

УДК 577.352.465

ИЗОФОРМ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ P13K ПОДАВЛЯЮТ АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННУЮ Ca²⁺-СИГНАЛИЗАЦИЮ ПО P13K-НЕЗАВИСИМОМУ МЕХАНИЗМУ

© 2022 г. Е. А. Дымова^а, О. А. Рогачевская^а, П. Д. Котова^а *

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

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

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 10.05.2022 г.

Принята к публикации 12.05.2022 г.

Ацетилхолин является первичным медиатором в аутокринных и паракринных регуляциях, контролируемых физиологические процессы в различных клетках и тканях. В данной работе с помощью микрофотометрии, Ca²⁺-зонда Fluo-4 и ингибиторного анализа показано, что в клетках линии НЕК-293 ацетилхолин вызывает мобилизацию Ca²⁺, стимулируя мускариновые рецепторы, сопряженные с фосфоинозитидным сигнальным каскадом. При исследовании роли P13-киназы (P13K) в трансдукции ацетилхолина установлено, что специфические ингибиторы P13Kβ (AZD 6482), P13Kγ (AS 605240) и P13Kδ (LTURM 36) полностью подавляют агонист-индуцированные Ca²⁺-сигналы. При этом специфический ингибитор P13Kα (GSK 1059615) не оказывает влияния на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca²⁺-ответы на ацетилхолин. Ряд фактов указывает на то, что эффекты ингибиторов P13K на клеточные ответы обусловлены механизмами, независимыми от ингибирования P13K, и что возможной клеточной мишенью этих соединений является мускариновый рецептор M3. Высказано предположение, что изоформ-специфические ингибиторы P13K AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36 являются антагонистами M3-рецепторов.

Ключевые слова: ингибиторы P13-киназы, мускариновые рецепторы, Ca²⁺-сигнализация

DOI: 10.31857/S0233475522060044

ВВЕДЕНИЕ

Ацетилхолин играет важную роль в физиологии клеток и тканей, в частности, выполняя роль нейротрансмиттера в центральной и периферической нервной системе и являясь первичным медиатором в аутокринных и паракринных регуляциях, контролируемых физиологические процессы в различных ненейрональных тканях [1, 2]. Чувствительность клеток к ацетилхолину обеспечивается поверхностными рецепторами двух классов, включая ионотропные никотиновые рецепторы, представляющие собой лиганд-активируемые Ca²⁺-проницаемые катионные каналы, и мускариновые рецепторы, сигнальная функция которых обеспечивается сопряжением с G-белками (G-protein coupled receptor, GPCR-рецепторы) и различными внутриклеточными сигнальными путями [1]. Ряд мускариновых рецепторов (M1, M3, M5) сопряжен с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией внутриклеточного Ca²⁺ [1]. Ключевыми в этом процессе являются продукция вторичного медиатора IP3, катализируемая фосфолипазой C, и IP3-зависимый выброс депони-

рованного Ca²⁺ из Ca²⁺-депо [3, 4]. Регуляторная роль IP3 сводится к активации IP3-рецепторов, которые фактически являются лиганд-управляемыми Ca²⁺-проницаемыми каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и некоторых других внутриклеточных органеллах [5]. Помимо IP3, коагонистом IP3-рецепторов является цитозольный Ca²⁺, который оказывает бифазное действие на их активность через Ca²⁺-связывающие центры двух типов [6]. Связывание Ca²⁺ с высокоаффинным активаторным сайтом IP3-рецептора приводит к существенному росту вероятности открытого состояния этого Ca²⁺-канала [7], так что ионы Ca²⁺, высвобождающиеся из Ca²⁺-депо через IP3-рецептор, потенцируют его активность. Эта положительная обратная связь лежит в основе Ca²⁺-индуцированного выброса депонированного Ca²⁺ (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release) – регенеративного процесса, который определяет многие аспекты внутриклеточной Ca²⁺-сигнализации [3, 8].

На протекание процесса Ca^{2+} -индуцированного выброса депонированного Ca^{2+} влияют механизмы, регулирующие IP3-рецепторы, активность которых, в частности, контролируется процессами фосфорилирования/дефосфорилирования при участии ряда киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (P13K) [9, 10]. Ранее нами было показано, что ингибитор P13K вортманнин не влияет на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, тогда как ингибитор P13K другой химической природы P1828 полностью подавляет эти ответы [11]. Разная эффективность вортманнина и P1828 могла быть связана с тем, что в клетках НЕК-293 функционируют изоформы P13K, существенно более чувствительные к P1828. Для внесения ясности в этот вопрос мы исследовали влияние изоформ-специфических ингибиторов P13K на Ca^{2+} -сигнализацию, инициируемую ацетилхолином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии НЕК-293 (российская коллекция клеточных культур позвоночных) культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich), 2 мМ глутамина (Sigma-Aldrich) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C.

Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} . Для эксперимента клетки снимали с культурального пластика 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы, в ряде экспериментов использовали внеклеточный раствор, содержащий 260 нМ свободного Ca^{2+} , для чего 2 мМ CaCl_2 заменяли на 0.5 мМ EGTA + 0.4 мМ CaCl_2 (все соли и буферы произведены Sigma-Aldrich). Для загрузки флуоресцентным Ca^{2+} -зондом Fluo-4 клетки инкубировали в присутствии проникающего через мембрану Fluo-4 AM (4 мМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток возбуждали на

длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм, что соответствует спектральным характеристикам Fluo-4. Изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – интенсивность эмиссии Ca^{2+} -индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc).

Все химические соединения, использованные в описанных ниже экспериментах, применяли путем полной замены раствора в фотометрической камере с помощью системы перфузии. В работе использовали: ацетилхолин, АТФ, AS 605240, AZD 6482, GSK 1059615, LTURM 36 (все Tocris Bioscience).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В физиологических экспериментах практически все клетки НЕК-293 генерировали Ca^{2+} -ответы на стимуляцию ацетилхолином. Нами были проанализированы механизмы, используемые клетками НЕК-293 для генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин. Одной из решавшихся задач было выяснение вклада источников ацетилхолин-индуцируемого поступления Ca^{2+} в цитозоль, т.е. выброса Ca^{2+} из внутриклеточного депо и входа наружного Ca^{2+} . Для этого, в частности, анализировали способность клеток НЕК-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин в среде с пониженным до цитоплазматического уровня содержанием Ca^{2+} (260 нМ). Оказалось, что все протестированные холинергические НЕК-293 в среде с пониженным Ca^{2+} генерировали практически нормальные по амплитуде и кинетике ответы на ацетилхолин (рис. 1а). Это свидетельствует о том, что основным источником Ca^{2+} для исследуемых ответов служит депонированный Ca^{2+} , а за чувствительность НЕК-293 к ацетилхолину ответственные GPCR-рецепторы ацетилхолина – мускариновые рецепторы. В связи с этим было вполне ожидаемо, что Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин подавлялись в присутствии ингибитора фосфолипазы C U73122 (рис. 1а). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что для генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин клетки НЕК-293 преимущественно используют мускариновые рецепторы, сопряженные с фосфоинозитидным путем трансдукции сигнала.

При исследовании эффектов изоформ-специфических ингибиторов P13K оказалось, что Ca^{2+} -

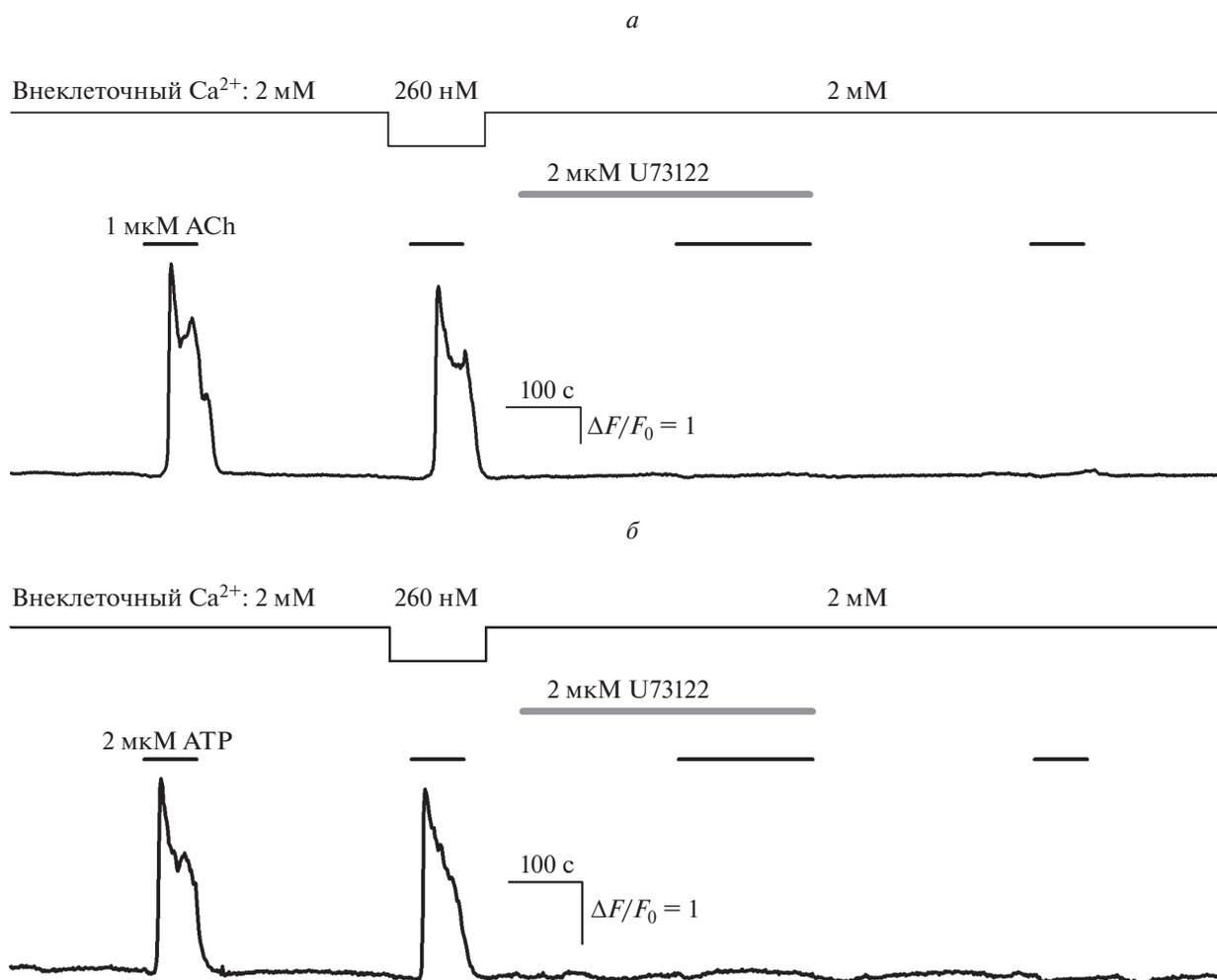
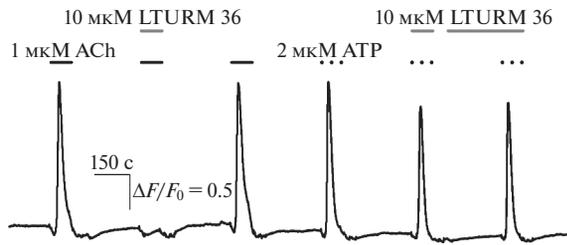


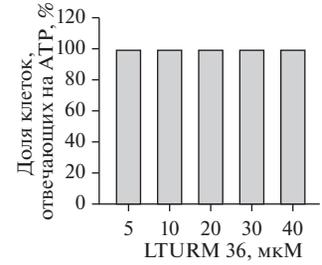
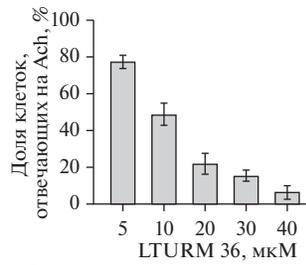
Рис. 1. Вклад фосфоинозитидного каскада в Ca^{2+} -ответы HEK-293 на ацетилхолин и АТР. Репрезентативные регистрации Ca^{2+} -ответов двух различных клеток HEK-293 при варьируемом внеклеточном Ca^{2+} и в присутствии ингибитора фосфолипазы С U73122 (2 мкМ) при стимуляции: а – 1 мкМ ацетилхолина (ACh), б – 2 мкМ АТР. Здесь и далее моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Изменение внутриклеточного Ca^{2+} оценивается по относительному изменению флуоресценции Fluo-4: $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии зонда и его эмиссия в начале регистрации соответственно.

ответы на ацетилхолин полностью подавлялись в присутствии AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36, использовавшихся в достаточных дозах (рис. 2). Наиболее эффективным оказался ингибитор $\text{PI3K}\delta$ LTURM 36, который в концентрации 10 мкМ блокировал ответы 48.8% клеток, чувствительных к ацетилхолину (рис. 2а). Концентрации полуэффекта для ингибиторов $\text{PI3K}\beta$ AZD 6482 и $\text{PI3K}\gamma$ AS 605240 составляли приблизительно 30 и 40 мкМ соответственно (рис. 2б, 2в). В то же время ингибитор $\text{PI3K}\alpha$ (GSK 1059615) в широком диапазоне концентраций (1–100 мкМ) не влиял на способность клеток генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин (рис. 2г), которые подавлялись в присутствии неспецифического ингибитора PI3K PI828 (рис. 2д) [11]. Формально полученные ре-

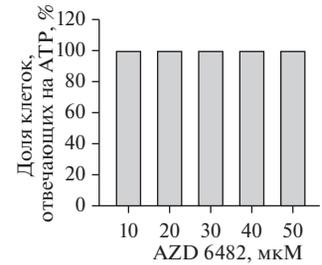
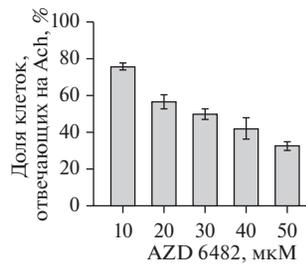
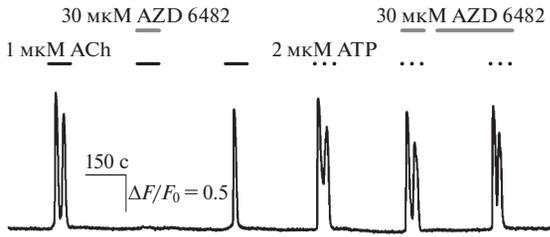
зультаты можно рассматривать как свидетельство того, что в генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин в клетках HEK-293 принимают участие β -, γ - и преимущественно δ -изоформа PI3K , тогда как α -изоформа не задействована в этом механизме. Однако обращал на себя внимание тот факт, что ингибирование Ca^{2+} -ответов в присутствии LTURM 36, AZD 6482 и AS 605240 наблюдалось при аппликации этих соединений одновременно с ацетилхолином, хотя обычно ингибирование внутриклеточных мишеней в интактных клетках требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану. В связи с этим возникал вопрос, в какой степени наблюдавшееся подавление Ca^{2+} -ответов обуслов-



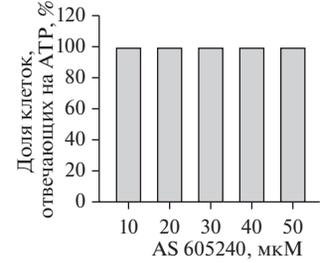
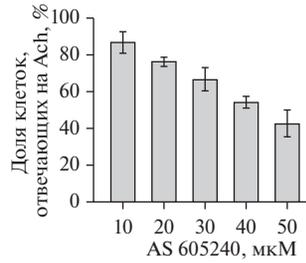
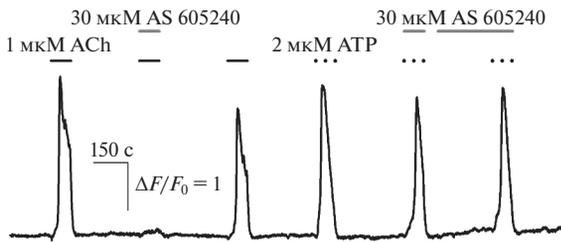
а



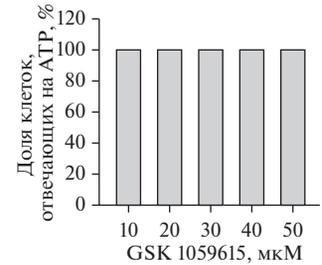
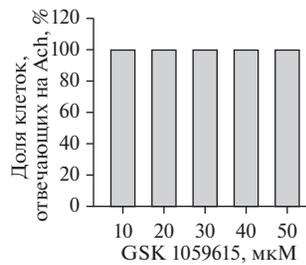
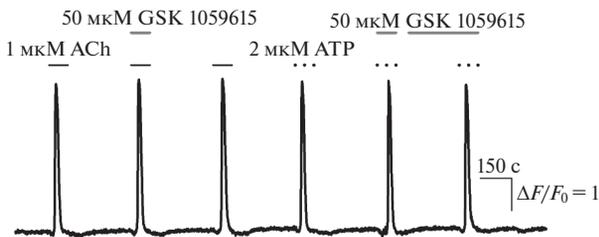
б



в



г



д

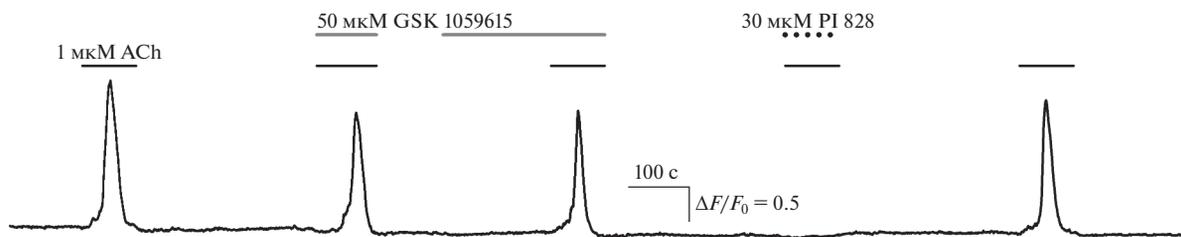


Рис. 2. Влияние специфических ингибиторов различных изоформ П13К на Ca^{2+} -ответы клеток НЕК-293 на ацетилхолин и АТР. *a–z* – На левых панелях представлены репрезентативные Ca^{2+} -ответы одиночных клеток на ацетилхолин (ACh) (1 мкМ) и АТР (2 мкМ) в контроле и присутствии ингибиторов: *a* – П13К δ LTURM 36 (10 мкМ), *b* – П13К β AZD 6482 (30 мкМ), *в* – П13К γ AS 605240 (30 мкМ), *z* – П13К α GSK 1059615 (50 мкМ). На средних панелях приводится доля (в %) клеток, отвечающих на ацетилхолин (1 мкМ), на правых панелях – доля (в %) клеток, отвечающих на АТР (2 мкМ), в присутствии ингибиторов: *a* – П13К δ LTURM 36 ($n = 341$), *b* – П13К β AZD 6482 ($n = 280$), *в* – П13К γ AS 605240 ($n = 226$), *г* – П13К α GSK 1059615 ($n = 357$). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение; усреднение по 3–5 независимым экспериментам, в каждом из которых мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} проводили в 80–100 индивидуальных клетках. *d* – Репрезентативная регистрация Ca^{2+} -ответов одиночной клетки на ацетилхолин (1 мкМ) в контроле и присутствии ингибитора П13К α GSK 1059615 (50 мкМ) и неспецифического ингибитора П13К П1828 (30 мкМ) ($n = 274$).

лено воздействием перечисленных соединений именно на внутриклеточные сигнальные процессы, активируемые в НЕК-293 ацетилхолином и, прежде всего, на фосфоинозитидный сигнальный путь.

Одним из возможных вариантов проверки воздействия ингибиторов П13К на фосфоинозитидный каскад было исследование влияния этих соединений на Ca^{2+} -сигнализацию, инициируемую не холинергическими агонистами. В эксперименте, аналогичном описанному выше, было установлено, что, действуя через P2Y-рецепторы, АТР вызывает в клетках НЕК-293 Ca^{2+} -ответы, которые также генерируются при участии фосфоинозитидного пути (рис. 1б). Оказалось, что ни один из исследовавшихся изоформ-специфических ингибиторов П13К не влиял на способность клеток НЕК-293 отвечать на АТР (рис. 2*a–z*), а значит, активность П13К вносит минимальный вклад в механизм их генерации.

Таким образом, исследовавшиеся ингибиторы П13К по-разному влияли на мобилизацию Ca^{2+} , индуцированную различными агонистами при участии фосфоинозитидного сигнального пути. С одной стороны, AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36 полностью подавляли Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, однако когда в качестве агониста использовали АТР, то какое-либо влияние перечисленных ингибиторов П13К на клеточные ответы отсутствовало. Полученные данные указывали на то, что подавление Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин соединениями AZD 6482, AS 605240, LTURM 36 связано не с ингибированием П13К, которая модулирует фосфоинозитидный каскад, а с воздействием на другую клеточную мишень, которая участвует в генерации Ca^{2+} -ответа на ацетилхолин, но не является частью фосфоинозитидного сигнального пути. Такой мишенью могут являться непосредственно мускариновые рецепторы ацетилхолина, что косвенно подтверждается способностью соединений AZD 6482, AS 605240, LTURM 36 блокировать Ca^{2+} -ответы при одновременной аппликации с ацетилхолином (рис. 2*a–z*). В исследованиях, предшествующих этому, нами было установлено, что за чувствительность НЕК-293 к ацетилхолину отвечает М3-рецептор [12], и, следовательно, именно этот

мускариновый рецептор является наиболее вероятной мишенью соединений AZD 6482, AS 605240, LTURM 36.

Ранее методами вычислительной биофизики нами была продемонстрирована возможность связывания с М3-рецепторами ингибиторов П13К LY294002, LY303511 и Voxelisib [12, 13]. Результаты физиологических экспериментов, описанные в данной работе, показали, что ингибитор П13К GSK 1059615 не влиял на способность клеток отвечать на ацетилхолин, а значит, не все синтетические ингибиторы П13-киназы обладают антагонистическими свойствами по отношению к мускариновым рецепторам. Полученные результаты по ингибированию клеточных ответов могут отражать эффективность связывания специфических ингибиторов П13К с М3-рецепторами, которая в этом случае описывается рядом: LTURM 36 > AZD 6482 > AS 605240. Сочетание экспериментальных подходов и математического моделирования, возможно, позволит в дальнейшем установить набор молекулярных признаков, которые обеспечивают узнавание М3-рецептором ингибиторов П13К как своих лигандов. В перспективе это может позволить создавать ингибиторы П13К, не оказывающие неспецифического действия на активность М3-рецепторов.

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

1. Brown D.A. 2019. Acetylcholine and cholinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* 3, 2398212818820506.
2. Wessler I., Kirkpatrick C.J. 2008. Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 154 (8), 1558–1571.
3. Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* 96, 1261–1296.

4. Thillaiappan N.B., Chakraborty P., Hasan G., Taylor C.W. 2019. IP3 receptors and Ca²⁺ entry. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* **1866** (7), 1092–1100.
5. Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP3 receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
6. Prole D.L., Taylor C.W. 2019. Structure and function of IP3 receptors. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **11** (4), a035063.
7. Mak D.O., Foskett J.K. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium.* **58**, 67–78
8. Rios E. 2018. Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J. Gen. Physiol.* **150**, 521–537.
9. Szado 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 Ca²⁺ release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (7), 2427–2432.
10. Frégeau M.O., Régimbald-Dumas Y., Guillemette G. 2011. Positive regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by mammalian target of rapamycin (mTOR) in RINm5F cells. *J. Cell Biochem.* **112** (2), 723–733.
11. Дымова Е.А., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Котова П.Д. 2021. PI828 подавляет Ca²⁺-сигнализацию, инициируемую аминергическими агонистами, по механизму, независимому от ингибирования PI3-киназы. *Биол. мембраны.* **38** (5), 265–273.
12. Лямин О.О., Котова П.Д., Дымова Е.А., Фадеев П.Ю., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Колесников С.С. 2022. Ингибитор PI3K и mTOR воксталисиб нарушает сопряжение мускаринового рецептора M3 с мобилизацией Ca²⁺. *Биол. мембраны.* **33** (3), 205–214.
13. Kotova P.D., Kochkina E.N., Lyamin O.O., Rogachevskaja O.A., Kovalenko N.P., Ivashin D.S., Bystrova M.F., Enukevich N.I., Kolesnikov S.S. 2020. Calcium signaling mediated by aminergic GPCRs is impaired by the PI3K inhibitor LY294002 and its analog LY303511 in a PI3K-independent manner. *Eur. J. Pharmacol.* **880**, 173182.

Isoform-Specific Inhibitors of PI3K Impair Agonist-Induced Ca²⁺ Signaling in a PI3K-Independent Manner

E. A. Dymova¹, O. A. Rogachevskaja¹, P. D. Kotova¹, *

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

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

Acetylcholine (ACh) serves as the first messenger mediating certain autocrine and paracrine regulations to control a variety of physiological processes in diverse tissues and cells. Using the inhibitory analysis, Ca²⁺ imaging, and Ca²⁺ dye Fluo-4, here we demonstrated that ACh was capable of mobilizing intracellular Ca²⁺ by stimulating muscarinic receptors coupled to the phosphoinositide signaling pathway. When a role for PI3K in the ACh transduction was analyzed, it was found that certain isoform-specific PI3K inhibitors, including AZD 6482 (PI3Kβ), AS 605240 (PI3Kγ), and LTURM 36 (PI3Kδ), suppressed ACh-induced Ca²⁺ signaling, while the PI3Kα inhibitor GSK 1059615 was ineffective. The evidence suggested that PI3K inhibitors inhibited cell responsiveness to ACh in PI3K-independent manner, and that the M3 muscarinic receptor appeared to be a likely cellular target. Based on the overall finding, we hypothesize that the specific PI3K inhibitors AZD 6482, AS 605240 и LTURM 36 can directly antagonize the M3 receptor.

Keywords: PI3K inhibitors, muscarinic receptors, Ca²⁺ signaling