

**НОВОСТИ
НАУКИ****Глубокоуважаемые коллеги!**

Предлагаемый вашему вниманию обзор открывает новую рубрику журнала – “Новости науки”. В этой рубрике редколлегия планирует регулярно знакомить вас с наиболее интересными работами в области биоорганической химии и родственных наук – в виде мини-обзоров по отдельным проблемам либо подборки кратких рефератов избранных работ по определенной тематике, опубликованных в ведущих журналах близкого профиля. Мы будем стараться обращать ваше внимание на новые проблемы, занимающие умы ученых, работающих в нашей области. Надеемся, что материал этой рубрики окажется для вас интересным и полезным.

Главный редактор журнала
академик В.Т. Иванов

УДК 577.112.5+577.113.5+577.17.01:591.05

**ЛЕПТИН – ПЕПТИДНЫЙ ГОРМОН АДИПОЦИТОВ.
СЕНСАЦИЯ 23-го КОНГРЕССА ФЕБО**

© 1996 г. Ю. А. Панков

Эндокринологический научный центр РАМН, 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11

Поступила в редакцию 12.10.95 г.

Представлен краткий обзор исследований гена ожирения (*obesity gene*). Рецессивные мутации гена *ob* в гомозиготном состоянии приводят у мышей к избыточному весу и сахарному диабету. При клонировании и секвенировании кДНК гена *ob* мыши и человека показано, что ген *ob* экспрессируется только в белой жировой ткани. кДНК кодирует белок *ob*, состоящий из 167 аминокислотных остатков. Белки *ob* мыши и человека гомологичны на 84%. Секретируемый в кровь пептид, названный лептином, состоит из 145 аминокислотных остатков и образуется в результате отщепления сигнального пептида от белка *ob*. Лептин получен генно-инженерным способом. Его введение мышам генетической линии *ob/ob* приводит к снижению веса тела и исчезновению признаков диабета. Лептин вызывает снижение веса тела и при введении здоровым животным вследствие активации использования эндогенных жиров в энергетическом обмене. Лептин присутствует в крови человека и в крови и жировой ткани мышей, но отсутствует в крови и жировой ткани мышей линии *ob/ob*. На основании полученных результатов сформулирован постулат: “продукт экспрессии гена *ob* – лептин является гормоном, который секретируется адипоцитами в кровь в изменяющихся количествах и контролирует массу жировой ткани путем стимуляции обмена липидов в организме”.

Ключевые слова: ген *ob*, гормон, липидный обмен, позиционное клонирование, захват экзонов, полимеразная цепная реакция, библиотека кДНК.

23-й конгресс Федерации европейских научных обществ (ФЕБО, Базель, Швейцария, 1995 г.) был отмечен крупным научным событием, которое, по всей вероятности, окажет большое влияние на развитие современной эндокринологии (наука о гормонах) и заставит коренным образом пересмотреть давно сложившиеся и утвердившиеся представления и концепции. Следует напомнить, что эндокринология зародилась и длитель-

ное время развивалась как наука об эндокринных железах и заболеваниях человека, вызванных нарушением их функции. Сразу же после зарождения эндокринологии в ней довольно быстро сформировалась номенклатура эндокринных желез, которая включала в себя гипофиз, щитовидную и паращитовидную железы, надпочечники, поджелудочную железу и половые железы. В отличие от обычных желез, выделяющих секрет через специальные выводящие протоки в полость желудочно-кишечного тракта и другие полости

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция.

организма, эндокринные железы не имеют выводящих протоков и секретируют вырабатываемые ими продукты непосредственно в кровь, с которой они распространяются по всему организму и оказывают регулирующее воздействие на различные органы и ткани. Эти узко специализированные органы (небольшие железы) иногда даже называли “маленькими органами большого значения”.

Серьезные сомнения в сложившиеся представления об эндокринологии зародили исследования, которые впоследствии позволили сделать заявление о том, что головной мозг также является эндокринным органом. Этот вопрос пока остается дискуссионным, но по крайней мере один из отделов головного мозга, а именно гипоталамус, который вырабатывает и секретирует в кровь большое количество разнообразных пептидных гормонов, несомненно, является эндокринным органом. Эти новейшие достижения, однако, довольно органично вписывались в старые представления, и в соответствии с новой концепцией гипоталамус и гипофиз стали даже называть эндокринным мозгом. Первое достаточно внушительное открытие, которое несколько пошатнуло твердый фундамент сложившихся представлений, было открытие натрий-уретического гормона, вырабатываемого и секретируемого в кровь сердцем. Этот гормон вместе со своим антагонистом альдостероном (гормон надпочечников) достаточно эффективно регулирует обмен ионов натрия в организме и недвусмысленно показывает, что сердце также является эндокринным органом. Однако после открытия натрий-уретического гормона старые представления в эндокринологии еще каким-то образом удержались и сохранились. Но они вряд ли останутся неизменными после открытия пептидного гормона адипоцитов – лептина, который вырабатывается и секретируется в кровь жировой тканью и оказывает регулирующее воздействие на энергетический обмен и хранение жиров в организме. Интересно, что одним из основных органов-мишеней лептина, по всей вероятности, является центральная нервная система, через воздействие на которую лептин осуществляет регуляцию липидного обмена.

Эти исследования начались в 50-е годы выведением мышей особых генетических линий – *ob/ob* и некоторых других, характеризующихся избыточным весом, высоким уровнем потребления пищи, низкой физической активностью, сниженным энергетическим обменом и повышенным отложением липидов в жировой ткани, что было вызвано рецессивной мутацией (*obese mutation*) [1]. Опыты по парабиозу с перекрестным кровообращением обычных мышей и мышей линии *ob/ob* показали, что, когда в организм *ob/ob*

мышей постоянно поступает кровь нормальных животных, у них снижается потребление пищи, увеличивается энергетический обмен и уменьшаются жировые запасы [2, 3], тогда как заметных изменений в состоянии здоровых мышечей не наблюдается. Полученные данные позволили постулировать, что в крови здоровых животных циркулирует гуморальный фактор, который стимулирует энергетический обмен и который отсутствует в крови мышечей линии *ob/ob*. Длительное время этот фактор идентифицировать не удавалось, и только в последнее время благодаря новейшим достижениям молекулярной биологии и разработке новых эффективных методических подходов удалось найти ответы на многие поставленные вопросы и решить ряд связанных с ними фундаментальных проблем.

Первые исследования показали, что ген *ob* (*obese gene*) располагается на проксимальной части 6-й хромосомы мышечей [4]. Стратегическая линия исследования гена *ob* основывалась на использовании позиционного клонирования и на поиске генов, активно экспрессирующихся в жировой ткани и не экспрессирующихся в других органах [5]. Для позиционного клонирования использовали искусственные хромосомы дрожжей (YAC – *yeast artificial chromosome*). Гены из клонированного в YAC фрагмента 6-й хромосомы размером 650 т. п. о. выделяли с использованием так называемого метода захвата экзонов (*exon trapping*) [6]. Для этого индивидуальные или объединенные клоны субклонировали в экзонзахватывающем векторе pSPL3 по сайтам *Bam*HI/*Bgl*II, затем их секвенировали и сравнивали с нуклеотидными последовательностями, представленными в Банке генов (*Gene Bank*). С помощью нозернблоттинга и ревертазной ПЦР (*reverse transcription PCR*) проводили скрининг мРНК, комплементарных предполагаемым экзонам, в различных тканях. Таким образом было отобрано и идентифицировано шесть генов, из которых четыре картированы внутри области *ob* (650 т. п. о.) и два вне ее.

Один из захваченных экзонов, обозначенный 2G7, с помощью нозернблоттинга гибридизовался с РНК размером ~4.5 т. п. о., представленной только в белой жировой ткани. Идентичные результаты были получены с использованием ревертазной ПЦР. Высокий уровень экспрессии экзона 2G7 в жировой ткани заставлял предполагать, что он является частью гена *ob*, что подтверждалось отсутствием экспрессии этого экзона в жировой ткани одной из линий мышечей *ob/ob* (*SM/Ckc^{+Dac} ob²¹/ob²¹*), характеризующейся блоковой экспрессии гена *ob*.

Экзон 2G7 использовали для выделения 22 комплементарных ему клонов ДНК из библиотеки кДНК, полученной на основе жировой ткани

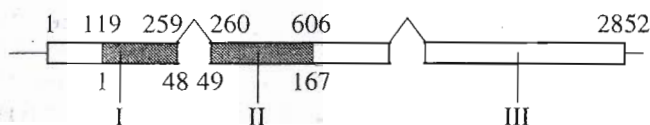


Рис. 1. Схема гена лептина (белка *ob*). I, II, III — экзоны; заштрихована кодирующая область гена. Цифры сверху — нумерация нуклеотидных остатков в кДНК *ob*; цифры снизу — аминокислотные остатки в пептиде.

нормальной мыши. Ни один из полученных клонов не имел участок ДНК длиннее 97 п. о. в сторону 5'-конца от экзона 2G7. Секвенирование кДНК различных клонов обнаружило стартовый кодон Met в экзоне 2G7, открытую рамку считывания нуклеотидной последовательности, кодирующей белок из 167 а. о., и очень длинную 3'-нетранслируемую область из 2233 нуклеотидных остатков [5]. Полная нуклеотидная последовательность кДНК *ob* включает в себя 2852 п. о. 5'- и 3'-нетранслируемые области кДНК *ob* содержат уникальные прямые повторы из 50 п. о., которые отсутствуют в Банке генов. кДНК *ob* (30% клонов) имеют делецию остатка глутамина в 49-м положении пептида, что может быть результатом альтернативного сплайсинга, поскольку кодон глутамина CAG содержит последовательность AG, соответствующую специфическому сайту сплайсинга. Использование этого сайта может приводить к удалению 3 п. о. из мРНК *ob*.

Дальнейшие исследования показали, что ген *ob* состоит из трех экзонов и двух интронов, причем его кодирующая область располагается в 3'-конце первого экзона и 5'-конце второго экзона, так что две ее части действительно разделены интроном (результаты представлены J.V. Friedman на 23-м конгрессе ФЕБО) (рис. 1).

Специальные исследования позволили идентифицировать мутацию в гене *ob* линии мышей *ob/ob* (C57BL/6J *ob/ob*). Из РНК жировой ткани этих мышей с использованием ПЦР был получен продукт, охватывающий всю кодирующую область гена *ob*, и проведено его секвенирование. В результате обнаружена замена С на Т, превращающая кодон Arg (CGA) в 105-м положении пептида на терминирующий (stop) кодон TGA [5]. Можно предполагать, что в результате синтеза неактивного продукта по механизму обратной связи происходит резкое (20-кратное) увеличение содержания дефектной мРНК *ob* в жировой ткани мышей линии C57BL/6J *ob/ob*.

Ген *ob* и белок *ob* не имеют заметной гомологии ни с одной последовательностью в Банке генов, поэтому можно думать, что лептин, продукт экспрессии гена *ob*, открывает новый класс или

семейство белков, которые станут предметом интенсивного исследования в будущем.

Гидрофобными свойствами в белке *ob* обладает только N-концевой сигнальный пептид, который отщепляется от белка с образованием гидрофильного секреторируемого пептида. Секреторируемый пептид состоит из 145 а. о. и имеет внутримолекулярную дисульфидную связь между C-концевым остатком цистеина и цистеином в положении 117. Белок *ob* не содержит дублетов основных аминокислот, по которым обычно происходит протеолитическое расщепление пептидной связи, если синтезируемый белок является предшественником более коротких биологически активных пептидов.

Из библиотеки кДНК, полученной на основе мРНК из жировой ткани человека, путем гибридизации с кДНК *ob* мышей отобраны и секвенированы кДНК *ob* человека. Нуклеотидные последовательности кодирующих областей кДНК *ob* человека и мыши высокогомологичны (84% идентичной аминокислотной последовательности) в отличие от 5'- и 3'-нетранслируемых областей (только 30% гомологии) [5]. Белок *ob* высококонсервативен. Методом гибридизации экспрессия генов *ob* обнаружена в жировой ткани 11 различных видов животных. Аминокислотные последовательности белков *ob* мыши и человека представлены на рис. 2.

Затем были созданы генно-инженерные конструкции для биотехнологического синтеза активного пептида в дрожжах [7] и в *E. coli* [8], что позволило наработать белок *ob* в достаточном количестве и изучить его биологические свойства, а также получить антисыворотку к пептиду. Методом иммуноблоттинга показано, что белок *ob* отсутствует в циркулирующей крови мышей *ob/ob*, обнаруживается в крови нормальных животных и в очень большом количестве присутствует в крови другой генетической линии мышей с ожирением — *db/db* [7]. Полученные результаты позволили высказать предположение о блокировании биологического действия белка *ob* у этих животных в результате либо мутаций гена рецептора белка *ob*, либо нарушения других стадий его пострецепторного действия [7], что приводит к гиперпродукции белка *ob* у мышей *db/db*.

Белок *ob* обнаружен в различных количествах в крови здоровых людей в виде мономера с молекулярной массой 16 кДа и замкнутой внутримолекулярной дисульфидной связью [7]. Эти данные говорят об отсутствии какой-либо модификации синтезируемого пептида при его секреции в кровь. У мышей белок *ob* циркулирует как в виде мономера, так и в виде димера. В значительном количестве он присутствует не только в крови, но и в жировой ткани мышей *db/db*, но отсутствует в

1	<u>MCWRPLCRFL WLWSYLSYVQ</u> AVPIQKVQDD TKTLIKTIIVT	40
2	H GT G P F	
1	RINDISHTQS VSAKQRVTLG DFIPGLHPIL SLSKMDQTLA	80
2	S T	
1	VYQQVLTSLP SQNVLQIAND LENLRDLLHL LAFSKSCSLP	120
2	I M R S V H	
1	QTSGLQKPES LDGVLEASLY STEVVALSRL QGSLQDILQQ	160
2	WA ETLG G G M W	
1	LDVSPEC	167
2	L G	

Рис. 2. Аминокислотная последовательность лептина мышей (1) и человека (2) в однобуквенном коде. Подчеркнут N-концевой сигнальный пептид. Для лептина человека приведены лишь отличающиеся от белка мыши остатки.

жировой ткани мышей линии *ob/ob*. Парентеральное и внутривенное введение белка *ob* в течение различных промежутков времени в количестве нескольких микрограммов на животное в день вызывает повышение энергетического обмена, увеличение двигательной активности, снижение потребления пищи, уменьшение жировых запасов и снижение веса животных на 30% через 2 недели [7–9]. Довольно быстро после прекращения введения белка *ob* все исследованные параметры возвращаются к исходному уровню.

В некотором роде линия мышей *ob/ob*, у которых помимо отмеченных характеристик наблюдается также значительное повышение содержания инсулина и глюкозы в крови, может служить экспериментальной моделью одной из форм неинсулинозависимого сахарного диабета человека (диабет II типа). Введение белка *ob* мышам линии *ob/ob* в дозе 0.1 и 1.0 мкг/кг веса приводит к быстрому и резкому снижению содержания инсулина и глюкозы в циркулирующей крови, а в дозе 10 мкг/кг веса тела он снижает содержание инсулина в крови в 6 раз и глюкозы в 4 раза, доводя таким образом их концентрацию в крови практически до нормального уровня [9]. Ни одно из известных соединений не обладает подобной активностью.

Белок *ob* оказывает свое действие не только на мышей линии *ob/ob*, но проявляет также некоторое влияние и на животных без признаков ожирения [9]. У животных с ожирением, вызванным избыточным потреблением жиров, введение белка *ob* также приводит к повышению энергетического обмена, снижению потребления пищи и уменьшению жировых запасов, несмотря на то что экспрессия и функционирование гена *ob* у

этих животных не нарушены. Эти результаты пока позволяют положительно оценивать перспективы использования белка *ob* в качестве лечебного средства при лечении больных с некоторыми формами ожирения, хотя этот вопрос потребует специального и длительного исследования.

Интересно, что белок *ob* оказывает свое действие не только при парентеральном и внутривенном введении, но и при введении в латеральный желудочек головного мозга, причем в первом случае его эффективная доза для одного животного составляет 6 мкг, во втором – 3, а при внутрижелудочковом введении – только 1 мкг белка в день [8]. Эти данные позволяют высказать предположение, что одним из органов-мишеней белка *ob* может быть центральная нервная система (ЦНС), через которую гормон осуществляет свое биологическое действие, и именно через ЦНС он вызывает снижение аппетита и потребления пищи, повышает энергетический обмен и увеличивает использование жиров в энергетическом обмене. Связь между вентромедиальными ядрами гипоталамуса и потреблением пищи обнаружена уже давно, поскольку повреждение вентромедиальных ядер приводит к увеличению веса тела животных, сопровождающемуся как повышением потребления пищи, так и снижением расходования энергии [10]. Возможно, лептин является важным звеном во взаимодействии жировой ткани – важнейшего депо энергии, с одной стороны, и мозга – с другой, в их регуляции энергетического обмена в организме.

Все эти результаты были представлены на 23-м конгрессе ФЕБО в пленарной лекции J.M. Friedman [11] и докладе P. Burn [12], который

открывал 43-й симпозиум “Молекулярные механизмы диабета II типа”. В пленарной лекции J.M. Friedman предложено несколько названий белка *ob*, из которых отдается предпочтение термину “лептин” (от греческого слова “leptos” – тонкий). От имени своей группы исследователей он сформулировал постулат, что белок *ob* секретируется адипоцитами в кровь в изменяющихся количествах в зависимости от потребностей организма и действует как гормон, контролирующий массу жировой ткани [11].

В докладе Р. Вигн был показан биологический эффект лептина не только при парентеральном и внутривенном введении препарата, но и при его введении в полость латерального желудочка мозга [12]. При обсуждении доклада Р. Вигн возник вопрос: если мозг является основным органом-мишенью лептина, то как он преодолевает гематоэнцефалический барьер? Вопрос остался открытым, поскольку требовал специального изучения, и было высказано предположение, что мозг, возможно, является не единственным органом-мишенью, через который белок *ob* осуществляет свое биологическое действие.

Дальнейшие исследования, несомненно, покажут, какие органы наиболее активно экспрессируют ген *ob* и секретируют кодируемый им гормон лептин в кровь и какие органы действительно являются органами-мишенями этого гормона. Если они подтвердят, что наиболее активно лептин секретируется адипоцитами и, следовательно, жировая ткань является эндокринным органом и, таким образом, регулирует свое собственное состояние, то эти результаты, несомненно, будут крупным, важным и интересным открытием в науке. После этого можно будет с уверенностью утверждать, что все ткани в организме животных и человека являются эндокринными органами и способны секретировать в кровь различные гормоны, которые предстоит еще открыть и которые скорее всего будут веществами пептидной природы, поскольку именно пептиды как информационные биополимеры лучше других химических веществ приспособлены к переносу информации в организме, а следовательно, и к выполнению регуляторных функций.

Таким образом, можно считать, что эндокринология как наука о специальных эндокринных железах и их патологии трансформируется в науку о гормонах – основных регуляторах процессов жизнедеятельности, регуляторах обмена веществ и физиологических функций. Эту интересную мысль многократно высказывал и подчеркивал в своих выступлениях Н.А. Юдаев [13]. Однако эти положения в нашей стране, к сожалению, почему-то не получили широкого признания и содер-

жащееся в ней рациональное зерно не нашло для своего развития благодатной почвы.

Термину “гормон” скоро исполнится 100 лет [13]. Он происходит от греческого *hormaino* (“приводить в движение, побуждать”) и впервые был введен в научную литературу английскими физиологами W.H. Bayliss и E. Starling в 1902 г. для биологически активного соединения секретина. Символично, что это название было присвоено пептидному гормону, вырабатываемому и секретируемому в кровь нетрадиционными эндокринными железами. Секретин, как известно, синтезируется клетками слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки (и в меньшей степени другими отделами кишечника), секретируется в кровь и регулирует экзокреторную функцию желудочно-кишечного тракта. В настоящее время помимо секретина открыто несколько десятков других пептидных гормонов пищеварительного тракта. Все эти результаты вместе с новейшими достижениями науки показывают, что гормоны являются чрезвычайно эффективными средствами коммуникации между органами и тканями, что именно они объединяют органы и ткани в единое целое и только тонкое взаимодействие ансамблей гормонов способно создавать и поддерживать гармонию в живом организме. Хотелось бы, чтобы эта важная область фундаментальных исследований нашла достойное развитие в отечественной науке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ingalls A.M., Dickie M.M., Snell G.D. // J. Hered. 1950. V. 41. P. 317–318.
2. Coleman O.L. // Diabetology. 1973. V. 9. P. 294–300.
3. Coleman O.L. // Diabetology. 1978. V. 14. P. 141–148.
4. Dickie M.M., Lane P.W. // Mouse News Lett. 1957. V. 17. P. 52.
5. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. // Nature. 1994. V. 372. P. 425–432.
6. Church D.M. // Nature Genet. 1994. V. 6. P. 98–105.
7. Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burly S.K., Friedman J.M. // Science. 1995. V. 269. P. 543–546.
8. Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Burn P. // Science. 1995. V. 269. P. 546–549.
9. Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T., Collins F. // Science. 1995. V. 269. P. 540–543.
10. Brobeck J.R. // Physiol. Rev. 1946. V. 25. P. 541–559.
11. Friedman J.M. // Abstracts of 23 Meeting of the FEBS, Basel, 1995. PL2. P. 1.
12. Burn P. // Abstracts of 23 Meeting of the FEBS, Basel, 1995. S43.1. P. 88.
13. Юдаев Н.А., Понов А.П., Федотов В.П. // БМЭ. 1977. Изд. 3. Т. 6. С. 352.

Leptin—A Peptide Hormone of Adipocytes: Sensation of the 23th FEBS Meeting

Yu. A. Pankov

*Research Center of Endocrinology, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Dmitriya Ul'yanova 11, Moscow, 117036 Russia*

Abstract—Studies of the *obese* gene are reviewed. Recessive mutations in the *ob* gene in homozygous state cause excessive weight and diabetes in mice. Cloning and expression of cDNA of the human and mouse *ob* genes revealed that the *ob* gene is only expressed in white adipose tissue. cDNA encodes the *ob* protein that consists of 167 amino acid residues, the homology between the mouse and human *ob* proteins being 84%. The peptide leptin, secreted into blood, consists of 145 amino acid residues and results from the cleavage of a signal peptide off the *ob* protein. Leptin was obtained by genetic engineering methods. Its injection into *ob/ob* mice decreases body weight and eliminates diabetes symptoms. Leptin also decreased body weight of healthy mice by activating the utilization of endogenous lipids in energy metabolism. Leptin was found in human and mouse blood and mouse adipose tissue but not in blood or adipose tissue of *ob/ob* mice. Based on the results obtained, it was postulated that leptin, a product of the *ob* gene, is a hormone that is secreted into blood in varying quantities by adipocytes and controls the adipose tissue weight by stimulating lipid metabolism in the organism.

Key words: ob gene, hormone, lipid metabolism, positional cloning, exon trapping, polymerase chain reaction, cDNA library.