

ИНВАРИАНТНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО ВХОДА Ca^{2+} ВО ВКУСОВЫХ КЛЕТКАХ ТИПА III ПО ОТНОШЕНИЮ К ВНЕКЛЕТОЧНОМУ Ca^{2+}

Черкашин А.П., Хохлов А.А., Колесников С.С., Рогачевская О.А.
ФБГУН Институт биофизики клетки РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ
e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Аннотация. Вкусные клетки типа III образуют классические химические синапсы, в которых выброс нейромедиатора инициируется повышением внутриклеточного Ca^{2+} за счет входа внеклеточного Ca^{2+} через потенциал-зависимые (ПЗ) Ca^{2+} каналы. Плотность упаковки клеток во вкусовой почке такова, что межклеточное пространство на два порядка меньше внутриклеточного. В силу этого, концентрации экстраклеточных ионов, включая ионы Ca^{2+} , могут значительно варьировать при изменении электрической активности клеток вкусовой почки за счет перераспределения ионов между цитоплазмой и межклеточной средой. В этом случае, надежность работы синапса в клетках типа III требует существования механизма, который бы обеспечивал относительную стабильность выброса нейромедиаторов условиях вариабельности внеклеточного Ca^{2+} в физиологически адекватном диапазоне концентраций. С целью частичной проверки идеи инвариантности нами анализировались внутриклеточные Ca^{2+} сигналы, генерируемые вкусовыми клетками типа III в ответ на стимуляцию при разных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} . Оказалось, что как ПЗ Ca^{2+} токи в клетках типа III, так и внутриклеточные Ca^{2+} сигналы, инициирующие в дальнейшем секрецию нейромедиатора, остаются инвариантными при варьировании внеклеточного Ca^{2+} в физиологическом диапазоне. Показано, что ПЗ Ca^{2+} токи инварианты по отношению к концентрации внеклеточного Ca^{2+} в диапазоне 1-2 мМ наружного Ca^{2+} , а увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , вызванное электрической или неинвазивной деполяризацией KCl, инвариантно в диапазоне 0.5-5 мМ Ca^{2+} во внеклеточной среде. Эти данные подтверждают существование во вкусовых клетках типа III неясного на настоящий момент механизма, который может обеспечивать инвариантность секреции нейромедиаторов посредством обеспечения стабильности внутриклеточных Ca^{2+} сигналов при разной концентрации ионов Ca^{2+} в межклеточном пространстве.

Ключевые слова: вкусные клетки, кальциевая сигнализация, экстраклеточный Ca^{2+} , ПЗ Ca^{2+} -каналы.

THE INVARIANCE OF POTENTIAL DEPENDENT Ca^{2+} INFLUX AT VARIABLE EXTRACELLULAR CALCIUM IN TYPE III TASTE CELL

Cherkashin A.P., Khokhlov A.A., Kolesnikov S.S., Rogachevskaja O.A.
Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences
Pushchino, Moscow oblast, 142290, Russia
e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Abstract. Type III tastecells form classical chemical synapses and release neurotransmitter is initiated by employing exocytosis that is triggered by Ca^{2+} ions entering through voltage-gated (VG) Ca^{2+} -channels. The density of cell packing in the taste bud is such that the intercellular space is two orders of magnitude smaller than the intracellular one and, therefore, the concentration of extracellular ions, including Ca^{2+} ions, can vary considerably when the electrical activity of the taste buds changes due to the redistribution of ions between the cytoplasm and external medium. If this is the case, then the reliability of the synapse in type III cells requires the existence of a mechanism that would ensure the independence of the release of the neurotransmitter from the concentration of extracellular Ca^{2+} in the physiologically relevant range, that is, an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration should be invariant with respect to extracellular Ca^{2+} . To examine this idea, we analyzed intracellular Ca^{2+} signals generated by type III taste cells in response to stimulation at different concentrations of extracellular Ca^{2+} . As was found, both VG Ca^{2+} currents in type III cells and intracellular Ca^{2+} signals, which subsequently trigger the release of the neurotransmitter, and its secretion proper, remain invariant when the extracellular Ca^{2+} varies in the physiological range. It is shown that the Ca^{2+} current is invariant with respect to the concentration of extracellular Ca^{2+} in the 1-2 mM range of the bath Ca^{2+} , and for the curve of depolarization-induced increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} from the concentration of the bath Ca^{2+} plateau is in the range 0.5-5 mM Ca^{2+} . These data confirm the existence in the taste cells of type III is not clear at the moment the mechanism that can ensure the invariance of the secretion of neurotransmitters by ensuring the stability of intracellular Ca^{2+} signals at different concentrations of Ca^{2+} ions in the extracellular environment.

Key words: taste cells, calcium signalization, extracellular Ca^{2+} , VG Ca^{2+} -channels.

Периферический орган вкуса - вкусовая почка, представляет собой плотно упакованную группу из 50-100 вкусовых клеток трех типов (тип I – тип III), различающихся по физиологическим функциям на молекулярном уровне. Вкусные клетки III типа секретируют нейромедиатор серотонин Ca^{2+} -зависимым образом в ответ на воздействие кислыми стимулами или на деполяризацию раствором KCl и секреция следует всегда после деполяризации клетки в результате генерации потенциала действия. Во время генерации потенциалов действия активируются потенциал-зависимые (ПЗ) Ca^{2+} каналы, что приводит к входу Ca^{2+} внутрь клетки и к стимуляции экзоцитоза [1-3]. Плотность упаковки вкусовых клеток в почке такова, что расстояние между мембранами соседних клеток составляет порядка 100 Å [4], и объем межклеточного пространства на два порядка меньше внутриклеточного объема. В связи с этим во вкусовой почке электрическая активность клеток может быстро

приводить к изменению концентрации ионов Ca^{2+} в межклеточной среде за счет перераспределения ионов между цитоплазмой и межклеточной средой. Между тем, истощение межклеточного пула Ca^{2+} влечет за собой падение потенциал-зависимого (ПЗ) Ca^{2+} тока, снижение амплитуды локального Ca^{2+} сигнала в пресинаптической терминали, уменьшение количества секретируемого нейротрансмиттера, и как итог - снижение эффективности синаптической передачи. Эта проблема ранее не озвучивалась для других систем, вероятно потому, что она гораздо менее выражена для наиболее исследуемых синапсов нейрональных клеток, поскольку ткань мозга характеризуется гораздо меньшей плотностью, чем вкусовая почка. Так же эта проблема не возникает в условиях работы *in vitro*, которые характеризуются значительно большим объемом экстраклеточного пространства по отношению к размеру клеток. Если для вкусовой почки действительно характерна сильная вариабельность внеклеточного Ca^{2+} , то надежность работы синапса в клетках типа III требует существования механизма, который бы обеспечивал независимость выброса нейромедиатора от концентрации внеклеточного Ca^{2+} в физиологически адекватном диапазоне. Нам представлялось необходимым проверить идею, что внутриклеточные Ca^{2+} сигналы, генерируемые во вкусовых клетках типа III и инициирующие выброс серотонина, и собственно его секрецию, должны оставаться инвариантными при варьировании концентрации внеклеточного Ca^{2+} . Исследования проводились путем мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} во вкусовых клетках типа III с использованием Ca^{2+} зондов при одновременной электрической стимуляции методом patch-clamp или неинвазивно, вызывая деполяризацию раствором KCl.

Материалы и методы. Выделение вкусовых почек и клеток проводилось по стандартной методике [5, 6]. Смесь ферментов (0.9 мг/мл коллагеназы Б, 1.2 мг/мл диспазы II, 0.2 мг/мл эластазы, 0.5 мг/мл ингибитора трипсина), растворенных в среде (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7.4), инъецировалась в удаленный язык максимально близко к эпителиальному слою. Язык инкубировался 25 минут при температуре 25⁰С в бескальциевом растворе, содержащем (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 1.1 MgCl₂, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы, pH 7.4. Отделенный от мышечной ткани языковой эпителий, содержащий вкусовые почки, прикреплялся в чашке Петри и после 20 минут инкубации в бескальциевом растворе помещался в физиологический раствор, содержащий (мМ): 130 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 5 глюкозы, 2 Na-пирувата, pH 7.4. Вкусовые почки и клетки вытягивали из вкусовой ткани с помощью стеклянной пипетки с диаметром кончика 70-90 мкм и затем помещали в перфузируемую экспериментальную камеру. **Электрофизиологические эксперименты** проводились в конфигурации perforated patch-clamp с применением усилителя Axopatch 200 В, ЦАП-АЦП конвертера Digidata 1440А и пакета лицензионных программ pClamp10.3 (все Axon Instruments, SINGAPORE). Визуализация клеток осуществлялась с использованием микроскопа Axioskope-2 (Zeiss, Германия) и объектива LDA-Plan 32x. Базовый внутриклеточный раствор содержал, мМ: 140 CsCl, 1 MgCl₂, 0.1 EGTA, 10 HEPES, Amphotericin B (400 мкг/мл), pH 7.3. Базовый внеклеточный раствор содержал, мМ: 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7.4. Система перфузии [7] обеспечивала смену раствора камеры со скоростью 0.1–1 мл/с. **Микрофотометрические измерения** концентрации цитозольного Ca^{2+} во вкусовых клетках осуществлялись при помощи флуоресцентного микроскопа Axioskope-2 (Zeiss, Германия), объектива PlanNeoFluar 20x/0.5 и цифровой ECCD камеры LucaR (AndorTechnology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем на сверхярких диодах [8]. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-8 (AAT- Bioquest, США), возбуждалась на длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссия регистрировалась в области 535 ± 20 нм. Каждые 0.1 секунды регистрировались последовательные флуоресцентные изображения. Изменение концентрации цитозольного кальция в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$). Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США). Все эксперименты проводились при температуре 22-25⁰С, реактивы фирм Sigma-Aldrich, Wortington, Molecular Probes, Tocris (США).

Результаты и обсуждение. Поскольку популяция клеток во вкусовой почке гетерогенна (см. рис. 1), ранее в нашей лаборатории были разработаны электрофизиологические [9] и неинвазивные [10] тесты, позволяющие уверенно определить тип клетки, и эксперименты всегда проводились на идентифицированных вкусовых клетках типа III, одиночных и в составе почек.

Основной физиологической характеристикой вкусовых клеток типа III, которая может использоваться при их идентификации, является их способность генерировать Ca^{2+} сигналы в ответ на деполяризацию за счет активации ПЗ Ca^{2+} каналов [11-13]. Электрическая активность этих каналов регистрируется в конфигурации perforated patch, при которой предотвращается потеря внутриклеточных компонент и не происходит инактивации ПЗ Ca^{2+} каналов. При регистрации ПЗ Ca^{2+} токов во вкусовых клетках типа III в условиях варьированной в пределах 0.5-10 мМ концентрации наружного Ca^{2+} , было обнаружено, что амплитуда ПЗ Ca^{2+} токов была инвариантна по отношению к концентрации ионов Ca^{2+} во внеклеточном растворе в диапазоне 1-2 мМ (см. рис. 2А).

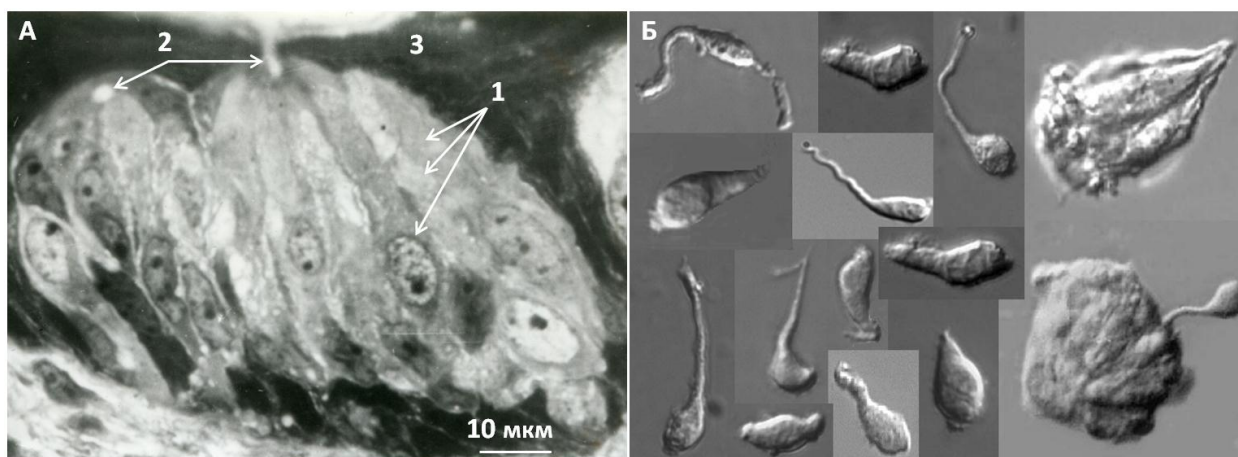


Рисунок 1 – Периферический вкусовой анализатор. А - срез вкусовой почки из желобоватого сосочка, фиксированная ткань языка мыши, световая микроскопия. 1- вкусовые клетки разных типов; 2 – вкусовая пора; 3 – эпителиальные клетки. Б – коллаж из фотографий живых изолированных вкусовых клеток и почек, находящихся в экспериментальной камере

Так как деполяризация вкусовых клеток типа III является непременным атрибутом каскада передачи вкусового сигнала [14], электростимуляция вкусовых клеток не только позволяет наблюдать ПЗ Ca^{2+} токи но и служит моделью возбуждения этих клеток вкусовыми стимулами. Во второй серии экспериментов вкусовые клетки деполяризовались электрически, одновременно с этим контролировался уровень Ca^{2+} внутри клетки по флуоресценции Ca^{2+} зонда Fluo-8 методом Ca^{2+} imaging и анализировалась зависимость величины Ca^{2+} ответов, инициируемых деполяризацией клетки, от концентрации наружного Ca^{2+} . Эксперимент проводился по следующему протоколу: 1) достижение гигаомного контакта клетка - регистрирующий электрод; 2) прокраска в течение 10 минут красителем Fluo-8; 3) отмыв излишков красителя; 4) последовательная деполяризация клетки серией электрических импульсов при варьируемой концентрации ионов Ca^{2+} во внеклеточном растворе (см. рис. 2Б). Было показано, что величина кальциевого ответа вкусовых клеток на деполяризацию электрическими импульсами практически не зависела от концентрации наружного кальция в диапазоне от 0.5 до 5 мМ (см. рис. 2Б).

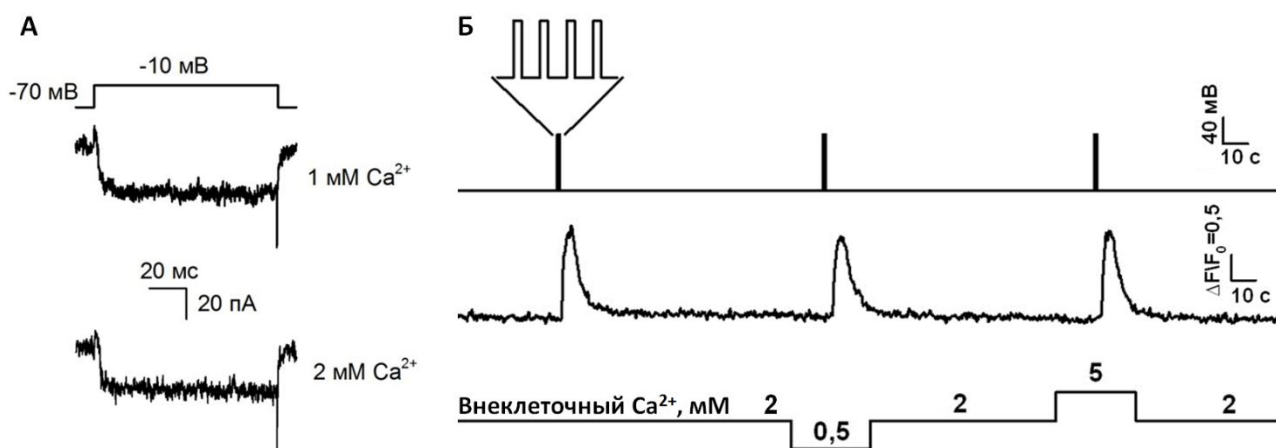


Рисунок 2 – Потенциал-зависимый вход Ca^{2+} во вкусовых клетках типа III. А - Репрезентативные регистрации ПЗ Ca^{2+} токов при изменении потенциала от -70 мВ до -10 мВ (верхняя панель) в одной и той же клетке при разных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} (средняя панель - 1 мМ; нижняя - 2 мМ). Раствор в регистрирующем электроде содержал 140 мМ CsCl; раствор для перфузии в камере содержал 140 мМ NaCl + 1 мкМ ТТХ (тетродоксин, блокатор ПЗ Na^{+} -каналов) и варьируемый $CaCl_2$. Б - Репрезентативная регистрация Ca^{2+} ответов одиночной вкусовой клетки типа III (средняя панель) на электрофизиологическую деполяризацию при варьировании наружного Ca^{2+} . Клетка поддерживалась при потенциале -70 мВ, для получения кальциевых ответов осуществлялась деполяризация серией импульсов от -70 мВ до 0 мВ (верхняя панель). На нижней панели указано изменение концентрации Ca^{2+} в наружной среде

В третьей серии экспериментов электрическая стимуляция клеток была заменена неинвазивной деполаризацией раствором с эквимолярной заменой части ионов Na^+ на K^+ (стимулирующий раствор содержал (мМ): 50 KCl, 80 NaCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES и варьруемую концентрацию CaCl_2 при pH 7.4) [10]. Такой подход позволяет проводить эксперименты не только на одиночных клетках, но и на клетках в составе почек, что позволяет работать с клетками, менее поврежденными в процессе выделения вкусовой ткани, а следовательно, с более сохранным рецепторным аппаратом и внутриклеточной структурой. Последнее особенно важно для сохранения полярного распределения рецепторов и ионных каналов на плазматической мембране вкусовых клеток. Вкусовые клетки прокрашивали кальциевым зондом Fluo-8 и регистрировали изменения Ca^{2+} в цитоплазме в ответ на аппликацию деполаризирующего раствора при различных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} (см. рис. 2). Оказалось, что Ca^{2+} ответы вкусовых клеток на неинвазивную деполаризацию так же инварианты по отношению к внеклеточному Ca^{2+} в диапазоне 0.5-5 мМ (см. рис. 3). Этот эффект наблюдался во всех исследованных клетках типа III (см. рис. 2Б), что подтверждает наличие механизма, стабилизирующего повышение внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} вне зависимости от его концентрации снаружи.

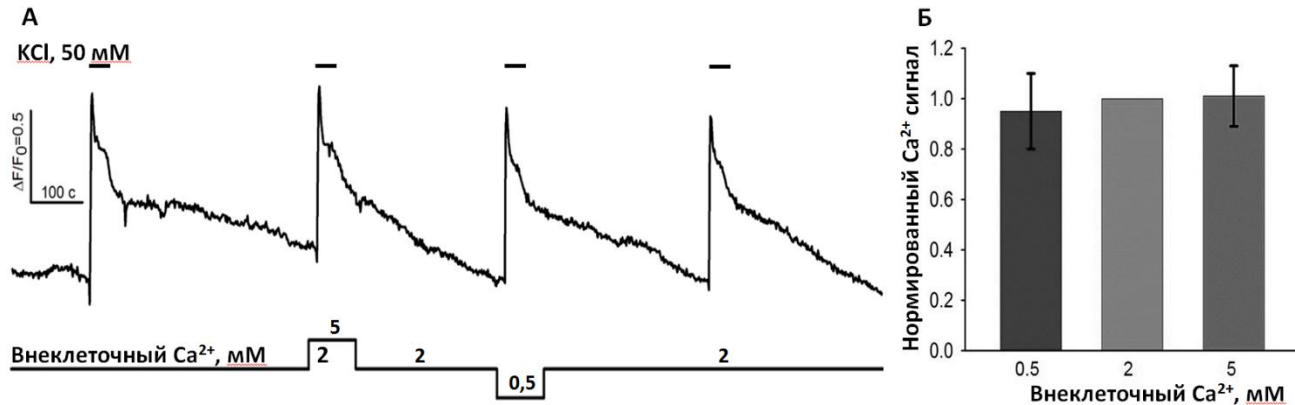


Рисунок 3 – Инвариантность Ca^{2+} ответов вкусовых клеток типа III. А - Репрезентативная регистрация Ca^{2+} ответов одиночной вкусовой клетки типа III на неинвазивную деполаризацию раствором KCl при различных концентрациях наружного Ca^{2+} . Время и продолжительность стимуляции указаны над экспериментальной кривой; нижняя панель – концентрация Ca^{2+} в экспериментальной камере. Б - Нормированные Ca^{2+} сигналы, инициируемые в цитоплазме вкусовых клеток типа III потенциал-зависимым входом Ca^{2+} при различных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} . Для сравнения регистраций от различных клеток внутриклеточный Ca^{2+} сигнал при 2 мМ Ca^{2+} снаружи принимался за единицу. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка (n=14)

Мы предполагаем, что одним из вероятных звеньев механизма, обеспечивающего инвариантность ПЗ повышения Ca^{2+} во вкусовых клетках типа III, может быть CaSR - гептаспиральный рецептор внеклеточного Ca^{2+} (extracellular calcium sensing receptor), который экспрессируется в этих клетках [10], и может регулировать не только ионный транспорт [15-17], но и синаптическую передачу [18]. Ранее в нашей лаборатории была получена математическая модель регуляции активности ПЗ Ca^{2+} каналов при участии рецептора CaSR. Оказалось, что при определенных значениях параметров модель удовлетворительно описывает экспериментальную зависимость ПЗ тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+} [13]. С использованием ингибиторного анализа проводились эксперименты с целью детализировать сигнальный каскад, сопрягающий рецептор CaSR и ПЗ Ca^{2+} каналы. К сожалению, большинство использовавшихся агонистов, ингибиторов и модуляторов инициировали рандаун (rundown) ПЗ Ca^{2+} токов, что препятствовало однозначной интерпретации данных ингибиторного анализа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01941а (рук. Рогачевская О.А.).

Список литературы / References:

1. Vandenberg A., Zorec R., Kinnamon S.C. Capacitance measurements of regulated exocytosis in mouse taste cells. *J. Neurosci.*, 2010, vol. 30, pp. 14695-14701.
2. Huang Y.-J., Maruyama Y., Lu K.-S., Pereira E., Plonsky I., Baur J.E., Wu D., Roper S.D. Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J. Neurosci.*, 2005, vol. 25, pp. 843-847.
3. Huang Y., Pereira E., Roper S.D. Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 10, e25471.
4. Yee C.L., Yang R., Bottger B., Finger T.E., Kinnamon J.C. "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.*, 2001, vol. 440, pp. 97-108.
5. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *J. Neurophysiol.*, 2003, vol. 90, pp. 3283-3294.

6. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jeang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.*, 2007, vol. 26, no. 3, pp. 657-667.
7. Kolesnikov S.S., Margolskee R.F. Extracellular K⁺ activates a K⁺ - and H⁺ - permeable conductance ion frog taste receptor cells. *J. Physiol.*, 1998, vol. 507, pp. 415-432.
8. Khokhlov A.A., Romanov R.A., Zubov B.V., Pashinin A.D., Kolesnikov S.S. An LED-Based Illuminator for Microphotometric Studies of Cells. *Physical instruments for ecology, medicine, and biology*, 2007, vol. 3, pp. 128-131.
9. Romanov R.A., Kolesnikov S.S. Electrophysiologically identified subpopulations of taste bud cells. *Neurosci. Lett.*, 2006, vol. 395, pp. 249-254.
10. Bystrova M.F., Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Churbanov G.D., Kolesnikov S.S. Functional expression of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in mouse taste cells. *J. Cell Sci.*, 2010, vol. 123, pp. 972-982.
11. Clapp T.R., Medler K.F., Damak S., Margolskee R.F., Kinnamon S.C. Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol.*, 2006, vol. 4, p. 7.
12. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Electrical excitability of taste cells. Mechanisms and possible physiological significance. *Biomembrans*, 2012, vol. 22, no. 1-2, pp. 85-101.
13. Cherkashin A.P., Zhao H., Kolesnikov S.S. Possible Mechanisms Mediating the Regulation of Voltage Gated Ca²⁺ Channels by Extracellular Ca²⁺. *Biomembrans*, 2015, vol. 32, no. 2, pp. 119-124.
14. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Afferent output in mammalian taste cells. A role of electrical excitability in mediating transmitter release. In: *Action Potential: Biophysical and Cellular Context, Initiation and Phases and Propagation*. Ed. Columbus F. Nova Science Publishers, Inc. New York, 2010, pp. 133-157.
15. Hofer A.M., Brown E.M. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, vol. 4, pp. 530-538.
16. Conigrave A.D., Ward D.T. Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract. Res. Clin. Endocrin. Metab.*, 2013, vol. 27, pp. 315-331.
17. Chow J.Y.C., Estrema C., Orneles T., Dong X., Barrett K.E., Dong H. Calcium-sensing receptor modulates extracellular Ca²⁺ entry via TRPC-encoded receptor-operated channels in human aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. 461-468.
18. Phillips C.G., Harnett M.T., Chen W., Smith S.M. Calcium-sensing receptor activation depresses synaptic transmission. *J. Neurosci.*, 2008, vol. 28, pp. 12062-12070.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ КАК ЭВОЛЮЦИЯ ИЕРАРХИЙ АКТИВНЫХ СРЕД

Сидорова А.Э., Твердислов В.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ
e-mail: sky314bone@mail.ru

Аннотация. На основе представлений о самоорганизации в иерархически сопряженных активных средах рассмотрена биофизическая модель эволюции биосферы. Такой аналитический подход позволяет по-новому рассмотреть идеи бифуркационного и, как следствие, сальтаторного развития популяций, сообществ организмов и биосферы в целом. Движущей силой эволюции биосферы - «нагнетающим насосом» - служит иерархия распределенных активных сред, составленных мозаикой биоценозов. В целом, активная среда создает фронтальное «давление естественного отбора». Иерархия активных сред определяет "векторность", т.е. направленность эволюционного развития. С гигантскими флуктуациями, формирующимися в неравновесной системе активных сред, как раз и «работает» внешний пассивный фильтр естественного отбора, позволяющий выйти данной ветви эволюции на устойчивую траекторию развития и закрепиться на ней. В отличие от классического филогенетического древа, отражающего принцип вертикальной эволюции биосферы, в данном подходе биосфера – единый организм – сопряженная система, эволюционирующая по законам, определяемым отбором, переносом генов, конвергенцией и дивергенцией – классическими механизмами эволюции. Трехмерная сеть прямых и обратных связей модели позволяет рассматривать эволюционирующую биосферу как иерархиюсопряженных активных сред.

Ключевые слова: иерархия активных сред, автоволны, биосфера, эволюция.