УДК 577.352.4

β-АДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ В АДИПОЦИТАХ БЕЛОГО ЖИРА

Туровский Е.А., Туровская М.В., Толмачева А.В., Долгачева Л.П., Зинченко В.П., Дынник В.В.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, e-mail: turovsky.84@mail.ru

В экспериментах на культивируемых белых адипоцитах мышей с использованием флуоресцентной микроскопии и систем анализа изображений показано, что нейротрансмиттер норадреналин или агонисты β-адренорецепторов – изопротеренол, BRL-37344 в присутствии антагониста α1/2-адренорецепторов фентоламина вызывали увеличение $[Ca^{2+}]i$ в клетках. Селективный антагонист всех трех подтипов β-адренорецепторов – пропраналол подавлял этот Ca^{2+} -ответ. Максимальная амплитуда $[Ca^{2+}]i$ наблюдалась при аппликации активатора β3-адренорецепторов – BRL-37344. Увеличение $[Ca2^{2+}]i$, инициированное активацией β-адренергических рецепторов, осуществляется аденилатциклазной системой трансдукции сигналов. С помощью селективных активаторов аденилатциклазной системы – форсколин, 8-Bromo-cAMP и ингибиторов протеинкиназы А (H-89) и рианодинового рецептора (рианодин) – показано, что cAMP, протеинкиназа А и рианодиновые рецепторы являются участниками пути генерации медленно-развивающегося Ca^{2+} -ответа в культивируемых адипоцитах белого жира мыши.

Ключевые слова: адипоциты, Ca^{2+}, изопротеренол, β-адренорецепторы, протеинкиназа А, IP_3 и RyR

THE β-ADRENORECEPTORS AS REGULATORS OF INTRACELLULAR CALCIUM IN WHITE ADIPOSE ADIPOCYTES

Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Tolmacheva A.V., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Dynnik V.V.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: turovsky.84@mail.ru

In experiments on mouse white adipocytes using fluorescent microscopy and imaging analysis systems it was shown that a neurotransmitter noradrenalin and the agonists of β-adrenergic receptors – isoproterenol and BRL-37344 in the presence of α1/2-adrenoreceptor antagonists, phentolamine, led to an increase in $[Ca^{2+}]i$ in the cells. Selective agonist of all the three subtypes of β-adrenergic receptors, propranolol, suppressed this $Ca2^{2+}$ -response. Maximal amplitude of $[Ca^{2+}]i$ was observed upon the application of an activator of β3-adrenergic receptors – BRL-37344. The increase of $[Ca^{2+}]i$ initiated by the activation of β-adrenergic receptors is realized through the adenylate cyclase signal transduction system. Using selective activators of adenylate cyclase system – forskolin and 8-Bromo-cAMP, as well as inhibitors of protein kinase A (H-89) and ryanodine receptor (ryanodine), it was shown that cAMP, protein kinase A and ryanodine receptors take part in the pathway of generating slow Ca^{2+} -response in the culture of white fat adipocytes of mouse.

Keywords: adipocytes, β-adrenoreceptors, protein kinase A, Ca^{2+}, RyR, IP_3-receptor

Симпатическая нервная система и нейротрансмиттер норадреналин (НА) играют важную роль в процессе липолиза триглицеридов белой жировой ткани [1]. Взаимодействие норадреналина с β-адренорецепторами приводит к активации Gs-белков, аденилатциклазы, увеличению уровня cAMP и активации протеинкиназы А (PKA). Фосфорилирование протеинкиназой А гормон-чувствительной липазы и перилипина инициирует липолиз [5]. На клетках бурого жира показано, что активация β-адренорецепторов может вызывать рост не только cAMP, но и Ca^{2+} [4]. Механизмы β-адренорецептор-зависимого повышения $[Ca^{2+}]_i$ в адипоцитах белой жировой ткани неизвестны. В данной работе на первичной культуре белых адипоцитов мышей предполагалось установить участие β-адренорецепторов и их подтипов в формировании Ca^{2+}-сигнала, пути передачи этих сигналов, участие Ca^{2+} каналов эндоплазматического ретикулума.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали первичную культуру белых адипоцитов мыши на 9 день культивирования (9 DIV), полученную из мезенхимальной фракции стволовых клеток эпидидимального жирового депо в соответствии с общепринятой методикой [8]. Измерение динамики цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) проводили с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия) на базе моторизованного микроскопа Axiovert 200M **с** высокоскоростной черно-белой CCD-камерой AxioCam HSm. Источником света служила ртутная лампа HBO 100. Возбуждение флуоресценции Fura-2 проводили при двух длинах волн (340 и 387 нм) с использованием запирающих светофильтров BP 340/30 и BP 387/15, регистрация в области (465–555) нм (светофильтр эмиссии BP 510/90). Для формирования изображения использовали объектив Plan Neofluar 20×/0.3. В эксперименте получали серии изображений культуры с интервалом 3 сек. Для обработки серий изображений использовали программу Image J 1.44). Клетки загружали кальций-чувствительным зондом Fura-2 (Molecular probes, USA) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), содержащем 10 мМ HEPES, pH 7,4 при 37°C в течение 40 мин с последующей

отмывкой от красителя в течение 15 мин. Построение графиков осуществляли помощью программы Origin-8. Результаты, представленные в работе, получены на 4-х клеточных культурах с 5-ю повторами для каждой культуры.

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее нами было показано на культуре белых адипоцитов, что норадреналин (НА) в физиологических концентрациях вызывает 3 типа кальциевых ответов у белых адипоцитов. Поскольку НА взаимодействует с α_1-, α_2- и β-адренорецепторами адипоцитов белого жира, то для выделения Ca^{2+}-ответа, инициируемого β-адренорецепторами, эксперименты были проведены в присутствии ингибитора α_1- и α_2-адренорецепторов – фентоламина (рис. 1). Как следует из рисунка, Ca^{2+}-ответ начинается после лаг-периода и представляет собой медленное увеличение цитозольного кальция.

Похожие Ca^{2+}-ответы были зарегистрированы под действием изопротеренола (агонист β_1, β_2, β_3-адренорецепторов), и BRL (агонист β_3-адренорецепторов) (рис. 2). Максимальная амплитуда увеличения $[Ca^{2+}]_i$ наблюдалась при аппликации агониста β_3-адренорецепторов, что согласуется с данными о том, что β_3-адренорецепторы селективно экспрессированы в зрелых адипоцитах [7]. Следует отметить, что изменения $[Ca^{2+}]_i$ под действием каждого из трех агонистов обычно развивается медленный двухфазный ответ.

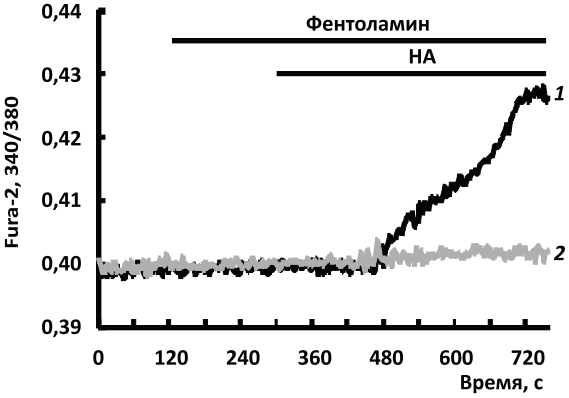

Рис. 1. Изменение $[Ca_2+]_i$ в адипоцитах белого жира при активации β-адренорецепторов норадреналином (НА) на фоне антагониста α1,2-адренорецепторов – фентоламина

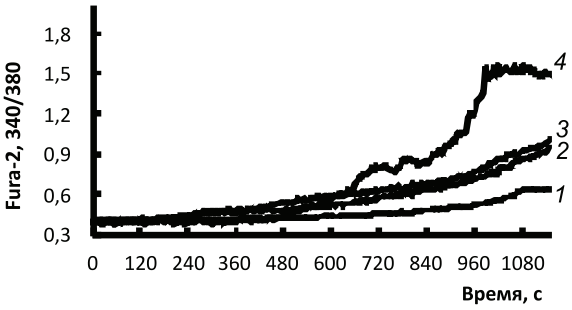

Рис. 2. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в дифференцированных белых адипоцитах при активации β-адренорецепторов и протеинкиназы А. Активация β-адренорецепторов селективными агонистами – изопротеренол ($\beta_{1,2,3}$, кривая 1), BRL-37344 (β_3, кривая 2), аденилатциклазы (форсколин, кривая 3) и протеинкиназы А (8-Bromo-cAMP, кривая 4) – приводит к медленному увеличению $[Ca^{2+}]_i$

Для доказательства специфичности Ca^{2+}-ответа были использованы селективные ингибиторы β-адренорецепторов пропраналол и α_1-, α_2-адренорецепторов фентоламин. Как следует из табл. 1, пропраналол полностью подавлял Ca^{2+}-ответ под действием изопротеренола, а фентоламин не оказывал влияния на этот ответ.

Для определения источника увеличения Ca^{2+} были проведены эксперименты с ингибиторами различных Ca^{2+}-транспортирующих систем (каналов). В табл. 1 показано, что в присутствии ксестоспонгина (ингибитора IP_3-рецепторов) происходит подавление амплитуды Ca^{2+}-ответа на 84%. Таким образом, повышение Ca^{2+} является следствием активации IP_3-рецепторов. Известно, что для целого ряда невозбудимых клеток мобилизация Ca^{2+} является IP_3- и Ca^{2+}-зависимой, а активность IP_3R регулируется фосфорилированием различными протеинкиназ.

Таблица 1

Изменение $[Ca^{2+}]_i$ под действием 3 μM изопротеренола и антагонистов рецепторов

Мишени	Антагонисты мишеней	Эффект
β-адренорецепторы	Пропранолол, 3 μM	Подавление $[Ca^{2+}]_I$ на 100%
α_1-,α_2-адренорецепторы	Фентоламин, 5 μM	Нет эффекта
IP_3-рецепторы	Ксестоспонгин, 0,5μM	Подавление амплитуды $[Ca^{2+}]_i$ на 84%

В последующих экспериментах мы показали, что Ca^{2+}-ответ, инициированный активацией β-адренергических рецепторов, сопряжен с активацией аденилатциклазной системы. Активация b-адренорецепторов адипоцитов приводит к опосредованной G-белками стимуляции аденилатциклазы и к образованию вторичного мессенджера – cAMP. Эти события можно имитировать либо добавлением форсколина – непосредственного активатора аденилатциклазы, либо добавлением к клеткам проникающего через плазматическую мембрану аналога cAMP – 8-Br-cAMP. Соединение 8-Br-cAMP является более резистентным к действию фосфодиэстераз, чем cAMP и активирует PKA.

Как следует из рис. 2, медленное увеличение внутриклеточного кальция происходит также при активации аденилатциклазы и протеинкиназы А с помощью проникающего аналога cAMP. Таким образом, воздействия, влияющие на увеличение в клетке cAMP, также вызывают повышение $[Ca^{2+}]_i$. Основной мишенью cAMP в клетках является ПКА. Добавление к клеткам ингибитора протеинкиназы А H-89 подавляло Ca^{2+}-ответы под действием cAMP (табл. 2), что указывает на участие этого фермента в повышении $[Ca^{2+}]_i$ под действием cAMP в адипоцитах белого жира. Для ряда клеток показано, что протеинкиназа А фосфорилирует IP_3- и рианодиновые рецепторы эндоплазматического ретикулума, и это приводит к увеличению активности Ca^{2+}-каналов этих рецепторов [6]. Как следует из табл. 2, ингибитор IP_3-рецепторов подавлял амплитуду Ca^{2+} сигнала на 83 %, а ингибитор рианодиновых рецепторов полностью подавлял Ca^{2+} сигнал у 20 % клеток.

Таблица 2

Изменение $[Ca^{2+}]_i$ под действием 5 μM 8-Br-cAMP и ингибиторов

Мишени	Антагонисты мишеней	Эффект
Протеинкиназа А	H-89, 200 нМ	Подавление $[Ca^{2+}]_I$ на 100 %
IP_3R	Ксестоспонгин С, 0,5 μM	Подавление амплитуды $[Ca^{2+}]_i$ на 83 %
Рианодиновые рецепторы (RyR)	Рианодин, 1 μM	Подавление $[Ca^{2+}]_I$ полное у 20 % клеток

Адипоциты белой жировой ткани играют главную роль в поддержании энергетического гомеостаза организма при голодании и физической нагрузке за счет липолиза запасенных триглицеридов. Процесс липолиза активируется адреналином и норадреналином через β-адренорецепторы, аденилатциклазу, cAMP, PKA и фосфорилирование гормончувствительной липазы и перилипина [5]. Мишенями протеинкиназы А являются и Ca^{2+}-транспортирующие системы клетки, такие как Ca^{2+}-каналы эндо/саркоплазматического ретикулума и плазматической мембраны и Ca^{2+}-АТРазы [6]. Ранее было показано, что активация β-адренорецепторов клеток бурого жира вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_i$ [3]. В данной работе показано, что агонисты β-адренорецепторов, активатор аденилатциклазы форсколин или проникающий негидролизуемый аналог cAMP – 8-Br-cAMP вызывают медленное (по сравнению с Ca^{2+}-ответами на агонисты α-адренорецепторов) повышение $[Ca^{2+}]$. В генерации этого Ca^{2+}-сигнала участвуют не только протеинкиназы А, Ca^{2+}-каналы IP_3R- и RyR-рецепторов, но и Ca^{2+}-каналы плазматической мембраны (неопубликованные данные). Эти факты свидетельствуют в пользу того, что один агонист (НА), активируя α- и β-рецепторы, создает условия для конвергенции таких сигнальных путей, регулирующих уровни cAMP, cGMP и Ca^{2+}, как аденилатциклазный и фосфоинозитидный [8].

Заключение

Представленный в данной работе медленный Ca^{2+}-сигнал, по-видимому, необходим клеткам для повышения базового уровня кальция, который влияет на частоту и амплитуду Ca^{2+}-ответов на множество гормонов и трансмиттеров, сопряженных с активацией Ca^{2+}-систем сигнализации. В таких параметрах, как частота и амплитуда, закодирована сигнальная информация, передаваемая в ядро на экспрессию специфических генов [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке: ФНМ – 01201258223; ГК 16.512.11.2092 – 01201179771; ФНМ – 01201256033; РФФИ № 10-04-01306.

Список литературы

1. Bartness T.J., Song C.K. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue // J Lipid Res. – 2007. – Vol. 48. – P. 1655–1672.

2. Bruce J.I., Straub S.V., Yule D.I. Crosstalk between cAMP and Ca^{2+} signaling in non-excitable cells. // Cell Calcium. – 2003. – Vol. 34, № 6. – P. 431–444.

3. Dolgacheva L.P., Abzhalelov B.B., Zhang S.J., Zinchenko V.P., Bronnikov G.E. Norepinephrine induces slow calcium

signaling in murine brown preadipocytes through the beta-adrenoceptor/cAMP/protein kinase A pathway. // Cell Signal. – 2003. – Vol. 15, № 2. – P. 209–216.

4. Hayato R., Higure Y., Kuba M., Nagai H., Yamashita H., Kuba K. β_3-Adrenergic activation of sequential Ca(2+) release from mitochondria and the endoplasmic reticulum and the subsequent Ca(2+) entry in rodent brown adipocytes. // Cell Calcium. – 2011. – Vol. 49, № 6. – P. 400–414.

5. Langin D., Ekholm D., Ridderstråle M., Lafontan M., Belfrage P. cAMP-dependent protein kinase activation mediated by beta 3-adrenergic receptors parallels lipolysis in rat adipocytes. // Biochim Biophys Acta. – 1992. – Vol. 1135, № 3. – P. 349–352.

6. Morimoto S., O-Uchi J., Kawai M., Hoshina T., Kusakari Y., Komukai K., Sasaki H., Hongo K., Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca2 + leak in mouse heart. // Biochem Biophys Res Commun. – 2009. – Vol. 390, № 1. – P. 87–92.

7. Mottillo E.P., Shen X.J., Granneman J.G. Beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1801, № 9. – P. 1048–1055.

8. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Tolmacheva A.V., Kaimachnikov N.P., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Maevskii E.I., Dynnik V.V. Convergence of Ca^{2+}-signaling pathways in adipocytes. The role of L-arginine and protein kinase G in generation of transient and periodic Ca^{2+}-signals. // Biochemistry (Moscow). – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 35–44.

References

1. Bartness T.J., Song C.K. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue // J Lipid Res. 2007. Vol. 48. pp. 1655-1672.

2. Bruce J.I., Straub S.V., Yule D.I. Crosstalk between cAMP and Ca^{2+} signaling in non-excitable cells. // Cell Calcium. 2003. Vol. 34, no. 6. **pp**. 431–444.

3. Dolgacheva L.P., Abzhalelov B.B., Zhang S.J., Zinchenko V.P., Bronnikov G.E. Norepinephrine induces slow calcium signaling in murine brown preadipocytes through the beta-adrenoceptor/cAMP/protein kinase A pathway // Cell Signal. 2003. Vol. 15, no. 2. pp. 209–216.

4. Hayato R., Higure Y., Kuba M., Nagai H., Yamashita H., Kuba K. β_3-Adrenergic activation of sequential Ca(2 +) release from mitochondria and the endoplasmic reticulum and the subsequent Ca(2 +) entry in rodent brown adipocytes // Cell Calcium. 2011. Vol. 49, no. 6. P. 400–414.

5. Langin D., Ekholm D., Ridderstråle M., Lafontan M., Belfrage P. cAMP-dependent protein kinase activation mediated by beta 3-adrenergic receptors parallels lipolysis in rat adipocytes // Biochim Biophys Acta. 1992. Vol. 1135, no. 3. pp. 349–352.

6. Morimoto S., O-Uchi J., Kawai M., Hoshina T., Kusakari Y., Komukai K., Sasaki H., Hongo K., Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca2 + leak in mouse heart. // Biochem Biophys Res Commun. 2009. Vol. 390, no. 1. pp. 87–92.

7. Mottillo E.P., Shen X.J., Granneman J.G. Beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. // Biochim Biophys Acta. 2010. Vol. 1801, no. 9. pp. 1048–1055.

8. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Tolmacheva A.V., Kaimachnikov N.P., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Maevskii E.I., Dynnik V.V. Convergence of Ca^{2+}-signaling pathways in adipocytes. The role of L-arginine and protein kinase G in generation of transient and periodic Ca^{2+}-signals // Biochemistry (Moscow). 2012. Vol. 6, no. 1. pp. 35-44.

Рецензенты:

Новоселов В.И., д.б.н., профессор лаборатории Механизмов рецепции, Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН); г. Пущино;

Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., лаборатория Регуляции внутриклеточных процессов, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 13.11.2012.