

О.І. Ковзун

Залучення протеїнкіназ, активованих мітогенами, і транскрипційного чинника c-Fos до трансдукції регуляторного сигналу естрадіолу в адренкортикоцитах щурів

Исследовали механизмы трансдукции регуляторных сигналов эстрадиола в коре надпочечников. Определяли влияние эстрадиола бензоата на секрецию кортикостероидов, содержание протеинкиназ ERK1/2, JNK, p38, активируемых митогенами, а также факторов транскрипции c-Jun и c-Fos в коре надпочечников крыс. Наиболее существенный эффект эстрадиол оказывает на изменение содержания ERK1/2, которое увеличивается в 1,7 раза после трехдневных инъекций 100 мкг эстрадиола. Содержание протеинкиназ p38 и JNK остается без изменений. Получены результаты об участии фактора транскрипции AP-1, состоящего из двух транскрипционных факторов (c-Jun и c-Fos), в реализации сигнальных путей эстрадиола. Содержание белка c-Fos возрастает в 1,8 раза в результате действия гормона, при этом содержание белка c-Jun не изменяется. Полученные результаты свидетельствуют о том, что реализация быстрой трансдукции сигнала эстрадиола в адренкортикоцитах осуществляется при участии киназы ERK1/2 и фактора транскрипции c-Fos.

ВСТУП

Нині в ендокринології поступово відмовилися від уявлень про монопольну роль кортикотропіну й ангіотензину II у регуляції функції кори надниркових залоз. Серед нових факторів регуляції адренкортикальної функції складністю та розмаїттям ефектів вирізняються естрогени. Їх рецептори охарактеризовано в тканині кори надниркових залоз людини, щурів і приматів [10, 22, 23]. Естрогени можуть регулювати секрецію кортикостероїдів адренкортикоцитами як прямо модулюючи секрецію [19], так і опосередковано через гіпоталамус і гіпофіз [3, 4]. Традиційно дослідження перенесення сигналу естрогенів здійснюються майже виключно на клітинах тканин репродуктивної сфери. Однак останнім часом особливо відзначають широкий спектр біологічних ефектів

естрогенів, безпосередньо не пов'язаних з процесами репродукції. Захворювання кісткової тканини, серцево-судинної системи, деякі типи пухлин мають прямий зв'язок із забезпеченістю організму естрогенами та характеризуються чіткими гендерними особливостями.

Аналіз механізмів впливу 17β -естрадіолу на клітини здебільшого концентрувався на прямих геномних ефектах; вторинні месенджери, що опосередковують дію естрогенів, тривалий час залишалися невідомими, і лише за останні кілька років у розумінні цих процесів відбулися суттєві зрушення [7, 16, 20, 24]. Дослідження молекулярних аспектів дії естрадіолу в адренкортикоцитах людини та експериментальних тварин дали змогу підтвердити залучення cAMP-залежної сигнальної системи та протеїнкінази C до перенесення регуляторних сигналів гормону [2], як це

© О.І. Ковзун

показано для клітин молочної залози людини (MCF-7 і T47D) і щурів [16, 21], а також клітин Лейдига [5].

В опосередкуванні сигналу естрадіолу, як і у разі багатьох стимуляторів проліферації, беруть участь протеїнкінази, що активуються мітогенами (МАРК; від англ. mitogen-activated protein kinase) [11, 17].

Метою нашої роботи було дослідження впливу естрадіолу бензоату *in vivo* на продукцію кортикостероїдних гормонів, зміни вмісту ферментів МАРК-сигнальної системи та білкових транскрипційних чинників *c-Jun* та *c-Fos* у клітинах кори надниркових залоз щурів.

МЕТОДИКА

У дослідах використовували дорослих щурів-самців лінії Вістар масою близько 200 г. Тварин розділили на три групи: контрольні тварини, яким вводили сливову олію, та тварини, що отримували дві різні дози естрадіолу (естрадіол бензоат «Koch-Light», Великобританія, розчинений у сливовій олії, у дозі 50 або 100 мкг/тварину протягом трьох діб). Тварин декапітували під дією етаміналу натрію (4 мг/100 г), введення якого не впливає на секрецію кортикостероїдів наднирковими залозами. Кров кожної тварини збирали у пробірки з гепарином (ЗАТ «Індар», Україна), центрифугували при 2000 г 10 хв, в отриманій плазмі визначали вміст 11-гідроксикортикостероїдів спектрофлуориметричним методом [1].

Надниркові залози виділяли, очищували на льоду від жиру та мозкової речовини. Зрізи кори надниркових залоз кожної тварини гомогенізували у 2–3 об'ємах охолодженого буфера, який містив: 0,25 моль/л сахарози, 25 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,4), 3 ммоль/л $MgCl_2$, 2 ммоль/л ЕГТА, 0,1 ммоль/л спермідину, 0,1% детергенту TRITON X-100 («Serva», Німеччина), 0,1 ммоль/л фенолметилсульфонілфториду

(«Serva», Німеччина). Гомогенат центрифугували при 2000 г 10 хв, надосадовні фракції зберігали до використання при $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Отриманий гомогенат кип'ятили у буфері, що містив 100 ммоль/л тріс-НСІ, 4 % додецилсульфату натрію, 0,2 % бромфенолового синього, 20 % гліцерину, 2 % 2-меркаптоетанолу, 10 % дитіотреїтолу (рН 6,8). Концентрацію білка в пробах визначали за методом Bradford [8]. На кожний трек наносили по 30 мкг білка, який розділяли в 9%-му поліакриламідному гелі. По завершенні електрофорезу білки переносили напівсухим способом на нітроцелюлозні мембрани Hybond C («Amersham Life Science», Великобританія). Мембрани блокували розчином 5%-го знежиреного сухого молока, який був приготовлений на 20 ммоль/л тріс-буфері і містив хлориду натрію 137 ммоль/л, твін-20 0,1 % (рН 7,6). Інкубували мембрани з первинними антитілами до кіназ ERK1/2, JNK, p38 і транскрипційних факторів *c-Jun*, *c-Fos* («Cell Signaling Technology» або «Sigma», США) протягом 1 год при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після триразової промивки буфером їх інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі з вторинними антитілами, сполученими з пероксидазою («Sigma», США), і знову тричі промивали. Після реакції з хемілюмінесцентним субстратом («Amersham Life Science», Великобританія) блот експонували на плівку Hyperfilm ECL («Amersham Life Science», Великобританія) для автографії. Отримані результати щодо вмісту білків були проаналізовані та оцифровані за допомогою програми PhotoCaptMw. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію *t* Стьюдента; вірогідними вважали значення при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення естрадіолу бензоату спричиняло істотне збільшення вмісту сумарних кортикостероїдів у плазмі крові самців

шурів (рис. 1). Показано, що синтез 11-гідроксикортикостероїдів клітинами кори надниркових залоз збільшується під впливом естрадіолу в 1,7 раза – з 1864 ± 244 в контролі до 3206 нмоль/л ± 157 нмоль/л у плазмі крові шурів, яким вводили 50 мкг гормону. При введенні 100 мкг естрадіолу бензоату цей показник підвищується більше ніж у 2,7 раза – до 5090 нмоль/л ± 347 нмоль/л. Це можна пояснити проліферативним і мітогенним ефектом естрадіолу, як це описано для інших типів клітин [13, 20, 25]. Вплив естрадіолу на синтез стероїдів в корі надниркових залоз шурів підтверджує спостереження щодо активації цього процесу в умовах дії естрогенів *in vivo* та *in vitro* в адренкортикальних клітинах людини, морських свинок і новонароджених поросят [2–4, 19].

До останнього часу механізми впливу естрогенів на клітини-мішені пов'язували виключно з геномними ефектами, що не потребують залучення вторинних посередників для внутрішньоклітинного перенесення регуляторних сигналів. Нині розглядається участь у цих процесах як протеїнкіназ А і С [7, 15], так і протеїнкіназ, що активуються мітогенами [12, 24]. Каскад MAPK/ERK є головним шляхом сигнальної трансдукції, що залучається до реалізації широкого спектра ефектів, спрямованих на проліферацію та диференціювання. Активована форма ERK1/2 здатна до транслокації в ядро і прямої взаємодії з ядерними транскрипційними чинниками [11, 17].

У корі надниркових залоз шурів естрадіол бензоат чинить найбільш виразний вплив на вміст ERK1/2. За результатом імуноблотингу, введення 50 мкг естрадіолу не призводить до змін вмісту ERK1/2 в адренкортикальній тканині порівняно із контрольними тваринами, що отримували ін'єкції олії. У разі тридобового введення естрадіолу в дозі 100 мкг цей показник вірогідно збільшується в 1,7 раза (рис. 2,а).

До сімейства MAPK відносять також JNK (с-Jun NH2-термінальна кіназа) та p38-кіназу, вміст яких було визначено методом імуноблотингу в корі надниркових залоз за умов стимуляції тканини естрадіолом. Незначне збільшення вмісту JNK спостерігається в адренкортикальній тканині при введенні 100 мкг естрадіолу бензоату, вміст p38-кінази залишається без змін при дії обох доз естрадіолу (див. рис. 2,а). У клітинах ендометрія фосфорилування цієї протеїнкінази збільшується вже через 2 хв інкубації з естрадіолом, проте тамоксифен спричинює такий самий вплив [24]. Фосфорилування p38-кінази і, особливо, ERK1/2 збільшується під впливом 17 β -естрадіолу в клітинних лініях MCF-7 раку молочної залози [12]. Експерименти з інгібіторами протеїнкінази А (H89) і MAPK (PD98059) показали, що ефекти естрадіолу в клітинних лініях T84 раку товстого кишечника опосередковуються тільки MAPK [14].

Слід зазначити, що естрогени викликають активацію експресії низки генів, зокрема протоонкогенів c-jun і c-fos [6, 12]. Продукти активації цих генів, білки c-Jun і c-Fos, утворюючи гомо- та гетеродимерні

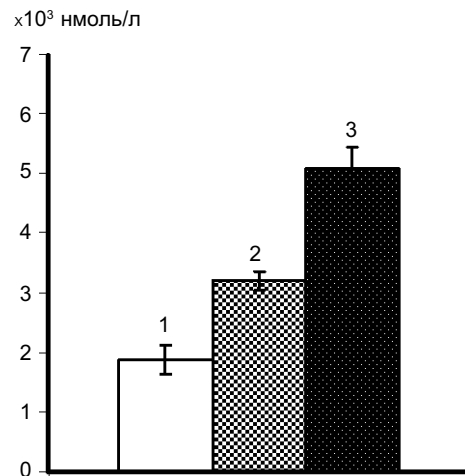


Рис. 1. Вміст 11-гідроксикортикостероїдів у плазмі крові шурів, що отримували *in vivo* естрадіолу бензоат: 1 – контроль, 2,3 – 50 і 100 мкг естрадіолу бензоату відповідно. ** P<0,01 (n = 5)

комплекси, входять до складу фактора транскрипції AP-1, який є надзвичайно важливим елементом перенесення сигналу в ядрі.

Ми визначали в адренокортикоцитах вміст білкових факторів транскрипції c-Jun і c-Fos, які можуть брати участь в опосередкуванні регуляторних сигналів естрогенів у корі надниркових залоз. Слід відмітити значне збільшення вмісту білка

c-Fos (1,8 раза), яке корелює з підвищенням дози естрадіолу бензоату. В цих умовах вміст білка c-Jun у корі надниркових залоз практично не змінюється (див. рис. 2,б).

Через залучення рецепторів естрогенів, асоційованих з G-білками (GPR30), і MAPK регулюється індукція естрогенами вмісту білка c-Fos у тироцитах. Такий стимулювальний ефект суттєво гальмувався блокуванням GPR30 та інгібітором MAPK PD98059 [25]. Вміст білка c-Fos збільшується під впливом 50 мкг естрадіолу бензоату як *in vivo* в гонадотрофах шурів після оваріоектомії [9], так і *in vitro* в клітинних лініях раку яєчника [6] і кератиноцитах людини під впливом 17 β -естрадіолу [15].

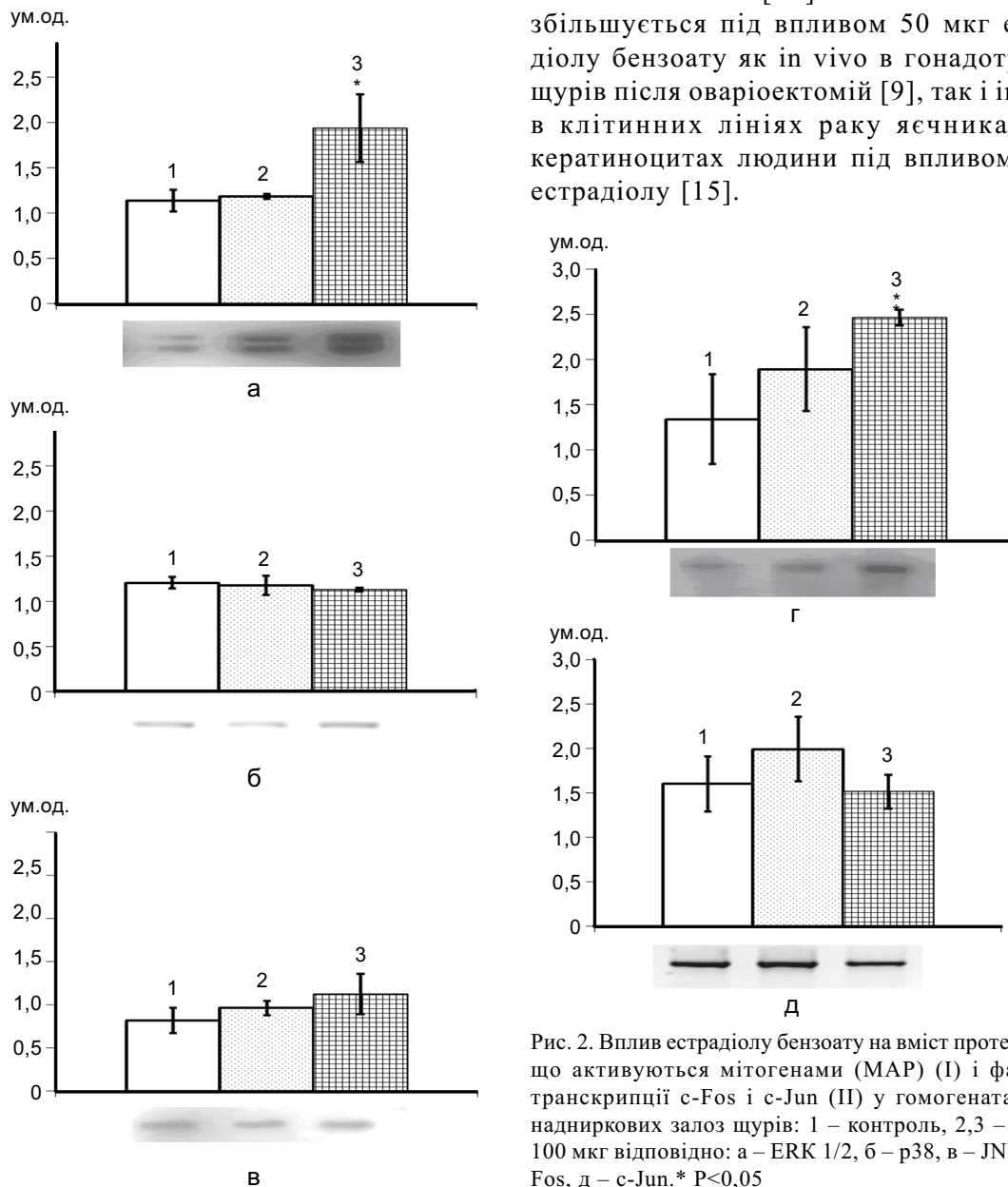


Рис. 2. Вплив естрадіолу бензоату на вміст протеїнкіназ, що активуються мітогенами (MAP) (I) і факторів транскрипції c-Fos і c-Jun (II) у гомогенатах кори надниркових залоз шурів: 1 – контроль, 2,3 – 50 мкг, 100 мкг відповідно: а – ERK 1/2, б – p38, в – JNR, г – c-Fos, д – c-Jun.* P<0,05

Установлено, що c-jun та c-fos не єдині ранні протоонкогени, експресія яких стимулюється естрогенами, 17 β -естрадіол також істотно збільшує рівень експресії мРНК протоонкогена c-myc в ембріональних стовбурових клітинах [13]. Основний регулятор функції кори надниркових залоз – кортикотропін – має здатність впливати на експресію c-myc, яка в адренкортикоцитах швидше за все пов'язана не з регуляцією стероїдогенезу, а з диференціюванням і проліферацією цих клітин [18].

Таким чином, базуючись на одержаних нами результатах і літературних даних, можна стверджувати про залучення MAPK ERK1/2 і фактора транскрипції c-Fos до перенесення регуляторного сигналу естрадіолу в клітинах кори надниркових залоз.

O.I. Kovzun

INFLUENCE OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES AND TRANSCRIPTIONAL FACTOR C-FOS ON ESTRADIOL SIGNAL TRANSDUCTION IN THE RAT ADRENOCORTICOCYTES

Signal transduction mechanisms mediating estradiol regulatory signals in the adrenal cortex were studied in rats. The effect of estradiol benzoate treatment on corticosteroids secretion, levels of ERK1/2, JNK, p38 mitogen-activated protein kinases, transcription factors c-Jun and c-Fos in adrenal cortex were investigated. The level of ERK1/2 was increased 1.7-fold in adrenocortical tissue after injections (3 days, 100 mkg per rat) of estradiol. However, the level of p38 kinase and protein kinase JNK was not changed in these conditions. The transcription factor AP-1, which includes c-Fos and c-Jun factors, is involved in realization of estradiol signal transduction. The level of c-Fos protein raised 1.8-fold after estradiol treatment, c-Jun protein was not increased. We conclude that ERK1/2 kinase and transcriptional factor c-Fos mediate fast estrogen signal transduction in adrenocorticytes.

V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – 76, № 2. – С. 280–283.

2. Ковзун О.І. Шляхи внутрішньоклітинного перенесення регуляторних сигналів естрадіолу в корі надниркових залоз людини // Доп. НАН України. – 2006. – № 8. – С. 187–191.
3. Микоша А.С., Ковзун Е.И., Гринченко Е.Н. Эстрадиол-17 β активует образование кортикостероидов и тормозит пролиферацию культивируемых клеток надпочечников свиней // Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, № 1. – С. 29–32.
4. Юдаев Н.А., Микоша А.С. Влияние эстрогена на биосинтез гидрокортизона надпочечниками морской свинки in vitro // Биохимия. – 1963. – 28, № 3. – С. 462–466.
5. Akingbemi B.T. Estrogen regulation of testicular function // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2005. – 3:51.
6. Albanito L., Madeo A., Lappano R. et al. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells // *Cancer Res.* – 2007. – 67, № 4. – P. 1859–1866.
7. Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S. Estrogen action via the cAMP signalling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – 91. – P. 8517–8521.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72, № 1–2. – P. 248–254.
9. Clarke I.J., Tobin V.A., Pompolo S., Pereira A. Effects of changing gonadotropin-releasing hormone pulse frequency and estrogen treatment on levels of estradiol receptor-alpha and induction of Fos and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in pituitary gonadotropes: studies in hypothalamo-pituitary disconnected ewes // *Endocrinology.* – 2005. – 146, № 3. – P. 1128–1137.
10. Cutler G.B.Jr., Barnes K.M., Sauer M.A., Loriaux D.L. Estrogen receptor in rat adrenal gland // *Ibid.* – 1978. – 102, № 1. – P. 252–257.
11. Edwards D.P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone // *Annu. Rev. Physiol.* – 2005. – 67. – P. 335–376.
12. Gutzman J.H., Nikolai S.E., Rugowski D.E. et al. Prolactin and estrogen enhance the activity of activating protein 1 in breast cancer cells: role of extracellularly regulated kinase 1/2-mediated signals to c-fos // *Mol. Endocrinol.* – 2005. – 19, № 7. – P. 1765–1778.
13. Han H.J., Heo J.S., Lee Y.J. Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2006. – 290, № 4. – C1067–C1075.
14. Hennessy B.A., Harvey B.J., Healy V. 17beta-Estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2005. – 229, № 1–2. – P. 39–47.

15. Kanda N., Watanabe S. 17beta-estradiol enhances the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human keratinocytes // *J. Invest. Dermatol.* – 2004. – **123**, № 2. – P. 329–337.
16. Karp G., Maissel A., Livneh E. Hormonal regulation of PKC: estrogen up-regulates PKCeta expression in estrogen-responsive breast cancer cells // *Cancer Lett.* – 2007. – **246**, № 1–2. – P. 173–181.
17. Lee S.J., McEwen B.S. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2001. – **41**. – P. 569–591.
18. 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**, № 3. – P. 623–638.
19. Lesniewska B., Nowak M., Malendowicz L.K. Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVIII. ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized and gonadal hormone replaced rats // *Horm. Metab. Res.* – 1990. – **22**, № 7. – P. 378–381.
20. Lobenhofer E.K., Huper G., Iglehart J.D., Marks J.R. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis // *Cell Growth Differ.* – 2000. – **11**. – P. 99–110.
21. Lopez A., Torres N., Ortiz V. et al. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – **291**, № 5. – E1059–E1066.
22. Nakao M., Sato B., Koga M. et al. Biochemical and immunological characterization of estrogen binding components in human neoplastic adrenocortical tissues // *J. Steroid Biochem.* – 1986. – **25**, № 1. – P. 1–9.
23. Pelletier G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues // *Histol. Histopathol.* – 2000. – **15**, № 4. – P. 1261–1270.
24. Seval Y., Cakmak H., Kayisli U.A., Arici A. Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – **91**, № 6. – P. 2349–2357.
25. Vivacqua A., Bonfiglio D., Albanito L. et al. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30 // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – **70**, № 4. – P. 1414–1423.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П.
Комісаренка АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 16.05.2007*