

УЧАСТЬ ФОСФОИНОЗИТИДІВ, ПРОТЕЇНКІНАЗ С ТА А У ПЕРЕДАЧІ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛУ K^+ В АДРЕНОКОРТИКАЛЬНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ

В. М. ПУШКАРЬОВ, О. І. КОВЗУН, М. Д. ТРОНЬКО, Н. М. КОСТЮЧЕНКО, О. С. МИКОША

*Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ;
e-mail: endo@i.kiev.ua*

Изучали мессенджерные механизмы, опосредующие проведение регуляторных сигналов K^+ в адренортикоцитах человека. Показано, что повышение концентрации ионов калия инициирует распад полифосфоинозитидов с образованием инозитолфосфатов и, очевидно, диацилглицерола. Последние соединения являются активаторами протеинкиназы С при воздействии различных агонистов. Методом иммуноблоттинга была показана транслокация α -формы этой киназы из цитозоля в микросомы после прединкубации ткани надпочечников в среде с повышенным содержанием калия (8,5 мМ), что свидетельствует о ее активации. Активность протеинкиназы С возрастает в микросомной фракции и не изменяется в цитозоле. Повышение концентрации K^+ в среде также активирует протеинкиназу А, хотя, вероятно, в меньшей степени по сравнению с протеинкиназой С. В отличие от последней, активность протеинкиназы А изменяется и в цитозоле.

Обсуждается возможность участия нескольких мессенджерных систем в проведении регуляторного сигнала K^+ в адренортикоцитах, а также гипотеза о взаимодействии мессенджерных механизмов для основных агонистов, регулирующих биосинтез альдостерона в надпочечных железах.

К л ю ч е в ы е с л о в а: адренортикоциты человека, K^+ , протеинкиназа С, протеинкиназа А, полифосфоинозитиды, инозитолфосфаты, болезнь Иценко-Кушинга.

Регуляція біосинтезу альдостерону здійснюється складною системою чинників, значну роль в якій відіграють іони калію. K^+ здатен активувати гормонопоез при підвищенні його вмісту у крові або інкубаційному середовищі, але крім того він є фактором, що модулює ефекти інших регуляторів, у першу чергу ангіотензину II та кортикотропіну [1–3]. Проте регуляція синтезу мінералокортикоїдів іонами калію досліджена значно гірше порівняно з іншими агоністами. Вважають, що основною ланкою в опосередкуванні ефектів калію у клітинах клубочкової зони надниркових залоз є система кальмодулін- Ca^{2+} /кальмодулінзалежна протеїнкіназа [4, 5]. Є, однак, дані, що свідчать про участь системи сАМР-залежної протеїнкінази А (ПКА) в реалізації цих ефектів [6, 7]. З іншого боку K^+ , так само як і ангіотензин, викликає прискорення транспортування кальцію у клітини та активацію протеїнкінази С (ПКС) [7, 8]. Аналіз даних літератури свідчить про недостатню вивченість внутрішньоклітинних механізмів передачі та посилення регуляторного сигналу K^+ , розуміння яких є необхідним для створення цілісної картини механізмів регуляції утворення мінералокортикоїдів. Вивчення тонких механізмів регуляції біосинтезу альдостерону крім теоретичного має і суто практичне значення, як фундамент для роз-

робки терапевтичних засобів при лікуванні гіпертензії та різноманітних захворювань надниркової залози.

Метою роботи було визначення участі ПКА, фосфоліпідів, що містять інозитол, та пов'язаної з ними активації ПКС в опосередкуванні регуляторних сигналів іонів K^+ в умовно нормальній тканині надниркових залоз у пацієнтів з хворобою Іценка-Кушинга.

Матеріали і методи

Досліджено постопераційні тканини надниркових залоз 7 хворих, прооперованих у клініці Інституту. Одержано 6 зразків гіперплазованої тканини (хвороба Іценка-Кушинга) та 1 зразок пухлини.

У дослідах використовували ділянки візуально нормальної тканини надниркових залоз людини (умовно нормальна тканина), з якої одержували дисперговані клітини за раніше описаною методикою [9].

Мічення, екстракція і хроматографічний аналіз фосфоліпідів, що містять інозитол, та їхніх похідних. До клітинної суспензії додавали [3H]-інозитол («Amersham Life Science», Велика Британія) в кількості 25 мкКі/мл та інкубували протягом ночі при кімнатній температурі. Вранці проби з клітинами переносили на водяну баню і про-

довжували інкубацію протягом 3 год при 37 °С. Клітини (біля 1 млн. на пробу) осаджували (1000 об/хв, 5 хв, центрифуга Т-23), відмивали від мітки, після чого суспендували в 0,25 мл середовища, що містить (мМ): NaCl – 130; MgSO₄ – 1,27; CaCl₂ – 2; Na₂HPO₄ – 10; KH₂PO₄ – 1 (всі солі осч «Merck», Німеччина); HEPES – 20 («Calbiochem», США); бичачий сироватковий альбумін («Seriva», Німеччина), рН 7,4. У деякі проби додавали LiCl до кінцевої концентрації 10 мМ і всі проби інкубували протягом 15 хв при 37 °С. Потім у проби вносили KCl до концентрації 3,5 або 8,5 мМ і продовжували інкубацію протягом 0–120 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,25 мл холодної 12%-ї трихлороцтової кислоти (ТХО) і залишали на 30 хв при 2 °С. Проби центрифугували (1500 об/хв, 10 хв), осад промивали 0,25 мл 5% ТХО і 0,25 мл води. Надосадову рідину з різних проб об'єднували і з неї видаляли ТХО трикратною екстракцією 3 мл насиченого водою ефіру.

До осаду додавали 2 мл суміші хлороформ/метанол/12 н. HCl (200 : 100 : 0,75) і екстрагували протягом 1 год при 4 °С. Потім у проби додавали 0,2 мл 1,2 н. HCl і суміш розшаровували центрифугуванням. Верхню фазу відсмоктували, нижню випарювали і осад розчиняли в 100 мкл суміші хлороформ/метанол/вода (75 : 25 : 2). Розділення фосфатидилінозиту (ФІ) і фосфоінозитидів (ФІФ та ФІФ₂) проводили методом тонкошарової хроматографії на силікагелі, імпрегнованому оксалатом калію в системах хлороформ : метанол : 4 н. аміак – 9 : 7 : 2 та хлороформ : ацетон : метанол : оцтова кислота : вода – 40 : 15 : 13 : 12 : 7.

Інозитолфосфати, які містяться в надосадовій рідині, розділяли на іонообмінній смолі DOWEX 1 × 8 («Bio-Rad», США). Смоли переводили в форміатну форму наступним чином. Для цього спочатку смолу промивали 2 н. HCl для звільнення її від решток речовин, які поглинають світло з довжиною хвилі 260 нм, а потім 3 н. форміатом амонію до зникнення хлоридів. Надлишок форміату видаляли, промиваючи смолу водою. Форміат амонію одержували титруванням 25% аміаку мурашиною кислотою до слабко лужної реакції. Одержаний розчин солі випаровували в вакуумному випарювачі до 50% об'єму, охолоджували, осаджували 2 об'ємами ацетону. Утворений осад переносили на фільтри і висушували.

Колонки об'ємом 1 мл промивали водою, потім 10 об'ємами 5 мМ міоінозиту і наносили на них дослідні проби. Елюцію інозитолфосфатів проводили в такій послідовності: 5 мМ міоінозитолом, 5 мМ розчином Na-тетраборату в 60 мМ Na-форміаті і, нарешті, сумішшю 0,1 М

мурашина кислота/форміат амонію у градієнті концентрацій останнього від 0,2 до 1 М. Збирали фракції об'ємом 2 мл.

Одержання субклітинних фракцій. Зрізи очищеної кори надниркових залоз вагою 200–300 мг промивали в 1 мл середовища 199 (Державний завод медичних препаратів, Україна) і вносили в 1 мл розчину, що містив (мМ): NaCl – 130; MgSO₄ – 1,27; CaCl₂ – 2; Na₂HPO₄ – 10 (всі солі фірми «Merck», Німеччина); HEPES – 20 (рН 7,4) («Calbiochem», США); 2 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну («Seriva», Німеччина). В частині проб концентрацію KCl доводили до 3,5 і 8,5 мМ та інкубували їх протягом 1 год при 37 °С і постійному струшуванні. Інкубацію припиняли переміщенням проби на лід. Зрізи гомогенізували в гомогенізаторі з тefлоновим товчачиком у 2–3 об'ємах охолодженого буфера, який містив 0,25 М сахарози; 25 мМ трис-HCl (рН 7,4); 3 мМ MgCl₂; 2 мМ ЕГТА; 0,1 мМ спермідину; 0,1% тритону X-100 та 0,1 мМ фенилметилсульфонілфториду. Гомогенат центрифугували при 10 000 г протягом 10 хв для осадження ядер, дебрису та мітохондрій. Постмітохондріальний супернатант нашаровували на 0,8 мл 0,5 М сахарози і центрифугували при 105 000 г протягом 60 хв для отримання цитозольної фракції та осаду мікросом.

Осади мікросом суспендували в невеликій кількості середовища з 100 мМ трис-HCl і 0,25 М сахарози (рН 7,4) та розтирали у скляному гомогенізаторі. Фракції зберігали при -60 °С.

Імуноблотинг. Для імунодетекції α-ізоформи протеїнкінази С (ПКСа) методом вестерн-блотингу використовували моноклональні антитіла («Sigma», США). Вторинні антитіла, мічені пероксидазою, та реагенти для їхньої хемілюмінесцентної візуалізації використовували із набору ECL («Amersham Life Science», Велика Британія). Білки мікросомальної та цитозольної фракцій розділяли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі [10], переносили напівсухим способом на нітроцелюлозні мембрани, які обробляли антитілами до ПКСа. Одержані комплекси виявляли за допомогою набору ECL. Після денситометричного визначення інтенсивності засвічення плівки Hyperfilm ECL результати обробляли у програмі «Scion Image».

Визначення активності ПКС та ПКА. Використано метод, що базується на визначенні кількості нейрограніну – високоспецифічного лужного пептидного субстрату ПКС, який внаслідок фосфорилування ПКС змінює заряд та рухається в агарозному гелі до аноду [11], в той час як нефосфорильований нейрогранін, як негативний контроль, мігрує до катоду. Активність

ПКА визначали за зміни напряму руху в агарозному гелі субстрату кемпиду внаслідок фосфорування ПКА [12].

Інкубаційне середовище для визначення активності ПКС містило 20 мМ трис-НСІ (рН 8,0); 0,5 мМ СаСІ₂; 1 мМ АТР; 6 мМ Mg-ацетату; 20 мкг/мл фосфатидилсерину; 10 мкг нейрограніну та 10 мкг білка досліджуваних субклітинних фракцій у 10 мкл реакційної суміші.

Інкубаційне середовище для визначення активності ПКА містило 20 мМ трис-НСІ (рН 8,0); 10 мМ MgСІ₂; 1 мМ АТР; 1 мМ сАМР; 10 мкг кемпиду та 10 мкг білка субклітинних фракцій у 10 мкл реакційної суміші.

Інкубацію проводили протягом 30 хв при 37 °С. Зупиняли реакцію кип'ятінням на водяній бані протягом 5 хв 10 мкл реакційної суміші, до якої додавали 2 мкл 80% гліцеролу і наносили її на 1,6% агарозний гель, приготований на 50 мМ трис-НСІ-буфері (рН 8,0). Використовували агарозу марки Туре-IV: Special High ЕЕО («Sigma», США). Електрофоретичний розподіл фосфорильованого та нефосфорильованого субстратів ПКС та ПКА проводили при 14 мА протягом 20 хв. Пластику агарозного гелю фіксували у 5%-й оцтової кислоті та виявляли білки фарбуванням 0,04% розчином кумасі R 250 у 3,5%-й хлорній кислоті. Ділянки агарозного гелю з фосфорильованим нейрограніном, кемпидом та негативним контролем вирізали, елюювали їх 5%-ю оцтовою кислотою кип'ятінням на водяній бані та реєстрували екстинкцію при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометрі СФ-46.

Активність протеїнкінази С виражали у нмольх нейрограніну, фосфорильованого протеїнкіназою С за 1 хв на 1 мкг білка; протеїнкінази А — у нмольх кемпиду, фосфорильованого протеїнкіназою А за 1 хв на 1 мкг білка.

Статистична обробка. Статистичний аналіз одержаних даних проводили за Стьюдентом та згідно з непараметричним критерієм U Вілкоксона-Манна-Утні.

Результати та обговорення

Вплив іонів калію на метаболізм фосфоліпідів, що містять інозитол. Процес активації типових Са²⁺-залежних форм протеїнкінази С ліпідними месенджерами є досить добре вивченим [13, 14]. Фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (ФІФ₂), який міститься у складі внутрішнього (цитоплазматичного) шару клітинної мембрани, за дії фосфоліпази С гідролізується до діацилгліцеролу (ДАГ) та інозитол-1,4,5-трифосфату (ІФ₃), який викликає вивільнення іонів Са²⁺ із внутрішньоклітинних депо. Вважають, що зв'язування Са²⁺ з ПКС підвищує її спорідненість до фосфатидилсери-

ну — звичайного компонента внутрішньоклітинних ліпідних бішарових мембран, що призводить до зв'язування ферменту з внутрішньоклітинними мембранними структурами. Подальше зв'язування з ДАГ викликає конформаційну зміну каталітичного центру, так що фермент стає активним.

Таким чином, гідроліз поліфосфоінозитидів з утворенням ДАГ та ІФ₃ є необхідною передумовою активації типових ізоформ ПКС.

На рис. 1, А представлено результати вивчення впливу різних концентрацій іонів калію на вміст мічених [³H]-інозитол поліфосфоінозитидів у клітинах надниркових залоз людини.

Привертає увагу значне збільшення з часом вмісту фосфатидилінозиту у клітинах, що інкубували в середовищі, яке містило 3,5 мМ К⁺ (рис. 1, А, крива 1). В результаті підвищення концентрації іонів калію в інкубаційному середовищі вже в перші 2–5 хв спостерігається підвищення вмісту ФІ, ФІФ та ФІФ₂, яке в подальшому змінюється на падіння їхнього рівня.

Підвищення вмісту фосфатидилінозиту та поліфосфоінозитидів під впливом калію відмічено і у клітинах клубочкової зони надниркових залоз щурів [15].

Результати цього експерименту не є досить інформативними щодо впливу калію на метаболізм фосфоліпідів, оскільки у клітині відбувається їхнє швидке відтворення. Тому ми провели передінкубацію клітин за присутності іонів літію, який, згідно загальноприйнятим уявленням, пригнічує фосфатазу інозитолфосфату і таким чином гальмує процес ресинтезу поліфосфоінозитидів. Таке гальмування відновлення фосфоліпідів створює цілком іншу картину змін вмісту радіоактивних поліфосфоінозитидів (рис. 1, Б, криві 1–3). Кількість мічених фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату, фосфатидилінозитол-4-фосфату та фосфатидилінозитолу при підвищеній концентрації іонів калію (8,5 мМ) помітно зменшується вже на першій хвилині інкубації. Швидке зниження триває до 5 хв і стабілізується десь біля 20 хв. При концентрації калію 3,5 мМ за присутності літію рівень ФІ та поліфосфоінозитидів у межах 20 хв інкубації майже не змінюється (рис. 1, Б, криві 1–3).

Розділення на колонці з аніонообмінником інозитолфосфатів, що присутні в водній фазі, показало, що через 20 хв інкубації клітин при підвищеній концентрації іонів калію (8,5 мМ) в середовищі відбувається накопичення інозитолмоно-, ди- і трифосфатів (рис. 2, А). За присутності іонів літію картина змінюється, а саме зростає кількість інозитол-1,4,5-трифосфату (рис. 2, Б).

Подібні дані було одержано і для надниркових залоз морських свинок (не наведено).

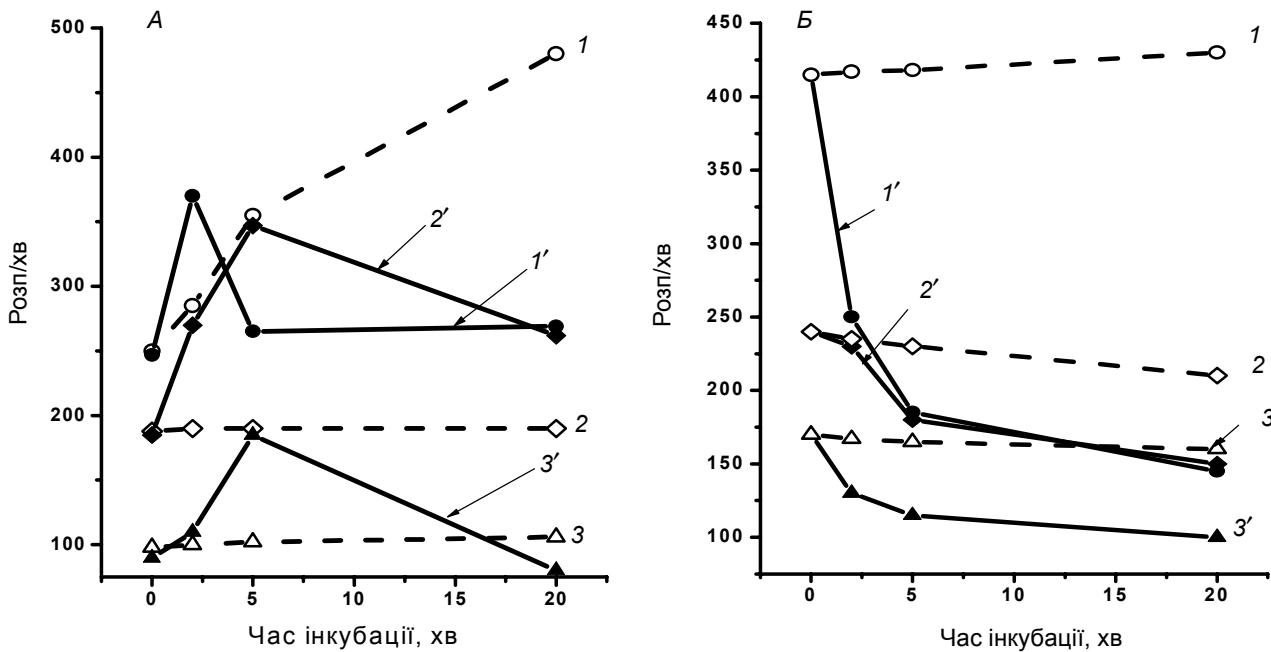


Рис. 1. Вплив підвищення концентрації K^+ в інкубаційному середовищі на рівень мічених по інозитолу фосфоінозитидів у тканині надниркових залоз людини: А – інкубація без літію, Б – після передінкубації з 10 mM Li^+ ; 1 – ΦI , 2 – $\Phi I\Phi$, 3 – $\Phi I\Phi_2$ ($3,5 \text{ mM K}^+$), 1' – ΦI , 2' – $\Phi I\Phi$, 3' – $\Phi I\Phi_2$ ($8,5 \text{ mM K}^+$). Наведено результат одного досліду із трьох.

Оскільки зменшення рівня мічених поліфосфоінозитидів з одночасним збільшенням кількості інозитолфосфатів можна розглядати як свідчення утворення $DAГ$, логічно припустити, що механізм активації протеїнкінази C іонами калію у клітинах надниркових залоз людини, а можливо і в надниркових залозах морських свинок [7], подібний до механізму стимуляції ферменту ангіотензином II [16].

Вплив K^+ на вміст ПКС α та активність ПКС у цитозолі та мікросомах кори надниркових залоз. Зміни рівня інозитолфосфатів та фосфоінозитидів у разі інкубації зрізів у середовищі з різним вмістом іонів K^+ вказують на можливу участь ПКС у опосередкуванні регуляторних сигналів іона в адренкортикоцитах людини. Ми вивчали активність ПКС та розподілення ізоформи ПКС α у субклітинних фракціях з умовно нормальної тканини надниркових залоз людини після інкубації зрізів у середовищі з різним вмістом K^+ за допомогою метода імуоблотингу. Встановлено, що кількість ферменту значно зростає в мікросомах і знижується в цитозолі по мірі підвищення концентрації K^+ (рис. 3). Таке накопичення ПКС α в мембранній фракції (її транслокація) свідчить про активацію ферменту.

Щоб переконатися в цьому, визначали активність ПКС. Як можна бачити з рис. 4, А, максимальна активність ферменту також спосте-

рігається при максимальній дослідженій концентрації калію $8,5 \text{ mM}$. Слід відзначити, що після інкубації зрізів у середовищі без калію, активність ПКС децю знижується порівняно з кіназною активністю за фізіологічної ($3,5 \text{ mM}$) концентрації K^+ . Можливо цей факт якимось пов'язаний з гальмуванням синтезу альдостерону при низьких концентраціях калію [17]. Активність ПКС у цитозолі практично не змінюється.

Активність ПКА у цитозолі та мікросомах кори надниркових залоз. У попередніх роботах нами було продемонстровано зростання кількості $sAMP$ у клітинах кори надниркових залоз морських свинок за умови стимуляції тканини калієм [7]. Крім того, за присутності пептидного інгібітора ПКА (2 мкг/мл) фосфорилювання білків при $5,5 \text{ mM K}^+$ у надниркових залозах морських свинок вірогідно зменшується (дані не наведено). Це свідчить про можливу участь ПКА в посиленні регуляторного сигналу K^+ в адренкортикоцитах морських свинок, як це спостерігається за дії АКТГ.

Визначення активності ПКА в мікросомній фракції показало, що калій активує цю кіназу (рис. 4, Б), хоча амплітуда активації виявилась значно нижчою порівняно з ПКС (рис. 4, А). Як і у випадку з ПКС, при концентрації калію в середовищі, нижчій від фізіологічної ($3,5 \text{ mM}$), активність ПКА знижується. Цікаво, що ак-

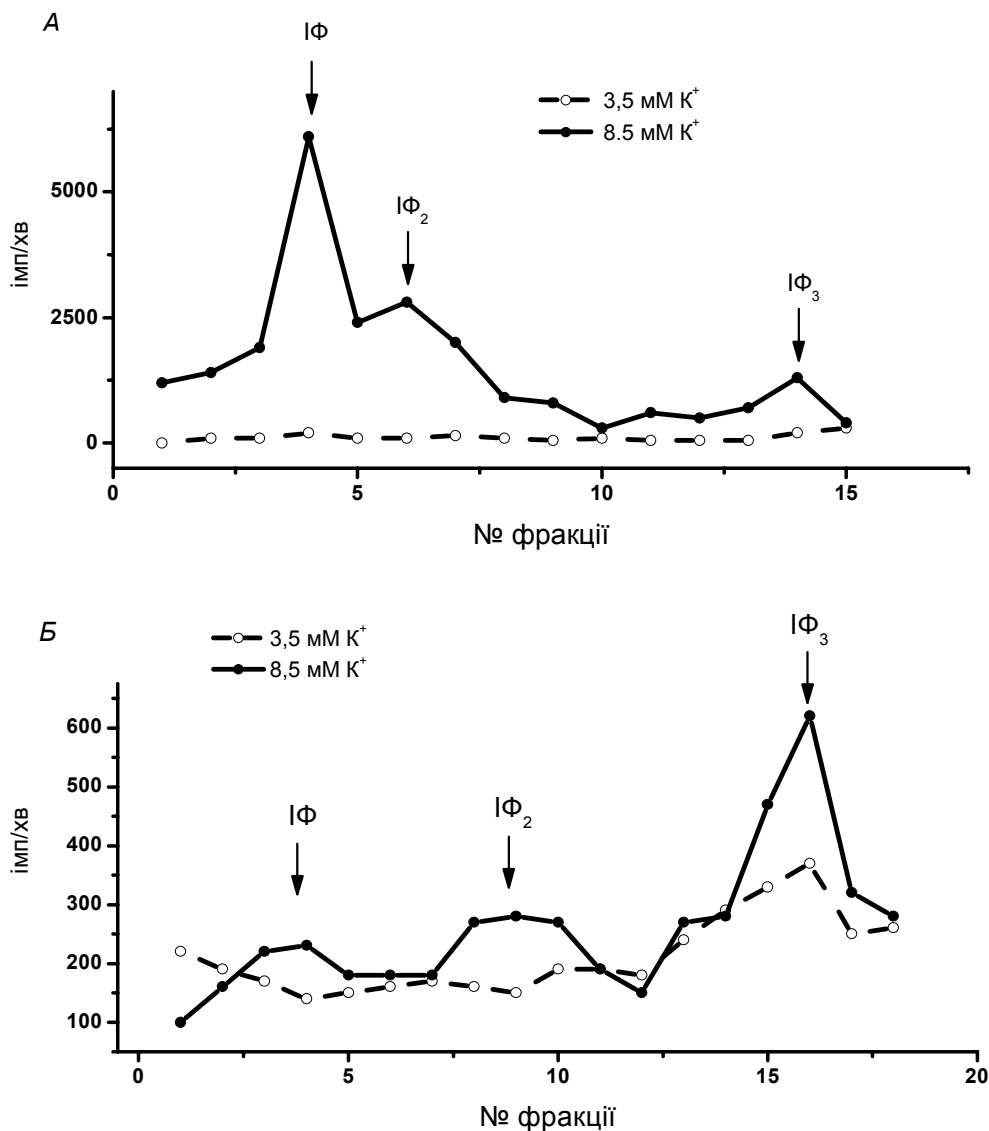


Рис. 2. Вплив підвищення концентрації K^+ в інкубаційному середовищі на рівень інозитолфосфатів у тканині надниркових залоз людини: А – інкубація без літію, Б – після передінкубації з 10 мМ Li^+ ; $I\Phi$ – інозитолфосфат, $I\Phi_2$ – інозитолдифосфат, $I\Phi_3$ – інозитолтрифосфат. Наведено результат однієї хроматограми з двох.

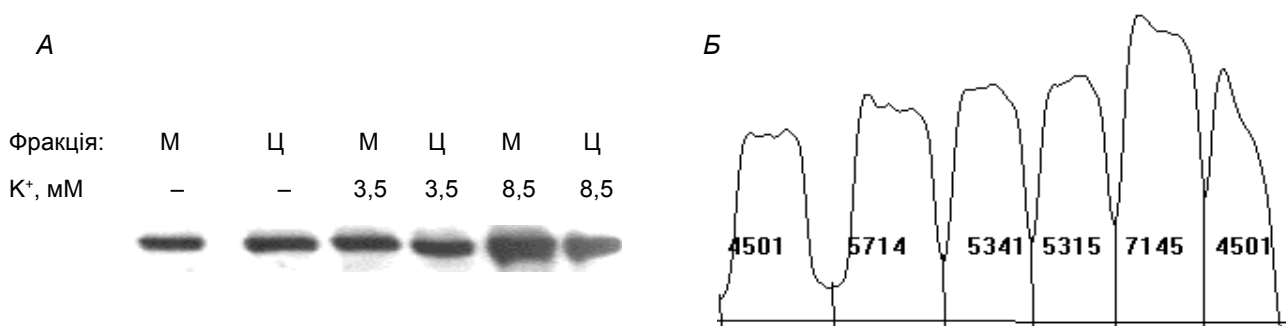


Рис. 3. Розподілення $PKC\alpha$ між цитозолом та мембранною фракцією при різних концентраціях іонів калію: А – вестерн-блотинг, М – мікросоми; Ц – цитозоль; Б – сканограма плівки з кількісною оцінкою інтенсивності смуг, одержаною за допомогою програми "Scion Image". Наведено результат одного дослідження з чотирьох.

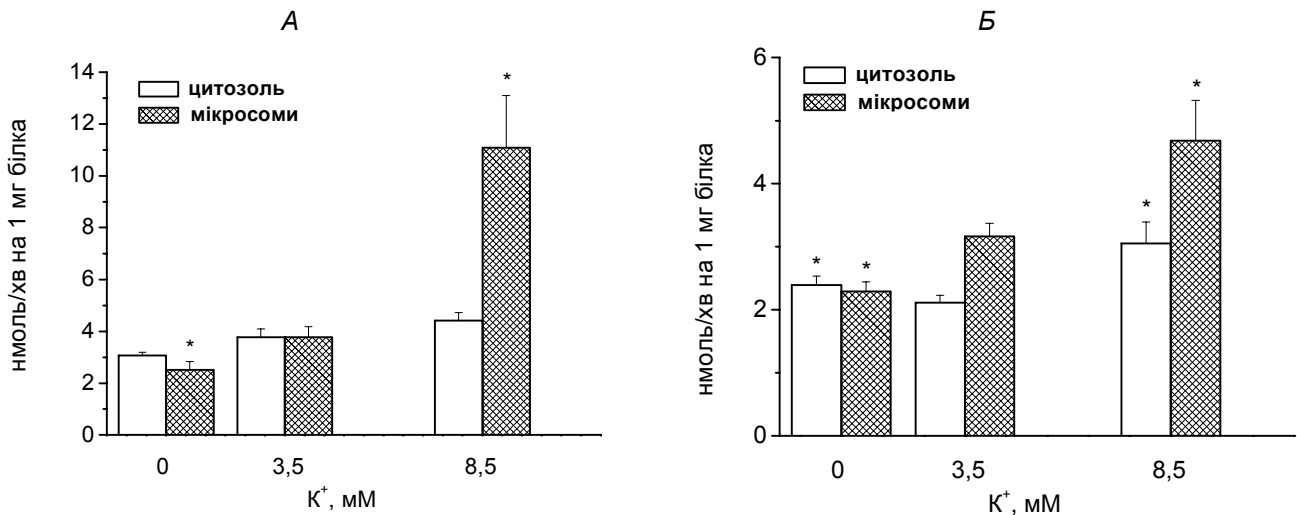


Рис. 4. Активність протеїнкіназ у цитозолі і мікросомальній фракції при різних концентраціях іонів калію: ПКС (А) та ПКА (Б), $n = 4$, ($M \pm m$). * Відміни між значенням даної точки і значенням точки при 3,5 мМ К⁺ (фізіологічна концентрація) для відповідного компартмента вірогідні, $p < 0,05$.

тивність ПКА в цитозолі, на відміну від ПКС, також змінюється в разі відхилення концентрації калію від фізіологічних значень (рис. 4, Б).

Таким чином, виходячи з одержаних та даних літератури можна стверджувати, що регуляція синтезу альдостерону іонами калію є значно складнішою, ніж вважалось до цього часу. К⁺, вочевидь, активує всі три основні месенджерні системи, що беруть участь у проведенні регуляторних сигналів агоністів, які впливають на стероїдогенез у надниркових залозах – сАМР/ПКА [6, 7, 18], Са²⁺-кальмодулін/кальмодулінзалежну протеїнкіназу [4, 5] та Са²⁺-фосфоліпідзалежну ПКС [7, 8]. А якщо враховувати, що регуляція утворення альдостерону кортикотропіном також залежить від Са²⁺ і АКТГ може викликати розпад поліфосфоінзитидів з утворенням ДАГ та транслокацією ПКС у мікросоми [19], а ефект ангіотензину пов'язаний зі збільшенням вмісту сАМР [20] та активацією білка-активатора стероїдогенезу StAR [21], то можна вважати, що прості схеми регуляції стероїдогенезу залишились у минулому. З'являються також дані, що свідчать про участь інших месенджерних систем у регуляції синтезу альдостерону, а саме сGMP-залежної протеїнкінази [22]. Напевно всі три основні фізіологічні агоністи – АКТГ, ангіотензин та К⁺ активують декілька месенджерних систем водночас і зараз доцільно говорити тільки про місце кожної з них у проведенні регуляторного сигналу конкретного агоніста. Важливим завданням, що постає перед дослідниками, є вивчення значення кожної з систем месенджерів для цих агоністів, послідовності їхньої активації в часі та взаємодії між ними.

THE ROLE OF PHOSPHOINOSITIDES, PROTEIN KINASE C AND PROTEIN KINASE A IN THE K⁺ REGULATORY SIGNAL TRANSDUCTION IN HUMAN ADRENOCORTICAL CELLS

V. M. Pushkarev, E. I. Kovzun, M. D. Tronko, N. N. Kostyuchenko, A. S. Mikosha

Komisarenko Institute of Endocrinology & Metabolism, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: endo@i.kiev.ua

S u m m a r y

The messenger mechanisms mediating K⁺ regulatory signals in human adrenocortical cells were studied. It was shown that potassium ions initiated decay of polyphosphoinositides to inositolphosphates and obviously diacylglycerol. The latter compounds activate protein kinase C as affected by different agonists. Using western blotting method we showed translocation of PKC α from cytosol to membranes after adrenal tissue preincubation in the medium with increased K⁺ content (8.5 mM). Translocation means activation of the enzyme. Activity of PKC increased in the microsomal fraction and did not change in cytosol. Increased concentration of K⁺ in the incubation medium also activates protein kinase A, although to a lesser extent compared to PKC. Unlike PKC activity of PKA was changed in cytosol as well.

The possibility of involvement of several messenger systems in K⁺ signal transduction in human adrenocortical cells as well as the hypothesis on cross-

talk between messenger mechanisms for main physiological agonists controlling aldosterone biosynthesis in the adrenals are discussed.

Key words: human adrenocorticytes, K⁺, protein kinase C, protein kinase A, polyphosphoinositides, inositolphosphates, Cushing's disease.

1. Pratt J. H., Rothrock J. K., Dominguez J. H. // *Endocrinology*. 1989. **125**, N 5. P. 2463–2469.
2. Robertson L. M., Keith L. D., Kendall J. W. // *Metabolism*. 1984. **33**, N 8. P. 703–709.
3. Chen X. L., Bayliss D. A., Fern R. J., Barrett P. Q. // *Amer. J. Physiol.* 1999. **276**, N 5. Pt 2. P. F674–F683.
4. Ganguly A., Chiou S., Fineberg N. S., Davis J. S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. **182**, N 1. P. 254–261.
5. Condon J. C., Pezzi V., Drummond B. M. et al. // *Endocrinology*. 2002. **143**, N 9. P. 3651–3657.
6. Hyatt P. J., Tait J. F., Tait S. A. S. // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1986. **227**, N 1. P. 21–42.
7. Pushkarev V. M., Mikosha A. S. // *Biomedical Sci.* 1991. **2**, N 2. P. 135–139.
8. Betancourt-Calle S., Jung E. M., White S. et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001. **184**, N 1–2. P. 65–76.
9. Тронько Н. Д., Пушкарев В. М., Богданова Т. И. и др. // *Физиол. журн.* 1989. **35**, № 4. С. 52–61.
10. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. **120**. P. 680–685.
11. Uchida N., Okamura S.-I., Kuwano H. // *Oncol. Reports*. 2000. **9**. P. 793–796.
12. Kemp B. E., Graves D. J., Benjamini E., Krebs E. G. // *J. Biol. Chem.* 1977. **252**. P. 4888–4894.
13. Nishizuka Y. // *FASEB J.* 1995. **9**. P. 484–496.
14. Toker A. // *Front. Biosci.* 1998. **1**, N 3. P. D1134–D1147.
15. Farese R. V., Sabir M. A., Larson R. E, Haley J. A. // *J. Clin. Invest.* 1980. **66**, N6. P. 1428–31.
16. Kojima I., Kojima K., Kreutter D., Rasmussen H. // *J. Biol. Chem.* 1984. **259**, N 23. P. 14448–14457.
17. Пушкарьов В. М., Тронько М. Д., Костюченко Н. М., Мікоша А. С. *Ендокринологія*. 2000. **5**, № 1. С. 123–126.
18. Tait J. F., Tait S. A. S. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1999. **26**. P. 947–955.
19. Cozza E. N., Vila M. C., Acevedo-Duncan M. et al. // *Endocrinology*. 1990. **126**, N 4. P. 2169–2176.
20. Bird I. M., Mason J. I., Oka K. et al. // *Ibid.* 1993. **132**, N 2. P. 932–934.
21. Betancourt-Calle S., Calle R. A., Isales C. M. et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001. **173**, N 1–2. P. 87–94.
22. Gambaryan S., Butt E., Marcus K. // *J. Biol. Chem.* 2003. **278**, N 32. P. 29640–29648.

Отримано 15.07.2004