Пептидные гормоны лептин и инсулин играют важную роль в контроле энергетического равновесия и отложения жиров в организме. Сбой в производстве этих гормонов может привести к серьезным растройствам здоровья, например к ожирению. Лептин образуется в адипоцитах (клетках жировой ткани), инсулин в бета-клетках поджелудочной железы. Оба гормона показывают огранизму, что он снабжен энергией в достаточной мере и потребление пищи можно прекратить. Лептин и инсулин действуют через соответствующие рецепторные белки, которые находятся в печени и гипоталамусе. Лептин, например, связывается со своим белком-рецептором и вызывает тем самым димеризацию этого белка. То есть после связывания с лептином две молекулы рецепторного белка (мономеры) соединяются в одну молекулу (димер) В состоящую двух молекул. димеризированном рецепторном фосфорилируется один цитоплазматический остаток тирозина c помощью определенной киназы (JAK или Janus Kinase) (рисунок 11 на странице 23). Это фосфорилирование приводит к фосфорилированию других внутриклеточных белков и активирует сигнальный путь, в результате которого потребление организмом пищи прекращается. Для остановки запущенного лептином сигнального пути энзим фосфатаза лептина удаляет остаток фосфорной кислоты с остатка тирозина (рисунок 12). Сбои 1) в образовании лептина/инсулина, 2) в связывании каждого гормона со своим рецептором, 3) в димеризации рецептора или 4) в последующем сигнальном пути приводят к растройствам в потреблении пищи и могут тем самым привести к ожирению.

10

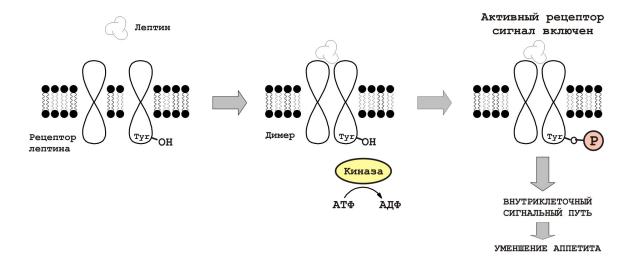


Рисунок 11. Запускаемый лептином сигнальный путь. Связывание лептина со своим рецепторным белком приводит к объединению двух рецепторных белков в димер. Димерный рецептор распознается киназой ЈАК-семейства, которая переносит остаток фосфорной кислоты с молекулы АТФ на один из остатков тирозина в рецепторе (фосфорилирует). Фосфорилированный рецепторный димер активен. Он запускает фосфорилирование других цитоплазматических белков, которое в конечном счете приводит к физиологическому ответу – уменьшению аппетита.

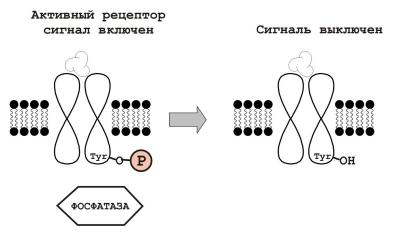


Рисунок 12. Выключение запущенного лептином сигнала. Для выключения запущенного лептином сигнала, фосфатаза убирает с остатка тирозина димерного рецептора фосфатную группу. Теперь рецептор инактивен и сигнал прерывается.

В расположенном в Миннесоте институте научного исследивания ожирения имени Ротшильда ученым удалось создать линию мышей под названием «толстяк».

Физиология и привычки питания особей этого вида были схожи с физиологией и поведением мышей находящихся в постоянном голоде, даже при достаточном кормлении. Например, у мышей «толстяк» был постоянно повышен уровень кортизола в сыворотке крови, проблемы с поддержанием постоянной температуры и постоянный голод. Из-за этого мыши имели избыточный вес – их масса тела превышала массу дикого типа до четырех раз (рисунок 13).

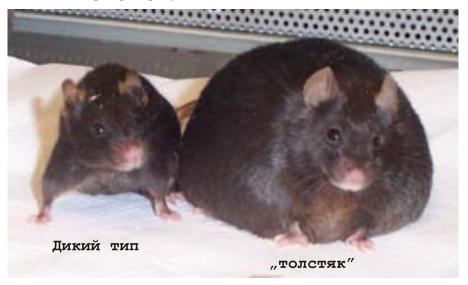
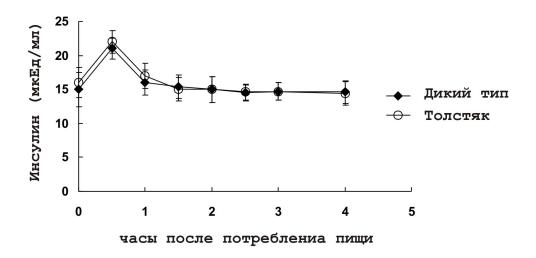


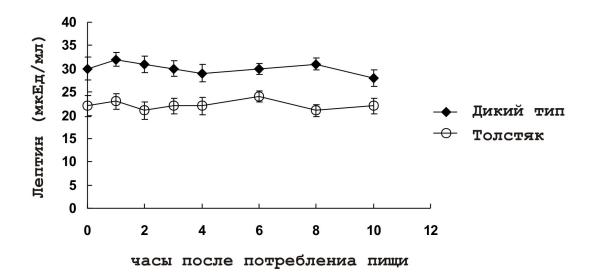
Рисунок 13. Сравнение мыши «толстяк» и мыши дикого типа.

Ученые провели ряд опытов *in vivo* (на живом организме) и *in vitro* (в пробирке) с мышами дикого типа и мышами «толстяк» для того, чтобы найти причину ожирения на молекулярном уровне. Результаты их опытов собраны на следующих графиках:

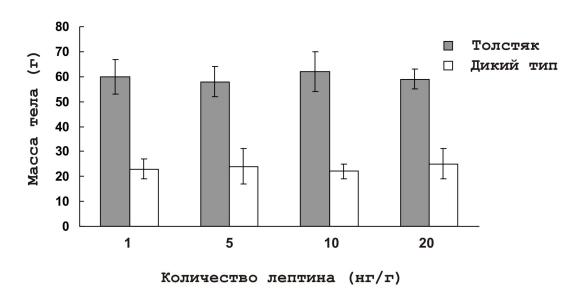
1) уровень инсулина в крови



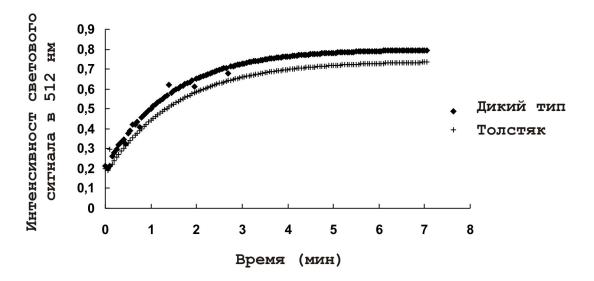
2) уровень лептина в крови



3) изменение массы тела мышей «толстяк» после двухнедельного внутривенозного введения разных доз лептина в организм



4) Димеризация лептиновых рецепторов в результате соединения с лептином. Димеризацию рецепторов измеряли с помощью FRET микроскопии.



Принцип FRET-микроскопии приведен на рисунке ниже:

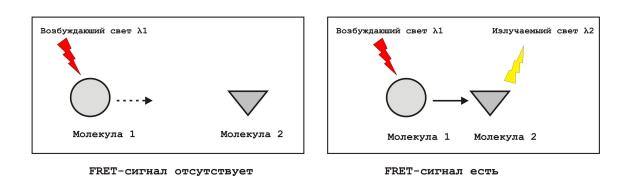


Рисунок 14. Принцип FRET (Фёрстеровский резонансный перенос энергии). Флуоресцирующую молекулу 1 (т.н. донор) облучают светом определенной длины волны λ_1 при помощи лазера. Молекула 1 поглощает падающий на нее свет и излучает свет с немного большей длиной волны, который поглощает молекула 2 (т.н. акцептор). После поглощения света, молекула 2 в свою очередь также излучает свет с длиной волны λ_2 , интенсивность которой можно измерить (здесь: $\lambda_2 > \lambda_1$). Для FRET важно, чтобы молекулы 1 и 2 находились близко друг к другу (меньше 6 нм), в противном случае возбуждающий луч не дойдет до молекулы 2 от молекулы 1 и молекула 2 не излучит свет с длиной волны λ_2 .

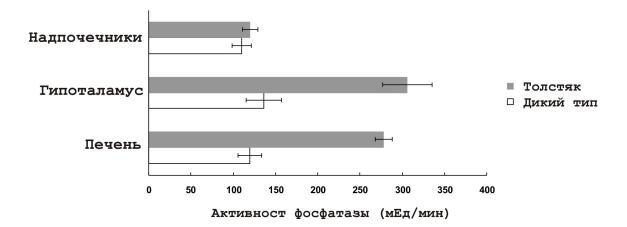
Для проведения FRET, ученые присоедили к одному из рецепторов вещество под названием флуоресцеин (Φ), а ко второму вещество под названием тетраметилродамин (T). Если флуоресцин возбуждать светом с длинной волны 494 нм, то он в свою очередь излучает свет с немного большей длиной волны, что в

свою очередь возбуждает тетраметилродамин. Тетраметилродамин излучает свет с длиной волны 512 нм, который можно измерить соответствующей аппаратурой. Вышеописанный перенос света от одной молекулы рецептора к другой молекуле происходит при условии, что флуоресцин и тетраметилродамин находятся достаточно близко друг к другу (менее 6 нм).

Рецепторы, помеченные молекулами **Ф** и **Т**, присоединили к искусственным клеточным мембранам (т.н. липосомам). Димеризацию молекул рецепторов запустили при помощи добавления лептина к липосомам. Реакционный раствор облучили светом в 494 нм, а затем измеряли излучение света с длиной волны 512 нм в растворе.

5) Активность цитоплазматической тирозин фосфатазы. Активность фосфатазы измеряли в суспензии раздавленных клеток печени наблюдая за гидролизом паранитрофенилфосфата при 37⁰ С и рН 7.

Пара-нитрофенол



Если взять в расчет все вышеприведенные данные, то какая из гипотез лучше всего описывает причину ожирения мышей «толстяк»

- А. Причиной увеличения массы тела у мышей «толстяк» является более низкий уровень лептина по сравнению с мышами дикого типа. У мышей «толстяк» недостаточно лептина, чтобы отправить сигнал о том, что мышь насытилась, в мозг.
- В. Причиной увеличения массы тела у мышей «толстяк» является мутация в рецепторе лептина. Эта мутация препятствует димеризации рецептора и тем самым не запускает сигнальную цепь, отвечающую за насыщение. Это также объясняет то, почему вкалывание лептина мышам «толстяк» не уменьшало их вес.
- С. Причиной увеличения массы тела у мышей «толстяк» является повышенная активность тирозин фосфатазы (напр. в результате мутации). Фосфатаза дефосфорилирует фосфорилированный лептиновый рецептор и сигнальный путь отвечающий за насыщение не запускается.
- D. Увеличение массы тела мышей «толстяк» связана с инсулином. А именно уровень инсулина в крови мышей «толстяк» равен уровню дикого типа, а масса тела до четырех раз больше. Тем самым количество инсулина на единицу массы у мышей «толстяк» меньше, чем у дикого типа и поэтому мозг «толстяков» не получает сигнала сытости.
- Е. Увеличение массы тела мышей «толстяк» не связана с сигнальной цепью запускаемой инсулином или лептином. Потому как 1) уровен инсулина у «толстяков» и мышей дикого типа одинаковый, 2) маленькое уменьшение уровня лептина у мышей «толстяк» не является статистически достаточным, чтобы объяснить такое значительное увеличение веса у мышей «толстяк» и 3) долговременное вкалывание лептина мышам «толстяк» не привело к уменьшению веса. Избыточный вес должен быть связан с каким-то другим фактором. Ученые все это время только тратили деньги налогоплательщиков.