

บทคัดย่อ

การเกิดการตายแบบอะพ็อพโทสิส (apoptosis) มีความสำคัญต่อหน้าที่ของเซลล์ทั้งในสภาวะปกติและภาวะที่เป็นโรคต่างๆ อาทิ มะเร็ง เบาหวาน และโรคที่มีภาวะการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) และ p53 มีบทบาทสำคัญในการเกิดการตายแบบอะพ็อพโทสิสที่เกี่ยวข้องกับไมโทคอนเดรีย มีรายงานว่า p53 จำเป็นสำหรับการเกิดการตายแบบอะพ็อพโทสิสในเมื่อมี overexpression ของ GSK3 ผลของโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า GSK3 มีส่วนเสริมการเพิ่มขึ้นของ p53 และการตายแบบอะพ็อพโทสิสที่กระตุ้นโดย DNA damage อีกทั้งยังส่งเสริมการเคลื่อนย้ายของ p53 ไปสู่มิโทคอนเดรียและส่งเสริมให้ cytochrome C หลุดออกจากไมโทคอนเดรียมาสู่ cytosol ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการตายแบบอะพ็อพโทสิสที่ผ่านทางไมโทคอนเดรีย อย่างไรก็ตามการส่งเสริมการเคลื่อนย้ายของ p53 ไปสู่มิโทคอนเดรียโดย GSK3 นั้นเกิดกับ wild-type p53 เท่านั้นไม่เกิดกับ mutant p53 การจับกันของ p53 กับ Bcl2 ที่ไมโทคอนเดรียและทำให้เกิด Bax oligomerization ที่กระตุ้นโดย DNA damage นั้นพบว่าลดลงเมื่อการทำงานของ GSK3 ถูกยับยั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า overexpression ของ GSK3 ทั้งแบบ wild-type, constitutively active และ kinase dead กระตุ้นการเพิ่มปริมาณของ p53 ในสภาวะ unstressed โดยผ่านทาง การเพิ่ม p53 stability siRNA GSK3 ทำให้ p53 ในเซลล์ลดลง แสดงว่า GSK3 มีส่วนในทำให้ปริมาณของ p53 ในภาวะปกติคงตัว เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าการยับยั้งการทำงานของ GSK3 สามารถป้องกันการตายแบบอะพ็อพโทสิสได้ซึ่งสาเหตุอันหนึ่งอาจมาจากการที่ GSK3 สามารถยับยั้ง transcription ของ VEGF ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาความเชื่อมโยงของการป้องกันการตายแบบอะพ็อพโทสิสโดยการยับยั้งการทำงานของ GSK3 และ VEGF expression ผลการศึกษาพบว่า การยับยั้ง VEGF โดยใช้ SU4312 ไม่สามารถระงับผลของการยับยั้ง GSK3 ที่ทำให้เกิดการลดลงของการตายแบบอะพ็อพโทสิสได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าผลการป้องกันการตายแบบอะพ็อพโทสิสที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของ GSK3 นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง transcription ของ VEGF โดย GSK3

โดยสรุปจากโครงการวิจัยพบว่า 1) GSK3 มีส่วนเสริมให้เกิดการเคลื่อนย้ายของ p53 ไปสู่มิโทคอนเดรีย ที่ซึ่ง p53 จับกับ Bcl2 และทำให้เกิด Bax oligomerization และ cytochrome C release นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ caspase และเกิดการตายแบบอะพ็อพโทสิสที่ผ่านทางไมโทคอนเดรีย 2) การเพิ่มปริมาณของ GSK3 ทำให้ปริมาณของ p53 เพิ่มขึ้นในสภาวะ unstressed โดยผ่านทาง การเพิ่ม p53 stability การนี้ ไม่ขึ้นกับ kinase activity ของ GSK3 3) การป้องกันการตายแบบอะพ็อพโทสิสที่เกิดจากการยับยั้งการทำงานของ GSK3 นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการที่ GSK3 สามารถการยับยั้ง transcription ของ VEGF

Abstract

Apoptosis is very important in normal cellular functions and pathology of many diseases including cancer, diabetes and neurodegeneration. Most of cell death in vertebrates occurs through mitochondria signaling pathway of apoptosis. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) and p53 play crucial roles in the mitochondrial apoptotic pathway, and ectopic expression of GSK3 has been shown to induce apoptosis through p53 dependent manner. The present study demonstrated that GSK3 promoted DNA damage-induced p53 accumulation and apoptosis as pharmacological inhibitor of GSK3 attenuated p53 accumulation and apoptosis induced by DNA damage. Furthermore, DNA damage induced translocation of p53 to the mitochondria and the release of cytochrome c from mitochondria, and both of these apoptotic responses were attenuated by inhibition of GSK3 suggesting that GSK3 promotional action on DNA damage-induced p53 mitochondrial translocation and mitochondrial apoptosis pathway. However, regulation of p53 mitochondrial translocation by GSK3 was only evident with wild-type, not mutated, p53. Additionally, inhibition of GSK3 reduced etoposide-induced association of p53 with Bcl2 and Bax oligomerization. As our finding indicates that GSK promotes p53 accumulation upon DNA damage stress, we examined whether GSK3 influenced p53 in unstressed condition. Overexpression of wild-type, constitutively active S9A, and kinase dead (KD) GSK3 β caused increase in level of basal p53 without affecting p53 phosphorylation at GSK3 site, serine-33. These indicate that GSK3 is capable inducing p53 independent of its kinase activity. GSK3 β induced increase in basal p53 by increase p53 stability as co-expression of GSK3 β S9A and p53 caused delay in degradation of p53 when protein synthesis was inhibited by cyclohexamide. GSK3 knock down by siRNA caused reduction of basal p53 confirming that GSK3 contributed to maintaining of p53 level at basal condition. The apoptotic protective of GSK3 inhibition is well documented, and a possible link to this action is that GSK3 suppresses transcription of VEGF gene. Therefore, we investigated whether antiapoptotic action of GSK3 inhibition was involved increase prosurvival signal by VEGF induction. The results showed that inhibition of GSK3 increased VEGF expression however VEGF may not play a role in protective action of GSK3 inhibition as inhibition of VEGF signaling by inhibiting VEGF receptor 2 kinase using its inhibitor, SU4312 could not reverse GSK3 inhibition protection against camptothecin-induced apoptosis.

Collectively, the present study reveals that 1) GSK3 promotes the mitochondrial translocation of wild-type but not mutated p53, where p53 interacts with Bcl2 to allow Bax oligomerization and the subsequent release of cytochrome C that leads to caspase activation in the mitochondrial pathway of intrinsic apoptotic signaling, 2) increase in GSK3 level augments p53 in basal condition through mechanism involves increase its stability, 3) the antiapoptotic action of GSK3 inhibition may not involve its ability to suppress VEGF expression.