

УДК 577.352.465

ИЗОФОРМЫ PI_3 -КИНАЗЫ В ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2020 г. П. Д. Котова^а, *, М. Ф. Быстрова^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: polinakotova88@gmail.com

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.

После доработки 28.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Методами транскриптомного анализа в популяции мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека выявлены транскрипты генов, кодирующих α , β и δ изоформы PI_3 -киназы класса I; изоформа $PI_3K\gamma$ в МСК не экспрессируется. Участие различных изоформ PI_3 -киназы в пуринаргической трансдукции в МСК анализировали, используя флуоресцентную микроскопию и Ca^{2+} -индикатор Fluo-4. Показано, что Ca^{2+} -ответы МСК на АТФ подавляются в присутствии ингибиторов $PI_3K\alpha$ и $PI_3K\beta$ (GSK 1059615 и AZD 6482 соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что в большинстве (69%) пуринаргических МСК для полноценной генерации Ca^{2+} -ответов на АТФ требуется активная $PI_3K\alpha$. При этом в небольшой (15%) субпопуляции этих клеток изоформа $PI_3K\beta$ также вовлечена в пуринаргическую трансдукцию.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, Ca^{2+} -сигнализация, пуринаргическая трансдукция, PI_3 -киназа

DOI: 10.31857/S0233475520020073

ВВЕДЕНИЕ

Семейство PI_3 -киназ представляет собой группу киназ, способных фосфолилировать некоторые белковые, но преимущественно липидные субстраты, а именно фосфатидилинозитолы (phosphatidylinositols, PtdIns). У млекопитающих идентифицировано 8 изоформ PI_3 -киназ, и на основе их функциональных и структурных свойств выделено 3 класса [1]. PI_3 -киназы класса I (PI_3KI) катализируют фосфорилирование сигнального липида фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PtdIns(4,5)P₂), продуцируя PtdIns(3,4,5)P₃, также известный как PIP_3 . PI_3 -киназы класса II генерируют PtdIns(3,4)P₂ и PtdIns3P из PtdIns. PI_3 -киназы класса III синтезируют PtdIns3P из PtdIns. Связываясь с РН-доменами различных эффекторных белков, PIP_3 модулирует их локализацию и активность, регулируя широкий ряд биологических процессов, включая клеточный цикл, миграцию клеток и ряд других. Таким образом, PI_3KI действуют как классический посредник передачи сигнала от рецепторов плазматической мембраны внутрь клетки, они вовлечены в передачу сигналов от тирозинкиназных рецепторов, G-белок-связанных рецепторов и малых GTPаз. Представители II и III классов PI_3 -киназ в основном регулируют мембранный

транспорт и лишь косвенно влияют на сигнальные процессы [2].

У млекопитающих подсемейство PI_3KI представлено четырьмя членами: $PI_3K\alpha$, $PI_3K\beta$, $PI_3K\gamma$ и $PI_3K\delta$ в соответствии с их каталитическими субъединицами p110 α , β , γ , и δ [1]. Уровни экспрессии изоформ PI_3KI варьируют в различных тканях, p110 α и p110 β присутствуют в клетках многих тканей, тогда как p110 γ и p110 δ на высоком уровне экспрессируются в лейкоцитах, а в других тканях присутствуют в меньших количествах. Функции изоформ PI_3KI также различны, например, ключевую роль в инсулиновой сигнализации играет $PI_3K\alpha$ [3], но не $PI_3K\beta$ [4], в ангиогенезе – $PI_3K\alpha$, сперматогенезе – $PI_3K\beta$ [5], в иммунных процессах – $PI_3K\gamma$ и $PI_3K\delta$ [6].

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию, которая содержит стволовые клетки, способные дифференцироваться и давать начало костной, хрящевой и жировой тканям. МСК присутствуют практически во всех тканях взрослого организма, однако наиболее доступными для их выделения источниками являются костный мозг и жировая ткань. МСК обладают высоким потенциалом для использования в регенеративной и клеточной медицине, и изучение их рецепторных и сигнальных систем является важной задачей на пути к более

глубокому пониманию физиологии этих клеток. Роль различных изоформ PI_3 -киназ в физиологии МСК на сегодняшний день в целом не очерчена, и в литературе имеются лишь разрозненные сведения об их вкладе в функционирование МСК. Так, например, показано, что уровень экспрессии белков PI_3K/Akt каскада повышается в процессе адипогенной дифференцировки, а ингибиторы PI_3 -киназ понижают ее эффективность, что свидетельствует о важной роли PI_3 -киназного пути для адипогенеза [7, 8]. При этом PI_3K/Akt -путь также вовлечен и в остеогенную дифференцировку МСК [9].

Ранее нами было показано, что в МСК, выделенных из жировой ткани человека, присутствует субпопуляция клеток, в которых аппликации экстраклеточного АТФ вызывают мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} . Ответы на АТФ генерируются по принципу “все или ничего”, и механизм их генерации включает две стадии. На первой – активированный АТФ $P2Y$ -рецептор посредством G-белка стимулирует фосфолипазу C, которая гидролизует фосфолипид PIP_2 и продуцирует два вторичных медиатора – IP_3 и DAG. В свою очередь, IP_3 стимулирует IP_3 -рецепторы, функционирующие в Ca^{2+} -депо, что приводит к выбросу депонированного Ca^{2+} , зависящему от концентрации агониста. Вторая стадия наблюдается, только если внешний стимул достигает некоторой пороговой величины, при которой первоначальный локальный внутриклеточный Ca^{2+} -сигнал достигает определенного уровня, достаточного, чтобы инициировать Ca^{2+} -индуцированный выброс депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR), развивающийся за счет стимуляции ионами Ca^{2+} IP_3 -рецепторов [10]. Механизм CICR продуцирует глобальный Ca^{2+} -ответ, не зависящий от концентрации агониста [11].

Одним из существенных вопросов, возникающих при изучении этой системы, является вопрос о том, какие внутриклеточные регуляторные системы определяют порог возникновения CICR как ключевого механизма усиления в каскаде трансдукции агонистов в МСК. Как было показано нами ранее, Ca^{2+} -ответы пуриnergических МСК на нуклеотиды модулируются и подавляются в присутствии LY294002, являющегося ингибитором PI_3 -киназы (phosphoinositide 3-kinase) [12]. Хотя это свидетельствовало о том, что PI_3 -киназа контролирует пуриnergическую трансдукцию в МСК, механизмы этого явления остались невыясненными. Описанные ниже эксперименты представляют собой попытку очертить роль различных изоформ PI_3 -киназы в этом процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение клеток. В данной работе исследовали МСК из жировой ткани человека, выделение и

поддержание первичной культуры которых подробно описано ранее [13]. Выделенные МСК культивировали в 12-луночной планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10% Advance Stem Supplement (HyClone). При достижении 80% монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем рассаживали. В экспериментах использовали МСК 2–4 пассажей.

Микрофотометрия. Клетки прикрепляли с помощью адгезивного материала Cell Tak на дно фотометрической камеры и инкубировали при комнатной температуре ($23-25^\circ C$) в присутствии проникающего через мембрану препарата Fluo-4AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes, США) в течение 20 мин, что обеспечивало загрузку клеток Ca^{2+} -зондом Fluo-4. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором, в котором их выдерживали 40 мин при $4^\circ C$. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology, США). Флуоресценцию клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждали при длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссию регистрировали в области 535 ± 20 нм. Изменение концентрации цитозольного Ca^{2+} в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$), 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 осуществлялся с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США). Используемые в экспериментах соли, HEPES, глюкозу и АТФ приобретали у Sigma–Aldrich (США); специфические ингибиторы $PI_3K\alpha$ – GSK 1059615, $PI_3K\beta$ – AZD 6482, $PI_3K\gamma$ – AS 605240 были получены от Tocris (Великобритания), $PI_3K\delta$ – IC 87114 – Calbiochem (США).

Молекулярная биология. ОТ-ПЦР. Тотальная РНК выделялась из суспензии МСК, содержащей до 10^6 клеток, с использованием набора GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). Удаление остатков геномной ДНК из образцов РНК и реакция обратной транскрипции проводились с использованием набора SuperScript IV VIL0 Master Mix with ezDNAse enzyme в присутствии случайных, гексамерных праймеров по протоколу производителя (Invitrogene). Для ПЦР использовалась готовая смесь ScreenMix-HS (Евроген) и следующие ген-специфические праймеры, комплементарные всем возможным тран-

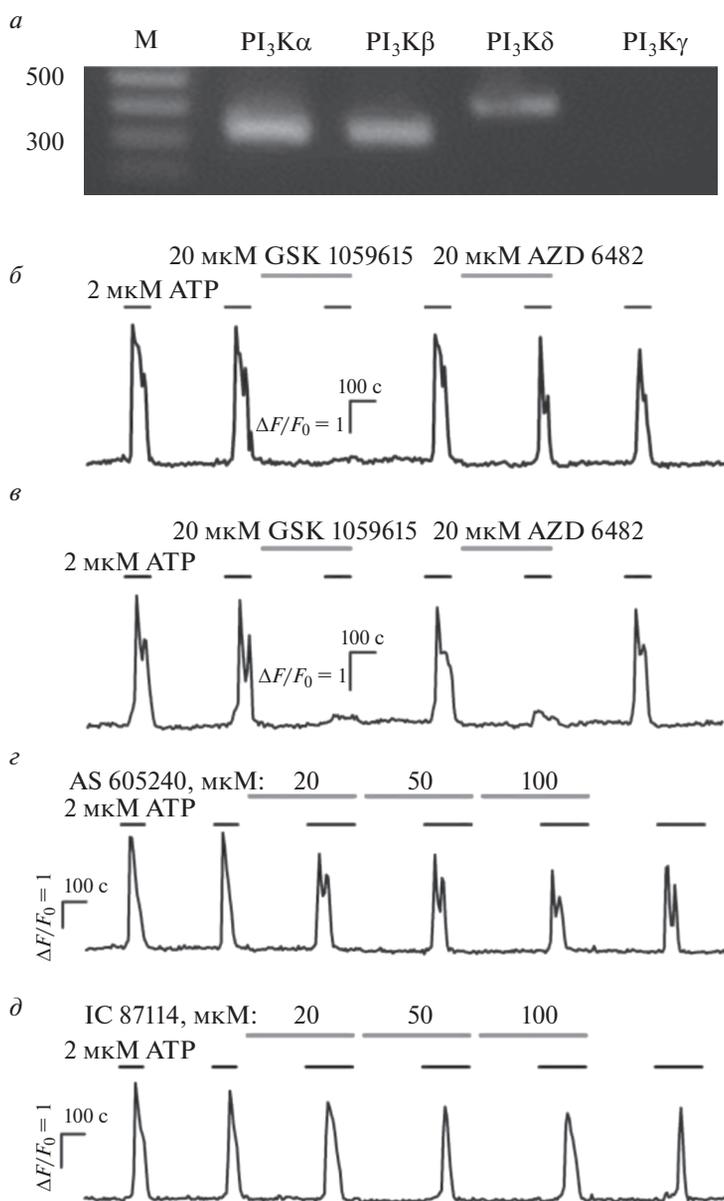


Рис. 1. Функциональная экспрессия изоформ PI₃-киназы в МСК.

a – Транскрипты генов PI₃Kα, PI₃Kβ и PI₃Kδ, идентифицированные в препаратах МСК (*n* = 3). Ампликоны ожидаемого размера 306, 316 и 407 п.н. соответствуют PI₃Kα, PI₃Kβ и PI₃Kδ. Транскрипты гена PI₃Kγ (309 п.н.) не детектировались. В качестве маркеров молекулярных весов (М) использовался GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Агарозный гель (1.3%) окрашивался бромидом этидия.

б, в – Репрезентативные регистрации Ca²⁺-ответов клетки на 2 мкМ АТФ в контроле и в присутствии ингибиторов PI₃Kα GSK 1059615 (20 мкМ) и PI₃Kβ AZD 6482 (20 мкМ) (*б*, *n* = 52; *в*, *n* = 11). Моменты аппликации АТФ и ингибиторов обозначены горизонтальными отрезками выше экспериментальной кривой.

г – Репрезентативный (*n* = 27) ответ клетки на 2 мкМ АТФ в контроле и в присутствии ингибитора PI₃Kγ AS 605240 в концентрациях 20–100 мкМ.

д – Репрезентативный (*n* = 33) ответ клетки на 2 мкМ АТФ в контроле и присутствии ингибитора PI₃Kδ IC87114 в концентрациях 20–100 мкМ. Во всех случаях изменение внутриклеточного Ca²⁺ характеризовали относительной флуоресценцией Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, *F* – текущая интенсивность флуоресценции, *F*₀ – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

скрипт-вариантам генов, кодирующих каталитические субъединицы PI3K, включая p110α (5'-GACAAGAACAAGGAGAAATATATG-3', 5'-AACACATCTCCTGAAACCTC-3'),

(5'-GTCAAAAAAAGCTGGCCAGCTC-3', 5'-TTC-CCTAATGCAAGAGAGTCC-3'), P110δ (5'-ATCT-TTAAGAACGGGGATGAC-3', 5'-AAAATCAAT-GTGGAACAGCTG-3'), P110γ (5'-AATCCCCTA-

CTGAAGAAAAGTTTC-3', 5'-TAAGCCTTAACA-CAGATGTCC-3'). Ожидаемый размер продуктов был 306, 316, 407 и 309 п.н. соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе проводились эксперименты с применением транскриптомного анализа и микрофотометрии, чтобы выявить изоформы PI₃KI, функционирующие в МСК. С этой целью в препаратах РНК, выделенной из суспензии МСК, осуществляли поиск транскриптов генов, кодирующих каталитические субъединицы PI₃KI, включая PI₃K α , PI₃K β , PI₃K δ и PI₃K γ . Для этого использовали метод ОТ-ПЦР и ген-специфичные праймеры, которые были сконструированы на основе имеющихся в базе данных последовательностей человеческих генов PI₃KI и были комплементарны всем возможным транскрипт-вариантам этих генов. Оказалось, что все три образца РНК, полученные независимо из трех препаратов МСК, содержали транскрипты генов PI₃K α , PI₃K β , PI₃K δ , в то время как транскрипты гена PI₃K γ не были обнаружены (рис. 1а).

В дополнение к транскриптомному анализу проводили функциональные тесты. МСК нагружали Ca²⁺-зондом Fluo-4, и их чувствительность к АТР оценивали по Ca²⁺-сигналам, инициируемым этим нуклеотидом в цитоплазме клеток. В общей сложности в нами было проанализировано 398 МСК, из которых 124 (31%) были идентифицированы как пуринаргические, поскольку в этих клетках регистрировалось повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ в ответ на аппликацию АТР (1–5 мкМ) (рис. 1б–1д). Как оказалось, ингибитор PI₃K α (GSK 1059615) блокировал ответы МСК на АТР в 52 (69%) из 75 протестированных в данном типе эксперимента пуринаргических МСК (рис. 1б), при этом в 11 клетках (15%) ингибитор PI₃K β (AZD 6482) также подавлял ответы на АТР (рис. 1в). В то же время ингибитор PI₃K γ (AS 605240) не влиял на способность МСК генерировать Ca²⁺-ответы на АТР в широком диапазоне концентраций (20–100 мкМ) ($n = 27$) (рис. 1з). Этот факт вполне согласуется с данными экспрессионного анализа об отсутствии транскриптов PI₃K γ в препаратах РНК, выделенных из популяции МСК ($n = 3$) (рис. 1а). Хотя транскрипты гена PI₃K δ детектировались (рис. 1а), роль этой изоформы PI₃K в генерации ответов на АТР выявлена не была – в присутствии ингибитора PI₃K δ (IC 87114, 20–100 мкМ) ($n = 33$) МСК генерировали полноценные Ca²⁺-ответы на АТР (рис. 1д). Вероятно, PI₃K δ проявляет свою регуляторную активность в других внутриклеточных процессах, не связанных с генерацией агонист-индуцированных Ca²⁺-ответов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в большинстве пуринаргических МСК для полноценной генерации Ca²⁺-ответов на АТР требуется активная PI₃K α . При этом в небольшой субпопуляции этих клеток PI₃K β -изоформа также вовлечена в пуринаргическую трансдукцию.

Хотя приведенные данные не позволяют в деталях определить роль выявленных изоформ PI₃K класса I, интересным является тот факт, что PI₃K α , PI₃K β , PI₃K δ принадлежат к подклассу А, представители которого, как правило, сопряжены с тирозинкиназными рецепторами. Изоформа PI₃K γ , которая не была обнаружена нами в МСК, является единственным представителем PI₃K класса IB, который преимущественно активируется $\beta\gamma$ -субъединицей GPCR-рецепторов [1]. Эти факты указывают на потенциальную возможность того, что сигнальные процессы, инициируемые в МСК агонистами GPCR-рецепторов, могут модулироваться при участии тирозинкиназных рецепторов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 17-75-10127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jean S., Kiger A.A. 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 923–928.
2. Bilanges B., Posor Y., Vanhaesebroeck B. 2019. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20** (9), 515–534.
3. Knight Z.A., Gonzalez B., Feldman M.E., Zunder E.R., Goldenberg D.D., Williams O., Loewith R., Stokoe D., Balla A., Toth B., Balla T., Weiss W.A., Williams R.L., Shokat K.M. 2006. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell.* **125** (4), 733–747.
4. Nylander S., Kull B., Bjorkman J.A., Ulvinge J.C., Oakes N., Emanuelsson B.M., Andersson M., Skarby T., Inghardt T., Fjellstrom O., Gustafsson D. 2012. Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) β : Effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3K β inhibitor. *J. Thromb. Haemost.* **10** (10), 2127–2136.
5. Guillermet-Guibert J., Smith L.B., Halet G., Whitehead M.A., Pearce W., Rebourcet D., Leon K., Crepieux P., Nock G., Stromstedt M., Enerback M., Chelala C., Graupera M., Carroll J., Cosulich S., Saunders P.T., Huhtaniemi I., Vanhaesebroeck B. 2015. Novel role for p110 β PI3-kinase in male fertility through regulation of androgen receptor activity in Sertoli cells. *PLoS Genet.* **11** (7), e1005304.
6. So L., Fruman D.A. 2012. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: New developments and therapeutic advances. *Biochem. J.* **442** (3), 465–481.
7. Yu W., Chen Z., Zhang J., Zhang L., Ke H., Huang L., Peng Y., Zhang X., Li S., Lahn B.T., Xiang A.P. 2008. Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Biochem.* **310** (1–2), 11–18.

8. Cervelli V., Scioli M.G., Gentile P., Doldo E., Bonanno E., Spagnoli L.G., Orlandi A. 2012. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl. Med.* **1** (3), 206–220.
9. Wu R., Ruan J., Sun Y., Liu M., Sha Z., Fan C., Wu Q. 2018. Long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates adipose-derived stem cells (ASCs) osteogenic differentiation through miR-665/IL6 axis via PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* **9** (1), 348.
10. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of IP₃ receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11** (4), a035063.
11. 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 Ca²⁺ mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
12. Котова П.Д. 2017. Модуляция Ca²⁺-ответов на АТФ PI₃-киназой в мезенхимных стромальных клетках. *Биол. мембраны.* **34** (1), 70–73.
13. Котова П.Д., Фадеева Ю.И., Рогачевская О.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Колесников С.С. 2015. Пуринергическая сигнализация в мезенхимных стромальных клетках. *Биол. мембраны.* **32**(4), 265–273.

PI₃ Kinase Isoforms in Purinergic Mesenchymal Stromal Cells

P. D. Kotova^{1, *}, M. F. Bystrova¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*
*e-mail: polinakotova88@gmail.com

By using the transcriptom analysis it was demonstrated that mesenchymal stromal cells (MSCs) from the human adipose tissue express α -, β -, and δ -isoforms of PI₃ kinase (PI₃K) from class I, while the PI₃K γ isoform is not expressed. The contribution of PI₃K isoforms to purinergic transduction in MSCs was evaluated with the Ca²⁺-imaging approach and Ca²⁺ dye Fluo-4. As was shown, Ca²⁺ transients elicited by ATP in MSCs could be canceled by the PI₃K α and PI₃K β inhibitors, GSK 1059615 and AZD 6482, respectively. The overall data indicated that most (69%) of MSCs were capable of generating robust ATP responses provided that PI₃K α was sufficiently active. Yet, a small (15%) subpopulation of purinergic MSCs additionally employed the PI₃K β isoform to transduce extracellular ATP.

Keywords: mesenchymal stromal cells, Ca²⁺ signaling, purinergic transduction, PI₃ kinase