

2-АМИНОЭТОКСИДИФЕНИЛ БОРАТ МОДУЛИРУЕТ ДЕПО-ЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И.,
Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: cozzy@mail.ru

Поступила в редакцию: 26.06.2018

Аннотация. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что 2-аминоэтоксидифенил борат оказывает дозо-зависимое модулирующее влияние на депо-зависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. В концентрации 25 мкМ 2-аминоэтоксидифенил борат вызывает потенциацию входа Ca^{2+} , в то время как в концентрациях 50 и 100 мкМ эффективно подавляет вход Ca^{2+} в макрофаги.

Ключевые слова: 2-аминоэтоксидифенил борат, депо-зависимый вход Ca^{2+} , макрофаги.

Универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот является депо-зависимый, или “емкостной”, вход Ca^{2+} [1,2]. В соответствии с моделью “емкостного” входа Ca^{2+} , этот процесс регулируется степенью заполнения Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} [1, 2].

Функциональной единицей депо-зависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс (store-operated calcium influx complex, SOIC), компоненты которого обладают высокой мобильностью, и взаимодействия между ними жестко регулируются [2, 3]. Основными компонентами комплекса, необходимыми и достаточными для активации депо-зависимого входа Ca^{2+} , являются Ca^{2+} -каналы Orai1 в плазмалемме и Ca^{2+} -сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+} -депо [2, 3]. При опустошении Ca^{2+} -депо, STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депо-зависимый вход Ca^{2+} [2, 3].

После обнаружения важной роли депо-зависимых Ca^{2+} -каналов в патогенезе тяжелых заболеваний человека, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит (severe combined immunodeficiency, SCID), назальный полипоз, ревматоидный артрит, эктодермальная дисплазия, тромбоз, острый панкреатит, аутоиммунные и аллергические заболевания [4], возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов, депо-зависимых Ca^{2+} -каналов.

Из различных фармакологических модуляторов депо-зависимых Ca^{2+} -каналов лучше других исследован 2-аминоэтоксидифенил борат (2-APB). 2-APB широко использовался в качестве инструмента исследования механизмов функционирования депо-зависимых Ca^{2+} -каналов [5, 6]. Показано, что 2-APB модулирует депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетках разных типов: в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [7], T-клетках линии Jurkat человека, В-клетках цыпленка (линия DT40) и лейкоцитарных базофилах крысы (RBL-2H3) [8].

Учитывая важную роль депо-зависимых Ca^{2+} -каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние 2-APB на депо-зависимый вход Ca^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22 °С через 1-2 сут. после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны ранее [9]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [10]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [11].

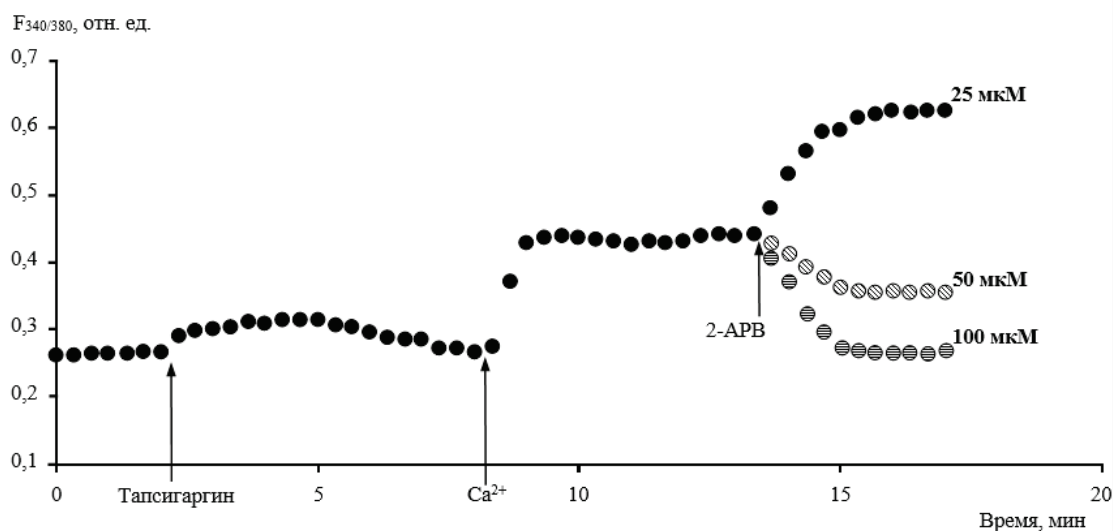


Рисунок 1. Влияние 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB) на вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином в макрофагах

В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0,5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 30 ± 8 нМ. При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депо-зависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 112 ± 21 нМ. Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ циклопязониковой кислоты (рис. 2). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой циклопязониковой кислотой, составило 31 ± 9 нМ, а во время входа Ca^{2+} - 99 ± 21 нМ (рис. 2).

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 2-APB на фоне развившегося депо-зависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, эффект 2-APB зависит от его концентрации. В концентрации 25 мкМ 2-APB вызывал значительную потенциацию входа Ca^{2+} (по данным 7 экспериментов на $105,2 \pm 25,3$ %). В то же время, добавление 2-APB в концентрации 50 или 100 мкМ приводило к подавлению депо-зависимого входа Ca^{2+} . По данным 7 экспериментов для каждой из концентраций 2-APB, подавление входа Ca^{2+} при действии 50 мкМ 2-APB составило $51,4 \pm 14,7$ %, а в концентрации 100 мкМ - $96 \pm 3,9$ %.

Аналогичные результаты мы получили при добавлении 2-APB на развившийся вход Ca^{2+} , индуцированный циклопязониковой кислотой. При воздействии 25 мкМ 2-APB наблюдалась потенциация входа Ca^{2+} на $116,3 \pm 23,7$ %. При приложении 50 мкМ 2-APB происходило подавление входа Ca^{2+} на $56,5 \pm 15,3$ %, а при действии 100 мкМ 2-APB - на $97,1 \pm 2,8$ %.

Здесь и на рисунке 2. по оси ординат - отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс - время.

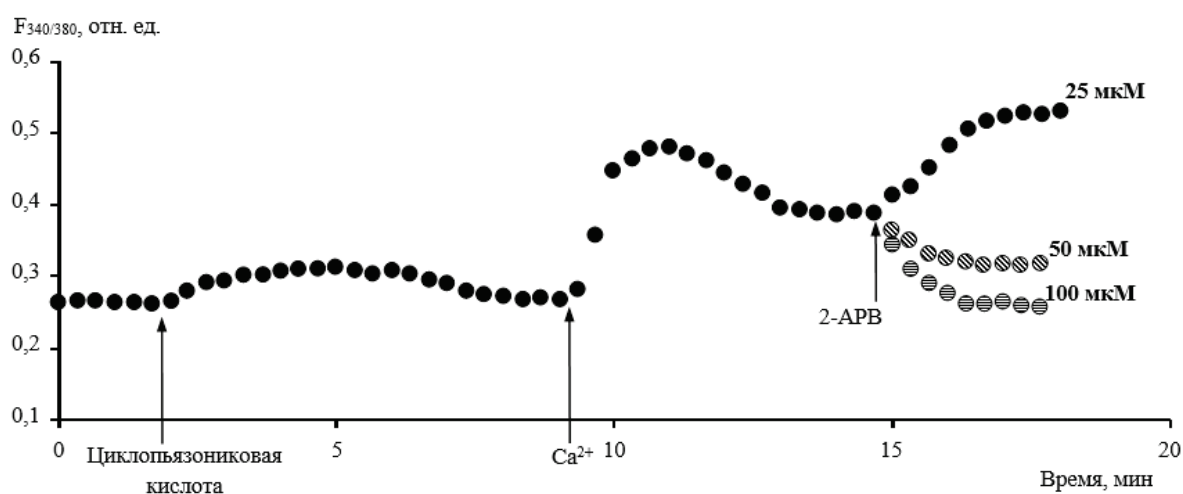


Рисунок 2. Влияние 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB) на вход Ca^{2+} , индуцируемый циклопязониковой кислотой в макрофагах

Макрофаги стимулировали 0,5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 25, 50 или 100 мкМ 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB).

Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов.

Макрофаги стимулировали 10 мкМ циклопязониковой кислоты в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 25, 50 или 100 мкМ 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB).

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, на макрофагах из костного мозга мыши обнаружено, что 50 мкМ 2-APB практически полностью подавляет депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином [12]. Дозо-зависимое модулирующее влияние 2-APB на депо-зависимый вход Ca^{2+} показано также на клетках различных типов: клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [7], Т-клетках линии Jurkat человека, В-клетках цыпленка (линия DT40) и лейкомиических базофилах крысы (RBL-2H3) [8]. В низких концентрациях (<30 мкМ) 2-APB потенцирует, в то время как в более высоких концентрациях практически полностью подавляет депо-зависимый вход Ca^{2+} . Полагают, что в низких концентрациях 2-APB потенцирует депо-зависимый вход Ca^{2+} путем прямого расширения (dilating) поры открытых Orai1 каналов [13, 14]. При этом диаметр поры Orai1 каналов увеличивается с 3,8 до 4,6 Å. Ингибирование входа Ca^{2+} при действии высоких концентраций 2-APB можно объяснить нарушением взаимодействия между STIM1 и Orai1 [15].

Таким образом, нами впервые на перитонеальных макрофагах крысы показано, что 2-APB дозо-зависимо активирует и ингибирует депо-зависимый вход Ca^{2+} . Это комплексное действие 2-APB на депо-зависимый вход Ca^{2+} может быть связано с его влиянием на оба компонента мультибелкового комплекса депо-зависимого входа Ca^{2+} , на белки STIM1 и Orai1. Полученные данные свидетельствуют также о том, что 2-APB является удобным фармакологическим инструментом для изучения депо-зависимого входа Ca^{2+} .

Список литературы / References:

1. Putney J. W. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990. vol. 11, pp. 611-624.
2. Prakriya M., Lewis R.S. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2015, vol. 95, pp. 1383-1436.
3. Vaca L. SOCIC: the store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium.*, 2010, vol. 47, pp. 199-209.
4. Lacruz R.S., Feske St. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2015, vol. 1356, pp. 45-79.
5. Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Roderick H.L., Berridge M.J., Peppiatt C.M. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release. *FASEB J.*, 2002, vol. 16, pp. 1145-1150.
6. Putney J.W. Pharmacology of store-operated calcium channels. *Mol. Interventions*, 2010, vol. 10, pp. 209-218.
7. De Haven W.I., Smyth J.T., Boyles R.R., Bird G.S., Putney J.W. Complex actions of 2-aminoethoxydiphenyl borate on store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, pp. 19265-19273.
8. Prakriya M., Lewis R.S. Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP_3 receptors. *J. Physiol.*, 2001, vol. 536. 1, pp. 3-19.
9. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Антонов В.Г. Arp 2/3-комплекс участвует в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. *Биофизика*, 2014, т. 59, вып. 5, с. 907-912. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. Arp2/3-complex is involved in the effect of glutoxim and molixan on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. *Biophysica*, 2014, vol. 59, pp. 907-912. (In Russ.)]
10. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
11. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566.
12. Vaeth M., Zee I., Concepcion A.R., Maus M., Shaw P., Portal-Celhay C., Zahra A., Kozhaya L., Weidinger C., Philips J., Unutmaz D., Feske S. Ca^{2+} -signaling but not store-operated Ca^{2+} entry is required for the function of macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.*, 201, vol. 195, pp. 1202-1217.
13. Xu X., Ali Sh., Li Y., Yu H., Zhang M., Lu J., Xu T. 2-aminoethoxydiphenyl borate potentiates CRAC current by directly dilating the pore of open Orai 1. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, p. 29304.
14. Ali Sh., Xu T., Xu X. CRAC channel gating and its modulation by STIM 1 and 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J. Physiol.*, 2017, vol. 595, no. 10, pp. 3085-3095.
15. Peinelt C., Lis A., Beck A., Fleig A., Penner R. 2-aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM 1-dependent gating of CRAC channels. *J. Physiol.*, 2008, vol. 586, pp. 3061-3073.

2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE MODULATES STORE-DEPENDENT Ca²⁺ ENTRY IN MACROPHAGES**Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G.**

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: cozy@mail.ru

Abstract. Using Fura-2AM microfluorimetry, it was shown for that 2-aminoethoxydiphenyl borate modulates store-dependent Ca²⁺ entry in dose-dependent manner. At concentration of 25 μM 2-aminoethoxydiphenyl borate potentiates Ca²⁺ entry, while at concentrations of 50 and 100 μM it effectively inhibits store-dependent Ca²⁺ entry in macrophages.

Key words: 2-aminoethoxydiphenyl borate, store-dependent Ca²⁺ entry, macrophages.