

УДК 577.21

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ АНАЛИЗА РОЛИ IRBIT В РЕГУЛЯЦИИ IP₃-РЕЦЕПТОРА I ТИПА

© 2024 г. Е. Е. Копылова^а, И. С. Масулис^{а, *}, О. А. Рогачевская^а, Е. Н. Кочкина^а,
Ю. А. Ковалицкая^а, М. Ф. Быстрова^а, С. С. Колесников^а

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

*e-mail: irina.masulis@gmail.com

Поступила в редакцию 08.05.2023 г.

Подписана в печать 23.07.2023 г.

Принята к публикации 21.09.2023 г.

В геномах позвоночных три гена кодируют субъединицы IP₃-рецепторов, включая IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3. Хотя их первичные аминокислотные последовательности высоко гомологичны, гомотетрамерные IP₃ рецепторы, формируемые IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3 в мембране эндоплазматического ретикулума, заметно различаются по своим функциональным свойствам и регуляторным механизмам. В частности, активность IP₃R1 специфически регулируется белком IRBIT (IP₃R binding protein released with IP₃), который является конкурентом IP₃ за связывание с IP₃R1. В свою очередь, аффинность связывания IRBIT с IP₃R1 регулируется фосфорилированием. С использованием технологии CRISPR/Cas9 для редактирования генома клеток линии HEK-293, в настоящей работе были получены две моноклональные клеточные линии для анализа роли IRBIT и ассоциированных регуляторных механизмов в контроле активности IP₃R1. В одной линии (HEK-IP₃R1) были инактивированы гены IP₃R2 и IP₃R3, но оставлен функциональным IP₃R1. На основе этой линии была получена линия HEK-IP₃R1/ΔIRBIT, в клетках которой был инактивирован ген IRBIT (AHCYL1). С использованием микрофотометрии и Ca²⁺-зонда Fluo-4 проведен сравнительный анализ агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках этих линий на примере ацетилхолина (ACh). В частности, показано, что клетки обеих линий отвечают на ACh в широком диапазоне концентраций по принципу «все или ничего», и, что клетки HEK-IP₃R1/ΔIRBIT менее чувствительны к этому агонисту по сравнению с клетками HEK-IP₃R1.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, IP₃-рецептор, IRBIT, внутриклеточная Ca²⁺-сигнализация, клетки HEK-293

DOI: 10.31857/S0233475524010023, **EDN:** znmzic

ВВЕДЕНИЕ

Паракринные и аутокринные регуляторные системы модулируют разнообразные клеточные функции при участии первичных медиаторов и их мишеней — молекулярных рецепторов, функционирующих на плазмалемме клеток. Эти рецепторы сопряжены с различными внутриклеточными сигнальными системами, среди которых фосфоинозитидный каскад вовлечен в трансдукцию многих агонистов. В основе его функционирования лежат стимул-зависимая активация фосфолипазы C (phospholipase C, PLC), катализируемый PLC гидролиз фосфолипида PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) и продукция двух вторичных медиаторов IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) и DAG (diacylglycerol) [1, 2]. Многие агонисты поверхностных рецепторов, включая гептаспиральные рецепторы (G-protein coupled receptors, GPCRs)

и рецептор тирозинкиназы (receptor-tyrosine kinases, RTK), инициируют мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺ при участии фосфоинозитидного каскада в клетках самых разнообразных фенотипов [1–3]. Сигнальная роль IP₃ преимущественно сводится к стимуляции выброса депонированного Ca²⁺ через IP₃-рецепторы (IP₃R), которые являются внутриклеточными Ca²⁺-каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и некоторых других внутриклеточных органеллах [2, 4].

Геномы позвоночных содержат три гена, *IP3R1*, *IP3R2* и *IP3R3*, кодирующих субъединицы IP₃R. Несмотря на высокую степень гомологии первичных последовательностей, IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3 заметно различаются по своим биофизическим свойствам и характеризуются разными регуляторными механизмами и чувствительностью к IP₃ и Ca²⁺ [5, 6]. В частности, активность IP₃R1 контролируется

белком IRBIT, который ингибирует связывание IP_3 с этой изоформой [7].

В разных клетках обычно функциональны две и даже все три изоформы IP_3R , активность каждой из которых находится под контролем различных механизмов [8, 9]. Это затрудняет анализ специфической роли IP_3R данного типа в физиологии различных клеток. Представляется, что клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP_3R могут быть эффективной модельной системой для анализа биофизических, фармакологических и функциональных свойств IP_3R различных подтипов.

Клетки линии HEK-293 широко используются как модельная гетерологическая система для экспрессии рекомбинантных белков и исследования рецепторных систем, механизмов внутриклеточной сигнализации и ионного транспорта. В этих клетках функционируют все три изоформы IP_3R [10]. Ранее нами отрабатывалась методология инактивации генов IP_3 -рецепторов в клетках HEK-293 с использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 [11]. В данной работе нами получена моноклональная линия клеток для анализа роли IRBIT в контроле активности IP_3R1 . В исходной линии (HEK- IP_3R1) инаktivированы гены $IP3R2$ и $IP3R3$, но оставлен функциональным $IP3R1$. На основе этой линии получена линия HEK- $IP_3R1/\Delta IRBIT$, в клетках которой был инаktivирован ген *IRBIT*. С использованием микрофотометрии проводился сравнительный анализ агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации в клетках этих линий. Клетки стимулировались ацетилхолином (ACh), который был наиболее эффективным агонистом в том отношении, что инициировал Ca^{2+} -ответы в наиболее представительной клеточной субпопуляции. В частности, показано, что клетки HEK- $IP_3R1/\Delta IRBIT$ менее чувствительны к этому агонисту по сравнению с клетками HEK- IP_3R1 .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Создание экспрессионных кассет для системы CRISPR/Cas9

Редактирование клеточного генома с использованием технологии CRISPR/Cas9 позволяет манипулировать рецепторными, сигнальными и эффекторными белками и, следовательно, является эффективным подходом как к познанию их индивидуального вклада во внутриклеточные процессы, так и с точки зрения направленного изменения клеточных функций. Эта технология основывается на способности эндонуклеазы Cas9

направленно вносить двухцепочечные разрывы в геномный локус, комплементарный короткой последовательности РНК (РНК-гиду), обеспечивающей доставку редактирующего комплекса к выбранному участку. Прилегающий к РНК-гиду мотив РАМ в редактируемой области позволяет пространственно ориентировать фермент для оптимального гидролиза ДНК-мишени [12].

1.1. Конструкция для направленного редактирования генов $IP3R2$ и $IP3R3$. В работе использована клеточная линия HEK- IP_3R1 , которая была получена ранее как HEK293/ $\Delta IP_3R2/\Delta IP_3R3$ [11]. Поиск оптимальных протоспейсеров проводился на последовательностях мРНК генов $IP3R2$ (база данных GenBank NM_002223.4) и $IP3R3$ (GenBank NM_002224.4). Для внесения редактирующего комплекса в клетки HEK-293 использован pGuide-it-tdTomato Vector, содержащий ген Cas9, слитый с красным флуоресцентным белком и позволяющий экспрессировать РНК-гид под контролем промотора U6. Дизайн нуклеотидных последовательностей для экспрессии РНК-гида для редактирования генов $IP3R2$ и $IP3R3$ описан в [11]. Олигонуклеотидные дуплексы клонировали по липким концам в коммерческую плазмиду pGuide-it-tdTomato Vector (Takara, США). Корректность полученных конструкций в плаزمидях pTomato/ $IP3R2$ и pTomato/ $IP3R3$ подтверждали секвенированием.

1.2. Конструкция AIO-GFP/IRBIT для направленного редактирования белка IRBIT. Для инаktivации гена *IRBIT* (*AHCYL1*) использована генетическая конструкция на основе вектора AIO-GFP (Addgene), кодирующего Cas9-D10A с низкой активностью в одной рамке считывания с зеленым флуоресцентным белком два РНК-гида, комплементарные близкорасположенным участкам ДНК в редактируемой области. Вектор AIO-GFP был предоставлен Steve Jackson (Addgene plasmid # 74119; <http://n2t.net/addgene:74119>). Для создания конструкции синтезировали две пары взаимно-комплементарных олигонуклеотидов: 5'-accgAGCAGGCAGAATTTGGACGC-3' и 5'-aaacGCGTCCAAATTCTGCCTGCT-3', соответствующие РНК-гиду со «смысловым» спейсером, и 5'-accgGTTGGTTTGCTGCTTCTCTC-3', и 5'-aaacGAGAGAAGCAGCAAACCAAC-3', соответствующие РНК-гиду с «антисмысловым» спейсером. Для формирования дуплексов синтезированные олигонуклеотиды сначала фосфолировали, а затем проводили отжиг. В вектор AIO-GFP последовательно клонировали сначала «антисмысловой» дуплекс по сайту BbsI (Thermo Scientific). Плазмидный клон анализировался на вставку нужного фрагмента ДНК путем ПЦР с колоний с прай-

мерами 5'-accgGTTGGTTTGCTGCTTCTCTC-3' и 5'-CTTGATGTACTGCCAAGTGGGC-3'. Плазмиды из клонов, содержащих вставку протоспейсера, подвергали рестрикции по сайту BsaI (Thermo Scientific) и лигировали со «смысловым» дуплексом, наличие вставок в векторе также подтверждалось ПЦР с колоний (ScreenMix-HS (UDG), Евроген) с праймерами 5'-accgAGCAGGCAGAATTTGGACGC-3' и 5'-CTTGATGTACTGCCAAGTGGGC-3' для «смыслового» спейсера. Наличие интегрированных спейсеров в полученной плазмиде pAIO/IRBIT подтверждали секвенированием (Евроген).

1.3. Синтез донорной матрицы для направленного внесения мутаций в редактируемый участок. Двухцепочечная матрица для гомологичной рекомбинации была создана с помощью реакции ПЦР по механизму «overlap extension» с применением мегапраймеров. Амплификация проводилась на геномной ДНК, выделенной из клеток HEK293, при помощи HS-Taq полимеразы (Евроген). В первом раунде параллельно ставились две реакции ПЦР с одним внешним (либо А, либо D) и одним внутренним праймером для мутагенеза (С или В). Полученные ПЦР-фрагменты очищали коммерческим набором MinElute Purification Kit (Qiagen). Сконструированные в ходе первого раунда два отдельных ПЦР-фрагмента использовались в следующем раунде ПЦР для синтеза матрицы, содержащей целевые мутации с использованием ДНК-полимеразы PrimeSTAR Max Premix (Takara Bio). Полученный двухцепочечный фрагмент очищали на магнитных частицах CleanMag DNA (Евроген), одноцепочечную донорную конструкцию получали из dsDNA путем гидролиза антисмысловой нити dsDNA ферментом Strandase (Takara Bio) из набора Guige-it™ Long ssDNA Strandase Kit (Takara Bio). Синтезированная одноцепочечная матрица очищалась повторно на магнитных частицах CleanMag DNA.

2. Культивирование и трансфекция клеток линии HEK-293

Трансфекцию вектором pAIO/IRBIT (1 мкг) и одноцепочечной матрицей ssDNA (1 мкг) клеток HEK-IP₃R1 осуществляли в 12-луночной планшете (TPP) при помощи набора реагентов Lipofectamin 3000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Через 72 ч после трансфекции клетки анализировали по интенсивности флуоресценции с помощью сортера клеток FACSAria SORP (BD Biosciences). Для получения моноклонов одиночные клетки с наибольшим уровнем флуоресценции помещали в 96-луночные планшеты, при

достижении 50–70% конфлюентности клеточные клоны последовательно переносили в лунки с большей ростовой поверхностью, используя 24-, 12- и 6-луночные планшеты. Клеточные моноклоны культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10–15% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 4 мМ L-глутамин (Sigma) при 37 °С в условиях 5% CO₂.

3. Определение мутаций, полученных с использованием системы CRISPR/Cas9-D10A

3.1. Оценка эффективности работы CRISPR/Cas9-D10A с помощью рестрикционного анализа. Для рестрикционного анализа собирали всю популяцию клеток с высоким уровнем флуоресценции, осаждали центрифугированием и использовали для выделения ДНК с помощью набора Qiagen. Амплификацию фрагментов для анализа проводили с использованием специфичных праймеров (IRBIT_For) 5'ATCCAGATGGGACCAAGTACCTC и (IRBIT_Rev) 5'GGAAGAGAGAACAAAATCCCAAGAC и ДНК-полимеразы 5X ScreenMix-HS (Евроген, Россия). Часть ПЦР-фрагмента подвергали гидролизу XhoI, часть — клонировали в вектор pJET1.2/blunt (Thermo Schientific). Для выявления направленной мутации 10 индивидуальных плазмидных клонов секвенировали.

3.2. Генерация и проверка нокаутных клонов IRBIT. В отобранных после трансфекции редактирующим вектором моноклонах клетки лизировали и экстрагировали из них геномную ДНК с использованием QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Полученная геномная ДНК служила матрицей для ПЦР-амплификации с использованием шести комбинаций специфичных праймеров, включая IRBIT_For, IRBIT_Rev и олигонуклеотиды, соответствующие протоспейсерам (sF; sR; asF; asR) (табл. 1). Условия реакции аналогичны описанным в разделе 3.1. Для точной локализации мутаций для каждого моноклона с выявленными редактирующими событиями была приготовлена клонотека ПЦР-фрагментов целевого участка, соответствующих обоим аллелям. Очищенные ПЦР-фрагменты клонировали в вектор pJET1.2/blunt по тупым концам с использованием набора CloneGet PCR Cloning Kit (Thermo Schientific), лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* XL1-blue (Евроген), колонии тестировали на присутствие вставки ПЦР с праймерами pJET F/R (ScreenMix-HS (UDG) (Евроген). Продукты ПЦР очищали при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Для

выявления indel-мутаций очищенные ампликоны не менее чем 10 индивидуальных клонов для каждой клонотеки, соответствующей одному моноклону трансфицированных клеток HEK-IP₃R1 были секвенированы (Евроген).

4. Мониторинг внутриклеточного Ca²⁺

Для фотометрического эксперимента клетки экстрагировали из культуральной чашки 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы. Для загрузки флуоресцентным Ca²⁺-зондом Fluo-4 клетки инкубировали в присутствии проникающего предшественника Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). В соответствии со спектральными характеристиками Fluo-4 флуоресценцию клеток возбуждали на длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм. Изменение уровня Ca²⁺ в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 — интенсивность эмиссии Ca²⁺-индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации, соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc).

Вещества, использовавшиеся в физиологических экспериментах, приобретались в Sigma-Aldrich (соли, буферы, глюкоза) и Tocris Bioscience (ACh).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интересной особенностью IP₃R1-изоформы является то, что ее IP₃-зависимая активность специфически регулируется белком IRBIT. Поэтому основной целью данной работы было создание моноклональной клеточной линии HEK-IP₃R1,

в которой функционирует только IP₃R1 и экспрессируется ген IRBIT с последующим его нокаутом и получением моноклональной линии HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT. Сравнительный анализ Ca²⁺-сигналикации в клетках HEK-IP₃R1 и в клетках HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT мог бы позволить выяснить роль IRBIT в регуляции IP₃R1 в условиях естественного микроокружения.

Конструкции для направленного редактирования на основе технологии CRISPR/Cas9

Получение линии клеток HEK-IP₃R1. Ранее путем последовательной инактивации генов *IP3R3* и *IP3R2* были получены клеточные линии с двойным нокаутом IP₃-рецепторов [11]. Для генетических манипуляций был использован вектор pGuide-it-td Tomato, полученные моноклоны тестировались методом RGEN-RFLP (RNA-guided engineered nucleases). После двухэтапного тестирования был отобран моноклон с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания гена *IP3R3* (табл. 1). На одной аллели обнаружена делеция 50 п.н., приводящая к образованию укороченного белка — 16 аминокислот. На другой аллели имеется делеция 2 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 9-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 32-й аминокислоты. В полученной линии HEK- Δ IP₃R3 с использованием вектора pGuide-it-tdTomato затем инактивировался ген *IP3R2*. Инактивирующие мутации выбранного моноклона с биаллельными мутациями *IP3R2* носили следующий характер: делеция 8 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 17-й аминокислоты, и появление стоп-кодона после 31-й аминокислоты, и инсерция 1 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 17-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 34-й аминокислоты (табл. 2). В полученной линии HEK-IP₃R1 интактным остается ген *IP3R1*.

Получение линии клеток HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT. Линия HEK-IP₃R1 использована как базовая для направленного редактирования *IRBIT*. На смысловой и антисмысловой нитях ДНК проведен поиск близко расположенных протоспейсеров для редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9—10A. На участке второго экзона гена *IRBIT* человека (NC_000001.11) на расстоянии 37 п.н. друг от друга были выбраны последовательности смыслового и антисмыслового протоспейсеров, фланкированные на 3'-конце РАМ-мотивами (рис. 1).

При создании конструкции на основе вектора AIO-GFP (Addgene) учитывалось, что используемая

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность использованных праймеров

Название праймера	Последовательность
sF	5'-accgAGCAGGCAGAATTTGGACGC3'
sR	5'- aaacGCGTCCAAATTCTGCCTGCT3'
asF	5'-accgGTTGGTTTGCTGCTTCTCTC3'
asR	5'-aaacGAGAGAAGCAGCAAACCAAC3'
IRBIT_For	5'-ATCCAGATGGGACCAAGTACCTC3'
IRBIT_Rev	5'-GGAAGAGAGAACAAAATCCCAAGAC3'
Irb mut For (XhoI)	5'-TGATGAGGTTTCTCTCGAGAGAAGCAGCAAACC3'
Irb mut Rev (XhoI)	5'-TTGCTGCTTCTCTCGAGAGAAACCTCATCATCAGAG3'
AIOseq	5'-CTTGATGTACTGCCAAGTGGGCG3'
pJET R	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC3'
pJET F	5' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG3'

никазная система, экспрессирующая нуклеазу Cas9-D10A, должна обеспечивать внесение требуемой мутации с минимизацией количества off-target-эффектов за счет наличия двух РНК-гидов, направляющих редактирующий комплекс к целевому локусу генома [12]. Для данной работы это было особенно важно с точки зрения сохранения интактного генетического окружения родительской линии НЕК-IP₃R1, обеспечивающей реализацию сигнальных процессов с участием IP₃R1 рецептора. Нами не было зарегистрировано каких-либо фенотипических различий линий НЕК-IP₃R1 и вновь полученной линии НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT.

Создание донорной матрицы для направленной репарации разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации. Для предварительного тестирования работоспособности выбранной нами редактирующей системы на основе никазы Cas9-D10A мы использовали явление гомологичной рекомбинации в присутствии донорной однострессовой матрицы (ssDNA), содержащей сайт для расщепления рестриктазой. Замена нативной последовательности на контекст, присутствующий в ssDNA,

подтверждает факт редактирующего события в выбранной области. Донорная матрица содержала одну нуклеотидную замену в области протоспейсера, с помощью которой вводился искусственный сайт рестрикции XhoI, а также точечную делецию одного нуклеотида, необходимую для исчезновения антисмыслового сайта PAM, узнаваемого никазой Cas9–10A, и два плеча гомологии 358 и 287 п.н. Направленная мутация состояла в одиночной нуклеотидной замене С/Т и делеции Δ С (рис. 2).

Двухцепочечная матрица была создана с помощью трехступенчатой реакции ПЦР на геномной ДНК, выделенной из клеток НЕК293, по механизму «overlap extension» с применением мегапраймеров (рис. 3а, 3б). Создание длинной одноцепочечной донорной матрицы из dsDNA осуществляли в реакции гидролиза антисмысловой нити dsDNA ферментом Strandase (Takara Bio). Действие strandазы заключается в расщеплении нефосфорилированной нити двухцепочечной ДНК-матрицы. При получении dsDNA методом ПЦР в реакции использовался верхний фосфорилированный праймер А (IRBIT_For), поэтому антисмысловая нить dsDNA осталась нефосфорилированной,

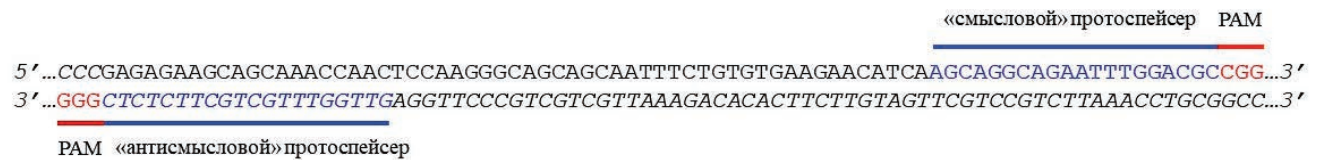


Рис. 1. Локализация протоспейсеров (отмечены синим) и PAM-мотивов (отмечены красным) на смысловой и антисмысловой цепях ДНК 2-го экзона гена IRBIT человека (NC_000001.11) для действия никазы Cas9–10A.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности участков целевых генов клеточной линии HEK-IP₃R1/ΔIRBIT после редактирования

Целевой ген	Мутации	Геномные мутации
ΔIP3R3	WT	ATGAGTGAAATGTCCAGCTTTCTTCACATCGGGGGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCAATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
	-50	ATGAGTGAAATGTCCAGCTTTCTTCA-----TCAGCACTTTGGG
	-2	ATGAGTGAAATGTCCAGCTTTCTTCA--TGGGGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCAATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
ΔIP3R2	WT	ATGACTGAGAAAAATGTCCAGCTTCCCTCTACATAGGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
	-8	ATGACTGAGAAAAATGTCCAGCTTCCCTCTACATAGGGGACATCGTGTCCCTGT-----GGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
	+1	ATGACTGAGAAAAATGTCCAGCTTCCCTCTACATAGGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
ΔIRBIT	WT	CTCCCGAGAGAAAGCAGCAAAACCAACTCCAAAGGGCAGCAGCAATTTCTGTGGAAGAACAATCAAGCAGGCAGAAATTTGGACGC CGG
	-38	CTCCCGAGAGAAAGCAGCAAAACCAACTCCAAAGGGCAGCAGCAATTTCTG-----AGATTGAGATTGCAGAGCAAG
	-43	CTCCCGAGAGAAAGCAGCAAAACCAACTCCAAAGGGCAGCAGCAATTTCT-----TGAGATTGCAGAGCAAG

Примечание. Инсерции выделены красным жирным шрифтом; последовательность РАР — жирным курсивом и голубым; последовательность РНКгида — желтым цветом. Последовательность генов представлена начиная с иницирующего кодона.

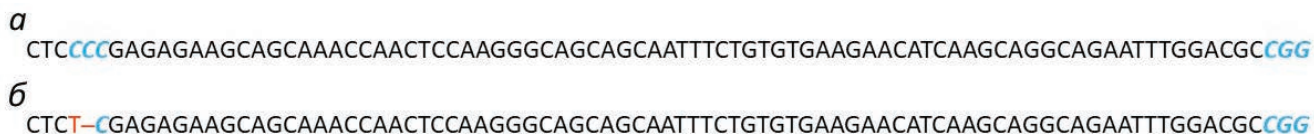


Рис. 2. *а* — Последовательность дикого типа локуса редактирования гена *IRBIT*. *б* — Направленная мутация донорной матрицы (одиночная нуклеотидная замена С/Т и ΔС), приводящая к исчезновению антисмыслового РАМ и возникновению в ssDNA-доноре размером 645 п.н. сайта XhoI CTCGAG.

а следовательно, расщеплялась страндазой. Полученная ssDNA мигрировала при электрофорезе быстрее, чем dsDNA того же нуклеотидного состава (рис. 3в).

Отбор стабильных клеточных моноклонов с нокаутом гена *IRBIT*. Наиболее трудоемким и дорогостоящим этапом в получении генетически модифицированных клеточных линий эукариот является стадия выявления биаллельных мутаций, обеспечивающих полную инактивацию целевого гена. Для идентификации мутаций используются разные подходы [13, 14]. Для оценки работоспособности РНК-гида и матрицы мы использовали стратегию рестрикционного анализа редактируемого локуса после гомологичной рекомбинации с участием донорной ssDNA.

Оценка работоспособности РНК-гида и матрицы. Для доставки сконструированных плазмиды и одноцепочечной матрицы ssDNA в клетки линии человека НЕК-293 была использована химическая трансфекция с помощью агента Lipofectamine 3000 (Invitrogen). Для подтверждения направленной репарации двухцепочечного разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации в трансфицированных клетках через 72 ч после трансфекции была проведена ПЦР-амплификация геномной ДНК с ген-специфическими праймерами (*IRBIT_For* и *IRBIT_Rev*), фланкирующими предположительный сайт мутации. Амплифицированный фрагмент ожидаемого размера 645 п.н. был подвергнут гидролизу эндонуклеазой Xho I. Сайт рестрикции XhoI должен появиться в целевом участке гена *IRBIT* в тех клетках, в которые (1) были доставлены и плаزمиды, и донорная матрица; (2) CRISPR/Cas9—10A системой была нанесена пара одноцепочечных разрывов в локусе целевого гена; (3) разрывы были репарированы по механизму гомологической рекомбинации с участием экзогенной донорной матрицы ssDNA. Наличие двух фрагментов размерами 358 и 287 п.н. (рис. 4) после рестрикции подтверждает направленную репарацию двухцепочечного разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации во фракции трансфицированных клеток и свидетельствует об эффективности работы никазы Cas9-D10A.

При секвенировании клонотек, полученных при клонировании целевого участка 645 п.н., в клетках были выявлены разные типы мутаций, возникшие как результат репарационных процессов по механизму гомологичного и негомологического соединения концов. Из 10 образцов клонотек два варианта относились к результатам гомологичной рекомбинации, восемь мутаций (как делеции, так и инсерции) возникли в процессе негомологичной рекомбинации.

Анализ индивидуальных клеточных моноклонов с нокаутом гена *IRBIT*. После подтверждения редактирующей способности конструкции pAIO/*IRBIT* с использованием донорной матрицы ssDNA на популяции клеток, была проведена повторная трансфекция. Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции с помощью сортера клеток FACS Aria SORP (BD Biosciences).

При использовании системы CRISPR/Cas9 и ее производных большинство мутаций возникают в сайтах двунитевых разрывов вблизи протоспейсеров. Для отбора моноклонов с мутациями мы использовали ПЦР с различными комбинациями праймеров, в том числе лежащих в области протоспейсеров: ПЦР1 — праймер 1 (*IRBIT_For*) и 4 (*asF*); ПЦР2 — праймер 1 (*IRBIT_For*) и 6 (*sR*); ПЦР3 — праймер 5 (*asR*) и 2 (*IRBIT_Rev*); ПЦР4 — праймер 3 (*sF*) и 2 (*IRBIT_Rev*); ПЦР5 — праймер 3 (*asR*) и 6 (*sR*) (рис. 5а, 5б). В немодифицированном целевом локусе все варианты комбинаций будут обеспечивать синтез ПЦР-продуктов (рис. 5в). В клонах с мутациями при использовании комбинаций с внутренними праймерами, которые могли отжигаться и на верхнюю, и на нижнюю цепь ДНК в участке редактирования ПЦР-продукты, соответствующие дикому типу, будут отсутствовать. Этот метод гораздо более точно отражает произошедшие события в месте внесенного двухцепочечного разрыва, и позволяет отслеживать внесение мутаций в областях двух разных протоспейсерных мотивов. Данный метод прост в исполнении и не требует затрат на дорогостоящие ферменты, по сравнению с другими методами оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas9. Таким образом, данные праймеры могут амплифицировать только аллели дикого

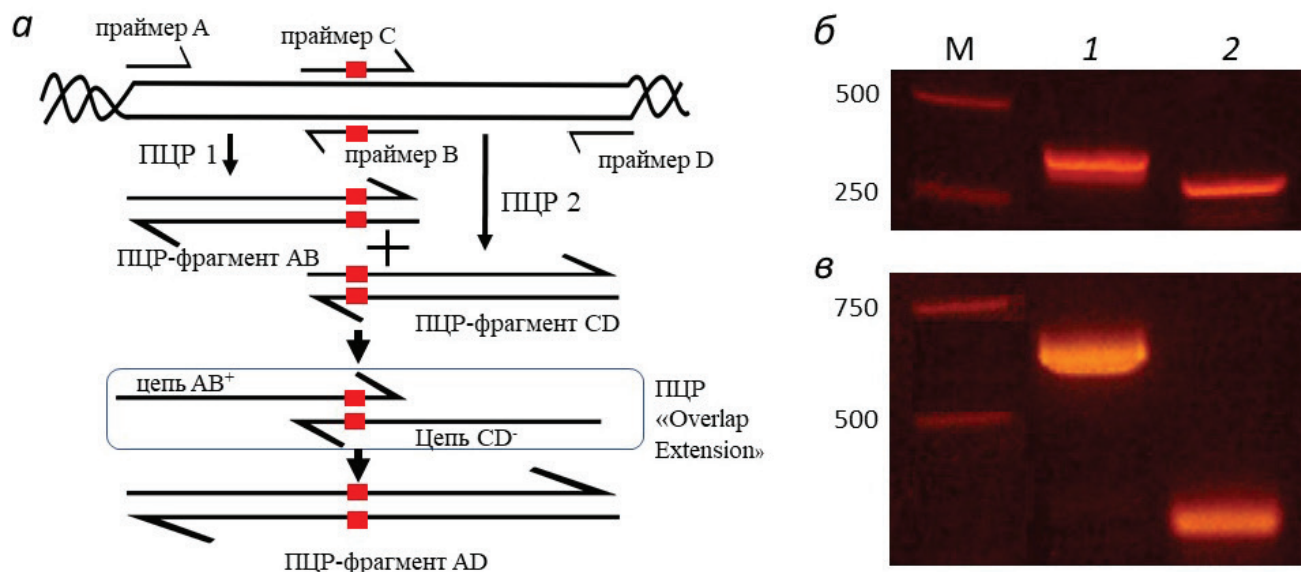


Рис. 3. *а* — Схема синтеза двухцепочечной матрицы с мутациями. *б* — Электрофорез амплифицированных мега-праймеров АВ (дорожка 1) и CD (дорожка 2). *в* — Электрофорез синтезированной двухцепочечной dsDNA (640 п.н.) с точечной мутацией (AD) и одноцепочечной матрицы донорной ssDNA того же нуклеотидного состава (отличается от двухцепочечной по скорости миграции и интенсивности окраски бромистым этидием).

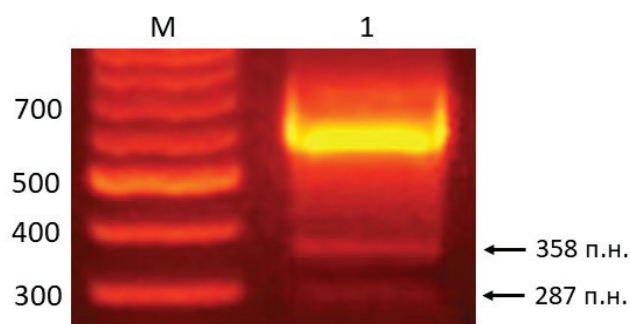


Рис. 4. Рестрикционный анализ участка локуса *IRBIT* (645 п.н.), амплифицированного с геномной ДНК, выделенной из клеток, трансфицированных компонентами системы CRISPR/Cas9–10A-ssDNA-донор через 72 ч после трансфекции.

типа, но не мутантные аллели, и возникающая мутация в области 3'-конца праймеров нарушит амплификацию соответствующих фрагментов.

По отсутствию накопления продуктов с разной комбинацией праймеров, затрагивающих редактируемую область, отбирали моноклоны, в которых редактируемый участок не амплифицировался и, следовательно, несет мутации, затрагивающие области на 3'-конце праймеров. На рис. 5*в* представлены результаты амплификации пяти комбинаций праймеров на геномной ДНК из восьми моноклонов. Из них моноклоны 4, 5, 6,

7 атрибутированы как клетки дикого типа, в 1-м и 3-м на наличие мутации указывает отсутствие ожидаемого продукта амплификации в комбинациях «ПЦР2» и «ПЦР5», «ПЦР4» и «ПЦР5» соответственно. В моноклоне 2 ПЦР-фрагмент с комбинацией праймеров № 2 мигрирует быстрее, чем в диком типе, и на наличие мутации указывает отсутствие нужного фрагмента в комбинации с праймерами № 5, как и в 8-м моноклоне.

Из двух моноклонов (1 и 3) были созданы клонотекы фрагментов геномной ДНК. Поскольку мутации на двух аллелях целевого гена могут носить различный характер, то с тотальной геномной ДНК клеточного моноклона будут амплифицироваться ПЦР-фрагменты различных последовательностей. Таким образом, в составе вектора мы получаем клонотеку фрагментов, последовательности которых соответствуют редактируемому участку обеих аллелей. Для клеточных моноклонов, с наиболее вероятными биаллельными мутациями, отобранных по результатам ПЦР с разными комбинациями праймеров (рис. 5*с*), были проанализированы результаты секвенирования 10 плазмидных образцов клонотек. После секвенирования был отобран моноклон (№ 1) с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания гена *IRBIT* (табл. 2). На одной аллели обнаружена делеция 38 п.н., приводящая к образованию стоп-кодона после 105-й аминокислоты. В другой аллели имеется делеция 43 п.н., приводящая

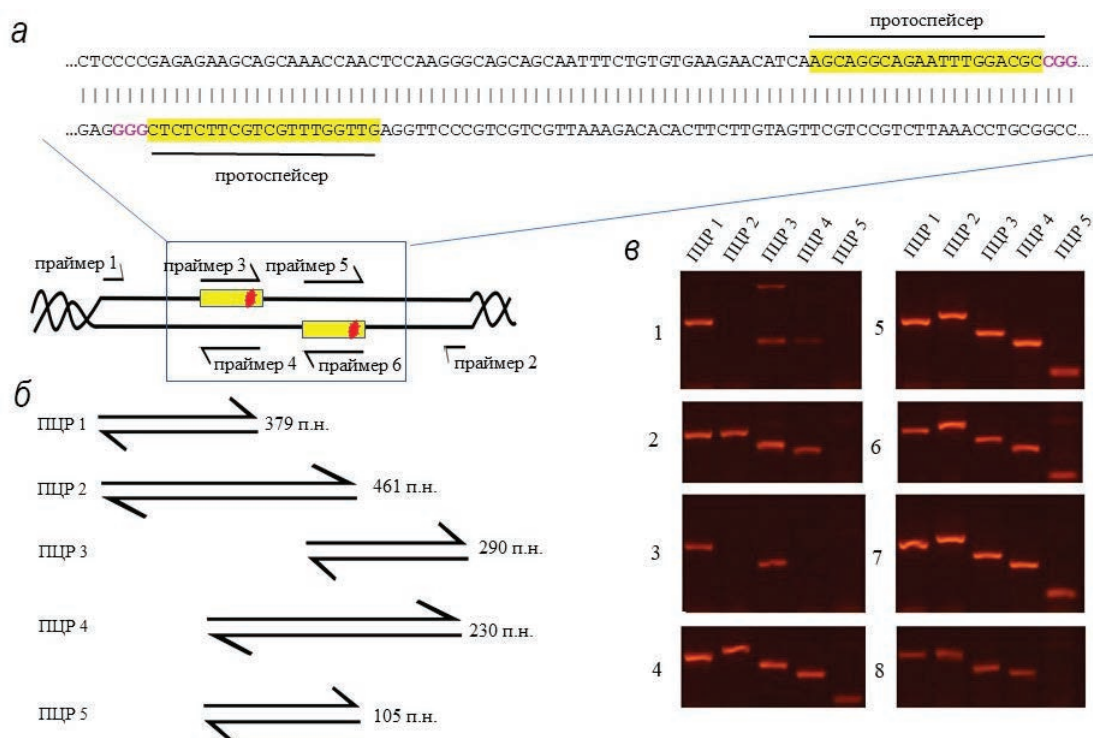


Рис. 5. *а* — Локализация протоспейсеров (подчеркнуты) на смысловой и антисмысловой нитях ДНК 2-го экзона гена *IRBIT* человека (NC_000001.11) и схема их расположения. *б* — Схема раундов амплификаций для проверки полученных мутаций в редактируемой области. *в* — Электрофорез восьми репрезентативных клонов, полученных после трансфекции.

к смещению открытой рамки считывания после 90-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 115-й аминокислоты. Таким образом, полученная клеточная линия НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT имеет по гену *IRBIT* биаллельные мутации, инактивирующие трансляцию этого белка.

Физиологические эксперименты

Далее проводился сравнительный функциональный анализ клеток НЕК-IP₃R1 и клеток НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT с использованием микрофотометрии (Ca²⁺ imaging) и Ca²⁺-зонда Fluo-4. В типичном эксперименте в фотометрической камере находилась популяция 100–120 клеток, содержащих Fluo-4, и для каждой клетки осуществлялся мониторинг Fluo-4-индуцированной флуоресценции. Как было показано ранее, ACh способен инициировать Ca²⁺-сигнализацию в большинстве (80–90%) клеток НЕК-293, стимулируя мускариновые рецепторы, сопряженные G-белками с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией депонированного Ca²⁺ [15]. Примечательной особенностью ответов клеток НЕК-293 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. Это свойство родительских клеток сохранялось и в клетках НЕК-IP₃R1 и НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT (рис. 6а, верхняя кривая). Такой характер («все-или-ничего») Ca²⁺-сигналов, инициированных ACh, не позволял характеризовать дозозависимость ответов индивидуальных клеток. Поэтому мы характеризовали дозозависимость клеточных ответов, используя популяционный параметр — фракцию клеток в данной популяции, способных генерировать Ca²⁺-ответ на ACh при данной дозе. Клетки стимулировались ACh в диапазоне концентраций от 250 нМ до 5 мкМ.

В общей сложности были проанализированы четыре клеточные популяции линии НЕК-IP₃R1 и изучены Ca²⁺-ответы 376 клеток. Для каждой популяции определялась фракция клеток, способных отвечать на агонист, концентрация которого варьировалась, и затем определялась средняя величина и стандартное отклонение по четырем популяциям. Соответствующая усредненная дозозависимость представлена на рис. 6б (синие кружочки). С клетками НЕК-IP₃R1/ Δ IRBIT проведены аналогичные эксперименты, в которых были изучены 255

клеток в трех популяциях. Полученная для этих клеток дозозависимость представлена красными кружочками на рис. 6б.

Экспериментальные зависимости аппроксимировались уравнением Хилла:

$$F(C) = F_0 \frac{C^n}{C_{0.5}^n + C^n},$$

где $F(C)$ — фракция клеток, чувствительных к ACh при концентрации C , F_0 — максимальная фракция ACh-чувствительных клеток, $C_{0.5}$ — концентрация полуэффекта (EC_{50}), n — коэффициент Хилла. На основе данной аппроксимации (рис. 6б, непрерывные кривые) для клеток HEK-IP₃R1 и HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT были оценены величины F_0 и EC_{50} дозы ACh как равные 76 и 61% и 0.56 и 0.75 мкМ, соответственно. Таким образом, клетки HEK-IP₃R1 оказались более чувствительными к ACh, чем клетки HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT.

ОБСУЖДЕНИЕ

Редактирование клеточного генома с использованием технологии CRISPR/Cas9 позволяет манипулировать рецепторными, сигнальными и эффекторными белками и, следовательно, является эффективным инструментом для анализа их индивидуального вклада во внутриклеточные сигнальные процессы. Эта технология основывается на способности эндонуклеазы Cas9 и ее модификаций направленно вносить двухцепочечные разрывы в геномный локус, комплементарный короткой последовательности РНК-гида [16]. В настоящей работе этот подход использовался для инактивации гена регуляторного белка IRBIT.

Активность IP₃-рецепторов, которые играют ключевую роль в агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках практически всех фенотипов, контролируется множественными механизмами в зависимости от внутриклеточного контекста и с определенной специфичностью по отношению к IP₃R1-, IP₃R2- и IP₃R3-изоформам [8, 9, 17]. Идентифицирован ряд малых регуляторных молекул, включая АТФ [18], сАМР [19], NADH [20]. Активность IP₃-рецепторов регулируется фосфорилированием/дефосфорилированием [9, 18, 21] и за счет белок-белкового взаимодействия, в частности, с кальмодулином и другими Ca²⁺-связывающими белками [18, 22] и с белками IRBIT и IRAG [3, 7, 23].

IRBIT был открыт как новый IP₃-рецептор-связывающий белок [7], который подавлял активность IP₃R1, конкурируя за связывание с IP₃ [24]. Фосфорилирование IRBIT по нескольким

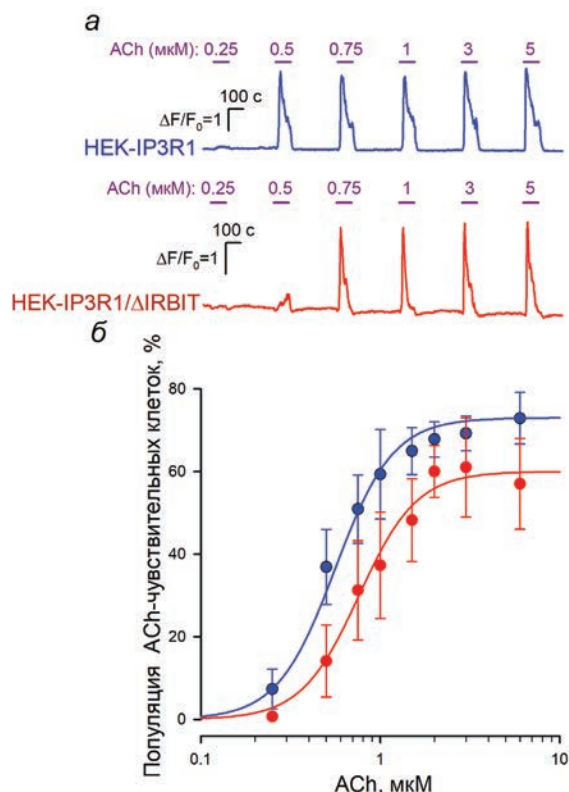


Рис. 6. Ca²⁺-ответы клеток на ACh. *a* — Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ в клетках HEK-IP₃R1 (верхняя панель) ($n = 366$) и HEK-IP₃R1/ Δ IRBIT (нижняя панель) ($n = 255$), загруженных Fluo-4. Моменты и продолжительность аппликаций ACh в указанных дозах обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальных кривых. Изменение внутриклеточного Ca²⁺ оценивали по относительно изменению флуоресценцию Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F — текущая интенсивность флуоресценции, F_0 — средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации. *б* — Количество клеток в каждой из линий, генерирующих Ca²⁺-ответы на ACh при различных дозах агониста.

сайтам увеличивало аффинность его связывания с IP₃R1 [24], которое также обеспечивалось наличием двух мотивов PEST и PDZ, детерминирующих белок-белковое узнавание [25]. Наличие PEST- и PDZ-доменов предполагало, что IRBIT может быть новой сигнальной молекулой, регулирующей не только IP₃-рецептор, но и другие внутриклеточные мишени. В дальнейшем таковые были действительно идентифицированы. Так, было показано, что IRBIT потенцирует активность Na⁺/HCO₃[−] котранспортера рNBC1 [26], формирует сигнальный комплекс с фосфатидилинозитол-фосфат-киназой (phosphatidylinositol phosphate kinases)

[27] и ингибирует Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу [28].

В настоящей работе были получены две моноклональные линии с единственной функциональной изоформой $\text{IP}_3\text{R1}$, в которых ген белка IRBIT был активен ($\text{HEK-IP}_3\text{R1}$) и инактивирован ($\text{HEK-IP}_3\text{R1/IRBIT}$). Поскольку IRBIT — конкурент за связывание IP_3 с $\text{IP}_3\text{R1}$, ожидалось, что в отсутствие IRBIT $\text{IP}_3\text{R1}$ должен быть более чувствителен к IP_3 . Как следствие, можно было бы ожидать, что клетки $\text{HEK-IP}_3\text{R1}$ должны быть менее чувствительны к ACh , чем клетки $\text{HEK-IP}_3\text{R1/IRBIT}$. Между тем, эксперименты показали противоположный результат (рис. 6). Хотя в настоящий момент у нас нет верифицированного объяснения этого факта, возможно, что в клетках HEK-293 имеет место бимодальная регуляция $\text{IP}_3\text{R1}$ при участии IRBIT : помимо ингибиторного пути, основанного на подавлении связывания IP_3 , имеется IRBIT -зависимая регуляция $\text{IP}_3\text{R1}$, которая потенцирует его активность. Проверка этой идеи требует дополнительных исследований.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток на приборе FACSaria SORP (BD Biosciences) (поддержано Программой развития МГУ) и сотрудника Сектора Спектральных и теплофизических методов исследований биополимеров (ИБП РАН) А.А. Софина за помощь в проведении работ по сортировке клеток на приборе MoFlo XDP (Beckman Coulter).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22–14–00031.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Clapham D. 2007. Calcium signaling. *Cell*. **131**, 1047–1058.
- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
- Lemmon M.A., Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **141**, 1117–1134.
- 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.
- Mikoshiba, K. 2015. Role of IP_3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 217–227.
- Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of IP_3 Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a035063.
- Ando H., Mizutani A., Matsuura T., Mikoshiba K. 2003. IRBIT , a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor-binding protein, is released from the IP_3 receptor upon IP_3 binding to the receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 10602–10612.
- Foscett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol. Rev.* **87**, 593–658.
- Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP_3 receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
- Lock J.T., Alzayady K.J., Yule D.I., Parker I. 2018. All three IP_3 receptor isoforms generate Ca^{2+} puffs that display similar characteristics. *Sci. Signal.* **11**, eaau0344.
- Копылова Е.Е., Воронова Е.А., Кабанова Н.В., Рогачевская О.А., Быстрова М.Ф., Колесников С.С. 2023. Клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP_3 рецептора. *Биол. мембраны*. **40**, 43–54.
- 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.
- Ломов Н.А., Вьюшков В.С., Петренко А.П., Сыркина М.С., Рубцов М.А. 2019. Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании. *Мол. Биология*. **53**, 982–997.
- Спасская Д.С., Давлетшин А.И., Тютяева В.В., Кулагин К.А., Гарбуз Д.Г., Карпов Д.С. 2022. Создание тест-системы для оценки активности мутантных вариантов SpCas9 в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. *Мол. биология*. **56**, 937–948.
- Быстрова М.Ф., Рогачевская О.А., Кочкина Е.Н., Коваленко Н.П., Колесников С.С. 2020. IP_3 рецептор второго типа является доминантной изоформой в клетках HEK-293 . *Биол. мембраны*. **37**, 434–441.
- Jiang F., Doudna J.A. 2017. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
- Parys, J.B., Vervliet T. 2020. New insights in the IP_3 receptor and its regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1131**, 243–270.
- Wagner L.E. II, Yule D.I. 2012. Differential regulation of the InsP_3 receptor type-1 and -2 single channel properties by InsP_3 , Ca^{2+} and ATP. *J. Physiol.* **590**, 3245–3259.
- Taylor C.W. 2017. Regulation of IP_3 receptors by cyclic AMP. *Cell Calcium*. **63**, 48–52.
- Kaplin A.I., Snyder S.H., Linden D.J. 1996. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-selective stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediates hypoxic mobilization of calcium. *J. Neurosci.* **16**, 2002–2011.
- Vanderheyden V., Devogelaere B., Missiaen L., De Smedt H., Bultynck G., Parys J.B. 2009. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-induced Ca^{2+} release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1793**, 959–970.

22. Taylor C.W., Laude A.J. 2002. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*. **32**, 321–334.
23. Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong X., Huber A., Neubauer G., Wang G. X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., Hofmann F., Ruth P. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase. *Nature*. **404**, 197–201.
24. Ando H., Mizutani A., Kiefer H., Tsuzurugi D., Michikawa T., Mikoshiba K. 2006. IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor. *Mol. Cell*. **22**, 795–806.
25. Devogelaere B., Nadif Kasri N., Derua R., Waelkens E., Callewaert G., Missiaen L., Parys J.B., De Smedt H. 2006. Binding of IRBIT to the IP₃ receptor: Determinants and functional effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 49–56.
26. Shirakabe K., Priori G., Yamada H., Ando H., Horita S., Fujita T., Fujimoto I., Mizutani A., Seki G., Mikoshiba K. 2006. IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃[–] cotransporter 1 (pNBC1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 9542–9547.
27. Ando H., Hirose M., Gainche L., Kawaai K., Bonneau B., Ijuin T., Itoh T., Takenawa T., Mikoshiba K. 2015. IRBIT interacts with the catalytic core of phosphatidylinositol phosphate kinase type Iα and IIα through conserved catalytic aspartate residues. *PLoS One*. **10**, e0141569.
28. Kawaai K., Mizutani A., Shoji H., Ogawa N., Ebisui E., Kuroda Y., Wakana S., Miyakawa T., Hisatsune C., Mikoshiba K. 2015. IRBIT regulates CaMKII alpha activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 5515–5520.

Cellular Model for the Analysis of IRBIT-Dependent Regulation of the Type 1 IP₃ Receptor

© 2024 г. E. E. Kopylova¹, I. S. Masulis¹*, O. A. Rogachevskaja¹, E. N. Kochkina¹,
Y. A. Kovalitskaya¹, M. F. Bystrova¹, S. S. Kolesnikov¹

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

*e-mail: irina.masulis@gmail.com

In vertebrate genomes, three genes encode subunits of IP₃ receptors, including IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3. Despite high homology between different subunits, homotetrameric IP₃ receptors formed by IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3 in the endoplasmic reticulum membrane are markedly distinct by their functional features and regulatory mechanisms. It was particularly reported that IP₃R1 is specifically regulated by the IP₃R binding protein released with IP₃ (IRBIT), which competes with IP₃ for binding to IP₃R1. In turn, affinity of IRBIT/IP₃R1 binding is regulated by phosphorylation of IRBIT. By using the CRISPR/Cas9 approach to edit the genome of HEK-293 cells, two monoclonal cell lines were generated as a platform for uncovering a role of IRBIT and associated regulatory circuits in control of the IP₃R1 activity. In one line, HEK-IP₃R1, IP₃R2, and IP₃R3 genes were disrupted, while IP₃R1 was remained functional. Based on this line, the HEK-IP₃R1/ΔIRBIT line was generated, wherein IRBIT (AHCYL1) gene was inactivated. The comparative analysis of ACh-induced Ca²⁺ signaling in cells of both lines was performed by employing the Ca²⁺ dye Fluo-4 and Ca²⁺ imaging. It was particularly shown that ACh mobilized Ca²⁺ in cells of both lines, which responded to the agonist at widely varied doses in an “all-or-nothing” manner. Yet, HEK-IP₃R1/ΔIRBIT cells turned out to be less sensitive to ACh compared to HEK-IP₃R1 cells.

Keywords: CRISPR/Cas9, IP₃ receptor, IRBIT, intracellular Ca²⁺ signaling, HEK-293 cells