

УДК 577.352.465

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2020 г. Е. Н. Кочкина^а, А. П. Черкашин^а, Н. В. Кабанова^а,
Е. А. Соколова^а, М. Ф. Быстрова^а, П. Д. Котова^а, *

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: polinakotova88@gmail.com

Поступила в редакцию 16.01.2020 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 23.03.2020 г.

Внеклеточный аденозин является сигнальной молекулой, которая участвует в регуляции физиологических процессов различных типов клеток, включая мезенхимные стромальные клетки (МСК). С использованием микрофотометрии и Ca^{2+} -зондов мы показали, что популяция МСК, выделенных из жировой ткани человека, содержит небольшую (5–10%) субпопуляцию аденозинергических клеток. В этих клетках функционируют А1, А2А и А2В аденозиновые рецепторы, которые сопряжены с фосфоинозитидным сигнальным каскадом. Стимуляция аденозинергических МСК аденозином инициирует мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} , при этом Ca^{2+} -ответы на аденозин генерируются по принципу “все или ничего”: в малых дозах аденозин не приводит к изменению уровня внутриклеточного Ca^{2+} , но при любой концентрации, превышающей пороговую, вызывает Ca^{2+} -ответы практически идентичной формы и амплитуды. Примечательно, что длительность задержки ответа от момента аппликации аденозина уменьшается с увеличением его концентрации. Ключевые этапы генерации Ca^{2+} -ответов на аденозин исследовали с использованием ингибиторного анализа. Полученные данные свидетельствуют о том, что аденозиновый рецептор активирует фосфолипазу С, стимулирующую продукцию IP_3 , который, в свою очередь, активирует IP_3 -рецепторы и инициирует выброс депонированного Ca^{2+} , скорее всего зависимый от концентрации агониста. Этот первоначальный Ca^{2+} -сигнал стимулирует масштабный выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо по механизму Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} , что формирует вторичный Ca^{2+} -ответ универсальной формы и амплитуды.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, аденозиновые рецепторы, Ca^{2+} -сигнализация

DOI: 10.31857/S0233475520040052

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, включающую мультипотентные стволовые клетки, которые способны к пролиферации и дифференцировке как минимум в костную, хрящевую и жировую ткани. Внеклеточный аденозин и распознающие его аденозиновые рецепторы вовлечены в оба эти процесса [1]. Показано, что аденозин является медиатором, стимулирующим пролиферацию МСК, выделенных из костного мозга мыши [2]. Основная же роль аденозина для МСК состоит в активации их дифференцировки в хондроциты и остеобласты [3–7], также продемонстрирована вовлеченность аденозиновых рецепторов и в их адипогенную дифференцировку [8–10].

Однако МСК стимулируют регенерацию тканей не только за счет своей способности к дифференцировке, но и благодаря секреции ряда

регуляторных молекул, которые способствуют индукции ангиогенеза, уменьшению фиброза, модуляции иммунной системы и некоторых других процессов. Стимуляция физиологических функций МСК происходит, в частности, при повреждении тканей и высвобождении во внеклеточную среду большого количества АТР, который действует как сигнал опасности и приводит к активации воспалительных процессов. При этом внеклеточный АТР подвергается последовательному ферментативному гидролизу до аденозина, который, в свою очередь, может оказывать действие, противоположное вызываемым АТР, в частности стимулируя противовоспалительные эффекты [11]. Так, один из иммуносупрессивных механизмов, приводящий к подавлению чрезмерной воспалительной реакции, основан на совместной работе МСК и Т-лимфоцитов через аденозинергический путь. Аденозин активно продуцируется из внеклеточного АТР благодаря

высокой экспрессии CD73 (экто-5'-нуклеотидаза, гидролизующая АМР до аденозина) на МСК и CD39 (эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза 1, гидролизующая АТР и АДР до АМР) на Т-лимфоцитах. В свою очередь внеклеточный аденозин подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, что приводит к снижению иммунного ответа [12]. Таким образом, внеклеточный аденозин является важной сигнальной молекулой в физиологии МСК, однако трансдукция аденозина для этих клеток не исследована. В связи с этим данная работа посвящена анализу механизма Ca^{2+} -сигнализации, инициируемой аденозином в МСК, выделенных из жировой ткани человека.

Ранее нами было показано, что популяция МСК функционально гетерогенна и содержит субпопуляции клеток, отличающиеся по чувствительности к агонистам различных гептаспиральных рецепторов (G-protein coupled receptors, GPCR), в том числе пуринаргическим [13, 14]. Чувствительность клеток млекопитающих к внеклеточному аденозину обеспечивают аденозиновые (P1) рецепторы четырех подтипов: A1, A2A, A2B и A3 [15]. В большинстве случаев A2A- и A2B-рецепторы сопряжены с аденилатциклазой стимулирующим Gs-белком, а A1- и A3-рецепторы – ингибиторным Gi-белком [16]. Кроме того, описано сопряжение аденозиновых рецепторов с фосфолипазой C, A1- и A3-рецепторы активируют ее посредством $\beta\gamma$ -комплекса Gi-белка, а A2B- и A3-рецепторы – α -субъединицей Gq-белка [17]. Таким образом, A1-, A2B- и A3-рецепторы могут быть непосредственно вовлечены в мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} аденозином. В настоящей работе анализировали Ca^{2+} -сигналы, инициируемые аденозином в цитоплазме МСК, а также выясняли подтипы аденозиновых рецепторов, обеспечивающих чувствительность МСК к экстраклеточному аденозину.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение клеток. В данной работе исследовали МСК из жировой ткани человека, выделение и поддержание первичной культуры которых подробно описано ранее [18]. Выделенные МСК культивировали на пластиковых чашках Петри и/или в 12-луночном планшете в среде Advance Stem (HyClone, США) с 10% Advance Stem Supplement (HyClone). При достижении 80% монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma, США) и 0.25% раствором трипсина, а затем рассаживали в соотношении 1 : 3. В экспериментах использовали МСК 2 – 6 пассажей.

Микрофотометрия. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak и инкубировали при комнатной температуре (23–25°C) в присутствии

мембранно-проникающего препарата Fluo-4AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes, США) в течение 30 мин, что обеспечивало загрузку клеток Ca^{2+} -зондом Fluo-4. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором, в котором их выдерживали 40 мин при 4°C. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5, CaCl_2 – 2, MgCl_2 – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. В ряде случаев использовали внеклеточный раствор, содержащий 260 нМ свободного Ca^{2+} , для получения которого вместо 2 мМ CaCl_2 добавляли 0.5 мМ EGTA + 0.4 мМ CaCl_2 . 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 на длине волны 480 ± 5 нм, 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 $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии Fluo-4 и его эмиссия в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США). Для скачкообразного повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} клетки инкубировали при комнатной температуре (23–25°C) в присутствии фоточувствительного Ca^{2+} -хелатора NP-EGTA AM (4 мкМ) (Molecular Probes) в течение 30 мин. Фотолиз NP-EGTA вспышкой ультрафиолетового диапазона (355 нм) инициировал импульсное высвобождение Ca^{2+} в цитоплазме клетки. В соответствующих экспериментах клетки нагружали одновременно NP-EGTA и Fluo-4.

ОТ-ПЦР анализ. Тотальную РНК выделяли из суспензии МСК, содержащей до 10^6 клеток с использованием RNeasy mini kit (Qiagen, Германия). Удаление остатков геномной ДНК из выделенной РНК проводили DNase I (Ambion, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью PrimeScript reverse transcriptase (Takara, Япония) в присутствии случайных гексамерных праймеров. Полученная кДНК служила матрицей для ПЦР с ген-специфическими праймерами, комплементарными всем возможным транскрипт-вариантам генов человеческих аденозиновых рецепторов, а также генам, кодирующим маркеры МСК, включая CD73, CD90, CD105 и MSCAM. Были использованы следующие последовательности ген-специфических праймеров, в скобках указан ожидаемый размер продукта: A1 5'-TCCATCTCAGCTTTCCAGG-3', 5'-TCAC-CACCATCTTGTAACCG-3' (349 п.н.), A2A

5'-CAGAACGTCACCAACTACTTTG-3', 5'-GGTCACCAAGCCATTGTACC-3' (240 п.н.), A2B 5'-ATGCTGCTGGAGACACAGG-3', 5'-CCGTGACCAAACCTTTTATACCT-3' (355 п.н.), A3 5'-AGAGATCACCCACAGAAAAG-3', 5'-GAGTGGTGACCCTTGTATC-3' (537 п.н.), CD73 5'-AAGACATGACTCTGGTGACC-3', 5'-CTGT-CACAAAGCCAGGTCC-3' (266 п.н.), CD90 5'-GTCACAGTGCTCAGAGAC-3', 5'-TACAAAAAG-ACAGCCAGAGG-3' (344 п.н.), CD105 5'-AGCAGAGCTTTGTGCAGGTC-3', 5'-GCTGATGATGTTCAAGCGCATG-3' (317 п.н.), MСAM 5'-AGGGAAGCAGGAGATCACG-3', 5'-GGCTTCTCTAGTCCCTTTG-3' (266 п.н.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В физиологических экспериментах было установлено, что популяция МСК содержит небольшую (5–10%) субпопуляцию клеток, специфически отвечающих на аденозин мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Для выяснения вклада в эти ответы различных источников Ca^{2+} анализировали изменение чувствительности МСК к аденозину в условиях понижения внеклеточного Ca^{2+} с 2 мМ до цитоплазматического уровня (260 нМ). Оказалось, что все протестированные аденозинергические МСК ($n = 26$) генерировали практически нормальные по амплитуде и кинетике ответы на аденозин в среде с пониженным до цитоплазматического уровня содержанием Ca^{2+} (рис. 1а). Это свидетельствует о том, что основной вклад в Ca^{2+} -ответы на аденозин вносит выброс депонированного Ca^{2+} при незначительной роли входа Ca^{2+} из внеклеточной среды. В связи с этим вполне предсказуемым был эффект ингибитора фосфолипазы С U73122, который полностью и необратимо подавлял Ca^{2+} -ответы на аденозин ($n = 17$) (рис. 1б). Действие U73122 в данном случае можно считать специфичным, так как его неактивный аналог U73343 в той же концентрации не влиял на способность МСК отвечать на аденозин (рис. 1б). Это свидетельствует о том, что аденозиновые рецепторы в МСК сопряжены с фосфолипазой С, которая является ключевым элементом в генерации Ca^{2+} -ответов на аденозин. Известно, что в различных клетках высвобождение депонированного Ca^{2+} происходит при стимуляции рианодиновых или IP_3 -рецепторов, являющихся лиганд-активируемыми Ca^{2+} -каналами эндоплазматического ретикулаума [19]. Предварительная инкубация МСК с антагонистом IP_3 -рецепторов 2-АРВ приводила к обратному подавлению ответов на аденозин, тогда как ингибитор рианодиновых рецепторов рианодин не влиял на способность клеток генерировать ответы на аденозин ($n = 12$) (рис. 1в). Следует отметить, что помимо IP_3 -рецепторов 2-АРВ также

может блокировать вход наружного Ca^{2+} , в частности, через ионные каналы TRPC типа [20–22]. Однако, поскольку Ca^{2+} -ответы на аденозин практически не зависели от наружного Ca^{2+} (рис. 1а), возможным влиянием 2-АРВ на вход Ca^{2+} можно пренебречь и полагать, что основной мишенью этого ингибитора в случае ответов на аденозин были именно IP_3 -рецепторы (рис. 1в). Таким образом, представленные данные (рис. 1) свидетельствуют о том, что трансдукция аденозина в МСК протекает при участии фосфоинозитидного каскада и включает в качестве основных событий стимуляцию фосфолипазы С, продукцию IP_3 , активацию IP_3 -рецепторов и выброс Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо.

Интересно, что форма и амплитуда Ca^{2+} -ответов на аденозин не зависели от его концентрации ($n = 21$). Другими словами, аденозин в концентрациях ниже пороговой (50–500 нМ) никогда не вызывал детектируемых Ca^{2+} -ответов, в то время как в концентрациях, превышающих пороговую, вызывал практически идентичные Ca^{2+} -ответы (рис. 2а). Еще одной характерной чертой ответов на аденозин была их заметная задержка от момента аппликации агониста (рис. 2б), причем длительность этой задержки уменьшалась с повышением концентрации агониста ($n = 11$) (рис. 2в). Так, например, у клетки, представленной на рис. 2б, задержка ответа от момента аппликации аденозина в низкой концентрации 0.1 мкМ составила 106 с, тогда как при стимуляции 2 мкМ аденозина она уменьшалась до 23 с. Такие особенности Ca^{2+} -ответов МСК ранее были описаны нами для других агонистов, включая норадреналин и АТР, в связи с этим мы предположили, что основные этапы механизма генерации ответов на аденозин идентичны уже описанным [13, 14]. На первом этапе аденозин посредством фосфоинозитидного сигнального каскада вызывает небольшой Ca^{2+} -сигнал, амплитуда которого, вероятно, зависит от концентрации агониста. Далее при достижении этим локальным Ca^{2+} -сигналом порогового значения он усиливается механизмом Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release, CICR), который и формирует глобальный Ca^{2+} -сигнал, амплитуда и кинетика которого уже не зависят от концентрации аденозина [13, 14].

Если это предположение верно, то любой внутриклеточный Ca^{2+} -сигнал, инициируемый в цитоплазме МСК достаточно быстро и превышающий порог, должен усиливаться механизмом CICR и преобразовываться в насыщающий Ca^{2+} -ответ, подобный ответу на аденозин. Для проверки этого предположения мы анализировали реакцию аденозинергических МСК на скачкообразное повышение внутриклеточного Ca^{2+} . Клетки

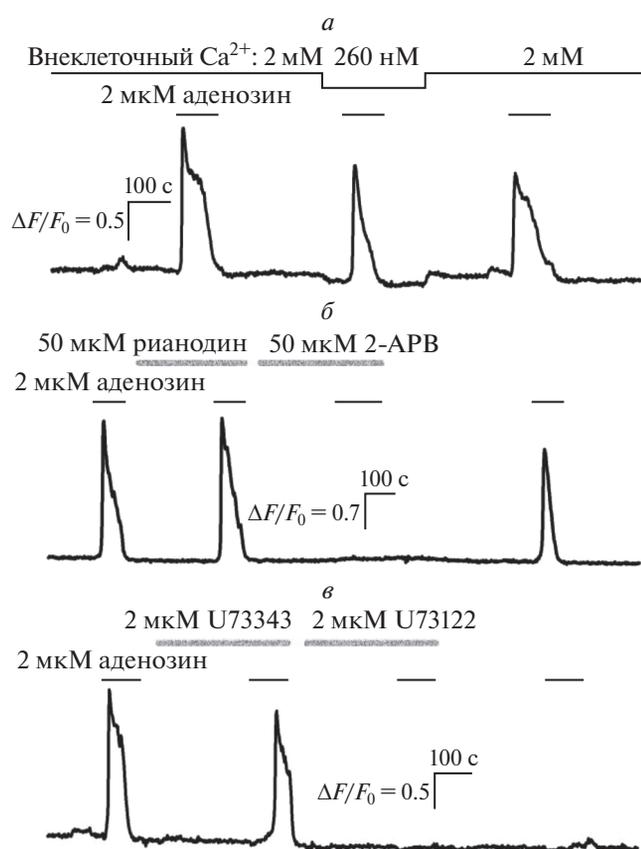


Рис. 1. Вклад различных источников Ca^{2+} в ответы МСК на аденозин.

a – Репрезентативная регистрация Ca^{2+} -ответов одиночной МСК на аденозин при варьируемом внеклеточном Ca^{2+} ($n = 26$). Моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Верхняя линия иллюстрирует изменение концентрации внеклеточного Ca^{2+} . Изменение внутриклеточной Ca^{2+} характеризовали относительной флуоресценцией $\text{Fluo-4 } \Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F – текущая интенсивность флуоресценции, F_0 – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

б – Ответы МСК на аденозин полностью и необратимо подавляются ингибитором фосфолипазы С U73122, но не его неактивным аналогом U73343 ($n = 17$).

в – Антагонист IP_3 -рецепторов 2-АРВ полностью подавляет ответы МСК на аденозин, в то время как ингибитор риаинодиновых рецепторов риаинодин не влияет на чувствительность МСК к аденозину ($n = 12$).

одновременно нагружали Fluo-4 и фоточувствительным Ca^{2+} -хелатором NP-EGTA, облучение которого светом УФ-диапазона вызывает разрушение координационной сферы связывания Ca^{2+} и его высвобождение [23], что приводит к скачкообразному повышению уровня свободного Ca^{2+} в цитоплазме клетки. Вспышки света УФ-диапазона (355 нм) продолжительностью 4 с приводили к генерации в цитоплазме МСК Ca^{2+} -ответов, по амплитуде и форме сходных с ответами на адено-

зин (рис. 2*з*) ($n = 5$). Из известных Ca^{2+} -зависимых механизмов только CICR способен так усилить и придать такую форму первичному Ca^{2+} -сигналу, вызванному фотолизом NP-EGTA; таким образом, проведенные эксперименты (рис. 2*з*) свидетельствуют о том, что в аденозинергических МСК именно механизм CICR ответственен за формирование Ca^{2+} -сигналов универсальной формы и амплитуды.

Для выявления подтипов аденозиновых рецепторов, обеспечивающих чувствительность МСК к экстраклеточному аденозину, нами был проведен экспрессионный анализ популяции МСК с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ген-специфических праймеров. Все исследованные образцы РНК, полученные от четырех доноров, содержали транскрипты A1-, A2A- и A2B-рецепторов, а также CD73, CD90, CD105 и MSCAM (рис. 3*а*), которые на данный момент считаются маркерами МСК. При этом транскрипты A3-рецептора не были обнаружены ни в одном из образцов. Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что все выявленные нами подтипы аденозиновых рецепторов вовлечены в те или иные физиологические процессы МСК. Например, показано, что стимуляция A1-рецептора усиливает дифференцировку в остеобласты МСК, выделенных из пульпы человека, посредством активации Wnt-пути [24]. CD73 действует как регуляторный фактор остео- и хондрогенной дифференцировки МСК костного мозга мыши через A2A [25]. Во многих исследованиях отмечено, что стимуляция A2B-рецептора приводит к индукции остеогенной дифференцировки как мышинных, так и человеческих МСК костного мозга [3–7]. При этом в большинстве перечисленных работ выявлена экспрессия и A3 аденозинового рецептора, однако его физиологическая роль не описана. Разногласие между нашими результатами и литературными данными об экспрессии A3-рецептора в МСК может быть объяснено тем, что в опубликованных работах анализировали МСК, выделенные из различных тканей, а иногда и организмов. Стоит отметить, что A3 не был обнаружен в хондрогенных прогениторных клетках человека [26].

Таким образом, транскриптомный анализ выявил, что в МСК могут функционировать три подтипа аденозиновых рецепторов, тем не менее было неясно, какие из них вовлечены в генерацию Ca^{2+} -ответов на аденозин. В связи с этим мы провели ряд физиологических экспериментов, в которых использовали специфические агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов. Оказалось, что часть аденозинергических МСК генерировала Ca^{2+} -ответы на специфический агонист A1-рецепторов 2'-MeCCPA ($n = 16$) (рис. 3*б*). В ряде случаев наблюдались ответы на агонист

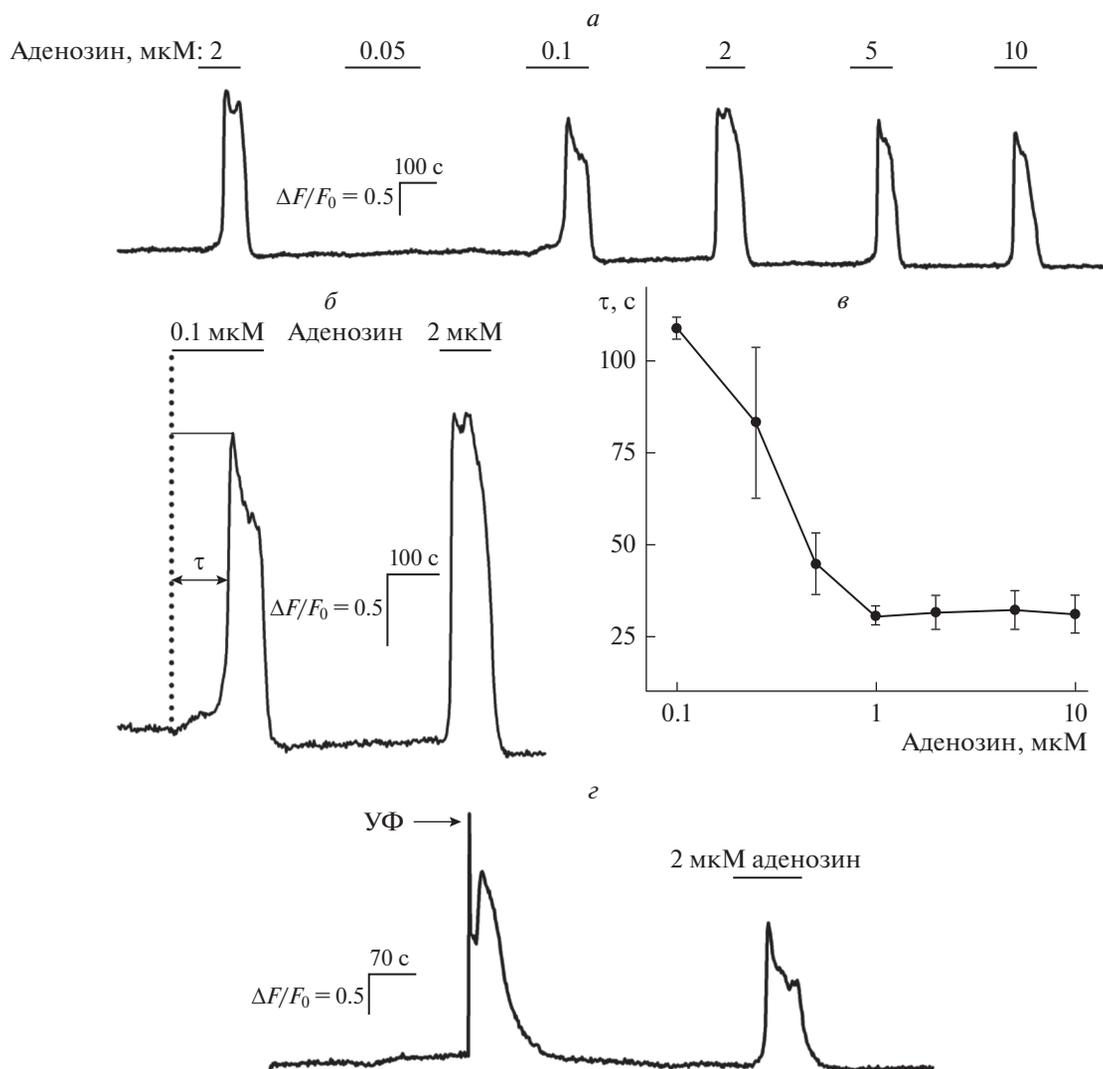


Рис. 2. Вклад CICR в Ca^{2+} -ответы МСК на аденозин.

a – Репрезентативные ответы одиночной МСК на аденозин в различных дозах ($n = 21$).

б – Последовательные ответы МСК на аденозин в концентрациях 0.1 мкМ (пороговая) и 2 мкМ (насыщающая). Ответы на 0.1 и 2 мкМ аденозина отсрочены от момента аппликации на 106 и 23 с соответственно. Длительность задержки (τ) определяли как время, необходимое для достижения ответом полумаксимального значения от момента аппликации аденозина.

в – Зависимость длительности задержки (τ) от концентрации аденозина, представлены средние значения времени задержки \pm стандартная ошибка ($n = 3-11$).

з – Ответ МСК на импульсное повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , вызываемое фотолизом NP-EGTA (УФ-импульс, 355 нм, 4 с), и на аденозин ($n = 5$).

A2A-рецепторов CGS 21680, при этом ответы таких клеток на аденозин блокировались в присутствии антагониста этих рецепторов SCH 58261, что свидетельствует в пользу специфичности действия этих соединений ($n = 12$) (рис. 3в). Еще одна группа клеток генерировала ответы на агонист A2B-рецепторов BAY 60-6583, тогда как их антагонист PSB 1115 полностью подавлял ответы этих клеток на аденозин ($n = 9$) (рис. 3з). Агонист же A3-рецепторов HEMADO в различных концентрациях не вызывал Ca^{2+} -ответов, а их антагонист MRS 3777 никогда не влиял на способность МСК

отвечать на аденозин ($n = 8$) (рис. 3д), что согласуется с результатами ОТ-ПЦР (рис. 3а), свидетельствующими об отсутствии этого рецептора в популяции МСК.

Суммируя полученные данные, можно утверждать, что в МСК жировой ткани человека функционируют A1-, A2A- и A2B-рецепторы аденозина, тогда как A3-рецептор, по-видимому, не экспрессируется. Все экспрессирующиеся подтипы аденозиновых рецепторов в МСК могут быть сопряжены с фосфоинозитидным сигнальным кас-

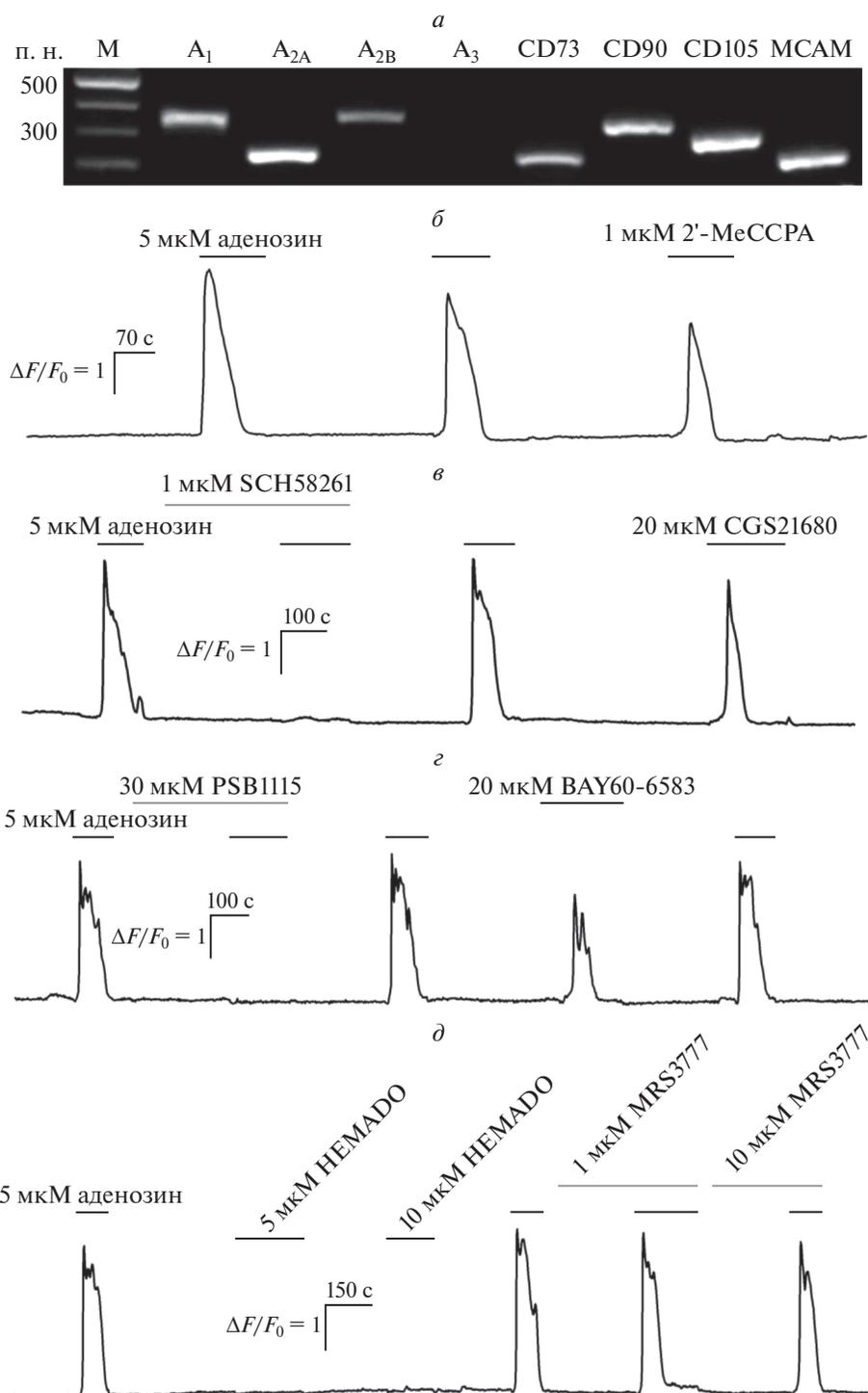


Рис. 3. Идентификация различных изоформ аденозиновых рецепторов, функционирующих в МСК.

a – Репрезентативный гель-электрофорез продуктов ОТ-ПЦР-анализа препаратов МСК ($n = 4$) с праймерами, специфичными для генов A₁-, A_{2A}-, A_{2B}-, A₃-рецепторов и маркеров МСК CD73, CD90, CD105, MCAM. Ампликоны ожидаемого размера были идентифицированы для A₁ (349 п.н.), A_{2A} (240 п.н.), A_{2B} (355 п.н.), CD73 (266 п.н.), CD90 (344 п.н.), CD105 (317 п.н.), MCAM (266 п.н.), в то время как транскрипты гена A₃-рецептора (537 п.н.) были недетектируемы. В качестве маркеров молекулярных масс (M) использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

б – Ca²⁺-ответы МСК на аденозин и агонист A₁-рецепторов 2'-MeCCPA ($n = 16$).

в – Ca²⁺-ответы МСК на аденозин в контроле и присутствии антагониста A_{2A}-рецепторов SCH 58261, а также на агонист A_{2A}-рецепторов CGS 21680 ($n = 12$).

г – Ca²⁺-ответы МСК на аденозин в контроле и присутствии антагониста A_{2B}-рецепторов PSB 1115, а также на агонист A_{2B}-рецепторов BAY 60-6583 ($n = 9$).

д – Ca²⁺-ответы МСК на аденозин в контроле и присутствии антагониста A₃-рецепторов MRS 3777, а также на агонист A₃-рецепторов HEMADO.

кадом, а их активация приводит к генерации Ca^{2+} -ответов. Полученные нами данные ингибиторного анализа позволяют предположить следующую последовательность событий, инициируемых внеклеточным аденозином в цитоплазме МСК: активированный аденозиновый рецептор посредством G-белка активирует фосфолипазу C, гидролизующую PIP_2 до IP_3 , который стимулирует IP_3 -рецепторы, что приводит к выбросу депонированного Ca^{2+} , скорее всего зависящему от концентрации агониста, этот первоначальный Ca^{2+} -сигнал стимулирует масштабный выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что продуцирует вторичный Ca^{2+} -ответ, не зависящий от концентрации агониста.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00365 мол_а и стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-924.2018.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaebisch C., Schipper D., Babczyk P., Tobiasch E. 2015. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **13**, 75–84.
2. Katebi M., Soleimani M., Cronstein B.N. 2009. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J. Leukoc. Biol.* **85** (3), 438–444.
3. Carroll S.H., Wigner N.A., Kulkarni N., Johnston-Cox H., Gerstenfeld L.C., Ravid K. 2012. A2B adenosine receptor promotes mesenchymal stem cell differentiation to osteoblasts and bone formation in vivo. *J. Biol. Chem.* **287** (19), 15718–15727.
4. Carroll S.H., Ravid K. 2013. Differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and chondrocytes: a focus on adenosine receptors. *Expert Rev. Mol. Med.* **15**, e1.
5. Ciciarello M., Zini R., Rossi L., Salvestrini V., Ferrari D., Manfredini R., Lemoli R.M. 2013. Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev.* **22** (7), 1097–1111.
6. He W., Mazumder A., Wilder T., Cronstein B.N. 2013. Adenosine regulates bone metabolism via A1, A2A, and A2B receptors in bone marrow cells from normal humans and patients with multiple myeloma. *FASEB J.* **27** (9), 3446–3454.
7. Shih Y.R., Hwang Y., Phadke A., Kang H., Hwang N.S., Caro E.J., Nguyen S., Siu M., Theodorakis E.A., Gianneschi N.C., Vecchio K.S., Chien S., Lee O.K., Varghese S. 2014. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (3), 990–995.
8. Gharibi B., Abraham A.A., Ham J., Evans B.A. 2011. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J. Bone Miner. Res.* **26** (9), 2112–2124.
9. Gharibi B., Abraham A.A., Ham J., Evans B.A. 2012. Contrasting effects of A1 and A2B adenosine receptors on adipogenesis. *Int. J. Obes.* **36** (3), 397–406.
10. Eisenstein A., Carroll S.H., Johnston-Cox H., Farb M., Gokce N., Ravid K. 2014. An adenosine receptor-Krüppel-like factor 4 protein axis inhibits adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **289** (30), 21071–21081.
11. de Oliveira Bravo M., Carvalho J.L., Saldanha-Araujo F. 2016. Adenosine production: A common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Purinergic Signal.* **12** (4), 595–609.
12. Kerkelä E., Laitinen A., Rabinä J., Valkonen S., Takatalo M., Larjo A., Veijola J., Lampinen M., Siljander P., Lehenkari P., Alftan K., Laitinen S. 2016. Adenosine immunosuppression by human mesenchymal stromal cells requires co-operation with T cells. *Stem Cells.* **34** (3), 781–790.
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. 2014. Functional expression of adenosine receptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 1899–1908.
14. 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^{2+} mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
15. Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. 2001. International union of pharmacology. XXV: Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews.* **53** (4), 527–552.
16. Burnstock G. 2018. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* **2**, 239821281817494.
17. Sheth S., Brito R., Mukherjea D., Rybak L.P., Ramkumar V. 2014. Adenosine receptors: Expression, function and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2), 2024–2052.
18. Котова П.Д., Фадеева Ю.И., Рогачевская О.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Колесников С.С. 2015. Пуриnergическая сигнализация в мезенхимных стромальных клетках. *Биол. мембраны.* **32** (4), 265–273.
19. Clapham D.E. 2007. Calcium signaling. *Cell.* **131** (6), 1047–1058.
20. Xu S.-Z., Zeng F., Boulay G., Grimm C., Harteneck C., Beech D.J. 2005. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: A differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br. J. Pharmacol.* **145** (4), 405–414.
21. Mustafa T., Walsh J., Grimaldi M., Eiden L.E. 2010. PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca^{2+} channels in PC12 cells. *Cell Signal.* **22** (10), 1420–1426.
22. Harteneck C., Gollasch M. 2011. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12** (1), 35–41.
23. Ellis-Davies G.C. 2007. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods.* **4** (8), 619–628.

24. D'Alimonte I., Nargi E., Lannutti A., Marchisio M., Pierdomenico L., Costanzo G., Di Iorio P., Ballerini P., Giuliani P., Caciagli F., Ciccarelli R. 2013. Adenosine A1 receptor stimulation enhances osteogenic differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells via WNT signaling. *Stem Cell Res.* **11** (1), 611–624.
25. Ode A., Schoon J., Kurtz A., Gaetjen M., Ode J.E., Geissler S., Duda G.N. 2013. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur. Cell Mater.* **25**, 37–47.
26. Matta C., Fodor J., Miosge N., Takács R., Juhász T., Rybaltovszki H., Tóth A., Csernoch L., Zákány R. 2015. Purinergic signaling is required for calcium oscillations in migratory chondrogenic progenitor cells. *Pflügers Arch.* **467** (2), 429–442.

Functional Expression of Adenosine Receptors in Mesenchymal Stromal Cells

E. N. Kochkina¹, A. P. Cherkashin¹, N. V. Kabanova¹,
E. A. Sokolova¹, M. F. Bystrova¹, P. D. Kotova¹, *

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS,
Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: polinakotova88@gmail.com*

Extracellular adenosine is a signaling molecule involved in the regulation of physiological processes in a variety of cells, including mesenchymal stromal cells (MSCs). Using the Ca^{2+} -imaging approach and Ca^{2+} -sensitive dyes we showed that a population of MSCs derived from human adipose tissue contains a small (5–10%) subpopulation of adenosinergic cells, which responds to adenosine by Ca^{2+} mobilization. It was shown that adenosinergic MSCs express adenosine receptors of the A1, A2A, and A2B subtypes coupled to the phosphoinositide cascade. MSCs generated Ca^{2+} responses to adenosine in an “all or nothing” manner: at low doses, adenosine did not affect intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$, but at concentrations exceeding the threshold it evoked Ca^{2+} responses of almost identical shape and magnitude. Notably, adenosine responses were markedly delayed relative to the moment of the agonist application, and the response lag reduced with an increase of an adenosine dose. The adenosine transduction in MSCs was detailed using the inhibitory analysis. Altogether, the results suggest that adenosine receptors, being coupled to phospholipase C, stimulate production of IP_3 , which, in turn, activates IP_3 receptors, thus initiating Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores. This initial Ca^{2+} signal, which presumably depends on the agonist concentration, stimulates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release that produces a global Ca^{2+} signal of an invariant shape.

Keywords: mesenchymal stromal cells, adenosine receptors, Ca^{2+} signaling