

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ АППАРАТОМ КЛЕТКИ

Э. С. ГЕВОРКЯН

В статье суммированы литературные данные по механизму действия глюкокортикоидных гормонов в ядрах клеток. Основное внимание уделяется взаимодействию гормон-рецепторных комплексов с акцепторными участками в ядре, приводящему к специфическому активированию генетического аппарата. Приводятся современные представления о механизме этого взаимодействия.

Имеющиеся в литературе многочисленные данные по механизму действия стероидных гормонов в разных тканях свидетельствуют о том, что эти гормоны способны регулировать метаболическую активность клеток-мишеней, контролируя синтез РНК, и что, по-видимому, существует универсальный механизм действия всех стероидов [24, 29, 38, 44, 45, 47, 62, 63]. В настоящее время считается доказанным, что стероидные гормоны, входящие в клетку, прочно и специфически связываются с цитоплазматическими белками-рецепторами [8, 10, 11, 17, 56]. В результате такого связывания происходит образование комплексов гормон—рецептор, которые, активируясь, становятся способными взаимодействовать с определенными участками хроматина [5, 6, 12, 14, 19, 40, 43, 49, 57, 58]. Такой механизм лежит в основе действия всех стероидных гормонов.

Наряду с этим, разнообразие наблюдаемых физиологических ответов тканей на разные стероидные гормоны является следствием сложного и специфического взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с разными акцепторными участками ядра. Именно этот этап в сложном, многоступенчатом механизме действия стероидных гормонов является важным в аспекте изучения механизмов активации генной экспрессии гормонами, как одной из форм внутриклеточной регуляции.

При изучении взаимодействия стероид-рецепторных комплексов с ядром ряд авторов наблюдали насыщение связывания с повышением содержания рецепторов в пробах при постоянной концентрации ядерных компонентов [33, 37, 48], в то время как другие предполагают, что наблюдаемое насыщение является скорее артефактом *in vitro* исследований [21, 34]. Вопрос насыщаемости вплотную связан с вопросом о наличии специфических к взаимодействию с гормон-рецепторными комплексами акцепторных участков на хроматине. В настоящее время

имеется много данных по идентифицированию разных компонентов ядра—ДНК [9, 32, 39, 64], кислых негистоновых белков [48, 59], основных белков [51], ядерномембранных структур [36] в качестве специфических акцепторных участков.

Механизм действия глюкокортикоидных гормонов на генетический аппарат эукариотов в настоящее время интенсивно изучается. Глюкокортикоиды, повышающие глюконеогенез, индуцируют ряд печеночных ферментов, участвующих в обмене аминокислот. Эту ткань можно считать мишенью для глюкокортикоидных гормонов. Считается, что в печени содержится, по крайней мере, три растворимых белка, способных связывать глюкокортикоиды. Один из этих рецепторов—это идентичный с транскортином (то есть кортикостероид-связывающим белком, глобулином) растворимый белок [41]. Транскортин синтезируется в печени и вместе со многими печеночными компонентами переходит в плазму. Второй—цитоплазматический белок А, который также связывается с природными глюкокортикоидами. Природа белка А остается невыясненной. Возможно, он является продуктом деградации или же промежуточным продуктом транскортина. Необходимо отметить, что оба рецептора связываются с гидрокортизоном и кортикостероном, однако не связываются с другими биологически активными, но синтетическими глюкокортикоидами—дексаметазоном и триамкинолоном. Этим в основном они и отличаются от третьего рецепторного белка глюкокортикоидов—белка G, который также локализован в цитоплазме. Известно, что именно белок G является посредником во многих биологических реакциях глюкокортикоидов [13, 16]. Так, было показано, что белок G довольно лабилен в цитоплазме, и только связывание с гормоном стабилизирует его. Комплекс белок G—гормон в активированной форме способен взаимодействовать с ДНК. К сожалению, этот рецептор пока не получен в высокоочищенной форме. Некоторые авторы установили, что белок G имеет стереохимическую специфичность по отношению к аналогам глюкокортикоидов в зависимости от их биологической потенции [28]. В то же время показано, что этот белок может участвовать во многих опосредованных гормональных эффектах внутри клеток печени. Существует определенная корреляция между дозой введенного гормона и степенью *in vivo* насыщения рецептора, а также между степенью насыщения рецептора и уровнем биологического ответа клетки на гормон [28]. Интересные результаты получены в опытах на адреналэктомированных животных. Показано, что удаление надпочечников приводит к резкому уменьшению количества кортикостероидных рецепторных белков в ядрах клеток печени. Иными словами, ядра клеток печени оперированных животных содержат меньшее количество белка G, чем ядра клеток печени нормальных, т. е. существует корреляция между количеством стероидных гормонов и концентрацией рецепторных молекул. Вместе с тем введение гидрокортизона адреналэктомированным животным приводит к уменьшению количества цитоплазматического рецептора, в то время как число рецепторных молекул в ядре увеличивается в три раза [15].

Следовательно, именно белок G, а не транскортин или белок A, является глюкокортикоидным рецептором биологической важности, а его функция заключается во взаимодействии и связывании с глюкокортикоидом.

В настоящее время считается доказанным, что для взаимодействия с хроматином или его компонентами комплекс гормон—рецептор должен активироваться. Химическая природа этого процесса полностью не выяснена. В ряде работ было показано, что процесс активирования комплекса и связывания его с чистой ДНК зависит от температуры [7, 30]. Активирования комплекса можно добиться термической трансформацией—подогреванием комплекса до 20° с последующим охлаждением до 0° [28]. Активированный таким образом комплекс становится способным легко связываться с ДНК или с ядром.

Стимулирование гидрокортизоном синтеза РНК в ядрах печени крыс установлено сравнительно давно [24, 44, 54]. Этот эффект сопровождается повышением активности РНК-полимеразы [18, 52]. В дальнейшем было обнаружено, что влияние гидрокортизона на матричную активность хроматина печени не связано с изменением скорости ацетилирования, метилирования и фосфорилирования гистонов [53]. Эти данные привели к предположению о ключевой роли негистоновых белков хроматина в специфической регуляции генетической активности [25, 50, 61].

В ранних работах Круха и сотр. [25] было показано, что кортикостерон при инкубации с ядерными компонентами клеток печени крыс связывается с негистоновыми белками хроматина. В дальнейшем было обнаружено, по крайней мере, три белка среди негистоновых белков хроматина печени, связывающих кортикостерон и эстрадиол. Если два из них специфически связывались с отдельными гормонами, то третий связывался с обоими стероидами, однако эта связь была низкоаффинной [26]. В последующих работах этих авторов [27] доказывается наличие непосредственной связи между этим акцепторным для кортикостерона—негистоновым белком и цитоплазматическим рецептором гормона. Основываясь на экспериментальных данных, авторы приходят к выводу, что глюкокортикоидные гормоны высокоаффинно и специфически связываются с определенным негистоновым белком хроматина, который представляет собой перешедший из цитоплазмы в ядро рецептор гормона. На основании этого авторы выдвигают гипотезу, согласно которой глюкокортикоидный рецептор, присутствующий в составе негистоновых белков, состоит из трех компонентов: белоксвязывающего компонента (R), положительного (PM) и отрицательного (NM) модуляторов. Для связывания гормона с рецептором необходимо взаимодействие R с PM. Вместе с тем отрицательный модулятор также способен связаться с PM и тем самым предотвратить образование комплекса R-PM. Предполагается, что PM находится в составе негистоновых белков хроматина и осуществляет специфическое связывание [43].

О важной роли негистоновых белков в специфическом активировании генома свидетельствует также работа Шелтон и Олфри [55], показавших селективное повышение синтеза негистонового белка с молекулярным весом 41000 хроматина печени при действии гидрокортизона.

Интересные результаты были получены Воробьевым и сотр. [3, 42] при изучении состава хроматина из клеток печени крыс после введения кортизона. Обнаружено, что гормон лишь в незначительной степени может изменить состав белков хроматина. Специфичным является лишь увеличение содержания белка с молекулярным весом 22000, который имел меньшую электрофоретическую подвижность, чем гистон H1. Методом электрофореза с додецилсульфатом натрия в составе общего кислоторастворимого белка обнаружена дополнительная подфракция гистона H1 и показано увеличение количества белка, расположенного на электрофореграмме между гистонами H1 и H3 [3]. Выявленная дополнительная фракция отличается от специфического белка, обнаруженного Шелтон и Олфри, хотя бы тем, что белок этот кислоторастворим. Было показано также, что удаление гистона H1 и слабосвязанных негистоновых белков экстракцией хроматина 0,7 М NaCl не изменяет специфического характера транскрипции. Только экстракция 1 М NaCl, нарушающая суперструктуру хроматина, полностью снимает вызванное кортизоном изменение транскрипции. Авторы предполагают, что увеличение содержания белковых фракций, прочно связанных в хроматине, в ответ на введение кортизона вызывает ослабление ДНК-белковых взаимодействий в хроматине и тем самым активирует гормоноспецифическую транскрипцию [3].

Хамана и Иваи в ряде работ [31, 35] изучали связываемость глюкокортикоид-рецепторного комплекса с негистоновыми белками и ДНК. Было показано, что комплекс проявляет вдвое большую связываемость с агрегированным и дегистонированным хроматином, чем с интактным. Авторы заключают, что этот комплекс специфически связывается с определенными негистоновыми белковыми компонентами и с определенным участком ДНК в хроматине печени.

В последнее время появилось много работ, показывающих ключевую роль ДНК во взаимодействии гормон-рецепторных комплексов с геномом. По данным Фейгельсона и сотр. [28], ядра печени связывают в 20 раз меньше глюкокортикоид-рецепторного комплекса, чем то же количество депротеинизированной ДНК. Обсуждая роль белков хроматина в специфическом связывании, авторы предполагают, что они могут иметь рестриктирующую функцию в процессе гормональной регуляции—выставлять те участки ДНК, которые способны к специфическому взаимодействию.

Интересные результаты были получены Беато и сотр. [20, 23] в экспериментах по изучению связываемости частично очищенных рецепторов глюкокортикоидов с хроматином и ДНК печени крыс. Авторами предварительно проводилась частичная очистка рецептора (в 3000 раз) на фосфоцеллюлозе [22]. Этот рецептор имел молекулярный вес, рав-

ный 33500, и не содержал примесей. Он связывался с ДНК, хроматином, а также с его субъединицами—нуклеосомами. Авторы установили, что нуклеосомы хроматина печени крыс и эритроцитов кур связывают равные количества гормон-рецепторного комплекса, хотя известно, что нефракционированный хроматин печени намного эффективнее связывает гормональный рецептор, чем хроматин эритроцитов кур. Следовательно, факторы, ответственные за такое различие в связывании, не расположены на нуклеосомах: они либо находятся на участках генома, не образующих нуклеосомы, либо связаны с высокоорганизованной структурой хроматина [23]. В другой работе этих авторов [20] показано, что связывание комплекса триамкинолон-рецептор с печеночным хроматином и ДНК имеет одинаковую скорость ассоциации и диссоциации, однако способность к связываемости у ДНК в 10 раз выше, чем у интактного хроматина. Авторы заключают, что большинство рецепторных молекул, *in vitro* связывающихся с хроматином, взаимодействует с доступными участками ДНК, и что на фоне такого низкоаффинного связывания возможность обнаружить высокоспецифичные участки связывания в геноме ничтожно мала. На это указывают также работы Ахрема и сотр. [1], изучавших взаимодействие рецептора глюкокортикоидных гормонов из печени крыс с ДНК в двухфазной системе декстран-полиэтиленгликоль. Ненасыщенный характер связывания комплексов гормон-рецептор с ДНК свидетельствует о низкоаффинном взаимодействии, по-видимому, маскирующем специфическое связывание, величина которого несравнимо мала. К аналогичному выводу пришли и мы, изучая связываемость гидрокортизон-рецепторного комплекса с разными группами негистоновых белков, находящихся в комплексе с ДНК [2]. Наши опыты не выявили ни в одной из групп негистоновых белков фракции, предпочтительно связывающейся с гормон-рецепторным комплексом, причем оказалось, что чистая ДНК связывает гораздо больше гормон-рецепторного комплекса, чем разные комплексы ДНК-негистоновый белок. К интересному предположению о роли компонентов хроматина в связывании гормон-рецепторных комплексов приходят в своей работе Смирнов и сотр. [4]. По мнению этих авторов, в ядре имеется, по крайней мере, два типа связывания. Первый тип—присоединение гормон-рецепторного комплекса к активному хроматину, в котором немаловажную роль могут играть белковые компоненты хроматина. Результатом такого присоединения является структурное изменение хроматина, приводящее к выставлению дополнительных участков для последующего, более специфического связывания новых порций гормон-рецепторных комплексов (второй тип). При этом специфичность гормонального эффекта может быть объяснена узнаванием гормон-рецепторного комплекса особых нуклеотидных последовательностей в ДНК [4].

Обобщая приведенные данные, можно заключить, что хотя полностью не раскрыт механизм взаимодействия глюкокортикоидных гормонов с геномом эукариотов, в достаточной мере не выяснена структу-

ра акцепторных участков, важную роль двух компонентов хроматина— ДНК и негистоновых белков в связывании гормон-рецепторных комплексов можно считать доказанной. По всей вероятности, на ДНК имеется большое количество акцепторных участков, связывающих гормон-рецепторные комплексы, однако эта связь низкоаффинная. Возможно, что специфическое связывание также имеет место, однако величина его мала и потому маскируется низкоаффинным связыванием. Высокую специфичность связывания могут обеспечить белковые компоненты хроматина, в частности негистоновые белки, что не всегда удается обнаружить. Возможно, что роль негистоновых белков хроматина в таком связывании выявляется при наличии сложной структуры нуклеопротеидного комплекса хроматина. Всякое нарушение данной структуры может привести к потере способности белков хроматина специфически связываться с гормон-рецепторным комплексом.

Греванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 20.VII 1979 г.

ԲՋՁԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱՊԱՐԱՏԻ ՀԵՏ ԴՆՅՈՒԿՈՐՏԻԿՈՒԴՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋ

Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

Հոդվածում ի մի են բերված բժիշների կորիզներում գլյուկոկորտիկոիդ հորմոնների ազդեցության մեխանիզմի վերաբերյալ գրականության մեջ եղած բազմաթիվ տվյալները: Հիմնականում ուշադրություն է դարձվում բժշի ակցիպտորային հատվածների հետ հորմոն-պեքսպտորային կոմպլեքսների փոխազդեցությանը, որ հանգեցնում է գենետիկական ապարատի սպեցիֆիկ ակտիվացմանը: Տրվում են ժամանակակից պատկերացումներ այդ փոխազդեցության մեխանիզմի վերաբերյալ:

ON THE MECHANISM OF GLUCOCORTICOID INTERACTION WITH THE GENETIC APPARATUS OF THE CELL

E. S. GEVORKIAN

Literature data on the mechanism of glucocorticoid hormones action in cell nuclei have been summarized. The special attention has been paid to the interaction between the hormone-receptor complexes and cell acceptor sites, that results in specific activation of genetic apparatus. Modern views on the mechanism of this interaction have been cited.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Барай В. Н., Зинченко А. И., Марцев С. П., Чащин В. Л. Биохимия, 43, 7, 1184, 1978.
2. Геворкян Э. С. Вопросы мед. химии, 1980 (в печати).
3. Константинова И. М., Туроверова Л. В., Воробьев В. И. Молек. биол., 12, 4, 879, 1978.

4. Смирнов В. Г., Кирьянов Г. И., Ваньшин Б. Р. Биохимия, 43, 10, 1845, 1978.
5. Abraham A. D., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 297, 142, 1973.
6. Alberga A., Massol N., Raynaud J. P., Baulieu E. E. Biochemistry, 10, 3835, 1971.
7. Anderson K. M., Liao S. Nature New Biol., 219, 277, 1968.
8. Arias F., Warren J. C. Bioch. Bioph. Acta, 230, 550, 1971.
9. Baxter J. D., Rousseau G. G., Benson M. C., Garcea R. L., Ito J., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1892, 1972.
10. Baxter J. D., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 68, 932, 1971.
11. Beato M., Biesewig D., Braendle W., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 192, 494, 1969.
12. Beato M., Braendle W., Biesewig D., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 203, 125, 1970.
13. Beato M., Feigelson P. Journ. Biol. Chem., 247, 7890, 1972.
14. Beato M., Homoki J., Sekeris C. E. Exptl. Cell. Res., 55, 107, 1969.
15. Beato M., Kalimi M., Feigelson P. Endocrinology, 94, 377, 1974.
16. Beato M., Kalimi M., Feigelson P. Bioch. Bioph. Res. Comm., 47, 1134, 1972.
17. Beato M., Schmid W., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 263, 764, 1972.
18. Borthwick N. M., Bell Ph. A. FEBS Lett., 60, 2, 393, 1975.
19. Bruchovsky N., Wilson J. D. Biol. Chem., 243, 5953, 1968.
20. Bugany H., Beato M. Mol. Cell Endocrin., 7, 49, 1977.
21. Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L. Biochemistry, 13, 327, 1974.
22. Climent F., Bugany H., Beato M. FEBS Lett., 66, 2, 317, 1976.
23. Climent F., Doenecke D., Beato M. Biochemistry, 16, 21, 4694, 1977.
24. Dahmus M. E., Bonner J. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 54, 1370, 1965.
25. Dastugue B., Defer N., Kruh J. FEBS Lett., 16, 121, 1971.
26. Defer N., Dastugue B., Kruh J. Biochimie, 56, 559, 1974.
27. Defer N., Dastugue B., Kruh J. Biochimie, 56, 1549, 1974.
28. Feigelson P., Beato M., Colman P., Kalimi M., Killewich L. A., Schutz G. Recent Progr. Horm. Res., 31, 213, 1975.
29. Gopalakrishnan T. V., Sadgopal A. Bioch. Bioph. Acta, 287, 164, 1972.
30. Gorski J., Toft D., Shyamala G., Smith D., Notides A. Recent Progr. Horm. Res., 24, 45, 1968.
31. Hamana K., Iwai K. J. Bioch., 83, 1, 279, 1978.
32. Harris S. E. Nature New Biol., 231, 246, 1971.
33. Higgins S. J., Rousseau G. G., Baxter J. D., Tomkins G. M., J. Biol. Chem., 248, 5866, 1973.
34. Higgins S. J., Rousseau G. G., Baxter J. D., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 70, 3415, 1973.
35. Iwai K., Hamana K. J. Ster. Bioch., 5, 349, 1974.
36. Jackson V., Chalkley R. J. Biol. Chem., 249, 1615, 1974.
37. Kalimi M., Beato M., Feigelson P. Biochemistry, 12, 3365, 1973.
38. Karlson P., Sekeris C. E. Acta endocrin., 53, 505, 1966.
39. King R. J. B., Gordon J. Nature New Biol., 240, 185, 1972.
40. King R. J. B., Gordon J., Steggles A. W. Bioch. J., 114, 1969.
41. Koblinsky M., Beato M., Kalimi M., Feigelson P. J. Biol. Chem., 247, 7897, 1972.
42. Konstantinova I. M., Vorobev V. I., Turoverova L. V. Studia Biophysica, Berlin, band 67, 127, 1978.
43. Kruch J., Defer N., Dastugue B., Tichonicky L. Cell Differ. Microorg. plants and animals, 94, 1977.
44. Lukacs I., Sekeris C. E. Bioch. Bioph. Acta, 134, 85, 1967.
45. Means A. R., Hamilton T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 56, 1594, 1966.
46. Monder C., Walker M. C. Biochemistry, 9, 2489, 1970.
47. O'Malley B. W., McGuire W. Z., Korenman S. G. Bioch. Bioph. Acta, 145, 204, 1967.
48. O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggles A. W. Nature New Biol., 235, 141, 1972.

49. O'Malley B. W., Toft D. O., Sherman M. R. J. Biol. Chem., 246, 1117, 1971.
50. Paul J., Gilmour R. S. J. Molec. Biol., 34, 305, 1963.
51. Puca G. A., Sica V., Nola E. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 979, 1974.
52. Seifart K. H., Sekeris C. E. Eur. J. Bioch., 7, 408, 1969.
53. Sekeris C. E. Bioch. J., 124, 5, 43p, 1971.
54. Sekeris C. E., Homoki J., Beato M., Gallwitz D., Seifart K. H., Lukacs I. Jr.,
Advances in the Biosciences, 2, 222, N. Y., Pergamon Press, 1968.
55. Shelton K. R., Alfrey V. G. Nature, 228, 132, 1970.
56. Sherman M. R., Corvol P. L., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 245, 6085, 1970.
57. Sluyser M. Bioch. Bioph. Acta, 182, 235, 1969.
58. Sluyser M. Bioch. J., 130, 49—50p, 1972.
59. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 246, 4188, 1971
60. Spelsberg T. C., Steggles A. W., Chytil F., O'Malley B. W. J. Biol. Chem., 247,
5, 1368, 1972.
61. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. I. Science, 183, 817, 1974.
62. Trachewsky D., Segal S. J. Eur. J. Bioch., 4, 279, 1968.
63. Vorobev V. I., Konstantinova I. M. FEBS Lett., 21, 169, 1972.
64. Yamamoto K. R., Alberts B. M. Proc. Nat. Acad. Sci, 49, 69, 2105, 1972.