

УДК 577.352.465

IP₃-РЕЦЕПТОР ВТОРОГО ТИПА ЯВЛЯЕТСЯ ДОМИНАНТНОЙ ИЗОФОРМОЙ В КЛЕТКАХ НЕК-293

© 2020 г. М. Ф. Быстрова^а, О. А. Рогачевская^а, Е. Н. Кочкина^а,
Е. Е. Копылова^а, Н. П. Коваленко^а, С. С. Колесников^а, *

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Московская обл., Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.

После доработки 13.07.2020 г.

Принята к публикации 17.07.2020 г.

Многие первичные медиаторы способны инициировать внутриклеточную Ca²⁺-сигнализацию, стимулируя поверхностные рецепторы клеток, сопряженные с фосфоинозитидным каскадом. Ключевыми в этом процессе являются продукция вторичного медиатора IP₃, катализируемая фосфолипазой C, и IP₃-зависимый выброс депонированного Ca²⁺. Регуляторная роль IP₃ сводится к активации IP₃-рецепторов, являющихся лиганд-управляемыми Ca²⁺-проницаемыми каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и некоторых других внутриклеточных органеллах. Геномы позвоночных содержат три гена, кодирующие субъединицы IP₃-рецепторов, включая IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3. В разных клетках функционируют различные комбинации IP₃-рецепторов, активность которых находится под контролем различных механизмов, что определяет индивидуальные особенности IP₃-зависимых Ca²⁺-сигналов и специфическую роль IP₃-рецепторов в физиологии клеток данного типа. Клетки линии НЕК-293 повсеместно используются как модельная гетерологическая система для экспрессии рекомбинантных белков и исследования рецепторных систем и механизмов внутриклеточной сигнализации. В этих клетках функционируют все три изоформы IP₃-рецепторов. Для анализа связи активности IP₃-рецепторов и различных аспектов внутриклеточной Ca²⁺-сигнализации определенные перспективы открывает создание линий клеток, в которых подтипы IP₃R-рецепторов функционируют в различных комбинациях. В данной работе в клетках НЕК-293 были последовательно инактивированы гены *IP₃R1* и *IP₃R3* с использованием системы CRISPR/Cas9 и была получена моноклональная линия клеток НЕК-293IP₃R2^{+/+}, в которой функционален только IP₃R2. Сравнительный анализ внутриклеточной Ca²⁺-сигнализации, инициируемой ацетилхолином в клетках НЕК-293 и клетках НЕК-293IP₃R2^{+/+}, свидетельствовал о том, что генетическая инактивация генов *IP₃R1* и *IP₃R3* не привела к изменению параметров Ca²⁺-ответов на ацетилхолин. В целом, полученные данные указывают на то, что в клетках НЕК-293 ключевой вклад в генерацию Ca²⁺-ответов на агонисты вносит IP₃-рецептор второго типа.

Ключевые слова: внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация, IP₃-рецепторы, система CRISPR/Cas9, клеточные моноклоны

DOI: 10.31857/S0233475520060031

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация является одним из ключевых процессов клеточной физиологии, который вовлечен в регуляцию самых разнообразных клеточных функций, включая подвижность, дифференцировку и пролиферацию, экспрессию генов, синаптическую передачу, трансцитоплазмальный транспорт, мышечную сократимость и апоптоз [1]. Многие рецепторы, функционирующие на клеточной поверхности, сопряжены с фосфоинозитидным каскадом и при активации агонистами способны инициировать мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺. Ключевым

этапом в этом процессе является продукция вторичного медиатора IP₃, катализируемая фосфолипазой C, и IP₃-зависимый выброс депонированного Ca²⁺ из Ca²⁺-депо, в роли которого выступает специализированная часть эндоплазматического ретикулума (ЭР), примыкающая к плазмолемме [2, 3]. Регуляторная роль IP₃ сводится к активации IP₃-рецепторов, которые фактически являются лиганд-управляемыми Ca²⁺-проницаемыми каналами, функционирующими в ЭР и некоторых других внутриклеточных органеллах [4]. Помимо IP₃ цитозольный Ca²⁺ также является ключевым регулятором IP₃-рецепторов, оказывая при

относительно небольших концентрациях стимулирующее воздействие и ингибируя их активность при микромолярных концентрациях [4, 5]. Связывание Ca²⁺ с высокоаффинным активаторным сайтом IP₃-рецептора приводит к существенному росту вероятности открытого состояния этого Ca²⁺-канала [6], так что ионы Ca²⁺, высвободившиеся из Ca²⁺-депо через IP₃-рецептор, потенцируют его активность. Эта и аналогичная положительная обратная связь в случае рианодиновых рецепторов лежат в основе Ca²⁺-индуцированного выброса депонированного Ca²⁺ (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, CICR) – регенеративного процесса, который детерминирует многие аспекты внутриклеточной Ca²⁺-сигналикации [2, 7].

Геномы позвоночных содержат три гена, которые кодируют субъединицы IP₃-рецепторов, включая IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3, которые способны формировать гомо- и гетеротетрамерные каналы [5], хотя ряд данных указывает на то, что доля гетеротетрамеров в клетках невелика [8]. Несмотря на высокую степень гомологии первичных последовательностей IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3, они заметно отличаются по своим биофизическим свойствам и характеризуются разными регуляторными механизмами и чувствительностью к IP₃ и Ca²⁺ [4, 5]. Так, аффинности связывания IP₃ описываются рядом IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3 [9]. В разных клетках IP₃-рецепторы функционируют в различных комбинациях, и их индивидуальная активность находится под контролем специфических механизмов, что определяет характерные особенности IP₃-зависимой Ca²⁺-сигналикации и специфическую роль IP₃-рецепторов в физиологии клеток данного типа и биологической ткани в целом [4, 5]. Так, IP₃R1 играет существенную роль в Ca²⁺-сигналикации в ооцитах, и в его отсутствие процессы оплодотворения и развития протекают с нарушениями [10, 11]. Атаксия у млекопитающих ассоциируется с мутациями *IP₃R1* [12, 13]. Основной изоформой в кардиомиоцитах является IP₃R2, и его аномально высокая экспрессия в этих клетках ассоциируется с сердечной гипертрофией [14]. IP₃R3 играет ключевую роль во вкусовой трансдукции, и инактивация гена *IP₃R3* приводит к потере чувствительности к горьким и сладким стимулам и аминокислотам [15]. В ряде клеток было показано, что IP₃R3 локализован в мембранных контактах эндоплазматического ретикула и митохондрий (mitochondria-associated membranes, MAMs); такая локализация указывает на его участие в формировании митохондриального Ca²⁺-сигнала, который может запустить апоптоз [16, 17].

Клетки линии НЕК-293 повсеместно используются как модельная гетерологическая система

для экспрессии рекомбинантных белков и для исследований рецепторных систем, механизмов внутриклеточной сигнализации и ионного транспорта. В этих клетках функционируют все три изоформы IP₃-рецепторов [18]. Для анализа роли IP₃-рецепторов в генерации различных форм Ca²⁺-сигналов, индуцированных агонистами рецепторов, целесообразно использовать линии клеток, в которых IP₃R-изоформы функционируют в различных комбинациях. В данной работе мы последовательно инактивировали гены *IP₃R1* и *IP₃R3* в клетках НЕК-293, используя систему CRISPR/Cas9. В результате была получена моноклональная линия клеток, в которых функционален только IP₃R2-подтип, и был проведен функциональный анализ этих генетически модифицированных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Редактирование генов IP₃-рецепторов

1.1. Конструкция для направленного редактирования гена *IP₃R3*. Экспрессионная кассета для внесения двухнитевого разрыва в выбранный участок гена *IP₃R3* сконструирована с использованием плазмиды pGuide-it-tdTomato и реагентов набора Guide-it CRISPR/Cas9 System (Takara). Для конструирования плазмиды pGuide-it-tdTomato/IP₃R3 были синтезированы два взаимно-комплементарных олигонуклеотида 5'-ccggATGTCCAGCTTTCTTCACAT-3' и 5'-aaacATGTGAAGAAAGCTGGACAT-3'. Олигонуклеотиды содержали на 5'-концах адаптерные последовательности для последующего клонирования в вектор (подчеркнуты). Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью T4-полинуклеотидкиназы, из набора Anza™ T4 PNK kit (Invitrogen). Реакцию отжига фосфорилированных олигонуклеотидов проводили в буфере Annealing Buffer из набора Guide-it CRISPR/Cas9 System (Takara) в соответствии с рекомендацией производителя. Полученный дуплекс олигонуклеотидов клонировали в линейаризованную плазмиду pGuide-it Vector по липким концам адаптерных последовательностей. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки Stellar Competent Cells (Takara). Наличие вставки в полученных плазмидных клонах и правильность полученной конструкции подтверждались секвенированием.

1.2. Конструкция для направленного редактирования *IP₃R1*. Для выключения гена *IP₃R1* использовали вектор AIO-GFP, обеспечивающий экспрессию Cas9-D10A нуклеазы, слитой с EGFP, и двух РНК-гидов, содержащих последовательности смыслового и антисмыслового спейсеров [19]. Вектор AIO-GFP был предоставлен Steve Jackson (Addgene plasmid # 74119; <http://n2t.net/addgene:74119>;

RRID:Addgene_74119). Для конструирования плазмиды AIO-GFP/IP₃R1 были синтезированы две пары взаимно-комплементарных олигонуклеотидов: 5'-accgAAATGGATTTATTAGCACCT-3' и 5'-aaacAGGTGCTAATAAATCCATTT-3', соответствующие РНК-гиду со смысловым спейсером, и 5'-accgAACAAATGTCTCCAATATGT-3' и 5'-aaacACATATTGGAGACATTTGTT-3', соответствующие РНК-гиду с антисмысловым спейсером. В вектор AIO-GFP последовательно клонировали сначала антисмысловый дуплекс фосфорилированных олигонуклеотидов по сайту BbsI, затем смысловой дуплекс по сайту BsaI. Наличие вставок в векторе AIO-GFP/IP₃R1 подтверждалось секвенированием.

1.3. Выявление клеточных моноклонов с биаллельными мутациями целевых генов. Геномная ДНК индивидуальных клеточных моноклонов использовалась в качестве матрицы для ПЦР-амплификации фрагмента целевого гена, предназначенного для редактирования, с праймерами AAGTCAGACTTTCCAGGTAAC и AGTGAATAAAGGCACTCTC для IP₃R1 (ожидаемый размер ампликона 769 п.н.) и с праймерами GG-GATTTGCATGTGTGTGGTG и СТАCTGAAGCTGGGAAGAACAGG для IP₃R3 (ожидаемый размер ампликона 962 п.н.). Амплифицированный участок геномной ДНК, содержащий предполагаемую мутацию, подвергался гидролизу комплексом гидРНК/Cas9 *in vitro* с использованием реагентов набора Guide-it™ Indel Identification Kit (Takara). Синтез РНК-гидов методом транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы фага T7 проводили с использованием реактивов набора Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit (Takara). Для получения ДНК матриц, содержащих последовательность промотора T7 РНК-полимеразы и спейсерные последовательности, были синтезированы олигонуклеотиды ССТСТААТАСГАСТСАСТАТАГГАААТ-ГГАТТТАТТАГСАСТГТТТААГАГСТАТГС для IP₃R1 и ССТСТААТАСГАСТСАСТАТАГГАТ-ГТССАГСТТТСТТСАСТГТТТААГАГСТАТГС для IP₃R3 (последовательности спейсеров РНК-гидов в составе олигонуклеотидов подчеркнуты). Фрагменты геномной ДНК клонов с выявленными в реакции *in vitro* биаллельными мутациями клонировались в вектор pJET1.2/blunt по тупым концам. Для выявления инделей 10 индивидуальных плазмидных клонов каждой клонотекы были секвенированы.

2. Обратная транскрипция с ПЦР в режиме реального времени

Уровень экспрессии генов семейства IP₃R-рецепторов оценивали методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реаль-

ного времени (ОТ-ПЦР-РВ). РНК из клеток НЕК-293 выделяли с помощью колонок и реагентов набора innuPREP DNA/RNA Mini Kit (Analytik Jena). Для удаления следов геномной ДНК и проведения реакции обратной транскрипции с отрицательным контролем использовали реагенты набора SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher Scientific). ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием прибора ДТлайт ("ДНК-Технология", Россия) и готовой реакционной смеси Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Для проведения реакции ПЦР-РВ использовались следующие ген-специфические праймеры: GTCGGAATTA-AAGGATCAGATGAC и AAGTGCAAAATCAGGT-GCTTTC для IP₃R1, AAAGACCCCAACAGAATCACTG и ATTCTTCCTTTGTTCTGTCATCTG для IP₃R2, GACATGCTTCATCTGTGGTC и TTTCCGCTGCTCCGTCATC для IP₃R3. Специфичность амплификации оценивали с помощью кривых плавления. В качестве референсного гена использовали ген бета-актина. Уровень экспрессии генов рассчитывали согласно стандартному методу 2^{-ΔCt}.

3. Получение моноклональных сублиний клеток НЕК-293 с модифицированным геномом

Трансфекцию клеток НЕК-293 проводили с использованием Lipofectamin 3000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Через 72 ч после трансфекции клетки анализировались по интенсивности флуоресценции с помощью сортера клеток FACS Aria SORP (BD Biosciences). Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции, переносили их по одной в лунку 96-луночного планшета, и по достижении 50–70% конфлюентности клеточные клоны переносили в лунки с большей ростовой поверхностью (последовательно в 24-, 12- и 6-луночные планшеты). После достижения монослоя в лунке 6-луночного планшета клетки использовались для генетического анализа. Клеточные моноклоны с выявленными биаллельными мутациями целевого гена культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в воздухе при 37°C. Перед экспериментом клетки обрабатывали последовательно раствором Версена и 0.25% раствором трипсина и ресуспендировали в полной ростовой среде. По этому протоколу с использованием плазмиды AIO-GFP/IP₃R1 сначала был получен клеточный моноклон с биаллельными мутация-

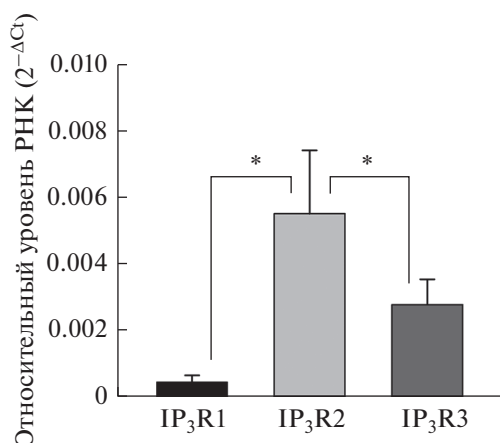


Рис. 1. Относительный уровень транскриптов генов *IP₃R1*, *IP₃R2* и *IP₃R3* в клетках HEK-293. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, полученные усреднением результатов четырех независимых экспериментов. Ген бета-актина использовался в качестве референсного. Уровень экспрессии генов рассчитывали согласно стандартному методу $2^{-\Delta C_t}$. Звездочками обозначены статистически значимые различия по Стьюденту ($p < 0.05$).

ми *IP₃R1*, который затем был трансфицирован плазмидой pGuide-it-tdTomato/*IP₃R3* с последующей селекцией и выявлением клеточного моноклона с биаллельными мутациями *IP₃R3*.

4. Микрофотометрия

Для анализа функциональных последствий инактивации генов IP₃-рецепторов проводился анализ агонист-зависимой Ca²⁺-сигнализации в модифицированных клетках HEK-293. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Затем клетки инкубировались в присутствии проникающего агента Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes, США) в течение 20–30 мин, что обеспечивало загрузку клеток Ca²⁺-зондом Fluo-4. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl₂ – 2, MgSO₄ – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10. Бескальцевый раствор содержал 100 мкМ EGTA вместо 2 мМ CaCl₂. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20 $\times$ /0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток поочередно возбуждали в диапазоне 480 $\pm$ 105 нм, эмиссию регистрировали в областях 525 $\pm$ 25 нм. Изменение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсив-

ности флуоресценции $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F_0 - F$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии Fluo-4 и его эмиссия в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений проводили с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспрессионный анализ

Как уже упоминалось выше, в клетках HEK-293 (human embryonic kidney) функционируют все три IP₃-рецептора человека [18]. С целью оценки относительного уровня экспрессии генов IP₃-рецепторов в образцах РНК, выделенной из клеток HEK-293, проводилась ОТ-ПЦР-РВ с использованием ген-специфических праймеров. Оказалось, что на уровне клеточной популяции уровень транскриптов гена *IP₃R2* превышал уровень транскриптов *IP₃R1* и *IP₃R3* в среднем на порядок и вдвое, соответственно (рис. 1). Это свидетельствовало о том, что в клетках HEK-293 IP₃R2 может вносить ключевой вклад в агонист-индуцированную Ca²⁺-сигнализацию. Поскольку до сих пор не разработаны изоформ-специфичные ингибиторы IP₃-рецепторов, для выяснения их роли в клеточной физиологии мы использовали технологию геномного редактирования CRISPR/ Cas9. Учитывая данные транскриптомного анализа, показывающего повышенный уровень экспрессии *IP₃R2* по сравнению с двумя другими генами, нами была получена стабильная клеточная сублиния с инактивированными генами *IP₃R1* и *IP₃R3* для проведения сравнительного функционального анализа с исходными клетками HEK-293 дикого типа (wild type, WT).

2. Получение клеточных моноклонов, экспрессирующих только IP₃R2-рецептор

Стабильная клеточная линия HEK293/ Δ IP₃R1/ Δ IP₃R3 с нокаутом генов *IP₃R1* и *IP₃R3* создавалась в два этапа. Сначала был получен клеточный моноклон HEK-293/ Δ IP₃R1 с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания *IP₃R1* человека, затем в этом моноклоне с использованием системы CRISPR/ Cas9 был инактивирован ген *IP₃R3*. Для редактирования *IP₃R1* человека мы использовали мутантный вариант Cas9-D10A с низкой активностью, применение которого способствует значительному снижению нецелевых эффектов по сравнению с действием нуклеазы Cas9. Целевое действие Cas9-D10A, приводящее к двухнитевому разрыву ДНК, обеспечивается кооперацией двух направляющих sgРНК. Экспрессионная каскада конструировалась на основе плазмиды

CCATACATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCGGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTGG
 GGATGTATAACCTCTGTAAACAAGAGACATGCGCCTCCCTAGCTGTTTACCTAAATAATCGTGAACC

Рис. 2. Положение последовательностей РАМ (выделены красным) с протоспейсерами (подчеркнуты) на смысловой и антисмысловой цепях ДНК выбранного участка *IP₃R1*.

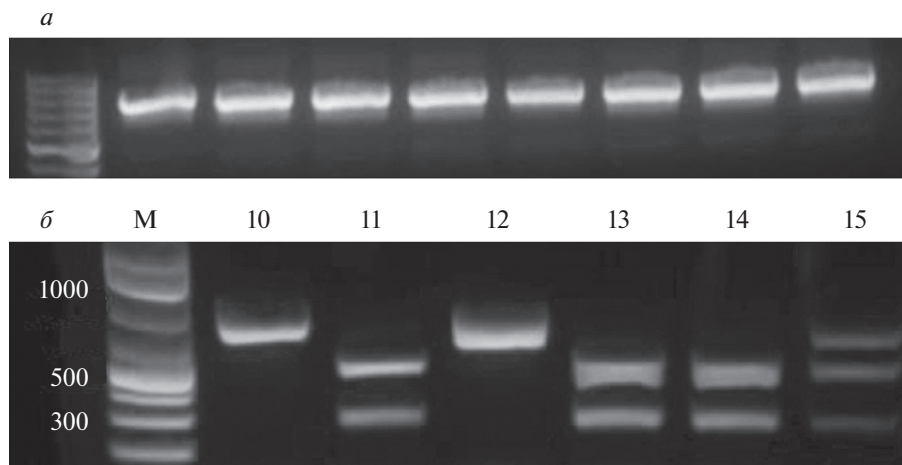


Рис. 3. ПЦР-амплификация фрагмента геномной ДНК, содержащей предположительный сайт мутации *IP₃R1*, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК индивидуальных клеточных моноклонов (а). Примеры гидролиза *in vitro* комплексом Cas9/sgRNA фрагментов геномной ДНК, амплифицированных из индивидуальных клеточных моноклонов 10–15 (б).

AIO-GFP, кодирующей никазу Cas9-D10A, сливную с зеленым флуоресцентным белком, и пару направляющих sgPHK под контролем промоторов U6 [19]. Потенциальные протоспейсеры для действия CRISPR/Cas9-10A, состоящие из 20 нуклеотидов и содержащие на 3'-конце мотив — NGG, были выбраны в третьем экзоне гена *IP₃R1* справа от старт-кодона (рис. 2).

Сконструированную плазмиду AIO-GFP/*IP₃R1* использовали для трансфекции клеток HEK-293 с последующей селекцией клеточных моноклонов. Из индивидуальных клеточных моноклонов была выделена геномная ДНК, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации с ген-специфическими праймерами, фланкирующими предположительный сайт мутации (рис. 3а).

Следующим этапом работы было выявление моноклонов с моноаллельными и биаллельными мутациями, проведенное в модели *in vitro* с помощью комплекса Cas9-sgRNA. В этой модели для специфического гидролиза амплифицированных фрагментов геномной ДНК индивидуальных моноклонов использовался коммерчески доступный фермент нуклеаза Cas9 и синтезированная нами sgRNA. Далее для каждого индивидуально моноклона была поставлена реакция гидролиза амплифицированных с геномной ДНК фрагментов *IP₃R1* в системе Cas9-sgRNA *in vitro*. На рис. 3б показаны результаты детекции типа мута-

ций в шести моноклонах HEK293/*ΔIP₃R1*. Биаллельные мутации содержат моноклоны 10 и 12, моноаллельные — 15, моноклоны 11, 13 и 14 содержат ДНК дикого типа. Генетические изменения в нокаутных субклинах подтверждались секвенированием целевого участка *IP₃R1*. По результатам секвенирования для дальнейшей работы был выбран клеточный моноклон со следующими биаллельными мутациями *IP₃R1*. Первая мутация состоит из делеции 48 пар нуклеотидов, приводящей к смещению открытой рамки считывания и изменению первичной последовательности *IP₃R1*-рецептора после 11-й аминокислоты. Вторая мутация представляет собой делецию 35 пар нуклеотидов, приводящую к смещению открытой рамки считывания и появлению стоп-кодона после 21-й аминокислоты (рис. 4а).

Для редактирования *IP₃R3* использовался вектор pGuide-it-tdTomato (Takara), кодирующий синтез sgRNA под управлением U6 промотора, нуклеазы Cas9 и красный флуоресцентный белок tdTomato. При конструировании плазмиды на участке вблизи старт-кодона *IP₃R3* в последовательности первого экзона был выявлен потенциальный протоспейсер для действия CRISPR/Cas9, содержащий с 3'-конца мотив РАМ — CGG (ATGTCCAGCTTTCTTCACATCGG). Полученной плазмидой pGuide-it-tdTomato/*IP₃R3*, кодирующей элементы системы CRISPR/Cas9, трансфицировались клетки субклина с нокаут-

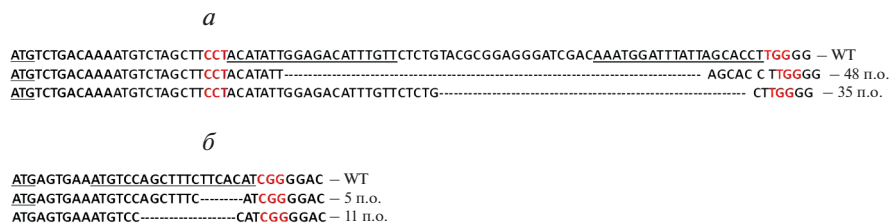


Рис. 4. Биаллельные делеции различной длины, выявленные в целевом участке *IP₃R1* (*a*). Области РАМ выделены красным, АТГ-кодон и положение протоспейсера подчеркнуты. *б* – Биаллельные делеции различной длины в целевом участке *IP₃R3*. АТГ-кодон и положение протоспейсера подчеркнуты.

рованным *IP₃R1*. Выявление мутаций *IP₃R3* в индивидуальных клеточных моноклонах проводили по тому же протоколу, что был использован при получении НЕК293/ Δ *IP₃R1*. Был получен клеточный моноклон с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания *IP₃R3* (рис. 4б). В результате первой мутации от первичной последовательности рецептора остается только 7 аминокислот, а в результате второй – только 5 аминокислот.

Таким образом, с помощью технологии CRISPR/Cas9 получена стабильная линия клеток НЕК293/ Δ *IP₃R1*/ Δ *IP₃R3* с биаллельными мутациями генов *IP₃R1* и *IP₃R3*, приводящими к их инактивации, при сохранении функционального гена *IP₃R2*. Для этой линии ниже используется термин НЕК-293IP₃R2⁺⁺.

3. Физиологические эксперименты

Далее проводился сравнительный функциональный анализ клеток НЕК-293WT и НЕК-293IP₃R2⁺⁺ с использованием микрофотометрии (Ca²⁺ imaging) и Ca²⁺-зонда Fluo-4. В типичном эксперименте в фотометрической камере находилось 100–120 клеток, загруженных Fluo-4, и осуществлялся мониторинг Fluo-4-индуцированной флуоресценции каждой клетки. Функциональные последствия инактивации генов *IP₃R1* и *IP₃R3* оценивались по способности клеток отвечать на ацетилхолин (ACh), который при достаточной дозе стимулирует Ca²⁺-сигнализацию в большинстве (70–80%) клеток НЕК-293WT. Следует отметить, что Ca²⁺-ответы клеток НЕК-293WT на ACh слабо зависели от внеклеточного Ca²⁺ и подавлялись ингибитором фосфолипазы C U73122, но не его неактивным аналогом U7343 (рис. 5а). Это свидетельствовало о незначительном вкладе никотиновых рецепторов в ACh-зависимые Ca²⁺-сигналы, которые, очевидно, генерировались в клетках НЕК-293WT за счет стимуляции мускариновых рецепторов, сопряженных G-белками с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией депонированного Ca²⁺. Примечательной особен-

ностью ответов клеток НЕК-293WT на ACh было то, что кратковременные последовательные аппликации агониста в увеличивающихся дозах либо не вызывали мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺, либо инициировали импульсное повышение Ca²⁺ практически до одной и той же величины при разных концентрациях выше пороговой (рис. 5б, верхняя кривая). При относительно малых концентрациях ACh генерировались гладкие одиночные Ca²⁺ пики, в то время как при увеличении дозы клеточные ответы носили осцилляторный характер (рис. 5б, верхняя кривая). В этом отношении генетически модифицированные клетки НЕК-293IP₃R2⁺⁺ фактически не отличались от клеток НЕК-293WT (рис. 5б, нижняя кривая). Такой характер ответов “все или ничего” на ACh и их рандаун (rundown), наблюдавшийся при длительных регистрациях у некоторых клеток, делали невозможным анализ дозозависимости величины ответов. Хотя частота осцилляций и глубина модуляции Ca²⁺-ответов в определенной степени зависели от концентрации ACh (рис. 5б), разброс этих параметров от клетки к клетке был слишком велик, чтобы использовать их в качестве параметров, характеризующих клеточную популяцию.

В силу сказанного выше мы охарактеризовали количественно дозозависимость клеточных ответов, используя популяционный параметр – фракцию клеток в популяции, способных генерировать Ca²⁺-ответ на ACh при данной концентрации. Клетки НЕК-293WT стимулировались ACh в диапазоне концентраций 125 нМ – 5 мкМ, где 125 нМ – это примерно пороговая концентрация для самых чувствительных клеток. Для клеток НЕК-293IP₃R2⁺⁺ использовалась область 125 нМ – 1 мкМ. В общей сложности мы проанализировали восемь клеточных популяций НЕК-293WT и изучили Ca²⁺-ответы 917 клеток. Для каждой популяции определялась фракция клеток, способных отвечать на агонист, концентрация которого варьировалась, и затем определялась средняя величина и стандартное отклонение по восьми популяциям. Соответствующая усредненная дозозависимость представлена на рис. 5в, светлые

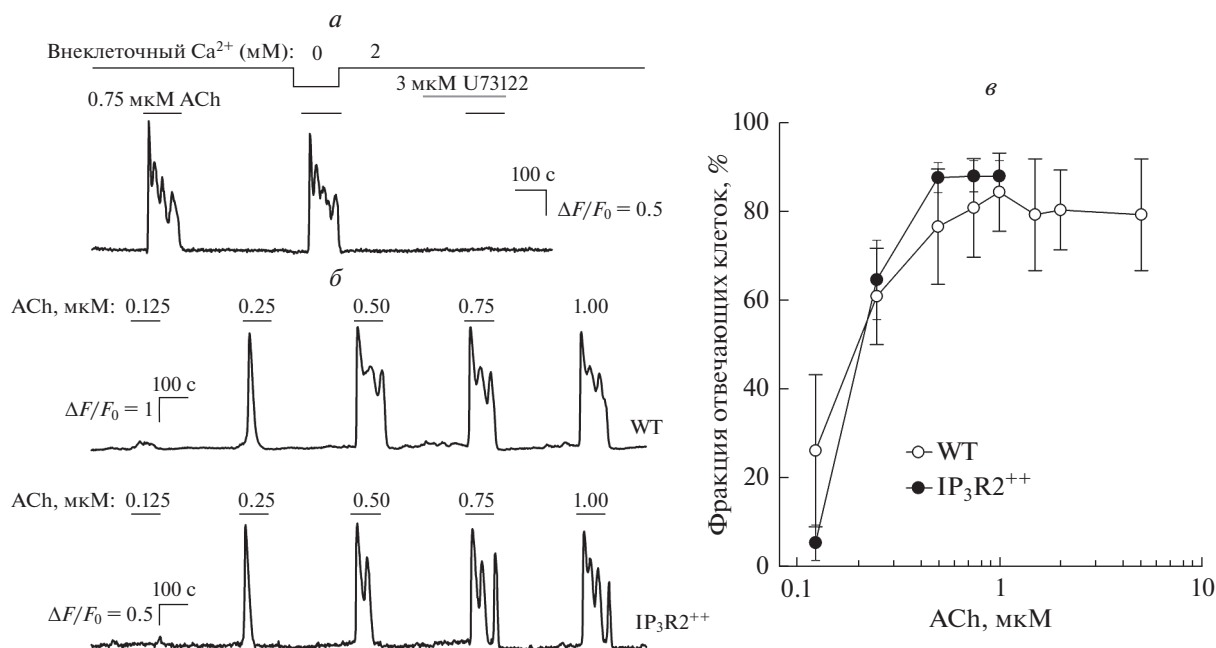


Рис. 5. Ca^{2+} -ответы клеток на ACh. *a* – Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в клетках HEK-293WT ($n = 53$), содержащих Fluo-4 (репрезентативный эксперимент; $n = 53$), в контроле, при удалении внеклеточного Ca^{2+} и в присутствии ингибитора фосфолипазы C U73122. *б* – Ответы клетки HEK-293WT (верхняя кривая) и HEK-293IP₃R2⁺⁺ (нижняя кривая) на ACh, апплицированный в разных дозах, как указано. *в* – Фракция клеток, генерирующих Ca^{2+} -ответы на ACh при данной концентрации, для популяции HEK-293WT (○) и HEK-293IP₃R2⁺⁺ (●). Моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальных кривых. Относительную флуоресценцию Ca^{2+} -индикаторов оценивали как $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F – текущая интенсивность флуоресценции, F_0 – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

кружочки. Аналогичные эксперименты были проведены с клетками HEK-293IP₃R2⁺⁺, в которых были изучены 296 клеток в четырех популяциях. Полученная для этих клеток дозозависимость представлена черными кружочками на рис. 5в. Оказалось, что в популяциях HEK-293WT и HEK-293IP₃R2⁺⁺ фракции клеток, в которых ACh вызывал детектируемую мобилизацию Ca^{2+} при использованных дозах, были статистически неотличимы, за исключением точки 125 нМ.

Таким образом, в согласии с данными ПЦР-РВ (рис. 1), которые предполагали заметно меньший уровень экспрессии IP₃R1 и IP₃R3 по сравнению с IP₃R2, а значит, меньшую функциональную значимость в клетках HEK-293WT, последнее прямо следовало из результатов функционального анализа клеток HEK-293IP₃R2⁺⁺. Оказалось, что инактивация генов IP₃R1 и IP₃R3 существенно не затронула Ca^{2+} -сигнализацию, по крайней мере, в части, касающейся ответов на ACh, которые у клеток HEK-293IP₃R2⁺⁺ по величине и кинетике были статистически неотличимы от таковых у клеток HEK-293WT. Поскольку популяционная кривая доза–ответ (рис. 5в) предполагает несколько более низкую чувствительность клеток HEK-293IP₃R2⁺⁺, возможно, что это является

следствием инактивации IP₃R1 и/или IP₃R3, которые играют заметную роль в генерации Ca^{2+} -ответов клеток HEK-293WT при их стимуляции при дозах ACh, близких к пороговым.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток (поддержана Программой развития МГУ). Работа поддержана Российским научным фондом (грант 18-14-00347).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foskett J.K., White C., Cheung K.H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol. Rev.* **87**, 593–658.
2. Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
3. Thillaiappan N.B., Chakraborty P., Hasan G., Taylor C.W. 2019. IP₃ receptors and Ca^{2+} entry. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1866** (7), 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2018.11.007>
4. Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP₃ receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
5. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and Function of IP₃ Receptors. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **11**(4), a035063.

6. Mak D.O., Foscett J.K. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*. **58**, 67–78.
7. Rios E. 2018. Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J. Gen. Physiol.* **150**, 521–537.
8. Chandrasekhar R., Alzayady K.J., Yule D.I. 2015. Using concatenated subunits to investigate the functional consequences of heterotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 364–370.
9. Iwai M., Michikawa T., Bosanac I., Ikura M., Mikoshiba K. 2007. Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 12755–12764.
10. Miyazaki S., Yuzaki M., Nakada K., Shirakawa H., Nakanishi S., Nakade S., Mikoshiba K. 1992. Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*. **257** (5067), 251e5.
11. Takei K., Shin R.M., Inoue T., Kato K., Mikoshiba K. 1998. Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science*. **282** (5394), 1705e8.
12. Matsumoto M., Nakagawa T., Inoue T., Nagata E., Tanaka K., Takano H., Minowa O., Kuno J., Sakakibara S., Yamada M., Yoneshima H., Miyawaki A., Fukuuchi Y., Furuichi T., Okano H., Mikoshiba K., Noda T. 1996. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*. **379** (6561), 168e71.
13. Tada M., Nishizawa M., Osamu O. 2014. IP₃ receptors in neurological disorders. In: *Pathologies of calcium channels*. Eds. Weiss N., Koschak A. Heidelberg: Springer. 731 p.
14. Nakayama H., Bodi I., Maillet M., DeSantiago J., Domeier T.L., Mikoshiba K., Lorenz J.N., Blatter L.A., Bers D.M., Molkentin J.D. 2010. The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res.* **107** (5), 659e66.
15. Hisatsune C., Yasumatsu K., Takahashi-Iwanaga H., Ogawa N., Kuroda Y., Yoshida R., Ninomiya Y., Mikoshiba K. 2007. Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **282** (51), 37225–37231.
16. Mendes C.C., Gomes D.A., Thompson M., Souto N.C., Goes T.S., Goes A.M., Rodrigues M.A., Gomez M.V., Nathanson M.H., Leite M.F. 2005. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 40892–40900.
17. Kuo I.Y., Brill A.L., Lemos F.O., Jiang J.Y., Falcone J.L., Kimmerling E.P., Cai Y., Dong K., Kaplan D.L., Wallace D.P., Hofer A.M., Ehrlich B.E. 2019. Polycystin 2 regulates mitochondrial Ca²⁺ signaling, bioenergetics, and dynamics through mitofusin 2. *Sci. Signal.* **12** (580), eaat7397.
18. Lock J.T., Alzayady K.J., Yule D.I., Parker I. 2018. All three IP₃ receptor isoforms generate Ca²⁺ puffs that display similar characteristics. *Sci. Signal.* **11** (561), eaau0344.
19. Chiang T.W., le Sage C., Larrieu D., Demir M., Jackson S.P. 2016. CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.* **6**, 24356.

IP₃ Receptor of Type 2 Is a Dominant Isoform in HEK-293 Cells

M. F. Bystrova¹, O. A. Rogachevskaja¹, E. N. Kochkina¹, E. E. Kopylova¹,
N. P. Kovalenko¹, S. S. Kolesnikov^{1, *}

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

The variety of the first messengers initiates intracellular Ca²⁺ signaling by stimulating cell surface receptors coupled to the phosphoinositide cascade. Fundamental for this process is the phospholipase C-mediated production of the second messenger IP₃ followed by IP₃-dependent Ca²⁺ release from Ca²⁺ stores. The regulatory role of IP₃ is to activate IP₃ receptors, which are ligand-gated Ca²⁺-permeable ion channels operating in endoplasmic reticulum and some other intracellular organelles. In invertebrate genomes, three genes encode IP₃ receptor subunits, including *IP₃R1*, *IP₃R2* и *IP₃R3*. Different cells employ distinct combinations of IP₃ receptors, and each of them is controlled by specific regulatory mechanisms. These factors determine attributes of IP₃-dependent Ca²⁺ signaling and a specific functional role for a given IP₃ receptor in physiology of a particular cell type. HEK-293 cells are ubiquitously used as a model heterologous system for the expression of recombinant proteins and studying receptors and related mechanisms of intracellular signaling. All three isoforms of IP₃ receptors are functional in HEK-293 cells. The link between IP₃ receptor activity and distinctive aspects of intracellular signaling can be explored by employing a set of cell lines, wherein IP₃ receptors function in certain combinations. Here we sequentially inactivated genes encoding *IP₃R1* and *IP₃R3* in HEK-293 cells by using the CRISPR/Cas9 approach. Eventually, the monoclonal cell line HEK-293IP₃R2⁺⁺ was generated, wherein solely *IP₃R2* was functional. The comparative analysis of intracellular Ca²⁺ signaling triggered by acetylcholine in HEK-293 и HEK-293IP₃R2⁺⁺ cells indicated that the ablation of genes *IP₃R1* and *IP₃R3* did not lead to any evident change of characteristics of Ca²⁺ responses to acetylcholine. The overall data obtained suggested that in HEK-293 cells, agonist-induced Ca²⁺ signals are mainly mediated by *IP₃R2*.

Keywords: intracellular Ca²⁺ signaling, IP₃ receptors, CRISPR/Cas9 system, monoclonal cell lines