

УДК 577.352.465

Влияние ионов кальция на электрофизиологические свойства одиночных каналов ANO6

Д. О. Колесников, Е. Р. Григорьева, М. А. Номеровская, Д. С. Решетин, А. В. Шалыгин*, Е. В. Казначеева**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: shalygin.alexey@gmail.com

**E-mail: evkazn@incras.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023

Принята к печати 12.12.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.27338

РЕФЕРАТ Белки семейства аноктаминов (ANO) формируют кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC). Наиболее необычный представитель этого семейства – ANO6 (TMEM16F) – совмещает в себе функции кальций-зависимой скрамблазы и ионного канала. ANO6 влияет на динамику плазматической мембраны, перенос фосфатидилсерина и участвует в программируемой клеточной гибели. Свойства каналов ANO6 остаются предметом дискуссии. В настоящей работе, регистрируя одиночные каналы ANO6, мы изучили влияние изменений внутриклеточной и наружной концентрации ионов кальция на электрофизиологические свойства эндогенных каналов ANO6. Показано, что (1) высокая концентрация ионов кальция во внеклеточном растворе увеличивает активность эндогенных каналов ANO6; (2) проницаемость эндогенных каналов ANO6 по отношению к хлорид-ионам не зависит от внеклеточной концентрации ионов кальция; (3) увеличение внутриклеточной концентрации кальция приводит к активации эндогенных каналов ANO6 с двойной амплитудой; (4) кинетика работы канала зависит от потенциала плазматической мембраны, но не от внутриклеточной концентрации ионов кальция. Полученные нами данные дают возможность предложить новые механизмы регуляции активности каналов ANO6 ионами кальция как с внутренней, так и с наружной стороны мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ANO6, TMEM16F, кальций-зависимые хлорные каналы, метод локальной фиксации потенциала, регистрация токов через одиночные каналы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CaCC – кальций-зависимые хлорные каналы; ANO – аноктамины; $[Ca^{2+}]_i$ – расчетная внутриклеточная концентрация свободных ионов кальция.

ВВЕДЕНИЕ

Кальций-зависимые хлорные каналы участвуют в регуляции критических внутриклеточных процессов, связанных с транспортом хлорид-ионов и динамикой плазматической мембраны.

Одна из изоформ аноктаминов – ANO6 (TMEM16F), совмещает функции скрамблазы и ионного канала. Нарушения функции ANO6 приводят к патологиям формирования скелета, плаценты и невынашиваемости беременности, онкологическим заболеваниям, кровотечениям [1–4]. Снижение активности ANO6 является эффективным подходом к лечению воспалительных заболеваний дыхательных путей [5, 6].

Большинство исследований функций канала выполнено при сверхэкспрессии ANO6, которая приводит к значительному изменению состояния

мембраны клетки, что влияет на свойства канала. Кроме того, такие электрофизиологические свойства, как время жизни открытого состояния канала, его одиночная амплитуда и проводимость, можно корректно оценить, только регистрируя ток через одиночные ионные каналы. Отсутствие этих данных мешает пониманию принципов функционирования ионного канала.

Канал ANO6, являясь кальций-зависимым ($EC_{50} = 10$ мкМ при +40 мВ), не только регулируется внутриклеточными ионами кальция, но и сам способен проводить ионы Ca^{2+} [4]. Так, в одних исследованиях выявлена анионная проводимость, тогда как в других показана катионная проводимость канала [4, 7]. Данных о влиянии наружного кальция на электрофизиологические свойства эндогенных каналов ANO6 крайне мало. Так же не ясно, как из-

менение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) или потенциала влияет на кинетику и подсостояния одиночных эндогенных каналов ANO6.

Данная работа направлена на определение зависимости электрофизиологических свойств одиночных эндогенных каналов ANO6 от двух основных модуляторов активности: концентрации кальция и потенциала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточная культура

Работа выполнена на клетках линии НЕК293Т из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали на жидкой модифицированной Иглос среде Дульбекко (DMEM) («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 1% пенициллина, 1% стрептомицина и 1% L-глутамина. Клетки пересеивали на фрагменты покровных стекол за 16–48 ч до проведения опытов.

Реактивы

Используемые в электрофизиологических экспериментах реактивы были получены от фирмы Sigma Aldrich (США).

Электрофизиологические измерения токов

Токи через одиночные каналы регистрировали методом локальной фиксации потенциала в конфигурации inside-out с использованием усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Оцифровку данных осуществляли АЦП-ЦАП Digidata 1322A (Axon Instruments) с частотой дискретизации 5 кГц. Сигнал пропускали через встроенный в усилитель низкочастотный фильтр Бесселя 2 кГц. Для анализа амплитуды, вероятности открытого состояния и презентации данных записи дополнительно фильтровали при 110 Гц. При анализе времени открытого состояния каналов дополнительную фильтрацию не применяли, события короче 0.5 мс не учитывали.

Состав внеклеточного раствора (раствор регистрирующей пипетки):

- 1) 105 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4;
- 2) 1.5 мМ $CaCl_2$, 126 мМ NaCl, 10 мМ TeacCl, 10 мМ глюкозы, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4;
- 3) 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA-Na, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4.

Расчет свободной концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$ проводили в программе Max Chelator (Stanford University, США). Внутриклеточный раствор с расчетным содержанием свободных ио-

нов кальция 100 нМ $[Ca^{2+}]_i$ содержал: 130 мМ CsGlutamate, 3.3 мМ $CaCl_2$, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ MgATP, 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES. pH 7.2.

Для получения растворов с расчетным содержанием свободных ионов кальция 0.2, 1, 10 мкМ к исходному раствору был добавлен $CaCl_2$ в концентрациях 5, 8.5, 9.82 мМ соответственно. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Сопrotивление стеклянных микропипеток составляло 7–15 МОм.

Для количественной оценки активности каналов использовали величину (NP_o), где N – число каналов, а P_o – вероятность открытого состояния канала. $NP_o = (I)/i$, где (I) – среднее значение тока через фрагмент мембраны, i – амплитуда тока открытого канала. Поскольку активность каналов значительно менялась во времени, для анализа использовали среднее значение $NP_{o\max_{30}}$, т.е. среднее NP_o , измеренное в течение 30-секундного интервала, когда активность каналов была максимальна.

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали в программе OriginPro2018 (Originlab, США) и Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США). Данные проверяли на нормальность с использованием теста Шапиро–Уилка, на равенство дисперсий – теста Левена. Выбросы, при их наличии, были убраны тестом Граббса. Для сравнения встречаемости использовали точный критерий Фишера. Для сравнения вероятности открытого состояния для независимых данных использовали тест Стьюдента, для связанных данных – парный тест Стьюдента. Для множественного сравнения использовали дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение активности эндогенных CaCC ANO6 при повышении внеклеточной концентрации кальция

Ранее мы зарегистрировали и описали одиночные каналы CaCC, которые образованы белками ANO6 [8, 9]. Для изучения влияния внеклеточной концентрации кальция на ANO6 использовали внешний раствор, содержащий 105 мМ Ca^{2+} или 1.5 мМ Ca^{2+} . Опыты проводили в конфигурации inside-out, при фиксированном потенциале на мембране +40 мВ. Активацию эндогенных CaCC ANO6 вызывали добавлением раствора 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ к внутриклеточной стороне мембраны (рис. 1А,Б). В присутствии физиологической концентрации 1.5 мМ

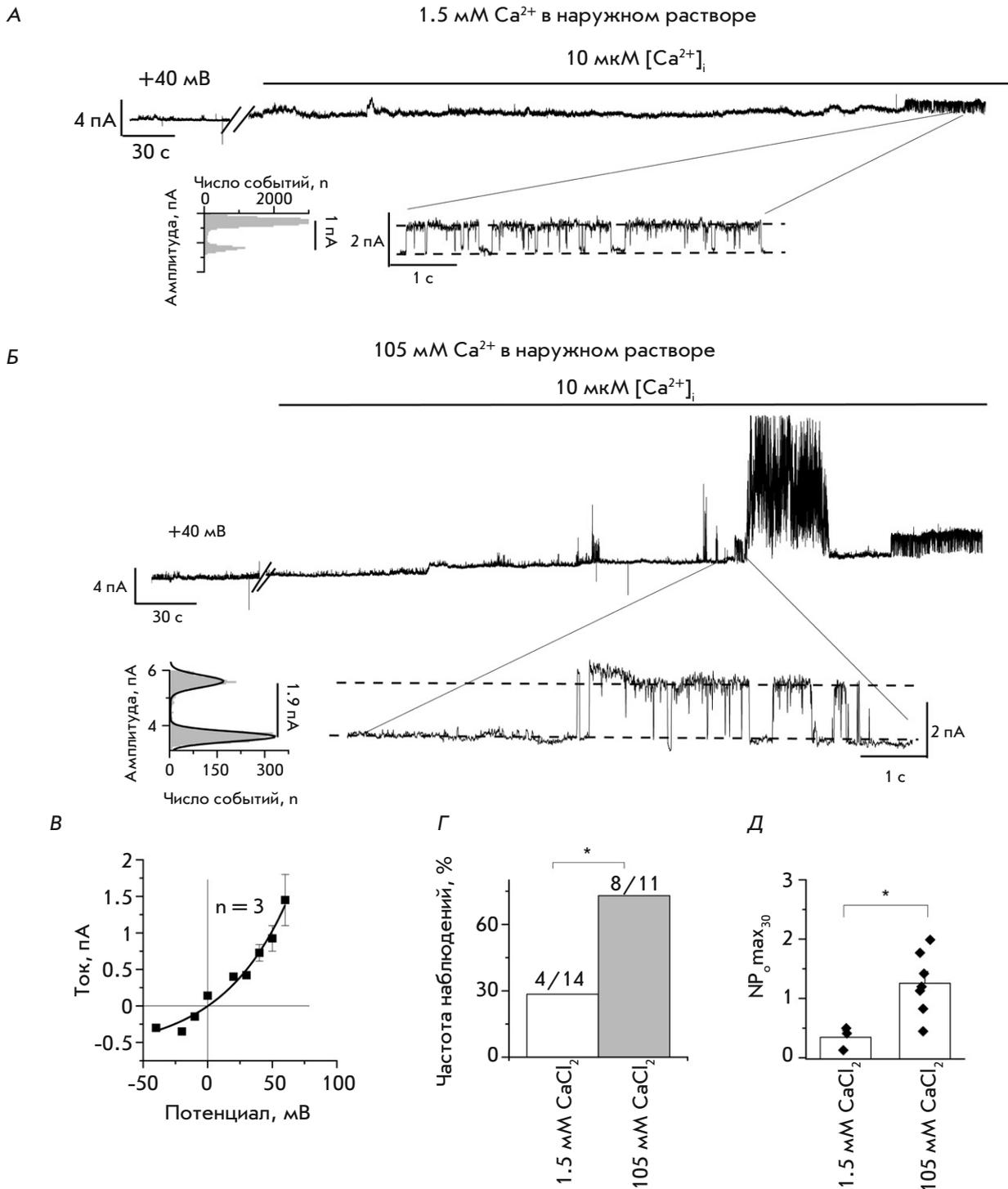


Рис. 1. Активность эндогенных CaCC ANO6, вызванная приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i к внутриклеточной стороне плазматической мембраны, в конфигурации inside-out в присутствии 1.5 или 105 мМ Ca²⁺ во внеклеточном растворе. Расширенные фрагменты выписок и амплитудные гистограммы указаны под выписками тока. **А** – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC ANO6, активированные приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при 1.5 мМ Ca²⁺ снаружи. **Б** – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC ANO6, активированные приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при 105 мМ Ca²⁺ снаружи. **В** – вольт-амперные характеристики эндогенных CaCC ANO6 в присутствии 1.5 мМ Ca²⁺ во внешнем растворе. **Г** – частота наблюдений опытов с эндогенными CaCC ANO6, активированных приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при 1.5 или 105 мМ Ca²⁺ снаружи ($p < 0.05$). **Д** – NP_o max₃₀ эндогенных CaCC ANO6, активированных приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i при наружных растворах 1.5 и 105 мМ Ca²⁺ ($p < 0.05$)

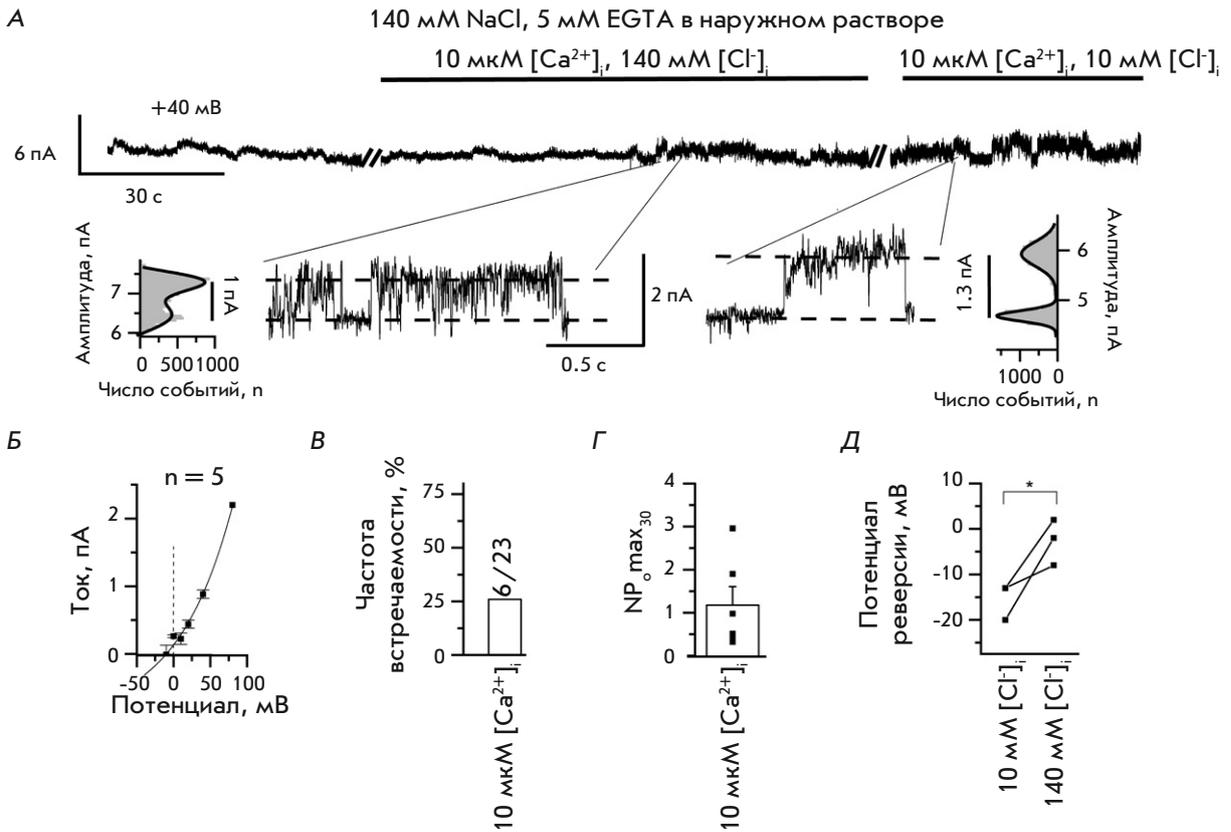


Рис. 2. Активность эндогенных CaCC ANO6 при отсутствии двухвалентных ионов в наружном растворе. А – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC ANO6 в наружном растворе, содержащем 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA. Расширенные фрагменты выписки и амплитудные гистограммы указаны под выпиской тока. Б – вольт-амперная характеристика эндогенных CaCC в наружном растворе, содержащем 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA и внутриклеточном растворе на основе CsGlutamate. В – встречаемость эндогенных CaCC ANO6 при 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA в наружном растворе. Г – вероятность открытого состояния эндогенных CaCC ANO6 при 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA в наружном растворе. Д – сдвиг потенциала реверсии эндогенных CaCC при замене внутриклеточного раствора CsGlutamate на CsCl при 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA в наружном растворе

CaCl₂ в наружном растворе активацию каналов наблюдали в 28.5% экспериментов (4/14) со средним значением NP₀max₃₀, равным 0.35 ± 0.11 (n = 3) (рис. 1А,В,Г,Д). В то же время в присутствии высокой концентрации кальция в наружном растворе – 105 мМ CaCl₂ – активацию каналов наблюдали достоверно чаще – в 73% экспериментов при NP₀max₃₀, равной 1.26 ± 0.2 (n = 7) (p < 0.05) (рис. 1Г,Д). Ранее нами было показано, что высокая концентрация ионов кальция в растворе пипетки не вызывает активацию эндогенных каналов ANO6 без дополнительной стимуляции внутриклеточными ионами Ca²⁺ [8]. Таким образом, увеличение активности каналов коррелирует с увеличением концентрации внеклеточного Ca²⁺.

Известно, что эндогенные каналы ANO6 не только активируются ионами кальция, но и проводят их [4]. Можно предположить, что при повышенной вну-

триклеточной концентрации кальция ионы кальция проникают через пору эндогенного канала ANO6, что может приводить к режиму самоподдержания активности и дальнейшему потенцированию работы каналов.

Таким образом, нами показано, что повышение концентрации ионов кальция в наружном растворе увеличивает как вероятность открытого состояния, так и встречаемость эндогенных CaCC ANO6 в клетках HEK293Т.

Внеклеточная концентрация кальция не влияет на анионную проводимость каналов

Данные об анионной проводимости каналов ANO6 противоречивы. В одних работах этот канал описан как анион-проводящий [7], в других – как катион-проводящий [4]. Проницаемость канала к хлорид-ионам зависит от [Ca²⁺]_i [10]. Показано, что при низ-

кой $[Ca^{2+}]_i$ канал будет проводить преимущественно катионы вместо анионов. Влияние наружного кальция на анионную проницаемость остается малопроявленным.

Для изучения этого вопроса мы убрали все свободные ионы кальция из внеклеточного раствора, используя хелатор EGTA. Активацию CaCC вызывали добавлением 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ с внутренней стороны мембраны (рис. 2А). В экспериментах мы наблюдали активацию эндогенных CaCC ANO6 (рис. 2Б).

В присутствии 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA во внеклеточном растворе эндогенные CaCC ANO6 встречались в 26% опытов (6/23), с вероятностью открытого состояния 1.17 ± 0.43 ($n = 6$). Активность каналов в наружном растворе 140 мМ NaCl, 5 мМ EGTA статистически не отличалась от активности каналов при физиологичной концентрации кальция (1.5 мМ Ca^{2+}) (рис. 1Д, рис. 2Г) ($p > 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что физиологическая концентрация кальция в наружном растворе сама по себе не потенцирует активность эндогенных CaCC ANO6 в клетках HEK293Т.

Оценить изменение проницаемости канала по отношению к хлорид-ионам можно по изменению потенциала реверсии при изменении концентрации Cl⁻ во внутриклеточном растворе. Для этого в опытах с бескальциевым внешним раствором мы меняли внутриклеточный раствор с 130 CsGlutamate (10 мМ [Cl⁻]) на раствор с 130 CsCl (140 мМ [Cl⁻]). Потенциал реверсии при замене внутриклеточного раствора с 10 мМ [Cl⁻] на 140 мМ [Cl⁻] смещался вправо на 12.7 ± 3.9 мВ ($n = 3$) (рис. 2Д). Ранее нами было показано, что в присутствии 105 мМ CaCl₂ во внеклеточном растворе потенциал реверсии сдвигается на 16 ± 2 мВ вправо при аналогичной смене внутриклеточного раствора [8]. Таким образом, сдвиг потенциала реверсии был статистически неразличим при использовании наружных растворов, содержащих и не содержащих ионы кальция (рис. 2Д) [8].

Таким образом, ионы Ca^{2+} в наружном растворе не влияют на проницаемость эндогенных каналов ANO6 для хлорид-ионов.

Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ ведет к преимущественной активации эндогенных каналов ANO6 с двойной амплитудой

Известно, что каналы семейства аноктаминов являются гомодимерами. В состав каждой субъединицы входит проводящая пора. Внутри каждой поры есть два сайта связывания ионов кальция, которые отличаются по своей аффинности [11].

Показано, что при низкой $[Ca^{2+}]_i$, когда занят только один сайт связывания $[Ca^{2+}]_i$, две поры каналов ANO1 работают независимо друг от друга

[12]. При увеличении $[Ca^{2+}]_i$ оба сайта связывания ионов Ca^{2+} в поре оказываются заняты, что приводит к синхронной работе проводящих пор канала [12]. Тем не менее на настоящий момент неизвестно, обладает ли ANO6 таким же свойством.

Чтобы ответить на этот вопрос, мы регистрировали активность эндогенных каналов ANO6 во внутриклеточных растворах с низкой (1 мкМ) и высокой (10 мкМ) $[Ca^{2+}]_i$ в конфигурации inside-out при потенциале на мембране +40 мВ. Для увеличения частоты встречаемости CaCC ANO6 использовали раствор в пипетке с 105 мМ CaCl₂.

Мы обнаружили, что в присутствии 1 мкМ $[Ca^{2+}]_i$, как правило, активируются каналы с амплитудой 0.95 ± 0.06 пА ($n = 10/11$) (рис. 3А). При аппликации раствора с 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ мы наблюдали не только активацию каналов с похожей амплитудой – 1 ± 0.12 пА ($n = 3/7$), но и в 57% опытов активацию каналов с двойной амплитудой – 1.79 ± 0.14 пА ($n = 4/7$) (рис. 3Б). В растворе с 1 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ активацию каналов с двойной амплитудой мы наблюдали только в 9% экспериментов ($n = 1/11$) ($p < 0.05$) (рис. 3В,Г).

Таким образом, наши данные позволяют предположить, что при увеличении $[Ca^{2+}]_i$ две проводящие поры эндогенных CaCC ANO6 начинают проводить ток синхронно. Следовательно, мы можем предположить, что механизмы регуляции внутриклеточными ионами кальция CaCC ANO1 и ANO6 схожи.

Время жизни открытого состояния эндогенных CaCC ANO6 определяется потенциалом на мембране, но не $[Ca^{2+}]_i$

Известно, что ток через эндогенные CaCC ANO6 увеличивается с повышением внутриклеточной концентрации кальция и деполяризации мембраны [10]. Ранее мы показали, что это связано с увеличением вероятности открытого состояния каналов, их амплитуды и проводимости [8]. Однако увеличение тока может быть в том числе связано и с изменением времени открытого состояния канала.

Для изучения этого вопроса мы проанализировали зависимость времени жизни открытого состояния эндогенных каналов ANO6 от концентрации $[Ca^{2+}]_i$ с внутренней стороны мембраны при фиксированном потенциале на мембране +40 мВ.

При 0.2 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ время открытого состояния каналов составляло 1.07 ± 0.21 мс ($n = 5$), для 1 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ – 0.77 ± 0.14 мс ($n = 4$), для 10 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ – 1.18 ± 0.31 мс ($n = 4$), для 100 мкМ $[Ca^{2+}]_i$ – 1.07 ± 0.15 мс ($n = 4$) ($p > 0.05$) (рис. 4А). Таким образом, время открытого состояния каналов не зависело от изменения $[Ca^{2+}]_i$. Анализ зависимости времени открытого состояния эндогенных каналов

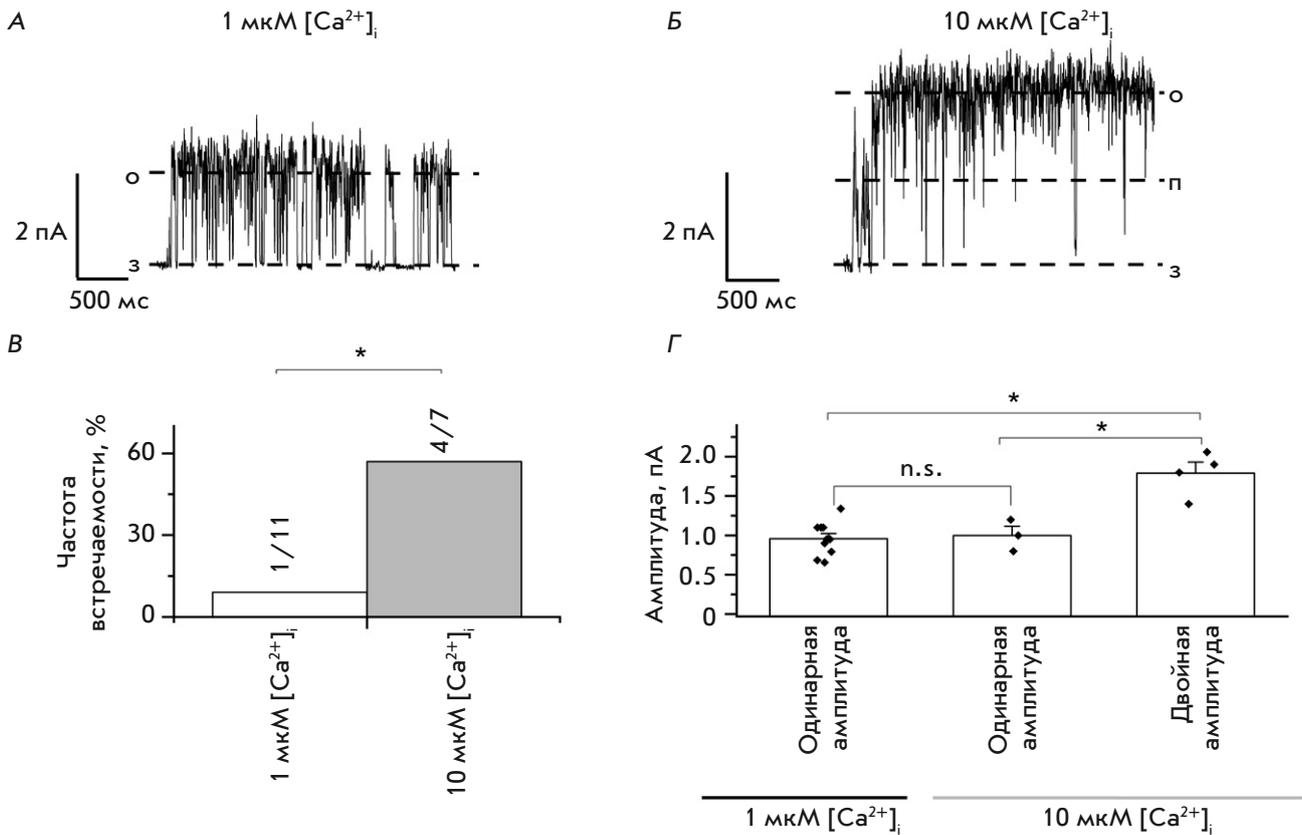


Рис. 3. Амплитуда эндогенных CaCC при 1 и 10 мкМ [Ca²⁺]_i. Внеклеточный раствор 105 мМ CaCl₂. Каналы активированы приложением растворов с 1 или 10 мкМ [Ca²⁺]_i. А – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC с одинарной амплитудой, активированные приложением 1 мкМ [Ca²⁺]_i; з – закрытое состояние канала, о – открытое состояние канала. Б – фрагмент выписки тока через эндогенные CaCC с двойной амплитудой, активированные приложением 10 мкМ [Ca²⁺]_i; з – закрытое состояние канала, о – открытое состояние канала, п – подсостояние. В – встречаемость эндогенных CaCC ANO6 с двойной амплитудой при их активации 1 мкМ [Ca²⁺]_i (белый) или 10 мкМ [Ca²⁺]_i (серый), *p* < 0.05. Г – амплитуда эндогенных каналов ANO6, активированных 1 или 10 мкМ [Ca²⁺]_i (*p* < 0.05)

ANO6 от потенциала на мембране при фиксированной внутриклеточной концентрации 100 мкМ [Ca²⁺]_i показал, что при деполяризации мембраны время открытого состояния CaCC увеличивается линейно с ростом потенциала (рис. 4Б).

Таким образом, увеличение тока через эндогенные CaCC при деполяризации мембраны связано не только с увеличением проводимости и вероятности открытого состояния каналов (описано нами ранее), но и с увеличением времени жизни открытого состояния эндогенных каналов ANO6. В то же время изменение [Ca²⁺]_i не приводит к изменению времени открытого состояния каналов.

Активность каналов ANO6 увеличивается после временной смены потенциала мембраны на отрицательный и обратно

Нами обнаружен эффект увеличения активности каналов ANO6 при потенциале +40 мВ после

кратковременного цикла изменения потенциала мембраны на отрицательный и обратно на +40 мВ. Ниже приведена схема опыта: каналы активировали добавлением 1 мкМ [Ca²⁺]_i к внутриклеточной стороне мембраны при потенциале +40 мВ, затем поддерживали отрицательный потенциал в течение 30 с и повторно подавали напряжение +40 мВ. Обратное переключение потенциала на +40 мВ приводило к увеличению активности, в среднем с 0.23 ± 0.06 до 0.81 ± 0.26 (*n* = 7, *p* < 0.05, рис. 5). При более высоких концентрациях кальция (10 или 100 мкМ) данный эффект не наблюдался, по-видимому, каналы были уже максимально индуцированы и поэтому дальнейшее увеличение активности не происходило.

Известно, что существует синергизм между увеличением внутриклеточной концентрации кальция и деполяризацией плазматической мембраны клеток в активации каналов ANO6. Так для сверхэкспрессированных каналов ANO6 деполяризация

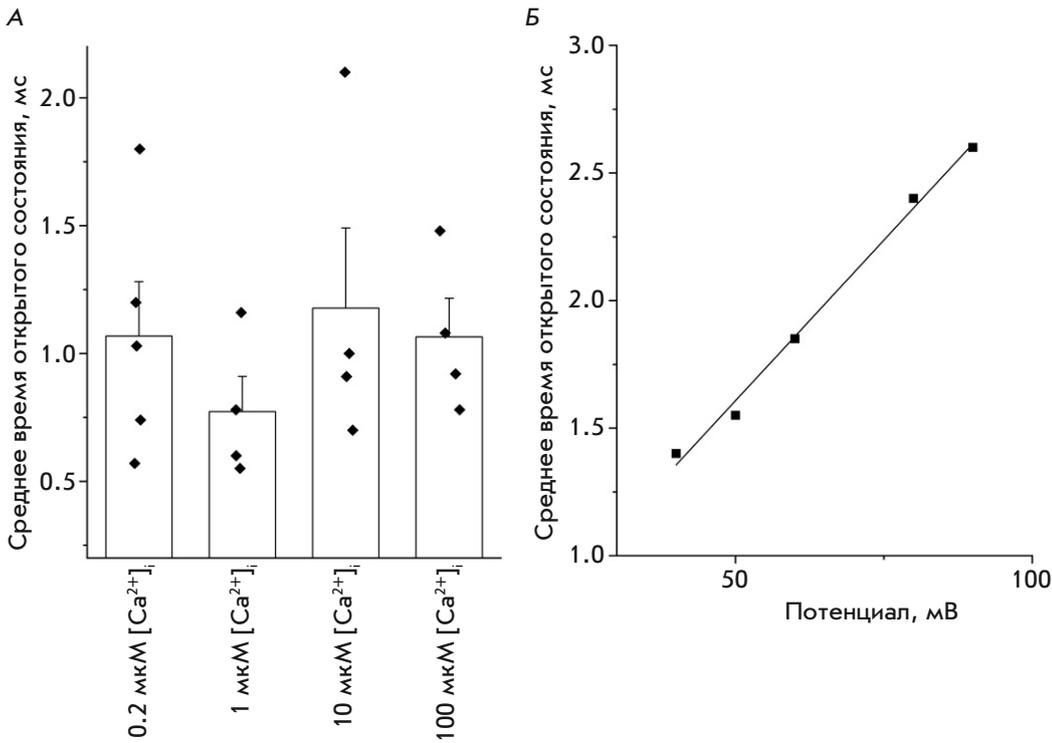


Рис. 4. Влияние $[Ca^{2+}]_i$ и потенциала на время жизни открытого состояния эндогенных каналов ANO6 в клетках HEK293T. Эксперименты проводили в конфигурации inside-out с 105 мМ $CaCl_2$ в наружном растворе. А – среднее время жизни открытого состояния эндогенных CaCC при +40 мВ при различных внутриклеточных концентрациях кальция ($p > 0.05$). Б – зависимость времени жизни открытого состояния эндогенных CaCC от потенциала на мембране при внутриклеточной концентрации кальция 100 мкМ (представлены данные репрезентативного эксперимента)

облегчает взаимодействие ионов кальция с внутриклеточными сайтами связывания, что приводит к увеличению активности каналов [10]. Здесь мы впервые показали, что переключение потенциалов само по себе увеличивает активность ANO6. Можно полагать, что изменение электрического поля в момент переключения потенциала мембраны с отрицательного на +40 мВ способствует конформационным изменениям эндогенных каналов ANO6, которые позволяют эффективно связать ионы кальция в вестибуле поры канала. Возможно, такая регуляция будет особенно ярко проявляться в физиологических условиях при флуктуациях потенциала мембраны (гиперполяризация, затем деполяризация), поскольку теоретически это снижает концентрацию кальция, необходимую для повышения активности канала. В дальнейшем интересно исследовать, зависит ли этот эффект от скорости изменения потенциала с отрицательного к положительному.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ кинетики работы одиночных CaCC впервые выявил увеличение времени жизни открытого состояния канала, индуцированное повышением потенциала на мембране. Это свойство, наряду с описанными нами ранее увеличением проводимости и вероятности открытого состояния каналов, по-

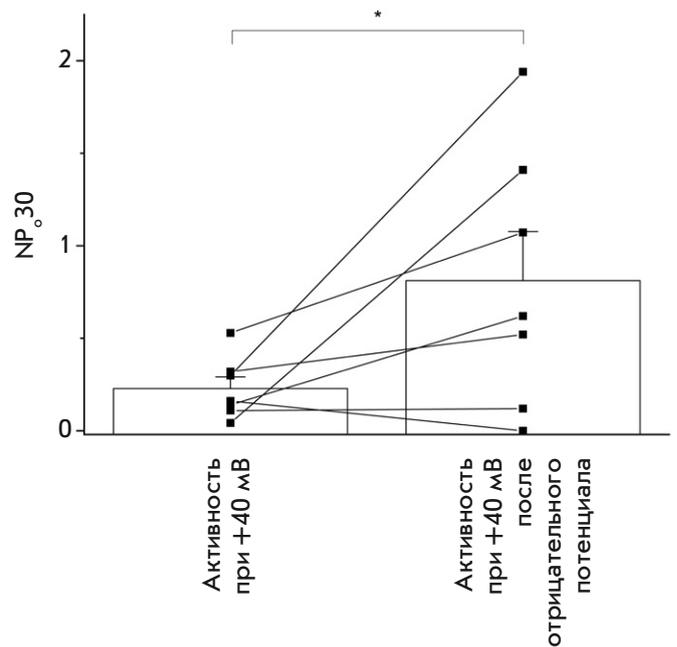


Рис. 5. Активность каналов ANO6 при потенциале +40 мВ до и после временного переключения потенциала мембраны на отрицательный. Каналы предварительно активировали, добавляя 1 мкМ кальция к внутриклеточной стороне мембраны. После развития активности при +40 мВ переходили на отрицательный потенциал и возвращались на +40 мВ

видимому, объясняет характерное выходящее выпрямление CaCC. Внутриклеточная концентрация кальция не влияла на время жизни канала, однако анализ амплитуды канала показал, что увеличение концентрации кальция приводит к синхронной работе пор димера аноктамина, что увеличивает ток в 2 раза.

В экспериментальных условиях каналы ANO6 активируются при большой концентрации внутриклеточного кальция (порядка десятков микромоль), тогда как в цитоплазме физиологическая концентрация кальция на два порядка ниже. Мы обнаружили, что цикл изменения потенциала мембраны (гиперполяризация, затем деполяризация) увеличивает активность каналов уже при 1 мкМ кальция. Возможно, такая регуляция может проявляться и в физиологических условиях при локальных флуктуациях потенциала мембраны.

Высокая концентрация внеклеточного кальция увеличивала активность каналов, возможно, за счет неселективного входа ионов кальция и автоподдержания активности канала. Поскольку этот эффект наблюдался только в присутствии избыточной концентрации кальция (почти на два порядка выше физиологической), физиологическая роль этого процесса не ясна. Проницаемость канала к хлорид-ионам не зависела от внеклеточной концентрации кальция.

Выявленные нами механизмы регуляции активности каналов ANO6 демонстрируют возможные пути тонкой настройки функционирования канала в нормальных физиологических и в патологических условиях. ●

*Работа поддержана грантом
РНФ № 22-24-00761.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ehlen H.W.A., Chinenkova M., Moser M., Munter H.M., Krause Y., Gross S., Brachvogel B., Wuelling M., Kornak U., Vortkamp A. // *J. Bone Mineral Res.* 2013. V. 28. № 2. P. 246–259.
- Zhang Y., Le T., Grabau R., Mohseni Z., Kim H., Natale D.R., Feng L., Pan H., Yang H. // *Sci. Advanc.* 2020. V. 6. P. eaba0310.
- Ousingsawat J., Wanitchakool P., Schreiber R., Wuelling M., Vortkamp A., Kunzelmann K. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 10. P. 6270–6280.
- Yang H., Kim A., David T., Palmer D., Jin T., Tien J., Huang F., Cheng T., Coughlin S.R., Jan Y.N., et al. // *Cell.* 2012. V. 151. № 1. P. 111–122.
- Cabrita I., Benedetto R., Schreiber R., Kunzelmann K. // *JCI Insight.* 2019. V. 4. № 15. P. e128414.
- Braga L., Ali H., Secco I., Chiavacci E., Neves G., Goldhill D., Penn R., Jimenez-Guardeño J.M., Ortega-Prieto A.M., Busani R., et al. // *Nature.* 2021. V. 594. № 7861. P. 88–93.
- Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Reisch B., Schreiber R., Kunzelmann K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 44. P. 18168–18172.
- Kolesnikov D., Perevoznikova A., Gusev K., Glushankova L., Kaznacheeva E., Shalygin A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. P. 4767.
- Kolesnikov D.O., Nomerovskaya M.A., Grigorieva E.R., Reshetin D.S., Skobeleva K.V., Gusev K.O., Shalygin A.V., Kaznacheeva E.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2024. V. 693. P. 149378.
- Ye W., Han T.W., He M., Nung Jan Y., Yeh Jan L. // *eLife.* 2019. V. 8. P. e45187.
- Kalienkova V., Clerico Mosina V., Paulino C. // *J. Mol. Biol.* 2021. V. 433. № 16. P. 166941.
- Lim N.K., Lam A.K.M., Dutzler R. // *J. Gen. Physiol.* 2016. V. 148. № 5. P. 375–392.