15. *Грищук В. М., Вороніна О. К., Дзержинський Е. М.* Динаміка змін у слизовій оболонці шлунка щурів при гипергастринемії різної тривалості // Біологічні дослідження молодих вчених на Україні: Матеріали VI Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів (Київ, 21–22 верес., 2006). – Київ, 2006. – С. 68–69.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 13.12.2006

УДК 612.453:612.433.451:612.015.1

© **2007**

О. І. Ковзун

Участь протеїнкіназ, що активуються мітогенами, і фактора транскрипції AP-1 в перенесенні регуляторного сигналу кортикотропіну в адренокортикоцитах щурів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Д. Троньком)

The messenger mechanisms mediating corticotropin regulatory signals in adrenal cortex are studied. We have measured the secretion of corticosteroids, levels of ERK1/2, JNK, p38 mitogen-activated protein kinases, and transcription factors c-jun and c-fos in adrenal cortex of rats after the corticotropin treatment. ACTH increased the ERK1/2 level by a factor of 1.5 in adrenocortical tissue. The level of ERK1/2 was decreased in 6 h after the corticotropin injection. ACTH influence on the JNK level is very significant. The protein kinase JNK level was 2 times higher after 1 h and decreased after 6 h of the corticotropin treatment. The level of p38 kinase was not changed under these conditions. The role of the transcription factor AP-1, which includes the c-fos and c-jun factors, attracts attention in realization of corticotropin signal transduction. C-jun was increased 2-fold by 1 h, and c-fos was increased 1.7-fold after 6 h of ACTH treatment. Together these findings suggest that JNK kinase and the transcriptional factor c-jun mediate the fast corticotropin signal transduction in adrenocorticocytes.

Кортикотропін (АКТГ) є основним регулятором ендокринної активності та росту надниркових залоз. Зв'язуючись з рецепторами, які асоційовані з G_s-білками, він активує аденілатциклазу, що призводить до збільшення внутрішньоклітинного рівня cAMP та активації протеїнкінази А (ПКА) [1, 2]. Дослідження адренокортикальних неоплазій дозволило виявити велику кількість сигнальних шляхів, змінених порівняно до нормальної тканини кори надниркових залоз. Хоча трансдукція сигналу кортикотропіну в корі надниркових залоз є необхідною для забезпечення адренокортикальної функції і опосередковується здебільшого cAMP-залежною ПКА, існує припущення, що цей шлях перенесення сигналу може водночас призводити до пригнічення росту адренокортикальної пухлини.

Останнім часом одержано чіткі дані про те, що дія АКТГ опосередковується не тільки cAMP і протеїнкіназою А, кортикотропін запускає розгалужену систему трансдукції сигналу, окремі компоненти якої взаємодіють на різних етапах [3]. Він здатен активувати інші

протеїнкінази, особливу увагу дослідників привернула протеїнкіназа С (ПКС) [2, 4–6] і протеїнкінази, що активуються мітогенами (МАР-кінази) [7–9]. Відомо, що АКТГ викликає транслокацію ПКС з цитозолю до мембран та її активацію [4, 5]. Під впливом АКТГ in vitro у мікросомальній фракції адренокортикоцитів імовірно збільшується загальна активність протеїнкінази С на тлі збільшення продукції 11-гідроксикортикостероїдів тканиною надниркових залоз [2]. АКТГ викликає швидку активацію протеїнкіназ, що активуються мітогенами, ERK1/2 [7] і JNK [8] у клітинах Y1, отриманих з пухлини надниркових залоз мишей.

Ядерний етап перенесення сигналу АКТГ полягає в активації факторів транскрипції та регуляції експресії специфічних генів стероїдних гідроксилаз. Продукти протоонкогенів *c-jun* та *c-fos*, білки jun і fos, утворюючи гомодимерні та гетеродимерні комплекси, входять до складу фактора транскрипції АР-1, який є надзвичайно важливим елементом трансдукції і ампліфікації сигналу кортикотропіну в ядрі [8, 10]. Короткостроковий вплив АКТГ викликає зростання рівня c-fos білка в клітинах Y1 [7]. При хронічному введенні АКТГ мРНК c-fos знижується до контрольного рівня. Все це дуже ускладнює перенесення сигналу кортикотропіну, оскільки встановлено, що експресія факторів транскрипції і специфічних генів опосередковується, з одного боку, cAMP-залежною протеїнкіназою А [1, 3], з іншого — протеїнкіназою С [4–6], можливою є також трансрегуляція з боку месенджерного каскаду, до якого залучені протеїнкінази, що активуються мітогенами [7, 8].

Метою роботи було з'ясування механізмів трансдукції регуляторного сигналу АКТГ у корі надниркових залоз із залученням МАР-кіназної сигнальної системи і факторів транскрипції c-jun та c-fos, які входять до складу транскрипційного фактора АР-1.

Роботу виконано на дорослих щурах-самцях лінії Вістар масою близько 200 г. Використовували три експериментальні групи: контрольні тварини, яким вводили фізіологічний розчин; тварини, що одноразово отримували АКТГ ("Sigma", США, 2 од./100 г маси тіла) і були декапітовані під етаміналовим наркозом (4 мг/100 г маси тіла) через 1 год або 6 год після ін'єкції. Відомо, що введення етаміналу не впливає на продукцію кортикостероїдів у корі надниркових залоз. Кров індивідуальних тварин збирали у пробірки з гепарином (ЗАТ "Індар", Україна), центрифугували при 1700 об./хв 10 хв, в отриманій плазмі проводили кількісне визначення 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) [11]. За стандарт використовували кортикостерон.

Надниркові залози видаляли, очищували на льоду від жиру та мозкової речовини. Зрізи кори надниркових залоз індивідуальних тварин гомогенізували у 2–3 об'ємах охолодженого буфера, який містив: 0,25 М сахарози, 25 мМ трис-HCl (pH 7,4), 3 мМ $MgCl_2$, 2 мМ ЕГТА, 0,1 мМ спермідину, 0,1% тритону Х-100, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Гомогенат центрифугували при 1700 об./хв 10 хв, надосадові фракції зберігали до використання при -60 °С. Отриманий гомогенат кип'ятили у буфері для зразків, який містив 100 мМ трис-HCl, 4% додецилсульфату натрію, 0,2% бромфенолового синього, 20% гліцерину, 2% 2-меркаптоетанолу, 10% дитіотреїтолу. На гель наносили по 40 мкг білка на кожний трек, розділяли в 9% поліакриламідному гелі. По завершенні електрофорезу білки переносили напівсухим способом на нітроцелюлозні мембрани Hybond C ("Amersham Life Science", Велика Британія). Мембрани блокували буфером, який містив 20 мМ трис-HCl, 137 мМ хлориду натрію, 0,1% твін 20 (pH 7,6) і 5% знежиреного сухого молока та інкубували з первинними антитілами до ERK1/2, JNK, p38, c-jun, c-fos ("Cell Signaling Technology" або "Sigma", США) протягом 1 год при 4 °С. Після триразової промивки буфером мембрани інкубували з вторинними антитілами, сполученими з пероксидазою ("Sigma", США), протягом 1 год

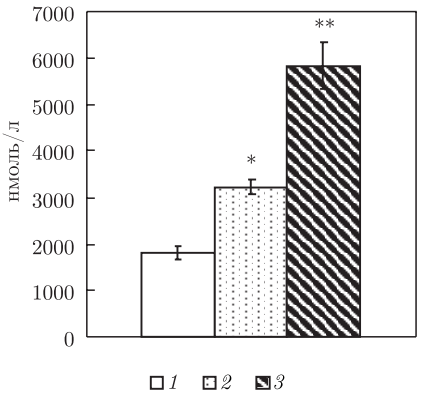

Рис. 1. Вміст 11-гідроксикортикостероїдів у плазмі крові щурів, що отримували in vivo АКТГ (2 од./100 г маси тіла):
1 — контроль; *2* — АКТГ 1 год; *3* — АКТГ 6 год. Вірогідний вплив АКТГ: * — $p < 0{,}05$, ** — $p < 0{,}01$, $n = 5$

при кімнатній температурі і знову тричі промивали. Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL ("Amersham Life Science", Велика Британія). Після денситометричного визначення інтенсивності засвічення плівки Hyperfilm ECL результати обробляли у програмі PhotoCaptMw. Статистичний аналіз одержаних даних проводили за t-критерієм Ст'юдента.

Синтез 11-гідроксикортикостероїдів клітинами кори надниркових залоз збільшується під впливом кортикотропіну в 3,2 раза — з (1824±156) нмоль/л у контролі до (5845± ±489) нмоль/л у плазмі крові тварин через 6 год після введення АКТГ ($p < 0{,}01$). Через 1 год після введення АКТГ рівень сумарних 11-ОКС у плазмі крові становив (3220 ± ± 168) нмоль/л (рис. 1).

До пострецепторного месенджерного механізму, що опосередковує дію АКТГ в адренокортикальних клітинах, залучено як сигнальні каскади, що пов'язані з протеїнкіназами A і C, так і месенджерні системи, які використовують в якості вторинних посередників протеїнкінази, що активуються мітогенами. Через 1 год після введення щурам АКТГ вміст ERK 1/2 в адренокортикальній тканині зростає більш ніж на 50%, а через 6 год починає знижуватись (рис. 2, *а*). Вважається, що проліферативна дія АКТГ реалізується в клітинах кори надниркових залоз за рахунок активації ERK 1/2 кіназ (p42/44), які відносяться до родини серинотреонінових протеїнкіназ, що активуються мітогенами. До сімейства MAP-кіназ відносять також JNK (c-jun NH2-термінальна кіназа або стрес-активована протеїнкіназа) та p38 кіназу. Ці серинотреонінові кінази в свою чергу є активаторами факторів транскрипції, які індукують експресію відповідних генів. За деякими даними, АКТГ не виявляв стимулювальної дії на MAP-кіназну активність [1] та блокував ефекти фактору росту фібробластів (FGF2) на стимуляцію ERK1/2 [12]. Проте інші дослідження на клітинах Y1, отриманих з адренокарцином мишей, довели, що АКТГ здатен індукувати швидке зростання активності ERK1/2 та стимулювати входження клітин у S-фазу клітинного циклу [7]. Медіатором мітогенної дії АКТГ у цих клітинах виступає c-fos білок [7]. Однак за даними G. Watanabe et al. [8], активність ERK зменшувалась під впливом АКТГ in vivo та in vitro в адренокортикальних клітинах лінії Y1.

Найбільш виразний вплив чинить АКТГ на рівень JNK кінази. Через 1 год після введення її вміст зростає більш ніж вдвічі, через 6 год, вірогідно, знижується (рис. 2, *в*). За літературними джерелами, АКТГ як in vitro у клітинах Y1, так і in vivo у 3–4 рази стимулював

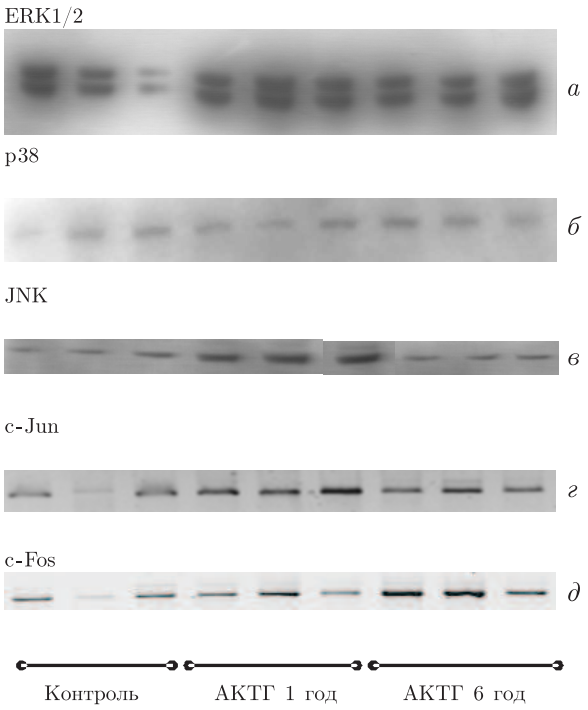

Рис. 2. Вплив АКТГ (2 од./100 г маси тіла) на рівні МАР-кіназ і факторів транскрипції c-fos і c-jun у гомогенатах кори надниркових залоз щурів; $n = 3$

активність залежних від ПКС кіназ, що активуються мітогенами, а саме JNK. Форболові ефіри також індукували збільшення активності JNK у Y1 клітинах. Під впливом cAMP такий ефект не спостерігався. Протеїнкіназні інгібітори H-89 і H-8 блокували стимульовану АКТГ активність JNK [8]. Кальцієвий іонофор A23 187 збільшував індуковану кортикотропіном активність JNK втричі, а хелатор іонів Ca^{2+} ЕДТА істотно її зменшував. Можна зробити висновок, що АКТГ індукує активність JNK через Ca^{2+}-залежний месенджерний шлях, що залучає ПКС. Пригнічення активності ERK може пояснити антипроліферативний ефект АКТГ і зменшення синтезу ДНК, а стимуляція активності JNK має кореляцію з гіпертрофією адренокортикальних клітин [9].

Внаслідок дії АКГТ рівень p38 МАР-кінази залишається без змін (рис. 2, *б*).

Привертає увагу участь фактора транскрипції АР-1, який складається з двох транскрипційних факторів — c-jun і c-fos, в перенесенні сигналу АКТГ. Відомо, що продукти генів ранньої відповіді ("early genes") *c-myc*, *c-jun*, *c-fos*, *jun B* і *fos B*, які ще інколи називають третинними месенджерами різноманітних чинників, що контролюють проліферацію і диференціювання різних типів клітин, зокрема беруть участь у регуляції структурних і функціональних характеристик адренокортикоцитів. Рівень c-jun у корі надниркових залоз зростає майже вдвічі через 1 год після введення АКТГ (рис. 2, *г*). Звертає на себе увагу значне збільшення з часом рівня c-fos, який, вірогідно, зростає в 1,7 раза тільки через 6 год після введення кортикотропіну (рис. 2, *д*). Індукція c-fos та стимуляція синтезу ДНК під дією АКТГ істотно гальмувалась інгібітором кінази MEK1 PD98059. 90% інгібування c-fos мРНК блокує стимульований АКТГ вступ Y1 клітин до S-фази клітинного циклу [7].

Виявилося, що *c-jun* та *c-fos* не єдині протоонкогени, експресія яких стимулюється АКТГ. Зокрема показано, що АКТГ значно підсилює експресію протоонкогена *c-myc* в куль-

тивованих клітинах надниркових залоз людини H295R [13] та мишей Y1 [8, 14]. cAMP і форболові ефіри також підсилювали експресію *c-myc*. Експерименти з інгібіторами ПКА і ПКС показали, що обидва протеїнкіназних механізми можуть бути залучені до модулювання експресії *c-myc* [8]. Подібні результати отримані на культивованих клітинах надниркових залоз плодів щурів. Певно інші чинники, крім АКТГ, також регулюють експресію *c-myc* і його експресія насамперед пов'язана не з регуляцією стероїдогенезу, а з диференціюванням адренокортикальних клітин.

Короткий термін дії АКТГ стимулює мітотичний цикл у фазі S і викликає активацію протеїнкіназ, що активуються мітогенами. Даний ефект не потребує cAMP, оскільки відтворюється в мутантних клітинах, які не експресують ПКА. Однак cAMP-залежне гальмування проліферації спостерігається при тривалій присутності АКТГ у середовищі культивування клітин Y1 [7]. Отже, пригнічення проліферації кортикотропіном може опосередковуватись cAMP, а стимулювальний ефект — MAP-кіназами.

Отримані нами результати дозволяють зробити висновок, що істотна роль у трансдукції сигналу АКТГ в адренокортикоцитах належить MAP-кіназі JNK і фактору транскрипції c-jun.

Залишається поза сумнівом, що вплив АКТГ на адренокортикоцити здійснюється, головним чином, через месенджерну систему cAMP-залежної ПКА [1, 6]. Проте нові дані щодо опосередкування дії кортикотропіну через активацію фосфоліпаз, утворення інозитолфосфатів та діацилгліцерину, дозволяють провести переоцінку ролі Ca^{2+} та сигнальних ланцюгів, пов'язаних з ПКС і MAP-кіназами у трансформації регуляторного сигналу кортикотропіну в клітинах [2, 15].

1. *Gallo-Payet N., Payet M. D.* Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP // Microsc. Res. Tech. – 2003. – **61**, No 3. – P. 275–287.
2. *Ковзун О. І., Тронько М. Д., Микоша О. С.* АКТГ активує in vitro протеїнкінази А та С в корі надниркових залоз людини // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 6. – С. 97–100.
3. *Richards J. S.* New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells // Mol. Endocrinol. – 2001. – **15**, No 2. – P. 209–218.
4. *Cozza E. N., del Carmen Vila M., Acevedo-Duncan M. et al.* ACTH increases de novo synthesis of diacylglycerol and translocates protein kinase C in primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells // J. Steroid Biochem. – 1990. – **35**, No 2. – P. 343–351.
5. *Lehoux J. G., Grondin F., Pacuraru J. P., Yachaoui Y.* The protein kinase C content is increased in the nuclear fraction of rat adrenal zona glomerulosa following long-term ACTH administration // Mol. Cell. Endocrinol. – 1991. – **78**, No 1./2. – P. 97–106.
6. *Schimmer B. P., Cordova M., Cheng H. et al.* Global profiles of gene expression induced by ACTH in Y1 mouse adrenal cells // Endocrinology. – 2006. – **147**, No 5. – P. 2357–2367.
7. *Lotfi* C. F., Armelin H. A. c-Fos protein is a mediator in mitogenic response to ACTH // Endocr. Res. – 1998. – **24**, No 3./4. – P. 421–424.
8. *Watanabe G., Pena P., Albanese C. et al.* Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**, No 32. – P. 20063–20069.
9. *Mazzocchi G., Aragona F., Malendowicz L. K., Nussdorfer G. G.* PTH and PTH-related peptide enhance steroid secretion from human adrenocortical cells // Amer. J. Phys. Endocrinol. Metab. – 2001. – **280**. – P. E209-E213.
10. *Lotfi C., Armelin H.* C-fos and c-jun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor – 2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells // J. Endocrinol. – 2001. – **168**. – P. 381–389.
11. *Балашов Ю. Г.* Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – **76**, № 2. – С. 280–283.
12. *Lepique A. P., Forti F., Moraes M. S., Armelin H.* Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2 // Endocr. Res. – 2000. – **26**, No 4. – P. 825–832.

13. *Liu J., Heikkila P., Kahri A. I., Voutilainen R.* Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells // J. Endocrinol. – 1996. – **150**. – P. 43–50.
14. *Lepique* A. P., Moraes M. S., Rocha K. M. et al. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells // J. Mol. Endocrinol. – 2004. – **33**, No 3. – P. 623–638.
15. *Kilianova Z., Basora N., Kilian P. et al.* Human MC2R expression and functionality. Effect of PKA and PKC on desensitization and internalization // Endocrinology. – 2006. – **147**, No 5. – P. 2325–2337.

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ

Надійшло до редакції 16.11.2006