

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО ВХОДА Ca^{2+} ВО ВКУСОВЫХ КЛЕТКАХ ТИПА III

Черкашин А.П., Рогачевская О.А.

ФБГУН Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская обл., РФ; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию: 06.07.2018.

Аннотация. Вкусковые клетки типа III используют классический химический синапс для нейротрансдачи сенсорной информации, и стимул-зависимый вход внеклеточного Ca^{2+} через потенциал-зависимые (ПЗ) Ca^{2+} -каналы и инициируемый этим выброс нейромедиатора по механизму Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза являются ключевыми событиями. Потенциально эффективность синаптической передачи может варьировать при изменениях внеклеточного Ca^{2+} , однако ранее мы показали, что ПЗ вход Ca^{2+} и величина Ca^{2+} -сигналов в клетках типа III остаются инвариантными при изменении внешнего Ca^{2+} в физиологическом диапазоне - это свидетельство функционирования механизма, обеспечивающего мониторинг внеклеточного Ca^{2+} и подстройку нейротрансдачи при его девиации. Сенсором внеклеточного Ca^{2+} может быть Ca^{2+} -чувствующий рецептор CaSR, экспрессию которого в клетках типа III мы продемонстрировали ранее. Мы предположили, что CaSR может регулировать активность ПЗ Ca^{2+} -каналов, и тогда ПЗ Ca^{2+} -токи должны быть чувствительны к агонистам/антагонистам этого рецептора. Регистрация ПЗ-токов в клетках типа III в цезиевых условиях показала наличие входящего Ca^{2+} -тока. Специфический агонист CaSR NPSR-568 подавлял этот ток, что можно было бы объяснить влиянием рецептора CaSR на активность ПЗ Ca^{2+} -каналов. Однако эффекты развивались быстро и были необратимы, указывая на возможность неспецифического действия. NPSR-568 ингибировал ПЗ-токи в клетках типа II, в которых рецептор CaSR не функционирует, подтверждая влияние этого соединения непосредственно на ПЗ-токи. Ряд других лигандов CaSR так же оказывал подобное неспецифическое действие на ПЗ-токи клеток типа III и II. В качестве альтернативы неоднозначным физиологическим данным нами предложена математическая модель, в которой постулируется, что внеклеточный Ca^{2+} влияет на уровень ПЗ Ca^{2+} -тока не только как носитель тока, но и как CaSR-опосредованный регулятор ПЗ Ca^{2+} -каналов. При определенных параметрах модель достаточно точно воспроизводит полученную экспериментальную зависимость величины ПЗ Ca^{2+} -тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+} .

Ключевые слова: *вкусковые клетки, ПЗ Ca^{2+} -каналы, рецептор внеклеточного Ca^{2+} , кальциевая сигнализация, нейротрансдача.*

Во вкусовой почке – периферическом органе вкуса – только вкусковые клетки типа III образуют классические химические синапсы, в которых осуществляется кальций-зависимый выброс нейромедиатора, передающего информацию о вкусовом стимуле окончаниям вкусового нерва и далее в мозг. Когда вкусовые вещества кислой модальности (и, возможно, ряд ионных стимулов [1, 2]) достигают апикальной части клеток типа III, эти клетки генерируют потенциал действия, что приводит к активации потенциал-зависимых (ПЗ) Ca^{2+} -каналов, входу внешнего Ca^{2+} , повышению Ca^{2+} в цитоплазме, и стимуляции экзоцитоза [3, 4], благодаря чему происходит выброс нейромедиатора в синаптическую щель, что активирует рецепторы постсинаптической мембраны окончаний вкусового нерва. Очевидно, что повышение Ca^{2+} в цитоплазме является ключевым моментом вкусовой нейротрансдачи и должно быть защищено от неспецифических внешних воздействий, например, изменения ионного состава в синаптической щели и межклеточного раствора вследствие электрической активности клеток, в частности, происходящего перераспределения ионов Ca^{2+} между клетками и межклеточным пространством и падение его концентрации в последнем. Можно предположить, что при физиологическом снижении внеклеточного Ca^{2+} потенциально может изменяться эффективность синаптической передачи. Ранее мы показали, что изменение концентрации ионов Ca^{2+} снаружи клетки в физиологическом диапазоне не приводит ни к падению амплитуды (ПЗ) Ca^{2+} -тока, ни к снижению амплитуды Ca^{2+} -сигнала в цитоплазме клеток, это свидетельствовало о том, в этих вкусовых клетках функционирует механизм, обеспечивающий мониторинг внеклеточного Ca^{2+} и обеспечивающий подстройку нейротрансдачи при его девиации. Сенсором внеклеточного Ca^{2+} может быть Ca^{2+} -чувствующий рецептор CaSR (extracellular calcium sensing receptor), экспрессия которого во вкусовых клетках типа III была продемонстрирована нами ранее [5], и описано его участие в регуляции ионного транспорта [6] и синаптической передачи [7]. Поэтому мы предполагаем, что CaSR может регулировать активность ПЗ Ca^{2+} -каналов, а следовательно, быть звеном механизма поддержания постоянства ответов клеток типа III. Если наше предположение верно, то можно ожидать, что ПЗ Ca^{2+} -токи и ПЗ внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы должны быть чувствительны к агонистам/антагонистам этого рецептора и модуляторам сопряженных с CaSR сигнальных белков. В настоящей работе мы проводили экспериментальную проверку этой идеи, анализируя зависимость амплитуды ПЗ Ca^{2+} -токов во вкусовых клетках типа III от воздействия веществ, влияющих на активность рецептора CaSR. Исследования проводились путем регистрации электрической активности вкусовых клеток методом patch-clamp с использованием ингибиторного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вкусовых почек и клеток проводилось по стандартной методике [8] из языка мышей (10-14 мес). 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 под эпителий отделенного языка, который затем инкубировался 25 минут при температуре 25 °С в бескальциевом растворе, содержащем (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 0,7 CaCl₂, 1,1 MgCl₂, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы, pH 7,4. Отделенный от мышечной ткани языковой эпителий с вкусовыми сосочками 20 минут инкубировался в бескальциевом растворе для дополнительной деструкции межклеточных связей во вкусовой почке, и затем 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 клетки вытягивали из вкусовой ткани с помощью стеклянной пипетки с диаметром кончика 70-90 мкм и затем помещали в перфузируемую экспериментальную камеру. **Электрическую активность** вкусовых клеток регистрировали методом patch-clamp в конфигурации perforated patch с использованием усилителя Axopatch 200 В, ЦАП-АЦП конвертера Digidata 1440А и пакета лицензионных программ pClamp10.3 (все Axon Instruments, Сингапур). Клетки в электрофизиологической камере визуализовали с использованием микроскопа Axioscop-2 (Carl Zeiss, Германия) и объектива LD A-Plan ×32. Базовый внутриклеточный раствор содержал, мМ: 140 CsCl, 1 MgCl₂, 0,1 EGTA, 10 HEPES-CsOH, Amphotericin В (400 мкг/мл), pH 7,3. Базовый внеклеточный раствор содержал, мМ: 135 NaCl, 5 KCl, 0,8 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES-NaOH (NaOH), pH 7,4. Система перфузии [9] обеспечивала смену раствора камеры со скоростью 0,1-1 мл/с. Опыты проводили при комнатной температуре 22-24 °С. Соли и реагенты приобретались в Sigma-Aldrich, Worthington, Molecular Probes, Tocris (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения типа вкусовой клетки ранее в нашей лаборатории были разработаны электрофизиологические [10, 11] тесты, позволяющие уверенно определить тип (I – III) клетки, и эксперименты всегда проводились на идентифицированных вкусовых клетках. Следует отметить, что регистрация ПЗ Ca²⁺-токов связана с рядом трудностей, для решения которых нами был подобран ряд условий. Для исследований токовых характеристик клеток применялась конфигурация perforated patch [12], что предотвращает потерю внутриклеточных компонент и ассоциированную с этим инактивацию ПЗ Ca²⁺-каналов; так же вкусовые клетки прединкубировались в присутствии проникающего агента ВАРТА-АМ (10 мкМ) в течение 10 мин, что снижало концентрацию внутриклеточного Ca²⁺, который регулирует активность ПЗ Ca²⁺-каналов. Регистрацию электрической активности проводили в условиях диализа клеток раствором, содержащим 140 мМ CsCl, что обеспечивало подавление выходящих токов через ПЗ K⁺-каналы и позволяло регистрировать относительно небольшие входящие токи через ПЗ Ca²⁺-каналы.

Деполаризация клеток типа III в условиях перфузии раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мМ CaCl₂, вызывала быстрые входящие ПЗ Na⁺-токи, блокируемые тетродотоксином (ТТХ), и медленно инактивирующиеся входящие ПЗ Ca²⁺-токи небольшой амплитуды (10-30 пА), маскируемые электрическими шумами (рис. 1а). Хорошо различимы ионные токи через ПЗ Ca²⁺-каналы были в условиях блокады ПЗ Na⁺-токов ТТХ и при использовании в качестве носителя тока ионов Ва²⁺ (4-10 мМ) (рис. 1б), для чего Ca²⁺ в наружном растворе заменялся на Ва²⁺. Вольт-амперные (I-V) характеристики этих токов показывали, что они переносятся преимущественно через высокопороговые ПЗ Ca²⁺-каналы (рис. 1в, кривая с черными кружками).

Было отмечено, что ионы Cd²⁺ в концентрации до 50 мкМ (рис. 1в, кривая с белыми кружками) полностью блокировали ПЗ Ca²⁺-проводимость, и после отмыва токи восстанавливались до первоначальной амплитуды при кратковременной (до 30 с) аппликации блокатора. Этот критерий позволил количественно оценить относительно небольшие ПЗ Ca²⁺-токи как разность Ca²⁺-токов, регистрируемых в присутствии/отсутствии 50 мкМ Cd²⁺.

После подбора условий для уверенной регистрации ПЗ Ca²⁺-токов, мы исследовали влияние активности рецептора CaSR на ПЗ токи в клетках типа III, для чего вкусовые клетки деполаризовались в присутствии специфических агонистов/антагонистов рецептора CaSR (рис. 2а, б, рис. 3а, б). В природе помимо ионов Ca²⁺ его агонистами являются другие дивалентные катионы, аминокислоты и пептиды [5-7], так же в настоящее время есть ряд синтетических узконаправленных агонистов/антагонистов этого рецептора, которые были использованы в наших экспериментах.

В условиях цезиевого диализа, регистрировавшиеся токи включали две доминантные компоненты: входящий ток, транспортирующийся через Ca²⁺-каналы, и выходящий ток через Cl⁻-каналы (рис. 2а, средняя панель). В присутствии 3 мкМ NPSR-568, агониста CaSR, подавлялись обе эти компоненты (рис. 2а, нижняя панель), и это можно было интерпретировать как то, что активация рецептора CaSR контролирует активность обоих типов каналов, однако этот эффект развивался очень быстро и был необратим, что с большой вероятностью указывает на неспецифичность действия. Поэтому нами был проведен контрольный эксперимент на клетках типа II (рис. 2в, г), в которых рецептор CaSR не функционирует, но у которых есть ПЗ-каналы (ПЗ Na⁺-каналы и TRPM5). Оказалось, что NPSR-568 также ингибировал ПЗ-токи в клетках типа II, подтверждая действие этого агониста не только на рецептор CaSR, но и неспецифическое непосредственное действие агониста на различные ПЗ-каналы.

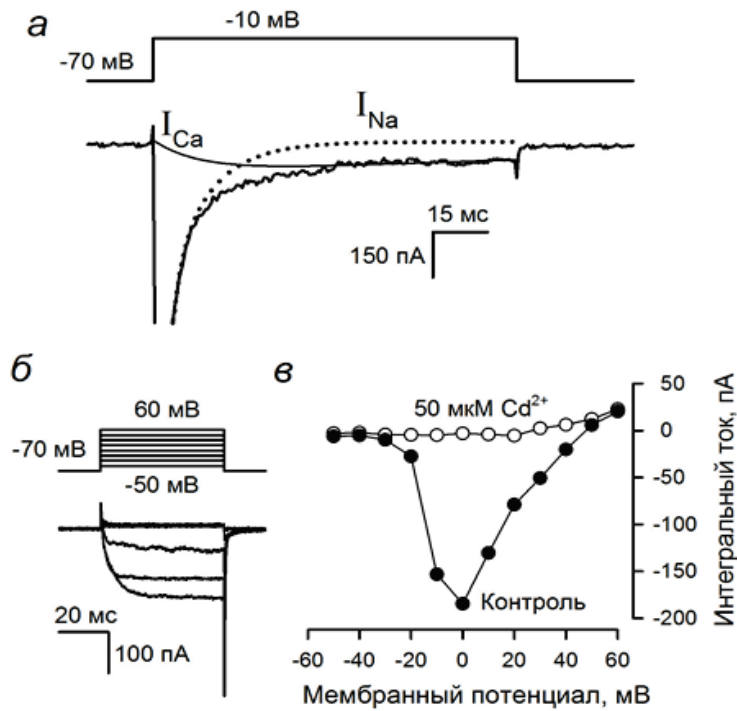


Рисунок 1. ПЗ ионные токи во вкусовых клетках типа III в условиях цезиевого диализа (140 мМ CsCl)

а – входящие Na^+ (I_{Na} , пунктирная кривая) и Ca^{2+} (I_{Ca} , тонкая линия) токи, регистрируемые от вкусовой клетки в ответ на деполяризацию импульсом -10 мВ в течение 100 мс (верхняя панель). Клетку поддерживали при потенциале -70 мВ и перфузировали раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мМ CaCl_2

б – репрезентативное семейство Ba^{2+} -токов через ПЗ Ca^{2+} -каналы, регистрируемых от вкусовой клетки в ответ на серию деполяризующих импульсов в промежутке между -50 и 60 мВ. В наружном растворе – 140 мМ NaCl + 4 мМ BaCl_2 + 1 мМ TTX

в – I-V характеристика стационарного Ba^{2+} -тока в контроле (семейство токов в б) и в присутствии 50 мкМ Cd^{2+} (оригинальные регистрации не показаны).

Далее было выявлено, что агонист CaSR цинакальцет (cinacalcet hydrochloride или AMG-073), который является кальцимиметиком нового поколения с лучшими фармакологическими характеристиками по сравнению с NPSR-568 [13] так же обладает сходным с NPS R-568 неспецифичным действием на ПЗ токи клеток типа III и II (Рис. 3). Позитивный аллостерический модулятор AC 265347 а так же антагонист NPS-2143 обладают сходным с NPS R-568 неспецифичным действием на ПЗ токи клеток типа III и II (данные не приведены).

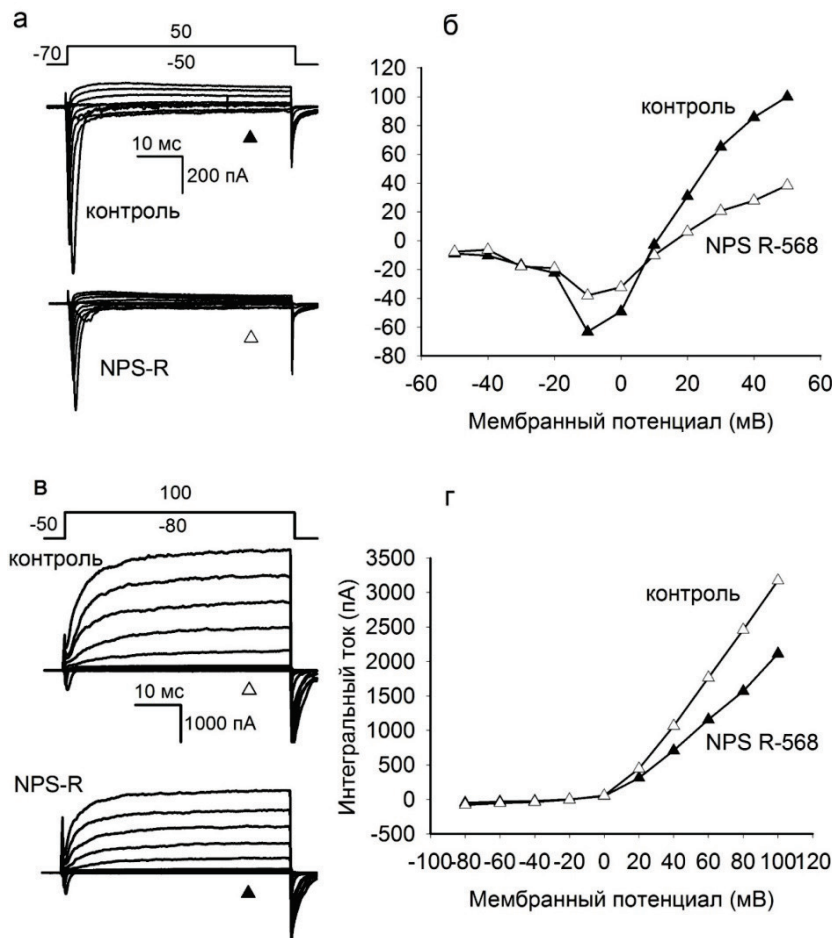


Рисунок 2. Эффекты агониста CaSR NPSR-568 на интегральные токи во вкусовых клетках в условиях цезиевого диализа

а – репрезентативные семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа III в контроле и в присутствии 3 мкМ NPSR-568. Треугольниками отмечены моменты измерений текущих значений тока для генерации I-V кривых, показанных на панели (б)

б – I-V характеристики токов, представленных в (а)

в – семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа II в контроле и в присутствии 3 мкМ NPSR-568

г - I-V характеристики токов в (в). Клетки поддерживались при -70 мВ, деполяризовались 50 мс импульсами в пределах от $-50/-80$ мВ до $50/100$ мВ, и перфузировались раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 2 мМ CaCl_2

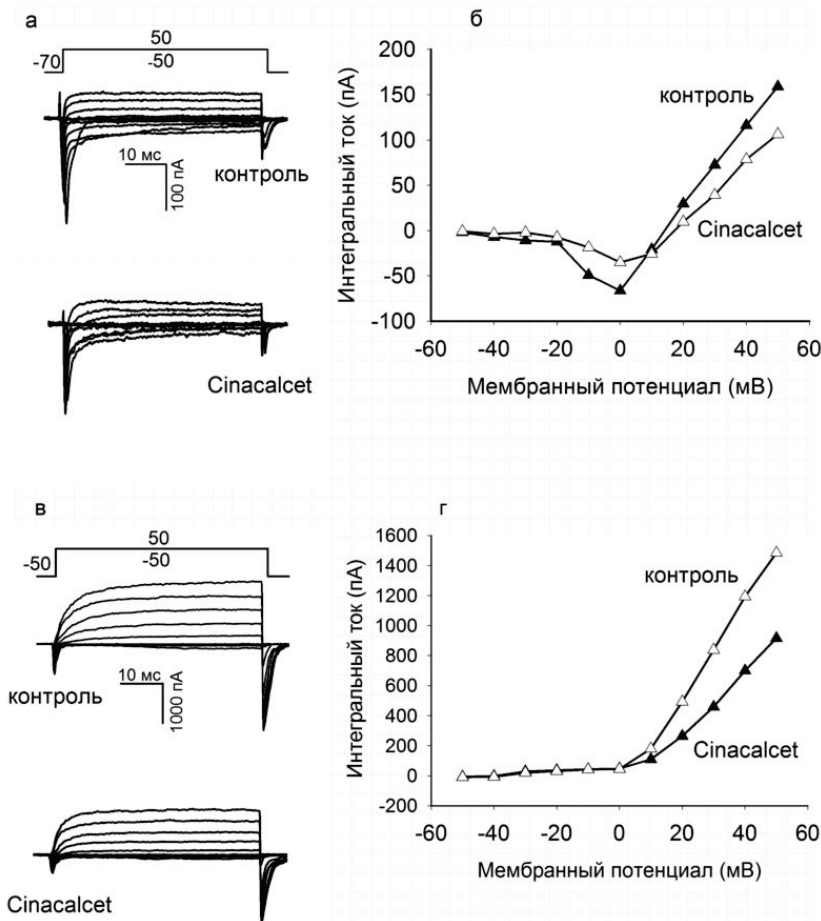


Рисунок 3. Эффекты агониста CaSR цинакальцета на интегральные токи во вкусовых клетках в условиях цезиевого диализа
 а – репрезентативные семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа III в контроле и в присутствии 1 мкМ Cinacalcet.
 б – I-V характеристики токов, представленных в (а)
 в – семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа II в контроле и в присутствии 1 мкМ Cinacalcet
 г – I-V характеристики токов, представленных в (в).
 Клетки поддерживались при -70 мВ, деполяризовались 50 мс импульсами в пределах от -50 мВ до 50 мВ, и перфузировались раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 2 мМ CaCl₂

Таким образом, все, доступные на данный момент лиганды для рецептора CaSR, не обладают заявленной производителем специфичностью по отношению к другим возможным клеточным мишеням и не представляется возможным получить достоверные физиологические данные о взаимосвязи активности рецептора CaSR и ПЗ Ca²⁺-каналов во вкусовых клетках типа III.

В попытке обосновать возможность регуляции ПЗ Ca²⁺-токов активацией рецептора CaSR мы применили математическое моделирование, в основу которого была взята модель переноса ионов, связывающихся в пору ионного канала; в этом случае ионный ток при фиксированном потенциале должен описываться кривой с насыщением типа изотермы Ленгмюра [14]. В случае одиночных Ca²⁺-каналов величина тока через канал *i* описывается уравнением, подтвержденным экспериментально [15]:

$$i = i_{\max} \frac{a_{Ca}}{a_{1/2} + a_{Ca}}, \tag{1}$$

где a_{Ca} – активность ионов Ca²⁺; $a_{1/2}$ – активность полуэффекта; i_{\max} – величина тока при $a_{Ca} \rightarrow \infty$.
 Интегральный ток *I* через *N* идентичных каналов связан с током через одиночный канал соотношением:

$$I = iNP, \tag{2}$$

где *P* – вероятность найти канал в открытом состоянии. Поскольку при миллимолярных концентрациях активность иона пропорциональна его концентрации, используя (1) и (2) можно описать зависимость интегрального Ca²⁺-тока от концентрации внеклеточного Ca²⁺ следующим уравнением:

$$I = I_{\max} P \frac{C}{C_{1/2} + C}, \tag{3}$$

где $I_{\max} = i_{\max}N$, *C* – концентрация внеклеточного Ca²⁺, $C_{1/2}$ – концентрация полуэффекта.

Из уравнения (3) следует, что, если вероятность открытого состояния не зависит от внеклеточного Ca²⁺, то интегральный ток как функция концентрации Ca²⁺ должен описываться монотонной зависимостью с

насыщением. Однако во время регистрации ПЗ Ca^{2+} -токов во вкусовых клетках типа III при девиациях Ca^{2+} во внеклеточном растворе от 0,5 до 10 мМ на возрастающей кривой зависимости ПЗ Ca^{2+} -тока от наружного Ca^{2+} было обнаружено наличие плато в области 1-2 мМ, что нельзя описать с помощью уравнения (3), поскольку плато в области 1-2 мМ Ca^{2+} невозможно воспроизвести при постоянных параметрах I_{\max} и P . Появление плато на кривой возможно, если в определенной области $P(C)$ убывает по мере увеличения концентрации Ca^{2+} . Более того, величина $P(C)$ не должна уменьшаться до нуля, иначе невозможен рост ПЗ Ca^{2+} -тока, наблюдаемый при дальнейшем увеличении концентрации Ca^{2+} . Учитывая эти соображения, а также то, что CaSR кооперативно стимулируется Ca^{2+} [5], мы рассмотрели следующую зависимость:

$$P(C) = P_0 - P_1 \frac{C^n}{K_{1/2}^n + C^n}, \quad (4)$$

где P_0 и $P_0 - P_1$ – вероятности открытого состояния в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} и при насыщающих концентрациях, соответственно; $K_{1/2}$ – концентрация полуактивации рецептора CaSR. Комбинируя уравнения (3) и (4), мы получаем следующую зависимость для интегрального тока как функции концентрации внеклеточного Ca^{2+} :

$$I(C) = I_{\max} P_0 \left(1 - \delta \frac{C^n}{K_{1/2}^n + C^n}\right) \frac{C}{C_{1/2} + C}, \quad (5)$$

где $\delta = P_1/P_0$.

Поскольку уровень ПЗ Ca^{2+} -токов различался для индивидуальных клеток, для сравнения результатов отдельных экспериментов Ca^{2+} -токи при разных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} нормировали на величину тока при 1 мМ Ca^{2+} , которую принимали за единицу. Для нормированного тока справедливо следующее выражение:

$$I(C)/I(1) = A \left(1 - \delta \frac{C^n}{K_{1/2}^n + C^n}\right) \frac{C}{C_{1/2} + C}, \quad (6)$$

где $A^{-1} = \frac{(1 - \delta/(K_{1/2}^n + 1))}{C_{1/2} + 1}$.

Опираясь на данные работы [15], мы зафиксировали $C_{1/2} = 14$ мМ и варьируя остальные параметры (δ , $K_{1/2}$ и n) в уравнении (6) выяснили, что при определенных значениях параметров это уравнение действительно воспроизводит плато экспериментальной кривой зависимости ПЗ Ca^{2+} -тока от наружного Ca^{2+} и в целом удовлетворительно описывает экспериментальную зависимость ПЗ тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+} . Это позволяет рассматривать полученные экспериментальные данные и результаты моделирования как свидетельство в пользу того, что гептаспиральный рецептор CaSR может обеспечивать инвариантность ПЗ Ca^{2+} -токов во вкусовых клетках типа III в условиях, когда наружный Ca^{2+} варьирует в физиологически уместном диапазоне концентраций.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01941-а.

Список литературы / References:

1. Chaudhari N., Roper S.D. The cell biology of taste. *J. Cell Biol.*, 2010, vol. 190, pp. 285-296.
2. Huang Y.A., Maruyama Y., Stimac R., Roper S.D. Presynaptic (type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J. Physiol.*, 2008, vol. 586, pp. 2903-2912.
3. Vandenbeuch A., Zorec R., Kinnamon S.C. Capacitance measurements of regulated exocytosis in mouse taste cells. *J. Neurosci.*, 2010, vol. 30, pp. 14695-14701.
4. 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 (10), pp. e25471.
5. Bystrova M.F., Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Churbanov G.D., Kolesnikov S.S. Functional expression of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor in mouse taste cells. *J. Cell Sci.*, 2010, vol. 123, pp. 972-982.
6. 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.
7. Chen W., Bergsman J.B., Wang X., Gilkey G., Pierpoint C.-R., Daniel E.A., Awumey E.M., Dauban P., Dodd R.H., Ruat M., Smith S.M. Presynaptic external calcium signaling involves the calcium-sensing receptor in neocortical nerve terminals. *PLoS One.*, 2010, vol. 5 (1), pp. e8563.

8. 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.
9. 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.
10. Romanov R.A., Kolesnikov S.S. Electrophysiologically identified subpopulations of taste bud cells. *Neurosci. Lett.*, 2006, vol. 395, pp. 249-254.
11. 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 (3), pp. 657-667.
12. Horn R., Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.*, 1988, vol. 92, pp. 145-159.
13. Filopanti M., Corbetta S., Barbieri A.M., Spada A. Pharmacology of the calcium sensing receptor. *Clin. Cases Miner Bone Metab.*, 2013, vol. 10 (3), pp. 162-165.
14. Hille B. *Ion channels in excitable membranes*. 3d ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2001, 814 p.
15. Hess P., Lansman J.B., Tsien R.W. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.*, 1986, vol. 88, pp. 293-319.

POSSIBLE MECHANISMS MEDIATING THE REGULATION OF THE POTENTIAL DEPENDENT Ca^{2+} INFLUX IN TYPE III TASTE CELLS.

Cherkashin A.P., Rogachevskaya O.A.

Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences

Institutional Street, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Abstract. Afferent output in Type III taste cells involves the classical chemical synapse, wherein Ca^{2+} entry through voltage-gated (VG) Ca^{2+} -channels triggers Ca^{2+} -dependent exocytosis of a neurotransmitter. In taste bud, extracellular Ca^{2+} may vary, thus affecting the efficacy of the synaptic transmission. As demonstrated earlier, VG Ca^{2+} influx and associated intracellular Ca^{2+} transients were apparently invariant when bath Ca^{2+} varied in a physiological range. This finding argued that in Type III taste, a mechanism exists to sense variability of extracellular Ca^{2+} and to provide the proper adjustment of neurotransmission. Previously, we found that extracellular Ca^{2+} -sensing receptor (CaSR) is functionally expressed in Type III cells, where one might serve as a sensor of extracellular Ca^{2+} and a regulator of activity of VG Ca^{2+} -channels. If so, VG Ca^{2+} -currents and related intracellular Ca^{2+} signals should have been sensitive to agonists/antagonists of this receptor. In Type III cells dialyzed with CsCl, we detected VG Ca^{2+} -currents. The specific CaSR agonist NPSR-568 suppressed these currents, implicating CaSR in control of their activity. However, the effects of NPSR-568 were apparently instant and irreversible, suggesting its action to be unspecific. NPSR-568 also inhibited VG-currents in Type II cells, wherein CaSR is not expressed. Given this fact and that the other ligands exerted similar inhibitory effects, the effects of CaSR ligands appeared to be unspecific. Since our inhibitory analysis failed, we employed a mathematical model that postulated that extracellular Ca^{2+} determines VG Ca^{2+} currents not only as a carrier but also as an CaSR agonist. At certain parameters, the model accurately reproduced the experimental dependence of the VG Ca^{2+} current on extracellular Ca^{2+} .

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