

ПЕРВЫЕ ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ В.Н. ОРЕХОВИЧА

УДК 577.17
©Ю.А. Панков

"Все, что видим мы, - видимость только одна,
Далеко от поверхности мира до дна,
Полагай несущественным явное в мире,
Ибо тайная сущность вещей - не видна"

Омар Хайям
900 лет назад

БЕЛКОВЫЕ ГОРМОНЫ, РЕЦЕПТОРЫ И ДРУГИЕ БЕЛКИ В МЕХАНИЗМАХ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Ю.А. Панков

Эндокринологический научный центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье 1,
эл. почта: yuri-pankov@mtu-net.ru

Первым белком, полная аминокислотная последовательность которого изучена в России, был свиной β -липотропин. Как и АКТГ, он освобождается из белкового предшественника проопиомеланокортина (ПОМК) после протеолитического расщепления. Фрагменты АКТГ и β -липотропина (α - и β -МСГ - меланокортины) в нейронах гипоталамуса являются проводниками действия лептина на аппетит и жировой обмен. Нарушение молекулярных механизмов функционирования меланокортинов или их трансмембранных рецепторов вызывает компенсаторное увеличение секреции жировой тканью лептина, который стимулирует выделение гипофизом гормона роста и гонадотропинов, и таким образом ускоряет рост тела и половое созревание. Исследования на животных с нокаутированными генами рецептора инсулина, инсулиноподобного ростового фактора I и внутриклеточных медиаторов действия гормонов раскрывают причины возникновения инсулинорезистентности и некоторых форм сахарного диабета. Анализ механизмов проведения гормональных сигналов внутриклеточными рецепторами позволяет оценить особенности молекулярной регуляции экспрессии генов стероидными и тиреоидными гормонами.

Ключевые слова: гормоны, рецепторы, лептин, меланокортины, жировой обмен, половое созревание, рост тела, проведение гормонального сигнала.

Настоящая статья подготовлена на основании выступления на первых научных чтениях, посвященных памяти В.Н. Ореховича. Автора многое связывало с Василием Николаевичем, однако, он не имел удовольствия работать в его лаборатории. Институт биологической и медицинской химии АМН, который в

БЕЛКИ В МЕХАНИЗМАХ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

течение многих лет возглавлял В.Н. Орехович, был лидером в исследовании белков, и автор поступил в институт для изучения этой проблемы. Вместе с В.Н.Ореховичем в Институте работали выдающиеся ученые: М.М Шемякин, А.Е. Браунштейн, С.Я. Капланский, Н.А. Юдаев, многие из которых впоследствии возглавили крупные научно-исследовательские институты. По количеству директоров, вышедших из одного научного учреждения, институт постоянно удерживал пальму первенства. А.Д. Мирзабеков также работал в лаборатории В.Н. Ореховича до 1961 г., да и автор, хотя и недолго, возглавлял Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов, созданный Н.А. Юдаевым. Эпиграфом к статье был выбран рубаи Омар Хайяма, который подчеркивает: задачей науки всегда было проникновение в тайную сущность вещей.

Белковые гормоны. Мой переезд в Москву в 1953 году совпал с двумя крупными событиями в биологической науке: открытием двойной спирали ДНК Watson и Crick [1] и расшифровкой аминокислотной последовательности инсулина Sanger [2]. Эти исследования открыли новую эру в биохимии и сделали первые шаги в современную геномику и протеомику. Сегодня, наверно, мало кто помнит или знает, какая первая полная первичная структура белка было изучена в России после классических работ Sanger. Можно с уверенностью полагать, что таким белком был β -липотропин, аминокислотная последовательность которого установлена в 1972 г [3] и представлена на рисунке 1 в сравнении с изученной ранее Li et al. структурой овечьего гормона [4]. Можно видеть заметные различия на карбоксильных концах белков, где располагается биологически активный пептид β -эндорфин, а также на N-конце. Однако, как показала последующая история, многие из этих различий в природе не существуют, поскольку в первых исследованиях β -липотропина были допущены ошибки: овечий гормон, так же как

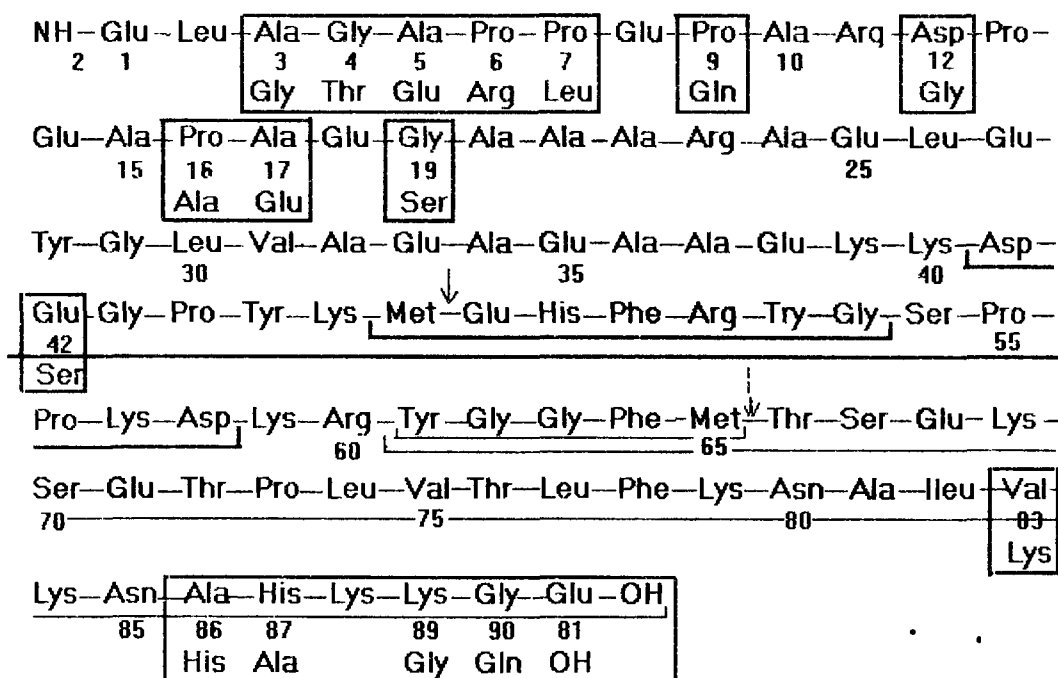


Рисунок 1.

Аминокислотная последовательность свиного β -липотропина [3]. Снизу в прямоугольниках указаны видовые различия в структуре свиного и овечьего β -липотропинов [4]. Подчеркнут жирной линией β -меланоцитстимулирующий гормон, двумя линиями - активная структура β -МСГ. Тонкой линией подчеркнут β -эндорфин. Двумя тонкими линиями - активная структура β -эндорфина. Вертикальными стрелками указаны связи, расщепляемые BrCN.

и свиной, состоит не из 90 аминокислотных остатков (а.о.), как опубликовано в первой работе, а из 91 а.о. [5, 6]. В нем переставлены местами Ala и His, потеряв остаток изолейцина, который заменен на лизин в дипептиде Ile-Ile на С-конце. Имеются ошибки в N-концевой структуре, где переставлены Thr и Gly, а также Glu и Ala [4,5]. Поэтому первая правильная и полная аминокислотная последовательность β -липотропина была изучена в Советском Союзе через 20 лет после исследований Sanger, и этот белок, как и инсулин, был пептидным гормоном. Публикация структуры свиного β -липотропина по непонятным причинам надолго задержалась [3], и работа вышла практически одновременно с другой статьёй, представлявшей С-концевую аминокислотную последовательность бычьего β -липотропина [7], на выделение и очистку которого было затрачено довольно много времени до начала изучения его первичной структуры.

Полная аминокислотная последовательность бычьего β -липотропина была опубликована через год [8]. Неожиданным в проведенных исследованиях было то, что молекула бычьего β -липотропина оказалась на два аминокислотных остатка длиннее свиного и овечьего и состояла из 93 а.о. В публикации [8] сохранились ошибочные различия между бычьим и свиным гормонами, с одной стороны, и овечьим β -липотропином, с другой. Причины некоторых неточностей в первых публикациях, по всей вероятности, были вызваны тем, что связь Ile-Ile в белках плохо расщепляется при кислотном гидролизе, и на аминокислотном анализаторе белки, содержавшие такие связи, давали один остаток Ile, а не расщепившийся дипептид Ile-Ile при этом вообще не определялся. Правильная структура овечьего β -липотропина с корректировкой допущенных ранее ошибок была вскоре опубликована Graf и Li [5].

Получив наши данные о структуре бычьего гормона, Li et al. [9] провели аналогичные исследования и очень огорчили нас тем, что, по их данным, бычий β -липотропин, так же как овечий и свиной, состоял из 91 а.о. [9]. Возникшие противоречия через шесть лет разрешили Nakanishi et al. [10], когда исследовали нуклеотидную последовательность кДНК проопиомеланокортина (ПОМК) быка (предшественника β -липотропина и АКТГ) и показали, что постулируемая на основе нуклеотидной последовательности первичная структура β -липотропина полностью совпадает с установленной нами аминокислотной последовательностью гормона [8].

В дальнейших работах были изучены β -липотропины и АКТГ разных видов животных, включая китов финвала и сейвала, и проведено сравнение видовых особенностей их структуры [11]. В β -липотропинах человека, кита и свиньи различия сосредоточены в основном на N-конце. β -Меланоцитстимулирующий гормон (β -МСГ), освобождающийся после протеолитического расщепления β -липотропина, располагается в центре и имеет практически одинаковую структуру у разных видов животных.

При анализе аминокислотных последовательностей кортикотропинов (АКТГ) [11] неожиданным в наших исследованиях оказалось полное совпадение структур АКТГ кита и человека. Коллеги в США провели аналогичные эксперименты с АКТГ кита [12] и подтвердили правильность полученных ранее результатов. Видовые различия в молекулах АКТГ локализируются на карбоксильном конце, и его активный N-концевой фрагмент (α -МСГ) у млекопитающих, птиц и рыб имеет идентичную химическую структуру. Активные участки в АКТГ и α -МСГ (MENFRWG) полностью совпадают по аминокислотной последовательности с активным центром β -МСГ в β -липотропине. Помимо действия на меланокортины кожных покровов, N-концевые пептиды АКТГ, как и фрагменты β -липотропина (α - и β -МСГ), выполняют функцию нейромедиаторов в центральной нервной системе. Они участвуют в консолидации памяти, снижают потребление пищи, активируют жировой обмен и регулируют другие физиологические функции. Поэтому продукты протеолитического расщепления ПОМК играют важную роль в регуляции многих жизненных процессов.

БЕЛКИ В МЕХАНИЗМАХ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Нуклеотидные последовательности генов гормонов. Совершенно естественным было наше стремление исследовать нуклеотидные последовательности кДНК ПОМК человека и животных, с тем, чтобы сравнить изученные аминокислотные последовательности гормонов с кодирующими их нуклеотидными последовательностями. Такая работа была проведена в сотрудничестве с коллегами из Новосибирского института биоорганической химии во главе с Н.П. Мертвецовым [13-15]. Первоначально в Новосибирске работали в основном с клонотеками из гипофизов животных. В исследованиях нуклеотидной последовательности кДНК ПОМК крупного рогатого скота еще раз была подтверждена правильность установленной ранее структуры бычьего β -липотропина [8,13,14]. Естественно, что ценность любых исследований возрастает, когда они проведены не только на животных, но и на ткани человека. В результате сотрудничества ученых разных институтов была создана клонотека кДНК из гипофизов людей. В то время были приложены немалые усилия, чтобы накопить гипофизы человека в Институте скорой помощи им. Склифосовского и доставить в глубоко замороженном состоянии из Москвы в Новосибирск так, чтобы сохранить в них полноразмерные матричные РНК для создания клонотеки кДНК. Работа проводилась только зимой в сильные морозы, чтобы исключить непредвиденные случайности при доставке замороженной ткани в дуаре с жидким азотом на большое расстояние. (Гипофизарная ткань человека представляла большую ценность). Эту работу успешно провела внс М.К. Чехранова, взявшая на себя самую трудоемкую часть исследований. На основе клонотеки был получен и отсекавенирован клон кДНК ПОМК человека [15]. К тому времени была известна только нуклеотидная последовательность экзонов гена ПОМК человека [16,17], а в нашей работе установлена структура кДНК предшественника.

Лептин - новый гормон в эндокринологии. Продукты, образующиеся в результате протеолитического процессинга ПОМК (меланокортины), в последнее время приобрели особую важность, поскольку являются проводниками биологического действия нового гормона лептина на аппетит и потребление пищи [18,19]. Лептин секретируется в кровь жировой тканью [18]. Большую часть своих эффектов гормон осуществляет через действие на центральную нервную систему [20], где он вызывает снижение чувства голода (рис.2). Помимо обмена липидов, лептин регулирует половое созревание, рост тела, секрецию гипофизом тропных гормонов, он необходим для проявления нормального биологического действия инсулина, поэтому при дефиците этого гормона у животных развивается сахарный диабет [18-20].

После связывания с рецептором на нейронах гипоталамуса, синтезирующих гонадолиберин, лептин стимулирует биосинтез этого медиатора и увеличивает секрецию гипофизом гонадотропинов: лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, которые активируют половое созревание и репродуктивную функцию [20]. Лептин может действовать и прямо на репродуктивные органы, минуя гипофиз, поскольку в яичниках и семенниках идентифицированы активные рецепторы лептина. Когда гормон связывается с рецептором на нейронах, синтезирующих соматолиберин (рилизинг гормон гормона роста), он увеличивает секрецию гипофизом соматотропина и стимулирует рост тела животных и человека.

После связывания с рецептором в нейронах гипоталамуса лептин активирует экспрессию гена ПОМК, что увеличивает биосинтез проопиомеланокортина, после протеолитического расщепления которого в нейронах освобождаются нейромедиаторы α -, β - и γ -МСГ - проводники действия лептина на аппетит, потребление пищи и другие физиологические функции, включая и действие эндогенного инсулина на углеводный обмен. Поэтому мутации в гене ПОМК нарушают нормальную экспрессию гена, тормозят биосинтез меланокортинов в нейронах и блокируют вызываемые лептином снижение аппетита и уменьшение

потребления пищи, что приводит к развитию ожирения. Нокаутирование гена ПОМК у мышей вызывает увеличение потребления пищи и развитие ожирения [21]. Естественно, у таких животных в отсутствие АКГГ и других пептидов ПОМК, не развиваются надпочечники, и в крови не определяются ни кортикостерон, ни альдостерон, что указывает на полную блокаду функции этого важного эндокринного органа и снижает жизнеспособность мутантных животных. Кроме того, ожирение у них сочетается с желтой окраской шерсти вследствие дефицита меланокортинов. После рождения гомозиготные мыши с нокаутированным геном ПОМК не отличаются от помета дикого типа, следовательно, их эмбриональное развитие проходит нормально, но через три месяца их вес в 2 раза превышает норму. В отличие от мышей *ob/ob* с мутациями в гене лептина, характеризующихся уменьшением длины тела, мыши с нокаутированным геном ПОМК вместе с накоплением жира имеют увеличенные линейные размеры. При ожирении у мутантных гомозигот в 5 раз повышается концентрация лептина в крови, который не способен регулировать потребление пищи в отсутствие ПОМК, но сохраняет стимулирующее действие на секрецию гипофизом гормона роста и таким образом активирует рост тела (рис. 2). У гетерозиготных мутантных мышей содержание лептина в крови увеличивается в 2 раза по сравнению с нормой, но никаких изменений веса тела не происходит, поскольку частичный дефицит меланокортинов компенсируется увеличенной секрецией лептина адипоцитами. В литературе описаны два пациента - дети с мутациями в гене ПОМК, которые блокировали его экспрессию и вызвали развитие ожирения с рыжей окраской волос [22].

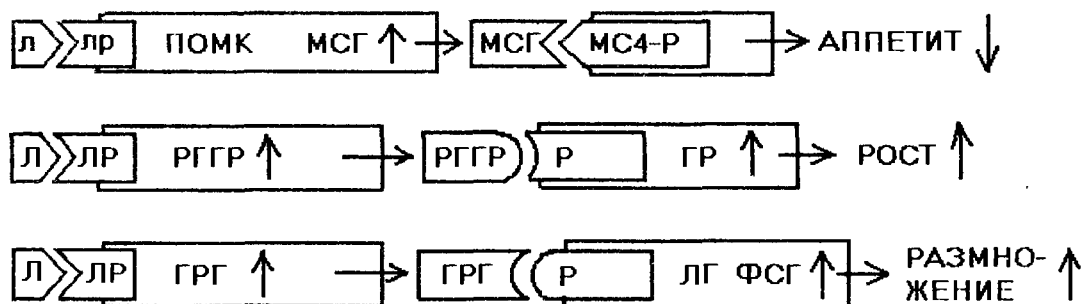


Рисунок 2.

Действия лептина через нейроны гипоталамуса на потребление пищи, рост и половое созревание.

Обозначения: Л - лептин, ЛР - рецептор лептина, МСГ - меланоцитстимулирующий гормон, МС4-Р - рецептор МСГ в гипоталамусе, РГР - рилизинг гормон гормона роста (соматолиберин),

ГРГ - рилизинг гормон гонадотропинов (гонадолиберин), Р - рецепторы соматолиберина и гонадолиберина (см. текст).

В наших исследованиях, наряду с серией известных мутаций, идентифицирована не описанная в литературе гетерозиготная мутация в гене ПОМК, которая приводит к замене в активном центре α -МСГ Phe118Leu [23]. Она переводит активную структуру нейромедиатора α -МСГ из HFRW в HLRW, что приводит к его инактивации и вызывает развитие ожирения у всех женщин в исследованной родословной. Возможно, такая мутация, помимо инактивации части синтезирующегося в нейронах α -МСГ, создавала также конкурентный ингибитор нейромедиатора в гипоталамусе и таким образом препятствовала его снижению действию на аппетит.

Рецепторы гормонов, взаимодействующие с JAK и STAT. В последнее время значительные успехи достигнуты в изучении структуры и механизмов функционирования лептинового рецептора, который относится к группе цитокиновых рецепторов класса I и является трансмембранным белком. Рецепторы этого класса являются проводниками биологического действия гормона

БЕЛКИ В МЕХАНИЗМАХ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

роста, пролактина, эритропоэтина, лептина и многих цитокинов. Все перечисленные гормоны характеризуются преобладанием α -спиральных структур в пространственной конформации молекул, поэтому их часто называют узлами из трех или четырех α -спиралей. Особенности функционирования рецепторов этих гормонов можно проследить на примере молекулярных механизмов действия пролактина [24]. Два сайта связывания с рецептором создаются в молекуле гормонов тремя α -спиральями. В отличие от гормонов один сайт связывания лиганда в рецепторе формируется N-концевым β -структурным доменом.

Обычно цитокиновый рецептор класса I кодируется одним геном, однако в результате альтернативного сплайсинга синтезируется серия рецепторов, которые имеют одинаковые внеклеточные домены, связывающие гормон, но различаются длиной и аминокислотной последовательностью внутриклеточных доменов. В случае пролактина синтезируется четыре варианта его рецептора, а в случае лептина - пять у мышей и четыре у человека. После связывания гормона происходит димеризация рецептора на мембране и его активация (рис. 3). С внутриклеточным доменом рецепторов нековалентно связана киназа Януса или JAK (just another kinase - JAK, просто другая киназа), которая активируется связыванием лиганда с рецептором. Киназа Януса катализирует фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецептора и в самом ферменте. В цитоплазме клеток присутствуют белки - факторы транскрипции STAT (signal transducers and activators of transcription - STAT, проводники сигнала и активаторы транскрипции). Они имеют специальные SH2 домены, которые связываются с фосфорилированными остатками тирозина в цитоплазматическом домене рецептора и в киназе Януса. Активированная гормоном киназа катализирует фосфорилирование остатков тирозина в рецепторе, в самой киназе и в молекулах белков STAT, связанных с рецептором и JAK. Фосфорилирование вызывает диссоциацию белков STAT от внутриклеточного домена рецептора и от JAK и соединение двух молекул факторов транскрипции с образованием димера за счет взаимодействия фосфотирозинов в

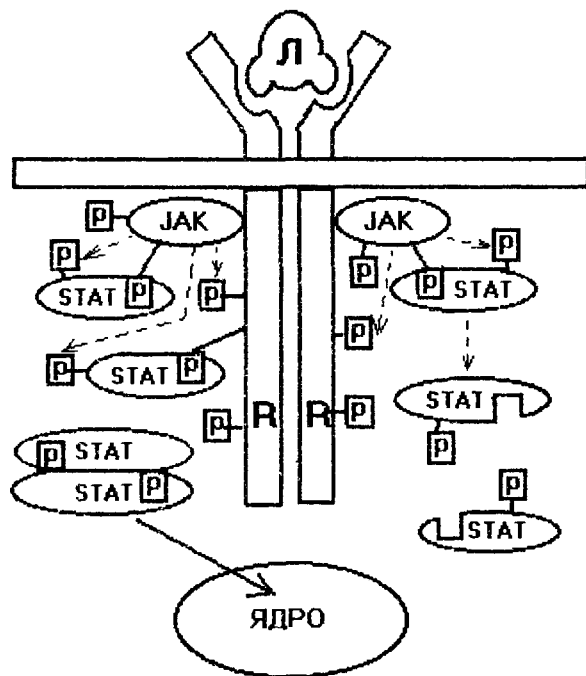


Рисунок 3.

Димер рецептора лептина в мембране и его функционирование. Л - лептин, R - внутриклеточный домен рецептора, JAK - киназа Януса, STAT - факторы транскрипции - проводники гормонального сигнала в ядро, p - фосфорилированные остатка тирозина в белке (см. текст).

одной молекуле STAT с SH2 доменом в другой молекуле. После этого димеры STAT приобретают способность проникать в ядро, где связываются с регуляторными последовательностями ДНК и стимулируют экспрессию генов, которые активируют биосинтез в цитоплазме белков-медиаторов биологического действия лептина, пролактина, гормона роста и других гормонов.

Все органы и ткани животных и человека являются эндокринными. Поскольку адипоциты жировой ткани синтезируют и секретируют в кровь белковый гормон лептин, который регулирует различные физиологические функции, то подкожная жировая клетчатка является важным эндокринным органом, и развитие ожирения у животных и человека следует рассматривать как нарушение эндокринной функции этой ткани [20]. Последние открытия позволяют выдвинуть гипотезу о том, что не только жировая ткань, но и другие органы, ткани и клетки также являются эндокринными [25,26]. Отдельные публикации о способности некоторых органов, традиционно не относившихся к эндокринным, секретировать в кровь гормоны, регулярно появлялись в научных журналах. Однако, первое подробное обсуждение этой проблемы опубликовано в журнале "Вопросы медицинской химии" в 1996 году [25]. Тогда выдвинутая гипотеза еще вызывала сомнение, и в заголовке стоял знак вопроса. Позднее сомнения рассеялись, и в журнале "Вестник РАМН" постулат **"Все органы, ткани и клетки животных и человека являются эндокринными"** представлен без знака вопроса [26].

Рецепторы гормонов с 7 трансмембранными доменами. Меланокортины - проводники биологического действия лептина - выполняют свою функцию через связывание с рецепторами, из которых MC3-R и MC4-R экспрессируются только в центральной нервной системе. После взаимодействия с MC4-R меланокортины вызывают снижение аппетита, уменьшают потребление пищи, стимулируют сгорание жира и таким образом поддерживают нормальный вес тела [20].

Рецепторы меланокортинов являются представителями другого класса мембранных рецепторов, отличных от рецептора лептина. Они имеют 7 трансмембранных доменов, один экстраклеточный, один цитоплазматический домен и по три петли на внешней и на внутренней поверхности мембраны. С участием рецепторов такого типа выполняют биологическую функцию больше половины всех известных гормонов, в число которых входят гипофизарные гормоны (за исключением соматотропина и пролактина), паратгормон, глюкагон, все релизинг гормоны гипоталамуса и катехоламины. Представители этого семейства рецепторов являются уникальными в том плане, что они не объединяются в димеры на мембранах при проведении гормональных сигналов, тогда как все другие рецепторы, подвергаются димеризации либо на мембране клеток, либо в ядре.

Рецептор катехоламинов имеет самый короткий экстраклеточный домен, состоящий из 34 а.о. В отличие от аналогичных рецепторов других гормонов, его N-концевой домен не принимает участия в связывании низкомолекулярных лигандов: адреналина и норадреналина, которые взаимодействуют только с наружными петлями пептидной цепи рецептора [27]. Самый длинный внеклеточный домен имеет рецептор тиреотропного гормона (ТТГ), состоящий из 408 а.о. [28]. Он синтезируется в щитовидной железе и участвует в регуляции секреции тиреоидных гормонов: тироксина и трийодтиронина. С ним связывается ТТГ, а также антитела к рецептору. В экстраклеточном домене имеются пептидные участки, с которыми связывается только ТТГ, а также структуры, которые связывают стимулирующие антитела и активируют эндокринную функцию щитовидной железы, и аминокислотные последовательности, связывающие антитела, блокирующие проведение гормонального сигнала. С внутриклеточными петлями рецептора ТТГ связаны три молекулы G-белков.

Подсемейство G-белков входит в большое суперсемейство, которое включает белки, связывающие гуанозинтрифосфат (GTP). Представителями суперсемейства являются Ras- и Ras-подобные белки, а также факторы инициации

и элонгации синтеза белков на рибосомах. Хотя в подсемействе G-белков имеется значительное разнообразие, входящие в него продукты характеризуются общими чертами. Они являются гетеротримерами, состоящими из α , β и γ субъединиц, которые кодируются разными генами [27]. Из них только α -субъединица связывает гуаниновые нуклеотиды и обладает гуанозинтрифосфатазной активностью (GTP-аза); β и γ субъединицы соединены друг с другом нековалентно и образуют единый $\beta\gamma$ -комплекс. Тройной комплекс G-белка обычно находится в контакте с рецептором внутри клетки, и в этом состоянии α -субъединица связана с GDP и неактивна. Присоединение гормона к экстраклеточному домену рецептора вызывает освобождение GDP от α -субъединицы, а поскольку концентрация GTP в цитоплазме на порядок превышает содержание в ней GDP, освободившееся место занимает GTP, что вызывает, с одной стороны, диссоциацию G-белка от рецептора, а с другой, освобождение α -субъединицы, связанной с GTP, из комплекса с $\beta\gamma$ -комплексом. Активированная свободная α -субъединица связывается с аденилатциклазой, встроенной в мембрану клетки, и индуцирует ее активность. Аденилатциклаза катализирует превращение АТФ в сАМР, так что концентрация сАМР в клетке увеличивается в сотни раз. Поскольку α -субъединица обладает GTP-азной активностью, она, хотя и медленно, превращает связанный с ней GTP в GDP, что направляет весь каскад реакций в обратную сторону, т.е. вызывает диссоциацию α -субъединицы от аденилатциклазы и индуцирует прекращение образования сАМР, что приводит к уменьшению концентрации сАМР в клетке. Освободившаяся α -субъединица соединяется с $\beta\gamma$ -комплексом, и образовавшийся G-белок снова присоединяется к внутриклеточному домену рецептора [27].

Идентифицирована серия сайтов ДНК, связывание с которыми факторов транскрипции активируется сАМР и запускает экспрессию генов. Такие сайты получили название CRE (сАМР -response elements) [29], и первой их канонической последовательностью был идентифицирован полиндромный мотив TGACGTCA. В действительности сайтов CRE в геноме много [29].

Дальнейшая активация экспрессии генов под влиянием большой группы гормонов осуществляется через сАМР, который связывается с протеинкиназой А и вызывает ее диссоциацию на регуляторные и каталитические субъединицы, что индуцирует протеинкиназную активность фермента и увеличивает фосфорилирование факторов транскрипции. Последние связываются с промоторными участками ДНК и регулируют экспрессию генов, активность которых контролируется гормонами [29]. К таким факторам транскрипции относятся CRE-BP1, CREB и другие белки. Общими характеристиками их структуры является наличие кластеров основных (положительно заряженных) аминокислотных остатков, участвующих в связывании с ДНК, и расположенной рядом с ними лейциновой застеежкой молнией, которая формирует димер [29] (рис. 4). В рассмотренное семейство факторов транскрипции входят также белки, которые не обязательно активируются сАМР, типа ATF, JUN и FOS, которые могут образовывать между собой гетеродимеры и таким образом существенно усложняют всю картину регуляции экспрессии генов.

На рисунке 4 схематически представлена структура фактора транскрипции, который в виде димера связывается с нуклеотидной последовательностью ДНК и индуцирует экспрессию генов. С участием таких механизмов выполняют биологические функции катехоламины, тиреотропный гормон, гонадотропины, АКТГ и другие гормоны.

Относящиеся к этой же группе гормонов меланокортины, которые являются проводниками гормонального сигнала лептина в центральной нервной системе, связываются с рецептором MC4-R в нейронах гипоталамуса и вызывают снижение аппетита, уменьшают потребления пищи и регулируют жировой обмен. Нокаутирование гена рецептора MC4-R у мышей блокирует действие лептина на потребление пищи и жировой обмен, и таким образом вызывает у них развитие ожирения [30] (рис. 3). При таком повреждении, так же как при нокаутировании

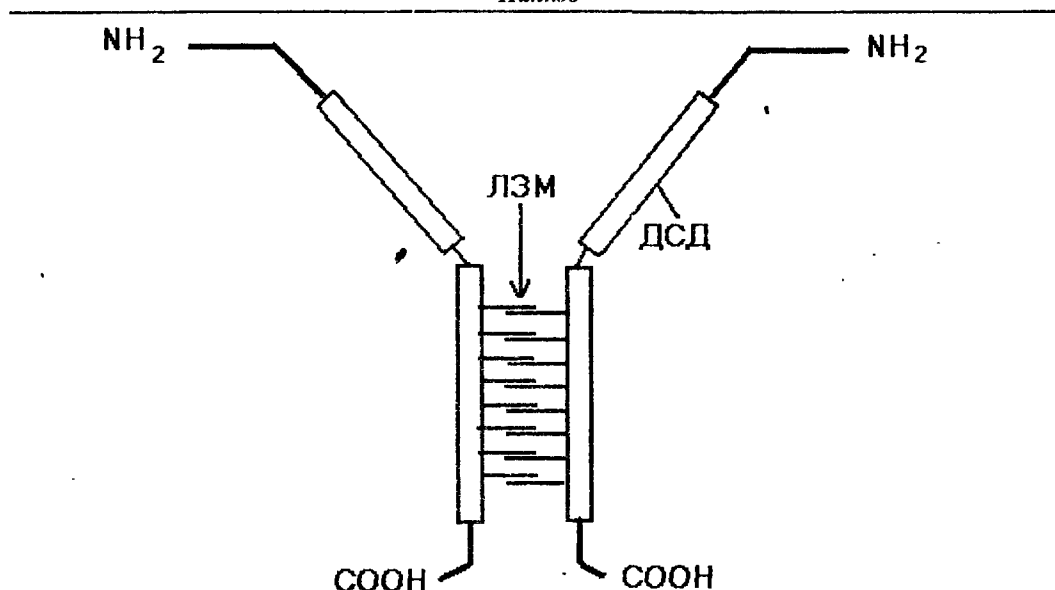


Рисунок 4.

Схема строения CREB - фактора транскрипции, проводника гормональных сигналов с участием G-белков, cAMP и протеинкиназы А. Обозначения: ЛЗМ лейциновая застежка молния, ДСД - домены связывания с ДНК.

гена ПОМК [21] (см. выше), нарушается только жировой обмен, а рост животных даже увеличивается по сравнению с нормой за счет повышенной стимуляции лептином секреции гормона роста. Никаких нарушений репродуктивной функции при этом также не происходит, поскольку действие лептина на нейроны, синтезирующие гонадолиберин, и его действие на рецепторы лептина в самих репродуктивных органах сохраняются. Таким образом, ожирение животных, которое вызывается нокаутированием гена рецептора MC4-R, связывающего пептиды ПОМК, обнаруживает некоторые общие черты с ожирением, вызванным дефицитом самого ПОМК. В обоих случаях ожирение сопровождается увеличением роста тела, вследствие повышенной секреции лептина адипоцитами, и отсутствием нарушения репродуктивной функции, которые обычно наблюдаются у животных при повреждениях гена лептина или гена его рецептора. Интересная проблема, которая требует специального изучения, заключается в том, что после нокаутирования гена MC4-R у животных вместе с нарушением регуляции потребления пищи развивается инсулинорезистентность [30]. В литературе описано три пациента с гетерозиготными мутациями в гене MC4-R, которые вызываются делецией или вставкой 4х нуклеотидов в экзоны гена, что приводит к сдвигам рамки считывания и блокирует синтез активного рецептора [31,32]. При развитии ожирения у них не нарушаются рост и половое созревание, но выявляются признаки инсулинорезистентности, как у животных с нокаутированным геном MC4-R.

В наших исследованиях был проведен скрининг мутаций в гене MC4-R в московской популяции пациентов с ожирением и здоровых лиц, и идентифицирована не описанная ранее мутация. Она выражается в замене гидрофильного остатка Ser на гидрофобный Leu в третьем трансмембранном домене рецептора вблизи наружной поверхности клеточной мембраны. Эта мутация идентифицирована у людей в сочетании с другой мутацией Val103Ile в той же нуклеотидной цепи гена MC4-R [33]. Такой гаплотип может нарушать действие лептина на нейроны гипоталамуса, регулирующие потребление пищи, и predisполагать людей к развитию ожирения без нарушения других физиологических функций.

БЕЛКИ В МЕХАНИЗМАХ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Рецепторы гормонов из двух субъединиц. Особую группу трансмембранных рецепторов составляют рецепторы инсулина и инсулиноподобного ростового фактора I (ИРФ I) [34,35]. Ген рецептора инсулина у человека располагается на коротком плече хромосомы 19 и содержит 22 экзона. Идентифицировано несколько сайтов начала транскрипции, множество сайтов полиаденилирования и различные варианты сплайсинга 11 экзона, в результате чего он либо включается в структуру мРНК рецептора, либо удаляется из нее. В результате в разных тканях синтезируются несколько вариантов рецептора инсулина. Две молекулы синтезированного прорецептора соединяются межсубъединичными дисульфидными связями и закрепляются на мембране. В результате протеолитического расщепления в области четырех основных аминокислот RKRR происходит расщепление прорецептора на α и β -субъединицы, которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками. Шапероны придают правильную конформацию экстраклеточному домену рецептора, и он приобретает способность связывать инсулин. После соединения гормона с внеклеточной α -субъединицей активируется тирозинкиназная функция внутриклеточной β -субъединицы, которая катализирует фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецептора и в других белках цитоплазмы - субстратов инсулинового рецептора (СИР 1, 2, 3, и 4, а также белков Grb-1 и Shc) [36]. Субстраты содержат 10-20 остатков тирозина, подвергающиеся фосфорилированию, и являются проводниками действия гормона в клетке. Фосфорилированные и активированные СИР нековалентно связываются с фосфатидилинозитол-3-киназой (ФИ-3К) и увеличивают его ферментативную активность в 20-50 раз. ФИ-3К является основным проводником биологического действия инсулина и участвует в стимуляции трансмембранного переноса глюкозы, биосинтеза белка, синтеза гликогена, роста тканей и регуляции экспрессии генов, которые лежат в основе процессов регуляции обмена веществ инсулином.

Нокаутирование одного из генов *СИР* обычно вызывает компенсаторное увеличение фосфорилирования другого *СИР*. *СИР-1* является проводником действия не только инсулина, но и ИРФ I. Поэтому повреждение гена *СИР-1* сопровождается некоторой задержкой роста, нарушением толерантности к глюкозе, но не приводит к развитию сахарного диабета. Нокаутирование же гена *СИР-2*, наоборот, индуцирует развитие сахарного диабета, хотя слабее влияет на инсулинорезистентность и в отличие от повреждения гена *СИР-1* не сопровождается задержкой роста экспериментальных животных [36].

Гомозиготные мыши с нокаутированным геном инсулинового рецептора во всех тканях нормально развиваются в эмбриогенезе, но погибают через неделю после рождения от кетоацидоза, вызванного абсолютной невосприимчивостью новорожденных мышей к действию эндогенного инсулина. Гетерозиготные мыши, у которых повреждена только одна аллель гена инсулинового рецептора, не проявляют признаков гипергликемии, но биологическая эффективность инсулина у них снижается на 50%. Такое нарушение компенсируется повышением секреции инсулина поджелудочной железой. У смешанных гетерозигот с двумя нокаутированными генами (инсулинового рецептора и *СИР-1*) метаболические нарушения становятся более выраженными. У них в 10 раз увеличивается концентрация инсулина в крови по сравнению с нормой, и через 6 месяцев у 50% таких мышей развивается сахарный диабет [36]. Таким образом, совместное частичное повреждение двух посредников проведения гормонального сигнала инсулина в клетке, инсулинового рецептора и *СИР-1*, усиливает недостаточность каждого из них в отдельности в несколько раз и может служить экспериментальной моделью развития некоторых форм инсулиннезависимого сахарного диабета у человека.

Избирательное нокаутирование гена инсулинового рецептора не во всем организме, а только в отдельных органах, например, в мышцах или жировой ткани обычно не приводит к существенным нарушениям обмена веществ, тогда как повреждение гена рецептора инсулина только в печени вызывает развитие тяжелой формы инсулинорезистентности [37]. Эти результаты подтверждают известный

поступат, что печень является основным органом-мишенью инсулина, и потеря ею способности воспринимать эффект гормона вызывает нарушение обмена веществ во всем организме.

Через рецептор, сходный по структуре с рецептором инсулина, осуществляю биологическое действие инсулиноподобные ростовые факторы. Описаны варианты образования комбинированных димеров, когда один мономер представлен рецептором инсулина, а другой - рецептором ИРФ. В этом случае расширяются возможности проведения гормональных сигналов, и действие гормонов на метаболические процессы может взаимно усиливаться. Возможно, здесь происходит "перекрест" в механизмах действия разных гормонов, и поэтому дефицит ИРФ 1 нарушает нормальное функционирование инсулина и вызывает у животных развитие инсулинорезистентности [38].

В настоящем сообщении рассмотрены трансмембранные рецепторы - проводники биологического действия гормонов, молекулы которых отличаются гидрофильными свойствами и не способны проникать через липидные мембраны клеток, а, следовательно, и в их ядра, и могут проявлять свое действие только через рецепторы, экспонированные на внешней поверхности клеточных мембран. Молекулярные механизмы и цитоплазматические белки, участвующие в проведении гормональных сигналов через трансмембранные рецепторы, существенно различаются при регуляции физиологических функций разными группами гормонов.

Внутриклеточные рецепторы липофильных гормонов. Липофильные стероидные и тиреоидные гормоны осуществляют регулирующее действие на обмен веществ другим путем, они свободно проникают в цитоплазму через клеточную мембрану, связываются с белковыми рецепторами, которые локализуются либо непосредственно в ядре, либо легко проникают в ядро из цитоплазмы после связывания с ними гормонов. По современным представлениям, только рецепторы глюкокортикоидов и минералокортикоидов исходно присутствуют в цитоплазме. В отличие от них рецепторы прогестерона и эстрогенов, а также рецепторы тиреоидных гормонов, ретиноевой кислоты и витамина D постоянно локализуются в ядре. Рецепторы стероидных гормонов обычно связаны в цитоплазме с тремя различными молекулами белков теплового шока, которые принимают участие в формировании грегичной структуры рецепторов. После связывания с гормоном происходит отделение белков теплового шока от рецептора, и гормон-рецепторный комплекс проникает в ядро, где взаимодействует с ДНК. Другие рецепторы слабее или вообще не связываются с белками теплового шока, поэтому они исходно локализуются в ядре. Все рецепторы, относящиеся к этому классу, имеют общие черты строения и молекулярных механизмов проведения гормональных сигналов [39].

В структуре рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов идентифицированы четыре субдомена: N-концевой, самый вариабельный (его также называют доменом A/B); центральный, высококонсервативный, ДНК-связывающий домен (C); короткий "шарнирный" участок (D) и длинный C-концевой лигандсвязывающий домен (E), куда входят консервативные области, участвующие в ассоциации с белками теплового шока, димеризации и транслокации в ядро. В активации транскрипции принимают участие все структуры рецептора, за исключением домена C [39].

В домене C, участвующем в связывании с ДНК, имеются два цинковых пальца за счет фиксации ионов цинка между четырьмя остатками цистеина (рис. 5), Р-бокс, определяющий взаимодействие с гормончувствительными элементами в нуклеотидной последовательности ДНК, и D-петля, участвующая в формировании димера рецепторов [39]. Функционально активная форма рецепторов является димером, и именно в форме димера рецепторы связываются с ДНК и активируют транскрипцию.



Структура цинковых пальцев в рецепторах стероидных и тиреоидных гормонов (см. текст).

В заключении следует отметить, что анализ современной биохимии гормонов и молекулярных механизмов их действия, которые лежат в основе различных физиологических процессов, позволяют сформулировать следующее определение жизни: "Жизнь есть существование, взаимодействие (функционирование) и воспроизведение уникальных и высокоорганизованных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей". Впервые оно прозвучало в 1991 году [11], а второй раз через 10 лет [41]. Действительно, в основе всех жизненных процессов в органах и тканях животных и человека лежат постоянные взаимодействия аминокислотных последовательностей между собой, нуклеотидных последовательностей между собой, и, наконец, аминокислотных последовательностей с нуклеотидными последовательностями в различных

клеточных структурах. Мозг в этом отношении не является исключением, и основу происходящих в нем нервных процессов и механизмов памяти составляют разнообразные лабильные и стабильные комплексы нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, т.е. белков и нуклеиновых кислот. Такие взаимодействия происходят во всех структурах клеток живого организма: ядрах, рибосомах, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и др.

Таким образом, в мировой науке происходят перемены, которые усложняют общую картину биохимических процессов в живой природе и радикально изменяют облик современной биологической науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Watson J.D., and Crick F.H.C.* (1953) *Nature*, **171**, 737-738
2. *Sanger F., and Thompson E.O.P.* (1953) *Biochem.J.*, **53**, 366-372
3. *Панков Ю.А., Юдаев Н.А.* (1972) *Биохимия*, **37**, 991-1031.
4. *Li, C.H., Barnafi, L., Chretien, M., and Chung, D.* (1965) *Nature*, **208**, 1093-1094.
5. *Graf, L., and Li, C.H.* (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1304-1309.
6. *Панков Ю.А.* (1980) *Вестник АМН СССР*, N 7, 61-71.
7. *Панков Ю.А.* (1972) *Биохимия*, **37**, 1095-1096.
8. *Панков Ю.А.* (1973) *Вопр. мед. химии*, **19**, 330-332.
9. *Li, C.H., Tan, L., and Chung, D.* (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1088-1093.
10. *Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., and Numa, S.* (1979) *Nature*, **278**, 423-427.
11. *Pankov, Yu. A.* (1991) *Sov. Med. Rev. B. Physicochemical Aspects of Med.*, **2**, 109-145.
12. *Kawauchi, H., Muramoto, K., and Ramachandran, J.* (1978) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **12**, 318-321.
13. *Мертвецов Н.П., Головин С.Я., Беклемишев А.Б., Каргинов В.А., Мамаев Л.В., Скобельцина Л.М., Зеленин С.М., Морозов И.В., Бондарь А.А., Панков Ю.А.* (1987) *Биохимия*, **52**, 707-714.
14. *Беклемишев А.Б., Головин С.Я., Ильичев А.А., Мамаев Л.В., Красных В.Н., Каргинов В.А., Панков Ю.А., Мертвецов Н.П.* (1987) *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, **10**, 19-23.
15. *Головин С.Я., Каргинов В.А., Бондарь А.А., Беклемишев А.Б., Чехранова М.К., Мертвецов Н.П., Панков Ю.А.* (1987) *Биоорганическая химия*, **13**, 562-564.
16. *Takahashi, H., Teranishi, Y., Nakanishi, S., and Numa, S.* (1981) *FEBS Letters*, **135**, 97-101.
17. *Takahashi, H., Hakamote, Y., and Watanabe, Y.* (1983) *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6847-6852.
18. *Zhang, Y., Proenca, P., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M.* (1994) *Nature*, **372**, 425-432.
19. *Панков Ю.А.* (1996) *Биохимия*, **61**, 705-710.
20. *Панков Ю.А.* (1999) *Биохимия*, **64**, 725-734.
21. *Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender U.* (1999) *Nature Med.*, **9**, 1066-1070.
22. *Krude, H., Bieberman, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Gruters, A.* (1998) *Nature Genet.*, **19**, 155-157.
23. *Панков Ю.А., Яцышина С.К., Карпова С.К., Чехранова М.К., Попова Ю.П., Григорян Е.И., Розаев Е.И.* (2002) *Вопросы мед. химии*, **48**, 120-131.
24. *Bole-Feysot, C., Coffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P.A.* (1998) *Endocrine Reviews*, **19**, 225-268.
25. *Панков Ю.А.* (1996) *Вопросы мед. химии*, **42**, 179-184.

БЕЛКИ В МЕХАНИЗМАХ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

26. Панков Ю.А. (2001) Вестник РАМН, N 5, 14-19.
27. Ломасни Д.У., Аллен Л.Ф., Лефковитц Р.Д. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология, (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва, с. 113-129.
28. Кон Л.Д., Бан Т., Окаджима Ф., Шимура Х., Шимура Й., Хидака А., Джулиано Ц., Наполитано Д., Косуги Ш., Икуяма Ш., Акамизу Т., Тахара К., Саджи М. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология, (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва с. 130-151.
29. Пестелл Р.Д., Джеймсон Д.Л. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва, с. 58-75.
30. Huzar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeir, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, E.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Lee, F. (1997) Cell, **88**, 131-141.
31. Yeo, G.S.H., Farooqi, S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., and O'Rahilly, S. (1998) Nature Genet., **20**, 111-112.
32. Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., and Froguel, P. (1998) Nature Genet. **20**, 113-114.
33. Yatsyshina, S.B., Chekhranova, M.K., Karpova, S.K., and Pankov, Y.A. (2002) ENEA 2002 MUNICH, 10th Meeting of European Neuroendocrine Association, September 12-14. Programme and Abstracts, p. 57.
34. Коллер Э.А., Акцили Д., Тейлор С.И. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва, с. 277-290.
35. ЛеРоит Д., Адамс М., Вернер Х. Робертс Ч.Т. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва, с. 178-190.
36. Панков Ю.А. (1999) Биохимия, **64**, 117-120.
37. Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Rostic, C., and Kahn, C.R. (2000) Mol. Cell, **6**, 87-98.
38. Pankov Yu.A. (2001) Molecular Biology, **35**, 315-317.
39. Инг Н.Г., О'Мэлли Б.У. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва, с. 191-212.
40. Уильямс Г.Р., Брент Г.А. (2003) В кн. Молекулярная эндокринология (под. ред. Вайнтрауба Б.Д.), Медицина, Москва, с. 213-233.
41. Панков Ю.А. (2001) Журнал эволюционной биохимии и физиологии, **37**, 442-445.

Поступила 03.01.2004.

PEPTIDE HORMONES, RECEPTORS AND OTHER PROTEINS IN THE MECHANISMS OF HORMONAL REGULATION

Yu.A. Pankov

Endocrine Research Centre of RAMS, , Moscowrechy str. 1, Moscow, 115478 Russia;
e-mail: yuri-pankov@mtu-net.ru

The amino acid sequence of porcine β -lipotropin was the first protein primary structure studied in Russia. This peptide as well as ACTH is liberated after proteolysis of proopiomelanocortin (POMC). α -MSH and β -MSH (melanocortins), which are the fragments of ACTH and β -lipotropin respectively, are the mediators of leptin action on appetite and lipid metabolism. The structure and molecular aspects of hormone signaling of the membrane receptors of leptin and melanocortins were analysed in the connection to the regulation of food consumption, growth, and puberty. Some aspects of insulin receptor and IGF-I receptor as well as intracellular receptors of lipid hormones (steroid and thyroid hormones) were also discussed. The postulate: "All organs, tissues, and cells of humans and animals are endocrine" is formulated on the basis of the accumulated data.

Key words: hormone, receptor, leptin, melanocortin, lipid metabolism, puberty, growth, hormone signaling.