

УДК 612.453.084:612.431.45.018:546.32

Вплив іонів калію та літію на рівень експресії кінази глікогенсинтази в адреноркортикоцитах морських свинок

О.І. Ковзун,
Н.І. Левчук,
В.М. Пушкар'юв,
В.В. Пушкар'юв,
М.Д. Тронько

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Вивчали вплив іонів калію – активатора стероїдогенезу в адреноркортикоцитах та іонів літію – інгібітора кінази глікогенсинтази-3 β (GSK-3 β), на експресію GSK-3 β . GSK-3 β є важливим регулятором апоптозу, проліферативних процесів, диференціації, транспорту глюкози та інших біохімічних процесів. Уперше показано, що K⁺ здійснює глибокий вплив на протеїнкіназу на рівні її синтезу. Кількість GSK-3 β помітно зменшується за підвищених концентрацій калію, які стимулюють стероїдогенез в адреноркортикоцитах (5,5 та 8,5 ммоль/л), і значно зростає за недостатності калію в середовищі. Іони літію дозозалежно посилюють експресію кінази. Обговорюються механізми впливу калію та літію на експресію GSK-3 β в адреноркортикоцитах та можлива участь цієї кінази в стероїдогенезі.

Ключові слова: іони калію, іони літію, адреноркортицити, кіназа глікогенсинтази-3 β .

Іони калію відіграють надзвичайно важливу роль у життєдіяльності клітини. Збіднення позаклітинного середовища іонами K⁺ та ростовими факторами сироватки (так званий S/K withdrawal) призводить до зупинки клітинного циклу та подальшої програмованої загибелі клітини. Ситуація щодо адреноркортикоцитів ускладнюється тим, що K⁺ є одним з основних регуляторів стероїдогенезу в цих клітинах.

Кіназа глікогенсинтази (GSK-3 β) є головним ферментом, який опосередковує зупин-

ку клітинного циклу та перехід до апоптозу за умов зниження вмісту K⁺ та ростових факторів сироватки в позаклітинному середовищі. Якщо спочатку їй приписували тільки метаболічні функції, зокрема контроль синтезу глікогену, то зараз ця кіназа розглядається як важливий регулятор апоптозу, проліферативних процесів та диференціації, транспорту глюкози, імунної відповіді. Порушення її функції пов'язано з нейродегенеративними (зокрема хвороби Паркінсона та Альцгеймера) та запальними процесами [1-5]. Отже GSK-3 β вважається перспективною мішенню для розробки терапевтичних засобів щодо лікування раку, діабету 2 типу, різних неврологічних, кардіологічних та запальних захворювань [5-7].

Препарати літію використовуються при лі-

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. e-mail: zdovado@ukr.net

Оригінальні дослідження

куванні психічних розладів [8]. Проте ефекти іона щодо систем організму, пов'язаних зі стероїдогенезом, вивчені ще недостатньо, хоча є дані, які свідчать про прямий вплив літію на вісь гіпоталамус-гіпофіз-надниркові залози [9] та на процеси синтезу стероїдів у корі надниркових залоз [10].

Метою роботи було дослідження впливу агоніста стероїдогенезу – K^+ та інгібітора кінрази глікогенсинтази-3 β – іонів літію на експресію GSK-3 β в адренкортикоцитах.

Матеріали та методи

Проведення експериментів узгоджено з Комісією з питань біоетики інституту.

Тканину надниркових залоз морських свинок швидко переносили на лід, звільняли від жиру і сполучної тканини та інкубували зрізи протягом 3 год. при 37 °С в 1 мл буфера наступного складу: 10 ммоль/л Na_2HPO_4 , 1 ммоль/л NaH_2PO_4 , 130 ммоль/л NaCl, 1,27 ммоль/л $MgSO_4$, 2 ммоль/л $CaCl_2$, 20 ммоль/л HEPES (рН 7,4), 2 мг/мл БСА. У проби додавали KCl до кінцевої концентрації 3,5 ммоль/л (контроль), 0,5 ммоль/л, 5,5 ммоль/л та 8,5 ммоль/л. Концентрація LiCl (ч.д.а., «Merck», Німеччина) у дослідних пробах становила 5 та 10 ммоль/л. Концентрація іонів калію в дослідах з літієм становила 3,5 ммоль/л. Проби інкубували протягом 1 год. при 37 °С та постійному струшуванні.

Після інкубації проби швидко охолоджували, тканину гомогенізували в лізис-буфері («Sigma», США), у пробах визначали кількість білка і проводили Вестерн-блотинг для кількісної оцінки вмісту GSK-3 β . У дослідженні використовували поліклональні антитіла до GSK-3 β та вторинні антитіла фірми «Cell Signaling Technology» (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL («Amersham Life Science», Велика Британія). Плівку проявляли, використовуючи стандартні реактиви для рентгенівських плівок («AGFA», Бельгія). Денситометричне визначення інтенсивності засвічення рентгенівської плівки проводили за допомогою програми «GelPro».

Статистичну обробку даних проводили за Стюдентом. Значення $p < 0,05$ вважали за вірогідні.

Результати та їх обговорення

Активність GSK-3 β контролюється протеїнкіназою Akt, яка є ключовою кіназою сигнального каскаду PI3K/PDK/Akt. Зменшення кількості іонів калію в середовищі призводить

до пригнічення активності Akt [11, 12], яка фосфорилує GSK-3 β по 9 залишку серину. Дефосфорилування GSK-3 β спричиняє її активацію, транслокацію до ліпідних рафтів [1] з наступною ініціацією апоптозних процесів. Важливо було з'ясувати, чи впливає K^+ тільки на активацію GSK-3 β [11, 12], чи здійснює щодо цієї кінрази більш глибокі регуляторні зміни в адренкортикоцитах.

З **рис. 1** видно, що в клітинах, які знаходяться в нормальних умовах (3,5 ммоль/л K^+) експресія GSK-3 β перебуває на досить високому рівні. З підвищенням концентрації калію в середовищі до значень, які стимулюють стероїдогенез, кількість GSK-3 β зменшується більш ніж удвічі. Більш кардинальні зміни в кількості протеїнкінази виявляються при зниженні концентрації калію до 0,5 ммоль/л. Експресія GSK-3 β зростає в понад три рази (**рис. 1**).

Таким чином, зміни концентрації K^+ впливають не тільки на активність GSK-3 β , але й на експресію (кількість) цієї протеїнкінази.

Взаємодію АТФ-залежних калієвих каналів та GSK-3 β описано при опіоїд-індукованій кардіопротекції в щурів [11], де вони виступають антагоністами. Подібний ефект щодо GSK-3 β здійснює і Li^+ , у результаті чого накопичується β -катенін та відбуваються залежні від останнього транскрипційні події [13]. Відомо, що іони літію в адренкортикоцитах за певних обставин можуть імітувати дію іонів калію щодо фосфорилування клітинних білків [14].

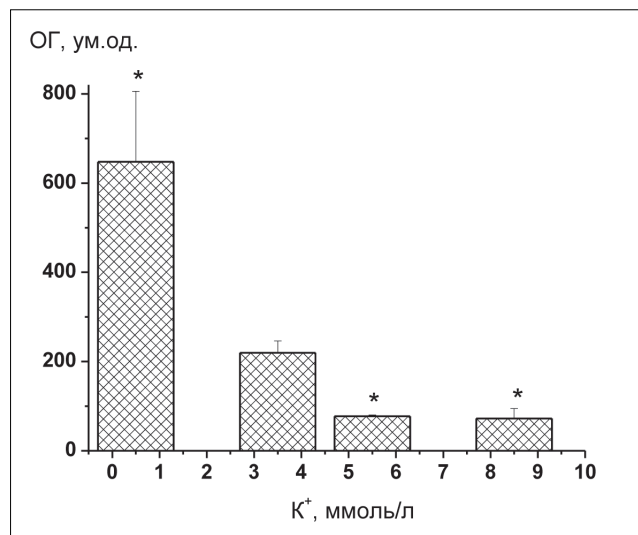


Рисунок 1. Вплив концентрації іонів калію на експресію GSK-3 β в адренкортикоцитах морських свинок. Кількість GSK-3 β визначали методом Вестерн-блотингу. * – відмінності від контролю (3,5 ммоль/л K^+) вірогідні, $p < 0,05$. $M \pm m$, $n = 6$.

Поки що незрозуміло, чи пов'язані зміни експресії GSK-3 β в аденокортикоцитах із регуляторним впливом калію на стероїдогенез (у першу чергу, при підвищенні концентрації іона), чи є звичайною реакцією клітини на рівень K $^+$ в позаклітинному середовищі. Зменшення кількості GSK-3 β за підвищених концентрацій калію можна пояснити зростанням у корі надниркових залоз експресії як eNOS, так і iNOS [15], які, у свою чергу, можуть активувати Akt та Akt-залежні транскрипційні фактори [16]. Відомо, що зростання експресії eNOS у клітинах MCF-7 при дії естрогенів також супроводжувалося пригніченням GSK-3 β [17]. Є також дані, що сигнальний каскад NOS/NO/cGMP/PKG бере участь у пригніченні активності GSK-3 β на рівні мітохондрій [18]. Безпосередній вплив калію на експресію гена GSK-3 β може здійснюватись через цАМФ/ПКА-, або, що більш імовірно, Ca $^{2+}$ /кальмодулін-залежні транскрипційні фактори [14]. Іншим механізмом, що регулює кількість GSK-3 β у клітинах може бути її розщеплення кальпаїном на два фрагменти при підвищенні концентрації Ca $^{2+}$ в клітині [19]. Оскільки зростання концентрації калію до величин, що стимулюють стероїдогенез, супроводжується підвищенням вмісту кальцію в клітині за рахунок притоку ззовні та виходу з внутрішньоклітинних депо [14], такий механізм цілком можливо діє і в аденокортикоцитах.

Даних щодо впливу GSK-3 β на стероїдогенез дуже мало. Показано, що GSK-3 β негативно регулює стероїдогенез у клітинах жовтого тіла, а лютеотропний гормон пригнічує її через активацію сигнального каскаду цАМФ/ПКА [20]. Гальмування активності цієї кінази специфічним інгібітором сприяло також диференціації стовбурових клітин у клітини, близькі за характеристиками до аденокортикоцитів, які продукують відповідні стероїди [21].

Трикратне підвищення кількості GSK-3 β при 0,5 ммоль/л калію вже не може пояснюватись експресією NOS, оскільки її рівень за такої концентрації K $^+$ мінімальний [15]. Якщо взяти до уваги нашу гіпотезу, за якою при низьких концентраціях калію в середовищі відбувається гальмування синтезу альдостерону [14], то збільшення кількості GSK-3 β при 0,5 ммоль/л калію може якраз бути конкретним механізмом такого гальмування, що є імовірним, враховуючи наведені вище дані [20]. Цілком можливо також, що зростання кількості кінази відображає звичайну, хоча й дуже потужну, реакцію клітини на зменшення вмісту калію в середовищі.

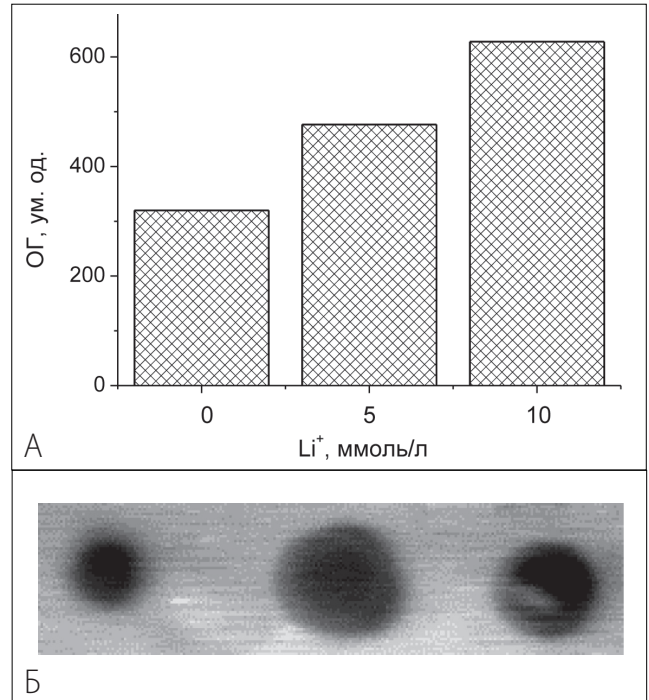


Рисунок 2. Вплив іонів літію на експресію GSK-3 β в аденокортикоцитах морських свинок
А. Кількісна оцінка GSK-3 β . Б. Результат Вестерн-блотингу (дот-блотинг). n = 6. Представлено типовий рисунок з б.

Доведено, що іони літію, які використовуються при лікуванні психічних розладів, є селективним інгібітором GSK-3 β [22, 23]. Антиапоптозний ефект іонів літію також пов'язують з прямим гальмуванням активності GSK-3 β [22, 23]. Показано, що ця кіназа характеризується виразною проапоптозною активністю, яка пригнічується в присутності інсуліну та ростових факторів [24]. У присутності іонів літію апоптозна активність GSK-3 β гальмується – можливо, причиною цього є імітація літієм функцій K $^+$.

Оскільки літій негативно впливає на активність і стан фосфорилування GSK-3 β , становило інтерес визначити його вплив на більш глибокі процеси, а саме – на експресію цієї протеїнкінази. З рис. 2 видно, що кількість GSK-3 β помітно зростає вже в присутності 5 ммоль/л літію, а підвищення концентрації іона до 10 ммоль/л призводить до збільшення її кількості більш ніж у два рази.

Фізіологічне значення такого посилення експресії GSK-3 β поки що невідоме. Можливо, в умовах повного або часткового пригнічення кінази іонами літію активуються процеси, які спрямовані на компенсацію втрати

Оригінальні дослідження

її активності. Стосовно механізму дії літію на транскрипцію гена GSK-3 β конкретних даних немає. Проте показано, що Li⁺ може безпосередньо або опосередковано впливати на активність транскрипційних факторів AP1, c-Jun та інших, у тому числі й безпосередньо задіяних у трансдукції сигналу через каскад PI3K/Акт (FoxO1) [25-27].

Висновки

1. Уперше показано, що зміни концентрації іонів калію в позаклітинному середовищі впливають на рівень експресії (кількість) GSK-3 β в адренкортикоцитах морських свинок.
2. Іони літію пропорційно їх концентрації посилюють експресію GSK-3 β в адренкортикоцитах морських свинок.

Список використаної літератури

1. Sui Z., Kovacs A.D., Maggirwar S.B. Recruitment of active glycogen synthase kinase-3 into neuronal lipid rafts // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 345, N 4, 1643-1648.
2. Suganthi M., Sangeetha G., Gayathri G., Sankar B. Biphasic Dose-Dependent Effect of Lithium Chloride on Survival of Human Hormone-Dependent Breast Cancer Cells (MCF-7) // *Biol. Trace Elem. Res.* 2012, 150, N 1-3, 477-486.
3. Yeste-Velasco M., Folch J., Trullas R. et al. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the regulation of the cell cycle in cerebellar granule cells // *Neuropharmacology.* 2007, 53, N 2, 295-307.
4. Iqbal K., Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention // *J. Cell Mol. Med.* 2008, 12, N 1, 38-55.
5. Holmes T., O'Brien T.A., Knight R. et al. The role of glycogen synthase kinase-3 β in normal haematopoiesis, angiogenesis and leukaemia // *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, N 15, 1493-1499.
6. Garcea G., Manson M.M., Neal C.P. et al. Glycogen synthase kinase-3 β ; a new target in pancreatic cancer? // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2007, 7, N 3, 209-215.
7. Takahashi-Yanaga F., Sasaguri T. GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy // *Cell Signal.* 2008, 20, N 4, 581-589.
8. Malhi G. S., Tanious M., Das P., Berk M. The science and practice of lithium therapy // *Australian N. Zealand J. Psychiatry.* 2012, 46, 192-211.
9. Bschor T., Ritter D., Winkelmann P. et al. Lithium monotherapy increases ACTH and cortisol response in the Dex/CRH test in unipolar depressed subjects. A study with 30 treatment-naive patients // *PLoS One.* 2011, 6, N 11, e27613, 1-8.
10. Тронько М.Д., Ковзун О.І., Пушкар'єв В.М. Механізми регуляції стероїдогенезу в корі надниркових залоз. К.: ЦНЛ, 2006. 304 с. (Tronko M.D., Kovzun O.I., Pushkarev V.M. The mechanisms of regulation of steroidogenesis in the adrenal cortex. Kiev: CNL, 2006. 304 p.)
11. Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J. GSK3 β inhibition and K(ATP) channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion // *Basic Res. Cardiol.* 2007, 102, N 4, 341-349.
12. Yeste-Velasco M., Folch J., Casadesus G. et al. Neuroprotection by c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the Akt pathway and inhibition of cell cycle reentry. *Neuroscience* // 2009, 159, N3, 1135-1147.
13. Wada A. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3 β , β -catenin, and neurotrophin cascades // *J. Pharmacol. Sci.* 2009, 110, N 1, 14-28.
14. Пушкар'єв В.М. Біохімічні механізми регуляції стероїдогенезу в корі надниркових залоз іонами калію. Дис. докт. біол. наук. К., 2005. 329 с. (Pushkarev V.M. Biochemical mechanism of steroidogenesis regulation in adrenal cortex by potassium ions. Dissertation for the obtaining of a scientific degree of Doctor of Biological Sciences. Kyiv, 2005. 329 p.)
15. Ковзун Е.І., Лукашеня О.С., Пушкар'єв В.М. и др. Влияние ионов калия и лития на экспрессию NO-синтазы в коре надпочечников человека // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2013, № 9, 307-309. (Kovzun Ye.I., Lukashenya O.S., Pushkarev V.M. et al. Effect of potassium and lithium ions on NO-synthase expression in the human adrenal cortex // *Bulletin of Experim. Biol. and Med.* 2013, N 9, 307-309).
16. Drenning J.A., Lira V.A., Soltow Q.A. et al. Endothelial nitric oxide synthase is involved in calcium-induced Akt signaling in mouse skeletal muscle // *Nitric Oxide.* 2009, 21, N 3-4, 192-200.
17. Nakatani K., Horinouchi J., Yabu Y. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase is induced by estrogen with glycogen synthase 3 β phosphorylation in MCF-7 cells // *Oncol. Rep.* 2004, 12, N 4, 833-836.
18. He Y., Xi J., Zheng H. et al. Astragaloside IV inhibits oxidative stress-induced mitochondrial permeability transition pore opening by inactivating GSK-3 β via nitric oxide in H9c2 cardiac cells // *Oxidative Med. Cell. Longevity.* 2012, 2012, Article ID 935738, 1-9.
19. Goni-Oliver P., Lucas J.J., Avila J., Hernandez F. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation // *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 22406-22413.
20. Roy L., McDonald C.A., Jiang C. et al. Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis // *Endocrinology.* 2009, 150, 5036-5045.
21. Sonoyama T., Sone M., Honda K. et al. Differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells into steroid-producing cells // *Endocrinology.* 2012, 153, 4336-4345.
22. Li X., Bijur G.N., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection // *Bipolar Disord.* 2002, 4, N 2, 137-144.
23. Jope R.S., Bijur G.N. Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3 β and cell survival // *Mol. Psychiatry.* 2002, 7, S35-S45.
24. Frame S., Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery // *Biochem. J.* 2001, 359, 1-16.
25. Reddy C.E., Albanito L., De Marco P. et al. Multisite phosphorylation of c-Jun at threonine 91/93/95 triggers the onset of c-Jun pro-apoptotic activity in cerebellar granule neurons // *Cell Death Dis.* 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.381.
26. Kim S.H., Yu H.S., Park H.G. et al. Egr1 regulates lithium-induced transcription of the Period 2 (PER2) gene // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, 1832, N 12, 1969-1979.
27. Zheng W., Zeng Z., Bhardwaj S.K. et al. Lithium normalizes amphetamine-induced changes in striatal FoxO1 phosphorylation and behaviors in rats // *Neuroreport.* 2013, 24, N 10, 560-565.

(Надійшла до редакції 17.10.2013)

Влияние ионов калия и лития на уровень экспрессии киназы гликогенсинтазы в адренокортикоцитах морских свинок

Е.И. Ковзун, Н.И. Левчук, В.М. Пушкарев,
В.В. Пушкарев, Н.Д. Тронько

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Изучали влияние ионов калия, активатора стероидогенеза в адренокортикоцитах, и ионов лития, ингибитора киназы гликогенсинтазы-3 β (GSK-3 β), на экспрессию GSK-3 β . GSK-3 β является важным регулятором апоптоза, пролиферативных процессов, дифференциации, транспорта глюкозы и других биохимических процессов. Впервые показано, что K⁺ осуществляет глубокое влияние на протеинкиназу на уровне ее синтеза. Количество GSK-3 β заметно уменьшается при повышенных концентрациях калия, которые стимулируют стероидогенез в адренокортикоцитах (5,5 и 8,5 ммоль/л), и значительно возрастает при недостаточности калия в среде. Ионы лития дозозависимо усиливают экспрессию киназы. Обсуждаются механизмы влияния калия и лития на экспрессию GSK-3 β в адренокортикоцитах и возможное участие этой киназы в стероидогенезе.

Ключевые слова: ионы калия, ионы лития, адренокортикоциты, киназа гликогенсинтазы-3 β .

Effect of potassium ions on the level of expression of glycogen synthase kinase in guinea pigs adrenocorticoocytes

O.I. Kovzun, N.I. Levchuk, V.M. Pushkarev,
V.V. Pushkarev, M.D. Tronko

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Nat. Acad. of Med. Sci. of Ukraine»

Summary. The influence of potassium ions – steroidogenesis activator in adrenocorticoocytes, and lithium ions – glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3 β) inhibitor, on GSK-3 β expression was studied. GSK-3 β is an important regulator of apoptosis, proliferative processes, differentiation, glucose transport and other biochemical processes. For the first time it has been shown that K⁺ has a profound effect on the level of protein kinase synthesis. The amount of GSK-3 β decreases markedly at high concentrations of potassium, which stimulate steroidogenesis in adrenocorticoocytes (5.5 and 8.5 mmol/l), and it significantly increases in case of potassium deficiency in the medium. Lithium ions dosage-dependently enhance kinase expression. The authors discuss the mechanisms of potassium action on the expression of GSK-3 β in adrenocorticoocytes and possible involvement of this kinase in steroidogenesis.

Keywords: potassium ions, lithium ions, adrenocorticoocytes, glycogen synthase kinase-3 β .