

СКОПИН Антон Юрьевич

Роль белков TRPC1 и TRPC3 в формировании ионных каналов, регулируемых  
белками STIM в электроневозбудимых клетках

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

- Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Елена Валентиновна Казначеева** заведующий лабораторией Ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Алексей Васильевич Зайцев** заведующий лабораторией Молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург;  
кандидат химических наук  
**Александр Александрович Василевский** заведующий лабораторией Молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва
- Ведущая организация:** Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино

Защита состоится «\_\_» декабря 2019 г. в \_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:  
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4

Сайт института: <https://www.incras.ru/>

Адрес электронной почты института: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru)

Факс института (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте  
<https://www.incras.ru/>

Реферат разослан «\_\_» ноября 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор биологических наук

М.Г.Мартынова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Кальций, как универсальный вторичный посредник принимает участие и регулирует практически все внутриклеточные процессы, такие как, экспрессия генов, клеточная подвижность, пролиферация, апоптоз и др. Нарушения механизма кальциевой сигнализации приводят к негативным последствиям не только для клетки, но и на уровне тканей и органов. Многие виды онкологических и нейродегенеративных заболеваний, патологий иммунной системы, в своей основе во многом имеют нарушения кальциевого гомеостаза (Feske, 2010; Sweeney и др., 2002). Основные информационные параметры кальциевой сигнализации – это концентрация свободных ионов кальция в цитозоле, ее величина, локализация и динамика изменения. Для регулировки этих параметров клетка задействует внеклеточный кальций и кальций, запасенный во внутриклеточных хранилищах (Putney, 1986), например, в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). В норме концентрация кальция вне клетки на четыре порядка выше, чем в цитозоле, а концентрация кальция в ЭР выше на два порядка, чем в цитозоле (Clapham, 2007).

В электроневозбудимых клетках один из основных путей входа кальция опосредуется работой депо-зависимых кальциевых каналов. Активация рецепторов, связанных с G-белками, приводит к активации фосфолипазы C, и увеличению концентрации инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ). Молекулы  $IP_3$  активируют  $IP_3$ -рецептор, расположенный в мембране эндоплазматического ретикулума и обладающий функцией канала (Nilius, Droogmans, 2001). После активации этого рецептора кальций из ЭР выходит в цитозоль по градиенту концентрации, что приводит к опустошению внутриклеточных кальциевых депо. Белки STIM – сенсоры кальция в ЭР, чувствительные к опустошению депо, активируют депо-зависимые кальциевые каналы плазматической мембраны, и внеклеточный кальций входит в цитозоль (Liou и др., 2005; Zhang и др., 2005).

После обнаружения белков STIM основное внимание научного сообщества сосредоточилось на изучении молекулярного состава каналов плазматической мембраны, обеспечивающих депо-зависимый вход. Необходимо отметить, что широко известный ток CRAC – не единственный компонент депо-зависимого входа, были задокументированы и менее селективные депо-зависимые токи (Bugaj и др., 2005). Наиболее вероятными кандидатами на роль депо-зависимых каналов назывались белки из суперсемейства TRP и, особенно, белки TRPC (Zagranichnaya и др., 2005; Liu и др., 2003).

Высокая вариативность передаваемых с помощью кальция сигналов свидетельствует о широком спектре механизмов регуляции и вовлечении большого количества каналообразующих, регуляторных и сенсорных белков. На данный момент информация о механизмах взаимодействия уже известных элементов депо-зависимого входа крайне скудна. В частности, не ясно разделение физиологических

ролей белков STIM1 и STIM2, их взаимодействие, спектр регулируемых каждым белком каналов. Требуется дополнительного изучения вклад белков семейства TRPC в депо-зависимый вход.

Получение новых сведений о молекулярном составе депо-зависимых каналов, а так же о способах их регуляции, позволит более точно описать механизм депо-зависимого входа кальция. Знания о белковом составе депо-зависимых каналов обеспечат эффективный поиск селективных ингибиторов и активаторов этих каналов, что позволит осуществлять точечную, высокоэффективную терапию при патологических состояниях, обусловленных нарушением работы данных каналов.

### **Цели и задачи исследования**

Данное исследование направлено на изучение роли белков TRPC1 и TRPC3 в формировании ионных каналов плазматической мембраны, регулируемых посредством белков STIM.

Для достижения указанной цели были поставлены соответствующие задачи исследования.

1. Оценить роль белка TRPC1 в формировании, либо регуляции депо-зависимых каналов плазматической мембраны в модельных клеточных линиях.
2. Выяснить роль белка TRPC3 в формировании, либо регуляции депо-зависимых каналов плазматической мембраны в модельных клеточных линиях.
3. Установить депо-зависимые каналы плазматической мембраны, регулируемые белком STIM1.
4. Идентифицировать депо-зависимые каналы плазматической мембраны, регулируемые белком STIM2.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Белок TRPC1 формирует экзогенный канал  $I_{\max}$ .
2. Белок TRPC3 является регуляторной компонентой эндогенного канала  $I_{\text{ns}}$ .
3. Активность канала  $I_{\text{ns}}$  регулируется белком STIM1.
4. Активность канала  $I_{\max}$  регулируется как белком STIM1, так и белком STIM2, но STIM1 является более значимым активатором  $I_{\max}$ .

### **Научная новизна исследования**

С помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране и флуоресцентных измерений впервые было показано, что эндогенный белок TRPC1 образует депо-зависимый ионный канал  $I_{\max}$ , который активируется белками STIM1 и STIM2, но активация белком STIM2 происходит с большей временной задержкой. Канал  $I_{\text{ns}}$ , содержащий TRPC3, активируется белком STIM1, но не STIM2. Таким образом, впервые был показан дополнительный регуляторный механизм депо-зависимого входа, действующий на пути сигнала от опустошенного

депо к каналам плазматической мембраны, которые имеют разную чувствительность к белкам STIM1 и STIM2. Впервые было показано наличие в одной клетке разных эндогенных каналов, сформированных различными белками семейства TRPC.

### **Личный вклад автора**

Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Общепризнано, что кальциевая сигнализация обеспечивает широкий спектр разнообразных сигналов, но механизмы генерации этих сигналов остаются мало изученными. Результаты, представленные в настоящей работе, показывают многоуровневую систему регуляции депо-зависимого входа: депо-зависимые каналы плазматической мембраны сформированы из различных белков и демонстрируют различные электрофизиологические характеристики. Сигнал опустошения депо передается к каналам через два белка-сенсора STIM с разной чувствительностью к концентрации кальция, а сам процесс передачи сигнала имеет возможность распределения сигналов между различными типами каналов плазматической мембраны.

Практическая ценность работы – это возможность использования полученных результатов при составлении учебных курсов, планировании экспериментальной работы. Сведения о молекулярных механизмах депо-зависимого входа помогут при разработке фармакологических препаратов, обладающих большей избирательностью и эффективностью, чем лекарства широкого спектра действия.

### **Апробация работы**

Основные научные результаты исследования были представлены и обсуждены на международных и российских конференциях, а именно: Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2006), XX съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова, (Москва, 2007), международной конференции «Рецепция и внеклеточная сигнализация», (Пушкино, 2007 и 2013), 38ом конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, 2013), 5ом съезде физиологов СНГ (Дагомыс, 2016), 62ом съезде Биофизического общества США (Сан-Франциско, 2018), а также на семинарах лаборатории Ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН.

По результатам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 152 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы и список используемой литературы. Материал иллюстрирован 33-мя рисунками. Библиографический указатель содержит 146 источников.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы**

**Клетки** эмбрионального почечного эпителия человека HEK293 и клетки эпидермоидной карциномы человека A431 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков.

**Трансфекция.** Клетки HEK293 и A431, выращенные до плотности 80%, трансфицировали плазмидой HuSH 29mer shRNA при помощи реагента для трансфекции эффектина. Через 48 ч клетки переводили в селекционную среду, содержащую 10 мкг/мл пуромицина (Stim1) либо бластидина (TRPC3).

Временная трансфекция клеток HEK293 осуществлялась с помощью агента для трансфекции липофектамина. Для подавления экспрессии TRPC1 клетки HEK293, выращенные до плотности 50%, были трансфицированы плазмидами RNAi-TRPC1 и EGFP в соотношении 3:1. Для оверэкспрессии TRPC1 клетки были трансфицированы вектором pсDNA3, кодирующим белок TRPC1 мыши, и плазмидой EGFP в соотношении 1:1. Через 24 часа после трансфекции клетки, экспрессирующие белок GFP, использовались для экспериментов.

**Электрофорез и иммуноблотинг.** Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 100 мм. После трансфекции клетки лизировали по стандартному протоколу. Белки лизатов разделяли электрофоретически в 8% полиакриламидном геле в вертикальной камере и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки на иммуноблоте выявляли с использованием моноклональных антител против STIM1 («BD Biosciences», США) в разведении 1:250, против STIM2, TRPC3 и TRPC1 (1:200) (все «Alomone Labs», Израиль). В качестве вторых антител использовали кроличьи антитела против константной части иммуноглобулинов мыши (1:5000). Белки на иммуноблотах выявляли с помощью субстрата Super Signal Chemiluminescent Substrate («Pierce», США). Эксперименты повторяли как минимум 3 раза, используя различные лизаты клеток. Для контроля равной загрузки дорожек использовали моноклональные антитела против  $\alpha$ -тубулина в разведении 1:1000 («Sigma», США). Процентное содержание белка сравнивали с помощью

стандартной программы сравнения интенсивности окрашивания сканированного иммуноблота.

**Внутриклеточную концентрацию кальция** регистрировали на флуориметрической установке InCyt Basic I/P dual wavelength fluorescence imaging system («Intracellular Imaging Inc.», США) с помощью флуоресцентного зонда Fura-2AM («Molecular Probes», США). Перед опытом фрагменты покровных стекол с прикрепленными клетками инкубировали 55 мин в растворе HBSS (130 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4) с 10 мМ глюкозы, 5 мкМ Fura-2AM и 0,025% детергента Pluronic («Molecular Probes», США) при комнатной температуре. Затем, клетки выдерживали 30 мин в растворе HBSS для снятия ацетоксиметильного блока с молекул зонда. Внеклеточный бескальциевый раствор содержал 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ HEPES/КОН, 0.2 мМ EGTA; pH 7.3. Кальциевый раствор содержал 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ HEPES/КОН, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>; pH 7.3. Результаты представлены как отношение интенсивностей флуоресценции зонда при длинах волн возбуждения F340/F380.

**Регистрация ионных токов.** В работе использовали метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в трех конфигурациях: в условиях подведения регистрирующей пипетки к мембране интактной клетки («cell-attached»), на изолированных фрагментах мембраны в варианте, когда в раствор экспериментальной камеры была обращена внутриклеточная поверхность фрагмента мембраны («inside-out»), а также в условиях регистрации тока от целой клетки («whole-cell»). Все измерения выполнены с помощью усилителя Axopatch 200B («Molecular Devices», США). Сопротивление микроэлектродов составляло от 6 до 12 МОм для конфигурации whole-cell и 10–15 МОм для конфигураций cell-attached и inside-out. Усиленный сигнал оцифровывали на частоте 2500 Гц с помощью платы АЦП L-305 (L-Card, Россия). При записях интегральных токов целой клетки потенциал мембраны поддерживали на 0 мВ. Периодически (каждые 5 с) потенциал на мембране изменяли до –100 мВ (на 30 мс), а затем постепенно (с постоянной скоростью 1 мВ/мс) его величину доводили до 70 мВ. Записанные токи нормировали относительно емкости клетки (10–30 пФ). Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы. Для анализа токов через одиночные каналы использовали дополнительную фильтрацию (100 Гц). Амплитуду одиночного тока определяли визуально из записей тока или с помощью амплитудных гистограмм. Все измерения производили при комнатной температуре (20–25°C).

**Растворы.** В измерениях, выполненных в конфигурации whole-cell, раствор регистрирующей пипетки содержал (в мМ): 145 NMDG-Asp, 10 EGTA-Cs, 10 HEPES-Cs и 4,5 CaCl<sub>2</sub> (pCa 7); pH 7,3. Внеклеточный раствор содержал (в мМ): 140 NMDG-Asp, 10 BaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-Cs; pH 7,3. При конфигурации inside-out внутриклеточный раствор (камера) содержал (в мМ): 140 К-глутамата, 5 NaCl, 1

MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-K, pH 7,4, 2 EGTA-K и 1,13 CaCl<sub>2</sub> (pCa 7). При конфигурации cell-attached внеклеточный раствор содержал (в mM): 140 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES-K, 1 MgCl<sub>2</sub> и 2 CaCl<sub>2</sub>. При конфигурациях cell-attached и inside-out раствор регистрирующей пипетки содержал (в mM): 105 BaCl<sub>2</sub> и 10 трис-HCl; pH 7,3. Агонисты подавали к объекту путем перфузии экспериментальной камеры. В работе использовали агонисты: UTP в концентрации 100 мкМ, тапсигаргин в концентрации 10 нМ и 1 мкМ, IP<sub>3</sub> в концентрации 2,5 мкМ. Время полной замены раствора у клетки или фрагмента мембраны – менее 1 с.

## Результаты

### 3.1. Роль белка TRPC1 в интегральном кальциевом входе.

С помощью трансфекции малых интерферирующих РНК (siRNA) против мРНК TRPC1 в клетках HEK293, была получена клеточная линия с подавлением

экспрессии белка TRPC1, эти клетки получили обозначение siTRPC1 [2].

Эффективность подавления, измеренная методом иммуноблотинга, составляла 40-60% (рисунок 1). Для изучения влияния супрессии белка TRPC1 на депо-зависимый вход кальция в клетках HEK293 была проведена серия флуоресцентных измерений с применением зонда Fura-2. Клетки предварительно были инкубированы в растворе, содержащем блокатор кальциевых помп эндоплазматического ретикулума (SERCA) тапсигаргин (Tg), в течение 5 минут при концентрации 1 мкМ, что гарантировало опустошение внутриклеточных кальциевых депо (Carafoli, Brini, 2000).

Затем, при переводе клеток в среду с содержанием 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>, наблюдался вход кальция через депо-управляемые каналы плазматической мембраны (рисунок 2). В клетках siTRPC1 депо-управляемый вход составлял 50% от значения в контрольных клетках, трансфицированных неспецифичной siRNA. Серия электрофизиологических измерений так же показала существенное снижение тапсигаргин-индуцированного входящего тока в клетках siTRPC1 (рисунок 3 А, Б). Депо-зависимый ток в контрольных клетках обладал линейной вольтамперной характеристикой с потенциалом реверсии порядка 10 мВ.

В тоже время, для клеток с подавлением экспрессии белка TRPC1 характерен Tg-индуцированный ток с потенциалом реверсии около 0 мВ. Таким образом,

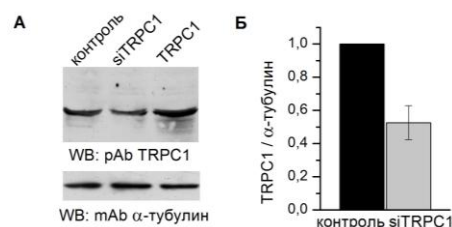


Рисунок 1. Уровень экспрессии белка TRPC1 в клетках siTRPC1. А – Иммуноблотинг с использованием антител против TRPC1. Б – Измерение оптической плотности полосы, соответствующей TRPC1 (отн. ед.). За 100% принята интенсивность полосы, соответствующей TRPC1 в клетках HEK293. Результаты денситометрии скорректированы с учетом ошибки нанесения, рассчитанной после анализа оптической плотности полос, соответствующих α-тубулину. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка по трем независимым экспериментам



супрессия белка TRPC1 уменьшала не только амплитуду, но и селективность депо-зависимого тока в клетках HEK293.

Для исследования эффекта подавления экспрессии белка TRPC1 на агонист-индуцированные токи мы использовали UTP в концентрации 100 мкМ. UTP – агонист, активирующий сигнальный каскад через фосфолипазу C, что приводит к увеличению концентрации  $IP_3$ .  $IP_3$ , в свою очередь, активирует  $IP_3$ -рецептор эндоплазматического ретикулума, через который кальций выходит из депо в цитоплазму. После опустошения депо активируются депо-зависимые каналы. Входящий UTP-индуцированный ток в клетках siTRPC1 по сравнению с контролем уменьшился почти на 90% (рисунок 3 Б, Г).

Данные whole-cell экспериментов, так же как и флуоресцентных измерений позволяют заключить, что белки TRPC1 являются важным элементом депо-зависимого входа кальция в клетках HEK293.

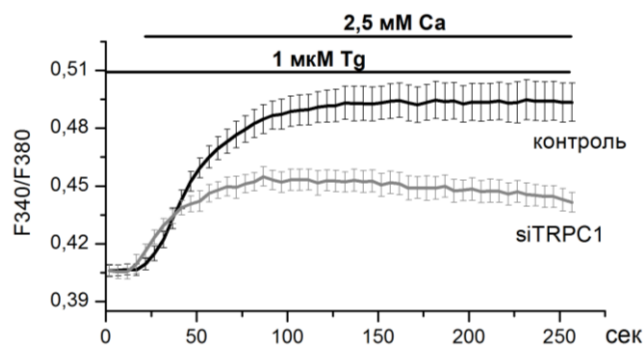


Рисунок 2. Влияние супрессии белка TRPC1 на депо-управляемый вход  $Ca^{2+}$  в клетках HEK293. Показан уровень концентрации Ca в цитозоле клеток siTRPC1 (серая линия) и контрольных HEK293 (черная линия), который представлен как отношение интенсивностей флуоресценции кальциевого зонда Fura-2 при двух длинах волн возбуждения ( $F340/F380$ ). Горизонтальные линии указывают на замену бескальцевого внеклеточного раствора раствором с 2,5 мМ  $Ca^{2+}$ , а также на добавление 1 мкМ Tg. Кривые представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка по 14–16 экспериментам.

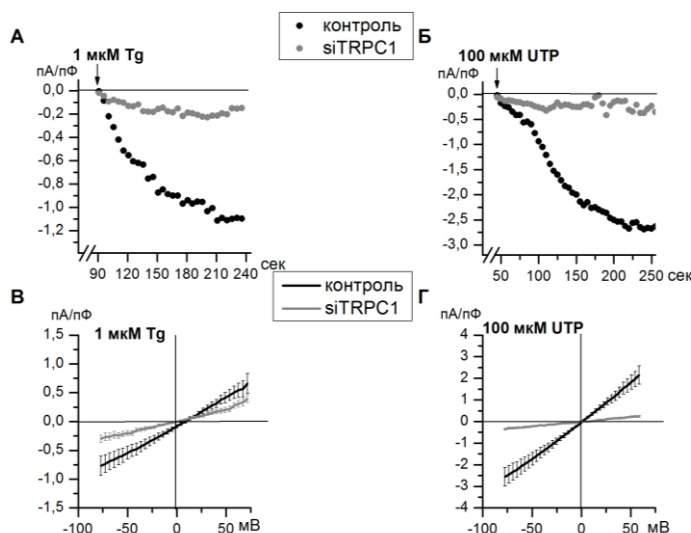


Рисунок 3. Влияние супрессии TRPC1 (серый) по сравнению с контролем (черный) на агонист- и депо-зависимый вход кальция. А и Б – графики развития входящего интегрального тока во времени. В и Г – вольтамперные характеристики интегральных токов по всей поверхности клеток. Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка по 17–20 экспериментам.

### 3.2. Белок TRPC1 формирует каналы $I_{max}$ .

Поскольку TRPC1 вносит существенный вклад в интегральный кальциевый ток, то можно предположить, что белок TRPC1 является субъединицей или регулирует

активность одного или нескольких типов кальциевых каналов. Для проверки этого предположения необходимы исследования на уровне токов через одиночные каналы. Ранее в нашей лаборатории была показана возможность сосуществования ансамбля депо-управляемых каналов в одной клетке (Bugaj и др., 2005).

Используя метод patch-clamp в конфигурации cell-attached, было показано, что внеклеточное приложение 100 мкМ UTP в клетках siTRPC1 активирует два типа каналов.

Первый тип характеризовался линейной вольтамперной характеристикой и проводимостью 1,2 пСм. Потенциал реверсии составлял приблизительно +50 мВ (рисунок 4 А, В), проницаемость двухвалентных катионов относительно одновалентных составляла 20:1. Такие электрофизиологические характеристики соответствуют ранее нами описанному каналу  $I_{min}$ .

Второй тип наблюдаемых каналов имел линейную вольтамперную характеристику с потенциалом реверсии около 0 мВ и проводимостью 4,5 пСм (рисунок 4 Б, В).

Эти данные полностью соответствуют характеристикам канала  $I_{ns}$  в клетках HEK293 дикого типа (рисунок 4, Д).

Приложение 1 мкМ Tg вызывало в клетках siTRPC1 только активность канала  $I_{ns}$ , поскольку канал  $I_{min}$  в клетках HEK293 не проявляет свойств депозависимости.

В контрольных экспериментах с клетками, трансфицированными неспецифичной siRNA, в ответ на внеклеточное приложение 1 мкМ Tg была зафиксирована активность каналов  $I_{ns}$  и  $I_{max}$  (рисунок 4). Каналы  $I_{max}$

обладали проводимостью около 17 пСм, экстраполированный потенциал реверсии был равен +30 мВ, проницаемость  $P_{Ba/K}=4$ . Наблюдаемые свойства каналов  $I_{max}$ ,  $I_{ns}$  и  $I_{min}$  в клетках HEK293, трансфицированных неспецифичной siRNA, идентичны свойствам этих каналов в клетках HEK293 дикого типа. По результатам анализа токов через одиночные каналы в клетках siTRPC1 и контрольных клетках, можно заключить, что супрессия белка TRPC1 приводит к исчезновению канала  $I_{max}$ ,

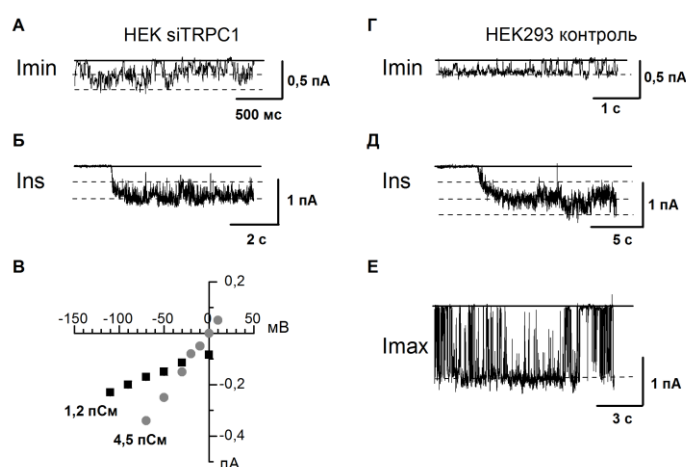


Рисунок 4. Записи токов в конфигурации cell-attached через одиночные каналы в клетках HEK siTRPC1 и контрольных HEK293, трансфицированных неспецифичной siRNA. Подача 100 мкМ UTP активирует: А – каналы  $I_{min}$  в клетках siTRPC1 и Г – каналы  $I_{min}$  в клетках HEK293. Подача 1 мкМ Tg активирует: Б – каналы  $I_{ns}$  в клетках siTRPC1, Д – каналы  $I_{ns}$  в клетках HEK293, Е – каналы  $I_{max}$  в клетках HEK293. В – вольтамперные характеристики каналов  $I_{ns}$  и  $I_{min}$  в клетках siTRPC1. Показаны средние значения  $\pm$  стандартная ошибка по 5 – 8 экспериментам. Пунктирными линиями показаны амплитуды открытого состояния. Масштаб времени и амплитуды указан сбоку от графика.

каналы  $I_{ns}$  и  $I_{min}$  не меняют своих свойств, и не зарегистрировано новых типов каналов. Вероятно, белок TRPC1 формирует каналы  $I_{max}$  в клетках HEK293. Для проверки этого предположения в клетках HEK293 был экспрессирован экзогенный белок TRPC1 (клетки TRPC1+).

Запись токов одиночных каналов осуществлялась в конфигурации inside-out метода patch-clamp. К внутриклеточной стороне подавали  $IP_3$  в концентрации 2,5 мкМ. Свойства записанных в клетках TRPC1+ каналов с проводимостью 17 пСм соответствуют свойствам каналов  $I_{max}$  в клетках HEK293 (рисунок 5). Внеклеточное приложение 1 мкМ Tg, в модификации cell-attached активировало экзогенные  $I_{max}$  каналы в клетках TRPC1+. В контрольных клетках HEK293, трансфицированных GFP, активность каналов  $I_{max}$  была непродолжительна, и в эксперименте обычно присутствовало не более одного канала  $I_{max}$ . Но в клетках TRPC1+ в каждом эксперименте были активны два или более каналов  $I_{max}$ , продолжительность открытого состояния которых была существенно выше, чем в контроле.

Таким образом, эксперименты с подавлением и увеличением экспрессии белка TRPC1 показали, что белок TRPC1 формирует каналы  $I_{max}$ , но не участвует в формировании и регуляции каналов  $I_{ns}$  и  $I_{min}$ .

### 3.3. Роль белка TRPC3 в депо-зависимом входе кальция.

Белки семейства TRPC способны формировать гетерогенный канал в сочетании TRPC1/4/5 и TRPC3/6/7. Представитель первой группы – TRPC1 был исследован нами ранее. Из второй группы наиболее перспективным является белок TRPC3, в некоторых исследованиях указывают на возможность данного белка формировать депо-зависимые каналы. Уровень экспрессии белка TRPC3 относительно других белков семейства TRPC в клетках A431 выше, чем в HEK293. Поэтому было решено в качестве объекта исследования выбрать клеточную линию A431, в которой присутствуют те же типы депо- и рецептор-управляемых кальциевых

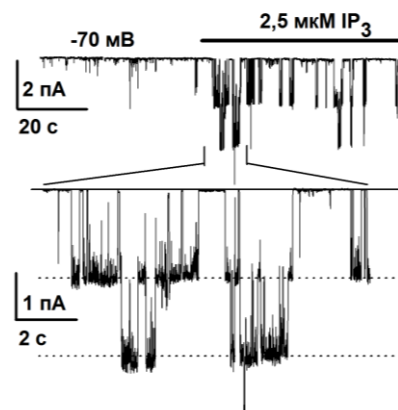


Рисунок 5. Активность экзогенных каналов  $I_{max}$ , зарегистрированная при потенциале на мембране  $-70$  мВ в ответ на приложение 2,5 мкМ  $IP_3$  в конфигурации inside-out, показан характерный эксперимент. Горизонтальной чертой обозначено время подачи  $IP_3$ .

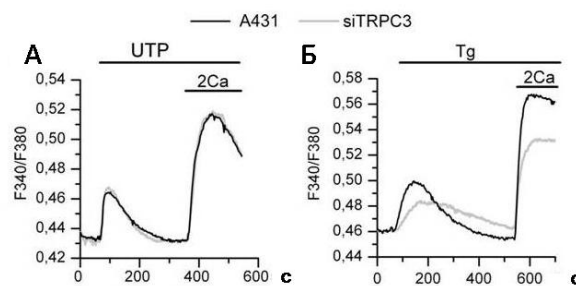


Рисунок 6. Влияние супрессии TRPC3 (серая линия) по сравнению с контролем (черная линия) на агонист- и депо-зависимый вход кальция в клетках A431. Линии указывают добавление 100 мкМ UTP(A) и 1 мкМ Tg(B), а так же на замену безкальцевого внеклеточного раствором с 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

каналов, что и в HEK293. Необходимо заметить, что в отличие от клеток HEK293 в клетках A431 канал  $I_{\min}$  является депо-управляемым [1].

Для изучения роли белка TRPC3 в кальциевом ответе клеток A431 была получена стабильная клеточная линия с подавлением экспрессии белка TRPC3 (siTRPC3). При измерении внутриклеточной концентрации кальция с помощью зонда Fura-2 было показано, что UTP-индуцированный вход кальция в клетках siTRPC3 и в контрольных A431 практически не отличался (рисунок 6 А). В ответ на пассивное опустошение депо тапсигаргином клетки siTRPC3 продемонстрировали вход кальция на 40% меньший, чем в контроле (рисунок 6 Б).

Для изучения влияния супрессии белка TRPC3 на интегральные агонист-индуцированные и депо-зависимые токи был использован метод patch-clamp. Whole-cell эксперименты показали, что подавление экспрессии TRPC3 не влияет на развитие и вольтамперную характеристику UTP-индуцированных токов. Депо-зависимые токи, вызванные приложением Tg, в клетках siTRPC3 развивались медленнее, чем в контроле. А достигнутый максимум тока в клетках siTRPC3 был меньше контрольного на 44% при потенциале  $-70$  мВ. Данные электрофизиологического метода согласуются с данными флуоресцентных измерений и показывают, что агонист-индуцированный вход кальция идет через TRPC3-независимые пути, либо в клетке включаются компенсаторные механизмы, позволяющие нивелировать недостаток TRPC3.

#### 3.4. Белок TRPC3 участвует в активации канала $I_{ns}$ .

Как и в клетках HEK293, в A431 функционирует целый ансамбль депо-управляемых каналов:  $I_{\min}$ ,  $I_{\max}$  и  $I_{ns}$ . Вероятно, в состав одного или нескольких из этих каналов входит белок TRPC3 и, чтобы выяснить за счет каких из этих каналов уменьшается депо-зависимый вход кальция в клетках siTRPC3, необходимо было поставить эксперименты по записи токов через одиночные каналы. В экспериментах cell-attached опустошение депо в клетках siTRPC3, вызванное приложением  $1$  мкМ Tg, приводило к активации токов через каналы  $I_{\min}$  и  $I_{\max}$ . Свойства этих каналов и частота появления были практически идентичны таковым в контрольных клетках A431. Каналы  $I_{ns}$ , наблюдавшиеся в 17,5% случаев ( $n=74$ ) в клетках A431, не активировались тапсигаргином в клетках с пониженной экспрессией TRPC3 ( $n=32$ ), что свидетельствует о необходимости белка TRPC3 для депо-зависимой активации каналов  $I_{ns}$ . Вероятно, уменьшение Tg-индуцированных интегральных токов в клетках siTRPC3 связано с исчезновением активности каналов  $I_{ns}$ . Ранее с помощью флуоресцентных и whole-cell измерений было установлено, что в клетках siTRPC3 и A431 нет различий в интегральном UTP-индуцированном токе. В экспериментах cell-attached приложение  $100$  мкМ UTP в клетках siTRPC3 вызывало активацию каналов  $I_{\min}$  и  $I_{\max}$ . Частота наблюдения этих каналов была аналогична соответственной частоте в клетках A431. Активность каналов  $I_{ns}$  в 62 экспериментах на клетках siTRPC3 не была зарегистрирована. Но, в

15% из этих экспериментов наблюдалась активность кальциевых каналов, не наблюдаемых ранее (рисунок 7). Каналы обладали линейной вольтамперной характеристикой с потенциалом реверсии близким к 0 мВ. Проводимость нового

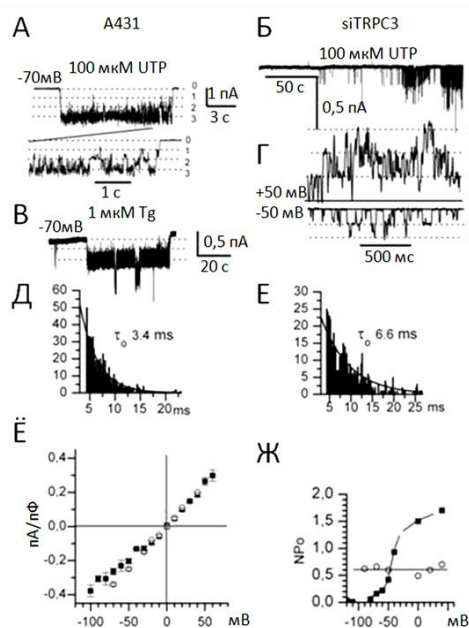


Рисунок 7. Активность каналов  $I_{ns}$  и  $I_{ns-2}$ . **А** и **Б** – Записи токов каналов  $I_{ns}$  в клетках A431 в ответ на приложение UTP (**А**) и Tg (**Б**). Под графиком **А** расположен фрагмент эксперимента в уменьшенном масштабе времени. **Б** – Записи токов каналов  $I_{ns-2}$  в клетках siTRPC3 в ответ на приложение UTP. **Г** – фрагменты записей токов при потенциалах на мембране 50 и -50 мВ. **Д** и **Е** – гистограммы открытого состояния канала  $I_{ns}$  в клетках A431 (**Д**) и  $I_{ns-2}$  в клетках siTRPC3 (**Е**). Из обработки исключены события длительностью меньше 3 мс. Обработанное количество событий для A431 – 1523, для siTRPC3 – 1385. Экстраполяция результатов экспоненциальной функцией с константами 3,4 мс (**Д**) и 6,6 мс (**Е**) показана сплошной линией. **Ё** – средние вольтамперные характеристики каналов  $I_{ns}$  (окружности,  $n=4$ ) и  $I_{ns-2}$  (квадраты,  $n=12$ ). Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка. **Ж** – зависимость вероятности открытого состояния каналов  $I_{ns}$  (окружности) и  $I_{ns-2}$  (квадраты) от потенциала на мембране.

канала была около 4 пСм, что схоже с каналом  $I_{ns}$ , но вероятность открытого состояния имела явную потенциал-зависимость и увеличивалась при потенциалах выше -50 мВ (рисунок 7, **Ж**). Новый канал в клетках siTRPC3 был назван  $I_{ns-2}$ . Канал  $I_{ns-2}$  не был зарегистрирован в экспериментах по записи Tg-индуцированных токов в клетках siTRPC3 ( $n=32$ ). Таким образом, этот канал является рецептор-управляемым, пассивное опустошение кальциевых депо не приводит к активации данного канала. Каналы  $I_{ns}$  и  $I_{ns-2}$  обладают схожей проводимостью 5 и 4 пСм соответственно, а также схожей частотой встречаемости 12% и 15%. Следовательно, канал  $I_{ns-2}$  способен компенсировать отсутствие  $I_{ns}$  при измерении интегральных UTP-индуцированных токов, что наблюдается и при флуоресцентных и при электрофизиологических измерениях. Исходя из приведенных выше фактов, можно заключить: белок TRPC3 участвует в регуляции каналов  $I_{ns}$  в клетках A431.

3.5. Кальциевый сенсор эндоплазматического ретикулума белок STIM1 активирует кальциевый вход.

Белок STIM1 – кальциевый сенсор эндоплазматического ретикулума, который при опустошении депо меняет свою конформацию и активирует кальциевые каналы плазматической мембраны. Так как в клетках HEK293 активны депо-зависимые кальциевые каналы различных типов, необходимо выяснить их индивидуальные



пути активации. Определить, все ли из этих каналов активируются через STIM1-зависимый сигнальный путь.

С помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) на базе клеток HEK293 была создана стабильная клеточная линия HEKS4 с подавлением экспрессии белка STIM1 [4,5]. Методом иммуноблотинга было показано уменьшение количества белка STIM1 в клетках HEKS4 на 70% по сравнению с контрольными клетками HEK293. В первую очередь, необходимо было оценить воздействие подавления экспрессии STIM1 на интегральный вход кальция в клетку HEK293. Измерение концентрации кальция в цитоплазме с помощью флуоресцентного зонда Fura-2 показало уменьшение депо-зависимого входа в клетках с подавлением экспрессии белка STIM1 на 32% по сравнению с контрольными клетками HEK293. УTP-индуцированный входа кальция был ниже на 40%.

Записи интегральных токов в конфигурации whole-cell тоже свидетельствуют о подавлении кальциевого входа в клетках HEKS4. УTP-индуцированный ток в клетках HEKS4 был подавлен на 90% по сравнению с HEK293, а Tg-индуцированный ток был подавлен на 75%.

Результаты, полученные на стабильной клеточной линии HEKS4, были подтверждены и при подавлении экспрессии STIM1 с помощью временной трансфекции siRNA (рисунок 8 В) [3]. Так, вход кальция в ответ на приложение 1 мкМ Tg уменьшился по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными неспецифичной siRNA, на 40% (рисунок 8 А).

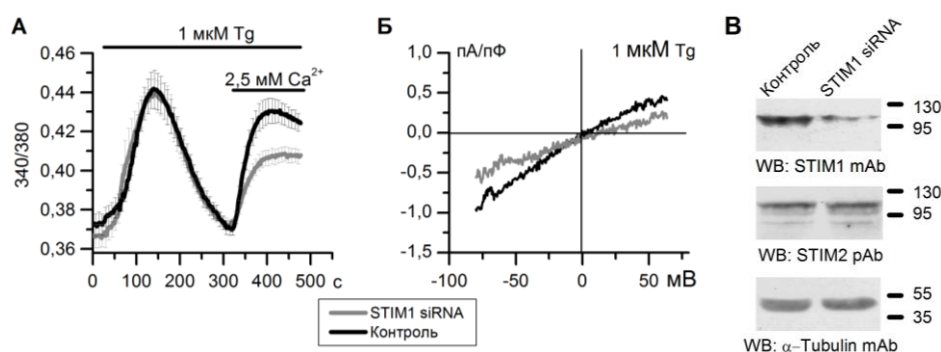


Рисунок 8. Влияние супрессии белка STIM1 на депо-управляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках HEK293. А – уровень концентрации Ca в цитозоле контрольных HEK293 (черная линия) и клеток с подавлением экспрессии STIM1 (серая линия) представлен как отношение интенсивностей флуоресценции кальциевого зонда Fura-2 при двух длинах волн возбуждения ( $F_{340}/F_{380}$ ). Горизонтальные линии обозначают замену бескальциевого внеклеточного раствора раствором с 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , а также добавление 1 мкМ Tg. Б – Средние вольт-амперные характеристики токов после приложения 1 мкМ Tg к клеткам HEK293 (черная линия) и клеткам с подавлением экспрессии STIM1 (серая линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов (примерно через 240 с после подачи Tg). В – иммуноблотинг с использованием антител против STIM1, STIM2 и тубулина.

Уменьшение интегральных токов, записанных с помощью метода whole-cell составило 30% (рисунок 8 Б).

В клетках HEK293 с экспрессией экзогенного белка STIM1 наблюдалось увеличение Tg- индуцированного входа кальция на 40% по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими белок GFP, а электрофизиологические эксперименты показывали увеличение интегрального тока на 80% (рисунок 9).

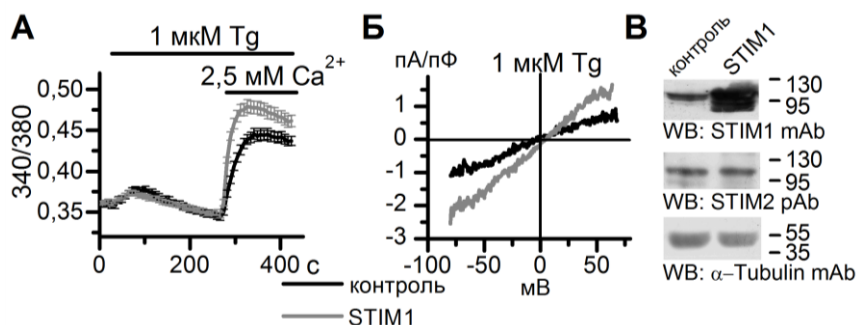


Рисунок 9. Влияние экспрессии экзогенного белка STIM1 на депо-управляемый вход Ca<sup>2+</sup> в клетках HEK293. **А** – уровень концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитозоле контрольных HEK293 (черная линия) и клеток с гиперэкспрессией STIM1 (серая линия) представлен как отношение интенсивностей флуоресценции кальциевого зонда Fura-2 при двух длинах волн возбуждения (F340/F380). Горизонтальные линии обозначают замену бескальциевого внеклеточного раствора раствором с 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>, а также добавление 1 мкМ Tg. **Б** – Средние вольт-амперные характеристики токов после приложения 1 мкМ Tg к клеткам HEK293 (черная линия) и клеткам с гиперэкспрессией STIM1 (серая линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов (примерно через 240 с после подачи Tg). **В** – иммуноблотинг с использованием антител против STIM1, STIM2 и тубулина.

Таким образом, белок STIM1 вносит существенный вклад в активацию депо-зависимого входа кальция в клетках HEK293, что согласуется с литературными данными. Но, в этой клеточной линии экспрессируется и гомолог белка STIM1 – белок STIM2, который тоже является кальциевым сенсором ЭР и может участвовать в активации депо-зависимого входа. Благодаря различиям в структуре N-концевых EF-hand–SAM доменов, белок STIM2 более чувствителен к незначительным колебаниям концентрации кальция в депо, чем STIM1.

### 3.6. Белок STIM2 активирует депо-зависимый вход кальция.

Подавление экспрессии белка STIM2 с помощью siRNA приводит к снижению Tg- индуцированного входа кальция на 50% по сравнению с контрольными клетками HEK293, трансфицированными неспецифичной siRNA (рисунок 10 В). В электрофизиологических экспериментах так же наблюдается уменьшение интегральных токов на 25% и изменение формы их вольтамперной характеристики в сторону увеличения потенциала реверсии (рисунок 10 Б). Экспрессия экзогенного белка STIM2 в клетках HEK293 приводит к увеличению Tg - индуцированного входа кальция (рисунок 11), измеренного с помощью Fura-2, на 26% по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими белок GFP. Интегральные токи при отрицательных потенциалах увеличились на 20% в клетках с гиперэкспрессией STIM2 относительно контрольных клеток, а потенциал реверсии сдвинулся в

сторону положительных значений. Таким образом, белок STIM2 вносит существенный вклад в активацию депо-зависимого входа кальция в клетках HEK293.

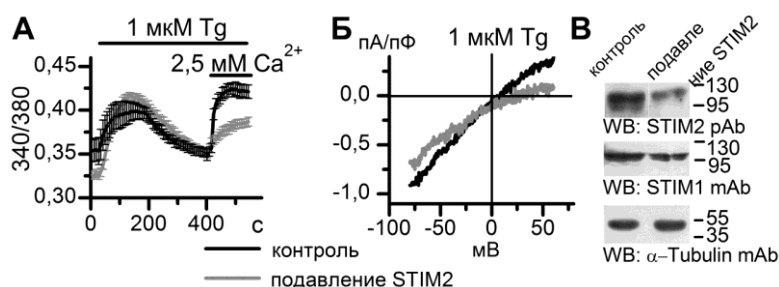


Рисунок 10. Влияние супрессии белка STIM2 на депо-управляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках HEK293. **А** – уровень концентрации  $\text{Ca}$  в цитозоле контрольных HEK293 (черная линия) и клеток с подавлением экспрессии STIM2 (серая линия) представлен как отношение интенсивностей флуоресценции кальциевого зонда Fura-2 при двух длинах волн возбуждения ( $F_{340}/F_{380}$ ). Горизонтальные линии обозначают замену бескальцевого внеклеточного раствора раствором с 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , а также добавление 1 мкМ Tg. **Б** – Средние вольтамперные характеристики токов после приложения 1 мкМ Tg к клеткам HEK293 (черная линия) и клеткам с подавлением экспрессии STIM2 (серая линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов (примерно через 240 с после подачи Tg). **В** – иммуноблоттинг с использованием антител против STIM1, STIM2 и тубулина.

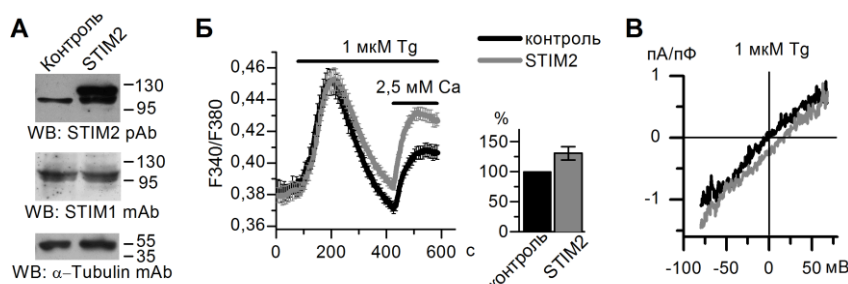


Рисунок 11. Влияние экспрессии экзогенного белка STIM2 на депо-управляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках HEK293. **А** – иммуноблоттинг с использованием антител против STIM1, STIM2 и тубулина. **Б** – уровень концентрации  $\text{Ca}$  в цитозоле контрольных HEK293 (черная линия) и клеток с оверэкспрессией STIM2 (серая линия) представлен как отношение интенсивностей флуоресценции кальциевого зонда Fura-2 при двух длинах волн возбуждения ( $F_{340}/F_{380}$ ). Горизонтальные линии обозначают замену бескальцевого внеклеточного раствора раствором с 2,5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , а также добавление 1 мкМ Tg. Гистограмма иллюстрирует увеличение депо-зависимого входа кальция по сравнению с контролем. **В** – Средние вольтамперные характеристики токов после приложения 1 мкМ Tg к клеткам HEK293 (черная линия) и клеткам с оверэкспрессией STIM2 (серая линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов (примерно через 240 с после подачи Tg).

### 3.7. Роль белков STIM1 и STIM2 в активации депо-зависимых каналов.

Поскольку STIM2 запускает сигнальный каскад при более слабом опустошении депо, чем нужно для активации STIM1, варьируя условия опустошения депо можно добиться селективной активации белка STIM2.



При записи токов через одиночные каналы были использованы следующие активаторы белков STIM:

- Приложение 100 мкМ UTP в конфигурации cell-attached или приложение 2,5 мкМ  $IP_3$  в конфигурации inside-out вызывает опустошение депо за счет активации  $IP_3R$ . В данном случае возможна активация как белков STIM1, так и STIM2.

- Пассивное опустошение депо с помощью 1 мкМ Tg активирует белки STIM1 и STIM2, не используя сигнальный путь через  $IP_3R$ .

- Частичное опустошение депо с помощью 10 нМ Tg активирует, в основном, белок STIM2.

### 3.7.1. Активация каналов $I_{ns}$ в клетках HEK293.

Канал  $I_{ns}$  в клетках HEK293 характеризуется потенциалом реверсии около 0 мВ, проводимостью 4,5 пСм и амплитудой 0,35 пА при потенциале  $-70$  мВ. В отличие от контрольных клеток, в стабильной линии HEK293 с подавлением экспрессии белка STIM1 не было зарегистрировано активности каналов  $I_{ns}$ . Ни приложение UTP или  $IP_3$ , ни пассивное опустошение депо с помощью Tg, не вызвали активацию этих каналов. В клетках с временной трансфекцией siRNA против белка STIM1, в 26 экспериментах не была зарегистрирована активность этих каналов. В контрольных клетках активность этих каналов была обнаружена в 3 экспериментах из 22, что говорит о необходимости наличия белка STIM1 для активации каналов  $I_{ns}$ .

При частичном опустошении депо с помощью 10 нМ Tg в клетках с оверэкспрессией STIM2 каналы  $I_{ns}$  не были зарегистрированы в 33 экспериментах (таблица 1), последующее добавление 100 мкМ UTP не вызвало активации этих каналов. Иначе говоря, увеличение количества сенсора STIM2 никак не повлияло на активность каналов  $I_{ns}$ .

В связи с низкой встречаемостью данного типа каналов наиболее показательным является эксперимент с подавлением белка STIM1, которое приводит к исчезновению активных каналов  $I_{ns}$ .

Таким образом, в клетках линии HEK293 белок STIM1 непосредственно активирует каналы  $I_{ns}$ , в то время как белок STIM2 не оказывает влияния на их активность.

Таблица 1. Частота наблюдений каналов  $I_{max}$  и  $I_{ns}$  при различных способах опустошения депо в клетках HEK293.

клетки	активатор	каналы $I_{max}$	каналы $I_{ns}$
HEK293 контрольная siRNA	1 $\mu$ M Tg	31%	14%
HEK293 подавление экспрессии STIM1	1 $\mu$ M Tg	12%	0%
HEK293 оверэкспрессия GFP	10 нМ Tg	16%	0%
HEK293 оверэкспрессия STIM2	10 нМ Tg	15%	0%

### 3.7.2. Активация каналов $I_{\max}$ в клетках HEK293.

Канал  $I_{\max}$  имеет проводимость 18 пСм, потенциал реверсии +20 мВ и амплитуду порядка 1,6 пА при потенциале –70 мВ.

В клетках HEKS4 и контрольных клетках HEK293 при внеклеточном приложении 100 мкМ UTP в экспериментах cell-attached активировались каналы  $I_{\max}$  в 25% и 40% случаев соответственно. Частота наблюдений каналов  $I_{\max}$  была значительно ниже в клетках HEKS4.

В контрольных клетках HEK293 каналы  $I_{\max}$  встречаются в 31% экспериментов. Временное подавление экспрессии STIM1 с помощью siRNA приводило к снижению частоты наблюдения каналов  $I_{\max}$  при активации их 1мкМ Tg до 12% (Таблица 1).

При частичном опустошении депо с помощью 10 нМ Tg, в условиях преобладающей активации STIM2, частота встречаемости каналов  $I_{\max}$  составила 16%. Тот факт, что активность данных каналов была зарегистрирована при частичном опустошении депо, говорит и о возможности активации каналов  $I_{\max}$  белком STIM2.

Таким образом, в клетках линии HEK293 каналы  $I_{\max}$  могут быть активированы как белком STIM1, так и STIM2, но STIM1 является более значимым активатором.

### 3.7.3. Белки STIM2 регулируют активность каналов $I_{\min}$ .

Каналы  $I_{\min}$  демонстрируют линейную вольтамперную характеристику в области отрицательных потенциалов, экстраполированный потенциал реверсии +50 мВ, проводимость 1,2 пСм, амплитуду порядка 0,18 пА при потенциале –70 мВ. У этих каналов ярко выраженная селективность к двухвалентным катионам относительно одновалентных. В клеточной линии A431 каналы  $I_{\min}$  демонстрируют свойство депо-зависимости, активируясь пассивным опустошением депо. В клетках HEK293 каналы  $I_{\min}$ , активировались приложением 100 мкМ UTP к внешней стороне клетки или внутриклеточным приложением 2,5 мкМ  $IP_3$ , но не в ответ на пассивное опустошение депо, вызванное действием 1 мкМ Tg, что

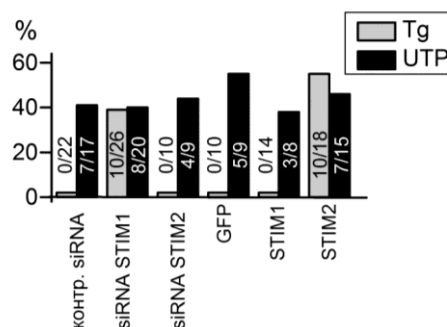


Рисунок 12. Частота встречаемости каналов  $I_{\min}$  в клетках (слева на право): контрольные клетки, трансфицированные неспецифичной siRNA, клетки с подавлением экспрессии STIM1, с подавлением экспрессии STIM2, экспрессирующие белок GFP, экспрессирующие экзогенный STIM1, экспрессирующие экзогенный STIM2. Черные столбики - ответ на приложение 1 мкМ Tg, Серые столбики – ответ на приложение 100 мкМ UTP. Цифры – количество экспериментов, где наблюдались каналы  $I_{\min}$  и общее количество экспериментов. Высота столбца соответствует процентному соотношению этих величин.

указывало на отсутствие свойства депо-зависимости. Однако, в клетках HEKS4 с пониженной экспрессией белка STIM1 каналы  $I_{\min}$  активировались не только приложением UTP и  $IP_3$ , но и в ответ на пассивное опустошение депо 1 мкМ Tg.

В клетках, трансфицированных siRNA против белка STIM1, в 10 из 26 экспериментов была зафиксирована активность каналов  $I_{\min}$  в ответ на приложение 1 мкМ Tg. Но, активность этих каналов не была зарегистрирована ни в одном из 22 экспериментов на контрольных клетках. В клетках, трансфицированных siRNA против STIM2, приложение 1 мкМ Tg не вызвало активности  $I_{\min}$  в 10 экспериментах, но последующее приложение 100 мкМ UTP показало наличие каналов  $I_{\min}$ . Экспрессия экзогенного белка STIM2 в клетках HEK293 привела к увеличению активности  $I_{\min}$ , в ответ на подачу Tg, в 10 случаях из 18 наблюдалась активность этих каналов. В 10 экспериментах на контрольных клетках, экспрессирующих белок GFP, активность  $I_{\min}$  в результате действия Tg не была замечена, но подача UTP активировала данные каналы (рисунок 12). Экспрессия экзогенного белка STIM1 не повлияла на регуляцию активности канала  $I_{\min}$ . Так же как и в контрольных клетках, лишь UTP активировал данные каналы, но не Tg.

Представленные выше эксперименты показали, что при увеличении относительного количества белка STIM2 в клетках HEK293 канал  $I_{\min}$  становится чувствительным к Tg, то есть приобретает свойство депо-зависимости и активируется белком STIM2. В клетках HEK293 дикого типа частичное опустошение депо 10 нМ Tg активирует каналы  $I_{\min}$ , что свидетельствует о STIM2 как об основном активаторе этого канала (рисунок 13).

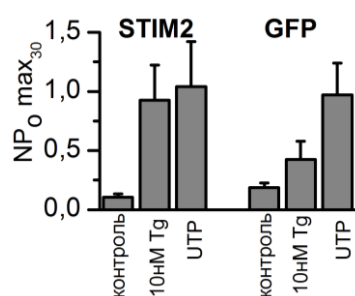


Рисунок 13. Активация каналов  $I_{\min}$  при частичном опустошении депо воздействием 10 нМ Tg. Данные представлены для клеток HEK293 дикого типа, HEK293, экспрессирующих экзогенный белок GFP, HEK293, экспрессирующих экзогенный белок STIM2. Значения вероятности открытого состояния каналов  $I_{\min}$  на участке записи с максимальной активностью и длительностью 30 секунд. Показаны значения перед приложением агонистов (контроль), после приложения 10 нМ Tg и 100 мкМ UTP соответственно. Представлены средние значения и стандартная ошибка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в диссертации данные позволяют иначе взглянуть на механизм регуляции депо-зависимого входа. Состав эндогенных депо-зависимых каналов неоднороден, в одной клетке могут сосуществовать различные каналы, сформированные как минимум двумя семействами белков (TRPC и Orai). Несмотря на то, что TRPC1 и TRPC3 гомологичные белки со схожей структурой, давно общепризнанные участники депо-зависимого входа, в настоящей работе было показано, что эти белки выполняют разные функции. Один из них (TRPC1) образует пору канала, а другой – регуляторный, отвечает за механизм активации канала.

Первый уровень регуляции депо-зависимого входа – это наличие в одной клетке набора депо-зависимых каналов с различными электрофизиологическими характеристиками, например, проводимостью и селективностью. Другой уровень регуляции – два кальциевых сенсора эндоплазматического ретикулума с разным сродством к кальцию, которые регулируют кальциевый вход в зависимости от степени опустошения депо. Если же говорить об активации исследованных каналов белками STIM, то хоть все три канала являются депо-зависимыми, но каждый из них обладает характерным механизмом активации, использующим разные белки-сенсоры STIM (рисунок 14). Таким образом, белки STIM взаимодействуют с различными каналами плазматической мембраны и могут конкурировать между собой, обеспечивая третий уровень регуляции депо-зависимого входа. Использование различных уровней позволяет клетке получить широкую вариативность кальциевых сигналов, которая и делает кальций универсальным вторичным мессенджером, способным информационно обеспечить множество происходящих в клетке процессов.

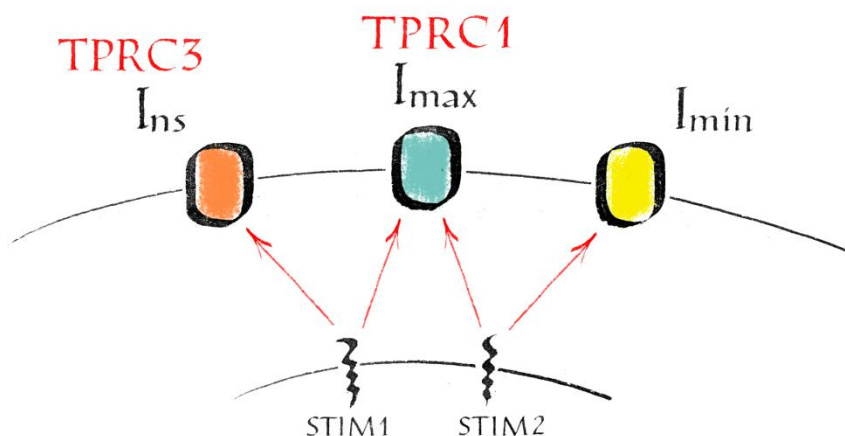


Рисунок 14. Активация депо-зависимых каналов белками STIM.

## ВЫВОДЫ

1. Белок TRPC1 формирует эндогенные гомомерные каналы  $I_{\max}$  в клетках HEK293.
2. Белок TRPC3 определяет депо-зависимую активацию эндогенного канала  $I_{ns}$  в клетках A431.
3. Канал  $I_{ns}$ , содержащий белок TRPC3, регулируется кальциевым сенсором эндоплазматического ретикулума белком STIM1.
4. TRPC1-сформированный канал  $I_{\max}$  регулируется как белком STIM1, так и белком STIM2, но STIM1 является более эффективным активатором.
5. Канал  $I_{\min}$  регулируется STIM2. Свойство депо-зависимости канала  $I_{\min}$  зависит от соотношения количества белков STIM1 и STIM2 в клетке.

## Список основных публикаций по теме диссертации

1. Suppression of TRPC3 leads to disappearance of store-operated channels and formation of a new type of store-independent channels in A431 cells/ Elena Kaznacheyeva, Lyuba Glushankova, Vladislav Bugaj, Olga Zimina, **Anton Skopin**, Vadim Alexeenko, Leonidas Tsiokas, Ilya Bezprozvanny, and Galina N. Mozhayeva // J. Biol. Chem. 2007. T. 282. № 32. С. 23655–23662.
2. TRPC1 protein forms only one type of native store-operated channels in HEK293 cells/ **Anton Skopin**, Alexey Shalygin, Vladimir Vigont, Olga Zimina, Lyubov Glushankova, Galina N. Mozhayeva, and Elena Kaznacheyeva // Biochimie. 2013. T. 95. № 2. С. 347–353.
3. STIM1 and STIM2 proteins differently regulate endogenous store-operated channels in HEK293 cells/ Alexey Shalygin, **Anton Skopin**, Vera Kalinina, Olga Zimina, Lyuba Glushankova, Galina N. Mozhayeva, and Elena Kaznacheyeva // J. Biol. Chem. 2015. T. 290. № 8. С. 4717–4727.
4. Роль белка STIM1 в рецептор и депо управляемом входе  $Ca^{2+}$  в клетки HEK293 / Зими́на, О. А., В. А. Вигонт, И. А. Поздняков, Л. Н. Глушанкова, С. В. Львовская, **А. Ю. Скопин**, Г. Н. Можаяева, Е. В. Казначеева // БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ. 2010. Т. 27. № 3. С. 237–243.
5. Электрофизиологические свойства кальциевых каналов в клетках линии HEK S4 с пониженным уровнем белка STIM1/ А. В. Шалыгин, В. А. Вигонт, Л. Н. Глушанкова, О. А. Зими́на, Д.О. Колесников, **А. Ю. Скопин**, Е. В. Казначеева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 3. С. 304–308.

## Список цитированной литературы

1. Feske S. CRAC channelopathies. // *Pflugers Arch.* 2010. T. 460. № 2. C. 417–35.
2. Sweeney M. Role of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in bronchial contraction and remodeling/ Sweeney, Michele, Sharon S. McDaniel, Oleksandr Platoshyn, Shen Zhang, Ying Yu, Bethany R. Lapp, Ying Zhao, Patricia A. Thistlethwaite, and Jason X. J. Yuan // *J. Appl. Physiol.* 2002. T. 92. № 4. C. 1594–602.
3. Putney J.W. A model for receptor-regulated calcium entry. // *Cell Calcium.* 1986. T. 7. № 1. C. 1–12.
4. Clapham D.E. Calcium signaling. // *Cell.* 2007. T. 131. № 6. C. 1047–58.
5. Nilius B., Droogmans G. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium // *Physiol Rev.* 2001. T. 81. № 4. C. 1415–1459.
6. Liou J. STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor essential for  $\text{Ca}^{2+}$ -store-depletion-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  influx/ Liou, Jen, Man Lyang Kim, Won Do Heo, Joshua T. Jones, Jason W. Myers, James E. Ferrell, and Tobias Meyer // *Curr. Biol.* 2005. T. 15. № 13. C. 1235–41.
7. Zhang S.L. STIM1 is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor that activates CRAC channels and migrates from the  $\text{Ca}^{2+}$  store to the plasma membrane/ Zhang, Shenyuan L., Ying Yu, Jack Roos, J. Ashot Kozak, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, Kenneth A. Stauderman, and Michael D. Cahalan // *Nature.* 2005. T. 437. № 7060. C. 902–5.
8. Bugaj V. Functional properties of endogenous receptor- and store-operated calcium influx channels in HEK293 cells/ Bugaj, Vladislav, Vadim Alexeenko, Alexander Zubov, Lyuba Glushankova, Anton Nikolaev, Zhengnan Wang, Elena Kaznacheyeva, Ilya Bezprozvanny, and Galina N. Mozhayeva // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 17. C. 16790–7.
9. Zagranichnaya T.K., Wu X., Villereal M.L. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells/ Zagranichnaya, Tatiana K., Xiaoyan Wu, and Mitchel L. Villereal // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 33. C. 29559–69.
10. Liu X., Singh B.B., Ambudkar I.S. TRPC1 is required for functional store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region/ Liu, Xibao, Brij B. Singh, and Indu S. Ambudkar // *J. Biol. Chem.* 2003. T. 278. № 13. C. 11337–43.
11. Carafoli E., Brini M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport/ Carafoli, E. and M. Brini // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000. T. 4. № 2. C. 152–61.