

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Кочкина Екатерина Николаевна

**Вклад различных изоформ IP_3 -рецептора
в Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293**

1.5.2. — Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., проф. Колесников С.С.

Пущино – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Рецепторные и сигнальные системы клеток.....	10
1.1.1. Рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCR)	10
1.1.1.1. G-белки	13
1.1.2. Аденилатциклазная система.....	15
1.1.3. Фосфолипазная система.....	16
1.1.4. Гуанилатциклазная система	18
1.2. Внутриклеточная кальциевая сигнализация	19
1.2.1. Клеточные системы кальциевого гомеостаза	19
1.2.1.1. Кальциевые каналы плазмолеммы.....	19
1.2.1.2. Внутриклеточные кальциевые каналы	21
1.2.1.3. Кальциевые насосы и обменники	24
1.2.1.4. Внутриклеточный кальциевый буфер	26
1.2.2. IP ₃ -рецепторы млекопитающих	27
1.2.2.1. Структура	29
1.2.2.2. Свойства	30
1.2.2.3. Регуляция.....	33
1.2.3. CICR.....	36
1.3. Общие представления о редактировании генома с использованием методологии CRISPR/Cas9 и получении клеточных линий	36
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Клеточные линии.....	38
2.2. Подготовка клеток к эксперименту	38
2.3. Мониторинг внутриклеточных сигналов в режиме реального времени.....	38
2.3.1. Методика и экспериментальная установка для микрофотометрии.....	38
2.3.2. Методика и экспериментальная установка для фотолиза химических групп (IP ₃ -uncaging)	39
2.3.3. Химические зонды и генетически кодируемые сенсоры.....	39
2.3.4. Аппликация соединений и смена растворов в экспериментальной камере	40
2.4. Статистическая репрезентативность и обработка данных	41
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	42
3.1 Механизм трансдукции сигнала ACh в клетках WT-НЕК	44
3.2. Анализ Ca ²⁺ -сигнализации в клетках IP ₃ R1-, IP ₃ R2- и IP ₃ R3-НЕК.....	50
3.3. Оценка вклада IP ₃ R1, IP ₃ R2 и IP ₃ R3 в утечку депонированного Ca ²⁺ в клетках WT-, IP ₃ R1-, IP ₃ R2- и IP ₃ R3-НЕК	54

3.3.1. Риаинодиновые рецепторы вносят незначительный вклад в утечку Ca^{2+} из ЭР...	59
3.3.2. Оценка Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР	60
3.4. Клетки ТКО-НЕК	63
3.5. Клетки $\text{IP}_3\text{R1}$ -, $\text{IP}_3\text{R2}$ - и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК с сенсором Ca^{2+} R-CEPIA1er	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
ВЫВОДЫ	73
ПРИЛОЖЕНИЕ	74
1. Влияние редактирования генома на фосфоинозитидный каскад	74
2. Упрощённая модель гомеостаза Ca^{2+}	75
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	78
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	88
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	90
БЛАГОДАРНОСТИ	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В многоклеточных организмах функционирование тканей и органов во многом детерминировано аутокринными и паракринными регуляциями, которые включают секрецию сигнальных молекул (первичных медиаторов) и их распознавание рецепторами, функционирующими на поверхности клеток и 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, мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} играет центральную роль в трансдукции сигналов многих первичных медиаторов, которые действуют через GPCR-рецепторы, сопряжённые G-белками с фосфоинозитидным каскадом [1; 2]. В этом случае, ключевым внутриклеточным событием является стимул-зависимая активация фосфолипазы C (PLC) [1; 3], которая гидролизует липид-предшественник PIP_2 (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат), тем самым продуцируя два вторичных мессенджера IP_3 (инозитол-1,4,5-трифосфат) и DAG (диацилглицерин). Функция IP_3 в значительной степени сводится к стимуляции IP_3 -рецепторов (IP_3R) и высвобождению Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо [2]. IP_3 -рецепторы представляют собой IP_3 - и Ca^{2+} -активируемые Ca^{2+} -каналы, функционирующие преимущественно на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР). IP_3 -рецепторы функционируют в виде гомо- или гетеротетрамерных канальных комплексов субъединиц $\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ и $\text{IP}_3\text{R3}$. Субъединицы IP_3 -рецептора кодируются тремя генами, которые подвергаются альтернативному сплайсингу, что также увеличивает гетерогенность популяции IP_3 -рецепторов, функционирующих в клетках [4; 5].

Клетки большинства типов экспрессируют два или все три гена IP_3 -рецепторов [5]. 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 [2]. 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 [5]. Так, $\text{IP}_3\text{R1}$, как правило, является доминантной изоформой в нейронах [6; 7] и ооцитах [8]. $\text{IP}_3\text{R2}$ экспрессируется на высоком уровне в гепатоцитах [7], глиальных клетках,

кардиомиоцитах и секреторных клетках различных типов [8], а IP_3R3 — в быстро пролиферирующих, таких как эпителиальные клетки [7], а также в бета-клетках поджелудочной железы. 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 [5; 7; 9; 10].

Ряд исследований, проведённых в нашей лаборатории ранее [11–13] и выполненных в рамках данной работы, позволили установить, что многие клетки 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 [14]. 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 IP_3R1 , IP_3R2 или IP_3R3 изоформа, соответственно, а также линия ТКО-НЕК, в клетках которой полностью отсутствуют функционирующие IP_3 -рецепторы.

Наличие клеток, в которых функциональны IP_3 -рецепторы только одного типа, обеспечивает возможность ответить на вопрос, сформулированный выше, а также на ряд других, относящихся к анализу механизмов регуляции индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов и их роли в Ca^{2+} -гомеостазе и агонист-индуцируемой Ca^{2+} -сигнализации. В контексте сказанного, были сформулированы следующие цели и задачи данного исследования.

Цель работы: изучить Ca^{2+} -сигнализацию, индуцированную внешними стимулами в клетках линии НЕК-293 (WT-НЕК) и производных IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК, IP_3R3 -НЕК, ТКО-НЕК, и выявить её закономерности, ассоциированные со свойствами индивидуальных изоформ IP_3 -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 Ca^{2+} и выброса депонированного Ca^{2+} , как основных источников внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов.
2. Провести сравнительный анализ Ca^{2+} -сигнализации в клетках моноклональных линий IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК и IP_3R3 -НЕК и оценить относительный вклад каждой из изоформ IP_3 -рецептора в генерацию индуцированных Ca^{2+} -сигналов.
3. Оценить вклад индивидуальных изоформ IP_3 -рецептора в утечку Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР) с использованием тапсигаргинового теста.
4. Разработать методологию для оценки уровня Ca^{2+} в ЭР.

Научная новизна работы

Благодаря использованию новых моноклональных клеточных линий с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецептора (IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК, IP_3R3 -НЕК), экспрессирующих генетически-кодируемый Ca^{2+} -сенсор R-CERIA1er с ретикулярной локализацией, а также клеток ТКО-НЕК, лишённых функциональных IP_3 -рецепторов, выявлены новые аспекты функционирования индивидуальных изоформ IP_3 -рецептора, в частности, оценен их вклад в Ca^{2+} -гомеостаз и в трансдукцию агонистов (ACh) по фосфоинозитидному пути.

Впервые показано, что клетки линий с единственной изоформой, как и клетки дикого типа, генерируют полноценные Ca^{2+} -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-CEPIA1er 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 НЕК-293 дикого типа (WT-НЕК), клетки полученных на её основе моноклональных линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и ТКО-НЕК, а также клетки данных линий, экспрессирующие рекомбинантный генетически-кодируемый Ca²⁺-сенсор R-CEPIA1ег.

Мониторинг цитозольного Ca²⁺ осуществляли с помощью метода микрофотометрии с использованием флуоресцентного Ca²⁺-зонда Fluo-8 АМ. 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 Пушинская 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 статистической достоверностью. 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 7 тезисов конференций.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Рецепторные и сигнальные системы клеток

Мониторинг внеклеточного пространства является ключевой задачей для выживания клеток, межклеточных коммуникаций, паракринных и аутокринных регуляций, метаболизма, подвижности и ряда других функций. Для восприятия внешних сигналов – первичных мессенджеров, имеющих в основном химическую природу, клетки используют разнообразные и многочисленные рецепторы, функционирующие преимущественно на плазмолемме. У млекопитающих идентифицированы следующие функциональные классы: ионотропные рецепторы; гептаспиральные рецепторы, сопряжённые с G-белками (G-protein coupled receptors, GPCR); рецепторы с тирозинкиназной активностью; рецепторные тирозинкиназы; рецепторные тирозинфосфатазы; рецепторные серин-треонин киназы; рецепторные гуанилатциклазы. Из них наиболее многочисленную группу ($\sim 10^3$ генов) составляют GPCR-рецепторы, которые вовлечены в регуляцию почти всех клеточных функций. Ниже при тезисном обсуждении сигнальных систем клеток мы ограничимся рецепторами именно этого класса, поскольку в нашей работе исследовались сигнальные процессы, в которых участвуют GPCR-рецепторы.

1.1.1. Рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCR)

GPCR-рецепторы являются белками, включающими в себя семь трансмембранных доменов, формируемые альфа-спиралями. N-концы данных рецепторов расположены во внеклеточном пространстве, в то время как C-концы находятся в цитозоле и принимают участие в связывании сигнальных и регуляторных белков, включая G-белки, киназы GPCR-рецепторов (RGK) и аррестины. GPCR-рецепторы передают многочисленные внеклеточные сигналы, запуская внутриклеточную передачу сигналов посредством взаимодействия с G-белками и аррестинами. GPCR-рецепторы делятся на несколько классов в зависимости от их аминокислотных последовательностей – А, В, С и F [15]. Класс А (родопсин-подобные) состоит из 719 рецепторов, которые разделяются на несколько подсемейств: аминергические, пептидные, белковые, липидные, мелатониновые, нуклеотидные, стероидные, сенсорные. Класс В делится на два подсемейства: В1 (секретиновые) и В2 (адгезивные), содержащие 15 и 33 члена соответственно. Класс С (глутаматоподобные) содержит 22 рецептора, включая CaSR, ГАМК, вкусовые рецепторы, которые делятся на 5 подсемейств. Класс F содержит 11 рецепторов. При связывании лиганда с GPCR-рецептором конформация белка меняется,

что приводит к распространению сигнала несколькими путями – через G-белок, аррестины и, возможно, посредством димеризации [16].

Остаётся спорным вопрос о механизме связывания GPCR-рецептора и G-белка [16], так как существуют две противоположные модели данного процесса. В модели «случайного сопряжения» эти взаимодействия происходят в результате свободной латеральной диффузии внутри плазматической мембраны, при которой G-белки взаимодействуют только с активированными GPCR-рецепторами. Альтернативная модель предполагает, что G-белки могут взаимодействовать с рецепторами до связывания агониста (то есть они «предварительно сопряжены») [17]. В любом случае, связанный с лигандом GPCR-рецептор активирует гетеротримерный G-белок, что приводит к замене в нуклеотидном центре $G\alpha$ -субъединицы GDP на GTP. Последнее инициирует диссоциацию гетеротримера на $G\alpha$ -субъединицу и $G\beta\gamma$ -комплекс [18], которые воздействуют на сопряжённые с ними эффекторные белки (подробнее ниже). Стоит отметить, что GPCR-рецепторы демонстрируют высокую конформационную подвижность. В частности, лиганд-связывающий карман претерпевает небольшие изменения в структуре, которые могут влиять на кинетику связывания лигандов и образовывать альтернативные сайты связывания аллостерических модуляторов [18; 19], поэтому GPCR-рецепторы должны рассматриваться как высокодинамичные системы, которые существуют во множестве функционально различных конформаций. Лиганды могут регулировать активность рецептора, влияя на его блуждания в конформационном пространстве, тем самым изменяя степень клеточного ответа или приводя к его смещению [18].

Несколько факторов детерминируют прекращение клеточного ответа, вызванного активацией GPCR-рецепторов. Ключевым является гидролиз GTP до GDP субъединицей $G\alpha$, обладающей внутренней GTPазной активностью, что инициирует диссоциацию $G\alpha$ и $G\beta\gamma$, завершая цикл активации G-белка. Белки, активирующие GTPазу (GAP), включая регуляторы сигнальных белков G-белка (RGS), могут взаимодействовать с активированными субъединицами $G\alpha$, увеличивая скорость гидролиза GTP более чем в 2000 раз. Таким образом, GAP-белки представляют собой важные модуляторы интенсивности и продолжительности внутриклеточной сигнализации при участии GPCR-рецепторов [18; 20].

Также активированные GPCR-рецепторы фосфорилируются GRK-киназами и затем связываются с аррестинами, что вызывает десенсибилизацию рецептора и опосредованную аррестином активацию нижестоящих эффекторных белков, таких как митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) или SRC-киназы [18]. В семействе генов

аррестинов есть четыре члена: аррестин 1 (антиген S), β -аррестин 1 (аррестин 2), β -аррестин 2 (аррестин 3) и аррестин 4 (X-аррестин, колбочковый аррестин, C-аррестин). Аррестины 1 и 4 – зрительные аррестины, которые высоко экспрессируются в палочках и колбочках сетчатки, соответственно. β -аррестины на 78% гомологичны по аминокислотному составу, экспрессируются повсеместно и способствуют передаче сигналов, индуцированных GPCR-рецепторами, но не зависящих от G-белка, путём стабилизации альтернативных активных конформаций GPCR-рецепторов и/или взаимодействий с дополнительными белками [21]. β -аррестины равномерно распределены в цитоплазме клеток, но при активации GPCR-рецептора лигандом быстро перемещаются к плазматической мембране и связываются с цитоплазматическими доменами GPCR-рецептор. Это приводит к изменению конформации β -аррестина или его посттрансляционным модификациям, включая фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование, нитрозилирование, что позволяет ему взаимодействовать с различными нижестоящими эффекторами, в том числе связываться непосредственно с сигнальными киназами (например, MAP-киназой, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK) [16] и с белками эндоцитарного аппарата [21]. β -аррестин может связываться как с нефосфорилированным, так и с фосфорилированным GPCR-рецептором с различными режимами связывания и функциональными результатами, что ещё больше расширяет спектр сигнализации GPCR, опосредованной аррестином [18].

Кроме того, связываясь с фосфорилированным GPCR-рецептором, β -аррестин ингибирует его взаимодействия с G-белком. Активный GPCR-рецептор фосфорилируется GRK-киназами [16; 20], а также киназами, регулируемые вторичными мессенджерами (PKA, PKC, CaMKII) [22]. Далее, GPCR/ β -аррестин комплекс ассоциирует с клатрином, что приводит к интернализации рецептора в эндосомы с дальнейшей деградацией или возвратом в плазматическую мембрану [16]. Такие рецепторы, как β_2 -адренорецепторы, мю-опиоиды, родопсины и аминергические GPCR, обладают слабым взаимодействием с β -аррестином, демонстрируют временную интернализацию и быстро возвращаются в плазматическую мембрану, тогда как рецепторы пептидных гормонов, демонстрируют более сильное и стабильное связывание с β -аррестином и подвергаются устойчивому эндоцитозу. Однако интернализованные GPCR (например, рецепторы тиреотропного гормона, паратиреоидного гормона и β_2 -адренорецепторы) могут продолжать посылать сигналы из эндосом, и этот процесс необходим для эффективной транскрипции генов в ядре [16]. Также GPCR могут инициировать сигнализацию из других внутриклеточных органелл, включая ЭР, ядро, митохондрии и лизосомы [16].

1.1.1.1. G-белки

Относительно небольшое количество типов G-белков передают сигналы от огромного количества GPCR, поэтому каждый член семейства G-белков должен иметь возможность взаимодействовать со многими различными рецепторами. Кроме того, многие рецепторы могут активировать несколько сигнальных путей при участии данного G-белка.

G-белки делятся на два подкласса: моно-субъединичные G-белки (например Ras) и гетеротримерные комплексы G-белков, состоящие из субъединиц α , β и γ [20]. У человека существует 21 субъединица $G\alpha$, кодируемая 16 генами, 6 субъединиц $G\beta$, кодируемых 5 генами, и 12 субъединиц $G\gamma$. Субъединицы $G\beta$ и $G\gamma$, прикрепленные к плазматической мембране с помощью липидов, представляют собой облигатные гетеродимеры и функционируют как единый комплекс $G\beta\gamma$ [20]. При этом $G\beta_1$ - β_4 с $G\gamma$ образуют комплекс, который может быть разделен только в денатурирующих условиях, а взаимодействие $G\beta_5$ с $G\gamma$ сравнительно слабое [23]. Субъединицы $G\alpha$ специфически взаимодействуют с такими эффекторами, как аденилатциклаза, cGMP-фосфодиэстераза, фосфолипаза C и RhoGEFs. Комплекс $G\beta\gamma$ может регулировать активность GRK-киназ, калиевых каналов внутреннего выпрямления, сопряженных с G-белком (GIRK), потенциал-зависимых кальциевых каналов, аденилатциклаз, фосфолипаз C, фосфоинозит-3-киназ и митоген-активируемыми протеинкиназ [18].

Как уже отмечалось выше, при связывании с GDP $G\alpha$ ассоциируется с димером $G\beta\gamma$, образуя неактивный гетеротример. Активация GPCR-рецептора способствует диссоциации GDP от $G\alpha$. Полученный комплекс рецептор и G-белка без нуклеотидов демонстрирует очень короткое время жизни из-за высокой концентрации GTP в клетках, что способствует быстрому связыванию GTP с нуклеотидным сайтом $G\alpha$ [18]. Стоит отметить, что G-белки могут активироваться не только посредством GPCR, но и с помощью особых регуляторов, содержащих мотив GBA ($G\alpha$ -Binding and Activating), активированных рецепторами других семейств [24].

Гетеротримеры обычно делятся на четыре основных класса на основе первичного сходства последовательностей субъединицы $G\alpha$: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ и $G\alpha_{12/13}$ [17; 18]. Субъединица $G\alpha$ имеет три различных структурных компонента: Ras-подобный GTPазный домен, α -спиральный домен и N-концевой спиральный домен. GTPаза и спиральные домены консервативны во всех субъединицах $G\alpha$ [20]. Хотя изначально считалось, что отдельные GPCR в первую очередь связываются только с одним типом G-белка, теперь

установлено, что в зависимости от стимуляции и внутриклеточного микроокружения, GPCR могут одновременно передавать сигналы при участии G-белков нескольких типов [16].

Белки класса $G\alpha_s$ связываются с аденилатциклазой, что приводит к повышению её каталитической активности и генерации cAMP. Хотя существует множество модуляторов девяти изоформ аденилатциклазы, все они активируются тремя изоформами $G\alpha_s$: два варианта сплайсинга ($G\alpha_{s/short}$ и $G\alpha_{s/long}$) и $G\alpha_{s/olf}$ [25].

Класс $G\alpha_{i/o}$ состоит из $G\alpha_o$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_z$ и $G\alpha_t$. Все три изоформы $G\alpha_i$ (1, 2 и 3) ингибируют аденилатциклазу, что приводит к снижению концентрации cAMP в клетках [25]. Поскольку уровни экспрессии $G\alpha_i$ и $G\alpha_o$ относительно высоки, их рецептор-зависимая активация приводит к высвобождению относительно больших количеств $\beta\gamma$ -комплексов. Структурное сходство между 3 изоформами $G\alpha_i$ предполагает, что они могут иметь частично перекрывающиеся функции. В отличие от других $G\alpha$, эффекты изоформы $G\alpha_o$, которая распространена в нервной системе, по-видимому, в первую очередь опосредуются её $\beta\gamma$ -комплексом. $G\alpha_o$ также слабо ингибирует аденилатциклазу [25]. Менее широко экспрессируемым представителем семейства $G\alpha_i/G\alpha_o$ является $G\alpha_z$, который специфически взаимодействует с различными другими белками, включая Rap1GAP и некоторые белки RGS [23].

Белки класса $G\alpha_{q/11}$ активируют β -изоформы фосфолипазы C. Субъединицы $G\alpha_q$ и $G\alpha_{11}$ экспрессируются практически повсеместно, в то время как $G\alpha_{14}$ и $G\alpha_{15/16}$ ($G\alpha_{15}$ — мышинный, $G\alpha_{16}$ — человеческий) демонстрируют довольно ограниченный паттерн экспрессии. GPCR, способные связываться с белками класса $G\alpha_{q/11}$, по-видимому, не различают $G\alpha_q$ и $G\alpha_{11}$ [23]. Мишенями $G\alpha_{q/11}$ также являются p63RhoGEF (инициирует активацию Rho путём преобразования Rho-GDP в Rho-GTP) и PKC ζ (активирует киназу ERK5) [25].

$G\alpha_{12}$ и $G\alpha_{13}$, которые часто активируются рецепторами, сопряжёнными с $G\alpha_{q/11}$, составляют класс $G\alpha_{12/13}$, экспрессируются повсеместно, могут индуцировать различные сигнальные пути, приводящие к активации фосфолипазы A_2 , Na^+/H^+ -обменника или C-Jun NH₂-терминальной киназы (JNK). Другой важной клеточной функцией $G_{12/13}$ является их способность регулировать образование структур на основе актомиозина и модулировать их сократимость путём увеличения активности малой GTPазы RhoA через p115RhoGEF [23; 25].

Комплекс $G\beta\gamma$ первоначально рассматривался как пассивный партнёр субъединицы $G\alpha$, однако он также может регулировать различные эффекторы. Например, $G\beta 1$ имеет схожую с $G\beta 4$ силу связывания с $\beta 1$ -адренергическим рецептором, однако при связывании с аденозиновым рецептором этот показатель в 20 раз ниже. Субъединица $G\gamma$ также играет роль во взаимодействии рецептора и G-белка. Так, мускариновый рецептор $M2$ не взаимодействует с гетеротримерами $G\alpha_o$, связанными с $G\beta 1\gamma 2$, тогда как комплекс $G\beta 1\gamma 5$ и $G\beta 1\gamma 7$ могут опосредовать сопряжение с этим рецептором [17]. Также $G\beta\gamma$ взаимодействует с GRK2 и калиевыми каналами внутреннего выпрямления (GIRK) [18].

1.1.2. Аденилатциклазная система

Аденилатциклазы (AC) катализируют превращение комплекса $Mg^{2+}\cdot ATP$ в cAMP, создавая циклическую фосфодиэфирную связь на основе α -фосфатной группы ATP и высвобождая пирогосфат. Так как высвобождение пирогосфата даёт энергию для реакции, то его диссоциация в конечном итоге ограничивает скорость производства cAMP [26]. Как вторичный медиатор, cAMP активирует несколько внутриклеточных мишеней, включая PKA, EPAC и ионные каналы, управляемые циклическими нуклеотидами.

Растворимая (sAC) и мембранная (tmAC) аденилатциклазы являются мономерными белками и катализируют продукцию цАМФ посредством димеризации своих двух каталитических доменов [27]. Мембранная AC (tmAC) имеет следующую структуру: за коротким цитоплазматическим аминоконцом следуют шесть трансмембранных участков (домен TM_1) и большой (примерно 40 кДа) цитоплазматический домен (C_1). Затем мотив повторяется: за вторым набором из шести трансмембранных участков (TM_2) следует второй цитоплазматический домен (C_2) [28]. Каталитические домены C_1 и C_2 образуют активный центр.

Существует девять изоформ tmAC млекопитающих, их специфическая регуляция может опосредоваться разнообразными внутриклеточными компонентами, включая белки $G\beta\gamma$, кальций-кальмодулин, протеинкиназы и оксид азота. Любой конкретный внутриклеточный регулятор может по-разному влиять на активность AC в зависимости от изоформы. Все они ингибируются высокими (100–1000 мкМ) концентрациями Ca^{2+} в результате конкуренции за Mg^{2+} , необходимый для катализа, но AC5 и AC6 ингибируются также и низкими микромолярными концентрациями Ca^{2+} [28; 29]. При этом AC1 и AC8 (и AC3 в меньшей степени) стимулируется наномолярными концентрациями Ca^{2+} /кальмодулина, а AC2, AC4, AC5 и AC6 нечувствительны к кальмодулину.

Gβγ также оказывает различные эффекты: стимулирует AC2 и AC4, но ингибирует AC1, AC5 и AC6 [29]. Протеинкиназа C стимулирует большинство изоформ, но ингибирует AC6. Связывание $G\alpha_s$ с сайтом, образованным двумя трансмембранными доменами TM₁ и N-концевым доменом C₂, а также форсколина с гидрофобным карманом в активном центре приводит к изменению конформации AC и увеличению продукции cAMP [26]. При этом $G\alpha_i$, наоборот, ингибирует AC и снижает генерацию cAMP.

cAMP не способен к свободной диффузии в клетке, но благодаря его распределению в компартментах разные GPCR, используя один и тот же вторичный мессенджер, могут запускать различные клеточные ответы. Локализация cAMP в сигнальных компартментах дополнительно регулирует активность изоформ AC, которые, вероятно, служат якорями для этих микродоменов, так как их расположение стабильно в разных типах клеток и при различных условиях активации [29].

Растворимая аденилатциклаза (sAC). Структура каталитической единицы sAC аналогична tmAC, но sAC не содержит два гидрофобных домена, состоящие из трансмембранных спиралей, что позволяет локализоваться независимо от мембран. При открытии фермент был назван «растворимой аденилатциклазой», поскольку он был обнаружен в цитозольном компартменте препаратов семенников крысы [27]. Позже было показано, что большая часть sAC не распределена в цитоплазме, а локализуется в конкретных органеллах, таких как ядро, митохондрии, центриоли или реснички. Активность sAC стимулируется HCO_3^- , Ca^{2+} и чувствительна к физиологически значимым колебаниям АТР. sAC млекопитающих, в отличие от tmAC, стимулируется Ca^{2+} независимо от кальмодулина путём снижения K_m для Mg^{2+} .АТР В свою очередь, форсколин, активирующий tmAC, не связывается с sAC. sAC действует как физиологический сенсор углекислого газа и бикарбоната, а следовательно, косвенно и pH.

1.1.3. Фосфолипазная система

Фосфолипазы катализируют гидролиз фосфолипидов, и в зависимости от локализации гидролизуемой ковалентной связи их разделяют на три основных класса: PLA (включает A1 и A2), PLC и PLD. Так, PLA1 и PLA2 воздействуют на положения sn-1 и sn-2 глицериновых фрагментов фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот и 2-ациллизифосфолипида или 1-ациллизифосфолипида, соответственно [30]. PLD гидролизует фосфодиэфирную связь между глицерофосфатом и боковой группой с образованием свободного основания (холина) и фосфатидной кислоты [30].

Каталитический домен PLC наиболее консервативен и предпочтительно гидролизует PIP_2 по сравнению с PIP и PI [31]. PLC катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP_2) с образованием двух классических вторичных мессенджеров инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3) и диацилглицерола (DAG). IP_3 , высвобождаемый из мембраны, диффундирует в цитозоль, где он взаимодействует с IP_3 -рецепторами для высвобождения Ca^{2+} из ЭР. Функция мобилизации Ca^{2+} IP_3 прекращается через его метаболизм либо IP_3 3-киназой, либо IP_5 -фосфатазой [2]. Полученные инозитолбисфосфат и инозитолтетрафосфат перерабатываются обратно в свободный инозитол. DAG перерабатывается обратно в предшественник CDP-DAG, который затем соединяется с инозитолом и преобразуется в фосфатидилинозитол (PI), который возвращается в плазматическую мембрану для фосфорилирования в предшественник PIP_2 . Ключевым компонентом этого метаболического пути является инозитолмонофосфатаза, которая гидролизует IP_1 до свободного инозитола. Её активность подавляется ионами лития (Li^+), что приводит к снижению генерации IP_3 [2].

На сегодняшний день идентифицировано 13 вариантов PLC млекопитающих, которые разделены на шесть подтипов: PLC β (1–4), γ (1, 2), δ (1, 3, 4), ϵ , ζ и η [32].

PLC β 1 и PLC β 3 экспрессируются повсеместно, тогда как PLC β 2 и PLC β 4 обнаруживаются преимущественно в гематопоетических и нейрональных тканях, соответственно. Изоформы PLC β активируются $\text{G}\alpha_q$, PLC β 2 и PLC β 3 также могут активироваться субъединицами $\beta\gamma$ семейства G-белков $\text{G}\alpha_{i/o}$ и малыми GTPазами [31]. Каталитическая активность полностью зависит от Ca^{2+} .

Изоформы PLC γ активируются преимущественно рецепторными тирозинкиназами (RTK) [2; 32]. PLC γ 1 экспрессируется повсеместно и действует ниже рецепторов тирозинкиназного фактора роста, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), PDGF и EGF, тогда как PLC γ 2 преимущественно экспрессируется в линиях гемопоэтических. И PLC γ 1, и PLC γ 2 могут активироваться рецепторами адгезии, такими как интегрины. Передача сигналов PLC γ 1 осуществляется как за счёт прямых взаимодействий с другими сигнальными молекулами через SH-домены, атаки и посредством её липазной активности [31].

Представители семейства PLC δ активируются при уровнях кальция, обычно характерных для цитозоля (от 10^{-7} М до 10^{-5} М), что делает их одной из наиболее чувствительных к кальцию изоформ PLC [31]. PLC δ 1 может активироваться при участии $\text{G}\alpha_{i/o}$ и G_q .

PLC ϵ может активироваться как GPCR, так и RTK, а также GTPазами Rho и Ras [32]. Изоформы PLC η 1 и PLC η 2 локализованы в мозге и нейронах и чрезвычайно чувствительны к изменениям уровня кальция в пределах физиологического диапазона [31]. PLC ζ – наименьшая PLC млекопитающих, экспрессируется в сперматозоидах, запуская CICR при слиянии с яйцеклеткой, таким образом, способствуя её активации [31].

1.1.4. Гуанилатциклазная система

cGMP синтезируется из GTP двумя типами гуанилатциклаз – растворимой, или цитозольной (sGC), и мембранной, или рецепторной (pGK) [33], а под действием фосфодиэстераз распадается до менее активной формы 5'-GMP. cGMP активирует протеинкиназу G, которая фосфорилирует различные белки.

Идентифицировано 7 изоформ мембранной GC (GC-A – GC-G), которые обладают высококонсервативной структурой. Они являются гомодимерами и включают в себя внеклеточный связывающий домен на N-конце (лиганд-связывающий в случае GC-A, -B, -C), одиночный трансмембранный, цитоплазматический примембранный и регуляторный KHD (имеет значительную гомологию с протеинкиназами) домены, шарнирную область, С-концевой каталитический домен, а также С-концевой хвост у некоторых изоформ (GC-C в клетках слизистой кишечника и GC-D, -E, -F в органах чувств) [34]. В неактивном состоянии pGC представляет собой гомоолигомер, каждый мономер которого содержит фосфорилированные остатки серина или треонина в составе KHD, что увеличивает сродство внеклеточных доменов. Связывание натрийуретического пептида с одним из сайтов вызывает конформационные изменения способствует связыванию АТР с KHD-доменом. Это, в свою очередь, приводит к активации каталитического домена и генерации cGMP.

Растворимая гуанилатциклаза (sGC) представляет собой $\alpha\beta$ -гетеродимер массой 72 кДа [33], мономеры которого состоят из N-концевого регуляторного домена и гем-связывающего домена, обладающего высоким сродством к оксиду азота (NO) и монооксиду углерода (CO). Кроме того, sGC обладают доменами димеризации и карбоксильными концевыми каталитическими доменами, которые образуют один активный и один неактивный каталитический сайт. Всего идентифицировано четыре полипептида sGC: α_1 , α_2 , β_1 и β_2 [33].

1.2. Внутриклеточная кальциевая сигнализация

1.2.1. Клеточные системы кальциевого гомеостаза

Концентрация внутриклеточного Ca^{2+} в покое поддерживается на уровне 50–200 нМ, тогда как внеклеточная среда содержит порядка 2 мМ Ca^{2+} , что на четыре порядка выше, чем в цитозоле. При стимуляции клеток концентрация цитоплазматического Ca^{2+} может кратковременно возрастать до нескольких микромолей за счёт выброса депонированного Ca^{2+} и входа внеклеточного Ca^{2+} . Ионы Ca^{2+} участвуют практически во всех процессах жизненного цикла клеток, являясь при этом цитотоксичными для клеток всех живых организмов (прокариот и эукариот). Поэтому поддержание Ca^{2+} -гомеостаза в покое и обеспечение контролируемой Ca^{2+} -сигнализация при возбуждении клеток представляют собой важную физиологическую задачу, для решения которой привлекаются достаточно сложные механизмы, контролирующие вход Ca^{2+} из внеклеточного пространства, высвобождение Ca^{2+} из внутренних депо и его пополнение, откачку Ca^{2+} во внеклеточное пространство и буферизация Ca^{2+} в цитозоле [2; 35].

1.2.1.1. Кальциевые каналы плазмолеммы

Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны подразделяются на три группы, основываясь на механизмах, контролирующих их активность: потенциал-управляемые (VGCC), рецептор-управляемые (ROCC) и депо-управляемые (SOCC) каналы.

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (VGCC - voltage-gated Ca^{2+} channels) являются ключевыми преобразователями изменений мембранного потенциала во внутриклеточные сигнальные процессы Ca^{2+} . Активация этих каналов происходит при деполяризации мембраны, тогда как при потенциале покоя (–60... –70 мВ) они остаются неактивными. Ca^{2+} -каналы представляют собой комплексы субъединиц $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ и δ . С генетической точки зрения Ca^{2+} -каналы, функциональная классификация которых выделяет L-, T-, N-, P/Q-, R- типы, подразделяются на три подсемейства [36]:

1) Группа Ca_v1 включает 4 гена, кодирующих порообразующие субъединицы $\alpha 1$ каналов L-типа - $\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.4$. Эти Ca^{2+} -каналы вовлечены в процессы сокращения, секреции, регуляции экспрессии генов, интеграции синаптического входа в нейроны и синаптическую передачу в ленточных синапсах в специализированных сенсорных клетках;

2) Группа Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$ - $\text{Ca}_v2.3$) кодирует $\alpha 1$ субъединицы каналов N-, P/Q-, R-типов. Эти каналы преимущественно участвуют в функционировании быстрых синапсов в нейрональных клетках.

3) Группа Ca_v3 ($\text{Ca}_v3.1$ - $\text{Ca}_v3.3$) кодирует $\alpha 1$ субъединицы каналов T-типа, которые необходимы для функционирования ритмически активных клеток, таких как сердечные миоциты и нейроны таламуса.

Активность VGCC может регулироваться кальмодулином, CaMKII, G-белками, протеинкиназами A и C, вторичными посредниками (cAMP, cGMP) [36].

Рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы

Рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы (ROCC, receptor-operated calcium channels) делятся на два типа.

1) Истинные рецептор-управляемые каналы – трансмембранные каналы, которые открываются при связывании с лигандом. Включают в себя каналы следующих рецепторов: никотиновый холинергический рецептор (неселективный катионный канал), пуринергические рецепторы P2X, рецепторы серотонина 5-HT₃ (проницаем для Na^+ , K^+ и Ca^{2+}), γ -аминомасляной кислоты A (ГАМК_A), глицина и ионотропного глутамата (NMDA-рецептор, проницаем для Na^+ , K^+ и Ca^{2+}) [37].

2) Каналы, активируемые вторичными посредниками (SMOC, second messenger-operated channels). Данные каналы могут активироваться cGMP, cAMP, NO, небольшими GTP-связывающими белками, такими как Ras, Rab и Rho [38], а также IP_3 , IP_4 , Ca^{2+} [39], DAG [40]. Одними из наиболее распространённых каналов данного типа являются TRPC2, 3, 6, 7, которые активируются DAG, продуцируемым PLC из PIP_2 при связывании различных лигандов с рецепторами [40], а также TRPC4, 5, которые активируются $\text{G}_{i/o}$ и PLC [41].

Депо-управляемые Ca^{2+} -каналы

Депо-управляемые каналы SOCC (store-operated calcium channels) так же, как и ROCC, необходимы для поступления экстраклеточного Ca^{2+} в клетку. Среди ионных каналов данного типа лучше всего охарактеризован Ca^{2+} -канал, активируемый высвобождением кальция (CRAC) [42], который состоит из белков STIM и Orai. У млекопитающих есть два белка STIM (STIM1, 2), и три белка Orai (Orai1, 2 и 3), но большая часть экспериментальной работы была проведена с STIM1 и Orai1 [43]. Сверхэкспрессия любого из этих белков по отдельности оказывает незначительное

влияние на депо-управляемый вход, однако их совместная сверхэкспрессия приводит к существенному депо-управляемому входу [44], а нокдаун STIM2 приводит к значительному снижению базального уровня цитозольного Ca^{2+} [43]. Стоит отметить, что в клетках линии НЕК-293 подтверждена экспрессия Orai1, 2, 3 и STIM1, 2 [45].

Снижение концентрации Ca^{2+} в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭР) приводит к активации и олигомеризации белков STIM1 — сенсоров ретикулярного Ca^{2+} , чувствительных к снижению уровня ионов в ЭР [45]. В местах контакта мембран ЭР и плазматической мембраны (ЭР-ПМ) STIM1 связывается с Ca^{2+} -каналами плазматической мембраны Orai1 [46] или TRPC1/4/5 [41], стимулируя их открытие, в результате чего происходит депо-управляемый вход Ca^{2+} (SOCE). Этот процесс, как правило, сопровождается активацией IP_3 -рецепторов, локализованных рядом с участками контакта ЭР-ПМ, что позволяет им локально опустошать депо и тем самым активировать SOCE [47]. Следовательно, в ответ на множество внеклеточных стимулов, вызывающих генерацию IP_3 , IP_3 -рецепторы позволяют быстро перераспределить Ca^{2+} из ЭР в цитозоль или другие органеллы, а также контролируют поступление Ca^{2+} в клетку через SOCE.

1.2.1.2. Внутриклеточные кальциевые каналы

Внутриклеточные кальциевые каналы находятся в мембранах кальциевых депо, преимущественно в мембранах эндоплазматического ретикулума, митохондрий и лизосом.

Двупоровые каналы лизосом (two-pore channels, TPC) представляют собой проницаемые для катионов каналы, расположенные на эндолизосомальных мембранах и участвующие во внутриклеточной передаче сигналов Ca^{2+} .

Являясь агонистом TPC, NAADP стимулирует эти каналы и инициирует высвобождение Ca^{2+} из кислых эндолизосомальных органелл. NAADP является наиболее мощным Ca^{2+} -мобилизующим мессенджером, проявляющим своё действие даже при низких наномолярных концентрациях. Вызванная NAADP передача сигналов Ca^{2+} может дополнительно запускать высвобождение Ca^{2+} из ЭР/СР посредством CICR. Также TPC стимулируются эндолизосомным PIP_2 [48].

Было обнаружено, что TPC2 регулируется Mg^{2+} , при этом цитозольный Mg^{2+} ингибирует направленный наружу ток TPC2, тогда как лизосомальный Mg^{2+} ингибирует поток, направленный как наружу, так и внутрь. Две структурно и ферментативно сходные протеинкиназы, p38 и JNK, также регулируют TPC2. Интересно, что изменения

концентрации PIP_2 и Mg^{2+} , а также активности JNK и p38 оказывают сходное влияние на NAADP-опосредованное высвобождение Ca^{2+} и открытие TPC2.

Также сообщается, что TRPC и IP_3 -рецепторы взаимодействуют друг с другом, координируют и усиливают Ca^{2+} -сигналы между лизосомами и ЭР [49].

Ca^{2+} -каналы митохондрий

Избыточный уровень митохондриального Ca^{2+} приводит к Ca^{2+} -индуцированной повышенной проницаемости наружной мембраны митохондрий и апоптозу. При этом митохондриям необходим Ca^{2+} для поддержания митохондриальной энергетической функции [50]. Транспорт Ca^{2+} между митохондриями и ЭР осуществляется через участки тесного контакта, называемые митохондриально-ассоциированными мембранами (МАМ). Они экспрессируют комплекс различных белков (например, GRP75, митофузины 1 и 2, FUN14), связывающих IP_3 -рецепторы (Ca^{2+} -каналы ЭР) и VDAC1 (потенциал-зависимые анионные каналы типа 1, являющиеся основными каналами транспорта ионов Ca^{2+} на внешней митохондриальной мембране), а также регулирующих активность транспорта Ca^{2+} [51]. Ca^{2+} высвобождается из ЭР в митохондрии через данные комплексы, а затем поступает в матрикс митохондрии через митохондриальный унипортер MCU [50]. При слишком большом расстоянии между мембранами митохондрий и ЭР эффективность транспорта Ca^{2+} невысока, но при его сокращении поглощение Ca^{2+} увеличивается, что может привести к чрезмерному накоплению Ca^{2+} в матриксе. Однако при дальнейшем уменьшении расстояния до 7 нм транспорт прекращается из-за недостаточного пространства для IP_3 -рецептора [51]. Эффективность транспорта в МАМ также регулируется множеством соединений, оказывающих влияние на IP_3 -рецепторы (Bcl-2, кальретикулин, цитохром C, ERp44 и др.), VDAC (PDK4) и белки комплекса (циклофилин D).

Ca^{2+} -каналы эндо/саркоплазматического депо (RyR и IP_3 -рецепторы)

В мембранах ЭР и СР находятся Ca^{2+} -каналы двух типов – рианодиновые рецепторы (RyR) и инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы (IP_3 -рецепторы). В данном разделе мы остановимся на кратком описании этих рецепторов, тогда как об IP_3 -рецепторах, являющихся объектом интереса нашей работы, более подробно поговорим

ниже (п. 1.2.2). В то время как рианодиновые рецепторы экспрессируются в ограниченном количестве тканей, особенно в скелетных и сердечных мышцах, а также в мозге [52], IP₃-рецепторы экспрессируются повсеместно [2; 5; 9; 47]. Важно отметить, что в клетках линии НЕК-293, которые мы использовали в работе, функционирующие рианодиновые рецепторы не были обнаружены [53; 54]. Так, связывание антител против RyR3 происходило только в клетках НЕК-293, в которых временно трансфицировали RyR3 [53].

Рианодиновые и IP₃-рецепторы эволюционно родственны: оба рецептора активируются цитозольным Ca²⁺, имеют схожее строение, грибовидную форму – «шляпка» находится в цитозоле (цитозольная доля – 90% у IP₃-рецептора [47] и 80% у рианодинового [55], «ножка» представляет собой трансмембранный участок, но у рианодинового рецептора есть дополнительные модули в цитозольной области [6]. Многие последовательности рецепторов очень консервативны, например, критическая воротная петля в IP₃-рецепторе и петля HS в рианодиновом практически идентичны, что указывает на важность этой структурной особенности для работы обоих каналов [55].

Рецепторы имеют гигантский размер (рианодиновый – около 2,2 МДа, IP₃-рецептор – 1,2 МДа), а особенно их цитозольная часть, которая позволяет регулировать их работу десятками белков и небольших молекул, влияющих на открытие и закрытие каналов. Каждый из этих рецепторов состоит из 4 субъединиц (RyR1–3 и IP₃R1–3), но рианодиновые рецепторы могут быть только гомотетрамерными, тогда как IP₃-рецепторы также бывают гетеротетрамерными, что увеличивает количество возможных вариантов IP₃-рецепторов с различными свойствами.

Оба типа рецепторов регулируются цитозольным Ca²⁺, который самостоятельно или в сочетании с другими лигандами открывает каналы, а при более высоких концентрациях ингибирует их. Для RyR1, который является преобладающим в скелетных мышцах, триггером для открытия канала также служит деполяризация мембраны, которая приводит к конформационным изменениям Cav1.1, потенциал-зависимого кальциевого канала L-типа. Это приводит к открытию RyR1 посредством механических взаимодействий без необходимости первоначального притока Ca²⁺ из цитозоля [6].

Хотя IP₃-рецепторы и рианодиновые рецепторы называются каналами высвобождения Ca²⁺, они обладают относительно плохой избирательностью по отношению к Ca²⁺ и другим катионам [56]. К примеру, IP₃-рецепторы проницаемы для различных одновалентных (K⁺, Na⁺ и Cs⁺) и двухвалентных катионов (Ca²⁺, Ba²⁺ и Mg²⁺) [57]. При этом, IP₃-рецептор пропускает через себя ~10⁵ ионов Ca²⁺ в су, что почти в 50 раз

больше, чем в случае Ca^{2+} -каналов L-типа [56]. Высокая проводимость и плохая селективность IP_3 -рецепторов аналогичны RyR .

Кроме IP_3 -рецепторов и рианодиновых рецепторов, утечка Ca^{2+} из ЭР может опосредоваться другими белками, включая укороченную версию SERCA SERCA1T, белки семейства TMBIM (Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif-containing), антиапоптотический белок Bcl-2 [58; 59], белки TMO1, которые способны олигомеризоваться при высоком уровне люминального Ca^{2+} , образуя временные каналы утечки Ca^{2+} [60], а также паннексины, транслоконы, CALHM1, MG23, BL-1 и другие [52].

1.2.1.3. Кальциевые насосы и обменники

Гомеостаз цитозольного Ca^{2+} поддерживается несколькими мембранными транспортными системами, различающимися по ёмкости и сродству к Ca^{2+} [61; 62]: плазматический мембранный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCX) и митохондриальный унипортер кальция (оба белка высокой ёмкости и с низким сродством к Ca^{2+}), митохондриальный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обменник NCLX, а также кальциевые насосы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) и плазматической мембраны (PMCA), обладающие высоким сродством к Ca^{2+} и отвечающими за тонкую настройку уровня Ca^{2+} в нестимулированной клетке.

При высокой концентрации в цитозоле, Ca^{2+} пассивно транспортируется внутрь митохондрии через канал MCU (митохондриальный кальциевый унипортер). Этот процесс управляется отрицательным потенциалом внутренней митохондриальной мембраны, и для активации MCU необходимо связывание Ca^{2+} с его цитозольным доменом. При этом очень высокий цитозольный Ca^{2+} , видимо, ингибирует MCU, предотвращая чрезмерное накопление Ca^{2+} в матриксе [62]. Вместе с этим, из-за низкого сродства к Ca^{2+} MCU способен пропускать его через себя только при достижении микромолярных концентраций ($\sim 10\text{--}20$ мкМ). Канал образован тремя субъединицами: MCU, MCUb и EMRE (не обнаружена у позвоночных). Считается, что MCUb функционирует как ингибирующая субъединица.

Во внутренней митохондриальной мембране также расположен $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обменник NCLX, необходимый для оттока избыточного Ca^{2+} из митохондриального матрикса. Предполагается, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -обменник зависит от электрохимического градиента, создаваемого высоким содержанием Na^+ в цитозоле, и в результате изменения потенциала внутренней мембраны митохондрий происходит обмен трёх (или двух) ионов

Na^+ на один ион Ca^{2+} из митохондриального матрикса. NCLX также участвует в транспорте Li^+ .

Два мембранных насоса PMCA и SERCA различаются локализацией и по распространённости, но оба имеют высокое сродство к Ca^{2+} и, соответственно, реагируют на малые изменения концентрации Ca^{2+} . Так, **PMCA** (plasma membrane Ca^{2+} ATPase) обеспечивает поддержание концентрации цитозольного Ca^{2+} в покое, противодействует её повышению, вызванного клеточными стимулами, а также регулирует активность специфических ферментативных комплексов путём локального контроля Ca^{2+} в микродоменах. У PMCA выделяют 4 изоформы, из которых наиболее распространена PMCA1, её нокаут приводит к эмбриональной смертности у мышей [63]. При этом наличие множества сплайс-форм позволяют насосу контролировать распространение сигналов Ca^{2+} в микродоменах, ограничивая их в пространстве и времени. Также сообщается, что нарушения в работе насоса обычно не приводят к глобальному повреждению клеток и последующей их гибели, но вызывают патологические состояния, поражающие только определенные популяции клеток или ткани, несмотря на наличие мутировавших изоформ во всём организме [64].

SERCA (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) представляет собой значительно более распространённый интегральный мембранный белок СР/ЭР, кодируемый тремя различными генами: *ATP2A1*, *ATP2A2* и *ATP2A3* [65]. Все три матричные РНК, продуцируемые этими генами, подвергаются альтернативному сплайсингу, что приводит к образованию большого разнообразия вариантов насосов SERCA. SERCA1a является самым быстрым насосом и экспрессируется в быстро сокращающихся скелетных мышцах, SERCA2a экспрессируется в основном в клетках сердца, а SERCA2b называется насосом «домашнего хозяйства», поскольку он присутствует в гладкомышечных клетках и немышечных клетках, имеющих ЭР. Каталитический цикл SERCA начинается со связывания двух ионов Ca^{2+} из цитоплазмы, что способствует связыванию АТФ и последующему фосфорилированию белка по высококонсервативному остатку аспарагиновой кислоты. Это приводит к конформационным изменениям, блокирующим доступ цитозольного Ca^{2+} и одновременно открывающим доступ к просвету ЭР с пониженным сродством к Ca^{2+} . В результате Ca^{2+} перекачивается в просвет СР/ЭР в обмен на протоны. Это финальное событие вызывает дефосфорилирование фермента и позволяет инициировать следующий каталитический цикл.

Существует насос, закачивающий Ca^{2+} в цистерны аппарата Гольджи – *SPCA* (secretory pathway Ca^{2+} -ATPase), который отличается от SERCA наличием только одного сайта связывания Ca^{2+} , также обладающего сродством к Mn^{2+} [61].

1.2.1.4. Внутриклеточный кальциевый буфер

Удаление Ca^{2+} из цитозоля происходит посредством закачки Ca^{2+} в депо и оттока во внеклеточное пространство, тогда как диффузия Ca^{2+} в основном определяется буферизацией Ca^{2+} , что представляет собой быстрое связывание Ca^{2+} , поступающего в цитозоль, с различными участками буферов. Буферизация Ca^{2+} является важным процессом передачи сигналов Ca^{2+} , поскольку лишь 1–5% Ca^{2+} [35; 47], поступающего в клетку, остаётся в свободной, физиологически активной форме. Таким образом, цитозольный ион Ca^{2+} большую часть времени связан с буфером, с которым он перемещается медленно, и вероятно, будет свободно диффундировать только короткий промежуток времени, прежде чем снова будет захвачен другим буфером. Благодаря данной особенности Ca^{2+} способен задерживаться в открытых каналах и служит локальным мессенджером.

Буферизация Ca^{2+} в цитоплазме в основном зависит от мобильных и фиксированных буферов, контролирующих диффузию свободных ионов Ca^{2+} внутри цитозоля как во времени, так и в пространстве. Неподвижные буферы представлены высокомолекулярными соединениями или сайтами связывания Ca^{2+} , закреплёнными на внутриклеточных структурах, тогда как мобильные буферы являются небольшими (20–25 кДа) молекулами, находящимися в цитозоле или просвете депо. Константы скорости связывания и диссоциации Ca^{2+} охватывают широкий диапазон от медленных буферов (скорость связывания около 1 c^{-1}) до быстрых буферов (скорость связывания около 100 c^{-1}) [35]. Поскольку большинство буферов Ca^{2+} характеризуются микромолярными значениями констант диссоциации, в нестимулированной клетке они, как правило, остаются несвязанными с Ca^{2+} [66]. При резком локальном повышении Ca^{2+} (в следствие его входа в цитозоль из внеклеточного пространства или депо по электрохимическому градиенту) буферы связывают более 95% Ca^{2+} на расстоянии 10–50 нм от точки входа Ca^{2+} [35].

Примерами буферов Ca^{2+} являются парвальбумины (изоформы α и β), кальбиндин-D9k, кальбиндин-D28k, кальретинин, тропонин С, кальсеквестрин и другие. Кальбиндин-D28k и кальретинин являются быстрыми буферами, тогда как парвальбумин имеет гораздо более медленную кинетику связывания и высокое сродство к Ca^{2+} [67]. Некоторые

белки (например, кальмодулин) играют роль скорее сенсоров Ca^{2+} , чем буферов Ca^{2+} из-за его низкой концентрации в клетке. Ионы Ca^{2+} связываются с сенсорами Ca^{2+} , вызывая конформационные изменения, которые позволяют им взаимодействовать со специфическими мишенями Ca^{2+} -регулируемым образом [35].

В ЭР основными внутрипросветными буферами Ca^{2+} являются кальсеквестрин и кальретикулин (которые также могут действовать в цитозоле), а также протеиндисульфидизомераза (PDI), регулируемый глюкозой белок 94 (Grp94), иммуноглобулин связывающий белок (BiP) и ERp57 [35]. Насосы SERCA отвечают за закачку Ca^{2+} из цитозоля внутрь ЭР, где Ca^{2+} связывается с внутрипросветными Ca^{2+} -связывающими белками с высокой ёмкостью (10 моль Ca^{2+} на 1 моль белка), но с низким сродством ($K_d \approx 1$ мМ), что позволяет ЭР хранить огромные количества Ca^{2+} , при этом быстро обмениваясь с цитозолем.

В состоянии покоя или при небольших изменениях концентрации Ca^{2+} удаляется из цитозоля закачкой в ЭР и выходом во внеклеточное пространство, тогда как при изменениях в микромолярном диапазоне запускается закачка в митохондрии [35] через митохондриальный унипортер, который представляет собой селективный Ca^{2+} -канал с низким сродством ($K_d \sim 10\text{--}50$ мкМ) и высокой проводимостью.

1.2.2. IP_3 -рецепторы млекопитающих

IP_3 -рецепторы представляют собой тетрамерные IP_3 - и Ca^{2+} -зависимые Ca^{2+} -каналы [47], которые локализуются преимущественно в гладком эндоплазматическом ретикулуле (ЭР) и в меньшей степени – в гранулярном ЭР, аппарате Гольджи, ядре и плазматической мембране (ПМ). IP_3 -рецепторы могут располагаться в ПМ нейронов, лимфоцитов, тромбоцитов и гепатоцитов, а также на участках мембранных контактов между ЭР и другими органеллами (митохондрии, лизосомы) [9]. Ядерные IP_3 -рецепторы играют важную роль в транскрипции генов и экспрессируются в ядерных хранилищах кальция, опосредуя ядерную передачу сигналов и вызывая ядерную транслокацию протеинкиназы С [9; 47]. IP_3 -рецепторы участвуют в регуляции роста и миграции клеток НЕК-293.

Три изоформы IP_3 -рецептора ($\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$, $\text{IP}_3\text{R3}$) экспрессируются в тканях с разной интенсивностью и образуют гомо- и гетеротетрамерные комплексы. Например, $\text{IP}_3\text{R1}$ является наиболее распространённой изоформой [8] и высоко экспрессируется в нейронах [6; 7] и ооцитах [8]. $\text{IP}_3\text{R2}$ присутствует в гепатоцитах [7], глиальных клетках, кардиомиоцитах, различных типах секреторных клеток [8], а $\text{IP}_3\text{R3}$ — в быстро

пролиферирующих клетках, таких как эпителиальные клетки [7], а также совместно с IP_3R2 в секреторных клетках [6; 8]. В ткани поджелудочной железы более 80% всех IP_3 -рецепторов составляют IP_3R2 и IP_3R3 [10], при этом в бета-клетках в основном представлена изоформа IP_3R3 , а в альфа-клетках IP_3R1 [68]. Также известно, что различные онкогены и опухолевые супрессоры напрямую взаимодействуют с IP_3 -рецептором, регулируя тем самым его активность или стабильность [8].

Сигналы цитозольного Ca^{2+} , вызванные активностью SOCE или IP_3 -рецепторов, регулируют различные физиологические реакции, включая экзокринную секрецию, глюконеогенез, эмбриологическое развитие, транскрипцию, рост нервов и миграцию [47]. IP_3 -рецепторы контролируют окислительное фосфорилирование и апоптоз, доставляя Ca^{2+} к митохондриальному унипортеру. Одновременно транспорт Ca^{2+} в лизосомы модулирует их функциональную активность за счёт накопления ионов.

IP_3R1 участвует в оплодотворении, формировании дорзо-вентральной оси, синаптической пластичности, IP_3R2 в функции сердца, секреции пота, слюны, поджелудочного сока и слёзной жидкости, а IP_3R3 во вкусовом восприятии, росте волос, образовании остеокластов, развитии синусита [69].

Так как IP_3 -рецепторы участвуют в различных физиологических процессах, то отсутствие одной или нескольких изоформ, либо их неправильная работа приводит к многочисленным заболеваниям. В клетках, лишённых всех трёх изоформ IP_3 -рецептора (с тройным нокаутом, ТКО), значительно снижены скорости пролиферации и миграции [70], а также отсутствует передача Ca^{2+} -сигналов, опосредованная IP_3 , которая полностью восстанавливается при сверхэкспрессии любой из изоформ в клетках ТКО [71].

Нарушение регуляции IP_3 -рецепторов ассоциировано с нейродегенеративными (болезни Хантингтона, Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, атаксия), нейropsychиатрическими (аутизм) и онкологическими патологиями [47; 72]. Отсутствие IP_3R1 в клетках мышечной ткани вызывает атаксию, эпилепсию, нарушение передачи сигналов Ca^{2+} в клетках Пуркинье мозжечка, усиление долговременной потенциации гиппокампа и исчезновение длительной депрессии [73]. Мыши, лишённые IP_3R2 и/или IP_3R3 , как правило, имеют менее серьёзные нарушения, такие как дисфункция слюнных и поджелудочной желез. При этом показано, что при различных видах рака либо значительно повышен уровень экспрессии IP_3R3 , либо эта изоформа существует в мутировавшем виде [74].

Несмотря на важную роль IP_3 -рецепторов как в нормальной физиологии, так и при различных заболеваниях, ни один из известных их антагонистов (гепарин, кофеин и ксестоспонгин С) не отличается высокой специфичностью по отношению к изоформам [75].

1.2.2.1. Структура

IP_3 -рецепторы формируют тетрамеры [47], состоящие из субъединиц трёх типов (IP_3R1 , IP_3R2 , IP_3R3). Однако доля гетеротетрамерных комплексов (сочетающих разные изоформы) остаётся неопределённой [10]. Каждая субъединица состоит примерно из 2700 аминокислотных остатков, а молекулярная масса тетрамера $\sim 1,2$ МДа [76], что делает IP_3 -рецепторы, наряду с рианодиновыми (5000 остатков), одними из самых крупных известных ионных каналов [47].

Хотя размеры рецептора могут быть слишком велики для узких соединений между ЭР и ПМ, где происходит SOCE, его крупная структура позволяет ему связываться с дополнительными белками и эффективно направлять Ca^{2+} к соседним органеллам, таким как митохондрии или лизосомы.

IP_3 -рецептор имеет грибовидную форму, и на 90% погружен в цитозоль. Большая часть «ножки» встроена в мембрану ЭР, а «шляпка» диаметром ~ 25 нм уходит в цитозоль на ~ 13 нм [47]. Рецептор высоко-консервативен: гомология аминокислотных последовательностей между изоформами оценивается в пределах от 55% [9] до 75% [7].

Цитозольный домен состоит из нескольких участков: SD (N-концевой супрессорный домен, который снижает аффинность связывания IP_3); IBC (IP_3 -связывающее ядро, являющееся минимальной областью, необходимой для специфического связывания IP_3); большой регуляторный домен; трансмембранный домен (образует канал) и С-концевой домен [9; 77]. Интересно, что мутация в SD является критической для IP_3 -индуцированного высвобождения Ca^{2+} , но не для связывания IP_3 [9]. Рентген-структурный анализ показал, что SD не маскирует сам карман связывания в IBC, но предположительно, может стабилизировать конформацию IBC, что приводит к ингибированию связывания IP_3 . Необходимость связывания IP_3 со всеми четырьмя субъединицами для активации рецептора подтверждается экспериментами [10]. Так, IP_3R1 , содержащий 3 субъединицы дикого типа и 1 мутантную субъединицу (которая не связывает IP_3), оказывался полностью неактивным. Похожие эксперименты были проведены с IP_3R2 . Такое ограничение количества активных IP_3 -рецепторов защищает

клетку от высвобождения Ca^{2+} в случае, когда концентрация IP_3 в цитозоле увеличивается незначительно.

Для активации IP_3 -рецепторов необходимым условием является также связывание с Ca^{2+} . Предположительно, существует два Ca^{2+} -связывающих сайта, при этом стимулирующий может располагаться ближе к поре, чем ингибирующий сайт [47]. Так, цитоплазматический домен каждой субъединицы IP_3 -рецептора обладает по меньшей мере четырьмя различными сайтами связывания Ca^{2+} . Если сайт Ca-III S/JD Ca^{2+} идентифицирован как активирующий сайт, то остаётся неясным, какой из трёх других сайтов (Ca-I LBD, Ca-II LBD, JD) является ингибирующим [78], а также сколько из них должно быть занято Ca^{2+} для активации канала [47].

1.2.2.2. Свойства

IP_3 -рецепторы опосредуют высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, преимущественно из эндоплазматического ретикула (ЭР). Схожие коэффициенты диффузии IP_3 ($10 \text{ мкм}^2/\text{с}$) и Ca^{2+} ($13\text{--}65 \text{ мкм}^2/\text{с}$) позволяет обоим мессенджерам действовать локально [47]. Для всех трёх типов IP_3 -рецепторов связывание с IP_3 побуждает их к связыванию с Ca^{2+} , что запускает открытие канала и, затем, выход Ca^{2+} в цитозоль или другие органеллы, а также инициирует депо-управляемый вход Ca^{2+} (SOCE). При этом изоформы по степени сродства к IP_3 распределяются следующим образом: $\text{IP}_3\text{R2}$ ($K_d 1 \text{ нМ}$) $>$ $\text{IP}_3\text{R1}$ ($K_d 50 \text{ нМ}$) $>$ $\text{IP}_3\text{R3}$ ($K_d 163 \text{ нМ}$) [4; 8; 10; 56; 77]. Гетеротетрамерные IP_3 -рецепторы 2:2 обладают чувствительностью к IP_3 , промежуточной между их гомотетрамерами, что расширяет разнообразие свойств IP_3 -рецепторов [10].

IP_3 -рецепторы являются катионными каналами с большой проводимостью и относительно слабой селективностью в отношении Ca^{2+} по сравнению с K^+ ($PCa/PK \sim 7$) [47]. Через них проходит $\sim 10^5$ ионов Ca^{2+} в су (или 1000 ионов Ca^{2+} на каждые 10 мс), что в 50 раз больше, чем у Ca^{2+} -каналов L-типа [47; 56]. Это позволяет нескольким IP_3 -рецепторам быстро и локально доставлять Ca^{2+} в цитозоль. Локальная концентрация Ca^{2+} у поры канала может превышать 100 мкМ, но падает ниже 1 мкМ в радиусе 1–2 мкм [5].

Большинство IP_3 -рецепторов подвижны внутри мембран ЭР, а IP_3 и/или Ca^{2+} может регулировать их кластеризацию. Несмотря на это, выбросы Ca^{2+} , вызванные IP_3 , неоднократно инициируются в одних и тех же фиксированных участках внутри клетки. Это объясняется тем, что большинство IP_3 -рецепторов собраны в небольшие кластеры (в

среднем по 8 рецепторов), которые часто находятся слишком далеко друг от друга (> 100 нм) для прямого контакта между ними, но могут взаимодействовать с помощью каркаса из белков или липидов [47; 79]. Кластеры перемещаются за счёт диффузии в мембранах ЭР или направленно моторами микротрубочек. Сверхэкспрессия IP_3 -рецепторов приводит к образованию большего количества кластеров и рецепторов в каждом из них, но средняя амплитуда выбросов Ca^{2+} не меняется, что может говорить об ограничении числа активных IP_3 -рецепторов внутри кластера [80].

Активность тетрамерных IP_3 -рецепторов регулируется IP_3 и Ca^{2+} . Для всех изоформ IP_3 -рецептора характерна двухфазная регуляция, зависящая от концентрации Ca^{2+} . Так, умеренная концентрация цитозольного Ca^{2+} (0,1–1 мкМ) увеличивает вероятность открытия канала, тогда как при более высокой концентрации (десятки мкМ) Ca^{2+} оказывает ингибирующее действие [56]. Для открытия канала необходимо связывание IP_3 с IP_3 -связывающим сайтом каждой из четырёх субъединиц рецептора, что приводит к конформационным изменениям и увеличивает сродство Ca^{2+} к Ca^{2+} -связывающему сайту [81; 82], поэтому ионы Ca^{2+} , высвобождаемые из ЭР, могут дополнительно стимулировать активность IP_3 -рецепторов.

В случае высоких концентраций цитозольного Ca^{2+} ингибирующий сайт связывания оказывается занятым, и канал инактивируется. Двухфазная регуляция IP_3 -рецепторов с помощью Ca^{2+} лежит в основе явления Ca^{2+} -индуцированного Ca^{2+} выброса (CICR), при котором Ca^{2+} , высвобождаемый одним каналом, может инициировать открытие соседних каналов.

Кроме того, уровень Ca^{2+} в просвете ЭР оказывает косвенное воздействие на активность IP_3 -рецепторов. Высокий уровень люминального Ca^{2+} повышает чувствительность IP_3 -рецептора к IP_3 , а сниженный десенсибилизирует рецептор [83]. Например, широко экспрессируемый Ca^{2+} -связывающий белок аннексин A1 (ANXA1), локализованный не только в цитоплазме, но и, возможно, в просвете ЭР [84], а также внутрипросветные ERp44 [85] и ERO-1 α [2], при высокой концентрации люминального Ca^{2+} подавляют активность IP_3 -рецептора.

IP_3 регулирует активность IP_3 -рецептора другим образом [56]: при низкой концентрации IP_3 происходит кратковременное случайное открытие отдельного IP_3 -рецептора, приводящее к выбросу Ca^{2+} . При более высокой концентрации IP_3 Ca^{2+} , поступающий из одиночного открытого канала, может инициировать открытие соседних IP_3 -рецепторов внутри кластера через CICR, приводя к локальному выбросу Ca^{2+} (puffs),

который длится около 100 мс [47]. Глобальные сигналы Ca^{2+} , такие как волны (bursts), распространяемые по всей клетке, инициируются более высокой концентрацией IP_3 посредством последовательной активации локальных сигналов через межкластерный CICR [86]. Следовательно, как пространственная, так и временная характеристика цитозольных сигналов Ca^{2+} может меняться с интенсивностью стимула.

Также на открытие канала и генерацию Ca^{2+} -сигналов оказывает влияние состав IP_3 -рецепторов. Изоформы различаются по своей способности поддерживать колебательные процессы: $\text{IP}_3\text{R2}$ поддерживает колебания Ca^{2+} , тогда как $\text{IP}_3\text{R3}$, наоборот, снижает вероятность их возникновения [56]. В случае гетеротетрамеров с сочетанием 2 $\text{IP}_3\text{R1}$ и 2 $\text{IP}_3\text{R2}$ преобладают свойства $\text{IP}_3\text{R2}$ в отношении индукции колебаний Ca^{2+} [10].

Изоформы IP_3 -рецептора оказывают влияние на гомеостаз Ca^{2+} в депо, действуя непосредственно или косвенно на SERCA и комплекс STIM и Orai (ответственны за SOCE). Сообщается, что в клетках, лишённых всех трёх изоформ (ТКО), по сравнению с диким типом, утечка и пополнение депо медленнее, а вызванный тапсигаргином (ингибитором SERCA) рост цитозольного Ca^{2+} не отличался от контроля [70], что в совокупности может говорить о меньшей активности SERCA. При этом сверхэкспрессия $\text{IP}_3\text{R1}$ и $\text{IP}_3\text{R3}$ увеличивает закачку Ca^{2+} в ЭР, функционально связывающихся с SERCA, и значительно ускоряет затухание вызванных тапсигаргином Ca^{2+} -сигналов [70]. SOCE в клетках ТКО значительно менее эффективен, а уровни экспрессии Orai1 снижены. Оба этих эффекта отменяются при сверхэкспрессии $\text{IP}_3\text{R3}$ или Orai1, в отличие от сверхэкспрессии $\text{IP}_3\text{R1}$ [70]. Также сообщается о противоположном воздействии отсутствия всех изоформ на SOCE (не отличается от дикого типа), но подчёркивается, что IP_3 -рецепторы облегчают взаимодействие между STIM и Orai, а следовательно, активируют SOCE [87].

Изоформы оказывают влияние и на пространственное распределение IP_3 -рецепторов в клетке. Так, в клетках ТКО HeLa митохондрии и структуры эндоплазматического ретикулума по глубине относительно мембраны клетки распределены более случайно относительно клеток, экспрессирующих IP_3 -рецепторы любой изоформы, а экспрессия любой изоформы рецептора увеличивала распределение плотных контактов ЭР и митохондрий вблизи адгезивной поверхности [71]. При этом большинство $\text{IP}_3\text{R1}$ концентрируется на адгезивной поверхности, тогда как $\text{IP}_3\text{R2}$ и $\text{IP}_3\text{R3}$ распределяются более равномерно. Также авторы показали, что роль различных изоформ в распространения сигналов Ca^{2+} в митохондрии распределяется согласно следующему ряду $\text{IP}_3\text{R2} > \text{IP}_3\text{R3} > \text{IP}_3\text{R1}$, но именно $\text{IP}_3\text{R1}$ наиболее эффективно способствует SOCE.

При этом отсутствие всех трёх изоформ IP_3 -рецептора приводит к блокировке передачи Ca^{2+} -сигнала между митохондриями и ЭР.

1.2.2.3. Регуляция

IP_3 -рецепторы могут активироваться не только IP_3 и Ca^{2+} , но и аденофостинном, H_2O_2 и тимеросалом [2]. При этом рецепторы блокируются высоким уровнем цитозольного Ca^{2+} (более 300 нМ), кофеином, кальмодулином, гепарином, $CaBP1$, 2-APB, ксестоспонгином, H_2S со стороны цитозоля и Egr44 и ERO-1 α со стороны просвета ЭР.

Важными регуляторами IP_3 -рецептора, кроме IP_3 и Ca^{2+} , являются cAMP, cGMP, H^+ , NADH и АТР. С IP_3 -рецепторами также взаимодействуют различные каналы, регулируя их активность: двупоровые каналы лизосом TPC [49], митохондриальный кальциевый унипортер MCU [88]. IP_3 -рецепторы могут регулироваться ковалентными модификациями, включая фосфорилирование, контролируемое более чем дюжиной протеинкиназ и фосфатаз, убиквитинирование, опосредованное трансклутаминой сшивание остатков Gln-Lys, тиоловую модификацию и нитрозилирование [7; 47; 56]. Некоторые модуляторные белки IP_3 -рецепторов связаны с заболеваниями человека. Так, мутантные формы гентингина (болезнь Хантингтона), атаксинов (спиноцеребеллярные атаксии) и пресенилина (наследственные формы болезни Альцгеймера) усиливают вызванные IP_3 сигналы Ca^{2+} [47].

Большинство вспомогательных белков, видимо, влияют на вызванное IP_3 высвобождение Ca^{2+} косвенно, действуя на связывание IP_3 или Ca^{2+} или взаимодействие между ними. Однако белки G $\beta\gamma$ могут имитировать IP_3 , а Ca^{2+} -связывающие белки, CIB1 и $CaBP1$, напрямую обратимо блокируют IP_3 -рецепторы [47]. Краткое описание некоторых основных регуляторов IP_3 -рецепторов приведено ниже.

cAMP

cAMP регулирует IP_3 -рецепторы несколькими способами. cAMP-зависимая протеинкиназа А (РКА) фосфорилирует IP_3 -рецепторы, усиливая активность IP_3R1 и, вероятно, IP_3R2 [10; 89]. Также аденилатциклаза 6, которая экспрессируется в клетках в малом количестве, доставляет cAMP в микродомен, окружающий IP_3R2 , увеличивая его активность [10]. Кроме того, присутствие cAMP само по себе может активировать IP_3R , которые были нечувствительны к IP_3 . Наряду с этим, паратиреоидный гормон через cAMP вызывает высвобождение Ca^{2+} после полного истощения депо, чувствительного к

карбахолу. Это указывает на то, что cAMP демаскирует IP_3 -рецепторы с высоким сродством к IP_3 .

Кальмодулин

Ca^{2+} -связывающий белок кальмодулин (CaM) модулирует активность IP_3 -рецепторов как зависимым, так и независимым от Ca^{2+} образом [90], обнажая в каждом домене рецептора гидрофобные остатки, что позволяет ему связываться с ними. Две формы кальмодулина (Ca^{2+} -кальмодулин и апо-кальмодулин) связываются с тремя сайтами IP_3R1 и одним сайтом IP_3R2 , в обоих случаях вызывая ингибирование, но не взаимодействуют с IP_3R3 [10]. Некоторые CaM-связывающие сайты используются другими Ca^{2+} -связывающими белками [91].

Аннексин A1

Ca^{2+} -связывающий белок аннексин A1 (ANXA1), предположительно, связывается со второй внутрипросветной петлей IP_3 -рецептора при высоких (> 100 мкМ) уровнях Ca^{2+} в депо и ингибирует IP_3 -рецептор [76; 84], что может ограничивать развитие нежелательных глобальных Ca^{2+} -сигналов или достижение токсичных уровней Ca^{2+} . Генетический нокдаун экспрессии ANXA1 усиливает глобальные и локальные Ca^{2+} -сигналы [84].

IRBIT

IRBIT (IP_3R -связывающий белок, высвобождаемый с IP_3) представляет собой белок, который ингибирует IP_3R1 [92], конкурируя с IP_3 за связывание с IBC, но делает это только после фосфорилирования IRBIT [10; 93]. IRBIT распространён повсеместно, имеет высокие уровни экспрессии (как и IP_3R) в головном мозге и мозжечке, однако они варьируются в зависимости от физиологического состояния клетки [94]. IRBIT конкурирует с IP_3 за один и тот же сайт (IBC) IP_3 -рецептора, при этом под действием IRBIT кривая доза-ответ смещается вправо для трёх процессов: связывания IP_3 , активации канала и высвобождения Ca^{2+} из ЭР. В состоянии покоя большая часть IRBIT, вероятно, связана с IP_3 -рецепторами, что снижает спонтанную активность рецептора и утечку Ca^{2+} . При этом IP_3 -рецептор является буфером для IRBIT, который выполняет множество функций в клетке, таким образом, связывая эти процессы с передачей сигналов Ca^{2+} .

KRAP

KRAP (KRas-индуцированный белок, взаимодействующий с актином) представляет собой цитозольный белок, который взаимодействует со всеми тремя изоформами IP_3 -

рецептора N-концом, а С-концом – с полимеризованным F-актином цитоскелета [95]. Ген, кодирующий KRAP, высококонсервативен от рыб до млекопитающих [56]. KRAP фиксирует кластеры IP₃-рецепторов вблизи к ПМ, где происходит SOCE, необходим для развития локального и глобального цитозольного Ca²⁺-сигнала, а также ограничивает степень Ca²⁺-ответа, вызванного агонистом [95].

Bcl-2 и Bcl-XL

Bcl-2 и Bcl-XL, являясь членами антиапоптотического семейства Bcl-2 могут избирательно регулировать IP₃-рецепторы. Так, Bcl-X_L напрямую связывается с С-концевой областью рядом с порой IP₃-рецептора, повышая его чувствительность и увеличивая частоту колебаний Ca²⁺ для клеток со всеми тремя изоформами IP₃-рецептора, одновременно снижая концентрацию Ca²⁺ в депо в клетках с единственной изоформой IP₃R3, но не в клетках с IP₃R1 или IP₃R2 [96]. Bcl-2, связываясь с этим же сайтом на С-конце, вызывает сенсibilизацию IP₃-рецептора, но, связываясь с центральным регуляторным доменом, наоборот, ингибирует его. Также сверхэкспрессия Bcl-X_L снижает уровень IP₃-рецепторов, а Bcl-2 повышает экспрессию SERCA, одновременно увеличивая скорость утечки Ca²⁺ из ЭР.

Beclin-1

Beclin-1 выполняет множество функций в клетке, непосредственно участвуя в инициации аутофагии и косвенно в развитии, эндоцитозе, адаптации к стрессу, старении и гибели клеток. Beclin-1 способен связываться с N-концевым супрессорным доменом IP₃R, но также активно связывается с IP₃-рецепторами во время голодания, при этом сенсibilизируя рецептор, что приводит к повышенному высвобождению Ca²⁺ из ЭР [97].

Цитохром С

Митохондриальный цитохром С взаимодействует с С-концевым участком IP₃-рецептора в процессе апоптоза [69]. На ранней стадии апоптоза цитохром С перемещается в ЭР, где он селективно связывается с IP₃-рецептором, что приводит к устойчивому, колебательному повышению уровня цитозольного Ca²⁺, в свою очередь вызывающего усиленное высвобождение цитохрома С из митохондрий и развитие апоптоза [98].

CaBP

CaBP – это семейство нейрональных Ca²⁺-связывающих белков, регулирующих чувствительность рецепторов к IP₃, связываясь с ними как зависимым, так и независимым от Ca²⁺ образом [90]. Также CaBP активирует высвобождение Ca²⁺ в отсутствие IP₃ [67].

1.2.3. CICR

Практически для всех типов клеток характерен эффективный внутриклеточный Ca^{2+} -буфер, связывающий 99 из 100 ионов Ca^{2+} , появившихся в цитозоле за счёт входа внеклеточного Ca^{2+} или высвобождения депонированного Ca^{2+} . Поэтому пассивное распространение быстрых и значительных Ca^{2+} -сигналов посредством диффузии практически невозможно, и для формирования глобальных Ca^{2+} -сигналов требуется механизм усиления. Таким механизмом является Ca^{2+} -индуцированный Ca^{2+} -выброс, или CICR (Calcium-induced calcium release), в котором участвуют два типа рецепторов мембран внутриклеточных Ca^{2+} -депо – IP_3 -рецепторы и рианодиновые рецепторы.

Действие цитозольного Ca^{2+} бимодально для обоих типов рецепторов, так как они имеют по два сайта связывания Ca^{2+} : активирующий сайт с высоким сродством к Ca^{2+} и ингибирующий с низким сродством [6; 81]. Соответственно, при низких концентрациях цитозольного Ca^{2+} каналы закрыты, при средних (300 нМ для IP_3 -рецепторов, 100–1000 мкМ для рианодиновых) – открываются, а при более высоких – вновь закрываются. При этом Ca^{2+} , высвобождаемый одним каналом, может инициировать открытие соседних каналов [81]. Эта положительная обратная связь опосредует CICR.

Стоит отметить, что активация IP_3 -рецепторов происходит, когда IP_3 занимает IP_3 -связывающие домены на всех четырёх субъединицах [82]. Это связано с конформационными изменениями, которые повышают чувствительность сайта связывания Ca^{2+} . Этот мультимодальный контроль IP_3 -рецепторов при участии IP_3 и Ca^{2+} является ключевым для различных аспектов внутриклеточной передачи Ca^{2+} -сигналов [2; 5].

1.3. Общие представления о редактировании генома с использованием методологии CRISPR/Cas9 и получении клеточных линий

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein) — это технология редактирования генов, которая даёт возможность манипулировать практически любой геномной последовательностью, что позволяет выяснить функцию определенного гена, отключив его или сверхэкспрессируя в живых организмах. Она включает в себя два основных компонента: направляющую РНК (sgRNA), соответствующую гену-мишени, и эндонуклеазу Cas9, которая вносит двухцепочечный разрыв ДНК, что позволяет осуществлять направленную модификацию генома.

CRISPR/Cas9 впервые была описана как адаптивная иммунная система у бактерий и архей: чужеродная ДНК (протоспейсер) распознаётся, разрезается и интегрируется в CRISPR-локус [99]. CRISPR-локус состоит из серии консервативных повторяющихся последовательностей, разделённых неповторяющимися последовательностями, называемыми спейсерами. В системах CRISPR наиболее простого II типа CRISPR-локус транскрибируется в пре-CRISPR РНК и процессируется до созревшей CRISPR-ассоциированной РНК (crРНК) с помощью транс-активирующей РНК (tracrРНК). Взаимодействие между crРНК и tracrРНК заставляет SpCas9 (*Streptococcus pyogenes*) распознавать специфическую последовательность ДНК, комплементарную протоспейсеру (19–20 нуклеотидов). Программируемая crРНК и фиксированная tracrРНК сливаются с образованием sgРНК (single guide RNA, 100–250 нуклеотидов), которая направляет Cas9 к РАМ-участку (состоит из трёх нуклеотидов вида NGG), прилежащему к 3'-концу целевого сайта ДНК. Cas9 включает домены HNH и домен RuvC (три субдомена), которые по сигналу sgРНК разрезают мишень и комплементарную ДНК [99; 100]. При связывании sgРНК с комплементарным участком ДНК Cas9 разрезает обе нити в трёх нуклеотидах от РАМ, в результате чего формируется двухцепочечный разрыв ДНК с тупыми концами. Последующий процесс репарации клеточной ДНК приводит к желаемым вставкам, делециям или заменам в целевых сайтах [100].

Нашими коллегами была проведена работа по созданию конструкций для направленного редактирования генов IP_3 -рецепторов с использованием CRISPR/Cas9 системы [101; 102]. Для получения каждого варианта моноклона последовательно инактивировали два гена, кодирующих изоформы IP_3 -рецептора. Для редактирования гена одной изоформы (например, IP_3R3) была сконструирована экспрессионная кассета с использованием реагентов набора Guide-it CRISPR/Cas9 System. Клетки линии HEK-293 трансфицировали полученным вектором pGuide-it-tdTomato/ IP_3R3 , затем их рассаживали по одной в лунку планшета с помощью клеточного сортера, культивировали и проверяли на моно- и биаллельности мутаций. Генетические изменения в моноклонах с биаллельными мутациями подтверждались секвенированием целевого участка IP_3R3 . Далее в полученных линиях аналогично выключали ген другой изоформы. Полученные моноклональные линии с единственной изоформой IP_3 -рецептора проверяли с помощью вестерн-блоттинга [103]. Также в клетках полученных моноклональных линиях временно экспрессировали генетически кодируемый сенсор Ca^{2+} R-CEPIA1ег с ретикулярной локализацией с использованием плазмидного вектора pCMV R-CEPIA1ег по протоколам, отработанным коллегами [14; 104].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточные линии

В данной работе использовали клетки линии НЕК-293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Санкт-Петербург), 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. Эти клеточные линии были получены нашими коллегами [101; 102].

2.2. 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, США) на дно фотометрической экспериментальной камеры, представляющей собой покровное стекло (Menzel-Glaser, Германия) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным Ca²⁺-зондом Fluo-8. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23–25 °C) в присутствии проникающего аналога Fluo-8 (мембранопроницаемого ацетоксиметильного эфира Fluo-8 AM) (3 мкМ) и детергента Pluronic F-127 (0,02%) (оба ААТ Bioquest, США) 20 мин, в течение которых гидролиз внутриклеточными эстеразами ацетоксиметиловой группы Fluo-8 AM продуцировал остаточное количество Fluo-8. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором при 25 °C в течение 40 мин.

В случае фотоиндуцированного высвобождения IP₃ (IP₃-uncaging) клетки инкубировали в присутствии 3 мкМ Fluo-8 AM, 4 мкМ caged-Ins(145)P₃/PM (SiChem, Германия) и 0,02% Pluronic F-127, как описано выше.

Состав внеклеточного раствора (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 HEPES, 0,05 EDTA, 10 глюкоза (все Sigma-Aldrich).

2.3. Мониторинг внутриклеточных сигналов в режиме реального времени

2.3.1. Методика и экспериментальная установка для микрофотометрии

Эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Fluar 20×/0,75 (Zeiss) и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology, Северная Ирландия). 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) [105]

для возбуждения флуоресценции. Флуоресценцию Fluo-8 и R-CEPIA1er возбуждали на длинах волн 480 ± 5 и 572 ± 17 нм, соответственно, а эмиссию регистрировали в областях 535 ± 20 и 630 ± 30 нм, соответственно. Экспрессия R-CEPIA1er в клетках исследуемых линий и загрузка в них Fluo-8 обеспечивали одновременный мониторинг цитозольного и депонированного Ca^{2+} .

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

2.3.2. Методика и экспериментальная установка для фотолиза химических групп (IP₃-uncaging)

Для скачкообразного повышения концентрации внутриклеточного IP₃ использовали фоточувствительный и проникающий через мембрану предшественник IP₃ caged-Ins(145)P₃/PM (SiChem, Германия). Фотолиз caged-Ins(145)P₃/PM вспышкой света ультрафиолетового диапазона (355 нм) инициировал импульсное повышение концентрации IP₃ в цитоплазме клетки. 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.

2.3.3. Химические зонды и генетически кодируемые сенсоры

Для мониторинга изменений концентрации цитозольного Ca^{2+} клетки инкубировались в присутствии соединения Fluo-8 AM, который проникал в цитозоль, где подвергался гидролизу клеточными эстеразами, конвертируясь в непроникающий флуоресцентный Ca^{2+} -зонд Fluo-8. Связывание ионов Ca^{2+} инициирует увеличение эмиссии Fluo-8 в зелёном диапазоне длин волн (возбуждение 490 нм, эмиссия 520 нм), что позволяло осуществлять мониторинг уровня Ca^{2+} в цитозоле клеток в режиме реального времени.

Для анализа изменений уровня депонированного Ca^{2+} клетки трансфицировали плазмидным вектором, кодирующим Ca^{2+} -сенсор с ретикулярной локализацией R-

CEPIA1er (возбуждение 570 нм, эмиссия 584 нм) [106]. Экспрессия R-CEPIA1er в исследуемых клетках и загрузка в них Fluo-8 позволяли проводить одновременный мониторинг цитозольного и депонированного Ca^{2+} .

2.3.4. Аппликация соединений и смена растворов в экспериментальной камере

Смену раствора в экспериментальной камере объёмом 200–300 мкл производили со скоростью ~ 1 мл/с. Используемые соединения (указаны в таблице 1) 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 0,5 мМ EGTA + 0,4 мМ CaCl_2 , что соответствовало снижению свободного Ca^{2+} с 2 мМ до 260 нМ, как это следует из расчётов по программе Maxchelator (<http://maxchelator.stanford.edu>).

Растворы ингибиторов или антагонистов подавали за 200 с до аппликации раствора агониста.

Таблица 1. Вещества, использованные в работе.

Название	Действие	Производитель	Номер
ACh	агонист никотиновых и мускариновых рецепторов	Tocris	2809
Тапсигаргин	ингибитор SERCA	Tocris	1138
U73122	ингибитор PLC	Tocris	1268
Иономицин	Ca^{2+} -ионофор	MP Biomedicals	159611
4-DAMP	антагонист мускариновых M3-рецепторов	Tocris	0482
caged-Ins(145)P3/PM	фоточувствительное производное IP_3	SiChem	cag-iso-2-145-100
Fluo-8 AM	флуоресцентный Ca^{2+} -зонд	AAT Bioquest	255118

Ксестоспонгин С	ингибитор IP ₃ R	Tocris	1280
Кофеин	агонист рианодиновых рецепторов	Sigma Aldrich	58-08-2
Рианодин	ингибитор рианодиновых рецепторов	MP Biomedicals	M1047
ГАМК	агонист ГАМК _A и ГАМК _B рецепторов	Sigma Aldrich	A2129
АТР	агонист пуринорецепторов	Sigma Aldrich	A9187
УТР	агонист пуринорецепторов	Sigma Aldrich	U6625
Дофамин	агонист дофаминовых рецепторов	Sigma Aldrich	H8502
Гистамин	агонист H1-H4 гистаминовых рецепторов	Tocris	3545
Серотонин	агонист серотониновых рецепторов	Tocris	3547
Аденозин	агонист аденозиновых рецепторов	Sigma Aldrich	A9251

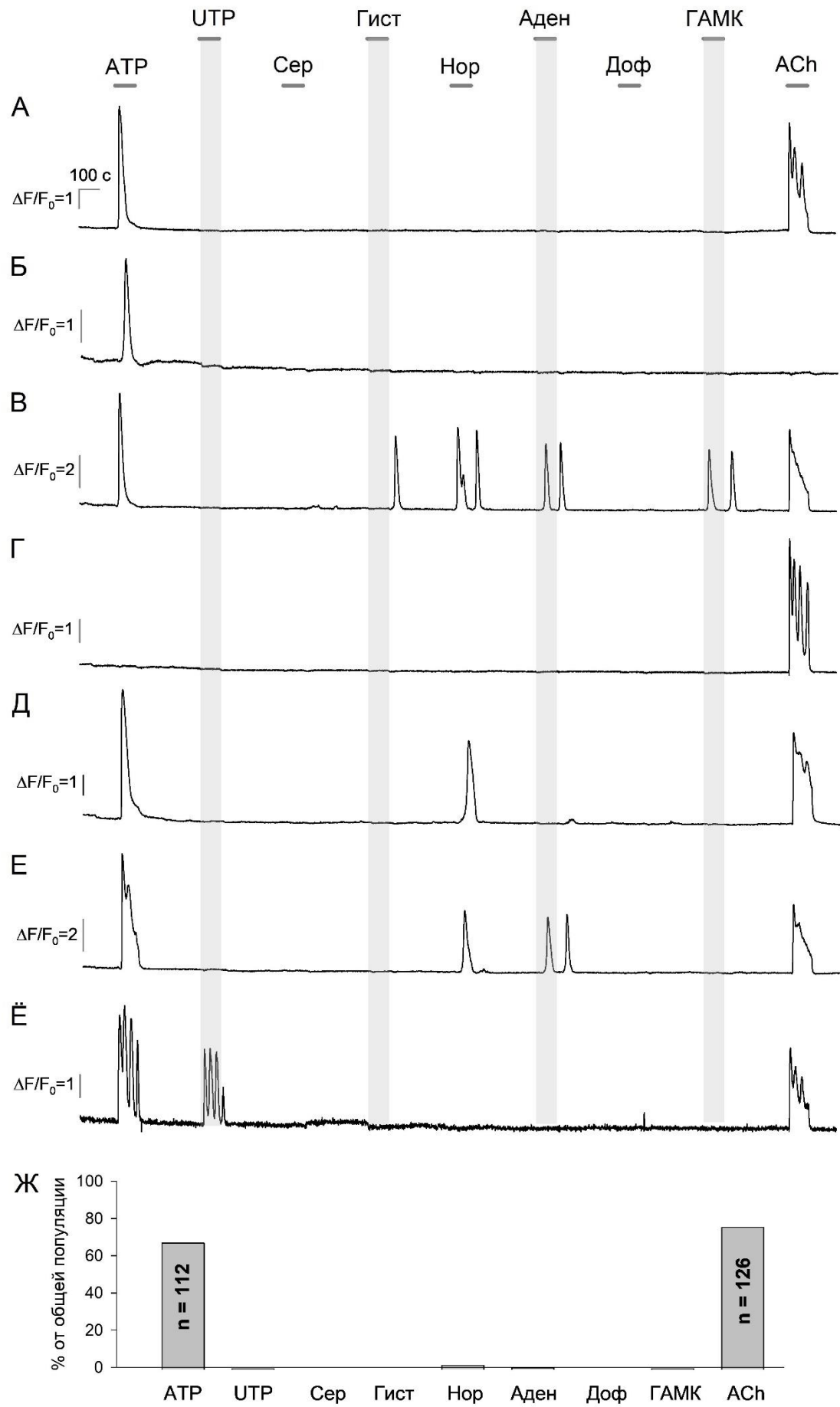
2.4. Статистическая репрезентативность и обработка данных

Все представленные эффекты были продемонстрированы не менее чем в трёх независимых экспериментах. Для построения графиков и их анализа использовали программу SigmaPlot (Grafiti, США). Статистически значимые различия между группами клеток определяли с использованием критериев Mann-Whitney или ANOVA on Ranks в программе Sigma Plot.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Когда в нашей лаборатории ставилась задача внедрить генно-инженерные подходы в практику исследования рецепторных и сигнальных систем клеток, представлялось, что начинать следует с клеток в культуре, которые бы удовлетворяли ряду критериев, таких как достаточная стабильность при культивировании, устойчивость к трансфекции различными векторами, кодирующими рекомбинантные белки, достаточно широкий спектр эндогенно экспрессируемых G-белков и других сигнальных молекул. В результате анализа литературных данных и на основе ряда собственных экспериментов, выбор был сделан в пользу клеток линии HEK-293. В список ключевых задач, которые предполагалось решить с использованием клеток HEK-293, входили исследование механизмов регуляции IP_3 -рецепторов и анализ роли индивидуальных изоформ в формировании внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов, которые могут быть весьма разнообразны по форме, интенсивности, длительности и локализации в цитозоле. Поскольку HEK-293, как и клетки многих других типов, экспрессируют все три изоформы IP_3 -рецепторов, представлялось перспективным в качестве первого шага инактивировать 1–3 гена этих рецепторов с использованием CRISPR/Cas9 технологии, получить моноклональные клеточные линии, в которых IP_3 -рецепторы функционируют в требуемых комбинациях, и охарактеризовать эти линии в функциональных тестах. Настоящая работа была сформулирована и реализована в рамках последней части вышеупомянутой программы.

Хотя клетки HEK-293 оказались способны отвечать мобилизацией Ca^{2+} на множество первичных медиаторов (Рисунок 1), ACh оказался наиболее эффективным в том отношении, что этот агонист инициировал Ca^{2+} -сигналы в 70–80% популяции клеток (Рисунок 1Ж). Поэтому в данной работе исследовалась ACh-индуцированная Ca^{2+} -сигнализация в клетках линии HEK-293 (далее для единообразия WT-HEK) и её производных IP_3R1 -HEK, IP_3R2 -HEK, IP_3R3 -HEK, в клетках которых функционирует только IP_3R1 , IP_3R2 или IP_3R3 изоформа, соответственно. Планировалось охарактеризовать различные аспекты сопряжения мускариновых рецепторов с мобилизацией Ca^{2+} и проанализировать функциональные последствия инактивации генов IP_3 -рецепторов.



←

Рисунок 1. А-Ё – Репрезентативные регистрации Ca^{2+} -ответов одиночных клеток линии НЕК-293 (здесь и далее WT-НЕК), демонстрирующие чувствительность в клетках НЕК-293 к различным агонистам GPCR-рецепторов, в качестве которых были использованы следующие вещества: АТР (5 мкМ), УТР (5 мкМ), серотонин (5 мкМ), гистамин (5 мкМ), норадреналин (5 мкМ), аденозин (5 мкМ), дофамин (5 мкМ), ГАМК (25 мкМ), АСh (3 мкМ). Концентрации были выбраны как насыщающие на основе опыта исследований нашего коллектива. Здесь и далее начало и длительность аппликации агониста обозначено отрезками прямой над кривой регистрации. Клетки были загружены Ca^{2+} -зондом Fluo-8, флуоресценцию которого возбуждали на длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссию регистрировали в области 535 ± 20 нм. Данные представлены как $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F – интенсивность флуоресценции клеток в данный момент времени, F_0 – интенсивность флуоресценции клеток в начале регистрации, усреднённая за 20-секундный интервал.

Ж – Диаграмма, демонстрирующая долю клеток WT-НЕК, специфически отвечающих на различные агонисты GPCR-рецепторов ($n = 165$). Клетки WT-НЕК генерировали Ca^{2+} -ответы на следующие агонисты: АТР (67,8%), УТР (0,6%), аденозин (1,2%), норадреналин (2,4%), ГАМК (0,6%), АСh (76,4%).

3.1 Механизм трансдукции сигнала АСh в клетках WT-НЕК

В типичном эксперименте в фотометрической камере находилось около 200 клеток, преимущественно одиночных и реже в виде агломерата 2–4 клеток. Одновременный мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} осуществлялся в 100–120 одиночных клетках, отобранных визуально как морфологически интактные, и в которых уровень флуоресценции Fluo-8 в покое примерно соответствовал внутриклеточной концентрации Ca^{2+} порядка 100 нМ.

В ходе работы был очерчен круг агонистов, которые инициировали мобилизацию Ca^{2+} в клетках линии WT-НЕК. Из ряда использовавшихся агонистов (АТР, аденозин, ацетилхолин (АСh), гистамин, норадреналин, УТР, дофамин, серотонин, ГАМК) (Рисунок 1), клетки генерировали Ca^{2+} -ответы на АТР (67,8%), аденозин (1,2%), АСh (76,4%), норадреналин (2,4%), УТР (0,6%), ГАМК (0,6%), тогда как на гистамин, дофамин и серотонин Ca^{2+} -ответы не детектировались (Рисунок 1Ж). Поскольку АСh 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 АСh – мускариновые GPCR-рецепторы и никотиновые ионотропные рецепторы, которые являются АСh-активируемыми катионными каналами, проницаемыми

для ионов Ca^{2+} [107]. Кроме того, Ca^{2+} может поступать в клетку через рецептор-управляемые каналы, проницаемые для Ca^{2+} [108].

Чтобы выяснить, вклад какого из механизмов являлся ключевым, был проведён эксперимент, в котором клетки стимулировали ACh во внеклеточном растворе, в котором содержание Ca^{2+} было понижено на 4 порядка (260 нМ), что должно было пропорционально снизить поток Ca^{2+} в клетку (Рисунок 2А). В данных условиях Ca^{2+} -ответы сохранялись, а их амплитуды были близки к таковым ответов, наблюдавшихся в контроле при 2 мМ наружного Ca^{2+} (Рисунок 2 А, Б) (81 клетка). Это свидетельствовало о том, что Ca^{2+} -ответы на ACh генерировались преимущественно за счёт внутриклеточных источников. При этом ингибитор фосфолипазы С U73122 подавлял ответы на ACh (Рисунок 2А) (121 клетка), свидетельствуя о том, что IP_3 -зависимый выброс депонированного Ca^{2+} , был основным механизмом генерации этих Ca^{2+} -сигналов.

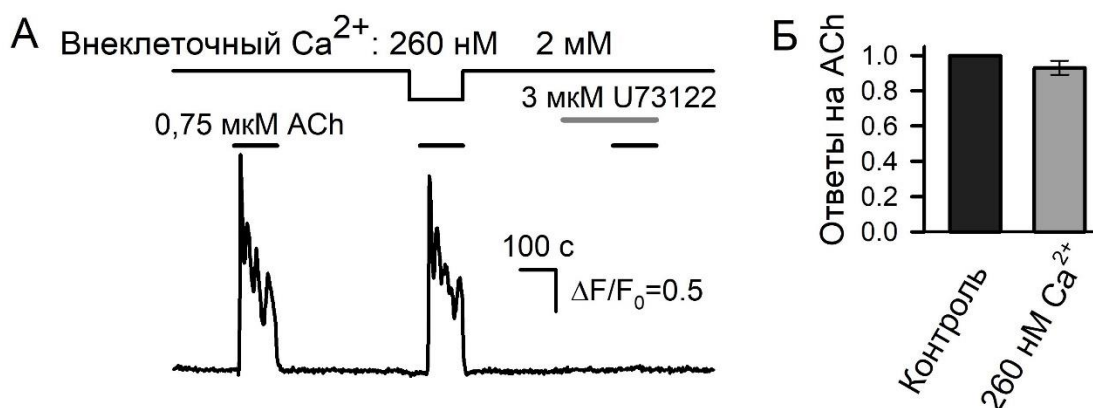


Рисунок 2. Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в одиночной клетке WT-НЕК, демонстрирующий вклад фосфоинозитидного каскада в генерацию Ca^{2+} -ответов при стимуляции ACh. Адаптировано из [103].

А – Клеточные ответы на 0,75 мкМ ACh при 2 мМ и 260 нМ Ca^{2+} идентичны по форме и амплитуде. В присутствии ингибитора фосфолипазы С U73122 клетка теряла способность генерировать Ca^{2+} -ответы на ACh.

Б – Статистика ответов на 0,75 мкМ ACh при 2 мМ и 260 нМ Ca^{2+} во внеклеточном растворе. Каждый ответ при низком уровне внеклеточного Ca^{2+} нормализовали на величину ответа при 2 мМ Ca^{2+} . Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 81$).

Далее было показано, что клетки WT-НЕК экспрессируют мускариновые рецепторы M1, M3, M4, M5, из которых M3 является доминантным как по уровню транскриптов (Рисунок 3А), так и по фармакологическим критериям – ответы на ACh полностью подавлялись в присутствии 4-DAMP (10 нМ) (Рисунок 3Б), который является специфическим антагонистом M3-рецепторов в наномолярных дозах.

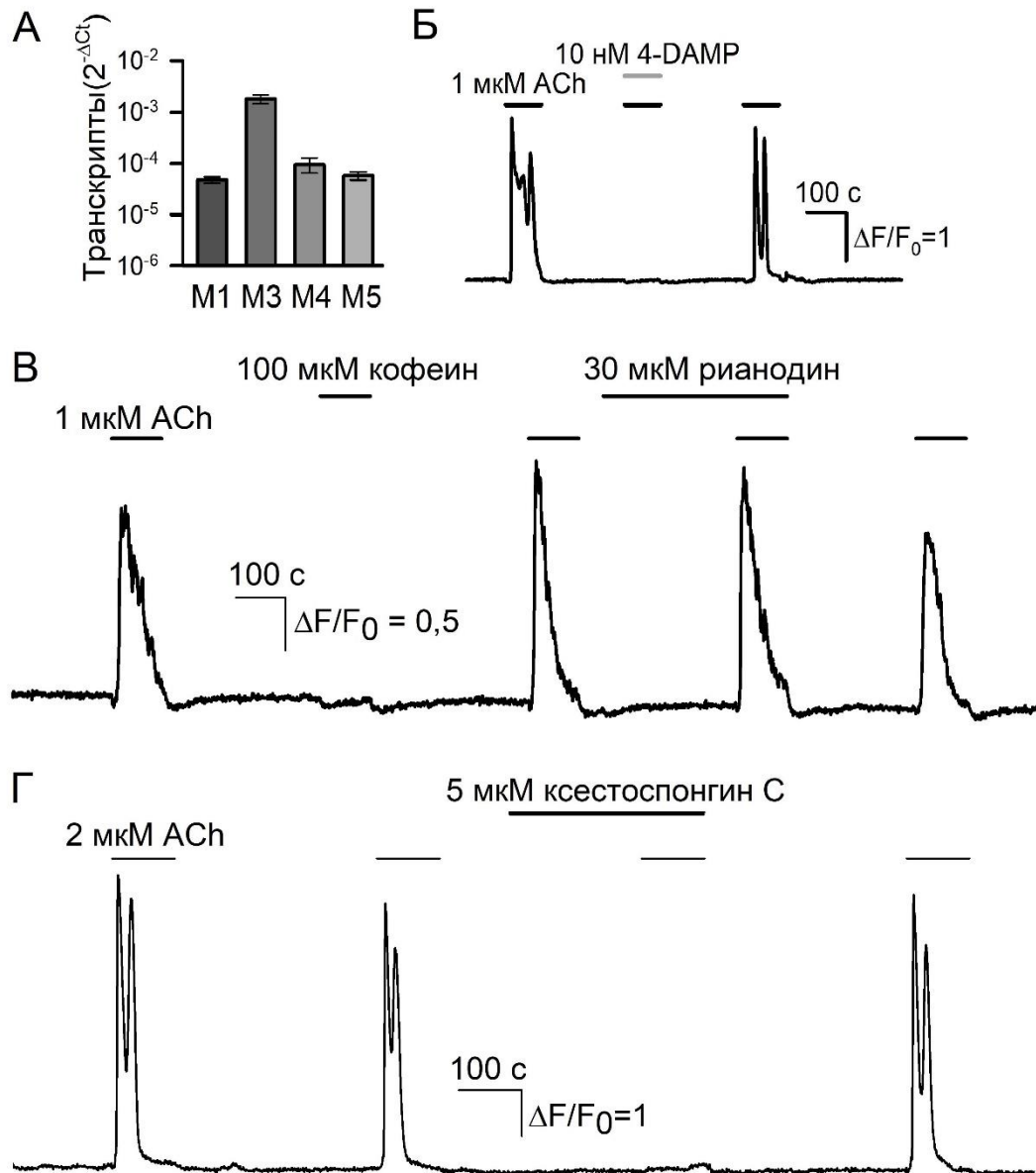


Рисунок 3. Вклад М3 и IP₃-рецепторов в генерацию Ca²⁺-ответов клетками линии WT-НЕК при стимуляции АСh. Адаптировано из [103].

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

Б – Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ в одиночной клетке, демонстрирующая обратимое подавление ответов на АСh антагонистом мускариновых М3-рецепторов 4-DAMP (10 нМ).

В – Репрезентативная регистрация, демонстрирующая отсутствие вклада рианодиновых рецепторов в генерацию ответов на ацетилхолин. Агонист рианодиновых рецепторов кофеин не вызывал генерацию Ca²⁺-ответов, а ингибитор рианодиновых рецепторов рианодин не влияет на способность клетки генерировать ответы на ацетилхолин.

Г – Репрезентативная регистрация, демонстрирующая обратимое подавление Ca²⁺-ответов на АСh антагонистом IP₃-рецепторов ксестоспонгином С (5 мкМ).

Отметим, что выброс Ca^{2+} из депо может происходить при участии двух типов рецепторов – IP_3 -рецепторов и рианодиновых (RyR) рецепторов, оба из которых могут поддерживать механизм CICR [61]. Поскольку в литературе нет свидетельств, что клетки WT-НЕК экспрессируют гены RyR [53; 73], участие рианодиновых рецепторов в генерации ответов на ACh было маловероятным. Тем не менее, этот вывод проверялся экспериментально, и было показано, что агонист рианодиновых рецепторов кофеин не стимулировал Ca^{2+} -сигналы в ACh-чувствительных клетках ($n = 82$), а антагонист рианодиновых рецепторов рианодин не блокировал Ca^{2+} -ответы на ACh (Рисунок 3В). Также было показано, что антагонист IP_3 -рецепторов ксестоспонгин С обратимо блокировал Ca^{2+} -ответы на ACh ($n = 27$) (Рисунок 3Г). Перечисленные выше факты указывали на то, что ACh индуцировал Ca^{2+} -ответы, стимулируя мускариновые рецепторы преимущественно М3 типа, сопряжённые с PLC и IP_3 -зависимым выбросом депонированного Ca^{2+} через IP_3 -рецепторы.

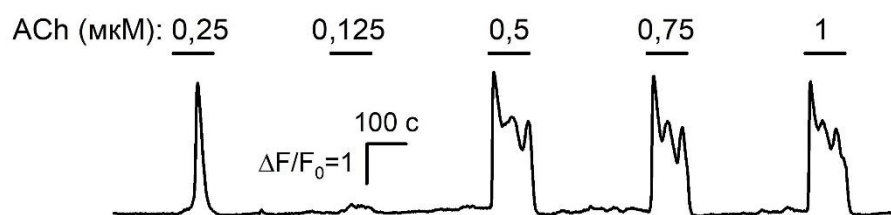


Рисунок 4. Репрезентативная регистрация внутриклеточного Ca^{2+} в одиночной клетке WT-НЕК, демонстрирующая генерацию Ca^{2+} -ответов на ACh по принципу «всё или ничего». Агонист использовался в концентрациях 0,125 – 1 мкМ. Адаптировано из [103].

Следует отметить, что характерной особенностью ответов на ACh было то, что, будучи апплицированным в разных концентрациях, агонист инициировал Ca^{2+} -сигналы примерно одной и той же амплитуды, т.е. Ca^{2+} -ответы генерировались по принципу «всё или ничего» (Рисунок 4). Ранее в нашей лаборатории было показано, в том числе и при участии автора данной работы, что агонист-индуцированные Ca^{2+} -ответы генерируются по принципу «всё или ничего» разными клетками, включая мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани человека при стимуляции разными агонистами [11; 14], а также клетками СНО и WT-НЕК, экспрессирующими рекомбинантный 5-НТ_{2C} или 5-НТ_{2В} рецептор, при стимуляции серотонином [13] (Рисунок 5).

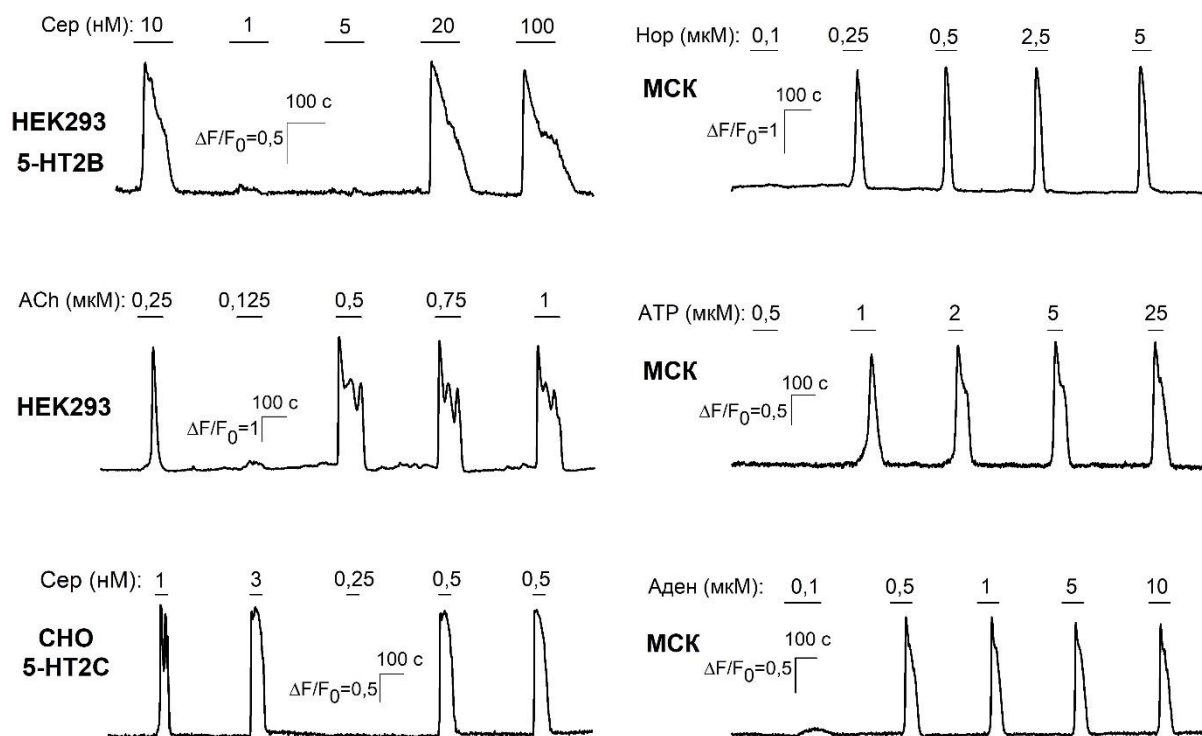


Рисунок 5. Репрезентативные регистрации внутриклеточного Ca^{2+} в клетках различных линий (НЕК-293/5-НТ2В, WT-НЕК (НЕК-293), CHO/5-НТ2С, МСК) в ответ на аппликацию агониста в разных концентрациях (серотонин (Сер), ацетилхолин (ACh), норадреналин (Нор), АТР и аденозин (Аден)), демонстрирующие генерацию Ca^{2+} -ответов по принципу «всё или ничего». Адаптировано из [11; 13; 14].

С учётом накопившихся данных была предложена следующая цепь внутриклеточных событий, которая должна приводить к феномену постоянной амплитуды Ca^{2+} -ответов на агонисты, апплицированные в разных дозах [11; 13; 14]. Активированный при связывании с агонистом GPCR-рецептор посредством G-белка активирует PLC, которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, продуцируя IP_3 и DAG. Далее локальный рост IP_3 стимулирует активность IP_3 -рецепторов, что приводит к первоначальному локальному выбросу депонированного Ca^{2+} , скорее всего, зависимому от концентрации агониста. Этот первоначальный Ca^{2+} -сигнал стимулирует масштабный выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо по механизму CICR, что и продуцирует вторичный Ca^{2+} -ответ, независимый от концентрации агониста (Рисунок 6).

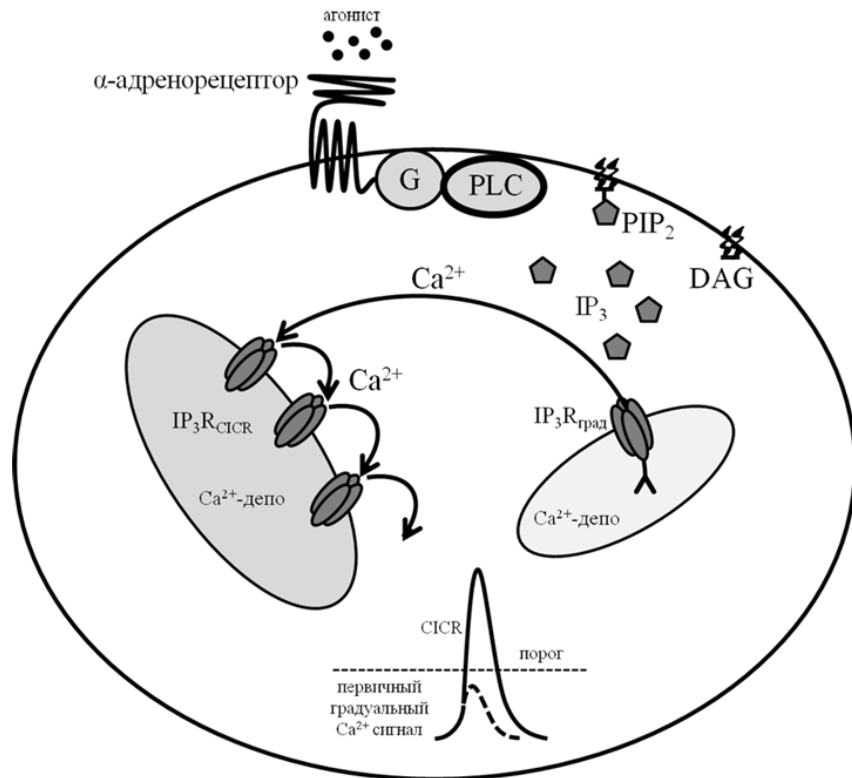


Рисунок 6. Предполагаемый механизм генерации Ca^{2+} -ответов при стимуляции агонистом. Адаптировано из [11]. Объяснения в тексте. $\text{IP}_3\text{R}_{\text{град}}$ – IP_3 -рецепторы, обеспечивающие первоначальный агонист-зависимый градуальный Ca^{2+} -сигнал; $\text{IP}_3\text{R}_{\text{CICR}}$ – IP_3 -рецепторы, активируемые при повышении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и участвующие во вторичном выбросе депонированного Ca^{2+} (CICR), не зависящем от концентрации агониста.

Чтобы верифицировать функционирование данного механизма в холинергических клетках WT-НЕК, мы использовали фотоиндуцированное высвобождение IP_3 в их цитозоле (IP_3 -uncaging). В соответствующих экспериментах помимо Fluo-8 клетки загружались фоточувствительным предшественником caged-Ins(145)P3/PM, который при поглощении кванта ультрафиолетового света высвобождает IP_3 . Было показано, что при стимуляции клеток импульсами ультрафиолета длительностью 0,5 с и 1,5 с генерируются идентичные Ca^{2+} -ответы, схожие по форме и амплитуде с ответами на ACh (Рисунок 7 А,Б). Поскольку вспышки длительностью 0,5 с и 1,5 с должны были высвобождать разное количество молекул IP_3 , отличающееся примерно в три раза, наши данные указывают на то, что зависимость амплитуды Ca^{2+} -ответа от инициирующей концентрации IP_3 носит пороговый характер «всё или ничего». Именно последнее и предполагает механизм, проиллюстрированный на рисунке 6.

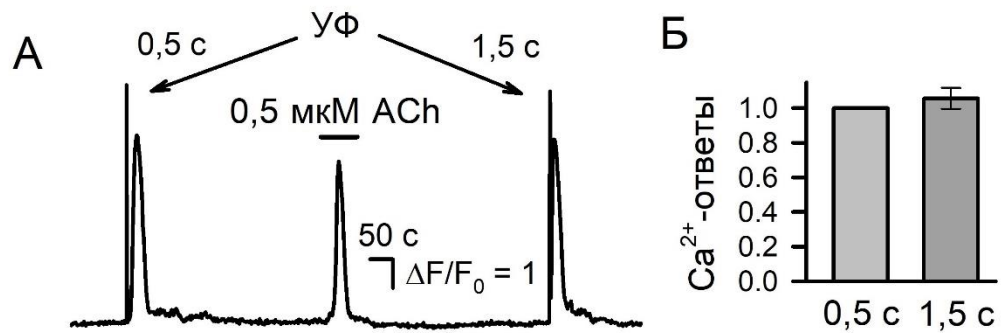


Рисунок 7. Ca^{2+} -ответы, инициируемые фотовысвобождением IP_3 . Адаптировано из [103]. **А** – Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в одиночной клетке WT-НЕК, загруженной одновременно caged-Ins(145)P3/PM и Fluo-8. Вспышки УФ (355 нм) инициировали импульсное повышение концентрации IP_3 в цитозоле клетки, что инициировало Ca^{2+} -сигналы, сходные с ответом на АСh. 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 принимался за 1. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 26$ клеток).

Перечисленные выше результаты экспериментов оставляли мало сомнений в 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 гена IP_3 -рецептора [103]. Поэтому оставалось неясным, опосредована ли реакция «всё или ничего» активностью конкретного подтипа IP_3 -рецептора, или каждая изоформа может обеспечивать этот вид Ca^{2+} -сигналов, индуцированных агонистом. Ответить на этот вопрос мы попытались в экспериментах, описанных ниже.

3.2. Анализ Ca^{2+} -сигнализации в клетках $\text{IP}_3\text{R1-}$, $\text{IP}_3\text{R2-}$ и $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$

Клетки линий $\text{IP}_3\text{R1-}$, $\text{IP}_3\text{R2-}$ и $\text{IP}_3\text{R3-}$ исследовались с использованием методологии, аналогичной описанной выше в п. 3.1. В первоначальных экспериментах анализировалась чувствительность этих клеток к АСh и дозо-зависимость их ответов. Как и в случае клеток WT-НЕК (Рисунок 4), кратковременная аппликация АСh инициировала импульсные Ca^{2+} -сигналы в цитоплазме клеток $\text{IP}_3\text{R1-}$, $\text{IP}_3\text{R2-}$ и $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$ (Рисунок 8А). Клетки всех этих типов генерировали ответы на АСh по механизму «всё или ничего», но при этом демонстрировали разную чувствительность к агонисту (Рисунок 8А). Поскольку в каждой клетке Ca^{2+} -ответы на АСh при варьируемых дозах были идентичны по амплитуде (Рисунок 8А), кривые дозо-зависимости ответов строили как зависимость фракции клеток в популяции (100%), отвечающих на агонист при данной его концентрации (Рисунок 8Б).

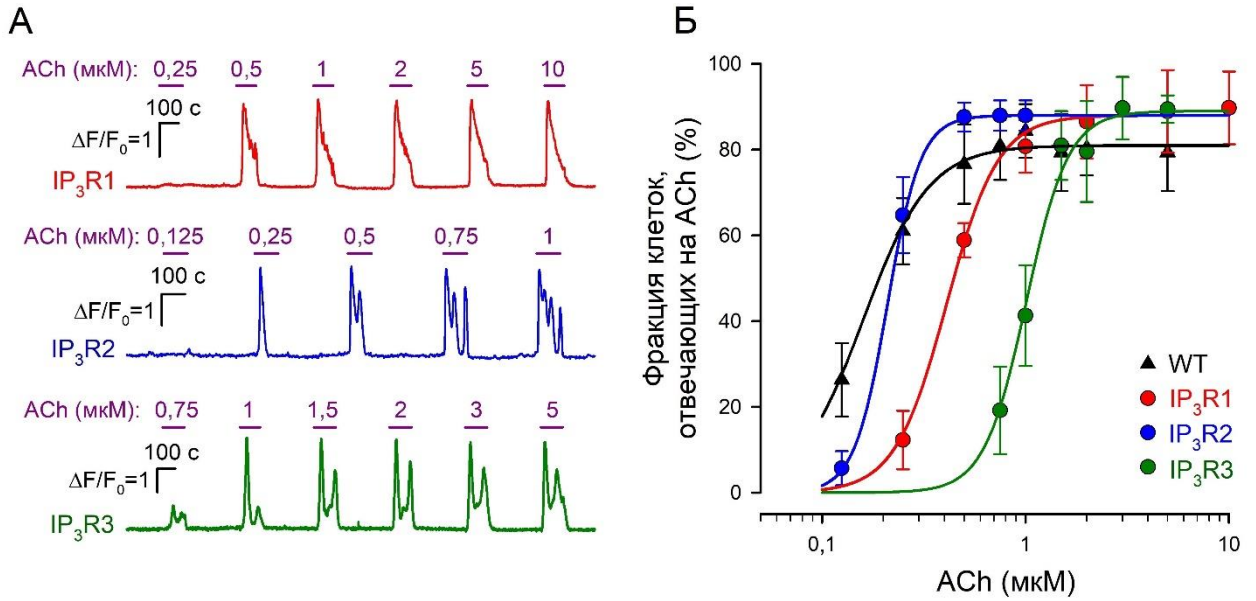


Рисунок 8. Зависимости ответов клеток IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и WT-НЕК от концентрации ACh. Адаптировано из [103].

А – Репрезентативные регистрации внутриклеточного Ca²⁺ 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 для клеток WT-НЕК, IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК с использованием уравнения (1) при следующих параметрах, соответственно: $F_0 = 81, 88, 88$ и 89 ; $C_{0,5} = 0,17, 0,41, 0,21$ и $1,01$ мкМ; и $h = 2,7, 5,3, 3,4$ и $4,2$.

Усреднённые по 7–11 отдельным экспериментам кривые доза-ответ для клеток исследовавшихся клеточных типов представлены на рисунке 8Б. Экспериментальные зависимости (символы) аппроксимировались уравнением Хилла (сплошные линии):

$$F(C) = F_0 \frac{C^h}{C_{0,5}^h + C^h} \quad (1)$$

где $F(C)$ – фракция клеток, отвечающих на ACh при концентрации C , F_0 – максимальная фракция ACh-чувствительных клеток, $C_{0,5}$ – доза полуэффекта (EC_{50}), h – коэффициент Хилла. На основе этой аппроксимации EC_{50} для клеток WT-, IP₃R1-, IP₃R2-, и IP₃R3-НЕК были оценены как 0,16, 0,41, 0,21, и 1,01 мкМ, соответственно. Таким образом, чувствительность к ACh анализируемых клеточных линий можно описать рядом:

$$\text{WT-НЕК} \approx \text{IP}_3\text{R2-НЕК} > \text{IP}_3\text{R1-НЕК} > \text{IP}_3\text{R3-НЕК}$$

Интересной особенностью клеток всех анализируемых линий было то, что Ca²⁺-сигналы в ответ на ACh генерировались с явной задержкой относительно момента аппликации агониста (Рисунок 9А). Количественно характерное время задержки ответа (τ_d)

определялось как интервал времени от момента аппликации стимула до момента достижения Ca^{2+} -ответом половины максимального значения (Рисунок 9А). Общей чертой задержек ответов клеток разных линий было то, что τ_d заметно уменьшалось с увеличением концентрации агониста (Рисунок 9 А, Б), и эта зависимость была достаточно специфична для клеток отдельных линий (Рисунок 9Б). Будучи практически одинаково чувствительными к ACh (Рисунок 8Б), клетки WT-НЕК и $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК показали идентичные зависимости задержки ответа от концентрации ACh (Рисунок 9Б). В случае клеток $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК задержки как функция концентрации были смещены вправо (Рисунок 9Б). Следует отметить, что моделирование процесса трансдукции сигналов Ca^{2+} -мобилизующих агонистов показало, что задержка Ca^{2+} -ответов определяется скоростью стимул-зависимой генерации IP_3 и аффинностью IP_3 -рецепторов [14]. Поскольку в большей дозе агонист стимулирует больше рецепторов, а значит увеличивает скорость продукции IP_3 , то это объясняет, почему задержка падает с увеличением дозы агониста. Как и предсказывалось вычислительными экспериментами [14], расположение задержек на оси концентраций, полученный для клеток $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК, $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК, полностью соответствует ряду аффинностей рецепторов к IP_3 [4; 8; 10; 77; 80]:

$$\text{IP}_3\text{R2} > \text{IP}_3\text{R1} > \text{IP}_3\text{R3}$$

То же соответствие имело место и для кривых доза-ответ (Рисунок 8Б). Поэтому представляется, что именно чувствительность конкретной изоформы IP_3 -рецептора к IP_3 является доминантным фактором, который определяет кривые доза-ответ и доза-задержка, характерные для клеточной линии, в которой он экспрессируется.

Как отмечалось выше, клеточные ответы на агонисты, генерирующиеся по принципу «всё или ничего» (Рисунки 4, 5), предполагают, что они формируются при участии механизма CICR [14]. Для клеток линии WT-НЕК это было подтверждено экспериментами по фотовысвобождению IP_3 с использованием фоточувствительного предшественника caged-Ins(145)P3/PM (Рисунок 6). В случае клеток линий $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК, $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК мы не проводили эти дорогостоящие эксперименты, полагая, что приведённые аргументы в случае клеток линии WT-НЕК можно экстраполировать на клетки других линий. Иными словами, тот факт, что клетки линий $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК, $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК генерировали ответы по принципу «всё или ничего», свидетельствует о том, что все три изоформы IP_3 -рецептора способны поддерживать механизм CICR. Этот вывод из наших экспериментов и математического моделирования (см. Приложение) [14]

согласуется с исследованиями Ca^{2+} -сигналикации в клетках с одной функциональной изоформой IP_3 -рецептора, проводившиеся в других лабораториях [109; 110].

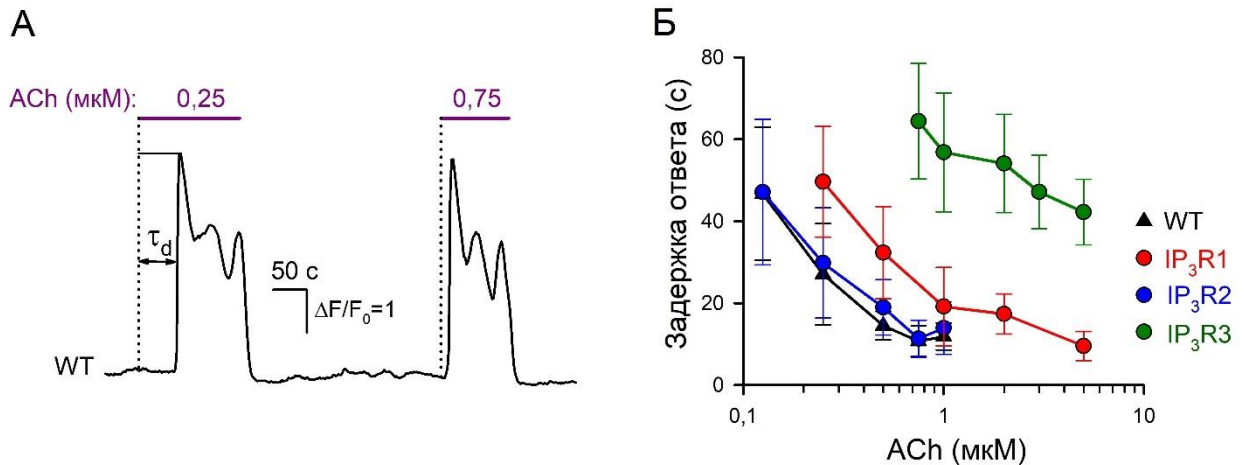


Рисунок 9. Зависимость задержки ответов клеток исследуемых линий на ацетилхолин от его концентрации. Адаптировано из [103].

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) определялось как интервал времени, необходимый для достижения Ca^{2+} -ответом половины своего максимального значения.

Б – Зависимость длительности задержки ответа от концентрации агониста. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 61, 56, 58$ и 49 (WT-НЕК, $\text{IP}_3\text{R1}$ -НЕК, $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК, соответственно).

В целом, результаты, представленные на рисунках 8 и 9, показывают, что экспрессия хотя бы одной изоформы IP_3 -рецептора достаточна для генерации Ca^{2+} -ответов на ACh. Это верифицирует выводы ингибиторного анализа о том, что фосфоинозитидный каскад играет принципиальную роль (Рисунок 2), а рианодиновые рецепторы вносят пренебрежимый вклад (Рисунок 3В) в Ca^{2+} -сигналикацию, инициируемую исследованными агонистами.

Следует отметить, что интерпретация описанных выше экспериментов с генетически модифицированными клетками проводилась, неявно предполагая, что внесение инактивирующих мутаций в гены IP_3 -рецепторов не затронуло другие элементы фосфоинозитидного каскада. Между тем, редактирование генома с использованием CRISPR/Cas9 методологии теоретически могло влиять на экспрессию других белков. Поэтому в нашей лаборатории помимо транскриптов мускариновых рецепторов (Рисунок 4А), в линиях WT-, $\text{IP}_3\text{R1}$ -, $\text{IP}_3\text{R2}$ - и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК были оценены относительные уровни транскриптов нескольких нижестоящих сигнальных белков, которые потенциально могли быть вовлечены в трансдукцию сигнала ACh, включая белки Gq и Gi1-3, которые сопрягают различные GPCR с PLC β 1-4, регулируемые G-белком (Рисунок 1П Б, В) [111].

Соответствующие данные представлены в Приложении (Рисунок 1П). Данные транскриптомного анализа позволили прийти к заключению, что различия в чувствительности к ACh клеточных линий IP₃R1-НЕК, IP₃R1-НЕК и IP₃R3-НЕК обусловлены не нарушениями, внесёнными в систему трансдукции геномным редактированием, а исключительно свойствами изоформы IP₃-рецептора, который экспрессируется в каждой из них.

3.3. Оценка вклада IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3 в утечку депонированного Ca²⁺ в клетках WT-, IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК

Одной из задач, для решения которых полезны клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора, была оценка вклада спонтанной активности IP₃-рецепторов в утечку Ca²⁺ из ЭР в покое. Прежде чем приступить к изложению методологии, использованной в наших экспериментах для решения этой задачи, рассмотрим упрощённо систему Ca²⁺-гомеостаза в клетке.

Клетки используют несколько транспортных систем для поддержания стационарного уровня Ca²⁺ в цитозоле в покое и для генерации Ca²⁺-сигналов в ответ на внешние стимулы [58; 67]. Уровень цитозольного Ca²⁺ определяется потоками Ca²⁺ через плазмалемму, мембраны ЭР и Ca²⁺-аккумулирующих органелл, включая митохондрии, кислые лизосомы и аппарат Гольджи.

Проницаемость мембраны ЭР для Ca²⁺ детерминирована IP₃-рецепторами, каналами Ca²⁺-утечки и Ca²⁺-АТФазой SERCA. В состоянии покоя уровень свободного Ca²⁺ в просвете ЭР, который колеблется от 300 до 800 мкМ [112], определяется балансом между активным пополнением ЭР Ca²⁺-АТФазой SERCA и пассивной утечкой Ca²⁺ [58]. Последняя определяется совокупной активностью каналов утечки [52] и спонтанной активностью IP₃-рецепторов в покое. На плазматической мембране функционирует множество Ca²⁺-проницаемых каналов, в том числе депо-управляемые Ca²⁺-каналы (SOCC), плазматическая Ca²⁺-АТФаза PMCA и Na⁺/Ca²⁺-обменник (Рисунок 10А). Перечисленные выше основные транспортные системы обеспечивают устойчивый уровень Ca²⁺ в ЭР и в цитозоле в состоянии покоя и быструю мобилизацию Ca²⁺ при стимуляции клеток, а также эффективную релаксацию цитозольного Ca²⁺ и пополнение запасов Ca²⁺ в ЭР после снятия возбуждения [58; 112; 113].

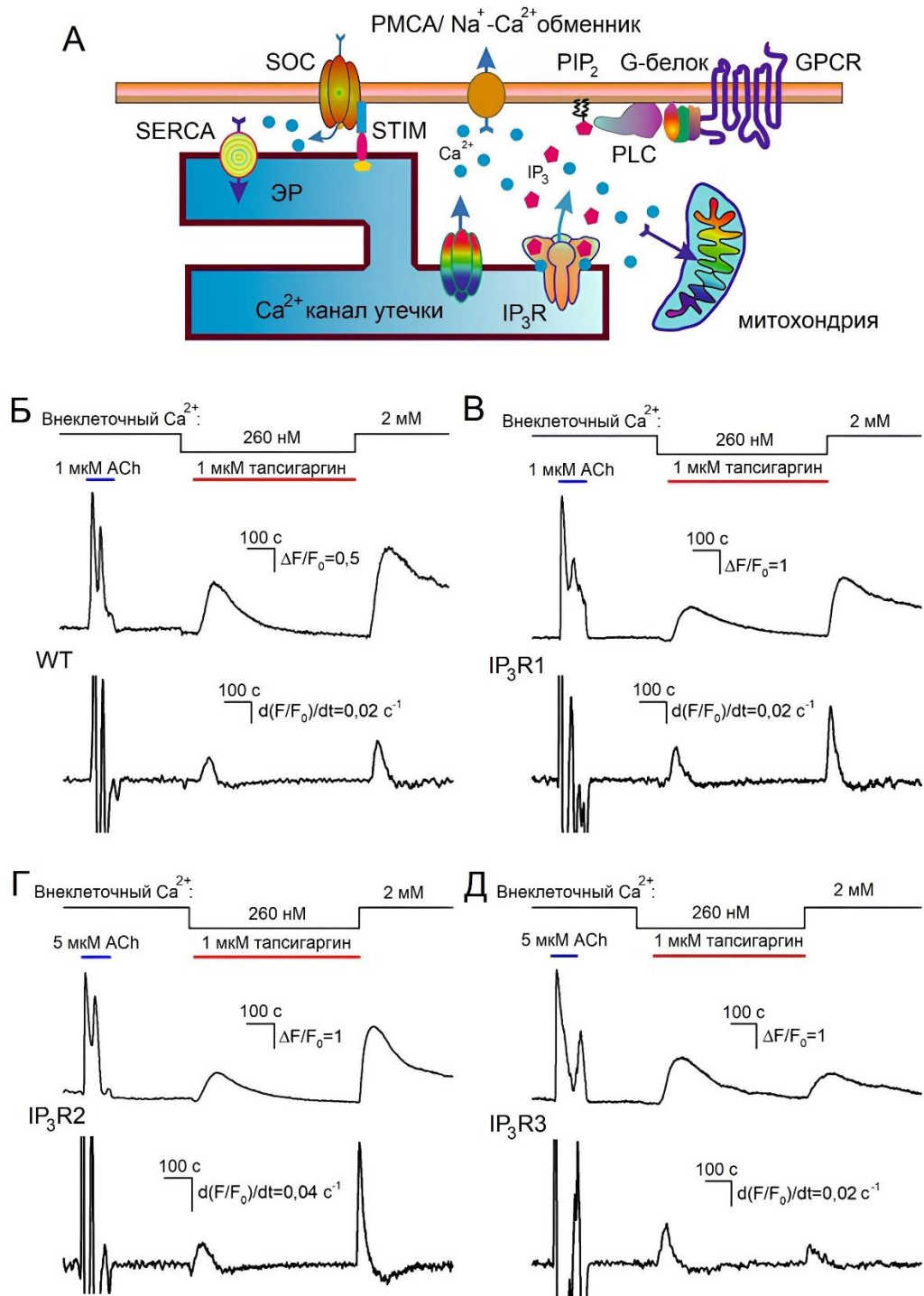


Рисунок 10. Ca^{2+} -сигналы, связанные с ингибированием SERCA тапсигаргином и истощением запасов Ca^{2+} в ЭР. Адаптировано из [103].

А – Схема, демонстрирующая основные процессы, вносящие вклад в Ca^{2+} -гомеостаз.

Б–Д, верхние кривые – Репрезентативные регистрации Ca^{2+} -сигналов, вызванных в клетках WT-НЕК ($n = 149$) (**Б**), IP₃R1-НЕК ($n = 135$) (**В**), IP₃R2-НЕК ($n = 101$) (**Г**), IP₃R3-НЕК ($n = 117$) (**Д**) в присутствии 1-5 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–Д, нижние кривые – Производные $d(F/F_0)/dt$ верхних кривых. Максимальные значения первого и второго пиков принимали за скорость высвобождения Ca^{2+} (R_r) и входа Ca^{2+} (R_e) соответственно.

Мы использовали классический тапсигаргиновый тест для выяснения роли спонтанной активности IP_3 -рецепторов в утечке Ca^{2+} из ЭР. Стоит отметить, что для упрощения рисунков, результаты экспериментов с клетками линии ТКО-НЕК вынесены в пункт 3.4. Схема экспериментов была следующей: сначала клетки стимулировали ACh в насыщающей концентрации (1–5 мкМ), и в случае, если Ca^{2+} -ответ был быстрым и превышал 2 в терминах $\Delta F/F_0$ (Рисунок 10 Б–Д), то системы Ca^{2+} -гомеостаза в данной клетке считались достаточно функциональными. Затем клетки инкубировали в присутствии 1 мкМ тапсигаргина, ингибирующего SERCA, в условиях пониженного внеклеточного Ca^{2+} (260 нМ). Это снижало поток наружного Ca^{2+} на четыре порядка, делая пренебрежимым его вклад во внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы. Отметим, что полное и продолжительное удаление внеклеточного Ca^{2+} с помощью EGTA приводило клетки в нефункциональное состояние, поэтому концентрацию внеклеточного Ca^{2+} снижали с 2 мМ только до 260 нМ. В этих условиях Ca^{2+} -ответы, инициируемые аппликацией тапсигаргина (Рисунок 10 Б–Д), были вызваны утечкой Ca^{2+} из ЭР, что опустошало Ca^{2+} -депо и стимулировало активность SOC-каналов, однако это не сопровождалось детектируемым SOCE за счёт низкого Ca^{2+} во внеклеточном растворе. После инкубации тапсигаргином в течение 600 с (интервал, обеспечивающий релаксацию внутриклеточного Ca^{2+} до исходного уровня) концентрацию внеклеточного Ca^{2+} возвращали к 2 мМ, инициируя существенный SOCE и заметные Ca^{2+} -ответы (Рисунок 10 Б–Д, верхние кривые). Для количественного описания выброса депонированного Ca^{2+} и входа наружного Ca^{2+} кривые регистрации Ca^{2+} -сигналов в отдельных клетках (Рисунок 10 Б–Д, верхние кривые) дифференцировались по времени, что позволяло оценить максимальные скорости выброса Ca^{2+} (R_r – rate of release) и входа Ca^{2+} (R_e – rate of entry) по соответствующим локальным максимумам на кривой $d(F/F_0)/dt$ (Рисунок 10 Б–Д, пики на нижних кривых).

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 (Рисунок 11). Это означало, что каждая конкретная клеточная линия могла включать 2–3 клеточные субпопуляции, различающиеся утечкой Ca^{2+} и SOCE. Возможно, уровни депонированного Ca^{2+} , активности каналов утечки Ca^{2+} и

насосов Ca^{2+} , а также взаимодействия Ca^{2+} -депо с SOC-каналами варьировали от клетки к клетке.

Как бы то ни было, экспериментальные гистограммы выявили различия между клетками WT-, $\text{IP}_3\text{R1}$ -, $\text{IP}_3\text{R2}$ - и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК как по высвобождению Ca^{2+} , индуцированному тапсигаргином, так и по SOCE. В частности, гистограммы R_f для клеток WT- и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК были шире и сдвинуты вправо по сравнению с гистограммами R_f , полученными для клеток $\text{IP}_3\text{R1}$ - и $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК (Рисунок 11, левые панели). Это указывало на то, что утечка Ca^{2+} в клетках WT- и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК была более интенсивной, чем в клетках $\text{IP}_3\text{R1}$ - и $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК.

Гистограммы, полученные для SOCE, наблюдаемого после опустошения Ca^{2+} -депо в течение 600 с, также были достаточно специфичны для индивидуальных клеточных линий (Рисунок 11, средние панели). В то время как клетки $\text{IP}_3\text{R1}$ - и $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК были сопоставимы по распределению и среднему значению SOCE после истощения Ca^{2+} -депо тапсигаргином (Рисунок 11, средние панели $\text{IP}_3\text{R1}$ и $\text{IP}_3\text{R3}$), активность SOC была выше в клетках $\text{IP}_3\text{R2}$ - и WT-НЕК (Рисунок 11, средние панели WT и $\text{IP}_3\text{R2}$), где $\text{IP}_3\text{R2}$ является функционально доминирующей изоформой [103]. Это указывало на возможность того, что $\text{IP}_3\text{R2}$ функционально сопряжены с Ca^{2+} -каналами, опосредующими SOCE в клетках WT- и $\text{IP}_3\text{R2}$ -НЕК. В поддержку возможности такого сопряжения свидетельствуют полученные ранее факты. Так, в клетках гепатомы печени Н4ПЕ, в которых экспрессируются все три изоформы IP_3 -рецептора, активность $\text{IP}_3\text{R1}$ (в меньшей степени $\text{IP}_3\text{R3}$, но не $\text{IP}_3\text{R2}$) необходима для активации CRAC, обеспечивающих определенную форму SOCE [114]. О возможности сопряжения IP_3 -рецепторов, как минимум функционального, с SERCA свидетельствует то, что в клетках WT-НЕК сверхэкспрессия $\text{IP}_3\text{R1}$ и $\text{IP}_3\text{R3}$ увеличивала загрузку Ca^{2+} в ЭР и значительно ускоряла релаксацию вызванных тапсигаргином Ca^{2+} -сигналов [70].

По литературным данным, постоянная утечка Ca^{2+} из ЭР, которая приводит к полному опустошению Ca^{2+} -депо при ингибировании SERCA тапсигаргином, опосредуется несколькими белками, включая укороченную версию SERCA SERCA1T, белки семейства TMBIM (Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif-containing), антиапоптотический белок Bcl-2 [58; 59], белки TMCO1, которые способны олигомеризоваться при высоком уровне люминального Ca^{2+} , образуя транзиентные каналы утечки Ca^{2+} [60], а также паннексины, транслоконы, CALHM1, MG23, BL-1 и другие [52]. Помимо этого, утечка Ca^{2+} из депо в покое может происходить за счёт спонтанной активности IP_3 -рецепторов и рианодиновых рецепторов [58; 59].

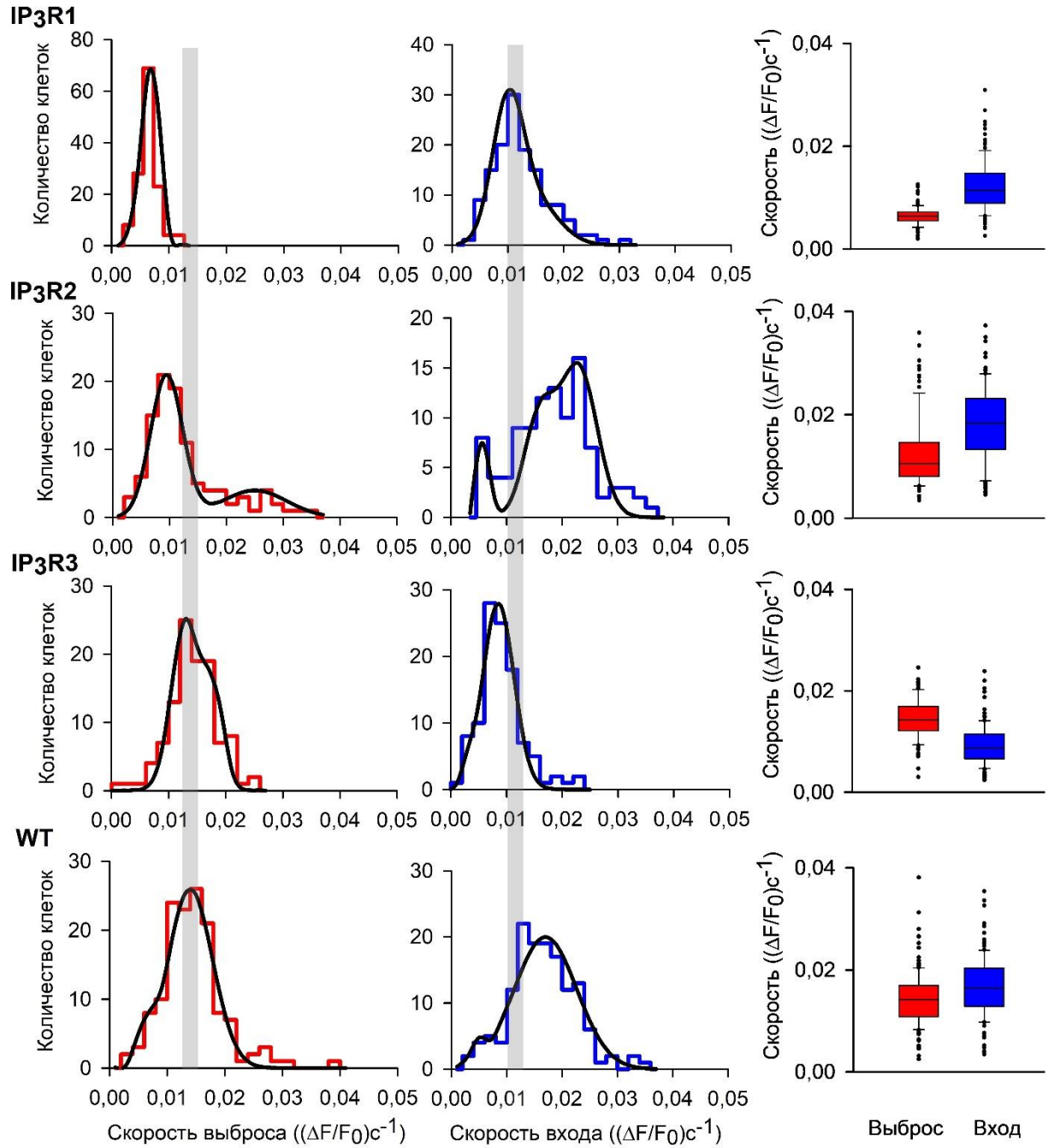


Рисунок 11. Распределение величин R_r (максимальная скорость Ca^{2+} -индуцированного Ca^{2+} -выброса из депо, *левые панели*) и R_e (максимальная скорость Ca^{2+} -входа, *средние панели*) в популяциях клеток линий $\text{IP}_3\text{R1-HEK}$ ($n = 136$), $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$ ($n = 103$), $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$ ($n = 108$), WT-HEK ($n = 141$). Адаптировано из [103]. *Правые панели:* максимальные скорости выброса и входа Ca^{2+} , представленные в виде графиков типа «ящики с усами», на которых отражены максимальное и минимальное значения, а также границы квартилей. 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 IP₃R1: левая панель, $N_1 = 19$, $N_2 = 73$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,004$, $r_2 = 0,007$; $\sigma_1 = 0,001$, $\sigma_2 = 0,002$.
 Для IP₃R1: средняя панель, $N_1 = 27$, $N_2 = 8$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,01$, $r_2 = 0,015$; $\sigma_1 = 0,004$, $\sigma_2 = 0,006$.
 Для IP₃R2: левая панель, $N_1 = 21$, $N_2 = 4$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,0095$, $r_2 = 0,025$; $\sigma_1 = 0,004$, $\sigma_2 = 0,008$.
 Для IP₃R2: средняя панель, $N_1 = 8$, $N_2 = 15$, $N_3 = 10$; $r_1 = 0,006$, $r_2 = 0,023$, $r_3 = 0,016$; $\sigma_1 = 0,0015$, $\sigma_2 = 0,0047$, $\sigma_3 = 0,004$.
 Для IP₃R3: левая панель, $N_1 = 25$, $N_2 = 13$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,013$, $r_2 = 0,018$; $\sigma_1 = 0,0035$, $\sigma_2 = 0,0025$.
 Для IP₃R3: средняя панель, $N_1 = 5$, $N_2 = 28$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,0025$, $r_2 = 0,0085$; $\sigma_1 = 0,0005$, $\sigma_2 = 0,004$.
 Для WT: левая панель, $N_1 = 5$, $N_2 = 26$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,006$, $r_2 = 0,014$; $\sigma_1 = 0,0015$, $\sigma_2 = 0,0055$.
 Для WT: средняя панель, $N_1 = 3$, $N_2 = 20$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,0045$, $r_2 = 0,017$; $\sigma_1 = 0,0015$, $\sigma_2 = 0,008$.

3.3.1. Рианодиновые рецепторы вносят незначительный вклад в утечку Ca^{2+} из ЭР

Для оценки возможного вклада рианодиновых рецепторов в утечку Ca^{2+} из ЭР в клетках WT-НЕК также использовался классический тапсигаргиновый тест. В целом, методика была такой же, как и в описанных выше экспериментах (Рисунок 10). Ca^{2+} -сигналы, вызванные тапсигаргином, анализировались в контроле и в присутствии 30 мкМ ингибитора рианодиновых рецепторов рианодина. Тестируемые клетки изначально стимулировались 1 мкМ ACh, и гомеостаз Ca^{2+} в данной клетке считался достаточно надёжным, если её Ca^{2+} -ответ на агонист был быстрым в терминах $\Delta F/F_0 > 2$ (Рисунок 12А). В контроле клетки инкубировали в присутствии 1 мкМ тапсигаргина и 260 нМ Ca^{2+} во внеклеточном растворе, чтобы сделать вклад Ca^{2+} -входа во внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы незначительным. В этих условиях вызванные тапсигаргином Ca^{2+} -ответы были вызваны утечкой Ca^{2+} из ЭР, что опустошало Ca^{2+} -депо. После инкубации тапсигаргином в течение 600 с (интервал, обеспечивающий релаксацию внутриклеточного Ca^{2+} до исходного уровня) концентрацию внеклеточного Ca^{2+} возвращали к 2 мМ, инициируя существенный SOCE и заметные Ca^{2+} -ответы (Рисунок 12А). В ряде экспериментов клетки сначала предынкубировали с 30 мкМ рианодина, а затем в раствор добавляли тапсигаргин, и ингибирование активности рианодиновых рецепторов не оказывало очевидного влияния на высвобождение Ca^{2+} , вызванное тапсигаргином (Рисунок 12Б). Для количественной оценки были продифференцированы кривые регистрации Ca^{2+} -сигналов отдельных клеток, максимальные скорости высвобождения Ca^{2+} были определены как соответствующий локальный максимум на кривых $d(F/F_0)/dt$, как показано на рисунке 10 Б–Д. Оказалось, что скорости высвобождения Ca^{2+} , вызванного тапсигаргином, в контроле и в присутствии рианодина были статистически неразличимы (t-критерий Стьюдента, $p <$

0,01) (Рисунок 12В), что предполагает незначительный вклад рианодиновых рецепторов в утечку Ca^{2+} из ЭР.

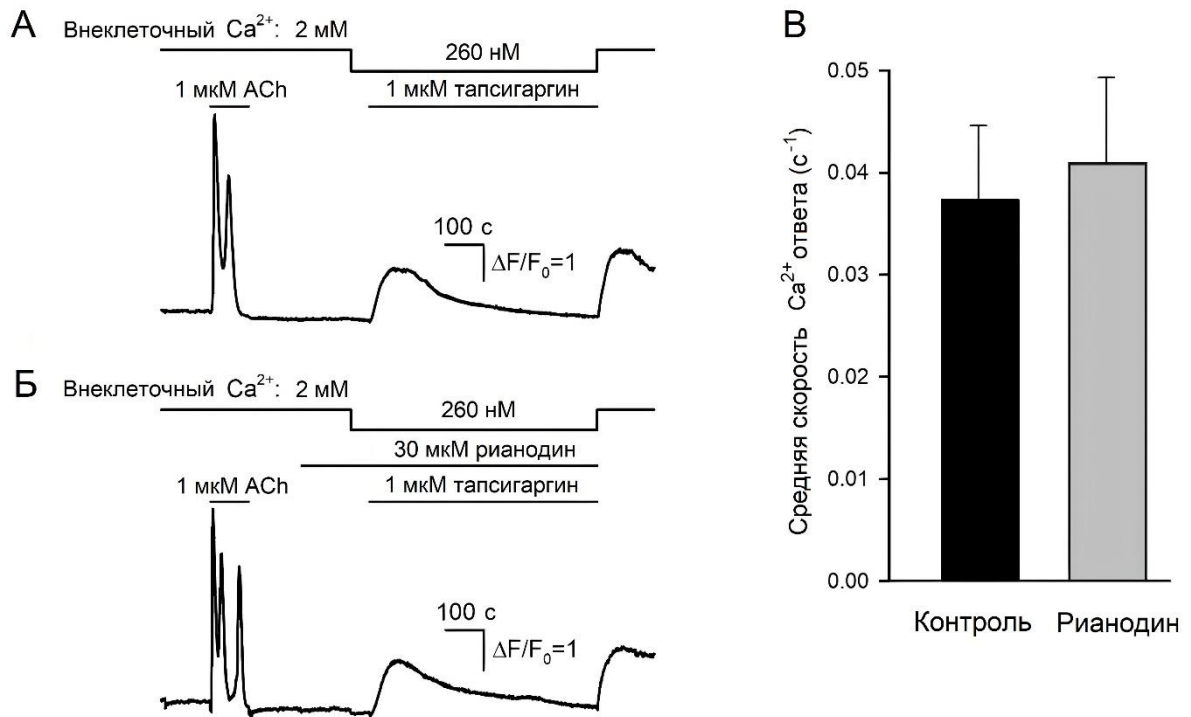


Рисунок 12. Ca^{2+} -сигналы, связанные с ингибированием SERCA тапсигаргином и истощением запасов Ca^{2+} в ЭР. Адаптировано из [103].

А, Б – Репрезентативные регистрации Ca^{2+} -сигналов, вызванные в клетках WT-НЕК в контроле ($n = 149$) (**А**) и в присутствии 30 мкМ рианодина ($n = 110$) (**Б**).

В – Отсутствие статистически значимой разницы между усреднёнными скоростями высвобождения Ca^{2+} , вызванного тапсигаргином, в контроле и в присутствии 30 мкМ рианодина (критерий Mann-Whitney, $p = 0,104$). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 149/110$ контроль/рианодин).

3.3.2. Оценка Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР

Определенная часть наших усилий была посвящена попытке оценить вклад IP_3 -рецепторов в Ca^{2+} -утечку, используя данные о скоростях выброса Ca^{2+} из ЭР в условиях тапсигаргинового теста (Рисунки 10, 11). Обращало внимание на себя то обстоятельство, что гистограмма начальных скоростей выброса Ca^{2+} для клеток $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$ была сдвинута вправо по отношению к гистограммам, полученных для клеток $\text{IP}_3\text{R1-НЕК}$ и $\text{IP}_3\text{R2-НЕК}$ (Рисунок 11, левые панели). Между тем, изоформа $\text{IP}_3\text{R3}$ характеризуется существенно меньшей аффинностью к IP_3 , а значит, должна иметь наименьшую спонтанную активность при прочих равных условиях. Можно было поэтому ожидать, что Ca^{2+} -проницаемость мембраны ЭР в клетках $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$ должна была быть наименьшей, что, на первый взгляд, не соответствовало факту, что клетки $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$ показали в среднем

большие начальные скорости высвобождения Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином (Рисунок 11, левая нижняя панель). Следует, однако, отметить, что скорость высвобождения Ca^{2+} зависит не только от проницаемости мембран ЭР для ионов Ca^{2+} , но и от уровня депонированного Ca^{2+} . Таким образом, скорость высвобождения Ca^{2+} не может служить независимым показателем проницаемости ЭР для Ca^{2+} . Для решения этой проблемы, мы редуцировали модель агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигналикации [14], чтобы описать Ca^{2+} -сигналы, цитозольные и ретикулярные, в условиях тапсигаргинового теста (см. Приложение). В итоге нами было получено соотношение для оценки относительной Ca^{2+} -проницаемости P мембраны ЭР, в соответствии с которым P пропорционально отношению:

$$P \sim \frac{\frac{dC}{dt}(0)}{\int_0^T C dt} \quad (2)$$

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 (Рисунок 13А).

Чтобы использовать данное соотношение, мы предположили, что флуоресценция Fluo-8 была значительно ниже уровня насыщения, учитывая, что Ca^{2+} -сигналы, индуцированные тапсигаргином, не превышали 2 в терминах $\Delta F/F_0$ (Рисунок 13А), в то время как динамический диапазон этого Ca^{2+} -зонда составляет не менее 100 [115]. Таким образом, 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+} (Рисунок 10 Б–Д, нижние панели), так и площадь под кривой, характеризующей степень выхода Ca^{2+} из депо (Рисунок 13А, заштрихованная область). Соответствующие гистограммы, полученные для конкретных изоформ IP_3 -рецептора, представлены на рисунке 13 Б–Г. Как показано, тапсигаргин индуцировал гораздо более масштабное высвобождение Ca^{2+} в клетках $\text{IP}_3\text{R3-HEK}$ (Рисунок 13Г, средняя панель) по сравнению с клетками $\text{IP}_3\text{R1-}$ и $\text{IP}_3\text{R2-HEK}$ (Рисунок 13 Б, В, средние панели).

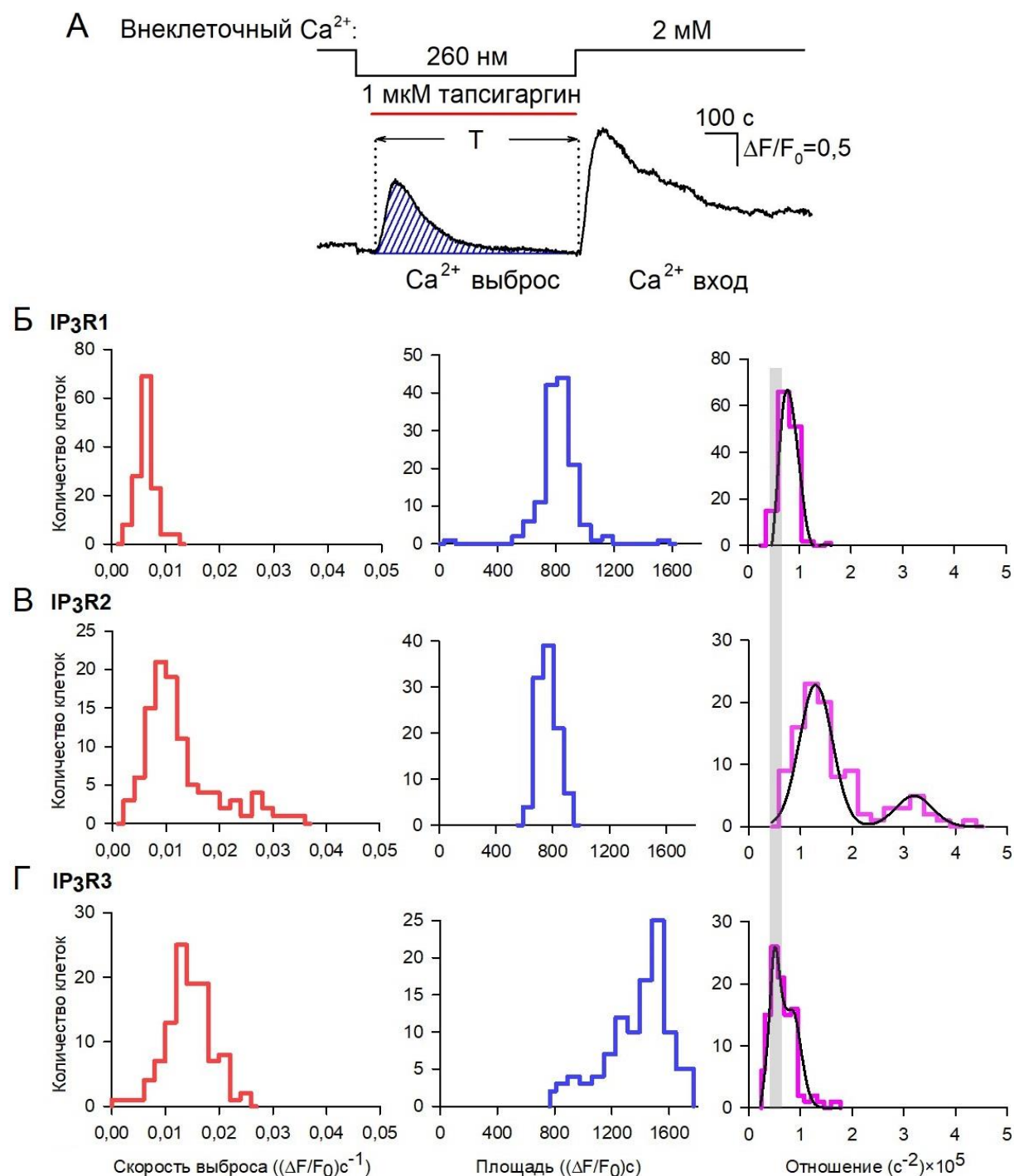


Рисунок 13. Оценка Ca^{2+} -проницаемости мембраны чувствительных к тапсигаргину Ca^{2+} -депо. Адаптировано из [103].

А – Колоколообразный Ca^{2+} -ответ, вызванный тапсигаргин-индуцированным высвобождением Ca^{2+} . Значение заштрихованной площади под кривой, соответствующее $\int_0^T C dt$ в уравнении (2), рассчитывали численно.

Б–Г – 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 ($n = 101$) и IP₃R3-НЕК ($n = 117$). 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.
 Для IP₃R1: $N_1 = 62$, $N_2 = 49$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,72$, $r_2 = 0,95$; $\sigma_1 = 0,1$, $\sigma_2 = 0,15$.
 Для IP₃R2: $N_1 = 23$, $N_2 = 5$, $N_3 = 0$; $r_1 = 1,3$, $r_2 = 3,2$; $\sigma_1 = 0,45$, $\sigma_2 = 0,5$.
 Для IP₃R3: $N_1 = 23$, $N_2 = 16$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,5$, $r_2 = 0,83$; $\sigma_1 = 0,5$, $\sigma_2 = 0,25$.

Затем с использованием уравнения 2 были рассчитаны относительные значения Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР для каждой клетки и получено их распределение среди клеток определенного подтипа (Рисунок 13 Б–Г, правые панели). В итоге были получены следующие оценки относительных значений (P) Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР для клеток IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК:

$$P_{\text{IP}_3\text{R1}} : P_{\text{IP}_3\text{R2}} : P_{\text{IP}_3\text{R3}} = 1 : 1,75 : 0,45$$

Таким образом, по относительной Ca^{2+} -проницаемости мембраны ЭР, клетки различных линий должны располагаться как:

$$\text{IP}_3\text{R2-НЕК} > \text{IP}_3\text{R1-НЕК} > \text{IP}_3\text{R3-НЕК}$$

Качественно эта последовательность идентична ряду вероятностей открытого состояния канала в условиях, близких к состоянию покоя в клетке (100 нМ Ca^{2+} , 1 мкМ IP₃), которые были оценены как $\sim 0,3$, $0,1$ и $< 0,1$ для одиночных каналов IP₃R2, IP₃R1 и IP₃R3, соответственно [81]. Такое соответствие можно было бы ожидать, если бы спонтанная активность IP₃-рецепторов была существенным фактором утечки Ca^{2+} из ЭР. Действительно, чем активнее IP₃-рецепторы при базальном уровне IP₃, тем выше отток Ca^{2+} , который он опосредует. Более того, данные, характеризующие высвобождение Ca^{2+} в течение 600-секундного интервала (Рисунок 13 Б–Г, средние панели), позволяют предположить, что уровень покоя Ca^{2+} в регулируемых IP₃ Ca^{2+} -депо в клетках IP₃R3-НЕК существенно выше, чем в клетках IP₃R2- НЕК и IP₃R1-НЕК при условии, что объём ЭР одинаков во всех случаях.

3.4. Клетки ТКО-НЕК

В качестве дополнительного контроля мы провели ряд экспериментов с клетками линии ТКО-НЕК, в которой были инактивированы все три гена IP₃-рецептора. Ожидаемо, данные клетки не генерировали Ca^{2+} -ответы при стимуляции ACh, АТР, по отдельности или в сочетании (Рисунок 14). В то же время, аппликация иономицина (5 мкМ) в конце регистрации инициировала значительный Ca^{2+} -сигнал, свидетельствуя о том, что система мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} была вполне функциональна. Результаты, представленные на рисунке 14, а также на рисунках 8 и 9, показывают, что экспрессия

хотя бы одной изоформы IP_3 -рецептора необходима и достаточна для генерации Ca^{2+} -ответов на ACh.

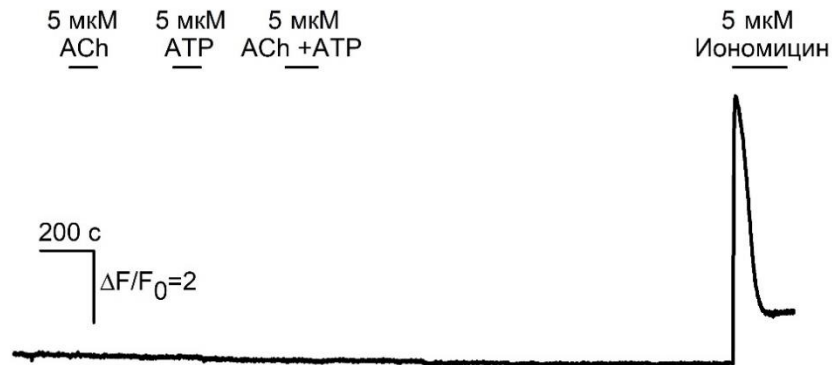


Рисунок 14. Репрезентативная регистрация изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в одиночной клетке линии ТКО-НЕК ($n = 61$). Продemonстрировано отсутствие генерации Ca^{2+} -ответов при стимуляции 5 мкМ ACh, 5 мкМ АТР и их смесью. При этом стимуляция 5 мкМ иономицина вызывает рост цитозольного Ca^{2+} .

С клетками линии ТКО-НЕК был проведён классический тапсигаргиновый тест для оценки скорости утечки Ca^{2+} из депо при отсутствии функционирующих IP_3 -рецепторов, а также для оценки Ca^{2+} -проницаемости мембраны чувствительных к тапсигаргину Ca^{2+} -депо. Результаты данной серии экспериментов сравнивали с аналогичными результатами, полученными на клетках линии IP_3R3 -НЕК, так как изоформа IP_3R3 имеет наименьшую спонтанную активность относительно остальных изоформ (Рисунок 13).

Эксперимент проводили по схеме, описанной в пункте 3.3. Сначала клетки стимулировали ацетилхолином, но генерации Ca^{2+} -сигналов не происходило (Рисунок 14). Затем клетки инкубировали в присутствии 1 мкМ тапсигаргина, ингибирующего SERCA, в условиях пониженного внеклеточного Ca^{2+} (260 нМ), вследствие чего клетки генерировали Ca^{2+} -ответы, вызванные утечкой Ca^{2+} из ЭР. В данном эксперименте клетки инкубировали в растворе с тапсигаргином 900 с, а не 600 с, как в случае клеток остальных линий, так как в клетках ТКО-НЕК релаксация цитозольного Ca^{2+} к базальному уровню и, соответственно, опустошение их ЭР занимали большее время. После инкубации тапсигаргином концентрацию внеклеточного Ca^{2+} возвращали к 2 мМ, инициируя существенный SOCE и заметные Ca^{2+} -ответы.

Так же, как и в п. 3.3., для количественного описания высвобождения и входа Ca^{2+} кривые регистрации Ca^{2+} -сигналов в отдельных клетках были продифференцированы, а максимальные скорости выброса Ca^{2+} (R_r – rate of release) и входа Ca^{2+} (R_e – rate of entry)

были определены как соответствующие локальные максимумы на кривой $d(F/F_0)/dt$, как показано на рисунке 10. На основании полученных данных были построены гистограммы, характеризующие распределение R_r и R_e среди клеток линии ТКО-НЕК (Рисунок 15).

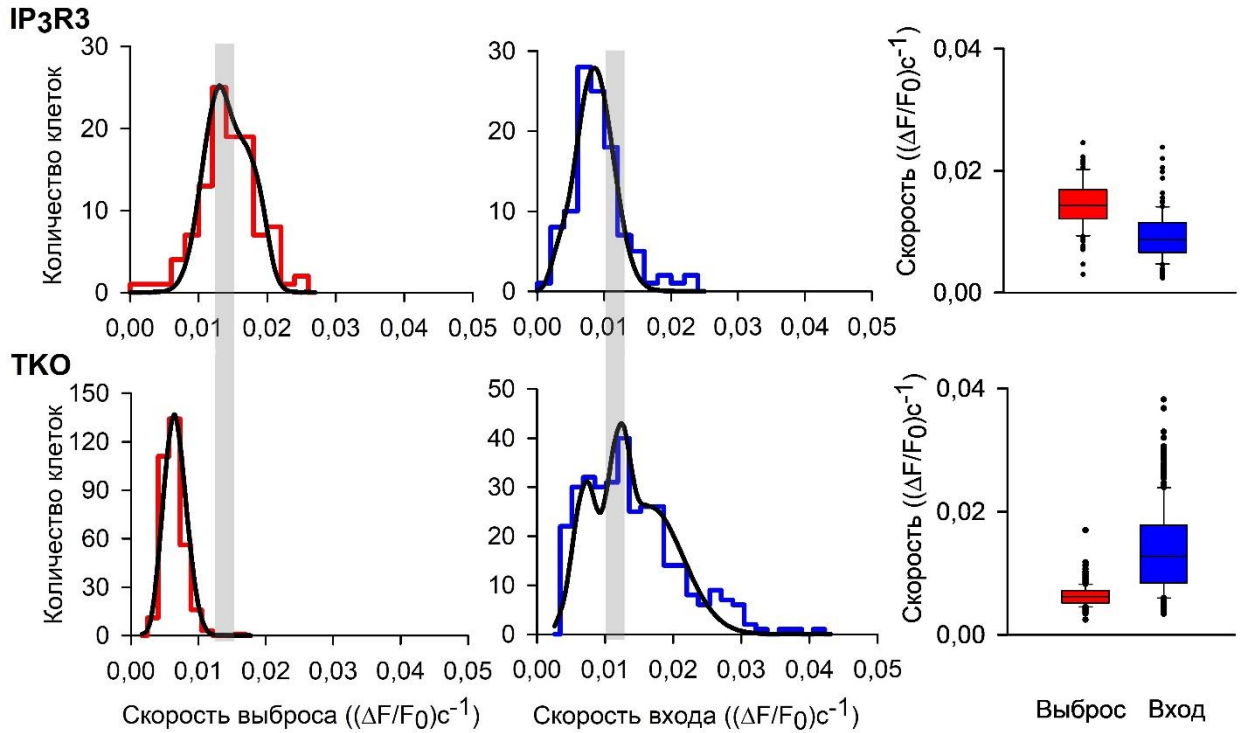


Рисунок 15. Распределение величин R_r (максимальная скорость Ca^{2+} -индуцированного Ca^{2+} -выброса из депо, *левые панели*) и R_e (максимальная скорость Ca^{2+} -входа, *средние панели*) в популяциях клеток линий $\text{IP}_3\text{R3}$ -НЕК ($n = 108$) и ТКО-НЕК ($n = 332$). Адаптировано из [103]. *Правые панели:* максимальные скорости выброса и входа, представленные в виде графиков типа «ящики с усами», на которых отражены максимальное и минимальное значения, а также границы квартилей. Каждая экспериментальная гистограмма была аппроксимирована (*плавные линии*) с использованием уравнения:

$$N(r) = N_1 e^{-\left(\frac{r-r_1}{\sigma_1}\right)^2} + N_2 e^{-\left(\frac{r-r_2}{\sigma_2}\right)^2} + N_3 e^{-\left(\frac{r-r_3}{\sigma_3}\right)^2}, \text{ где } N(r) - \text{количество клеток,}$$

скорость высвобождения/входа Ca^{2+} в которых равна r , а N_i , r_i и σ_i являются константами.

Для $\text{IP}_3\text{R3}$: левая панель, $N_1 = 25$, $N_2 = 13$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,013$, $r_2 = 0,018$; $\sigma_1 = 0,0035$, $\sigma_2 = 0,0025$.

Для $\text{IP}_3\text{R3}$: средняя панель, $N_1 = 5$, $N_2 = 28$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,0025$, $r_2 = 0,0085$; $\sigma_1 = 0,0005$, $\sigma_2 = 0,004$.

Для ТКО: левая панель, $N_1 = 118$, $N_2 = 45$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,006$, $r_2 = 0,008$; $\sigma_1 = 0,002$, $\sigma_2 = 0,002$.

Для ТКО: средняя панель, $N_1 = 27$, $N_2 = 26$, $N_3 = 26$; $r_1 = 0,007$, $r_2 = 0,0165$, $r_3 = 0,012$; $\sigma_1 = 0,0025$, $\sigma_2 = 0,007$, $\sigma_3 = 0,002$.

Экспериментальные гистограммы выявили различия между клетками $\text{IP}_3\text{R3}$ - и ТКО-НЕК как по высвобождению Ca^{2+} , индуцированному тапсигаргином, так и по SOCE.

В частности, гистограмма R_f для клеток IP₃R3-НЕК была шире и сдвинута вправо по сравнению с гистограммой, полученной для ТКО-НЕК (Рисунок 15, левые панели), что ожидаемо указывало на менее интенсивную утечку Ca^{2+} из депо в клетках ТКО-НЕК.

При этом гистограмма, полученная для SOCE (Рисунок 15, средние панели), вызванного после опустошения Ca^{2+} -депо в течение 900 с, в случае клеток ТКО-НЕК, была шире и сдвинута вправо относительно гистограммы, полученной для клеток IP₃R3-НЕК. Как следствие такого распределения, SOCE в клетках ТКО-НЕК оказался выше такового в клетках IP₃R3-НЕК примерно на 50%. Возможно, это связано с тем, что в отсутствие IP₃-рецепторов и, следовательно, при минимальной Ca^{2+} -утечке в клетках ТКО-НЕК, уровень Ca^{2+} в ЭР максимален, вследствие чего индивидуальные SOC-каналы относительно менее активны. Отметим, что в невозбужденных клетках SOC-каналы являются существенным фактором входа наружного Ca^{2+} . Поэтому для поддержания физиологически адекватного уровня цитозольного Ca^{2+} в покое требуется большее количество SOC-каналов, если активность индивидуальных каналов меньше. Возможно, именно это отражает тот факт, что SOCE в клетках ТКО-НЕК существенно выше, чем в клетках IP₃R3-НЕК.

Значения максимальных скоростей Ca^{2+} -выброса из депо (R_f), полученные для клеток всех линий, представлены на рисунке 16. Оказалось, что скорости высвобождения Ca^{2+} , вызванного тапсигаргином, различаются между клетками всех линий, кроме IP₃R1-НЕК и ТКО-НЕК.

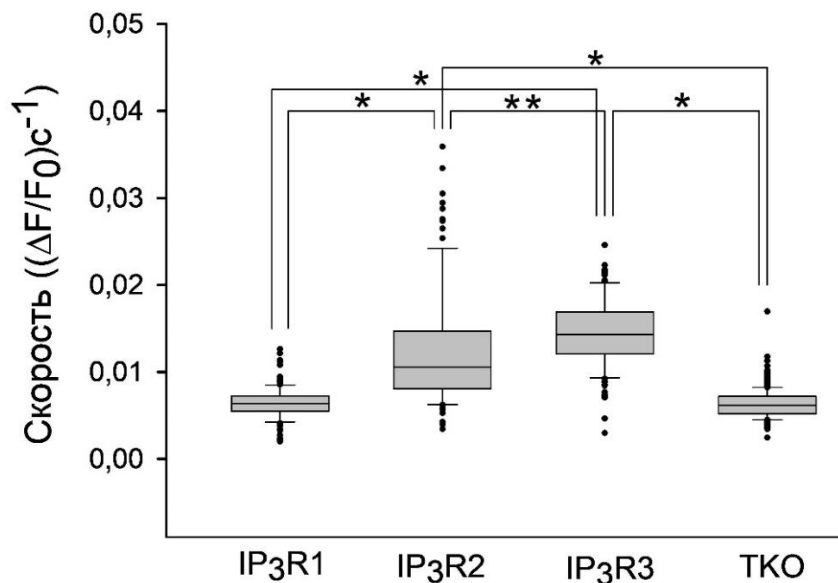


Рисунок 16. Максимальные скорости Ca^{2+} -индуцированного Ca^{2+} -выброса из депо в популяциях клеток линий IP₃R1-НЕК ($n = 136$), IP₃R2-НЕК ($n = 103$), IP₃R3-НЕК ($n = 108$), и ТКО-НЕК ($n = 332$). Данные представлены в виде графиков типа «ящики с усами», на которых отражены максимальное и минимальное значения, а также границы квартилей.

Звёздочки указывают на статистически значимую разницу (критерий ANOVA on Ranks; $p < 0,001$ ($\square$), $p = 0,008$ ($\square\square$)). Между клетками линий IP₃R1-НЕК и ТКО-НЕК статистически значимой разницы не было.

Аналогично экспериментам, представленным в пункте 3.3, для клеток линии ТКО-НЕК мы получили гистограммы, демонстрирующие распределение начальных скоростей высвобождения Ca²⁺ (Рисунок 17, левые панели), площадь под кривой, характеризующей степень выхода Ca²⁺ из депо (Рисунок 17, средние панели), а также их соотношения (Рисунок 17, правые панели). Как показано, тапсигаргин индуцировал гораздо более масштабное высвобождение Ca²⁺ в клетках IP₃R3-НЕК по сравнению с клетками ТКО-НЕК (Рисунок 17, средние панели), что может говорить о более низком уровне Ca²⁺ в депо клеток ТКО-НЕК в связи с менее активной SERCA.

С использованием уравнения 2 было рассчитано значение Ca²⁺-проницаемости мембраны ЭР для каждой клетки и получено их распределение среди клеток определенного подтипа (Рисунок 17, правые панели). Общий ряд оценки относительных значений (P) Ca²⁺-проницаемости мембраны ЭР для клеток ТКО-НЕК, IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК выглядит следующим образом:

$$P_{IP3R1} : P_{IP3R2} : P_{IP3R3} : P_{TKO} = 1 : 1,75 : 0,45 : 0,41$$

Таким образом, эксперименты с клетками линии ТКО-НЕК подтверждают вклад IP₃-рецепторов в спонтанную утечку Ca²⁺ из депо в состоянии покоя.

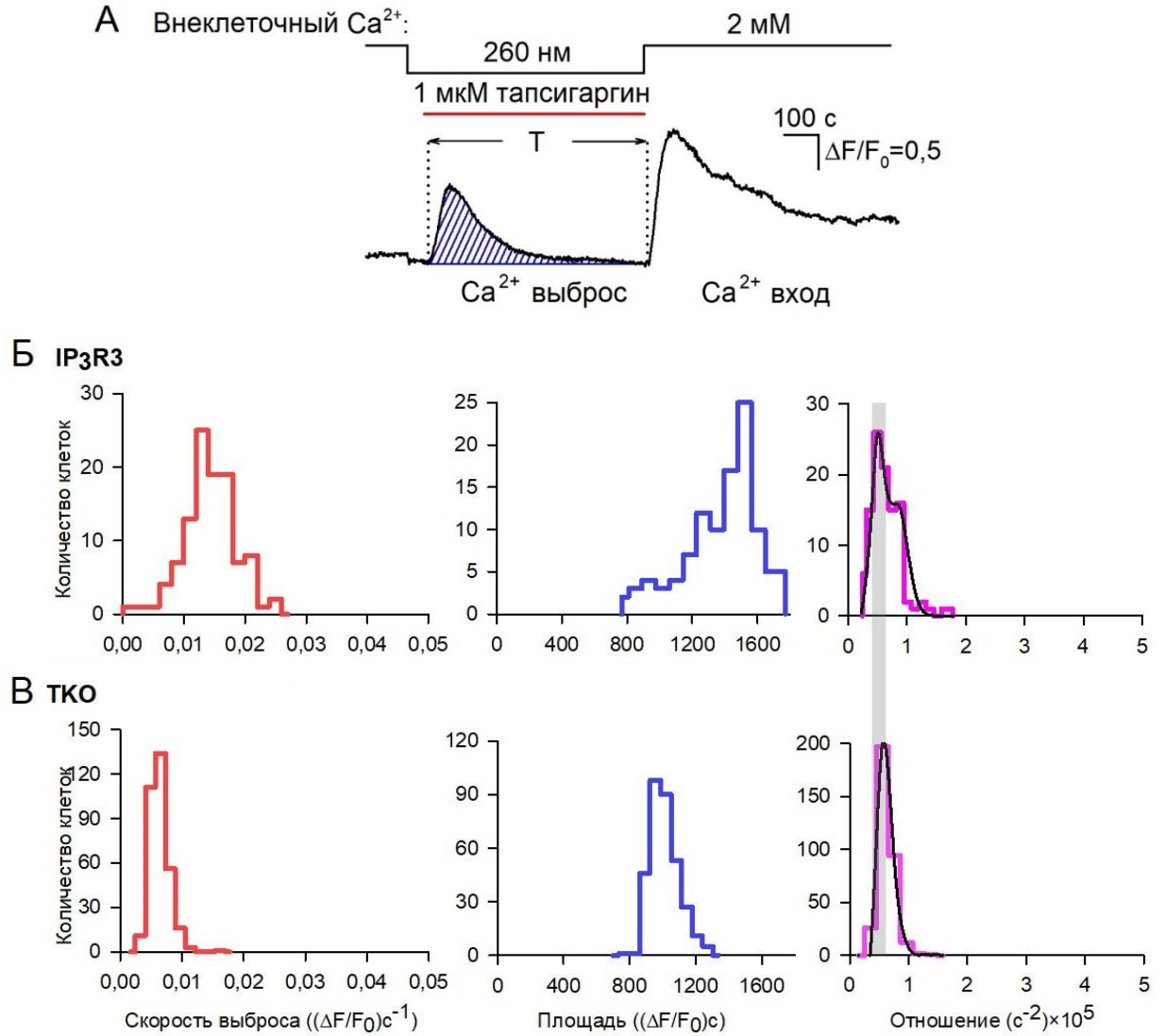


Рисунок 17. Оценка Ca^{2+} -проницаемости мембраны чувствительных к тапсигаргину Ca^{2+} -депо. Адаптировано из [103].

А – Колоколообразный Ca^{2+} -ответ, вызванный тапсигаргин-индуцированным высвобождением Ca^{2+} . Значение заштрихованной площади под кривой, соответствующее $\int_0^T C dt$ в уравнении (2), рассчитывали численно.

Б–В – Распределение скоростей высвобождения Ca^{2+} (левые панели), площадей под кривыми высвобождения Ca^{2+} (средние панели) и их отношения (правые панели) среди популяций клеток 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.

Для IP₃R3: $N_1 = 23$, $N_2 = 16$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,5$, $r_2 = 0,83$; $\sigma_1 = 0,5$, $\sigma_2 = 0,25$.

Для ТКО: $N_1 = 195$, $N_2 = 83$, $N_3 = 0$; $r_1 = 0,54$, $r_2 = 0,76$; $\sigma_1 = 0,1$, $\sigma_2 = 0,15$.

3.5. Клетки IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК с сенсором Ca²⁺ R-CEPIA1er

Для более подробного изучения Ca²⁺-гомеостаза клетки полученных линий IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-НЕК трансфицировали плазмидным вектором pCMV R-CEPIA1er, который кодирует Ca²⁺-сенсор с ретикулярной локализацией R-CEPIA1er [106]. После трансфекции и селекции в присутствии антибиотиков G-418 в течение двух недель большинство (~ 60–70%) клеток проявляло достаточно высокий уровень экспрессии R-CEPIA1er. Загрузка Fluo-8 в полученные клетки позволяла проводить одновременный мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca²⁺ (Рисунок 18). ACh стимулировал Ca²⁺-ответы в цитозоле клеток (Рисунок 18 А–В, верхние панели) и синхронное падение ретикулярного Ca²⁺, который возвращался близко к уровню покоя, несмотря на присутствие агониста в растворе (Рисунок 18 А–В, нижние панели). Ca²⁺-ионофор иономицин (5 мкМ), добавленный в раствор с низким содержанием Ca²⁺ (260 нМ), также запускал цитозольные сигналы Ca²⁺ (Рисунок 18 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 достигаться при уравнивании потоков Ca²⁺, опосредованных SERCA и иономицином. Интересно, что в клетках IP₃R1- и IP₃R3-НЕК иономицин опустошал запасы Ca²⁺ в гораздо большей степени, чем ACh (Рисунок 18 А, В, нижние панели). При этом в клетках IP₃R2-НЕК ACh и иономицин снижали депонированный Ca²⁺ до сопоставимых уровней (Рисунок 18Б, нижняя панель). Это явление можно объяснить взаимодействием Ca²⁺-связывающего белка аннексина А1 (ANXA1) и IP₃-рецептора. Несвязанный с ANXA1 IP₃-рецептор активен, но при увеличении концентрации Ca²⁺ в просвете ЭР (> 100 мкМ) ANXA1 ингибирует IP₃-рецепторы [84]. Такая регуляция может объяснить, почему, в отличие от клеток IP₃R1-НЕК и IP₃R3-НЕК, ACh и иономицин снижают депонированный Ca²⁺ до близких уровней в клетках IP₃R2-НЕК. Действительно, наши результаты показывают, что проницаемость ЭР для Ca²⁺ является самой высокой именно в клетках IP₃R2-НЕК (Рисунок 13 Б–Г, правые панели). Можно поэтому ожидать, что в клетках IP₃R2-НЕК уровень люминального Ca²⁺ 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-НЕК в меньшей степени ингибированы белком ANXA1, и несмотря на более низкий уровень люминального Ca²⁺, таковые обеспечивают более интенсивную утечку Ca²⁺ по сравнению с IP₃-рецепторами в клетках IP₃R1-НЕК и IP₃R3-НЕК.

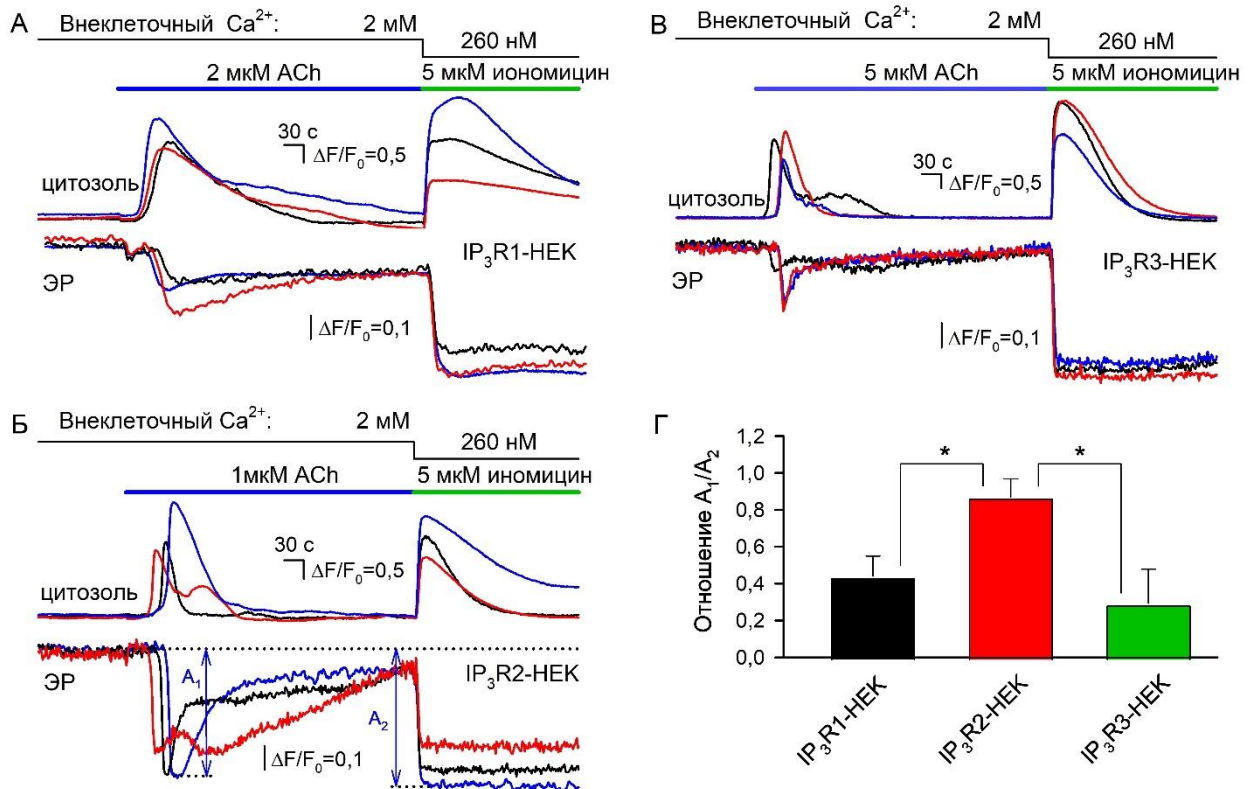


Рисунок 18. Одновременный мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca²⁺ в клетках, загруженных Fluo-8 и экспрессирующих сенсор Ca²⁺ R-CEPIA1ег. Адаптировано из [103].

А–Б – Репрезентативные регистрации Ca²⁺-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 Ca²⁺ и 5 мкМ иономицина при 260 нМ Ca²⁺ во внеклеточном растворе. Для каждой клеточной линии концентрация ACh была выбрана так, чтобы она превышала EC_{50} (Рисунок 8Б) примерно в 5 раз.

Г – Отношения амплитуд ответов R-CEPIA1ег 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.

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. Роль индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов в формировании индуцированных Ca^{2+} -сигналов, весьма разнообразных по форме, продолжительности и функциональным последствиям, в общем случае оценить достаточно трудно, поскольку клетки обычно экспрессируют все три изоформы этих рецепторов. Эта же причина существенно осложняет анализ регуляторных механизмов IP_3 -рецепторов, для которых характерны изоформ-специфичные особенности. Определенный прогресс в решении этих проблем могли бы внести клеточные модели, в которых функционирует единственная изоформа IP_3 -рецептора. Для анализа сигнальных процессов, ассоциированных с GPCR-рецепторами и сопряжёнными с IP_3 -рецепторами, ранее в нашей лаборатории были созданы линии генетически модифицированных клеток путём редактирования генома клеток НЕК-293 (WT-НЕК) и экспрессии генетически кодируемых сенсоров. В частности, были получены клетки, в которых функциональна единственная изоформа IP_3 -рецептора ($\text{IP}_3\text{R1-НЕК}$, $\text{IP}_3\text{R2-НЕК}$, $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$) и клетки ТКО-НЕК, в которых IP_3 -рецепторы не функциональны. В настоящей работе проводили анализ индуцированной Ca^{2+} -сигнализации в клетках данных линий. Большую часть экспериментов проводили в условиях стимуляции клеток ацетилхолином (ACh). В качестве Ca^{2+} -мобилизующего агента ACh был выбран потому, что в популяции исследовавшихся клеток всех типов, за исключением ТКО-НЕК, большинство (75–90%) генерировало Ca^{2+} -ответы на этот агонист. Это обеспечивало высокую статистическую репрезентативность каждого эксперимента.

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 WT-НЕК $\approx$ IP₃R2-НЕК > IP₃R1-НЕК > IP₃R3-НЕК. Для клеток с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора ряд IP₃R2-НЕК > IP₃R1-НЕК > IP₃R3-НЕК идентичен ряду аффинностей IP₃-рецептора к IP₃: IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3. Так как мы предполагаем, что экспрессия участников фосфоинозитидного каскада одинакова в клетках всех линий (см. Приложение), то аффинность к IP₃ той изоформы IP₃-рецептора, которую экспрессируют клетки данной линии, является доминантным фактором, определяющим их чувствительность к агонистам.

В нестимулированных клетках спонтанная активность IP₃-рецепторов может быть фактором утечки Ca²⁺ из Ca²⁺-депо. Чтобы внести ясность в этот вопрос, нами была разработана методология оценки относительной проницаемости мембраны ЭР для ионов Ca²⁺. Оказалось, что по этому параметру клетки с единственной функциональной изоформой IP₃-рецепторов ранжируются как IP₃R2-НЕК > IP₃R1-НЕК > IP₃R3-НЕК $\approx$ ТКО-НЕК. Ряд IP₃R2-НЕК > IP₃R1-НЕК > IP₃R3-НЕК соответствует ряду для вероятностей открытого состояния соответствующих типов IP₃-рецептора в нестимулированных клетках: IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3. Таким образом, спонтанная активность IP₃-рецепторов, особенно IP₃R2, может вносить заметный вклад в Ca²⁺-утечку из ЭР в нестимулированных клетках.

Также с использованием генетически кодируемого сенсора R-CEPIA1er мы оценили степень опустошения ЭР при стимуляции агонистом, которая, как оказалось, зависит от экспрессируемой в клетках изоформы IP₃-рецептора.

Таким образом, клетки линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК, а также их варианты, экспрессирующие генетически кодируемый сенсор ретикулярного Ca²⁺, могут служить относительно простым и эффективным инструментом для поиска фармакологических средств воздействия на IP₃-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 $\text{IP}_3\text{R2-НЕК} > \text{IP}_3\text{R1-НЕК} > \text{IP}_3\text{R3-НЕК}$, что коррелирует с аффинностями функционирующих IP_3 -рецепторов к IP_3 : $\text{IP}_3\text{R2} > \text{IP}_3\text{R1} > \text{IP}_3\text{R3}$.
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 $\text{IP}_3\text{R1-НЕК}$, $\text{IP}_3\text{R2-НЕК}$ и $\text{IP}_3\text{R3-НЕК}$ получен ряд: $P_{\text{IP}_3\text{R1}} : P_{\text{IP}_3\text{R2}} : P_{\text{IP}_3\text{R3}} = 1 : 1,75 : 0,45$, что соответствует активностям изоформ в нестимулированных клетках.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Влияние редактирования генома на фосфоинозитидный каскад

Хотя приведённые ниже данные получены сотрудником нашей лаборатории Н.П. Коваленко, они важны для данного исследования, поскольку интерпретацию описанных выше экспериментов с генетически модифицированными клетками проводили, неявно предполагая, что внесение инактивирующих мутаций в гены IP_3 -рецепторов не затронуло другие элементы фосфоинозитидного каскада. Между тем, редактирование генома с использованием CRISPR/Cas9 методологии теоретически могло влиять на экспрессию других белков. Поэтому в нашей лаборатории помимо транскриптов мускариновых рецепторов (Рисунок 3А, 1ПА), в линиях WT-, IP_3R1 -, IP_3R2 - и IP_3R3 -НЕК методом количественной ПЦР были оценены относительные уровни транскриптов нескольких нижестоящих сигнальных белков, которые потенциально могли быть вовлечены в трансдукцию сигнала ACh. В частности, оценивалась экспрессия G-белков Gq и Gi1–3, которые сопрягают различные GPCR с фосфолипазами PLC β 1–4, регулируемые G-белками [111].

Как показано на рисунке 1ПА, уровни транскриптов доминантного мускаринового M3-рецептора достоверно не различаются во всех четырёх линиях. Известно, что M3-рецептор преимущественно сопряжён с белком Gq [116]. Оказалось, что уровни транскриптов Gq статистически достоверно, хотя и не драматически, различаются в линиях IP_3R1 - НЕК и IP_3R3 -НЕК (Рисунок 1ПБ). Вряд ли эти различия имеют значимые физиологические последствия, поскольку распределение относительных уровней транскриптов Gq (Рисунок 1ПБ) не коррелирует с рядом чувствительности клеток линий IP_3R1 -, IP_3R2 - и IP_3R3 -НЕК к ACh (Рисунок 9Б). Оказалось также, что уровни транскриптов Gi1–3 во всех четырёх клеточных линиях были близки и статистически неразличимы (Рисунок 1ПБ).

Несмотря на неравномерную экспрессию разных изоформ PLC β в линиях, статистически значимые отклонения демонстрировала только PLC β 3 (Рисунок 1ПБ). Однако по сравнению с PLC β 1 и PLC β 2, уровень транскриптов PLC β 3 был ниже в 3–10 раз, свидетельствуя, что её вклад в агонист-индуцированную Ca²⁺-сигнализацию, скорее всего, незначителен.

Таким образом, данные транскрипционного анализа предполагают, что различия в чувствительности к ACh клеточных линий IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК и IP_3R3 -НЕК обусловлены не нарушениями, внесёнными в систему трансдукции геномным

редактированием, а исключительно свойствами изоформы IP_3 -рецептора, который каждая из них экспрессирует.

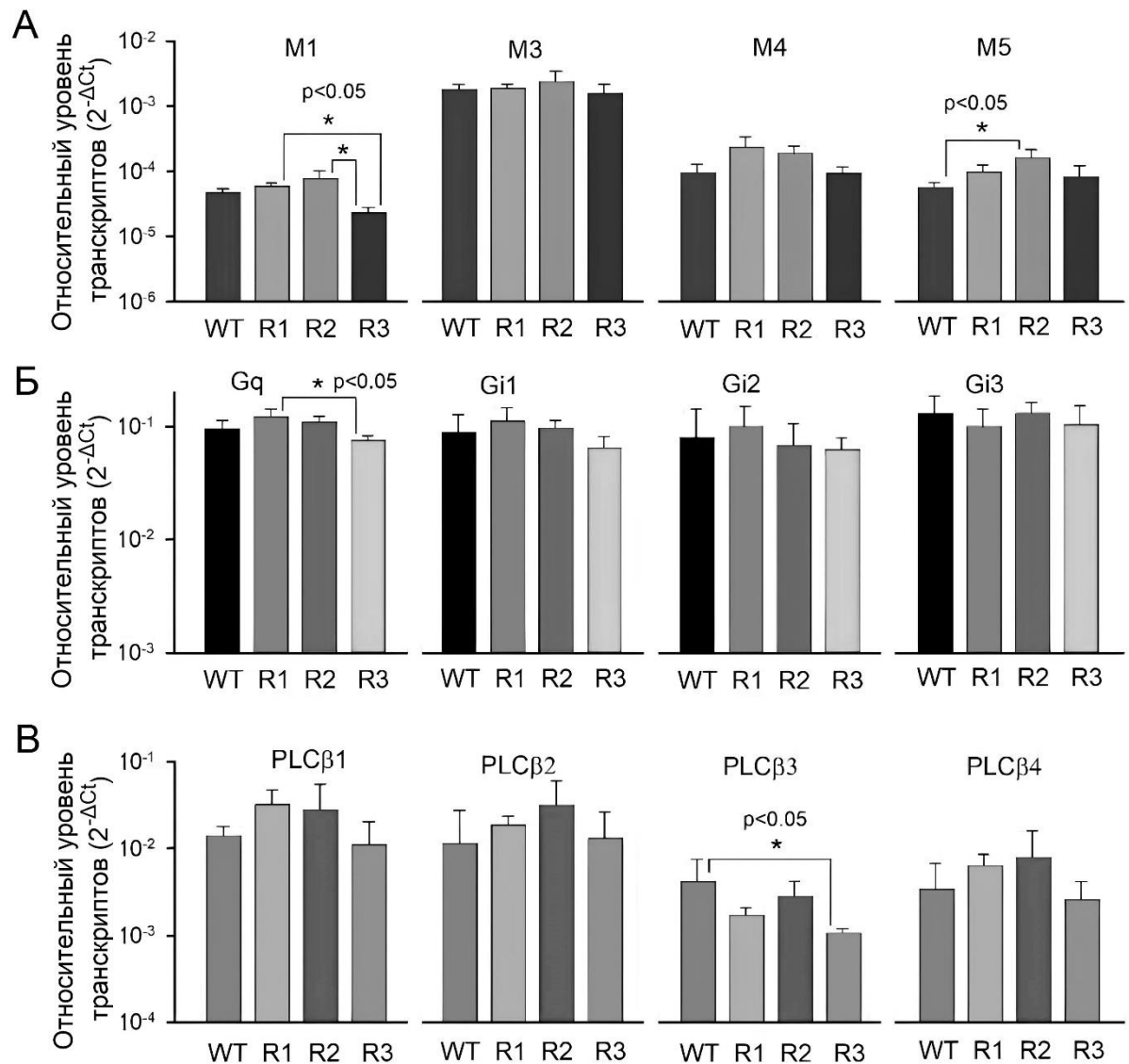


Рисунок 1П. Экспрессия сигнальных белков фосфоинозитидного каскада в клетках разных линий (данные получены Н.П. Коваленко). Адаптировано из [103].

А–В – Относительные уровни транскриптов мускариновых рецепторов (**А**), Gq- и Gi-белков (**Б**) и различных изоформ PLCβ (**В**) в клетках WT-, IP_3R1 -, IP_3R2 - и IP_3R3 -НЕК. Звёздочками отмечены статистически значимые различия (ANOVA-тест, $p < 0,05$), референтный ген актин.

2. Упрощённая модель гомеостаза Ca^{2+}

Мы предполагаем, что в нестимулированных клетках четыре основных потока Ca^{2+} определяют уровень цитозольного Ca^{2+} : вход (entry, J_{En}) внешнего Ca^{2+} через различные каналы, проницаемые для Ca^{2+} ; поток экструзии Ca^{2+} (J_{Ex}), опосредованный Ca^{2+} -АТФазой плазмалеммы (PMCA) и/или Na^+/Ca^{2+} -обменником; утечка (leakage, J_L) Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР) через каналы утечки Ca^{2+} и спонтанно активные

IP₃-рецепторы и рианодиновые рецепторы; вход Ca^{2+} (J_{SERCA}) в ЭР, опосредованный ретикулярной Ca^{2+} -АТФазой (SERCA) (рис. 2П). В цитозоле и ЭР Ca^{2+} связывается с Ca^{2+} -буфером, который, как предполагается, является быстрым и далёким от насыщения, т. е. линейным, так что концентрации связанного (binding) и свободного (free) Ca^{2+} были пропорциональны: $[\text{Ca}^{2+}]_b = \beta[\text{Ca}^{2+}]_f$. Следовательно, для общего (total) содержания Ca^{2+} можно записать: $[\text{Ca}^{2+}]_t = [\text{Ca}^{2+}]_b + [\text{Ca}^{2+}]_f = (1 + \beta)[\text{Ca}^{2+}]_f \approx \beta[\text{Ca}^{2+}]_f$, учитывая, что β обычно превышает 100 [117].

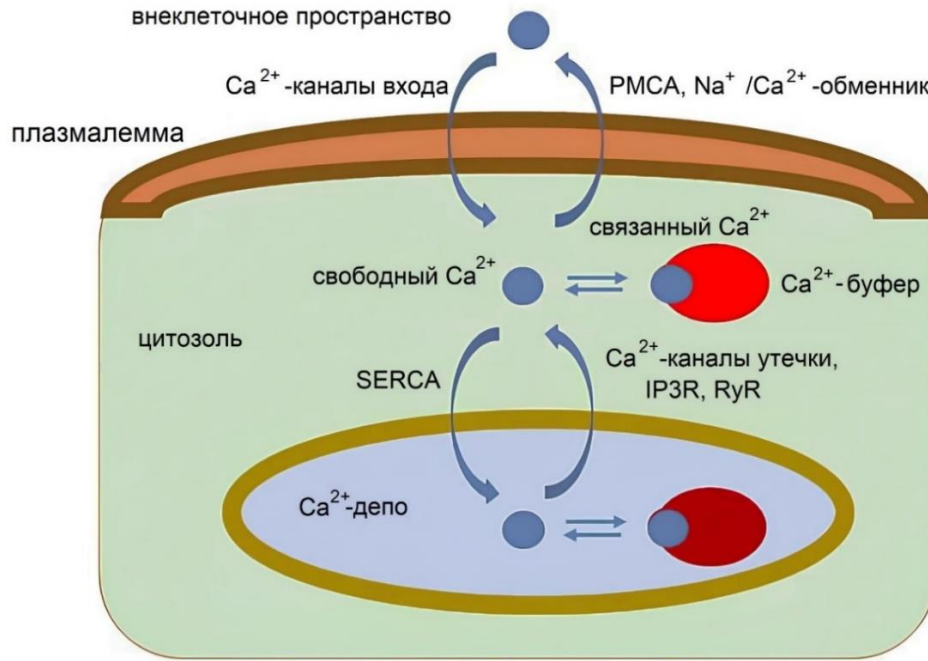


Рисунок 2П. Кинетическая модель гомеостаза Ca^{2+} в нестимулированной клетке. Адаптировано из [103].

Вводя переменные C и C_R для концентраций свободного Ca^{2+} в цитозольном и ретикулярном хранилище Ca^{2+} , соответственно, можно записать следующие уравнения для баланса Ca^{2+} :

$$\alpha_C \frac{dC}{dt} = J_{En} + J_L - J_{Ex} - J_{\text{SERCA}} \quad (1\text{П})$$

$$\alpha_R \frac{dC_R}{dt} = J_{\text{SERCA}} - J_L \quad (2\text{П})$$

где $\alpha_C = \beta_C V_C$ и $\alpha_R = \beta_R V_R$, где β_C и β_R являются коэффициентами связывания Ca^{2+} цитозольного и ретикулярного буферов Ca^{2+} , V_C и V_R являются объёмами цитозольного и ретикулярного Ca^{2+} -компарментов. Когда SERCA ингибируется тапсигаргином, а J_{En} аннулируется удалением Ca^{2+} из внеклеточной среды, приведённые выше уравнения редуцируются до:

$$\alpha_C \frac{dC}{dt} = J_L - J_{Ex} \quad (3П)$$

$$\alpha_R \frac{dC_R}{dt} = -J_L \quad (4П)$$

Поскольку линейное приближение значительно упрощает анализ, мы использовали следующие выражения для потоков Ca^{2+} : $J_L = P(C_R - C)$ и $J_{Ex} = QC$, где P — общая проницаемость мембраны ЭР для Ca^{2+} , Q — константа скорости. В этом приближении уравнения 3П и 4П дают:

$$\alpha_C \frac{dC}{dt} = P(C_R - C) - QC \quad (5П)$$

$$\alpha_R \frac{dC_R}{dt} = -P(C_R - C) \quad (6П)$$

Интегрируя уравнение 5П по времени от 0 до T (т.е. по интервалу воздействия на клетки тапсигаргина, в конце которого цитозольный Ca^{2+} вернулся к исходному уровню (Рисунок 13А)), можно получить:

$$\int_0^T \frac{dC}{dt} dt = C(T) - C(0) = 0 = \frac{P}{\alpha_C} \int_0^T C_R dt - \frac{P+Q}{\alpha_C} \int_0^T C dt \quad (7П)$$

$$\int_0^T \frac{dC_R}{dt} dt = C_R(T) - C_R(0) = -\frac{P}{\alpha_R} \left(\int_0^T C_R dt - \int_0^T C dt \right) \quad (8П)$$

Предполагая, что тапсигаргин значительно опустошил ЭР в течение периода T , $C_R(T) \ll C_R(0)$, и принимая во внимание уравнение 7П, можно записать:

$$\int_0^T C dt = \frac{\alpha_R}{Q} C_R(0) \quad (9П)$$

Поскольку в нестимулированной клетке $C_R \gg C$, при $t = 0$, уравнения 6П и 9П дают:

$$\frac{dC}{dt}(0) \approx \frac{P}{\alpha_C} C_R(0) = \frac{PQ}{\alpha_C \alpha_R} \int_0^T C dt \quad (10П)$$

что даёт:

$$P \approx \frac{\alpha_C \alpha_R \frac{dC}{dt}(0)}{Q \int_0^T C dt} \quad (11П)$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lemmon, M.A. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger // *Cell*. – 2010. – Vol. 141. – № 7. – P. 1117-1134. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
2. Berridge, M.J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease / M.J. Berridge // *Physiological Reviews*. – 2016. – Vol. 96. – № 4. – P. 1261-1296. DOI: 10.1152/physrev.00006.2016.
3. Huang, E.J. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction / E.J. Huang, L.F. Reichardt // *Annual Review of Biochemistry*. – 2003. – Vol. 72. – № 1. – P. 609-642. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629.
4. Mikoshiba, K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts / K. Mikoshiba // *Journal of Neurochemistry*. – 2007. – Vol. 102. – № 5. – P. 1426-1446. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04825.x.
5. Foskett, J.K. Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels / J.K. Foskett, C. White, K.-H. Cheung, D.-O.D. Mak // *Physiological Reviews*. – 2007. – Vol. 87. – № 2. – P. 593-658. DOI: 10.1152/physrev.00035.2006.
6. Woll, K.A. Calcium-release channels: structure and function of IP₃ receptors and ryanodine receptors / K.A. Woll, F. Van Petegem // *Physiological Reviews*. – 2022. – Vol. 102. – № 1. – P. 209-268. DOI: 10.1152/physrev.00033.2020.
7. Kerkhofs, M. Pathophysiological consequences of isoform-specific IP₃ receptor mutations / M. Kerkhofs, B. Seitaj, H. Ivanova, G. Monaco, G. Bultynck, J.B. Parys // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2018. – Vol. 1865. – № 11. – P. 1707-1717. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.06.004.
8. Parys, J.B. IP₃ Receptor Biology and Endoplasmic Reticulum Calcium Dynamics in Cancer / J.B. Parys, G. Bultynck, T. Vervliet. – 2021. – P. 215-237. DOI: 10.1007/978-3-030-67696-4_11.
9. Hamada, K. IP₃ Receptor Plasticity Underlying Diverse Functions / K. Hamada, K. Mikoshiba // *Annual Review of Physiology*. – 2020. – Vol. 82. – № 1. – P. 151-176. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034433.
10. Parys, J.B. New Insights in the IP₃ Receptor and Its Regulation / J.B. Parys, T. Vervliet. – 2020. – P. 243-270. DOI: 10.1007/978-3-030-12457-1_10.
11. Kotova, P.D. Calcium Signaling Initiated by Agonists in Mesenchymal Stromal Cells from the Human Adipose Tissue / P.D. Kotova, O.A. Rogachevskaja, M.F. Bystrova, E.N. Kochkina, D.S. Ivashin, S.S. Kolesnikov // *Calcium and Signal Transduction*. – InTech, 2018. – P. 139-163. DOI: 10.5772/intechopen.79097.
12. Kotova, P.D. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue / P.D. Kotova, V.Yu. Sysoeva, O.A. Rogachevskaja, M.F. Bystrova, A.S. Kolesnikova, P.A. Tyurin-Kuzmin, J.I. Fadeeva, V.A. Tkachuk, S.S. Kolesnikov // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2014. – Vol. 1843. – № 9. – P. 1899-1908. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.002.

13. Cherkashin, A.P. Taste Cells of the Type III Employ CASR to Maintain Steady Serotonin Exocytosis at Variable Ca^{2+} in the Extracellular Medium / A.P. Cherkashin, O.A. Rogachevskaja, N.V. Kabanova, M.F. Bystrova, S.S. Kolesnikov // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 8. – P. 1369. DOI: 10.3390/cells11081369.
14. Kaimachnikov, N.P. Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells / N.P. Kaimachnikov, P.D. Kotova, E.N. Kochkina, O.A. Rogachevskaja, A.A. Khokhlov, M.F. Bystrova, S.S. Kolesnikov // *BBA Advances*. – 2021. – Vol. 1. – P. 100012. DOI: 10.1016/j.bbadv.2021.100012.
15. Yang, D. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery / D. Yang, Q. Zhou, V. Labroska, S. Qin, S. Darbalaei, Y. Wu, E. Yuliantie, L. Xie, H. Tao, J. Cheng, Q. Liu, S. Zhao, W. Shui, Y. Jiang, M.-W. Wang // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 7. DOI: 10.1038/s41392-020-00435-w.
16. Calebiro, D. G protein-coupled receptor-G protein interactions: a single-molecule perspective / D. Calebiro, Z. Koszegi, Y. Lanoiselée, T. Miljus, S. O'Brien // *Physiological Reviews*. – 2021. – Vol. 101. – № 3. – P. 857-906. DOI: 10.1152/physrev.00021.2020.
17. Oldham, W.M. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors / W.M. Oldham, H.E. Hamm // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9. – № 1. – P. 60-71. DOI: 10.1038/nrm2299.
18. Hilger, D. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes / D. Hilger, M. Masureel, B.K. Kobilka // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 4-12. DOI: 10.1038/s41594-017-0011-7.
19. Latorraca, N.R. GPCR Dynamics: Structures in Motion / N.R. Latorraca, A.J. Venkatakrishnan, R.O. Dror // *Chemical Reviews*. – 2017. – Vol. 117. – № 1. – P. 139-155. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00177.
20. Jiang, H. G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors / H. Jiang, D. Galtes, J. Wang, H.A. Rockman // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2022. – Vol. 323. – № 3. – P. C731-C748. DOI: 10.1152/ajpcell.00210.2022.
21. Jean-Charles, P.-Y. Chapter Nine - Cellular Roles of Beta-Arrestins as Substrates and Adaptors of Ubiquitination and Deubiquitination / P.-Y. Jean-Charles, N.J. Freedman, S.K. Shenoy. – 2016. – P. 339-369.
22. Pavlos, N.J. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It / N.J. Pavlos, P.A. Friedman // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2017. – Vol. 28. – № 3. – P. 213-226. DOI: 10.1016/j.tem.2016.10.007.
23. Wettschureck, N. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions / N. Wettschureck, S. Offermanns // *Physiological Reviews*. – 2005. – Vol. 85. – № 4. – P. 1159-1204. DOI: 10.1152/physrev.00003.2005.
24. Garcia-Marcos, M. Heterotrimeric G protein signaling without GPCRs: The $\text{G}\alpha$ -binding-and-activating (GBA) motif / M. Garcia-Marcos // *Journal of Biological Chemistry*. – 2024. – Vol. 300. – № 3. – P. 105756. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.105756.

25. Campbell, A.P. Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins / A.P. Campbell, A. V. Smrcka // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018. – Vol. 17. – № 11. – P. 789-803. DOI: 10.1038/nrd.2018.135.
26. Halls, M.L. Adenylyl cyclase signalling complexes – Pharmacological challenges and opportunities / M.L. Halls, D.M.F. Cooper // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2017. – Vol. 172. – P. 171-180. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.01.001.
27. Schmid, A. Soluble adenylyl cyclase in health and disease / A. Schmid, D. Meili, M. Salathe // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2014. – Vol. 1842. – № 12. – P. 2584-2592. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.07.010.
28. Taussig, R. Mammalian Membrane-bound Adenylyl Cyclases / R. Taussig, A.G. Gilman // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270. – № 1. – P. 1-4. DOI: 10.1074/jbc.270.1.1.
29. Johnstone, T.B. cAMP Signaling Compartmentation: Adenylyl Cyclases as Anchors of Dynamic Signaling Complexes / T.B. Johnstone, S.R. Agarwal, R.D. Harvey, R.S. Ostrom // *Molecular Pharmacology*. – 2018. – Vol. 93. – № 4. – P. 270-276. DOI: 10.1124/mol.117.110825.
30. Park, J.B. Phospholipase signalling networks in cancer / J.B. Park, C.S. Lee, J.-H. Jang, J. Ghim, Y.-J. Kim, S. You, D. Hwang, P.-G. Suh, S.H. Ryu // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 11. – P. 782-792. DOI: 10.1038/nrc3379.
31. Bill, C.A. Phospholipase C / C.A. Bill, C.M. Vines // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2020. – Vol. 1131. – P. 215-242. DOI: 10.1007/978-3-030-12457-1_9.
32. Yang, Y.R. The physiological roles of primary phospholipase C / Y.R. Yang, M.Y. Follo, L. Cocco, P.-G. Suh // *Advances in Biological Regulation*. – 2013. – Vol. 53. – № 3. – P. 232-241. DOI: 10.1016/j.jbior.2013.08.003.
33. Poulos, T.L. Soluble guanylate cyclase / T.L. Poulos // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2006. – Vol. 16. – № 6. – P. 736-743. DOI: 10.1016/j.sbi.2006.09.006.
34. Lucas, K.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. / K.A. Lucas, G.M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K.P. Chepenik, S.A. Waldman // *Pharmacological reviews*. – 2000. – Vol. 52. – № 3. – P. 375-414.
35. Gilibert, J.A. Cytoplasmic Calcium Buffering: An Integrative Crosstalk / J.A. Gilibert. – 2020. – P. 163-182.
36. Catterall, W.A. Voltage-Gated Calcium Channels / W.A. Catterall // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2011. – Vol. 3. – № 8. – P. a003947-a003947. DOI: 10.1101/cshperspect.a003947.
37. Collingridge, G.L. A nomenclature for ligand-gated ion channels / G.L. Collingridge, R.W. Olsen, J. Peters, M. Spedding // *Neuropharmacology*. – 2009. – Vol. 56. – № 1. – P. 2-5. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.063.
38. Tsunoda, Y. Receptor-Operated Calcium Influx Mediated by Protein Tyrosine Kinase Pathways / Y. Tsunoda // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 1998. – Vol. 18. – № 4-6. – P. 281-310. DOI: 10.3109/10799899809047748.

39. Irvine, R.F. Back in the water: the return of the inositol phosphates / R.F. Irvine, M.J. Schell // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – Vol. 2. – № 5. – P. 327-338. DOI: 10.1038/35073015.
40. Mori, M.X. Dynamics of receptor-operated Ca^{2+} currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P₂-PLC signaling pathway / M.X. Mori, K. Itsuki, H. Hase, S. Sawamura, T. Kurokawa, Y. Mori, R. Inoue // *Frontiers in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 6. DOI: 10.3389/fphar.2015.00022.
41. Wang, H. TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes / H. Wang, X. Cheng, J. Tian, Y. Xiao, T. Tian, F. Xu, X. Hong, M.X. Zhu // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 209. – P. 107497. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107497.
42. Derler, I. Gating and permeation of Orai channels / I. Derler // *Frontiers in Bioscience*. – 2012. – Vol. 17. – № 1. – P. 1304. DOI: 10.2741/3988.
43. Brandman, O. STIM2 Is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Levels / O. Brandman, J. Liou, W.S. Park, T. Meyer // *Cell*. – 2007. – Vol. 131. – № 7. – P. 1327-1339. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.039.
44. Putney, J.W. Phospholipase C signaling and calcium influx / J.W. Putney, T. Tomita // *Advances in Biological Regulation*. – 2012. – Vol. 52. – № 1. – P. 152-164. DOI: 10.1016/j.advenzreg.2011.09.005.
45. Chiu, T.-Y. Dominant Role of Orai1 with STIM1 on the Cytosolic Entry and Cytotoxicity of Lead Ions / T.-Y. Chiu, H.-C. Teng, P.-C. Huang, F.-J. Kao, D.-M. Yang // *Toxicological Sciences*. – 2009. – Vol. 110. – № 2. – P. 353-362. DOI: 10.1093/toxsci/kfp099.
46. Prakriya, M. Store-Operated Calcium Channels / M. Prakriya, R.S. Lewis // *Physiological Reviews*. – 2015. – Vol. 95. – № 4. – P. 1383-1436. DOI: 10.1152/physrev.00020.2014.
47. Prole, D.L. Structure and Function of IP₃ Receptors / D.L. Prole, C.W. Taylor // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. a035063. DOI: 10.1101/cshperspect.a035063.
48. Jin, X. Targeting Two-Pore Channels: Current Progress and Future Challenges / X. Jin, Y. Zhang, A. Alharbi, A. Hanbashi, A. Alhoshani, J. Parrington // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2020. – Vol. 41. – № 8. – P. 582-594. DOI: 10.1016/j.tips.2020.06.002.
49. Yuan, Y. Two-pore channel-2 and inositol trisphosphate receptors coordinate Ca^{2+} signals between lysosomes and the endoplasmic reticulum / Y. Yuan, V. Arige, R. Saito, Q. Mu, G.C. Brailoiu, G.J.S. Pereira, S.R. Bolsover, M. Keller, F. Bracher, C. Grimm, E. Brailoiu, J.S. Marchant, D.I. Yule, S. Patel // *Cell Reports*. – 2024. – Vol. 43. – № 1. – P. 113628. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113628.
50. Vervliet, T. Modulation of Ca^{2+} Signaling by Anti-apoptotic B-Cell Lymphoma 2 Proteins at the Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Interface / T. Vervliet, E. Clerix, B. Seitaj, H. Ivanova, G. Monaco, G. Bultynck // *Frontiers in Oncology*. – 2017. – Vol. 7. DOI: 10.3389/fonc.2017.00075.

51. Yang, S. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus / S. Yang, R. Zhou, C. Zhang, S. He, Z. Su // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 571554. DOI: 10.3389/fcell.2020.571554.
52. Lemos, F.O. A comprehensive overview of the complex world of the endo- and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -leak channels / F.O. Lemos, G. Bultynck, J.B. Parys // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2021. – Vol. 1868. – № 7. – P. 119020. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2021.119020.
53. Chen, S.R.W. Functional Characterization of the Recombinant Type 3 Ca^{2+} Release Channel (Ryanodine Receptor) Expressed in HEK293 Cells / S.R.W. Chen, X. Li, K. Ebisawa, L. Zhang // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 39. – P. 24234-24246. DOI: 10.1074/jbc.272.39.24234.
54. Rossi, D. RyR1 and RyR3 isoforms provide distinct intracellular Ca^{2+} signals in HEK 293 cells / D. Rossi, I. Simeoni, M. Micheli, M. Bootman, P. Lipp, P.D. Allen, V. Sorrentino // *Journal of Cell Science*. – 2002. – Vol. 115. – № 12. – P. 2497-2504. DOI: 10.1242/jcs.115.12.2497.
55. Amador, F.J. Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure–function studies / F.J. Amador, P.B. Stathopulos, M. Enomoto, M. Ikura // *The FEBS Journal*. – 2013. – Vol. 280. – № 21. – P. 5456-5470. DOI: 10.1111/febs.12194.
56. Smith, H.A. IP3 receptors: An “elementary” journey from structure to signals / H.A. Smith, N.B. Thillaiappan, A.M. Rossi // *Cell Calcium*. – 2023. – Vol. 113. – P. 102761. DOI: 10.1016/j.ceca.2023.102761.
57. Ramos-Franco, J. Location of the Permeation Pathway in the Recombinant Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor / J. Ramos-Franco, D. Galvan, G.A. Mignery, M. Fill // *The Journal of General Physiology*. – 1999. – Vol. 114. – № 2. – P. 243-250. DOI: 10.1085/jgp.114.2.243.
58. Carreras-Sureda, A. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses / A. Carreras-Sureda, P. Pihán, C. Hetz // *Cell Calcium*. – 2018. – Vol. 70. – P. 24-31. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.08.004.
59. Camello, C. Calcium leak from intracellular stores—the enigma of calcium signalling / C. Camello, R. Lomax, O.H. Petersen, A.V. Tepikin // *Cell Calcium*. – 2002. – Vol. 32. – № 5-6. – P. 355-361. DOI: 10.1016/S0143416002001926.
60. Wang, Q.-C. TMCO1 Is an ER Ca^{2+} Load-Activated Ca^{2+} Channel / Q.-C. Wang, Q. Zheng, H. Tan, B. Zhang, X. Li, Y. Yang, J. Yu, Y. Liu, H. Chai, X. Wang, Z. Sun, J.-Q. Wang, S. Zhu, F. Wang, M. Yang, C. Guo, H. Wang, Q. Zheng, Y. Li, Q. Chen, A. Zhou, T.-S. Tang // *Cell*. – 2016. – Vol. 165. – № 6. – P. 1454-1466. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.051.
61. Berridge, M.J. The versatility and universality of calcium signalling / M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2000. – Vol. 1. – № 1. – P. 11-21. DOI: 10.1038/35036035.
62. Sterea, A.M. The Role of Mitochondrial Calcium Signaling in the Pathophysiology of Cancer Cells / A.M. Sterea, Y. El Hiani. – 2020. – P. 747-770.

63. Krebs, J. The Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA): Regulation of Cytosolic Ca^{2+} , Genetic Diversities and Its Role in Sub-plasma Membrane Microdomains / J. Krebs. – 2017. – P. 3-21.
64. Cali, T. The Plasma Membrane Ca^{2+} ATPases: Isoform Specificity and Functional Versatility / T. Cali, D. Ottolini, M. Brini // Regulation of Ca^{2+} -ATPases, V-ATPases and F-ATPases. – Cham : Springer International Publishing, 2016. – P. 13-26.
65. Guerrero-Hernández, A. Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium Release Model Based on Changes in the Luminal Calcium Content / A. Guerrero-Hernández, V.H. Sánchez-Vázquez, E. Martínez-Martínez, L. Sandoval-Vázquez, N.C. Perez-Rosas, R. Lopez-Farias, A. Dagnino-Acosta // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2020. – P. 337-370. DOI: 10.1007/978-3-030-12457-1_14.
66. Schwaller, B. Cytosolic Ca^{2+} Buffers / B. Schwaller // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2010. – Vol. 2. – № 11. – P. a004051-a004051. DOI: 10.1101/cshperspect.a004051.
67. Berridge, M.J. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling / M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2003. – Vol. 4. – № 7. – P. 517-529. DOI: 10.1038/nrm1155.
68. Nordenskjöld, F. Expression of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and the Ryanodine Receptor Ca^{2+} -Release Channels in the Beta-Cells and Alpha-Cells of the Human Islets of Langerhans / F. Nordenskjöld, B. Andersson, Md.S. Islam. – 2020. – P. 271-279.
69. Mikoshiba, K. Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases / K. Mikoshiba // Advances in Biological Regulation. – 2015. – Vol. 57. – P. 217-227. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.10.001.
70. Yue, L. Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor is a Crucial Regulator of Calcium Dynamics Mediated by Endoplasmic Reticulum in HEK Cells / L. Yue, L. Wang, Y. Du, W. Zhang, K. Hamada, Y. Matsumoto, X. Jin, Y. Zhou, K. Mikoshiba, D.L. Gill, S. Han, Y. Wang // Cells. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 275. DOI: 10.3390/cells9020275.
71. Bartok, A. IP3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer / A. Bartok, D. Weaver, T. Golenár, Z. Nichtova, M. Katona, S. Bánsághi, K.J. Alzayady, V.K. Thomas, H. Ando, K. Mikoshiba, S.K. Joseph, D.I. Yule, G. Csordás, G. Hajnóczky // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 3726. DOI: 10.1038/s41467-019-11646-3.
72. Egorova, P.A. Inositol 1,4,5- trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders / P.A. Egorova, I.B. Bezprozvanny // The FEBS Journal. – 2018. – Vol. 285. – № 19. – P. 3547-3565. DOI: 10.1111/febs.14366.
73. Rossi, A.M. Analysis of IP3 receptors in and out of cells / A.M. Rossi, S.C. Tovey, T. Rahman, D.L. Prole, C.W. Taylor // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. – 2012. – Vol. 1820. – № 8. – P. 1214-1227. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.10.004.
74. Wu, L. Type 3 IP3 receptor: Its structure, functions, and related disease implications / L. Wu, J. Chen // Channels. – 2023. – Vol. 17. – № 1. DOI: 10.1080/19336950.2023.2267416.

75. Gambardella, J. The discovery and development of IP₃ receptor modulators: an update / J. Gambardella, M.B. Morelli, X. Wang, V. Castellanos, P. Mone, G. Santulli // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 16. – № 6. – P. 709-718. DOI: 10.1080/17460441.2021.1858792.
76. Parys, J.B. The interplay between associated proteins, redox state and Ca²⁺ in the intraluminal ER compartment regulates the IP₃ receptor / J.B. Parys, F.O. Lemos // *Cell Calcium*. – 2024. – Vol. 117. – P. 102823. DOI: 10.1016/j.ceca.2023.102823.
77. Saleem, H. Stimulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP₃) Receptor Subtypes by Analogues of IP₃ / H. Saleem, S.C. Tovey, T. Rahman, A.M. Riley, B.V.L. Potter, C.W. Taylor // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 1. – P. e54877. DOI: 10.1371/journal.pone.0054877.
78. Lunko, O. Viewing Ca²⁺-binding sites in the inositol trisphosphate receptor / O. Lunko, J.K. Foskett // *Cell Calcium*. – 2023. – Vol. 110. – P. 102697. DOI: 10.1016/j.ceca.2023.102697.
79. Lock, J.T. Spatial-temporal patterning of Ca²⁺ signals by the subcellular distribution of IP₃ and IP₃ receptors / J.T. Lock, I.F. Smith, I. Parker // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 94. – P. 3-10. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.01.012.
80. Smith, H.A. Dissociation of inositol 1,4,5-trisphosphate from IP₃ receptors contributes to termination of Ca²⁺ puffs / H.A. Smith, C.W. Taylor // *Journal of Biological Chemistry*. – 2023. – Vol. 299. – № 2. – P. 102871. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.102871.
81. Mak, D.-O.D. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view / D.-O.D. Mak, J.K. Foskett // *Cell Calcium*. – 2015. – Vol. 58. – № 1. – P. 67-78. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.12.008.
82. Taylor, C.W. IP₃ Receptors: Toward Understanding Their Activation / C.W. Taylor, S.C. Tovey // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Vol. 2. – № 12. – P. a004010-a004010. DOI: 10.1101/cshperspect.a004010.
83. Cai, S. The Role of the Pore-forming Region in the Regulation of IP₃ Receptor by Luminal Ca²⁺ / S. Cai, W. Chen, L. Zhang, W.S.R. Chen // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 96. – № 3. – P. 96a-97a. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.12.408.
84. Vais, H. ER-luminal [Ca²⁺] regulation of InsP₃ receptor gating mediated by an ER-luminal peripheral Ca²⁺-binding protein / H. Vais, M. Wang, K. Mallilankaraman et al. // *eLife*. – 2020. – Vol. 9. DOI: 10.7554/eLife.53531.
85. Higo, T. Subtype-Specific and ER Luminal Environment-Dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44 / T. Higo, M. Hattori, T. Nakamura, T. Natsume, T. Michikawa, K. Mikoshiba // *Cell*. – 2005. – Vol. 120. – № 1. – P. 85-98. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.048.
86. Lock, J.T. All three IP₃ receptor isoforms generate Ca²⁺ puffs that display similar characteristics / J.T. Lock, K.J. Alzayady, D.I. Yule, I. Parker // *Science Signaling*. – 2018. – Vol. 11. – № 561. DOI: 10.1126/scisignal.aau0344.

87. Chakraborty, P. Regulation of store-operated Ca^{2+} entry by IP₃ receptors independent of their ability to release Ca^{2+} / P. Chakraborty, B.K. Deb, V. Arige, T. Musthafa, S. Malik, D.I. Yule, C.W. Taylor, G. Hasan // *eLife*. – 2023. – Vol. 12. DOI: 10.7554/eLife.80447.
88. Decuypere, J.-P. The IP₃ receptor–mitochondria connection in apoptosis and autophagy / J.-P. Decuypere, G. Monaco, G. Bultynck et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2011. – Vol. 1813. – № 5. – P. 1003-1013. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.023.
89. Taylor, C.W. Regulation of IP₃ receptors by cyclic AMP / C.W. Taylor // *Cell Calcium*. – 2017. – Vol. 63. – P. 48-52. DOI: 10.1016/j.ceca.2016.10.005.
90. Kasri, N.N. Regulation of InsP₃ receptor activity by neuronal Ca^{2+} -binding proteins / N.N. Kasri, A.M. Holmes, G. Bultynck, J.B. Parys, M.D. Bootman, K. Rietdorf, L. Missiaen, F. McDonald, H.D. Smedt, S.J. Conway, A.B. Holmes, M.J. Berridge, H.L. Roderick // *The EMBO Journal*. – 2004. – Vol. 23. – № 2. – P. 312-321. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600037.
91. Taylor, C.W. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca^{2+} / C.W. Taylor, A.J. Laude // *Cell Calcium*. – 2002. – Vol. 32. – № 5-6. – P. 321-334. DOI: 10.1016/S0143416002001859.
92. Ando, H. IRBIT, a Novel Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP₃) Receptor-binding Protein, Is Released from the IP₃ Receptor upon IP₃ Binding to the Receptor / H. Ando, A. Mizutani, T. Matsu-ura, K. Mikoshiba // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 12. – P. 10602-10612. DOI: 10.1074/jbc.M210119200.
93. Ando, H. IRBIT Suppresses IP₃ Receptor Activity by Competing with IP₃ for the Common Binding Site on the IP₃ Receptor / H. Ando, A. Mizutani, H. Kiefer, D. Tsuzurugi, T. Michikawa, K. Mikoshiba // *Molecular Cell*. – 2006. – Vol. 22. – № 6. – P. 795-806. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.05.017.
94. Yang, D. IRBIT: It Is Everywhere / D. Yang, N. Shcheynikov, S. Muallem // *Neurochemical Research*. – 2011. – Vol. 36. – № 7. – P. 1166-1174. DOI: 10.1007/s11064-010-0353-6.
95. Thillaiappan, N.B. KRAP tethers IP₃ receptors to actin and licenses them to evoke cytosolic Ca^{2+} signals / N.B. Thillaiappan, H.A. Smith, P. Atakpa-Adaji, C.W. Taylor // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 4514. DOI: 10.1038/s41467-021-24739-9.
96. Monaco, G. The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP₃Rs and beyond / G. Monaco, T. Vervliet, H. Akl, G. Bultynck // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2013. – Vol. 70. – № 7. – P. 1171-1183. DOI: 10.1007/s00018-012-1118-y.
97. Decuypere, J.-P. Ins(1,4,5) P₃ receptor-mediated Ca^{2+} signaling and autophagy induction are interrelated / J.-P. Decuypere, K. Welkenhuyzen, T. Luyten, R. Ponsaerts, M. Dewaele, J. Molgó, P. Agostinis, L. Missiaen, H.D. Smedt, J.B. Parys, G. Bultynck // *Autophagy*. – 2011. – Vol. 7. – № 12. – P. 1472-1489. DOI: 10.4161/auto.7.12.17909.
98. Boehning, D. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis / D. Boehning, R.L. Patterson, L. Sedaghat, N.O. Glebova, T. Kurosaki, S.H. Snyder // *Nature Cell Biology*. – 2003. – Vol. 5. – № 12. – P. 1051-1061. DOI: 10.1038/ncb1063.

99. Ma, Y. Genome modification by CRISPR/Cas9 / Y. Ma, L. Zhang, X. Huang // The FEBS Journal. – 2014. – Vol. 281. – № 23. – P. 5186-5193. DOI: 10.1111/febs.13110.
100. Zhang, F. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges / F. Zhang, Y. Wen, X. Guo // Human Molecular Genetics. – 2014. – Vol. 23. – № R1. – P. R40-R46. DOI: 10.1093/hmg/ddu125.
101. Быстрова, М.Ф. IP₃-рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках HEK-293 / М.Ф. Быстрова, О.А. Рогачевская, Е.Н. Кочкина, Е.Е. Копылова, Н.П. Коваленко, С.С. Колесников // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2020. – Vol. 37. – № 6. – P. 434-441. DOI: 10.31857/S0233475520060031.
102. Копылова, Е.Е. Клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP₃ рецептора / Е.Е. Копылова, Е.А. Воронова, Н.В. Кабанова, О.А. Рогачевская, М.Ф. Быстрова, С.С. Колесников // Биологические мембраны. – 2023. – Vol. 40. – № 1. – P. 43-54. DOI: 10.31857/S0233475523010036.
103. Kochkina, E.N. Agonist-Induced Ca²⁺ Signaling in HEK-293-Derived Cells Expressing a Single IP₃ Receptor Isoform / E.N. Kochkina, E.E. Kopylova, O.A. Rogachevskaja, N.P. Kovalenko, N.V. Kabanova, P.D. Kotova, M.F. Bystrova, S.S. Kolesnikov // Cells. – 2024. – Vol. 13. – № 7. – P. 562. DOI: 10.3390/cells13070562.
104. Котова, П.Д. Клеточная тест-система с генетически кодируемыми сенсорами цитоплазматического и ретикулярного кальция / П.Д. Котова, О.А. Рогачевская // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2020. – Vol. 37. – № 5. – P. 373-380. DOI: 10.31857/S0233475520050072.
105. Хохлов, А.А. Осветитель на излучающих диодах для микрофотометрических исследований клеток. / А.А. Хохлов, Р.А. Романов, Б.В. Зубов, А.Д. Пашинин, С.С. Колесников // Приборы и техника эксперимента. – 2007. – Vol. 3. – P. 128-131.
106. Suzuki, J. Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA / J. Suzuki, K. Kanemaru, K. Ishii, M. Ohkura, Y. Okubo, M. Iino // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 4153. DOI: 10.1038/ncomms5153.
107. Noviello, C.M. Structure and gating mechanism of the α7 nicotinic acetylcholine receptor / C.M. Noviello, A. Gharpure, N. Mukhtasimova, R. Cabuco, L. Baxter, D. Borek, S.M. Sine, R.E. Hibbs // Cell. – 2021. – Vol. 184. – № 8. – P. 2121-2134.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.049.
108. Harteneck, C. Pharmacological Modulation of Diacylglycerol-Sensitive TRPC3/6/7 Channels / C. Harteneck, M. Gollasch // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2011. – Vol. 12. – № 1. – P. 35-41. DOI: 10.2174/138920111793937943.
109. Mataragka, S. All three IP₃ receptor subtypes generate Ca²⁺ puffs, the universal building blocks of IP₃-evoked Ca²⁺ signals / S. Mataragka, C.W. Taylor // Journal of Cell Science. – 2018. – Vol. 131. – № 16. DOI: 10.1242/jcs.220848.
110. Lock, J.T. IP₃ mediated global Ca²⁺ signals arise through two temporally and spatially distinct modes of Ca²⁺ release / J.T. Lock, I. Parker // eLife. – 2020. – Vol. 9. DOI: 10.7554/eLife.55008.

111. Kadamur, G. Mammalian Phospholipase C / G. Kadamur, E.M. Ross // Annual Review of Physiology. – 2013. – Vol. 75. – № 1. – P. 127-154. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183750.
112. Zampese, E. Intracellular organelles in the saga of Ca^{2+} homeostasis: different molecules for different purposes? / E. Zampese, P. Pizzo // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2012. – Vol. 69. – № 7. – P. 1077-1104. DOI: 10.1007/s00018-011-0845-9.
113. Takeshima, H. New and notable ion- channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: do they support the process of intracellular Ca^{2+} release? / H. Takeshima, E. Venturi, R. Sitsapesan // The Journal of Physiology. – 2015. – Vol. 593. – № 15. – P. 3241-3251. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.281881.
114. Jones, L. The predominant role of IP3 type 1 receptors in activation of store-operated Ca^{2+} entry in liver cells / L. Jones, L. Ma, J. Castro, T. Litjens, G.J. Barritt, G.Y. Rychkov // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. – 2011. – Vol. 1808. – № 3. – P. 745-751. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.12.013.
115. McMahon, S.M. In situ Ca^{2+} titration in the fluorometric study of intracellular Ca^{2+} binding / S.M. McMahon, M.B. Jackson // Cell Calcium. – 2014. – Vol. 56. – № 6. – P. 504-512. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.10.010.
116. Saternos, H.C. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system / H.C. Saternos, D.A. Almarghalani, H.M. Gibson, M.A. Meqdad, R.B. Antypas, A. Lingireddy, W.A. AbouAlaiwi // Physiological Genomics. – 2018. – Vol. 50. – № 1. – P. 1-9. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00062.2017.
117. Neher, E. The use of fura-2 for estimating ca buffers and ca fluxes / E. Neher // Neuropharmacology. – 1995. – Vol. 34. – № 11. – P. 1423-1442. DOI: 10.1016/0028-3908(95)00144-U.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АС – аденилатциклаза	IBC – IP ₃ -связывающее ядро
ACh – ацетилхолин	IP ₃ – инозитолтрифосфат
ADP – аденозиндифосфат	IP ₃ R – IP ₃ -рецептор
ANXA1 – Ca ²⁺ -связывающий белок аннексин A1	IP ₄ – инозитолтетрафосфат
АТР – аденозинтрифосфат	IRBIT – IP ₃ R-связывающий белок, высвобождаемый с IP ₃
Bcl – регулятор апоптоза	JNK – класс MAPK
CaBP – Ca ²⁺ -связывающий белок	KRAP – KRas-индуцированный белок
CaM – кальмодулин	MAM – митохондриально-ассоциированные мембраны
CaMK – кальмодулин-зависимая киназа	MCU – митохондриальный Ca ²⁺ -унипортер
cAMP – циклоаденозинмонофосфат	NAADP – никотинамидадениндинуклеотид фосфат
cGMP – циклогуанинмонофосфат	NADH – никотинамидадениндинуклеотид
CICR – Ca ²⁺ -индуцированный выброс Ca ²⁺ из внутриклеточных депо	NCLX – Na ⁺ /Ca ²⁺ /Li ⁺ -обменник митохондрий
CRAC – Ca ²⁺ -канал, активируемый выбросом Ca ²⁺	NCX – Na ⁺ /Ca ²⁺ -обменник плазматической мембраны
CRISPR/Cas9 – кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы / белок, ассоциированный с CRISPR	Orai – белок Ca ²⁺ -канала, активируемого Ca ²⁺ -выбросом
DAG – диацилглицерол	P38 – класс MAPK
Ерас – обменный белок, напрямую активируемый cAMP	PDK – пируватдегидрогеназный комплекс
ERO – оксидоредуктаза ЭР	PIP – фосфатидилинозитол
ERp – экспортируемый повторяющийся белок	PIP ₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
GAP – белок, активирующий GTPазу	PKA – протеинкиназа А
GDP – гуанозиндифосфат	PKC – протеинкиназа С
GPCR – рецептор, сопряжённый с G-белком	PLA – фосфолипаза А
GRK – киназа GPCR	PLC – фосфолипаза С
GC – гуанилатциклаза	PLD – фосфолипаза D
GTP – гуанинтрифосфат	PMCA – Ca ²⁺ -АТРаза плазматической мембраны
	RAB, Ras, Rho – семейства малых G-белков

ROCC – рецептор-управляемый Ca^{2+} -канал

RTK – рецепторная тирозинкиназа

RyR– рианодиновый рецептор

sAC – растворимая аденилатциклаза

SD – супрессорный домен

SERCA – Ca^{2+} -АТРаза
саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума

SOCE – депо-управляемый вход Ca^{2+}

SOCC – депо-управляемый Ca^{2+} -канал

STIM – молекула стромального
взаимодействия

ТКО – клетки с тройным нокаутом гена

tmAC – трансмембранная аденилатциклаза

TPC – двупоровые каналы лизосом

UTP – уридинтрифосфат

VDAC – потенциал-зависимый анионный
канал

VGCC – потенциал-управляемый Ca^{2+} -
канал

WT – клетки дикого типа

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПМ – плазматическая мембрана

СР – саркоплазматический ретикулум

ЭР – эндоплазматический ретикулум

МАРК – митоген-активируемая
протеинкиназа

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. 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., IntechOpen, London, 2018, pp 139-163.
2. **Кочкина Е.Н.**, Котова П.Д., Енукашвили Н.И., Колесников С.С. (2019) cGMP-зависимая протеинкиназа модулирует чувствительность мезенхимных стромальных клеток к пуринаргическим агонистам. Биологические мембраны Т.36(4), 296-300.
3. 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 НЕК-293. // Биологические мембраны. 2020. Т.37 (6). С.434-441..
4. Kaimachnikov N.P, Kotova P.D., **Kochkina E.N.**, Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. (2021) Modeling of Ca²⁺ transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells BBA Advances 1, 100012.
5. **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 Ca²⁺ 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.

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

6. **Кочкина Е.Н.**, Кabanova Н.В., Коваленко Н.П. Анализ роли изоформ IP₃ рецепторов в генерации Ca²⁺ 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 Ca²⁺-сигнализации в клетках НЕК-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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-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 Ca²⁺-сигналы в клетках НЕК-293 с единственной изоформой IP₃-рецептора. Синхронный мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca²⁺. // 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 Ca²⁺-утечку покоящихся клеток линии НЕК-293. // 28 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – Наука XXI века». Пущино, Россия 2025. Сборник тезисов. С. 422.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность коллективам лаборатории молекулярной физиологии клетки и группы геномного редактирования и трансгенеза ИБК РАН за постоянную поддержку, ценные обсуждения и помощь на всех этапах работы.

Особая благодарность адресована научному руководителю Станиславу Сергеевичу Колесникову — за постановку научной проблемы, неоценимую помощь в планировании экспериментов и внимательное руководство на протяжении всего исследования.

Автор глубоко признательна Александру Анатольевичу Хохлову и Александру Павловичу Черкашину за безупречное техническое обеспечение работы и оперативное решение возникающих проблем.

Отдельная благодарность Марине Фёдоровне Быстровой, Ирине Станиславовне Масулис, Ольге Анатольевне Рогачевской, Елизавете Евгеньевне Копыловой и Нине Петровне Коваленко за кропотливую работу по получению и проверке клеточных линий, без которой данное исследование было бы невозможно.

Автор также благодарит Полину Дмитриевну Котову и Евгению Александровну Воронову за ценные замечания и помощь в подготовке текста.