

УДК 577.175.632

## Молекулярная биология прогестерона

А. Н. Смирнов

**АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ СМИРНОВ** — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эндокринологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: физиология и биохимия гормонов и рецепторов, гормональная регуляция экспрессии генов, половая дифференцировка.

119992, Москва, Ленинские горы 1/12, МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, лаборатория эндокринологии, тел. (095)939-36-78, факс (095)939-43-09, E-mail smirnov\_an@mail.ru

Стероидный гормон яичников и плаценты прогестерон (см. схему) получил свое название благодаря способности поддерживать беременность (гестацию) после удаления у животных яичников. Помимо гестагенной функции, прогестерон оказывает множество других эффектов на организм, включая индукцию развития лобуло-альвеолярного аппарата молочной железы, прямую и опосредованную гипоталамо-гипофизарной системой регуляцию функции яичников и созревания яйцеклетки, стимуляцию полового поведения, а также ряд эффектов на системы, не имеющие прямого отношения к репродукции, например, сердечно-сосудистую, желчевыделительную и терморегуляцию. Синтетические аналоги (агонисты и антагонисты) прогестерона (см. схему) находят широкое применение в заместительной терапии при недостаточности секреции прогестерона, а также в составе контрацептивных препаратов. Подобное применение нередко сопровождается нежелательными побочными эффектами, например, вирилизацией или увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний, что диктует необходимость создания аналогов прогестерона избирательного действия. Одним из прототипов селективных аналогов прогестерона могут служить 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклоалканопрогестероны (см. схему) [1]. Подходы к

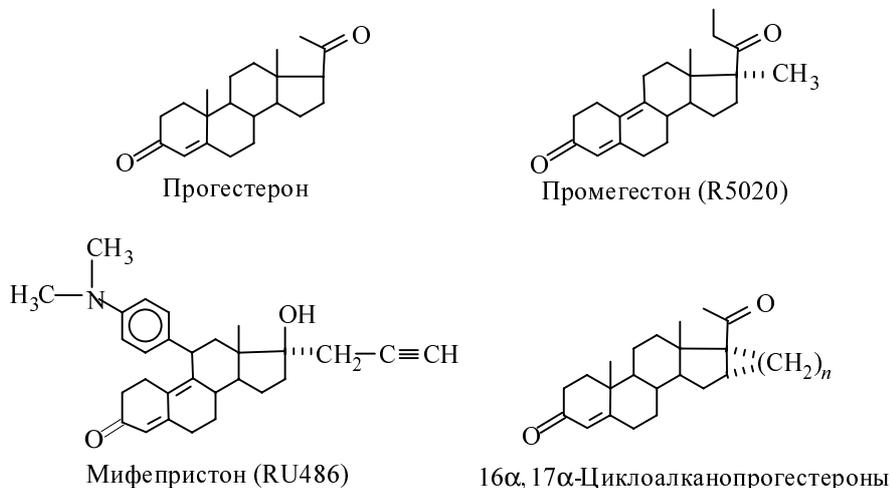
решению этой задачи кроются в особенностях проведения разных сигналов прогестерона, чему, преимущественно, и посвящен предлагаемый обзор. Механизмы действия прогестерона имеют много общего с действием других стероидных гормонов, причем некоторые стороны проведения гормонального сигнала лучше исследованы в отношении других стероидов (прежде всего глюкокортикоидов и эстрогенов). Соответствующие данные с большой степенью вероятности могут быть аппроксимированы к действию прогестерона и поэтому также включены в обзор.

### Ядерные рецепторы прогестерона

#### Общие сведения

Подавляющая часть эффектов прогестерона в организме млекопитающих опосредуется его рецепторами, относящимися к семейству ядерных рецепторов. Это семейство включает рецепторы других стероидных гормонов (глюко- и минералокортикоидов, андрогенов, эстрогенов), рецепторы гормонов щитовидной железы, гормональной формы витамина D<sub>3</sub> и ретиновых кислот, а также сенсоры негормональных соединений, таких как желчные и жирные кислоты, гидроксипроизводные холестерина, поллютанты. Некоторые ядерные рецепторы, по-видимому, не способны взаимодействовать с низкомолекулярными соединениями, и их активность регулируется другими механизмами. Ядерные рецепторы имеют сходную структурно-функциональную организацию и действуют преимущественно как транскрипционные факторы, хотя известны и другие формы проявления их активности [2].

Ядерные рецепторы обнаружены как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных, однако рецепторы стероидных гормонов, включая рецепторы прогестерона, являются эволюционным завоеванием хордовых. Предполагается, что наи-



Схема

более древним из рецепторов стероидов является рецептор эстрогенов (ER), причем исходно его лигандами могли служить не сами эстрогены, а их биосинтетические предшественники — 3-гидроксид<sup>5</sup>-стероиды. Лишь после появления 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы/ $\Delta^5$ -4-изомеразы (EC 1.1.1.145/EC 5.3.3.1) (фермента, катализирующего окисление 3 $\beta$ -гидроксила до кетогруппы и переброжку двойной связи из кольца В в кольцо А стероидной молекулы) возникла возможность биосинтеза эстрогенов из андростендиона или тестостерона, и эстрогены стали предпочтительными лигандами ER. Последующая эволюция рецепторов стероидных гормонов включала серию дубликаций и расхождений гена ER и его наследников. В результате дубликации гена ER появился прототипичный рецептор 3-кетостероидов, близкий к рецептору прогестерона (PR). Двойная дубликация гена PR, в свою очередь дала, с одной стороны, рецептор андрогенов (AR), а с другой — рецептор глюкокортикоидов (GR). Позднее дубликация гена GR обеспечила появление рецептора минералокортикоидов. Предполагается, что движущей силой эволюции рецепторов служили сами стероиды [3, 4].

У человека рецепторы прогестерона PR кодируются одним геном, транскрипция которого может давать несколько изоформ белка. Наиболее распространенными изоформами PR являются PR-A и PR-B, возникающие в результате действия разных промоторов (областей, определяющих инициацию транскрипции) гена PR и различающиеся между собой наличием на N-конце PR-B фрагмента из 164 аминокислотных остатков, отсутствующего в PR-A. Использование того или иного промотора гена PR тканеспецифично и дополнительно контролируется эндокринными и паракринными факторами [5–7]. Эксперименты с разделным нокаутом двух промоторов гена PR у мыши показали, что для подготовки к беременности и ее поддержания прогестероном необходим PR-A, а для развития молочной железы требуется экспрессия PR-B [8, 9]. Две изоформы PR различаются по спектру индуцируемых прогестероном ответов одной и той же клетки, и PR-A может даже ингибировать действие прогестерона через PR-B [10]. Для понимания причин отмеченных различий в биологической активности двух изоформ PR следует рассмотреть их структуру в связи с другими участниками системы проведения сигнала прогестерона (рис. 1).

Активационные функции 1 и 3 (АФ-1 и -3) модуляторного домена А/В включают поверхности взаимодействия с коактиваторными белками и способны действовать независимо от связывания рецептором лиганда [11, 12]. Отсутствие АФ-3 в изоформе PR-A обеспечивает проявление активности ингибиторного домена (ИД), способного взаимодействовать с корепрессорными белками [13]. Домен А/В участвует также в димеризации PR [14]. Данный домен активно фосфорилируется рядом протеинкиназ (ферментов, переносящих  $\gamma$ -фосфат аденозинтрифосфата (АТФ) на остаток серина, треонина или тирозина белковых субстратов), что может оказывать дифференцированное

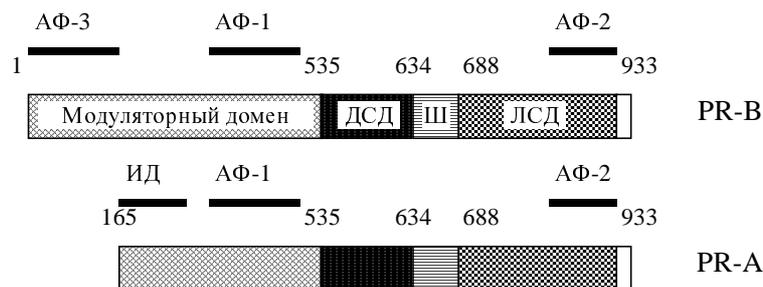


Рис. 1. Доменная организация изоформ В и А рецептора прогестерона человека:

ДСД — ДНК-связывающий домен (= домен С); Ш — шарнирный домен (= домен D); ЛСД — лигандсвязывающий домен (= домен E). Модуляторный домен = домен А/В. Небольшой домен F на С-конце молекулы подавляет агонистическую активность антагонистов. АФ-1, АФ-2 и АФ-3 — активационные функции 1, 2 и 3. ИД — ингибиторный домен. Цифрами обозначены номера аминокислотных остатков

влияние на активность изоформ PR [15]. ДНК-связывающий домен включает два цинковых «пальца» и С-концевое расширение, аминокислотные остатки которых взаимодействуют с нуклеотидами или сахарофосфатным остовом ДНК в составе гормончувствительных элементов регуляторных областей компетентных генов [16]. Шарнирный домен обеспечивает двустороннюю передачу сигнала о конформационных изменениях в N- и С-концевых областях молекулы и участвует в димеризации PR [14]. ДНК-связывающий и шарнирный домены формируют сигнал ядерной локализации PR, участвующий также и в экспорте рецептора из клеточного ядра [17]. Лигандсвязывающий домен (ЛСД) выполняет одновременно несколько функций. Помимо лиганда, этот домен взаимодействует с шаперонными белками («белками-няньками»), регулируя внутриклеточный транспорт рецептора и его готовность к проведению гормонального сигнала (см. ниже). ЛСД (совместно с шарнирным доменом) содержит также поверхность гомодимеризации рецептора, необходимой для высокоаффинного связывания рецепторной молекулы с палиндромной (построенной из комплементарных друг другу фрагментов) структурой гормончувствительного элемента ДНК [14]. На С-конце ЛСД расположена активационная функция 2, представляющая собой поверхность, формируемую в присутствии прогестерона и обеспечивающую взаимодействие рецептора с коактиваторами. При сходном плане строения разные ядерные рецепторы могут несколько различаться по локализации отдельных функциональных элементов [18].

#### Регуляция рецепторов прогестерона шаперонными белками

В отличие от других ядерных рецепторов, зрелые формы рецепторов стероидов в отсутствие лиганда находятся в составе олигомерных белковых комплексов, включающих помимо рецепторной молекулы белок теплового шока 90 (Hsp90), кошаперонный белок p23 и один из белков, содержащих так называемый 34-членный повтор (TPR). В последнюю группу белков входят иммунофилины: циклофилин 40 (Cyp40), связывающий иммуносупрессорный агент циклоспорин А, белки FKBP51 и FKBP52, связывающие продуцируемый стрептомицетами иммуносупрессорный агент

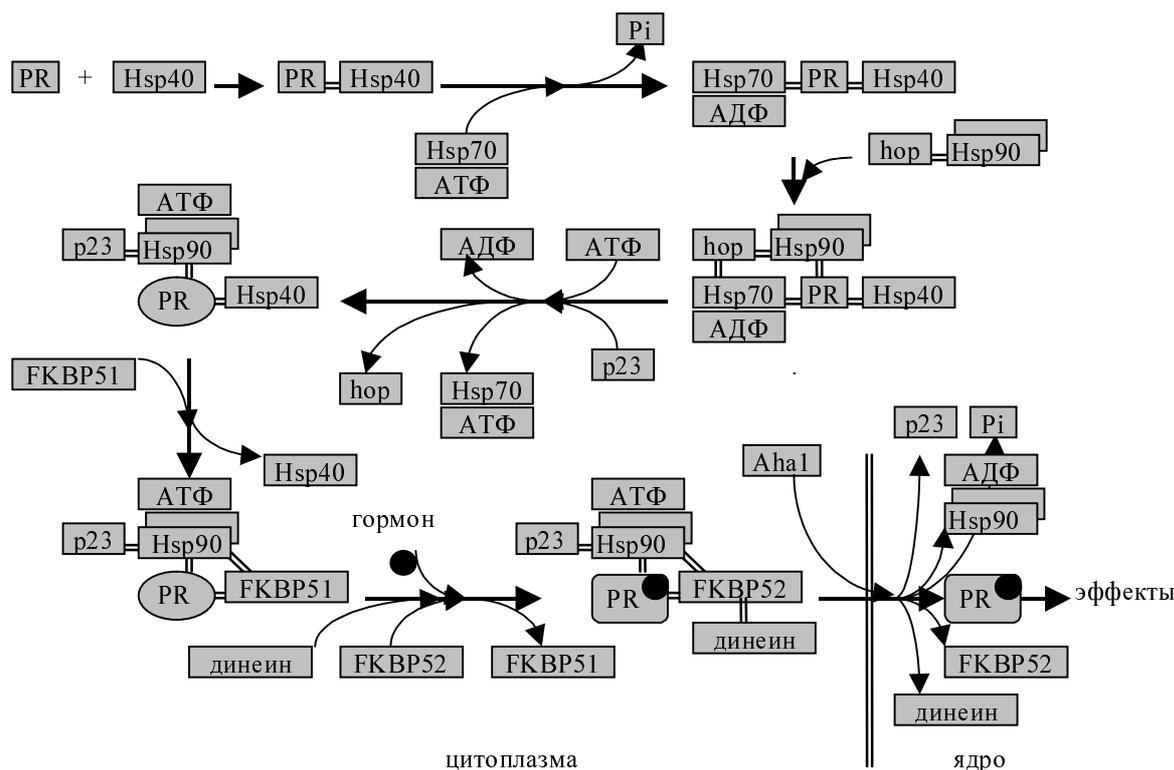


Рис. 2. Модель созревания рецепторов прогестерона с участием шаперонных белков. Сокращения — см. в тексте

FK506, а также протеинфосфатаза 5 (PP5) (фермент, гидролизующий связь фосфата с аминокислотными остатками белковых субстратов). В составе комплексов белки находятся в стехиометрическом отношении 1(PR) : 2(Hsp90) : 1(p23) : 1(TRP-содержащий белок) [19–21]. В соответствии с количеством упомянутых выше TRP-содержащих белков возможно формирование четырех дискретных олигомерных комплексов PR. Эти комплексы могут различаться функционально, и соотношение в клетке разных TRP-содержащих белков может оказывать существенное влияние на гормональную чувствительность данной клетки.

Указанные олигомерные комплексы рецепторов формируются не в результате простой ассоциации входящих в их состав белков, а в ходе сложного динамичного процесса межбелковых взаимодействий с участием, по меньшей мере, еще 4-х белков: Hsp40, Hsp70, hsp и hop. Предполагаемая последовательность событий представлена на рис. 2 [22–24]. Необходимо отметить, что данная схема не является окончательной или универсальной. В частности, в случае рецептора глюкокортикоидов, Hsp40, по-видимому, входит в состав рецепторных комплексов уже после взаимодействия рецептора с Hsp70 [25].

Смысл столь сложной системы, по-видимому, заключается в последовательной пространственной укладке полипептидной цепи рецептора с образованием способной к связыванию гормона конформации рецептора. Комплексы рецептора с Hsp90 при физиологических условиях сравнительно нестабильны ( $t_{1/2} \sim 5$  мин), и высвобождающийся рецепторный белок входит в новый цикл созревания [26]. При связывании

рецептором лиганда может происходить взаимообмен TRP-содержащих белков в составе олигомерных комплексов, способствующий транслокации рецепторов из цитоплазмы в клеточное ядро. Элементы данной системы способны взаимодействовать с низкомолекулярными соединениями (нуклеотидами и их миметиками, иммуносупрессорными агентами), что позволяет ожидать возможность фармакологического манипулирования чувствительностью клетки к гормону уже на уровне подготовки рецептора к проведению гормонального сигнала, и попытки такого вмешательства уже предпринимаются [27–28]. Для того, чтобы оценить перспективы данного типа терапии, следует более подробно рассмотреть структуру и функции отдельных белков, участвующих в «шаперонинге» рецепторов стероидных гормонов.

Центральное место в поддержании рецептора в состоянии готовности к связыванию лиганда занимает Hsp90, экспрессируемый практически во всех клетках в виде двух структурно и функционально близких изоформ,  $\alpha$  и  $\beta$ . Две изоформы различаются, однако, по регуляции их содержания в клетках. Кроме того, в выделенных олигомерных комплексах рецепторов преобладающей была изоформа  $\alpha$  [29]. В составе Hsp90 выявлено несколько функциональных доменов. В N-концевой части молекулы содержится сайт связывания пуриновых нуклеотидов в составе каталитического АТФазного центра (гидролизующего связь между  $\gamma$ - и  $\beta$ -остатками фосфата в АТФ). В этой области расположены также поверхности связывания кошаперона p23 и некоторых белков-«клиентов». В C-концевой области Hsp90 локализованы взаимоис-

ключающие поверхности гомодимеризации и связывания TPR-содержащих белков и белковых «клиентов». В центральной части молекулы Hsp90 содержится сайт связывания кошаперонов Aha1 и Hch1, которые стимулируют АТФазную активность Hsp90 за счет экспозиции расположенной здесь каталитической петли и ее сближения с сайтом связывания АТФ N-концевой области молекулы [30].

Связывание АТФ и АТФазная функция играют важную роль в функционировании Hsp90. Присоединение АТФ стимулирует связывание кошаперона р23 и ослабляет взаимодействие Hsp90 с белками-«клиентами» [31]. Гидролиз АТФ обеспечивает возвращение Hsp90 к состоянию готовности к новому циклу шаперонинга. Антибиотики группы ансамицина (продуцируемые актиномицетами гелданамицин, гербимицин А, макбедин) включают структуру, имитирующую пуриновые нуклеотиды, за счет чего указанные антибиотики прочно связываются сайтом связывания АТФ/АДФ и тем самым блокируют функцию Hsp90. Одним из последствий является снижение уровня рецепторов стероидных гормонов в клетках [32—33].

Кошаперон р23 повышает взаимодействие Hsp90 с рецептором прогестерона и увеличивает лигандсвязывающую активность рецептора, возможно, за счет стабилизации комплекса Hsp90/PR. В отношении ряда белков-«клиентов» р23 может выполнять и самостоятельную шаперонную функцию [21].

TPR-содержащие белки взаимодействуют с С-концевой областью Hsp90 [34]. Помимо иммунофилинов и PP5, входящих в состав зрелого олигомерного рецепторного комплекса, мотивы TPR выявлены в кошаперонных белках hpr и hpr. Последний белок за счет TPR, расположенных на N- и С-концах его молекулы, взаимодействует одновременно с АДФ-связанными формами Hsp70 и Hsp90, оказывая влияние на конформацию и функцию обоих белков, что способствует замене Hsp70 на Hsp90 в олигомерных комплексах рецепторов [22, 35].

Области взаимодействия рецептора и с Hsp70, и с Hsp90 расположены в N-концевой части лигандсвязывающего домена, но не перекрываются полностью. Важно отметить, что мишенью действия Hsp90 служит граница между гидрофобным лигандсвязывающим карманом и окружающей гидрофильной поверхностью белка. В результате взаимодействия Hsp90 с этой областью рецептора происходит открытие входа в лигандсвязывающий карман [25]. Разные рецепторы стероидных гормонов могут различаться по стабильности данной активной конформации: при низкой температуре рецепторы прогестерона сохраняют лигандсвязывающую активность и после удаления Hsp90, тогда как вход в лигандсвязывающий карман рецептора глюкокортикоидов сразу захлопывается после удаления Hsp90.

Имунофилины, входящие в состав зрелых олигомерных комплексов рецепторов, помимо способности взаимодействовать с иммуносупрессорными агентами, обладают еще несколькими видами активности. Все они (Cyp40, FKBP51 и FKBP52) обладают пептидилпролизомеразной активностью (то есть способностью катализировать *цис-транс*-изомеризацию имидных пептидных связей пролина). FKBP51, по-видимому, участвует в системе отрицательной обратной

связи в функционировании рецепторов. Этот белок способен одновременно взаимодействовать и с Hsp90, и с рецепторной молекулой, снижая ее сродство к гормональному лиганду [36]. Экспрессия данного иммунофилина стимулируется стероидными гормонами, включая прогестерон [37]. Интересно, что известная гипочувствительность приматов нового света к стероидным гормонам связана, по-видимому, с повышенной экспрессией FKBP51 и его повышенной ингибирующей активностью в отношении рецепторов стероидов [38—39].

Вплоть до последнего времени считалось, что гормональный лиганд индуцирует изменение конформации рецептора, обеспечивающее отделение шаперонных белков и последующую транслокацию апорецептора в клеточное ядро. Оказалось, однако, что лиганд сначала стимулирует замещение FKBP51 другим иммунофилином, FKBP52, который способен рекрутировать в олигомерный рецепторный комплекс динеин — белок, участвующий в транспорте белков из цитоплазмы в клеточное ядро с участием микротрубочек. Диссоциация олигомерных рецепторных комплексов, по-видимому, происходит уже в клеточном ядре [24, 40]. Помимо стимуляции внутриклеточного транспорта рецептора, FKBP52 увеличивает сродство рецептора к лиганду, и для этого требуется пептидилпролизомеразная активность FKBP52 [41]. Как и FKBP51, FKBP52, наряду со связыванием Hsp90, взаимодействует непосредственно с рецепторами (шарнирная область). На С-конце молекулы FKBP52 локализована область взаимодействия с кальмодулином (небольшим белком, взаимодействие которого с белками-«клиентами» стимулируется кальцием) [20]. Различия в сродстве FKBP51 и FKBP52 к Hsp90 определяются С-концевыми последовательностями двух белков: в FKBP51 эта последовательность повышает, а в FKBP52 снижает сродство [42].

Часть олигомерных комплексов рецепторов включает PP5. Этот фермент имеет область гомологии с пептидилпролизомеразным доменом иммунофилинов и, по-видимому, также может регулироваться иммуносупрессорными агентами. За счет указанной области PP5 способна взаимодействовать с динеином, что позволяет предполагать ее участие во внутриклеточном транспорте рецепторов [43]. Cyp40 обладает низким сродством к Hsp90 и входит в состав лишь небольшой части рецепторных комплексов. Вместе с тем чувствительность системы проведения гормонального сигнала в некоторых клетках к лиганду Cyp40 — циклоспорину А позволяет предполагать реальное участие Cyp40 в шаперонинге рецепторов [44].

Перекрывание областей взаимодействия иммунофилинов и PP5 с динеином и центров связывания иммуносупрессорных агентов FK506 или рапамицина обеспечивает ингибиторное действие указанных агентов на проведение гормонального сигнала [27], хотя имеются и прямо противоположные данные [44]. Противоречия, возможно, отчасти связаны с различиями в функциях разных иммунофилинов, взаимодействующих с одним и тем же кругом низкомолекулярных регуляторов [20, 33, 45—46]. С учетом тканевых различий в экспрессии и расхождении функций разных иммунофилинов, а также предпочтительности во взаимодействии иммунофилинов с разными рецепторами, можно ожидать появления новых подходов в манипу-

лировании чувствительностью клеток к воздействию гормональных стероидов с применением негормональных низкомолекулярных регуляторов шаперонинга.

### Генотропное действие

В рамках общепринятой парадигмы действие прогестерона на экспрессию компетентных генов включает несколько ключевых моментов. Связывание агониста рецептором сопровождается таким изменением конформации рецепторной молекулы, которое обеспечивает:

- а) способность рецепторной молекулы узнавать и специфически связывать фрагменты ДНК, называемые гормончувствительными элементами;
- б) отделение от рецепторной молекулы белков, ингибирующих транскрипционную активность рецептора, называемых корепрессорами;
- в) рекрутирование в комплекс белков, повышающих транскрипционную активность рецептора, называемых коактиваторами;
- г) создание перmissive (разрешающей) среды для транскрипции за счет прямой или опосредованной дополнительными привлеченными белками модификации (релаксации) хроматина;
- д) прямое или опосредованное активирующее взаимодействие коактиваторов с компонентами базального комплекса транскрипции;
- е) запуск систем аутоингибирования проведения гормонального сигнала.

Данные кристаллографического анализа лигандсвязывающего домена разных ядерных рецепторов, включая рецепторы прогестерона, подтвержденные экспериментами с мутагенезом рецепторов, показали, что ведущую роль в инициации указанных событий в действии гормона играет изменение ориентации 12-й  $\alpha$ -спирали, входящей в состав активационной функции 2 (АФ-2) рецептора. Непосредственными следствиями данного изменения конформации рецепторной молекулы являются: захлопывание входа в лигандсвязывающий карман рецептора, отражающееся в повышении стабильности лиганд-рецепторных комплексов; возникновение стерического препятствия для взаимодействия рецептора с корепрессорами; появление поверхности взаимодействия рецептора с коактиваторами; создание возможности связывания рецептора с белками, обеспечивающими инактивацию рецепторов, в частности, убиквитинлигазами (ферментами, катализирующими присоединение к белкам-«клиентам» небольшого белка убиквитина). Необходимо подчеркнуть, что конформационные изменения при связывании лиганда затрагивают всю рецепторную молекулу, однако отсутствие кристаллографических данных для полноразмерного рецептора не позволяют пока построить обобщенную модель таких изменений. Феноменологически индуцированные лигандом изменения конформации рецептора за пределами лигандсвязывающего домена выражаются, в частности, в увеличении доли молекул рецептора, способных связываться с ДНК, в увеличении прочности связи рецептора с ДНК [47], в возникновении кооперативности в действии активационных функций 1(3) и 2 [48], в стимуляции гомодимеризации рецепторов, в изменении доступности ряда участков полипептидной цепи рецептора для фосфорилирования различными

протеинкиназами, в изменении чувствительности рецепторов к действию протеолитических ферментов.

Конформационная пластичность рецепторов обеспечивает и другие разнообразные взаимодействия партнеров рецепторов (гормональных лигандов, ДНК, корегуляторов) между собой без вступления в непосредственный контакт, т.е. рецептор выступает в качестве адапторной молекулы. Примерами подобных опосредованных рецептором взаимодействий служит влияние гормончувствительного элемента ДНК и на лигандсвязывающие свойства рецептора [49], и на взаимодействие его с коактиватором [50]. Это особенно важно учитывать при создании селективных аналогов гормонов. Конформационная пластичность обеспечивает также возможность имитации действия гормонального лиганда ковалентной модификацией рецептора, чаще всего фосфорилированием. Например, эстрогеноподобное действие эпидермального фактора роста в значительной мере обусловлено фосфорилированием рецептора эстрогенов при активации ростовым фактором рецепторной тирозинкиназы [51].

Данные рентгеноструктурного анализа лигандсвязывающего домена рецептора прогестерона и некоторых других ядерных рецепторов показывают, что, несмотря на относительно невысокую гомологию, общий план укладки полипептидной цепи разных рецепторов сходен и напоминает трехслойный сэндвич из антипараллельных  $\alpha$ -спиралей (рис. 3). В формировании гидрофобного лигандсвязывающего кармана принимают участие аминокислотные остатки из различных участков цепи рецепторной молекулы. В частности, с лигандом непосредственно контактируют остатки  $\alpha$ -спиралей 3, 5, 7, 11 и 12 и некоторые остатки, находящиеся вне  $\alpha$ -спиралей. Однако лигандная специфичность рецептора определяется не только этими остатками. Например, в дискриминации глюкокортикоидов и прогестинов важную роль играют отдаленные от лиганда остатки спиралей Н6 и Н7 [52]. Такие остатки могут определять общий размер и форму лигандсвязывающего кармана, а также степень индуцированного лигандом изменения ориентации спирали

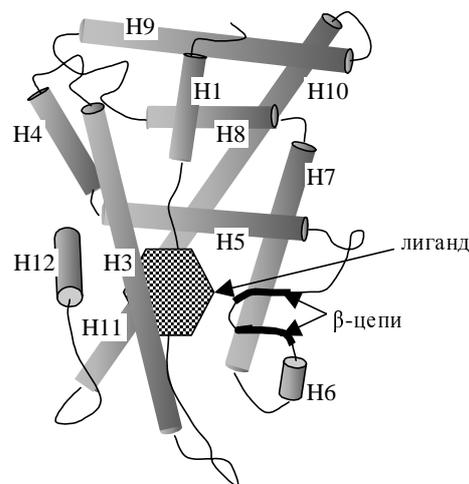


Рис. 3. Схематическое изображение пространственной укладки лигандсвязывающего домена рецептора прогестерона:

$\alpha$ -спиральные участки (Н1–Н12) изображены в виде цилиндров

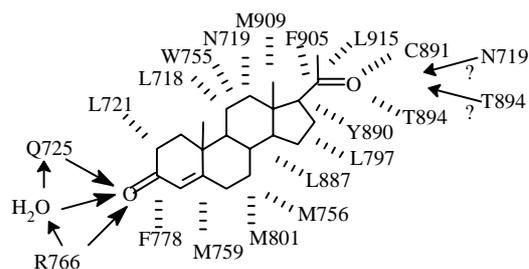


Рис. 4. Взаимодействия прогестерона с рецептором.

Водородные связи обозначены стрелками, контакты Ван-дер-Ваальса — пунктиром. Аминокислотные остатки представлены в однобуквенном коде: M — Met, F — Phe, L — Leu, C — Cys, N — Asp, T — Thr, Y — Tyr, R — Arg, Q — Gln, W — Trp. Цифрами обозначены номера аминокислотных остатков

H12, которая связана с направленностью биологического действия лиганда в ряду: полный агонист—частичный агонист/антагонист—полный антагонист.

Важнейшей общей структурной детерминантой прогестинов, кортикостероидов и андрогенов является 3-кетогруппа кольца А стероидной молекулы. Данная группа узнается инвариантными остатками глутамина и аргинина  $\alpha$ -спиралями H3 и H5 соответствующих рецепторов (Gln725 и Arg766 в PR) с образованием водородных связей. Остатки, расположенные рядом с кольцом D прогестинов и кортикостероидов и локализованные в  $\alpha$ -спирали H3 и петле 11-12, также весьма консервативны. Непосредственное окружение молекулы прогестерона в лигандсвязывающем кармане PR показано на рис. 4 [53].

Основанные на данных кристаллографического анализа модели лигандсвязывающих доменов ядерных рецепторов создают основу для дизайна новых гормонально активных соединений с заданными биологическими свойствами [54]. Самым простым является так называемый докинг или примерка предполагаемого лиганда в лигандсвязывающий карман. При этом учитываются геометрия партнеров и возможность формирования между ними водородных и гидрофобных взаимодействий. Примером данного подхода может служить дизайн 17-галогенметиленовых аналогов прогестерона [55]. На следующем этапе в расчет принимаются изменения координат атомов аминокислотных остатков полипептидной цепи рецептора, индуцируемые заместителями в молекуле лиганда. Такие изменения могут оказывать существенное влияние на геометрию лигандсвязывающего кармана [56]. Поскольку один и тот же заместитель в сочетании с разными модификациями молекулы лиганда может оказывать прямо противоположное влияние на лиганд-рецепторное взаимодействие [57], подгонка может быть продолжена с учетом и этого обстоятельства. С помощью данного подхода можно весьма продуктивно прогнозировать прочность лиганд-рецепторного взаимодействия. На основании расчетных изменений ориентации 12-й  $\alpha$ -спирали определенные предсказания можно сделать и в отношении направленности биологической активности лиганда, поскольку эти изменения различны в присутствии агониста и антагониста [56]. Разумеется, возможности данного способа дизайна новых лигандов ограничены, поскольку пока отсут-

ствует возможность учета отдаленных взаимодействий в рецепторной молекуле. Например, при данном подходе невозможно предсказать степень влияния того или иного гормончувствительного элемента ДНК на лиганд-рецепторное взаимодействие. Такое влияние установлено экспериментально и оно различно для разных лигандов [49]. Кроме того, взаимодействие рецептора с различающимися гормончувствительными элементами может приводить к различным изменениям в ориентации 12-й  $\alpha$ -спирали и, следовательно, к индивидуальной для каждого компетентного гена и типа клетки направленности биологической активности лиганда [50].

Корегуляторы (коактиваторы и корепрессоры) ядерных рецепторов представляют собой большую и постоянно пополняемую группу белков с различным механизмом действия [58]. Считается, что специфичность гормонального действия формируется в значительной мере именно на уровне корегуляторов. Действительно, рецепторы прогестерона, глюкокортикоидов, минералокортикоидов и андрогенов узнают одну и ту же консенсусную последовательность гормончувствительных элементов ДНК, GGTCAnnnTGTTCC (где n — любой нуклеотид). В одной клетке часто экспрессируется не менее двух из указанных рецепторов. Однако спектры эффектов разных гормонов перекрываются редко. Одним из механизмов канализации разных гормональных стимулов служит предпочтительность взаимодействия разных рецепторов с теми или иными корегуляторами. Так, в экспериментах с интегрированным в геном вирусным промотором было показано, что взаимодействующий с ним рецептор прогестерона рекрутирует коактиватор SRC-1, а рецептор глюкокортикоидов — родственный коактиватор SRC-2. Эта предпочтительность отражается на вовлечении в комплекс (через разные SRC) различающихся корегуляторов: CBP и pCAF, соответственно. Одним из следствий служат различия в характере индуцируемых прогестероном и глюкокортикоидом модификаций гистонов (в частности, ацетилирования Lys5 в гистоне H4 и ацетилирования Lys14 и фосфорилирования Ser10 в гистоне H3, соответственно) [59]. Как было показано для рецептора эстрогенов, предпочтительность взаимодействия рецептора с тем или иным коактиватором может также зависеть от особенностей конкретного гормончувствительного элемента ДНК [60]. Ряд корегуляторов экспрессируется тканеспецифично, что также может служить основой для возникновения уникального для каждого гормона спектра действия. Активность корегуляторов ядерных рецепторов может индивидуально контролироваться рядом факторов, в частности, путем фосфорилирования [61]. Специфичность гормонального действия может также зависеть от локализации гормончувствительного элемента относительно сайта инициации транскрипции: в разных клетках характер зависимости транскрипционной эффективности действия гормона от положения элемента различен, что, по-видимому, отражает участие разных корегуляторов во взаимодействии рецептора с базальным комплексом транскрипции [62].

Выявлены корегуляторы, взаимодействующие с C-концевой областью рецепторов, включающей активационную функцию 2, и это взаимодействие является гормонзависимым. Некоторые коактиваторы независимо от гормона связываются с N-концевой областью

рецепторов, включающей активационную функцию 1 (и АФ-3 в PR-B). Известны коактиваторы, взаимодействующие одновременно с N- и C-концевыми областями рецепторов. Часть корегуляторов узнает структуры ДНК-связывающего или шарнирного доменов рецепторов. Области контакта коактиватора с рецептором обычно включают мотив LXXLL (где L — лейцил, X — любая аминокислота). В корепрессорах этот мотив изменен до L/IXXII (I — изолейцил). Некоторые корегуляторы могут служить и коактиваторами, и корепрессорами, в зависимости, в частности, от типа рецептора. Так, взаимодействие корегулятора FKHR, как и коактиваторов, с рецептором эстрогенов стимулируется агонистом, но это приводит не к повышению, а к снижению транскрипционной активности рецептора. В то же время транскрипционная активность рецепторов тиреоидных гормонов и ретиноевой кислоты стимулируется данным корегулятором [63].

Возвращаясь к основной цели настоящего обзора, можно сделать заключение, что существование известных и возможность создания новых селективных аналогов стероидных гормонов в значительной мере определяется комбинаторикой коактиваторов и корепрессоров в клетках того или иного типа, а также локализацией и окружением гормончувствительных элементов в компетентных генах. Иллюстрацией первой части этого вывода могут служить данные работы [64]. Оказалось, что агонистическая активность частичных агонистов/антагонистов эстрогенов и прогестивнов/глюкокортикоидов (тамоксифена и RU486, соответственно) может быть существенно увеличена экспрессией коактиватора L7/SPA, взаимодействующего с шарнирным доменом рецепторов. В то же время L7/SPA не оказывал влияния на эффекты полных агонистов и антагонистов этих гормонов. Механизм такого избирательного действия L7/SPA, по-видимому, включает конкуренцию данного коактиватора с корепрессорами N-CoR или SMRT за рецепторы, находящиеся в конформации, являющейся промежуточной между полностью активной и полностью неактивной. Аналогично L7/SPA могут действовать и другие коактиваторы [65].

Комбинаторика корегуляторов, возможно, определяет и различия в действии аналогов прогестерона через изоформы рецептора прогестерона А и В. В частности, в зависимости от клеточного и промоторного контекста агонист R5020 и антагонист RU486 могут действовать однонаправленно (в случае PR-A) или разнонаправленно (в случае PR-B) на транскрипционную активность рецептора эстрогенов [66]. В экспериментах *in vitro* PR-A, как правило, проявляет слабую транскрипционную активность и может служить негативным регулятором трансактивации под действием PR-B. Это связано, как полагают, с экспозицией в PR-A ингибиторной функции, скрытой в молекуле PR-B. В результате PR-A прочнее связывает корепрессоры и слабее взаимодействует с коактиваторами по сравнению с PR-B [67].

Генотропное действие прогестерона, по-видимому, не всегда связано с индукцией гормоном взаимодействия димерного PR с палиндромным гормончувствительным элементом ДНК. Так, индукция прогестероном экспрессии пролактина в децидуальных клетках эндометрия происходит с участием фрагмента регуляторной области гена, содержащего лишь полусайт

гормончувствительного элемента. Для индукции, однако, необходимо взаимодействие рецептора прогестерона с транскрипционным фактором C/EBP $\beta$ , двоянный сайт посадки которого на ДНК расположен рядом с полусайтом для рецептора прогестерона. В данном случае рецептор прогестерона может, вероятно, выступать в качестве адаптора для взаимодействия C/EBP с корегуляторами. Интересно отметить, что в описанном примере изоформа PR-A проявляла большую транскрипционную активность, чем изоформа PR-B. Обратная ситуация имела место при применении репортерных конструкций, включавших палиндромный гормончувствительный элемент [68]. Использование полусайтов гормончувствительных элементов при одновременном взаимодействии с локализованными рядом транскрипционными факторами описано и для других рецепторов стероидных гормонов, например, в случае стимуляции глюкокортикоидами экспрессии  $\beta$ -казеина в молочной железе [69].

Продукты транскрипции более половины экспрессируемых у человека генов подвергаются альтернативному сплайсингу (вырезанию из новосинтезированной РНК отдельных фрагментов), в результате которого могут синтезироваться белки с разными, а в ряде случаев, и противоположными биологическими свойствами [70]. Примером тканеспецифичного сплайсинга может служить образование гормона кальцитонина в С-клетках щитовидной железы и нейромедиатора, пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), — в нервных клетках [71]. Стероидные гормоны, включая прогестерон, помимо действия на интенсивность транскрипции компетентных генов могут оказывать существенное влияние на характер сплайсинга новосинтезированной пре-мРНК. Данный эффект связан с рекрутированием рецепторами стероидов корегуляторов, взаимодействующих с белками, которые участвуют в узнавании последовательностей РНК, определяющих границы экзонов (фрагментов, остающихся в составе матричной РНК) и интронов (удаляемых фрагментов). В экспериментах с экспрессией минигенов, находящихся под контролем промоторов, содержащих гормончувствительные элементы, было показано, что влияние стероидов на характер сплайсинга зависит от типа промотора, самого гена и клетки, и оно специфично для индивидуального рецептора [72—74]. Эта специфичность может быть объяснена следующим образом. Посредством рецептор- и тканеспецифичного коактиватора 1 гормон рекрутирует в преинициативный транскрипционный комплекс РНК-связывающий коактиватор 2, способный распознавать определенные мотивы нуклеотидных последовательностей, связанные со сплайсингом. Данный коактиватор может быть специфичным в отношении коактиватора 1 и тканеспецифичным. В зависимости от соотношения средств к белкам преинициативного транскрипционного комплекса и новосинтезируемой РНК коактиватор 2 может либо оставаться в ассоциации с промотором гена и стимулировать интенсивность транскрипции, либо перемещаться вдоль новосинтезированной РНК вслед за РНК-полимеразой и сканировать потенциальные сайты сплайсинга пре-мРНК. Соответственно, в первом случае гормон будет влиять преимущественно на скорость биосинтеза РНК, а во втором — на процессинг РНК [75]. Действие того же гормона на процессинг транскрипта того же гена в

клетках другого типа может оказаться прямо противоположным из-за рекрутирования коактиваторов 1' и 2' с иной специфичностью. То же самое может иметь место в отношении двух генов в одной и той же клетке. Дополнительными факторами специфичности гормонального действия на процессинг РНК могут служить процессы ковалентной модификации (метилования, фосфорилирования и т.д.), влияющие на активность соответствующих белков [76].

Поскольку комбинаторика корегуляторов рецепторов стероидных гормонов в значительной мере определяет генную и тканевую специфичность гормонального действия, можно предположить, что эффекты стероидных соединений и их аналогов могут быть скорректированы в необходимом направлении путем модуляции активности или экспрессии отдельных корегуляторов.

### Мембранные рецепторы прогестерона

Помимо медленно (на протяжении часов) развивающихся эффектов прогестерон, как и другие стероидные гормоны, может индуцировать быстрые (в течение секунд—минут) ответы клеток. Эти ответы не блокируются ингибиторами биосинтеза белка и РНК и, следовательно, реализуются на посттрансляционном уровне. Многие из этих эффектов инициируются на поверхности клеток, поскольку могут быть воспроизведены конъюгатами прогестерона или его аналогов с белками, которые не проникают в клетку (см., например, обзоры [77—80]). В соответствии с этими данными на плазматической мембране многих типов клеток выявлены белки, которые специфически связывают прогестерон и могут служить его рецепторами. Некоторые из этих белков к настоящему времени идентифицированы.

#### Рецепторы, идентичные ядерным рецепторам

В случае рецепторов эстрогенов однозначно показано их заякоривание на плазматической мембране за счет присоединения пальмитата [81—82]. Что касается рецепторов прогестерона, то вопрос о возможности их связывания с мембраной остается открытым. Действительно, антитело против ядерных рецепторов прогестерона узнает эпитоп (узнаваемый антителом фрагмент поверхности антигена), локализованный на плазматической мембране [83]. Однако носителями этого эпитопа, по-видимому, являются белки, отличные от ядерных рецепторов [84]. Лишь в одном случае — индукции прогестероном созревания ооцита шпорцевой лягушки — получены доказательства участия ядерных рецепторов прогестерона в проведении сигнала не в качестве транскрипционных факторов, а в качестве пускателя протеинкиназных каскадов [85—87]. Интересно отметить, что данное негеномное действие прогестерона воспроизводится антипрогестином RU486. Это позволяет предполагать, что эффекторные структуры, участвующие в проведении негеномного сигнала узнают элементы конформации рецептора, отличные от таковых, узнаваемых коактиваторами и корепрессорами. Негеномное действие классического ядерного PR может включать взаимодействие его богатой пролином области с SH3 доменами ряда белков, включая тирозинкиназу c-Src [87]. В комплекс с рецептором могут также рекрутироваться фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) и активируемая митогенами

протеинкиназа p42 (MAPK p42) [88]. Способность прогестинов активировать c-Src значительно увеличивается в присутствии рецептора эстрогенов, который, видимо, служит мостиком между PR и c-Src [89].

#### Белок RDA288

Один из мембранных белков, узнаваемых антителом C-262 против ядерного рецептора прогестерона, был выделен из гранулезных клеток яичников крысы (которые не экспрессируют классический ядерный рецептор прогестерона) и оказался идентичным RDA288 — белковому продукту, возможно участвующему в регуляции стабильности мРНК. Экспрессия RDA288 в клетках повышала связывание прогестерона мембранами клеток и усиливала антиапоптотическое (препятствующее запрограммированной гибели клеток) действие гормона. Связывание прогестерона данным белком происходит, по-видимому, с участием сайтов, взаимодействующих с гиалуроновой кислотой: гиалуроновая кислота воспроизводит эффект прогестерона и ингибирует его связывание мембранами клеток [90].

#### Мембранный рецептор прогестинов альфа

Из яичников морской форели клонирован интегральный (то есть конститутивно связанный с мембраной) мембранный белок с 7 трансмембранными доменами, сопряженный с G<sub>i</sub> белком. Данный белок с высоким сродством и избирательностью связывает прогестины и обеспечивает их стимулирующее действие на созревание ооцитов, опосредуя ингибирующий эффект на аденилатциклазу (фермент, катализирующий превращение АТФ в циклический аденозинмонофосфат, цАМФ) и активирующий эффект на активируемую митогенами протеинкиназу (МАРК) [91]. Гомологичные белки были клонированы из других видов животных, включая человека. Для взаимодействия этих белков с лигандом характерна быстрая кинетика, типичная для мембранных рецепторов [92].

#### Ассоциированные с мембранами компоненты 1 и 2 рецептора прогестерона

Из гладкомышечных клеток и печени свиньи, а затем и из других источников разных видов, включая человека, клонировано два гомологичных прогестеронсвязывающих белка с гомологией гемсвязывающему домену цитохрома b<sub>5</sub>. Эти белки включают один трансмембранный домен и локализуются в микросомальной фракции клеток. У человека компонент 1 экспрессируется преимущественно в печени и почках, а компонент 2 — в плаценте [93—95]. Связывание прогестерона данными белками ингибируется рядом лигандов рецепторов опиоидов сигма, что позволило предположить определенную общность двух типов белков [96], тем более, что рецепторы сигма также включают лишь один трансмембранный домен и локализуются в эндоплазматическом ретикулуме.

#### Рецепторы опиоидов сигма-1

Прогестерон может служить антагонистом рецепторов опиоидов сигма-1, ингибируя, в частности, болевую чувствительность [97]. Рецепторы сигма служат физиологическими антагонистами анальгетического действия опиоидов через мю-, дельта- и каппа-рецепторы [98]. Полагают, что механизм действия рецепторов сигма включает регуляцию компартамента-

зации липидов в клетке [99] и амплификацию внутриклеточных систем проведения внеклеточных сигналов [100]. Выявленное действие прогестерона, по-видимому, является физиологически значимым, поскольку беременность снижает стимулированное сигма-1 возбуждающее действие аналога глутамата N-метил-D-аспартата (NMDA) [101].

#### **Рецепторы глицина**

Рецепторы глицина представляют собой пентамерные мембранные структуры, служащие каналами для  $Cl^-$ . Их активация приводит к гиперполяризации клетки и торможению ее возбудимости. Прогестерон служит избирательным ингибитором рецепторов, включающих альфа(2) субъединицы [102].

#### **Рецепторы ацетилхолина**

Никотиновые рецепторы ацетилхолина представляют собой пентамерные мембранные структуры, служащие каналами для  $Na^+$ . Открытие каналов обеспечивает деполяризацию клетки и повышение ее возбудимости. Прогестерон, его гидроксильированные производные и синтетический аналог промгестон могут служить неконкурентными ингибиторами данных рецепторов [103–104].

#### **Рецепторы А гамма-аминомасляной кислоты**

Рецепторы типа А гамма-аминомасляной кислоты ( $GABA_A$ ) являются пентамерными структурами, состоящими из трех типов субъединиц, формирующих канал для  $Cl^-$ . Эти рецепторы обеспечивают мощное тормозное синаптическое действие. Сходные рецепторы обнаружены и в невозбудимых клетках. Прогестерон, его метаболиты и особенно его  $3\alpha,5\alpha/\beta$ -тетрагидропроизводные являются аллостерическими регуляторами рецептора  $GABA_A$ , стимулирующими активность канала. Одним из объектов данного пути действия прогестина служат сперматозоиды, где прогестины вызывают акросомную реакцию [105–106].

#### **Заключение**

Результаты исследований механизмов проведения сигналов прогестерона и других стероидных гормонов показывают, что эти механизмы множественны, тканеспецифичны и включают широкий спектр регуляторных белков и низкомолекулярных посредников. Это обстоятельство наряду с конформационной пластичностью и множественностью рецепторов может послужить основой для разработки новых, высокоселективных гормональных аналогов и модуляторов гормонального действия, функционирующих на разных уровнях проведения сигнала. Вместе с тем, следует понимать, что на современном этапе удастся очертить лишь самые общие контуры сложнейшего образования, каким является организм высших животных, включая человека. Несмотря на очевидные достижения в области молекулярной биологии стероидных гормонов, мы пока не можем предсказать все последствия введения в организм нового гормонального аналога. Примером непредвиденных обстоятельств такого рода может служить обнаружение высокоаффинного взаимодействия селективных аналогов прогестерона ряда  $16\alpha,17\alpha$ -циклоалканпрогестеронов с рецепторными белками отдельных тканей и сыворотки крови [107–108]. Вполне очевидно, что потребуются ог-

ромные совместные усилия химиков, молекулярных биологов и физиологов для создания «фабрики» гормонов, выпускающей продукцию, приемлемую не только для Фармкомитета, но и для организма.

#### **Словарь терминов**

**Агонист (антагонист)** — аналог, действующий однопавлено (противоположно) с природным гормоном

**Акросомная реакция** — экзоцитоз специализированной лизосомы (акросомы) головной части сперматозоида

**«Белки-клиенты»** — белки, являющиеся объектами шаперонинга

**Вирилизация** — маскулинизация, приобретение мужских признаков

**Гранулезные клетки** — зернистые клетки, формирующие внутреннюю выстилку фолликулов яичников и окружающие яйцеклетку

**Децидуальные клетки** — морфологически и биохимически измененные стромальные клетки эндометрия матки

**Лобуло-альвеолярный аппарат** — система железистых полостей (альвеол) и протоков в пределах доли молочной железы

**Паракринные факторы** — сигнальные соединения, действующие местно, недалеко от места образования

**Пермиссивная среда** — среда, позволяющая осуществление транскрипции

**Шаперонные белки** — «белки-няньки»

**Шаперонинг** — действие «белков-нянек» на процессы функционального созревания белка, включая пространственную укладку полипептидной цепи и доставку белка к месту его назначения в клетке

**Убиквитин** — небольшой белок (у человека 76 аминокислотных остатков), ковалентно присоединяемый к белкам-мишеням и направляющий их на путь протеолитической деградации

**Энхансеры** — последовательности ДНК, усиливающие транскрипционную активность промоторов генов

#### **Список сокращений**

C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) — белок, связывающий CCAAT/энхансер

CBP (CREB-binding protein) — белок, связывающий CREB

CREB (cAMP response element-binding protein) — белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент

$G_i$ -белок (guanine nucleotide-binding protein, inhibitory) — белок, связывающий гуаниновые нуклеотиды, ингибирующий (аденилатциклазу)

L7/SPA (switch protein for antagonists) — белок-переключатель для антагонистов

N-CoR (nuclear receptor corepressor) — корепрессор ядерных рецепторов

pCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor) — фактор, ассоциированный с белком, связывающим p300/CREB; p300 — белок с  $M = 300$  кДа

RDA288 — белок не имеет названия

SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors) — медиатор молчания рецепторов ретиноидных и тиреоидных гормонов

SRC (steroid receptor coactivator) — коактиватор рецепторов стероидов

TPR-содержащие белки (tetratricopeptide repeat) — тридцатичетырехчленный повтор

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Камерницкий А.В., Левина И.С. Хим.-фармацевт. ж., 1991, № 10, с. 4—16.
2. Смирнов А.Н. Биохимия, 2002, т. 67, № 9, с. 1157—1181.
3. Baker M.E. Mol. Cell Endocrinol., 2004, v. 215, № 1—2, p. 55—62.
4. Baker M.E. J. Mol. Endocrinol., 2002, v. 28, № 3, p. 149—152.
5. Flototto T., Niederacher D., Hohmann D. e. a. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2004, v. 88, № 2, p. 131—142.
6. Petz L.N., Ziegler Y.S., Schultz J.R. e. a. Ibid., 2004, v. 88, № 2, p. 113—122.
7. Madsen G., Zakar T., Ku C.Y. e. a. J. Clin. Endocrinol. Metab., 2004, v. 89, № 2, p. 1010—1013.
8. Mulac-Jericevic B., Conneely O.M. Reproduction, 2004, v. 128, № 2, p. 139—146.
9. Conneely O.M., Mulac-Jericevic B., Lydon J.P. Steroids, 2003, v. 68, № 10—13, p. 771—778.
10. Vegeto E., Shahbaz M.M., Wen D.X. e. a. Mol. Endocrinol., 1993, v. 7, № 10, p. 1244—1255.
11. Sartorius C.A., Melville M.Y., Hovland A.R. e. a. Ibid., 1994, v. 8, № 10, p. 1347—1360.
12. Takimoto G.S., Tung L., Abdel-Hafiz H. e. a. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2003, v. 85, № 2—5, p. 209—219.
13. Hovland A.R., Powell R.L., Takimoto G.S. e. a. J. Biol. Chem., 1998, v. 273, № 10, p. 5455—5460.
14. Tetel M.J., Jung S., Carbajo P. e. a. Mol. Endocrinol., 1997, v. 11, № 8, p. 1114—1128.
15. Takimoto G.S., Hovland A.R., Tasset D.M. e. a. J. Biol. Chem., 1996, v. 271, № 23, p. 13308—13316.
16. Giguere V. Endocr. Rev., 1999, v. 20, № 5, p. 689—725.
17. Tyagi R.K., Amazit L., Lescop P. e. a. Mol. Endocrinol., 1998, v. 12, № 11, p. 1684—1695.
18. Tanenbaum D.M., Wang Y., Williams S.P., Sigler P.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, v. 95, № 11, p. 5998—6003.
19. Rehberger P., Rexin M., Gehring U. Ibid., 1992, v. 89, № 17, p. 8001—8005.
20. Silverstein A.M., Galigniana M.D., Kanelakis K.C. e. a. J. Biol. Chem., 1999, v. 274, № 52, p. 36980—36986.
21. Weaver A.J., Sullivan W.P., Felts S.J. e. a. Ibid., 2000, v. 275, № 30, p. 23045—23052.
22. Hernandez M.P., Sullivan W.P., Toft D.O. Ibid., 2002, v. 277, № 41, p. 38294—38304.
23. Hernandez M.P., Chadli A., Toft D.O. Ibid., 2002, v. 277, № 14, p. 11873—11881.
24. Davies T.H., Ning Y.M., Sanchez E.R. Ibid., 2002, v. 277, № 7, p. 4597—4600.
25. Murphy P.J., Morishima Y., Chen H. e. a. Ibid., 2003, v. 278, № 37, p. 34764—34773.
26. Smith D.F. Mol. Endocrinol., 1993, v. 7, № 11, p. 1418—1429.
27. Le Bihan S., Marsaud V., Mercier-Bodard C. e. a. Ibid., 1998, v. 12, № 7, p. 986—1001.
28. Miyata Y. Nippon Yakurigaku Zasshi., 2003, v. 121, № 1, p. 33—42.
29. Binart N., Chambrud B., Dumas B. e. a. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, v. 159, № 1, p. 140—147.
30. Meyer P., Prodromou C., Liao C. e. a. EMBO J., 2004, v. 23, № 3, p. 511—519.
31. Obermann W.M., Sondermann H., Russo A.A. e. a. J. Cell Biol., 1998, v. 143, № 4, p. 901—910.
32. Vanaja D.K., Mitchell S.H., Toft D.O. e. a. Cell Stress Chaperones, 2002, v. 7, № 1, p. 55—64.
33. Prima V., Depoix C., Masselot B. e. a. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2000, v. 72, № 1—2, p. 1—12.
34. Carrello A., Ingley E., Minchin R.F. e. a. J. Biol. Chem., 1999, v. 274, № 5, p. 2682—2689.
35. Lassle M., Blatch G.L., Kundra V. e. a. Ibid., 1997, v. 272, № 3, p. 1876—1884.
36. Sinars C.R., Cheung-Flynn J., Rimerman R.A. e. a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, v. 100, № 3, p. 868—873.
37. Kester H.A., van der Leede B.M., van der Saag P.T., van der Burg B. J. Biol. Chem., 1997, v. 272, № 26, p. 16637—16643.
38. Scammell J.G., Denny W.B., Valentine D.L., Smith D.F. Gen. Comp. Endocrinol., 2001, v. 124, № 2, p. 152—165.
39. Hubler T.R., Denny W.B., Valentine D.L. e. a. Endocrinology, 2003, v. 144, № 6, p. 2380—2387.
40. Galigniana M.D., Radanyi C., Renoir J.M. e. a. J. Biol. Chem., 2001, v. 276, № 18, p. 14884—14889.
41. Riggs D.L., Roberts P.J., Chirillo S.C. e. a. EMBO J., 2003, v. 22, № 5, p. 1158—1167.
42. Cheung-Flynn J., Roberts P.J., Riggs D.L., Smith D.F. J. Biol. Chem., 2003, v. 278, № 19, p. 17388—17394.
43. Galigniana M.D., Harrell J.M., Murphy P.J. e. a. Biochemistry, 2002, v. 41, № 46, p. 13602—13610.
44. Renoir J.M., Mercier-Bodard C., Hoffmann K. e. a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, v. 92, № 11, p. 4977—4981.
45. Zuo Z., Urban G., Scammell J.G. e. a. Biochemistry, 1999, v. 38, № 28, p. 8849—8857.
46. Dean D.A., Urban G., Aragon I.V. e. a. BMC Cell Biol., 2001, v. 2, № 1, p. 6.
47. Shchelkunova T.A., Rubtsov P.M., Levina I.S. e. a. Steroids, 2002, v. 67, № 5, p. 323—332.
48. Tetel M.J., Giangrande P.H., Leonhardt S.A. e. a. Mol. Endocrinol., 1999, v. 13, № 6, p. 910—924.
49. Pokrovskaya E.V., Levina I.S., Kamernitsky A.V. e. a. Steroids, 2003, v. 68, № 4, p. 351—359.
50. Hall J.M., McDonnell D.P., Korach K.S. Mol. Endocrinol., 2002, v. 16, № 3, p. 469—486.
51. Marquez D.C., Lee J., Lin T., Pietras R.J. Endocrine, 2001, v. 16, № 2, p. 73—81.
52. Robin-Jagerschmidt C., Wurtz J.M., Guillot B. e. a. Mol. Endocrinol., 2000, v. 14, № 7, p. 1028—1037.
53. Williams S.P., Sigler P.B. Nature, 1998, v. 393, № 6683, p. 392.
54. Bursi R., Groen M.B. Eur. J. Med. Chem., 2000, v. 35, № 9, p. 787—796.
55. Hillisch A., von Langen J., Menzenbach B. e. a. Steroids, 2003, v. 68, № 10—13, p. 869—878.
56. Madauss K.P., Deng S.J., Austin R.J. e. a. J. Med. Chem., 2004, v. 47, № 13, p. 3381—3387.
57. Покровская Е.В., Левина И.С., Куликова Л.Е., Камерницкий А.В., Смирнов А.Н. Биоорг. химия, 2004, т. 30, № 3, с. 301—307.
58. Li X., O'Malley B.W. J. Biol. Chem., 2003, v. 278, № 41, p. 39261—39264.
59. Li X., Wong J., Tsai S.Y. e. a. Mol. Cell Biol., 2003, v. 23, № 11, p. 3763—3773.
60. Loven M.A., Likhite V.S., Choi I., Nardulli A.M. J. Biol. Chem., 2001, v. 276, № 48, p. 45282—45288.
61. Ko L., Cardona G.R., Henrion-Caude A., Chin W.W. Mol. Cell Biol., 2002, v. 22, № 1, p. 357—369.
62. Nordeen S.K., Ogden C.A., Tarasevicene L., Lieberman B.A. Mol. Endocrinol., 1998, v. 12, № 6, p. 891—898.
63. Zhao H.H., Herrera R.E., Coronado-Heinsohn E. e. a. J. Biol. Chem., 2001, v. 276, № 30, p. 27907—27912.
64. Jackson T.A., Richer J.K., Bain D.L. e. a. Mol. Endocrinol., 1997, v. 11, № 6, p. 693—705.
65. Liu Z., Auboeuf D., Wong J. e. a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, v. 99, № 12, p. 7940—7944.
66. Kraus W.L., Weis K.E., Katzenellenbogen B.S. Mol. Cell Biol., 1995, v. 15, № 4, p. 1847—1857.
67. Giangrande P.H., Kimbrel E.A., Edwards D.P., McDonnell D.P. Ibid., 2000, v. 20, № 9, p. 3102—3115.

68. Christian M., Pohnke Y., Kempf R. e. a. *Mol. Endocrinol.*, 2002, v. 16, № 1, p. 141–154.
69. Wyszomierski S.L., Rosen J.M. *Ibid.*, 2001, v. 15, № 2, p. 228–240.
70. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. e. a. *Nature*, 2001, v. 409, № 6822, p. 860–921.
71. Lou H., Gagel R.F. Alternative ribonucleic acid processing in endocrine systems. In: *Endocrine Reviews*, 2001, v. 22, p. 205–225.
72. Auboeuf D., Dowhan D.H., Li X. e. a. *Mol. Cell Biol.*, 2004, v. 24, № 1, p. 442–453.
73. Auboeuf D., Dowhan D.H., Kang Y.K. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, v. 101, № 8, p. 2270–2274.
74. Auboeuf D., Honig A., Berget S.M., O'Malley B.W. *Science*, 2002, v. 298, № 5592, p. 416–419.
75. Nogues G., Kadener S., Cramer P. J. *Biol. Chem.*, 2002, v. 277, № 45, p. 43110–43114.
76. Kim S., Park G.H., Paik W.K. *Amino Acids*, 1998, v. 15, № 4, p. 291–306.
77. Bramley T. *Reproduction*, 2003, v. 125, № 1, p. 3–15.
78. Shah C., Modi D., Gadkar S. e. a. *Indian J. Exp. Biol.*, 2003, v. 41, № 7, p. 773–780.
79. Rupprecht R. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, v. 28, № 2, p. 139–168.
80. Sutter-Dub M.T. *Steroids*, 2002, v. 67, № 2, p. 77–93.
81. Li L., Haynes M.P., Bender J.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, v. 100, № 8, p. 4807–4812.
82. Acconcia F., Ascenzi P., Fabozzi G. e. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, v. 316, № 3, p. 878–883.
83. Welter B.H., Hansen E.L., Saner K.J. e. a. *J. Histochem. Cytochem.*, 2003, v. 51, № 8, p. 1049–1055.
84. Peluso J.J. *Steroids*, 2004, v. 69, № 8–9, p. 579–583.
85. Bayaa M., Booth R.A., Sheng Y., Liu X.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, v. 97, № 23, p. 12607–12612.
86. Tian J., Kim S., Heilig E., Ruderman J.V. *Ibid.*, 2000, v. 97, № 26, p. 14358–14363.
87. Boonyaratanakornkit V., Scott M.P., Ribon V. e. a. *Mol. Cell.*, 2001, v. 8, № 2, p. 269–280.
88. Bagowski C.P., Myers J.W., Ferrell J.E. *J. Biol. Chem.*, 2001, v. 276, № 40, p. 37708–37714.
89. Ballare C., Uhrig M., Bechtold T. e. a. *Mol. Cell Biol.*, 2003, v. 23, № 6, p. 1994–2008.
90. Peluso J.J., Pappalardo A., Fernandez G., Wu C.A. *Endocrinology*, 2004, v. 145, № 6, p. 3014–3022.
91. Zhu Y., Rice C.D., Pang Y. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, v. 100, № 5, p. 2231–2236.
92. Zhu Y., Bond J., Thomas P. *Ibid.*, 2003, v. 100, № 5, p. 2237–2242.
93. Meyer C., Schmid R., Scriba P.C., Wehling M. *Eur. J. Biochem.*, 1996, v. 239, № 3, p. 726–731.
94. Falkenstein E., Meyer C., Eisen C. e. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, v. 229, № 1, p. 86–89.
95. Gerdes D., Wehling M., Leube B., Falkenstein E. *Biol. Chem.*, 1998, v. 379, № 7, p. 907–911.
96. Meyer C., Schmieding K., Falkenstein E., Wehling M. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, v. 347, № 2–3, p. 293–299.
97. Ueda H., Inoue M., Yoshida A. e. a. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, v. 298, № 2, p. 703–710.
98. Mei J., Pasternak G.W. *Ibid.*, 2002, v. 300, № 3, p. 1070–1074.
99. Hayashi T., Su T.P. *Ibid.*, 2003, v. 306, № 2, p. 718–725.
100. Su T.P., Hayashi T. *Curr. Med. Chem.*, 2003, v. 10, № 20, p. 2073–2080.
101. Bergeron R., de Montigny C., Debonnel G. *Br. J. Pharmacol.*, 1999, v. 127, № 8, p. 1769–1776.
102. Maksay G., Laube B., Betz H. *Neuropharmacology*, 2001, v. 41, № 3, p. 369–376.
103. Blanton M.P., Xie Y., Dangott L.J., Cohen J.B. *Mol. Pharmacol.*, 1999, v. 55, № 2, p. 269–278.
104. Garbus I., Bouzat C., Barrantes F.J. *Neuroreport.*, 2001, v. 12, № 2, p. 227–231.
105. Somanath P.R., Gandhi K.K. *Anim. Reprod. Sci.*, 2002, v. 74, № 3–4, p. 195–205.
106. Hawkinson J.E., Kimbrough C.L., McCauley L.D. e. a. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, v. 269, № 2, p. 157–163.
107. Smirnov A.N., Pokrovskaya E.V., Kogteva G.S. e. a. *Steroids*, 2000, v. 65, № 3, p. 163–170.
108. Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Левина И.С., Куликова Л.Е., Камерницкий А.В., Шевченко В.П. *Биохимия*, 2001, т. 66, № 6, с. 846–852.