

УДК 577.352.465

МОНИТОРИНГ АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ АКТИВНОСТИ PI3-КИНАЗЫ В КЛЕТКАХ НЕК-293 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА

© 2022 г. П. Д. Котова^а, *, О. А. Рогачевская^а, Н. В. Кабанова^а, С. С. Колесников^а

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

*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 24.05.2022 г.

IP3-зависимый выброс депонированного Ca^{2+} вносит ключевой вклад в агонист-индуцированную мобилизацию Ca^{2+} в невозбудимых клетках. Эффективность фосфоинозитидного каскада, сопрягающего поверхностные рецепторы с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} , модулируется рядом киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), которая, фосфорилируя PIP2, продуцирует фосфолипид PIP3. Ранее нами было показано, что ингибитор PI3K вортманнин не влияет на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, тогда как ингибитор PI3K другой химической природы PI828 полностью подавляет эти ответы. Разная эффективность вортманнина и PI828 могла быть связана с тем, что в клетках НЕК-293 функционируют изоформы PI3K, существенно более чувствительные к PI828. Для внесения ясности в этот вопрос нами была получена моноклональная линия клеток НЕК-293, экспрессирующих два генетически кодируемых сенсора, а именно сенсор цитозольного Ca^{2+} (R-GECO1) и сенсор PIP3 PH(Akt)-Venus. Клетки этой линии позволяли одновременно регистрировать Ca^{2+} -сигналы и проводить мониторинг активности PI3K. Характерной особенностью R-GECO1 является увеличение интенсивности флуоресценции при повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} , в то время как PH(Akt)-Venus при PI3K-зависимой генерации PIP3 в плазмалемме перераспределяется из цитозоля в мембрану клетки. Оказалось, что ацетилхолин инициировал кратковременное повышение внутриклеточного Ca^{2+} , но не влиял на распределение PIP3-сенсора в цитоплазме клеток. Последнее указывало на отсутствие ацетилхолин-зависимой активации PI3K. В то же время инсулин, стимулирующий PI3K при участии тирозин-киназных рецепторов, вызывал перераспределение молекул PH(Akt)-Venus из цитозоля в мембрану клеток, что демонстрировало инсулин-индуцированную активность PI3K. Этот феномен не наблюдался в присутствии вортманнина или PI828, что свидетельствовало об эффективном подавлении активности PI3K этими соединениями. Таким образом, стимулируя внутриклеточную Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293, ацетилхолин не инициировал активацию PI3K-пути, который, следовательно, не был вовлечен в холинергическую трансдукцию. Хотя полученные данные свидетельствуют об эффективном ингибировании активности PI3K вортманнином и PI828, последний подавлял ацетилхолин-индуцируемую Ca^{2+} -сигнализацию неспецифически, т.е. воздействуя не на PI3K, а на какую-то иную клеточную мишень.

Ключевые слова: мускариновые рецепторы, внутриклеточная Ca^{2+} -сигнализация, PI3-киназа, генетически кодируемый сенсор PIP3, ацетилхолин

DOI: 10.31857/S0233475522050097

ВВЕДЕНИЕ

Мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} является одной из наиболее универсальных форм реакции клеток на внешние возмущения, включая стимуляцию первичными медиаторами, обеспечивающими аутокринную и паракринную регуляцию клеточных функций. Хотя в генерации Ca^{2+} -сигналов принимает участие множество внутриклеточных сигнальных и транспортных систем, ключевой вклад в агонист-индуцированную мобилизацию Ca^{2+} в невозбудимых клетках вносит IP3-зависимый выброс депонированного Ca^{2+} [1, 2].

Фосфоинозитидный каскад может сопрягать разнообразные поверхностные рецепторы, включая гептаспиральные трансмембранные рецепторы (G-protein coupled receptor, GPCR-рецепторы), с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Его эффективность модулируется при участии различных сигнальных систем, включая каскад фосфатидилинозитол-3-киназы класса I (PI3K) – фермента, катализирующего образование сигнального/регуляторного фосфолипида PIP3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата) [3–5]. Так, например, показано, что PI3K/Akt-путь является важным регулятором Ca^{2+} -сигнализации и сократитель-

ной активности кардиомиоцитов [6, 7]. Участие P13K/Akt-каскада в регуляции выброса Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо было продемонстрировано для клеток MDCK [8], COS-7 [9] и RINm5F [10]. Его роль в Ca^{2+} -сигнализации может быть обусловлена P13K/Akt-зависимой регуляцией активности P3-рецепторов и/или фосфолипазы C [10–12].

Ранее при исследовании роли P13K в генерации Ca^{2+} -ответов на GPCR-агонисты, нами был использован ряд ингибиторов P13K, включая вортманнин и PI828, различающиеся по химической структуре. Было установлено, что вортманнин не влиял на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, в то время как PI828 полностью подавлял эти ответы [13]. Причины столь разной эффективности PI828 и вортманнина оставались неясными. Одна из возможных причин состояла в том, что в сравнении с вортманнином PI828 существенно более эффективно блокировал изоформы P13K, функционирующие в клетках НЕК-293. В любом случае эти данные свидетельствовали о том, что механизм действия вортманнина и PI828, которые считаются ингибиторами P13K, в действительности не так очевиден. Следовательно, результаты, полученные при исследовании роли P13K в механизме генерации Ca^{2+} -сигналов с использованием данных соединений, нельзя интерпретировать однозначно, что делает целесообразным проведение одновременного мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} и активности P13K. Данная работа посвящена отработке такой методологии и ее использованию для установления роли P13K в генерации Ca^{2+} -ответов клеток НЕК-293 на ацетилхолин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии НЕК-293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) и модифицированные клетки НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich), 2 мМ глутамин (Sigma-Aldrich) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C. Для культивирования моноклональных линий в ростовую среду добавляли 300 мкг/мл селективного антибиотика геницитина G418 (Invitrogen).

Трансфекция клеток. Клетки НЕК-293 трансфицировали плазмидными векторами CMV-R-GECO1 (Addgene plasmid #32444) и PH(Akt)-Venus (Addgene plasmid #85223) одновременно, используя набор для трансфекции FuGENE 6 (Promega) по протоколу, оптимизированному согласно рекомендациям производителя. Накануне трансфекции клетки рассеивали из расчета $(2-4) \times 10^5$ клеток в 1 лунку 12-луночного планшета в 1 мл ростовой

среды. Для трансфекции в лунку к среде с растущими клеткам добавляли трансфекционную смесь, содержащую 100 мкл среды OptiMEM (Gibco), 4 мкл FuGENE 6 (Promega), 0.5 мкг CMV-R-GECO1 и 0.5 мкг PH(Akt)-Venus. Через 24 ч среду заменяли на свежую ростовую.

Получение моноклональных линий НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus. Популяцию трансфицированных клеток селективировали в ростовой среде с добавлением 700 мкг/мл G-418 (Invitrogen) в течение 2–3 недель. Из полученной после селекции популяции с помощью клеточного сортера FACSaria SORP (Beckton Dickinson) отбирали клетки, обладающие флуоресценцией, соответствующей экспрессии обоих белков интереса: флуоресценцию R-GECO1 возбуждали при длине волны 561 нм, эмиссию регистрировали в области 610 ± 10 нм, флуоресценцию PH(Akt)-Venus возбуждали при длине волны 488 нм, эмиссию регистрировали в области 515 ± 10 нм. Клетки, обладающие наиболее яркой флуоресценцией обоих сенсоров, помещали по одной в лунку 96-луночного планшета, содержащую 150 мкл ростовой среды с повышенным до 15% содержанием сыворотки, и культивировали, наращивая таким образом моноклональные линии. Клетки каждой полученной моноклональной линии тестировали физиологически, а именно, работоспособность полученных клеток оценивали по ответам сенсоров R-GECO1 и PH(Akt)-Venus на стимуляцию ацетилхолином и инсулином соответственно. В результате проведенного тестирования была отобрана лучшая моноклональная линия клеток НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus.

Мониторинг внутриклеточных Ca^{2+} и PIP3. Перед экспериментом клетки НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus культивировали в фотометрических камерах в течение 24 ч в ростовой среде в CO_2 -инкубаторе. В процессе эксперимента клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы (все соли и буфер произведены Sigma-Aldrich). Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0.75, цифровой sCMOS камерой Zyla 4.2P (Andor Technology), металлогалогенным источником света АМН-200-F6S (Andor Technology) и спиннинг-диск для конфокальной микроскопии Revolution DSD2 (Andor Technology). Флуоресценцию R-GECO1 и PH(Akt)-Venus возбуждали поочередно при длинах волн 560 ± 20 и 500 ± 10 нм соответственно, эмиссию регистрировали в областях 630 ± 37 и 535 ± 15 нм соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon).

Аппликацию всех соединений, использовавшихся в описанных ниже экспериментах, проводили путем полной замены раствора в фотомет-

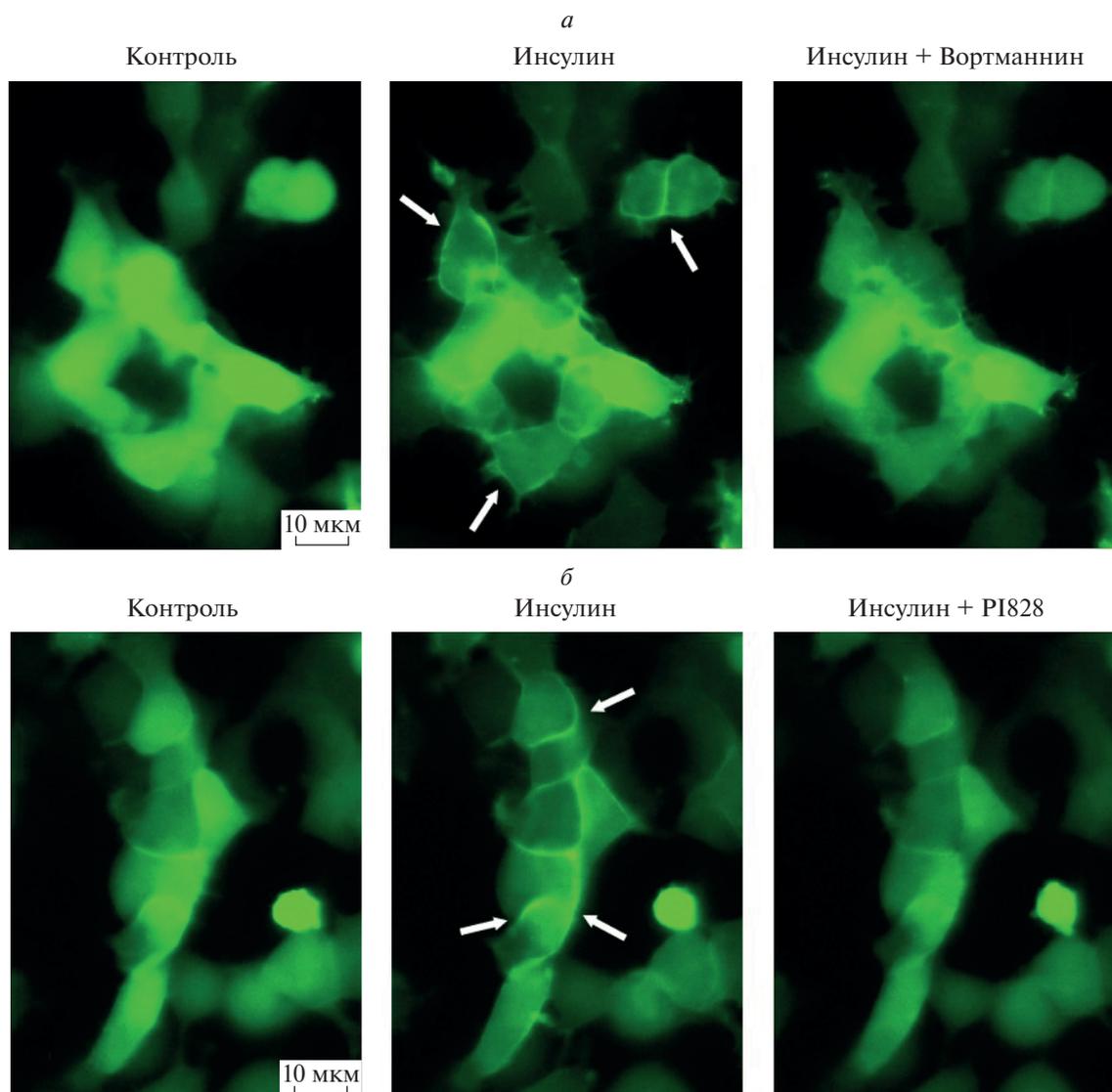


Рис. 1. Мониторинг инсулин-индуцированной активности PI3K с помощью сенсора PH(Akt)-Venus. *а, б* – Репрезентативные последовательные изображения клеток HEK-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus, полученные непосредственно перед (левые панели) и через 5 мин после (средние панели) начала стимуляции 100 нМ инсулина. Падение флуоресценции тела клетки и появление различных полосообразных флуоресцентных зон (указаны стрелками на средних панелях) свидетельствовали об индуцированном инсулином перераспределении сенсора PH(Akt)-Venus из цитозоля к мембране клеток. На правых панелях представлены изображения клеток, полученные в присутствии 10 мкМ вортманнина (*а*) и 30 мкМ PI828 (*б*), которые были добавлены в раствор через 5 мин после инсулина. Локализованный у мембраны после стимуляции инсулином сенсор PH(Akt)-Venus в присутствии ингибиторов PI3K возвращался в цитозоль. Флуоресцентные изображения клеток (*а, б*) получены с помощью SDCM-микроскопии.

рической камере с помощью системы перфузии. В работе использовали ацетилхолин, инсулин, вортманнин и PI828 производства Tocris Bioscience.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мониторинг активности PI3K проводили в клетках моноклональной линии HEK-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus, экспрессирующих сенсор цитозольного Ca^{2+} R-GECO1 и сенсор PI3K PH(Akt)-Venus, принципы функционирования ко-

торых различаются. Характерной особенностью сенсора R-GECO1 является градуальное увеличение интенсивности флуоресценции при повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} [14]. В покое, когда уровень PI3K в плазмалемме низок, сенсор PH(Akt)-Venus локализован преимущественно в цитозоле, но при PI3K-зависимой генерации PI3P он перераспределяется из цитозоля к мембране клетки [15]. Этот феномен можно наблюдать при регистрации флуоресценции PH(Akt)-Venus на оптическом срезе клетки, в связи с этим

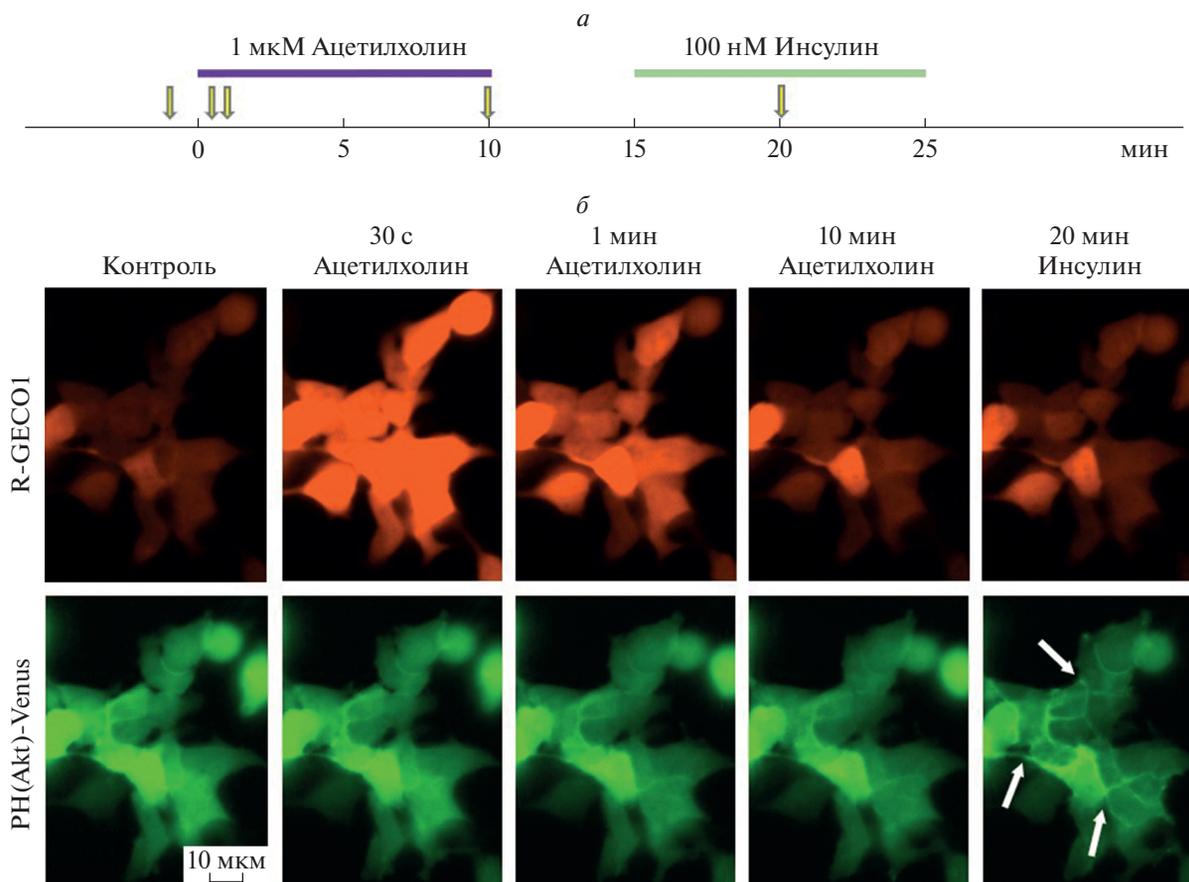


Рис. 2. P13К не вовлечена в сигнальные процессы, стимулируемые ацетилхолином. *a* – Схема протокола эксперимента; моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой; моменты получения изображений указаны стрелками; *b* – репрезентативные последовательные изображения клеток НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus, полученные в контроле (за 30 с до стимуляции ацетилхолином) и после их стимуляции 1 мкМ ацетилхолина и 100 нМ инсулина. На верхней и нижней панелях представлены сигналы от Ca²⁺-сенсора R-GECO1 и PIP3-сенсора PH(Akt)-Venus соответственно. Как видно, аппликация ацетилхолина (1 мкМ) инициировала кратковременное увеличение интенсивности флуоресценции R-GECO1, что свидетельствовало о повышении концентрации цитозольного Ca²⁺. При этом пространственное распределение флуоресценции PH(Akt)-Venus не менялось, что указывает на отсутствие ацетилхолин-зависимой активации P13К. Стимуляция инсулином (100 нМ) не влияла на флуоресценцию R-GECO1, т.е. не затрагивала внутриклеточный Ca²⁺, но приводила к аккумуляции PH(Akt)-Venus у плазмалеммы клеток (указано стрелками), свидетельствуя об активации P13К.

в данной работе использовали SDCM-микроскопию (spinning disk confocal microscopy).

Оказалось, что при стимуляции клеток НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus инсулином, запускающим P13К-сигнализацию посредством активации тирозин-киназных рецепторов [16], регулярно наблюдалось перераспределение флуоресценции сенсора PH(Akt)-Venus из цитозоля к плазматической мембране клетки, причем этот эффект отменялся в присутствии вортманнина или PI828 (рис. 1). Эти данные свидетельствовали о том, что инсулин действительно стимулировал активность P13К в исследованных клетках, а вортманнин и PI828 эффективно ингибировали

P13К. Для выявления роли P13К в генерации агонист-индуцированных Ca²⁺-сигналов клетки НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus последовательно стимулировали ацетилхолином и инсулином (схема эксперимента представлена на рис. 2*a*). Хотя для стимуляции Ca²⁺-сигнализации было достаточно аппликации ацетилхолина длительностью 1 мин, P13К-сигнализация является более медленным процессом [17], и поэтому клетки инкубировали в присутствии ацетилхолина в течение 10 мин. При таком протоколе клетки массово генерировали кратковременные Ca²⁺-ответы в течение первой минуты после начала стимуляции, хотя затем некоторые клетки могли генерировать

повторные Ca^{2+} -сигналы (рис. 2б, R-GECO1). При этом изменений в пространственном распределении флуоресценции сенсора PIP3 PH(Akt)-Venus, которое в контроле было равномерным, в присутствии ацетилхолина зарегистрировано не было (рис. 2б, PH(Akt)-Venus). В то же время при последующей стимуляции клеток инсулином наблюдалась иная реакция. Оказалось, что инсулин не вызывал детектируемого изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} по отношению к покою, но инициировал аккумуляцию PH(Akt)-Venus у плазматической мембраны клеток, свидетельствуя о PI3K-зависимой генерации PIP3 (рис. 2б).

Таким образом, полученные данные наглядно демонстрируют, что, стимулируя Ca^{2+} -сигнализацию, ацетилхолин не инициирует существенную активацию PI3K-пути в клетках НЕК-293. Поэтому PI3K не может быть вовлечена в трансдукцию ацетилхолина в клетках НЕК-293. Как следствие, хотя результаты работы свидетельствуют об эффективном ингибировании PI3K вортманнином и PI828, последний не мог подавлять Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, воздействуя на PI3K, но действовал на какую-то иную клеточную мишень. Ее идентификация представляет собой задачу для последующих исследований.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток на клеточном сортере FACSAria SORP в рамках Программы развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Clapham D. 2007. Calcium signaling. *Cell*. **131**, 1047–1058.
- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev*. **96**, 1261–1296.
- Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 329–341.
- Jean S., Kiger A.A. 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 923–928.
- Parys J.B., Vervliet T. 2020. New insights in the IP3 receptor and its regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1131**, 243–270.
- Graves B.M., Simerly T., Li C., Williams D.L., Wondergem R. 2012. Phosphoinositide-3-kinase/akt – dependent signaling is required for maintenance of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, I_{Ca} , and Ca^{2+} transients in HL-1 cardiomyocytes. *J. Biomed. Sci.* **19**, 59.
- Ghigo A., Laffargue M., Li M., Hirsch E. 2017. PI3K and calcium signaling in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **121**, 282–292.
- Santoso N.G., Cebotaru L., Guggino W.B. 2011. Polycystin-1, 2, and STIM1 interact with IP3R to modulate ER Ca^{2+} release through the PI3K/Akt pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **27**, 715–726.
- Marchi S., Marinello M., Bononi A., Bonora M., Giorgi C., Rimessi A., Pinton P. 2012. Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca^{2+} release and apoptosis. *Cell Death Dis.* **3**, e304.
- Fregeau M.O., Rergimbald-Dumas Y., Guillemette G. 2011. Positive regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by mammalian target of rapamycin (mTOR) in RINm5F cells. *J. Cell. Biochem.* **112**, 723–733.
- Szabo T., Vanderheyden V., Parys J.B., De Smedt H., Rietdorf K., Kotelevets L., Chastre E., Khan F., Landegren U., Söderberg O., Bootman M.D., Roderick H.L. 2008. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca^{2+} release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 2427–2432.
- Zhang Y., Kwon S.H., Vogel W.K., Filtz T.M. 2009. PI(3,4,5)P3 potentiates phospholipase C- β activity. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **29**, 52–62.
- Дымова Е.А., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Котова П.Д. 2021. PI828 подавляет Ca^{2+} -сигнализацию, инициируемую аминергическими агонистами, по механизму, независимому от ингибирования PI3-киназы. *Биол. мембраны.* **38** (5), 388–392.
- Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.-F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. 2011. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science.* **333** (6051), 1888–1891.
- O'Neill P.R., Gautam N. 2014. Subcellular optogenetic inhibition of G proteins generates signaling gradients and cell migration. *Mol. Biol. Cell.* **25** (15), 2305–2314.
- Hopkins B.D., Goncalves M.D., Cantley L.C. 2020. Insulin-PI3K signalling: An evolutionarily insulated metabolic driver of cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16** (5), 276–283.
- Backer J.M., Schroeder G.G., Kahn C.R., Myers M.G. Jr., Wilden P.A., Cahill D.A., White M.F. 1992. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267** (2), 1367–1374.

Monitoring Agonist-Induced Activity of PI3-Kinase in HEK-293 with a Genetically Encoded Sensor

P. D. Kotova¹, *, O. A. Rogachevskaja¹, N. V. Kabanova¹, S. S. Kolesnikov¹

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

**e-mail: p.d.kotova@gmail.com*

In non-excitabile cells, IP₃-driven Ca²⁺ release plays a pivotal role in agonist-induced Ca²⁺ signaling. The efficiency of the phosphoinositide cascade, which couples diverse cell surface receptors to Ca²⁺ mobilization, is modulated by a number of kinases, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K) that phosphorylates PIP₂ to generate the phospholipid PIP₃. We have previously shown that the PI3K inhibitor wortmannin does not affect acetylcholine-induced Ca²⁺ signaling in HEK-293 cells, while PI828, a PI3K inhibitor of distinct chemical nature, completely suppressed cellular responses to the agonist. As a possible reason for the different effectivity of wortmannin and PI828, PI3K isoforms functioning in HEK-293 could be much more sensitive to PI828. To clarify this issue, we generated a monoclonal line of HEK-293 cell, which expresses two genetically encoded sensors, namely, the cytosolic Ca²⁺ sensor R-GECO1 and the PIP₃ sensor PH(Akt)-Venus. The cells of this line allowed for simultaneous monitoring of Ca²⁺ signals and PI3K activity. While R-GECO1 fluorescence is directly stimulated by Ca²⁺ binding, generation of PIP₃ by PI3K initiates the translocation of PH(Akt)-Venus from the cytosol to the plasmalemma. It turned out that acetylcholine initiated a transient increase in the intracellular Ca²⁺ but did not affect the distribution of the PIP₃ sensor in the cell cytosol. This indicated that acetylcholine did not stimulate PI3K activity. At the same time, insulin, which stimulates PI3K through tyrosine kinase receptors, caused the cytosol/plasmalemma translocation of PH(Akt)-Venus, thus demonstrating insulin-induced PI3K activity. This insulin-evoked translocation of PH(Akt)-Venus was canceled by wortmannin and PI828, suggesting that the inhibition of PI3K activity by these compounds was rather effective. Thus, being capable of stimulating intracellular Ca²⁺ signaling in HEK-293 cells, acetylcholine did not stimulate the PI3K pathway, which, therefore, was not involved in cholinergic transduction. Although the inhibition of PI3K by wortmannin and PI828 was undoubtable, the results of the present work suggest that PI828 suppressed acetylcholine-induced Ca²⁺ signaling nonspecifically, that is, not involving PI3K, but acting on some other cellular target.

Keywords: muscarinic receptors, intracellular Ca²⁺ signaling, PI3-kinase, genetically encoded PIP₃ sensor, acetylcholine