

ПРОИЗВОДНОЕ ПИРАЗОЛА УМ-58483 ИНГИБИРУЕТ ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева, 6, г. Санкт-Петербург, 194044, РФ; e-mail: l.milenina@spbu.ru

Поступила в редакцию: 23.06.2020

Аннотация. Депозависимый вход Ca^{2+} является повсеместным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных Ca^{2+} -депо; участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (экзоцитоз, экспрессия генов, пролиферация клеток и др.). После обнаружения важной роли депозависимых Ca^{2+} -каналов в патогенезе тяжелых заболеваний человека, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит, назальный полипоз, ревматоидный артрит и др. возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов депозависимых Ca^{2+} -каналов. Учитывая важную роль депозависимых Ca^{2+} -каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние производного пиразола соединения УМ-58483 на депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крыс. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM мы впервые обнаружили, что при добавлении УМ-58483 на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином или ЦПК, наблюдается практически полное подавление депозависимого входа Ca^{2+} . Это свидетельствует о том, что УМ-58483 эффективно подавляет уже развившийся депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Во втором варианте экспериментов мы исследовали влияние УМ-58483 на уже активированные опустошением депо механизмы входа Ca^{2+} в макрофаги. Макрофаги стимулировали ЦПК или тапсигаргином в номинально бескальциевой среде. После окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо клетки инкубировали в течение 5 мин в присутствии УМ-58483, после чего инициировали вход Ca^{2+} в цитозоль. Обнаружено, что и в этих условиях УМ-58483 вызывает значительное подавление входа Ca^{2+} . Таким образом, мы впервые на перитонеальных макрофагах крыс показали, что производное пиразола УМ-58483 эффективно ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} и является удобным фармакологическим инструментом для изучения депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, как и в клетках других типов.

Ключевые слова: производное пиразола соединение УМ-58483, депозависимый вход Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Депозависимый или «емкостной» вход Ca^{2+} , впервые описанный Джеймсом Патни более тридцати лет назад, является повсеместным (ubiquitous) механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных Ca^{2+} -депо [1, 2]. Депозависимый вход Ca^{2+} участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (экзоцитоз, экспрессия генов, рост и пролиферация клеток и др.) в норме и патологии [3, 4].

Функциональной единицей депозависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс (store-operated calcium influx complex, SOIC), компоненты которого обладают высокой мобильностью, и взаимодействия между ними жестко регулируются [5, 6]. Основными компонентами комплекса, необходимыми и достаточными для активации депозависимого входа Ca^{2+} , являются Ca^{2+} -каналы Orai1 в плазмалемме и Ca^{2+} -сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+} -депо [4]. При опустошении Ca^{2+} -депо, STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулула, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депозависимый вход Ca^{2+} [7-9].

После обнаружения важной роли депозависимых 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 [10-12] возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов депозависимых Ca^{2+} -каналов.

Производное пиразола иммунодепрессант УМ-58483 (также известный как ВТР2 или Руг2) является представителем семейства бис(трифторметил)пиразолов. Ранее было обнаружено, что УМ-58483 эффективно ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} и продукцию интерлейкина-2 в Т-клетках линии Jurkat человека [13].

Учитывая важную роль депозависимых Ca^{2+} -каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, представлялось

целесообразным исследовать влияние YM-58483 на депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крыс.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22°C 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 [14]. 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 [15]. 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 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

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 (рисунок 1а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 60 ± 13 нМ ($n=7$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 159 ± 22 нМ ($n=7$). Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК. В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 61 ± 14 нМ ($n=7$), а во время входа Ca^{2+} - 170 ± 20 нМ ($n=7$) (рисунок 1б).

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 5 мкМ YM-58483 на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином или ЦПК, наблюдается практически полное подавление депозависимого входа Ca^{2+} (рис. 1а, б). При добавлении YM-58483 на фоне входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином, подавление депозависимого входа Ca^{2+} составило $80,2 \pm 15,3$ % ($n=7$), а при добавлении YM-58483 на фоне входа Ca^{2+} , индуцированного ЦПК - $90,1 \pm 14,9$ % ($n=7$). Это свидетельствует о том, что YM-58483 эффективно подавляет уже развившийся депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги.

Во втором варианте экспериментов мы исследовали влияние YM-58483 на уже активированные опустошением депо механизмы входа Ca^{2+} в макрофаги. Макрофаги стимулировали 10 мкМ ЦПК в номинально бескальциевой среде. После окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызванной ЦПК, клетки инкубировали в течение 5 мин в присутствии 5 мкМ YM-58483, после чего вводили 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду (рис. 1в). Обнаружено, что и в этих условиях YM-58483 вызывает значительное подавление входа Ca^{2+} (на $64,5 \pm 15,3$ %, $n=7$). Аналогичные результаты были получены с применением 0,5 мкМ тапсигаргина.

Полученные нами результаты согласуются с данными, представленными в литературе. Так, на Т-клетках линии Jurkat человека показано, что после опустошения Ca^{2+} -депо тапсигаргином, преинкубация клеток с YM-58483 (0,01-10 мкМ) в течение 1 мин до введения Ca^{2+} приводит к дозозависимому ингибированию депозависимого входа Ca^{2+} . Кроме того, YM-58483 подавляет уже развившийся депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином в Т-лимфоцитах [13].

На нейронах дорзальных корешков спинного мозга мыши обнаружено, что преинкубация клеток с YM-58483 не влияет на мобилизацию Ca^{2+} из депо, индуцированную тапсигаргином, но значительно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} . Кроме того, 1 мкМ YM-58483 практически полностью подавляет уже развившийся вход Ca^{2+} , вызванный ЦПК в нейронах мыши [17].

В эндотелиальных клетках проксимальных тубул почки человека (линия НК-2) ВТР2 подавляет развившийся депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином [18]. Обнаружено также, что добавление ВТР2 после опустошения Ca^{2+} -депо тапсигаргином и до введения в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} приводит к подавлению депозависимого входа Ca^{2+} в одонтобластах крысы [19] и лейкоцитарных базофилах крысы (линия RBL-1) [20].

Механизм действия YM-58483 на депозависимый вход Ca^{2+} до конца не изучен. YM-58483 может модулировать депозависимый вход Ca^{2+} , воздействуя на STIM1, прямо блокировать пору Orai1 каналов или влиять на взаимодействие белков STIM1 и Orai 1. Было показано, что ВТР2 не влияет на кластеризацию белков STIM1 и белков Orai1 [20, 21]. В связи с этим полагают, что YM-58483 ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , взаимодействуя с белками Orai1 [20, 22, 23].

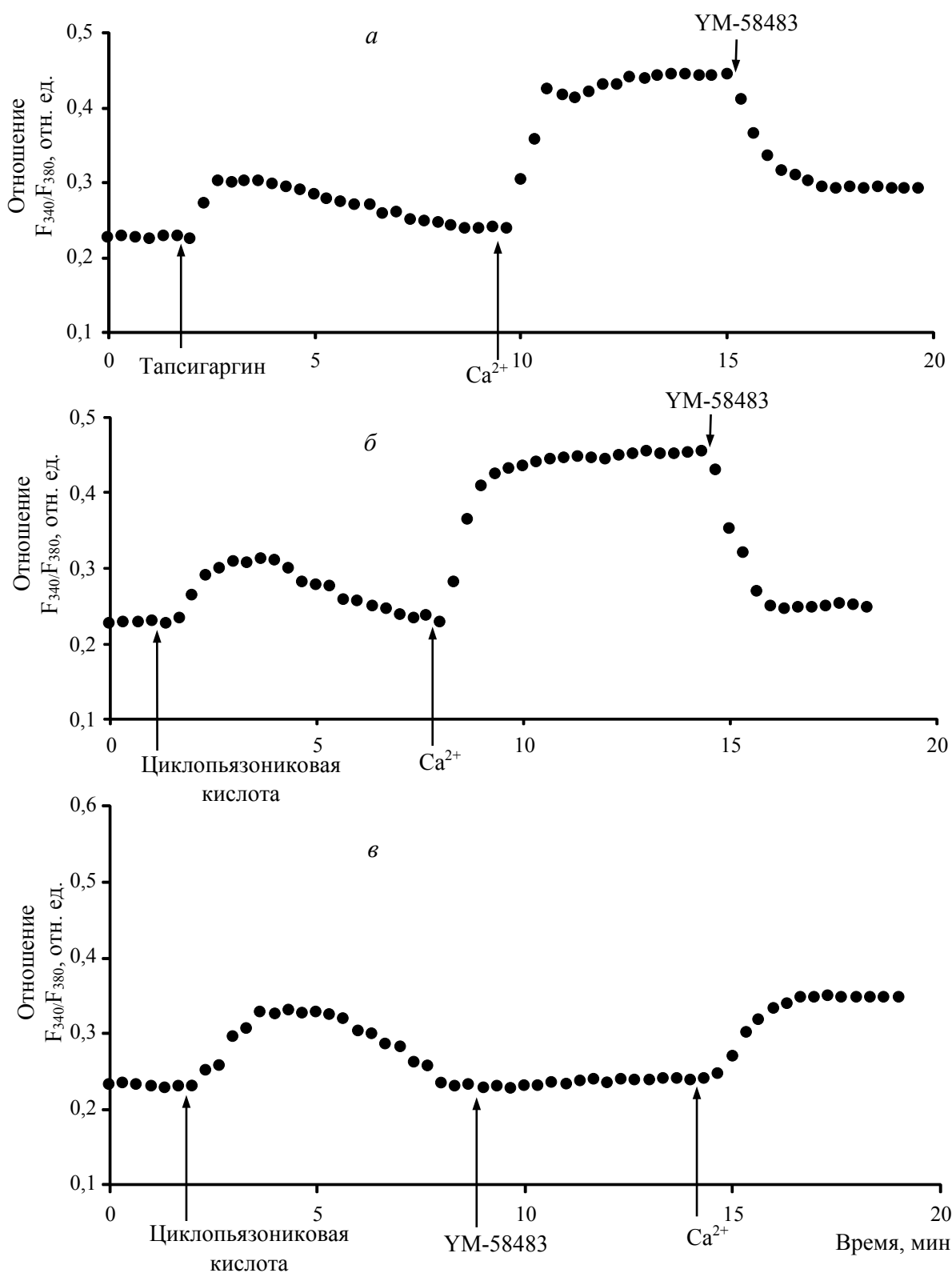


Рисунок 1. Влияние соединения YM-58483 на депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином и циклопязониковой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы. По оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fuga-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380}), отн. ед. *a*, *б* – макрофаги стимулировали 0,5 мкМ тапсигаргина (*a*) или 10 мкМ ЦПК (*б*) в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 5 мкМ YM-58483. *в* – клетки стимулировали 10 мкМ ЦПК в бескальциевой среде, после окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо добавляли 5 мкМ YM-58483; через 5 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6-7 независимых экспериментов.

Таким образом, мы впервые на перитонеальных макрофагах крыс показали, что производное пиразола YM-58483 эффективно ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} и является удобным фармакологическим инструментом для изучения депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, как и в клетках других типов.

Список литературы / References:

1. Putney J.W. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990. vol. 11, pp. 611-624.
2. Putney J.W. Store-operated calcium entry: a historical overview. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 981, pp. 205-214.
3. Putney J. W. The physiological function of store-operated calcium entry. *Neurochem. Res.*, 2011., vol. 36, pp. 1157-1165.
4. Prakriya M., Lewis R.S. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2015, vol. 95, pp. 1383-1436.
5. Vaca L. SOCIC: the store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium.*, 2010, vol. 47, pp. 199-209.
6. Moreno C., Vaca L. Microdomain organization of SOCE signaling. In: Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) pathways. *Wien: Springer-Verlag*, 2012, pp. 93-113.
7. Nwokonko R.M., Cai X., Loktionova N.A., Wang Y., Zhou Y., Gill D.L. The STIM-Orai pathway: conformational coupling between STIM and Orai in the activation of store-operated Ca^{2+} entry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 993, pp. 83-98.
8. Nguyen N.T., Han W., Cao W.-M., Wang Y., Wen S., Huang Y., Li M., Du L., Zhou Y. Store-operated calcium entry mediated by ORAI and STIM. *Comprehensive Physiol.*, 2018, vol. 8, pp. 981-1002.
9. Lunz V., Romanin C., Frischauf I. STIM1 activation of Orai1. *Cell Calcium*, 2019, vol. 77, pp. 29-38.
10. Shaw P.J., Feske St. Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system. *Front. Biosci.*, 2013, vol. 4, pp. 2253-2268.
11. Lacruz R.S., Feske St. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2015, vol. 1356, pp. 45-79.
12. Feske St. CRAC channels and disease – From human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs. *Cell Calcium*, 2019, vol. 80, pp. 112-116.
13. Ishikawa J., Ohga K., Yoshino T., Takezawa R., Ichikawa A., Kubota H., Yamada T. A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, pp. 4441-4449.
14. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют Ca^{2+} ответы, вызываемые трифлуоперазином, в макрофагах. *Цитология*, 2018, т. 60, номер 2, с. 116-121. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Arachidonic acid metabolism inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 315-322. (In Russ.)]
15. 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.
16. 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.
17. Xia J., Pan R., Gao X., Meucci O., Hu H. Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis. *J. Physiol.*, 2014, vol. 592.16, pp. 3443-3461.
18. Zeng B., Chen G.-L., Garcia-Vaz E., Bhandari S., Daskoulidou N., Berglund L. M., Jiang H., Hallett T., Zhou L.-P., Huang L., Xu Z.-H., Nair V., Nelson R. G., Ju W., Kretzler M., Atkin S. L., Gomez M.F., Xu Sh.-Z. ORAI channels are critical for receptor-mediated endocytosis of albumin. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, p. 1920, DOI: 10.1038/s41467-017-02094-y.
19. Kimura M., Nishi K., Higashikawa A., Ohyama S., Sakurai K., Tazaki M., Shibukawa Y. High pH-sensitive store-operated Ca^{2+} entry mediated by Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels in rat odontoblasts. *Front. Physiol.*, 2018, vol. 9, p. 443. DOI: 10.3389/fphys.2018.00443.
20. Rahman S., Rahman T. Unveiling some FDA-approved drugs as inhibitors of the store-operated Ca^{2+} entry pathway. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, p. 12881. DOI: 10.1038/s41598-017-13343-x.
21. Sadaghiani A.M., Lee S.M., Odegaard J.I., Leveson-Gower D.B., McPherson O.M., Novick P., Kim M.R., Koehler A.N., Negrin R., Dolmetsch R.E., Park Ch.Y. Identification of Orai1 channel inhibitors by using minimal functional domains to screen small molecule microarrays. *Chem. Biol.*, 2014, vol. 21, pp. 1278-1292.
22. Derler I., Schindl R., Fritsch R., Heftberger P., Riedl M.Ch., Begg M., House D., Romanin Ch. The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium*, 2013, vol. 53, pp. 139-151.
23. Jairaman A., Prakriya M. Molecular pharmacology of store-operated CRAC channels. *Channels*, 2013, vol. 7, pp. 402-414.

PYRAZOLE DERIVATIVE YM-58483 INHIBITS STORE-OPERATED Ca^{2+} ENTRY IN MACROPHAGESMilenina L.S.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹¹ Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia

² Kirov Medical Academy

Lebedeva str., 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia; e-mail: l.milenina@spbu.ru

Abstract. Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is the ubiquitous mechanism of regulated Ca^{2+} -entry in eukaryotic cells, activated upon depletion of intracellular Ca^{2+} -stores; participates in regulation of a wide range of cellular processes (exocytosis, gene expression, etc.). After discovery of the important role of SOCE in the pathogenesis of human diseases, such as severe combined immunodeficiency, nasal polyposis, etc., the researcher's interest in the development of low molecular weight blockers of SOCE increased. To determine the pharmacological characteristics of SOCE in macrophages, it seemed appropriate to study the effect of the pyrazole derivative compound YM-58483 on SOCE induced by endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid (CPA) in rat peritoneal macrophages. Using Fura-2AM microfluorimetry we found that upon addition of YM-58483 during the developed SOCE induced by thapsigargin or CPA almost complete inhibition of SOCE was observed. This suggests that YM-58483 effectively suppresses already developed SOCE in macrophages. In the second series of experiments, we investigated the effect of YM-58483 after Ca^{2+} entry mechanisms were activated by store depletion. Macrophages were stimulated by CPA or thapsigargin in Ca^{2+} -free medium. After Ca^{2+} -mobilization from the stores, the cells were incubated for 5 min with YM-58483, then Ca^{2+} entry into the cell was initiated. It was found that under these conditions, YM-58483 also causes a significant suppression of SOCE. Thus, we showed for the first time on rat peritoneal macrophages, that pyrazole derivative YM-58483 effectively inhibits SOCE and is a useful pharmacological tool for studying SOCE in macrophages, as well as in other cell types.

Key words: pyrazole derivative compound YM-58483, store-operated Ca^{2+} entry, peritoneal macrophages.