

УЧАСТЬ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2 В РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ РЕДОКС-СИСТЕМИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ: ВІДНОСНИЙ ВНЕСОК Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНИХ ТА Ca^{2+} -НЕЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ ЇЇ АКТИВАЦІЇ

І. Н. ЯКОВЕНКО, В. В. ЖИРНОВ, О. П. КОЗАЧЕНКО,
О. В. ШАБЛИКІН, В. С. БРОВAREЦЬ

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

На еритроцитах людини показано зменшення активності редокс-системи плазматичних мембран (РСПМ) за дії специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 (2.7.11.1).

За допомогою інгібіторного аналізу додатково досліджено Ca^{2+} -залежні та Ca^{2+} -незалежні механізми регуляції трансмембранного транспорту електронів в еритроцитах людини. Показано, що в цих клітинах функціональні Ca^{2+} -антагоністи (нітрендипін та кальмідазол) істотно збільшують, а функціональні Ca^{2+} -агоністи дещо знижують (кальциміцин) або не впливають (Bay K 8644) на активність РСПМ. В усіх випадках модифікації кальцієвої системи сигналізації інгібування кінази СК2 також супроводжується значним зменшенням активності РСПМ еритроцитів. На фоні інгібування СК2 зазначений вплив на РСПМ нітрендипіну та Bay K 8644 не змінюється, кальмідазолу посилюється, а кальциміцину не виявляється. Результати роботи свідчать про інгібіторний вплив Ca^{2+} і кальмодуліну на РСПМ еритроцитів людини та активацію цієї системи протеїнкіназою СК2, головним чином, за участю Ca^{2+} -незалежних механізмів. Обговорюється певна участь кальмодуліну в регуляції активності РСПМ еритроцитів кіназою СК2.

Ключові слова: еритроцити, протеїнкіназа СК2, інгібітори, редокс-система плазматичних мембран.

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

Функціональне значення РСПМ, а також наявність та селективність до різних донорів та акцепторів електронів ензимів чи їх комплексів у складі РСПМ різних клітин може суттєво відрізнитись. В еритроцитах, крім умовно не-

ензиматичного, виявлено трансмембранні протеїни з безпосередньою ензиматичною фериціанідредуктазною активністю – Dcytb та VDAC1 [2]. Dcytb належить до сімейства цитохромів *b561* і використовує аскорбат цитозоля як донор електронів для прямого відновлення фериціаніду ззовні клітин [2]. Як компонент РСПМ Dcytb спочатку був знайдений в еритроцитах дванадцятипалої кишки, а пізніше – в плазматичних мембранах інших клітин, включаючи еритроцити людини [4]. Вперше виявлений як трансмембранний протеїн зовнішньої мембрани мітохондрій VDAC1 у подальшому був також ідентифікований як електронно-транспортний протеїн цитоплазматичних мембран із внутрішньоклітинною NADH-оксидазною активністю [5]. Наявність VDAC1 в мембранах еритроцитів було показано імунологічним аналізом [6]. Розміщену на внутрішній поверхні мембран еритроцитів цитохром *b₅*-редуктазу (метгемоглобін-редуктазу) в деяких роботах також вважають компонентом РСПМ [7]. Однак цей ензим не є трансмембранним протеїном і його внесок у загальну фериціанідредуктазну

активність опосередковується його здатністю відновлювати CoQ та вільні радикали аскорбату за допомогою NADH цитозолу [2].

Використовуючи NADH та аскорбат як внутрішньоклітинні донори електронів, РСПМ еритроцитів підтримує редокс-гомеостаз крові, відновлюючи вільні радикали до менш активних сполук. Таким чином, еритроцити забезпечують антиоксидантний захист всього організму [1]. В дослідженнях РСПМ еритроцитів як зовнішній акцептор електронів зазвичай використовують фериціанід, оскільки він та його відновлена форма (фероціанід) не проникають у клітини. Тому традиційно ензиматичний компонент РСПМ еритроцитів в деяких публікаціях називають фериціанідредуктазою, що насправді є узагальненим визначенням трансмембранних оксидоредуктаз.

Крім компонентів РСПМ, протеїнкіназу СК2 (2.7.11.1) також виявлено в цитозолі та мембранах еритроцитів людини вже майже 30 років тому [8, 9]. Як відомо, протеїнкіназа СК2 (казеїнкіназа II) – це серин/треонінова протеїнкіназа, яка модифікує функціональну активність вже більш ніж 300 різноманітних клітинних протеїнів і кількість їх постійно збільшується. Серед них більше 100 транскрипційних факторів та модуляторів вторинної і третинної структури РНК/ДНК, майже 80 сигнальних протеїнів (включаючи 11 кальційзв'язувальних), близько 30 протеїнкіназ, фосфатаз та ензимів метаболізму, завдяки чому кіназа СК2 відіграє ключову роль у ланцюгах клітинної сигналізації, про що детально описано в огляді К. Дмитрука та А. Сибірського [10]. Однак в літературі відсутні безпосередні дані щодо участі протеїнкінази СК2 (СК2) в модуляції активності РСПМ клітин, механізми регуляції якої останнім часом активно вивчаються.

Метою наших досліджень було вивчення ролі кінази СК2 в регуляції активності РСПМ еритроцитів людини. Одержані результати дозволили нам показати модулюючий ефект кінази СК2 на трансмембранний транспорт електронів в еритроцитах. Додатково був досліджений відносний внесок Ca^{2+} -залежних та незалежних механізмів модуляції активності РСПМ еритроцитів кіназою СК2.

Матеріали і методи

В експериментах використовувалася свіжа венозна кров донорів регіонального донорського пункту. Частку крові центрифугували 10 хв при 1800 г (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 Na_2HPO_4 (pH 7,4). Після подальшого центрифугування за цих самих умов одержаний осад еритроцитів ще двічі відмивали розчином Кребса наступного складу (в ммоль/л): NaCl – 133; KCl – 4,7; CaCl_2 – 2,5; MgCl_2 – 1,2; NaH_2PO_4 – 1,38; NaHCO_3 – 10; глюкоза – 7,8; HEPES – 10 (pH 7,4) шляхом центрифугування і далі ресуспендували в розчині Кребса до 10% гематокриту. Оскільки активність РСПМ еритроцитів варіює порівняно в широких межах залежно від віку та загального стану донорів [13], для порівняльного вивчення впливу хімічних сполук на активність РСПМ нами було використано кров 9 донорів зі стандартною активністю РСПМ в інтервалі від 2 до 3 мкМ фероціаніду/мл еритроцитів/30 хв.

Активність РСПМ еритроцитів оцінювали за реакцією відновлення фериціаніду до фероціаніду суспензією клітин із реестрацією останнього колориметричним методом. Механізми та роль кінази СК2 в регуляції активності РСПМ досліджували за допомогою інгібіторного аналізу. У пробі із 2 мл одержаної суспензії еритроцитів та в контрольні пробірки з розчином Кребса без клітин додавали специфічні інгібітори кінази СК2 та/або модулятори Ca^{2+} -системи сигналізації з наступною 30-хвилинною інкубацією при кімнатній температурі (20 °C), після чого добавляли до 1 ммоль/л фериціанід калію та відразу видаляли половину їх об'єму на центрифугування для контрольного визначення рівня фероціаніду в нульовий проміжок часу. Залишок проб інкубували на шейкерній бані протягом 30 хв при 37 °C з подальшим центрифугуванням. Аліквоти одержаних супернатантів (0,1 мл) до та після 30-хвилинної інкубації використовували для визначення в них кількості утвореного фероціаніду за методом Аврона та Шевіт [12] в колориметричній реакції з батофенантроліном при 535 нм із використанням коефіцієнта молярної адсорбції ($21\ 600\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) проти відповідного безклітинного контролю. Активність РСПМ еритроцитів представляли в одиницях мкмоль фероціаніду/мл еритроцитів/30 хв.

У роботі використовували HEPES, батофенантролін (Sigma, США), інші реактиви – марки «хч» вітчизняного виробництва. Як інгібітори кінази СК2 було застосовано похідні оксазолу (5-аміно-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазолу), синтезовані нами та раніше

ідентифіковані як високоспецифічні інгібітори протеїнкінази СК2 в тестах *in vitro* з використанням рекомбінантної протеїнкінази СК2 людини та 7 інших протеїнкіназ [11].

Результати подано у вигляді середнього ± середньоквадратичної похибки середнього ($M \pm m$). Статистичну оцінку виконували з використанням *t*-критерію Стьюдента для вибраного рівня значущості $P < 0,05$.

Результати та обговорення

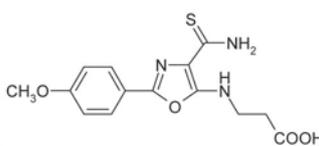
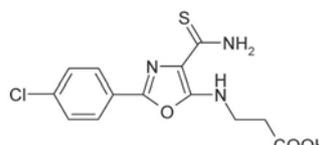
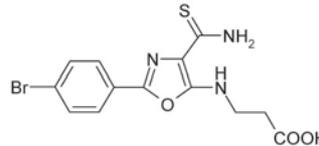
В дослідженнях виявлено зменшення активності РСПМ еритроцитів людини за дії інгібіторів кінази СК2 (табл. 1), що свідчить про активацію цим ферментом РСПМ еритроцитів. Таким чином, на прикладі еритроцитів нами вперше встановлено участь кінази СК2 в механізмах модуляції активності РСПМ живих клітин. У роботі нами було використано нещодавно знайдені серед 5-аміно-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазолів та описані в літературі високоспецифічні інгібітори кінази СК2, IC_{50} яких було встановлено *in vitro* з використанням рекомбінантної протеїнкінази СК2 людини та низки інших протеїнкіназ [11]. Як видно з табл. 1, спостерігається пряма залежність між рівнем гальмування активності РСПМ еритроцитів похідними оксазолу та їх IC_{50} , що може бути додатковим підтвердженням

високої специфічності використаних сполук до кінази СК2 не тільки *in vitro*, а також *in vivo*.

Оскільки активність РСПМ залежить від структурно-функціональної властивості мембран та метаболізму клітин, а кіназа СК2 належить до загальних регуляторів процесів внутрішньоклітинної сигналізації та метаболізму, фосфорилуючи широкий спектр протеїнів, кількість яких щороку збільшується [10], вплив кінази СК2 на активність РСПМ може реалізовуватись за рахунок різноманітних молекулярних механізмів як прямих, так і опосередкованих. Хоча в літературі відсутні дані про модифікацію кіназою СК2 протеїнових компонентів РСПМ, враховуючи низьку селективність цього ферменту та одержані нами дані, вивчення можливості фосфорилування кіназою СК2 протеїнів РСПМ може бути предметом додаткових досліджень.

Вплив кінази СК2 на РСПМ еритроцитів також може бути опосередкований деякими протеїнами, які модулюють активність РСПМ. Відомо, що протеїнкіназа СК2 фосфорилує протеїни цитоскелета [9], котрі, за даними інших авторів, взаємодіють із фериціанідредуктазою VDAC1 [22] та регулюють активність РСПМ [23, 24]. Також показано, що активація РСПМ еритроцитів у разі підвищення концентрації оксидантів у

Таблиця 1. Вплив інгібіторів протеїнкінази СК2 (1–3) на активність РСПМ еритроцитів людини

Сполука, (№)	IC_{50} , мкМ	Контроль	Концентрація сполуки, мкМ	
			10	1
(1) 	1,2	$2,44 \pm 0,112$	$0,94 \pm 0,043^*$ (38,5%)	$1,82 \pm 0,094^*$ (74,6%)
(2) 	2,0	$2,47 \pm 0,116$	$1,02 \pm 0,058^*$ (41,3%)	$1,84 \pm 0,072^*$ (74,5%)
(3) 	4,5	$2,53 \pm 0,138$	$1,65 \pm 0,077^*$ (65,2%)	$2,25 \pm 0,123^*$ (88,9%)

Тут і в табл. 2: активність РСПМ представлена в одиницях мкмоль фероціаніду/мл еритроцитів/30 хв ($M \pm m$, $n = 5$). Додатково ефект інгібіторів протеїнкінази СК2 представлено у відсотках змін відносно контролю. *Вірогідно порівняно з контролем ($P < 0,05$). IC_{50} наведено за даними роботи [11].

зовнішньому середовищі залежить від рівня глюкози та супроводжується перебудовою клітинного метаболізму шляхом чотириразової порівняно з контролем активації пентозофосфатного циклу [1, 14]. Гліколітичні ензими – фосфофруктокіназа, альдолаза та гліцеральдегід 3-фосфат дегідрогеназа (GAPDH) – утворюють протеїновий комплекс із мембранним $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінником зони 3 [15, 16], який тісно взаємодіє із протеїнами цитоскелета [24]. Під час розпаду протеїнового комплексу гліколітичних ензимів з аніонним обмінником зони 3 пригнічується пентозофосфатний шлях обміну глюкози та активується гліколіз, що спричинює зменшення спроможності еритроцитів до синтезу NADPH та глутатіону, в свою чергу необхідних для відновлення дегідроаскорбату до аскорбату як одного із донорів електронів РСПМ [18, 19]. У цьому разі РСПМ використовує гліколітичний NADH як основний донор електронів. Хоча кіназа СК2 нездатна істотно фосфорилувати $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінник еритроцитів [9], її вплив на структурно-функціональні властивості цього протеїну, метаболізм глюкози і активність РСПМ може реалізовуватись за рахунок фосфорилування протеїнів цитоскелета, з якими аніонний обмінник зони 3 тісно взаємодіє. Протеїнкіназа СК2 також фосфорилує кальмодулін [10], який зумовлює перебудову протеїнів цитоскелета [25]. Тому, незважаючи на відсутність даних літератури щодо впливу цього Ca^{2+} -зв'язувального протеїну на активність РСПМ еритроцитів, він може відбуватись хоча б за рахунок регуляції кальмодуліном структури цитоскелета.

Активність РСПМ еритроцитів може безпосередньо контролюватись сигнальними системами клітин. Показана стимуляція трансмембранного транспорту електронів еритроцитів агоністами β -адренорецепторів за участю сигнальних G-протеїнів мембран [23]. Незважаючи на досить тривалий період дослідження РСПМ еритроцитів нам не вдалося знайти в літературі безпосередніх даних щодо ролі Ca^{2+} -системи сигналізації в регуляції її активності. Хоча такі дослідження було проведено на ядерних клітинах: кардіоміоцитах [24], культурі клітин карциноми Ерліха [25] та моркви [26], вони не можуть бути екстрапольовані на еритроцити, враховуючи особливості їхніх морфофункціональних властивостей. Тому методом інгібіторного аналізу нами були проведені додаткові дослідження ролі Ca^{2+} -системи сигналізації в регуляції активності РСПМ

еритроцитів із визначенням відносного внеску Ca^{2+} -залежних та Ca^{2+} -незалежних механізмів модуляції трансмембранного транспорту електронів кіназою СК2. Для цього нами було використано функціональні Ca^{2+} -антагоністи (інгібітор кальмодуліну кальмідазол та інгібітор Ca^{2+} -каналів L-типу нітрэндипін), Ca^{2+} -агоністи (Ca^{2+} -іонофор кальциміцин; активатор Ca^{2+} -каналів L-типу Bay K 8644) та один із наведених у табл. 1 інгібіторів кінази СК2 – N-(2-(4-хлорофеніл)-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)- β -аланін (сполука 2).

Виявлено значну активацію РСПМ еритроцитів кальмідазолом та нітрэндипіном і, навпаки, деяке пригнічення активності цієї системи кальциміцином за відсутності істотного ефекту Bay K 8644 (табл. 2). Як видно з табл. 2, ступінь активації РСПМ еритроцитів дослідженими функціональними Ca^{2+} -антагоністами істотніша, ніж гальмування активності РСПМ еритроцитів Ca^{2+} -агоністами. Одержані дані свідчать про інгібування РСПМ еритроцитів активним Ca^{2+} та вищу чутливість цієї системи до зменшення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} , ніж до його збільшення.

На фоні дії як функціональних Ca^{2+} -агоністів, так і Ca^{2+} -антагоністів сполука 2 також істотно пригнічує активність РСПМ еритроцитів відносно її базових значень в інтактних клітинах та позитивного контролю – проб із відповідним фармакологічним агентом (табл. 2). Це вказує на істотну присутність в еритроцитах Ca^{2+} -незалежних шляхів активації РСПМ кіназою СК2. За сумісної дії сполуки 2 з кальциміцином або Bay K 8644 рівень активності РСПМ еритроцитів не відрізняється від його значень у пробах з одним інгібітором протеїнкінази СК2 (табл. 2). У разі комбінованої дії сполуки 2 з кальмідазолом або нітрэндипіном рівень активності РСПМ еритроцитів нижче базових значень інтактних клітин, але вище, ніж у пробах з одним інгібітором кінази СК2 (табл. 2). Порівняння кількісних показників окремої та комбінованої дії інгібітора кінази СК2 та фармакологічних агентів на активність РСПМ відносно контролю та позитивного контролю відповідно свідчать про певну взаємну модифікацію впливу кінази СК2 та Ca^{2+} -системи сигналізації на трансмембранний транспорт електронів.

Як видно з табл. 2, інгібітор кальмодуліну кальмідазол на фоні дії сполуки 2 відносно позитивного контролю виявляє виразніший РСПМ-активуючий ефект порівняно з його

Таблиця 2. Вплив інгібітора протеїнкінази СК2 – N-(2-(4-хлорофеніл)-4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)-β-аланіну, 10 мкМ/л – сполука 2 (в табл. 1) на активність РСПМ інтактних та модифікованих функціональними Ca²⁺-агоністами та Ca²⁺-антагоністами еритроцитів людини

Фармакологічний агент (концентрація)	Умови досліджу			
	Контроль	Інгібітор протеїнкінази СК2	Фармакологічний агент	Фармакологічний агент + інгібітор протеїнкінази СК2
Кальциміцин (10 мкМ) % від контролю % від (+)-контролю	2,49 ± 0,105	1,02 ± 0,072* 41,0	2,16 ± 0,097* 86,7	1,09 ± 0,042*.& 43,8 (50,5), [106,9]
Вау К 8644 (10 мкМ) % від контролю % від (+)-контролю	2,53 ± 0,123	1,09 ± 0,043* 43,1	2,42 ± 0,133 95,70	1,09 ± 0,056*.& 43,1 (45,0), [100,0]
Кальмідазол (4 мкМ) % від контролю % від (+)-контролю	2,52 ± 0,137	1,01 ± 0,054* 40,0	3,71 ± 0,238* 147,2	2,01 ± 0,116*.&. # 79,8 (54,2), [199,0]
Нітрэндипін (10 мкМ) % від контролю % від (+)-контролю	2,52 ± 0,119	1,01 ± 0,060* 40,1	3,67 ± 0,223* 145,6	1,51 ± 0,091*.&. # 59,9 (41,0), [149,5]

*Вірогідно порівняно з контролем ($P < 0,05$); &. # вірогідно порівняно з позитивним контролем ($P < 0,05$) – пробами, що містять фармакологічний агент або сполуку 2 відповідно. Ефект комбінованої дії сполук представлено у відсотках змін відносно позитивного контролю – проб, що містять фармакологічний агент, або інгібітор протеїнкінази СК2.

дією на інтактні еритроцити. Оскільки фосфорилування кальмодуліну кіназою СК2 спричинює зменшення його активності [25], інгібування кінази СК2 має супроводжуватись ростом активності цього Ca²⁺-зв'язувального протеїну. Тому наведена в табл. 2 істотніша дворазова активація кальмідазолом РСПМ еритроцитів проб зі сполукою 2 відносно позитивного контролю порівняно з півторазовим ростом активності РСПМ за його дії на інтактні еритроцити може бути обумовлена підвищенням базової активності кальмодуліну та рівня його гальмівного впливу на активність РСПМ. За цих умов кальмідазол має бути ефективнішим стимулятором активності РСПМ. У свою чергу, на фоні інгібування кальмодуліну спостерігається менш істотне пригнічення активності РСПМ еритроцитів сполукою 2 (до 54,2% від позитивного контролю) порівняно з падінням активності РСПМ (до 40,0% від контролю) за дії цього інгібітора кінази СК2 на інтактні еритроцити. Цей ефект може бути опосередкований неможливістю на фоні інгібування кальмідазолом активації кальмодуліну та збільшенням його гальмівного впливу на РСПМ за рахунок зменшення рівня фосфорилування цього протеїну кіназою

СК2. Тому процентне відношення різниць рівнів падіння активності РСПМ еритроцитів від позитивного контролю та контролю за дії сполуки 2 на проби з кальмідазолом та інтактні клітини відповідно, яке становить 76,3%, на наш погляд, певною мірою може бути кількісним показником відносного внеску Ca²⁺-незалежних шляхів модуляції активності РСПМ еритроцитів кіназою СК2.

Відсутність взаємної модифікації ефектів нітрэндипіну та сполуки 2 (табл. 2) на РСПМ також може бути пов'язана з участю кальмодуліну в опосередкованих Ca²⁺ механізмах впливу кінази СК2 на РСПМ за відсутності значного зменшення активності кальмодуліну в еритроцитах на фоні інгібуванні Ca²⁺-каналів L-типу. У цьому разі виявлена активація РСПМ еритроцитів нітрэндипіном може бути обумовлена зменшенням рівня іонізованого, не зв'язаного кальмодуліном кальцію. Нами також не виявлено взаємної модифікації дії сполуки 2 і активатора Ca²⁺-каналів L-типу Вау К 8644 на РСПМ еритроцитів та істотного впливу самого Вау К 8644 на активність цієї системи (табл. 2). Останнє, на наш погляд, може бути пов'язане з підвищенням в еритроцитах базового рівня активності Ca²⁺-каналів

зумовленого фериціанідом калію, який може окислювати біомембрани зі зміною їхньої іонної проникності, хоча його присутність у середовищі інкубації необхідна для визначення активності РСПМ.

Зазначена в табл. 2 відсутність додаткового пригнічення кальциміцином активності РСПМ еритроцитів за дії сполуки **2** поряд з деяким зменшенням інгібуючої РСПМ активності цього інгібітора протеїнкінази СК2 на фоні дії кальциміцину відносно відповідних позитивних контролів також може бути певною мірою пояснена підвищенням активності кальмодуліну за рахунок зменшення його фосфорилування кіназою СК2 до рівня, коли збільшення кількості внутрішньоклітинного Ca^{2+} вже не може супроводжуватись додатковою активацією цього Ca^{2+} -зв'язувального протеїну до рівня, достатнього для додаткового інгібування РСПМ.

Таким чином, в еритроцитах людини присутні як Ca^{2+} -незалежні, так і Ca^{2+} -опосередковані механізми регуляції активності РСПМ. Одержані результати свідчать про активацію кіназою СК2 РСПМ еритроцитів людини, в основному, за рахунок Ca^{2+} -незалежних механізмів, а також певною мірою за участю кальмодуліну.

**УЧАСТИЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ СК2
В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ
РЕДОКС-СИСТЕМЫ
ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН
ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА:
ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ ВКЛАД
 Ca^{2+} -ЗАВИСИМЫХ И Ca^{2+} -
НЕЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ ЕЕ
АКТИВАЦИИ**

*И. Н. Яковенко, В. В. Жирнов,
А. П. Козаченко, О. В. Шаблыкн,
В. С. Броварец*

Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

Виявлено участие протеинкиназы СК-2 (2.7.11.1) в модуляции трансмембранного транспорта электронов живых клеток. На эритроцитах человека показано уменьшение активности редокс-системы плазматических мембран (РСПМ) при действии специфических ингибиторов протеинкиназы СК2.

При помощи ингибиторного анализа исследованы Ca^{2+} -зависимые и Ca^{2+} -независимые механизмы регуляции трансмембранного

транспорта электронов в эритроцитах человека. Показано, что в этих клетках функциональные Ca^{2+} -антагонисты (нитрендипин и кальмидазол) существенно увеличивают, а функциональные Ca^{2+} -агонисты несколько уменьшают (кальцимицин) или не влияют (Вау К 8644) на активность РСПМ. Во всех случаях модификации кальциевой системы сигнализации ингибирование киназы СК2 также сопровождается существенным уменьшением активности РСПМ эритроцитов. На фоне ингибирования протеинкиназы СК2 отмеченное влияние на РСПМ нитрендипина и Вау К 8644 не изменяется, кальмидазола усиливается, а кальцимицина не проявляется. Данные работы свидетельствуют об ингибиторном влиянии Ca^{2+} и кальмодулина на РСПМ эритроцитов человека и активирование этой системы протеинкиназой СК2 в основном за счет Ca^{2+} -независимых механизмов. Обсуждается некоторое участие кальмодулина в регуляции активности РСПМ эритроцитов киназой СК2.

Ключевые слова: эритроциты, протеинкиназа СК2, ингибиторы, редокс-система плазматических мембран.

**PARTICIPATION OF PROTEINKINASE
СК2 IN REGULATION OF HUMAN
ERYTHROCYTES PLASMA MEMBRANE
REDOX SYSTEM ACTIVITY:
RELATIVE CONTRIBUTION OF Ca^{2+} -
DEPENDENT AND Ca^{2+} -INDEPENDENT
MECHANISMS OF ITS ACTIVATION**

*I. N. Yakovenko, V. V. Zhirnov,
A. P. Kozachenko, O. V. Shablykin,
V. S. Brovarets*

Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

S u m m a r y

Involvement of protein kinase СК2 (2.7.11.1) in modulation of live cells trans-plasma membrane electron transport was first discovered. Using human erythrocytes a decrease of plasma membrane redox system (PMRS) activity is shown under the action of specific protein kinase СК2 inhibitors.

Using inhibitory analysis the activity regulation of human erythrocytes PMRS by Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms were investigated. It was shown that functional Ca^{2+} -antagonists (nitrendipine and calmidazolium) significantly increased, and functional Ca^{2+} -agonists

to some extent reduced (calcimycin) or did not affect (Bay K 8644) the trans-plasma membrane electron transport in these cells. In all cases of calcium signaling the system modifications inhibition of kinase CK2 is also accompanied by significant reductions of erythrocytes PMRS activity. Against the background of kinase CK2 inhibition the mentioned influence activity of nitrendipine and Bay K 8644 on PMRS does not change, that of calmidazolium increases and of calcimycin is not revealed. Obtained results demonstrate the inhibitory effect of Ca^{2+} and calmodulin on human erythrocytes PMRS and the activation of this system by protein kinase CK2 mainly through Ca^{2+} -independent mechanisms. Some participation of calmodulin in PMRS activity regulation by kinase CK2 is discussed.

Key words: erythrocytes, protein kinase CK2, inhibitors, plasma membrane redox system.

1. Kennett E. C., Kuchel P. W. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – **8**, N 7–8. – P. 1241–1247.
2. Principe D. D., Avigliano L., Savini I., Catani M. V. // *Ibid.* – 2011. – **14**, N 11. – P. 2289–2318.
3. May J. M. // *Front. Biosci.* – 1998. – **3**. – D1–D10.
4. Su D., May J. M., Koury M. J., Asard H. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 52. – P. 39852–39859.
5. Baker M. A., Lane D. J. R., Ly J. D. et al. // *Ibid.* – 2004. – **279**, N 6. – P. 4811–4819.
6. Shimizu S., Matsuoka Y., Shinohara Y. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2001. – **152**, N 2. – P. 237–250.
7. Papandreou P., Rakitzis E. T. // *Clin. Chim. Acta.* – 1989. – **181**, N 2. – P. 189–196.
8. Erusalimsky J. D., Balas N., Milner Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – **276**, N 2. – P. 171–181.
9. Wei T., Tao M. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1993. – **307**, N 1. – P. 206–216.
10. Дмитрук К. В., Сибірний А. А. // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 2. – С. 27–36.
11. Шабликін О. В., Козаченко О. П., Брова-рець В. С. та ін. // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2010. – **8**, № 1. – С. 61–66.
12. Avron M., Shavit N. // *Anal. Biochem.* – 1963. – N 6. – P. 549–554.
13. Rizvi S. I., Jha R., Maurya P. K. // *Rejuvenation Res.* – 2006. – **9**, N 4. – P. 470–474.
14. Roman I., Figys J., Steurs G., Zizi M. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – **1758**, N 4. – P. 479–486.
15. Barr R., Stone B., Craig T. A., Crane F. L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – **126**, N 1. – P. 262–268.
16. Matteucci E., Giampietro O. // *Biomark. Insights.* – 2007. – **2**. – P. 321–329.
17. Himmelreich U., Kuchel P. W. // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – **246**, N 3. – P. 638–645.
18. Campanella M. E., Chu H., Low P. S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**, N 7. – P. 2402–2407.
19. Messana I., Orlando M., Cassiano L. et al. // *FEBS Lett.* – 1996. – **390**, N 1. – P. 25–28.
20. Cimen M. Y. // *Clin. Chim. Acta.* – 2008. – **390**, N 1–2. – P. 1–11.
21. Rogers S. C., Said A., Corcuera D. et al. // *FASEB J.* – 2009. – **23**, N 9. – P. 3159–3170.
22. Sacks D. B., Lopez M. M., Li Z., Kosk-Kosicka D. // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – **239**, N 1. – P. 98–104.
23. Marques F., Bicho M. P. // *Biol. Signals.* – 1997. – **6**, N 2. – P. 52–61.
24. Clark M. G., Rattigan S. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1986. – **18**, N 5. – P. 69–77.
25. del Castillo-Olivares A., Esteban del Valle A., Marquez J. et al. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1995. – **27**, N 6. – P. 605–611.
26. Barr R., Stone B., Craig T. A., Crane F. L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – **126**, N 1. – P. 262–268.

Отримано 15.04.2012