———— КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ ———

УДК 577.352.465

# сGMP-ЗАВИСИМАЯ ПРОТЕИНКИНАЗА МОДУЛИРУЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК К ПУРИНЕРГИЧЕСКИМ АГОНИСТАМ

© 2019 г. Е. Н. Кочкина<sup>*a*</sup>, П. Д. Котова<sup>*a*</sup>, Н. И. Еникашвили<sup>*b*</sup>, С. С. Колесников<sup>*a*</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Пущино, Московская обл., Россия, ул. Институтская, 3 <sup>b</sup>Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербуре, Россия, Тихорецкий пр., 4 \*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com Поступила в редакцию 04.12.2018 г. После доработки 11.01.2019 г. Принята к публикации 07.02.2019 г.

Используя флуоресцентную микроскопию и Ca<sup>2+</sup>-индикатор Fluo-4, анализировали Ca<sup>2+</sup>-сигнализацию, индуцированную ATP в мезенхимных стромальных клетках (MCK) жировой ткани человека. Ранее было установлено, что агонисты рецепторов GPCR мобилизуют Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме MCK, стимулируя продукцию IP<sub>3</sub> и активируя выброс депонированного Ca<sup>2+</sup> через рецепторы IP<sub>3</sub>. В данной работе показано, что в присутствии ингибитора фосфодиэстеразы IBMX увеличивается лаг-период Ca<sup>2+</sup>-ответов, и кривая доза-ответ для ATP сдвигается в сторону больших концентраций. При концентрации ATP, близкой к пороговой, MCK обратимо теряли чувствительность к агонисту в присутствии IBMX (50 мкМ). Ингибитор протеинкиназы A (H89) не влиял на эффекты IBMX, тогда как добавление в среду инкубации ингибитора протеинкиназы G (KT-5823) отменяло эффект IBMX. В присутствии KT-5823 существенно сокращался лаг-период ответов на ATP. Полученные данные свидетельствуют о том, что протеинкиназа G модулирует чувствительность MCK к ATP, вероятно, фосфорилируя рецепторы IP<sub>3</sub> cGMP-зависимым образом.

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, пуринорецепторы, Ca<sup>2+</sup>-сигнализация, циклические нуклеотиды

DOI: 10.1134/S0233475519040066

### введение

Разнообразные сигнальные молекулы, секретируемые клетками и распознаваемые поверхностными рецепторами, вовлечены в межклеточные коммуникации и аутокринную регуляцию клеточных функций. Среди них пурины (АТР, ADP, β-NAD, ADPR, cADPR, аденозин) и пиримидины (UTP, UDP) секретируются клетками или продуцируются внеклеточно эктонуклеотидазами фактически во всех тканях [1-3]. Ранее нами было показано, что мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани человека и поддерживаемые в первичной культуре, способны распознавать широкий спектр первичных медиаторов, включая норадреналин, ГАМК, ацетилхолин, серотонин и ряд других агонистов гептаспиральных рецепторов (G-protein coupled receptor, GPCR) [4]. Не вызывает сомнения то, что МСК из различных источников представляют собой клеточную популяцию, гетерогенную функционально и на молекулярном уровне [5, 6]. Так, первичная культура

296

МСК из жировой ткани человека содержит субпопуляции клеток, которые специфически чувствительны к какому-либо агонисту, способному стимулировать мобилизацию цитозольного Ca<sup>2+</sup> [4]. Наиболее многочисленной оказалась субпопуляция МСК, чувствительных к АТР и другим нуклеотидам [4, 7]. Интересной особенностью Са<sup>2+</sup>-ответов МСК на агонисты была их генерация по принципу "все или ничего". Иными словами, в малых дозах агонист не вызывал изменения Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме МСК, но при превышении пороговой концентрации инициировал глобальный Ca<sup>2+</sup>-сигнал, величина и кинетика которого слабо зависела от интенсивности стимуляции [4, 7]. Этот феномен находит рациональное объяснение, если предположить, что трансдукция Са<sup>2+</sup>мобилизующих агонистов в МСК протекает в две стадии [8]. Агонист первоначально вызывает локальный и градуальный Ca<sup>2+</sup>-сигнал, активируя GPCR-рецептор, сопряженный G-белком с фосфолипазой С, и инициируя продукцию ІР<sub>3</sub> с последующим выбросом депонированного Ca<sup>2+</sup> через рецепторы IP<sub>3</sub>. При достижении порогового уровня локальный Ca<sup>2+</sup>-сигнал инициирует лавинообразный выброс Ca<sup>2+</sup> по механизму CICR (Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release), который играет ключевую роль в превращении локальных Ca<sup>2+</sup>-сигналов в глобальные, а также в распространении Ca<sup>2+</sup>-волн в цитоплазме клеток [9, 10]. В основе феномена CICR лежит положительная обратная связь по Ca<sup>2+</sup>, которой охватывается высвобождение Ca<sup>2+</sup> из Ca<sup>2+</sup>-депо через IP<sub>3</sub>- и рианодиновые рецепторы, активность которых стимулируется цитоплазматическим Ca<sup>2+</sup> в определенном диапазоне концентраций [11, 12].

Одним из существенных аспектов изучения этой двухстадийной системы трансдукции агонистов в МСК является вопрос о том, каким образом регулируется порог инициации СІСЯ и амплитуда результирующего глобального Ca<sup>2+</sup>-сигнала. Мы анализировали эту проблему на примере пуринергической системы МСК и, в частности, обнаружили, что сGMP-зависимое фосфорилирование может играть существенную роль в регуляции чувствительности МСК к агонистам.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали МСК человека, предоставленные Покровским банком стволовых клеток (С.-Петербург). Паспортизированные образцы первичных культур МСК получены из жировой ткани здоровых доноров при наличии информированного согласия в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 11 августа 2017 г. № 517н и рекомендациями Хельсинкской декларации (Хельсинкская декларация WMA об этике. Принципы медицинских исследований с участием людей, с поправками, внесенными 64-й Генеральной Ассамблеей WMA, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.).

МСК культивировали в 12-луночном планшете (Corning, США) в среде Advance Stem (Hy-Clone, CIIIA) c 10% Advance Stem Supplement (Hy-Clone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. При достижении 80% монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma, США) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем рассаживали в соотношении 1:4. В экспериментах использовали МСК второго-четвертого пассажей. Перед экспериментом клетки двукратно промывали раствором Версена (Sigma), инкубировали в растворе трипсина (Sigma), ресуспендировали в полной ростовой среде и помещали в пробирку, затем концентрировали на дне пробирки центрифугированием. Клетки прикрепляли с помощью адгезивного материала Cell Так на дно фотометрической камеры, представляющей собой покровное стекло Menzel-Glaser с пластиковыми

бортиками, и затем загружали флуоресцентным  $Ca^{2+}$ -зондом Fluo-4. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23–25°C) в присутствии проникающего аналога Fluo-4AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes, CША) в течение 20 мин. Затем клетки отмывали раствором, содержащим (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgSO<sub>4</sub> – 0.8, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10, в котором их выдерживали при 4°C в течение 40 мин.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Carl Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan Neo-Fluar 20×/0.75 и цифровой ЕМССД камерой Luca-R (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходяшего света, микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив с использованием осветителя на сверхъярких диодах (340-535 нм) [13]. Флуоресценцию Fluo-4 возбуждали при длине волны  $480 \pm 5$  нм, эмиссию зонда регистрировали в области 525 ± 20 нм. Последовательные флуоресцентные изображения клеток регистрировали 1 раз в секунду. Изменение свободного Ca<sup>2+</sup> в цитозоле клеток оценивали по отношению  $\Delta F/F_0$ , где  $\Delta F = F_0 - F$ , F и  $F_0$  – текущая интенсивность эмиссии Fluo-4 и его эмиссия в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений проводили с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США). Использованные в экспериментах соли, HEPES, глюкозу и ATP приобретали у Sigma-Aldrich (США): IBMX, H89 и KT-5823 получены от Tocris (Великобритания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чувствительность МСК к АТР оценивали по Ca<sup>2+</sup>-сигналам, инициируемым данным нуклеотидом в цитоплазме клеток. В общей сложности в популяции МСК, исследованной в работе, 78 клеток (31%) идентифицированы как пуринергические, исходя из того, что в них наблюдалась мобилизация Ca<sup>2+</sup> в ответ на аппликацию АТР (0.5–5 мкМ) (рис. 1*a*). Хотя чувствительность МСК к АТР несколько варьировала от клетки к клетке, в большинстве из них (~90%) 1.5 мкМ АТР вызывал массированную мобилизацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> (рис. 1*a*, 1*б*). При этом Ca<sup>2+</sup>-ответы на кратковременную аппликацию АТР в дозах 1.5–5 мкМ были сходны кинетически и по амплитуде (рис. 1*a*).

Помимо основного активатора IP<sub>3</sub>, активность рецепторов IP<sub>3</sub> регулируется Ca<sup>2+</sup>, ATP, Ca<sup>2+</sup>-связывающими белками (CaBP1, CaM) и фосфорилированием при участии ряда протеинкиназ



**Рис. 1.** Ответы МСК на АТР в различных условиях. *a* – Репрезентативная синхронная регистрация Ca<sup>2+</sup>-ответов двух клеток на АТР, апплицируемого при варьируемых концентрациях в контроле и в присутствии 50 мкМ IBMX. Здесь и ниже моменты аппликации обозначены горизонтальными отрезками выше экспериментальной кривой. *б* – Распределение клеток в популяции пуринергических МСК (*n* = 54), отвечающих на АТР в указанной концентрации в контроле и присутствии 50 мкМ IBMX. *в* – репрезентативная регистрация са в троле и в присутствии 50 мкМ IBMX. *в* – репрезентативная регистрация ответов клетки на 1.5 мкМ АТР в контроле и в присутствии ингибиторов. *е* – синхронная регистрация Ca<sup>2+</sup>-ответов трех клеток на 1.5 мкМ АТР в контроле и в присутствии 1 мкМ KT-5823. *д* – Влияние ингибировния РКG на характерное время задержки  $\tau_d$  (верхняя панель) ответов МСК на 1.5 мкМ АТР. *д* – Усредненные задержки, полученные для KT-5823-чувствительных МСК (*n* = 9) в контроле и в присутствии 1 мкМ KT-5823. Символ \* означает статистически значимое различие (*t*-критерий Стьюдента, *p* < 0.05). *e* – Усредненные задержки, полученные для KT-5823-нечувствительных МСК (*n* = 4) в контроле и в присутствии 1 мкМ KT-5823. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

(PKA, PKC, PKG, Akt, mTOR) [14, 15]. Участие в том или ином физиологическом процессе протеинкиназ, регулируемых сАМР (сАМР-dependent protein kinase, PKA) и cGMP (cGMP-dependent protein kinase, PKG), можно установить достаточно легко, поскольку к настоящему моменту разработан обширный фармакологический инструментарий для манипуляции активностью циклаз, фосфодиэстераз (PDE) и собственно PKA и PKG. В ряде экспериментов мы использовали ІВМХ – неспецифический ингибитор PDE, ожидаемым клеточным эффектом которого должно быть увеличение внутриклеточных концентраций как сАМР, так и сGMP. Оказалось, что при концентрации 50 мкМ, близкой по порядку величины к IC<sub>50</sub>, для блокирования различных изоформ PDE (www.tocris.com), IBMX оказывал значимое влияние на чувствительность МСК к АТР, увеличивая пороговую концентрацию и несколько меняя зависимость амплитуды Ca<sup>2+</sup>-ответов от концентрации ATP (рис. 1*a*). Так, среди пуринергических MCK (n = 54), которые стимулировались АТР в концентрации 0.5-5 мкМ, 3 и 16 клеток ответили на агонист, использованный в дозах 0.5 и 1 мкМ соответственно (рис. 16). В присутствии 50 мкМ IBMX АТР инициировал Са<sup>2+</sup>-сигналы в МСК, только начиная с дозы 1.5 мкМ (рис. 1б). При этом в контроле за редким исключением (рис. 1*а*, верхняя панель) амплитуды Са<sup>2+</sup>-ответов были примерно одинаковы при всех дозах АТР, т.е. следовали принципу "все или ничего". В присутствии IBMX наблюдалась более градуальная зависимость доза-ответ (рис. 1а).

Учитывая, что наиболее универсальный путь регуляции клеточных функций циклическими нуклеотидами – это сАМР/сGMР-зависимое фосфорилирование различных белков, мы анализировали эффекты специфичных ингибиторов РКА и РКG, а именно Н89 и КТ-5823 соответственно. В общей сложности проанализировано 13 клеток, которые генерировали Са<sup>2+</sup>-ответы на 1.5 мкМ АТР, и во всех случаях 50 мкМ ІВМХ обратимо ингибировал клеточные ответы (рис. 1*в*). На фоне IBMX добавление во внеклеточный раствор Н89 (2-4 мкМ) не восстанавливало чувствительность клеток к 1.5 мкМ АТР (рис. 16). Между тем, если МСК инкубировали в присутствии комбинации ингибиторов IBMX (50 мкМ) + Н89 (4 мкМ) + KT-5823 (1 мкМ), то они сохраняли способность генерировать нормальные по форме и кинетике Ca<sup>2+</sup>-сигналы в ответ на 1.5 мкМ АТР (рис. 1в). Это свидетельствовало о том, что ингибиторный эффект IBMX обусловлен увеличением уровня циклических нуклеотидов в цитоплазме МСК и, как следствие, увеличением активности РКА и РКG. Последняя, видимо, играла ключевую роль в эффектах этого ингибитора PDE.

В ряде экспериментов мы анализировали функциональные последствия ингибирования РКС с использованием пуринергических МСК. Следует отметить, что МСК генерируют Ca<sup>2+</sup>-ответы на агонисты с заметной задержкой в пределах 15-100 с обратно пропорциональной зависимостью от концентрации лиганда [8]. Среди исследованных в данной серии пуринергических MCK (n = 17) 13 были достаточно чувствительны, так что 1.5 мкМ АТР инициировал высокоамплитудные Ca<sup>2+</sup> -ответы с характерной задержкой (рис. 1г, клетки 1 и 2). При аппликации 1 мкМ КТ-5823 в 9 из 13 МСК наблюдалось существенно уменьшение характерного времени задержки  $\tau_d$ , которое определялось как время достижения полуответа от момента аппликации стимула (рис. 1г, клетка 1). Для таких КТ-5823-чувствительных клеток  $\tau_d$  в среднем составляло 72 ± 14 с в контроле и снижалось до 45 ± 10 с под действием ингибитора РКG (рис. 1 $\partial$ ). В четырех клетках 1 мкМ КТ-5823 не оказывал существенного влияния на задержку (рис. 1г, клетка 2; рис. 1е). В таких клетках характерное время задержки в контроле составило 38 ± 13 с, т.е. было статистически неотличимо от  $45 \pm 11$  с, полученных для КТ-5823-чувствительных клеток в присутствии ингибитора (рис. 1 $\partial$ ). Этот факт указывал на возможность того, что в КТ-5823-нечувствительных МСК уровень сGMP в покое был низок, следствием чего была низкая активность PKG. В этом случае ингибирование РКС не должно было приводить и не приводило к значимым изменениям параметров ответов на АТР. Следует также отметить, что четыре клетки не отвечали на 1.5 мкМ АТР в контроле, но их чувствительность к нуклеотиду обратимо восстанавливалась после прединкубации в среде, содержащей 1 мкМ КТ-5823 (рис. 1*г*, клетка 3). В своей совокупности полученные данные (рис. 1*в*-1*е*) свидетельствуют о том, что трансдукция АТР в МСК модулируется сGMP-зависимым фосфорилированием.

В заключение отметим, что в МСК из жировой ткани человека генерация Ca<sup>2+</sup>-ответов на агонисты основана практически исключительно на высвобождении депонированного Ca<sup>2+</sup> через рецепторы ІР<sub>3</sub> [8]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том. что РКС может фосфорилировать рецепторы IP<sub>3</sub> типа 1 (IP3R1) [16, 17] и типа 3 [18]. При этом сGMP-зависимое фосфорилирование IP3R1 сопровождается уменьшением IP3-зависмого выброса депонированного Ca<sup>2+</sup> [17]. В гладкомышечных клетках IP3R1 и РКG найдены в комплексе с белком IRAG (IP<sub>3</sub>R-associated cGMP kinase substrate), сGMP-зависимое фосфорилирование которого ассоциировано с подавлением IP3-зависмого выброса депонированного Ca<sup>2+</sup> [20]. Таким образом, описанная в цитированных работах РКG-зависимая регуляция IP3-зависмого выброса Ca<sup>2+</sup> сводится к его подавлению. Если в МСК РКС-регулируемый IP3R1 играет доминантную роль в генерации первоначального локального агонист-зависимого Са<sup>2+</sup>-сигнала, то можно ожидать, что его скорость должна увеличиваться при ингибировании РКG. Как результат, в присутствии КТ-5823 этот локальный Ca<sup>2+</sup>-сигнал должен раньше достигать порога, при котором запускается CICR, формирующий глобальный Ca<sup>2+</sup>-сигнал, детектируемый в эксперименте (рис. 1). Это эквивалентно наблюдаемому уменьшению задержки (рис. 1г. клетка 1). Адекватность этой модели требует дальнейшей верификации.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Burnstock G. 2014. Purinergic signalling: From discovery to current developments, *Exp. Physiol.* **99**, 16–34.
- Verkhratsky A., Burnstock G. 2014. Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *Bio-Essays.* 36, 697–705.
- 3. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Sign.* **8**, 437–502.
- 4. 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. 2014. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 1899–1908.

- Galle J., Hoffmann M., Krinner A. 2013. Mesenchymal stem cell heterogeneity and ageing *in vitro*: A model approach. In: *Computational modeling in tissue engineering*. Ed. Geris L. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 183–205.
- Phinney D.G. 2012. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy. *J. Cell. Biochem.* 113, 2806–2812.
- Kotova P.D., Bystrova M.F., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Sysoeva V.Yu., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2018. Coupling of P2Y receptors to Ca<sup>2+</sup> mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
- Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kochkina E.N., Ivashin D.S., Kolesnikov S.S. 2018. Calcium signaling initiated by agonists in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. In: *Calcium and Signal Transduction*. Ed. Buchholz J.N., London: IntechOpen, P. 139–163.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. 2003. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- Iino M. 2010. Spatiotemporal dynamics of Ca<sup>2+</sup> signaling and its physiological roles. *Proc. Japan Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 86, 244–256.
- 11. Rios E. 2018. Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J. Gen. Physiol.* **150**, 521–537.
- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* 96, 1261–1296.
- 13. Хохлов А.А., Романов Р.А., Зубов Б.В., Пашинин А.Д., Колесников С.С. 2007. Осветитель на излучающих

диодах для микрофотометрических исследований клеток. Приборы и техника эксперимента. **3**, 128–131.

- Shah S.Z.A., Zhao D., Khan S.H., Yang L. 2015. Regulatory mechanisms of endoplasmic reticulum resident IP3 receptors. *J. Mol. Neurosci.* 56, 938–948.
- Vanderheyden V., Devogelaere B., Missiaen L., De Smedt H., Bultynck G., Parys J.B. 2009. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim. Biophis. Acta* **1793**, 959–970.
- Komalavilas P., Lincoln T.M. 1994. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 269. 8701–8707.
- Murthy K.S., Zhou H. 2003. Selective phosphorylation of the IP3R-I *in vivo* by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Gastr. Liver Physiol.* 284, G221–G230.
- Soulsby M.D., Wojcikiewicz R.J. 2005. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase at three sites. *Biochem. J.* 392, 493–497.
- Tertyshnikova T., Yan X., Fein A. 1998. cGMP inhibits IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J. Physiol.* 512, 89–96.
- 20. Ammendola A., Geiselhoringer A., Hofmann F., Schlossmann J. 2001. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Iβ. J. Biol. Chem. 276, 24153–24159.

## cGMP-Dependent Protein Kinase Modulates the Sensitivity of Mesenchymal Stromal Cells to Purinergic Agonists

E. N. Kochkina<sup>1</sup>, P. D. Kotova<sup>1</sup>, N. I. Enukashvili<sup>2</sup>, S. S. Kolesnikov<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia <sup>2</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St.-Petersburg, 194064 Russia \*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Calcium signaling induced by ATP in mesemchymal stromal cells (MSCs) from the human adipose tissue was studied by using the Ca<sup>2+</sup> dye Fluo-4 and Ca<sup>2+</sup> imaging. Previously, purinergic agonists have been found to mobilize Ca<sup>2+</sup> in the MSC cytoplasm by stimulating IP<sub>3</sub> production and triggering Ca<sup>2+</sup> release from Ca<sup>2+</sup> stores via IP<sub>3</sub> receptors. Here we demonstrated that the phosphodiesterase inhibitor IBMX increased a lag period of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> responses and also shifted the dose–response curve to higher concentrations. When stimulated by ATP at doses close to the threshold concentration, MSCs became irresponsive in the presence of 50  $\mu$ M IBMX. The PKA inhibitor H89 did not restore MSC responsivity to ATP lost in the presence of IBMX, while the application of KT-5823, a PKG inhibitor, canceled the inhibitory effect of IBMX. Yet, the cell treatment with KT-5823 resulted in a marked decrease in the ATP response delay. Altogether, the data obtained suggest that PKG modulates the MSC sensitivity to ATP, presumably by phosphorylating IP<sub>3</sub> receptors in a cGMP-dependent manner.

Keywords: mesenchymal stromal cells, purinoreceptors, Ca<sup>2+</sup> signaling, cyclic nucleotides