



УДК 612.313:577.352.468

## ДЕПОКЕРОВАНИЙ ВХІД $\text{Ca}^{2+}$ У СЕКРЕТОРНІ КЛІТИНИ СЛИННИХ ЗАЛОЗ ЛИЧИНКИ *Drosophila melanogaster*

Т. І. Чорна<sup>1,2</sup>, Г. Хасан<sup>2</sup>, В. В. Манько<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: [tanya0104@yandex.ru](mailto:tanya0104@yandex.ru); [vvmanko@gmail.com](mailto:vvmanko@gmail.com)

<sup>2</sup>Національний Центр Біологічних Наук,  
Тата Інститут Фундаментальних Досліджень, м. Бангалор, Індія

З використанням конфокальної мікроскопії зареєстровано депокерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторні клітини слинних залоз личинки лінії *Drosophila melanogaster*, яка селективно експресує  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор G-CaMP1.6. Для вивільнення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо використовували  $\text{Ca}^{2+}$ -іонофор іономіцин або блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргін. Додавання цих речовин до безкальцієвого середовища спричиняло незначне і нетранзйентне зростання концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах. Внаслідок збільшення позаклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до 2 ммоль/л відбувалося значне зростання рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в обох випадках. Але за використання іономіцину зростання цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у всіх випадках було транзйентним, причому  $\text{Ca}_6^{2+}$ -індуковані  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенти від різних клітин фрагмента залози були синхронними і зумовлювались, очевидно, як активацією депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$ , так і його надходженням із позаклітинного середовища внаслідок іонофоретичного обміну. У разі спустошення депо тапсигаргіном збільшення позаклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у частині клітин спричиняло швидкі транзйенти цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , у частині – повільні транзйенти, які змінювались нетранзйентним зростанням рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , а в частині – лише нетранзйентне зростання рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Такі відмінності  $\text{Ca}_6^{2+}$ -індукованих  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйентів у різних клітинах за використання тапсигаргіну зумовлені, мабуть, тим, що у їх генеруванні беруть участь не лише депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, а й інші  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи плазматичної мембрани і внутрішньоклітинних органел.

**Ключові слова:** секреторні клітини, слинні залози, депокерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенти, іономіцин, тапсигаргін, *Drosophila melanogaster*, конфокальна мікроскопія.

## ВСТУП

В електрично незбудливих клітинах надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є необхідним для регулювання багатьох процесів, зокрема експресії генів, росту клітин і їх проліферації, екзоцитозу, апоптозу тощо. Основним шляхом надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у ці клітини, як вважають, є депокерований, або ємнісний [20], при якому спустошення внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$  активує  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани [23]. Значним поштовхом у з'ясуванні механізмів регулювання цих каналів і ролі у різноманітних фізіологічних процесах було нещодавнє відкриття важливих компонент депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  – білків Stim [12, 25] та Orai [7].

Stim (stromal interacting molecule) – це трансмембранний білок, який відіграє роль своєрідного  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсора ендоплазматичного ретикулулу. Причому у *Drosophila melanogaster* експресується тільки один ген *Stim*, тоді як у ссавців – два (*Stim1* і *Stim2*) [23].

Трансмембранний білок Orai є компонентом  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу плазматичної мембрани, який активується вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  із депо (CRAC-каналу). У *Drosophila* він кодується геном *olf186-F* [25], а у людини три ізоформи цього білка (Orai1, Orai2, Orai3) кодуються трьома генами – *TMEM142A*, *TMEM142B*, *TMEM142C* [9].

Попередніми дослідженнями із використанням генспецифічних праймерів було показано експресію гена *olf186-F* у слинних залозах личинки *Drosophila* [4]. Це може свідчити про важливе значення депокерованого входу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз личинки дрозофіли для підтримання  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу. Проте необхідно отримати функціональне підтвердження цього припущення, що було основною метою наших досліджень із застосуванням методів конфокальної мікроскопії.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на слинних залозах личинок лінії *Drosophila melanogaster*, яка селективно експресує  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор – G-CaMP1.6 у секреторних клітинах. Для цього провели таке схрещування:

♂ C155 Gal 4 × ♀ UAS-G-CaMP1.6.

G-CaMP1.6 [18] – це вдосконалений класичний G-CaMP, до складу якого входить молекула білка cрGFP, кальмодулінзв'язуючий пептид M13 (фрагмент кінази легкого ланцюга міозину) та кальмодулін [17]. Його флуоресценція є у 40 разів вищою завдяки, головним чином, підвищенню квантового виходу. G-CaMP1.6 експресується у цитоплазмі, володіє порівняно із класичним G-CaMP вищою афінністю до іонів  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d=146$  нмоль/л, коефіцієнт Хілла – 3,8,  $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}=4,9$ ) та меншою чутливістю до рН середовища [18].

Дрозофілу вирощували на стандартному поживному декстрозному середовищі при температурі 22–25°C. Слинні залози виділяли із личинок третього вікового періоду у розчині, що містив (ммоль/л): NaCl – 150, KCl – 5,  $\text{CaCl}_2$  – 1,  $\text{MgCl}_2$  – 1, HEPES – 20, сахароза – 3,55; рН 7,2. В експериментах також використовували безкальцієвий розчин, у якому 1 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  еквімолярно заміняли на  $\text{MgCl}_2$  і додавали EGTA до кінцевої концентрації 1 ммоль/л. Для інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулулу використовували тапсигаргін (Sigma) у концентрації 10 мкмоль/л. Пасивне спустошення внутрішньоклітинних депо викликали також використанням 10 мкмоль/л іономіцину (Sigma).

Після виділення слинні залози поміщали у чашки Петрі з вихідним або безкальцієвим розчином і закріплювали їх у штативи інвертованого мікроскопа (Olympus, Japan).

$\text{Ca}^{2+}$ -залежні зміни флуоресценції білка G-CaMP1.6 після обробки слинних залоз іономіцином і тапсигаргіном досліджували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа Olympus Fluoview1000 (Olympus, Japan), використовуючи об'єктив 10×/NA 0.4, або Yokogawa spinning disc – Andor&Olympus (Yokogawa/Andor/Olympus, Japan) зі застосуванням об'єктива 20×/NA 0.7. В обох випадках як джерело збуджуючого світла (довжиною 488 нм) використовували багатохвильовий аргонний лазер. Довжина хвилі флуоресцентного випромінювання була у межах 510–520 нм.

Протягом кожного з експериментів у полі зору фокусували ділянку залози, що складалася приблизно із 10–15 клітин, і сканували її у часі: 3–5 хв – у контролі, а після додавання іономіцину, тапсигаргіну або  $\text{CaCl}_2$  – ще 20 хв. Результати отримали у вигляді серії зображень сфокусованого фрагмента залози зі змінами її флуоресценції протягом усього часу. Загальний час інкубування не перевищував 45 хв. Кожний експеримент серії повторювали 3–7 разів.

Аналіз отриманих зображень проводили з використанням програмного забезпечення FV10-ASW1.3 (для Olympus Fluoview1000) та Andor iQ1.8.1 (для Yokogawa spinning disc – Andor&Olympus), беручи до уваги інтенсивність флуоресценції як від фрагмента залози, так і від окремих клітин.

Для того, щоб з'ясувати природу висхідної і низхідної частин піку, отриманого внаслідок заміни вихідного безкальцієвого розчину  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісним, ми порівняли швидкість його наростання і спадання. Для розрахунку швидкості наростання і спадання транз'єнта амплітуду його висхідної або низхідної частини (в ум. од.) ділили на її тривалість (у с).

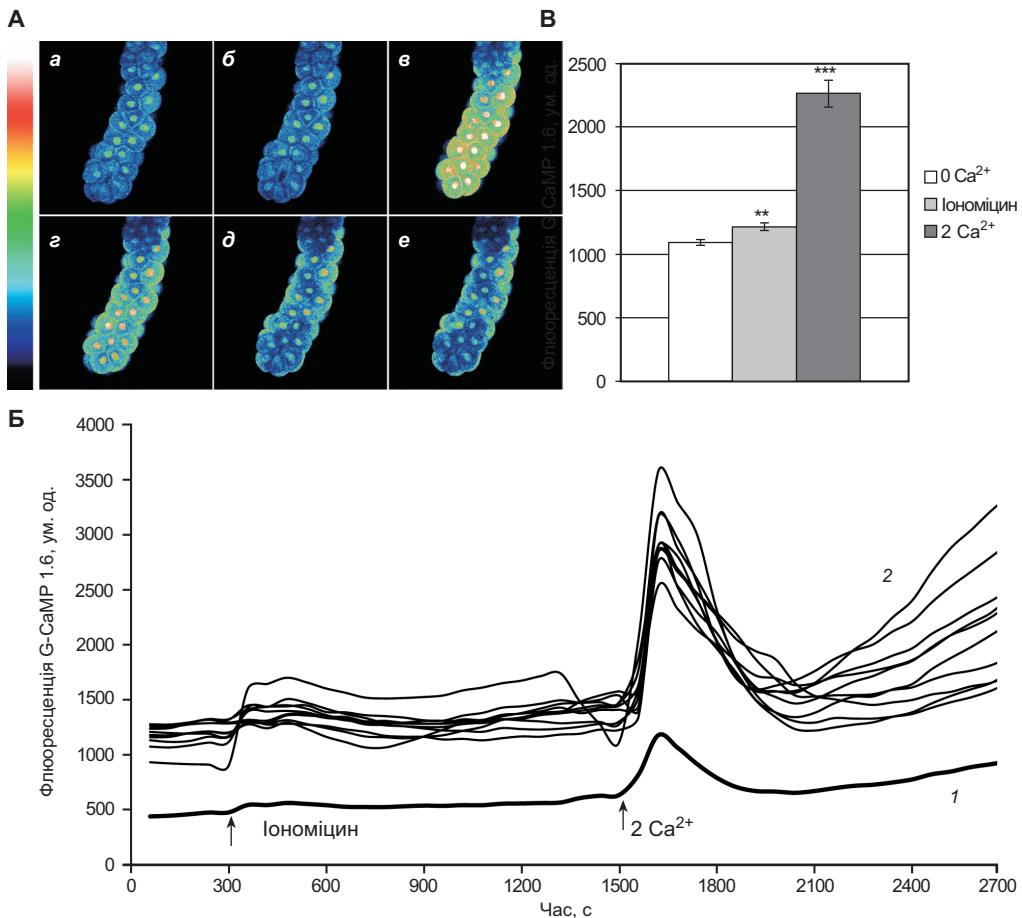
Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*, достовірність змін визначали за t-критерієм Стюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Методичним підходом для активації депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини є спустошення його внутрішньоклітинних депо [19]. Цього можна досягнути різними шляхами:

- 1) фізіологічно – за рахунок підвищення рівня інозитол-1,4,5-трифосфату ( $\text{IP}_3$ ) [20], або
- 2) шляхом його пасивного спустошення – з використанням інгібіторів активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в ендоплазматичного ретикулум тапсигаргіну, циклопіазонієвої кислоти чи 2,5-тетра-бутилгідроксисініону [19].

$\text{Ca}^{2+}$ -іонофори, зокрема A23187 та іономіцин, також можуть бути використані з метою пасивного спустошення внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$ , хоча спричинюють надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину і через плазматичну мембрану за принципом електронейтрального  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -обміну [6]. Іономіцин з цією метою було використано у багатьох незбудливих клітинах: в ацинарних клітинах підшлункової залози мишей [10], у лінії клітин молочної залози та клітин раку підшлункової залози, базофільної лейкемії щурів [3] і в HeLa-клітинах [5]. Тому на першому етапі ми зосередили свої зусилля на дослідженні можливості використання іономіцину для спустошення внутрішньоклітинних депо секреторних клітин слинних залоз личинки *Drosophila*. Для цього слинні залози личинки спочатку інкубували у безкальцієвому середовищі протягом 5 хв, після чого їх обробляли іономіцином. Інкубування продовжували ще 20 хв, одночасно скануючи сфокусовану ділянку однієї з них. На рис. 1, Б представлено зміну інтенсивності флуоресцентного сигналу, отриманого від фрагмента залози (1) та окремих клітин цього фрагмента (2) до і після обробки іономіцином.

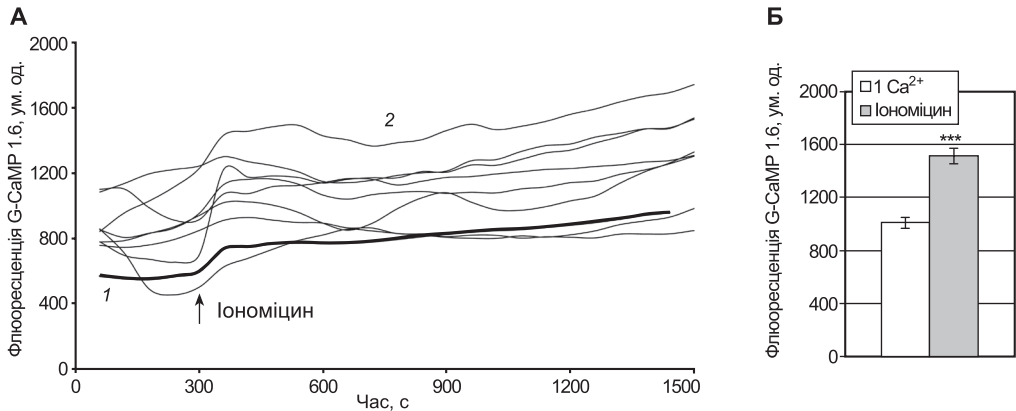


**Рис. 1.** Активация депокерowanego входу  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторні клітини слинних залоз личинки *Drosophila melanogaster* за використання іономіцину: **A** – конфокальні фотографії фрагмента залози (а – у контролі; б – після обробки іономіцином; в, з, д, е – після збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  до 2 ммоль/л); **Б** –  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали, зареєстровані від цього фрагмента (1) і його 10-ти окремих клітин (2); **В** – зміна вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах за дії іономіцину і збільшення позаклітинної  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  і 2 ммоль/л відповідно,  $[\text{іономіцин}] = 10$  мкмоль/л; \*\* – різниця порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,01$ ; \*\*\* – з  $P < 0,001$ ,  $n = 30$

**Fig. 1.** Activation of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the secretory cells of *Drosophila melanogaster* larval salivary glands under the use of ionomycin: **A** – confocal images of gland's region (a – in control; б – after ionomycin treatment; в, з, д, е – after increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  to 2 mmol/l); **Б** –  $\text{Ca}^{2+}$ -signals, registered from this portion (1) and from its 10 cells separately (2); **В** – change of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  content in the secretory cells under the influence of ionomycin and increase of extracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  and 2 mmol/l respectively,  $[\text{ionomycin}] = 10 \mu\text{mol/l}$ ; \*\* – difference is significant compare to the control with  $P < 0,01$ ; \*\*\* – with  $P < 0,001$ ,  $n = 30$

Як видно, внаслідок аплікації іономіцину спостерігається статистично достовірне ( $n = 30$ ,  $P \leq 0,01$ ), але незначне і нетранзйентне підвищення флуоресценції від  $1089,55 \pm 26,35$  до  $1212,67 \pm 31,48$  ум. од., тобто на 11% (рис. 1, В). Це підвищення інтенсивності флуоресценції свідчить про незначне збільшення цитозольної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Причому таке іономіциніндуковане зростання цитозоль-

ної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є наслідком, на нашу думку, вивільнення цих іонів із внутрішньоклітинних депо, оскільки у позаклітинному середовищі їх не було. Це припущення підтверджується тим, що за збільшеної позаклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до 1 ммоль/л іономіцин викликав суттєвіше підвищення ( $n = 26$ ,  $P \leq 0,001$ ) вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  – на 49% (рис. 2, А і Б). У цьому випадку індуковане іономіцином зростання флуоресценції, зареєстрованої від фрагмента залози, теж було нетранзійентним. Більше того, протягом 20 хв рівень цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  поступово підвищувався (рис. 2, А).



**Рис. 2.** Іономіциніндуковані зміни рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз, інкубованих у  $\text{Ca}^{2+}$ -вмісному середовищі: **А** –  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали, зареєстровані від фрагмента залози (1) та його 8-ми окремих клітин (2); **Б** – зміна вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах за дії іономіцину;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1$  ммоль/л,  $[\text{іономіцин}] = 10$  мкмоль/л; \*\*\* – різниця порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,001$ ,  $n = 26$

**Fig. 2.** Ionomycin-induced changes of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level in the secretory cells of salivary glands, incubated in the  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium: **A** –  $\text{Ca}^{2+}$ -signals, registered from gland's region (1) and from its 8 cells separately (2); **B** – change of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  content in the secretory cells under the influence of ionomycin;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 1$  mmol/l;  $[\text{ionomycin}] = 10$   $\mu\text{mol/l}$ ; \*\*\* – difference is significant compare to the control with  $P < 0,001$ ,  $n = 26$

Цікавим є те, що інтенсивність флуоресцентного сигналу окремих клітин фрагмента залози дещо відрізняється. В одних випадках спостерігається виражене зростання інтенсивності флуоресценції, в інших – її підвищення спочатку змінюється зниженням, після чого простежується поступове зростання інтенсивності. Очевидно, це пов'язано з поступовим розчиненням іономіцину в мембранах; спочатку – у плазматичній мембрані, внаслідок чого іони  $\text{Ca}^{2+}$  можуть транспортуватись у цитозоль чи позаклітинне середовище за градієнтом концентрації. Згодом іономіцин вбудовується у внутрішньоклітинні мембрани, що спричиняє вивільнення депонованого  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазму клітин.

Для активації депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторні клітини, оброблені іономіцином, збільшували його позаклітинну концентрацію до 2 ммоль/л. Внаслідок цього спостерігали суттєве статистично достовірне ( $n = 30$ ,  $P \leq 0,001$ ) і транзійентне підвищення флуоресценції на 86% (рис. 1, В). Варто зазначити, що у цій серії дослідів відповідь як від фрагмента залози, так і від окремих клітин цього фрагмента мала однакову динаміку, що свідчить про синхронність процесу у всіх клітинах.

Середньоарифметична тривалість транзєнта, розрахована вїд 30-ти клїтин, становила  $378,0 \pm 25,2$  с. Швидкїсть його наростання ( $15,3 \pm 1,49$  ум. од./с) виявилася статистично достовїрно ( $n = 30, P \leq 0,001$ ) бїльшою на 80% вїд швидкостї спадання транзєнта ( $3,06 \pm 0,26$  ум. од./с), що свїдчить про пасивний характер входу  $\text{Ca}^{2+}$  у клїтини; низхїдна частина піку вїдображає, мабуть, активне транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрїшньоклїтиннї депо.

Ми припускаємо, що висхїдна частина  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнта пов'язана як з активацїєю депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналїв плазматичної мембрани, так і з надходженням іонїв  $\text{Ca}^{2+}$  у клїтину з позаклїтинного середовища за участю  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ -обмїну. Низхїдна частина цього піку може бути зумовлена, в першу чергу, депонуванням  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксї мїтохондрїй, якї, як вїдомо, вїдїграють важливу роль у регуляцїї депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  у клїтини [8]. Слїд зауважити, що пїсля спадання  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнта спостерїгається вторинне пїдвищення флуоресценцїї, можливою причиною чого є пасивне вивільнення депонованого  $\text{Ca}^{2+}$  (з ендоплазматичного ретикулуку і/або мїтохондрїй) внаслїдок поступового розчинення іономїцину у внутрїшньоклїтинних мембранах протягом тривалого часу інкубування.

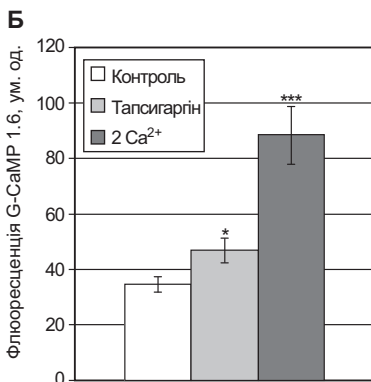
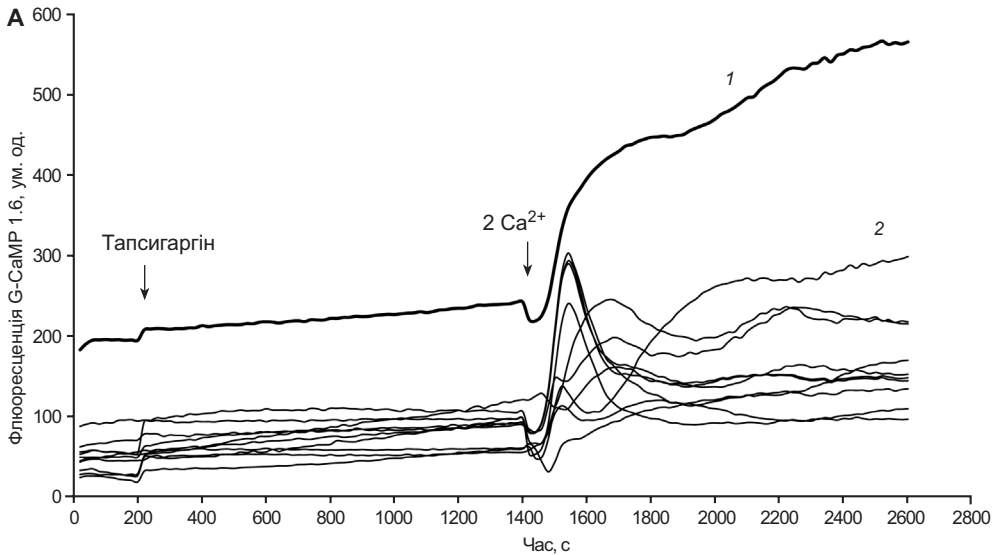
Бїльш адекватним засобом для активацїї депокерованого входу іонїв  $\text{Ca}^{2+}$  у клїтини є використання селективних блокаторїв  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуку. Тому у подальших серїях дослїджень ми спустошували внутрїшньоклїтинне депо  $\text{Ca}^{2+}$  тапсигаргїном, застосувавши конфокальний мїкроскоп Yokogawa spinning disc – Andor&Olympus, основною перевагою якого є висока швидкїсть сканування, що дає змогу чїткїше простежувати швидкї  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали.

З'ясувалося, що за дїї тапсигаргїну у концентрацїї 10 мкмоль/л на слиннї залози, інкубованї у безкальцїєвому середовищї, рївень флуоресценцїї статистично достовїрно ( $n = 51, P \leq 0,05$ ) нетранзїєнтно пїдвищувався на 35% (рис. 3, А і Б). За меншої концентрацїї тапсигаргїн не спричиняв значимих змїн цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Тому у подальших дослїдженнях з метою пасивного вивільнення іонїв  $\text{Ca}^{2+}$  з депо використовувався специфїчний інгїбітор  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи мембрани ендоплазматичного ретикулуку у такїй досить таки високїй концентрацїї.

На вїдмїну вїд цього, збїльшення позаклїтинної концентрацїї  $\text{Ca}^{2+}$  у всїх випадках спричиняло транзїєнтне зростання рївня флуоресценцїї – в середньому на 89% ( $n = 51, P \leq 0,001$ ; рис. 3, Б). Але цї транзїєнти, слїд зазначити, мали складний характер і суттєво вїдрїзнялися за своїми часовими й амплїтудними параметрами на вїть у межах однїєї залози (рис. 3, А). Зокрема, у 4 клїтинах з 10-ти цей  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал був представлений швидким транзїєнтом, тривалїсть якого становила приблизно 360 с. В інших трьох випадках  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал мав хвилеподїбний характер протягом часу реєстрацїї – повільний транзїєнт змїнювався менш вираженим, практично нетранзїєнтним пїдвищенням флуоресценцїї. Амплїтуда повільного транзїєнта була меншою, нїж амплїтуда швидкого транзїєнта у вищезгаданих 4-х клїтинах. У інших 3-х клїтинах спостерїгалася поступове в часї зростання рївня цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$ .

Унаслїдок сумациї швидких і повільних транзїєнтїв вїд рїзних клїтин  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, зареєстрований вїд фрагмента залози, має виражене плато (тривалїстю 60 с). Вторинне пїдвищення флуоресценцїї вїд фрагмента залози є вїдображенням послїдовної сумациї нетранзїєнтних пїдвищень флуоресценцїї, зареєстрованих вїд поодиноких клїтин.

Цїкаво, що за вїдсутностї тапсигаргїну внаслїдок замїни безкальцїєвого  $\text{Ca}^{2+}$ -вмїсним розчином рївень флуоресценцїї статистично достовїрно ( $n = 30, P \leq 0,001$ )

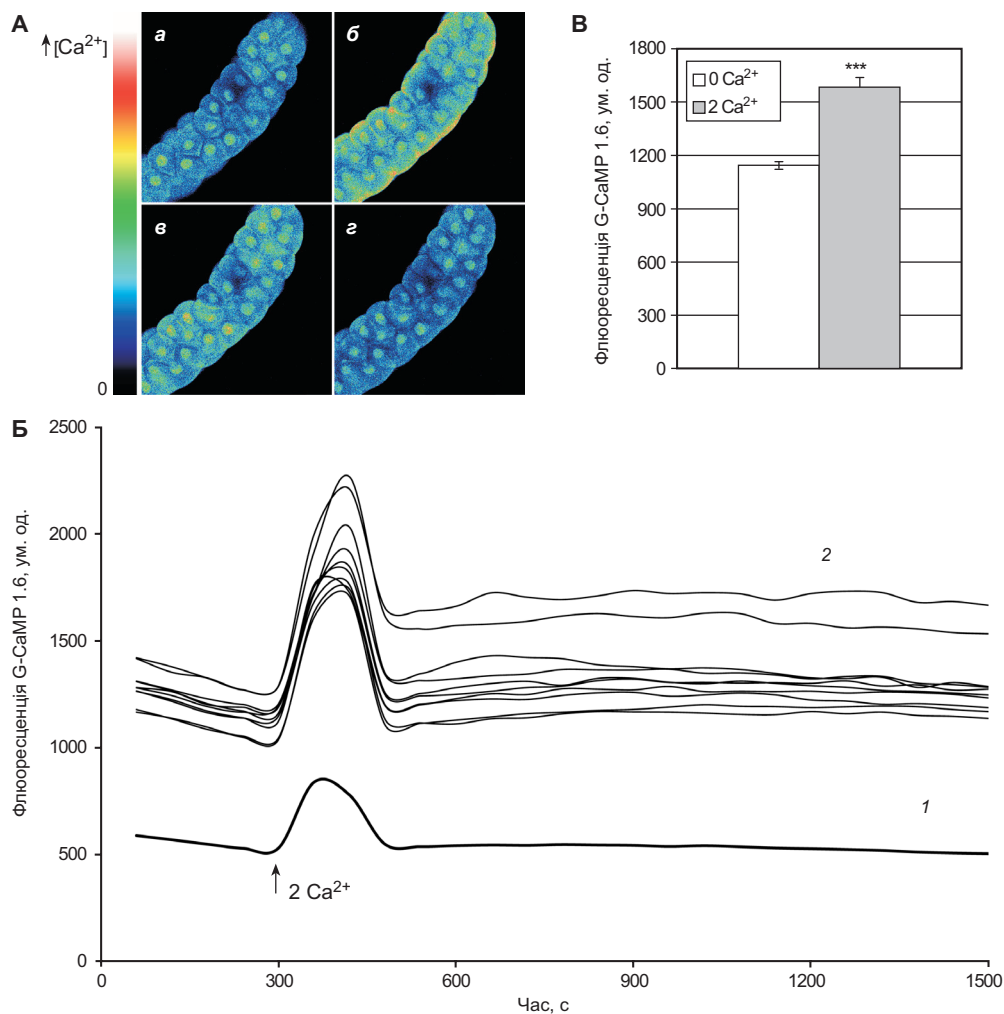


**Рис. 3.** Активація депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторні клітини за використання тапсигаргину: **А** –  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали, зареєстровані від фрагмента залози (1) та його 10-ти окремих клітин (2); **Б** – зміна вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах за дії тапсигаргину і збільшення позаклітинної  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  і 2 ммоль/л відповідно, [тапсигаргін] = 10 мкмоль/л; \* – різниця порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,05$ ; \*\*\* – з  $P < 0,001$ ,  $n = 51$

**Fig. 3.** Activation of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the secretory cells under the use of thapsigargin: **A** –  $\text{Ca}^{2+}$ -signals, registered from gland's region (1) and from its 10 cells separately (2); **B** – change of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  content in the secretory cells under the influence of thapsigargin and increase of extracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  and 2 mmol/l, [thapsigargin] = 10  $\mu\text{mol/l}$ ; \* – difference is significant compare to the control with  $P < 0,05$ , \*\*\* – with  $P < 0,001$ ,  $n = 51$

транзійтно зростав у всіх клітинах лише на 38% (рис. 4). Цей транзійт, на нашу думку, може бути зумовлений входом іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину за рахунок зворотного режиму функціонування  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника, що, як відомо, може активуватися збільшенням позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  [1]. Його тривалість становила у середньому  $154,2 \pm 7,2$  с ( $n = 30$ ). Швидкості наростання та спадання виявилися між собою майже однаковими і становили  $5,3 \pm 0,5$  та  $5,3 \times 0,6$  ум. од./с відповідно. Отже, у генерації такого транзійнта бере участь одна і та ж  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальна система (наприклад,  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінник). Крім того, швидкість його наростання виявилася на 65% меншою ( $n = 30$ ,  $P \leq 0,001$ ) від швидкості наростання транзійнта, спричиненого позаклітинним  $\text{Ca}^{2+}$  (2 ммоль/л) після обробки залоз іономіцином (рис. 1, В). Це дає нам підстави стверджувати, що висхідна частина цього транзійнта зумовлена активним транспортуванням іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину; ми розглядаємо ці дані як опосередковане підтвердження функціональної активності  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника у плазматичній мембрані секреторних клітин слинних залоз личинки дрозофіли.

Наведені вище дані свідчать, що у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Drosophila* наявна система депокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$ . Цілком можливо, що у депокерованому надходженні  $\text{Ca}^{2+}$  у ці секреторні клітини важливу роль відіграє трансмембранний білок *Orai*, оскільки попередніми дослідженнями встановлено експресію у них гена *olf186-F* [4].



**Рис. 4.**  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане зростання цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах слинних залоз, інкубованих у безкальцієвому середовищі: **A** – конфокальні фотографії фрагмента залози (а – у контролі; б, в, г – після збільшення позаклітинної  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ); **Б** –  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали, зареєстровані від цього фрагмента (1) і його 10-ти окремих клітин (2); **В** – зміна вмісту цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах після збільшення позаклітинної  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  і 2 ммоль/л відповідно; \*\*\* – різниця порівняно з контролем достовірна з  $P < 0,001$ ,  $n = 30$

**Fig. 4.**  $\text{Ca}^{2+}$ -induced increase of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in the secretory cells of salivary glands incubated in the  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium: **A** – confocal images of gland's region (a – in control; б, в, г – after increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ); **Б** –  $\text{Ca}^{2+}$ -signals, registered from this portion (1) and from its 10 cells separately (2); **В** – change of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  content in the secretory cells after increase of extracellular  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0$  and 2 mmol/l respectively; \*\*\* – difference is significant compare to the control with  $P < 0,001$ ,  $n = 30$



Тривала стимуляція клітин повинна раніше чи пізніше спричинити вичерпання депонованого у внутрішньоклітинних органелах  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки підвищення його концентрації у цитозолі спричиняє активацію не лише  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму, а й  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи (і  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, якщо він там є) плазматичної мембрани. Особливо це стосується секреторних клітин, функціональна активність яких збільшується за рахунок вивільнення депонованого  $\text{Ca}^{2+}$ , а не надходження його ззовні. Відомо, що протягом глобальних  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнтів, викликаних секретогогами, така клітина втрачає більше 20%  $\text{Ca}^{2+}$ , вивільненого з внутрішньоклітинних депо [25]. Для збудливих клітин основним шляхом надходження позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозоль є потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, хоча певну роль відіграє і депокерований вхід [22]. Для незбудливих клітин постулюється, що депокерований вхід позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  є чи не єдиним шляхом поповнення внутрішньоклітинних депо [20]. Його наявність показана для ацинарних клітин підшлункової залози щурів [11], лінії клітин раку підшлункової залози [5], ацинарних клітин підщелепних залоз мишей [16], привушних і підщелепних залоз людини [14, 15]. Але властивості депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у різних клітинах виявилися різними. Зокрема, депокерований  $\text{Ca}^{2+}$ -струм ( $I_{\text{SOC}}$ ) через TRPC1-канали ацинарних клітин підщелепних залоз людини за своїми електрофізіологічними характеристиками суттєво відрізняється від депокерованого  $\text{Ca}^{2+}$ -струму через CRAC-канали ( $I_{\text{CRAC}}$ ), притаманного іншим незбудливим клітинам [13]. Більше того, експресія гена *olf186-F*, який кодує компоненту CRAC-каналу (білок Orai), не може бути однозначним підтвердженням того, що депокерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$  реалізується лише CRAC-каналами. Тому питання про можливий вклад різних компонент у депокероване надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторні клітини слинних залоз личинки *Drosophila* залишається відкритим.

Не зовсім зрозумілим є і те, чому за синхронністю  $\text{Ca}_0^{2+}$ -індуковані  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнти у разі спустошення депо іономіцином і тапсигаргіном відрізняються між собою. І причину цього потрібно шукати, спираючись на відмінності дії цих речовин: іономіцин, на відміну від тапсигаргіну, не лише порушує здатність ендоплазматичного ретикулуму депонувати  $\text{Ca}^{2+}$ , а й спричиняє втрату функціональної цілісності плазматичної мембрани.

Втрата функціональної цілісності плазматичної мембрани унеможлиблює виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини системами активного ( $\text{Ca}^{2+}$ -помпами) і вторинно-активного ( $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінником) транспортування  $\text{Ca}^{2+}$ . Відповідно, низхідна частина  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнта у цьому випадку може бути зумовлена лише буферним зв'язуванням  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі та залишковим депонуванням на фоні недепозалежної інактивації депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів.

У разі застосування тапсигаргіну  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани, активована збільшенням цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , ефективно транспортує його з клітини. Власне, у цьому випадку низхідну частину  $\text{Ca}_0^{2+}$ -індукованого  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнта визначають не тільки буферне зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі та акумулювання у мітохондріях, а й активне транспортування з клітини.

Крім того, у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Drosophila* на підставі аналізу змін мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  за дії гіперкалієвої деполаризації постулюється наявність потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів [2]. Внаслідок активації депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів виникає вхідний струм, що має супроводжуватися деполаризацією плазматичної мембрани і, відповідно, активацією потенціалкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Тому потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали повинні потенціювати ефект депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів лише у тих випадках, коли обидві системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  наявні у клітині. Це може бути ще однією причиною, чому відрізняються між

собою  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенти, якi супроводжують активацiю депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналiв, у рiзних клiтинах слинних залоз. Внаслiдок потенцiювання активацiї потенцiалкерованих i депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналiв у секреторних клiтинах, у яких наявнi обидвi системи, i виникає, мабуть, швидкий  $\text{Ca}_i^{2+}$ -iндукований транзйент за використання тапсигаргiну. У випадку, коли потенцiювання вiдсутнє,  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйент є повiльним. При застосуванні iономiцину депокерований вхiд  $\text{Ca}^{2+}$  потенцiюється, без сумнiву, його надходженням iз позаклiтинного середовища внаслiдок iонофоретичного обмiну. Тому  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйенти в усiх клiтинах у цьому випадку розвивалися синхронно.

I, нарештi, причиною нетранзйентного пiдвищення рiвня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у частинi клiтин за застосування тапсигаргiну є, мабуть, активацiя  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмiнника плазматичної мембрани у зворотному режимi внаслiдок зростання електрорушiйної сили транспортування  $\text{Ca}^{2+}$ .

Звичайно, наведенi вище припущення про причини вiдмiнностей  $\text{Ca}^{2+}$ -транзйентiв значною мiрою є гiпотетичними i потребувуть експериментального пiдтвердження.

---

## STORE-OPERATED $\text{Ca}^{2+}$ -ENTRY INTO THE SECRETORY CELLS OF *Drosophila melanogaster* LARVAL SALIVARY GLANDS

T. I. Chorna<sup>1,2</sup>, G. Hasan<sup>2</sup>, V. V. Manko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: tanya0104@yandex.ru; vvmanko@gmail.com

<sup>2</sup>National Centre for Biological Sciences,  
Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore, India

Confocal microscopy enabled the identification of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the secretory cells of *Drosophila melanogaster* larval salivary glands, which expresses  $\text{Ca}^{2+}$  sensor G-CaMP1.6. To release  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores, we used  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ionomycin and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -pump inhibitor thapsigargin. Addition of these compounds to the  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium caused slight and non-transient elevation of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the secretory cells. After an increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at 2 mmol/l, a significant increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level appeared in both cases. Although under the use of ionomycin, an increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was transient in all cases,  $\text{Ca}_i^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -transients from different cells of investigated gland's region were synchronous, and determined by activation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry as well as by its entry from extracellular medium under the ionophoretic exchange. In case of emptying stores by thapsigargin, an increase of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced in part of the cells, fast transients of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , in some part – slow primary transients, which changes by non-transient elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level, and in another part – only non-transient increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  level. Such differences of  $\text{Ca}_i^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -transients in different cells is determined, perhaps, by the fact that their generation involved only store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels as far as other  $\text{Ca}^{2+}$ -transport systems of plasma membrane and intracellular organelles.

**Key words:** secretory cells, salivary glands, store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry,  $\text{Ca}^{2+}$ -transients, ionomycin, thapsigargin, *Drosophila melanogaster*, confocal microscopy.

**ДЕПОУПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД  $\text{Ca}^{2+}$  В СЕКРЕТОРНЫЕ КЛЕТКИ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ЛИЧИНКИ *Drosophila melanogaster*****Т. И. Чорна<sup>1,2</sup>, Г. Хасан<sup>2</sup>, В. В. Манько<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: tanya0104@yandex.ru; vvmanko@gmail.com

<sup>2</sup>Национальный Центр Биологических Наук,  
Тата Институт Фундаментальных Исследований, г. Бангалор, Индия

С использованием конфокальной микроскопии зарегистрирован депоуправляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в секреторные клетки слюнных желез личинки линии *Drosophila melanogaster*, которая селективно экспрессирует  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор G-CaMP1.6. Для высвобождения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо использовали  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофор иономицин и блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -помпы эндоплазматического ретикулума тапсигаргин. Добавление этих веществ к безкальциевой среде вызывало незначительное и нетранзиентное возрастание концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в секреторных клетках. Вследствие повышения внеклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  к 2 ммоль/л происходило значительное возрастание уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в обеих случаях. При использовании иономицина возрастание цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  во всех случаях было транзитным, причем  $\text{Ca}_e^{2+}$ -индуцированные  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиенты от разных клеток фрагмента железы были синхронными и обусловлены, очевидно, как активацией депоуправляемого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , так и его поступлением из внеклеточной среды вследствие ионофоретического обмена. В случае опустошения депо тапсигаргином повышение внеклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  у части клеток вызывало быстрые транзиенты цитозоли  $\text{Ca}^{2+}$ , у части – медленные транзиенты, которые сменялись нетранзиентным возрастанием уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , а у части – только нетранзиентное возрастание уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Такие отличия  $\text{Ca}_e^{2+}$ -индуцированных  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиентов в разных клетках при использовании тапсигаргина обусловлены, наверное, тем, что в их генерации участвуют не только депоуправляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, но и другие  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортные системы плазматической мембраны и внутриклеточных органелл.

**Ключевые слова:** секреторные клетки, слюнные железы, депоуправляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -транзиенты, иономицин, тапсигаргин, *Drosophila melanogaster*, конфокальная микроскопия.

1. Манько В.В. Методологічні підходи до дослідження  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну в екзокринних секреторних клітинах. **Укр. біохім. журн**, 2006; 78(1): 43–62.
2. Чорна Т.І., Манько В.В., Клевець М.Ю. Ідентифікація потенціалокерованого входу  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторні клітини слинних залоз личинки *Drosophila melanogaster*. **Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія**, 2007; 2: 29–34.
3. Broad L.M., Braun F.J., Lievreumont J.P. et al. Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. **J. Biol. Chem**, 2001; 276(19): 15945–15952.
4. Chorna T.I., Hasan G., Man'ko V.V., Klevets M. Yu. Genes expression of calcium signaling molecules in salivary glands of *Drosophila melanogaster* larvae. **Укр. біохім. журн**, 2009; 81(1): 39–42.
5. Chvanov M., Walsh C.M., Haynes L.P. et al. ATP depletion induces translocation of STIM1 to puncta and formation of STIM1-ORAI1 clusters: translocation and re-translocation of STIM1 does not require ATP. **Pflugers Arch**, 2008; 457(2): 505–517.

6. Erdahl W.L., Chapman C.J., Taylor R.W. et al. Effect of pH conditions on Ca<sup>2+</sup> transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. **Biophys. J**, 1994; 66: 1678–1693.
7. Feske S., Gwack Y., Prakriya M. et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. **Nature**, 2006; 441: 179–185.
8. Glitsch M.D., Bakowski D., Parekh A.B. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry depends on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. **EMBO J**, 2002; 21(24): 6744–6754.
9. Gwack Y., Srikanth S., Feske S. et al. Biochemical and functional characterization of Orai1-family proteins. **J. Biol. Chem**, 2007; 282(22): 16232–16243.
10. Krause E., Pfeiffer F., Schmid A., Schulz I. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. **J. Biol. Chem**, 1996; 271(51): 32523–32528.
11. Mogami H., Nakano K., Tepikin A.V., Petersen O.H. Ca<sup>2+</sup> flow via tunnels in polarized cells: recharging of apical Ca<sup>2+</sup> stores by focal Ca<sup>2+</sup> entry through basal membrane patch. **Cell**, 1997; 88: 49–55.
12. Liou J., Kim M.L., Heo W.D. et al. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. **Curr. Biol**, 2005; 15: 1235–1241.
13. Liu X., O'Connell A., Ambudkar I.S. Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of a store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human submandibular gland cells. Role of a staurosporine-sensitive protein kinase and intracellular Ca<sup>2+</sup> pump. **J. Biol. Chem**, 1998; 273: 33295–33304.
14. Liu X., Liao D., Ambudkar I.S. Distinct mechanisms of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in HSY and HSG cells: role of Ca<sup>2+</sup> influx and internal Ca<sup>2+</sup> store recycling. **J. Membrane Biol**, 2001; 181: 185–193.
15. Liu X., Groschner K., Ambudkar I.S. Distinct Ca<sup>2+</sup>-permeable cation currents are activated by internal Ca<sup>2+</sup>-store depletion in RBL-2H3 cells and human salivary gland cells, HSG and HSY. **J. Membrane Biol**, 2004; 200: 93–104.
16. Liu X., Cheng K.T., Bandyopadhyay B.C. et al. Attenuation of store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. **PNAS**, 2007; 104(44): 17542–17547.
17. Nakai J., Ohkura M., Imoto K. A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. **Nature Biotech**, 2001; 19: 137–141.
18. Ohkura M., Matsuzaki M., Kasai H. Genetically encoded bright Ca<sup>2+</sup> probe applicable for dynamic Ca<sup>2+</sup> imaging of dendritic spines. **Anal. Chem**, 2005; 77: 5861–5869.
19. Parekh A.B., Penner R. Store depletion and calcium influx. **Physiol. Rev**, 1997; 77: 901–930.
20. Parekh A.B., Putney J.W. Jr. Store operated calcium channels. **Physiol. Rev**, 2005; 85: 757–810.
21. Prakriya M., Feske S., Gwack Y. et al. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. **Nature**, 2006; 443: 230–233.
22. Putney J.W. Jr. Capacitative calcium entry in the nervous system. **Cell Calcium**, 2003; 34: 339–344.
23. Putney J.W. Jr. New molecular players in capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. **J. Cell Sci**, 2007; 120(12): 1959–1965.
24. Roos J., DiGregorio P.J., Yeromin A.V. et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. **JCB**, 2005; 169(3): 435–445.
25. Tepikin A. V., Voronina S. G., Gallacher D. V. et al. Pulsatile Ca<sup>2+</sup> extrusion from single pancreatic acinar cells during receptor-activated cytosolic Ca<sup>2+</sup> spiking // **J. Biol. Chem**, 1992. Vol. 267. P. 14073–14076.
26. Yeromin A. V., Zhang S. L., Jiang W. et al. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. **Nature**, 2006; 443: 226–229.

Одержано: 16.02.2009