

І. Н. Яковенко, В. В. Жирнов, О. В. Шабликін, В. С. Броварець

Участь протеїнкінази СК2 у модуляції трансмембранного транспорту електронів еритроцитів людини

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

Виявлено пригнічення трансмембранного транспорту електронів в еритроцитах людини при дії ряду 5-аміно-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазолів як нових специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2. Показано, що протеїнкіназа СК2 модулює активність редокс-системи плазматичних мембран еритроцитів в основному за участю Ca^{2+} -незалежних та певною мірою Ca^{2+} -залежних механізмів.

Редокс-систему плазматичних мембран (РСПМ), яка транспортує електрони через мембрану клітин від внутрішньоклітинних субстратів (НАДН, НАДФН, аскорбату, глутатіону, флавоноїдів) до їх зовнішньоклітинних акцепторів (фериціанід-аніон, дихлорофеноліндофенол, флавін, Fe^{3+} , компоненти цитохрому-*b*), виявлено в усіх еукаріотичних клітинах: бактерій, грибів, рослин, тварин та людини [1]. У цілому розрізняють ензиматичний та умовно неензиматичний компоненти РСПМ [2]. Останній функціонує як “човниковий” механізм за рахунок трансмембранної дифузії цитоплазматичного аскорбату, що ззовні клітини виконує роль відновника, окиснюючись до дегідроаскорбату, який знову відновлюється внутрішньоклітинними ензимами до аскорбату за рахунок НАДФН та глутатіону після його дифузії в клітину [3].

РСПМ еритроцитів, використовуючи НАДН та аскорбат як внутрішньоклітинні донори електронів, підтримує редокс-гомеостаз крові, відновлюючи вільні радикали до менш активних сполук. Таким чином, у ролі мобільних відновників еритроцити забезпечують антиоксидантний захист усього організму [1].

Крім умовно неензиматичного, опосередкованого циклічним трансмембранним обміном аскорбатдегідроаскорбат, в еритроцитах виявлено трансмембранні білки з безпосередньою ензиматичною фериціанідредуктазною активністю — Dcytb та VDAC1 [2]. Dcytb належить до сімейства цитохромів *b5b1* і використовує як донор електронів внутрішньоклітинний аскорбат для прямого відновлення зовнішньоклітинного фериціаніду [2]. Наявність VDAC1 у мембранах еритроцитів було показано імунологічним аналізом [4].

Крім компонентів РСПМ протеїнкіназу СК2 також знайдено в цитозолі та мембранах еритроцитів людини вже майже 30 років тому [5, 6]. Як відомо, СК2 є серин/треоніновою протеїнкіназою, яка модифікує функціональну активність вже більш ніж 300 різноманітних клітинних протеїнів і їх кількість постійно збільшується [7]. Незважаючи на наявність як СК2, так і РСПМ в еритроцитах, у науковій літературі відсутні безпосередні дані щодо ролі СК2 у модуляції активності РСПМ клітин.

Метою наших досліджень було вивчення впливу ряду 5-аміно-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазолів як нових високоактивних специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 [8] на активність РСПМ еритроцитів людини. Додатково досліджено Ca^{2+} -залежні та Ca^{2+} -незалежні механізми модуляції протеїнкіназою СК2 РСПМ еритроцитів.

Матеріали та методи досліджень. В експериментах було використано венозну кров донорів регіонального донорського пункту. Частку крові центрифугували 10 хв при 1800 g (20 °C). Після видалення супернатанту та поверхневої лейкомаси осад еритроцитів розводили 10 об'ємами охолодженого фізіологічного фосфатного буфера, який містив 140 ммоль/л NaCl та 12,5 ммоль/л Na₂HPO₄ (pH 7,4). Після подальшого центрифугування за цих самих умов отриманий осад еритроцитів ще двічі відмивали розчином Кребса такого складу, ммоль/л: NaCl 133; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgCl₂ 1,2; NaH₂PO₄ 1,38; NaHCO₃ 10; глюкоза 7,8; HEPES 10 (pH 7,4) шляхом центрифугування та в подальшому ресуспендували в розчині Кребса до 10%-го гематокриту. В проби з 2 мл отриманої суспензії еритроцитів та контрольні пробірки з розчином Кребса без клітин вносили досліджувані сполуки та інкубували 30 хв при кімнатній температурі (20 °C). Після предінкубації зі сполуками в проби вносили до 1 ммоль/л фериціаніду калію та відразу видаляли половину їх об'єму на центрифугування для контрольного визначення рівня фериціаніду в нульовий проміжок часу. Залишок проб інкубували на шейкерній бані при 37 °C 30 хв з подальшим центрифугуванням. Після чого 0,1 мл аліквоти отриманих супернатантів до та після 30 хв інкубації використовували для визначення в них кількості утвореного фериціаніду, згідно з методом Аврона, Шевіт [9], у колориметричній реакції з батофенантроліном при 535 нм з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $\epsilon = 21600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ проти відповідного безклітинного контролю. Активність РСПМ еритроцитів представлена в одиницях мікромоля на літр фериціаніду/мілілітр еритроцитів/30 хвилин. Як відомо, активність РСПМ еритроцитів варіює в порівняно широких межах залежно від віку та загального стану різних донорів [10]. Тому для порівняльного вивчення впливу хімічних сполук на активність РСПМ нами була використана кров дев'яти донорів зі стандартною активністю РСПМ в інтервалі від 2 до 3 мкмоль/л фериціаніду/мл еритроцитів/30 хв.

У роботі використовували HEPES, батофенантролін ("Sigma", США). Інші реактиви були марки "х. ч." вітчизняного виробництва. Результати подавалися у вигляді середнього \pm середньоквадратичної похибки середнього ($M \pm m$). Статистичну оцінку виконували за допомогою *t*-критерію Стьюдента для вибраного рівня значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. В дослідженнях виявлено зменшення активності РСПМ еритроцитів людини при дії нещодавно знайдених серед 5-аміно-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазолів специфічних інгібіторів СК2 (табл. 1). Як видно з табл. 1, нами спостерігалась пряма залежність між рівнем гальмування активності РСПМ еритроцитів та параметром IC₅₀ сполук, що відповідає концентрації сполуки, при якій відбувається 50% інгібування активності СК2. Отже, на прикладі еритроцитів було вперше встановлено участь протеїнкінази СК2 у модуляції РСПМ живих клітин.

Результатами аналізу у [1] доведено можливість реалізації впливу СК2 на активність РСПМ за рахунок багатьох молекулярних механізмів. Як відомо, активність РСПМ еритроцитів залежить від редокс-стану цитозолу й оточуючого середовища та тісно пов'язана з активністю гліколітичних ферментів. Активація РСПМ еритроцитів людини у відповідь на підвищення рівня оксидантів у зовнішньому середовищі залежить від рівня глюкози та супроводжується перебудовою клітинного метаболізму шляхом активації пентозофосфатного шляху обміну глюкози [1, 2].

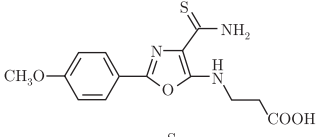
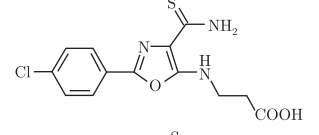
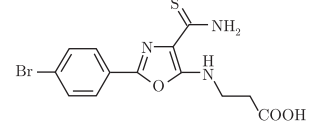
Також було показано, що гліколітичні ферменти фосфофруктокіназа, альдолаза та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (GAPDH) утворюють протеїновий комплекс з мембранним аніонним обмінником зони 3, більш тісна взаємодія протеїнів якого спостерігається при

підвищенні оксигенації гемоглобіну [2]. При деоксигенації еритроцитів протеїновий комплекс гліколітичних ензимів з протеїном зони 3 розпадається, що послідовно спричинює активацію гліколізу, зменшення спроможності еритроцитів до відновлення НАДФН і глутатіону в результаті зниження активності пентозофосфатного циклу обміну глюкози та розвитку окиснювального стресу. Тому при гіпоксії компенсація функціональної неспроможності підтримання необхідного рівня редокс-стану еритроцитів пентозофосфатним циклом обміну глюкози відбувається шляхом активації РСПМ з використанням аскорбату як донора електронів, у той час як НАДН за цих умов переважно використовується метгемоглобін-редуктазою [2].

Активність РСПМ також залежить від внутрішньоклітинного рН. Фармакологічна блокада Na^+/H^+ обмінника пригнічувала стимульовану аскорбатом активність РСПМ в еритроцитах [2]. Оскільки РСПМ функціонує як трансмембранний комплекс, її активність також має залежати від структурних властивостей плазмалеми. Було показано зниження фериціанідредуктазної активності еритроцитів при збільшенні плазмалемального рівня холестерину [11].

Отже, активність РСПМ є інтегральним показником структурних та функціональних властивостей біомембрани, метаболізму та цитоскелета клітин. Оскільки протеїнкіназа СК2 має порівняно низьку ензиматичну селективність до широкого спектра клітинних протеїнів, виявлене пригнічення активності РСПМ еритроцитів при дії інгібіторів СК2 може опосередковуватись зміною рівня фосфорилування протеїнів як самої біомембрани, так і цитоскелета та ензимів клітинного метаболізму. В науковій літературі відсутні відомості про можливість фосфорилування протеїнкіназою СК2 протеїнів з фериціанідредуктазною активністю, що не виключає такої можливості і може бути предметом додаткових досліджень. Вплив СК2 на РСПМ еритроцитів також може бути опосередкований здатністю цього ензиму фосфорилувати протеїни цитоскелета [6], які взаємодіють з фериціанідредуктазою VDAC1 і модулюють активність РСПМ [4]. З протеїнами цитоскелета також взаємодіє кальмодулін, активність якого зменшується після фосфорилування протеїнкіназою СК2 [4]. Тому,

Таблиця 1. Вплив інгібіторів протеїнкінази СК2 на активність РСПМ еритроцитів людини

Сполука	IC ₅₀ , мкмоль/л	Контроль	Концентрація сполуки	
			10 мкмоль/л	1 мкмоль/л
	1,2	2,44 ± 0,112	0,94 ± 0,043* (38,5)	1,82 ± 0,094* (74,6)
	2,0	2,47 ± 0,116	1,02 ± 0,058* (41,3)	1,84 ± 0,072* (74,5)
	4,5	2,53 ± 0,138	1,65 ± 0,077* (65,2)	2,25 ± 0,123* (88,9)

Примітка. Тут і в табл. 2: активність РСПМ, мкмоль/л фериціаніду/мл еритроцитів/30 хв ($M \pm m$, $n = 5$). Додатково ефект інгібіторів СК2 наведено у відсотках зміни відносно контролю (у %).

*Вірогідно відносно контролю ($p < 0,05$). IC₅₀ наведено за даними роботи [8].

незважаючи на відсутність літературних даних щодо впливу кальмодуліну на активність РСРМ, він може відбуватись хоча б за рахунок його взаємодії з протеїнами цитоскелета.

Для більш детального дослідження механізмів регуляції протеїнкіназою СК2 трансмембранного транспорту електронів нами вивчено вплив інгібітора СК2 N-(2-(4-хлорофеніл)-4-тіокарбамойл-1,3-оксазол-5-іл)- β -аланіну (ХТОА з $IC_{50} = 2,0$ мкмоль/л) на активність РСРМ еритроцитів на фоні модифікації Ca^{2+} -системи внутрішньоклітинної сигналізації функціональними Ca^{2+} -агоністами (Ca^{2+} -іонофором кальциміцином, активатором Ca^{2+} -каналів L-типу Bay K 8644) та Ca^{2+} -антагоністами (інгібітором кальмодуліну кальмідазол, інгібітором Ca^{2+} -каналів L-типу нітрендипіном). Було виявлено, що нітрендипін та кальмідазол істотно збільшують активність РСРМ, а кальциміцин дещо зменшує та Bay K 8644 майже не змінює активність РСРМ еритроцитів (табл. 2). При цьому рівень збільшення трансмембранного транспорту електронів в еритроцитах при дії досліджених функціональних Ca^{2+} -антагоністів виявився більш істотним, ніж викликане зазначеними функціональними Ca^{2+} -агоністами гальмування активності РСРМ. Отримані дані свідчать про більш істотну залежність активності РСРМ еритроцитів людини від зменшення рівня активного Ca^{2+} , ніж від його збільшення при наявності інгібуючого ефекту Ca^{2+} на активність РСРМ цих клітин.

На фоні впливу як функціональних інгібіторів, так і активаторів Ca^{2+} -системи внутрішньоклітинної сигналізації ХТОА також істотно пригнічував активність РСРМ еритроцитів (див. табл. 2). При сумісній дії кальциміцину або Bay K 8644 та зазначеного інгібітора СК2 активність РСРМ зменшувалась до рівня, який спостерігався при дії одного інгібітора СК2 (див. табл. 2). Можливо допустити, що інгібуючий ефект кальциміцину відносно активності РСРМ на фоні дії ХТОА не проявляється, про що свідчить відсутність падіння активності РСРМ при дії цього Ca^{2+} -іонофора сумісно з інгібітором СК2 відносно пози-

Таблиця 2. Вплив інгібітора СК2 N-(2-(4-хлорофеніл)-4-тіокарбамойл-1,3-оксазол-5-іл)- β -аланіну (10 мкмоль/л, сполука з $IC_{50}=2,0$ мкмоль/л) на активність РСРМ інтактних та модифікованих функціональними Ca^{2+} -агоністами та Ca^{2+} -антагоністами еритроцитів людини

Фармакологічний агент (концентрація, мкмоль/л)	Умови досліджу			
	контроль	інгібітор СК2, %	фармакологічний агент, %	фармакологічний агент + інгібітор СК2, %
Кальциміцин (10)	2,49 ± 0,105	1,02 ± 0,072*	2,16 ± 0,097*	1,09 ± 0,042* ^{&}
% від контролю		(41,0)	(86,7)	(43,8)
% від (±) контролю				(50,5), [106,9]
Bay K 8644 (10)	2,53 ± 0,123	1,09 ± 0,043*	2,42 ± 0,133	1,09 ± 0,056* ^{&}
% від контролю		(43,1)	(95,7)	(43,1)
% від (±) контролю				(45,0), [100,0]
Кальмідазол (4)	2,52 ± 0,137	1,01 ± 0,054*	3,71 ± 0,238*	2,01 ± 0,116* ^{&}
% від контролю		(40,0)	(147,2)	(79,8)
% від (±) контролю				(54,2), [199,0]
Нітрендипін (10)	2,52 ± 0,119	1,01 ± 0,060*	3,67 ± 0,223*	1,51 ± 0,091* ^{&}
% від контролю		(40,1)	(145,6)	(59,9)
% від (±) контролю				(41,0), [149,5]

*Вірогідно відносно контролю ($p < 0,05$); [&] вірогідно відносно позитивного контролю ($p < 0,05$) — пробами, що містять відповідний фармакологічний агент.

Ефект інгібіторів СК2 при сумісній дії з фармакологічними агентами наведено у відсотках зміни відносно відповідного позитивного контролю — проб, що містять фармакологічний агент (у %) або інгібітор СК2 (у %).

тивного контролю — пробами з інгібітором СК2 (див. табл. 2). На фоні кальмідазолу або нітрендипіну інгібітор СК2 знижував активність РСПМ до рівня, який перевищував значення активності РСПМ при дії інгібітора СК2 на інтактні еритроцити (див. табл. 2). Таким чином, при сумісній дії з ХТОА кальмідазол та нітрендипін також виявляли активуючу РСПМ еритроцитів активність. При цьому інгібітор кальмодуліну кальмідазол на фоні дії інгібітора СК2 відносно позитивного контролю (пробами з інгібітором СК2) виявляв більший РСПМ-активуючий ефект порівняно з його дією на інтактні еритроцити (див. табл. 2). Останнє може бути зумовлене зазначеним у літературі падінням активності кальмодуліну при його фосфорилуванні протеїнкіназою СК2 [12]. Таким чином, інгібування СК2 повинно супроводжуватись ростом активності кальмодуліну, за рахунок якого має підвищитись гальмівний вплив Ca^{2+} -залежних механізмів на активність РСПМ еритроцитів і на цьому фоні рівень РСПМ-активуючого ефекту кальмідазолу відносно позитивного контролю (пробами з інгібітором СК2) порівняно з рівнем активації кальмодуліном РСПМ інтактних клітин також має збільшитись.

Таким чином, інгібування СК2 модифікує ефективність дії функціональних агоністів та антагоністів кальцію на РСПМ еритроцитів. При сумісній дії з інгібітором СК2 гальмівний ефект кальцієвого іонофору кальциміцину на активність РСПМ еритроцитів не виявляється зі збереженням гальмівної ефективності відносно РСПМ самого інгібітора СК2. При цьому активуюча РСПМ ефективність інгібітора кальмодуліну кальмідазолу на фоні інгібування СК2 збільшується. В свою чергу, при сумісній дії з інгібітором кальмодуліну кальмідазолом гальмівна ефективність інгібітора СК2 відносно РСПМ еритроцитів дещо знижується. Отримані результати свідчать про певну присутність Ca^{2+} -залежних механізмів у модуляції протеїнкіназою СК2 активності РСПМ еритроцитів, хоча, на наш погляд, у цих клітинах Ca^{2+} -незалежні механізми впливу СК2 на РСПМ є більш значними.

1. Kennett E. C., Kuchel P. W. Plasma membrane oxidoreductases: effects on erythrocyte metabolism and redox homeostasis // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – **8**, No 7./8. – P. 1241–1247.
2. Principe D. D., Avigliano L., Savini I., Catani M. V. Trans-plasma membrane electron transport in mammals: functional significance in health and disease // *Ibid.* – 2011. – **14**, No 11. – P. 2289–2318.
3. May J. M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte // *Front. Biosci.* – 1998. – **3**. – P. 1–10.
4. Matteucci E., Giampietro O. Electron Pathways through Erythrocyte Plasma Membrane in Human Physiology and Pathology: Potential Redox Biomarker? // *Biomark. Insights.* – 2007. – **2**. – P. 321–329.
5. Erusalimsky J. D., Balas N., Milner Y. Possible identity of a membrane-bound with a soluble cyclic AMP-independent erythrocyte protein kinase that phosphorylates spectrin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – **276**, No 2. – P. 171–181.
6. Wei T., Tao M. Human erythrocyte casein kinase II: characterization and phosphorylation of membrane cytoskeletal proteins // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1993. – **307**, No 1. – P. 206–216.
7. Meggio F., Pinna L. A. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? // *FASEB J.* – 2003. – **17**, No 3. – P. 349–368.
8. Шаблюкін О. В., Козаченко О. П., Броварець В. С. та ін. N-(2-арил-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)- β -аланіни – специфічні інгібітори протеїнкінази СК2 // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2010. – **8**, № 1. – С. 61–66.
9. Avron M., Shavit N. A sensitive and simple method for determination of ferrocyanide // *Anal. Biochem.* – 1963. – No 6. – P. 549–554.
10. Rizvi S. I., Jha R., Maurya P. K. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging // *Rejuvenat. Res.* – 2006. – **9**, No 4. – P. 470–474.
11. Balmukhanov B. S., Bulegenov K. E., Basenova A. T. The effect of cholesterol level in erythrocyte membranes on the sedimentation rate, electrophoretic motility, and the rate of potassium ferricyanide reduction // *Biofizika.* – 1990. – **35**, No 2. – P. 293–296.

12. Sacks D. B., Lopez M. M., Li Z., Kosk-Kosicka D. Analysis of phosphorylation and mutation of tyrosine residues of calmodulin on its activation of the erythrocyte Ca(2+)-transporting ATPase // Eur. J. Biochem. – 1996. – **239**, No 1. – P. 98–104.

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 23.11.2011

И. Н. Яковенко, В. В. Жирнов, О. В. Шаблыкин, В. С. Броварец

Участие протеинкиназы СК2 в модуляции трансмембранного транспорта электронов эритроцитов человека

Выявлено угнетение трансмембранного транспорта электронов в эритроцитах человека при действии ряда 5-амино-4-тиокарбамоил-1,3-оксазолов как новых специфических ингибиторов протеинкиназы СК2. Показано, что протеинкиназа СК2 модулирует активность редокс-системы плазматической мембран эритроцитов в основном за счет Ca²⁺-независимых и в определенной степени Ca²⁺-зависимых механизмов.

I. N. Iakovenko, V. V. Zhirnov, O. V. Shablykin, V. S. Brovarets

Participation of proteinkinase CK2 in modulation of transmembrane membrane electron transport in human erythrocytes

A decrease of the transmembrane electron transport activity in human erythrocytes under the action of N-(4-thiocarbamoyl-1,3-oxazol-5-yl)-β-alanines as new specific inhibitors of protein kinase CK2 is first discovered. It is shown that protein kinase CK2 modulates the activity of the plasma membrane redox system of erythrocytes mainly involving Ca²⁺-independent and, to some extent, Ca²⁺-dependent mechanisms.