

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ КАК ДОНОРОВ, АКЦЕПТОРОВ И ПЕРЕНОСЧИКОВ ЭЛЕКТРОНОВ

© 2014 Н. Б. Кузнецова¹, П. Е. Кузнецов²

¹доцент каф. химии, канд. хим. наук
e-mail: moscow1978@mail.ru

²профессор каф. химии, докт. хим. наук
e-mail: kuznetsovpe@mail.ru

Курский государственный университет

На основе рентгеноструктурных данных из Protein Data Base и квантово-химических расчетов взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с нуклеотидами (гуанозиндифосфатом ГДФ и ДНК) предложен механизм действия гормонов как доноров, акцепторов и переносчиков электронов. Он заключается в том, что гормон-рецепторные комплексы могут инициировать перенос электрона от ДНК или ГДФ на гормоны, которые в протонированной форме могут выступать в качестве акцепторов. Являясь переносчиками электронов, гормоны могут взаимодействовать с рецепторами и ДНК, находящимися в триплетном состоянии. Объясняются гормональные эффекты.

Ключевые слова: гормоны, рецепторы, ДНК, ГДФ, триплетное состояние, механизм действия, перенос электрона, квантово-химическая модель.

Существует два вида клеточных рецепторов, связывающихся с гормонами: мембранные (в том числе трансмембранные) и внутриклеточные (цитозольные и ядерные).

Некоторые **трансмембранные рецепторы** относятся к мембранным G-протеин-связывающим белкам [Bulenger, Marullo, Bouvier 2005]. При взаимодействии лиганда (гормона) с рецептором образующийся гормон-рецепторный комплекс связывает G-белок и активирует его. В неактивном состоянии α -субъединица G-белка связана с гуанозиндифосфатом (ГДФ). Взаимодействие G-белка с лиганд-рецепторным комплексом активирует G-белок и вызывает обмен ГДФ на гуанозинтрифосфат (ГТФ). В результате G-белок отделяется от рецептора, распадается и диссоциирует на α -субъединицу и β, γ -комплекс. α -Субъединица передает далее сигнал на белки-эффекторы [Альбертс и др. 1994; Кольман, Рем 2000].

Ядерные рецепторы, взаимодействуя с лигандами, регулируют экспрессию генов. Не связанные с гормонами ядерные рецепторы оказывают ингибирующее влияние на механизм экспрессии генов. Только образование гормон-рецепторного комплекса блокирует это влияние. Стартовой точкой транскрипции являются изменения структуры хроматина в области промотора. Транскрипция может запускаться связыванием гормон-рецепторного комплекса с соответствующим промотором путем узнавания мишени в ДНК аминокислотной последовательностью рецептора. Это связывание, видимо, приводит к расплетанию двойной спирали ДНК. После этого РНК-полимераза связывается с промотором одноцепочечной ДНК и инициирует транскрипцию [Льюин 2012].

Таким образом, объектами действия гормон-рецепторного комплекса являются нуклеотиды. В случае некоторых трансмембранных рецепторов – это ГДФ, который меняется на ГТФ; а в случае ядерного рецептора – это нуклеотиды промотора ДНК.

Возможному механизму передачи сигнала от гормона через белок (рецептор) на нуклеотиды и посвящена настоящая статья.

Ранее нами было установлено, что некоторые биомишени в организмах, в том числе и рецепторы, могут находиться в триплетном состоянии. Так, было показано [Кузнецова, Кузнецов 2013], что основное состояние активного центра тиреоидного рецептора – триплетное, то же самое можно сказать и о молекуле АТФ. Кроме того, известно, что молекула кислорода также находится в триплетном состоянии. Квантово-химическими расчетами [Кузнецова, Кузнецов 2014a] было установлено, что основное состояние комплекса гормона с активным центром NR_3C_4 рецептора триплетное, так как энтальпия его синглетного состояния на 40,4 ккал/моль выше. Были рассчитаны триплетное и синглетное состояния петли холецистокининового ССК-2 рецептора [Кузнецова, Кузнецов 2014b]. Показано, что триплетное состояние петли рецептора термодинамически более выгодно. Можно предположить, что в многоатомных системах синглетные и триплетные состояния сближаются по энтальпии образования. Предполагаем, что и молекулы нуклеотидов, на которые передается сигнал от гормона, также могут находиться в триплетном состоянии.

Рецептор 9-цис-ретиноевой кислоты образует гетеродимер с рецептором тиреоидных гормонов. Такой димер узнает элементы промотора TGACCT [Льюин 2012].

Расчеты нуклеотидов проводились программами HyperChem 7e [Hyper Chem Release 7 for Windows] (MNDO/d), Discovery Studio Client v2.5.0.9164 [Discovery Studio Client v2.5.0.9164]. Мы использовали в упрощенных моделях фрагменты из трех и четырех нуклеотидов. Расчеты показали, что для фрагмента ДНК – TGAC – триплетное состояние термодинамически устойчивее синглетного на 17,6 ккал/моль. Таким образом, можно сказать, что фрагменты ДНК, с которыми взаимодействует комплекс тиреоидного рецептора с гормоном, находится в триплетном состоянии.

ГДФ в ионизированной форме также в триплетном состоянии на 15 ккал/моль устойчивее, чем в синглетном состоянии.

Ранее нами было показано, что при взаимодействии определенных гормонов с рецепторами, находящимися в триплетном состоянии, происходит перенос электрона с рецептора на гормон. Это было показано для тиреоидного рецептора и гормона трийодтиронина [Кузнецова, Кузнецов 2013]; NR_3C_4 -рецептора и дигидротестостерона [Кузнецова, Кузнецов 2014a]; гормона ССК-4 и рецептора ССК-2 [Кузнецова, Кузнецов 2014b]. Следует уточнить, что в случае тиреоидного рецептора перенос электрона может происходить как с рецептора на гормон, так и наоборот. Результат зависит от того, в каком состоянии находится гормон – в виде цвиттер-иона или в депротонированном виде.

Можно предположить, что рецептор является лишь передаточным звеном, по которому переносится электрон, а начальными и конечными звеньями в цепи переноса электрона являются фрагменты ДНК или ГДФ и гормоны. Таким образом, мы можем представить упрощенную модель взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с ДНК или с ГДФ в виде комплекса гормона с активным центром рецептора и нуклеотидами.

Взаимодействие гормон-рецепторного комплекса ядерного рецептора с ДНК. Рассмотрим взаимодействие трийодтиронина (T_3), активного центра тиреоидного рецептора и фрагмента ДНК – GAC. Упрощенная модель взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с ДНК сформирована в виде комплекса T_3 , активного центра тиреоидного рецептора и нуклеотидов GAC и представлена на рис. 1. Модель основана на экспериментальных данных базы [Protein Data Base]. Гормон T_3 находится в протонированном виде. 5'-фосфатная группа цепи ДНК ионизирована в соответствии с

как доноров, акцепторов и переносчиков электронов литературными данными [Льюин 2012]. Заряд фрагмента GAC равен минус четырем, следовательно, этот фрагмент является донором электронов. На НСМО-уровне протонированного T_3 недостаток электронов локализован на концевой аминогруппе, которая предположительно является акцептором электронов. Гидроксильная группа гормона образует водородную связь с протонированным атомом азота гистидина рецептора [Protein Data Base], а N-концевая аминогруппа рецептора образует водородную связь с ДНК GAC в соответствии с литературными данными [Льюин 2012], как показано на рисунке. С помощью расчетов было установлено, что основное состояние комплекса соответствует состоянию со спином равным пяти.

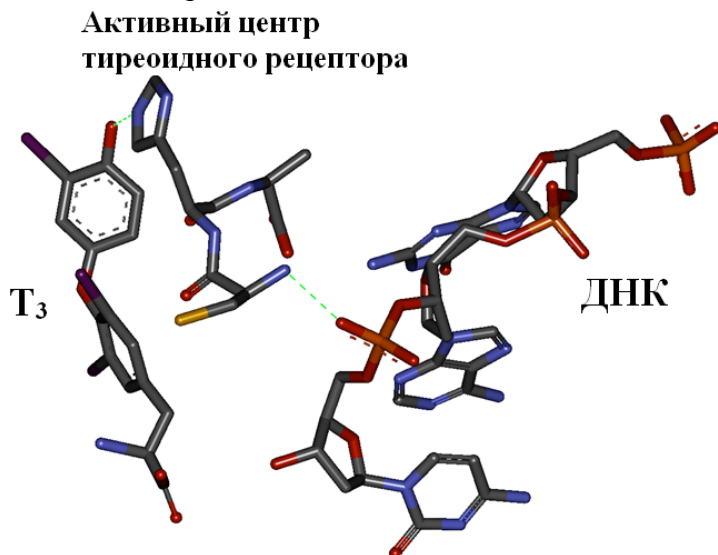


Рис. 1. Упрощенная модель комплекса: гормона T_3 ; активного центра тиреоидного рецептора; нуклеотидов GAC – элементов промотора, узнаваемых тиреоидным рецептором

Распределение спиновой плотности комплекса, полученное в результате расчетов, показано на рисунке 2. В каждой из областей, отмеченных на рисунке пунктиром, находится на валентной оболочке по одному электрону с параллельными спинами. До образования комплекса электроны с параллельными спинами находились на фрагменте GAC и рецепторе, основное состояние которых триплетное. Следовательно, произошло перераспределение электронов. Так, заряд на T_3 до взаимодействия был равен плюс единице, а после – равен нулю. Заряд на нуклеотидах GAC был равен минус четырем, а после взаимодействия стал равен минус двум. Заряд на активном центре рецептора был равен плюс единице, а стал равен нулю. Следовательно, два электрона перераспределились с ДНК GAC на гормон и на рецептор. Таким образом, возможно, присоединение гормон-рецепторного комплекса к определенному фрагменту ДНК инициирует перенос электронов с ДНК на гормон T_3 и тиреоидный рецептор.

Расчеты показали, что перенос электронов термодинамически выгоден, а конечное состояние комплекса намного устойчивее исходного состояния.

Исследуем с помощью квантово-химических расчетов процесс переноса двух электронов с фрагмента ДНК GAC и последующее расплетание двойной спирали ДНК. Выгоден ли этот процесс с точки зрения термодинамики? Для этого рассмотрим электронные и энергетические характеристики двойной спирали ДНК GAC до и после

переноса двух электронов и расплетания спирали ДНК, то есть разрыва водородных связей.

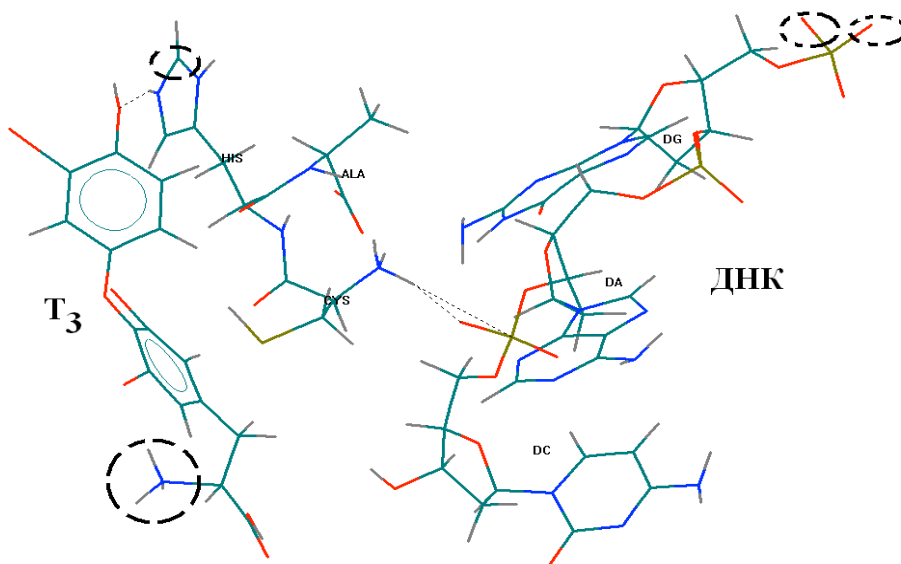


Рис. 2. Распределение спиновой плотности в упрощенной модели комплекса, содержащего гормон T_3 ; активный центр тиреоидного рецептора; нуклеотиды GAC – элементы промотора, узнаваемые тиреоидным рецептором. Пунктиром показаны электроны ВЗМО с параллельными спинами

Распределение электронов на ВЗМО двойной спирали GAC в основном состоянии, соответствующем состоянию со спином пять, показано на рисунке 3. Заметим, что мультиплетность двух триплетных фрагментов ДНК в сумме равна пяти. Как показывают расчеты и как видно из рисунка 3, фрагмент спирали ДНК GAC характеризуется наличием пяти обычных водородных связей и трех слабых ($>2\text{\AA}$).

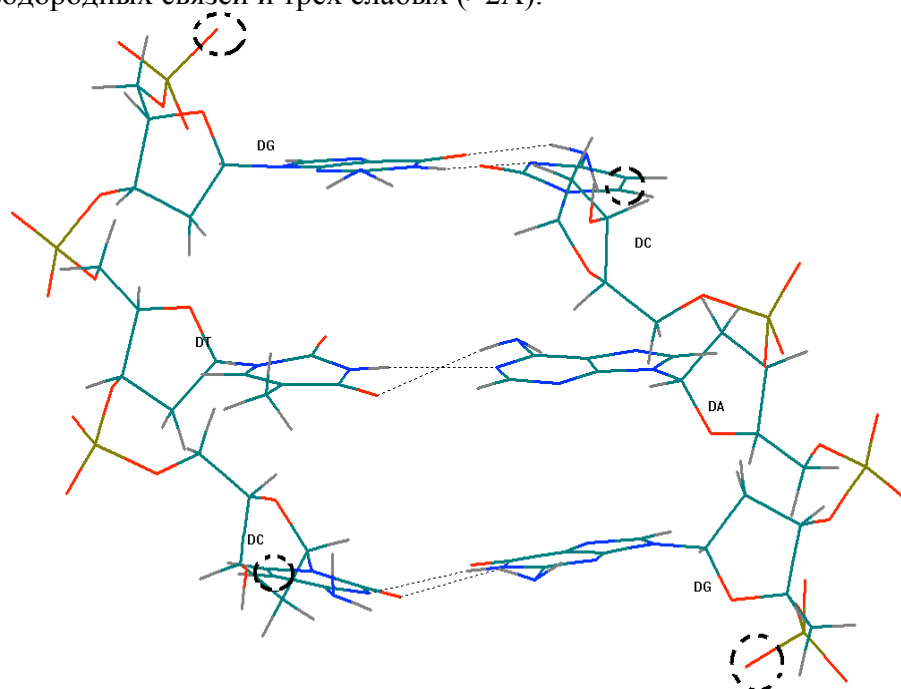


Рис. 3. Распределение электронов на ВЗМО двойной спирали ДНК GAC в основном состоянии до переноса двух электронов и расплетания спирали ДНК

Таким образом, энергия водородных связей фрагмента не превышает минус 50 ккал/моль.

Распределение электронов ВЗМО GAC после переноса двух электронов и разрыва водородных связей показано на рисунке 4. Расчеты показали, что конечные продукты в процессе переноса двух электронов и разрыва водородных связей более чем на 300 ккал/моль устойчивее начальных. Это становится возможным вследствие особенностей электронного строения молекулы ДНК, которая содержит множество отрицательно заряженных атомов кислорода. Таким образом, перенос электронов становится термодинамически выгодным, а энергия переноса двух электронов намного превышает энергию разрыва водородных связей. Это и приводит к расплетанию двойной спирали ДНК.

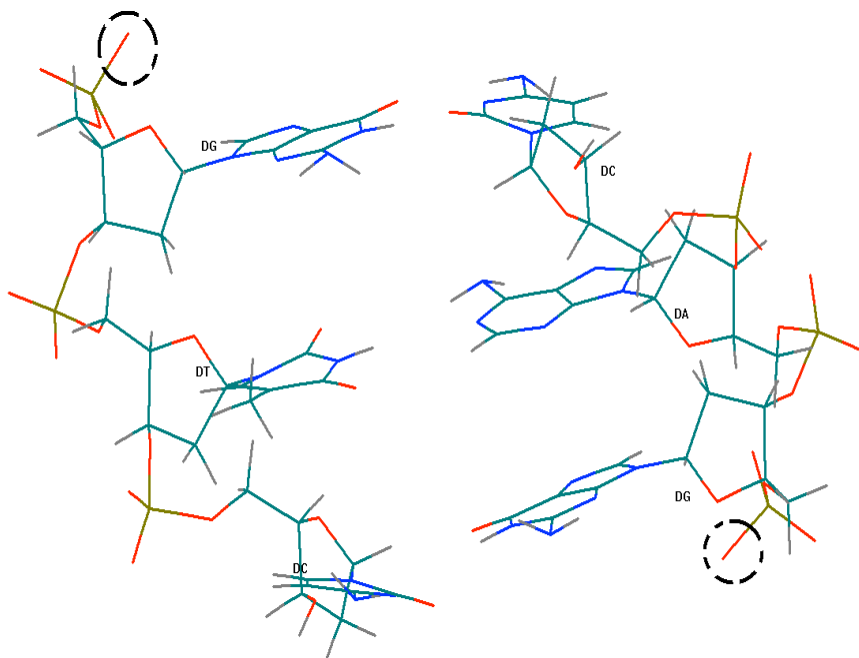


Рис. 4. Распределение электронов на ВЗМО катион-радикала двойной спирали ДНК GAC после переноса двух электронов и расплетания спирали ДНК

Таким образом, протонированный гормон T_3 путем переноса электронов на гормон-рецепторный комплекс активирует нужный фрагмент ДНК. Последний трансформируется в катион-радикал, и его структура, заряд и электростатический потенциал изменяются, а двойная спираль ДНК расплетается. Изменения структуры и заряда ДНК в области промотора и расплетание двойной спирали ДНК влекут за собой инициацию транскрипции РНК-полимеразой.

Взаимодействие гормон-рецепторного комплекса трансмембранного рецептора с ГДФ G-белка. Взаимодействие гормона ССК-4 с петлями трансмембранного рецептора ССК-2 было рассмотрено в статье [Кузнецова, Кузнецов 2014б]. Из литературных данных известно [Кольман, Рем 2000: 469], что лиганд-рецепторный комплекс приобретает способность связывать G-белок и инициировать обмен ГДФ на ГТФ.

Рассмотрим взаимодействие гормона ССК-4 и ГДФ, связанного с гормоном через рецептор ССК-2 и G-белок. Упрощенная модель взаимодействия гормон-рецепторного

комплекса с ГДФ G-белка сформирована в виде комплекса гормона ССК-4, активного центра рецептора ССК-2 и нуклеотида ГДФ и представлена на рисунке 5. Модель основана на экспериментальных данных ЯМР исследований [Giragossian, Mierke 2001; Giragossian, Mierke 2002]. Гормон находится в протонированной форме по N-концу, как все пептиды. ГДФ находится в частично ионизированной форме с одной OH-группой, связанной с атомом фосфора, в соответствии с литературными данными [Кнорре, Мызина 2000].

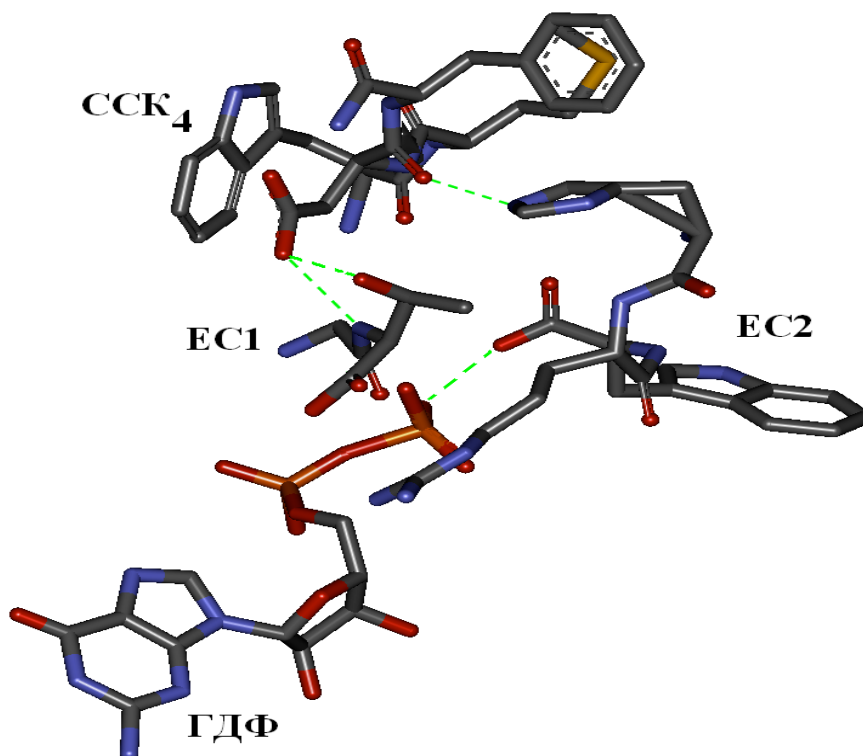


Рис. 5. Упрощенная модель комплекса, содержащего гормон ССК-4, фрагменты петель рецептора ССК-2 – EC1 и EC2, а также ГДФ

Заряд ГДФ равен минус двум, следовательно, этот фрагмент может являться донором электронов. На НСМО-уровне протонированного ССК-4 недостаток электронов локализован на концевой аминогруппе, которая предположительно является акцептором электронов. Гормон ССК-4 образует две водородные связи с петлей EC1 и одну – с петлей EC2 в соответствии с ЯМР исследованиями [Giragossian 2001; Giragossian 2002]. С-конец петли EC2 образует водородную связь с OH-группой ГДФ в соответствии с литературными данными [Pommier 2003].

Проведенные методом MNDO/d квантово-химические расчеты показали, что в каждой из областей, отмеченных на рисунке 6 пунктиром, находится на валентной оболочке по одному электрону с параллельными спинами.

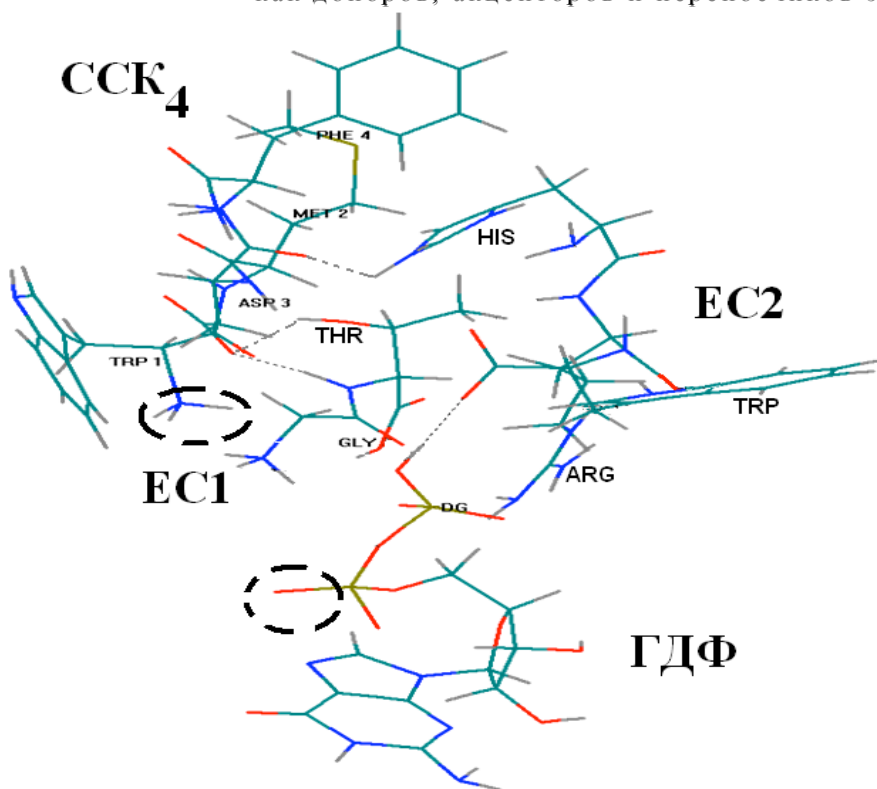


Рис. 6. Распределение спиновой плотности в упрощенной модели комплекса, содержащего гормон ССК-4, фрагменты петель рецептора ССК-2 – EC1 и EC2, а также ГДФ. Пунктиром показаны электроны ВЗМО с параллельными спинами

До образования комплекса электроны с параллельными спинами находились на рецепторе, так как ГДФ с зарядом минус два существует в синглетном состоянии. Следовательно, произошло перераспределение электронов. Так, заряд на ССК-4 до образования комплекса был равен нулю, а после – стал равен минус единице. Заряд на ГДФ был равен минус двум, а после стал равен минус единице. На рецепторе заряд не изменился. Следовательно, электрон перераспредилился с ГДФ на гормон. Таким образом, возможно, присоединение к рецептору ССК-2 гормона ССК-4 инициирует перенос электрона с ГДФ G-белка на гормон через ССК-2 рецептор.

Расчеты показали, что перенос электрона термодинамически выгоден, так как энтальпия образования конечного состояния намного ниже, чем для исходного состояния.

Таким образом, гормон ССК-4 в протонированной форме, как акцептор электрона, путем переноса электрона с ГДФ на гормон-рецепторный комплекс через G-белок активирует ГДФ, трансформируя его в катион-радикал. На рисунке 7 представлена молекула ГДФ и катион-радикал ГДФ и их электростатические потенциалы (ЭСП). На рисунках видно, что после переноса электрона изменяется ЭСП ГДФ, а главное – заряд нуклеотида, вследствие чего комплекс ГДФ с G-белком распадается с дальнейшим обменом ГДФ на ГТФ.

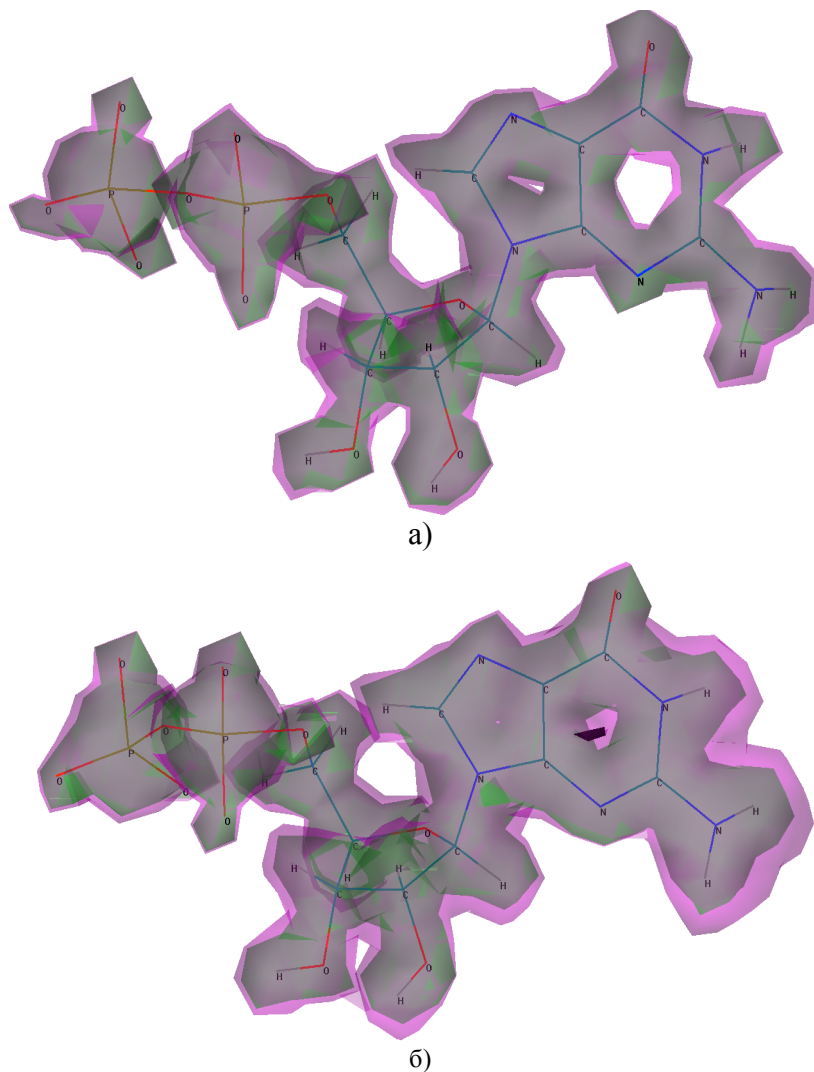


Рис. 7. Структура и ЭСП молекулы ГДФ (а) и катион-радикал ГДФ (б)

Таким образом, в предлагаемом механизме действия для разных гормонов (гормоны, действующие на трансмембранный (ССК-4) и ядерный (T_3) рецепторы) наблюдаются некоторые общие закономерности:

1. Рецепторы и связанные с ними нуклеотиды могут находиться в триплетном состоянии.
2. Гормоны в случае трансмембранного и ядерного рецепторов могут протонироваться.
3. Гормоны воздействуют на нуклеотиды через большие белковые глобулы – рецепторы, G-белки, цепи ДНК.
4. Пептидные цепи рецепторов и цепь ДНК рассматриваются как цепь переноса электронов.
5. Гормоны, представляющие собой небольшие по размерам молекулы, могут узнавать с помощью рецепторов на большом расстоянии нужные нуклеотиды и изменять их структуру.
6. Структура нуклеотидов изменяется за счет переноса электрона с нуклеотида на гормон, при этом образуются катион-радикалы нуклеотидов.

7. Перенос электрона осуществляется потому, что энтальпия образования комплекса после переноса электрона намного ниже (комплекс устойчивее), чем энтальпия образования комплекса до переноса электрона.

8. Изменения заряда и структуры нуклеотидов, расплетание цепей ДНК влечет за собой инициацию транскрипции генов или активацию либо ингибирование ферментов.

Предлагаемый механизм действия гормонов состоит из следующих этапов:

1. Гормоны протонируются.
2. Гормоны взаимодействуют с рецепторами, образуя комплексы, находящиеся в триплетном состоянии.
3. Гормон-рецепторный комплекс узнает соответствующую последовательность нуклеотидов.
4. После контакта нуклеотида и гормона через пептидные цепи рецептора переносится электрон.
5. Структура и заряд нуклеотидов изменяются из-за превращения их в катион-радикалы.
6. Изменения структуры нуклеотидов влечет за собой либо расплетание спирали ДНК и экспрессию генов в случае ядерных рецепторов, либо активацию и ингибирование ферментов в случае трансмембранных рецепторов.

Таким образом, предлагается вероятный молекулярный механизм действия некоторых гормонов. Он заключается в том, что гормоны могут протонироваться и, образуя гормон-рецепторные комплексы, через белки воздействовать на нуклеотиды (соответствующие фрагменты ДНК в промоторе и ГДФ) путем переноса электрона с нуклеотидов на гормон. В результате нуклеотиды трансформируются в катион-радикалы, их заряд и структура изменяются, что влечет за собой изменение структуры и заряда ДНК или ГДФ. Это в свою очередь приводит к инициации дальнейших преобразований ДНК (расплетанию двойной спирали ДНК) или к обмену ГДФ на ГТФ. После взаимодействия с нуклеотидами через рецепторы протонированные гормоны превращаются в анион-радикалы, которые могут отдавать электрон переносчикам электронов, вновь протонируются, образуя гормон-рецепторные комплексы. В результате гормоны множество раз могут катализировать перенос электрона с нуклеотидов в вышеописанных процессах. При этом структура гормона остается неизменной. Этим объясняется их биологическое действие, когда гормоны в малых концентрациях оказывают выраженное воздействие на биохимические процессы.

Библиографический список

- Альбертс Б., Брей Д., Льюис Д., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Д.* Молекулярная биология клетки: в 3 т.: пер. с англ. М.: Мир, 1994. 1560 с.
- Кнорре Д.Г., Мызина С.Д.* Биологическая химия. М.: Высшая школа, 2000. Т. 3. 479 с.
- Кольман Я., Рем К.* Наглядная биохимия: пер. с нем. М.: Мир, 2000. 469 с.
- Кузнецова Н.Б., Кузнецов П.Е.* Квантово-химическая модель гормонов щитовидной железы как доноров и переносчиков электронов // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2013. № 4. С. 179–184.

Кузнецова Н.Б., Кузнецов П.Е. Квантово-химическое моделирование механизма действия лигандов NR_3C_4 рецептора // AUDITORIUM: электронный научный журнал. 2014а. № 1. URL: <http://auditorium.kursksu.ru/pdf/001-004.pdf> (дата обращения: 14.08.2014).

Кузнецова Н.Б., Кузнецов П.Е. Прогнозирование биологической активности антагонистов холецистокининового рецептора // AUDITORIUM: электронный научный журнал. 2014б. № 2. URL: auditorium.kursksu.ru/pdf/002-003.pdf (дата обращения: 19.09.2014).

Льюин Б. Гены. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 896 с.

Bulenger S., Marullo S., Bouvier M. Emerging role of homoand heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation // Trends Pharmacol. Sci. 2005. Vol. 26. P. 131–137.

Giragossian C., Mierke D.F. Intermolecular interactions between cholecystokinin-8 and the third extracellular loop of the cholecystokinin-A receptor // Biochemistry. 2001. V. 40. № 13. P. 3804–3809.

Giragossian C., Mierke D.F. Intermolecular interactions between cholecystokinin-8 and the third extracellular loop of the cholecystokinin-2 receptor // Biochemistry. 2002. V. 41. № 14. P. 4560–4566.

Hyper Chem Release 7 for Windows. 2002. HyperCube, Inc. 860 p.

Pommier B., Marie-Claire C. et al. Further evidence that the CCK_2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis // J.Neurochem. 2003. Vol. 85. P. 454–461.

Discovery Studio Client v2.5.0.9164 [Сайт]. URL: <http://www.accelrys.com/> (дата обращения: 20.06.2011).

Protein Data Base [Сайт]. URL: www.rcsb.org/pdb/home/home.do (дата обращения: 24.11.2013).