

НАКОПЛЕНИЕ ИОНОВ Li^+ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА (HUVES), ОБРАБОТАННЫХ LiCl , ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC*

© 2024 О.Е. Квитко*, Д.А. Федоров*, С.В. Сидоренко,
О.Д. Лопина, Е.А. Климанова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии,
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.08.2024

После доработки 26.09.2024

Принята к публикации 30.09.2024

Показано, что изменение внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ приводит к изменению экспрессии генов. Другой одновалентный катион, Li^+ , хорошо известен как компонент лекарственных препаратов, используемых для лечения психических расстройств, но механизм его действия неясен. Таким образом, важно оценить влияние Li^+ на экспрессию генов в эндотелиальных клетках. В данной работе мы изучили влияние повышенной внутриклеточной концентрации Na^+ или Li^+ на транскрипцию Na^+/K^+ -чувствительных генов. Инкубация эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) в присутствии LiCl в течение 1,5 ч приводила к накоплению Li^+ в клетках. Это вызывало увеличение уровня мРНК *FOS* и *EGR1* и снижение уровня мРНК *JUN* и *MYC*. Обработка HUVES монензином обеспечивала накопление Na^+ и потерю ионов K^+ этими клетками. При этом Na^+ -ионофор монензин не оказывал существенного влияния на экспрессию генов. Инкубация HUVES в среде с повышенной внеклеточной концентрацией NaCl приводила к увеличению внутриклеточного содержания K^+ и транскрипции *ATF3* и снижению транскрипции *JUN*. Эти результаты наглядно показывают, что Na^+ и Li^+ по-разному влияют на профиль экспрессии исследуемых генов, что, по-видимому, связано с различным действием на соотношение одновалентных катионов во внутриклеточном пространстве.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: литий, натрий, Na^+/K^+ -чувствительные гены, монензин, эндотелиальные клетки.

DOI: 10.31857/S0320972524100091 EDN: IOYVJO

ВВЕДЕНИЕ

Клетки животных строго поддерживают градиент одновалентных катионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану, в основном за счёт активности Na,K-ATPазы . Этот градиент имеет решающее значение для регуляции клеточных функций, таких как поддержание объёма клетки и внутриклеточного pH, вторичный транспорт ионов и метаболитов, формирование мембранного потенциала, активность ферментов и процессы трансляции [1]. Однако при некоторых физиологических и патологических состояниях

наблюдаются изменения внутриклеточной концентрации этих катионов, которые влияют на экспрессию генов [2]. К числу таких генов принадлежат так называемые Na^+/K^+ -чувствительные гены, экспрессия которых изменяется в ответ на изменение концентрации одновалентных катионов независимо от ионов Ca^{2+} . К ним относятся гены, кодирующие различные транскрипционные (*FOS*, *JUN*, *EGR1*, *ATF3* и др.) и провоспалительные (*IL6* и *PTGS2*) факторы [3]. Было обнаружено, что количество и уровень экспрессии дифференциально экспрессируемых генов напрямую связаны с величиной соотношения Na^+/K^+ [4]. В связи с этим возникает вопрос о существовании внутриклеточного молекулярного сенсора одновалентных катионов. Одним из возможных механизмов влияния одновалентных катионов на экспрессию генов является формирование G-квадруплексов и изменение их конформации в результате взаимо-

Принятые сокращения: HUVES – эндотелиальные клетки пупочной вены человека.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

действия с ионами металлов [5, 6]. G-Квадруплексы – это неканонические вторичные структуры, образующиеся в гуанин-богатых областях нуклеиновых кислот [7]. G-Квадруплексы связывают одновалентные катионы, причём способность катионов различных металлов стабилизировать G-квадруплексы уменьшается в порядке $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+$ [8]. Классическим примером гена, транскрипция которого контролируется G-квадруплексом в промоторной области, является ген транскрипционного фактора с-Мус [9]. Кроме того, наличие G-квадруплексов предсказано в промоторах генов *FOS* [10], *JUN*, *EGR1* [7]. До сих пор препараты, содержащие ионы Li⁺, являются одними из основных фармакологических средств, используемых в лечении психических расстройств. Попадая в плазму крови, они в первую очередь влияют на метаболизм эндотелиальных клеток [11]. В данном исследовании была изучена взаимосвязь между влиянием ионов Na⁺ и Li⁺ на транскрипцию генов *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *ATF3*, *MYC*, *PTGS2* и изменением внутриклеточного содержания одновалентных катионов в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Первичная культура HUVES и среда для выращивания эндотелиальных клеток были приобретены у компании «Cell Applications» (Калифорния, Сан-Диего, США), среды DMEM и F12, L-глутамин – у «ПанЭко» (Россия). Монензин, FBS, LiCl и Trizol были приобретены у «Thermo Fisher Scientific» (США), NaCl и KCl – у «MP Biomedicals» (США), ТХУ (трихлоруксусная кислота) – у «Диа-М» (Россия), MgCl₂ – у «Honeywell Fluka» (Германия). Планшеты, культуральные флаконы и серологические пипетки были приобретены у компании «Corning» (США). Набор ZymoResearch Quick-RNA Microprep был получен от «ZymoResearch» (США), набор ImProm-ITM Reverse Transcription System – от «Promega» (США), набор R-402 для ПЦР с Taq-полимеразой в присутствии красителя SYBR Green I – от «Синтол» (Россия).

Методы. Культура клеток. HUVES, культивировавшиеся менее 3 пассажей, были получены от компании «Cell Applications» (#200-05n). Клетки высевали с плотностью $\sim 6 \times 10^4$ клеток на лунку в 6-луночные планшеты, содержащие среду для роста эндотелиальных клеток (#211-500, «Cell Applications»), и выдерживали при 37 °C в увлажнённой атмосфере с 5% CO₂. Через 3–5 дней после посева клетки достигали 80–90%-ной конfluence, после чего их повторно культивировали в среде DMEM:F12, содержащей 0,2% FBS, 4 mM L-глутамина и стрептомицин-пенициллин,

в течение 6 ч. После этого клетки инкубировали в аналогичной среде с добавлением 40 mM NaCl, 40 mM LiCl или 0,5–2 мкг/мл монензина в течение 1,5 ч.

Измерение внутриклеточного содержания Na⁺, Li⁺, K⁺. Подготовку образцов проводили на льду. Лунки планшетов трижды промывали холодным раствором 0,1 M MgCl₂. После этого в лунки добавляли 5%-ный раствор ТХУ и инкубировали при +4 °C в течение 1–2 ч. Полученные преципитаты центрифугировали при 18 000 g в течение 40 мин. Супернатант собирали в отдельные пробирки и использовали для измерения внутриклеточного содержания Na⁺, Li⁺ и K⁺ методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре «Квант-2м1» («Кортек», Россия) в пропано-воздушной смеси в соответствии с инструкцией. Для калибровки использовали растворы KCl (0,5–4 мг/л K⁺), LiCl (0,25–4 мг/л Li⁺) и NaCl (0,5–2 мг/л Na⁺) в 5%-ном растворе ТХУ. Осадки растворяли в 0,1 M NaOH, содержащем 0,1% дезокси-холата натрия, концентрацию белка определяли методом Лоури [12]. Содержание внутриклеточных ионов нормировали на общее содержание белка в образце.

Выделение РНК и обратная транскрипция.

Выделение РНК проводили с помощью набора ZymoResearch Quick-RNA Microprep. Лунки промывали ледяным раствором 0,1 M MgCl₂, затем добавляли 400 мкл реагента Trizol. Водную фазу, содержащую тотальную РНК, выделяли из полученных лизатов с помощью хлороформа и 96%-ного этанола. Дальнейшую очистку РНК и обработку ДНК проводили на колонках Quick-RNA Microprep Kit в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию РНК в полученных элюатах определяли с помощью прибора NanoVue («VWR International», США) при длине волны 260 нм, а чистоту препаратов оценивали по соотношению A260/A280. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора ImProm-ITM Reverse Transcription System в соответствии с инструкциями производителя.

ПЦР в реальном времени. Комплементарную ДНК (кДНК), синтезированную методом обратной транскрипции, использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 («BioRad», США). Изолированную РНК, не подвергавшуюся обратной транскрипции, использовали в качестве отрицательного контроля. Для контроля загрязнения реагентов использовали реакционную смесь, содержащую воду в объёме, равном объёму добавленной кДНК. Образцы содержали прямой и обратный праймеры («Синтол») в концентрации 200 нМ и кДНК в количестве 60 нг. ПЦР проводили по протоколу, описанному ранее [13]. Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали методом $\Delta\Delta C_t$ [14], используя RPS18

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Символ гена	Название гена	Размер ПЦР-продукта, п.о.	Номер мРНК-последовательности в базе данных GenBank	Последовательности праймеров
<i>RPS18</i>	Ribosomal protein S18	205	NM_022551.3	F: 5'-ATTAAGGGTGTGGGCCGAAG-3' R: 5'-TGGCTAGGACCTGGCTGTAT-3'
<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	154	NM_005252.4	F: 5'-GCAAGGTGGAACAGTTATCTC-3' R: 5'-GCAGACTTCTCATCTTCTAGTTG-3'
<i>EGR1</i>	Early growth response factor 1	291	NM_001964.3	F: 5'-CAGTGCCATCCAACGACAG-3' R: 5'-ACAGAGGGGTAGCGAAGG-3'
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	109	NM_002228.4	F: 5'-GGCTACAGTAACCCCAAGATCC-3' R: 5'-AGGTGAGGAGTCCGAGTTC-3'
<i>ATF3</i>	Activating transcription factor 3	119	NM_001674.4	F: 5'-GAGGCGACGAGAAAGAAATAAG-3' R: 5'-CCTCAGTTCAGCATTCACAC-3'
<i>MYC</i>	Myc proto-oncogene, bHLH transcription factor	264	NM_002467.6	F: 5'-GATTCTCTGCTCTCCTCGACG-3' R: 5'-GTTGTGCTGATGTGTGGAGAC-3'
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	156	NM_000963.4	F: 5'-GTATGTATGAGTGTGGGATTTGAC-3' R: 5'-CTTGAAGTGGGTAAGTATGTAGTG-3'

в качестве референсного гена. Последовательности праймеров, использованных в работе, представлены в табл. 1.

Статистический анализ данных проводили с помощью Microsoft Excel и GraphPad Prism 9. Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Сравнение выборок проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса и одностороннего ANOVA. Различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все данные представлены как среднее \pm SE, объём выборки составлял 4–6 биологических повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения влияния ионов Li^+ и Na^+ на транскрипцию генов *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *ATF3*, *MYC* и *PTGS2* в HUVEC клетки инкубировали в среде, содержащей LiCl , или в контрольной среде, содержащей Na^+ -ионофор монензин. Для контроля осмолярности внеклеточной среды использовали NaCl в концентрации, эквивалентной LiCl .

На рис. 1, а, б показано, что инкубация HUVEC в присутствии 40 мМ внеклеточного LiCl в течение

1,5 ч не влияла на внутриклеточное содержание ионов Na^+ и K^+ , но приводила к внутриклеточному накоплению 230 нмоль Li^+ /мг белка (рис. 1, в). Добавление 40 мМ Na^+ во внеклеточную среду практически не влияло на содержание Na^+ (рис. 1, а), но увеличивало содержание K^+ внутри клеток на ~ 400 нмоль/мг белка (рис. 1, б) за счёт активации Na,K-ATPазы , как мы показали ранее [13]. Обработка клеток 1,2 мкг/мл монензина в течение 1,5 ч обеспечивала общее изменение внутриклеточного содержания одновалентных катионов (рис. 1, а, б), сопоставимое с тем, которое вызывала инкубация клеток в присутствии ионов Li^+ (рис. 1, в). Однако в этом случае наблюдалось увеличение содержания Na^+ на 300 нмоль/мг белка и уменьшение содержания K^+ на 261 нмоль/мг белка внутри клеток. Потеря K^+ , скорее всего, происходит за счёт активации K^+, Cl^- -котранспортёров (КСС) и/или K^+ -каналов, возникающей вследствие набухания клеток, опосредованного внутриклеточным накоплением Na^+ [15, 16]. Предварительно мы убедились, что зависимость содержания внутриклеточного Na^+ от концентрации монензина носит линейный характер (рис. 2). Эти результаты согласуются с увеличением внутриклеточного

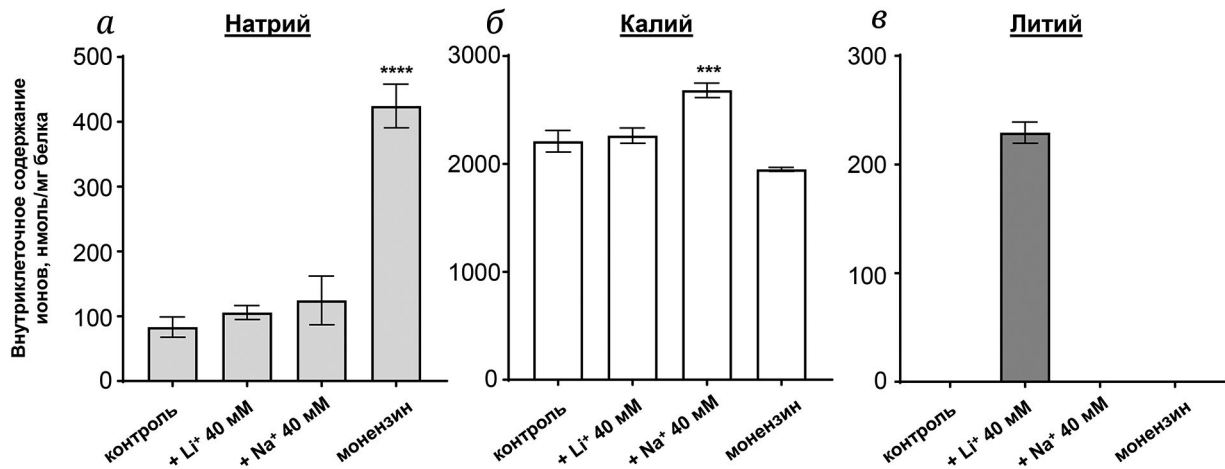


Рис. 1. Влияние 40 мМ LiCl, 40 мМ NaCl и 1,2 мкг/мл монензина, добавленных в культуральную среду, на внутриклеточное содержание ионов Na⁺ (а), K⁺ (б) и Li⁺ (в) в HUVEC. Клетки инкубировали в экспериментальных условиях в течение 1,5 ч. Значения представлены как среднее ± SE (n = 4–6). Значимые различия рассчитывали с помощью одностороннего ANOVA; * p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001

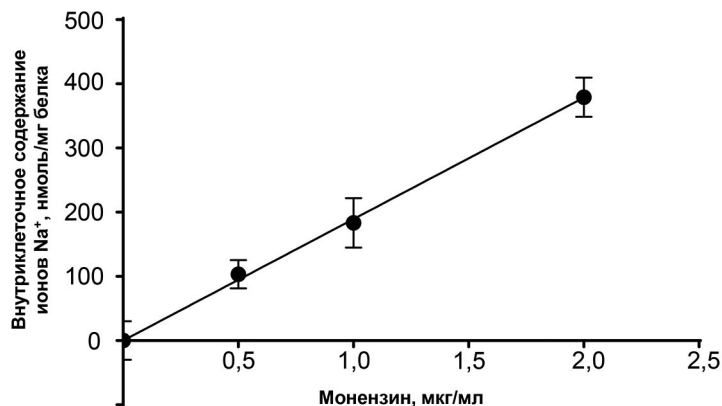


Рис. 2. Зависимость внутриклеточного содержания Na⁺ в HUVEC от концентрации монензина в культуральной среде. Клетки инкубировали в среде, содержащей монензин, в течение 1,5 ч. Значения представлены как среднее ± SE (n = 4–6)

точного содержания Na⁺, наблюдаемым в клетках HeLa, обработанных 1 мкг/мл монензина в течение 6 ч [17]. Учитывая, что дисбаланс одновалентных катионов способствует экспрессии генов в HUVEC Ca²⁺-независимым образом [3], мы изучили влияние ионов Na⁺ и Li⁺ на экспрессию некоторых Na⁺/K⁺-чувствительных генов. На рис. 3, а–г показано, что накопление Li⁺ в клетках приводило к увеличению транскрипции генов раннего ответа *FOS* и *EGR1* в 15 и 8 раз соответственно и снижению транскрипции *JUN* и *MYC* в 3 раза. Уровень экспрессии *A F3* и *PTGS2* существенно не изменялся (рис. 3, д, е). Эти данные в основном согласуются с ранее опубликованными результатами. Во-первых, было показано, что 24-часовая инкубация клеток лейкемии человека NB4 в присутствии 20 мМ LiCl снижала уровень белка с-Мус в 2 раза [18]. Во-вторых, лечение литием здоровых мужчин в течение 2 недель приводило к накоплению Li⁺ в крови до 0,73 ± 0,27 мМ.

Это вызывало увеличение транскрипции *FOS* в 1,8 раза и снижение транскрипции *JUN* в 2 раза в лейкоцитах [19]. В-третьих, обработка клеток нейробластомы SH-SY5Y 20 мМ Li⁺ приводила к увеличению транскрипции *EGR1* [20]. В-четвертых, лечение литием пациентов с биполярным расстройством не изменяло экспрессию *ATF3* в их моноцитах [21], тогда как инкубация хондроцитов человека T/C28a в присутствии 20 мМ LiCl в течение 5 ч приводила к увеличению уровня мРНК *PTGS2* в 3–4 раза [22], что не согласуется с нашими результатами. Возможно, это объясняется тем, что обработка эндотелиальных клеток Li⁺ в течение 1,5 ч недостаточна для увеличения экспрессии *PTGS2*, и этот эффект проявится при более длительной инкубации.

Увеличение содержания внеклеточного Na⁺ на 40 мМ приводило к двукратному снижению уровня мРНК *JUN* (рис. 3, в) и трёхкратному увеличению транскрипции *ATF3* (рис. 3, е), не влияя

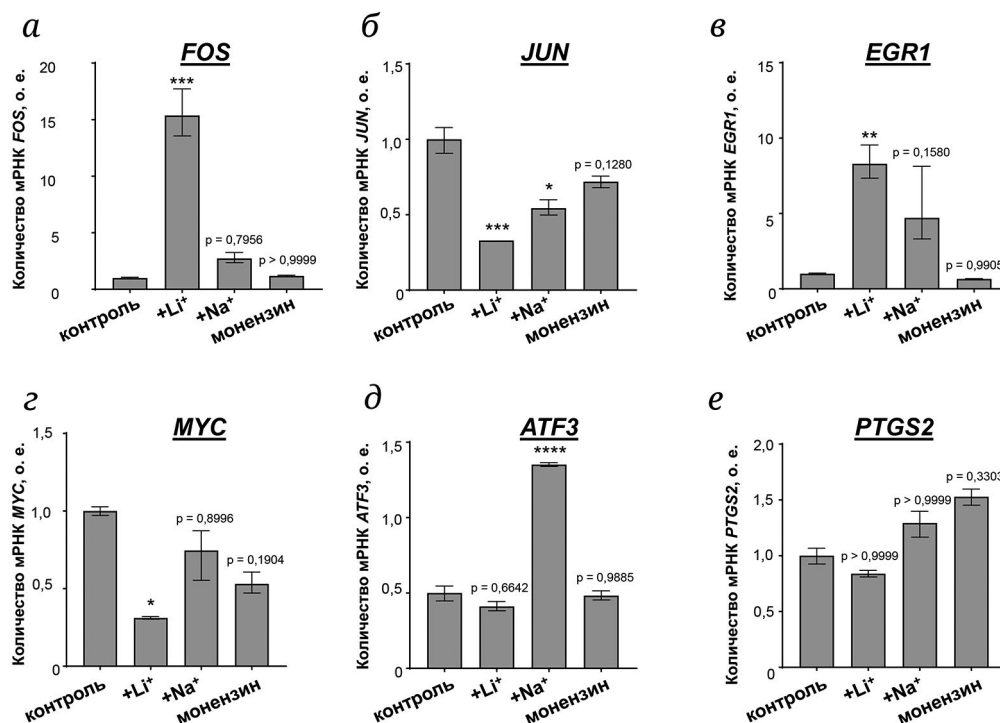


Рис. 3. Влияние 40 мМ LiCl, 40 мМ NaCl и 1,2 мкг/мл монензина, добавленных в культуральную среду, на содержание мРНК генов *FOS* (а), *JUN* (б), *EGR1* (в), *MYC* (г), *ATF3* (д), *PTGS2* (е) в HUVEC. Клетки инкубировали в экспериментальных условиях в течение 1,5 ч. Значения представлены как среднее \pm SE ($n = 5$). Значимые различия рассчитывали с помощью одностороннего ANOVA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

на транскрипцию других исследуемых генов. Это согласуется с полученными нами ранее данными о том, что увеличение концентрации внеклеточного Na⁺ усиливает экспрессию *ATF3* как на уровне мРНК, так и на уровне белка в HUVEC [23]. Увеличение внутриклеточного содержания Na⁺ при инкубации клеток в присутствии монензина не оказало существенного влияния на экспрессию исследуемых генов (рис. 3). Этот результат оказался неожиданным, поскольку ранее было показано увеличение экспрессии *FOS* на уровне белка в клетках HeLa, обработанных 1 мкг/мл монензина в течение 6 ч, что сопровождалось внутриклеточным дисбалансом одновалентных катионов [17]. С другой стороны, подобный эффект не был обнаружен в аналогичных экспериментах с использованием гладкомышечных клеток из аорты крысы [24]. Однако здесь необходимо учитывать различия в паттернах экспрессии генов, инициируемых диссипацией градиента одновалентных катионов в клетках грызунов и негрызунов [25]. Несмотря на то что в клетках, обработанных монензином, содержание Na⁺ было в 4 раза выше по сравнению с контрольными образцами, мы не обнаружили изменений в экспрессии Na⁺/K⁺-чувствительных генов. Если принять во внимание гипотезу о том, что G-квадруплексы участвуют в регуляции экспрессии таких генов, то отсутствие эффекта монензина на этот параметр можно объ-

яснить стабилизирующим действием ионов K⁺, содержание которых в присутствии монензина существенно не менялось (рис. 1, б).

Влияние ионов Li⁺ на экспрессию генов было описано достаточно давно [26], однако точные механизмы этого явления до сих пор мало изучены. В этой связи рассматриваются различные сигнальные пути в клетке, включая cAMP- [27], Wnt/ β -катенин- [28], PI3K/Akt-зависимый сигнальные пути [29]. Мы, в свою очередь, предлагаем рассмотреть эту проблему в контексте прямого воздействия одновалентных катионов на G-квадруплексы. Способность ионов Li⁺ увеличивать экспрессию генов посредством дестабилизации G-квадруплексов подтверждается тем, что его положительное влияние на транскрипцию *KIT* аналогично действию синтетических олигонуклеотидов, препятствующих сборке G-квадруплексов [30]. Часто предполагается, что дестабилизация G-квадруплексов должна приводить к увеличению экспрессии генов. Однако следует иметь в виду, что сами G-квадруплексы, помимо создания стерических препятствий для РНК-полимеразы, могут служить участками для взаимодействия с белками, регулирующими транскрипцию генов. В частности, показано, что мутации G-квадруплекса в промоторе *MYC*, нарушающие его формирование, приводят к уменьшению экспрессии *MYC* как на уровне транскрипции, так и на

уровне трансляции. Изменённые последовательности, не образующие G-квадруплексы, значительно слабее взаимодействовали с РНК-полимеразой и транскрипционными факторами. Кроме того, эти мутации приводили к освобождению участка для посадки нуклеосомы, затрудняющей ход транскрипции [31]. Таким образом, дестабилизация и/или изменение типа этих структур может повлиять на взаимодействие ДНК с белками или другими удалёнными регуляторными элементами генома [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что ионы Li⁺ и Na⁺ изменяют экспрессию факторов транскрипции *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC* и *ATF3*, причём влияние этих ионов различно. Это явление может быть связано с G-квадруплексами, расположенными в промоторах исследуемых генов. Возможно, изменения конформации G-квадруплексов, опосредованные одновалентными катионами, приводят к последующим изменениям транскрипции этих генов. Различия во влиянии ионов Na⁺ и Li⁺ на профиль экспрессии исследуемых генов, вероятно, связаны

с различной чувствительностью разных G-квадруплексов к этим катионам. Однако эта гипотеза требует дальнейшей экспериментальной проверки. Кроме того, необходимо выяснить, каким должно быть минимальное значение внутриклеточного соотношения Na⁺/K⁺, так называемый «натрий-калиевый переключатель» [33], обеспечивающее Na⁺/K⁺-чувствительные изменения экспрессии генов.

Вклад авторов. Е.А. Климанова – концепция и руководство работой; О.Е. Квитко, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко – проведение экспериментов; О.Е. Квитко, Д.А. Федоров, Е.А. Климанова – обсуждение результатов исследования; О.Е. Квитко, Д.А. Федоров – написание текста; О.Д. Лопина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skou, J. C., and Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 249-261, <https://doi.org/10.1007/BF00768846>.
2. Pollack, L. R., Tate, E. H., and Cook, J. S. (1981) Turnover and regulation of Na-K-ATPase in HeLa cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **241**, C173-C183, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1981.241.5.C173>.
3. Koltsova, S. V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O. A., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2012) Ubiquitous Na⁺/K⁺-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺-independent excitation-transcription coupling, *PLoS One*, **7**, e38032, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038032>.
4. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Smolyaninova, L. V., Kapilevich, L. V., Gusakova, S. V., Lopina, O. D., and Orlov, S. N. (2019) Ubiquitous and cell type-specific transcriptomic changes triggered by dissipation of monovalent cation gradients in rodent cells: physiological and pathophysiological implications, *Curr. Top. Membr.*, **83**, 107-149, <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.01.006>.
5. Beniaminov, A., Shchyolkina, A., and Kaluzhny, D. (2019) Conformational features of intramolecular G4-DNA constrained by single-nucleotide loops, *Biochimie*, **160**, 122-128, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.02.013>.
6. Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., and Neidle, S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402-5415, <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>.
7. Papp, C., Mukundan, V. T., Jenjaroenpun, P., Winnerdy, F. R., Ow, G. S., Phan, A. T., and Kuznetsov, V. A. (2023) Stable bulged G-quadruplexes in the human genome: identification, experimental validation and functionalization, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 4148-4177, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad252>.
8. Venczel, E. A., and Sen, D. (1993) Parallel and antiparallel G-DNA structures from a complex telomeric sequence, *Biochemistry*, **32**, 6220-6228, <https://doi.org/10.1021/bi00075a015>.
9. Yang, D., and Hurley, L. H. (2006) Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 951-968, <https://doi.org/10.1080/15257770600809913>.
10. Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Abramicheva, P. A., Tverskoi, A. M., Orlov, S. N., and Lopina, O. D. (2020) Transcriptomic changes in endothelial cells triggered by Na,K-ATPase inhibition: a search for upstream Na⁺/K⁺ sensitive genes, *IJMS*, **21**, 7992, <https://doi.org/10.3390/ijms21217992>.
11. Volkman, C., Bschor, T., and Köhler, S. (2020) Lithium treatment over the lifespan in bipolar disorders, *Front. Psychiatry*, **11**, 377, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00377>.

12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
13. Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Parshina, E. Y., Tverskoi, A. M., Abramicheva, P. A., Maksimov, G. V., Orlov, S. N., Lopina, O. D., and Klimanova, E. A. (2021) Na⁺/K⁺ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl, *Heliyon*, **7**, e08088, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08088>.
14. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method, *Methods*, **25**, 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
15. Chew, T. A., Zhang, J., and Feng, L. (2021) High-resolution views and transport mechanisms of the NKCC1 and KCC transporters, *J. Mol. Biol.*, **433**, 167056, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167056>.
16. Lang, F. (2007) Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. College Nutr.*, **26**, 613S-623S, <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719667>.
17. Haloui, M., Taurin, S., Akimova, O. A., Guo, D.-F., Tremblay, J., Dulin, N. O., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2007) Na⁺-induced c-Fos expression is not mediated by activation of the 5'-promoter containing known transcriptional elements, *FEBS J.*, **274**, 3557-3567, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05885.x>.
18. Li, L., Song, H., Zhong, L., Yang, R., Yang, X.-Q., Jiang, K.-L., and Liu, B.-Z. (2015) Lithium chloride promotes apoptosis in human leukemia NB4 cells by inhibiting glycogen synthase kinase-3 beta, *Int. J. Med. Sci.*, **12**, 805-810, <https://doi.org/10.7150/ijms.12429>.
19. Watanabe, S., Iga, J., Nishi, A., Numata, S., Kinoshita, M., Kikuchi, K., Nakataki, M., and Ohmori, T. (2014) Microarray analysis of global gene expression in leukocytes following lithium treatment, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **29**, 190-198, <https://doi.org/10.1002/hup.2381>.
20. Kim, S. H., Yu, H. S., Park, H. G., Ahn, Y. M., Kim, Y. S., Lee, Y. H., Ha, K., and Shin, S. Y. (2013) Egr1 regulates lithium-induced transcription of the *Period 2 (PER2)* gene, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 1969-1979, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.06.010>.
21. Haarman, B. (Benno) C., Riemersma-Van der Lek, R. F., Burger, H., Netkova, M., Drexhage, R. C., Bootsman, F., Mesman, E., Hillegers, M. H., Spijker, A. T., Hoencamp, E., Drexhage, H. A., and Nolen, W. A. (2014) Relationship between clinical features and inflammation-related monocyte gene expression in bipolar disorder – towards a better understanding of psychoimmunological interactions, *Bipolar Disord.*, **16**, 137-150, <https://doi.org/10.1111/bdi.12142>.
22. Zhang, W. V., Jüllig, M., Connolly, A. R., and Stott, N. S. (2005) Early gene response in lithium chloride induced apoptosis, *Apoptosis*, **10**, 75-90, <https://doi.org/10.1007/s10495-005-6063-x>.
23. Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Bukach, O. V., Gorbunov, A. M., Lopina, O. D., and Klimanova, E. A. (2022) Increased extracellular sodium concentration as a factor regulating gene expression in endothelium, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 489-499, <https://doi.org/10.1134/S0006297922060013>.
24. Taurin, S., Dulin, N. O., Pchejetski, D., Grygorczyk, R., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2002) c-Fos Expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium-mediated, calcium-independent mechanism, *J. Physiol.*, **543**, 835-847, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.023259>.
25. Lopina, O. D., Tverskoi, A. M., Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., and Orlov, S. N. (2020) Ouabain-induced cell death and survival. Role of α1-Na,K-ATPase-mediated signaling and Na⁺/K⁺-dependent gene expression, *Front. Physiol.*, **11**, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01060>.
26. Villegas-Vázquez, E. Y., Quintas-Granados, L. I., Cortés, H., González-Del Carmen, M., Leyva-Gómez, G., Rodríguez-Morales, M., Bustamante-Montes, L. P., Silva-Adaya, D., Pérez-Plasencia, C., Jacobo-Herrera, N., Reyes-Hernández, O. D., and Figueroa-González, G. (2023) Lithium: a promising anticancer agent, *Life*, **13**, 537, <https://doi.org/10.3390/life13020537>.
27. Masana, M. I., Bitran, J. A., Hsiao, J. K., and Potter, W. Z. (1992) *In vivo* evidence that lithium inactivates G_i modulation of adenylate cyclase in brain, *J. Neurochem.*, **59**, 200-205, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08891.x>.
28. Rao, A. S., Kremenevskaja, N., Resch, J., and Brabant, G. (2005) Lithium stimulates proliferation in cultured thymocytes by activating Wnt/β-catenin signalling, *Eur. J. Endocrinol.*, **153**, 929-938, <https://doi.org/10.1530/eje.1.02038>.
29. Zeng, Z., Wang, H., Shang, F., Zhou, L., Little, P. J., Quirion, R., and Zheng, W. (2016) Lithium ions attenuate serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells through regulation of the Akt/FoxO1 signaling pathways, *Psychopharmacology*, **233**, 785-794, <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4168-7>.
30. Chowdhury, S., Wang, J., Nuccio, S. P., Mao, H., and Di Antonio, M. (2022) Short LNA-modified oligonucleotide probes as efficient disruptors of DNA G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 7247-7259, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac569>.
31. Esain-Garcia, I., Kirchner, A., Melidis, L., Tavares, R. C. A., Dhir, S., Simeone, A., Yu, Z., Madden, S. K., Hermann, R., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2024) G-quadruplex DNA structure is a positive regulator of *MYC* transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **121**, e2320240121, <https://doi.org/10.1073/pnas.2320240121>.

32. Lopina, O. D., Sidorenko, S. V., Fedorov, D. A., and Klimanova, E. A. (2024) G-quadruplexes as sensors of intracellular Na⁺/K⁺ ratio: potential role in regulation of transcription and translation, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, S262-S277, <https://doi.org/10.1134/S0006297924140153>.
33. Sen, D., and Gilbert, W. (1990) A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA, *Nature*, **344**, 410-414, <https://doi.org/10.1038/344410a0>.

Li⁺ IONS ACCUMULATION TRIGGERS *FOS*, *JUN*, *EGR1*, *MYC* TRANSCRIPTION ALTERATION IN LiCl-TREATED HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS (HUVEC)

O. E. Kvitko[#], D. A. Fedorov[#], S. V. Sidorenko, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova*

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biochemistry,
119234 Moscow, Russia; e-mail: klimanova.ea@yandex.ru*

Changes in the intracellular concentrations of Na⁺ and K⁺ are shown to alter gene expression. Another monovalent cation, Li⁺, is well known as medicine for the treatment of psychiatric disorders but mechanism of its action is obscure. Thus, it is important to evaluate an effect of Li⁺ on gene expression in endothelial cells. Here we studied the influence of increased intracellular Na⁺ or Li⁺ concentrations on the transcription of Na⁺/K⁺-sensitive genes. A treatment of human endothelial cells (HUVEC) with LiCl for 1.5 h caused an accumulation of Li⁺ in the cells. This was followed by an increase in *FOS* and *EGR1* mRNA and a decrease in *JUN* and *MYC* mRNA levels. Treatment of HUVEC with monensin led to an accumulation of Na⁺ and a loss of K⁺ ions. However, Na⁺-ionophore monensin had no significant effect on gene expression. Incubation of HUVEC with elevated extracellular NaCl concentration increased intracellular K⁺ concentration and *ATF3* transcription and decreased *JUN* transcription. These results indicate that Na⁺ and Li⁺ ions have different effects on the cellular gene expression profile that apparently due to various actions on the intracellular monovalent cations ratio.

Keywords: lithium, sodium, Na⁺/K⁺-sensitive genes, monensin, endothelial cells