

# Участь фактора транскрипції AP-1 у перенесенні регуляторного сигналу N-ацильованих похідних етаноламіну в адренокортикоцитах людини

О.І. Ковзун,  
О.С. Лукашеня,  
О.А. Горносталь,  
О.С. Микоша

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме.** Досліджували месенджерні механізми, що забезпечують перенесення регуляторних сигналів канабіноїдів у корі надниркових залоз. Метою роботи було визначення впливу N-ацильованих похідних етаноламіну (NAE) на експресію факторів транскрипції c-jun і c-fos у корі надниркових залоз людини. Висловлено гіпотезу щодо участі факторів транскрипції c-jun і c-fos, які входять до складу фактора AP-1, у перенесенні внутрішньоклітинного сигналу NAE. Рівень c-jun зростає на 50% за дії NAE в концентрації 10 мкмоль/л, а рівень c-fos вірогідно збільшується в 3 рази. Зроблено висновок, що фактори транскрипції c-jun та c-fos беруть участь у трансдукції сигналу NAE в адренокортикоцитах людини.

**Ключові слова:** фактори транскрипції, трансдукція сигналів, кора надниркових залоз, N-ацильовані похідні етаноламіну.

Регуляція функції надниркових залоз є надзвичайно складною. Крім добре відомих активаторів залози кортикотропіну (АКТГ), ангіотензину II та іонів K<sup>+</sup>, стероїдогенез модулюється пролактином, естрогенами і ендоканабіноїдами. Проте шляхи перенесення сигналів агоністів вивчені недостатньо.

Контроль активності кори надниркових залоз здійснюється на етапі перетворення холестерину в прегненолон. Ця реакція проходить на внутрішній мембрані мітохондрій адренокортикоцитів. Проте лімітуючим етапом є не лише реакція відщеплення бічного ланцюга холестерину, а й транспорт холестерину з цитозолу до мітохондрій. Утворення прегненолону каталізується ферментом десмолазою холестерину (КФ 1.14.15.6; СУР 11A1), а перенесення холе-

\* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. e-mail: kovzun@newmail.ru

© О.І. Ковзун, О.С. Лукашеня, О.А. Горносталь, О.С. Микоша

стерину потребує спеціального транспортного білка StAR.

Активация адренокортикальної функції забезпечується підвищенням синтезу цих білків в ядрі.

Перенесення сигналів агоністів від плазматичних мембран, де локалізовано більшість рецепторів, до цитозолу досліджено доволі детально [1].

Ядерний етап перенесення сигналу агоністів полягає в активації факторів транскрипції та регуляції експресії специфічних генів. Продукти протоонкогенів *c-jun* та *c-fos*, білки *jun* і *fos*, утворюючи гомодимерні та гетеродимерні комплекси, входять до складу фактора транскрипції AP-1, який є надзвичайно важливим елементом трансдукції і ампліфікації сигналу в ядрі [2]. Підвищення експресії *c-jun* і *c-fos* за дії АКТГ вже було описано [3,4]. Вплив основних регуляторів на транскрипцію коротко підсумовано в огляді [5]. Ядерні механізми впливу канабіноїдів у надниркових залозах не досліджувались. У холангіоцитах ендоканабіноїд анандамід викликає зростання рівня *c-fos* і *c-jun* білків [6].

Аналіз перенесення внутрішньоклітинних сигналів ендоканабіноїдів дуже складний, оскільки встановлено, що експресія факторів транскрипції і специфічних генів у надниркових залозах опосередковується, з одного боку, cAMP-залежною протеїнкіназою А [7,8], з іншого – протеїнкіназою С [7,9]. Можливою є також трансрегуляція з боку месенджерного каскаду, до якого залучені протеїнкінази, що активуються мітогенами [9,10,11], та сигнальна система Wnt/бета-катенін [12].

**Метою роботи** було визначення експресії факторів транскрипції *c-jun* та *c-fos* у корі надниркових залоз людини після інкубації тканини з N-ацильованими похідними етаноламіну.

## Матеріали та методи

Досліди проведено на умовно нормальних тканинах кори надниркових залоз хворих, прооперованих у клініці інституту. Проведення експериментів узгоджено з Комітетом із біоетики інституту. На льоду готували зрізи умовно нормальної кори надниркових залоз, що межує з пухлинною, інкубували їх в 1 мл середовища 199 (Державний завод медичних препаратів, Україна), що містило 20 мМ HEPES (рН 7,4) («Calbiochem», США) та 2 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну («Serva», Німеччина) при 37°C та постійному струшуванні. До середовища інкубації додавали спиртовий розчин суміші ненасичених НАЕ в кінцевій концентрації 1 та 10 мкмоль/л. Суміш НАЕ було синтезовано в Інсти-

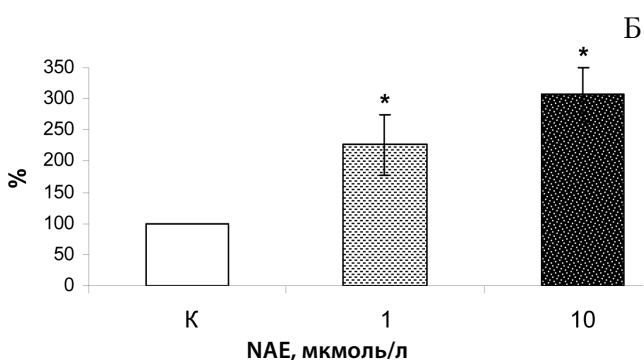
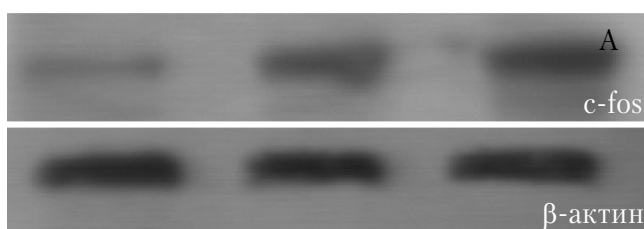
туті біології моря (Владивосток, Російська Федерація). Суміш N-ацилетаноламінів більш ніж на 60% складала ацили ненасичених жирних кислот: 6,3% арахідонової; 1,8% лінолевої; 7,6% гондової; 18,4% олеїнової; 6,4% пальмітоолеїнової; 16,7% ейкозапентаєнової; 2,7% докозагексаєнової, близько 30% – ацили насичених жирних кислот: 6,4% міристинової; 22,4% пальмітинової; 3,0% стеаринової; 1,0% арахінової; 1,4% бегенової. Контрольні проби містили розчинник у відповідній концентрації.

Після інкубації (37°C, 2 год.) зрізи гомогенізували у 2-3 об'ємах охолодженого буфера, який містив: 0,25 М сахарози, 25 мМ трис-НСІ (рН 7,4), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ EGTA, 0,1 мМ спермидину, 0,1% тритону X-100, 0,1 мМ фенолметилсульфонілфториду. Гомогенат центрифугували при 2000 g 10 хв, надосадові фракції зберігали до використання при мінус 60°C. Отриманий супернатант кип'ятили у буфері для зразків, що містив 100 мМ трис-НСІ, 4% додецилсульфату натрію, 0,2% бромфенолового синього, 20% гліцерину, 2% 2-меркаптоетанолу, 10% дитіотреїтолу. В лунку 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). Визначення рівнів факторів транскрипції *c-jun*, *c-fos*, β-актину в корі надниркових залоз людини проводили методом Вестерн блот аналізу. Мембрани блокували буфером, що містив 20 мМ трис-НСІ, 137 мМ хлориду натрію, 0,1% твін у 20 (рН 7,6) і 5% знежиреного сухого молока та інкубували з первинними антитілами до *c-jun*, *c-fos*, β-актину («Sigma», США) протягом 1 год. при 4 °С. Після триразової промивки блокуючим буфером мембрани інкубували з вторинними антитілами (анти-кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою, «Sigma», США), протягом 1 год. при кімнатній температурі і знову тричі промивали блокуючим буфером. Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL («Amersham Life Science», Велика Британія). Після денситометричного визначення інтенсивності засвічення плівки Hyperfilm ECL результати обробляли за допомогою програми GelPro v.3.2. Статистичний аналіз одержаних даних проводили за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні.

## Результати та їх обговорення

Аналіз концентраційної залежності впливу етаноламінів, N-ацильованих сумішшю ненасичених жирних кислот, на вміст транскрипційного факто-

## Оригінальні дослідження



**Рисунок 1.** Вплив NAE на рівень фактора транскрипції c-fos у корі надниркових залоз людини:

А – сканограми результатів Вестерн-блот аналізу.

Б – усереднені результати досліджень.

К – контроль,  $M \pm m$ ,  $n=3$ .

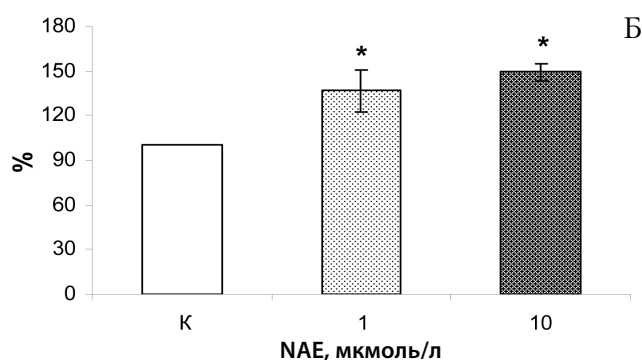
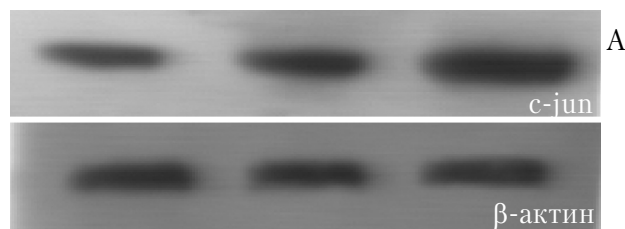
\* – різниця порівняно з контролем є вірогідною за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні ( $p < 0,05$ ).

ра c-fos у корі надниркових залоз людини показано на **рисунку 1**. Помітне зростання вмісту транскрипційного фактора c-fos в адренкортикальній тканині людини спостерігається вже при концентрації NAE 1 мкмоль/л, при збільшенні концентрації NAE до 10 мкмоль/л рівень фактора c-fos збільшується в 3 рази. Отримані дані підтверджують, що c-fos може залучатись до перенесення регуляторних сигналів канабіноїдів, як це показано для нейронів та ядер гіпоталамуса [13,14].

Рівень c-jun у корі надниркових залоз зростає на 36% після додавання NAE в концентрації 1 мкмоль/л та майже на 50% після використання 10 мкмоль/л NAE (**рисунк 2, Б**).

У літературі немає жодного повідомлення про зміни рівня ядерних транскрипційних факторів в адренкортикальній тканині під впливом NAE. Проте на гепатоцитах показано участь чинника c-jun у реалізації ефекту канабіноїдів. Анандамід не тільки збільшував рівень c-jun білка в клітинах, а й прискорював утворення транскрипційного чинника AP-1 як гомодимерного комплексу c-jun або гетеродимерного – c-jun/junB. Зростає також рівень двох транскрипційних мішеней AP-1 (FasL та Vim) [15].

Раніше ми показали, що при інкубації зрізів надниркових залоз самиць щурів у присутності



**Рисунок 2.** Вплив NAE на рівень фактора транскрипції c-jun у корі надниркових залоз людини:

А – сканограми результатів Вестерн-блот аналізу.

Б – усереднені результати досліджень.

К – контроль,  $M \pm m$ ,  $n=3$ .

\* – різниця порівняно з контролем є вірогідною за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні ( $p < 0,05$ ).

10 мкмоль/л N-ацильованих етаноламінів включення міченого [ $^3\text{H}$ ]-холестерину в альдостерон і кортикостерон зростало. Цей ефект не спостерігався в присутності етаноламінів, N-ацильованих сумішшю ненасичених жирних кислот, у концентрації 1 мкмоль/л, а мічення кортикостерону в присутності 1 мкмоль/л N-стеароїлетаноламіну дещо знижувалось. Синтез кортикостероїдів наднирковими залозами самиць щурів зростає [16], тоді як надниркові залози самців продукували менше сумарних 11-гідроксикортикостероїдів у присутності NAE [17].

При інкубації зрізів кори надниркових залоз людини в присутності 10 мкмоль/л N-ацильованих етаноламінів рівень cAMP вірогідно знижувався [7], а при інкубації зрізів надниркових залоз самиць щурів за таких самих умов спостерігалась стимуляція стероїдогенезу [16]. Можливо, активація стероїдогенезу за таких умов відбувається за рахунок активації ПКС. За даними Massagone et al., при додаванні анандаміду в концентрації 10 мкмоль/л до середовища інкубації активність протеїнкінази С (ПКС) у кератиноцитах збільшувалась втричі і була співставною з рівнем ПКС при інкубації в присутності форболових ефірів ТРА та іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. Цікаво, що зниження концентрації анандаміду до 1 мкмоль/л

призводило до зменшення загальної активності ПКС до контрольного рівня. ПКС, у свою чергу, є регулятором транскрипційного фактора AP-1 та відіграє важливу роль у регуляції стероїдогенезу. Додавання анандаміду до інкубаційного середовища в концентрації 10 мкмоль/л залишало активність AP-1 на рівні контролю, а в концентрації 1 мкмоль/л призводило до зниження активності AP-1 у 2,5 рази [18].

Виявилося, що c-jun та c-fos не є єдиними транскрипційними чинниками, експресія яких стимулюється NAE. Зокрема показано, що канабіноїди експресію ядерного фактора NFκB [19] та zif268 [10]. Експерименти з антагоністами канабіноїдних рецепторів СВ 1 типу та СВ 2 типу показали, що обидва рецепторні механізми можуть бути залучені до модулювання експресії c-fos [20,21].

Виходячи з наявних даних, поки що неможливо виділити якийсь один, головний механізм дії канабіноїдів на клітини. У внутрішньоклітинних системах перенесення регуляторних сигналів канабіноїдів важливе місце відводиться cAMP-залежному каскаду [7,22]. Саме в такий спосіб змінюється також експресія cAMP-індуцибельних генів, до яких належать гени ферментів стероїдогенезу. Крім cAMP-залежної протеїнкінази А, у якості потенційних месенджерів розглядається серин-треонінова протеїнкіназа С, яка може виступати трансактиватором протеїнкіназ, що активуються мітогенами [7,9,11,23].

Таким чином, активація NAE систем внутрішньоклітинної сигналізації в аденокортикоцитах людини пов'язана з трансактивацією ядерних транскрипційних чинників c-fos і c-jun, які входять до складу чинника AP-1, що у свою чергу, запускає механізми, які викликають ініціацію проліферативних процесів у клітині.

### Список використаної літератури

1. Тронько М.Д., Микоша О.С., Ковзун О.І., Пушкарьов В.М. Регулятори функції кори надниркових залоз // Київ: ТОВ «Доктор-Медіа», 2009. 244 с. (Tronko M.D., Mikosha A.S., Kovzun O.I., Pushkarev V.M. Function regulators of the cortex of the adrenal glands // Kiev: TOV «Doctor – Media», 2009. 244 p.)
2. Meng Q., Xia Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network // *Protein. Cell.* 2011, 2, N11, 889-898.
3. Imai T., Seo H., Murata Y., Ohno M., Satoh Y., Funahashi H., Takagi H., Matsui N. Adrenocorticotropin increases expression of c-fos and β-actin genes in the rat adrenals // *Endocrinology.* 1990, 127, N4, 1742-1747.
4. Ohno M., Seo H., Imai T., Murata Y., Miyamoto N., Satoh Y., Funahashi H., Takagi H., Matsui N. ACTH increases expression of c-fos, c-jun and β-actin genes in the dexamethasone-treated rat adrenals // *Endocrinol. Japan.* 1992, 39, 377-383.
5. LaVoie H.A., King S.R. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B // *Exp. Biol. Med.* 2009, 234, 880-907.
6. DeMorrow S., Francis H., Gaudio E. Anandamide inhibits cholangiocyte hyperplastic proliferation via activation of thioredoxin 1/redox factor 1 and AP-1 activation // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008, 294, 506-519.
7. Ковзун О.І., Левчук Н.І., Гула Н.М., Микоша О.С. Участь циклічних нуклеотидів, протеїнкіназ А та С у реалізації дії N-ацетиланоламінів в аденокортикальних клітинах людини // *Укр. біохім. журн.* 2007, 79, №5, 133-139. (Kovzun O.I., Levchuk N.I., Gula N.M., Mikosha A.S. Participation of cyclic nucleotides, protein kinases A and C in realization of N-acylethanol-amines action in human adrenocortical cells // *Ukr. Biochem. Zhurnal.* 2007, 79, N5, 133-139).
8. Lepicier P., Bouchard J.F., Lagneux C., Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia // *Br. J. Pharmacol.* 2003, 139, N4, 805-815.
9. Lee S.Y., Lee J.H., Kang K.K., Hwang S.Y., Choi K.D., Oh U. Sensitization of vanilloid receptor involves an increase in the phosphorylated form of the channel // *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28, N4, 405-412.
10. Derkinderen P., Valjent E., Toutant M., Corvol J.C., Enslin H., Ledent C., Trzaskos J., Caboche J., Girault J.A. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus // *J. Neurosci.* 2003, 23, N6, 2371-2382.
11. Fonseca B.M., Correia-da-Silva G., Teixeira N.A. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation // *Apoptosis.* 2013, 18, N12, 1526-1535.
12. Laezza C., d'Alessandro A., Malfitano A.M., Bifulco M. Anandamide inhibits the Wnt/β-catenin signalling pathway in human breast cancer MDA MB 231 cells // *Eur. J. Cancer.* 2013, 49, N8, 2066-2067.
13. Ruginsk S.G., Uchoa E.T., Elias L.L., Antunes-Rodrigues J. Anandamide modulates the neuroendocrine responses induced by extracellular volume expansion // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2013, 40, N10, 698-705.
14. Soria-Gomez E., Matias I., Rueda-Orozco P.E., Cisneros M., Petrosino S., Navarro L., Di Marzo V., Prospero-Garcia O. Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus // *Br. J. Pharmacol.* 2007, 151, N7, 1109-1116.
15. Giuliano M., Calvaruso G., Pellerito O., Portanova P., Carlisi D., Vento R., Tesoriere G. Anandamide-induced apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway // *Int. J. Mol. Med.* 2006, 17, N5, 811-819.
16. Mikosha A., Kovzun O., Zhukov A., Gulaya N. Effect of dopamine and long-chain N-acylethanolamines on steroidogenesis in rat adrenal gland in vitro // *Med. Sci. Res.* 1998, 26, 85-88.
17. Гула Н.М., Микоша О.С., Жуков О.Д., Челнакова І.С. Дія N-ацетиланоламінів на функцію кори надниркових залоз // *Укр. біохім. журн.* 2000, 72, №3, 82-86. (Gula N.M., Mikosha A.S., Zhukov A.D., Chelnakova I.S. N-acylethanolamines effects on the adrenal glands function // *Ukr. Biochem. Zhurnal.* 2000, 72, N3, 82-86).
18. Maccarrone M., Di Rienzo M., Battista N., Gasperi V., Guerrieri P., Rossi A., Finazzi-Agro A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase // *J. Biol. Chem.* 2003, 278, N36, 33896-33903.
19. Sancho R., Marco A.C., Vincenzo di M., Appendino G., Eduardo M. Anandamide inhibits Nuclear Factor-β activation through a cannabinoid receptor-independent pathway // *Mol. Pharmacol.* 2003, 63, 429-438.
20. Guidali C., Viganò D., Petrosino S., Zamberletti E., Realini N., Binelli G., Rubino T., Di Marzo V., Parolaro D. Cannabinoid CB1 receptor antagonism prevents neurochemical and behavioural deficits induced by chronic phencyclidine // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2011, 14, N1, 17-28.
21. Montecucco F., Di Marzo V., da Silva R.F. The activation of the cannabinoid receptor type 2 reduces neutrophilic protease-mediated vulnerability in atherosclerotic plaques // *Eur. Heart. J.* 2012, 33, N7, 846-856.
22. Selley D.E., Cassidy M.P., Martin B.R., Sim-Selley L.J. Long-term administration of Delta9-tetrahydrocannabinol desensitizes CB1-, adenosine A1-, and GABA-mediated inhibition of adenylyl cyclase in mouse cerebellum // *Mol. Pharmacol.* 2004, 66, N5, 1275-1284.

Оригінальні дослідження

23. Gomez R., Conde J., Scotece M., Lopez V., Lago F., Reino J.J.G., Gualillo O. Endogenous cannabinoid anandamide impairs cell growth and induces apoptosis in chondrocytes // J. Orthop. Res. 2014, 32, N9, 1137-1146.

(Надійшла до редакції 10.12.2014)

**Участие фактора транскрипции AP-1 в переносе регуляторного сигнала N-ацелированных производных этаноламина в адренокортикоцитах человека**

**Е.И. Ковзун, О.С. Лукашеня, О.А. Горносталь, А.С. Микоша**

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

**Резюме.** Исследовали мессенджерные механизмы, обеспечивающие перенос регуляторных сигналов каннабиноидов в коре надпочечников. Целью работы было определение влияния NAE на экспрессию факторов транскрипции c-jun и c-fos в коре надпочечников человека. Высказана гипотеза об участии факторов транскрипции c-jun и c-fos, которые входят в состав фактора AP-1, в переносе внутриклеточного сигнала N-ацелированных производных этаноламина. Уровень c-jun повышается на 50% под влиянием NAE в концентрации 10 мкмоль/л, а уровень c-fos достоверно увеличивается в 3 раза. Сделан вывод, что факторы транскрипции c-jun и c-fos участвуют в трансдукции сигнала NAE в адренокортикоцитах человека.

**Ключевые слова:** факторы транскрипции, трансдукция сигналов, кора надпочечников, N-ацелированные производные этаноламина.

**The involvement of transcriptional factor AP-1 of the N-acylethanolamines signal transduction in the human adrenocorticytes**

**O.I. Kovzun, O.S. Lukashenia, O.A. Gornostal, A.S. Mikosha**

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine»

**Summary.** The messenger mechanisms mediating cannabinoids regulatory signals in the adrenal cortex were studied. The aim of the work was to measure levels of transcription factors c-jun and c-fos in human adrenal cortex after N-acylethanolamines (NAE) treatment. The role of transcription factors c-fos and c-jun, which are included in AP-1 factor, attracts attention in realization of NAE signal transduction. Level expression of c-jun increased 50% after 10  $\mu$ M NAE treatment, c-fos increased 3-fold after NAE treatment. Together these finding suggest that transcriptional factors c-jun and c-fos mediate NAE signal transduction in human adrenocorticytes.

**Keywords:** transcription factors, signal transduction, adrenal cortex, N-acylethanolamines.