

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т. Г. ШЕВЧЕНКО
Медицинский факультет
Кафедра биологии и физиологии человека

ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СИГНАЛ. СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ

Учебное пособие

Тирасполь

*Издательство
Приднестровского
Университета*

2022

УДК 576.311.348.37(075.8)

ББК Е.051я73

О80

Составители:

К. К. Вдовиченко, канд. биол. наук, доц. каф. биологии и физиологии человека

Л. И. Гарбуз, канд. биол. наук, доц., зав. каф. биологии и физиологии человека

Рецензенты:

В. А. Шептицкий, док. биол. наук, зав., проф. каф. физиологии и санокреатологии естественно-географического факультета ПГУ им. Т. Г. Шевченко

А. И. Леорда, канд. биол. наук, доц., ведущий научный сотрудник Института физиологии и санокреатологии Академии Наук Молдовы

Ответ клетки на сигнал. Сигнальные каскады: учебное пособие / О80 составители: К. К. Вдовиченко, Л. И. Гарбуз – Тирасполь: Изд-во Приднестр. ун-та, 2022. – 88 с.

В пособии рассмотрены механизмы реагирования клетки на различного рода внеклеточные сигналы. Подробно описаны типы рецепторов, их свойства и функции. Дано описание принципов работы сигналпередающих систем. Также рассмотрены вторичные посредники, подробно объяснена их роль в реализации ответа клетки на сигнал.

При рассмотрении сигнальных каскадов уделено большое внимание патологиям, возникающим вследствие нарушения работы сигнальных систем.

Учебное пособие рекомендовано студентам медицинских специальностей «Лечебное дело», «Педиатрия», «Фармация», «Стоматология», специалистам в области биологии.

УДК 576.311.348.37 (075.8)

ББК Е.051я73

Рекомендовано Научно-методическим советом ПГУ им. Т. Г. Шевченко

© К. К. Вдовиченко, Л. И. Гарбуз, составление, 2022

ВВЕДЕНИЕ: ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СИГНАЛ, СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ

Клетки используют примерно 25 различных семейств рецепторных белков для обнаружения и ответа на множество химических и физических стимулов. Большинство рецепторов – это белки плазматической мембраны, которые взаимодействуют с химическими лигандами или стимулируются физическими воздействиями, такими как абсорбция света. Некоторые химические сигналы, включая стероидные гормоны и оксид азота, проникают сквозь плазматическую мембрану и связываются с рецепторами внутри клетки. Некоторые лиганды образуются внутри клетки в виде циклических нуклеотидов, которые стимулируют сопряженные с ними каналы (рис. 1), сюда относятся также некоторые метаболиты, которые связываются с рибопереключателями (малыми молекулами РНК, меняющими свою конформацию в зависимости от наличия определенного метаболита).

Дупликация генов и эволюционная дивергенция привели к появлению множества изоформ рецепторов, взаимодействующих с различными лигандами. У представителей таких семейств имеются один или более структурно гомологичных доменов. В некоторых семействах у изоформ наблюдается схожесть концепций в связывании лиганда и передаче сигнала (например, семитопные рецепторы и рецепторы цитокинов).

В других семействах сходны либо структуры, связывающие лиганд (семейство **tumor necrosis factor** [TNF] рецепторов), либо ме-

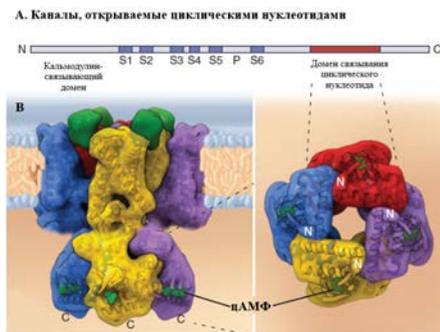


Рис. 1. ЦН-зависимые катионные каналы.

А. Доменная архитектура: N-концевой сайт связывания кальмодулина, шесть трансмембранных спиралей (S1 to S6), а также P-петля, С-концевой ЦН-связывающий домен.

В. Ленточная диаграмма модели цАМФ-зависимого канала, основанная на гомологичных трансмембранных элементах TRPV1-канала и структуры цитоплазматического циклонуклеотид-связывающего домена, кристаллизованного как тетрамер.

тод передачи сигнала (рецепторные тирозинкиназы). Замены аминокислотных остатков в общих структурах рецепторов позволяют изоформам распознавать свои специфические лиганды. В многоклеточных организмах селективная экспрессия определенных рецепторов и ассоциированных с ними сигнальных молекул позволяет дифференцированным клеткам отвечать специфически только на конкретные лиганды.

Механизмы работы хорошо изученных рецепторов распространяются и на остальные члены семейства рецепторов. Таким образом понятен механизм множества других гомологичных рецепторов.

Знания химической природы сигнальной молекулы недостаточно, чтобы определить тип рецептора или механизм передачи сигнала таким рецептором. Так, для рецепторных киназ и сопряженных с киназами рецепторов единственными известными сигнальными молекулами являются белки и пептиды. Белки и пептиды также могут стимулировать некоторые семитопные рецепторы и рецепторные гуанилатциклазы.

Семитопные рецепторы активируются особенно широким спектром сигналов: фотоны, аминокислоты, нуклеотиды, биогенные амины, липиды, пептиды, белки и сотни разных органических молекул. Некоторые лиганды связываются с разными рецепторами на разных клетках. Например, **ацетилхолин** активирует сокращение скелетных мышц путем открытия сопряженных с рецепторами ионных каналов (рис. 2). Также он связывается с семитопными рецепторами на других клетках, активируя при этом сигнальные пути, которые передают сигнал через ГТФ-связывающие белки (рис. 3). Некоторые лиганды способны связываться с разными рецепторами на разных типах клеток. Так, например, несколько интерлейкинов (от IL-2 до IL-6) связываются с цитокиновыми рецепторами, а IL-1 активирует рецепторы TNF-семейства, в то время как IL-8 связывается с семитопным рецептором, сопряженным с G-белком.

Энергия связывания лиганда с рецептором изменяет конформацию рецептора и тем самым запускает передачу сигнала через плазматическую мембрану и активацию цитоплазматических участников передачи сигнала. Связывание лиганда на клеточной поверхности изменяет конформацию семитопного рецептора, его цитоплазматическую часть. В основном связывание лиганда с внеклеточным доменом рецептора выстраивает его цитоплазматические домены

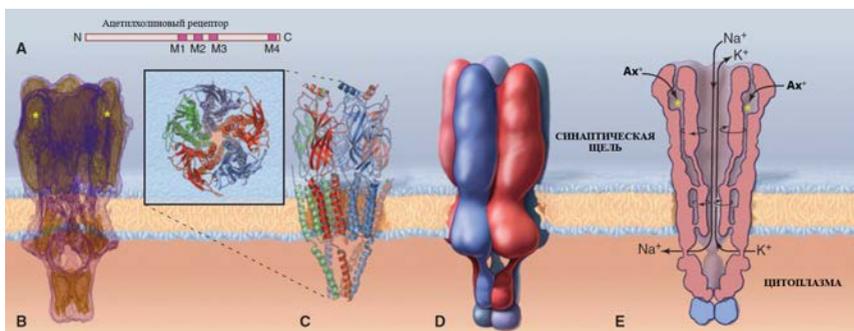


Рис. 2 Никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

А. Доменная организация. Все четыре гидрофобных сегмента, от M1 до M4, образуют мембранные спирали.

В–С. Структура пентамерного никотинового ацетилхолинового рецептора из электрического органа электрического ската, определенная с помощью электронной микроскопии.

В. Реконструкция в разрешении 0.46 нм.

С. Ленточная диаграмма никотинового ацетилхолинового рецептора (разрешение 0.40 нм). Слева, Вид со стороны внеклеточной стороны, показывающий пять M2-спиралей, выступающих центральную пору. Справа, Вид сбоку модели. Внеклеточный домены двух красных α -субъединиц связывают ацетилхолин.

Д. Объемная модель.

Е. Диаграмма, показывающая ацетилхолин-связывающие (Ах) сайты, конформационные изменения после активации и прохождение ионов Na^+ внутрь, а ионов K^+ наружу из клетки. 43-kD белок рапсин (rapsun) (серо-голубой) связан с рецептором с цитоплазматической стороны.

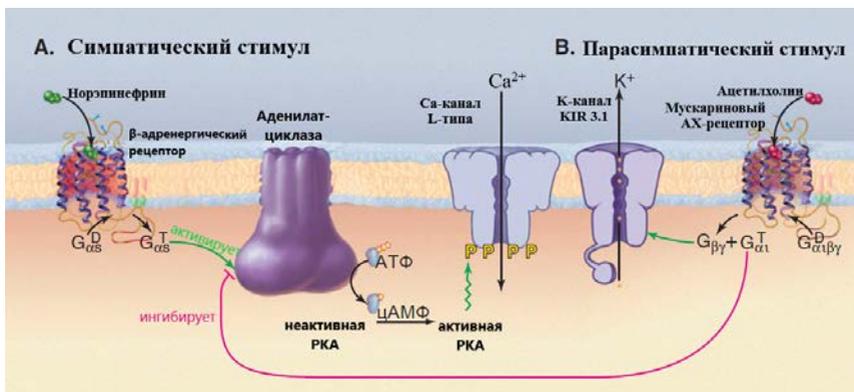


Рис. 3 Регулирование скорости клеток сердечного ритмоводителя симпатическими (А) и парасимпатическими (В) нервами.

GTP-Gas стимулирует аденилатциклазу. GTP-Gai ингибирует её. D – это ГДФ, ассоциированный с α -субъединицей G-белка. Т – это ГТФ. Ach = acetylcholine; PKA = protein kinase A.

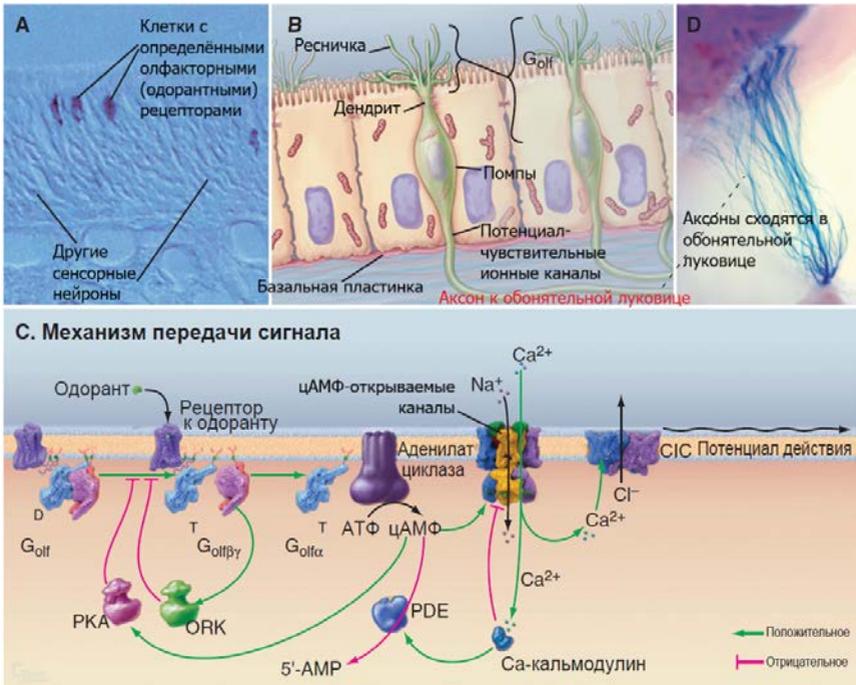


Рис. 4. Обоняние.

А – световая микроскопия среза чувствительного эпителия из носового прохода мыши после окраски на мРНК одного из ольфакторных рецепторов. Обратите внимание, что лишь пару клеток экспрессируют данный ген.

В – схематичное изображение чувствительного эпителия.

С – механизм передачи сигнала. Молекула одоранта связывается со специфическим семитопным рецептором и активирует его. Активированный рецептор катализирует обмен ГДФ на ГТФ у G-белка, после чего тот диссоциирует на свои субъединицы: $G_{olf}\alpha$ и $G\beta\gamma$. $G_{olf}\alpha$ -ГТФ активирует аденилатциклазу, синтезирующую цАМФ. В свою очередь, цАМФ связывается с ионным каналом и открывает его, что приводит к деполяризации плазматической мембраны. Ca^{2+} , который только что вошел через открытый канал, открывает хлорные каналы (CIC), которые лишь усиливают деполяризацию мембраны. Теперь деполяризация мембраны запускает потенциал действия у самого основания аксона, МПД распространяется до вторичных нейронов в мозге. Петли ООС (красные) прерывают стимуляцию. цАМФ активирует протеинкиназу А (PKA), а $G\beta\gamma$ активирует киназу одорантного рецептора (odorant receptor kinase, ORK), и обе киназы фосфорилируют и тем самым инактивируют рецептор. Ca^{2+} связывается с кальмодулином, который ингибирует цАМФ-зависимый кальциевый канал, а ещё активирует фосфодиэстеразу (PDE), разрушающую цАМФ.

Д – световая микроскопия обоняющей луковицы мыши, в которой экспрессируется маркерный белок (β -galactosidase) под промотором одного из одорантных рецепторов.

Аксоны прокрашены светло-синим. Аксоны от множества ольфакторных сенсорных нейронов, экспрессирующих один и тот же рецептор, сходятся на одну гломерулу в луковичке.

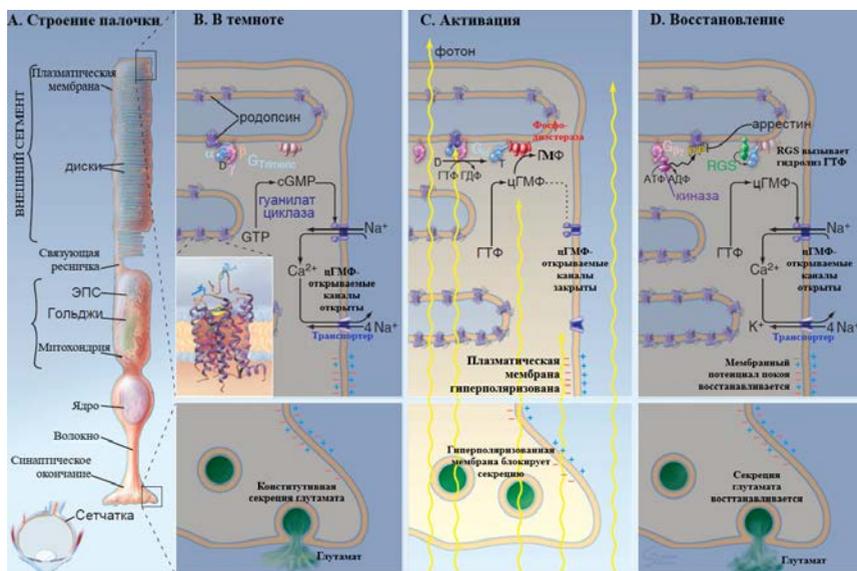


Рис. 5 Восприятие оптических сигналов у позвоночных.

A – изображение «палочек». Диски во внешнем сегменте богаты родопсином. ER = ЭПС. B–D – изображение малой части внешнего сегмента (верхняя панель) и синаптической терминали (нижняя панель) клетки-палочки. Активные компоненты изображены яркими цветами.

B – покоящаяся клетка в темноте. Постоянный синтез цГМФ поддерживает часть цГМФ-зависимых мембранных каналов в открытом состоянии большую часть времени, это позволяет втекать ионам Na⁺ и Ca²⁺. При таком мембранном потенциале в синаптической терминали постоянно секретируется нейротрансмиттер глутамат. Ca²⁺ покидает внешний сегмент через натрий/кальциевый обменник во внешнем сегменте, а натрий покидает клетку через натриевый насос в плазматической мембране внутреннего сегмента.

C – абсорбция фотона активирует родопсин, что позволяет ему катализировать обмен ГДФ (с которым связано много молекул трансдуцина) на ГТФ. При этом G_tα диссоциирует от Gβγ. Каждая молекула G_tα-GTP связывается с молекулой фосфодиэстеразы и активирует её, и она быстро расщепляет цГМФ до ГМФ. С падением концентрации свободного цГМФ, цГМФ-зависимые каналы закрываются, это приводит к гиперполяризации плазматической мембраны и прекращению секреции глутамата в синапс.

D – восстановление начинается, когда родопсин-киназа фосфорилирует активированный родопсин. Связывание арестина с фосфорилированным родопсином предотвращает дальнейшую активацию родопсином трансдуцина.

Фосфодиэстераза и белок RGS объединяются для стимуляции гидролиза ГТФ в трансдуцине (G_t), возвращая его в неактивное, G_tα-ГДФ – состояние. Синтез цГМФ гуанилатциклазой восстанавливает цитоплазматическую концентрацию цГМФ до уровня покоя, цГМФ-зависимые каналы открываются. Секреция глутамата возобновляется.

таким образом, что происходит стимулирование ферментативной активности или делает возможным связывание с другими белками, передающими сигнал далее.

Большинство сигнальных путей включают в себя один или несколько ферментов, амплифицирующих (усиливающих) сигнал. В некоторых семействах рецепторов фермент является частью самого рецепторного белка (рецепторные тирозинкиназы), а в других семействах рецептор взаимодействует с отдельным цитоплазматическим ферментом (тримерные G-белки, цитоплазматические протеинкиназы).

Если внеклеточная стимуляция длится долгое время, то большинство сигнальных систем снижают интенсивность ответа (даунрегулирование). В литературе этот феномен называется **адаптацией, аттенюацией, десенсибилизацией, тахифилаксией** или **толерантностью**. Так, например, родопсиновые и одорантные (воспринимающие запахи) рецепторы выключаются в течение секунды при длительном стимулировании (см. рис. 4 и 5). Это позволяет человеку различать быстро сменяющиеся визуальную информацию и концентрации запахов.

ТИПЫ РЕЦЕПТОРОВ

СЕМИТОПНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Наиболее обширное семейство рецепторов построено из серпантинно уложенных семи α -спиралей, пронизывающих мембрану (см. рис. 6). При активации такие рецепторы становятся гуанин-нуклеотид-обменивающими белками (guanine nucleotide exchange proteins, GEF) (см. рис. 7) для цитоплазматических тримерных ГТФ-связывающих белков (см. рис. 8). Такие рецепторы называют сопряженными с G-белком рецепторами. Связывание с ГТФ активирует тримерные G-белки, которые релейно передают сигнал на эффекторные белки внутри клетки. Семитопные рецепторы имеют одинаковую структуру и сайт связывания с лигандом (например, с бактериородопсином). Это указывает на то, что их гены очень древние.

У млекопитающих только в обонятельных клетках используется от 500 до 1000 различных семитопных рецепторов для различения одорантных молекул.

В других клетках экспрессируется ещё примерно 375 различных семитопных рецепторов, отвечающих на свет, аминокислоты, пептидные и белковые гормоны, катехоламины и липиды. Химические лиганды для некоторых рецепторов еще не определены, и такие рецепторы называются «сиротскими» рецепторами, или орфанными.

Многие лекарства, используемые в современной клинике, связываются с семитопными рецепторами.

Изучение более 75 кристаллических структур показало, что в семитопных трансмембранных рецепторах спирали уложены примерно одинаково: центральная третья спираль образует карман, с которым связывается лиганд. Размер внешнего входа в этот карман варьирует у разных рецепторов. N-концы находятся во внеклеточной стороне и варьируют в диапазоне от 7 до 6000 аминокислотных (ак) остатков. Большие N-концевые домены участвуют в связывании лиганда.

Цитоплазматические петли между 1–2, 3–4 и 5–6 спиралями взаимодействуют с тримерными G-белками. C-концевой сегмент

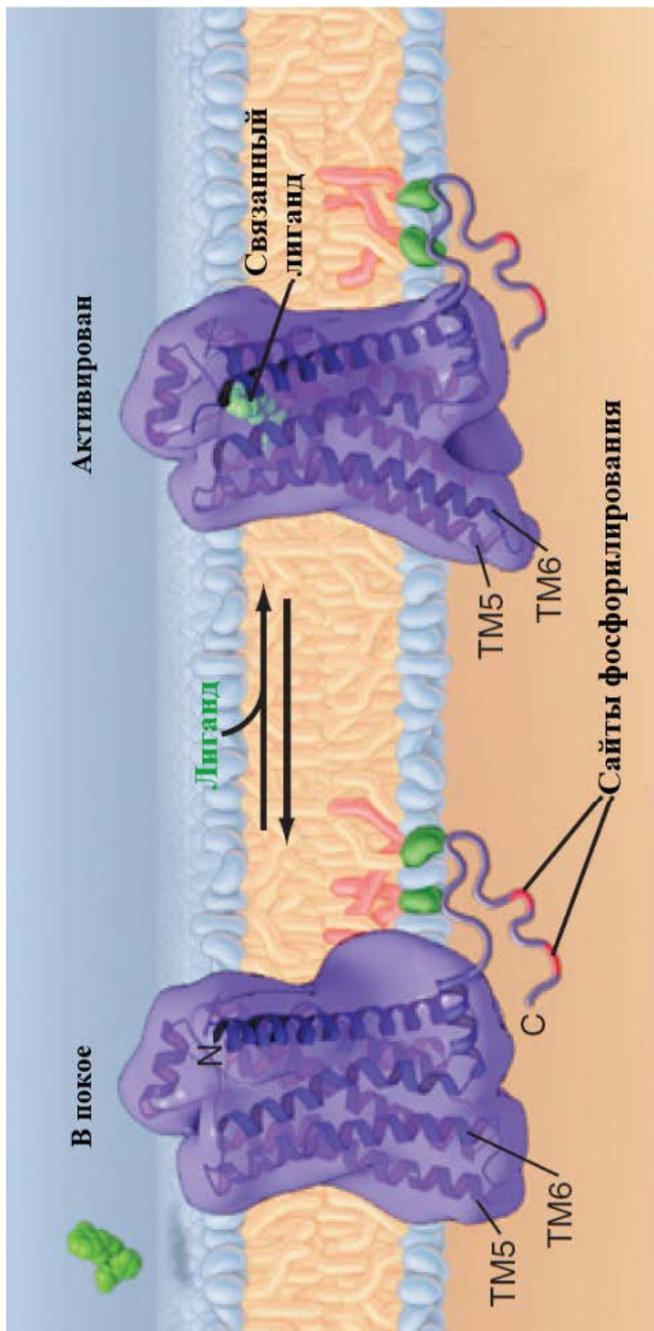


Рис. 6. Структура семитопного рецептора.

Ленточная диаграмма кристаллической структуры β 2-адренергического рецептора человека иллюстрирует разницу в конформациях, вносимую связыванием с лигандом (адреналином). Структура активного рецептора, связанного с тримерным G-белком, практически идентична.

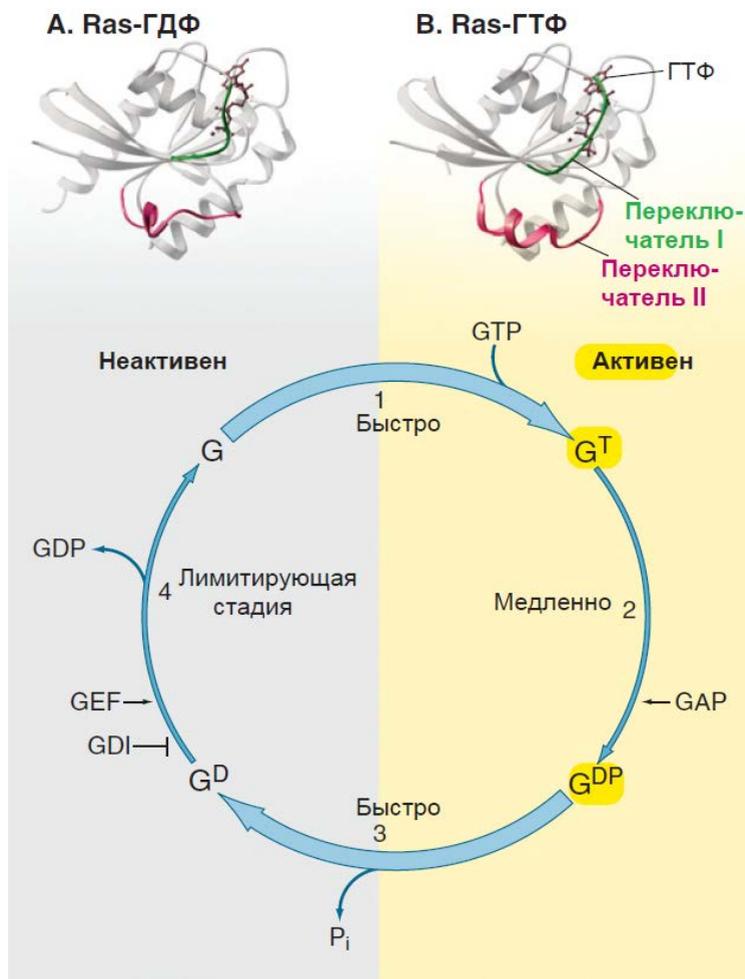


Рис. 7. Сверху, атомарные структуры малой ГТФазы Ras. Гидролиз ГТФ и диссоциация фосфата изменяют конформацию переключательных петель.

Внизу, Обобщенный ГТФазный цикл. Размер стрелок показывает относительную скорость реакций.

GAP = GTPase activating protein (активирующий ГТФазу белок);

G^D = ГТФаза со связанным ГДФ;

GDI = guanine nucleotide dissociation inhibitor;

G^{DP} = GTPase со связанным ГДФ и неорганическим фосфатом;

GEF = guanine nucleotide exchange factor (гуанин нуклеотид обменный фактор);

G^T = GTPase со связанным ГТФ;

P_i = фосфат.

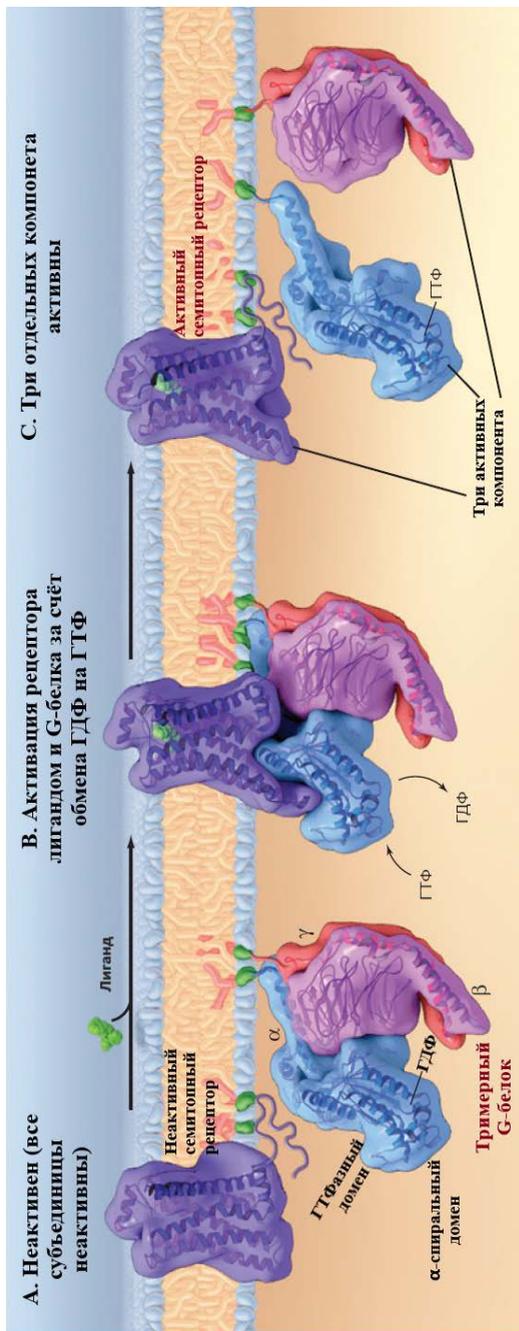


Рис. 8. Активация примерного G-белка посредством семитопного рецептора.

В данном примере представлен β_2 -адренергический рецептор и G_s -белковый комплекс (G_s – стимуляторный).
 А – Стадия покоя рецептора без лиганда и отдельный тримерный G-белок в своём неактивном, связанном с ГДФ состоянии (GDP- G_{off}). Субъединицы G_α и G_γ закорены в липидном бислое.
 В – Взаимодействие активного рецептора с тримерным G-белком. Это взаимодействие катализирует обмен ГДФ на ГТФ в субъединице G_α .

С – Активные G_α и $G_{\beta\gamma}$ диссоциируют друг от друга и рецептора и теперь могут взаимодействовать с эффекторными белками.

полипептидной цепи располагается в цитоплазме и заякоривается на билипидный слой двумя ковалентно связанными с этим сегментом остатками жирных кислот. Такой сегмент не имеет упорядоченной структуры и количество аминокислотных остатков в нём варьирует от 12 до 350. На рисунках семитопные рецепторы изображают как мономеры, однако множество семитопных рецепторов функционирует как димеры или более обширные олигомеры.

Растворимые лиганды в большинстве случаев активируют семитопные рецепторы посредством связывания с их центральным карманом, расположенном во внеклеточной части белка на примерно 1/3 толщины мембраны. Ак-остатки, выстилающие этот карман, переменны и представлены изоформами, что обеспечивает специфичность связывания лиганда. Лекарства также связываются со спиралью в кармане.

Светопоглощающий пигмент **11-cis ретиналь** ковалентно связан в таком кармане с фоторецепторным белком родопсином (см. рис. 6 В, врезка. Ретиналь отображен светло-синим) и активируется при абсорбции фотона, что приводит к изменению конформации ретиналя (см. рис. 5).

Пептидные гормоны также связываются в глубокой части кармана семитопных рецепторов, взаимодействуя с аминокислотами в них, находящимися ближе к внеклеточной части мембраны. В семитопных рецепторах к большим лигандам (гипофизарные гликопротеиновые гормоны, такие как лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон, а также тиреотропный гормон) и некоторым малым лигандам (глутамат, ГАМК, кальций) наблюдается высокая аффинность N-концевых доменов. После связывания с лигандом такой N-концевой домен активирует трансмембранный домен рецептора. Фермент системы свертывания крови тромбин активирует свои рецепторы на тромбоцитах путем протеолиза рецептора, а не с помощью непосредственного с ним связывания (см. рис. 9). N-концевой пептид, отрезаемый от рецептора, диссоциирует и активирует другие рецепторы, при этом транскрированный N-конец такого рецептора складывается в новую конформацию и уже активирует свой собственный рецептор.

Семитопные рецепторы представлены двумя равновесными конформациями (см. рис. 6): состояние покоя и состояние активации (в которых происходит обмен нуклеотидов в тримерных G-белках) (см. рис. 10).

В отсутствии лиганда рецептор находится в состоянии покоя. Связывание лиганда с рецептором (или изомеризация ретиналя после абсорбции фотона) сдвигает равновесие к активированному состоянию, что запускает передачу сигнала. Активация приводит к перестройке контактов между спиралями во внутренней части рецептора и большим сдвигам 5-ой и 6-ой спиралей.

Эти изменения формируют сайт связывания с α -субъединицей соответствующего G-белка. Сайт связывания состоит из цитоплазматических концов трансмембранных спиралей 3, 5 и 6.

Активированный рецептор катализирует диссоциацию ГДФ, связанного с G α -субъединицей G-белка. Затем ГТФ связывается с этой субъединицей и активирует её (см. рис. 8). Единичный активный семитопный рецептор способен усилить сигнал, активируя до 100 молекул G-белка. После диссоциации от рецептора и друг от друга, G α -ГТФ субъединица, а также димер G $\beta\gamma$ стимулируют эффекторные белки, ещё более амплифицируя сигнал (рис. 11).

Большинство семитопных рецепторов адаптируются к длительной стимуляции с помощью отрицательной обратной связи. При активации рецептора вырабатываются вторичные посредники, стимулирующие множество киназ. Эти киназы фосфорилируют C-концевой участок рецептора, что приводит к ингибированию взаимодействия между G-белком и его рецептором (с рецептором всё ещё связан лиганд). Киназы включают в себя (цАМФ)– **активированная протеинкиназа А (РКА)** и протеинкиназа С (РКС). Кроме того, G $\beta\gamma$ -субъединицы, высвобожденные из G-белка при активации рецептора, активируют киназу рецептора, сопряженного с G-белком. Эта киназа модифицирует сам рецептор. Такие сигнальные пути дают возможность взаиморегулирования между рецепторами, поскольку активация одного класса рецепторов способна инактивировать другие рецепторы.

Фосфорилирование «хвоста» рецептора создает на нём сайт связывания с белком арестином, имеющим множество функций. Во-первых, арестин блокирует взаимодействие между рецептором и G-белком, прекращая передачу сигнала по основному пути у большинства семитопных рецепторов. В некоторых случаях, арестин инициирует передачу нового сигнала через киназы митоген-активируемых белков (МАР) (см. рис. 12 и 13). Аррестин также запускает изъятие семитопных рецепторов с плазматической мембраны путем

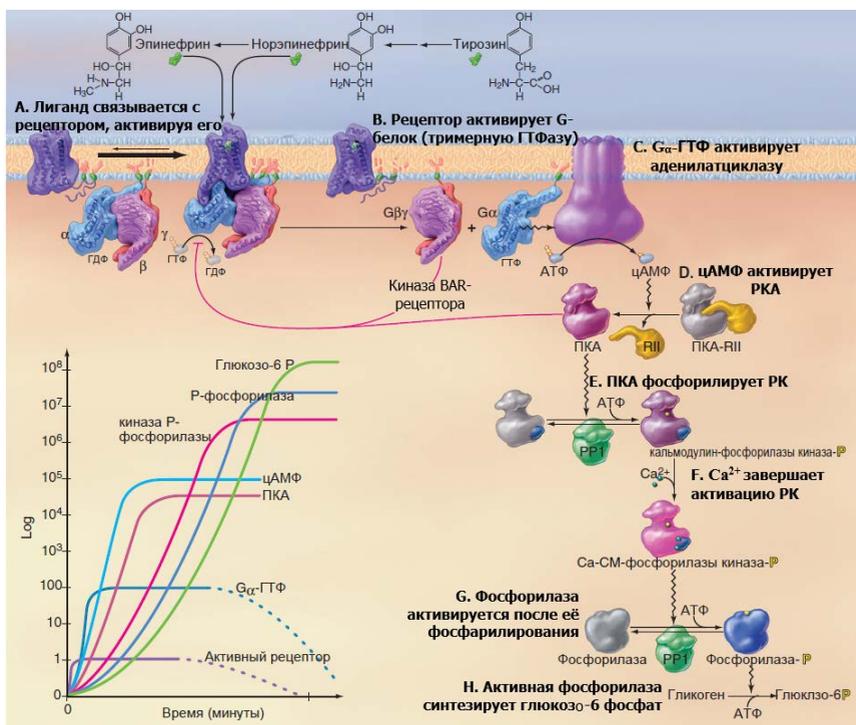


Рис. 11. β -адренергический сигнальный механизм.

Активные компоненты показаны яркими цветами. Вверху справа, каскад синтеза эпинефрина. Внизу слева, шкала времени и амплификации сигнала в каталитическом каскаде.

А – эпинефрин связывается с семитопным β -адренергическим рецептором и активирует его.

В – активный рецептор катализирует обмен ГДФ на ГТФ в субъединице G_{sa} , она диссоциирует от $G_{\beta\gamma}$.

С – субъединица G_{sa} -ГТФ активирует аденилатциклазу, синтезирующую много цАМФ.

Д – цАМФ активирует протеинкиназу А (РКА, или ПКА), регуляторная субъединица RII при этом диссоциирует от киназы.

Е – РКА (ПКА) фосфорилирует и частично активирует множественные молекулы киназы фосфорилазы (РК).

Ф – ионы Ca^{2+} связываются с кальмодулином (СМ), ассоциированным с РК, завершая её активацию.

Г – РК фосфорилирует и активирует фосфорилазу.

Н – фосфорилаза катализирует конверсию гликогена в глюкозо-6-фосфат. Петли ООС (сиреневые) прекращают стимулирование. цАМФ активирует РКА, а $G_{\beta\gamma}$ активирует киназу β -адренергического рецептора, оба они ингибируют катализ рецептором обмена нуклеотидов

эндоцитоза в клатриновых везикулах. При этом некоторые интернализированные рецепторы возвращаются затем назад на мембрану (рециклируют), некоторые продолжают активировать G-белки прямо из эндосомы, а некоторые модифицируются с помощью убиквитина и направляются в протеасому для разрушения.

Зафиксированы сотни мутаций в семитопных рецепторах. Некоторые из них безопасны, например, рецессивные мутации в гене рецептора к меланокортину 1, придающие рыжий оттенок волосам и светлый оттенок коже. Другие мутации связаны с болезнями человека. Мутации инактивируют семитопные рецепторы разными способами – от неспособности синтезировать полноразмерный белок, до снижения сродства (аффинности) к лиганду или неспособности активировать G-белок. Так, например, потеря функции в родопсине приводит к пигментному ретиниту – дегенерации фоторецепторных клеток. Мутации в меланокортиновом рецепторе 4 вызывают у человека ожирение.

Мутации могут иметь и другой эффект. Так, примерно сотня мутаций вызывает постоянную активацию семитопных рецепторов (даже в отсутствие лиганда). Некоторые мутации в родопсине вызывают ночную слепоту, а мутации в кальциевом рецепторе приводят к дисфункции паращитовидной железы.

РЕЦЕПТОРНЫЕ ТИРОЗИНКИНАЗЫ

Ростовые факторы контролируют пролиферацию клеток и их дифференцировку путем связывания с рецепторами плазматической мембраны, имеющими тирозинкиназную активность цитозольных частей (см. рис. 14). Например, эпидермальный фактор роста (EGF) стимулирует пролиферацию и дифференциацию эпителиальных клеток. Фактор роста из тромбоцитов (PDGF) стимулирует рост клеток гладкой мускулатуры, глиальных клеток и фибробластов (см. рис. 15).

Цитокиновые рецепторы (рис. 16), а также рецепторы иммунных клеток (см. рис. 45) передают сигнал через разные тирозинкиназные субъединицы. При секвенировании генома человека было обнаружено 58 генов в 20 семействах тирозинкиназ, и все эти семейства имеют различные структуры. Большинство тирозинкиназ имеют лиганд-связывающий домен, который связан с цитоплазматическим тирозинкиназным доменом единственной трансмембранной спира-

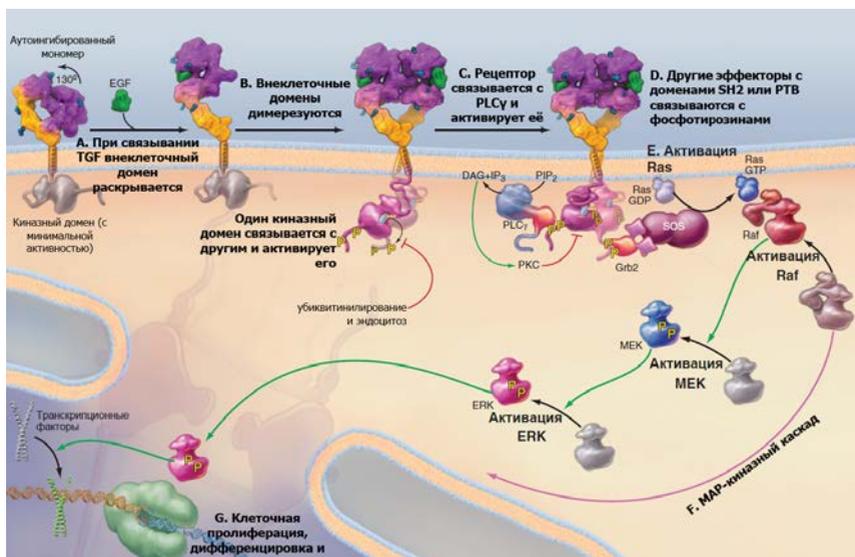


Рис. 12. Тирозинкиназный рецептор к эпидермальному фактору роста и сигнальный MAP (mitogen-activated protein) каскад.

А – при связывании лиганда происходят конформационные изменения во внеклеточном домене рецептора.

В – внеклеточные домены димеризуются, тирозинкиназные домены сближаются и трансфосфорилируют друг друга. Это создает сайты связывания в киназных доменах с адаптерными белками, имеющими домены, узнающие специфические фосфотирозиновые остатки (SH2 (Src homology 2) домены, например).

С – фосфолипаза С_γ (PLC_γ) связывается с одним из фосфотирозинов на киназном домене, там же она и фосфорилируется, это активирует её, она расщепляет PIP₂ на DAG и IP₃.

Д – комплекс адаптерного белка Grb2 и обменного фактора SOS (белок также связываются с фосфотирозинами (другими). (SOS, «son of sevenless»).

Е – SOS катализирует обмен ГДФ на ГТФ в малой, закоренной в мембране ГТФазе Ras. Ras-GTP привлекает цитоплазматическую серин/треониновую киназу Raf и фосфорилирует её.

Ф – активированный Raf фосфорилирует и активирует MEK. MEK фосфорилирует и активирует ERK-киназу.

Г – ERK-киназа входит в ядро и активирует определенные транскрипционные факторы.

лю (см. рис. 14). Связывание лиганда осуществляется **иммуноглобулиновыми** доменами, доменами **фибронектина III** (см. рис. 17), **кадгериновыми** доменами (см. рис. 18), и иногда β-спиральными и цистеин-богатыми доменами. Такая структура свидетельствует о том, что гены рецепторных тирозинкиназ были собраны из последовательностей известных доменов с последующей дивергенцией, давшей возможность взаимодействовать с различными лигандами.

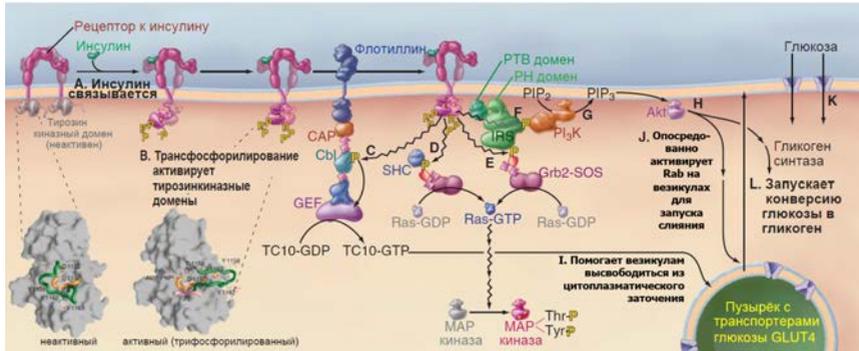


Рис. 13. Инсулиновый сигнальный каскад в адипозных клетках.

А – инсулин связывается с димерным рецептором, сблизая трансмембранные домены и тирозинкиназные домены в цитоплазме.

В – тирозинкиназные домены активируют друг друга с помощью трансфосфорилирования активаторных петель. После этого киназы фосфорилируют разные мишени:

(С) – адаптерный белок Cbl активирует обменный фактор (GEF), тот, в свою очередь, активирует малую ГТФазу TC10;

(D) – адаптерный белок SHC связывается с Grb2-SOS и медленно запускает MAP-киназный каскад;

(E) – адаптерный белок IRS также связывается с Grb2-SOS, но быстро запускает MAP-киназный каскад;

(F) один из фосфотирозинов на IRS связывается с фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K).

G – PI3K фосфорилирует PIP2, превращая его в PIP3.

H – PIP3 связывается с несколькими протеинкиназами и активирует их: Akt (протеинкиназа B [PKB]), протеинкиназа C α (PKC α) и PKC ζ .

I – Активированный TC10 инициирует высвобождение переносчика глюкозы 4 (транспортёр-глюкозы 4, GLUT4) из «складских» пузырьков (там этот переносчик запасается, но высвобождается лишь вышеописанным способом).

J – Akt фосфорилирует и инактивирует Rab GTPase-активирующие белки (GAP) (пояснение: GAP катализирует гидролиз ГТФ до ГДФ у данной ГТФазы, что переводит Rab в неактивное состояние; если инактивировать GAP, то тогда некому будет «разоружать» Rab, и он будет в активной форме), что ведёт к активации Rab на GLUT4-везикулах, а это стимулирует их слияние с плазматической мембраной.

K – GLUT4 транспортирует глюкозу в клетку.

L – Akt косвенно активирует гликоген-синтазу. CAP связывает Cbl с белком плазматической мембраны флотиллином. РТВ-домен белка IRS связывается с фосфотирозином, а РН домен – с PIP₃.

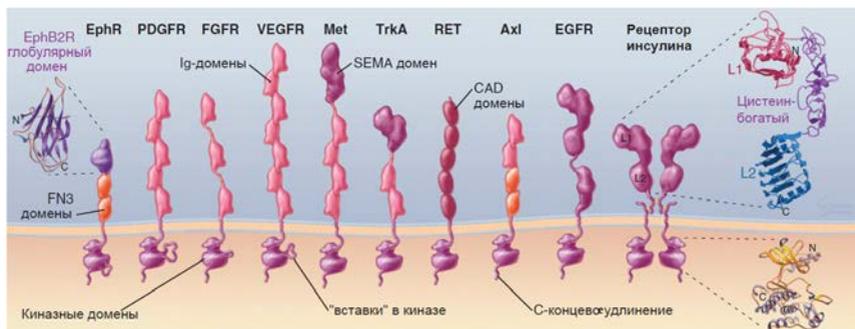


Рис. 14. Рецепторные тирозинкиназы.

Доменная архитектура девяти из 20 семейств рецепторных тирозинкиназ.

Глобулярный домен EphB2-рецептора представлен β -складкой, лиганд-связывающий сайт включает наружную петлю в передней части модели. Цитоплазматический киназный домен инсулинового рецептора подобен обычным киназам.

Названия рецепторов: Axl – рецептор для ростового фактора Gas6; EGFR – epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста); EphR – рецептор к эфрину (ephrin) – мембранный лиганд в нервной системе.

FGFR – fibroblast growth factor receptor (фактор роста фибробластов). Met – рецептор к фактору роста гепатоцитов. PDGFR – platelet-derived growth factor receptor (фактор роста из тромбоцитов); RET – рецептор адгезии кадгеринов. TrkA – рецептор к фактору роста нервов. VEGFR – vascular endothelial growth factor (рецептор к фактору роста сосудистого эндотелия).

Названия доменов: CAD – cadherin; F3 – fibronectin-III; Ig – immunoglobulin.

Связывание лиганда активирует РТК путем сближения пары киназных доменов на цитозольной стороне мембраны. Такое сближение киназных доменов позволяет активировать друг друга при непосредственном взаимодействии, либо же путем взаимного фосфорилирования по специфическим остаткам тирозина. В большинстве случаев фосфорилирование активаторной петли каталитического домена переводит киназу из неактивного в активированное состояние (см. рис. 19).

Фосфорилирование тирозиновых остатков между мембраной и киназным доменом может приводить к активации, либо ингибированию некоторых рецепторов. Лиганды сближают тирозинкиназные домены несколькими путями. Димерный лиганд, например, PDGF или фактор стволовых клеток (SCF) связываются с парой рецепторов из пула молекул, диффундирующих в плоскости плазматической мембраны, и объединяют их физически (см. рис. 20 А). Такая индуцируемая димеризация помещает рядом два киназных домена в цитоплазме. Внеклеточные домены EGF-рецептора уложены изна-

Рис. 15. Заживление раны в соединительной ткани.

А – При ранении происходит утрата некоторого количества ткани и повреждение сосудов, при этом кровь поступает в повреждение.

В – Кровь образует сгусток из фибрина и фибронектина, высвобожда пептиды фибрина, а тромбоциты секретируют PDGF и трансформирующий фактор бета (TGF)- β , это всё привлекает нейтрофилы и моноциты.

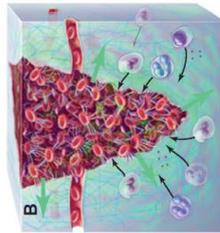
С – Нейтрофилы поглощают бактерии. Моноциты подчищают остатки и превращаются в макрофаги, которые секретируют цитокины, привлекающие фибробласты и сосуды.

Д – Фибробласты секретируют коллаген типа III и гиалуронан, которые, в свою очередь, замещают фибриновый сгусток.

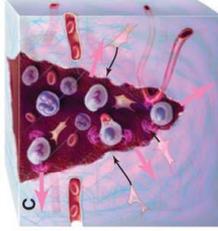
Е – Фибробласты перестраивают временную соединительную ткань на содержащую коллаген типа I, а сосуды заново прорастают в новой ткани.



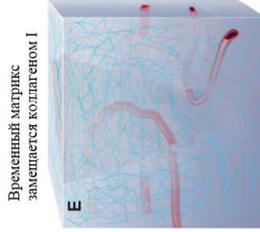
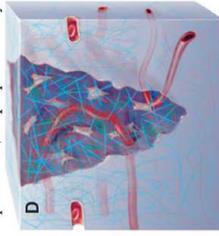
Образуется сгусток из фибрина и фибронектина. Тромбоциты секретируют PDGF и TGF β . Пептиды высвобождаемые из фибрина, привлекают нейтрофилы и моноциты



Нейтрофилы поедают бактерий
Моноциты дифференцируются в макрофаги
Макрофаги секретируют цитокины
Цитокины привлекают капилляры и фибробласты



Фибробласты секретируют коллаген III, который замещает фибриновый сгусток



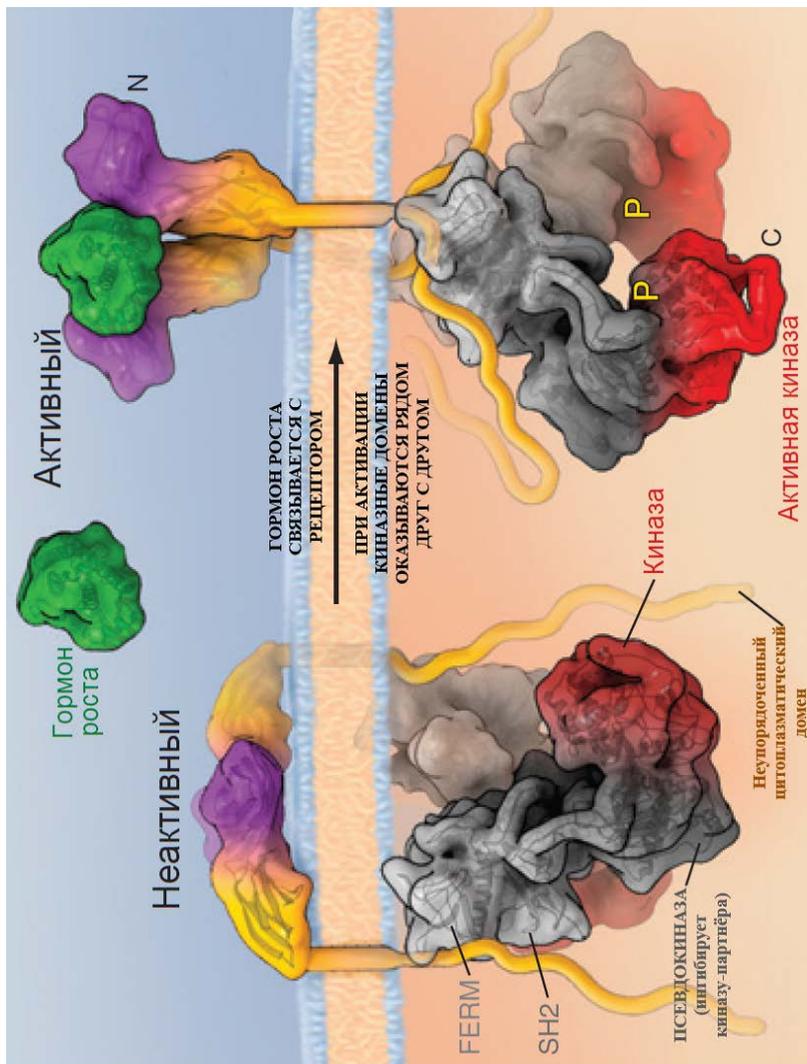
Временный матрикс замещается коллагеном I

Рис. 16. Структура и активация рецептора растового фактора.

В неактивном димерном рецепторе киназа JAK2 связана с каждым из неупорядоченных (показаны желтым) цитоплазматических «хвостов» вблизи внутренней части мембраны. Псевдокиназные домены

взаимодействуют с киназными и взаимно ингибируют их (то есть псевдокиназный домен первой молекулы ингибирует киназу на второй молекуле и наоборот).

При связывании гормона роста происходит взаимная перестройка обеих молекул рецептора с высвобождением киназных доменов, которые транслируют друг друга.



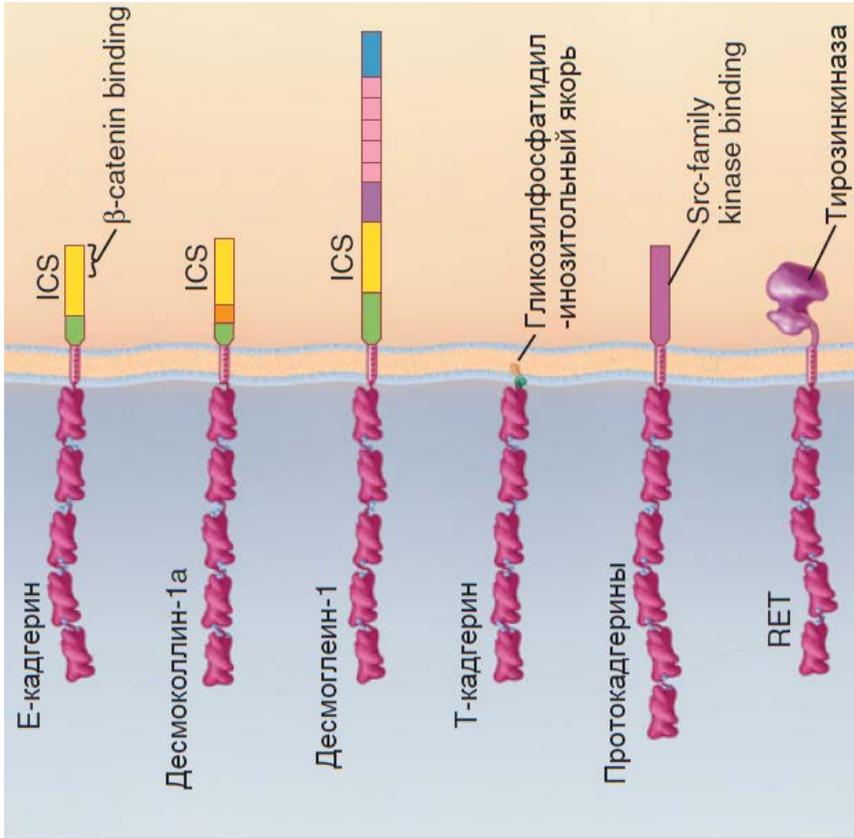
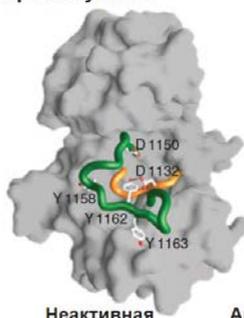
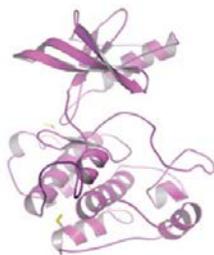


Рис. 18. Доменная карта кадгеринов.

У всех кадгеринов есть внеклеточные домены CAD. Единичный трансмембранный сегмент закоряивает приведенные кадгерина на мембране. У Т-кадгерина якорем служит гликозилфосфатидинозитол

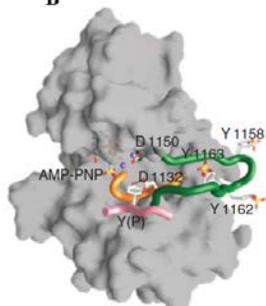
(GPI). Внутриклеточные сегменты кадгерина (ICS) взаимодействуют с определенными адаптерами и связывают E-кадгерин с актиновыми филаментами, а десмоколлин и десмоглеин – с промежуточными филаментами.

А. Тирозинкиназа рецептора инсулина



Неактивная

В



Активная (трифосфорилированная)

Рис. 19. Структуры протеинкиназ.

А – тирозинкиназа инсулинового рецептора. Ленточная диаграмма и объемная модели, на которых показана каталитическая петля (оранжевый) и активационная петля (зеленый).

В – объемная модель с трифосфорилированной активаторной петлей киназы инсулинового рецептора. Перестройки в активационной петле позволяют субстрату (розовый с белым остатком тирозина) получить доступ к активному сайту.

AMP-PNP – это негидролиземый аналог АТФ.

чально в аутоингибирующую конформацию, что предотвращает их димеризацию (рис. 20 В). Связывание лиганда (то есть самого EGF) с рецепторами запускает перестройки во внеклеточном домене, что благоприятствует их димеризации без непосредственного взаимодействия лиганда с обоими рецепторами. Затем димеризация рецепторов приводит к сближению цитозольных киназных доменов этих рецепторов. Один киназный домен физически взаимодействует с другим и активирует его, но без фосфорилирования активаторной петли в киназе.

Инсулин вызывает конформационные изменения в сформированном заранее рецепторном димере (см. рис. 13–14). Конформационные изменения приводят к сближению киназных доменов, при этом домены активируют друг друга путем трансфосфорилирования активаторных петель (см. рис. 19).

РТК активируют эффекторные белки двумя разными способами. Все активированные киназы фосфорилируют тирозины, находящиеся в специальных участках на С-концах их собственных киназных доменов, создавая сайты связывания с фосфотирозинами для адаптерных белков, имеющих домены **Src homology 2 (SH2)** или фосфотирозин-байндинг (**PTB**) (см. рис. 12–13, 20). Домены SH2 и

РТВ предпочтительно связываются с определенным фосфотирозиновым сайтом с помощью имеющегося в таких доменах кармана, в котором распознается как фосфотирозин, так и несколько соседних с ним аминокислотных остатков (см. рис. 21). Например, каждый из пяти фосфотирозинов на PDGF-рецепторе связывается с разными эффекторами или адапторами. Связывание эффекторного белка с фосфотирозином на рецепторе запускает фосфорилирование эффектора рецепторной киназой. В случае фосфолипазы C γ , фосфорилирование тирозина активирует её каталитическую активность, а также вызывает диссоциацию фермента от его РТВ-сайта, что позволяет фосфолипазе перемещаться по мембране к месту её работы (заметьте, что данная киназа уже активирована).

Альтернативно, связывание с рецептором может запускать активацию путем помещения эффекторного белка в непосредственной близости от его субстрата. Так активируются **фосфоинозитид 3-киназа**, которая работает с липидами в мембранном бислое; а также

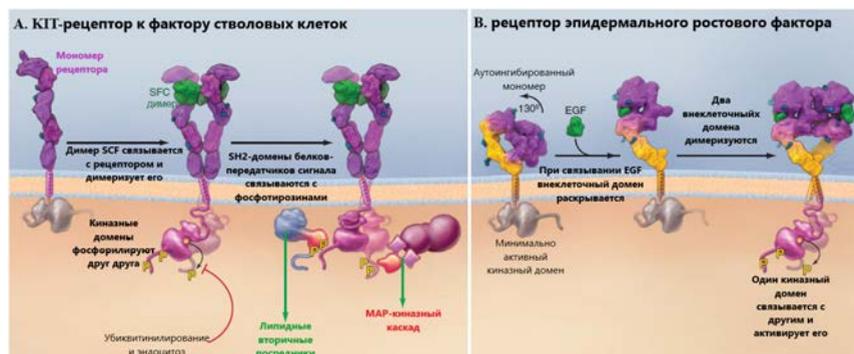


Рис. 20 Механизм димеризации субъединиц при активации рецепторных тирозинкиназ. А – KIT-рецептор к фактору стволовых клеток (stem cell factor, SCF). (Отметьте, что это не SCF Skp1-Cullin-F box убиквитин E3 лигаза, участвующая в регуляции клеточного цикла). В отсутствие SCF, мономеры рецептора диффундируют в плоскости мембраны. Связывание SCF (в виде димера) сближает две молекулы рецептора, что приводит к сближению их киназных доменов. Это приводит к трансфосфорилированию их активаторных петель и созданию фосфотирозиновых сайтов связывания для Src homology 2 (SH2) и фосфотирозин-биндинг (РТВ) доменов белков даунстрим в сигнальной трансдукции.

В – рецептор эпидермального ростового фактора (EGF). В отсутствие EGF, внутримолекулярные взаимодействия предотвращают димеризацию. Связывание EGF изменяет конформации внеклеточных доменов, это приводит к их димеризации, киназные домены приходят в соприкосновение. Один киназный домен связывается с другим и активирует его, также создавая при этом фосфотирозиновые сайты связывания для SH2 и РТВ доменов белков даунстрим в сигнальной трансдукции.

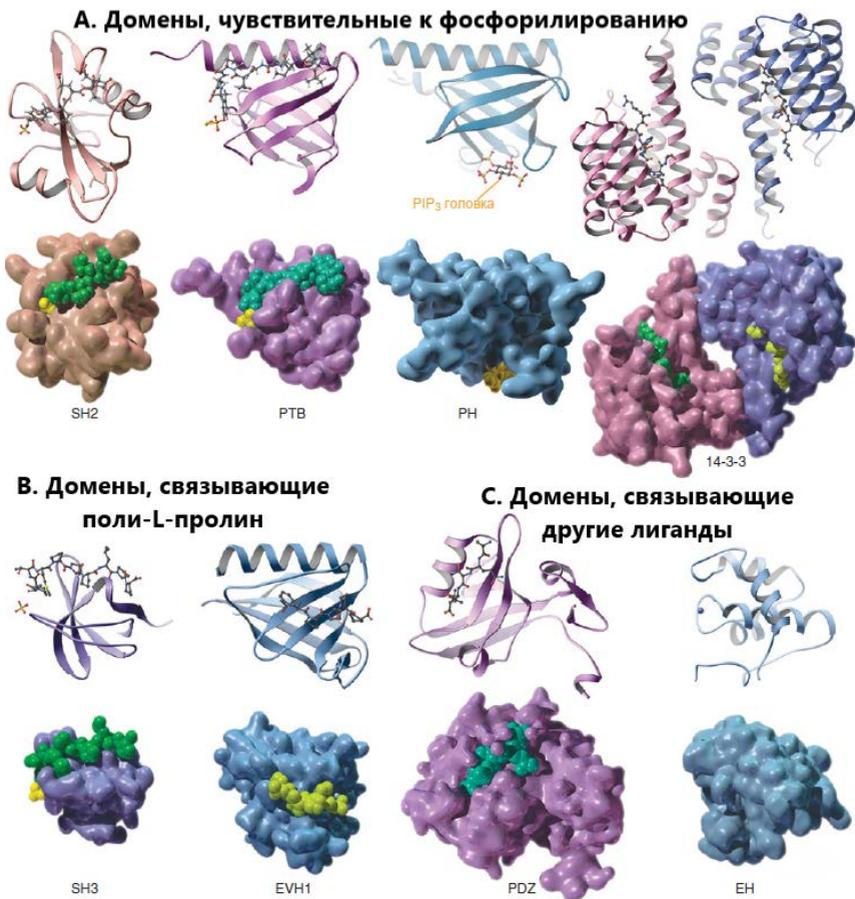


Рис. 21. Объемные модели адаптерных белковых доменов.

Ленточные диаграммы показывают их архитектуру, а объемные модели показывают, как связывается лиганд.

А – домены с чувствительностью к фосфорилированию.

В – домены с poly-L-proline лигандами.

С – домены с другими лигандами.

EH = Eps15 poly homology; EVH1 = Ena-Vasp homology 1; PDZ = postsynaptic density protein 95, disc large tumor suppressor (Dlg1), and zona occludens 1; PH = pleckstrin homology; PTB = phosphotyrosine-binding; SH2/3 = Src homology 2/3.

нуклеотид-обменивающий фактор, активирующий ГТФазу Ras, которая заякорена на мембране.

В клетке есть множество механизмов для подавления активности тирозинкиназ. При действии на коротких временных интервалах

некоторые внутриклеточные передатчики сигнала (трансдукторы), активированные рецептором, обеспечивают обратную отрицательную связь, позволяющую «выключать» рецептор.

Например, вторичный мессенджер – липид, производимый фосфолипазой $C\gamma$ – активирует протеинкиназу C, которая ингибирует РТК путем её фосфорилирования.

При действии на продолжительных временных интервалах клетка использует эндоцитоз, при котором активные димерные рецепторы помещаются в клатриновые пузырьки, таким образом клетка удаляет их из плазматической мембраны. Однако рецепторы могут продолжать передавать сигнал и из эндосомы. А некоторые тирозинкиназы рециклируют назад на плазматическую мембрану. Другие модифицируются путем присоединения белка убиквитина к одному или нескольким остаткам лизина, а затем уничтожаются (рис. 22).

Мутации в генах РТК вызывают заболевания у человека. Во многих видах опухолей встречаются активирующие мутации или избыточный синтез рецепторов из семейства EGF. Активирующие

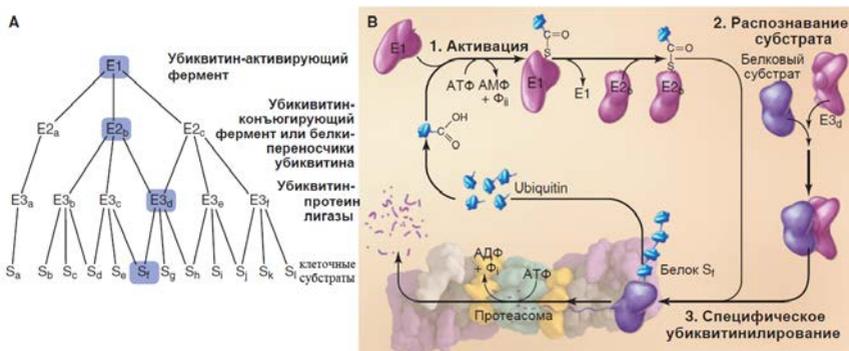


Рис. 22. Механизм присоединения убиквитина.

A – иерархия убиквитин-присоединяющих ферментов и убиквитинлигаз, работающих совместно для распознавания и убиквитинилирования специфических клеточных субстратов.

B – три стадии убиквитинилирования на примере одного набора ферментов. Единый убиквитин-активирующий фермент (E1) работает во всех таких каскадах. Один из примерно 35 (у человека) E2-ферментов служит в качестве промежуточного белка для переноса, активированного убиквитина, E2 работает далее с E3-ферментом (у человека их более 600 изоформ), распознающим соответствующую мишень (Sf) и переносящим первую молекулу убиквитина на неё. После последующего полиубиквитинилирования белок доставляется в протеасому на деградацию

мутации встречаются во всех частях этих рецепторов и работают самыми разнообразными способами, включая димеризацию рецепторов без связывания лиганда, а также снятие аутоингибирования. В качестве терапии в этих случаях используются антитела против внеклеточных доменов (тогда рецепторы не могут димеризоваться) и лекарства, ингибирующие киназную активность рецепторов.

Активирующие мутации в факторе роста из фибробластов приводят к врожденным аномалиям скелета, включая нанизм (карликовость) и преждевременное слияние швов между костями черепа.

ЦИТОКИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Цитокины – это обширное семейство полипептидных гормонов и ростовых факторов, связывающихся с трансмембранными рецепторами, которые ассоциированы с цитоплазматическими тирозинкиназами. Эти киназы активируют транскрипционные факторы, называемые STAT (передатчик сигнала и активатор транскрипции), которые регулируют множество процессов в клетке. Несмотря на различия в деталях, все цитокины представляют собой полипептиды из собранных в сборку четырёх спиралей. Гипофизарный гормон роста контролирует рост тела и развитие млекопитающих, и потеря функции в его рецепторе вызывает один из типов нанизма. Эритропоэтин регулирует пролиферацию и дифференцировку предшественников эритроцитов (рис. 23). Интерлейкины модулируют клетки иммунной системы. Потеря функции в их рецепторах ведёт к дефициту иммунных клеток.

Примерно 30 цитокиновых рецепторов у человека представляют собой либо гомо- либо гетеродимеры, в состав которых входят внеклеточные фибронектиновые III домены, которые связывают лиганд, а также одиночную трансмембранную спираль (см. рис. 16). Большие (40-кДа) неупорядоченные цитоплазматические домены имеют сайт связывания возле мембраны с несколькими тирозинкиназами, называемыми **ЯК (Янус киназа)**. В этой киназе есть как киназный, так и псевдокиназный домены (как у двуликого Януса). При ассоциации с цитоплазматическим доменом неактивного рецепторного димера псевдокиназные домены ингибируют киназные домены своей **партнерской** молекулы ЯК.

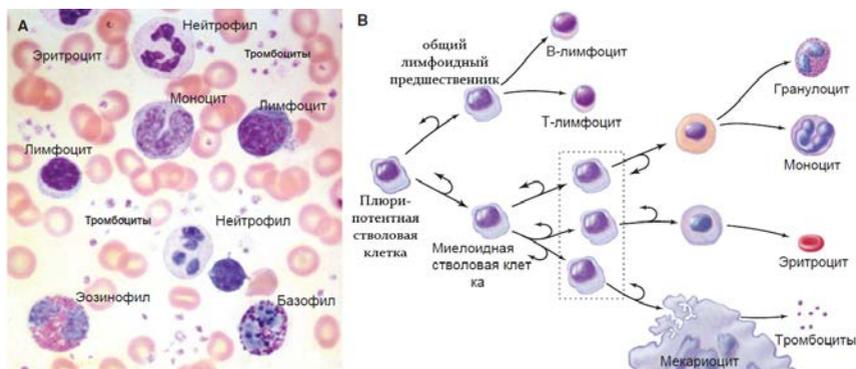


Рис. 23 Клетки крови

А – микрофотография световой микроскопии мазка крови, приготовленного и окрашенного по Райту.

В – древо кровяных клеток показывает дифференцировочные взаимоотношения между различными линиями (ростками). Стрелки с обратным загибом показывают самообновление данного типа.

Наиболее изучен цитокиновый рецептор, связывающий гормон роста. При связывании этого мономерного лиганда происходит вращение внеклеточного и трансмембранного доменов рецептора относительно друг друга, и происходит активация ЯК-киназ, связанных с цитоплазматическими доменами: псевдокиназные домены отделяются от киназных (и, таким образом, перестают их ингибировать, см. рис. 16). Это позволяет Янус-киназам активировать друг друга путем трансфосфорилирования. Активированные ЯК также фосфорилируют тирозины в цитоплазматических участках рецептора, а также факторы STAT, которые затем мигрируют в ядро и регулируют экспрессию определенных генов (см. рис. 24).

РЕЦЕПТОРНЫЕ СЕРИН/ТРЕОНИНОВЫЕ КИНАЗЫ

Третий класс рецепторов к ростовым факторам использует цитоплазматические серин/треониновые киназные (РСТК) домены для передачи сигнала (см. рис. 25–26). Димерные белковые лиганды сближают два разных типа рецепторных субъединиц для включения киназной активности. Активированные рецепторы фосфорилируют транскрипционные факторы **SMAD (Sma- and Mad-related proteins)**, что вызывает их перемещение из цитоплазмы в ядро, где они контролируют гены, отвечающие за пролиферацию и диффе-

ренцировку клеток (см. рис. 27). У человека примерно 40 различных белков способны связываться с РСТК. Эти димерные ростовые факторы особо важны во время эмбриогенеза.

Трансформирующий фактор β (transforming growth factor- β , TGF- β) ингибирует пролиферацию большинства клеток взрослого организма, а также стимулирует выработку внеклеточного матрикса, включая коллагены, протеогликаны и адгезивные гликопротеины. Активин был открыт как релизинг-фактор для гипофизарного ФСГ (фолликулостимулирующего гормона), но он также сильно

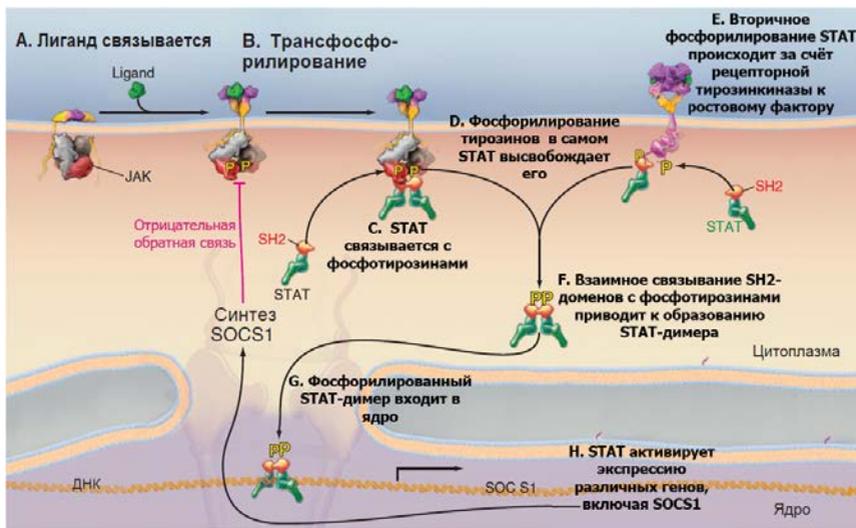


Рис. 24. JAK/STAT-сигнальный каскад.

А – цитокин связывается с димерным рецептором (см. рис. 25), изменяя при этом положение тирозинкиназ JAK, связанных с цитоплазматическими доменами рецептора.

В – активированные JAK фосфорилируют друг друга (трансфосфорилирование), а также тирозиновые остатки на рецепторе.

С – SH2-домен транскрипционного фактора STAT связывается с фосфотирозинами рецептора.

Д – JAK фосфорилирует STAT, который затем диссоциирует от рецептора.

Е – рецепторная тирозинкиназа к ростовому фактору также активирует STAT (дополнительно фосфорилирует его).

Ф – STAT образуют активные димеры благодаря взаимному связыванию своих SH2-доменов с фосфотирозинами на партнёре (SH2-домен одной молекулы STAT взаимодействует с фосфотирозинами на другой молекуле STAT).

Г – димер STAT входит в ядро.

Н – димерный STAT активирует экспрессию различных генов. Одним из этих генов является SOCS1, создающий ООС посредством ингибирования дальнейшей активации STAT.

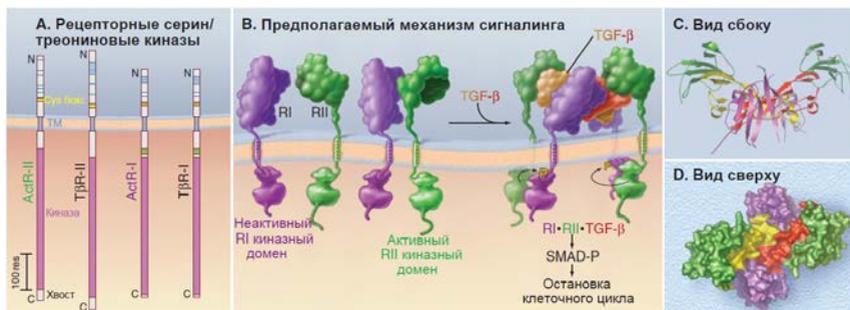


Рис. 25. Рецепторные серин/треониновые киназы.

А – доменная архитектура рецепторов к активину (Act) и TGF- β . ТМ – трансмембранный домен.

В – механизм активации рецепторной сер/тре киназы. Лиганд (в виде димера) связывается с двумя рецепторами типа II (RII) и двумя типа I (RI). Внутри этого гексамерного комплекса RII фосфорилирует и активирует RI, который, в свою очередь, фосфорилирует SMAD (образуется SMAD-P, то есть фосфорилированная форма). Фосфорилированный SMAD перемещается в ядро и активирует транскрипцию определенных генов.

С–D – ленточная и объемная модели белка морфогенеза костей (*bone morphogenetic protein 7, BMP7*), связанного с рецепторами RI и RII.

влияет на дифференцировку ранних эмбриональных клеток в первичных зародышевых листках.

Семейство белков мофrogenов костей (**bone morphogenetic proteins, BMP**) вовлечено в дифференциацию остеобластов, закладывающих костный матрикс, а также множества других клеток.

РСТК состоят из двух типов субъединиц. У человека имеются 7 генов для рецепторов типа I и 5 генов для типа II.

Единичный трансмембранный домен объединяет малые лиганд-связывающие домены с цитоплазматическими серин/треонин-киназными доменами. Мостик между трансмембранной спиралью и киназным доменом типа I ингибирует его активность.

Для передачи сигнала необходима активация двух субъединиц (то есть рецептора типа I и типа II). Рецепторы связываются в димеры: вначале объединяются два рецептора типа II, затем с этим комплексом объединяется ещё два рецептора типа I (рис. 25 В). Внутри такого комплекса конститутивно активная киназа рецептора типа II активирует рецептор типа I путем фосфорилирования сериновых и треониновых остатков в ингибиторном линкерном участке. Далее сигнал передается через киназу рецептора типа I, которая фосфорилирует SMAD. Фосфорилированный SMAD перемещается в ядро,

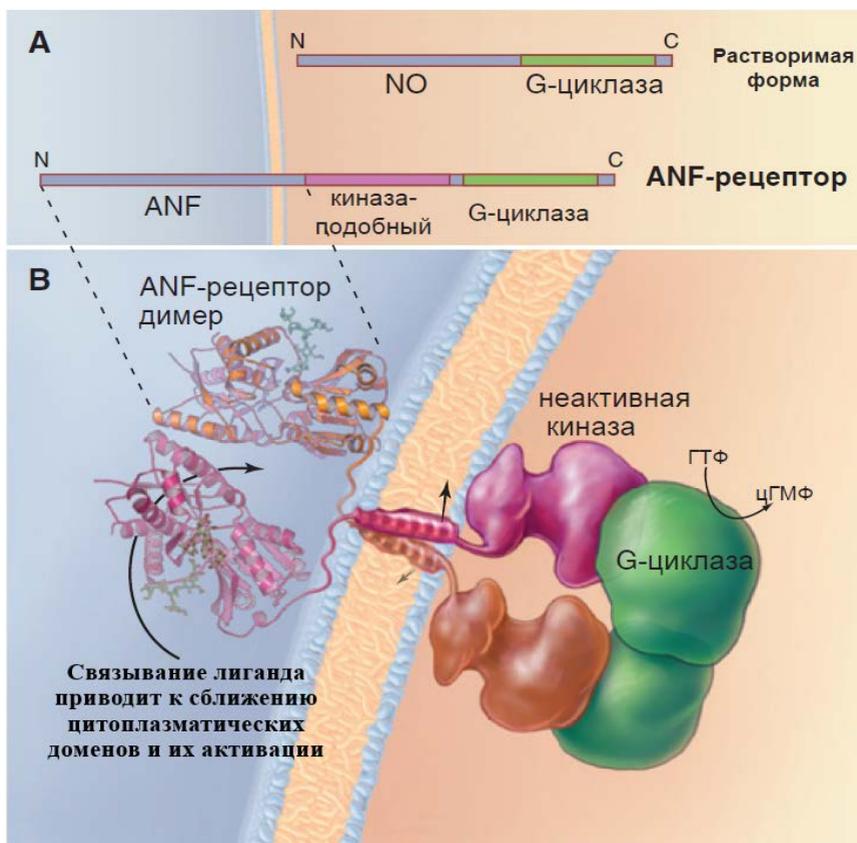


Рис. 26. Гуанилатциклазные рецепторы.

A – сравнение доменной архитектуры рецептора к трансмембранному предсердному натрийуретическому фактору (ANF) и цитоплазматического рецептора к окиси азота.

B – ленточная модель внеклеточных доменов димерного ANF-рецептора со сближенными цитоплазматическими доменами. Связывание ANF приводит к наклону трансмембранных доменов, последующему выравниванию активных сайтов и активации гуанилатциклазных доменов.

где кооперируется с другими транскрипционными факторами и регулирует экспрессию определенных генов (рис. 27). Эти рецепторы также могут активировать MAP-киназные и PI3-киназные сигнальные каскады, и ещё способны фосфорилировать тирозиновые остатки на некоторых белках.

Повреждение или потеря TGF- β -рецепторов делает некоторые опухоли невосприимчивыми к ингибированию роста самим TGF- β ,

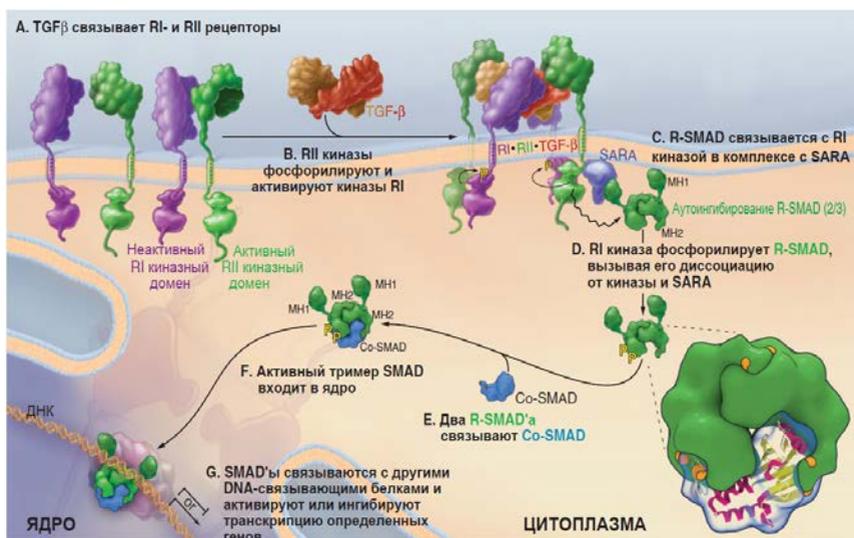


Рис. 27. TGF- β /SMAD сигнальный каскад.

- A – при связывании TGF- β -димера собирается сигнальный комплекс из двух RII и двух RI.
 B – RII фосфорилирует и активирует RI.
 C – аутоингибированный R-SMAD связывается с RI в комплексе с адаптором SARA.
 D – киназа RI фосфорилирует R-SMAD, при этом R-SMAD диссоциирует от RI.
 E – co-SMAD связывается с R-SMAD-димером и образует уже активный тример.
 F – Тример SMAD входит в ядро.
 G – Тример SMAD связывается с другими ДНК-связывающими белками и активирует (или ингибирует) транскрипцию специфических генов.

а это, отчасти, даёт возможность опухолям реплицироваться автономно. С другой стороны, неправильное регулирование TGF- β сигналинга (передачи сигнала) приводит к перепроизводству внеклеточного матрикса при хронических воспалениях и патологическому фиброзу, который оставляет шрамы на пораженных органах. Мыши с ноль-мутацией (такая мутация (мутации), которая приводит к полной потере синтеза данного белка) в одном из их трех TGF- β генов умирали от воспаления во множестве органов, вызванного избыточной пролиферацией лимфоцитов.

В добавок к описанным выше TGF- β -рецепторам, передающим сигнал, на мембране клетки присутствует намного больше TGF- β -связывающего белка (рецептор типа III), у которого нет способности передавать сигнал. Единичный трансмембранный участок связывает большой внеклеточный протеогликановый домен с малым цитозоль-

ным доменом; этот рецептор концентрирует TGF- β на клеточной поверхности (поскольку связывается с TGF- β , то есть работает как ловушка). Однако даже в отсутствие самого TGF- β , рецепторы типа II фосфорилируют рецепторы типа III, что создает сайты связывания с β -арестином и запускает эндоцитоз обоих рецепторов: и типа II, и типа III (поскольку их полипептиды находятся в паре друг с другом).

ГУАНИЛАТЦИКЛАЗНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

У животных есть семейство рецепторов клеточной мембраны (см. рис. 26) с внутриклеточным доменом, катализирующим образование 3'-5'-циклического гуанозин монофосфата (цГМФ, структурно то же, что и цАМФ, но вместо аденинового основания в данном нуклеотида используется гуаниновое) из ГТФ. Второй тип гуанилатциклазы обнаружен в цитоплазме, и он активируется оксидом азота или монооксидом углерода (угарный газ) (рис. 28). Однако вне зависимости от того, каким ферментом был синтезирован цГМФ, он регулирует одни и те же мишени: ионные каналы, открываемые цГМФ (см. рис. 1), цГМФ-активируемые протеинкиназы и фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов.

Практически все известные на сегодня лиганды для мембранных гуанилатциклаз являются пептидами, хотя для некоторых рецепторов лиганды пока неизвестны. У позвоночных есть семь изоформ гуанилатциклазных рецепторов; у червей нематод их найдено более 25. Такие рецепторы являются гомодимерами с характерными лиганд-связывающими внеклеточными доменами, единичной трансмембранной спиралью и двумя цитоплазматическими доменами – киназным и гуанилатциклазным. В отсутствие лиганда цитоплазматический циклазный домен находится в неактивном состоянии. Связывание лиганда в расщелине между внеклеточными доменами вызывает похожее на ножницы движение, которое изменяет взаимное расположение цитозольных доменов так, что это приводит к активации гуанилатциклазного домена.

Гуанилатциклазный рецептор А (GC-A) связывается с **атриальным (предсердным) натрийуретическим фактором** – полипептидным гормоном, секретлируемым преимущественно сердцем для контроля кровяного давления. Этот гормон стимулирует выведение соли и воды почками и расширяет кровеносные сосуды. У мышей с

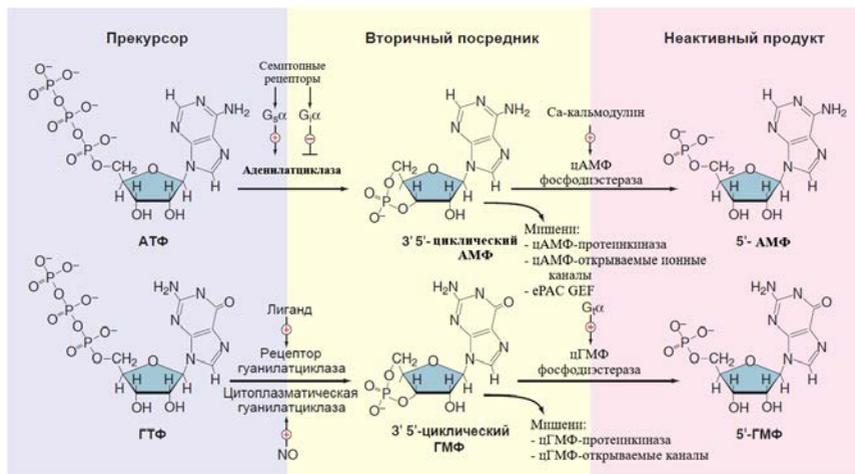


Рис. 28. Метаболизм циклических нуклеотидов.

Синтез и разрушение цАМФ и цГМФ включая источники и мишени. $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_q\alpha$ – это α -субъединицы соответствующих G-белков (см рис. 8).

нуль-мутацией по GC-A наблюдается повышенное кровяное давление и увеличенное сердце, а также они не отвечают на избыток воды и соли, вводимых внутривенно.

Кишечный гуанилатциклазный рецептор C (GC-C) способен связываться с *энтеротоксином*, вызывающим секрецию жидкости при бактериальной дизентерии. Этот бактериальный токсин похож на хозяйские кишечные пептиды, регулирующие баланс секреции жидкости в кишечнике. Мыши с нуль-мутацией по GC-C полностью резистентны к энтеротоксину без других физиологических дефектов.

Гуанилатциклазные рецепторы E и F (GC-E, GC-F) находятся лишь в глазах; нуль-мутации по GC-E приводят к потере клеток-колбочек.

Гуанилатциклазный рецептор D (GC-D) экспрессируется в обонятельном нейроэпителии. В сперматозоидах морского ежа этот рецептор используется для ответа на пептиды, секретируемые икринками.

СЕМЕЙСТВО РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ (TUMOR NECROSIS FACTOR, TNF)

TNF и его рецептор являются прототипами для широкой группы сигнал-проводящих молекул (см. рис. 29), регулирующих экс-

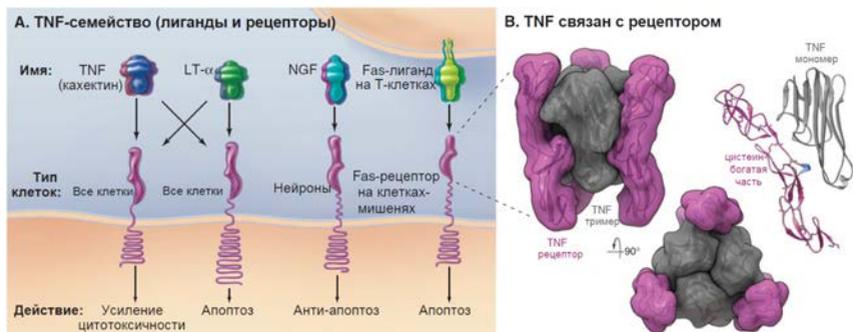


Рис. 29. Семейство TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) рецепторов.

А – доменная архитектура представителей семейства. LT-α = lymphotoxin-α; NGF = nerve growth factor.

В – объемная структура TNF, связанного с рецептором. TNF – это тример из трех идентичных β-складчатых субъединиц, уложенных в грушеподобную структуру. Четыре внеклеточных цистеин-богатых домена в рецепторе в виде зубцов крепко связываются с TNF. При этом три цитоплазматических домена объединяются, что позволяет адаптерным белкам присоединиться и продолжить передачу сигнала дальше.

прессию множества генов развития и воспалительных процессов, а также клеточной смерти (рис. 30). Лимфоциты синтезируют три изоформы TNF (называемого также лимфотоксином и кахекином) – тримерного лимфокина. TNF имеет важные роли при шоке и воспалении, защите от бактериальных инфекций, обезвреживании опухолевых клеток, а также в сопровождающемся кахексией хроническом воспалении. У человека данное семейство включает в себя 19 лигандов и 29 соответствующих рецепторов. TNF синтезируется как трансмембранный белок, он высвобождается с клеточной поверхности путем протеолиза. У мышей с удаленным геном лимфотоксина-α (TNF) не развиваются лимфатические узлы, что говорит об участии TNF в развитии иммунной системы. Другие лиганды для рецепторов из семейства TNF также являются тримерами субъединиц, состоящих из β-листов (способ укладки полипептидной цепи), например, мембранный **Fas-лиганд** на киллерных Т-клетках.

Клетки человека экспрессируют два типа TNF-рецепторов, которые связываются с одними и теми же лигандами, но вызывают разные ответы на них. Рецепторы обоих типов состоят из сходных лиганд-связывающих доменов, соединенных трансмембранными сегментами с различающимися цитоплазматическими доменами.

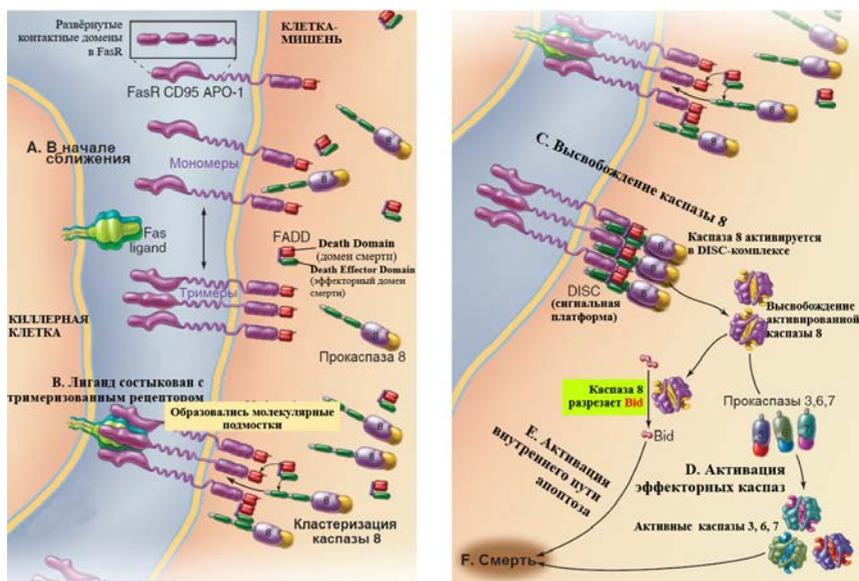


Рис. 30. Внешний каскад апоптоза.

Здесь показан каскад, активируемый рецептором клеточной смерти Fas.

A – предварительное сближение.

B – лиганд пришвартован на тримерный рецептор.

C – высвобождение активированной каспазы.

D – активация эффекторной каспазы.

E – активация внутреннего пути апоптоза.

F – собственно, смерть клетки.

DISC, death-inducing signaling complex; FADD, Fas-associated death domain.

Внеклеточные части этих рецепторов состоят из 4 одинаковых повторов (примерно по 40 аминокислотных остатков), каждый из которых стабилизирован тремя дисульфидными мостиками. В отсутствие лиганда отдельные рецепторы независимо и свободно диффундируют в плоскости мембраны. Три похожих на палец рецептора захватывают одну тримерную молекулу TNF. Лиганд TNF конической формы сближает трансмембранные сегменты и цитоплазматические домены трех рецепторов. Агрегация трех цитоплазматических доменов позволяет активированным TNF-рецепторам собрать сигнальную платформу с адаптерными белками, которые полиубиквитинилируются и в конечном счете **активируют ядерный транскрипционный фактор κ B (NF- κ B)** (см. рис. 31). Активированные TNF-рецепторы также включают находящуюся в плазматической

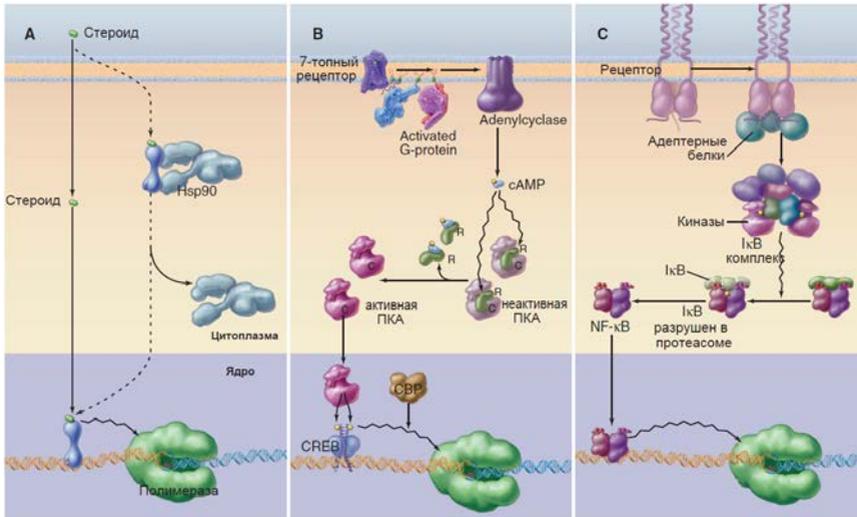


Рис. 31. Транскрипционные факторы в качестве мишени сигнальных каскадов.

А – стероидные гормоны диффундируют через клеточную мембрану и связываются с рецептором гормона в цитоплазме (например, для эстрогена), либо (что бывает чаще) прямо в ядре. Связывание лиганда активирует рецептор, и теперь он может в качестве транскрипционного фактора влиять на транскрипцию определенных генов.

В – лиганд после связывания с семитопным рецептором активирует каскад, в котором активируется протеинкиназа А (ПКА), она перемещается в ядро и там фосфорилирует транскрипционный фактор CREB (фактор, связывающийся с цАМФ-респонсивным элементом).

(С – каталитическая субъединица ПКА; R – регуляторная субъединица ПКА).

С – в третьей стратегии постоянно активные транскрипционные факторы поддерживаются в заблокированном (секвестрированном) состоянии в цитоплазме до тех пор, пока каскад не будет активирован. В данном примере транскрипционный фактор NF-κB связан со своим ингибитором IκB (Inhibitor of nuclear factor κB). Активация каскада приводит к фосфорилированию IκB, что высвобождает NF-κB, который отправляется в ядро и там уже активирует транскрипцию определенных генов.

мембране фосфолипазу, которая расщепляет **сфингомиелин**, производя при этом вторичный посредник **церамид** (рис. 32).

TNF участвует в воспалении, ассоциированном с аутоиммунными заболеваниями, такими, как ревматоидный артрит. Перехват TNF ещё до того, как он достигнет своих рецепторов, является удачной схемой лечения для притупления воспаления при этом заболевании. Такой подход осуществляется с помощью инъекции моноклональных антител к TNF либо конструкций, содержащих лишь внеклеточный домен TNF-рецепторов.

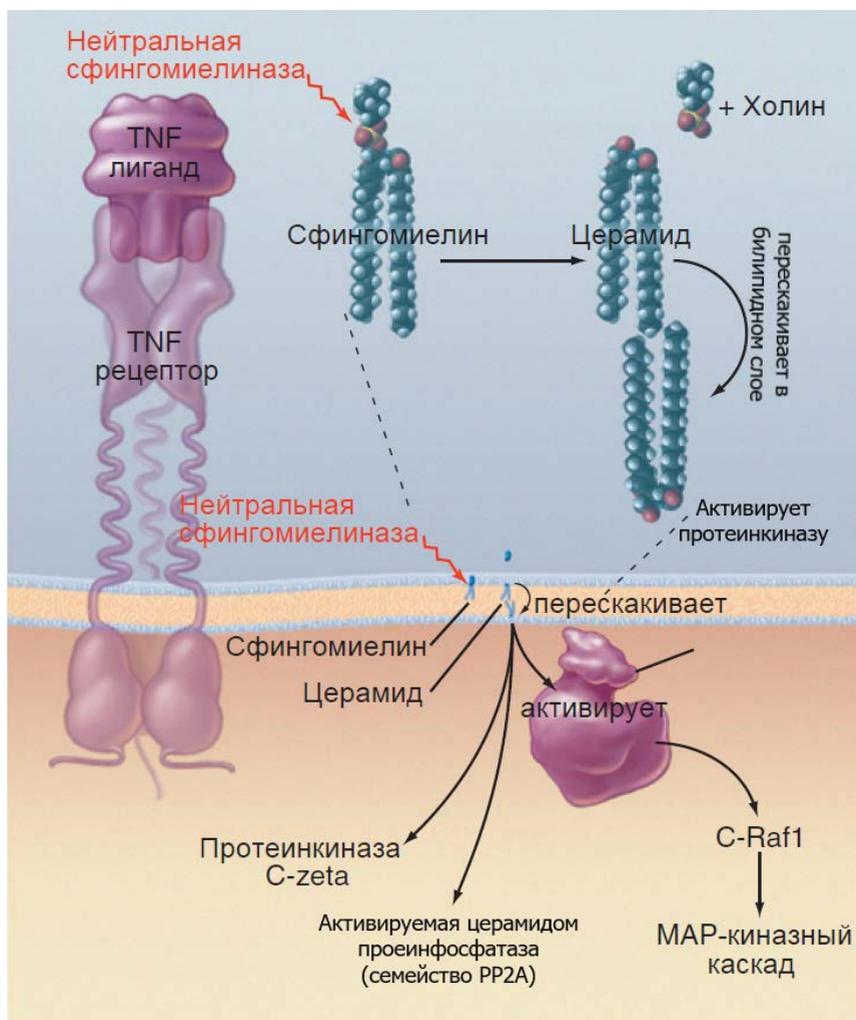


Рис. 32. Сфингомиелин/церамид сигнальный каскад.

Стимулирование TNF-рецептора активирует нейтральную сфингомиелиназу, которая отрезает холин от сфингомиелина (и получается свободный холин и церамид).

Церамид способен перепрыгивать из одного листка мембраны в другой, а затем активировать цитоплазматическую киназу, например, protein kinase C (PKC)-ζ, а также протеинфосфатазы.

MAP, mitogen-activated protein.

Рецепторы TNF-семейства также связываются с мультимерными лигандами с образованием цитоплазматических сигнальных комплексов. Например, Fas-лиганд запускает апоптоз с помощью агрегации Fas-рецепторов и сборке сигнальной платформы, активирующей каскад внутриклеточного протеолиза (см. рис. 30).

TOLL-ПОДОБНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Многоклеточные организмы используют семейство рецепторов, именуемых **toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs)** для обнаружения и ответа на инфекции из числа широкого спектра микроорганизмов, включая вирусы, бактерии, грибки и протозои. Они запускают ответ путем регулирования экспрессии генов факторов воспаления (рис. 33).

NOTCH-РЕЦЕПТОРЫ

Компоненты Delta/Notch-сигнального каскада были идентифицированы с помощью анализа мутаций, влияющих на раннее развитие нематод и мух. Лиганды в данном каскаде называются **Delta** (для мух и позвоночных). Лиганды и их **Notch-рецепторы** регулируют участь клеток в раннем эмбриональном развитии. Обычно клетки, экспрессирующие Delta, взаимодействуют с Notch-рецепторами, находящимися на соседней клетке (юкстакринная сигнальная система) и задают ей программу развития, отличающуюся от своей собственной. Итог такого взаимодействия зависит от окружения клетки. В каждой ткани Delta/Notch-сигналы интегрированы с действием других сигнальных путей. В общем итоге можно сказать, что Delta/Notch сигнальный путь имеет тенденцию к усилению различий между клетками в конкретной ткани. Например, Delta, экспрессируемая на самых ранних нейронах, направляет соседние клетки по другому пути дифференцировки. Дефекты функции Delta или Notch приводят в данном случае к избытку нейронов. Активный лиганд Delta находится на клеточной мембране и локально взаимодействует с соседними клетками, однако матриксная металлопротеаза отрезает некоторые молекулы Delta от мембраны, что позволяет им (не связанным более с клеточной мембраной) взаимодействовать с клетками, отдаленными от клетки, из которой они произошли.

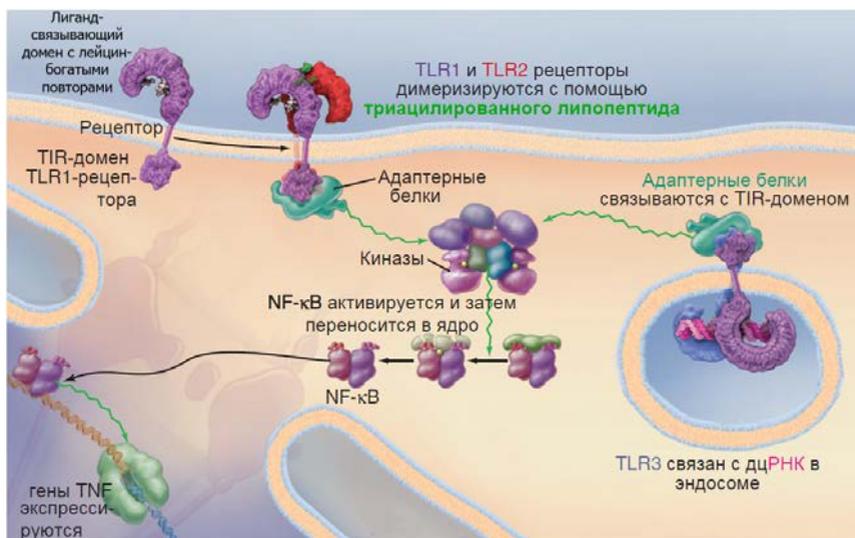


Рис. 33. Передача сигнала через TOLL-LIKE рецепторы на мембране и в эндосоме.

Связывание триацилированного бактериального липопептида стабилизирует гетеродимер Toll-like receptor (TLR)-1 и TLR2 в плазматической мембране, как показано на ленточной диаграмме, наложенной на объемную модель. Димеры TLR3 в мембране эндосомы связываются с двухцепочечной РНК, высвобожденной из вируса. При связывании лиганда димер рецептора активируется и через адапторные белки запускается передача сигнала на киназы, которые активируют цитоплазматические транскрипционные факторы, включая ядерный фактор κB (NF-κB). NF-κB транспортируется в ядро, где стимулирует транскрипцию генов TNF и других медиаторов воспаления.

дцРНК – двухцепочечная РНК.

Рецептор Notch состоит из 36 EGF-подобных доменов и лейцин-богатых повторов и одного трансмембранного участка, внутриклеточного региона **анкириновых повторов**, не обладающего ферментативной активностью. Синтезируется Notch как одна полипептидная цепь, которая перед транспортировкой на мембрану разрезается в одном месте вблизи основания внеклеточного домена в аппарате Гольджи. Два полипептида остаются ассоциированными благодаря нековалентному взаимодействию.

Клетки, на которых экспрессируется Delta, активируют Notch-рецепторы на соседних клетках. Это ведёт к протеолитическому расщеплению и отсоединению внутриклеточного домена рецептора от мембраны. Далее этот домен перемещается в ядро и образует белковый комплекс, который затем активирует транскрипцию ряда генов (см. рис. 34).

РЕЦЕПТОРЫ HEDGEHOG

Генетические работы, выполненные на дрозофиле, выявили новый класс белковых лигандов, названных **Hedgehog**, а также двух мембранных белков – **Patched** и **Smoothened**, требуемых для передачи сигнала во время развития. Рецептор Patched состоит из 12 трансмембранных сегментов, сходных с движимыми протонами антипортерами у бактерий, однако транспортируемый ими субстрат (если таковой вообще имеется) неизвестен. Smoothened является необычным семитопным рецептором, он постоянно активен.

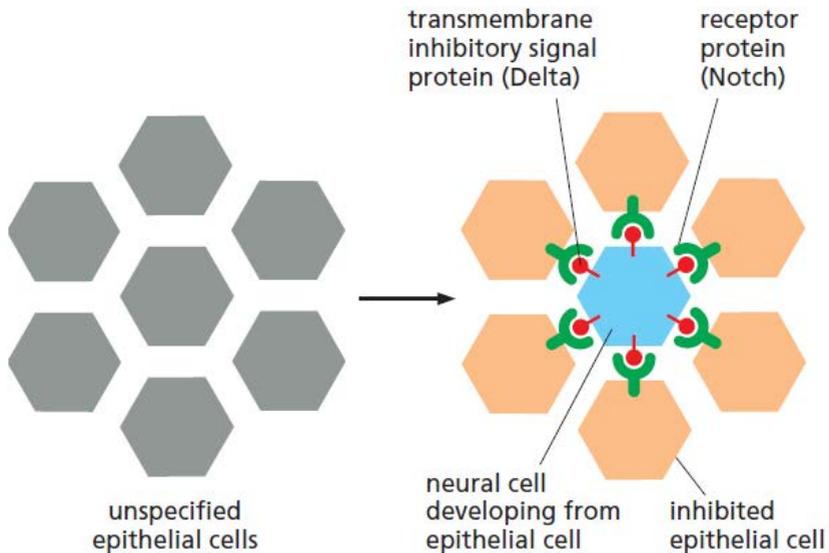


Рис. 34. Латеральное ингибирование, опосредуемое Notch и Delta во время развития нервной клетки у *Drosophila*.

Когда отдельная клетка в эпителии начинает развиваться по типу нервной, она сигнализирует соседям не делать того же самого. Такая ингибиторная передача контактного сигнала выполняется лигандом Дельта, который появляется на поверхности будущей нервной клетки, и связывается с Notch-рецепторами на соседних клетках.

Во многих тканях все клетки в кластере изначально экспрессируют как Delta, так и Notch, возникает конкуренция: какая же из клеток окажется победителем, экспрессирующим больше Delta и ингибирующим тем самым соседние клетки от такого же поведения (то есть от становления нервной клеткой).

В других случаях действуют дополнительные факторы, которые взаимодействуют с Delta или Notch, делая одни клетки более восприимчивыми к латеральному ингибирующему сигналу, а другие клетки — невосприимчивыми к нему.

Субстехиометрические количества Patched подавляют активность белка Smoothed, возможно путем выкачивания из клетки лиганда, который связывается со Smoothed и ингибирует его. У мушек Hedgehog-сигнальный каскад кооперируется с Wnt-каскадом (рис. 35) для формирования границ между сегментами в эмбрионе и поддержки пула стволовых клеток.

Каждый аспект этой новой сигнальной системы устроен по новому принципу. Сигнальная последовательность направляет белок Hedgehog в секреторный путь, но прежде чем он достигнет клеточной поверхности, этот белок разрезает сам себя в двух местах. С-концевой участок белка выполняет данное разрезание. Кроме разрезания, к новому С-концу первой (ближе к N-концу, на рисунке обозначена синим) половины белка, являющейся доменом

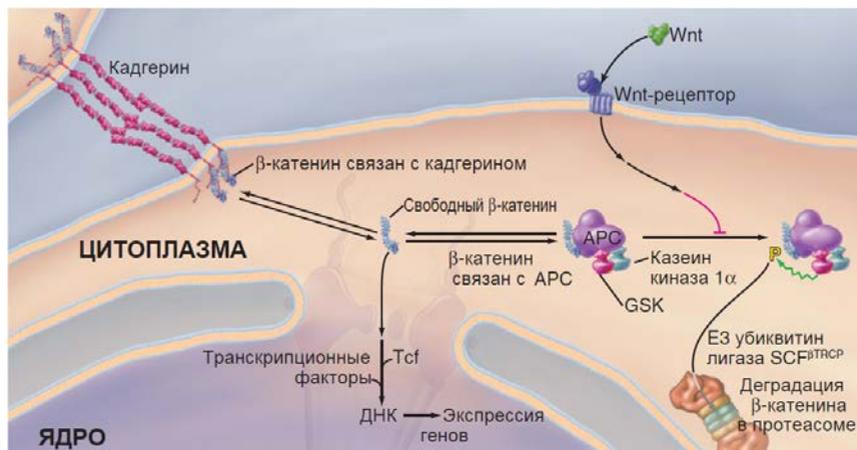


Рис. 35. Роль β -катенина в экспрессии генов.

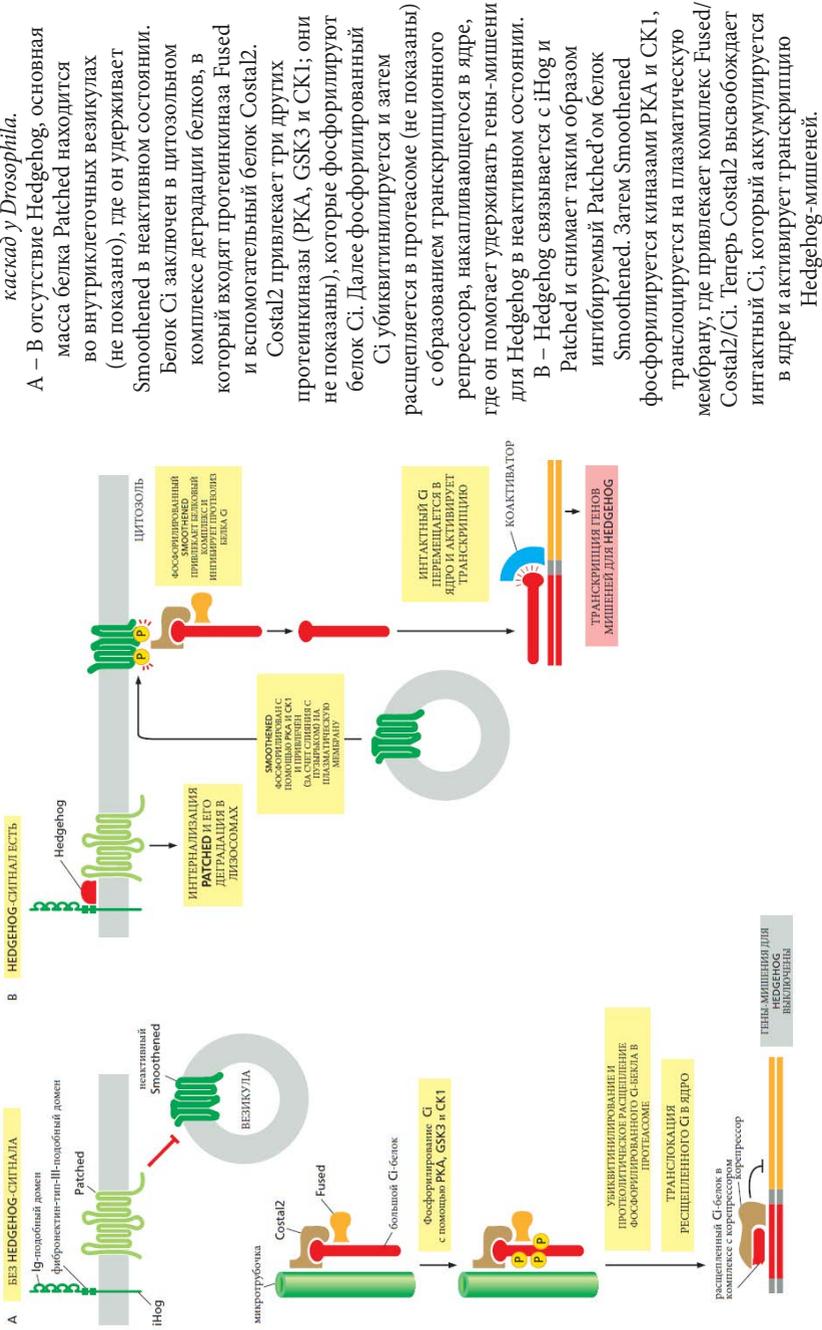
Свободный β -катенин находится в равновесии с сайтами связывания на кадгеринах и APC (adenomatous polyposis coli), но он также способен перемещаться в ядро, где комбинируется с транскрипционными факторами Tcf/LEF-1. Если концентрация β -катенина в ядре находится на низком уровне, то Tcf/LEF-1 подавляет экспрессию генов, но комплекс β -катенина с Tcf/LEF-1 активирует экспрессию генов клеточного роста и дифференцировки.

Синтез β -катенина происходит в клетке постоянно, с постоянной скоростью, поэтому концентрация β -катенина в цитоплазме определяется скоростью его деградации:

Гликоген-синтаза киназа (GSK) и киназа 1 α фосфорилируют β -катенин, связанный с APC, запуская тем самым его убиквитинилирование и последующую деградацию.

Внеклеточный лиганд Wnt действует через свой рецептор (семитопный), а также и некоторые другие рецепторы, и способствует экспрессии генов, поскольку блокирует фосфорилирование β -катенина и его деградацию.

Рис. 36. Hedgehog-сигнальный каскад у *Drosophila*.



сигнальной активности, ковалентно присоединяется молекула холестерина.

Это первый пример того, что холестерол используется для посттрансляционной модификации белка. Холестерол и N-концевой остаток пальмитиновой кислоты заякоривают сигнальный домен на клеточную мембрану или на мембрану пузырьков, которые секретируются и могут работать в клетках, находящихся от источника секреции до 30 клеточных радиусов.

Сигнальный Hedgehog-каскад сложный, отчасти потому, что его активация достигается при инактивации ингибиторов (рис. 36). В отсутствие лиганда (то есть белка Hedgehog) активный Patched ингибирует Smoothened. Связывание Hedgehog выключает Patched и, таким образом, снимает ингибирование Smoothened. Теперь активный Smoothened собирает комплекс из нескольких белков; этот комплекс блокирует протеолитическое инактивирование транскрипционного фактора Ci (который до этого расщеплялся в отсутствие Hedgehog).

Активный Ci контролирует экспрессию нескольких генов, необходимых для клеточной дифференцировки, включая ген самого Patched. Ортологи (белки с аналогичной функцией из разных организмов) позвоночных участников инсектного Hedgehog-каскада выполняют такие же функции, регулируют клеточную дифференцировку во множестве тканей, включая образование нервной трубки. Мутации в одном из Hedgehog-генов (sonic hedgehog, SHH) приводят к множественным дефектам развития от средних до гротескных (нелепых) форм, включая один глаз по среди лица. Мутации в гене Patched вызывают базальноклеточную карциному у светложких людей. Ген человека Smoothened является протоонкогеном; активирующие мутации в этом гене предотвращают его ингибирование белком Patched и вызывают опухоли кожи. Ортолог Ci у человека – Gli1 – является онкогеном, изначально найденным в опухолях мозга.

СВОЙСТВА СИГНАЛ-ПЕРЕДАЮЩИХ СИСТЕМ

К белкам, передающим сигналы в цитоплазму, относятся протеинкиназы, протеинфосфатазы, ГТФазы, а также адаптерные белки.

Стоит отметить, что киназы и ГТФазы используют одну и ту же стратегию при взаимодействии с молекулами, несущими информацию по сигнальным путям: простое ковалентное присоединение или удаление неорганического фосфата. Протеинкиназы добавляют фосфатную группу на специфические мишени (переносят её с АТФ на свою мишень), а фосфатазы удаляют эту группу. ГТФазы связываются с ГТФ и гидролизуют его до ГДФ и неорганического фосфата (Pi), который затем диссоциирует от ГТФазы. Однако в обоих случаях, наличие или отсутствие единичной фосфатной группы переключает состояние белка между неактивным и активным конформациями.

Добавление фосфатной группы обратимо, так что оба типа переключений можно использовать как молекулярные таймеры, которые циклически включаются и выключаются с временным промежутком, определяемым внутренними свойствами переключателя и его окружением. ГТФазы активны в состоянии с присоединенным ГТФ и становятся неактивными, когда сами гидролизуют этот связанный с ними ГТФ до ГДФ. Сходным образом фосфорилирование активирует многие белки, но может инактивировать другие. Такие молекулярные переключения часто выстраиваются в ряд и образуют **сигнальный каскад**, который может не только просто передавать, но и улучшать сигнал. Ферменты в сигнальном каскаде (включая киназы) часто работают как умножители (усилители) сигнала. Включение двоичного переключателя в одной молекуле фермента (и, таким образом, активирование данного фермента) приводит к производству данной молекулой фермента множества молекул, являющихся продуктом его работы. А продукты сами могут передавать сигнал далее и амплифицировать его таким образом.

Во многих сигнальных путях предусмотрены петли отрицательной обратной связи (ООС). Некоторые сигнальные пути линейны. Однако множество сигнальных путей является ветвящимися и пересекаются с другими сигнальными путями, что позволяет клетке

интегрировать информацию от множества рецепторов и контролировать множественные эффекторные системы одновременно.

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ КИНАЗ

Нарушение регулирования таких киназ, как, например, рецепторная тирозинкиназа RET при эндокринных опухолях или циклинзависимая киназа 4 (Cdk4) при меланоме делает пациента предрасположенным к возникновению опухолей. У большинства пациентов с хронической миелогенной лейкемией находят генную перестройку, которая дает химерный белок (смешанный, то есть он состоит из частей разных белков) между белками **bcr** и **c-abl** – нерецепторную тирозинкиназу. Этот химерный (или фьюжн, от английского **fusion** – слияние) белок постоянно активирован и вызывает трансформацию предшественников белых кровяных клеток в опухолевые клетки. На сегодняшний день наиболее эффективным лечением в данном случае является препарат иматиниб мезилат (торг. назв. **Гливек**), который ингибирует киназную активность **bcr-abl**. Разрабатываются и другие лекарства для подавления других сверхактивных киназ, вызывающих пролиферацию опухолевых клеток.

КООПЕРАЦИЯ МЕЖДУ КИНАЗАМИ И ФОСФАТАЗАМИ

Некоторые протеинфосфатазы стабильно связаны со своими субстратными белками. Одним из примеров может служить MAP kinase phosphatase-3 (МКР-3), которая связана с MAP-киназой (см. рис. 12). После активации её апстрим (то есть ферментами, находящимися в цепочке передачи сигнала «выше по течению», *upstream*) киназами эта MAP-киназа активна лишь временно, поскольку связанная с ней фосфатаза дефосфорилирует (и таким образом инактивирует) MAP-киназу. Это называется самокорректировкой сигнальных комплексов, более широко – биологический таймер.

ГТФАЗНЫЙ ЦИКЛ

Вне зависимости от того, мономерная это ГТФаза (как, например, белок Ras), или тримерная (как G-белки), этот цикл состоит из четырех стадий (см. рис. 37):

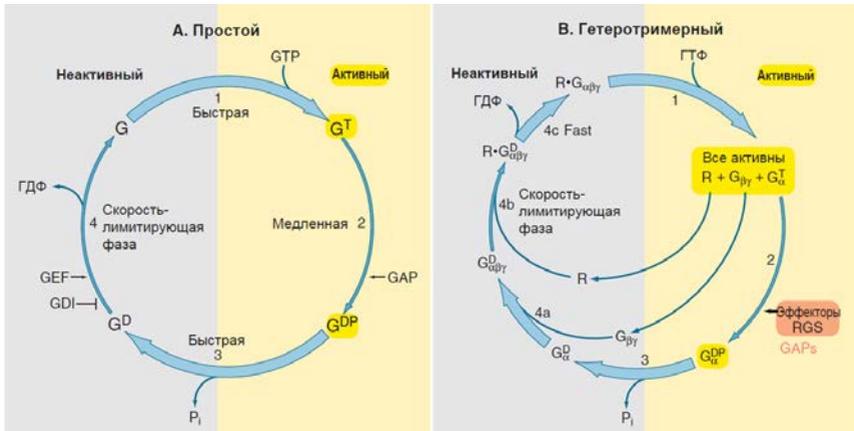


Рис. 37. Сопоставление ГТФазных циклов для Ras и G-белка. Размер стрелок показывает относительную скорость реакций.

А – ГТФазный цикл для протеинкиназы Ras.

В – ГТФазный цикл для G-белка. R – семитопный рецептор.

Регуляторы передачи сигнала через G-белок (Regulators of G-protein signaling, RGS) и некоторые эффекторные белки стимулируют гидролиз ГТФ.

GAP = GTPase-activating protein; G^D = ГТФаза со связанным ГДФ; GDI = ингибитор диссоциации гуанинового нуклеотида (guanine nucleotide dissociation inhibitor); G^DP = ГТФаза со связанным ГДФ и неорганическим фосфатом; GEF = фактор обмена нуклеотидов (guanine nucleotide exchange factor); G^T = ГТФаза со связанным ГТФ.

(1) Быстрое связывание ГТФ сопровождается конформационными изменениями трех сегментов белка, называемых switch-I, switch-II и switch-III. В активной ГТФазе эти переключательные петли образуют сайт связывания с мишенями даунстрим (то есть следующими «вниз по течению» в сигнальном каскаде).

(2) Гидролиз ГТФ происходит медленно, однако необратимо.

(3) Диссоциация γ-фосфата (отщепленного от ГТФ) происходит быстро и сопряжена с возвращением переключательных петель в неактивное состояние.

(4) ГТФазы в основном находятся в связанном с ГДФ состоянии, поскольку диссоциация ГДФ идет медленно и ГТФ не может связаться с белком до тех пор, пока из сайта связывания не уйдет ГДФ.

Различные внутренние или внешние белковые модули регулируют ГТФазный цикл. Большинство ГТФаз зависит от других белков, названных гуанин-нуклеотид обменивающими факторами (**guanine nucleotide exchange factors**, или **GEF**), которые ускоряют диссоци-

ацию ГДФ. Различаясь по структуре, GEF имеют одинаковые механизмы. Они меняют конформацию Р-петли – части нуклеотид-связывающего сайта, который взаимодействует с β -фосфатом (см рис. нуклеотида), позволяя ГДФ высвободиться, а затем прочно связывается со свободной от нуклеотида ГТФазой.

Большинство малых ГТФаз требует внешних белков, активирующих ГТФазу (**GTPase-activating proteins**, или **GAP**) для стимулирования гидролиза ГТФ, который выключает ГТФазу.

Часто ГТФазы имеют ковалентно с ней связанный липид (или остаток жирной кислоты, так называемый изопреноид – длинный гидрофобный «хвост»), который заякоривает ГТФазу на липидном бислое.

G-БЕЛКИ И БОЛЕЗНИ

Как излишняя инактивация, так и чрезмерная активация G-белков вызывают заболевания. Мутации, препятствующие гидролизу ГТФ, приводят к накоплению G_{α} в связанном с ГТФ состоянии и перманентно активируемым далее в каскаде эффекторам. Например, мутации в остатках аргинина или глутамина в G_{α} , которые крайне важны для гидролиза ГТФ, могут вызвать опухоли вследствие пролонгированной активации сигнальных путей, отвечающих за клеточную пролиферацию. Также в G-белках часто встречаются мутации, которые ассоциированы с высоким кровяным давлением и другими частыми заболеваниями.

Некоторые бактериальные токсины проявляют свое негативное действие благодаря воздействию на G-белки. Бактерия холеры вызывает диарею вследствие секреции холерного токсина – фермента, входящего в цитоплазму после долгого и сложного взаимодействия с клеточной поверхностью. Этот фермент катализирует добавление АДФ-рибозы на аргинин, который необходим для гидролиза ГТФ субъединицей $G_{\beta\alpha}$. Вследствие этого накапливается активированная $G_{\beta\alpha}$ -субъединица, это приводит к увеличению уровней цАМФ, который и вызывает диарею из-за стимулирования секреции воды и соли клетками кишечного эпителия. Коклюшный токсин, производимый бактерией коклюша, это фермент, добавляющий АДФ-рибозу на остаток цистеина, а субъединице $G_{i\alpha}$ или G_{α} , что препятствует взаимодействию тримерного G-белка с активированным

рецептором, так что G-белок накапливается в неактивном состоянии. Одним из последствий этого является недостаточное орошение воздушных путей.

Сходным образом токсин С3 бактерии **Clostridium botulinum** АДФ-рибозилирует и таким образом ингибирует ГТФазу Rho, а токсин из **Clostridium difficile** использует УДФ-глюкозу для гликозилирования и выключения целого класса Rho-белков.

ВТОРИЧНЫЕ ПОСРЕДНИКИ (SECOND MESSENGERS)

Вторичные посредники (ВП) – это малые молекулы, передающие сигнал уже внутри клетки. Они химически разнородны, от гидрофобных липидов, ограниченных мембранным бислоем; неорганических ионов (Ca^{2+}); нуклеотидов (цАМФ и цГМФ); до газов (оксид азота, оксид углерода). «Послания», которые передают эти мессенджеры, закодированы в их концентрации. В простейшем случае, увеличение или падение концентрации вторичного посредника передает сигнал от источника к своим мишеням. В других случаях сигнал зависит от скорости или частоты флуктуации концентраций ВП. Локальная концентрация ВП зависит от скорости его синтеза, скорости диффузии от места синтеза и от скорости его распада (или удаления). Большинство ВП синтезируется ферментами, способными к быстрому включению и выключению, что даёт возможность модулировать концентрацию ВП в шкале миллисекунд. В случае Ca^{2+} , цитоплазматическая концентрация определяется каналами, высвобождающими его из депо, и помпами (насосами), которые выкачивают его из цитоплазмы (либо обратно в депо, либо во внеклеточное пространство).

Физико-химические свойства ВП имеют важное значение. Производное липида, например, будет достигать разные мишени в зависимости от того, в чем оно более растворимо: в липидном бислое или в воде. Сходным образом Ca^{2+} работает только локально в цитоплазме, где имеется большое количество сайтов его связывания, что ограничивает его диффузию. Циклические нуклеотиды быстро диффундируют в цитоплазме, но их концентрация возрастает и падает локально, в определённых местах синтеза и там же быстрого гидролиза.

Сложность сигнальных путей определяется числом источников и мишеней каждого ВП. Обобщенно можно сказать, что многочисленные источники сигнала и многочисленные мишени ВП дают довольно-таки сложную сеть.

ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ

Два циклических нуклеотида (ЦН) – цАМФ и цГМФ – используются клеткой как ВП (см. рис. 28). Оба действуют за счет обратимого связывания со специфическими белками. Ферменты, которые синтезируют и разрушают ЦН, определяют их концентрацию и, соответственно, их доступность для связывания с мишенями. Такие ферменты работают довольно быстро, так что они способны быстро амплифицировать сигнал (в течение миллисекунд). Циклазы производят ЦН в одностадийной реакции из соответствующих нуклеотидтрифосфатов. ЦН диффундируют в цитоплазме практически с такой же скоростью, как и в свободном растворе, активируют определенный набор мишеней, включая протеинкиназы (см. рис. 19), ЦН-зависимые ионные каналы (см. рис. 1) и – в случае цАМФ – один из классов гуанин-нуклеотид обменивающих факторов (G_o), работающих с малыми ГТФазами Rap1 и Rap2.

Семейство, состоящее из 10 генов у человека, кодирующих аденилатциклазы (АЦ), синтезирует цАМФ из АТФ. Одна из АЦ является растворимым ферментом, и накапливается в ядре. Но большинство этих ферментов заякорены на плазматической мембране множественными трансмембранными сегментами. Два гомологичных каталитических домена расположены в цитоплазме (С1 и С2, рис. 38). Для катализа необходимы оба домена, поскольку активный сайт находится в месте взаимодействия этих доменов. Обычно концентрация АЦ довольно мала по сравнению с количеством тримерных G-белков, регулирующих её активность. Так, GTP-G_sα (альфа-субъединица активирующего G-белка; индекс «s» (stimulating) говорит о том, что данный G-белок является стимулирующим для своей мишени) активирует многие мембранные АЦ путём связывания с ними (далеко от активного сайта), вызывая конформационные изменения. Са²⁺-кальмодулин или протеинкиназа С (РКС) активируют другие аденилатциклазы. GTP-G_iα (альфа-субъединица ингибирующего G-белка; индекс «i» (inhibiting) обозначает, что данный G-белок проявляет ингибирующее действие на свою мишень) и протеинкиназа А (РКА) ингибируют некоторые циклазы. Gβγ-субъединица активирует некоторые АЦ, но ингибирует другие. Регулирование растворимой формы АЦ отличается от всех других изоформ. Она активируется бикарбонатом и играет важную роль в созревании спермиев.

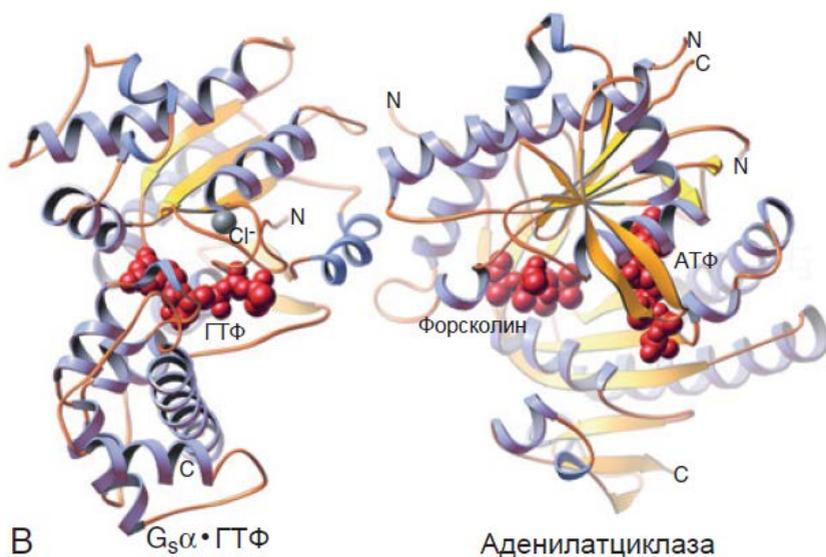
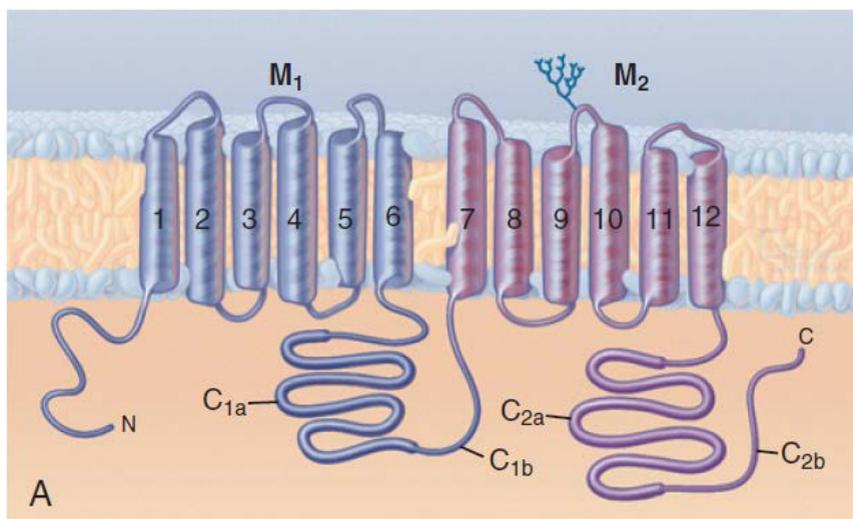


Рис. 38. Аденилатциклаза.

А – топология полипептида. С1а и С2а участки складываются и образуют активный фермент.

В – атомарная структура каталитического домена аденилатциклазы с ассоциированной $G_s\alpha$. АТФ связан в активном сайте

Концентрация цАМФ в покоящейся клетке довольно мала (примерно 10^{-8} М) для того, чтобы данный нуклеотид мог связаться со своими мишенями. Стимулирование соответствующих рецепторов (например, симитопных β -адренэргических рецепторов, см. рис. 11) повышает концентрацию цитоплазматического цАМФ более чем в 100 раз, и этого уже достаточно для насыщения регуляторных субъединиц протеинкиназы А. Диссоциация регуляторных (R) субъединиц высвобождает активные каталитические субъединицы РКА, которые фосфорилируют цитоплазматические и мембранные субстраты и перемещаются в ядро, где активируют, например, транскрипционный фактор CREB (cyclic nucleotide regulatory element-binding protein) (см. рис. 31).

Гуанилатциклазы также являются димерами, похожими на аденилатциклазы. У позвоночных есть два типа ГЦ (см. рис. 26). Члены семейства трансмембранных рецепторов с цитоплазматическими циклазными доменами при связывании с лигандами выравнивают оба цитоплазматических домена и синтезируют цГМФ. Оксид азота и монооксид углерода активируют цитоплазматические гуанилатциклазы, когда эти оксиды связываются с гемом в регуляторном домене.

ВТОРИЧНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ (ВМ) ПРОИЗВОДНЫЕ ЛИПИДОВ

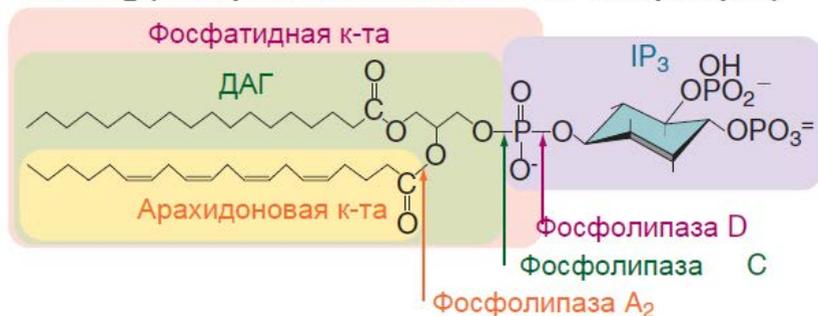
Фосфолипиды и сфинголипиды не только формируют клеточную мембрану, но также участвуют во многих сигнальных механизмах. Три мембранных липида являются основным источником сигнальных молекул:

1. Фосфатидилинозитол и его многочисленные фосфорилированные производные;
2. Фосфатидилхолин – основной мембранный фосфолипид;
3. Сфингомиелин.

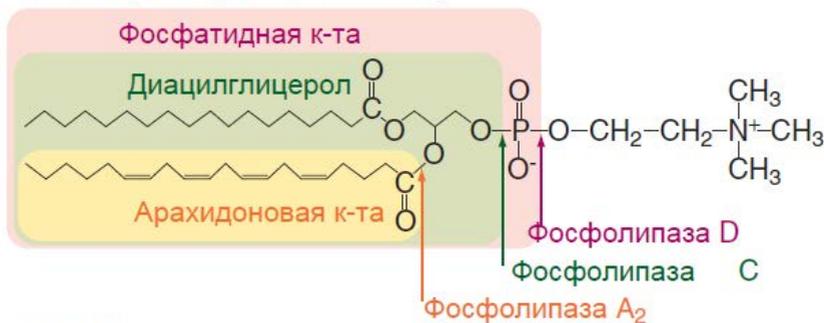
Три вида ферментов – фосфолипазы, липидкиназы и липидфосфатазы – синтезируют большинство ВМ-производных липидов.

Любопытно, но большинство всевозможных продуктов, получаемых из этих трех начальных липидов вышеперечисленными ферментами, действительно участвуют в сигнальных реакциях, прямо или косвенно. Эти ВМ распределяются между водной частью цитоплазмы и гидрофобной частью мембраны.

A. PIP₂ (Фосфатидилинозитол 4, 5-бисфосфат)



B. PC (Фосфатидилхолин)



C. Сфингомиелин

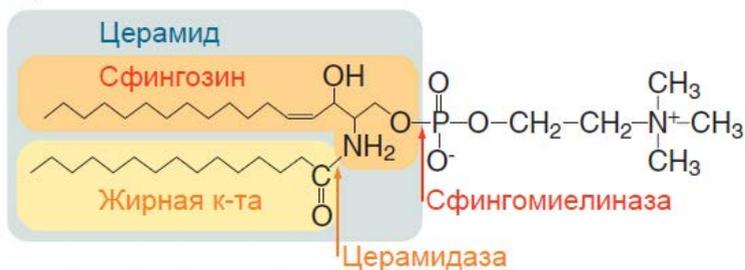


Рис. 39. Синтез липидных вторичных посредников.

А – PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). IP₃ = inositol trisphosphate.

В – PC (phosphatidylcholine).

С – Sphingomyelin. Вторичные посредники обозначены и заключены в цветные прямоугольники.

Фосфолипазы разрезают 3 из 4 эфирных связей в фосфолипидных эфирах (см. рис. 39).

Липид-киназы добавляют фосфат на диацилглицерол, в результате получается фосфатидная кислота. При добавлении киназой фосфата на фосфатидинозитол получаются фосфоинозитиды (**phosphatidylinositol 4-phosphate, PIP; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂; phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP₃**)

Липид-фосфатазы удаляют фосфат от фосфатидной кислоты (и получается ДАГ), либо от инозитольной головки в фосфоинозитидах.

КАЛЬЦИЙ

Ионы кальция являются универсальным ВМ, регулирующим много процессов, включая синаптическую трансмиссию, фертилизацию, секрецию, мышечное сокращение и цитокинез. Все эукариоты (но не прокариоты) используют Ca^{2+} - сигналы. Принимая во внимание то, что клетка зависит от фосфатов, необходимых для запасания энергии (АТФ), структуры ДНК и РНК, и многих других функций, ранние клетки разработали механизм изъятия ионов кальция из цитоплазмы, чтобы избежать преципитации фосфата кальция (нерастворимая соль). Таким образом клетки использовали полученный градиент Ca^{2+} между цитоплазмой и океанской водой (или внеклеточным пространством у животных) для создания малых импульсов Ca^{2+} в цитоплазме для передачи сигнала. Перемещение кальция между компартментами по ионным каналам происходит очень быстро. Вместо запуска синтеза и распада, как происходит в случае других ВМ, кальций высвобождается в цитоплазму и выводится из неё в неизменном виде, и нет необходимости в его синтезе или разрушении (рис. 40). АТФ-зависимые **Ca^{2+} -насосы (или помпы)** в плазматической мембране и мембране ЭПС поддерживают цитоплазматический кальций на низком уровне. Различные стимулы, работающие через различные рецепторы, открывают кальциевые каналы в плазматической мембране или мембране ЭПС, что позволяет очень концентрированному раствору Ca^{2+} ворваться в цитоплазму.

Клеточные ответы на кальций зависят от репертуара Ca^{2+} - чувствительных белков и эффекторных систем. Некоторые белки непосредственно связывают кальций, в то время как другие отвечают на кальций, связанный с малым белком **кальмодулином**.

УДАЛЕНИЕ Ca^{2+} ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ

АТФ-зависимые Ca^{2+} -насосы Р-типа (см. рис. 41, 42) в плазматической мембране и ЭПС поддерживают низкий уровень цитоплазматического кальция и создают 5000-кратный градиент концентрации через эти мембраны (рис. 40). Повышенная цитоплазматическая концентрация кальция активирует кальциевые помпы до тех пор, пока не упадет до примерно $0,1 \text{ мкМ}$ – уровня покоя.

С трех разных генов и с помощью альтернативного сплайсинга синтезируется как минимум пять Ca^{2+} -насосных АТФаз. Особенно много насосов SERCA (саркоплазматический эндоплазматический

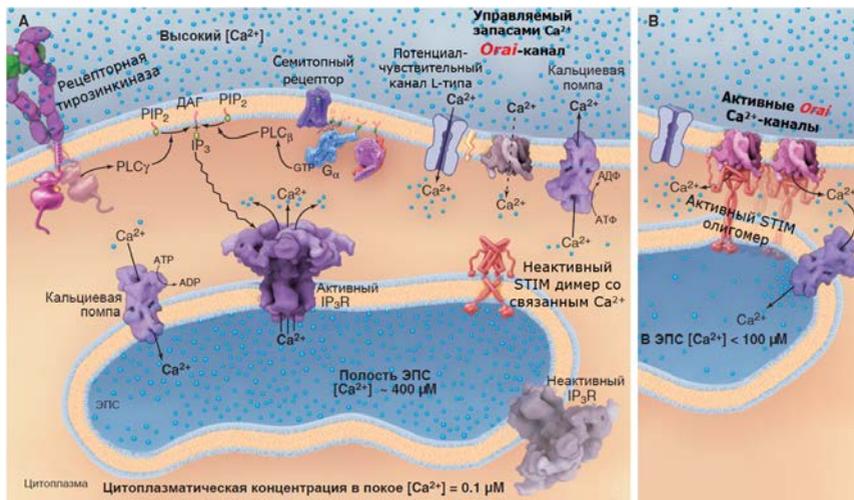


Рис. 40. Пути высвобождения и поглощения кальция.

А – Ca^{2+} -помпы в плазматической мембране и мембране ЭПС используют гидролиз АТФ для выкачивания Ca^{2+} из цитоплазмы. Множество рецепторов активирует фосфолипазу С (PLC), производящую IP $_3$ из фосфатидилинозитола 4,5-бифосфата (PIP $_2$). IP $_3$ диффундирует к ЭПС, открывает на её мембране IP $_3$ -рецепторы (IP $_3$ R), высвобождающие кальций в цитоплазму. Потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы L-типа срабатывают при деполяризации мембраны, впуская кальций в цитоплазму. STIM – стромальная молекула взаимодействия.

В – Пополнение кальция в депо. Если при передаче сигналов происходит истощение кальция в ЭПС, то Ca^{2+} диссоциирует от сайтов связывания в STIM (в полости ЭПС). При этом STIM агрегируют и взаимодействуют своими цитоплазматическими доменами с мембранными кальциевыми каналами Orai , и внеклеточный кальций медленно приходит в цитоплазму, а кальциевые насосы в ЭПС пополняют его запасы.

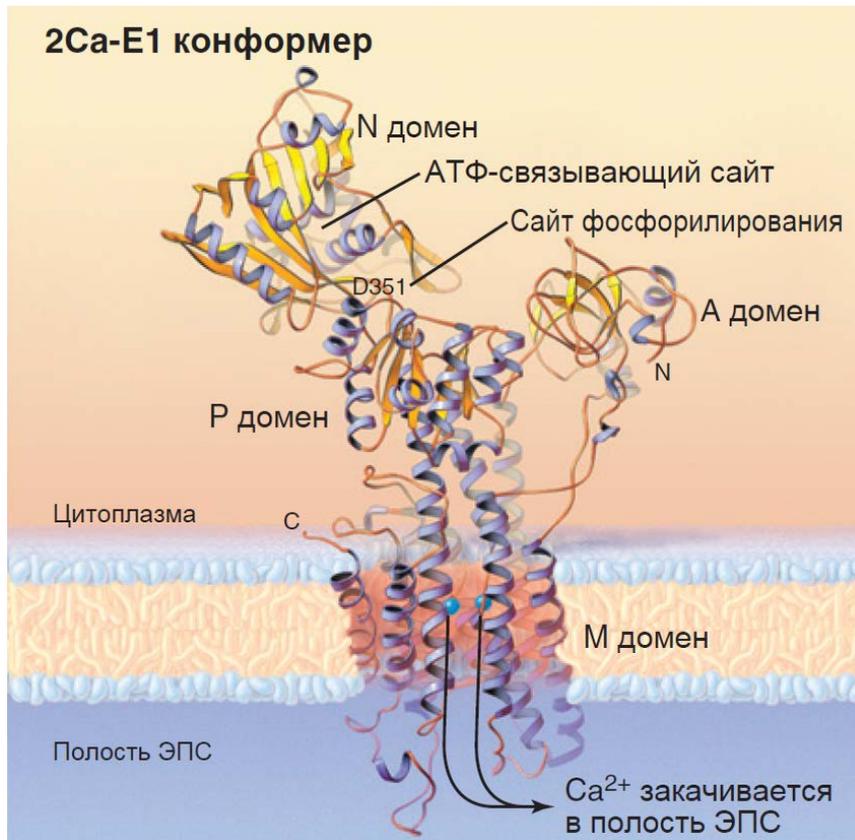


Рис. 41. Структура АТФ-насоса Р-типа.

Кристаллическая структура кальциевой АТФазы из саркоплазматического ретикулума (SERCA) скелетных мышц в 2Ca-E1 конформации с двумя ионами кальция, связанными с 4 из 10 трансмембранных спиралей примерно посреди липидного бислоя. В цитоплазме N-концевой домен связывает АТФ и переносит γ -фосфат на Asp351 (D351) в Р-домене.

ретикулум кальций АТФаза) в ЭПС гладкой мускулатуры или СПС скелетных мышц. Это даёт возможность ЭПС (СПС) закачивать кальций назад за миллисекунды (см. рис. 43). В сердце активность Ca²⁺ насосных АТФаз модулируется фосфоламбаном – бкДа интегральным мембранным белком саркоплазматического ретикулума. При фосфорилировании протеинкиназой А и кальмодулин-активируемой киназой (СаМ киназа) фосфоламбан диссоциирует от кальциевой помпы, таким образом активируя её.

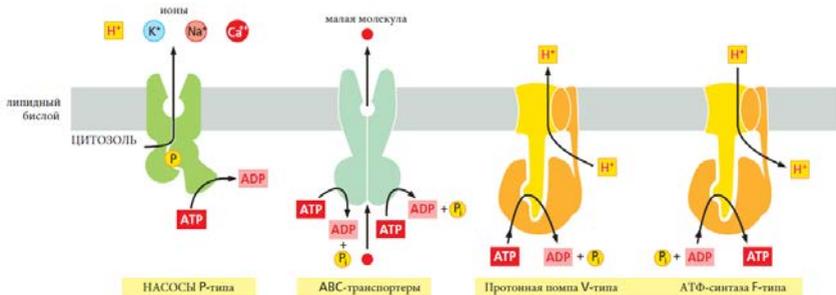


Рис. 42. Насосы (помпы). Три типа АТФ-зависимых насосов (помп).

Как и другие ферменты, все данные насосы могут работать в обоих направлениях, в зависимости от электрохимического градиента своих солютов (растворимых субстратов) и отношения концентраций АТФ/АДФ. При высоком соотношении АТФ/АДФ они гидролизуют АТФ; если же это отношение низкое, то они могут синтезировать АТФ. АТФазы F-типа в митохондриях обычно работают в таком «реверсном» режиме, синтезируя большинство клеточной АТФ.

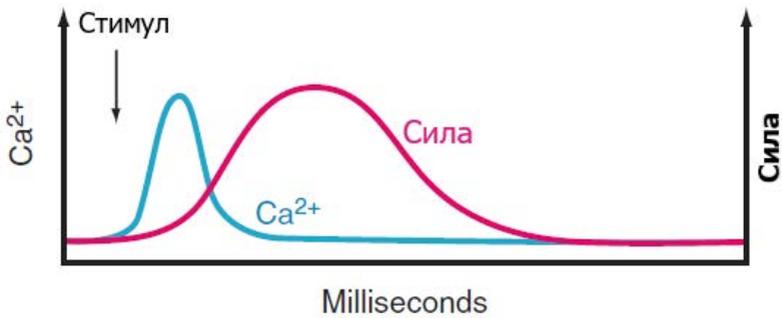
ЭПС запасает Ca^{2+} с использованием различных белков. Эти белки в полости ЭПС связывают много ионов кальция, но с низкой аффинностью, что даёт возможность устанавливаться быстрому равновесию между связанным и свободным кальцием, а это обеспечивает свободные ионы кальция при открытии каналов. Кальсеквестрин – основной кальций-связывающий белок СПС скелетной мускулатуры. В других клетках основным Ca^{2+} -связывающим белком в ЭПС является кальретикулин. Помимо связывания (с низкой аффинностью, но большого количества – 25 ионов на молекулу белка) Ca^{2+} , кальретикулин ещё является немембранным шапероном (в отличие от кальнексина), вовлеченным в фолдинг белков (см. рис. 44).

Митохондрия запасает кальций, используя переносчики, управляемые электрохимическим потенциалом на внутренней мембране. И хотя в них запасается много кальция, митохондрии не участвуют в передаче сигнала с помощью высвобождения кальция в цитоплазму.

Повторяющиеся стимуляции могут истощить запасы кальция в клеточных депо, поскольку насосы в плазматической мембране выкачивают часть кальция, который был высвобожден из ЭПС.

Процесс, называемый запасанием кальция в депо, пополняет его запасы в ЭПС путем переноса внеклеточного кальция через каналы в плазматической мембране, называемые Orai (рис. 40 В).

А. Рывок



В. Судорога

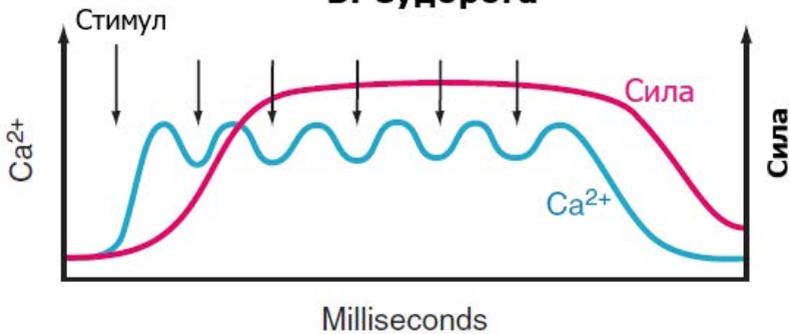


Рис. 43. Ca^{2+} запускает сокращение скелетных мышц.

В данных экспериментах Ca^{2+} -чувствительный белок экворин (aequorin) был введён в живые мышечные клетки для детекции сигнала о концентрации цитоплазматического кальция.

А – единичное стимулирование. Цитоплазматический Ca^{2+} временно увеличивается, что сопровождается коротким сокращением. Это недолгое сокращение продолжается некоторое время после того, как уровень кальция достигает уровня покоя.
В – множественное стимулирование. При каждом стимулировании наблюдается новый импульс кальция, сокращение продлевается до состояния судороги (tetanus).

Слабопроводящие Ca^{2+} - селективные каналы состоят из гексамера идентичных субъединиц с четырьмя трансмембранными доменами, не родственными другим каналам. Интегральный белок ЭПС, называемый **STIM** (Stromal interaction molecule), является сенсором концентрации Ca^{2+} в полости ЭПС и контролирует насос Orai. У STIM имеются Ca^{2+} - связывающие вспомогательные EF-домены (кальций-

чувствительные домены, так называемые «EF-hand») в полости ЭПС, одна трансмембранная спираль и цитоплазматический домен из суперспиралей, который взаимодействует с Orai. Димеры STIM рассеяны по мембране при высокой концентрации кальция в полости ЭПС. Если же концентрация кальция там снижается, и ионы кальция диссоциируют от STIM, то STIM агрегируют и образуют комплексы, которые непосредственно контактируют с цитоплазматической частью Orai (при этом данные кальциевые каналы открываются). На-

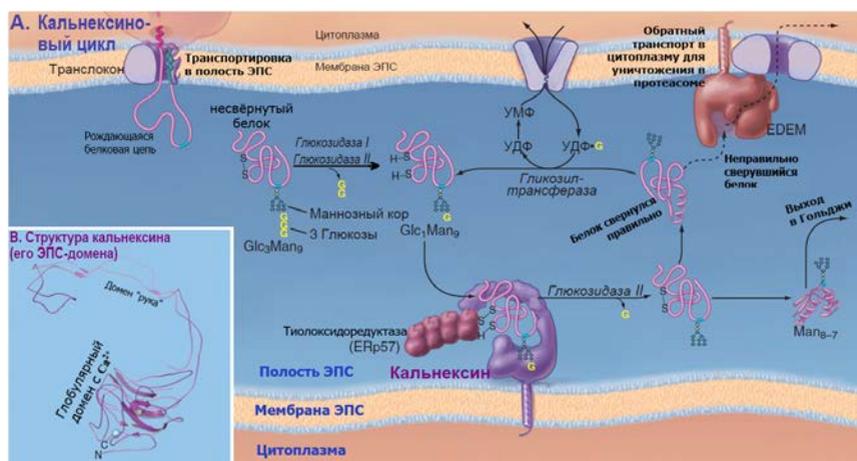


Рис. 44. Цикл фолдинга белков с помощью кальнексина в ЭПС.

А – гликозидазы I и II быстро удаляют два остатка глюкозы от новосинтезированного, ещё не свернутого белка. Кальнексин-тиол-оксидоредуктазный комплекс связывается с моногликозилированным белком. Гликозидаза II удаляет оставшуюся глюкозу, высвобождая белок (который во время связи с комплексом претерпевал фолдинг). Если высвобожденный белок свернулся правильно, он может покинуть ЭПС. Если же нет, он распознаётся гликозилтрансферазой и вновь гликозилируется, входя повторно в цикл фолдинга, и находится в этом цикле до тех пор, пока фолдинг не завершится. Либо же «упрямый» белок (который долгое время находился в циклах фолдинга, но всё никак не сворачивался) будет деградирован: при взаимодействии с EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein) – медленной маннозидазой, от белка отщепляет по одному остатку маннозы при каждом проходе через цикл фолдинга; при достижении критического числа остатков манноз в белке он выходит из цикла и направляется в канал обратного (ретроградного) транслокона, который доставит несвернутый белок в протеасому. Тиолоксидоредуктаза управляет перестройками дисульфидных связей при фолдинге.

(Glc = glucose; Man = mannose; UDP = uridine diphosphate)

В – трехмерная структура кальнексина, в котором видны глобулярный, лектин-связывающий домен, и «рука», состоящая из 4 повторяющихся модулей, окутывающих остаток сахара после того, как он связывается с глобулярным доменом.

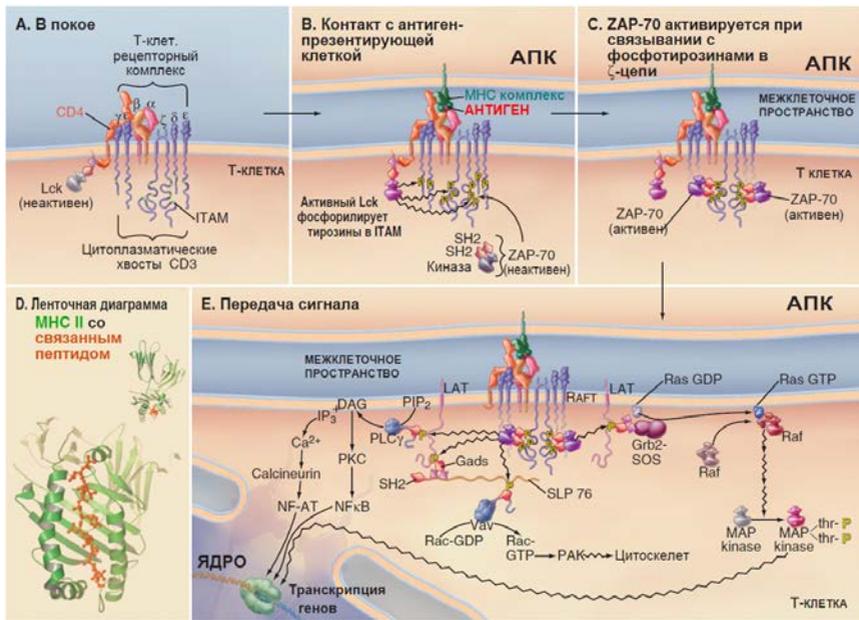


Рис. 45. (А–Е) Активация Т-лимфоцитов.

А – Комплекс Т-клеточного рецептора (TCR) на покоящемся лимфоците включает в себя нерецепторную тирозинкиназу Lck и нефосфорилированные сайты (ITAM [immunoreceptor tyrosine-based activation motifs]) на цитоплазматических хвостах субъединиц CD3.

В – встреча антиген-презентирующей клетки (АПК), на поверхности которой находится главный комплекс гистосовместимости (МНС), связанный с определенным пептидом («чужаком»), против которого нужно бороться), комплементарным какому-то определенному (в данном случае тому, что на рисунке) TCR, запускает передачу сигнала. Активный Lck фосфорилирует различные ITAM.

С – киназа ZAP-70 (zeta-associated protein of 70 kD) активируется при связывании своими SH2-доменами с фосфорилированными ITAM на зета-цепях.

Д – ленточная диаграмма МНС II (зеленый) со связанным пептидом (оранжевый) (вид сверху).

Е – активный ZAP-70 фосфорилирует различные мишени, включая трансмембранный белок LAT и адаптерный белок SLP76, которые затем передают сигнал далее. Фосфолипаза $\text{C}\gamma$ связывается с фосфотирозином на LAT и синтезирует IP_3 + DAG. IP_3 высвобождает Ca^{2+} из депо. Ca^{2+} активирует кальцинейрин (является протеинфосфатазой 2В), который активирует транскрипционный фактор NF-AT. DAG и Ca^{2+} активируют PKC, а она уже активирует транскрипционный фактор NF-кВ. Vav – обменный фактор для малой ГТФазы Ras, активируется при связывании с SLP76. Grb2-SOS связывается с другим фосфорилированным ITAM и запускает MAP

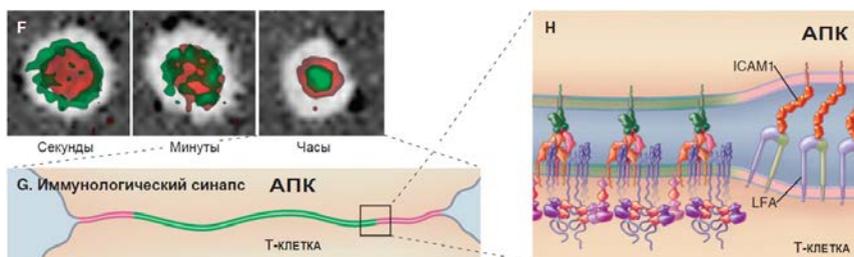


Рис. 45. (F–H)

F – кадры взаимодействия Т-клетки с искусственной мембраной, похожей на мембрану антиген-презентирующей клетки. Каждый кадр представляет наложение интерференционных отражений, показывающую близость контакта в оттенках серого (где белый – это наиболее близкая аппозиция, то есть положение в контакте), а флуоресцентная микрофотография показывает TCR (зеленые) и молекулы межклеточной адгезии (межклеточная адгезионная молекула 1, ICAM1) (красный). Стабильная перегруппировка ICAM1 вокруг сконцентрировавшихся TCR называется иммунологическим синапсом.

G–H – иммунологический синапс, в центральной зоне которого TCR связаны с комплексами MHC, а по периферии находятся ICAM1, связанные с интегрином LFA.

сосы ЭПС забирают вошедший в цитоплазму кальций, пополняя его запасы, а кластеры STIM теперь отсоединяются от Orai.

Мутации в Orai вызывают иммунодефициты, поскольку такой механизм входа кальция (управляемый запасами Ca^{2+} в ЭПС) крайне важен для активации лимфоцитов (рис. 45).

КАНАЛЫ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИЕ КАЛЬЦИЙ

Потенциал-зависимые и агонист-зависимые каналы в плазматической мембране дают возможность входить ионам кальция в цитоплазму извне. Потенциал-зависимые каналы особенно важны для возбудимых клеток, таких как миоциты и нейроны. Благодаря быстрой инактивации вследствие отрицательной обратной связи такие каналы дают быстрые кальциевые импульсы (спайки) (см. рис. 46).

Два типа агонист-зависимых каналов – называемых IP_3 рецепторные и риаудиновые (ryanodine) – названные так потому, что они чувствительны к растительному алкалоиду риаудину – высвобождают Ca^{2+} из ЭПС. В поперечнополосатых

мышцах используются рианодиновые рецепторы, в то время как в гладкой мускулатуре и немышечных клетках есть оба типа каналов.

В возбудимых мышечных клетках Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране включают рианодиновые кальциевые каналы для высвобождения кальция из ЭПС (саркоплазматической сети).

В невозбудимых клетках при стимуляции семитопных рецепторов, либо же тирозинкиназ, синтезируется инозитол-трис-фосфат, или IP_3 , который включает IP_3 -рецепторы и также происходит высвобождение кальция из ЭПС.

Цитоплазматические IP_3 и Ca^{2+} кооперируют друг с другом в открывании и закрывании этих каналов, причём IP_3 определяет чувствительность каналов к Ca^{2+} . IP_3 связывается с субмикромольярной аффинностью между доменами вблизи N-конца каждой субъединицы вдали от мембранной поры (которую образует данный канал). Основные аминокислоты образуют водородные связи со всеми тремя фосфатами и гидроксиллами инозитолтрисфосфата. В то же время Ca^{2+} связывается с IP_3 -связывающими доменами и несколькими другими сайтами вдоль полипептидной цепи. Чтобы канал открылся, необходимо, чтобы IP_3 занял все четыре своих сайта связывания. Каналы отвечают быстро, поскольку связывание и диссоциация обоих лигандов (кальция и IP_3) происходит быстро. Высокие концентрации кальция в полости ЭПС увеличивают чувствительность рецепторов к IP_3 . Фосфорилирование с помощью PKA, PKC и CaM-киназы повышает либо понижает эту чувствительность.

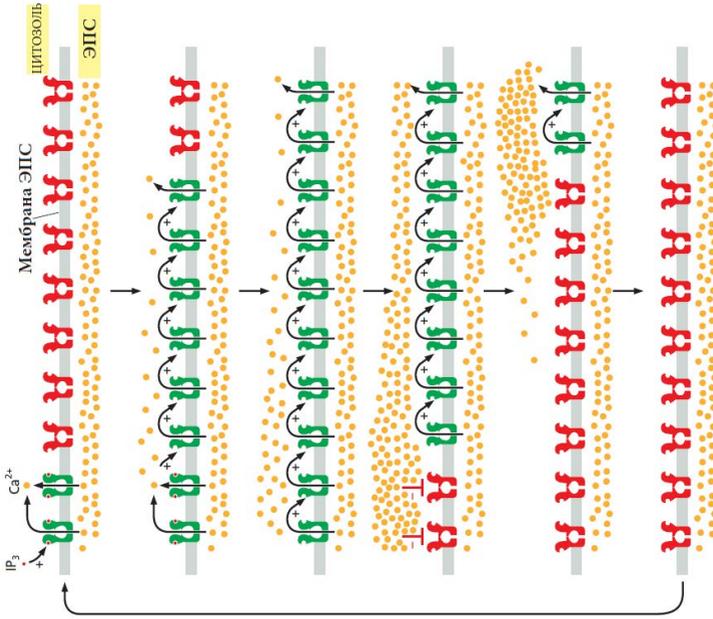
У человека три гена и альтернативный сплайсинг дают множество IP_3 -рецепторов с разными физиологическими свойствами для различных типов клеток. IP_3 -рецепторы типов I и II открываются в ответ на Ca^{2+} в колоколообразной зависимости концентрации кальция. Когда IP_3 активирует канал, высвобождение Ca^{2+} обеспечивает быструю положительную обратную связь, поскольку его локальная цитоплазматическая концентрация повышается в микромолярном диапазоне, что стимулирует открытие каналов и затем осуществление медленной отрицательной обратной связи (ООС), поскольку локальная концентрация Ca^{2+} становится намного большей. Результатом такой работы канала становится короткий, самоограничивающийся импульс кальция в ответ на умеренное изменение в концентрации IP_3 (рис 46).

Рис. 46. Положительная и отрицательная обратные связи порождают волны и осцилляции Ca^{2+} .

На данной диаграмме показаны IP_3 -рецепторы и риадиноновые рецепторы на мембране ЭПС: активные рецепторы показаны зеленым, неактивные – красным. Когда небольшое количество цитозольного IP_3 (инозитол трис-фосфат) активирует кластер IP_3 -рецепторов в каком-то месте мембраны ЭПС (вверху рисунка), локальное высвобождение ионов Ca^{2+} запускает открывание соседних IP_3 - и риадиноновых рецепторов, что приводит к еще большему высвобождению ионов Ca^{2+} . Такая положительная обратная связь (ПОС) (показана знаками «плюс») порождает самоподдерживающуюся (регенеративная) волну высвобождения Ca^{2+} , которая распространяется по всей клетке. Волны высвобождения Ca^{2+} распространяются по клетке намного быстрее, чем это было возможно за счет простой диффузии. Кроме того, даже при выросте большого количества ионов Ca^{2+} диффузия быстро уменьшает концентрацию этих ионов по мере их распространения от места выброса; регенеративная волна поддерживает высокую концентрацию ионов кальция во всей клетке.

Наконец, локальная концентрация Ca^{2+} инактивирует IP_3 - и риадиноновые рецепторы (средняя часть рисунка; показано знаками «минус»), что останавливает высвобождение Ca^{2+} . Кальциевые помпы понижают концентрацию цитозольного Ca^{2+} до её нормального (низкого) уровня. Конечным итогом этого является кальциевый импульс (или спайк): ПОС даёт быстрый подъем цитозольного кальция, а отрицательная обратная связь (ООС) ведёт к снижению этой концентрации до нормального уровня. Ca^{2+} -каналы остаются некоторое время невосприимчивыми (или рефрактерными) к новой стимуляции, препятствуя запуску нового Ca^{2+} -спайка (в нижней части рисунка). Но в конечном счёте ООС ослабевает, что даёт возможность IP_3 запустить новую Ca^{2+} -волну.

Так возникают осцилляции Ca^{2+} .



IP_3 -рецепторы типа III работают по-другому. Ca^{2+} активирует их, однако его высокие концентрации не конкурируют с IP_3 за связывание с каналом и не ингибируют высвобождение кальция. Такое отсутствие ООС позволяет клеткам с IP_3 -рецепторами типа III давать значительный, глобальный импульс кальция, который, конечно же, опустошает запасы кальция в ЭПС.

РИАНОДИНОВЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ

Рианодиновые рецепторы – кальциевые каналы высвобождают кальций из ЭПС при запуске сокращения скелетных мышц. Рианодиновые рецепторы являются гомотетрамерами с большими цитоплазматическими доменами и образуют катионный канал из доменов вблизи своих С-концов (рис. 47). По строению они похожи на IP_3 -каналы. Рианодиновые рецепторы являются главными каналами высвобождения кальция в поперечнополосатой мускулатуре, где они активируются при помощи физического контакта с потенциал-

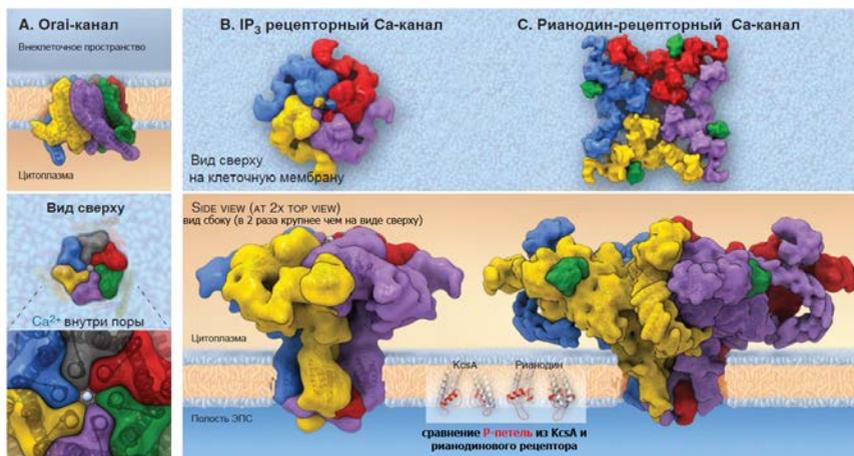


Рис. 47. Структуры кальциевых каналов.

A – кристаллическая структура канала Orai.

B – криоэлектронная микроскопия структуры канала IP_3 -рецептора.

Шесть трансмембранных сегментов и P-петля (P-loop), смотрящие в просвет ЭПС, сходны и у других каналов.

C – криоэлектронная микроскопия структуры канала рианодинового рецептора. Канал также состоит из 4 идентичных субъединиц. Шесть спиралей и P-петля, образующие канал, расположены в середине трансмембранного домена.

TRPV1 = transient receptor potential vanilloid-1.

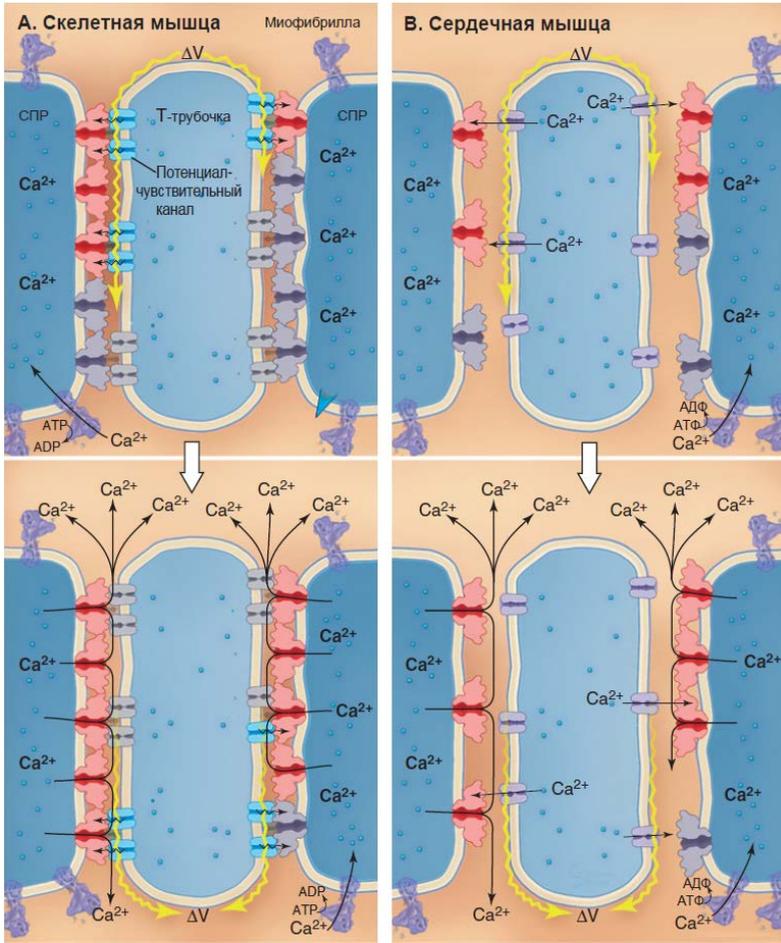


Рис. 48. Механизм высвобождения кальция в скелетной и сердечной мышечной клетке.

Оба типа мышц используют потенциал-зависимые кальциевые каналы в мембранах Т-трубочек и каналы высвобождения кальция из гладкой ЭПС (СПС – саркоплазматическая сеть).

А – прямое сопряжение в скелетных мышцах. Потенциал действия в Т-трубочке (ΔV) активирует сенсоры потенциала (на рисунке они из серых становятся голубыми).

Эти активированные каналы за счёт прямого сопряжения открывают уже каналы высвобождения кальция в мембране ЭПС (из серых становятся розовыми). Уровень цитоплазматического кальция ненадолго возрастает, поскольку Ca^{2+} -АТФазы закачивают кальций назад в полость ЭПС.

В – провоцируемое кальцием высвобождение кальция в сердечной мышце. Потенциал действия открывает потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы в Т-трубочке, высвобождая кальций прямо в цитоплазму. А уже этот Ca^{2+} открывает каналы высвобождения кальция, расположенные в мембране ЭПС.

зависимыми кальциевыми каналами (рис. 48). В сердечной мышце рианодиновые рецепторы активируются кальцием после высвобождения его (кальция) из Т-трубок за счёт срабатывания потенциал-зависимых кальциевых каналов. Как и в случае IP_3 -рецепторов типа I и II, Ca^{2+} активирует рианодиновые рецепторы по колоколообразной зависимости от концентрации кальция. Такой кальций-индуцируемый релизинг (высвобождение) кальция позволяет распространяться локальной волне активации от одного рианодинового рецептора до следующего.

ОКСИД АЗОТА

Свободный радикал оксида азота – $NO\bullet$ (точка обозначает неспаренный электрон в атоме азота) – даёт возможность клетке передавать сигналы особым образом. Он быстро диффундирует через мембраны, позволяя распространяться сигналу от клетки к клетке подобно липидным вторичным посредникам, в отличие от обычных вторичных посредников, которые ограничены лишь той клеткой, в которой они были синтезированы. Оксид азота известен как умеренно токсичный загрязнитель воздуха, так что неудивительным кажется тот факт, что макрофаги производят его для уничтожения микроорганизмов и опухолевых клеток. Однако в поздних 1980-ых выяснилось, что оксид азота является диффундирующим мессенджером: так, производимый в эндотелии, выстилающем сосуды, он расслабляет гладкую мускулатуру в стенке артерий и служит неконвенциональным нейротрансмиттером для некоторых нейронов в центральной и периферической нервных системах.

У оксида азота есть несколько химических форм. $NO\bullet$ – это лишь одно из легко переходящих друг в друга редокс-состояний (окисленных-восстановленных) монооксида азота. Другие его состояния – это ионы нитрозония (NO^+) и нитроксила (NO^-). Оксид азота стабилен в воде, но он быстро реагирует с кислородом, его период полужизни составляет всего несколько секунд в нашем теле. Отсюда следует, что оксид азота должен синтезироваться постоянно для обеспечения продолжительного эффекта. Основной причиной инактивации оксида азота служит его связывание с гемом в гемоглобине. Окись азота метаболизируется в организме до нитрата и нитрита и выводится из организма. Обратите внимание на то, что

газ, используемый в анестезии – закись азота, N_2O (так же известный под названием «веселящий газ») – не является частью семейства монооксида азота.

Монооксид-синтазы (NOS – nitric oxide synthase) синтезируют оксид азота путём конверсии L-аргинина и молекулярного кислорода в цитруллин и окись азота (рис. 49). В качестве восстановительного эквивалента для данной реакции используется **никотинамид аденин динуклеотид фосфат** (NADPH). NOS по сути имеет две ферментативные активности. Её N-концевой (оксидазный) домен содержит группу гема, участвующую напрямую в окислении аргинина. С-концевой (редуктазный) домен поставляет электроны для оксидазного домена. Для NOS требуется необычно большое число кофакторов: гем и тетрагидробиоптерин связываются с оксидазным доменом; а ФАД (флавин аденин динуклеотид), флавин мононуклеотид и NADPH – с редуктазным доменом. В некоторых грамположительных бактериях есть NOS, содержащая лишь N-концевой домен, который предположительно является эволюционным предком эукариотических NOS. Данный бактериальный фермент катализирует нитрирование субстратов, а не продукцию окиси азота.

У позвоночных экспрессируется три изоформы NOS, специфичные для определенных тканей. NOS1 и NOS3 синтезируются конститутивно, а индуцибельная изоформа – (iNOS или NOS2) была обнаружена в макрофагах, печени и фибробластах. В макрофагах NOS2 синтезируется лишь при стимуляции их эндотоксинами,

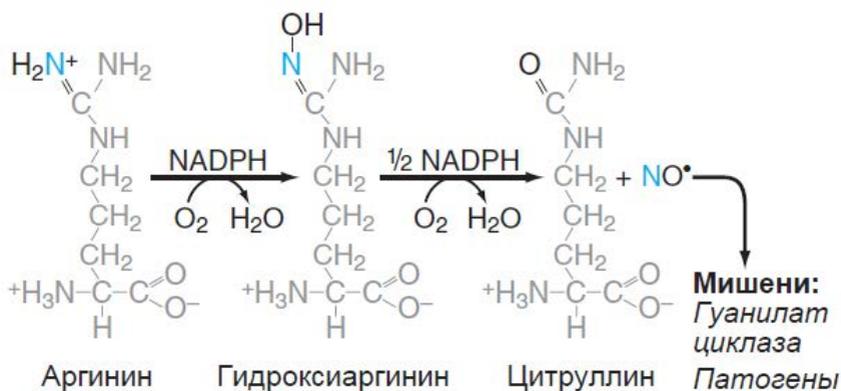


Рис. 49 Синтез оксида азота.

интерфероном- γ и некоторыми другими факторами. Эндотелиальная NOS (eNOS или NOS3) также синтезируется в некоторых нейронах. NOS3 связывается с мембраной благодаря миристоилрованию и пальмитоилрованию её N-конца. Нейрональная NOS (nNOS или NOS1) синтезируется примерно в 1% нейронов церебрального кортекса, а также скелетной мускулатуре и эпителиальных клетках. В скелетных мышцах NOS1 связывается с мембранным дистрофиновым комплексом. У пациентов, страдающих мышечной дистрофией (вызванной дисфункцией фибриллина-1), не удается обнаружить мембранную NOS1.

Активность NOS регулируется Ca^{2+} -кальмодулином и с помощью фосфорилирования. Ca^{2+} -кальмодулин активирует NOS при связывании его с короткой регуляторной последовательностью, расположенной между двумя доменами в NOS. Кальциевый сигнал активирует NOS в большинстве тканей, хотя в макрофагах NOS2 связывается с Ca^{2+} -кальмодулином настолько прочно, что NOS2 становится активной перманентно. PKB/Akt – киназа, активируемая фосфатидил инозитол трисфосфатом (PIP_3), фосфорилирует и, таким образом, активирует NOS3.

Основной мишенью оксида азота является растворимая гуанилатциклаза – цитоплазматический фермент, синтезирующий цГМФ (см. рис. 26). Он обратимо связывается с атомом железа в геме гуанилатциклазы, что приводит к конформационным изменениям, активирующим данный фермент. Оксид азота также реагирует с цистеиновыми остатками в белках (*S*-нитрозилирование). Данная ковалентная посттрансляционная модификация приводит к изменению активности белков, таких как NSF (*N*-этилmaleимид чувствительный фактор) – фактора, требуемого для осуществления транспортровки мембран.

Макрофаги синтезируют окись азота в довольно высоких концентрациях, способных напрямую убить микроорганизмы. Оксид азота взаимодействует с супероксид-анионом (O_2^-) с образованием пероксинитрита (OONO^-), быстро распадающегося на OH^\cdot и NO_2^\cdot – токсичные оксиданты, убивающие поглощенные микроорганизмы.

Оксид азота из трех различных источников регулирует кровяное давление. Во время физической нагрузки повторяющееся высвобождение Ca^{2+} , стимулирующее сокращение скелетной мускулатуры (рис см. 43), приводит и к связыванию с кальмодулином (и его

активации), который активирует NOS, синтезирующую оксид азота. Он диффундирует из скелетных мышц и расслабляет клетки гладкой мускулатуры кровеносных сосудов за счет активации в них синтеза цГМФ и, таким образом, протеинкиназы G (PKG). PKG понижает возбудимость мембраны путем открытия Ca-активируемых калиевых каналов и ингибирует сокращение гладкомышечных клеток путем снижения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в них за счет ингибирования синтеза IP_3 . PKG снижает возбудимость мембраны путём открытия активируемых кальцием K-каналов и подавляет сокращение благодаря снизившейся внутренней концентрации ионов кальция из-за ингибирования синтеза IP_3 . Это приводит к увеличению локального кровотока. Эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды, тоже используют оксид азота для регуляции сосудистой гладкой мускулатуры. Механическое напряжение сдвига от кровотока непрерывно стимулирует фосфатидилинозитол-3 киназу эндотелиальных клеток к выработке PIP_3 , который стимулирует фосфорилирование (и таким образом активацию) NOS3 с помощью PKB/Akt. Это даёт долгий устойчивый сигнал расслабления сосудистой гладкой мускулатуры. Гормоны, такие как ацетилхолин и брадикинин, стимулируют эндотелиальные клетки к выработке оксида азота, поскольку вызывают высвобождение Ca^{2+} из ЭПС. У мышей, не имеющих NOS3, наблюдается постоянное высокое кровяное давление. Моно- и ди- N^G -метилованные аргинины сильно ингибируют NOS и поэтому используются в экспериментах по определению биологических функций оксида азота. Блокирование NOS не позволяет макрофагам убивать бактерии, а блокировка производства оксида азота в эндотелии приводит к сокращению сосудистой гладкомышечной мускулатуры, вследствие чего поднимается кровяное давление – свидетельство того, что оксид азота играет важную роль в расслаблении этих клеток. Оксид азота, синтезируемый в автономных нервах, вызывает эрекцию благодаря усилению синтеза цГМФ и расслаблению гладкомышечной сосудистой мускулатуры. Так, препарат **сильденафил** («Виагра») используется для лечения эректильной дисфункции, а также он ингибирует фосфодиэстеразу, которая разрушает цГМФ. Сильденафил (и гомологичные препараты) связывается с активным сайтом фосфодиэстеразы, блокируя доступ к нему цГМФ. В других автономных нервах оксид азота используется для контроля гладкомышечных клеток в стенках кишечника. Оксид

азота является активным метаболитом нитроглицерина – лекарства, широко используемого для снятия боли (стенокардии), вызываемой нарушением кровотока в сердце. Данный препарат расширяет коронарные артерии и улучшает кровоснабжение самого сердца. Производимый нервными клетками головного мозга оксид азота, помимо регуляции мозгового кровотока, вносит вклад в некоторые типы обучения путем усиления выработки нейротрансмиттеров.

Монооксид углерода («угарный газ», CO) – другой газообразный межклеточный вторичный посредник. Он также регулирует немембранную гуанилатциклазу и влияет на активность некоторых ферментов.

ИНТЕГРАЦИЯ СИГНАЛОВ

Обонятельные (или олфакторные) чувствительные (сенсорные) нейроны располагаются в назальном эпителии позвоночных, они улавливают специфические одоранты (молекулы, вызывающие ощущение запаха). Нейроны отвечают на них, пересылая потенциал действия в мозг (см. рис. 4).

У этих нейронов есть три специализированные зоны. Апикальные дендриты выходят из поверхности эпителия в виде примерно 12 сенсорных ресничек, которые специализированы на ответ при действии определенных внеклеточных одорантов. Ответ определяется высокими концентрациями четырех мембранных белков в ресничке: одним определенным типом одорантного рецептора, тримерным G_{olf} -белком (олфакторные G-белки), аденилатциклазой типа III и ионного канала, открываемого циклическим нуклеотидом. В клеточном «теле» (или центральной части) содержится ядро, белок-синтезирующий аппарат, насосы и каналы в плазматической мембране, устанавливающие мембранный потенциал покоя. Аксон простирается от основания каждого нейрона до вторичных нейронов в обонятельной луковице, расположенной в передней части мозга. Олфакторные сенсорные нейроны обладают уникальной способностью замещаться из клеток-предшественников в эпителии в течение 30 дней после их повреждения или разрушения.

Процесс рецепции и трансдукции олфакторного стимула происходит в 5 этапов:

1. Одорант активирует семитопный рецептор на ресничке олфакторного нейрона.
2. Активированный рецептор усиливает сигнал путем замены ГДФ на ГТФ при большом количестве молекул G_{olf} .
3. GTP- $G_{olf\alpha}$ диссоциирует от $G\beta\gamma$ и амплифицирует сигнал далее, активируя аденилатциклазу, которая синтезирует большое количество цАМФ.
4. цАМФ связывается с ионным каналом, открывает его, что приводит к деполяризации плазматической мембраны.

5. Деполяризация мембраны открывает потенциал-зависимые натриевые каналы, запуская потенциал действия (рис. 50), который возникает в основании аксона сенсорного нейрона и движется ко вторичным нейронам в обонятельной луковице.

АДАПТАЦИЯ

Десенсибилизация – это затухание восприимчивости к одоранту несмотря на его постоянное присутствие. Даже если одорант продолжает воздействовать на рецепторы, происходит адаптация

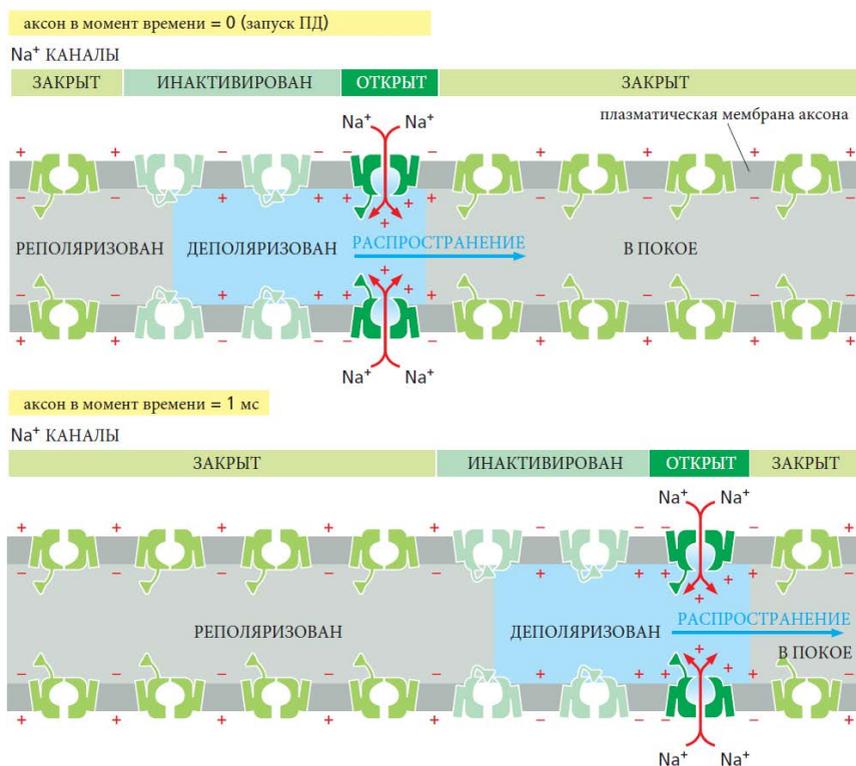


Рис. 50. Распространение потенциала действия по аксону.

Изменения в Na⁺-каналах и потоки натрия (изогнутые красные стрелки) порождают движущийся потенциал действия. Участок аксона с деполаризованной мембраной закрашен голубым цветом. Заметьте, что ПД распространяется в одном направлении, идя от участка деполаризации, поскольку инактивация Na⁺-канала предотвращает распространение деполаризации в обратном направлении.

на каждом шаге в сигнальном каскаде благодаря временной (транзиентной) активации G-белков, самоограничивающее повышение цАМФ и быстрой деполяризации мембраны.

Связанные с G-белками рецепторы десенсибилизируются с помощью протеинкиназ, фосфорилирующих рецепторы и с помощью белков арестинов, которые связываются с фосфорилированными рецепторами (см. рис. 10). Это приводит к инактивации G-белка и обеспечивает ООС на первом этапе амплификации сигнала.

ООС также осуществляется и на этапе активации рецептора, поскольку киназа ольфакторных рецепторов переносится к плазматической мембране вследствие связывания с $G\beta\gamma$ -субъединицами, высвободившимися после диссоциации G-белка.

Кальций, зашедший в клетку через цАМФ-зависимый кальциевый канал, связывается с кальмодулином, дающим два типа ООС. (Кальмодулин- Ca^{2+}) активирует цАМФ-фосфодиэстеразу, быстро инактивирующую цАМФ. Также (Кальмодулин- Ca^{2+}) связывается с цАМФ-кальциевым каналом, понижая его чувствительность к цАМФ примерно в 10 раз.

Эти два эффекта кальция изменяют отклик нейрона на воздействие одоранта, ограничивают время ответа, расширяют диапазон концентраций одоранта, на которые клетка может давать ответ, а также делают клетку временно невосприимчивой к дополнительной стимуляции.

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

Множество внеклеточных лигандов влияет на генную экспрессию тремя путями (рис. 51). Лиганды в первом пути – это малые гидрофобные молекулы, такие как стероиды, витамин А, тиреоидный гормон. Эти лиганды проникают через плазматическую мембрану и связываются с ядерными рецепторами в цитоплазме (затем транспортируются в ядро). Лиганды остальных двух путей включают в себя малые заряженные молекулы, пептиды и белки, которые неспособны проникать сквозь мембрану. Они связываются с соответствующими рецепторами на клеточной поверхности и запускают сигнальные каскады, которые активируют транскрипционные факторы. Во всех случаях активированные транскрипционные факторы кооперируют с другими ядерными белками и регулируют экспрессию специфических генов (см. рис. 31 А).

МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМЫЙ КИНАЗНЫЙ КАСКАД

Множество мембранных рецепторов запускают сигнальные пути, которые активируют MAP-киназные каскады. Многие из этих путей проходят через малую ГТФазу **Ras**, что позволяет клетке интегрировать различные ростовые сигналы и контролировать клеточный цикл. (см. рис. 12).

Рецепторные тирозинкиназы для ростовых факторов и инсулина (см. рис. 13) также посылают сигналы через Ras. Другие рецепторы, например, рецепторы Т-лимфоцитов, используют нерецепторные тирозинкиназы, сопряженные с Ras и MAP-киназами через ZAP-киназу (см. рис. 45).

Семитопные рецепторы также могут активировать MAP-киназные пути. Например, β -арестин не только инактивирует β -адренэргические рецепторы, но он также сопрягает их с MAP-киназными путями.

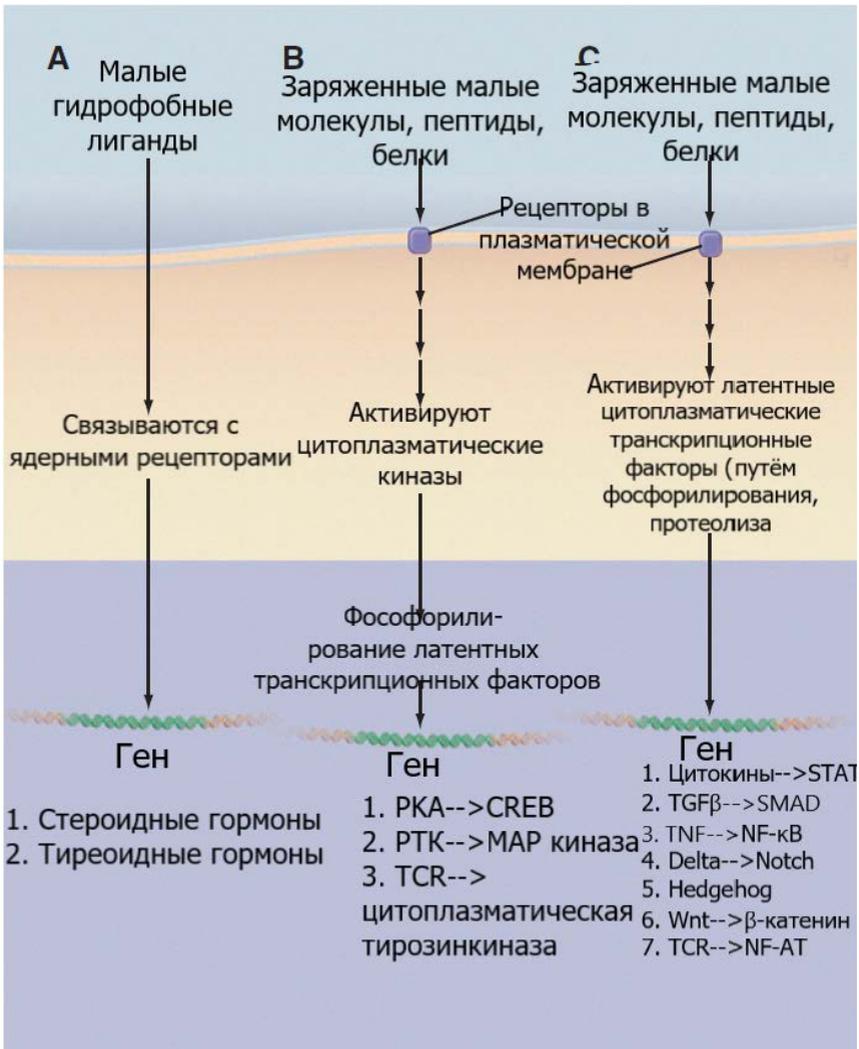


Рис. 51. Три способа передачи сигнала, с помощью которых внеклеточные лиганды влияют на экспрессию генов.

A – путь через ядерный рецептор. Малые гидрофобные лиганды проходят через плазматическую мембрану.

B – данный путь используют мембранные рецепторы и цитоплазматические киназы, которые затем входят в ядро и активируют транскрипционные факторы.

C – через плазматические рецепторы активируются транскрипционные факторы в цитоплазме.

CREB = cAMP response element-binding protein; ECM = extracellular matrix; TCR = T-cell receptor; TNF = tumor necrosis factor; TGFβ – трансформирующий ростовой фактор β.

Каскад киназ позволяет интегрировать входящие воздействия от сходящихся путей и амплифицировать сигналы. Амплификация может быть настолько сильной, что MAP-киназный каскад работает как переключатель в режиме «всё-или-ничего». Например, яйцо лягушки, которое застряло на G_2 -стадии клеточного цикла, реагирует на гормон **прогестерон** так, что либо остаётся на прежней стадии, либо входит в клеточный цикл на полной скорости. Прогестерон активирует MAP-киназный каскад, состоящий из Mos, MEK1 и p42 MAP-киназы. В отдельных клетках MAP-киназа либо нефосфорилирована и неактивна, либо дважды фосфорилирована и полностью активна. Такое бистабильное состояние (то есть либо одно состояние, либо другое) зависит от факта, что обе киназы – MEK1 и MAP – требуют двух независимых актов фосфорилирования для своей активации. MAP-киназа активирует Mos путем его фосфорилирования, а также усиливает его экспрессию.

В итоге, незначительный стимул включает некоторые клетки, а остальные остаются не включёнными, но переходных состояний нет.

ЦИТОКИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР И JAK/STAT КАСКАДЫ

Множество полипептидных гормонов и ростовых факторов, обобщенно называемых цитокинами, регулируют экспрессию генов посредством трехбелковой цепи без участия вторичных мессенджеров (ВМ) – это наиболее прямая передача сигнала от лиганда в ядро клетки (рис. 24).

Гормон роста использует такой механизм для контроля роста всего организма, эритропоэтин направляет пролиферацию и созревание предшественников эритроцитов, а интерфероны и интерлейкины участвуют в иммунном ответе.

Три компонента в данном пути – эти димерный мембранный рецептор без собственной ферментативной активности, тирозинкиназа (JAK), конститутивно ассоциированная с каждой из субъединиц рецептора, а также латентный (скрытый, то есть находящийся в цитоплазме и начинающий работать лишь после доставки в ядро) транскрипционный фактор STAT (signal transducer and activator of transcription). Киназы JAK, первоначально простодушно названные «just another kinase» (то есть «просто ещё одна киназа» или «просто

ещё одна из киназ»), теперь называют киназами Януса (двуликий греческий бог, открывающий двери). N-концевые половины JAK участвуют в ассоциации с рецептором. В отсутствие лиганда киназа неактивна из-за взаимодействия со своей второй молекулой (см рис. 16). Какие-то цитокиновые рецепторы связываются и активируют лишь один тип JAK, другие могут связываться со многими типами.

Передача сигнала от лиганда через JAK к STAT и затем в ядро происходит следующим образом:

1. Связывание лиганда изменяет конформацию рецептора и снимает взаимное ингибирование между ассоциированными с ним киназами JAK.

2. Киназы JAK взаимно активируют друг друга путем трансфосфорилирования, а также фосфорилируют цитоплазматические «хвосты» рецепторов, что создаёт док-сайты (то есть места для «пришвартовки») для STAT.

3. SH2-домены направляют предварительно образовавшиеся димеры STAT к фосфотирозинам на рецепторе.

4. JAK фосфорилирует STAT, изменяя ориентацию субъединиц. Это позволяет диссоциировать STAT от рецептора.

5. Активный димер STAT входит в ядро и активирует экспрессию различных генов.

Три механизма выключают ответ на активацию цитокином.

- 1) Фосфатазы инактивируют рецептор, киназы и внутриядерный STAT.

- 2) Эндоцитоз также выключает активные рецепторы.

- 3) Медленная петля ООС ограничивает длительность ответа.

Один из генов, экспрессирующихся в ответ на STAT, кодирует белок **SOCS1**. После синтеза этот белок ингибирует дальнейшую активацию STAT путем взаимодействия с цитокиновым рецептором.

Селективная экспрессия специфических цитокиновых рецепторов, четырех JAK и шести STAT подготавливает дифференцированные клетки млекопитающих к специфическому ответу на различные цитокины. Активные STAT могут быть либо гомо-, либо гетеродимерами. Ряд белков STAT – некоторые с уникальными, а другие – с общими доменами, связывается с регуляторными сайтами генов, требующихся для активации в определенных клетках. Продукты этих генов, контролируемых STAT'ами, отвечают не только за работу определенных дифференцированных функций в клетке, но также

направляют клеточную пролиферацию. Так, потеря функции JAK приводит к иммунодефицитам, в то время как пациенты с мутациями в STAT5b резистентны к гормону роста и не способны расти. При мутации в JAK2, которая делает данный белок постоянно активным, наблюдается другой эффект: наблюдается неконтролируемая пролиферация предшественников эритроцитов, вне зависимости от эритропоэтина.

Трехкомпонентный путь от цитокиновых рецепторов привлекает своей простотой, однако он не работает в изоляции от других путей. С одной стороны, сходящиеся сигналы от EGF- и PDGF-рецепторов могут фосфорилировать и активировать STAT – это второй способ регулирования STAT-респонсивных генов (то есть генов, которые начинают экспрессироваться при взаимодействии STAT с их регуляторными областями). С другой стороны, некоторые цитокиновые рецепторы регулируют экспрессию генов, работая через Shc и Grb2-SOS- Ras и другие пути.

«РЕЦЕПТОРНАЯ СЕРИН/ТРЕОНИНОВАЯ КИНАЗА – SMAD» СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

Все многоклеточные используют семейство димерных полипептидных ростовых факторов, родственных трансформирующему ростовому фактору β (**transforming growth factor- β , TGF- β**) (см. рис. 25) для определения направления дифференцировки во время эмбриогенеза и для контроля клеточной пролиферации во взрослом организме. У человека найдено более 40 генов лигандов этого семейства, которые подразделяются на два класса: а) близкого родства с TGF- β и активинами, б) широкое семейство белков костного морфогенеза. Все они активируют короткий сигнальный каскад, состоящий из рецепторной серин/треониновой киназы и белка из семейства мобильных транскрипционных факторов, называемых SMAD (Sma- and Mad-related proteins).

Рецептор состоит из двух типов субъединиц: RI (7 изоформ у человека) и RII (5 изоформ). Различные комбинации этих рецепторов связывают около 30 различных лигандов, некоторые лиганды являются антагонистами друг-другу. Связывание лиганда приводит в соприкосновение RI и RII, это позволяет RII-рецепторам активировать RI-рецепторы путем трансфосфорилирования (см. рис. 25).

Активные RI-рецепторы фосфорилируют «регулируемые» SMAD (R-SMAD), такие как SMAD2 и SMAD3 (см. рис. 27). Фосфорилированные R-SMAD диссоциируют от RI и ассоциируют с SMAD4, также называемым «кофактор SMAD» (co-SMAD). Таким образом, тример, состоящий из двух R-SMAD и одного co-SMAD, входит в ядро и ассоциирует там с другими ДНК-связывающими белками, активируя или ингибируя транскрипцию специфических генов, а также влияя на структуру хроматина. Число регулируемых генов варьирует от нескольких единиц до сотен, в зависимости от других транскрипционных факторов, синтезируемых клеткой, и эпигенетической модификации хроматина, содержащего гены-мишени. Другие SMAD регулируют эти сигнальные пути с помощью ингибирования фосфорилирования R-SMAD.

SMAD-каскад, активированный ростовым фактором TGF- β , регулирует пролиферацию клетки и дифференцировку многих типов клеток, включая эпителиальные и гемопоэтические. И хотя в название этого ростового фактора входит слово «трансформирующий» (что подразумевает, что данный фактор должен управлять трансформацией), на самом деле TGF- β останавливает клеточный цикл в G1-фазе с помощью запуска экспрессии отрицательных регуляторов циклин-зависимых киназ. С другой стороны, TGF- β способен стимулировать рост некоторых опухолей. В соответствии со способностью TGF- β -сигнального пути ингибировать клеточный рост, во многих опухолях человека происходят мутации в генах TGF- β -рецепторов или в генах SMAD, приводящих к потере функции этих белков.

Мутации во вспомогательном рецепторе для TGF- β приводят к неправильно сформированным сосудам при наследственной геморрагической телангиэктазии. Мыши с гомозиготными мутациями в генах TGF-каскада умирают во время эмбрионального периода.

Как и другие сигнальные пути, данные рецепторы и SMAD не работают изолированно от других каскадов. MAP-киназы и CDK (циклин-зависимые киназы, см. «Клеточный цикл») могут фосфорилировать SMAD, а активные RI-рецепторы способны активировать MAP-киназные каскады и другие сигнальные пути.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. – Molecular biology of the cell, 6th edition. – Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. – New York (USA). – 2015.

2. Carlberg C., Molner F. – Mechanisms of Gene Regulation, 2nd edition. – Springer Science+Business Media Dordrecht. – 2016.

3. Pollard T. D., Earnshaw W. C. et al. – Cell Biology, 3d edition. – Elsevier, Inc. – Philadelphia (USA). – 2017.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ: ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СИГНАЛ, СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ.....	3
ТИПЫ РЕЦЕПТОРОВ	9
Семитопные рецепторы	9
Рецепторные тирозинкиназы.....	18
Цитокиновые рецепторы	30
Рецепторные серин/треониновые киназы.....	31
Гуанилатциклазные рецепторы	36
Семейство рецепторов фактора некроза опухолей (Tumor Necrosis Factor, TNF)	37
Toll-подобные рецепторы	42
Notch-рецепторы.....	42
Рецепторы hedgehog	44
СВОЙСТВА СИГНАЛ-ПЕРЕДАЮЩИХ СИСТЕМ	48
Нарушение функции киназ	49
Кооперация между киназами и фосфатазами	49

ГТФазный цикл49

G-белки и болезни51

**ВТОРИЧНЫЕ ПОСРЕДНИКИ
(SECOND MESSENGERS) 53**

Циклические нуклеотиды54

Вторичные мессенджеры (ВМ) производные липидов56

Кальций58

Удаление Ca^{2+} из цитоплазмы59

Каналы, высвобождающие кальций.....65

Рианодиновые кальциевые каналы68

Оксид азота.....70

ИНТЕГРАЦИЯ СИГНАЛОВ 75

Адаптация76

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ..... 78

Сигнальные каскады,
влияющие на экспрессию генов.....78

Митоген-активируемый киназный каскад78

Цитокиновый рецептор
и JAK/STAT каскады.....80

«Рецепторная серин/треониновая киназа – SMAD» сигнальный каскад..... 82

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 84

Учебное издание

ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СИГНАЛ. СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ

Учебное пособие

Составители: Константин Константинович Вдовиченко, Людмила Ильинична Гарбуз

Издается в авторской редакции
Компьютерная верстка *И. И. Головачук*

ИЛ № 06150. Сер. АЮ от 21.02.02.
Подписано в печать 28.02.22. Формат 60x84/16.
Уч.-изд. л. 5,5. Электронное издание. Заказ № 1180.

Опубликовано на Образовательном портале ПГУ им. Т. Г. Шевченко moodle.spsu.ru