

АГОНИСТ-ИНДУЦИРУЕМАЯ Ca^{2+} СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Котова П.Д., Ивашин Д.С., Колесников С.С.

ФБГУН Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская обл., РФ; e-mail: polinakotova88@gmail.com

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) из различных источников представляют собой гетерогенную популяцию недифференцированных пролиферирующих клеток, которая содержит мультипотентные стволовые клетки, способные к дифференцировке в клетки нескольких мезенхимных линий. Используя микрофотометрию (Ca^{2+} imaging) и Ca^{2+} -чувствительный флуорофор Fluo-4, мы исследовали Ca^{2+} сигналы, инициируемые агонистами ряда GPCR рецепторов в МСК из жировой ткани человека. Интересной особенностью агонист-индуцированной Ca^{2+} сигнализации в МСК было то, что кратковременная стимуляция клеток вызывала Ca^{2+} ответы, которые генерировались по принципу “все-или-ничего”. Более точно, при относительно низких дозах агонисты не вызывали детектируемого изменения внутриклеточного Ca^{2+} , но стимулировали большие Ca^{2+} ответы, которые были примерно одинаковы по амплитуде при различных концентрациях агонистов, превышающих пороговую. Последняя была оценена как 0.1, 0.5, 1 и 2 мкМ для норадреналина, ADP, АТР, и УТР, соответственно. Результаты экспериментов с использованием ингибиторного анализа и фотолиза химических групп (uncaging) свидетельствовали о том, что фосфоинозитидный каскад и Ca^{2+} индуцированный выброс депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR)) вовлечены в формирование агонист-зависимых Ca^{2+} сигналов в цитоплазме МСК. В целом, полученные данные позволяют рассматривать трансдукцию исследованных агонистов как двух-стадийный процесс. Первоначально агонист стимулирует локальный Ca^{2+} сигнал, который, скорее всего, градуально зависит от его дозы. При превышении порога этот локальный Ca^{2+} сигнал стимулирует CICR, который конвертирует его в глобальный Ca^{2+} сигнал и придает окончательную форму Ca^{2+} ответу на агонист, делая его универсальным при различных концентрациях, превышающих пороговую.

Ключевые слова: Ca^{2+} сигнализация, гептаспиральные рецепторы, calcium-induced calcium release, IP_3 рецепторы, мезенхимные стромальные клетки.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, включающую недифференцированные клетки, которые обеспечивают регенерацию поддерживающей и соединительной тканей, благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке в клетки разных линий [1-3]. В силу ряда специфических свойств МСК, поддерживаемые в культуре, вызывают особый интерес в области регенеративной медицины и иммунотерапии [4]. Несмотря на очевидный прогресс в области физиологии МСК в целом, существующие представления все еще недостаточно характеризуют рецепторные и сигнальные системы этих клеток. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, многие экстраклеточные сигнальные молекулы, включая гормоны, цитокины и нуклеотиды, способны регулировать физиологические процессы в МСК [5, 6]. Следовательно, на плазматической мембране МСК должны функционировать разнообразные рецепторные белки, сопряженные с различными внутриклеточными сигнальными каскадами, которые позволяют МСК адаптировать свои физиологические функции к изменяющемуся микроокружению.

В данной работе нами исследовались МСК из жировой ткани человека и анализировались внутриклеточные Ca^{2+} сигналы, индуцированные агонистами определенных гептаспиральных рецепторов (G-protein coupled receptors, GPCRs). По ряду причин мы фокусировались на исследовании адренергической и пуринергической систем МСК. Дело в том, что норадреналин, высвобождаемый симпатическим нервом, является важным регулятором физиологических функций жировой ткани, например, метаболизма липидов и глюкозы и секреции ряда факторов, включая адипокины и цитокины [7]. Таким образом, МСК, функционирующие в жировой ткани, должны подвергаться действию норадреналина и сигнальных молекул, высвобождаемых адипоцитами. Имеющиеся данные указывают, что пуринергические агонисты являются факторами, детерминирующими дифференцировку и миграцию МСК [5, 6, 8-10]. Повреждение биологической ткани обычно ассоциируется с существенным увеличением уровня внеклеточного АТР, который может конвертироваться внеклеточными эктонуклеотидазами в ADP, AMP и аденозин [11]. Вполне вероятно, что МСК, мигрирующие в поврежденную ткань, подвергаются воздействию нуклеотидов. Практически все эукариотические клетки экспрессируют гены пуринорецепторов, поэтому способность детектировать внеклеточные пурины и пиримидины является универсальной для различных клеточных систем [12]. Можно думать, что МСК не являются исключением. В силу сказанного, нами исследовалась Ca^{2+} сигнализация в МСК, индуцированная норадреналином, АТР, УТР и ADP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка клеток к эксперименту. МСК человека выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров ($n = 7$) как описано ранее [13]. Выделенные МСК культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США) и/или в 12-луночном планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10 % Advance Stem Supplement (HyClone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. При достижении 80 % монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем рассаживали в соотношении 1:3. В экспериментах использовали МСК 2-4 пассажей.

Перед экспериментом клетки культивировали в 12-луночный планшет в среде роста (см. выше) без антибиотика в течение 12 ч. Затем клетки двукратно промывали раствором Версена (Sigma). Для отделения от субстрата клетки инкубировали 2-3 мин в 200 мкл фермента HyQTase (HyClone). Фермент ингибировали добавлением 800 мкл полной ростовой среды, клетки ресуспендировали и помещали в пробирку для центрифугирования. Клетки концентрировали в нижней части пробирки при 50 g в течение 45 с. Клетки прикрепляли с помощью Cell Tak (BD Biosciences, США) на дно фотометрической камеры, представляющей собой покровное стекло (Menzel Glaser, Германия) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным Ca^{2+} -зондом Fluo-4. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23-25 °C) в течение 20 мин в присутствии проникающего в течение 20 мин предшественника Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0,02 %) (Molecular Probes, США). Затем клетки при 4 °C в течение 40 мин отмывали внеклеточным раствором (мМ): 110 NaCl, 5,5 KCl, 2 CaCl₂, 0,8 MgSO₄, 10 HEPES, 10 глюкоза. В экспериментах с низким содержанием Ca^{2+} 2 мМ CaCl₂ во внеклеточном растворе заменяли на 0,5 мМ EGTA + 0,4 мМ CaCl₂ (260 нМ свободного Ca^{2+}).

Микрофотометрия. Эксперименты проводились с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0,75 и цифровой EMCCD камерой iXon888 (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждалась на длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссия регистрировалась в области 535 ± 20 нм. Последовательные изображения клеток во флуоресцентном свете регистрировались с частотой 1-2 Гц. Изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$), где $\Delta F = F - F_0$, F – текущая флуоресценция, F_0 – флуоресценция в начале регистрации. Фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

Фотолиз химических групп (uncaging). В ряде экспериментов помимо Fluo-4 клетки загружались NP-EGTA и caged-Ins(145)P₃, которые являются фотолabileм Ca^{2+} хелатором и предшественником IP₃. С этой целью клетки инкубировались в присутствии 4 мкМ Fluo-4-AM и 4 мкМ NP-EGTA-AM (Invitrogen) или 4 мкМ caged-Ins(145)P₃/PM (SiChem) + 0.02 % Pluronic (Invitrogen) в течении 30 мин при 23 °C. Стимуляции фотолиза происходила на длине волны 351 нм, для чего один из входов бифуркационного оптического волокна был соединен с лазером TECH-351 Advanced (Лазер-Экспорт, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах нами использовались перфузируемые фотометрические камеры объемом ~ 150 мкл, в которые обычно помещалось порядка 10^2 МСК, нагруженных Fluo-4, что позволяло анализировать чувствительность клеток к различным соединениям методом микрофотометрии (Ca^{2+} imaging). В общей сложности нами было исследована выборка из порядка 5×10^3 МСК, которая, как оказалось, содержала небольшие субпопуляции клеток, специфически чувствительных к норадреналину (6,7 %), АТФ (12 %), АДФ (7,1 %) и УТФ (6 %). Это свидетельствовало о функциональной гетерогенности популяции МСК, отмечавшейся ранее [3, 13]. Между тем, для разных агонистов Ca^{2+} сигнализация, инициируемая каждым из них в цитоплазме МСК, развивалась в значительной степени идентично, что свидетельствовало о сходстве или даже идентичности механизмов, вовлеченных в сопряжение соответствующего поверхностного GPCR рецептора с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} .

Зависимость Ca^{2+} ответов от концентрации агонистов.

В качестве одной из базовых характеристик нами анализировалась дозо-зависимость Ca^{2+} сигналов, индуцированных исследовавшимися агонистами. В соответствующих экспериментах первоначально исследовались ответы МСК на норадреналин и было установлено, что норадреналин-зависимые Ca^{2+} сигналы генерировались МСК в соответствии с принципом “все-или-ничего”. Иными словами, при концентрациях ниже 100 нМ норадреналин не вызывал детектируемых изменений уровня внутриклеточного Ca^{2+} , но выше пороговой дозы 100-200 нМ, кратковременная аппликация этого агониста инициировала импульсы Ca^{2+} , которые были в значительной степени идентичны по форме и амплитуде при различных концентрациях (рис. 1А). Поскольку кривые доза-ответ, представленные в литературе, носят градуальный характер в большинстве случаев, мы рассматривали возможность, что норадреналин вызывал слишком большие Ca^{2+} ответы, которые могли насыщать флуоресценцию Fluo-4. Это могло быть причиной того, что клеточные ответы казались примерно одинаковыми при использовавшихся дозах агониста. Однако, насыщение Ca^{2+} зонда вряд ли имело место, поскольку обработка

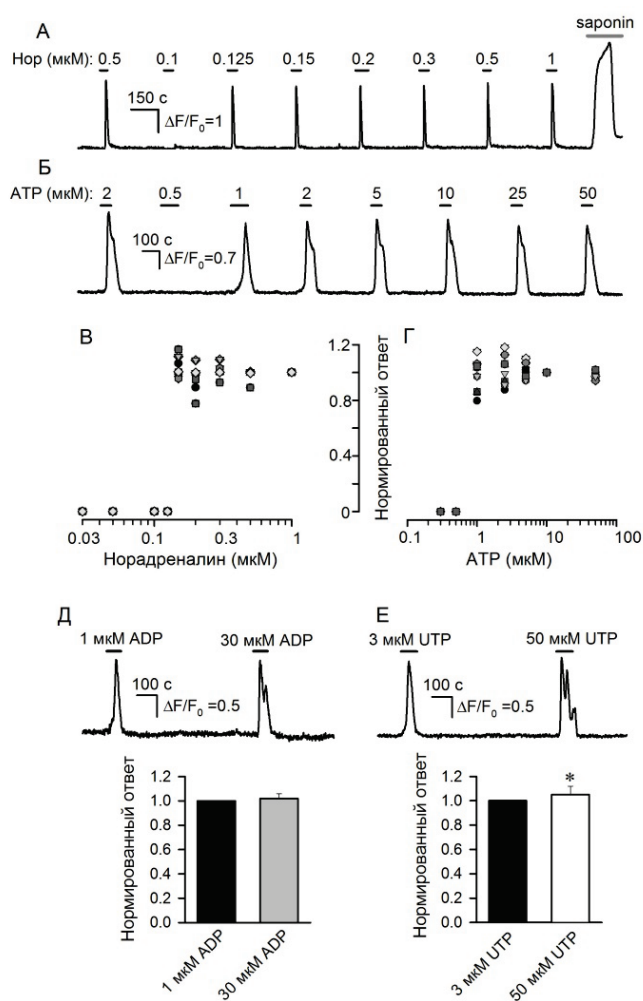


Рисунок 1. Дозозависимость Ca^{2+} ответов, инициированных агонистами (А, Б) Репрезентативные ответы МСК на норадреналин и АТР, апплицированных при варьируемых концентрациях. (В) Нормированные дозозависимости амплитуды ответов на норадреналин, полученные от 10 клеток. Для каждой клетки ответы на норадреналин при разных концентрациях нормировались на величину ответа на 1 мкМ норадреналина. (Г) Нормированные дозозависимости ответов на АТР, полученные от 8 клеток. Для каждой клетки ответы на АТР нормировались на величину ответа на 10 мкМ АТР. (Д) Репрезентативные ответы МСК на АТР при низкой и высокой концентрациях (верхняя панель) и ответы, усредненные по выборке из 16 клеток (нижняя панель). (Е) Репрезентативные ответы МСК на УТР при низкой и высокой концентрациях (верхняя панель) и ответы, усредненные по выборке из 11 клеток (нижняя панель). Здесь и ниже звездочка означает статистически значимые различия по отношению к контролю (Student t-test, $p < 0.05$)

клеток детергентом сапонином (0.1 мг/мл), формирующим поры в наружной мембране, вызвала Ca^{2+} сигналы, которые по величине в 1,5-2 раза превышали ответы на норадреналин (17 клеток) (рис. 1А). Дальнейшие эксперименты показали, что Ca^{2+} МСК на другие тестируемые агонисты также следуют принципу “все-или-ничего”. В частности, в субмикромольных дозах АТР был неэффективен, но инициировал идентичные Ca^{2+} сигналы при концентрациях 1-2 мкМ и выше (рис. 1Б).

В случае норадреналина и АТР Ca^{2+} ответы МСК аккуратно исследованы в условиях, когда концентрация агонистов варьировалась в широком диапазоне с достаточно малым шагом (рис. 1А, Б). Поскольку рефрактерный период ответов был порядка 400 с, такие регистрации были достаточно продолжительны, и во многих клетках ответы были подвержены рандауну (rundown), который затруднял количественный анализ. В общей сложности, была найдена 21 клетка, которые достаточно стабильно отвечали на норадреналин (30 нМ – 10 мкМ) с порогом 100-200 нМ. Среди них оказалось 10 клеток, которые отвечали на норадреналин с одинаковым порогом 150 нМ и которые послужили выборкой для количественного анализа. Чтобы сравнить разные регистрации, ответы данной клетки на норадреналин при разных дозах нормировались на величину ответа на 1 мкМ норадреналин. На рисунке 1В представлены нормированные Ca^{2+} ответы на норадреналин, где разные символы соответствуют индивидуальным клеткам. Хотя имеет место определенный разброс данных, нормированные ответы локализованы в узкой области 0,8-1,2 (рис. 1В), демонстрируя, что во всех случаях кривые доза-ответ не являются градуальными, а скорее описываются зависимостью типа функции Хэвисайда, т.е. следуют принципу “все-или-ничего”. Аналогичные выводы следуют из экспериментов с АТР-чувствительными МСК, из которых 32 клетки стабильно отвечали на нуклеотид, апплицировавшийся в дозах 0,5-50 мкМ (рис. 1Б). Среди них 9 МСК генерировали идентичные Ca^{2+} сигналы при стимуляции АТР в увеличивающихся дозах при пороговой концентрации 1 мкМ (рис. 1Б, В).

В случае АТР и УТР, пороговые концентрации для этих агонистов лежали в области 0,5-2 мкМ и 3-6 мкМ, соответственно. Хотя чувствительность МСК к АТР и УТР не исследовалась столь детально, как в случае норадреналина и АТР, ряд фактов свидетельствовали о том, что кривые доза-ответ для этих нуклеотидов также подчинялись принципу “все-или-ничего”. В частности, идентичные Ca^{2+} сигналы регистрировались в МСК в ответ на АТР при концентрациях 1 и 30 мкМ (16 клеток). То же наблюдалось в случае УТР, апплицированного при 3 и 50 мкМ (11 клеток) (рис. 1Д, Е).

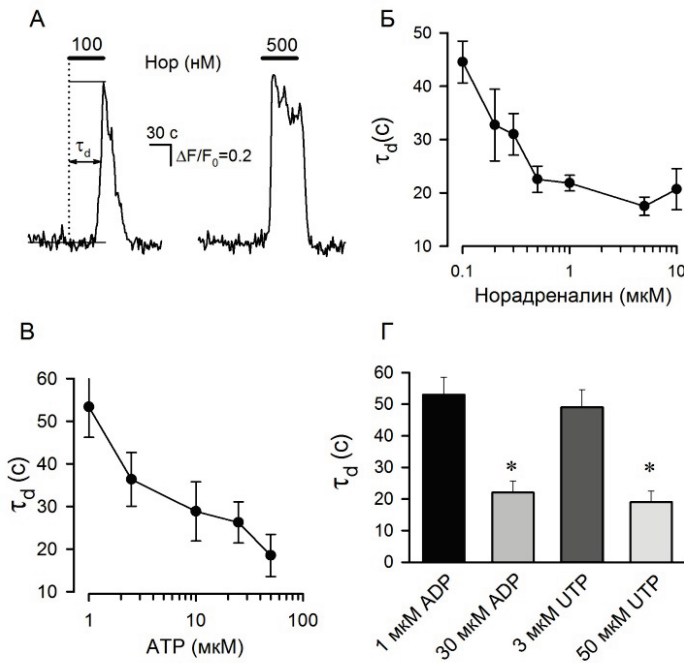


Рисунок 2. Дозозависимость лагпериода Ca^{2+} ответов на агонисты

(А) Репрезентативные Ca^{2+} сигналы в цитоплазме МСК, инициированные норадреналином при 100 нМ и 500 нМ. Характерное время задержки (лагпериод) ответов (τ_d) определялось как интервал времени от момента аппликации агониста до момента достижения Ca^{2+} сигналом полу-амплитудного значения.

(Б, В) Лагпериод ответа как функция концентрации агониста. Данные получены по выборке 10 адренергических и 8 пуринергических МСК.

(Г) Лагпериод ответов МСК на ADP (n=16) и UTP (n=11).

В (Б-Г) Данные представлены как среднее \pm стандартная девиация.

Еще одной примечательной особенностью ответов МСК на норадреналин и нуклеотиды было то, что индуцированные ими Ca^{2+} сигналы были заметно задержаны по отношению к моменту аппликации агонистов. Характеристическое время задержки (τ_d , рис. 2А) градуально уменьшалось по мере роста концентрации агониста, что детально исследовалось в случае норадреналина и АТР (рис. 2Б, В). В частности, было установлено, что задержка Ca^{2+} ответов, стимулируемых норадреналином, составляла 38-55 с при дозах, близких к пороговой (рис. 2А, левая панель), и сокращалась до 17-26 с при концентрации 1 мкМ и выше (рис. 2А, правая панель). Хотя для ADP и UTP этот феномен детально не исследовался, сравнительный анализ клеточных ответов демонстрирует примерно двукратное уменьшение времени задержки Ca^{2+} сигналов при переходе от относительно низких к высоким концентрациям агонистов (рис. 2Г). Таким образом, амплитуда ответов МСК на исследовавшиеся агонисты и лаг-период ответов демонстрировали принципиально разные дозозависимости, свидетельствуя о сложности механизма трансдукции.

Роль фосфоинозитидного каскада и Ca^{2+} -индуцированного Ca^{2+} выброса в трансдукции агонистов.

Сопряжению GPCR рецепторов с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} обычно обеспечивается за счет стимуляции G_q - и G_i -белками фосфолипазы С (phospholipase C, PLC), катализирующей гидролиз фосфолипида PIP_2 и продукцию растворимого (IP_3) и липидного (DAG) медиаторов, с последующей активацией внутриклеточного Ca^{2+} канала - IP_3 -рецептора – и выброса Ca^{2+} , депонированного в Ca^{2+} депо [14]. Для выявления роли фосфоинозитидного каскада в генерации Ca^{2+} сигналов, инициируемых в цитоплазме МСК агонистами, нами использовался ингибиторный анализ. Оказалось, что прединкубация клеток в растворе, содержащем U73122 (2-5 мкМ), который практически необратимо ингибирует PLC, приводила к полному подавлению агонист-зависимых Ca^{2+} сигналов, включая инициированные норадреналином (17 клеток), АТР (39 клеток), UTP (7 клеток) и ADP (5 клеток) (рис. 3А-В, Ж-И). Ингибиторные эффекты U73122 были специфичными, поскольку его гораздо менее эффективный аналог U73343 (2-5 мкМ) никогда не подавлял клеточные ответы на агонисты (рис. 3А-В, Ж, 3). Кроме того, снижение Ca^{2+} в наружном растворе с 2 мМ до уровня, близкого к внутриклеточному (260 нМ), приводило к незначительному изменению Ca^{2+} ответов, вызываемых норадреналином (31 клетка), АТР (26 клеток), ADP (13 клеток) и UTP (14 клеток) (рис. 3В, Г, Ж-И). Таким образом, агонисты, которые инициировали Ca^{2+} сигнализацию в МСК, стимулировали GPCR рецепторы, которые сопряжены фосфоинозитидным каскадом преимущественно с выбросом депонированного Ca^{2+} при пренебрежимом вкладе входа наружного Ca^{2+} . Следует отметить, что пороговая дозо-зависимость амплитуды Ca^{2+} ответов от концентрации агониста (рис. 1) и их незначительная зависимость от наружного Ca^{2+} (рис. 3В, Г, Ж-И) свидетельствуют о незначительном вкладе P2X рецепторов, являющихся АТФ-активируемыми Ca^{2+} -проницаемыми каналами [15], в генерацию ответов МСК на АТР.

Поскольку PLC ингибитор U73122 оказывал драматические эффекты на чувствительность МСК к агонистам, было мало сомнения в том, что IP_3 рецепторы, активность которых контролируется PLC [15], должны были быть одними из ключевых эффекторов в цепи трансдукции исследовавшихся лигандов. Как и ожидалось, в присутствии проникающего блокатора IP_3 рецепторов 2-APB (50 мкМ) были подавлены Ca^{2+} сигналы, инициировавшиеся в МСК АТР (21 клетка), норадреналином (19 клеток), ADP (9 клеток) и UTP (10 клеток) (рис. 3Г-И).

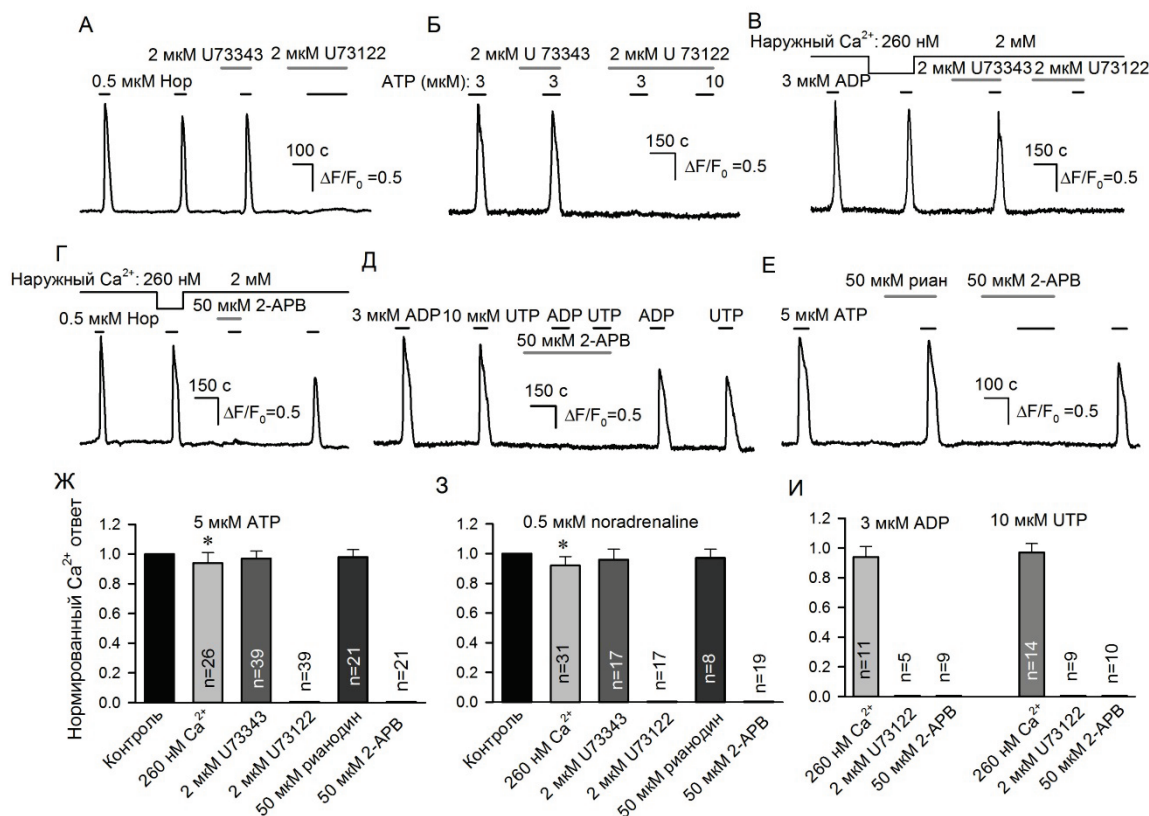


Рисунок 3. Фосфоинозитидный каскад обеспечивает трансдукцию агонистов (А-В) Ингибитор PLC U73122 (2 μM) подавляет Ca^{2+} сигналы в МСК, инициированные различными агонистами, включая 0.5 μM норадреналин (А), 3 μM АТФ (В) и 3 μM АДП (С). (В, Г) Уменьшение Ca^{2+} во внеклеточном растворе с 2 мМ до 260 нМ слабо влияло на агонист-зависимые Ca^{2+} сигналы. (Г-Е) Блокатор IP_3 рецептора 2-АРВ (50 μM) подавлял ответы МСК на агонисты, включая 0.5 μM норадреналин, 3 μM АДП, 10 μM УТР и 5 μM АТФ. (Е) Рианодин (50 μM) (антагонист рианодиновых рецепторов) не ингибировал ответы на агонисты, включая 5 μM АТФ. (Ж-И) Статистика изменения клеточных ответов на агонисты в контроле и в присутствии различных соединений; данные представлены как среднее \pm стандартная девиация

Следует отметить, что 2-АРВ блокирует не только IP_3 рецепторы, но и ряд Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов, обеспечивающих вход наружного Ca^{2+} [16-18]. Учитывая, однако, что наружный Ca^{2+} слабо влиял на агонист-зависимую Ca^{2+} сигнализация в МСК, эффекты 2-АРВ (рис. 3Г-Е) были обусловлены исключительно блокадой IP_3 рецепторов. В противоположность 2-АРВ ответы МСК на агонисты не ингибировались рианодином (50 μM) (рис. 3Е-Ж) – антагонистом рианодиновых рецепторов, являющимся еще одним типом внутриклеточных Ca^{2+} каналов, ответственных за высвобождение Ca^{2+} ионов из Ca^{2+} депо [19].

Имеются множественные публикации, в которых показаны градуальные зависимости клеточных ответов от концентрации агонистов [20-22]. В противоположность этому, величина Ca^{2+} ответов, инициируемых агонистами в МСК, следовала принципу “все-или-ничего” (рис. 1). Если в МСК трансдукция агонистов базируется преимущественно на PLC-зависимой продукции IP_3 и пропорциональному высвобождению депонированного Ca^{2+} через IP_3 рецепторы, то неясно, почему имеет место ступенчатая дозо-зависимость для амплитуды Ca^{2+} ответов (рис. 1), и почему при этом лаг-период ответов градуально уменьшается с концентрацией агониста (рис. 2). В поисках решения этой проблемы, мы предположили, что в МСК трансдукция агонистов базируется на двух механизмах – градуальном и триггерном. Стимулируя соответствующий GPCR рецептор, сопряженный с фосфоинозитидным каскадом, агонист первоначально вызывает локальный и небольшой по величине Ca^{2+} сигнал, который градуально растет с концентрацией агониста. В силу локальности, этот Ca^{2+} сигнал не разрешается при использовании не конфокальной оптики. При достижении определенного порога этот первоначальный Ca^{2+} сигнал стимулирует Ca^{2+} -индуцированный выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) [19, 23, 24] и тем самым усиливается до насыщающего и конвертируется в глобальный Ca^{2+} -сигнал. При таком развитии событий, амплитуда и форма агонист-зависимых Ca^{2+} сигналов должны слабо зависеть от концентрации агониста (рис. 1), в то время как задержка ответа, которая определяется временем достижения порогового уровня локальным Ca^{2+} сигналом, должна уменьшаться по мере увеличения интенсивности стимула (рис. 2).

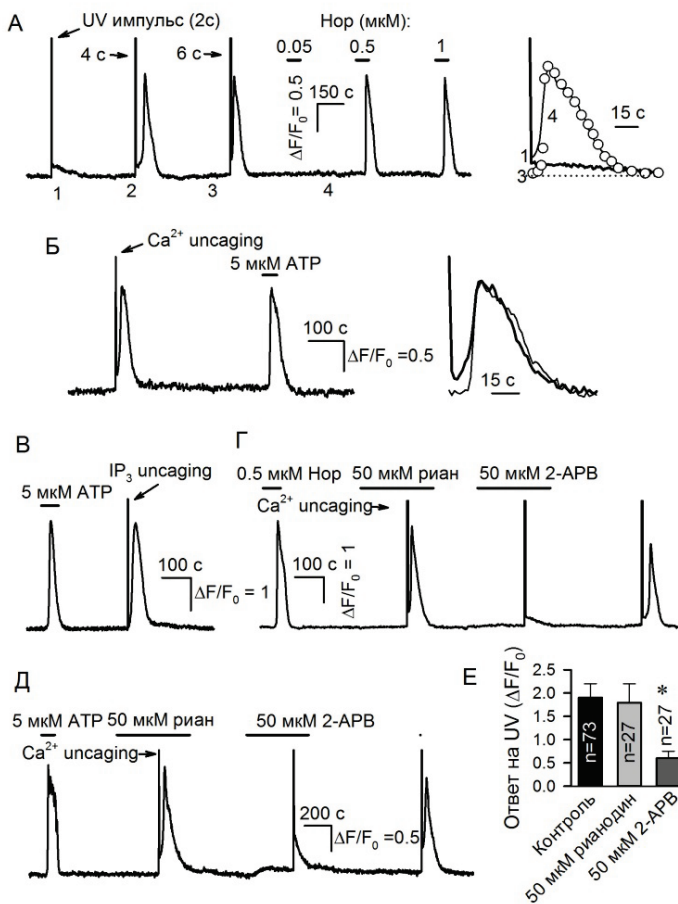


Рисунок 4. Ca^{2+} -индуцированный выброс Ca^{2+} в МСК.

(А) Левая панель – Ca^{2+} сигналы, инициированные в МСК фотолизом NP-EGTA под действием импульсов UV различной длительности и Ca^{2+} ответы на норадреналин при указанных концентрациях. Правая панель – наложение Ca^{2+} сигналов обозначенных в (А) как 1 (толстая линия), 3 (кружечки) и 4 (тонкая линия).

(Б) Левая панель – Ca^{2+} сигналы в МСК, вызванные фотолизом NP-EGTA (4 с импульс UV) (Ca^{2+} uncaging) и 5 мкМ АТФ. Правая панель – наложение Ca^{2+} сигналов, вызванных импульсом UV (толстая линия) и АТФ (тонкая линия).

(В) Внеклеточный АТФ (5 мкМ) и импульс IP_3 в цитоплазме МСК (IP_3 uncaging, 2 с импульс UV) вызывают идентичные Ca^{2+} сигналы в клетках, нагруженных caged-Ins(145)P₃.

(Г, Д) 2-АРВ (50 мкМ) полностью подавляет бифазные Ca^{2+} сигналы, вызванные фотолизом NP-EGTA, в то время как рианодин (50 мкМ) был неэффективен.

(Е) Статистика Ca^{2+} ответов, инициированных фотолизом NP-EGTA в контроле и в присутствии рианодина и 2-АРВ. Данные представлены как среднее ± стандартная девиация

Чтобы верифицировать предлагаемую гипотезу и продемонстрировать функциональность механизма CICR в МСК, мы использовали метод фотолиза химических групп (uncaging), нагружая клетки фоточувствительным хелатором Ca^{2+} NP-EGTA или фоточувствительным предшественником IP_3 - caged-Ins(145)P₃. Фотолиз NP-EGTA или caged-Ins(145)P₃ импульсом ультрафиолета (UV) позволял генерировать в цитоплазме МСК скачок Ca^{2+} или IP_3 , соответственно. В наших экспериментах фотолиз NP-EGTA выполнялся при умеренной интенсивности UV, чтобы высвободить физиологически адекватное количество Ca^{2+} в течении нескольких секунд, тем самым контролируя задержку клеточных ответов на свет. В экспериментах с адренергическими (n=33) и пуринергическими (n=23) МСК, нагруженными NP-EGTA, было показано что, импульсы UV вызывают два типа Ca^{2+} ответов. Относительно короткие, обычно не превышающие 2 с импульсы UV продуцировали оптический артефакт и без видимой задержки небольшой скачок Ca^{2+} , который экспоненциально релаксировал к уровню покоя (рис. 4А, левая панель и толстая линия в правой панели). Последующие более продолжительные импульсы длительностью обычно 4 и 6 с могли вызывать бифазные Ca^{2+} сигналы одинаковой амплитуды (рис. 4А, левая панель), которые кинетически и по амплитуде были сходны с ответами на агонисты (рис. 4А, правая панель, рис. 4Б). Эти данные свидетельствовали о том, что механизм CICR функционален в МСК, и что именно этот процесс обеспечивает триггероподобное высвобождение депонированного Ca^{2+} , которое определяет кинетику и амплитуду ответов на агонисты. Согласно литературным данным лавинообразное высвобождение Ca^{2+} по механизму CICR может протекать при участии как рианодиновых рецепторов, так и IP_3 рецепторов [19, 23, 24]. В экспериментах с МСК, нагруженных caged-Ins(145)P₃, импульсное высвобождение IP_3 инициировало Ca^{2+} сигналы как в пуринергических (n=12) так и адренергических (n=7) МСК, причем таковые были сходны с ответами на агонисты (рис. 4В). Это свидетельствовало о том, что главным образом IP_3 рецепторы обеспечивают лавинообразное высвобождение Ca^{2+} по механизму CICR. В подтверждение этому, 2-АРВ (50 мкМ) драматически подавлял клеточные ответы на скачки внутриклеточного Ca^{2+} , вызванные фотолизом NP-EGTA как в адренергических (n=16), так и в пуринергических (n=11) МСК (рис. 4Г, Д). В то же время, рианодин (50 мкМ) не ингибировал ответы ни на агонисты, ни на фотолиз NP-EGTA (рис. 4Г, Д).

Таким образом, проведенные эксперименты подтверждают, что в МСК трансдукция агонистов протекает в две сопряженные стадии и базируется на градуальном (агонист-зависимом) и триггерном по механизму CICR (агонист-независимом) высвобождении депонированного Ca^{2+} . Это объясняет почему дозо-зависимости амплитуды ответов на агонисты и их лаг-период носят скачкообразный и градуальный характер, соответственно.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант 18-14-00347).

Список литературы / References:

1. Kalinina N.I., Sysoeva V.Y., Rubina K.A., Parfenova Y.V., Tkachuk V.A. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta Naturae*, 2011, vol. 3, pp. 30-37.
2. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 10, pp. 709-716.
3. Baer P.C., Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*, 2012, 812693.
4. Casiraghi F., Perico N., Cortinovis M., Remuzzi G. Mesenchymal stromal cells in renal transplantation: opportunities and challenges. *Nature Reviews. Nephrology*, 2016, vol. 12, pp. 241-253.
5. Scarfi S. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World Journal of Stem Cells*, 2014, vol. 6, pp. 153-162.
6. Forostyak O., Forostyak S., Kortus S., Sykova E., Verkhatsky A., Dayanithi G. Physiology of Ca²⁺ signalling in stem cells of different origins and differentiation stages. *Cell Calcium*, 2016, vol. 59, pp. 57-66.
7. Penicaud L. Relationships between adipose tissues and brain: what do we learn from animal studies? *Diabet and Metabolism*, 2010, vol. 36, pp. 39-44.
8. Cavaliere F., Donno C., D'Ambrosi N. Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015, vol. 9, p. 211.
9. Glaser T., Cappellari A.R., Pillat M.M., Iser I.C., Wink M.R., Battastini A.M., Ulrich H. Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal*, 2012, vol. 8, pp. 523-537.
10. Jiang L.H., Hao Y., Mousawi F., Peng H., Yang X. Expression of P2 Purinergic Receptors in Mesenchymal Stem Cells and Their Roles in Extracellular Nucleotide Regulation of Cell Functions. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, vol. 232, pp. 287-297.
11. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signaling*, 2012, vol. 8, pp. 437-502.
12. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental Physiology*, 2014, vol. 99, pp. 16-34.
13. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1843, pp. 1899-1908.
14. Berridge M.J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 2016, vol. 96, pp. 1261-1296.
15. Samways D.S., Li Z., Egan T.M. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, vol. 8, p. 6.
16. Xu S.Z., Zeng F., Boulay G., Grimm C., Harteneck C., Beech D.J. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *British Journal of Pharmacology*, 2005, vol. 145, pp. 405-414.
17. Mustafa T., Walsh J., Grimaldi M., Eiden L.E. PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca²⁺ channels in PC12 cells. *Cellular Signaling*, 2010, vol. 22, pp. 1420-1426.
18. Harteneck C., Gollasch M. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, vol. 12, pp. 35-41.
19. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2003, vol. 4, pp. 517-529.
20. Berg K.A., Clarke W.P., Sailstad C., Saltzman A., Maayani S. Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2A and type 2C receptor systems. *Molecular Pharmacology*, 1994, vol. 46, pp. 477-484.
21. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *Journal of Neurophysiology*, 2003, vol. 90, pp. 3283-3294.
22. Petrel C., Kessler A., Dauban P., Dodd R.H., Rognan D., Ruat M. Positive and negative allosteric modulators of the Ca²⁺-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, pp. 18990-18997.
23. Clapham D.E. Calcium Signaling. *Cell*, 2007, vol. 131, pp. 1047-1058.
24. Iino M. Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2010, vol. 86, pp. 244-256.

AGONIST INDUCED Ca^{2+} SIGNALING IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Kotova P.D., Ivashin D.S., Kolesnikov S.S.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutional Street, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: polinakotova88@gmail.com

Abstract. Mesenchymal stromal cells (MSCs) from different sources represent a heterogeneous population of proliferating non-differentiated cells that contains multipotent stem cells capable of originating a variety of mesenchymal cell lineages. By using Ca^{2+} imaging and the Ca^{2+} dye Fluo-4, we studied MSCs from the human adipose tissue and examined Ca^{2+} signaling initiated by purinergic agonists. Although all tested compounds were capable of mobilizing intracellular Ca^{2+} in MSCs, sensitivity of individual MSCs to a particular agonist varied from cell to cell. Being characterized by a relative change of Fluo-4 fluorescence, agonist-induced Ca^{2+} responses were generated in an “all-or-nothing” fashion. Specifically, at relatively low doses, agonists elicited undetectable responses but initiated quite similar Ca^{2+} transients of large magnitude at all concentrations above the threshold, which was nearly 0.1, 0.2, 0.5, 1, and 2 μ M for noradrenaline, ADP, ATP, and UTP, respectively. The inhibitory analysis and Ca^{2+}/IP_3 uncaging pointed at the phosphoinositide cascade as a pivotal pathway responsible for agonist transduction and implicated Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) mediated by IP_3 receptors in shaping agonists-dependent Ca^{2+} signals. Altogether, our data suggest that agonist transduction in MSCs includes two fundamentally different stages: an agonist initially triggers a local, gradual, and relatively small Ca^{2+} signal, which next stimulates CICR to accomplish transduction with a large and global Ca^{2+} transient. By involving the trigger-like mechanism CICR, a cell is capable of generating Ca^{2+} responses of virtually universal shape and magnitude at different agonist concentrations above the threshold.

Key words: Ca^{2+} signaling, G-protein coupled receptors, calcium-induced calcium release, IP_3 receptors, mesenchymal stromal cells.