

АКТГ АКТИВУЄ *IN VITRO* ПРОТЕЇНКІНАЗИ А ТА С У КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ЛЮДИНИ

О. І. КОВЗУН, М. Д. ТРОНЬКО, О. С. МИКОША

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

*Проведен аналіз активації кортикотропіном протеїнкіназ А і С в корі надпочечників людини. Під впливом АКТГ *in vitro* в мікросомальній фракції адренкортикоцитів вероятно збільшується активність протеїнкінази А і загальна активність протеїнкінази С на фоні збільшення продукції 11-оксикортикостероїдів тканин надпочечників. В пострецепторний месенджерний механізм, який забезпечує дію АКТГ в адренкортикальних клітках, включені як сАМР-залежна протеїнкіназа А, так і протеїнкіназа С.*

Ключові слова: АКТГ, протеїнкіназа А, протеїнкіназа С, кора надпочечників.

Адренкортикотропін (АКТГ) є основним гормоном, що бере участь у регуляції ендокринної активності та росту надниркових залоз. Зв'язуючись з рецепторами, які асоційовані з G_s-білками, він активує аденилатциклазу, що призводить до збільшення внутрішньоклітинного рівня сАМР та активації протеїнкінази А (ПКА) [1, 2]. У корі надниркових залоз людини вплив АКТГ реалізується здебільшого за участю ізоформ аденилатциклази 5/6 та 2/4 [3], а у адренкортикоцитах мишей лінії Y1 за участю аденилатциклази 4 [4]. Основним фактором транскрипції, що фосфорилується ПКА, є CREB – білок, який зв'язує сАМР-респонсивний (залежний) елемент. У такий спосіб змінюється експресія сАМР-індуцибельних генів, до яких належать гени ферментів стероїдогенезу [5]. Механізми перенесення сигналу сАМР-залежними шляхами частково узагальнені в огляді [6]. Регуляція кортикотропіном адренкортикальної функції забезпечується здебільшого за рахунок прямого фосфорилування сАМР-залежною ПКА специфічних білків [7], а також стероїдогенних факторів SF-1 та SF-2 [5, 8], що беруть участь у реакціях стероїдогенезу, змінюючи його швидкість. АКТГ здатен також активувати інші протеїнкінази. Особливу увагу дослідників привернула протеїнкіназа С (ПКС) [9–11]. До сигнальних шляхів, що забезпечують перенесення сигналу кортикотропіну, залучені також процеси дефосфорилування специфічних білків, які здійснюються серин/треоніновими та тирозиновими фосфатазами [12].

Показано, що АКТГ спричинює транслокацію ПКС із цитозолу до мембран [10]. У той самий час секрецію кортикостероїдів, стимульовану АКТГ, пригнічують інгібітори ПКС [11].

За іншими даними, тривале пригнічення ПКС призводить до специфічного збільшення активності 11 β -гідроксилази та 3 β -гідроксистероїд-гідрогенази, що посилює стероїдогенез [13].

Метою роботи було з'ясування механізмів перенесення регуляторного сигналу АКТГ у корі надниркових залоз людини із залученням сАМР-залежної протеїнкінази А та серин/треонінової протеїнкінази С.

Матеріали і методи

У досліджах використовували постопераційні тканини надниркових залоз 9 хворих, прооперованих у клініці інституту. Одержано 4 зразки гормонально неактивних пухлин, 3 – гіперплазованої тканини (хвороба Іценка-Кушинга), 1 зразок феохромоцитом та 1 – альдостероми. Із ділянок візуально незміненої тканини кори надниркових залоз (умовно нормальна тканина) одержували зрізи вагою 200–300 мг, які вносили в 1 мл середовища 199 (Державний завод медичних препаратів, Україна), до якого додавали 10 мМ Нерес, рН 7,4 («Calbiochem», США) та 2 мг/мл сироваткового альбуміну бика («Seriva», Німеччина). З метою звільнення рецепторів АКТГ від ендogenous кортикотропіну здійснювали попередню інкубацію тривалістю 15 хв. АКТГ («Sigma», США) вносили до інкубаційного середовища із розрахунку 0,2 та 2 од. на 100 мг тканини. Пробі інкубували упродовж 1 год при 37 °С та постійному струшуванні. Інкубацію припиняли, перемішуючи пробі до льоду. Середовище інкубації зливали і проводили кількісне визначення 11-оксикортикостероїдів [14]. Як стандарт використовували гідрокортизон. Зрізи гомогенізували та одержували субклітинні фракції, як описано раніше [15].

Визначення активності ПКС у цитозольній та мікосомальній фракціях проводили з використанням нейрограніну (Ala-Ala-Lys-Ile-Gln-Ala-Ser-Phe-Arg-Gly-His-Met-Ala-Arg-Lys-Lys, «Sigma», США) – високоспецифічного лужного пептидного субстрату ПКС, який внаслідок фосфорилування протеїнкіназою С змінює заряд та рухається в агарозному гелі до анода [16], а нефосфорильований нейрогранін, який використовується як негативний контроль, мігрує до катода. Інкубаційне середовище для визначення активності ПКС містить: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 мМ CaCl₂; 1 мМ АТР; 6 мМ Mg-ацетату; 20 мкг/мл фосфатидилсерину; 0,1 мМ лейпептину; 10 мкг нейрограніну та 10 мкг білка досліджуваних субклітинних фракцій в 10 мкл реакційної суміші.

Активність ПКА визначали за методикою, що базується на зміні напрямку руху в агарозному гелі пептидного субстрату кемпиду (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly, «Sigma», США) внаслідок його фосфорилування ПКА [17]. Інкубаційне середовище для визначення активності ПКА містить: 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 10 мМ MgCl₂; 1 мМ АТР; 1 мкМ сАМР; 0,1 мМ лейпептину; 10 мкг кемпиду та 10 мкг білка субклітинних фракцій в 10 мкл реакційної суміші.

Активність ПКС та ПКА виражали в нмоль фосфорильованого субстрату · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Синтез 11-оксикортикостероїдів зрізами кори надниркових залоз збільшується під впливом кортикотропіну в 1,7 раза (з 11,66 ± 1,54 до 20,30 ± 3,07 мкг/г тканини, рис. 1). Під впливом кортикотропіну та форсколіну значно зростає секреція кортизолу наднирковими залозами морських свинок [18]. Одночасне використання активатора ПКС ОАГ (1-α-1-oleoyl-2-acetyl-sn-3-glycerol) та кальцієвого іонофора А23187 також стимулює секрецію кортизолу [18], що свідчить про залучення Ca²⁺/фосфоліпідзалежної ПКС до процесів стероїдогенезу. На первинній культурі адренкортикоцитів людини АКТГ-стимульована продукція кортизолу зменшується під впливом інгібітора ПКА Н-7 [19] та кортикотропінінгібувального пептиду СІР [20].

Опосередкована G_s-білками активація аденілатциклази та сАМР-залежної протеїнкінази А є етапом основної месенджерної системи, що забезпечує перенесення сигналу АКТГ в адренкортикальній тканині. Вплив АКТГ на активність ПКА в субклітинних фракціях кори надниркових залоз людини показано на рис. 2, А.

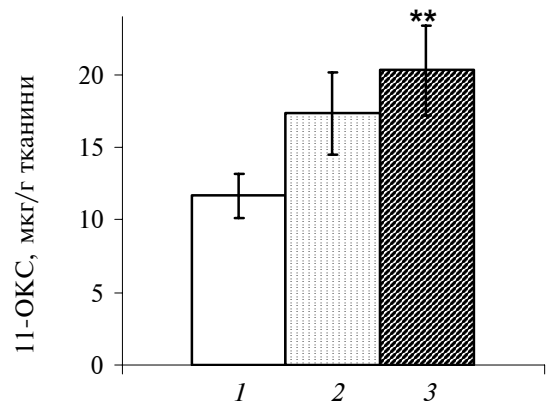


Рис. 1. Вплив АКТГ на секрецію 11-оксикортикостероїдів зрізами кори надниркових залоз людини. 1 – контроль, 2 – АКТГ у кількості 0,2 од./100 мг тканини, 3 – АКТГ у кількості 2 од./100 мг тканини. ** Вірогідний вплив АКТГ, $p < 0,01$; $n = 8$.

АКТГ *in vitro* в концентрації 0,2 од./100 мг тканини не призводить до активації ПКА ні в мембранній, ні в цитозольній фракціях. При збільшенні концентрації кортикотропіну до 2 од./100 мг тканини протеїнкіназна активність у мікосомальній фракції ($14,9 \pm 2,5$ нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка) зростає вірогідно порівняно з контрольними пробами ($3,3 \pm 0,2$ нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка). В адренкортикальних клітинах лінії Y1 сАМР індуквана АКТГ активність ПКА (6 разове збільшення) редукується інгібітором ПКА Н-8 [21].

ПКА відіграє суттєву роль у найважливіших етапах стероїдогенезу: відщепленні бокового ланцюга холестеролу спотихромом *P*-450_{sec}, активації білка StAR, транспорту вільного холестеролу до внутрішньої мітохондріальної мембрани [6]. Як АКТГ, так і дибутирил сАМР спричинюють дозозалежне збільшення акумуляції StAR та *P*-450_{sec} мРНК у первинній культурі адренкортикоцитів, яке повністю усувається інгібіторами протеїнкіназ [19].

Таким чином, під час аналізу змін активності ПКА в умовно нормальній тканині кори надниркових залоз людини не було виявлено будь-яких особливостей цього процесу порівняно з культивованими адренкортикальними клітинами або нормальною тканиною надниркових залоз тварин.

Дані щодо впливу АКТГ на активність ПКС у субклітинних фракціях кори надниркових залоз людини представлено на рис. 2, Б. У контролі (в умовах відсутності АКТГ) активність ферменту визначається на дещо вищому рівні в мікосомальній фракції, ніж у цитозолі ($7,8 \pm 0,9$ та $6,7 \pm 0,5$ нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка відповідно). Але це стосується умовно нормальної тканини, прилеглої до пухлин, адже, як було пока-

*Рис. 2. Вплив АКТГ на активність ПКА (А) та ПКС (Б) у субклітинних фракціях кори надниркових залоз людини. 1 – контроль, 2 – АКТГ у кількості 0,2 од./100 мг тканини, 3 – АКТГ у кількості 2 од./100 мг тканини. * Вірогідний вплив АКТГ, $p < 0,05$; $n = 5$. ** Вірогідний вплив АКТГ, $p < 0,01$; $n = 4$.*

зано раніше, в пухлинах спостерігається чітка транслокація α -ізоформи ПКС до мембранної фракції, в той час як в умовно нормальній тканині розподіл ПКС становить у % приблизно 50 : 50 [15]. Можливо з такою транслокацією пов'язаний більш високий рівень активності ПКС у мембранах порівняно з цитозолем в умовно нормальній тканині, прилеглий до пухлини.

Кортикотропін *in vitro* в концентрації 0,2 од./100 мг тканини не справляє істотного впливу на активність ПКС ні в мембранній, ні в цитозольній фракціях. Збільшення концентрації АКТГ до 2 од./100 мг тканини не змінює показники протеїнкіназної активності в цитозолі, але призводить до вірогідного її зростання в мікросомальній фракції з $7,8 \pm 0,9$ до $11,2 \pm 1,7$ нмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ білка. Обробка адренокортикальних клітин Y1 із пухлин надниркових залоз мишей тетрадеканойл-форболацетатом (ТРА) індукує 1,5-разове збільшення активності ПКС [21]. У наших дослідженнях АКТГ підвищує активність ПКС в 1,4 раза.

За даними [10], короткий термін дії АКТГ *in vivo* (30 хв) призводить до значного зниження (з 70 до 43%) вмісту ПКС у цитозольній фракції клубочкової зони кори надниркових залоз щурів водночас зі збільшенням вмісту ПКС у мембранній фракції з 30 до 48%. У разі тривалої стимуляції кори надниркових залоз кортикотропіном збільшується процент активності ПКС, що локалізована в ядерній фракції. Це відбувається завдяки транслокації ферменту з цитоплазми до ядер за рахунок підвищення їхньої спорідненості до ПКС [10].

Подібний ефект спостерігали R. Farese et al., які показали, що співвідношення активності

ПКС у мембранах до загальної активності ПКС у надниркових залозах щурів збільшується за впливу кортикотропіну з 35 до 57% вже через 15 хв [22]. За нашими даними, активність ПКС становить 43% у цитозольній фракції і 57% у мембранній за умов одногодинного впливу АКТГ *in vitro* у концентрації 2 од./100 мг тканини.

Встановлено, що основною ізоформою ПКС у цитозольній, мікросомальній та ядерній фракціях кори надниркових залоз людини є Ca^{2+} -фосфоліпідзалежна α -ізоформа [15]. При інкубації клітин феохромоцитоми щурів РС12 з 4 β -форбол 12 β -міристат 13-ацетатом (РМА) – потужним специфічним активатором ПКС – спостерігається значна активація ізоформ ПКС α , ϵ та ξ здебільшого в ядерній фракції клітин [23].

Протеїнкіназа С є важливим компонентом ще майже невизначеного механізму ростового ефекту АКТГ. У короткочасних експериментах з культурою адренокортикоцитів мишей АКТГ або не впливає на їхній ріст, або пригнічує його [11, 24]. У процесі тривалого культивування (72 год і більше) кортикотропін стимулює за певних умов ріст адренокортикальних клітин [11]. Проліферативна дія АКТГ у гломерулозній зоні кори надниркових залоз щурів, яка визначається за збільшенням включення міченого тимідину в ДНК, повністю усувається інгібітором аденилатциклази SQ-22536, блокатором сАМР Рр-сАМР-С та інгібітором ПКА Н-89 [25].

Представлені дані дозволяють вважати, що активація ПКА та ПКС у мікросомальній фракції клітин кори надниркових залоз людини внаслідок дії АКТГ свідчить про участь цих протеїнкіназ у перенесенні регуляторного сигналу кортикотропіну в адренокортикоцитах.

ACTH ACTIVATES IN VITRO PROTEIN KINASES A AND C IN HUMAN ADRENAL CORTEX

O. I. Kovzun, M. D. Tronko, 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 activation of protein kinases A and C by corticotropin in the human adrenal cortex was analyzed. ACTH influence in vitro significantly increase protein kinase A activity, total protein kinase C activity in the membrane fraction of adrenocortico-cytes and 11-hydroxycorticosteroids production of adrenal cortex tissue. Either cAMP-dependent protein kinase A or protein kinase C are included to postreceptor messenger mechanism, that mediates ACTH action in adrenocortical cells.

Key words: ACTH, protein kinase A, protein kinase C, adrenal cortex.

- Grahame-Smith D. G., Butcher R. W., Ney R. L., Sutherland E. W. // J. Biol. Chem. — 1967. — 242, N 23. — P. 5535–5541.*
- Richards J. S. // Mol. Endocrinol. — 2001. — 15, N 2. — P. 209–218.*
- Côte M., Guillon G., Payet M. D., Gallo-Payet N. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2001. — 86, N 9. — P. 4495–4503.*
- Rui X., Al-Hakim A., Tsao J. et al. // Mol. Cell. Endocrinol. — 2004. — 215, N 1–2. — P. 101–108.*
- Li L. A., Chang Y. C., Wang C. J. et al. // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. — 2004. — 91, N 1–2. — P. 11–20.*
- Микоша А. С., Тронько Н. Д. // Успехи соврем. биол. — 2004. — 124, № 4. — С. 362–370.*
- Colonna C., Podesta E. J. // Exp. Cell. Res. — 2005. — 304, N 2. — P. 432–442.*
- Ikeda Y., Lala D. S., Luo X. et al. // Mol. Endocrinol. — 1993. — 7, N 7. — P. 852–860.*
- Cozza E. N., del Carmen Vila M., Acevedo-Duncan M. et al. // J. Steroid Biochem. — 1990. — 35, N 2. — P. 343–351.*
- Lehoux J. G., Grondin F., Pacuraru J. P., Yachaoui Y. // Mol. Cell. Endocrinol. — 1991. — 78, N 1–2. — P. 97–106.*
- Arola J., Heikkilä P., Voutilainen R., Kahri A. I. // J. Endocrinol. — 1994. — 141. — P. 285–293.*
- Bey P., Gorostizaga A. B., Maloberti P. M. et al. // Endocrinology. — 2003. — 144, N 4. — P. 1399–1406.*
- Reyland M. E. // Mol. Endocrinol. — 1993. — 7, N 8. — P. 1021–1030.*
- Балашов Ю. Г. // Физиол. журн. СССР. — 1990. — 76, № 2. — С. 280–283.*
- Tronko N. D., Kovzun O. I., Kovalenko A. E., Mikosha A. S. // Ендокринологія. — 2004. — 9, № 1. — P. 9–15.*
- Uchida N., Okamura S.-I., Kuwano H. // Oncol. Reports. — 2000. — 7. — P. 793–796.*
- Kemp B. E., Graves D. J., Benjamini E., Krebs E. G. // J. Biol. Chem. — 1977. — 252. — P. 4888–4894.*
- Shimada T., Hirose T., Matsumoto I., Aikawa T. // J. Endocrinol. — 2005. — 184, N 2. — P. 381–391.*
- Liu J., Heikkilä P., Kahri A. I., Voutilainen R. // J. Endocrinol. — 1996. — 150. — P. 43–50.*
- Mazzocchi G., Aragona F., Malendowicz L. K., Nussdorfer G. G. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. — 2001. — 280. — P. E209–E213.*
- Watanabe G., Pena P., Albanese C. et al. // J. Biol. Chem. — 1997. — 272, N 32. — P. 20063–20069.*
- Farese R. V., Fanjul L. F., de Ruiz Galarreta C. M. et al. // Life Sci. — 1987. — 41. — P. 2631–2637.*
- Gardner A. M., Olah M. E. // J. Biol. Chem. — 2003. — 278, N 17. — P. 15421–15428.*
- Lepique A. P., Moraes M. S., Rocha K. M. et al. // J. Mol. Endocrinol. — 2004. — 33, N 3. — P. 623–638.*
- Andreis P. G., Markowska A., Champion H. C. et al. // Endocrinology. — 2000. — 141, N 6. — P. 2098–2104.*

Отримано 16.05.2005