

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.465

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ НА НОРАДРЕНАЛИН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОННОГО МОНИТОРИНГА Ca^{2+} И cAMP В КЛЕТКАХ НЕК 293

© 2021 г. Е. Н. Кочкина^a *, О. А. Рогачевская^a, П. Д. Котова^a

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

*e-mail: kate-kochkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.05.2021 г.

После доработки 23.07.2021 г.

Принята к публикации 25.07.2021 г.

Норадреналин играет важную роль в регуляции широкого круга физиологических процессов и распознается клетками различных типов с помощью адренергических рецепторов, которые сопряжены с фосфолипазным и аденилатциклазным сигнальными путями. В данной работе мы исследовали адренергическую систему клеток НЕК 293 с использованием генетически кодируемых сенсоров GEM-GECO1 и Pink Flamingo для мониторинга внутриклеточных Ca^{2+} и cAMP соответственно. Нами показано, что в одиночных клетках НЕК 293 норадреналин одновременно стимулирует и Ca^{2+} -сигнализацию, и продукцию cAMP. Интересной особенностью cAMP- и Ca^{2+} -сигналов оказалось то, что с повышением дозы норадреналина амплитуда cAMP-ответов росла градуально, в то время как величина Ca^{2+} -ответов не зависела от концентрации агониста. Физиологическая значимость таких зависимостей обсуждается.

Ключевые слова: адренергические рецепторы, норадреналин, Ca^{2+} -сигнализация, cAMP-сигнализация, генетически кодируемые сенсоры

DOI: 10.31857/S0233475521060050

ВВЕДЕНИЕ

Адреналин и норадреналин представляют собой катехоламины и функционируют как гормоны и нейромедиаторы, модулирующие активность различных органов и тканей, включая сердечно-сосудистую систему, почки, печень и мозг. Самые разнообразные клетки, от нейронов и кардиомиоцитов до мезенхимных стромальных клеток, экспрессируют гены, кодирующие адренорецепторы. Последние принадлежат к суперсемейству гептаспиральных рецепторов, сигнальная функция которых во многом обеспечивается взаимодействием с G-белками (G-protein coupled receptors). Идентифицировано девять генов, кодирующих адренорецепторы, которые на основе структурных и функциональных свойств отнесены к трем группам: α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) и β (β_1 , β_2 , β_3) [1]. Традиционно считалось, что α_1 -адренорецепторы преимущественно сопряжены с $G_{q/11}$ -белком, стимулирующим фосфолипазу C (PLC), α_2 -адренорецепторы — с $G_{i/o}$ -белком, ингибирующим активность аденилатциклазы (AC), а β -адренорецепторы связываются с G_s -белком, активирующим аденилатциклазу. Между тем данные, накопленные к настоящему мо-

менту, свидетельствуют о том, что варианты сопряжения адренергических рецепторов с внутриклеточными сигнальными каскадами куда более разнообразны [2, 3]. Так, например, показано, что активация β -адренорецепторов может приводить к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} по cAMP-независимому пути [4].

В наших исследованиях адренергической системы мезенхимных стромальных клеток (МСК), выделенных из жировой ткани человека, было показано, что норадреналин инициирует Ca^{2+} -сигнализацию в МСК. Интересной особенностью этих Ca^{2+} -сигналов было то, что в малых концентрациях норадреналин не вызывал детектируемого увеличения уровня внутриклеточного Ca^{2+} , но начиная с пороговой дозы инициировал Ca^{2+} -ответы, величина которых фактически не зависела от концентрации агониста [5]. Иными словами, клетки генерировали Ca^{2+} -ответы на норадреналин по принципу “всё или ничего”; такой характер ответа ставит вопрос о том, как в МСК кодируется информация о величине приходящего стимула для формирования адекватной реакции на него. Было также неясно, насколько универсален данный тип клеточных ответов на агонисты. В

данной работе мы установили, что клетки НЕК 293 также отвечают на норадреналин мобилизацией Ca^{2+} в цитозоле, при этом Ca^{2+} -ответы генерируются по принципу “всё или ничего” (рис. 1а, верхняя кривая, 1б). Таким образом, данный тип Ca^{2+} -ответа может быть достаточно универсальным, и в этом случае вопрос о кодировании интенсивности адренергических стимулов уже не сводился к анализу физиологических процессов в МСК. Возможно, клетки экспрессируют такой набор адренорецепторов, что норадреналин способен запускать в их цитозоле параллельные процессы, один из которых — мобилизация Ca^{2+} , а другой — например, генерация сАМР, каждый из которых нацелен на решение специфических задач клеточной физиологии. Нам представлялось интересным выяснить, вовлекает ли адренергическая сигнализация в клетках параллельные процессы, например Ca^{2+} -сигнализацию и сАМР-сигнализацию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мониторинг сАМР в живой клетке в режиме реального времени возможен только с помощью генетически кодируемых сенсоров, поскольку синтетических флуоресцентных сАМР-зондов на сегодняшний день не разработано. Поэтому для исследования внутриклеточных сАМР- и Ca^{2+} -сигналов мы использовали генетически кодируемые сенсоры внутриклеточного сАМР Pink Flamindo [6] и цитозольного Ca^{2+} GEM-GECO1 [7]. Эти молекулярные сенсоры были гетерологически экспрессированы в клетках линии НЕК 293. Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco), содержащей 4.5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C. Клетки трансфицировали плазмидными векторами Pink Flamindo и CMV-GEM-GECO1 (оба Addgene) с целью индукции экспрессии Pink Flamindo и GEM-GECO1. Для трансфекции использовали набор для липофекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу. В физиологических экспериментах использовали клетки через 24–48 ч после трансфекции. Для мониторинга внутриклеточных сАМР и Ca^{2+} клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning) и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl — 130, KCl — 5, CaCl_2 — 2, MgCl_2 — 1, HEPES — 10, глюкозу — 10. 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 Pink Flamindo и GEM-GECO1 возбуждали поочередно на длинах волн 480 ± 10 нм и 572 ± 17.5 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм и 634 ± 34 нм соответственно. Изменение концентрации сАМР и Ca^{2+} в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Pink Flamindo и GEM-GECO1 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В общей сложности было проанализировано 226 клеток, для которых была характерна флуоресценция, индуцированная экспрессией одновременно обоих флуоресцентных белков — Pink Flamindo и GEM-GECO1. Оказалось, что стимуляция таких клеток норадреналином в различных дозах инициировала увеличение концентраций сАМР и/или Ca^{2+} в их цитозоле. Так, 152 клетки (67%) генерировали исключительно сАМР-ответы, 25 клеток (11%) генерировали только Ca^{2+} -ответы, а в 49 клетках (22%) наблюдалось увеличение уровня обоих вторичных медиаторов в ответ на норадреналин (рис. 1а). Таким образом, значительное большинство (89%) клеток НЕК 293, чувствительных к норадреналину, генерировали сАМР-ответы, тогда как агонист-зависимая мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} наблюдалась лишь в 33% субпопуляции. Такая функциональная гетерогенность клеток НЕК 293, видимо, отражает их молекулярную гетерогенность в том отношении, что индивидуальная клетка характеризуется специфическим паттерном экспрессии генов адренорецепторов и/или специфическими механизмами их сопряжения с внутриклеточными сигнальными каскадами. С этих позиций можно объяснить количественное противоречие, состоящее в том, что адренорецепторы экспрессируются в большинстве МСК [8], в то время как норадреналин мобилизует Ca^{2+} лишь в небольшой (5–15%) популяции этих клеток [5].

Генерация Ca^{2+} -ответов на норадреналин клетками НЕК 293 подчинялась принципу “всё или ничего”, т.е. при стимуляции агонистом в подпороговых концентрациях ответы не детектировались, тогда как амплитуда ответов на агонист в любых концентрациях, превышающих пороговую, была практически одинаковой (рис. 1а, верхняя кривая, 1б). Пороговая концентрация норадреналина варьировалась от клетки к клетке и лежала в пределах 1–5 мкМ. Описанный тип дозозависимости Ca^{2+} -ответов на агонисты был

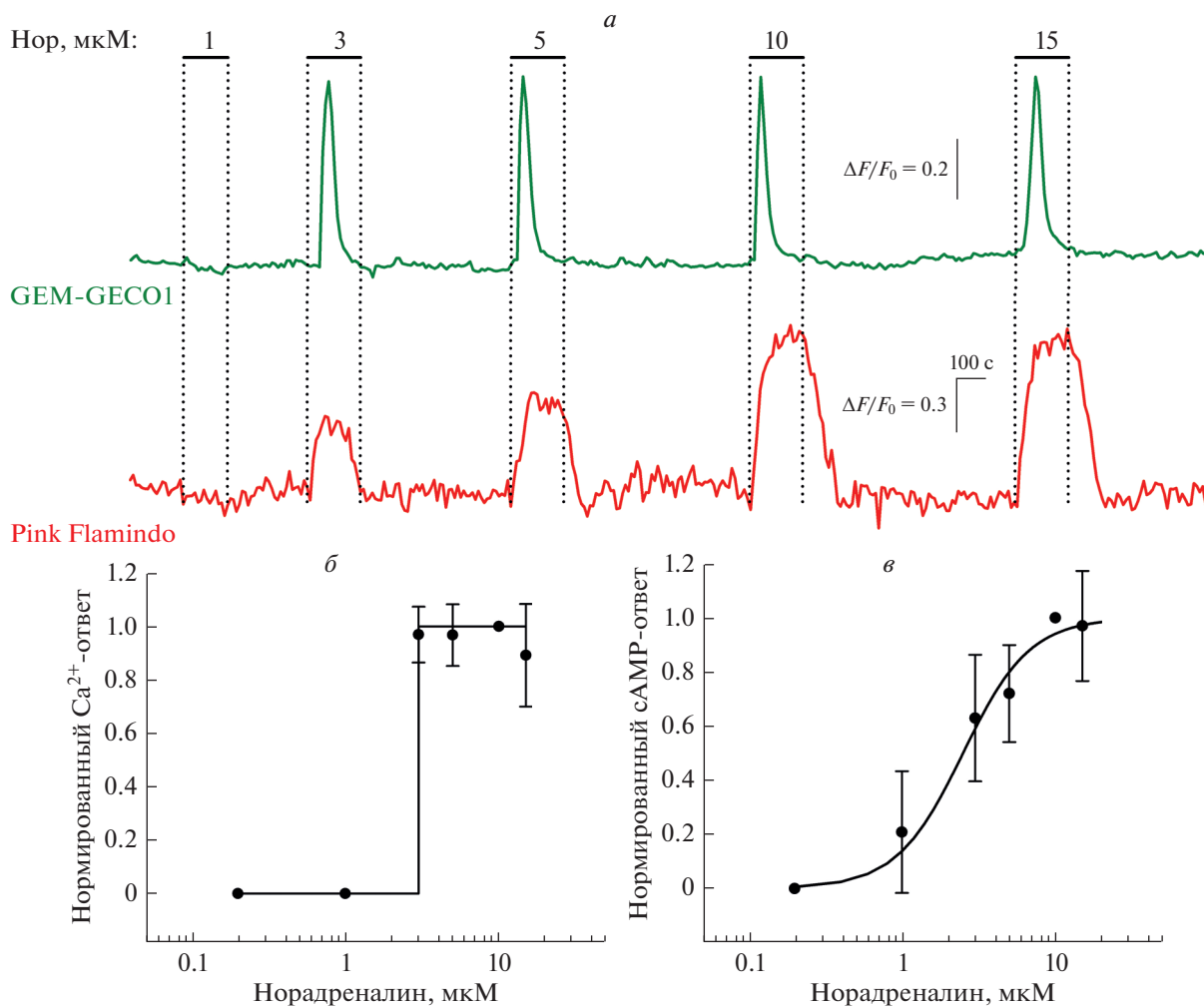


Рис. 1. Ca^{2+} - и сАМР-ответы одиночных клеток НЕК 293 на стимуляцию норадреналином в различных концентрациях. *а* – Репрезентативная регистрация Ca^{2+} - и сАМР-ответов одиночной клетки НЕК 293 на норадреналин (Нор) в различных концентрациях ($n = 226$). Моменты и продолжительность аппликаций норадреналина обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Изменение внутриклеточного Ca^{2+} характеризовали относительной флуоресценцией GEM-GECO1 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F_0 - F$, изменение внутриклеточного сАМР характеризовали относительной флуоресценцией Pink Flamindo $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – текущая интенсивность эмиссии индикатора и его эмиссии в начале регистрации соответственно.

б – Дозозависимость Ca^{2+} -ответов клеток НЕК 293, характеризующихся одинаковым порогом чувствительности к норадреналину 3 мкМ ($n = 14-20$). Каждый ответ был нормирован на ответ, вызванный в соответствующей клетке норадреналином в концентрации 10 мкМ. Экспериментальная зависимость (точки) аппроксимирована функцией Хевисайда со скачком в точке 3 мкМ (непрерывная линия). Экспериментальные данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

в – Дозозависимость сАМР-ответов на норадреналин клеток НЕК 293 ($n = 201$). Каждый ответ был нормирован на ответ, вызванный в данной клетке 10 мкМ норадреналина. Экспериментальная зависимость (точки) аппроксимирована уравнением Хилла: $R = A^h / (A_{0.5}^h + A^h)$, где R – нормированный клеточный ответ, A – концентрация норадреналина, $A_{0.5}$ – концентрация полуэффекта, h – коэффициент Хилла. Непрерывная линия получена при $h = 2$ и $A_{0.5} = 2.5$ мкМ. Экспериментальные данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

обнаружен в МСК в наших предыдущих исследованиях [5, 9, 10]. Результаты этих работ свидетельствовали о том, что ключевым механизмом, обеспечивающим инвариантность формы Ca^{2+} -сигналов, индуцированных агонистами в различных дозах, является Ca^{2+} -индуцированный вы-

брос депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR). По-видимому, универсальность величины и формы Ca^{2+} -ответов на норадреналин в клетках НЕК 293 (рис. 1а, верхняя кривая) также обеспечивает CICR. Отметим, что дозозависимость сАМР-ответов клеток НЕК 293 носила

совершенно иной характер: пороговая концентрация норадреналина лежала в области 1–3 мкМ, а амплитуда cAMP-ответов росла пропорционально концентрации агониста (рис. 1а, нижняя кривая, 1б).

Таким образом, использование генетически кодируемых сенсоров Ca^{2+} и cAMP позволило продемонстрировать, что норадреналин способен инициировать в клетках НЕК 293 сложный паттерн внутриклеточных событий, стимулируя как минимум мобилизацию Ca^{2+} и генерацию cAMP. Поскольку Ca^{2+} -ответы, инициированные короткими аппликациями норадреналина, были инвариантны по форме при разных дозах агониста, то кодирование информации об интенсивности стимула могло осуществляться на уровне cAMP-сигналов, амплитуда которых зависела от концентрации норадреналина (рис. 1). Скорее всего, клетки, которые генерируют Ca^{2+} -сигналы в ответ на агонисты по принципу “всё или ничего”, например МСК, могут использовать сходную стратегию кодирования внешних стимулов, генерируя не только Ca^{2+} -сигналы, но и сигналы другой природы, например, в форме импульсов cAMP, градуально зависящих от силы стимуляции.

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guimaraes S., Moura D. 2001. Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacol. Rev.* **53** (2), 319–356.
- Cotecchia S. 2010. The α 1-adrenergic receptors: Diversity of signaling networks and regulation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **30**, 410–419.
- Cottingham C., Chen H., Chen Y., Peng Y., Wang Q. 2011. Genetic variations of α 2-adrenergic receptors illuminate the diversity of receptor functions. In: *Advances in adrenergic receptor biology*. Ed. Wang Q. San Diego: Academic Press, p. 162–190.
- Galaz-Montoya M., Wright S.J., Rodriguez G.J., Lichtarge O., Wensel T.G. 2017. β 2-Adrenergic receptor activation mobilizes intracellular calcium via a non-canonical cAMP-independent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **292** (24), 9967–9974.
- Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2014. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 1899–1908.
- Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. 2017. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7** (1), 7351.
- 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.
- Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Kanareikina M.A., Kalinina N.I., Sysoeva V.Yu., Dyikanov D.T., Stambolsky D.V., Tkachuk V.A. 2016. Activation of β -adrenergic receptors is required for elevated α 1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* **6**, 32835.
- 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.
- Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., Kochkina E.N., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. 2021. Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells. *BBA Advances*. **1**, 100012.

Responsiveness of HEK 293 Cells to Norepinephrine Analyzed by the On-line Monitoring of Intracellular Ca^{2+} and cAMP

E. N. Kochkina¹ *, O. A. Rogachevskaja¹, P. D. Kotova¹

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

*e-mail: kate-kochkina@yandex.ru

Norepinephrine plays an important role in the regulation of a variety of physiological processes. Cells of various types recognize this hormone by employing adrenergic receptors that can be coupled to the phospholipase and adenylate cyclase signaling pathways. Here we investigated the adrenergic system of HEK 293 cells using genetically encoded sensors GEM-GECO1 and Pink Flamingo for on-line monitoring of intracellular concentrations of Ca^{2+} and cAMP, respectively. We found that in single HEK 293 cells, norepinephrine stimulated both Ca^{2+} signaling and cAMP production. An interesting feature of the cAMP and Ca^{2+} signals was that the magnitude of cAMP responses gradually increased with the dose of norepinephrine, while Ca^{2+} responses exhibited nearly the same magnitude at different agonist concentrations above the threshold value. The physiological significance of such dose dependencies is discussed.

Keywords: adrenergic receptors, norepinephrine, Ca^{2+} signaling, cAMP signaling, genetically encoded sensors