

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

Учебное пособие

(неполная версия 2013 г.)

Содержание

Введение	2
Гормоны и эндокринная регуляция.....	2
Информация передается между клетками разными способами.....	4
Гормональные реакции носят пространственно-временной характер	5
Гормоны используют классические стратегии регуляции активности ферментов.....	6
Гормоны контролируют разнообразные клеточные реакции.....	8
Контроль метаболического баланса.....	8
Контроль роста и деления клеток.....	9
Гематопоз.....	10
Регуляция дифференцировки и клеточный иммунитет	10
Воспалительные реакции	11
Регенерация тканей.....	12
Мышечное сокращение	13
Рецепция внешних сигналов	14
Рецептор – ключевой элемент передачи сигнала внутрь клетки	14
Мембранные рецепторы наиболее многочисленны	16
Лиганд-управляемые ионные каналы наиболее быстрые.....	18
Внутриклеточные рецепторы наиболее медленные и регулируют транскрипцию генов	21
Принципы внутриклеточной передачи сигнала.....	28
Непосредственные мишени рецепторов принудительно локализуются на мембране.....	30
ГТФ-связывающие белки выполняют роль таймеров и распределителей сигнала.....	32
Сигнал поступает в клетку каскадным или эстафетным способами	38
Вторичные посредники усиливают сигнал	39
Адаптерные белки обеспечивают специфичность.....	41
Каркасные белки организуют сигнальные модули.....	44
Киназы служат основными исполнителями.....	49
Фосфатазы нейтрализуют действие киназ.....	56
Выключение рецепторов происходит в несколько этапов	60
Интеграция и регуляция	63
Разные рецепторы используют одинаковые сигнальные каскады.....	64
Обратные связи регулируют активность сигнальных каскадов.....	65
Субстратные циклы нужны для эффективной регуляции	67
Ионные сигнальные системы имеют осцилляторный характер.....	68
Частота и длительность – ключевые параметры осцилляторных систем	71
Гипертония и вазоспазм как результат инактивации фосфатазы субстратного цикла.....	73
Обратная связь контролирует метаболические эффекты инсулина	76
Направленная миграция клеток требует множественных обратных связей.....	79

Введение

Молекулярная эндокринология – это наука о действии гормонов на клеточном и молекулярном уровне. Этот курс направлен, в основном, на молекулярные механизмы действия гормонов в клетке; в меньшей степени он включает вопросы общей эндокринологии. В нем последовательно разбираются механизмы рецепции клеткой внешних сигналов, виды рецепторов, принципы и основные способы передачи сигнала в клетке, основные сигнальные молекулы клетки, разновидности и способы регуляции активности ферментов – конечных мишеней сигнальных каскадов. Особое внимание уделяется взаимодействию сигнальных систем и способам организации сигнальных сетей клетки как основному механизму, определяющему пространственно-временную динамику клеточных реакций. На отдельных примерах рассматриваются механизмы гормональной регуляции поведенческих реакций клеток и физиологических функций организма.

Гормоны и эндокринная регуляция

Эндокринная регуляция – это, по-существу, химическая координация функций организма, а эндокринология – наука о гормонах. Однако дать ответ на вопрос "что такое гормоны?", в наши дни значительно сложнее, чем всего лишь несколько десятков лет назад. Согласно классическому определению, гормоны – это химические вещества, образующиеся в определенных тканях организма и секретируемые в кровь, которая направляет их к органам-мишеням. Однако это определение было сформулировано тогда, когда подавляющее большинство доступных сведений в области эндокринологии было ограничено организмами позвоночных. По мере развития этой науки становились известными новые гормоны и регуляторные системы, которые выходили за рамки классического определения.

Во-первых, специализированные эндокринные железы существуют только у членистоногих, моллюсков и позвоночных, а химические вещества с гормональным действием обнаружены почти у всех животных, растений и грибов. Даже у позвоночных существуют *парагормоны*, которые призваны действовать локально. Парагормоны и многие ростовые факторы позвоночных синтезируются разными клетками в участках местного действия.

Во-вторых, перенос гормонов кровью является всего лишь частным случаем. Кровь уникальна для позвоночных, но даже и в этих организмах парагормоны достигают своих мишеней, диффундируя в интерстициальной жидкости. *Нейромедиаторы* секретируются и действуют весьма локально. Ряд животных использует *эктогормоны*, которые переносятся по воздуху или водой, воздействуя

индивидуально или на группу особей. Эти гормоны особенно разнообразны у насекомых и включают *феромоны* (межполовые аттрактанты), *гамоны* (индукторы полового развития), *алломоны* и *кайромоны* (межвидовые аттрактанты). Такие молекулы есть даже у простейших организмов. К примеру, цАМФ является служит вторичным посредником в клетках позвоночных, но является эктогормоном у свободноживущей амебы *Dictyostelium*, которая использует его для коллективных поведенческих реакций (см. ниже).

В-третьих, мишенью гормонов не всегда является отдельный орган. После секреции некоторые паргормоны не только диффундируют и воздействуют на соседние клетки, но и стимулируют клетки, их образующие. Эта положительная обратная связь обычно именуется *аутокринным* действием и возникает тогда, когда синтезирующая гормон клетка становится его собственной мишенью. Кроме того, бактерии производят ряд сигнальных молекул для внутреннего использования. Эти молекулы, называемые *алармонами*, обычно представляют собой нуклеотиды и образуются в ответ на возникновение определенного стресса, например при голодании или недостатке витаминов.

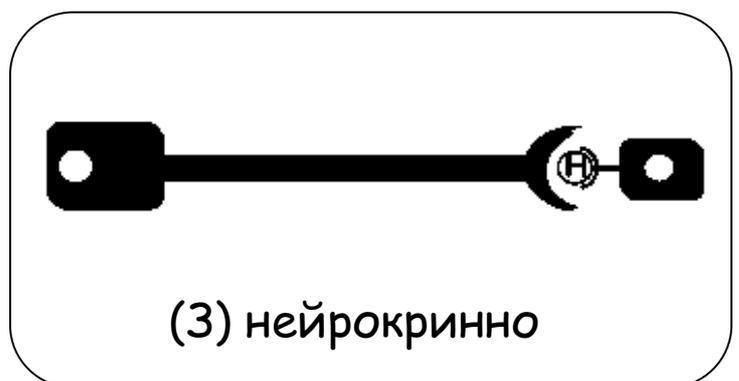
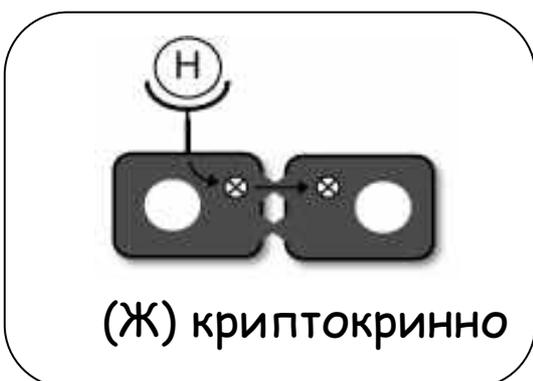
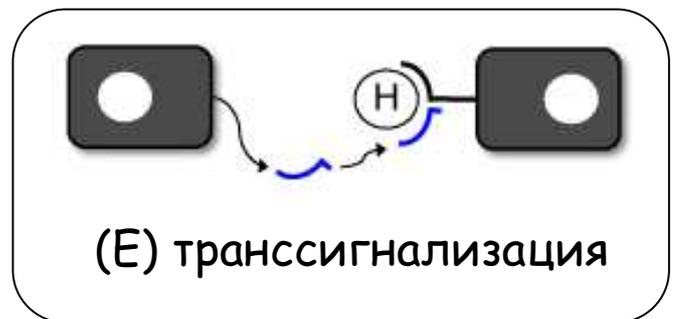
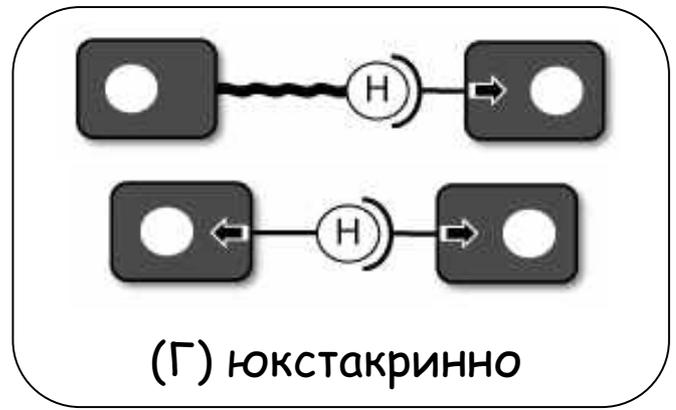
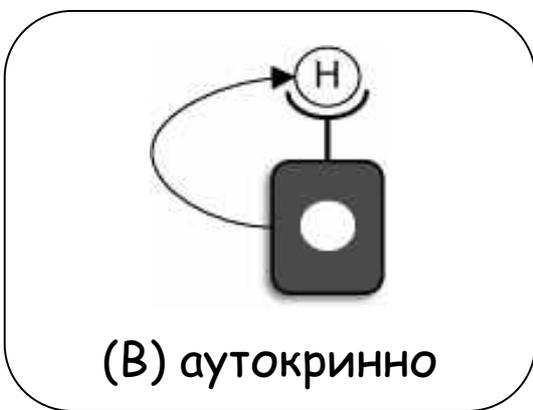
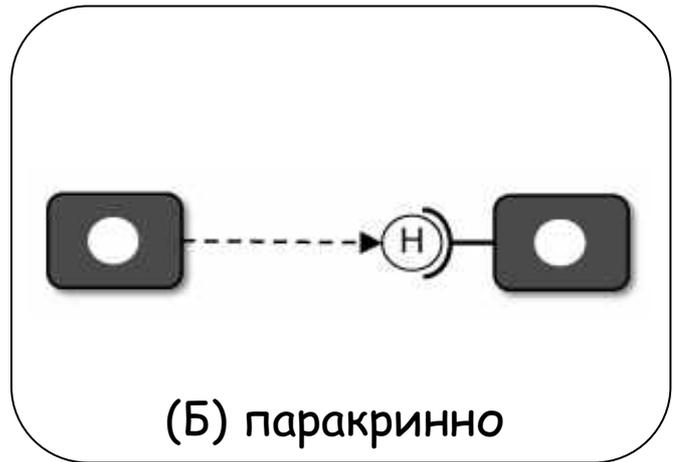
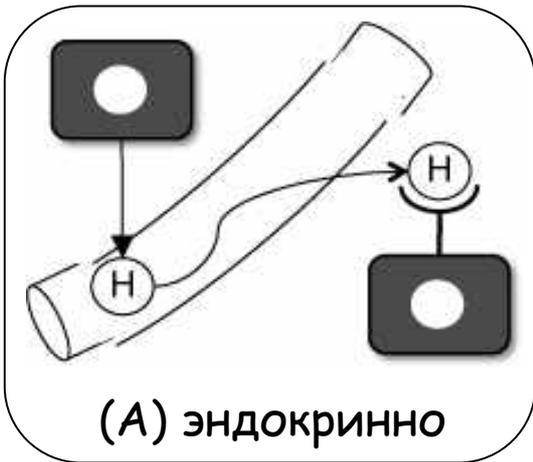
Таким образом, для гормонов необходимо использовать другое, более широкое определение. *Гормонами следует считать непищевые межклеточные передатчики информации химической природы, которые действуют в микромолярном (и менее) диапазоне концентраций.* Однако и такое определение не является всеобъемлющим. Оно не включает алармоны, которые действуют исключительно в одной клетке и, до некоторой степени, аутокринные регуляторы. Хотя логично ограничить гормоны химическими веществами, их природа может быть и иной. Так, родопсин-трансдуциновая система регистрирует кванты света в качестве внешних сигналов, а некоторые организмы используют свет для передачи сигналов к поведенческим реакциям. Пищевые молекулы исключаются из числа гормонов на том основании, что активность метаболических цепочек регулируется в клетке на субстратном уровне за счет концентраций метаболитов или их аллостерического действия. Однако такие аминокислоты как глутамат, аспарат и глицин, а также нуклеотид АТФ выступают рецепторными агонистами или их предшественниками. Некоторые жирорастворимые витамины являются лигандами внутриклеточных рецепторов, что позволяет считать их отчасти гормонами. Введение действующей концентрации в определение гормонов используется чтобы исключить случаи разнообразных низкоаффинных лигандов, но вместе с тем исключает гормоны растений, некоторые из которых действуют в высоких концентрациях, а также матриксные лиганды для рецепторов клеточной и межклеточной адгезии в клетках позвоночных.

Информация передается между клетками разными способами

В классической *эндокринной* системе гормон производится в одной части организма, но действует в другой его части, попадая в нее с кровотоком (рис. 1, А). В *паракринной* системе гормон остается в той же ткани, где образуется, и достигает клеток-мишеней путем диффузии (рис. 1, Б). В *аутокринном* варианте гормон действует на ту же клетку, в которой образовался (рис. 1, В); часто такая регуляция является частью положительной или отрицательной обратной связи.

Юкстакринная регуляция (рис. 1, Г) представляет собой другой вид ограниченной диффузии гормонов. Гормон синтезируется как мембран-связанный предшественник, который после отщепления сигнального пептида остается на мембране и может сохранять биологическую активность. Действие таких гормонов ограничено длиной их якоря. Они могут действовать однонаправленно (например, эпидермальный фактор роста EGF, трансформирующий фактор роста TGF α , фактор некроза опухолей TNF α , колониестимулирующий фактор CSF-1, и фактор стволовых клеток SCF, он же лиганд рецептора c-Kit). В некоторых случаях якорь мембран-связанного гормона может иметь внутриклеточный домен, сопряженный с сигнальными системами и вторичными посредниками. Активация такого гормона ведет к передаче сигнала в обоих направлениях и стимуляции двух клеток. Примером такой двунаправленной сигнализации являются эфринные лиганды, которые активируют как прямую сигнализацию в соседней клетке, несущей эфринные рецепторы, так и обратную сигнализацию в клетке, на мембране которой они расположены. Юкстакринная регуляция включает также гормоны, диффузия которых ограничена за счет связывания с белками внеклеточного матрикса. К ним относится большинство факторов роста.

При *интракринной* регуляции синтез гормона и связывание с рецептором происходят внутри клетки (рис. 1, Д). Примером могут служить ядерные рецепторы различных липидных молекул. Например, X-рецептор гепатоцитов связывает холестерин-подобные стеролы, синтез которых он же и регулирует. Есть три вариации, этого гормонального механизма, при котором эндогенный предшественник синтезируется где-либо, но конвертируется в активную форму на месте действия. Первым примером являются тиреоидные гормоны, которые синтезируются в щитовидной железе преимущественно как тироксин, но преобразуются в триодтиронин периферическими ферментами. Вторым примером являются половые стероидные гормоны: около 40% андрогенов у мужчин и 75% эстрогенов у женщин в постменструальном периоде образуются в тканях-мишенях из предшественников, синтезируемых в надпочечниках. Некоторые стероиды могут также локально реактивироваться в тканях-мишенях путем десульфатации. Наконец, такие пептидные



гормоны, как фактор роста гепатоцитов (HGF) и трансформирующий фактор роста (TGFβ), секретируются неактивными и активируются в зоне действия ограниченным протеолизом.

При *транссигнализации* одна клетка передает другой субъединицу рецептора (рис. 1, E), которая связывается с базовой субъединицей и придает высокую аффинность рецепторному комплексу клетки-хозяина. Многие цитокиновые рецепторы имеют несколько субъединиц; некоторые из них расщепляются с образованием растворимых полипептидов. Например, рецептор интерлейкина-6 (IL-6) состоит из двух частей – гликопротеина 130-кДа и собственно рецептора (IL-6R), которые имеют низкое сродство друг к другу и экспрессируются конститутивно в таких количествах, что активный комплекс практически не образуется. При воспалении активированные лейкоциты сдувают с поверхности IL-6R, который затем взаимодействует с gp130 и образует активный рецептор. В сущности, растворимая субъединица рецептора действует как парагормон.

Наконец, *крипторинная* система использует секрецию гормона в малое закрытое пространство (рис. 1, Ж) как, например, между эпителиальными клетками коры тимуса (вилочковой железы) и Т-лимфоцитами. В этом случае диффузионные барьеры отсутствуют, а избирательность достигается наличием рецепторов к этому гормону на клетках-мишенях. Другим примером может служить перенос вторичных посредников (циклические нуклеотиды, инозитолтрифосфат или Ca^{2+} через щелевые контакты между соседними клетками. Разновидностью крипторинной системы является *нейрокринная* регуляция (рис. 1, З), которая осуществляется с использованием химических сигнальных молекул и синаптической передачи.

Гормональные реакции носят пространственно-временной характер

Гормоны вызывают разнообразные реакции, которые можно условно классифицировать по масштабу (ареалу действия), времени действия и скорости развития.

Даже в таких минимальных живых системах как клетка, рецепторы и связанные с ними сигнальные системы распределяются и активируются не равномерно. Как правило, они имеют участки повышенной или пониженной плотности, т.е. *компартиментализованы* в определенных частях клетки. Компартиментализация действия гормонов вполне очевидна на уровне организма, поскольку связана с функционированием отдельных органов. Клетки, составляющие эти органы, имеют характерную комбинацию и количество рецепторов; в последнем случае говорят об уровне экспрессии отдельных рецепторов. Активация этих рецепторов в определенных частях клетки или организма приводит к локальным реакциям. В отличие от них, системные реакции являются совокупными ответами живых систем на комплексные внешние воздействия. Они происходят с участием разных гормонов, рецепторов и связанных с ними сигнальных систем. Это особенно

важно в случае многоклеточных организмов, где эндокринная регуляция имеет иерархичную структуру и происходит с участием многих гормонов одновременно. Их образование, время жизни и взаимосвязь контролирует центральная нервная система, также с помощью своих гормонов и нейромедиаторов.

Период действия гормонов может существенно различаться и быть коротким или длительным. Он зависит от многих факторов. На клеточном уровне это время жизни сигнальных молекул, таких как сами гормоны (снаружи) и передатчики сигнала (внутри клетки), а также формируемые ими обратные и латеральные связи в сигнальных цепочках. Подробнее эти вопросы рассмотрены позже в разделе, посвященном интеграции и регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов. Кроме того, активируемые гормонами клеточные ответы сами по себе имеют разную длительность, а системная регуляция изменяет период активного синтеза гормонов на физиологическом уровне.

Хотя *скорость развития реакции* формально является производным пространства и времени, она имеет особое значение и определяется временем ответа живой системы на данное воздействие. Как подробнее рассматривается ниже, быстрые реакции, как правило, опосредованы быстро образующимися и инактивирующимися сигналами, а также быстрыми системами распространения и передачи сигнала снаружи и внутри клеток. Так действует большинство гормонов, имеющих на клетках поверхностные рецепторы. Напротив, медленно развивающиеся ответы опосредованы медленно синтезирующимися и разрушающимися молекулами, длительными механизмами активации участков генома и экспрессии генов. Эти реакции часто носят системный характер. Они характерны для стероидных и тиреоидных гормонов, использующих внутриклеточные рецепторы.

Многообразие гормонов, рецепторов и передающих сигналы молекул определяет плейотропность их действия и условность классификации по масштабу, месту и времени действия. В данном курсе разбираются факторы и механизмы, позволяющие гормонам вызывать быстрые поведенческие, относительно быстрые метаболические и достаточно медленные синтетические реакции.

Гормоны используют классические стратегии регуляции активности ферментов

Действие гормонов направлено на изменение активности внутриклеточных ферментов. Гормоны активируют те внутриклеточные механизмы, которые используют в отношении ферментов большинство регуляторных стратегий, известных из классической энзимологии. Под контролем гормонов находятся шесть из восьми главных стратегий регуляции активности ферментов (рис. 2). Четыре из них (ковалентная модификация, белок-белковые взаимодействия, аллостерическая регуляция и ограниченный протеолиз) прямо направлены на быстрые изменения удельной активности ферментов, тогда как две остальных (изменение уровня экспрессии и изоформного

1. Изменение концентраций участников реакции
 2. Действие метаболитов
 3. Ковалентная модификация
 4. Белок-белковые взаимодействия
 5. Аллостерическая регуляция
 6. Ограниченный протеолиз
 7. Изменение уровня экспрессии
 8. Изменение изоформного состава
- } действие гормонов

состава) связаны с изменением количества ферментов и косвенно изменяют их общую активность в клетке.

Именно первичные изменения на молекулярном уровне приводят к видимым изменениям на уровне целой клетки и организма. Последние проявляются как немедленные поведенческие реакции, быстрые метаболические или медленные морфогенетические изменения. Примерами поведенческих реакций могут быть изменение формы клеточек и их движение. Поведенческие гормоны и химические молекулы различной природы действуют через разные рецепторы, но в основном относящиеся к ионотропным и метаболотропным поверхностным рецепторам. В подавляющем большинстве случаев, соответствующими мишенями таких рецепторов являются цитоплазматические белки и цитоскелет.

Метаболические гормоны действуют преимущественно через метаболотропные поверхностные рецепторы. В многоклеточном организме они регулируют энергетический баланс в шкале времени, сопоставимой с приемами пищи. Как правило, эти гормоны действуют в функциональном антагонизме, стимулируя анаболизм (инсулин) или катаболизм (адреналин и глюкагон). Их главные мишени также имеют цитоплазматическую локализацию.

Гормоны, регулирующие синтетические процессы, контролируют длительные и глобальные клеточные ответы за счет изменения доступности генома, экспрессии генов и скорости клеточного цикла. На уровне организма эти реакции проявляются как рост, развитие и старение. Мишени этих гормонов располагаются внутри клетки и действуют в ядре.

По мере развития эндокринологии стало очевидно, что такая классификация довольно условна из-за плейотропности действия гормонов. Хорошо известно, что цитокины стимулируют как быстрые реакции, связанные с движением клетки, так и транскрипцию генов. Аналогично, факторы роста вызывают и быстрые реакции по изменению формы клетки, и регулируют клеточный цикл. Такой "чисто метаболический" гормон как инсулин, регулирует также адипоцитарную дифференцировку клеток-предшественников и старение клеток. Стероидные гормоны также действуют не только на внутриклеточные рецепторы, вызывая медленные синтетические ответы, но и активируют другие типы рецепторов, вызывая быстрые метаболические реакции.

Гормоны контролируют разнообразные клеточные реакции

Контроль метаболического баланса

У позвоночных печень является главным метаболическим органом; в ней активно протекают практически все процессы катаболизма и анаболизма. Гепатоцит дает возможность проанализировать суммарное действие главных метаболических гормонов (рис. 3 и 4).

Инсулин – анаболический гормон; он контролирует запасание энергии (рис. 3). Повышенный уровень глюкозы, жирных кислот и аминокислот в крови вызывает секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы. Инсулин увеличивает транспорт этих питательных веществ в клетку, и их преобразование в гликоген, белки и триглицериды (ТАГ). Уровень инсулина в крови находится под контролем нескольких механизмов, обеспечивающих его плавные изменения. Например, парасимпатическая нервная система стимулирует перистальтику и секрецию гормонов в ЖКТ. Ее активность способствует активному перевариванию и всасыванию пищи в ЖКТ. Поэтому логично, что парасимпатический нейромедиатор ацетилхолин стимулирует секрецию инсулина. Помимо этого, присутствие углеводов в кишечнике стимулирует выброс желудочного ингибиторного пептида, который также усиливает секрецию инсулина.

Действие инсулина разнообразно. Некоторые его эффекты основаны на блокировании или обращении действия других гормонов. Например, некоторые гормоны, действующие через цАМФ, стимулируют распад гликогена и липолиз за счет фосфорилирования ключевых метаболических ферментов. Однако инсулин активирует соответствующие фосфатазы и дефосфорилирование этих ферментов; таким образом он ингибирует катаболизм гликогена и ТАГ, способствуя накоплению гликогена и жиров (рис. 3).

Инсулин влияет на метаболизм, изменяя приток субстратов. Он усиливает вход глюкозы в клетки и накопление в них глюкозо-6-фосфата, который аллостерически активирует гликогенсинтазу. В другом случае инсулин стимулирует переход пирувата в ацетил-КоА, который поступает в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК, цикл Кребса). В результате чего клетка насыщается АТФ, который тормозит цикл Кребса путем аллостерического ингибирования изоцитратдегидрогеназы и других его ключевых ферментов. В результате накапливается цитрат, аллостерически ускоряющий синтез жирных кислот. Прямые эффекты инсулина, опосредуемые инсулиновым рецептором и рецептор-зависимыми сигнальными каскадами, включают быстрые изменения активности цитоплазматических ферментов и более длительные изменения транскрипционной активности генов. Подробнее они рассматриваются в последующих разделах. Таким образом, инсулин прямо

СУММАРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА

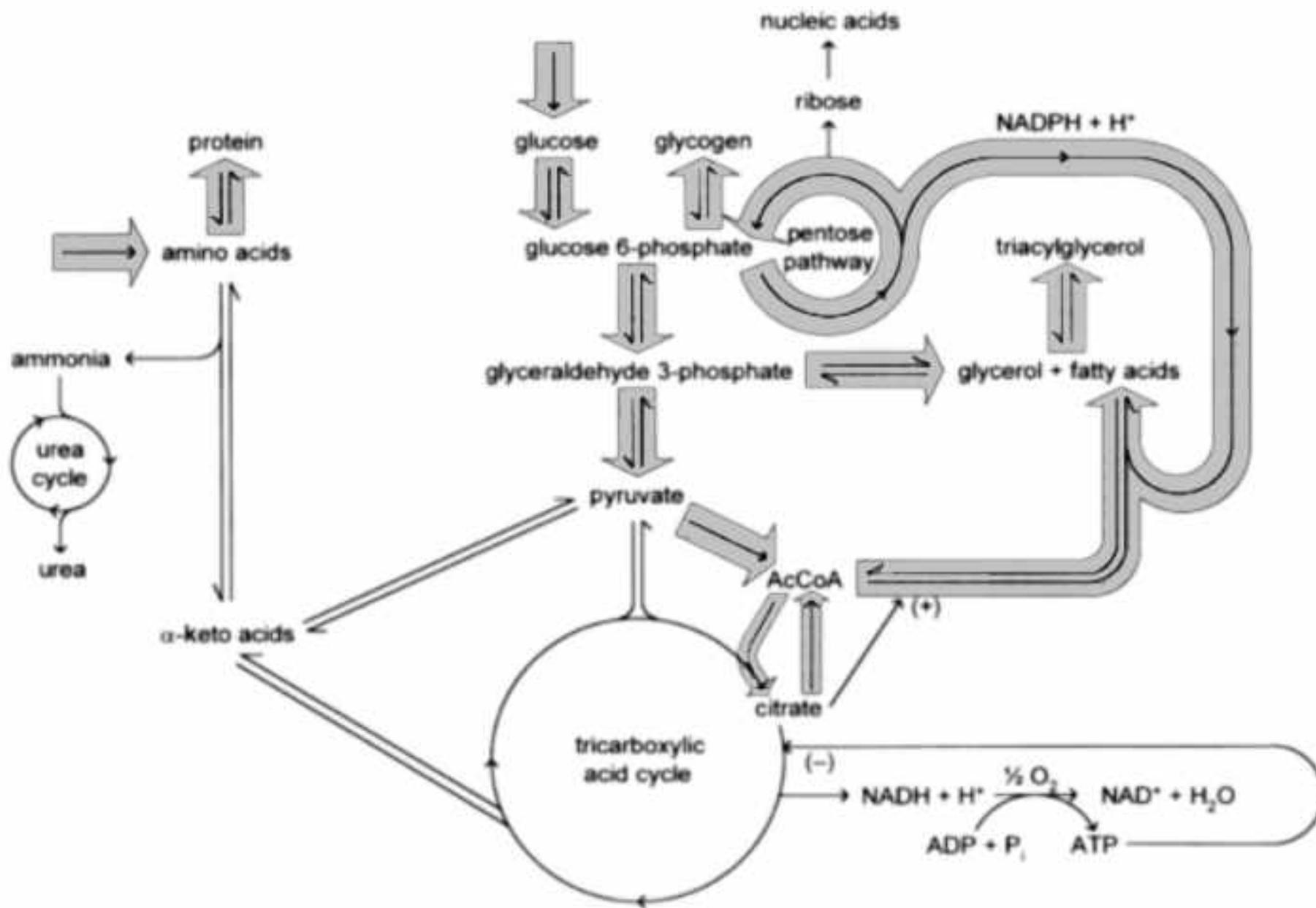


Рисунок 3

СУММАРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКАГОНА, АДРЕНАЛИНА, КОРТИЗОЛА И ГОРМОН РОСТА

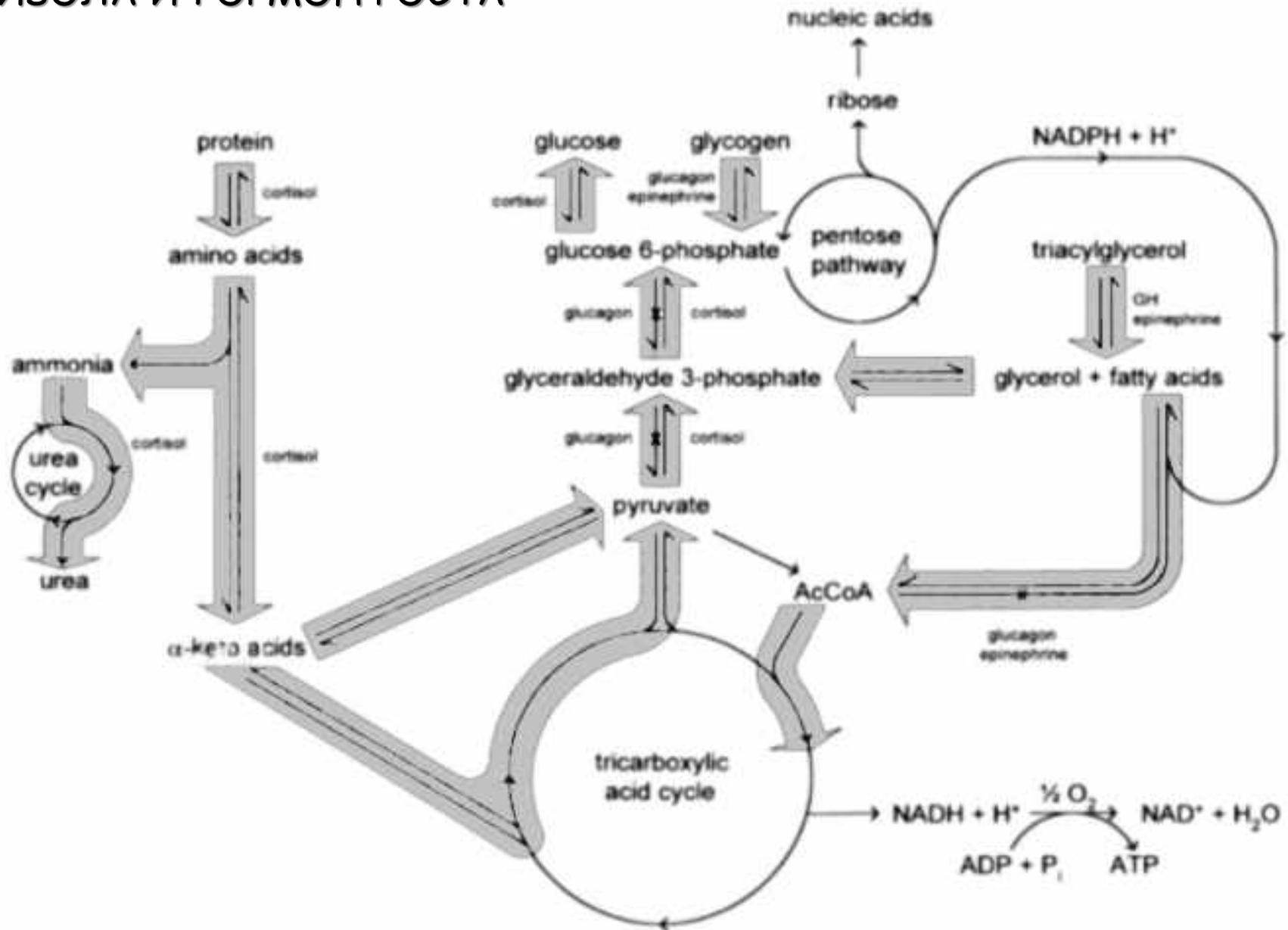


Рисунок 4

влияет на активность метаболических ферментов и оказывает косвенное воздействие на их количество в клетке.

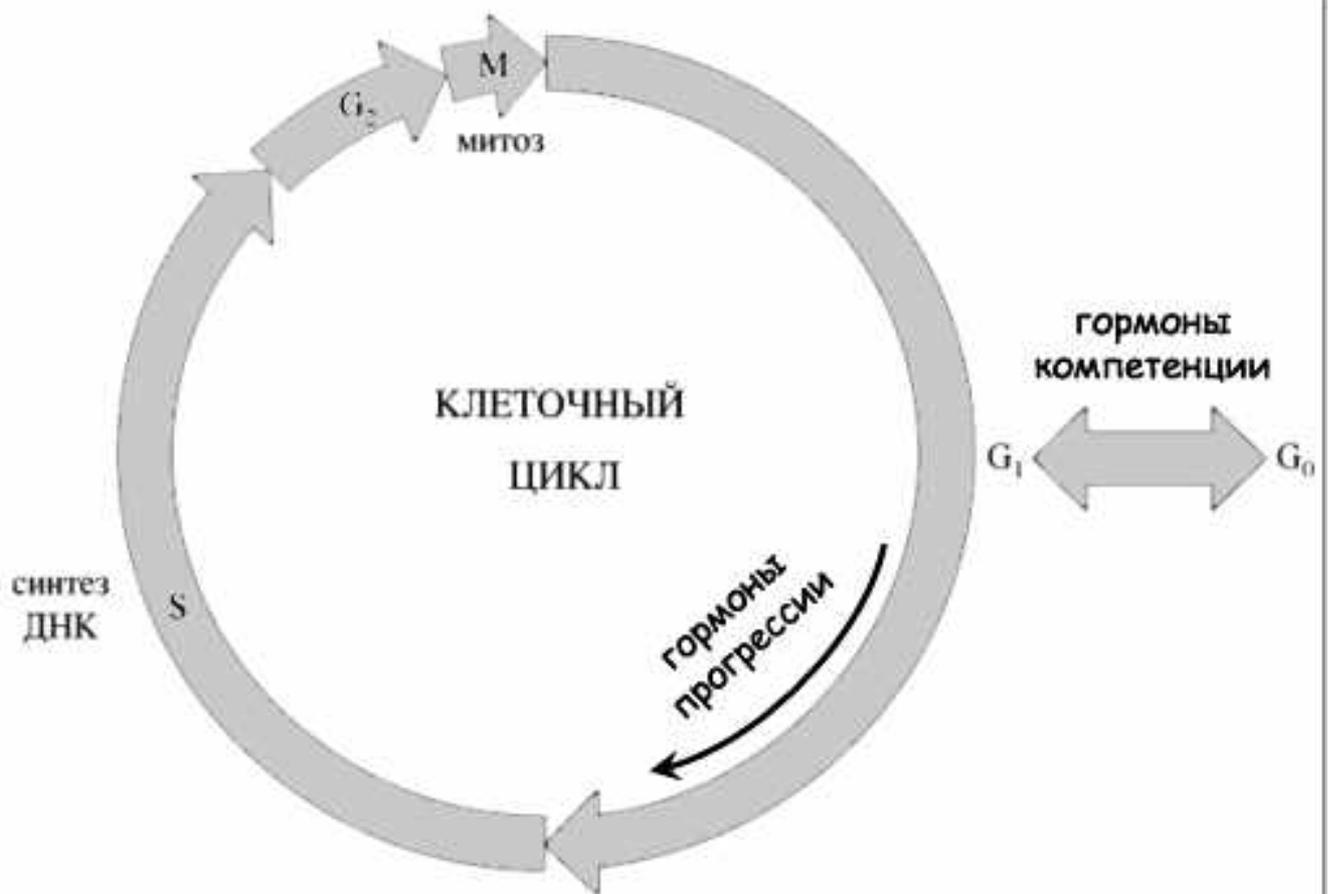
Глюкагон является катаболическим гормоном и функциональным антагонистом инсулина (рис. 4). Его действие направлено главным образом на повышение уровня глюкозы в крови. Глюкагон стимулирует распад гликогена и ингибирует гликолиз. Этому также способствует адреналин (эпинефрин), который запускает распад гликогена в мышцах и липолиз в жировой ткани. Оба гормона действуют через цАМФ-зависимую киназу, которая фосфорилирует ключевые ферменты этих метаболических путей. *Кортизол* оказывает дополнительное действие, стимулируя глюконеогенез в печени. При низких концентрациях кортизол ингибирует синтез белка, а при высоких вызывает распад белков в тканях, что обеспечивает печень глутаматом и глутамином. Последние служат донорами α -кетокислот для синтеза пирувата и глюконеогенеза в печени. Действие кортизола (кроме эффектов на синтез белка) опосредовано активацией внутриклеточных стероидных рецепторов.

Контроль роста и деления клеток

Клеточный цикл представляет собой повторяющуюся последовательность событий в активно делящихся клетках. Он включает 4 основных стадии: M, G1, S, и G2. Стадия M – это митоз, в котором клетка делится с образованием двух дочерних. Подолжительность митоза невелика по сравнению с остальными стадиями клеточного цикла. Стадия S связана с синтезом ДНК и внешне никак не проявляется. G1 и G2 предворяют стадии S и M, соответственно. Они до сих пор остаются "темными пятнами". Хотя действие факторов роста связано именно с ними, остается до сих пор не совсем ясно, на какие процессы конкретно они воздействуют.

Большинство факторов роста действуют в фазе G1, ускоряя ее прохождение активно делящейся клеткой. Они часто не влияют на клетки, находящиеся в покое. Такие факторы получили название "гормонов прогрессии" (рис. 5). Другие ростовые факторы могут сенситизировать неделящуюся клетку, то есть заставить ее стать чувствительной к действию гормонов прогрессии, хотя сами по себе не способны инициировать деление клеток. В связи с этим такие факторы получили название "гормонов компетенции" (рис. 5), а результат их действия позволяет думать, что неделящиеся клетки не просто останавливаются на стадии G1, а на самом деле выходят из цикла в так называемую фазу покоя G0. Для того, чтобы снова вступить в цикл и стать мишенью гормонов прогрессии, они должны быть возвращены в него гормонами компетенции.

ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ РОСТА



Гематопоз

Созревание клеток крови (гематопоз) происходит в костном мозге и является классическим примером регулируемой дифференцировки. Все клетки крови образуются из одной стволовой клетки – гематоцитобласта, находящегося в костном мозге (рис. 6). Он дает начало пяти бластным (мультипотентным) клеткам. *Проэритробласт* развивается в эритроциты (красные клетки крови, RBC) (рис. 6, А). Они осуществляют газообмен в легких и тканях. *Миелобласт* дает начало клеткам с секреторными гранулами – гранулоцитам (рис. 6, Б); они включают полиморфно-ядерные нейтрофилы (PMN), эозинофилы и базофилы, также известные как тучные клетки в других тканях. Нейтрофилы фагоцитируют бактерии, эозинофилы участвуют в аллергических и противомикробных реакциях, базофилы содержат гистамин и гепарин, и участвуют в аллергических реакциях и свертывании крови. *Монобласты* дифференцируются в моноциты, обеспечивающие защиту от вирусной и туберкулезной инфекций, и макрофаги, фагоцитирующие дебрис и патогены (рис. 6, В). *Лимфобласты* развиваются в В-лимфоциты, продуцирующие антитела, и Т-лимфоциты, которые обеспечивают клеточный иммунитет (рис. 6, Г). *Мегакариобласт* дает начало фрагментирующимся клеткам – тромбоцитам, играющим ключевую роль в свертывании крови.

Гематопэтические факторы роста (цитокины) имеют несколько особенностей. Во-первых, они не сохраняются и не накапливаются, а быстро синтезируются по мере необходимости. Во-вторых, они образуются многими разными типами клеток. В-третьих, многие из них дублируют друг друга и плеiotропны по действию. Специфичность их действия достигается ограничением секреции в пространстве и времени, а также уровнем экспрессии соответствующих рецепторов на клетках-мишенях. В-четвертых, активность цитокинов зависит от других факторов, например, от стадии клеточного цикла клеток-мишеней, окружающих их клеток и других цитокинов, относительными концентрациями и локальными градиентами последних. Эти особенности вносят большие сложности в анализ механизмов действия цитокинов.

Регуляция дифференцировки и клеточный иммунитет

В эмбриогенезе В-лимфоциты (В-клетки) дифференцируются. В каждой клетке происходит так называемая соматическая рекомбинация генов тяжелых и легких цепей, приводящая к образованию специфических иммуноглобулинов, которые относятся к классу IgM. Их антигенная специфичность определяется произвольным набором множественных экзонов. Каждая В-клетка образует уникальный IgM и выставляет его на своей поверхности.

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕМАТОПОЭЗА

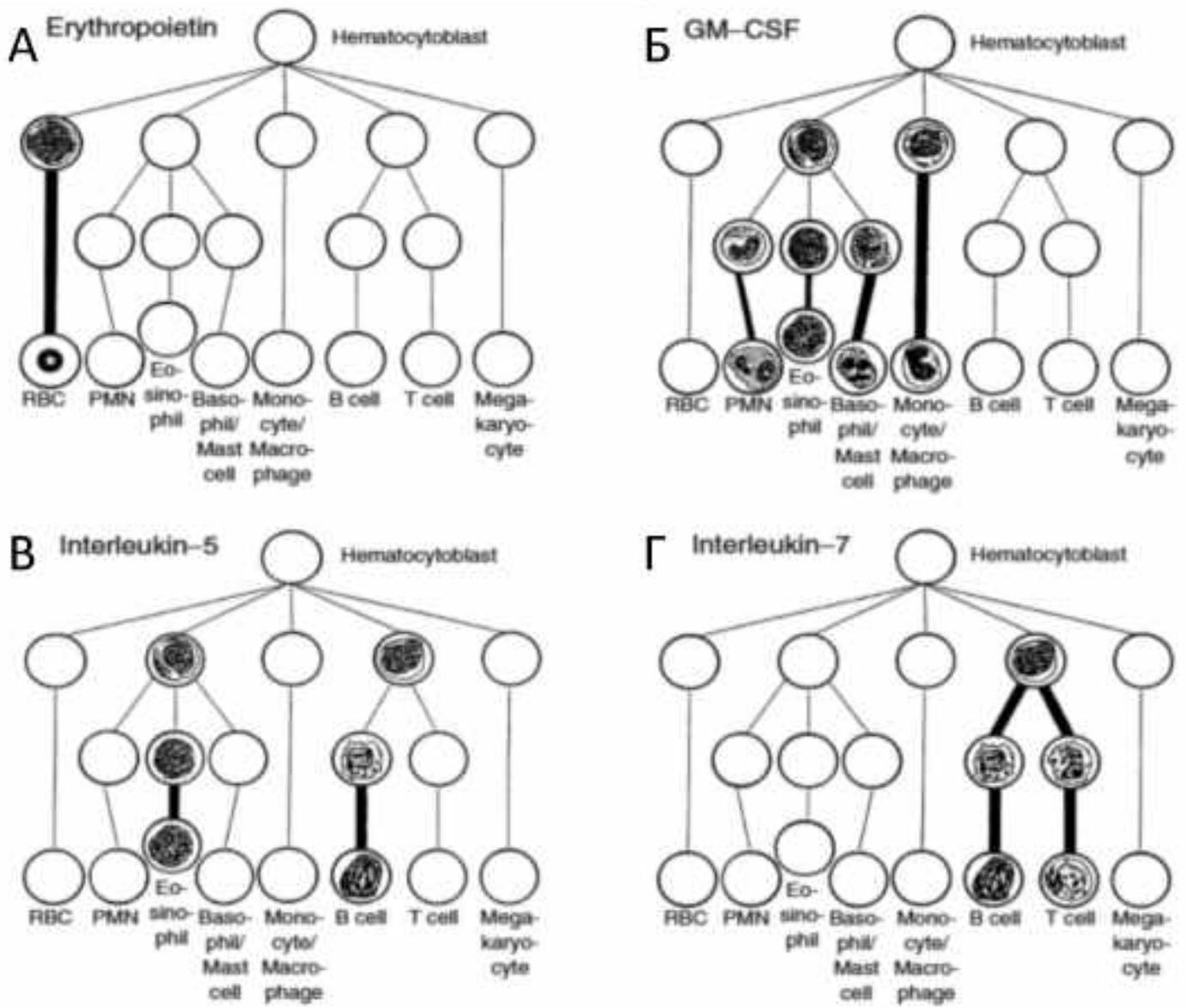


Рисунок 6

Когда В-лимфоцит встречает антиген, соответствующий специфичности его IgM-антитела, он связывает (рис. 7, 1), интернализует и частично деградирует (рис. 7, 2) этот антиген, после чего выставляет на поверхность его продукты, связанные с главным комплексом гистосовместимости II класса (МНС-II) (рис. 7, 3). МНС-II представляет собой только две легких цепи, заякоренные на плазматической мембране с помощью гидрофобных С-концов.

Одновременно, весь этот процесс копируется антиген-презентирующими клетками, к которым относятся макрофаги, дендритные клетки лимфатических тканей и клетки Лангерганса кожи (рис. 7, 4). Такой процессинг антигена необходим потому, что рецептор на Т-лимфоцитах узнает только частично развернутые пептиды.

Другие лимфоциты (Т-хелперы) несут Т-клеточные рецепторы (TCR), которые напоминают МНС-II. Т-клетки, у которых TCR имеет нужную специфичность, связывают частично деградированный антиген на поверхности макрофагов (рис. 7, 5). Эффективность этого взаимодействия достигается с участием специальных белков межклеточной адгезии, таких как CD4. CD4 особенно примечателен, поскольку именно он используется вирусом иммунодефицита человека (HIV) для того, чтобы попасть в Т-клетку, которую он потом уничтожает.

В результате взаимодействия с Т-клеткой макрофаг секретирует интерлейкин-1 (рис. 7, 6), который вызывает ряд воспалительных реакций, в том числе лихорадку, а также стимулирует образование интерлейкина-2 в хелперных Т-клетках (рис. 7, 7). IL-2 действует аутокринно, запуская пролиферацию Т-хелперов. Это явление носит название клональной селекции, поскольку происходит амплификация только тех клеток, которые несут TCR, специфичный для данного антигена.

Теперь хелперные Т-клетки могут связывать такой же антиген на В-клетках (рис. 7, 8). Это взаимодействие вызывает секрецию интерлейкинов 4, 5 и 6 хелперными Т-клетками (рис. 7, 9). IL-4 запускает второй раунд соматической рекомбинации, с помощью которого антигенная специфичность первичного IgM-антитела передается на IgG или любой другой класс антител. Этот феномен называется переключением тяжелых цепей. IL-5 стимулирует пролиферацию В-клеток, что приводит к клональной селекции только тех В-клеток, которые образуют антитела к данному антигену. Наконец, IL-6 вызывает созревание В-клеток в плазматические клетки, производящие антитела (рис. 7, 10).

Воспалительные реакции

Направленное движение лейкоцитов в очаг воспаления происходит по градиенту молекул, выбрасываемых патогенными микроорганизмами и разрушающимися клетками. Этот процесс

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

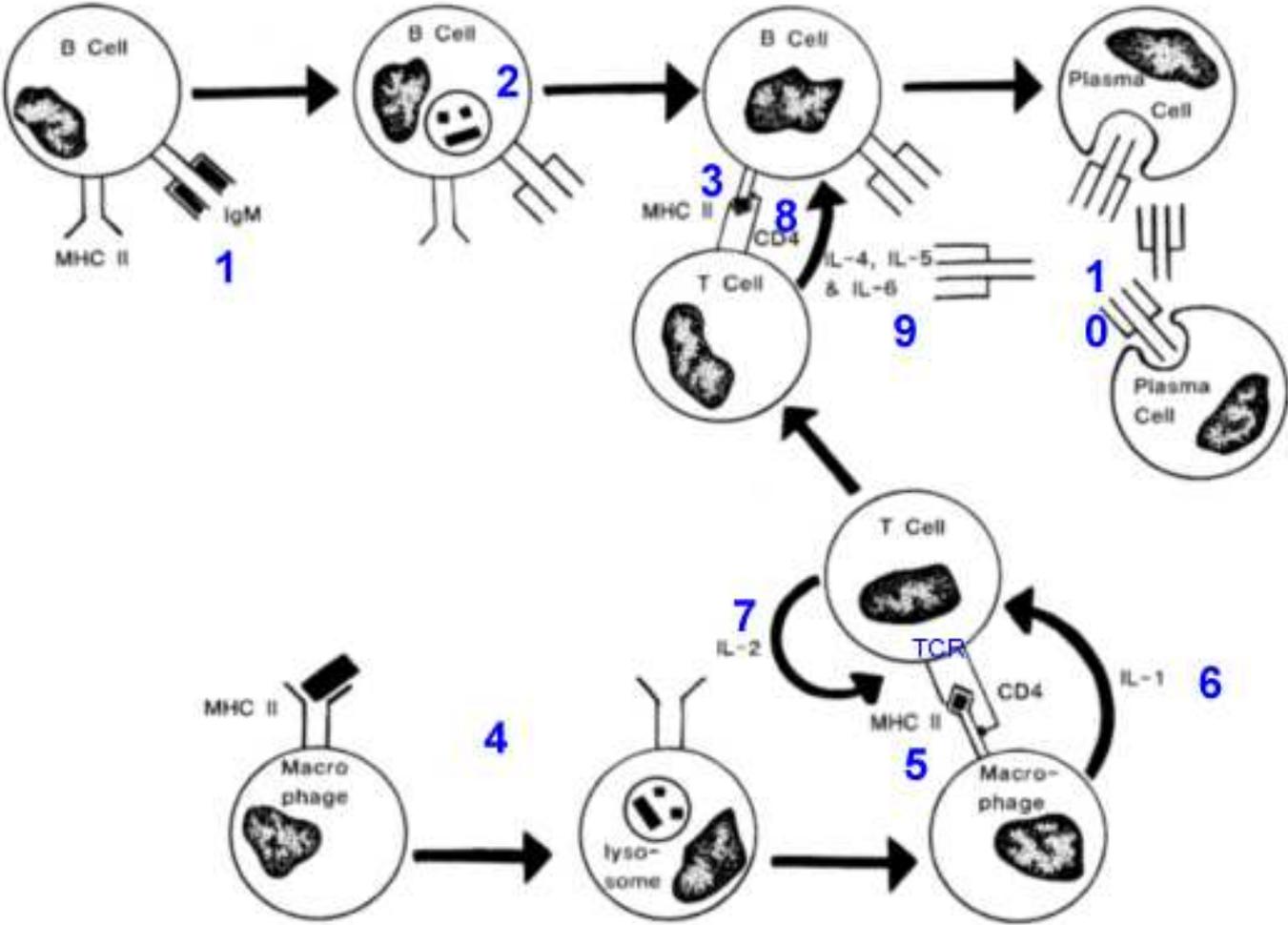


Рисунок 7

известен как хемотаксис. Он основан на внутренней способности клеток к движению, но контролируется поверхностными рецепторами и активируемыми ими сигнальными механизмами, которые передают информацию о наличии хемоаттрактанта внутрь клетки. Повышенное число активированных рецепторов на том участке мембраны, который обращен в сторону градиента хемоаттрактанта, задает направление движения клетки. Лейкоциты используют для хемотаксиса рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками плазматической мембраны. Их лигандами выступают классические цитокины CXCL-ряда. Эти небольшие по размеру клетки слабо адгезируют и движутся с большими скоростями, до 10 микрон в минуту. Они легко меняют форму и проникают в узкие промежутки между окружающими клетками или компонентами внеклеточного матрикса за счет амёбоидного движения. Их отличает высокая чувствительность к хемотактическим лигандам, за счет которой они эффективно определяют их низкие концентрации и направление пологих градиентов.

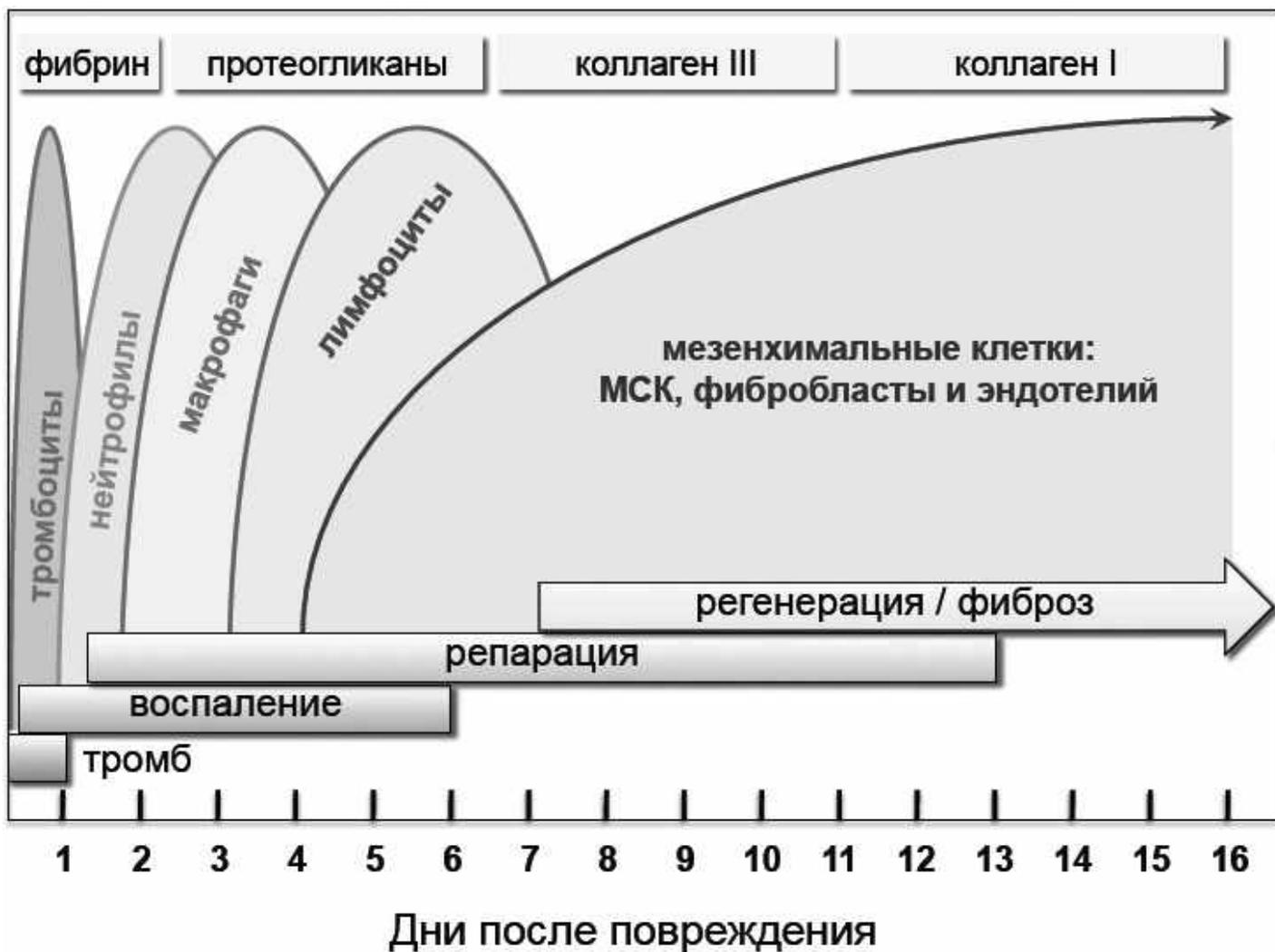
Нейтрофилы издали чувствуют пологие градиенты молекул, выбрасываемых патогенными организмами, гибнущими или поврежденными клетками. Первые нейтрофилы движутся в рану по градиенту пероксида водорода, который образуется там в результате окислительного стресса как стабильный метаболит активных форм кислорода. За нейтрофилами следуют моноциты и лимфоциты, которые направленно мигрируют из отдаленных участков и, в наибольшем количестве, из окружающих рану сосудов.

Нейтрофилы и, видимо, большинство лейкоцитов, обладают уникальной способностью к детекции сразу нескольких хемотактических градиентов и к так называемой «эстафетной навигации» в таких градиентах на дальние расстояния. Ее смысл состоит в том, что с помощью поверхностных рецепторов клетки реагируют преимущественно на градиент «целевого» фактора, даже если он менее выражен, чем градиент «промежуточного фактора». Таким образом миграция этих клеток может переключаться с одного фактора на другой и поддерживаться на больших расстояниях.

Регенерация тканей

Классическая схема процесса регенерации ткани и его примерная временная развертка для случая заживления кожных ран показаны на [рис. 8](#). Весь процесс включает три последовательных фазы: воспаления, тканеобразования и восстановления функции, традиционно именуемых как воспалительная, пролиферативная и фаза ремоделирования. Они соответствуют анти-инфекционной реакции воспаления на повреждения различной этиологии, репарации путем быстрого закрытия поврежденного участка и восстановления его исходной формы, и собственно регенерации – замещения временного каркаса постоянной тканью, в идеале соответствующей исходной, с такой же физиологической активностью. Во всех случаях ключевым действующим

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ



элементом регенеративного процесса являются живые клетки. Их направленная миграция в очаг повреждения из прилежащей ткани или из других источников является ключевым событием на разных этапах регенерации, правильность и своевременность которого определяет конечный успех регенерации ткани.

Воспалительная фаза начинается с приходом в зону воспаления нейтрофилов и гематопозитические клетки играют в ней ключевую роль. Нейтрофилы движутся с помощью хемотаксиса и очищают рану от обломков внеклеточного матрикса и патогенов. Они секретируют цитокины и образуют пероксид водорода, которые привлекают в рану и активируют там моноциты, вызывая их дифференцировку в макрофаги. Макрофаги фагоцитируют отработавшие нейтрофилы и берут на себя их функцию. Они синтезируют новые цитокины, которые служат хемоаттрактантами и привлекают в очаг лимфоциты и фибробласты. Задачей лимфоцитов является иммунный ответ, тогда как фибробласты и макрофаги создают грануляционную ткань – временный матрикс.

Репаративная фаза связана с приходом в зону повреждения мезенхимальных фибробластов и стромальных клеток (МСК), которые являются предшественниками фибробластов. Как и гематопозитические, эти клетки также используют хемотаксис для попадания внутрь раны. Там они принимают эстафету от гематопозитических клеток и ремоделируют грануляционную ткань, постепенно замещая ее коллагеновым матриксом. Восстановление защитного барьера происходит за счет эпителиальных клеток, которые закрывают рану, пролиферируя и направленно двигаясь внутрь раны по ее поверхности из окружающей живой ткани. Эндотелиальные клетки и перicytes направленно мигрируют внутри грануляционной ткани от ближайших сосудов, формируют новую капиллярную сеть для снабжения репарирующих клеток и восстанавливающегося участка кислородом и питательными веществами.

Последующая фаза *регенерации* включает дальнейшее ремоделирование внеклеточного матрикса (изменение коллагенового состава) и восстановление структуры и функции ткани – двух связанных, но функционально различных этапов единого процесса. Как и на предыдущем этапе, на этой стадии важную роль играют мезенхимальные клетки-предшественники и фибробласты, которые рекрутируются из окружающих тканей или отдаленных источников (например, стромы костного мозга).

Мышечное сокращение

Поперечнополосатая мускулатура формирует скелетные мышцы и миокард; гладкомышечные ткани входят в состав сосудов и полых органов. Во всех типах этих тканей сокращение запускается ионами Ca^{2+} , которые поступают в цитоплазму преимущественно через ионные

каналы. Эти каналы бывают двух типов и открываются либо за счет изменения потенциала при деполяризации мембраны (потенциал-зависимые кальциевые каналы), либо при связывании лиганда – гормона или вторичного посредника (рецептор-зависимые кальциевые каналы). В кардиомиоцитах (сократительных клетках сердца) и миотубах (клетках скелетных мышц) кальций связывается с тропонином, расположенным на актиновых филаментах. В результате тропонин изменяет конформацию и позволяет тропомиозину совершить латеральное перемещение, открывая на актине участки связывания моторных доменом миозина. Актин служит кофактором миозина, ускоряя скорость гидролиза АТФ в активном центре этого фермента примерно в 1000 раз. Освобождаемая энергия переводится в изменения конформации миозина, связанного с актином, и обеспечивает продвижение актина вдоль миозина. Сокращение мышцы является результатом суммации элементарных усилий, развиваемых несколькими тысячами таких актомиозиновых моторов.

Рецепция внешних сигналов

Узнавание внешних сигналов представляет собой первый этап получения клеткой информации об окружающей среде. Внешние носители информации могут иметь различную природу и быть химическими (низкомолекулярные гормоны), физическими (кванты света), или биологическими (пептидно-белковые гормоны, компоненты межклеточного матрикса). Однако независимо от своей природы, все они материальны и регистрируются клеткой путем физического захвата. Этот процесс известен как *рецепция* внешнего сигнала. Он осуществляется специализированными клеточными молекулами, называемыми *рецепторами*. Взаимодействуя с рецептором, физический носитель внешнего сигнала выступает *лигандом*. Связывание лиганда вызывает *активацию* рецептора и *передачу сигнала* от него к конечным мишеням. Эта передача всегда происходит внутри клетки и сигнализирует ей об изменении внешних условий и необходимости дать соответствующую ответную реакцию. Именно поэтому этот процесс получил название *внутриклеточной сигнализации*. Она обеспечивает соответствие клеточных реакций внешним сигналам и согласование этих реакций по скорости развития, продолжительности и месту действия в клетке.

Рецептор – ключевой элемент передачи сигнала внутрь клетки

По биохимическому определению, рецептором является молекула белка, либо погруженная в плазматическую мембрану, либо находящаяся в цитозоле, и связывающая одну или несколько сигнальных молекул специфической структуры. Такие сигнальные молекулы выступают по отношению к рецептору лигандами, или *первичными посредниками*, что отражает первичную роль этих молекул в передаче сигнала между клетками. Лигандами могут служить низкомолекулярные

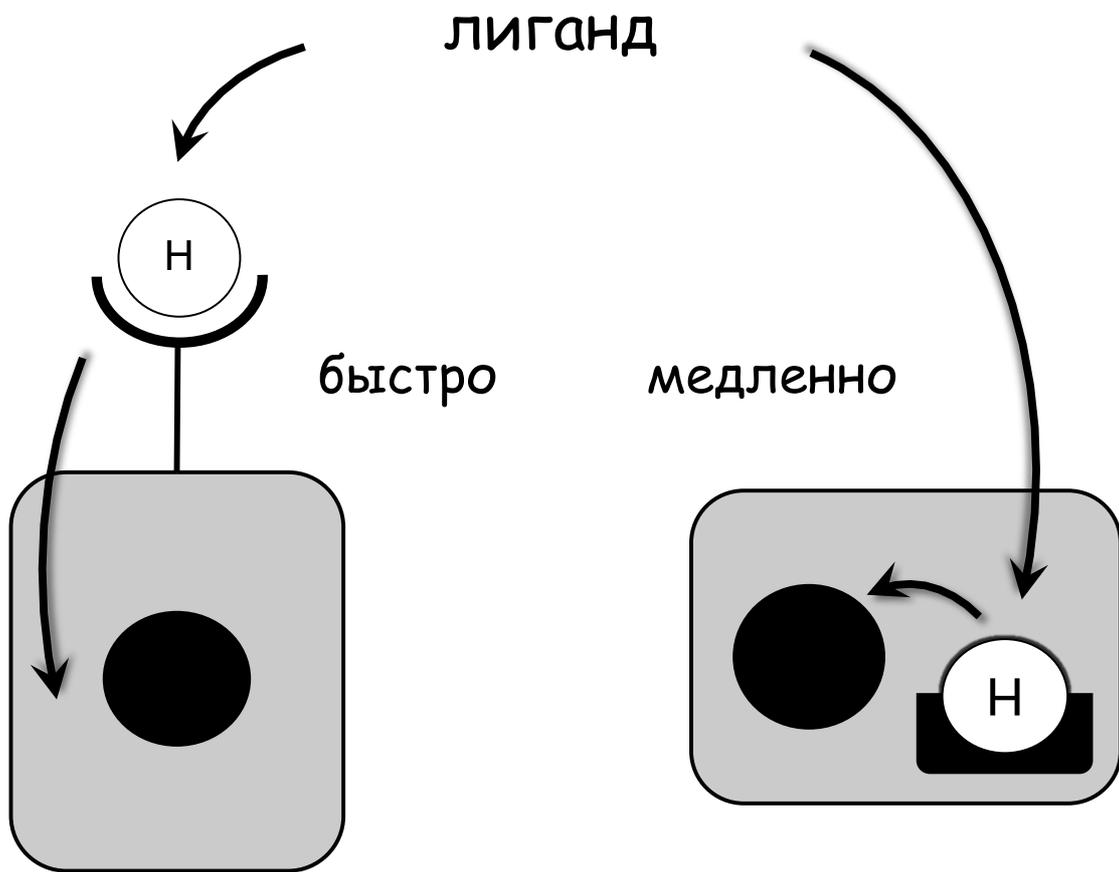
химические вещества, к которым относятся нейротрансмиттеры, гормоны, фармакологические соединения или токсины, а также короткие пептиды, полипептиды и даже многокомпонентные крупные комплексы, например липопротеидные частицы, адипонектины, липополисахариды и др. Каждый вид рецептора может связывать лиганды определенного размера и формы.

При связывании лиганда рецептор обязательно *изменяет конформацию*, что является сигналом для последующей передачи внутрь клетки информации о наличии внешнего сигнала. Некоторые соединения выступают *антагонистами* рецепторов. Они связываются с рецептором, не вызывают активирующих его конформационных изменений, но блокируют посадку лиганда, тем самым препятствуя передаче сигнала внутрь клетки. В противоположность антагонистам, активирующие рецептор лиганды часто называют *агонистами*, независимо от того, имеют ли они биологическое или искусственное происхождение. За редким исключением, антагонисты и соответствующие им рецепторы не встречаются в пределах одного организма, но могут существовать у разных биологических видов. Так, большинство природных антагонистов рецепторов высших животных имеют растительное происхождение.

Каждая клетка несет множество рецепторов различных видов, составляющих две большие группы (рис. 9). Обычно рецепторы располагаются на поверхности клетки, являясь *мембранными*. Это связано с тем, что большинство лигандов имеют гидрофильную природу и не могут проходить сквозь биологические мембраны. Однако некоторые лиганды, например, стероидные гормоны, гидрофобны и достаточно легко проникают через плазматическую мембрану. Такие лиганды имеют *внутриклеточные* рецепторы, которые располагаются в цитоплазме или в ядре клетки.

Мембранные рецепторы составляют большинство рецепторов. Молекула лиганда не проникает сквозь мембрану, она связывается с внеклеточной частью таких рецепторов, вызывая изменения их конформации и, особенно, его внутренней части. Если рецептор является ферментом, такое событие ведет к изменению его ферментативной активности. В ином случае оно ведет к открытию участков связывания внутриклеточных молекул на внутренней части рецептора, что запускает передачу сигнала (сигнализацию) внутрь клетки. Такая организация обеспечивает относительно быструю рецепцию внешних сигналов и передачу информации о них внутрь клетки.

Внутриклеточные рецепторы часто называют ядерными по месту выполнения их главной функции. Тем не менее, помимо ядра они могут быть локализованы и связывать свои лиганды в цитоплазме. Однако цитоплазматические рецепторы тоже перемещаются в ядро после связывания лиганда. Их лигандами выступают жирорастворимые молекулы, такие как стероидные гормоны тестостерон и прогестерон, а также производные витаминов А и D. Они легко проникают через клеточные мембраны и попадают внутрь клетки путем простой диффузии. Активированные

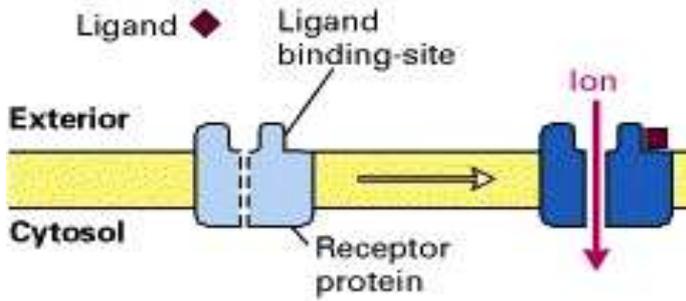


внутриклеточные рецепторы контролируют экспрессию генов; они связываются со специальными последовательностями на ДНК, известными как гормон-чувствительные элементы (HRE, hormone response elements) и запускают или подавляют экспрессию соседних генов путем соответствующих изменений активности транскрипционных комплексов. В дополнение, лиганд-связывающие домены этих рецепторов (LBD, ligand binding domain) контролируют ремоделирование хроматина за счет модификаций составляющих его белков, в основном регулируя ацетилирование гистонов. Активация экспрессии генов является более медленной реакцией, чем воздействие на уже существующие сигнальные белки, поэтому большинство реакций, вызываемых внутриклеточными рецепторами, имеют долгосрочный характер.

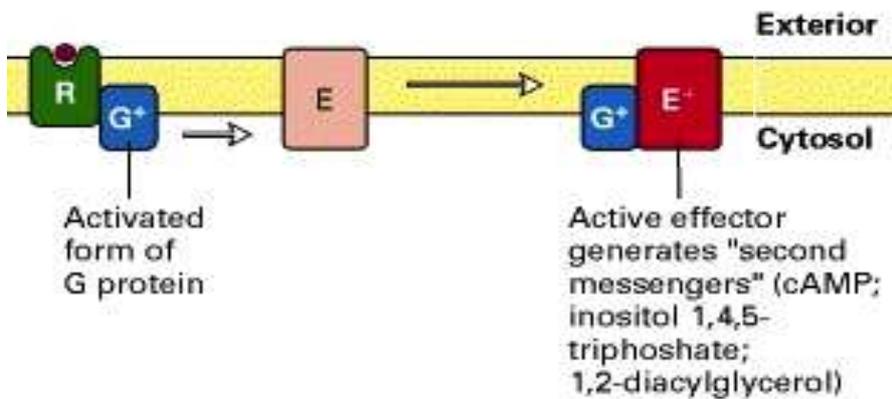
Согласно общей классификации по структуре и механизму действия, выделяют пять основных групп клеточных рецепторов. *Внутриклеточные* рецепторы наиболее просты и составляют отдельную группу. В сущности, к ним относятся лиганд-регулируемые транскрипционные факторы. Остальные четыре группы рецепторов являются интегральными мембранными белками (рис. 10). *Лиганд-управляемые ионные каналы* (ligand-gated ion channels, LGIC) и *рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками* (G-protein coupled receptors, GPCR) составляют две наиболее известные и характеризованные группы. В группе *рецепторов-ферментов* выделяют несколько подгрупп. Среди них рецепторные тирозиновые киназы (receptor protein tyrosine kinases, RPTK) и небольшая группа рецепторных серин/треониновых киназ, а также рецепторы-ферменты с некиназной активностью, такие как гуанилатциклазные (guanylyl cyclase, GCase). Четвертую группу составляют *цитокиновые рецепторы* (cytokine receptors, CR). По способу действия они очень похожи на RPTK, но не имеют своей ферментативной активности и привлекают в качестве партнеров ферменты из цитозоля. Последними, в основном, являются протеинкиназы, которые связывают активированные цитокиновые рецепторы и только после этого фосфорилируют специфические субстраты, таким способом передавая сигнал в цитоплазму. Следует отметить, что мембранная локализация всех этих рецепторов не означает их расположения исключительно на поверхности клетки. Они могут находиться также и на внутренних мембранах органелл, например, на эндосомах, митохондриях или эндоплазматическом ретикулуме. Часто они попадают в эти участки как интернализированные внешние рецепторы, где продолжают активно сигнализировать в цитоплазму.

Мембранные рецепторы наиболее многочисленны

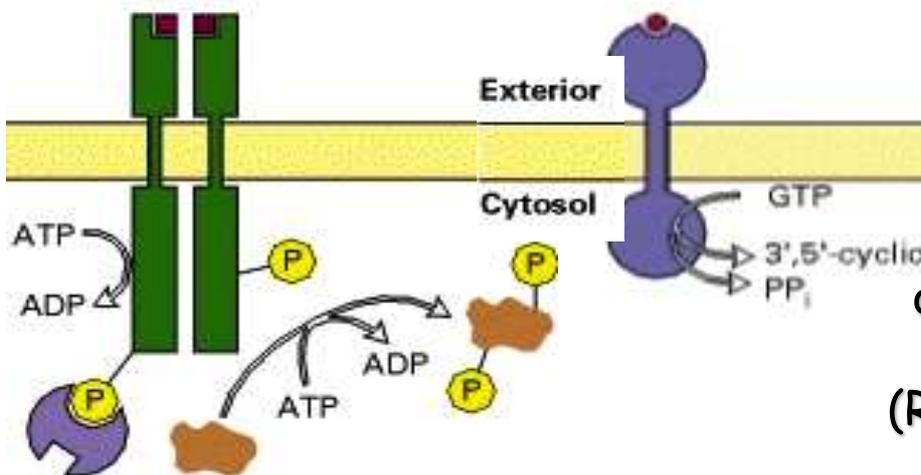
Мембранные рецепторы являются специализированными интегральными белками, которые осуществляют трансмембранную передачу информации от внешних сигналов (гормонов) внутрь клетки. Внеклеточные сигнальные молекулы (обычно гормоны, нейротрансмиттеры, цитокины,



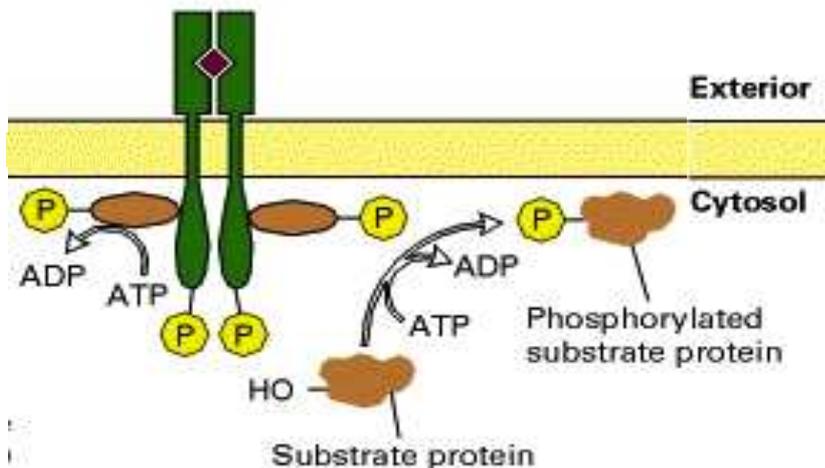
Лиганд-зависимые
ионные каналы
(LGIC)



Рецепторы,
сопряженные
с тримерными
G-белками
(GPCR)



Рецепторы с
собственной
ферментативной
активностью
(RPTK, GCase и др.)



Цитокиновые
рецепторы
(CR)

факторы роста, молекулы матрикса и межклеточного узнавания) выступают лигандами, которые связываются с рецепторами и изменяют поведение клетки. Связывание лигандов вызывает набор взаимосвязанных химических реакций или структурных изменений специальных молекул с цитоплазматической стороны клеточной мембраны. Этот процесс представляет собой механизм переноса информации к конечным мишеням внутри клетки и называется внутриклеточной передачей сигнала или сигнализацией (англ. signal transduction).

Рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками (GPCR), называют также серпентиновыми или семидоменными, поскольку они содержат 7 характерных альфа-спиралей, погруженных в мембрану (рис. 11). В первичной последовательности эти спирали разделены гидрофильными последовательностями, которые в третичной структуре находятся вне мембраны. Образованная пространственная структура напоминает мехи, или гармошку, содержащую 7 трансмембранных звеньев. G-белковые комплексы, состоящие из 3-х субъединиц (α , β и γ) связываются с активированными рецепторами на внутренней стороне мембраны.

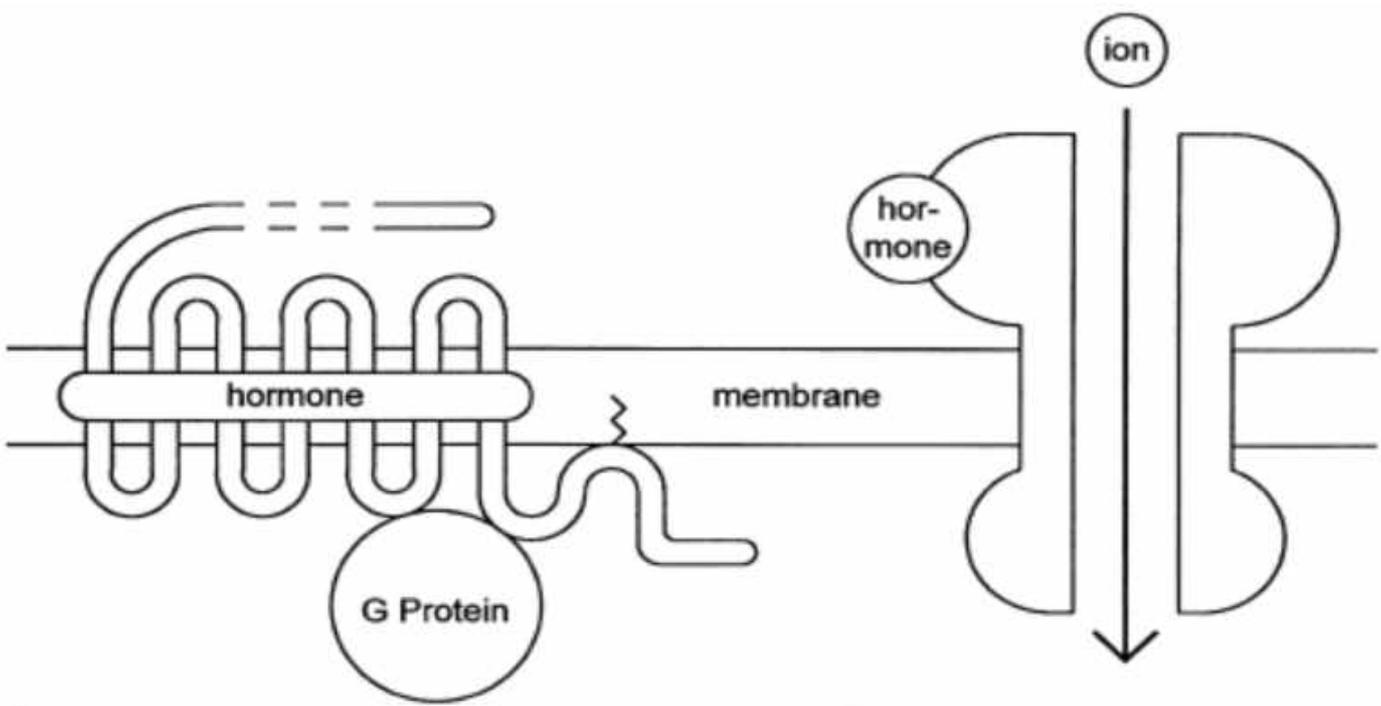
Лиганд-управляемые ионные каналы (LGICs) обычно построены из нескольких субъединиц, каждая из которых содержит трансмембранный домен. Ассоциируя, они образуют бубликоподобную структуру (тор), внутри которой расположен канал (рис. 11). В несвязанном с лигандом состоянии субъединицы взаимодействуют так плотно, что внутренний канал практически отсутствует, т.е. закрыт. Связывание гормона вызывает изменение конформации и взаимодействия субъединиц, которое приводит к появлению просвета, т.е. открытию канала.

По функциональной нагрузке поверхностные рецепторы принято разделять на *ионотропные* и *метаботропные*. По сути, это разделение отражает тип клеточного ответа при активации этих рецепторов. Согласно названию, ионотропные рецепторы регулируют ионные токи, т.е. управляют лиганд-зависимыми ионными каналами. Они быстро меняют мембранный потенциал и, таким образом, опосредуют наиболее быстрые реакции клеток на воздействия внешней среды. Так реагируют зрительные, вкусовые и обонятельные клетки. Напротив, метаботропные рецепторы регулируют внутри клетки метаболические превращения (потоки энергии). Они используют адаптерные белки и ферменты для эстафетной передачи сигнала и изменения активности ферментов-мишеней.

Как правило, метаболические эффекты метаботропных рецепторов наступают достаточно быстро, без изменения уровня экспрессии белков. Тем не менее, они требуют определенного времени для развития, поскольку проявляются как изменения концентрации метаболитов химических реакций, катализируемых ферментами-мишенями. Таким образом, ответ на активацию метаботропных рецепторов развивается медленнее, чем при активации ионотропных рецепторов, но значительно

GPCR

LGIC



быстрее, чем клеточные ответы, связанные с транскрипцией ДНК и экспрессией генов (рис. 12). Ионные каналы обеспечивают быстрые реакции в секундном и субсекундном диапазоне; их лигандами выступают в основном нейромедиаторы центральной и периферической нервной системы. Поведенческие гормоны также могут регулировать активность ионных каналов, вызывая быстрые изменения морфологии и двигательной активности клеток в минутной шкале. Временной диапазон действия метаботропных гормонов и рецепторов более длительный и составляет минуты и десятки минут. Стероидные, тиреоидные и глюкокортикоидные гормоны, действующие через внутриклеточные рецепторы, вызывают длительные синтетические ответы в часовом диапазоне, опосредованные транскрипцией ДНК.

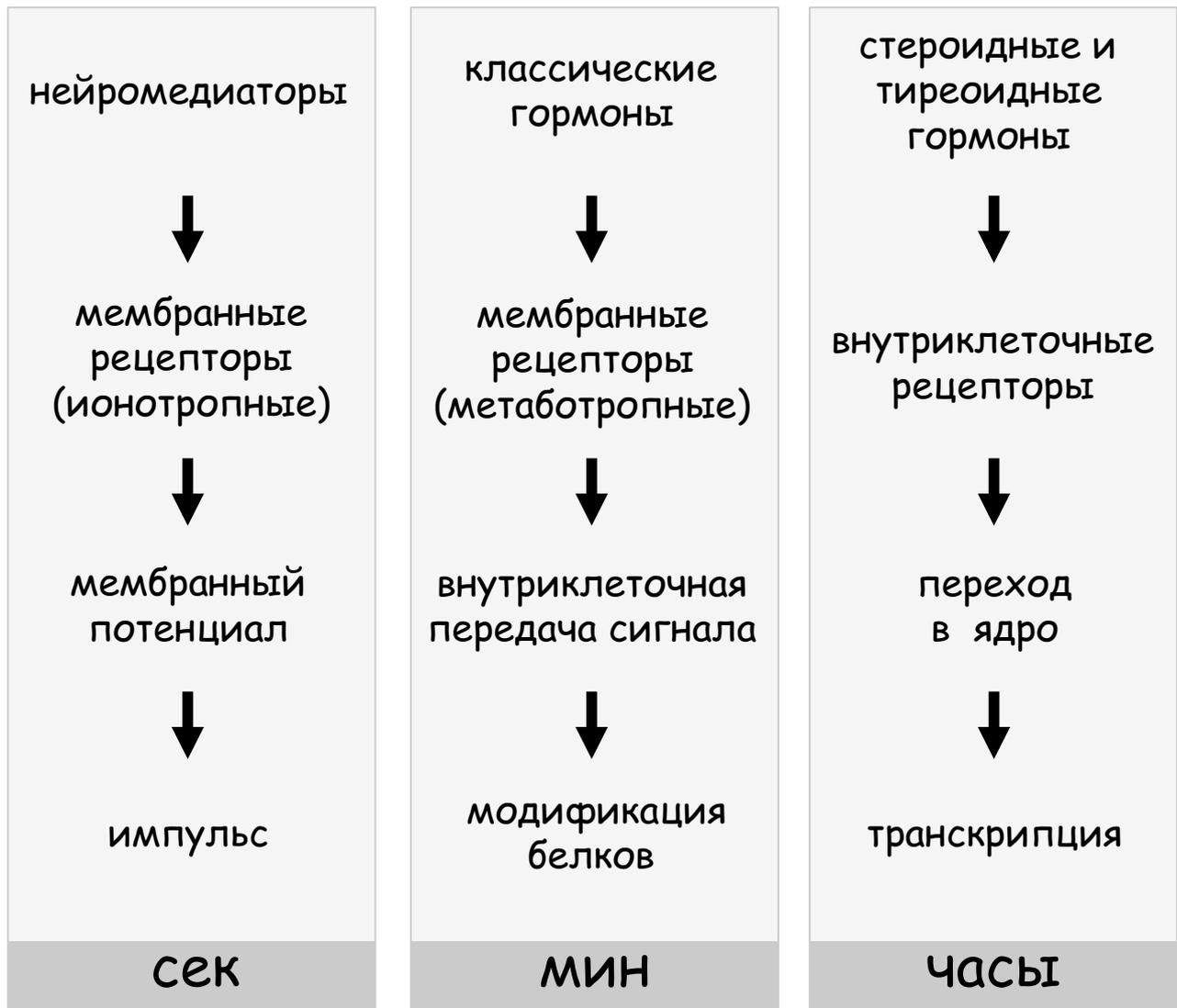
Одни и те же гормоны могут действовать как на ионотропные, так и метаботропные рецепторы, вызывая тем самым клеточные ответы разных типов и разной временной шкалы. Это свойство наиболее характерно для низкомолекулярных соединений, многие из которых являются нейротрансмиттерами (ацетилхолин, глутамат, серотонин, гистамин и др.). Например, ацетилхолин связывается с ионотропными никотиновыми канальными рецепторами (nAChR) и с метаботропными мускариновыми GPCR (mAChR) (рис. 13). Эти традиционные названия возникли благодаря растительному алкалоиду табака никотину и ядовитому алкалоиду некоторых грибов мускарину, которые способны селективно связываться и активировать, соответственно, nAChR и mAChR. GABA рецепторы для ГАМК, пуриnergические рецепторы для АТФ/АДФ и серотониновые рецепторы также имеют ионотропные (LGIC) и метаботропные (GPCR) варианты (рис. 13). Гормоны белковой природы действуют, как правило, через один тип рецепторов. Но и в этом случае один гормон может оказывать в клетке эффекты разной временной шкалы в результате пострецепторного расхождения сигнала. Например, рецепторы факторов роста и цитокинов, которые очень сходны по типу передачи сигнала, вызывают как быстрые метаболические, так и затянутые синтетические реакции. Первые являются результатом активации цитоплазматических мишеней киназных каскадов, вторые – транскрипционных факторов, действующих в ядре. Таким образом, разделение гормонов и рецепторов по времени клеточного ответа, показанное на рис. 12, является условным и отражает тенденцию, но не общее правило.

Лиганд-управляемые ионные каналы наиболее быстрые

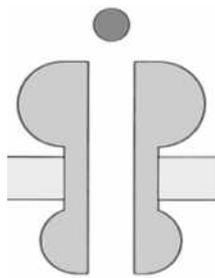
Лиганд-управляемые ионные каналы (LGICs) открываются или закрываются в ответ на непосредственное связывание лигандов, таких как нейротрансмиттеров. Это отличает LGICs от каналов, опосредовано регулируемых метаботропными рецепторами через вторичные посредники. Обычно LGICs располагаются в синапсах и принимают химический сигнал, идущий от пресинаптической мембраны, быстро переводя его в постсинаптический электрический сигнал.

Нервная система

Эндокринная система



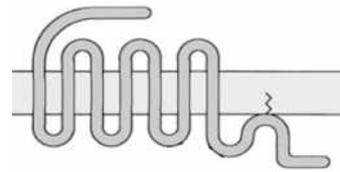
ацетилхолин
глутамат
серотонин
АТФ



Ионотропные
рецепторы

LGIC:

nAChR
GABA_A
5-HT₃
P2X, P2Z



Метаботропные
рецепторы

GPCR:

mAChR
GABA_B
5-HT₁₋₂, 5-HT₄₋₇
P1, P2Y, P2U,
P2T

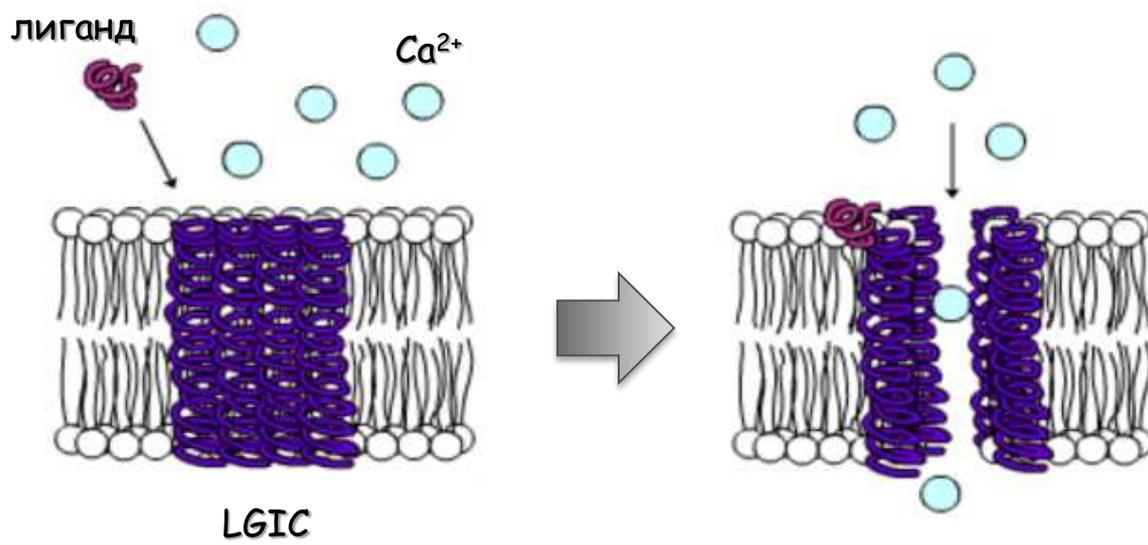
Как правило, участок связывания лиганда расположен на другой стороне белкового комплекса LGIC, чем канал, где проходят ионы, и таким образом является аллостерическим (рис. 14). Сходным образом устроены потенциал-управляемые и стретч-активируемые ионные каналы. Они не активируются прямым связыванием лиганда и реагируют, соответственно, на изменение трансмембранного потенциала и механическую деформацию мембраны.

Канальные рецепторы, содержащие Cys-петлю (рис. 15), названы так из-за характерной полипептидной петли, образуемой дисульфидной связью на внешней части рецептора. Классифицируются эти рецепторы по типу проводимого иона (анионные или катионные) и далее по группам, в соответствии с лигандом. Все они являются пентамерами.

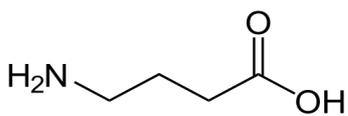
Лигандом *GABA рецепторов* служит γ -аминомасляная кислота (GABA). GABA_A рецепторы являются основными ингибиторными (тормозящими) в ЦНС. В активированном состоянии они селективно проводят ионы Cl⁻, приводя к гиперполяризации нейрона. Это снижает вероятность возникновения последовательных потенциалов действия и тормозит проведение нервного сигнала. Напротив, рецепторы GABA_B являются метаботропными и регулируют калиевые каналы через тримерные G-белки.

Глициновые рецепторы (GlyR) – одни из наиболее распространенных ингибиторных рецепторов в ЦНС, находящийся на постсинаптической мембране многих нейронов. Эти рецепторы выполняют множество физиологических функций, преимущественно ингибируя передачу нервного импульса. Также, как и GABA_A, активный GlyR проводит ионы Cl⁻, гиперполяризуя мембрану нейрона. Связыванию глицина с GlyR препятствует вызывающий судороги алкалоид стрихнин.

Серотониновые (5-гидрокситриптаминовые, 5-НТ) рецепторы находятся в центральной и периферической нервной системе. Только 5-НТ₃ серотониновый рецептор является возбуждающим ионотропным, а все другие – метаботропные, связанные с Gi/G₀, Gs, Gq/11 тримерными G-белками. Рецепторы 5-НТ₃ могут быть и возбуждающими, и тормозящими. Они вызывают секрецию таких нейротрансмиттеров, как GABA, дофамин, адреналин/норадреналин, ацетилхолин, а также многих гормонов, включая окситоцин, пролактин, вазопрессин, кортизол, кортикостерон, кортикотропин, и вещество P. Таким способом они контролируют множество реакций организма, в том числе агрессивность, беспокойство, аппетит, обучаемость, память, сон и температуру. Серотониновые рецепторы являются мишенями многих фармакологических соединений, к которым относятся антидепрессанты, антипсихотики, галлюциногены и препараты против мигрени.

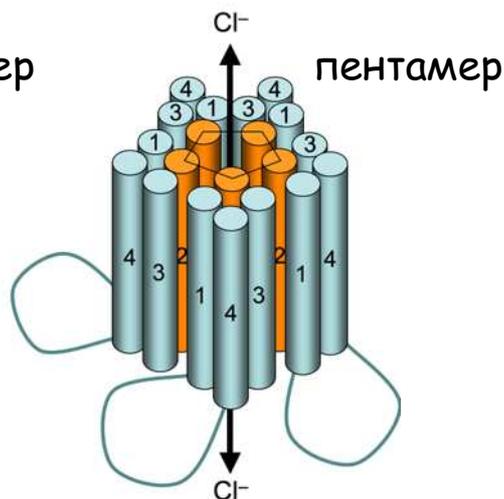
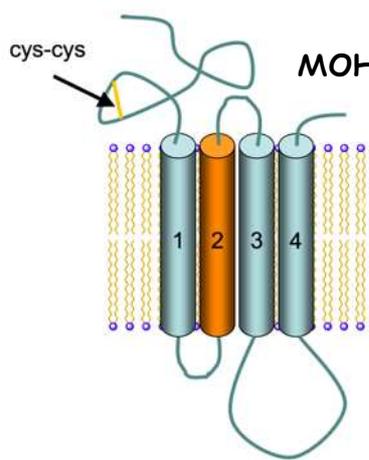
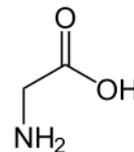


анионные каналы



GABA_AR
(ГАМК)

Gly-R
(глициновый)



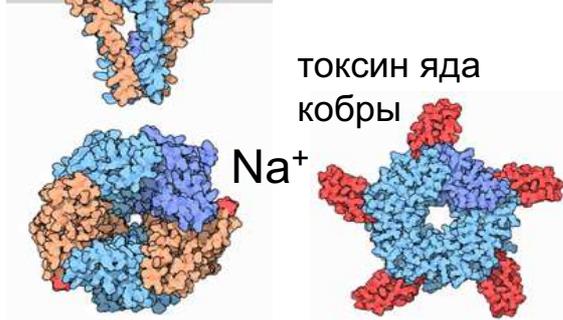
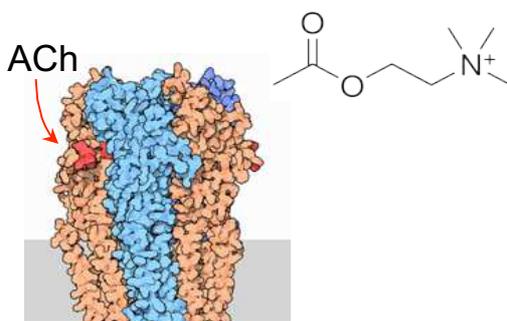
катионные

5-HT₃-R

nAChR

Zn-CR

(серотониновый) (ацетилхолиновый) (Zn-зависимый)



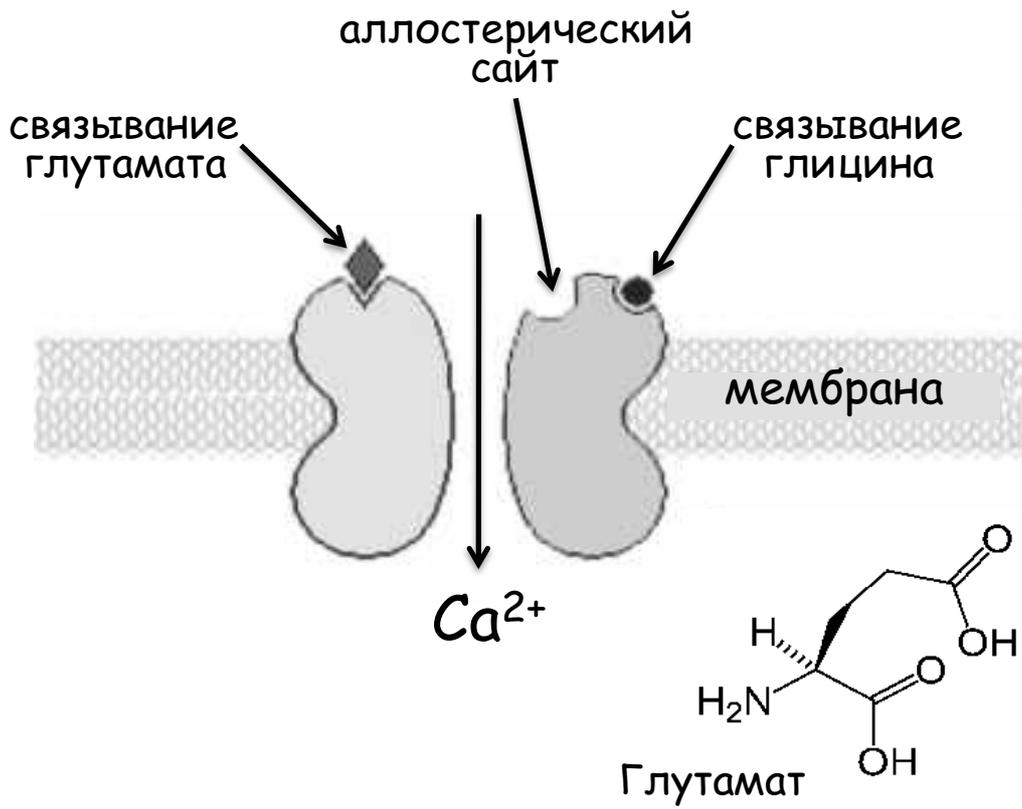
Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются прототипными LGIC. Они имеют 5 субъединиц и 2 участка связывания ацетилхолина (ACh), который при связывании изменяет конформацию рецептора и вызывает открытие канала (рис. 15). Это позволяет ионам Na^+ входить по градиенту внутрь клетки, деполяризовать плазматическую мембрану и вызывать потенциал действия. α -Токсин из яда кобры действует как антагонист nAChR мышечного типа и вызывает паралич препятствуя связыванию ацетилхолина с nAChR. Мускариновые mAChR относятся к GPCRs и связаны с Gq и Gi белками.

ZAC (Zn^{2+} -активируемый ионный канал) активируется спонтанно. Ген ZAC присутствует у человека и собаки, но у грызунов его ортологи не обнаружены. Функции ZAC остаются пока непонятными.

Глутаматные рецепторы связывают глутамат, действующий в качестве нейротрансмиттера. Они являются тетрамерами и классифицируются по своим агонистам (рис. 16). Специфическим агонистом *AMPA-рецепторов* является α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изооксазолпропионовая кислота (AMPA). Для *каинатных рецепторов* агонистом служит каиновая кислота. Она была впервые получена из красной альговой водоросли *Digenea simplex*, имеющей японское название "Каинин-соу". Каинат является мощным стимулятором ЦНС. Он селективно активирует постсинаптические рецепторы при возбуждающей нейротрансмиссии, а также вызывает выброс тормозного нейротрансмиттера GABA.

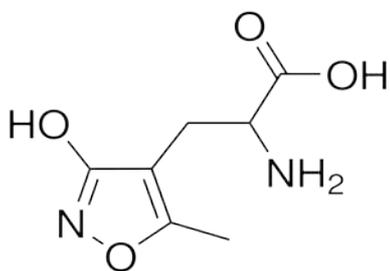
Для *NMDA рецепторов* специфическим агонистом служит N-метил-D-аспартат (NMDA); он не взаимодействует с другими глутаматными рецепторами. Активация NMDA-рецепторов вызывает открытие неселективных катионных каналов. Уникальным свойством этих рецепторов является их чувствительность к мембранному потенциалу, который вызывает связывание внеклеточного Mg^{2+} и фиксацию канала в открытом положении. Это делает возможным потенциал-зависимый вход в клетку ионов Na^+ и небольших количеств Ca^{2+} , а также выход ионов K^+ . Постсинаптический NMDA-рецептор имеет сложную надмолекулярную структуру, в которую входят несколько регуляторных участков. Помимо специфического участка связывания агониста (L-глутамата), он содержит участок связывания ко-агониста (которым является глицин) и аллостерические сайты, расположенные как на мембранной стороне (полиаминовый), так и в ионном канале (участки связывания двухвалентных катионов и неконкурентных антагонистов) (рис. 16).

АТФ-управляемые каналы составляют две группы P2-пуриnergических рецепторов, которые открываются в ответ на связывание внеклеточного АТФ. Среди всех пуриnergических рецепторов ионотропными являются только P2X и P2Z. Остальные P2-пуриnergические (P2Y, P2U и P2T), также как и P1-пуриnergические рецепторы (A1 и A2, лигандом которых служит аденозин),

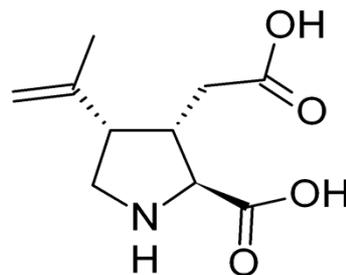


AMPA

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid

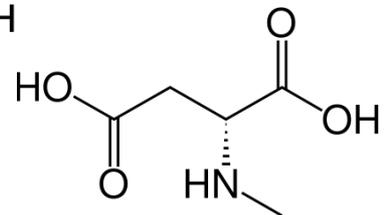


Каинат



NMDA

N-methyl D-aspartate



сопряжены с тримерными G-белками и являются метаботропными. Идентифицированы 7 генов, кодирующих субъединицы P2X рецепторов. За исключением P2X₆, эти белки легко ассоциируют с образованием гомодимеров, но только тримеры функционируют как канал. Считается, что все P2X₁₋₇ способны образовывать гетеротримеры. Ионотропные P2X-рецепторы обнаружены в разных тканях, но основную роль играют в сердечно-сосудистой системе, регулируя сократимость сосудов и сосудистый тонус, а также сократимость миокарда и ритм сердца.

Внутриклеточные рецепторы наиболее медленные и регулируют транскрипцию генов

Суперсемейство внутриклеточных рецепторов объединяет группу рецепторов стероидных, тиреоидных и некоторых других гормонов. Все их лиганды имеют гидрофобную природу и относительно свободно проникают сквозь клеточные мембраны, которые не являются для них барьером. Для одних лигандов рецепторы располагаются в цитоплазме, для других – в ядре, но в конечном счете все лиганд-рецепторные комплексы действуют в ядре (рис. 17). Поэтому эти рецепторы также называют ядерными.

Действие внутриклеточных рецепторов связано с регуляцией экспрессии генов (рис. 17). Они связывают лиганды внутри клетки и по локализации этого события различают рецепторы I или II типа. Рецепторы I типа связывают лиганды в ядре, II типа – в цитозоле, где этот комплекс стабилизируется белками теплового шока (HSP). Как правило, при активации ядерные рецепторы димеризуются. Попадая в ядро, они взаимодействуют со специальными последовательностями ДНК, которые в общем виде называются участками гормонального ответа или гормон-зависимыми элементами (hormone response elements, HREs). После этого они стимулируют или блокируют активность транскрипционных белковых комплексов, тем самым активируя или подавляя экспрессию генов. Внутриклеточные рецепторы влияют также на посттрансляционные модификации гистонов (в основном на их ацетилирование), таким образом участвуя в ремоделировании хроматина. Это связано с функционированием лиганд-связывающего домена рецепторов.

Классификация внутриклеточных рецепторов основана на природе лигандов. Выделяют 4 основных группы стероидных, тиреоидных, ретиноевых и орфановых рецепторов (рис. 18), которые далее подразделяются на 10 подгрупп. Орфановые (сиротские) рецепторы названы так потому, что лиганды для них пока не обнаружены. Для рецепторов остальных групп характерен определенный тип, а также количество последовательностей ДНК, с которыми они связываются. Это отличие обычно подчеркивают заменой первой буквой общей аббревиатуры участка связывания в ДНК, например, SRE является участком связывания стероидных (sterol response element), GRE – глюкокортикоидных, а ERE – эстрогеновых рецепторов.

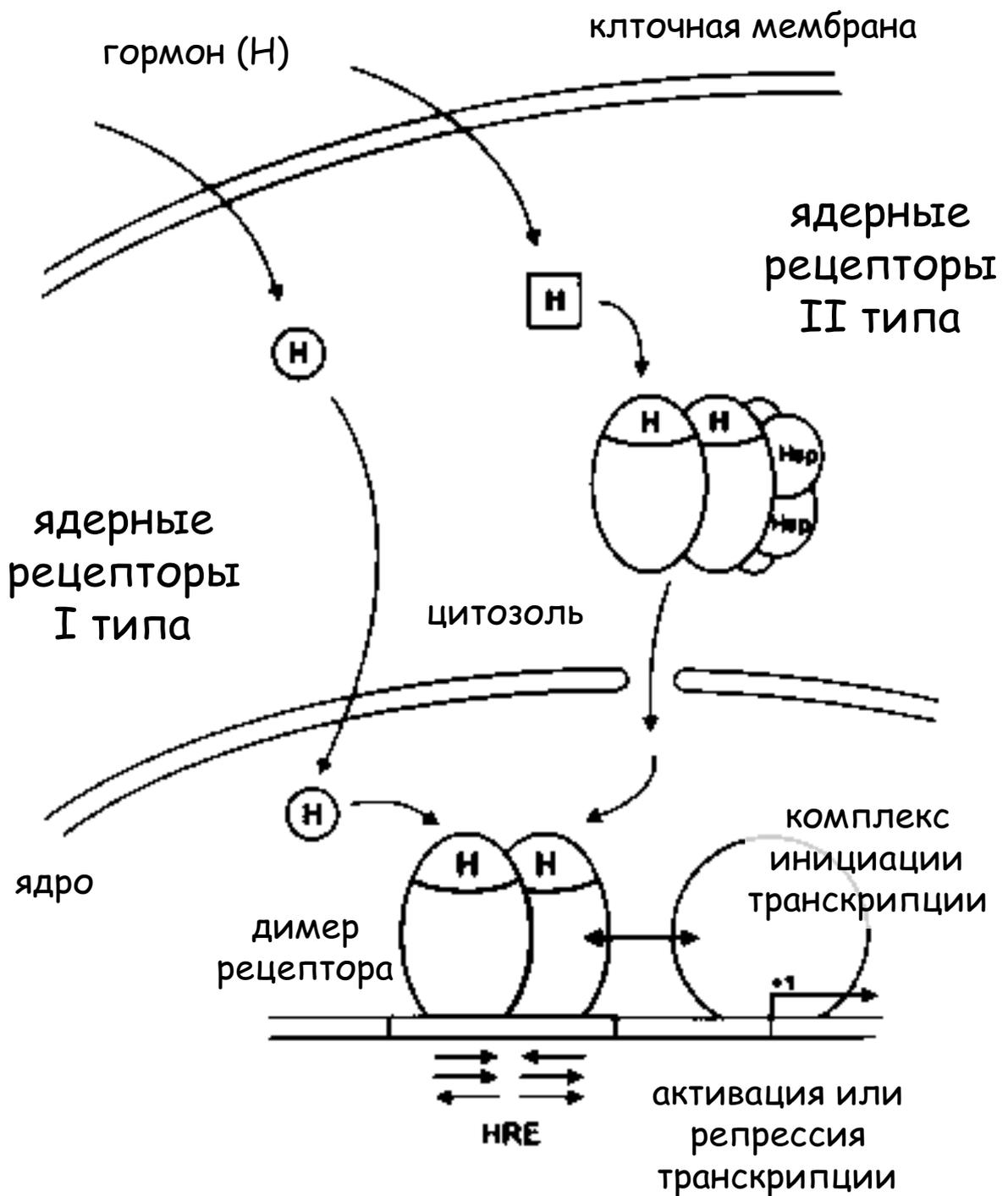
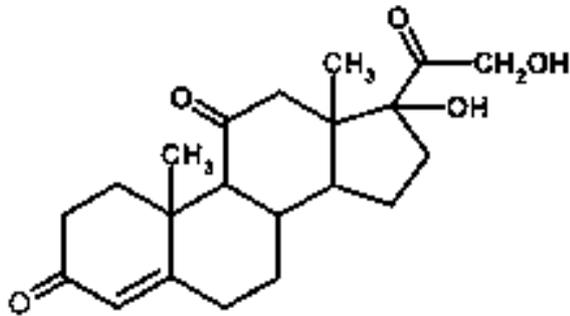
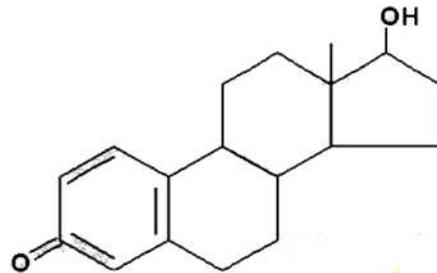


Рисунок 17

Стероидные гормоны

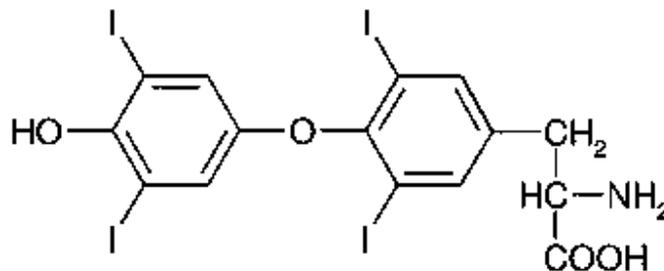


глюкокортикоиды
(кортизол)

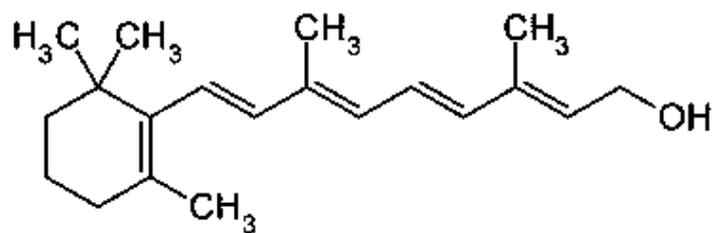


эстрогены
(эстрадиол)

Тиреоидные гормоны



Ретиноевая кислота



Рецепторы стероидных гормонов наиболее поздние в эволюционном отношении. Они разделяются на глюкокортикоидные и эстрогеновые. Первые имеют четырех представителей, содержащих идентичный элемент, называемый P-бокс. С его помощью они рецепторы узнают свой участок гормонального ответа, а именно GRE. По-видимому вследствие своего недавнего появления эти рецепторы не показывают большого разнообразия и известны всего лишь несколько их изоформ (или изорецепторов). Изорецепторы структурно и функционально отличны друг от друга, но связывают один и тот же гормон. Возможно, они являются продуктами изначально разных генов, но может быть возникли и как результат дупликации и альтернативного процессинга одного гена.

Эстрогеновые рецепторы занимают промежуточное положение между глюкокортикоидными и эволюционно более ранними тиреоидными. Хотя они имеют свой уникальный P-бокс, структурно тот больше напоминает P-бокс тиреоидных рецепторов, и оба типа рецепторов используют один HRE. Таким образом, тиреоидные рецепторы взаимодействуют с ERE. Более того, и эстрогеновые, и тиреоидные рецепторы могут взаимодействовать с ДНК лиганд-независимым образом, т.е. без связанного гормона. Однако в отличие от тиреоидных, эстрогеновые рецепторы взаимодействуют с белками теплового шока, аналогично глюкокортикоидным, но с меньшим сродством.

Тиреоидные рецепторы наиболее древние и поэтому наиболее разнообразны. Большинство членов этой группы имеют множество изоформ, которые чаще являются продуктами разных генов, и реже продуктами альтернативного сплайсинга мРНК. Все они имеют короткий участок, называемый A/B, и уникальный P-бокс. Они проявляют высокое сродство к ДНК и часто связывают HRE даже не будучи в комплексе с лигандом. Эти рецепторы не формируют стабильных комплексов с белками теплового шока, но могут кратковременно связываться с ними в процессе синтеза. Несмотря на одинаковый P-бокс, организация и последовательность участков связывания в ДНК отличается для разных представителей этой группы. На самом деле, один и тот же рецептор способен связываться с несколькими разными HRE. Также как и остальные ядерные рецепторы, тиреоидные рецепторы димеризуются при активации, но эти взаимодействия неспецифичны и в результате могут образовываться разнообразные гетеродимеры. Как следствие, эти димеры также неизбирательно взаимодействуют с HRE как в прямой, так и обратной ориентации их повторов.

Ретиновые рецепторы служат мишенями 9'-цис-ретиновой кислоты (RXR) и полностью транс-ретиновой кислоты (RAR). Ретиновая кислота является метаболитом витамина А (ретинола) и опосредует его действие в процессе роста и развития организма. Функционируют ретиновые рецепторы в виде гомо- и гетеродимеров, главным образом регулируя транскрипцию генов так называемого Нох-семейства. В процессе раннего эмбрионального развития организма эти гены отвечают за определение типа сегментов и взаимное расположение частей тела в передне-заднем

направлении (anterior/posterior patterning). Кроме того, во взрослом организме ретиновые рецепторы регулируют экспрессию ферментов жирового обмена, таких как апобелок А1, внутриклеточный ретинол-связывающий белок, синтаза и дегидрогеназа ацил-СоА и некоторые ферменты окисления жирных кислот.

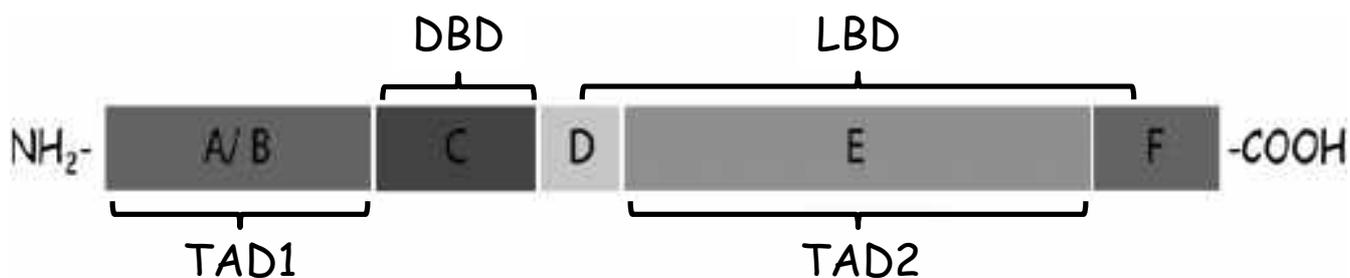
Орфановые рецепторы составляют группу белков, гомологичных ядерным рецепторам, для которых не известны лиганды. Связывание лиганда считается эволюционно приобретенной способностью предсуществующих белковых молекул. Поэтому орфановые рецепторы могут рассматриваться как более примитивный тип регуляции, находящийся на стадии становления или происходящий за счет посттрансляционных модификаций. Как альтернатива, эти рецепторы могут быть интракринными и их лигандами могут выступать молекулы внутриклеточных метаболитов.

В отличие от самих внутриклеточных рецепторов, действие их лигандов связано не только с геномом, но и с регуляцией метаболических процессов от поверхностных рецепторов клетки. Это явление еще раз указывает на отмеченную выше возможность относительно независимого происхождения рецепторов и их лигандов в процессе эволюции. Эстрогеновые рецепторы дают его хорошую иллюстрацию. Эти рецепторы представлены в клетках тремя группами, ER α , ER β и GPR30, разнообразие изоформ которых обеспечивается альтернативным сплайсингом. С одной стороны, ER α и ER β функционируют как классические рецепторы I типа и опосредуют длительные реакции клеток, связанные с изменением экспрессии генов. В комплексе с белком HSP90 они связывают в цитоплазме проникающие в клетку эстрогены, после чего диссоциируют от HSP90 и переходят в ядро. Там они связываются с эстроген-чувствительными локусами ДНК, усиливая (ER α) или подавляя (ER β) транскрипцию генов. Однако, кроме этого, ER α и ER β присутствуют также и в плазматической мембране. При связывании лигандов они димеризуются и активируют сигнальные каскады, типичные для мембранных рецепторов: PI3-киназный и MAP-киназный каскады, тирозиновую киназу Src, фосфолипазу C, протеинкиназа C, инозитолтрифосфат и Ca²⁺. Эти каскады ведут к изменению транскрипционной активности, а также обеспечивают и негеномные эффекты эстрадиола. В дополнение к этому, эстрогеновый рецептор GPR30 прямо сопряжен с G-белками. Он содержит характерные семь трансмембранных доменов, специфично и действует независимо от ER α и ER β , вызывая в клетке быстрые метаболические реакции. Он действует, активируя аденилатциклазу и цАМФ-зависимые реакции, а также матриксную металлопротеиназу. Последняя слущивает с поверхности клеток связанный с гепараном эпидермальный фактор роста (HB-EGF) и переводит его в активную форму (EGF), таким образом трансактивируя его рецептор и связанные с ним тирозинкиназные каскады.

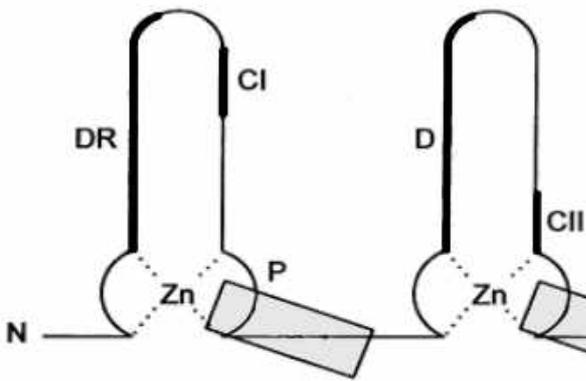
Структура внутриклеточных рецепторов достаточно однотипна (рис. 19). Они содержат четыре основных домена, разделенных шарнирным участком. Эти части последовательно обозначаются буквами А-D начиная с N-конца молекулы. Домены С и Е наиболее консервативны, но различия в домене Е обеспечивают связывание разных лигандов. Домены А/В наиболее переменчивы и изоформы отличаются главным образом по домену А, что обеспечивает их различия в отношении активации транскрипции.

N-концевой А/В домен не имеет отчетливой и стабильной третичной структуры. Он приобретает нужную конформацию при взаимодействии с другими частями рецептора, ДНК, и коактиваторами транскрипции. Активация транскрипции является его основной функцией. Домене А/В несет один из двух субдоменов активации транскрипции (TAD1). Второй такой субдомен (TAD2) расположен в домене Е. Две других функции А/В домена также имеют прямое отношение к транскрипционной активности. Они обеспечивают рецепторный синергизм и генную избирательность. Суть рецепторного синергизма заключается в том, что активация нескольких HRE оказывает существенно больший эффект на транскрипцию, чем простая арифметическая сумма эффектов индивидуальных HRE. Считается, что этот механизм зависит от ко-активаторов: чем больше рецепторов связано рядом с геном, тем больше вероятность того, что необходимые факторы будут привлечены и останутся в непосредственной близости с комплексом. Понятие генной селективности означает, что группа транскрипционных факторов, связанных с локусом TAD1, может активировать другой набор генов, чем факторы, связывающиеся с последовательностью TAD2.

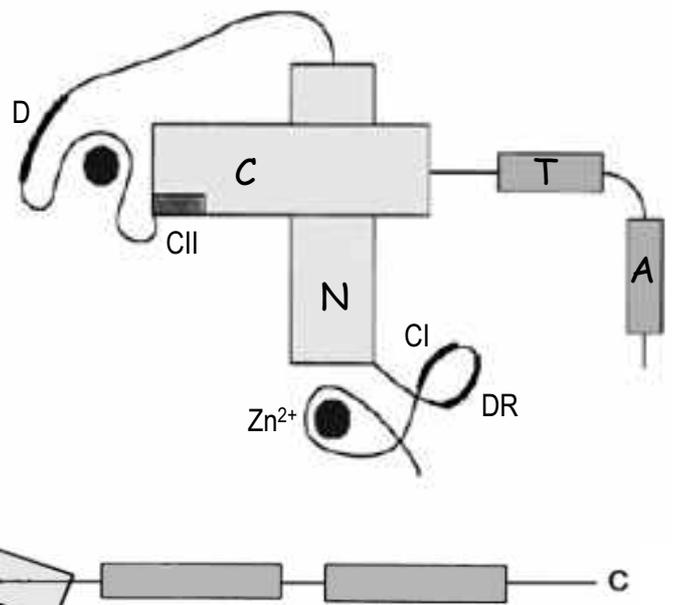
ДНК-связывающий С-домен (DBD) состоит из двух “цинковых пальцев”, стабилизированных α -спиралями, а также дополнительных линейных структур (T-box и A-box) (рис. 20А). Каждый Zn^{2+} -связывающий участок содержит две пары цистеинов, отстоящих друг от друга на 10-15 остатков и координирующих ион Zn^{2+} . Когда была выяснена пространственная структура DBD, оказалось, что в ней доминируют не “пальцы”, а две примыкающие α -спирали; каждая начинается на С-конце Zn^{2+} -связывающего кармана и служит продолжением “пальца” (рис. 20Б). В третичной структуре эти спирали располагаются перпендикулярно друг другу так, что N-концевая спираль ориентируется поперек ДНК и попадает в канавку между ее витками, а С-концевая лежит сверху вдоль нити ДНК. Такая структура позволяет димеру рецептора стереоспецифично связывать ДНК наподобие скрепки (рис. 20В). При этом N-концевые спирали формируют прочные контакты с определенными нуклеотидными остатками ДНК, а С-концевые определяют регистр и придают всей структуре жесткость. Такая конфигурация очень напоминает спираль-петлю-спираль, характерную для транскрипционных факторов прокариот. P-box находится в N-конце первой спирали; он непосредственно узнает и связывает HRE.



- DBD : ДНК-связывающий домен
- LBD : лиганд-связывающий домен
- TAD1 : домен лиганд-независимой трансактивации
- TAD2 : домен лиганд-зависимой трансактивации

А

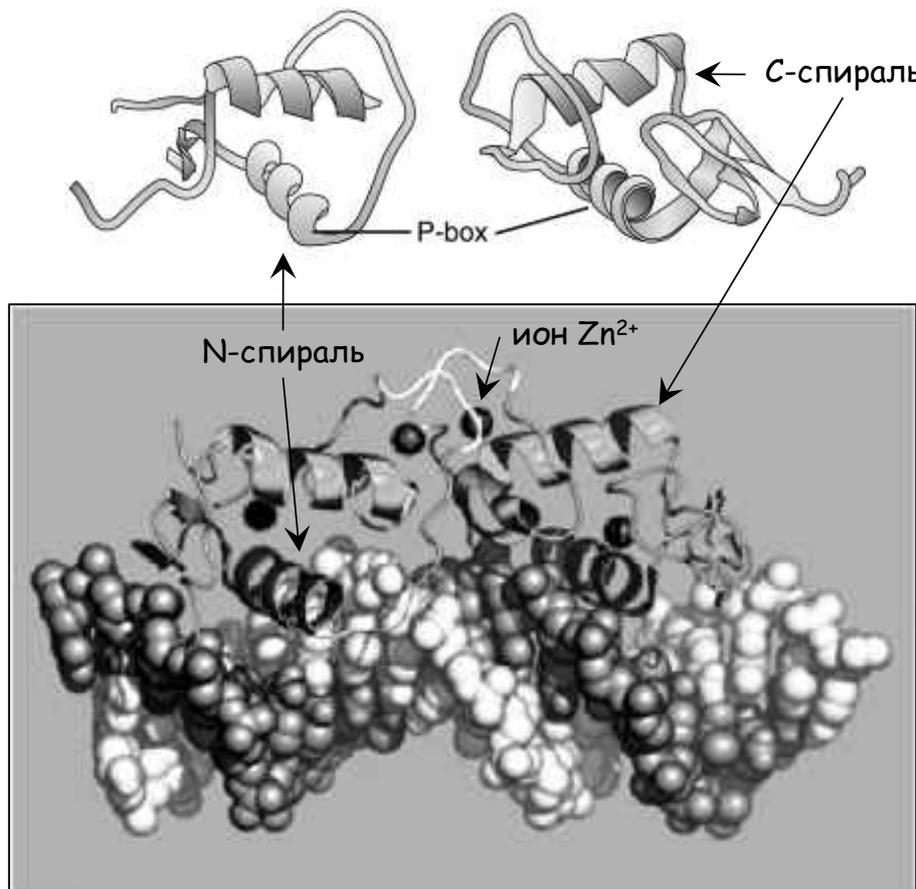
N-спираль
и P-box (P)

Б

C-спираль

T-box

A-box

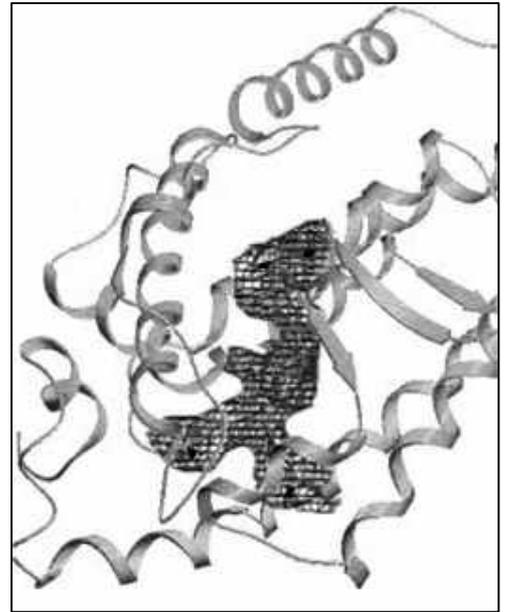
В

Некоторые представители тиреоидных рецепторов имеют 2 дополнительные последовательности к С-концу от второй спирали: Т-бокс нужен для димеризации рецептора, и А-бокс (или Н-бокс) взаимодействует с А/Т-богатой последовательностью к 5'-концу от HRE. Кроме того, DBD имеет несколько минорных участков димеризации: СI и DR (direct repeat), находящиеся в первом “цинковом пальце”, а также D-бокс и СII, находящиеся во втором. Димеры взаимодействуют с палиндромными HRE в ориентации “голова-к-голове”, что позволяет N-концевым частям каждого второго “пальца” располагаться антипараллельно друг другу и формировать множественные водородные и ионные связи (рис. 20B). Однако этих взаимодействий оказывается недостаточно, чтобы стабилизировать структуру димера в растворе, и они вносят существенный вклад на стадии кооперативного связывания димера с HRE.

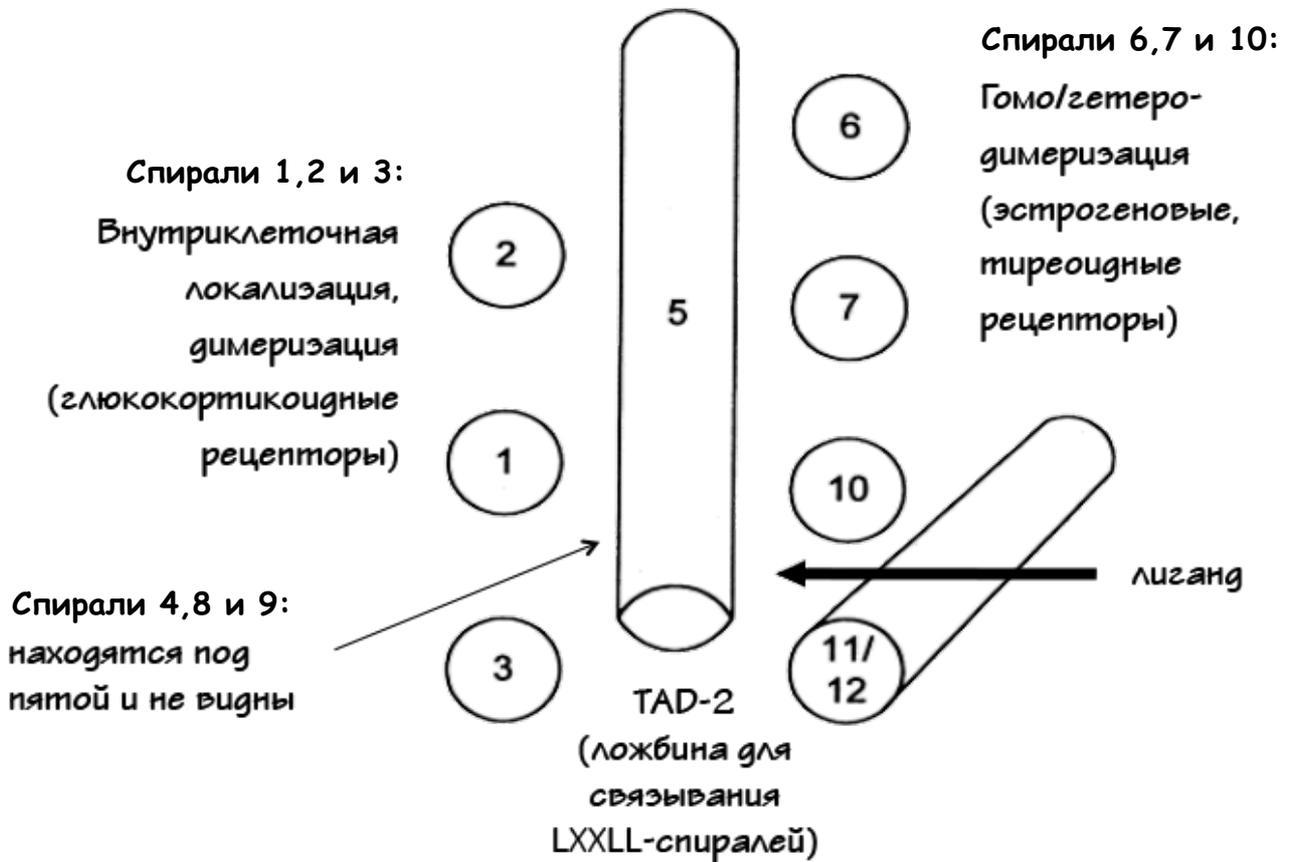
Шарнирный участок D разделяет DBD и лиганд-связывающий домен (LBD), обеспечивая им относительную подвижность. Однако главной функцией D-участка является ядерная локализация рецептора. Он несет специальную последовательность импорта белка в ядро (nuclear localization signal, NLS), которая узнается транспортными системами ядра. Часто этой последовательности предшествует участок фосфорилирования киназой II типа (CK2), которая ускоряет транспорт в ядро. Шарнирный участок имеет также несколько дополнительных функций. Во-первых, он участвует в димеризации и связывании ДНК, поскольку фактически в нем расположены А-бокс и Т-бокс. Во-вторых, некоторые остатки, участвующие в узнавании лиганда и входящие в протяженные лиганд-связывающие последовательности LBD, также попадают в участок D. Наконец, здесь связываются некоторые коактиваторы и репрессоры транскрипции. Наиболее важными из них являются белки HMGB (high mobility group B), которые повышают сродство стероидных рецепторов к ДНК.

Лиганд-связывающий домен E выполняет 4 важных функции. Главная следует из его названия – это связывание лиганда. Другими являются активация транскрипции, димеризация рецептора и связывание белков теплового шока. Пространственная структура LBD имеет тип сэндвича, построенного тремя взаимоперпендикулярными уровнями α -спиралей. Ее приблизительная 3-мерная топография показана в виде стереопары на рис. 21A, где в качестве примера изображен LBD рецептора витамина D в комплексе с синтетическим лигандом Gemini. В этой структуре спирали, расположенные слева вверху, почти перпендикулярны плоскости, образованной правыми нижними спиралями, а третья плоскость сформирована β -складками на переднем плане. Структура LBD ядерных рецепторов состоит только из α -спиралей. Она схематично представлена ниже, на рис. 21B. Спирали 4, 8 и 9 лежат параллельно позади спирали 5, и поэтому не видны. Спирали 11/12 имеют разделяющую их точку перегиба и считаются разными. В отсутствие лиганда они лежат вне третьей плоскости и их гидрофобная поверхность экспонирована наружу. Она создает

А



Б



“вход” для гидрофобных лигандов. После связывания лиганда, спираль 11/12 складывается, создавая две важных поверхности, и “вход” закрывается. Во-первых, третий уровень спиралей становится плоским и формирует контактный интерфейс для образования димеров. Во-вторых, он полностью оформляет борозду на краю LBD, представляющую собой TAD2. Размер и строение борозды таковы, что она связывает α -спирали, несущие последовательность LxxLL, обозначаемую как домен взаимодействия с ядерными рецепторами (NID), или просто NR-box. Эти домены присутствуют практически во всех коактиваторах и репрессорах транскрипции, которые являются партнерами ядерных рецепторов. В апорецепторе (без лиганда), с TAD2-последовательностями связаны репрессоры и они держат активность транскрипционного комплекса на низком уровне. Когда спирали 11/12 структурируют борозду так, что создаются структурные предпосылки для замещения репрессоров коактиваторами и создания активного транскрипционного комплекса. Поверхность первого α -спирального слоя участвует в связывании HSP, компонентов ядерного матрикса и цитоскелета. Помимо этого, у глюкокортикоидных рецепторов здесь находится второй NLS и структура, репрессирующая транскрипционную активность.

F-домен является просто С-концевым. У многих ядерных рецепторов вся эта последовательность участвует в связывании гормона и формально относится к LBD; эти рецепторы фактически лишены F-домена. В тех же рецепторах, где этот домен присутствует, с ним связан весьма ограниченный набор второстепенных функций. Однако для эстрогеновых рецепторов этот домен важен, так как он участвует в связывании коактиваторов.

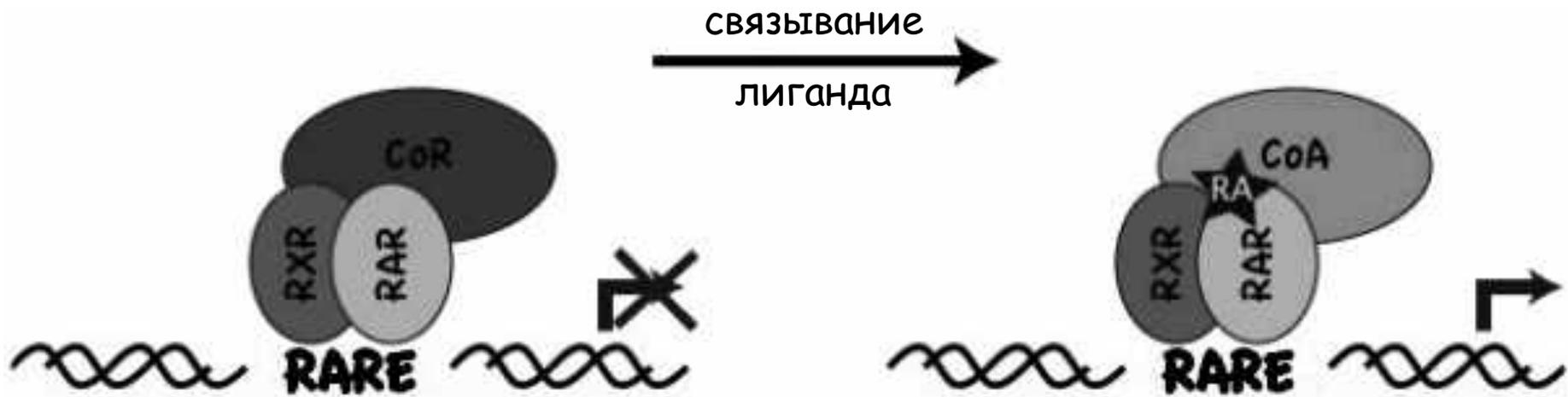
Механизм действия внутриклеточных рецепторов включает несколько важных этапов. Изначально они пребывают в динамическом равновесии между неактивной и активной конформациями. Лиганды и коактиваторы стабилизируют активную форму, а HSP, кошапероны и иммунофилины (для цитозольных рецепторов) или корепрессоры (для ядерных рецепторов) стабилизируют неактивную конформацию. Различные ковалентные модификации могут также стабилизировать одну из конформаций, в зависимости от расположения участка фосфорилирования и конкретного рецептора. Финальная конформация, приобретаемая рецептором, зависит от комбинации этих факторов. Этот механизм весьма логичен и с той точки зрения, что связывание лиганда является более поздним приобретением внутриклеточных рецепторов. До этого, транскрипционные факторы регулировались другими факторами; связывание лиганда эти факторы не заменило, а было к ним просто добавлено.

Активация рецептора путем связывания лиганда является первым этапом. Это событие вызывает несколько последствий. Во-первых, изменяется конформация рецептора и спираль 11/12 сдвигается так, что “вход” в лиганд-связывающий карман закрывается, рецептор становится более

компактным и устойчивым к действию протеолитических ферментов. Во-вторых, от рецептора диссоциируют связанные с ним HSP, их кошапероны и иммунофилины, стабилизовавшие рецептор в неактивной конформации. В-третьих, эти изменения ведут к димеризации рецептора и особенно важным является изменение положения спирали 11/12 в зоне контакта мономеров. В-четвертых, если рецептор находится в цитоплазме и связывает там лиганд, то диссоциация HSP ведет к открытию NLS и димер рецептора транслоцируется в ядро. До сих пор непонятно, влияет ли связывание лиганда на взаимодействие рецептора с ДНК, или только на диссоциацию HSP и перемещение рецептора в ядро. Тот факт, что изолированный DBD домен конститутивно активен свидетельствует о том, что лиганд для связывания рецептора с ДНК не нужен. В-пятых, связывание лиганда провоцирует фосфорилирование рецептора, вероятно открывая доступ киназам. Однако последовательность этих событий четко не определена и может быть обратной.

Функции фосфорилирования рецепторов остаются во многом противоречивы, хотя определены многие протеинкиназы и картировано большинство модифицируемых остатков. Считается, что фосфорилирование оказывает прямое и не прямое воздействие. Для внутриклеточных рецепторов характерно так называемое иерархическое, или последовательное фосфорилирование. Его суть заключается в том, что каждая предыдущая модификация оказывает перmissive эффект, разрешая последующую. Это достигается тем, что фосфорилированный остаток становится определяющим для узнавания субстрата следующей киназой. Существуют три различные фазы фосфорилирования. Базальное, или конститутивное, происходит в процессе синтеза рецептора или сразу после него. Гормон-зависимое фосфорилирование происходит после связывания лиганда. Третья серия этих модификаций происходит под действием ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) после связывания рецептора с ДНК. Фосфорилирование может влиять на локализацию рецептора, стабильность активной или неактивной конформации, активность транскрипционного комплекса или сродство к лиганду.

Транскрипционное действие димеров ядерных рецепторов зависит от их связывания с участками HRE в ДНК, а также с корегуляторами – коактиваторами и корепрессорами (рис. 22). Первое обеспечивают DBD, а второе – TAD-последовательности рецепторов. TAD2 формируется лиганд-зависимым образом при смещении спирали 11/12. По-видимому, TAD1 эволюционно более ранний, он работает независимо от связывания лиганда. В комплексе с димерами рецепторов, корегуляторы изменяют его транскрипционную активность. Однако они не служат коферментами, которые отличаются малыми размерами, небелковой природой и абсолютной необходимостью для ферментативной активности, так как обеспечивают часть катализа.



- RA - ретиноевая кислота
- RXR/RAR - рецепторы ретиноевой кислоты
- RARE - HRE для ретиноевой кислоты
- CoR - корепрессор
- CoA - коактиватор

Корегуляторы были открыты в первой половине 1990-х годов, хотя негистоновые белки, поддерживающие функцию ядерных рецепторов, были известны еще в 1970-х. Сейчас стало ясно, что они являются важной точкой приложения регуляторных воздействий со стороны разных сигнальных каскадов клетки. Известен целый ряд пост-трансляционных модификаций, которые регулируют активность, локализацию и взаимодействие корегуляторов с рецепторами. Помимо фосфорилирования, к ним относятся ацетилирование, метилирование и убиквитинирование.

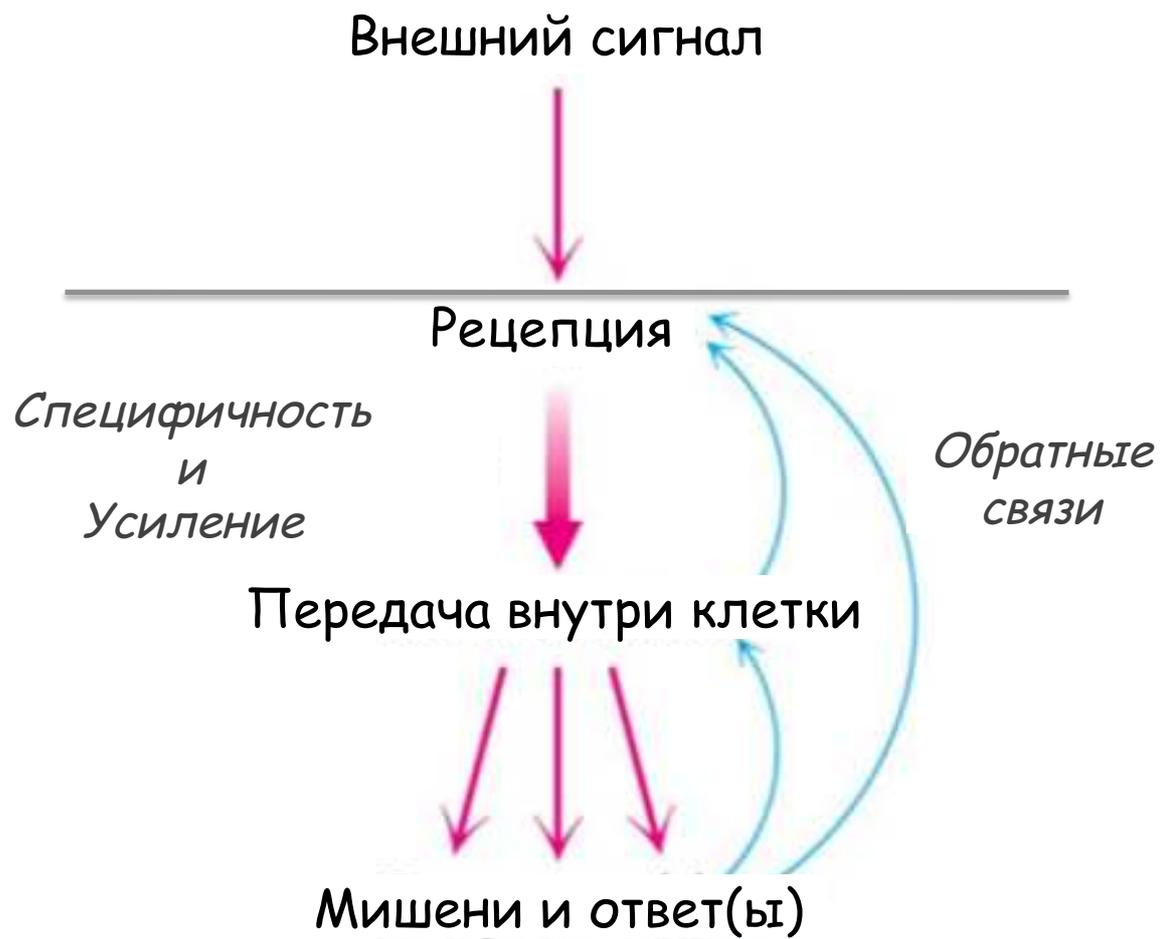
Механизмы выключения внутриклеточных рецепторов остаются во многом неясными. Очевидно, что одним из них является регулируемая диссоциация лиганда и корегуляторов. Рециклизация ядерных рецепторов и восстановление неактивных комплексов происходят так быстро после удаления лиганда, что не могут объясняться экспрессией рецепторов *de novo*. Считается, что для рециклирования решающее значение имеет дефосфорилирование рецепторов.

Принципы внутриклеточной передачи сигнала

Общая схема рецепции и внутриклеточной сигнализации показана на [рис. 23](#). На ней обозначены ключевые компоненты, которые более подробно анализируются в последующих разделах и рассматриваются в отношении отдельных типов рецепторов и их основных представителей. В этой главе термин "рецептор" обозначает главным образом метаботропный рецептор, но многие рассматриваемые здесь принципы передачи сигнала характерны и для внутриклеточных, и для канальных рецепторов.

Рецепторы связывают лиганды и таким образом воспринимают внешние сигналы. При этом они претерпевают конформационные изменения, которые необходимы для развития последующих событий. Рецепторы селективны по отношению к лигандам, однако полной специфичности нет и лиганды действуют, связываясь с несколькими типами или изоформами рецепторов. Это явление вносит вклад в разнообразие и специфичность клеточных реакций, однако их полностью не определяет. Разные рецепторы часто запускают общие сигнальные механизмы. И наоборот, различные сигнальные последовательности используются сходными рецепторами одного класса.

Мембранная локализация необходима для непосредственных мишеней мембранных рецепторов. Для повышения ее эффективности клетка часто использует принудительные механизмы, главным образом модификацию липидными якорями. Тем самым достигается компартментализация этих мишеней поблизости от рецепторов и снижается энтропийный фактор на первых этапах передачи сигнала.



ГТФ-связывающие белки действуют как молекулярные переключатели и таймеры при передаче сигнала внутри клетки. Они "включены" и проводят сигнал когда связаны с молекулой ГТФ, но "выключаются" и прерывают передачу сигнала когда гидролизуют ГТФ и остаются связанными с ГДФ. Рецепторы сопрягаются с G-белками посредством факторов, регулирующих обмен гуаниловых нуклеотидов в ГТФ-связывающем участке G-белков (GEF, GAP и GDI). Большое число таких факторов позволяет распределять сигнал в направлении одного или другого G-белка.

Вторичные посредники являются короткоживущими и малыми по размеру внутриклеточными молекулами, которые передают и умножают сигналы, получаемые от активированных рецепторов. Эти малые и подвижные молекулы действуют, как правило, на большие расстояния в клетке и запускают реакции, охватывающие обширные области или даже всю клетку. К ним относятся цАМФ, цГМФ, диацилглицерол (ДАГ), инозитолтрисфосфат (ИФ3), различные фосфоинозитиды, ионы Ca^{2+} , продукты активных форм кислорода NO и H_2O_2 , и некоторые другие молекулы.

Адаптерные белки организуют сигнал-проводящие системы, последовательно скрепляя их элементы в сигнальные цепочки. Зачастую они не обладают каталитической активностью, но содержат различные комбинации специализированных доменов, отвечающих за специфическое узнавание в процессе белок-белковых и иных взаимодействий.

Каркасные (скаффолдовые) белки действуют аналогично адаптерным, обеспечивая создание, на своей основе, многокомпонентных сигнальных комплексов. Они связывают несколько участников сигнальных каскадов, объединяя их в функциональные комплексы, направляют их в определенные области клетки и часто служат точками приложения обратных регуляторных связей. Тем самым они обеспечивают специфичность и эффективность сигнал-проводящим системам, а также возможность контроля их активности.

Каскадная организация сигнальных систем внутри клетки обеспечивает *специфичность* и *усиление* при передаче сигнала. В дополнение к адаптерным белкам, важную роль в сигнальных каскадах играют ферменты; основными из них являются *киназы* и *фосфатазы*.

Сигнальные сети формируются в результате функционального взаимодействия компонентов различных сигнальных каскадов. Это явление часто именуется перекрестом сигнальных каскадов (от англ., *crosstalk*). Оно обеспечивает плеiotропность действия гормонов за счет латеральной передачи сигнала от одного сигнального модуля к другому.

Обратная регуляция позволяет контролировать силу и продолжительность клеточных реакций. Она может использовать разные механизмы и быть положительной или отрицательной. Текущие

представления рассматривают обратную регуляцию как механизм адаптации – подстройки реакций клетки к изменениям силы и длительности внешних воздействий.

Выключение рецепторов необходимо для терминации сигнала и инактивации клеточного ответа. Оно достигается за счет специальных и сложно регулируемых механизмов, включающих множественную модификацию, интернализацию и внутриклеточный трафик рецепторов.

Непосредственные мишени рецепторов принудительно локализируются на мембране

Когда трансмембранные рецепторы передают внешние сигналы в клетку, первые события как правило плотно привязаны к внешней мембране. Поэтому клетки часто принудительно используют локализацию на мембране первых компонентов сигнальных модулей. Это достигается с помощью пост-трансляционной модификации этих компонентов *липидными якорями* – жирными кислотами, изопреноидами и сложными гликолипидами. Некоторые из них показаны на [рис. 24](#). Главная задача таких модификаций – вызвать связывание сигнальных белков с мембраной и повысить эффективность их взаимодействия с активированным рецептором.

Липидные якоря могут добавляться на сигнальный белок в результате рецепторной активации, т.е. быть частью механизма передачи сигнала и служить молекулярными включателями ([рис. 25](#), сверху). Такой механизм отличается от несигнального, когда липидная модификация происходит в процессе синтеза или созревания белка и прямо не зависит от рецепторной активации.

Промежуточным вариантом может быть изменение конформации сигнального белка и положения предсуществующего липидного якоря ([рис. 25](#), внизу). Так происходит при Ca^{2+} -миристильном включении реверина, и в процессе ГТФ-миристильного включения малой ГТФ-азы Arf. В этих случаях происходят лиганд-зависимые изменения конформации белков и экспонирование липидного якоря. Другим примером служит активация некоторых изоформ РКВ/Akt с участием комплекса mTor2. Киназа mTor фосфорилирует миристилированную РКВ/Akt и одного этого фосфорилирования оказывается достаточно для активации РКВ/Akt. Напротив, классический механизм активации РКВ/Akt, не содержащей липидного якоря, требует рецептор-зависимой активации PI3-киназы и фосфорилирования дополнительного остатка в РКВ/Akt.

Другим способом мембранной локализации сигнальных белков является наличие в них *специальных последовательностей*, отвечающих за связывание с компонентами мембран. К настоящему времени обнаружено большое число вариантов таких последовательностей, многие из которых являются модульными доменами адаптерных белков (см. ниже). Они связывают мембранные фосфолипиды, в том числе и те молекулы, которые транзиторно образуются при активации мембранных рецепторов. Например, рецептор-зависимая активация PI3-киназы ведет к

Модификация	Пример	Участок
Миристилирование	Гетеротримерные G-белки (α -субъединица) Цитоплазматические тирозинкиназы	N-конец
S-пальмитилирование	Гетеротримерные G-белки (α -субъединица) GPCRs Ras-белки	Внутри
S-пренилирование <i>геранилгеранил</i> <i>фарнезил</i>	Гетеротримерные G-белки (γ -субъединица) Ras-белки Родопсин-киназа	C-конец

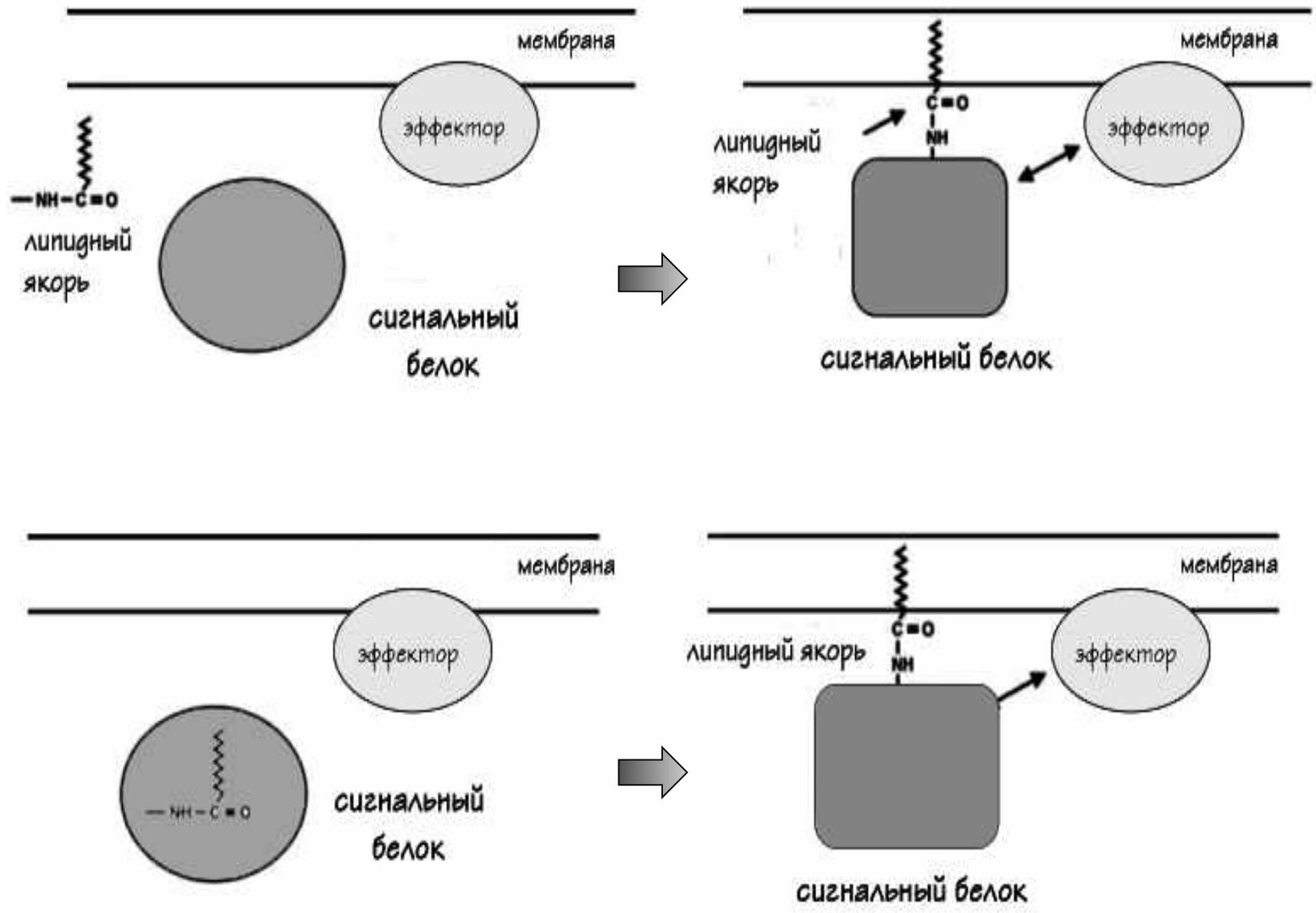
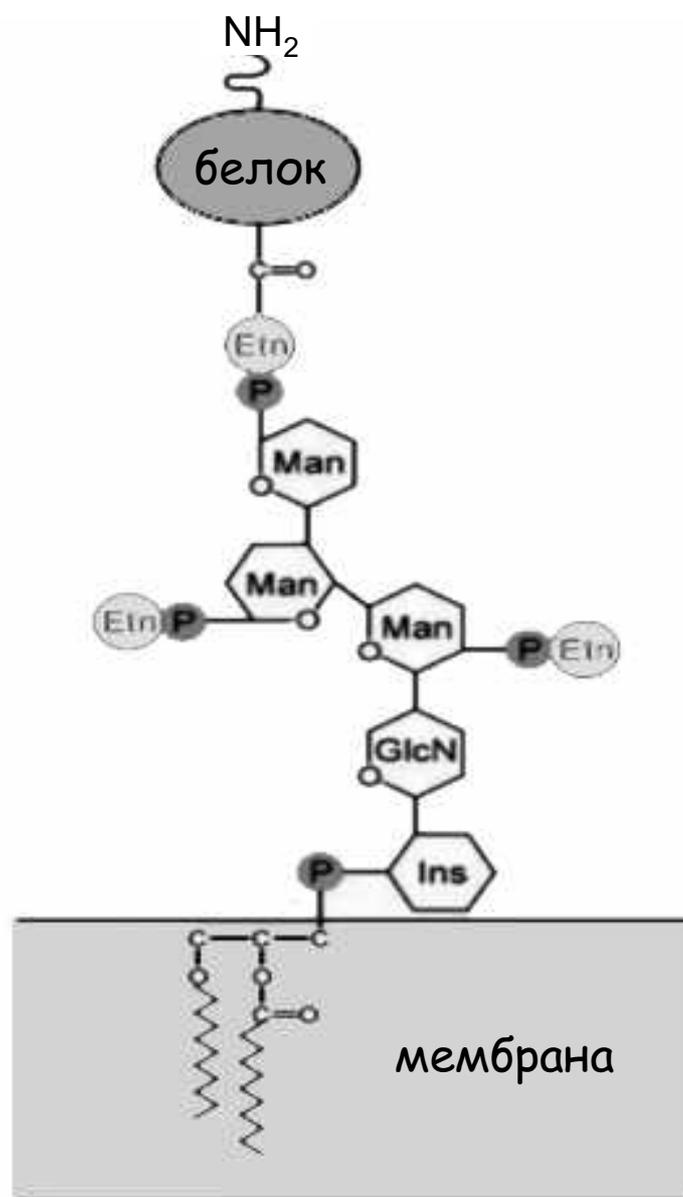


Рисунок 25

быстрому и локализованному накоплению в мембране фосфатидилинозитолтрисфосфата (PIP₃), с которым связываются белки, содержащие домен плекстриновой гомологии (PH-домен). Это взаимодействие позволяет рекрутировать на мембрану такие белки, которые подвергаются там дальнейшим модификациям, в том числе и под действием самой PIP₃-киназы. Так, фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа PDK1 содержит PH-домен и является одним из главных субстратов PIP₃-киназы. При активации соответствующих рецепторов, PDK1 быстро переходит на мембрану, где активируется под действием PIP₃-киназы и фосфорилирует свой основной субстрат – PKB/Акт, которая также содержит PH-домен и попадает на мембрану при активации тех же рецепторов и PIP₃-киназы. Этот каскад является классическим примером определяющей роли мембранной локализации его компонентов в проведении сигнала. Другим примером служит активация малой ГТФ-азы Rac1 под действием активирующих факторов обмена гуаниловых нуклеотидов, подавляющее большинство которых имеет PH-домен и активируется рецепторами, запускающими PIP₃-киназу.

Липидные якоря бывают не только внутриклеточными. *Гликозилфосфатидилинозитольный якорь* (ГФИ или GPI) является внеклеточным. Он состоит из фосфолипида с присоединенными к нему гликозильными и фосфоэтанольными группами, к одной из которых присоединяются разные внеклеточные белки (рис. 26). К таким белкам относятся рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназы) и внеклеточные металлопротеиназы (ММП) из семейства адамализинов (ADAM-белков). Эти ГФИ-заякоренные белки, не имеющие трансмембранного и цитоплазматического доменов, крайне подвижны и быстро перемещаются в плоскости мембраны. Они играют важную роль в протеолизе и ремоделировании внеклеточного матрикса, определяя способность клеток к инвазии. Кроме того, эти ферменты активируют связанные с матриксом или с поверхностью клетки латентные факторы роста и цитокины. Те, в свою очередь, связываются со своими рецепторами и запускают миграцию и инвазию клеток. Помимо этого, рецептор урокиназы и некоторые ММП могут трансактивировать другие поверхностные рецепторы и интегрины. Они и, особенно, урокиназа являются самыми определяющими маркерами метастазирования.

В семейство *ADAM-белков* (A Disintegrin And Metalloprotease) входит более 30 гликопротеидов, которые включают ММП. Термин “дезинтегрин” был впервые использован в 1990 г. в отношении семейства белков змеиного яда, богатых остатками Cys и имеющих интегрин-связывающий пептид RGD. Они ингибировали агрегацию тромбоцитов и интегрин-зависимую адгезию. Название этих белков отражает наличие в них двух структурных доменов. Дезинтегриновый домен выполняет антиадгезивную, а металлопротеазный – протеолитическую функцию. Протеазную активность ММП регулирует про-последовательность, которая блокирует доступ ионам цинка, а активация происходит при ее удалении или окислении консервативного



цистеинового остатка. Основной задачей ADAM-белков является шединг (т.е. "срезание") внеклеточных частей с других трансмембранных белков. Таким способом ADAM10 активирует HER2 (ErbB2) рецептор эпидермального фактора роста (EGF), а ADAM17 активирует гепарин-связанный HB-EGF (рис. 27). Аналогичным образом внеклеточному протеолизу и активации подвергаются фактор некроза опухолей TNF α и рецептор урокиназы uPAR. В последнем случае из uPAR выщепляется полипептид, который становится лигандом для цитокинового рецептора и паракринно воздействуют на соседние клетки.

Многие ADAM-белки являются трансмембранными и содержат цитоплазматический домен. Он опосредует активацию ADAM-белков изнутри клетки и часто обеспечивает так переключение сигнала с GPCR на тирозинкиназные рецепторы (рис. 27). ADAM-белки участвуют в тканях и процессах ремоделирования и инвазии клеток, например при проникновении сперматозоида к яйцеклетке. Они играют важную роль в метастазировании опухолевых клеток, являясь одной из наиболее перспективных мишеней для антиопухолевой терапии.

ГТФ-связывающие белки выполняют роль таймеров и распределителей сигнала

В клетке G-белки функционируют как *молекулярные таймеры*, определяя время прохождения сигнала. Они активны пока связаны с ГТФ и выключаются когда ГТФ гидролизуется и фосфатная группа диссоциирует из активного центра, оставляя G-белок связанным с ГДФ. G-белок остается неактивным пока новая молекула ГТФ не заменит ГДФ в его активном центре. Этот циклический переход G-белка из неактивного в активное, а затем снова в неактивное состояние необратим и называется *ГТФ-азным циклом* (рис. 28).

Открытие G-белков связано с работами Мартина Родбелла (Martin Rodbell) и Альфреда Гилмана (Alfred G. Gilman) (рис. 29). В 1960-е годы активность аденилатциклазы определяли в препаратах клеточных мембран используя только гормон и субстрат – Mg²⁺-АТФ. Мембраны, содержащие нужные компоненты и каталитическую активность, успешно синтезировали цАМФ. Коммерчески доступный АТФ был отличным субстратом и о необходимости ГТФ тогда никто не догадывался. Однако в 1970-е годы высокоочищенный АТФ перестал давать воспроизводимые результаты, раз от разу показывая отсутствие циклазной активности. Как выяснилось, причиной этого явилось отсутствие примесей ГТФ в очищенных по новым технологиям препаратах АТФ. В классической работе, выполненной в лаборатории Мартина Родбелла было показано, что добавление ГТФ в такую систему приводило к восстановлению гормон-зависимого синтеза цАМФ (Rodbell et al., 1971, рис. 29). Кроме того, ГТФ также снижал сродство рецептора к агонисту и не влиял на сродство к антагонисту. Из этого стало ясно, что ГТФ играет ключевую роль в гормон-зависимой активации циклазы, но не как субстрат, а как кофактор. К двум известным ранее важным

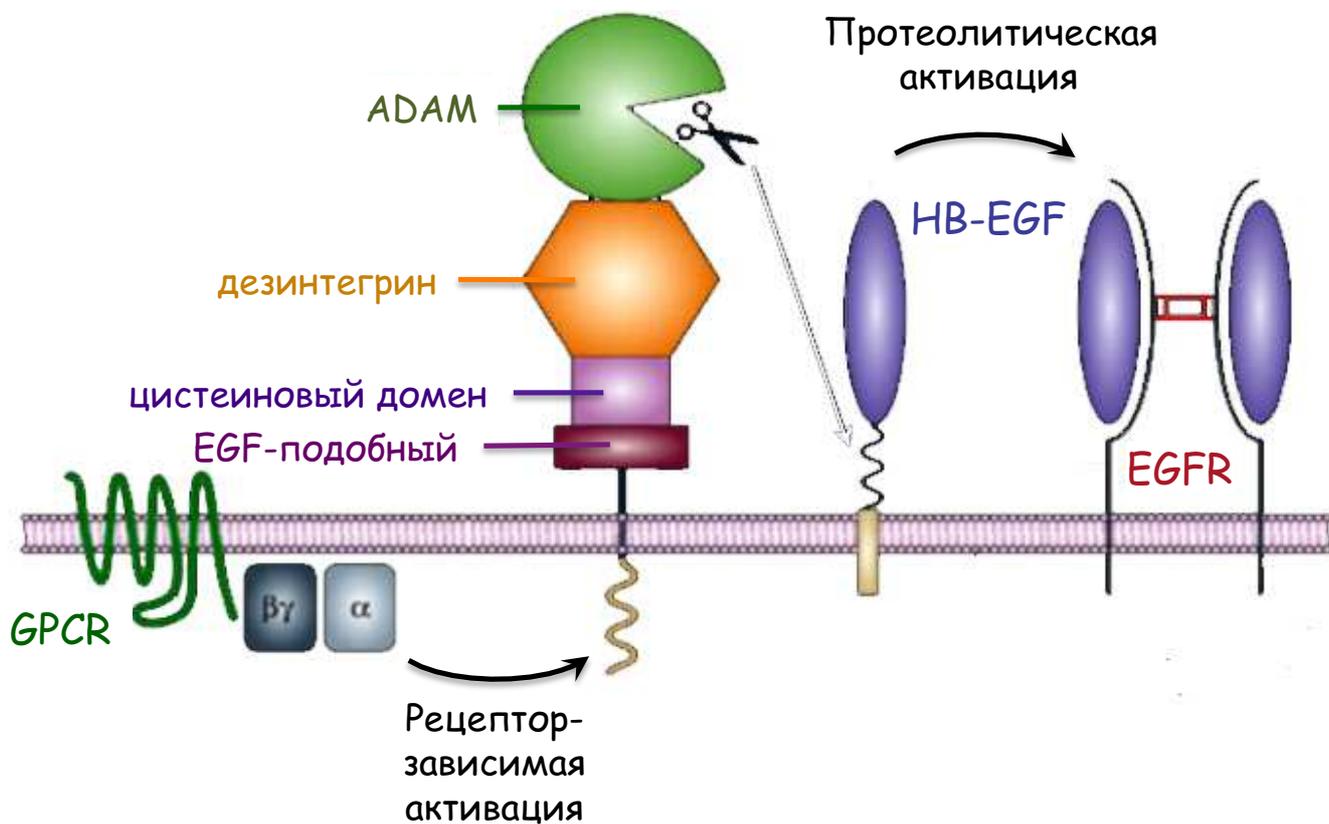
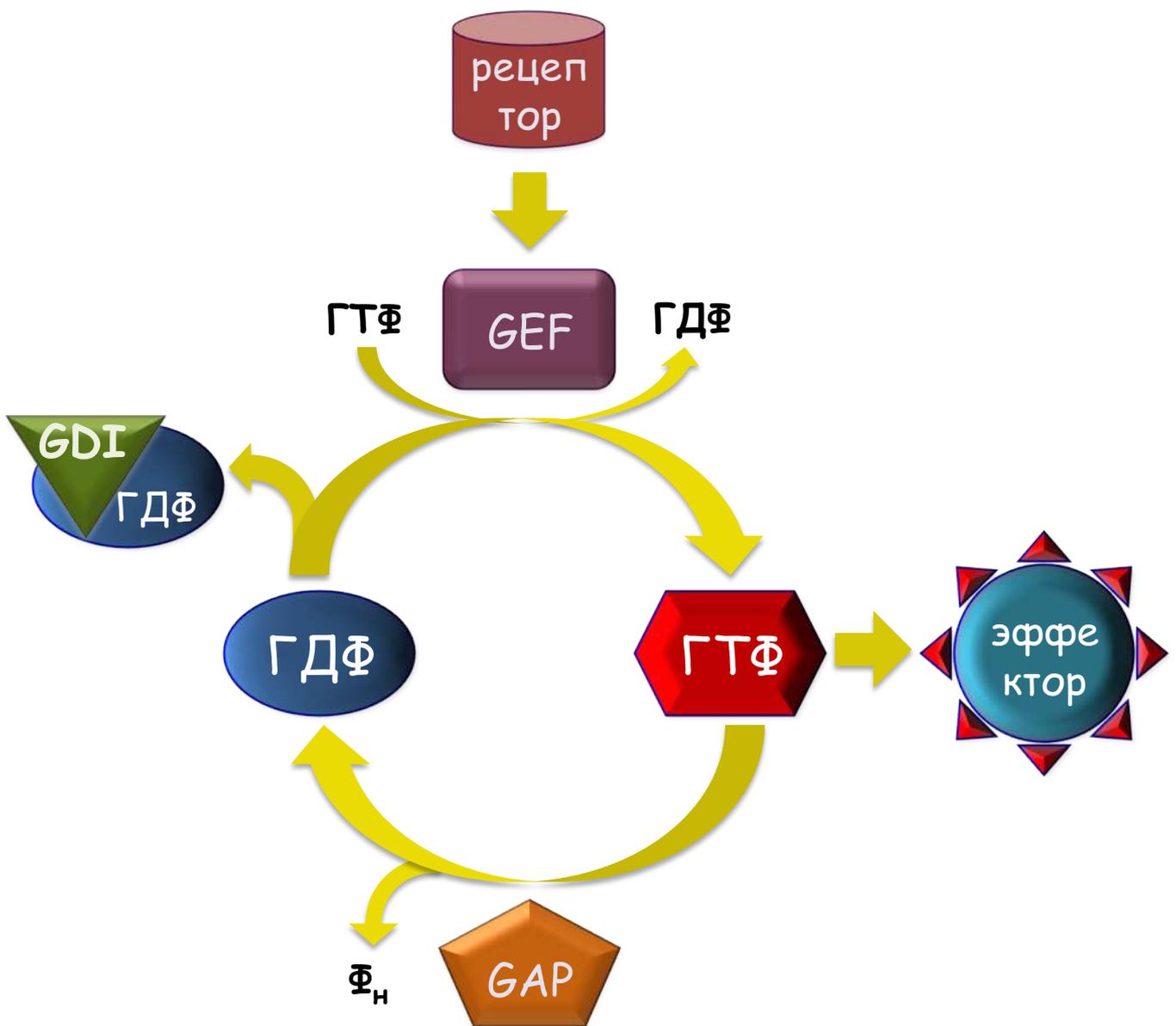


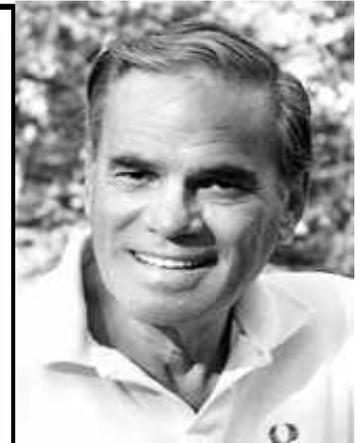
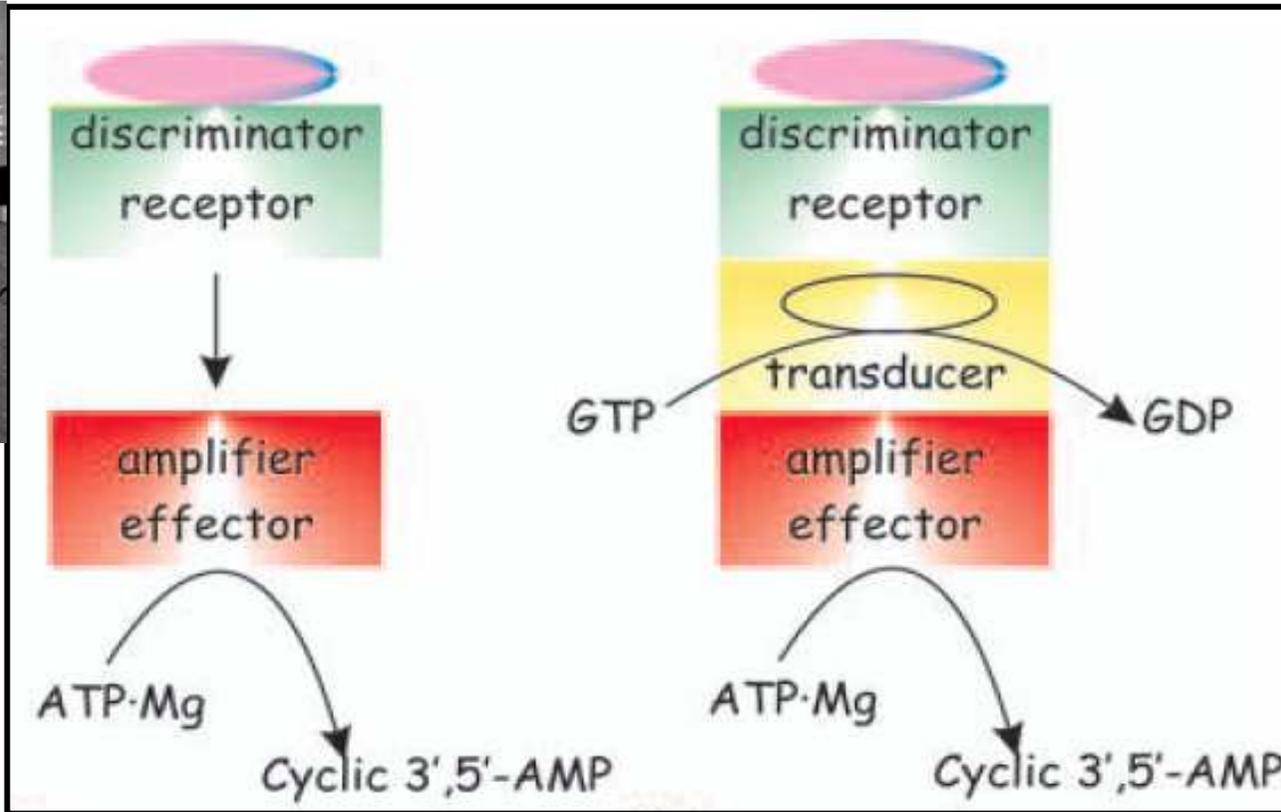
Рисунок 27

ГТФ-азный цикл G-белка





Alfred G
Gilman



Martin
Rodbell

Rodbell M , Birnbaumer L , Pohl SL , Krans HM . The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver: An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action . J Biol Chem. 1971 ; 246 : 1877 – 1882

Rodbell M . Nobel Lecture. Signal transduction: evolution of an idea . Biosci Rep . 1995 ; 15 : 117 – 133

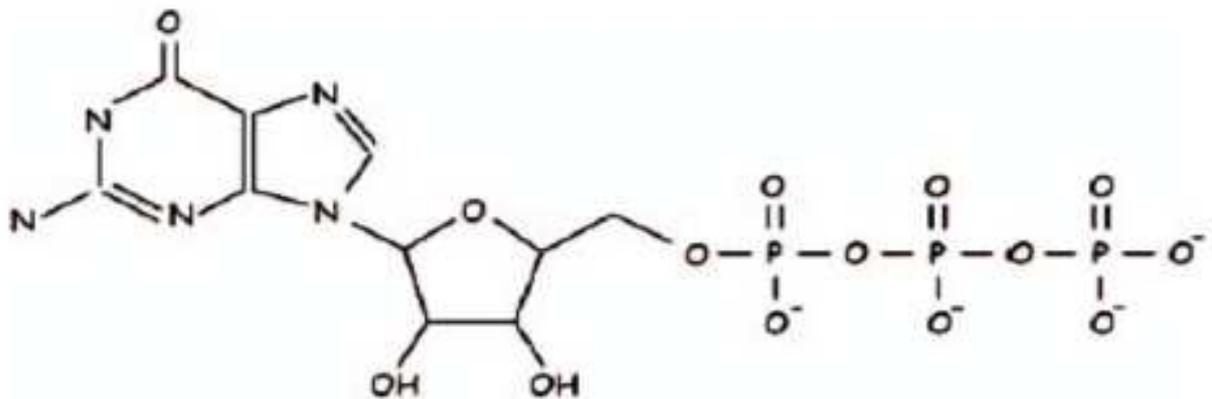
компонентам, которые Родбелл назвал дискриминатором (рецептор) и эффектором (циклаза), добавился третий – трансдьюссер (передатчик), связывающий ГТФ (Rodbel, 1995, [рис. 29](#)).

В чистом виде G-белки были впервые получены в лаборатории Альфреда Гилмана. Он работал с клетками лимфомы S49, которые не содержали α -субъединицы Gs-белка ($G_s\alpha$), хотя в то время считалось, что эти клетки не содержат аденилатциклазы, за что они и получили название *cus*-. Изолированные мембраны *cus*- клеток объединили с мембранами нормальных клеток, что привело к восстановлению циклазной активности. Прогревание донорных мембран до 30°C приводило к инактивации аденилатциклазы, но не G-белка, который оказался относительно термостабилен. Добавление фторида натрия, негидролизуемого аналога ГТФ (β,γ -метилен-ГТФ), ГТФ или ГТФ вместе с агонистом рецептора изопротеринолом приводило к успешному восстановлению циклазной активности в смеси мембран. В 1994 году Альфред Гилман разделил Нобелевскую премию по физиологии или медицине с Мартином Родбеллом за "открытие G-белков и их роли во внутриклеточной передаче сигнала".

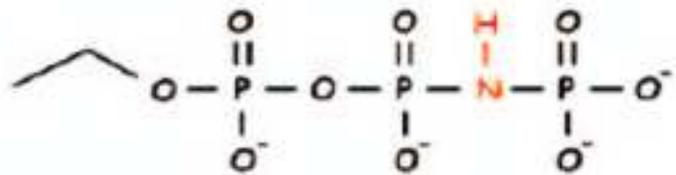
Функции G-белков в клетке не ограничиваются сигнальными. Они также регулируют синтез белка, но при этом используют несколько другой механизм. В этом случае эффектором G-белка является фактор элонгации EF-Tu, который добавляет одну аминокислоту к синтезирующемуся на рибосоме полипептиду. Каждый цикл удлинения требует инактивации и реактивации EF-Tu за счет прохождения G-белком полного ГТФ-азного цикла. Напротив, при передаче сигнала G-белок связывает ГТФ и образует относительно стабильный комплекс с ферментом-эффектором, который постоянно активен до тех пор, пока ГТФ не гидролизуется до ГДФ в активном центре G-белка. Различие механизмов отчетливо проявляется при использовании негидролизуемого аналога ГТФ ($GTP\gamma S$), который конститутивно активирует Gs-белок и аденилатциклазу, в то время как $GTP\gamma S$ в комплексе с EF-Tu стимулирует только один шаг удлинения полипептидной цепочки и дальше становится блокатором синтеза.

Негидролизуемые аналоги ГТФ являются незаменимым инструментом и широко используются для структурно-функциональных исследований G-белков. $GTP\gamma S$, β,γ -метилен-ГТФ и β,γ -имино-ГТФ ([рис. 30](#)) очень медленно или вовсе не гидролизуются ГТФ-азами. Они фиксируют G-белки в активной форме; то есть в постоянно "включенном" состоянии. Для внутриклеточной передачи сигнала это означает постоянную активность сигнального каскада, за активацию которого отвечает данный G-белок. Во многих случаях участие и роль G-белков в цепи сигнальных событий выяснялись по эффекту, оказываемому негидролизуемым аналогом. Негидролизуемые аналоги ГТФ оказались также не менее важными для определения активной конформации G-белка. Их способность образовывать стабильные комплексы с разными ГТФ-азами позволила

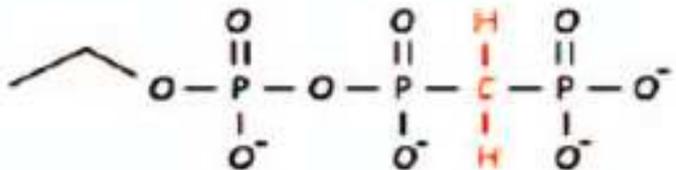
Негидролизуемые аналоги ГТФ



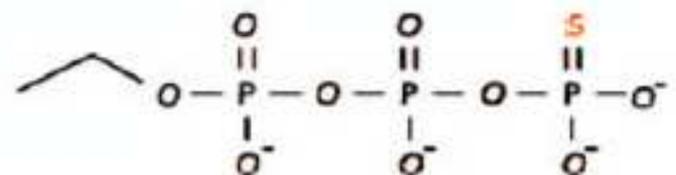
GMP.PNP
(βγ-имидо-ГТФ)



GMP.PCP
(βγ-метилен-ГТФ)



GTPγS



кристаллизовать их в активной форме и определить пространственную структуру с помощью рентгеновской дифракции.

ГТФ-азный цикл составляет механизм действия G-белков (рис. 28). В отсутствие внешних воздействий G-белки связаны с ГДФ. Приходящий от активированного рецептора сигнал вызывает диссоциацию ГДФ. Быстрое последующее связывание ГТФ предпочтительно, поскольку концентрация ГТФ в клетке существенно выше, чем ГДФ. Кинетика гидролиза и диссоциации ГТФ определяет время, в течение которого ГТФ-азный переключатель находится во включенном состоянии.

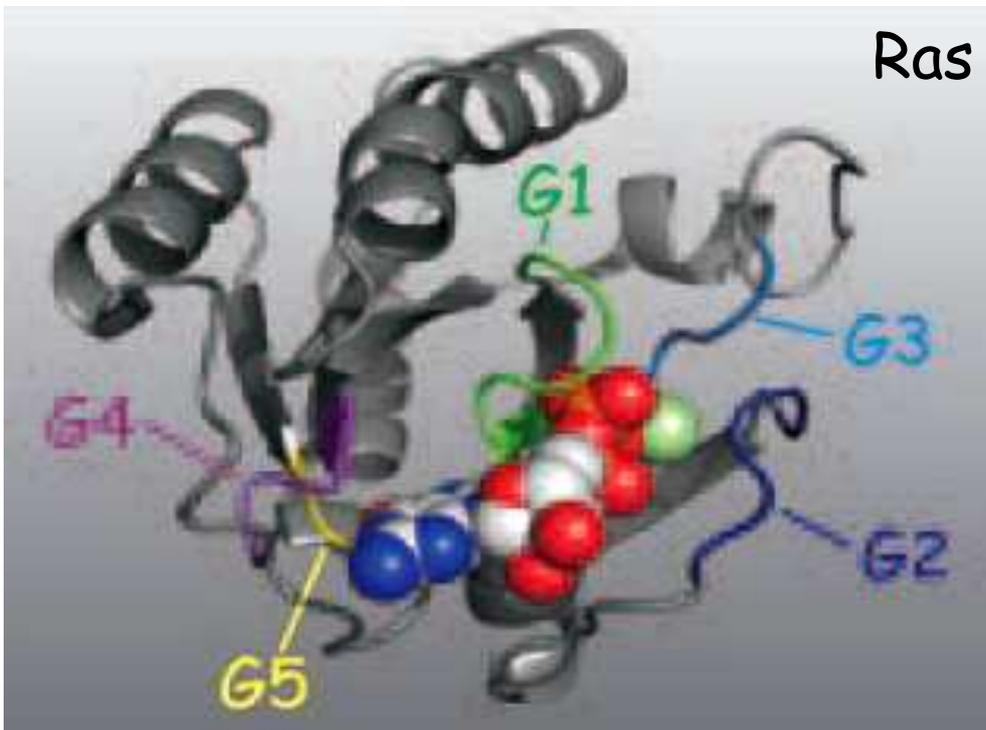
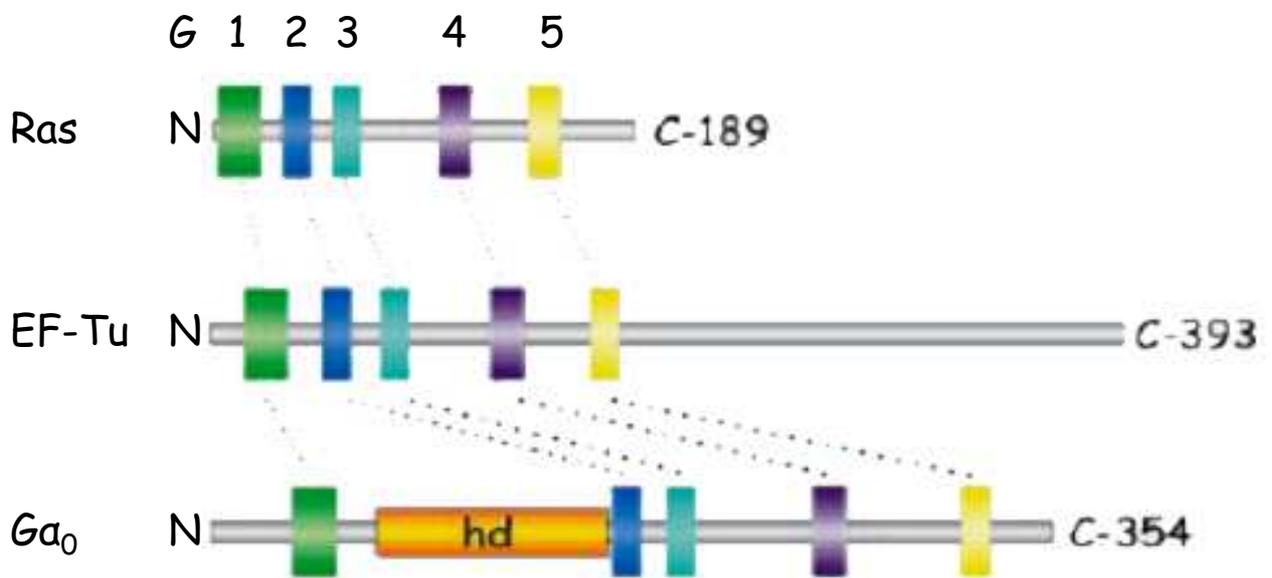
Скорость-лимитирующими в ГТФ-азном цикле являются две стадии – диссоциация нуклеотида и гидролиз ГТФ. Поэтому все основные регуляторные воздействия направлены на именно на эти стадии. Как правило, активированный рецептор направляет сигнал на первую из них, стимулируя замену ГДФ на ГТФ в активном центре G-белка (рис. 28). Гораздо реже рецептор инактивирует G-белок, стимулируя гидролиз ГТФ. Соответственно, существует два основных типа белков (GEF и GAP), принимающих сигнал от рецептора и регулирующих эти две стадии ГТФ-азного цикла. Кроме них, есть один дополнительный класс регуляторов (GDI); они работают только с некоторыми G-белками, по другому механизму и вне ГТФ-азного цикла. Передача сигнала от рецептора происходит не прямо на G-белок, а на эти регуляторные факторы. Клетка использует широкий набор GAP, GEF и GDI для того, чтобы направить сигнал к нужному G-белку. Точно также, как и в случае лиганд-рецепторных взаимодействий, один рецептор может использовать несколько разных GAP и GEF, а один G-белок – регулироваться несколькими GAP и GEF, принимающими сигналы от разных рецепторов. Это дает возможность регуляторным факторам выполнять функцию распределителей сигнала, а клетке формировать с их помощью переплетенные и взаимосвязанные сигнальные сети.

G-белки имеют высокое сродство к нуклеотидам, но низкую скорость их обмена. *Фактор обмена гуаниловых нуклеотидов* (GTP exchange factor, GEF) снижает сродство к ГДФ, ускоряя его диссоциацию из активного центра G-белка на несколько порядков. ГТФ быстро встраивается на место ушедшего нуклеотида, поскольку концентрация ГТФ в клетке существенно выше чем ГДФ. Время гидролиза ГТФ и диссоциации неорганического фосфата определяет продолжительность включенного состояния G-белка. *Фактор активации ГТФ-азы* (GTP activating factor, GAP) ускоряет гидролиз ГТФ и сброс фосфата, переводя G-белок в неактивную ГДФ-связанную конформацию. ГТФ-азы семейств Rho и Rab дополнительно регулируются ингибиторами диссоциации ГДФ (GTP dissociation inhibitor, GDI). GDI затрудняет пренилирование этих малых G-белков и таким образом вызывает их накопление в цитоплазме. Для Rab белков также описаны

специальные факторы GDF (GTPase displacement factor), которые затрудняют уход этих малых ГТФ-аз с везикул.

Связывание нуклеотидов происходит в участках G-белков, имеющих консервативную структуру и очень сходных в таких разных G-белках как малые ГТФ-азы (например, Ras), α -субъединица гетеротримерного G-белка и EF-Tu (рис. 31). Все три суперсемейства ГТФ-аз различны по структуре, но имеют короткие гомологичные последовательности G1 – G5. При упаковке в пространстве эти сегменты почти накладываются друг на друга, вместе формируя нуклеотид-связывающий карман. У тримерных ГТФ-аз участки G1 и G2 разделены α -спиральным доменом (*hd*). Последовательности G2 and G3 находятся внутри так называемых "переключательных" локусов (switch 1 и switch 2), которые претерпевают основной конформационный переход при замене ГДФ на ГТФ и "включают" активность G-белка. В белке Ras участок G2 представлен остатками 26–45. Они образуют эффекторный интерфейс, который опосредует взаимодействие с белками-мишенями. Его остатки 30–40 одинаковы во всех разновидностях Ras-белка, от дрожжей до млекопитающих. Если в них происходит мутация, то образующиеся белки как правило неактивны, по крайней мере в отношении трансформации клеток *in vitro*.

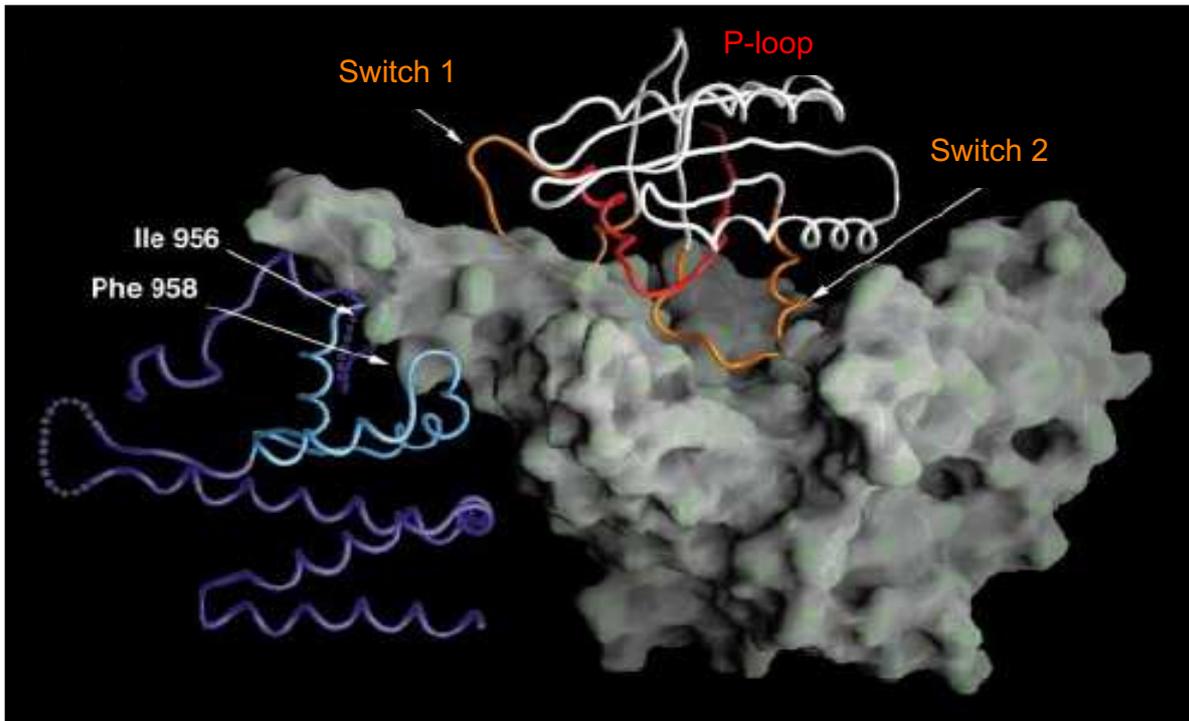
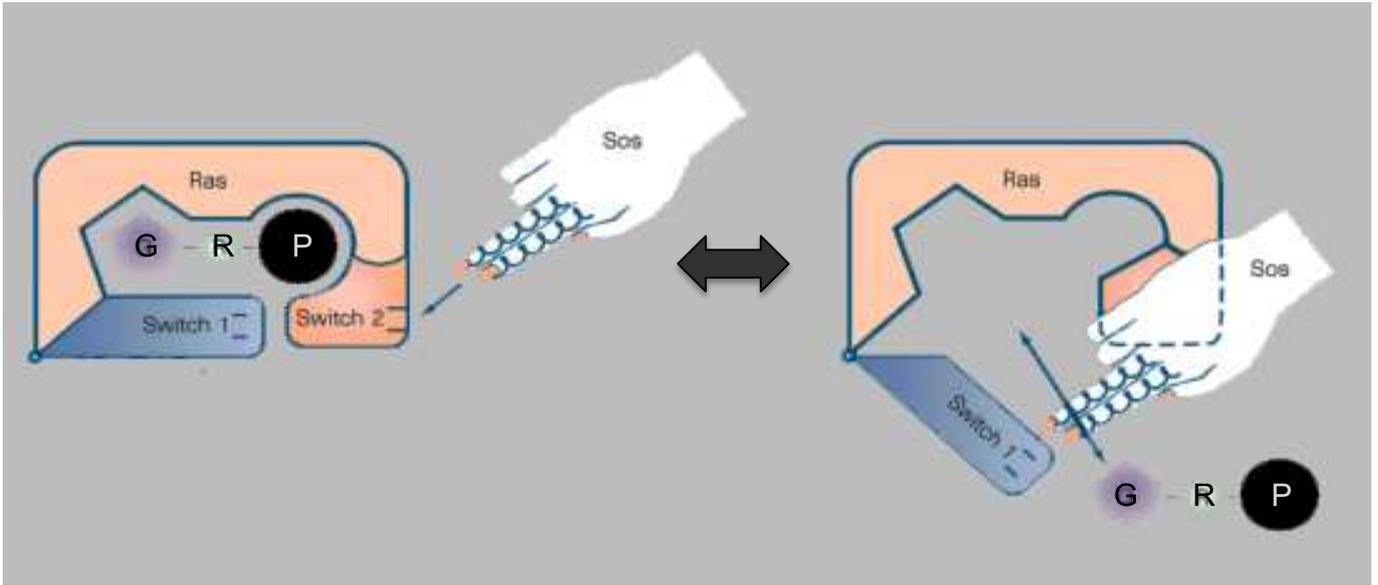
Механизм активации G-белков наиболее хорошо изучен на примере белка Ras. Белок SOS (Son of sevenless, получил название от соответствующего гена дрозофилы) является фактором обмена нуклеотидов (GEF) для Ras. Он локализован в цитоплазме покоящихся клеток. При активации рецепторов факторов роста, Sos рекрутируется на плазматическую мембрану, где располагается Ras. Нуклеотид связан с основным участком Ras через гуаниловое основание (G) и с дополнительным участком через Mg^{2+} -фосфат (P), тогда как рибоза (R) в связывании практически не участвует (рис. 32). Константа скорости диссоциации нуклеотида составляет около 10^{-5} сек; это означает, что без катализа диссоциация может протекать часами. SOS снижает сродство к нуклеотиду и увеличивает скорость его диссоциации на несколько порядков, так что весь процесс занимает меньше секунды. При этом Sos образует с Ras-ГДФ комплекс и связывается в области второго "переключательного" домена (Switch 2), блокируя вход фосфатного хвоста нуклеотида и иона Mg^{2+} (который нужен для прочного связывания) внутрь связывающего кармана. В то же самое время SOS использует выступающую как палец α -спиральную петлю для того чтобы сдвинуть в сторону первый "переключательный" домен (Switch 1) так сильно, что полностью открывает ту часть кармана, в которой связывается основание. В результате связывание основания значительно ухудшается и нуклеотид диссоциирует. Поскольку концентрация ГТФ в клетке существенно выше, чем ГДФ, то происходит замещение нуклеотида. После этого конформация Ras-ГТФ изменяется так, что SOS диссоциирует.



Пространственная структура комплекса H-Ras и части SOS1 человека показана на [рис. 32](#), внизу. SOS1 состоит из каталитического C-домена, отвечающего за обменную активность (серый), и N-домена, который не взаимодействует с Ras и выполняет чисто структурную функцию (синий слева). Консервативные остатки Pe-956 и Phe-958 на одной стороне C-домена SOS1 образуют гидрофобный интерфейс с N-доменом. Другая сторона C-домена связывает Ras в области между его "переключательными" доменами Switch 1 и Switch 2, "раздвигая" их и ослабляя связывание нуклеотида. Нуклеотид координируется Р-петлей (P-loop), которая также оказывается вблизи поверхности SOS1.

Существует две группы сигнальных ГТФ-аз. К первой относятся *гетеротримерные G-белки*. Они построены из трех разных субъединиц (α , β , и γ) и сопрягаются (взаимодействуют и работают вместе) с серпентиновыми рецепторами типа GPCR. Активация GPCR вызывает связывание тримерного G-белка с рецептором и замену молекулы ГДФ на молекулу ГТФ в активном центре α -субъединицы. Активация α -субъединицы ведет к ее диссоциации из G-белкового комплекса. Поскольку именно α -субъединица опосредует связывание всего комплекса с рецептором, то остающийся бинарный комплекс $\beta\gamma$ субъединиц также приобретает независимость. В результате разделения на α -субъединице и комплексе $\beta\gamma$ открываются участки связывания, которые вступают во взаимодействие со своими непосредственными мишенями. Замена ГДФ на ГТФ и гидролиз ГТФ в α -субъединице ускоряется под действием GEF и GAP, специализированных для тримерных G-белков.

Мономерные (или малые) G-белки составляют вторую группу ГТФ-аз. Геном человека содержит более 150 членов этого суперсемейства ([рис. 33](#)). Эволюционно консервативные ортологи обнаружены и подробно описаны у *Drosophila*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, амёбы *Dictyostelium* и растений. Первые представители этого суперсемейства ГТФ-аз были обнаружены в 1980-е годы в разных лабораториях. Ras-белок был открыт первый как онкоген (1980), за ним последовали Rab как YPT1-белок дрожжей (1983-1987), Arf (1984-1986) и Rho (1985). Роберт Вайнберг (Robert Weinberg) ([рис. 33](#)) известен своими пионерскими открытиями первых онкогенов человека, а также считается открывателем первого гена опухолевого супрессора. Онкогены вызывают неопластическую трансформацию и превращают нормальную клетку в раковую, а супрессоры препятствуют этому превращению. В конце 1970-х годов Майкл Бишоп (Michael Bishop) и Харолд Вармус (Harold Varmus) ([рис. 33](#)) исследовали процесс трансформации клеток вирусом саркомы. Они выяснили, что ген вируса (*v-src*), вызывающий неопластическую трансформацию инфицированных клеток, изначально оказался в геноме вируса после захвата им нормального клеточного гена (прото-онкогена). Последующая мутация этого гена превратила его в онкоген. В 1989 году М.Бишоп и Х.Вармус получили Нобелевскую премию "за открытие



клеточной природы ретровирусных онкогенов", а позднее Вармус стал директором НИИ (Национальных Институтов Здоровья США). Р.Вайнберг премию не получил, хотя до сих пор считается одним из основных авторитетов в молекулярной онкологии. Алан Холл (рис. 33) известен последующим открытием Rho-семейства малых ГТФ-аз, и выяснением их ключевой роли в поддержании морфологии и регуляции двигательной активности клеток.

По структурному сходству выделяют 5 основных групп малых ГТФ-аз: Ras, Rho, Rab, Ran and Arf. К дополнительной шестой группе относится ГТФ-аза Miro: по-существу, она является Rho-белком митохондрий, расположена на их поверхности и регулирует транспорт, по-видимому, контролируя Ca^{2+} -зависимое связывание кинезина с митохондриями. Все малые ГТФ-азы используют один механизм, работая как молекулярные включатели-выключатели. Многие из них посттрансляционно модифицированы липидами, которые служат для транслокации и заякоривания малых G-белков на клеточных мембранах. Например, большинство белков Ras и Rho несут C-концевую последовательность CAAX (где C=Cys, A=алифатический и X=любой остаток). Этот остаток Cys модифицируется фарнезилтрансферазой и геранилгеранилтрансферазой I. Они, соответственно, ковалентно присоединяют фарнезильный и геранилгеранильный изопреновые якоря. Белки Rab-семейства имеют на C-конце CC, CXC, CCX, CCXX или CCXXX последовательности, узнаваемые геранилгеранилтрансферазой II. Некоторые члены Arf-семейства несут на N-конце миристоильный якорь.

Белки Ras семейства (Ras, Rap, R-Ras, Ral и Rheb) действуют в цитоплазме, регулируя активность сигнальных каскадов, которые контролируют экспрессию генов, рост, пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток. Ras-белки являются чисто сигнальными распределителями; Rheb (Ras homolog enriched in brain) участвует в активации комплекса mTOR и, таким образом, в регуляции метаболизма клетки. Rap-белки обеспечивают альтернативную сигнализацию цАМФ через белки Erac. Ral-белки регулируют секреторную машину (сборку и активность экзоцита).

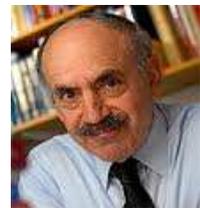
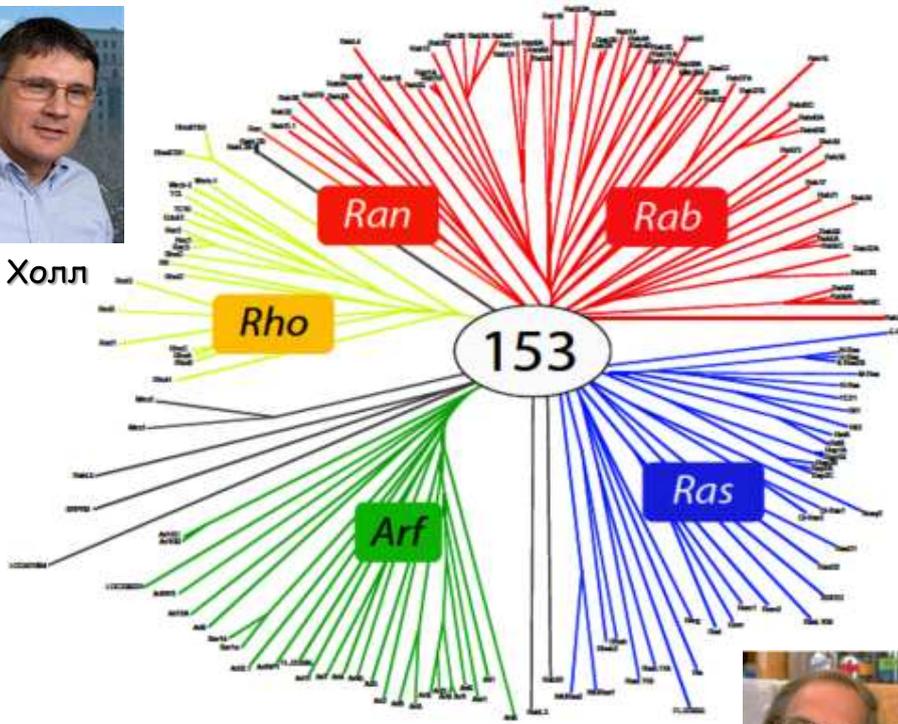
ГТФ-азы Rab контролируют транспорт и сортировку везикул в разных компартментах клетки, в том числе Rab1 – в эндоплазматическом ретикулуме и комплексе Гольджи, Rab3A – секреторные везикулы, Rab4 и Rab5 – ранние эндосомы и клатриновые везикулы, Rab7 – поздние, а Rab11 – рециклирующие эндосомы.

Rho-семейство насчитывает более 20 членов; наиболее изучены RhoA, Rac1 и Cdc42. Они передают сигналы от рецепторов к цитоскелету, регулируя его динамику, морфологию и движение клеток. RhoA вызывает образование актиновых стресс-фибрилл и фокальных адгезий; Rac1 регулирует образование ламеллиподий и разветвленную сеть актиновых филаментов внутри них;

Малые ГТФазы



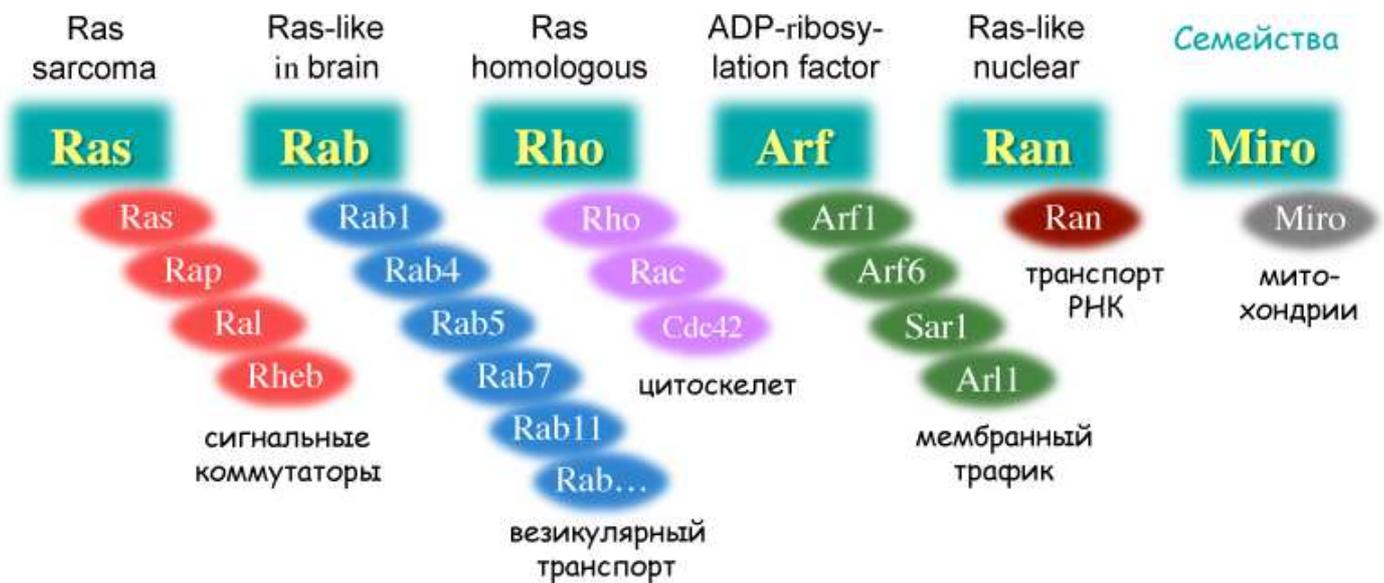
А. Холл



Р. Вайнберг



М.Бишоп и Х.Вармус



Cdc42 контролирует образование филоподий и первые стадии выдвижения мембраны в направлении движения клетки.

Arf-белки являются АДФ-рибозилирующими факторами, участвующими в регуляции везикулярного транспорта. Arf1 регулирует образование везикул, покрытых COPI белком (coat protein I) – они осуществляют ретроградный транспорт от ЭПР к системе Гольджи, а также везикул, покрытых клатрином и адаптерным белком AP1 в сети транс-Гольджи (TGN). Arf6 выполняет другую функцию и регулирует сборку актина на везикулах и эндоцитоз. Sar1 действует аналогично Arf1, контролируя образование COPII-покрытых везикул, осуществляющих транспорт от Гольджи к ЭПР. Arl1 регулирует трафик мембран.

ГТФ-аза *Ran* (1 представитель) регулирует транспорт РНК и белков через ядерные поры, а также синтез ДНК и клеточный цикл.

Сигнал поступает в клетку каскадным или эстафетным способами

Принципиально, существует три варианта элементарного акта передачи сигнала; каждый из них призван решить одну из трех главных задач. *Активация ферментов* служит для усиления сигнала, т.к. один фермент обрабатывает много молекул субстрата. К таким ферментам относятся ГТФ-азы (G-белки), киназы (фосфотрансферазы) и фосфатазы (фосфогидролазы), циклазы (циклизующие фосфоуглеводную часть нуклеотидов) и другие. Киназы и фосфатазы могут находиться в составе самих рецепторов, или функционировать отдельно, связывая активированные рецепторы. *Адаптерные молекулы* – специальные посредники, обеспечивающие специфичность передачи сигнала путем докинг-взаимодействий за счет отказа от его усиления. Открытие (или закрытие) *ионных каналов* обеспечивает быстроту и усиление сигнала при низкой специфичности.

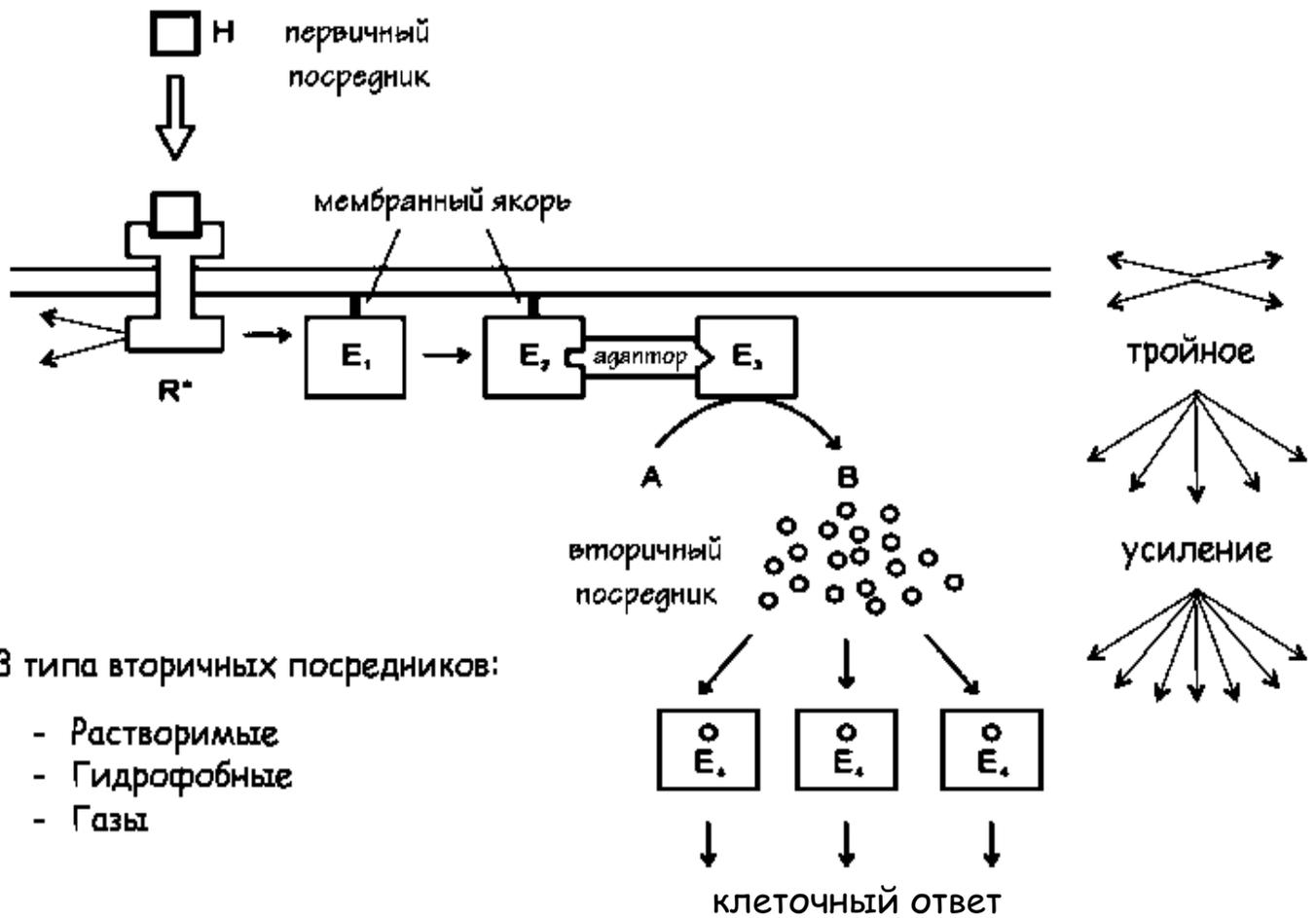
Каскадный принцип передачи заключается в том, что переход одного из участников сигнального каскада в активное состояние ведет к изменению активности следующего компонента. Обычно эти изменения имеют векторный характер; их механизм может быть чисто структурным (изменение конформации молекулы) или ферментативным (снижение или повышение удельной активности фермента). Уникальность структурных перестроек определяется высокоселективным узнаванием (докинг-взаимодействиями) участников каскада, обеспечивая специфичность передачи сигнала. Характерной особенностью каскадного механизма является усиление сигнала. Его обеспечивают ферментативные реакции, обязательно используемые на одном из его этапов. Основными исполнителями ферментативных реакций являются протеинкиназы, фосфорилирующие в белках-мишенях остатки серина, треонина и тирозина. Липидные и углеводные киназы также выступают участниками некоторых каскадов, но в целом используются реже. Соответствующие фосфатазы

нейтрализуют действие киназ, дефосфорилируя сигнальные молекулы. Фосфорилирование и киназы используются, как правило, для активной сигнализации, а фосфатазы для ее прерывания. Однако существуют и обратные примеры, например, тирозинфосфатазные рецепторы запускают передачу сигнала.

Эстафетный способ передачи сигнала несколько отличается от каскадного и задействует иных участников. Он широко используется в двухкомпонентных регуляторных системах прокариот для восприятия информации о внешней среде (питательных веществах, поведенческих сигналах, хемоаттрактантах, антибиотиках и др.), тогда как у эукариот найдены только одиночные примеры. Как правило, такие системы состоят из мембранной *гистидин-киназы* (ГК), выполняющей роль специфического рецептора, и соответствующего *регулятора ответа* (РО). Они вместе буквально "переносят" сигнал внутрь клетки, передавая его "с рук на руки" и запуская избирательную экспрессию генов-мишеней. Передача происходит посредством переноса фосфорильного остатка от молекулы АТФ на определенный остаток гистидина в ГК путем самофосфорилирования. После этого ГК переносит эту же фосфатную группу на остаток аспартата в РО. Фосфорилирование вызывает такое изменение конформации РО, при котором активируется один из его доменов, по существу выполняющий функцию транскрипционного фактора. Активность РО прямо зависит от уровня его фосфорилирования.

Вторичные посредники усиливают сигнал

Система вторичных посредников – это способ внутриклеточной сигнализации, при котором в клетке быстро образуется легко диффундирующая сигнальная молекула; она активирует эффекторные внутриклеточные белки, отвечающие за дальнейшее проведение сигнала. Системы вторичных посредников могут активироваться разными способами: либо включением ферментов, их синтезирующих (как в случае циклаз, синтезирующих циклические нуклеотиды), либо путем открытия ионных каналов, как в случае Ca^{2+} -сигнализации. В дополнение к передаче сигнала, вторичные посредники существенно его амплифицируют. Сигнальные системы с использованием вторичных посредников имеют обычно три уровня усиления сигнала (рис. 34). Первое усиление происходит на уровне мембраны. Пока рецептор связан с лигандом, он активирует несколько мишеней (например, G-белков), которые, в свою очередь, активируют несколько эффекторов (в случае G-белков, пока ГТФ находится в активном центре). Эти эффекторы составляют второй, и самый мощный, уровень усиления сигнала. Как правило, они являются ферментами с высокой каталитической силой и числом оборотов; в их задачу входит синтез многочисленных вторичных посредников. Наконец, третий этап усиления обычно реализуется в цитозоле, где каждый вторичный посредник воздействует на несколько конечных мишеней такого сигнального каскада.



3 типа вторичных посредников:

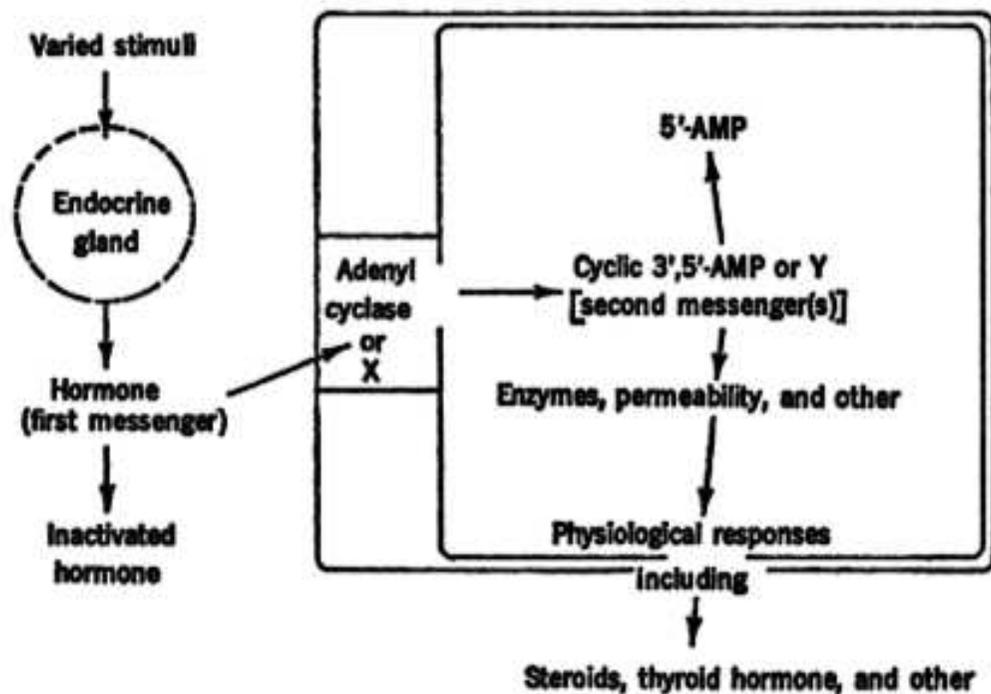
- Растворимые
- Гидрофобные
- Газы

Выделяют 3 группы вторичных посредников. Гидрофильные молекулы (цАМФ, цГМФ, IP₃, Ca²⁺, H₂O₂) действуют в цитозоле. Гидрофобные молекулы (такие как диацилглицеролы ДАГ и фосфатидилинозитолы PIP_n) действуют локально в мембранах. Газы (оксид азота NO и углерода CO) являются короткоживущими, но относительно стабильными, продуктами активных форм кислорода; они растворимы в цитозоле и могут проникать туда извне через клеточные мембраны.

История открытия вторичных посредников восходит к Эрлу Сазерлэнду (Erl W. Sutherland, Jr.) (рис. 35), который в 1958 г. сделал открытие, приведшее его к Нобелевской премии по физиологии или медицине 1971 года. Именно тогда Сазерлэнд получил вещество, которое он назвал циклическим АМФ (цАМФ), и доказал, что оно опосредует действие адреналина в печени. Вместе с Тэдом Роллом (Ted Rall) он выделил некий термостабильный фактор, который повышал активность гликогенфосфорилазы в гомогенатах печени. Последующий химический анализ показал, что это вещество представляет собой аденинрибонуклеотид, но с необычными свойствами. Сазерлэнд написал Леону Хэппелю (Leon Heppel) в надежде, что тот поможет с определением структуры. Примерно в то же время Хэппель написал Дэвид Липкин (David Lipkin); который описал новый нуклеотид, полученный им при обработке АТФ гидроокисью бария. Хэппель догадался, что Сазерлэнд и Липкин работают с одним веществом, которым и оказался аденозин 3,5-монофосфат, известный сейчас как циклический АМФ, или цАМФ.

Сазерлэнд обнаружил фермент, который образует цАМФ, и назвал его *аденилатциклазой*. Согласно схеме Сазерлэнда, показанной на рис. 35, адреналин связывается с рецептором, который стимулирует аденилатциклазу, вызывая образование цАМФ, который уже и оказывает действие, активируя фосфорилазу. Позже Сазерлэнд предсказал, что подобная схема описывает действие многих гормонов, которые не входят в клетку, а действуют снаружи на поверхностные рецепторы и вызывают образование цАМФ. Сначала эта гипотеза была подвергнута сильной критике, поскольку сложно было представить, что один вторичный посредник может приводит к целому спектру клеточных реакций. Однако со временем она была не раз подтверждена и Сазерлэнд был удостоен Нобелевской премии. Несколько позже Сазерлэндом были сформулированы критерии, которым должна удовлетворять любая молекула – кандидат во вторичные посредники. Эти базовые критерии незначительным образом переформулируются и дополняются, но остаются актуальными и до сих пор (рис. 35).

Вторичные посредники должны иметь высокую скорость синтеза и распада: при низкой скорости метаболизма они не будут успевать за быстрыми изменениями в стимуляции рецептора. На рис. 36 показаны теоретические зависимости динамики четырех абстрактных вторичных посредников (т.е. изменения их внутриклеточной концентрации во времени) при виртуальном уменьшении или



Earl W. Sutherland, Jr. (1915-1974)
 Нобелевская премия по медицине, 1971
 "for his discoveries concerning the mechanisms of the action of hormones"



Критерии вторичного посредника:

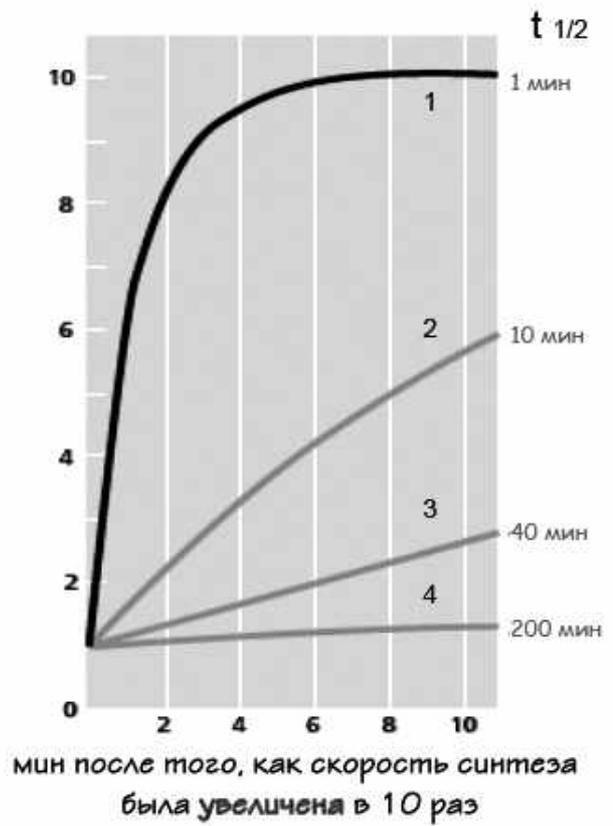
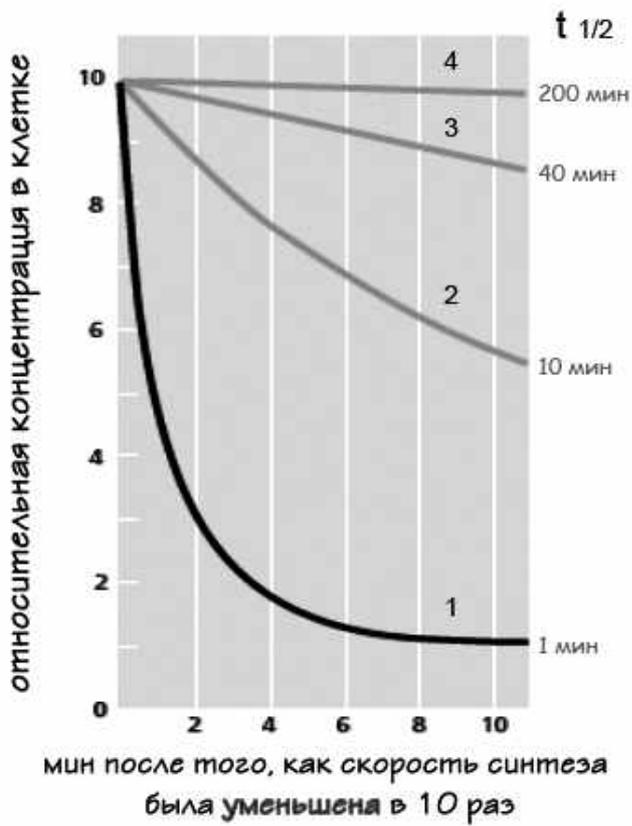
1. Имитирует действие гормона
2. Гормон стимулирует его синтез
3. Механизм синтеза / распада
4. Внутриклеточные мишени
5. Антагонист блокирует действие

Rall TW, Sutherland EW (1958) Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* **232**: 1065-1076

Sutherland EW, Rall TW (1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**: 1077-1091

Sutherland EW, Robison GA (1966) The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev* **18**: 145-161

Sutherland EW (1972) Studies on the mechanism of hormone action. *Science* **177**: 401-408



увеличении скорости их синтеза в 10 раз в нулевой момент времени. Эти вторичные посредники отличаются временем полужизни ($t_{1/2}$), отражающим скорость их распада, и показанном справа от каждого графика. В обоих случаях концентрация тех молекул, которые в норме деградируют быстро (черные кривые под №1) изменяется очень быстро, тогда как тех, которые метаболизируют медленно (серые кривые), изменяется пропорционально медленнее. Быстрый метаболизм вторичных посредников необходим клетке для быстрого реагирования как на возникновение, так и на исчезновение или смену сигнала. Обычно в тех случаях, когда нужно, чтобы кратковременная активация рецепторов давала длительные эффекты, включаются механизмы обратных связей.

Адаптерные белки обеспечивают специфичность

Использование *докинг-взаимодействий* дает альтернативный способ внутриклеточной передачи сигнала (рис. 37). Они основаны на близком (но неполном) сходстве формы и комплементарности зарядов участвующих в них молекул. В процессе таких взаимодействий реализуется известный из энзимологии принцип "рука-перчатка" (induced fit), согласно которому общий молекулярный интерфейс формируется за счет мелких конформационных изменений, "подгоняющих" друг к другу форму и размер вступающих в контакт поверхностей. Такой механизм существенно снижает энергию активации последующих конформационных переходов в молекуле-мишени, таким образом подготавливая ее и облегчая связывание следующего участника каскада.

При внутриклеточной передаче сигнала в докинг-взаимодействия вступают не только белки, но и липидные и углеводные молекулы. Для успешной реализации этого механизма природа создала специальные *адаптерные белки*, которые и опосредуют эти взаимодействия. Структурный дизайн этих белков полностью отвечает задаче множественных индуцированно-комплементарных взаимодействий. Эти белки обычно не обладают ферментативной активностью и их главной задачей является высокоселективное связывание других таких же белков или эффекторов сигнальных каскадов, запускаемых поверхностными рецепторами.

История открытия модульных доменов и адаптерных белков начинается с работ, в которых была обоснована концепция белковых доменов – функционально обособленных элементов третичной структуры белков, обладающих определенной активностью. Основываясь на результатах исследований гликолитических ферментов, американский рентгенолог Майкл Россмэнн (Michael Rossmann) выдвинул гипотезу о том, что белках содержат "домены", которые можно определить по следующим критериям: (1) они имеют гомологичные первичные последовательности в разных белках, (2) структурно и (3) пространственно отделены от остальной части белка, (4) имеют свою функцию и (5) свой активный центр (рис. 38). Спустя короткое время, Тони Поусон (Anthony 'Tony' Pawson) использовал с коллегами компьютерный анализ белковых последовательностей и

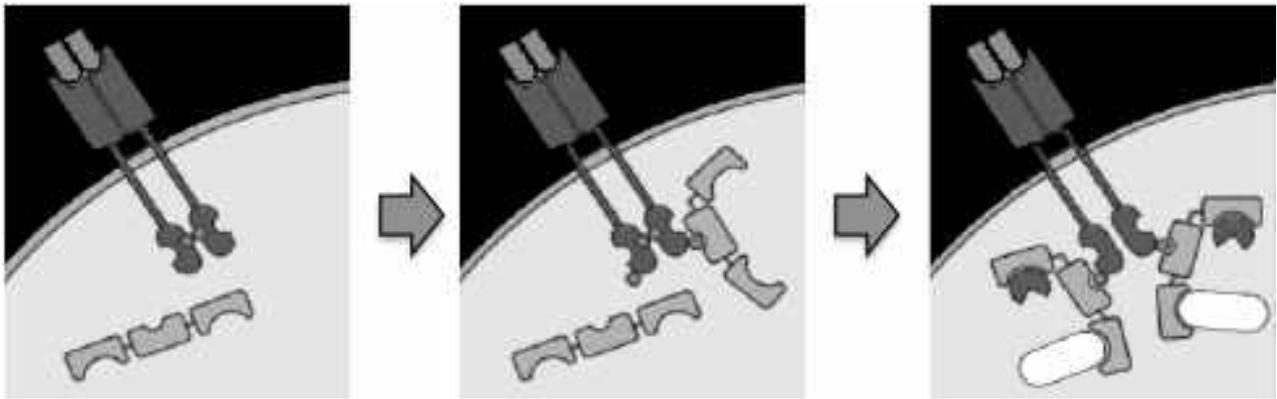


Рисунок 37



Michael G Rossmann,
Purdue Univ, USA

Критерии белкового домена:

1. Последовательности гомологичны другим белкам
2. Структурное сходство (третичная структура)
3. Пространственная обособленность
4. Функциональная независимость
5. Активный центр

Rossmann MG (1981) Evolution of glycolytic enzymes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293: 191-203



МОДУЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ
И
АДАПТЕРНЫЕ БЕЛКИ

Anthony 'Tony' Pawson,
Univ Toronto, Canada



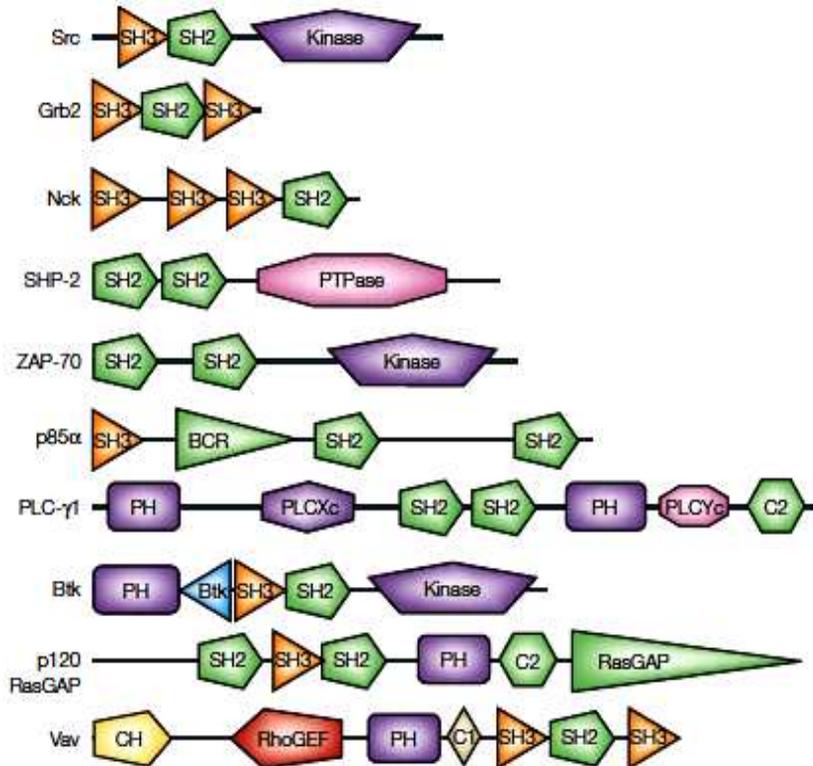
описал структуру, расположенную в N-концевой области нерецепторной тирозиновой киназы Src и в других сигнальных белках. Она получила название домена гомологии с Src-киназой 2-го типа (Src-homology 2 domain), или сокращенно SH2-домена. С помощью биохимического анализа эти исследователи продемонстрировали функции SH2 домена, и вскоре в разных белках были идентифицированы другие домены, такие как SH3, PH, WW и др., а также консервативные структуры молекул-мишеней, отвечающие за их связывание. Последующий делеционный мутагенез показал, что целостность этих белковых модулей необходима для выполнения ими своих функций, в частности для способности вирусной Src трансформировать клетки. Наконец, структурный анализ модульных доменов с помощью рентгеновской кристаллографии и ЯМР выявил активные центры внутри этих доменов и прояснил молекулярные механизмы их белково-белковых взаимодействий. В совокупности, эти данные подтвердили первоначальные предположения Майкла Россманна, позволили определить структурно-функциональные характеристики модульных доменов и показали важность белок-белковых взаимодействий во внутриклеточной передаче сигнала.

Адаптерные белки имеют *характерное строение*: они как бы "собраны" из отдельных модулей. Наиболее известные модульные домены SH2 и PTB (phosphotyrosine binding) входят в состав многих сигнальных белков (рис. 39). Полипептидные цепи этих доменов имеют сходную пространственную упаковку (рис. 40), что обеспечивает им узнавание коротких пептидных последовательностей, содержащих фосфотирозиновые остатки в других белках.

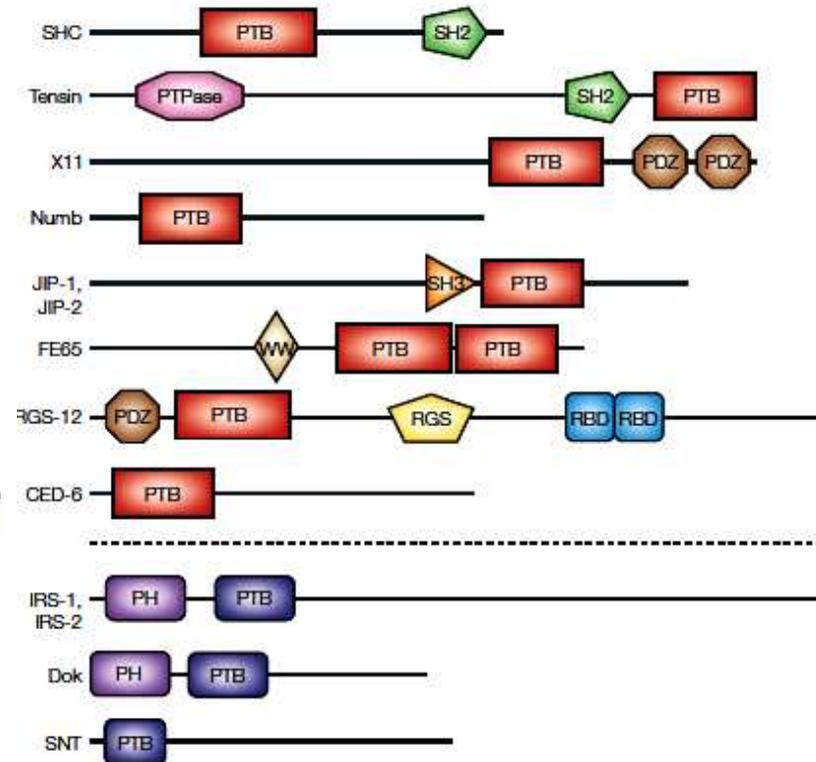
SH2 домены представляют наиболее многочисленную группу фосфотирозин-связывающих белковых доменов. Они связывают не одиночные остатки, а короткие пептидные последовательности, содержащие фосфотирозин. Фосфотирозин является главным и необходимым условием для связывания, а дополнительным и достаточным – несколько остатков, обычно примыкающих к нему с С-конца. Эти остатки определяют лигандную специфичность SH2 домена. Как и для рецепторов, в клетке существует более одного SH2 домена, подходящего для одного лиганда. Этот феномен полностью соответствует принципу индуцированных взаимодействий, согласно которому межмолекулярный интерфейс формируется только в процессе связывания.

Основу SH2 домена составляют четыре антипараллельных β -складки (рис. 40, снизу). Связанный фосфопептид "оборачивается" вокруг формируемого ими β -листа так, что фосфотирозин лежит на одной его стороне, а пять аминокислотных остатков в позициях от +1 до +5 к С-концу от Р-Туг оказываются на другой его стороне. Ключевые остатки, координирующие Р-Туг, расположены как на поверхности β -листа, так и в составе обращенной к ней боковой α A-спирали. Они консервативны для всех SH2 доменов. На другой поверхности β -листа располагается α B-спираль и

Адаптерные белки, несущие SH2-домен



Адаптерные белки, несущие PTB-домен



две дополнительных β -складки. Они выполняют каркасную функцию, но EF-петля, соединяющая эти β -складки, и VG-петля, соединяющая α -спираль с центральным β -листом, узнают пять C-концевых от P-Tyr остатков. Тем самым они определяют специфичность разных SH2 доменов к определенным фосфопептидам. Например, Src-подобные SH2 домены, входящие в состав малых тирозинкиназ Src, Fyn, Hck и Nck, узнают отрицательно заряженные группы в положениях P-Tyr+1 и P-Tyr+2, а также используют гидрофобный карман для связывания алифатического радикала в положении P-Tyr+3. Напротив, SH2 домены, гомологичные таковым в фосфолипазе C- γ 1, используют длинную гидрофобную борозду для выбора алифатических радикалов во всех пяти позициях от P-Tyr+1 до P-Tyr+5. Совсем другой способ связывания имеют Grb2-подобные SH2-домены. Они содержат объемный тирозиновый радикал, выступающий из EF-петли; он блокирует положение остатка P-Tyr+3 фосфопептида, если тот имеет вытянутую конформацию. Это заставляет фосфопептид складываться с образованием β -поворота, что достигается только при наличии остатка аспарагина (Asn) в положении P-Tyr+2.

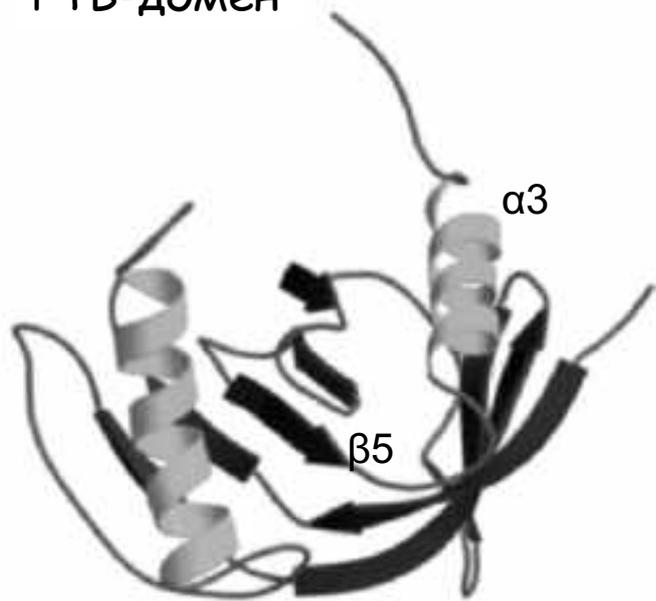
Фосфотирозин-связывающие (РТВ) домены выполняют функции, сходные с SH2 доменами. Они также узнают не только сам фосфотирозин, но и окружающие его остатки. Структурные детерминанты SH2 и РТВ доменов очень похожи, но явно отличаются. Это хорошо заметно в трехмерной структуре РТВ домена адаптерного белка Shc, находящегося в комплексе с фосфотирозин-содержащим пептидом из рецептора фактора роста нервов (TRKA). РТВ домены приобретают конформацию, удивительно похожую на упаковку доменов плекстриновой гомологии (РН), связывающих кислые фосфолипиды плазматической мембраны (см. ниже). Эти домены построены двумя параллельными β -листами, складки одного из которых перпендикулярны складкам другого. На входе в образуемую ими щель расположена C-концевая α 3-спираль. Большинство фосфопептидов связывается на входе в щель, продольно между α 3-спиралью и крайней β 5-складкой (см. [рис. 40](#)). Лигандная специфичность определяется вторичными элементами, не входящими в эту базовую структуру.

Модульный домен SH3 обычно взаимодействует с пролин-содержащими эпитопами, которые имеют консенсусную последовательность -X-P-p-X-P-, где X – алифатические остатки, P – обязательные пролины, а p – предпочтительный пролин. Эта последовательность формирует так называемую полипролиновую спираль II типа (РПИ), которая связывается с гидрофобным карманом в SH3 домене и есть у всех SH3-лигандов.

РН-домены плекстриновой гомологии, упомянутые выше, являются наиболее характерными представителями модульных липид-связывающих доменов. Они имеют около 120 остатков и были впервые обнаружены в белке плекстрине – главном субстрате протеинкиназы C в тромбоцитах.

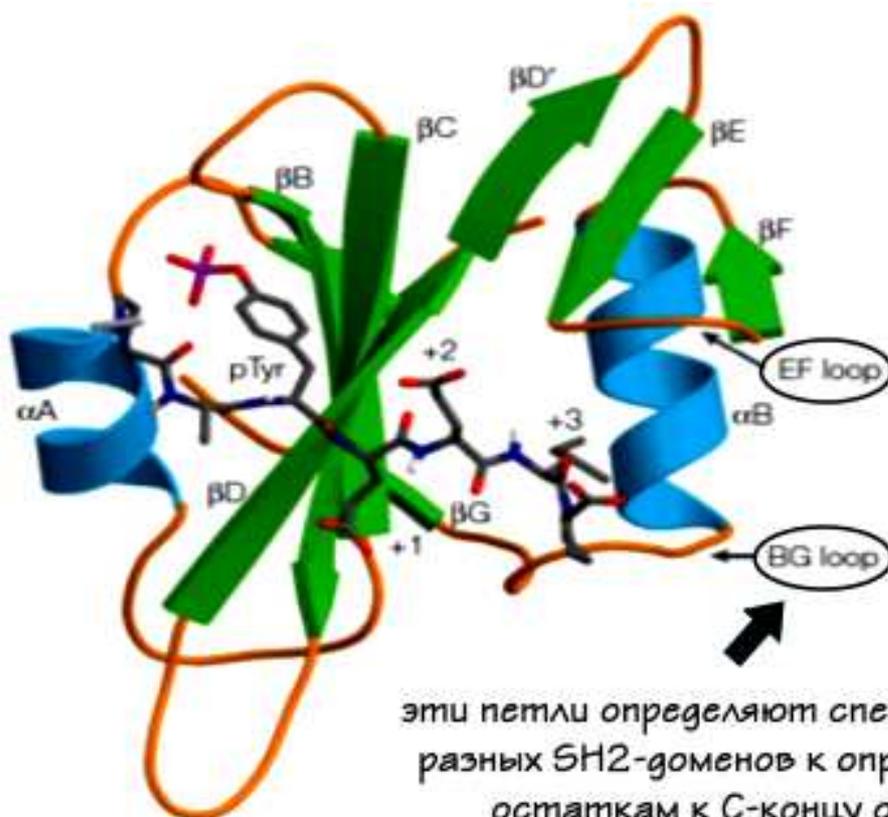
SH2-домен

PTB-домен



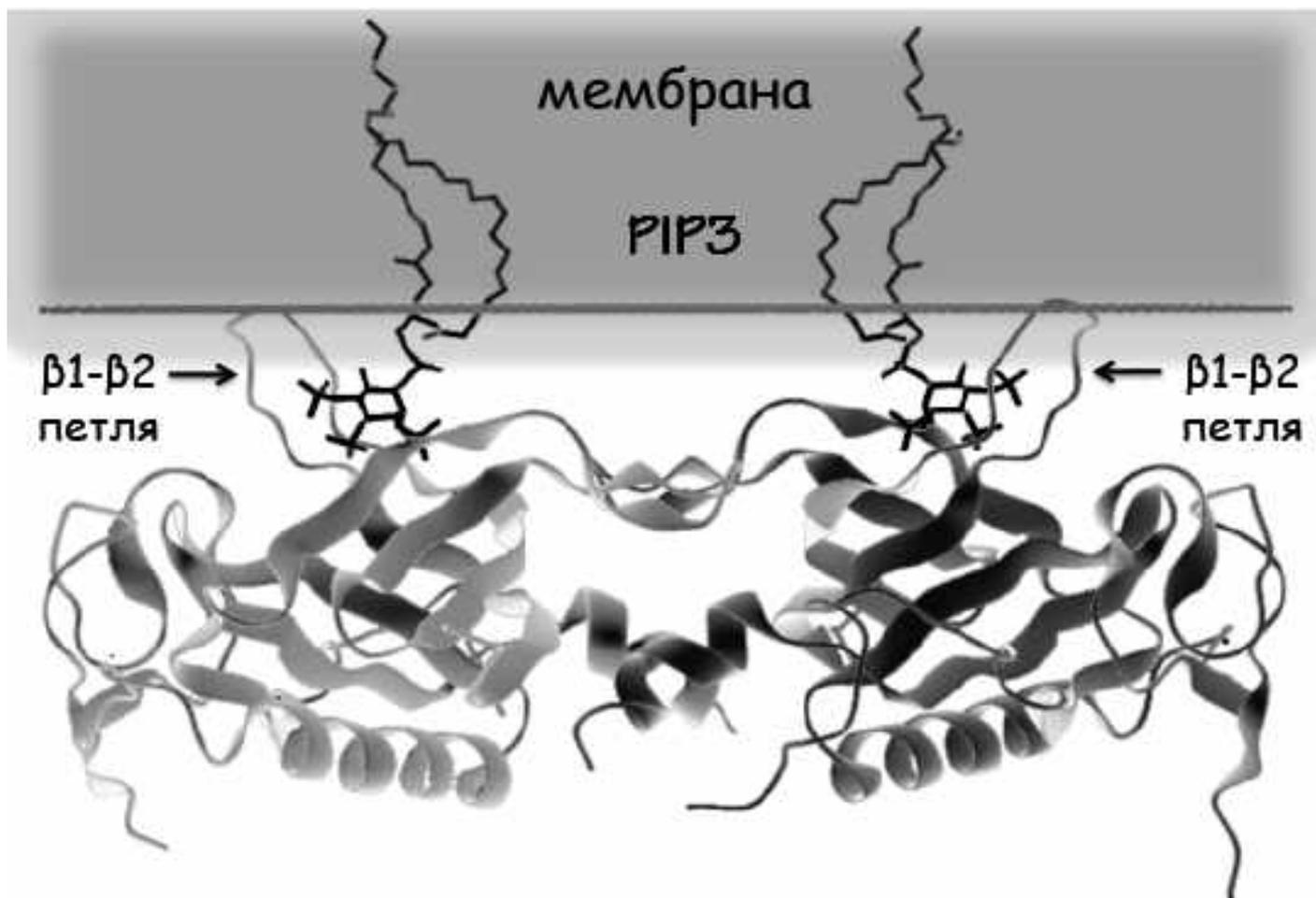
Src

Shc



эти петли определяют специфичность
разных SH2-доменов к определенным
остаткам к С-концу от Р-Тур

PH, PX и FYVE домены



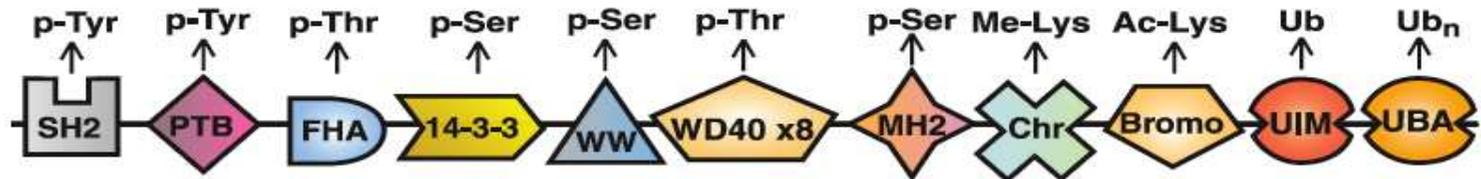
Разные PH-домены взаимодействуют с фосфатидинозитолами мембран (рис. 41), узнавая фосфаты, связанные с разными положениями инозитольного кольца. Отдельно выделяют других представителей фосфоинозитид-связывающих доменов – FYVE (от Fab1, YOYOTB, Vac1, EE A1' белков дрожжей) и PH-домены (Phox homology) НАДФН-оксидаз фагоцитов. Эти последовательности образуют характерную 7-заходную β -структуру, которая формирует сэндвич из двух β -листов. Петля между первыми $\beta 1$ и $\beta 2$ складками образует "платформу" для связывания фосфоинозитидов (см. рис. 41). Эта петля создает глубокий связывающий карман, в глубине которого располагается последовательность KXn(K/R)XR. Ее положительно заряженные радикалы координируют отрицательно заряженные фосфатные группы. Другие остатки, в том числе из остальных частей домена, создают дополнительные контакты, определяющие специфичность конкретного PH-домена к определенным фосфоинозитидам и пространственной ориентации инозитольного кольца. PH-домен тирозиновой киназы Btk (Bruton's tyrosine kinase), показанный на рис. 41, наиболее специфично узнает фосфат в 3'-положении инозитольного кольца. Именно это положение фосфорилируют PI3-киназы, активность которых контролируется поверхностными рецепторами клетки. Дефосфорилирование по 3'-положению инозитольного кольца осуществляет фосфатаза PTEN, мутации в гене которой часто являются онкогенными.

В настоящее время описаны десятки модульных доменов разных белков и сотни разновидностей каждого из них. Однотипные модульные домены разных белков обладают сходной первичной и третичной структурой и являются своеобразными "строительными блоками" внутриклеточной сигнализации. На рис. 42 приведена неполная классификация некоторых модульных доменов в соответствии с их связывающими функциями.

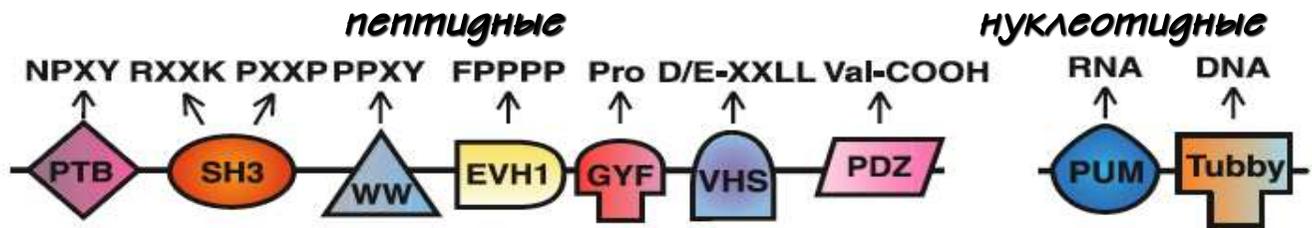
Каркасные белки организуют сигнальные модули

Функции каркасных белков (или скаффолдовых, от англ. scaffold) довольно разнообразны. Они являются частным случаем адаптерных белков и обеспечивают взаимодействия, которые приводят к формированию сигнальных комплексов и реализуются в клетке разными способами (рис. 43). В одном случае каркасный белок собирает сигнальный комплекс, включающий рецептор и/или сигнальные компоненты активируемого им сигнального каскада (рис. 43A). Тем самым эффективность нужных взаимодействий и проведения сигнала в определенном направлении увеличивается за счет энтропийного фактора. Существуют два таких варианта: каркасным белком выступает либо сам рецептор, либо его непосредственная мишень. В первом, классическом варианте рецепторов факторов роста, активированный рецептор фосфорилирует себя в нескольких местах по остаткам тирозина, которые после этого выступают якорными участками для внутриклеточных адаптерных белков. Второй сценарий характерен для инсулинового рецептора.

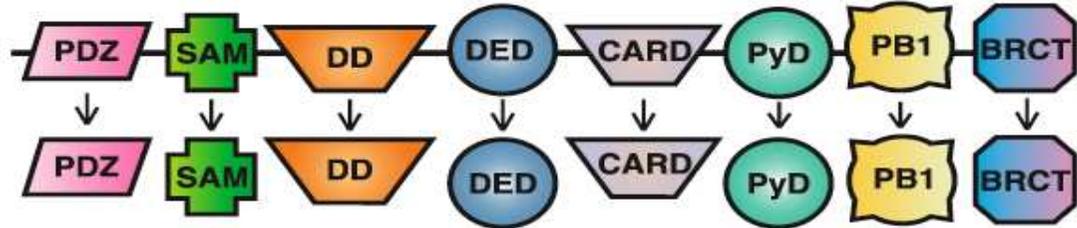
участки
модификации



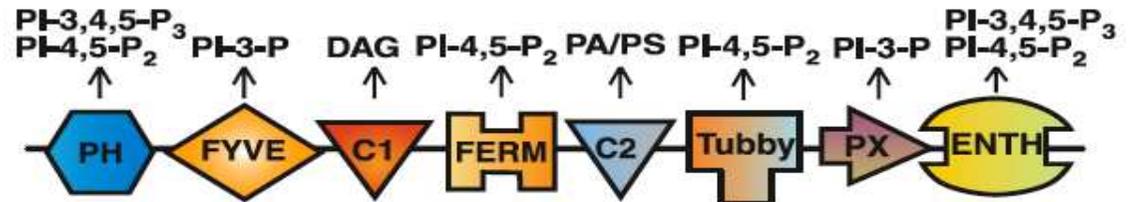
последовательности



домен-доменные
взаимодействия



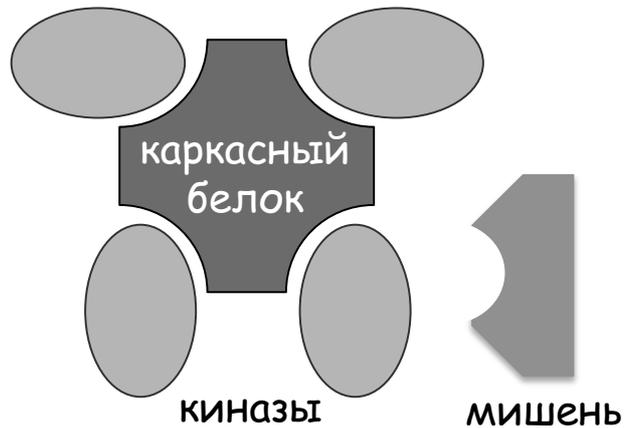
фосфолипидные
взаимодействия



А
объединение



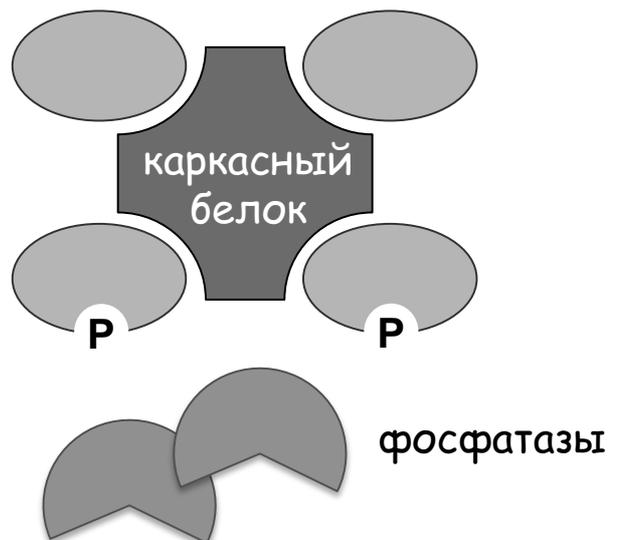
Б
обратная регуляция



В
локализация



Г
защита от инактивации



При активации он связывает и фосфорилирует по остаткам тирозина преимущественно один субстрат – каркасный белок IRS (insulin receptor substrate). Именно IRS дальше распределяет сигнал, взаимодействуя с соответствующими адаптерными белками.

Каркасные белки выполняют в клетке и другие задачи, действуя по сходному механизму. В частности, они могут разными способами обеспечивать работу обратных регуляторных связей (рис. 43Б). Так, в случае сигнализации от инсулинового рецептора, обратное фосфорилирование каркасного белка IRS угнетает его активность и тормозит передачу сигнала к протеинкиназе В (PKB/Akt). PKB/Akt выполняет в клетке множество разных функций, в том числе запуская выход на плазматическую мембрану глюкозного транспортера ГЛЮТ4 и захват глюкозы. Тем самым PKB/Akt опосредует стимулирующее действие инсулина на поступление глюкозы в гепатоциты, адипоциты и мышечные клетки, которые экспрессируют преимущественно ГЛЮТ4. Кроме того, PKB/Akt активирует и другие протеинкиназы, которые фосфорилируют остатки серин/треонина в белке IRS по механизму обратной связи и препятствуют тирозиновому фосфорилированию этого белка. Результатом является разобщение активного инсулинового рецептора и его конечных мишеней в клетке. В этом состоит молекулярный механизм так называемой *инсулиновой резистентности* у диабетиков, при которой инсулин перестает стимулировать вход глюкозы в клетки и снижать ее уровень в крови.

Каркасные белки служат также для локализации сигнальных молекул в определенных компартментах клетки, например, на плазматической мембране или внутриклеточных органеллах (рис. 43В). Такие каркасные белки как MP1 (MEK1 partner 1 для каскада MAP-киназ от тирозинкиназных рецепторов), β -аррестин (партнер рецепторов, сопряженных с тримерными G-белками) и SARA (SMAD anchor for receptor activation в каскаде цитокиновых рецепторов) организуют сигнальные комплексы на мембранах эндосом или лизосом, где они остаются активными и поддерживают сигнал долгое время после выключения рецепторов на внешней мембране и инактивации связанных с ними каскадов. Другим способом поддержания активного состояния сигнальных молекул может служить предохранение от инактивации за счет связывания с каркасным белком, например, путем ограничения доступности для фосфатаз (рис. 43Г).

Белковые комплексы с участием *протеинкиназы mTOR* играют роль главных метаболических переключателей клетки и дают пример сочетания разных стратегий функционирования каркасных белков. Эти комплексы, сокращенно именуемые mTorC1 (mTOR комплекс 1) и mTorC2 (mTOR комплекс 2), формируются на каркасных белках Raptor или Rictor, соответственно (рис. 44). Первый комплекс усиливает синтез белков и липидов; второй регулирует направленное движение клетки (хемотаксис) по градиенту питательных веществ и поступление глюкозы в клетку. Киназа

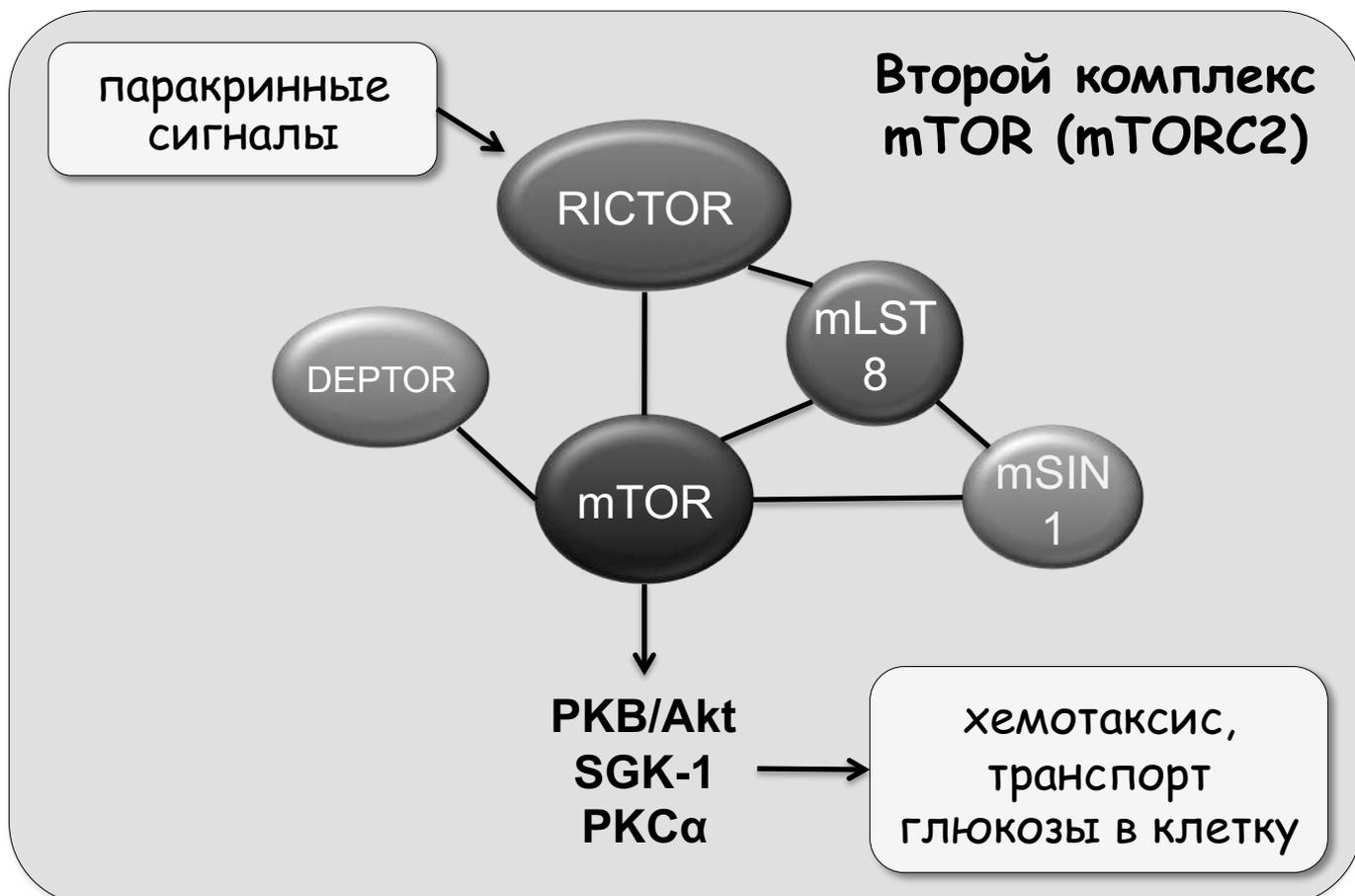
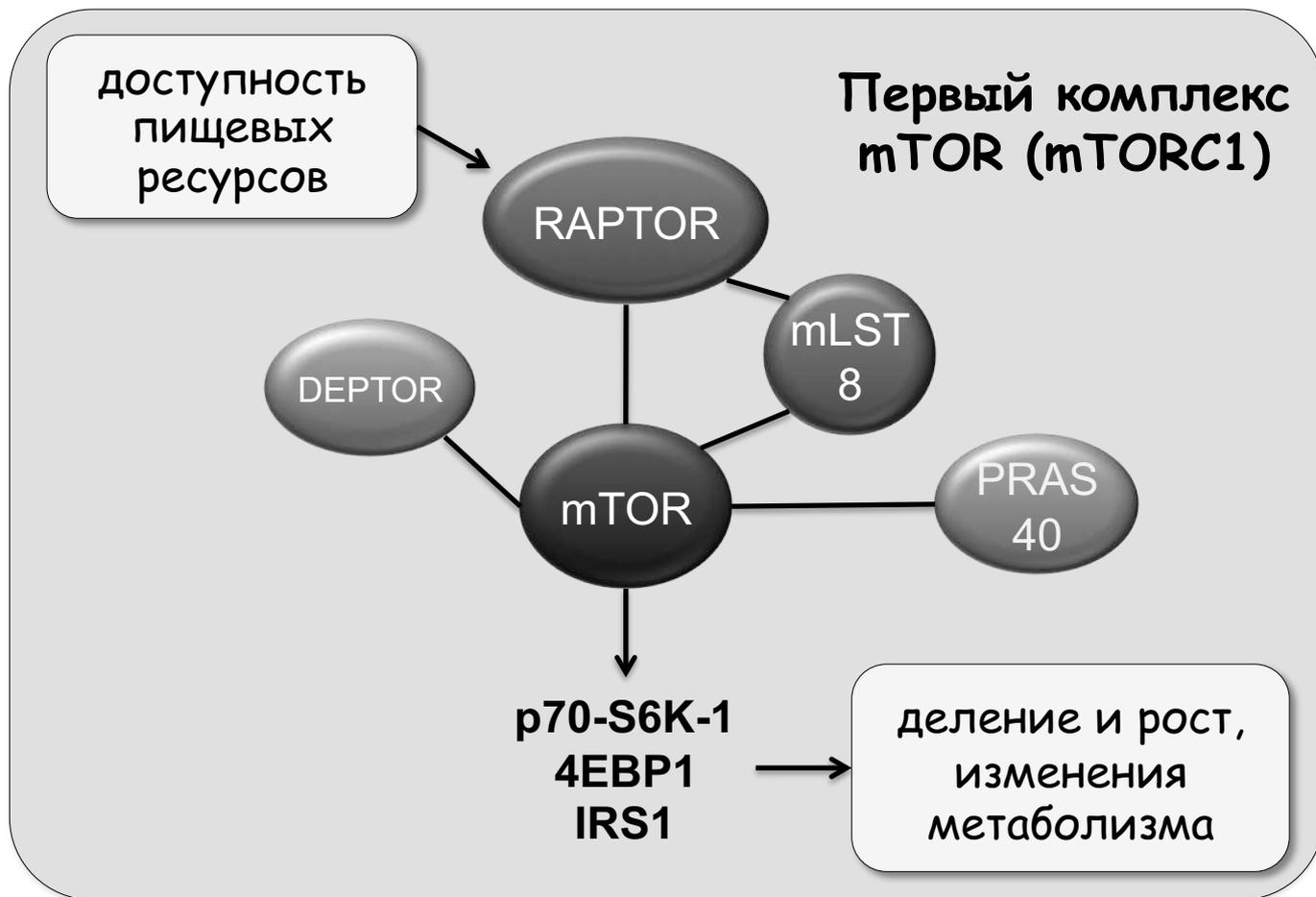


Рисунок 44

mTOR является ключевым исполнителем обоих комплексов, а каркасные белки Raptor и Rictor играют роль распределителей сигнала внутри клетки.

Синтез белка запускается тогда, когда будучи в составе первого комплекса mTOR фосфорилирует и активирует рибосомальную киназу S6K1. В свою очередь, S6K1 фосфорилирует ингибирующий белок EBP1 и высвобождает его из комплекса с фактором инициации трансляции 4E (eIF4E). В результате eIF4E разблокируется и его активность восстанавливается. Помимо этого, mTorC1 контролирует интенсивность аутофагии, т.е. способности клетки получать энергию путем убиквитин-зависимой утилизации отработавших белков в протеасомах. Синтез жиров запускается при активации комплексом mTorC1 факторов транскрипции SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein 1) и PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). В дополнение, PPAR- γ вызывает дифференцировку клеток-предшественников в адипоцитарном направлении. Таким образом, активный mTorC1 усиливает анаболическую (синтетическую) активность клетки.

Активность mTorC1 снижается при повышении уровня питательных веществ снаружи клетки, в состоянии гипоксии или при снижении энергетического потенциала внутри клетки (соотношения АТФ/АДФ). АМФ-зависимая протеинкиназа (АМПК) служит главным сенсором энергетического потенциала; она прямо или опосредованно подавляет активность mTorC1 и переключает клетку в катаболический режим с целью получения энергии. Сама АМПК активируется при повышении концентрации АМФ в цитоплазме, а также при фосфорилировании протеинкиназой LKB1 (liver kinase B1). Подробный механизм активации LKB1 неясен, но дефект этого фермента ведет к потере клеткой полярности и опухолевому росту даже в энергетически невыгодных условиях.

Сборка mTorC2 регулируется воздействием на клетку ростовых факторов в процессе ауто- и паракриной регуляции. В отличие от mTorC1, детальный механизм активации mTorC2 пока не известен, также как и все мишени в клетке. Главной мишенью mTorC2 считается протеинкиназа РКВ/Akt, которая активируется путем двойного фосфорилирования под действием PI3-киназы и mTorC2. РКВ/Akt выполняет разнообразные функции и имеет множество субстратов в клетке. Одним из них является фактор обмена гуаниловых нуклеотидов AS160, активирующий ряд малых ГТФ-аз семейства Rab. Эти ГТФ-азы регулируют транспорт секреторных везикул, содержащих глюкозный транспортер ГЛЮТ4, и их слияние с плазматической мембраной. Именно каскад РКВ/Akt > AS160 > ГЛЮТ4 рассматривается в качестве молекулярного механизма активации входа глюкозы в клетку при воздействии инсулина (см. [рис. 45](#)). Другим активатором этого же каскада может выступать комплекс mTorC2, однако пока неясно, является ли он альтернативным, дополнительным или необходимым по отношению к инсулин-зависимому.

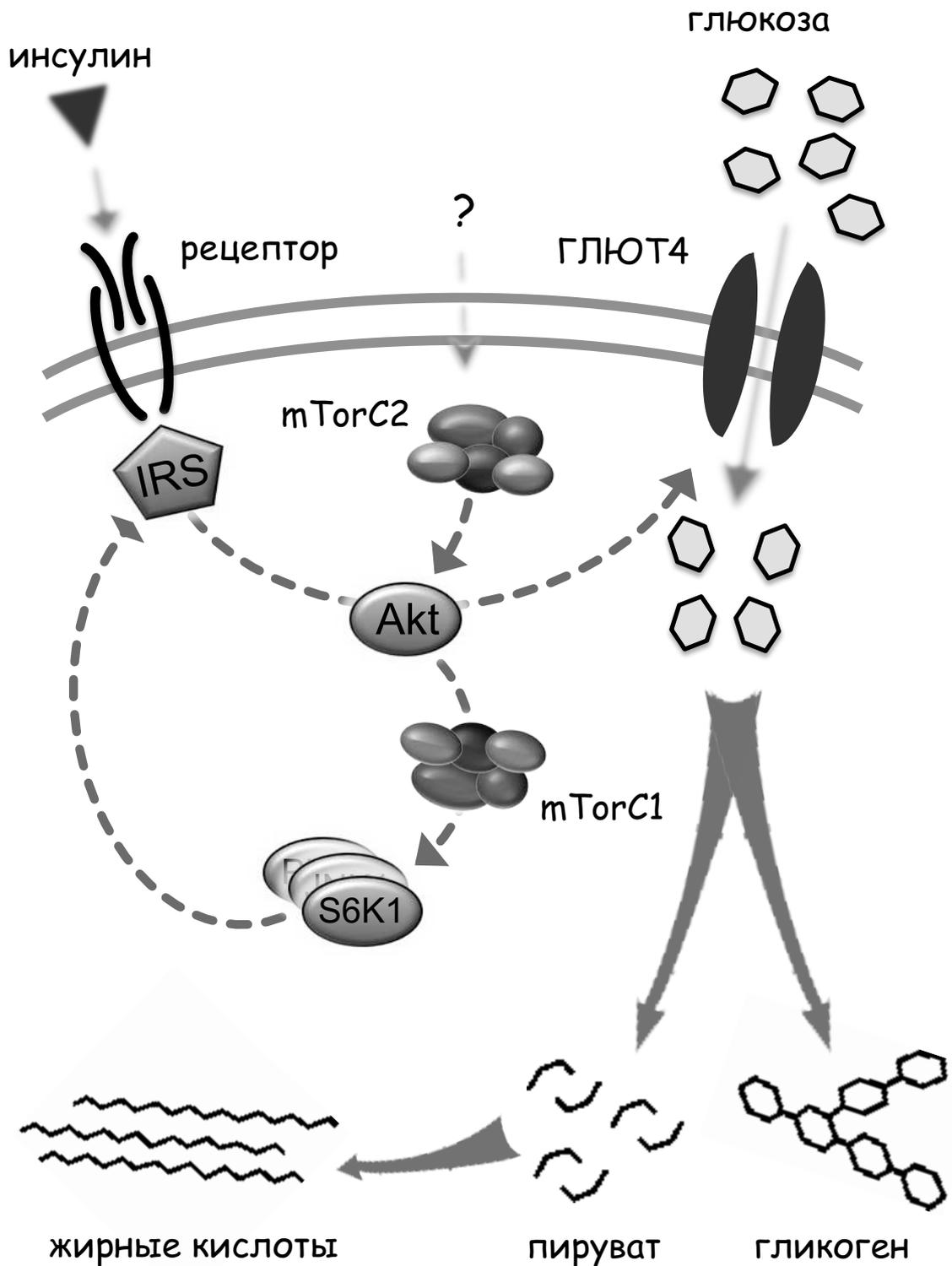


Рисунок 45

Комплексы mTOR собираются и функционируют *взаимозависимо* (см. [рис. 45](#)). Во-первых, они делят между собой общие компоненты. В зависимости от того, какой из каркасных белков (Раптор или Риктор) использован преимущественно, внешний сигнал перенаправляется в сторону белково-липидного или углеводного обмена, деления и роста клетки или активного поиска ею пищевых источников. Во-вторых, активация mTorC1 в сильной степени определяется активностью mTorC2. Координирующую функцию выполняет РКВ/Akt. Вполне вероятно, что именно она выбирает тип каркасного белка для создания нужного комплекса. При этом РКВ/Akt действует опосредовано, что создает еще один, промежуточный, уровень приложения регуляторных воздействий. РКВ/Akt реализует принцип двойного отрицания, так как фосфорилирует главный ингибитор mTorC1 – гамартин/тубериновый комплекс белков TSC1/TSC2, и устраняет его ингибирующее действие на mTorC1.

Помимо функции сигнальных организаторов и распределителей, каркасные белки Раптор и Риктор обеспечивает *обратную регуляцию* поступления глюкозы в клетку, запуская вышеупомянутую регуляторную петлю обратной связи к субстрату инсулинового рецептора IRS ([рис. 45](#)). mTorC1 выступает важным участником этого механизма как непосредственная мишень РКВ/Akt, а его эффекторами, фосфорилирующими IRS в разных органах, служат рибосомальная киназа S6K1, MAP-киназа JNK1 или протеинкиназа C. Хотя в настоящее время роль mTorC2 в этой обратной петле малопонятна, он может активировать РКВ/Akt независимо от инсулинового рецептора или влиять на активность комплекса mTorC1 путем конкуренции Раптора и Риктора за общие компоненты соответствующих комплексов.

Каркасные белки Ste5p и Pbs2p дают еще один пример переадресации внутриклеточного сигнала и выбора клеточного ответа ([рис. 46](#)). У пекарских и пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* есть несколько MAP-киназных каскадов, которые контролируют феромон-зависимое спаривание (mating), целостность клеточной стенки при осмотическом шоке и инвазивный рост с образованием гифоподобных структур. Протенкиназа Ste11p выполняет функцию MEKK и функционирует во всех трех MAP-киназных каскадах; ее постоянно активный мутант одновременно их активирует. Поэтому у Ste11p возникает проблема выбора: как "узнать", какой сигнал активировать и "понять", какой MAP-киназный каскад запустить?

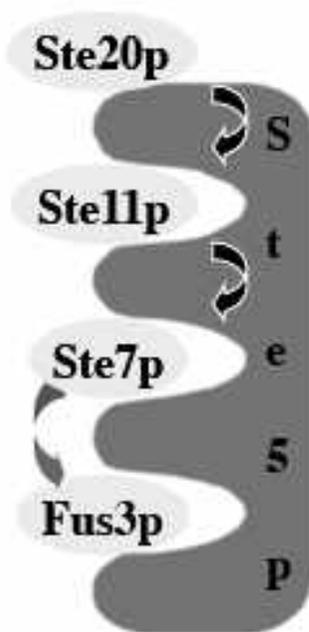
В норме, специфичность выбора каскада определяют каркасные белки. При недостатке азота в окружающей среде активируется MAP-киназный путь без участия каркасного белка (по крайней мере таковой не обнаружен) ([рис. 46](#), слева). В MAP-киназном каскаде, активирующем феромон-зависимое спаривание работает каркасный белок Ste5p. Он связывает MEKK Ste11p, MEK Ste7p и MAP-киназу Fus3p ([рис. 46](#), в центре). При осмотическом шоке активируется трансмембранный

недостаток азота



рост

феромон



спаривание

осмотический шок



гомеостаз
(образование
глицерина)

сенсор Sho1p. Он взаимодействует с каркасным белком Pbs2p, который одновременно является и MAP-киназой второго уровня MEK. Pbs2p привлекает в комплекс Ste11p и конечную MAP-киназу Hog1p, организуя передачу сигнала в этом направлении (рис. 46, справа).

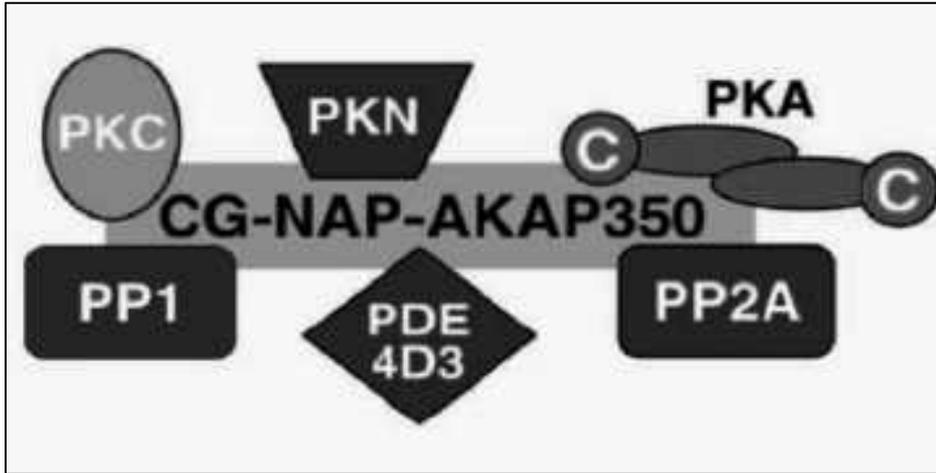
Несколько других примеров роли каркасных белков в организации сигнальных модулей показаны на рис. 47. Каркасные белки, связывающие протеинкиназу A (A-kinase anchoring proteins, AKAP) взаимодействуют также и с другими протеинкиназами (PKC и PKN) и фосфатазами (PP1 и PP2A), обеспечивая их близкое соседство в нужном компартменте клетки. Так достигается эффективное фосфорилирование и дефосфорилирование находящихся рядом субстратов. Гигантский белок CG-NAP/AKAP350 локализует PKN в центросоме и аппарате Гольджи (centrosome and Golgi localized PKN associated protein) (рис. 47А). Он имеет массу 450 кДа и поэтому известен также как AKAP450. Связывая несколько протеинкиназ и фосфатаз, он интегрирует сигналы, идущие через разные каскады. Эти сигналы регулируют уровень фосфорилирования белков, синхронизирующих деление клетки. Каркасный белок mAKAP, специфичный для мышечных клеток, координирует работу цАМФ-зависимого сигнального модуля, одновременно связывая PKA и фосфодиэстеразу PDE4D3 (рис. 47Б). Фосфодиэстераза гидролизует цАМФ и ограничивает активацию PKA.

Другой AKAP-белок тоже связывает PKA и каталитическую субъединицу фосфатазы PP1, локализуя их в постсинаптических окончаниях нейромышечных соединений (рис. 47В). Там он взаимодействует с рецептором NMDA, регулируя уровень фосфорилирования рецептора путем доставки к нему соответствующей киназы и фосфатазы. Благодаря наличию в структуре суперспирали типа coiled coil, этот AKAP-белок имеет сильно вытянутую форму и поэтому был назван Yotiao – так же, как и популярные в Китае обжаренные мучные палочки.

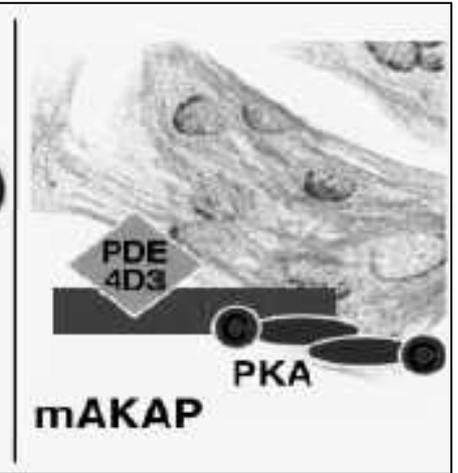
Каркасный белок β -аррестин (также как и паксиллин) обеспечивает активацию MAP-киназных каскадов рецепторами, сопряженными с тримерными G-белками (рис. 47Г). Оставаясь связанным с рецептором в эндосомах, β -аррестин поддерживает активность этого сигнального каскада даже тогда, когда рецептор эндоцитирует и уходит с поверхности клетки. Существуют две изоформы этого белка: β -аррестин 1 специфичен к родопсину и активирует Erk-MAP-киназный каскад, тогда как β -аррестин 2 взаимодействует и с другими GPCR, в дополнение активируя каскад JNK-MAP-киназ.

RACK-белки (receptors for activated C kinase) взаимодействуют с последовательностями разных белков, гомологичных участку протеинкиназы C, который открывается при ее аллостерической активации. RACK-белки обеспечивают специфическую компартиментализацию разных изоформ PKC и влияют на их субстратную специфичность. К настоящему времени обнаружено множество субстратов (рис. 47Д), так же как и аналогов RACK-белков. К последним относятся каркасные

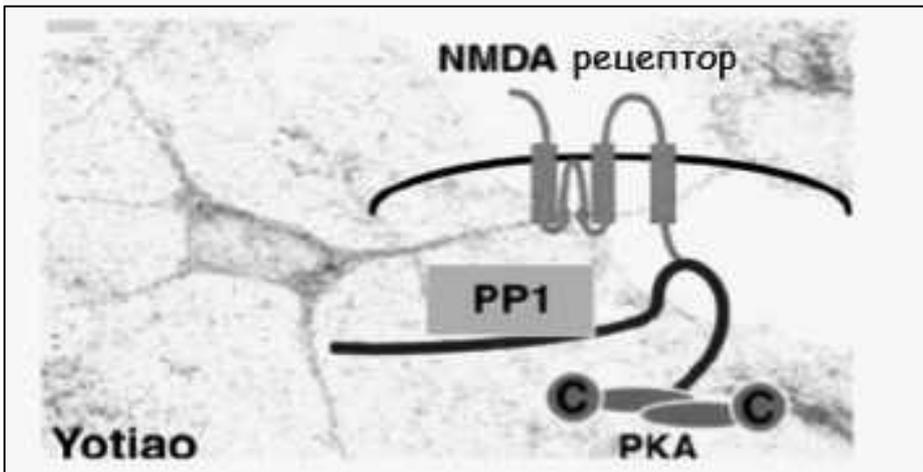
А



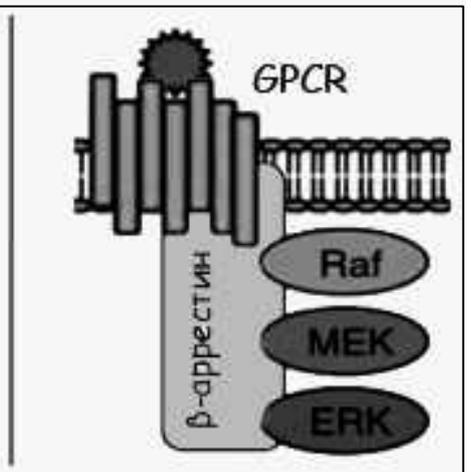
Б



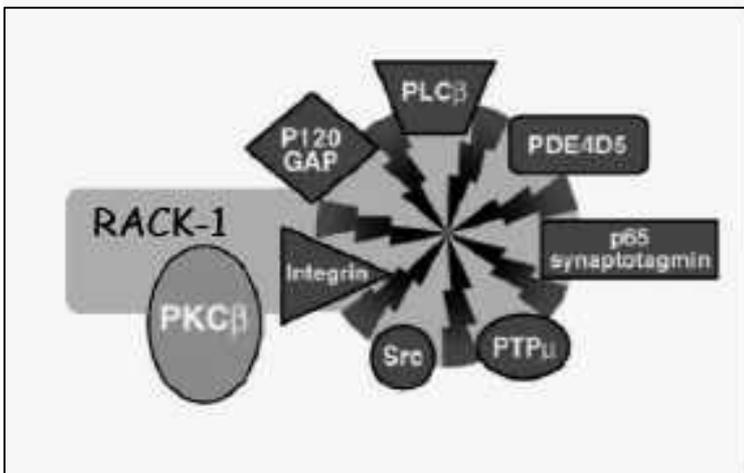
В



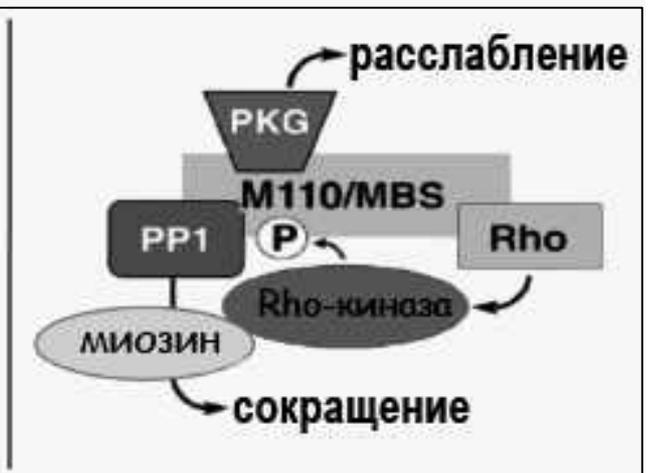
Г



Д



Е



белки PICK (proteins that interact with C kinase) и STICK (substrates that interact with C kinase). Хотя они связывают свои мишени несколько иначе, чем RACK-белки, они также определяют выбор мишеней и включение PKC в сигнальные сети клетки.

Миозин-связывающая субъединица MYPT (myosin phosphatase targeting subunit) экспрессируется в гладких мышцах, где служит каркасным белком для каталитической субъединицы фосфатазы первого типа PP1 (рис. 47E). Сокращение гладких мышц активируется путем фосфорилирования единственного остатка в молекуле гладкомышечного миозина, которое запускает работу этого молекулярного мотора. Расслабление происходит в результате дефосфорилирования этого остатка под действием PP1 и выключения миозинового мотора. За фосфорилирование отвечают или специфическая Ca^{2+} -зависимая киназа легких цепей миозина, или Rho-киназа, активируемая малой ГТФ-азой Rho. MYPT с высоким сродством взаимодействует с миозином и может локализовать фосфатазу миозина в непосредственной близости от ее субстрата, способствуя расслаблению. Однако этого не происходит если Rho-киназа фосфорилирует MYPT по двум остаткам, тем самым препятствуя связыванию каталитической субъединицы PP1 с MYPT. В результате активность Rho-киназы по отношению к миозину сохраняется, а PP1 – падает. Миозин остается преимущественно фосфорилированным, а мышца – сокращенной. Считается, что именно этот механизм отвечает за развитие гипертонии, так как стенка артериальных сосудов сформирована именно гладкими мышцами. Расслабление гладких мышц происходит под действием гормонов и доноров оксида азота. В клетках они активируют цГМФ-зависимую протеинкиназу (PKG), которая тоже связывает MYPT и препятствует воздействию Rho-киназы. Как следствие, фосфатаза получает возможность взаимодействовать с MYPT и дефосфорилировать расположенный поблизости миозин. Считается, что с этим механизмом связано действие нитроглицерина, который вызывает расслабление мелких сосудов, повышая кровоток и газообмен в миокарде. Обращает на себя внимание тот факт, что обратимое фосфорилирование ключевых белков-регуляторов полностью определяет способность гладких мышц к сокращению.

Киназы служат основными исполнителями

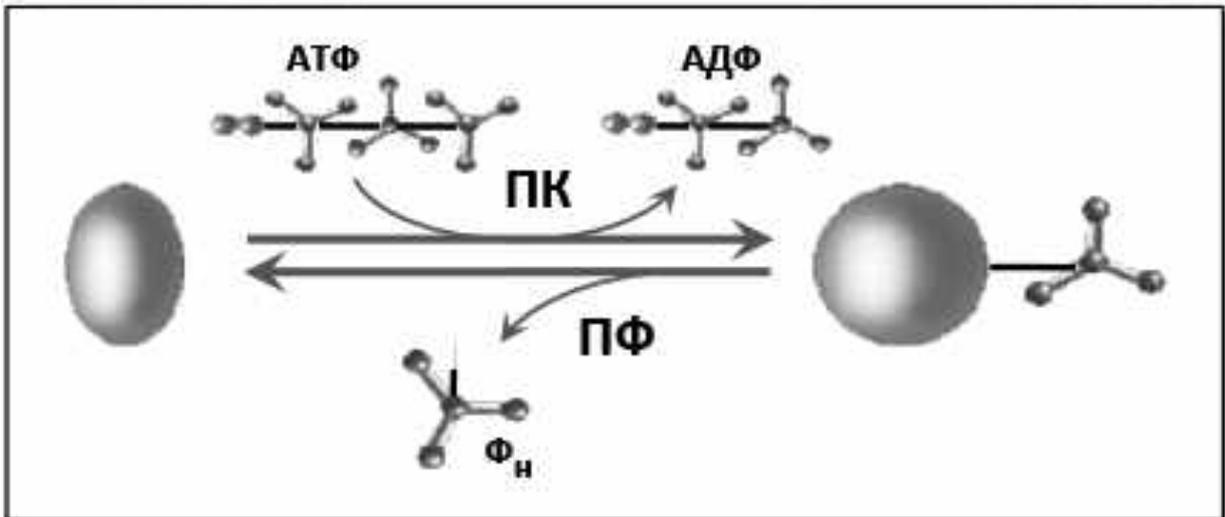
Концепция обратимого фосфорилирования как основного механизма регуляции активности белков была предложена и разработана Эдвином Кребсом и Эдмондом Фишером в 1950-х годах (рис. 48), за что они и получили Нобелевскую премию по физиологии или медицине в 1992 г. ("for their discoveries concerning reversible protein phosphorylation as a biological regulatory mechanism"). Э. Кребс родился в Лансинге (Айова, США) и получил медицинскую степень в университете г. С-Луис. Во время второй мировой войны был полевым врачом и участвовал в боевых действиях. После войны работал в лаборатории Карла и Терезы Кори, которые изучали метаболизм гликогена



Edwin
Krebs



Edmond
Fisher

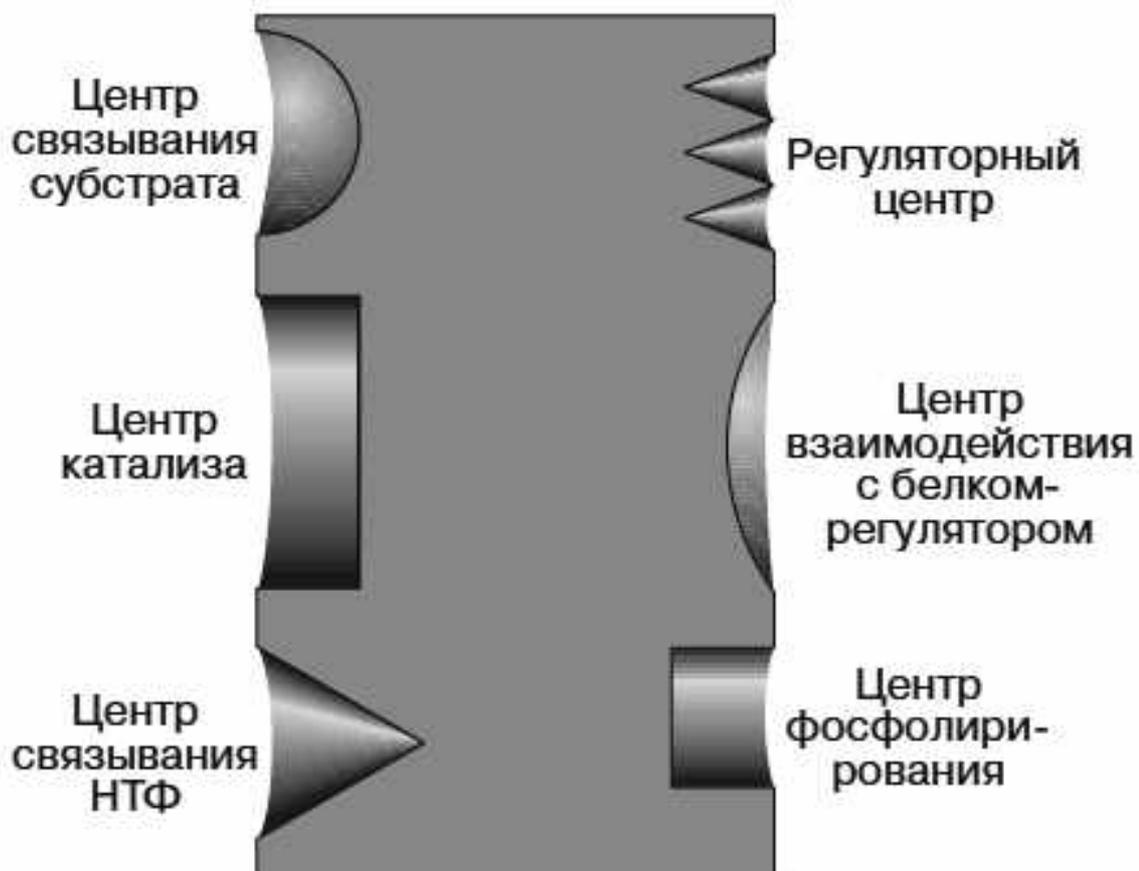


и уже тогда имели мировую известность. Э. Фишер родился в Шанхае (Китай); его отцом был австралиец, а мать – француженка. Он получил образование в Швейцарии и заинтересовался работой ферментов, исследуя структуру крахмала и гликогена. В 1950-х он переехал в г. Сиэтл (США), где преподавал биохимию в университете штата Вашингтон. С 1953 г. Э. Кребс и Э. Фишер работали в Сиэтле вместе, исследуя регуляцию активности гликогенфосфоорилазы.

С тех пор годы исследований показали, что фосфорилирование действительно служит основным способом регуляции активности метаболических и сигнальных ферментов. В клетке примерно 30% белков находятся в фосфорилированном состоянии. Примерно 2% генома человека (518 генов) кодирует различные протеинкиназы (ПК). Они разделяются на две главных группы: 428 серин-треониновых (Ser/Thr) киназ и 90 тирозиновых (Tyr) киназ. Большинство протеинкиназ фосфорилируют белки-мишени по остаткам Ser (86%), меньше – по остаткам Thr (12%), и всего 2%, фосфорилируют белки по остаткам Tyr. Есть также киназы двойной специфичности, которые одинаково эффективно фосфорилируют и остатки Ser/Thr, и остатки Tyr. Среди них наиболее известны промежуточные участники MAP-киназных каскадов. У бактерий и растений есть также гистидиновые киназы, которые обеспечивают эстафетную передачу сигнала от рецепторов в клетку (см. выше). Со времен Кребса и Фишера стало ясно, что не все киназы являются протеинкиназами.

Существуют также ферменты, фосфорилирующие липиды и сахара – примером служат PI3-киназы и классические гексокиназы, соответственно. Как правило, активность киназ жестко регулируется. В основном, это происходит за счет самофосфорилирования или фосфорилирования другими киназами, но может также происходить за счет связывания других белков-регуляторов или малых молекул (например, вторичных посредников), или за счет изменения локализации внутри клетки.

Протеинкиназы оперируют как минимум с двумя субстратами, причем не обязательно белками. Поэтому они имеют два субстрат-связывающих участка (см. [рис. 49](#)). Один из них связывает АТФ или другой нуклеотид, который служит донором фосфатной группы, а второй – субстрат, на который эта группа переносится. Центр катализа (активный центр) содержит вполне определенные, как правило, консервативные остатки. Они непосредственно участвуют в переносе фосфатной группы. Оба субстрат-связывающих участка и активный центр расположены вблизи друг от друга и соответствующим образом ориентированы так, чтобы сделать перенос фосфата с одного субстрата на другой максимально эффективным и наименее энергозатратным. Участок связывания субстрата-мишени должен отвечать требованиям специфичного узнавания так, чтобы фермент мог избирательно использовать только определенные субстраты в качестве мишеней. Эти структурные элементы обеспечивают исполнительный механизм протеинкиназ.



За небольшим исключением, все киназы имеют участки регуляторных воздействий. Их необходимость связана именно с тем, что фосфорилирование является основным механизмом регуляции активности внутриклеточных молекул, то есть оно должно иметь возможность включения и выключения. Регуляторные центры отличаются и различным образом представлены в разных киназах. На [рис. 49](#) они объединены в гипотетический фермент со всеми возможными участками регуляторных воздействий. К таким относятся центры связывания низкомолекулярных регуляторов, таких как Ca^{2+} , циклические нуклеотиды, липиды, и другие метаболиты, центр фосфорилирования (если активность киназы регулируется фосфорилированием), а также центр взаимодействия с белками-регуляторами, в качестве которых могут выступать многие адаптерные белки сигнальных каскадов клетки.

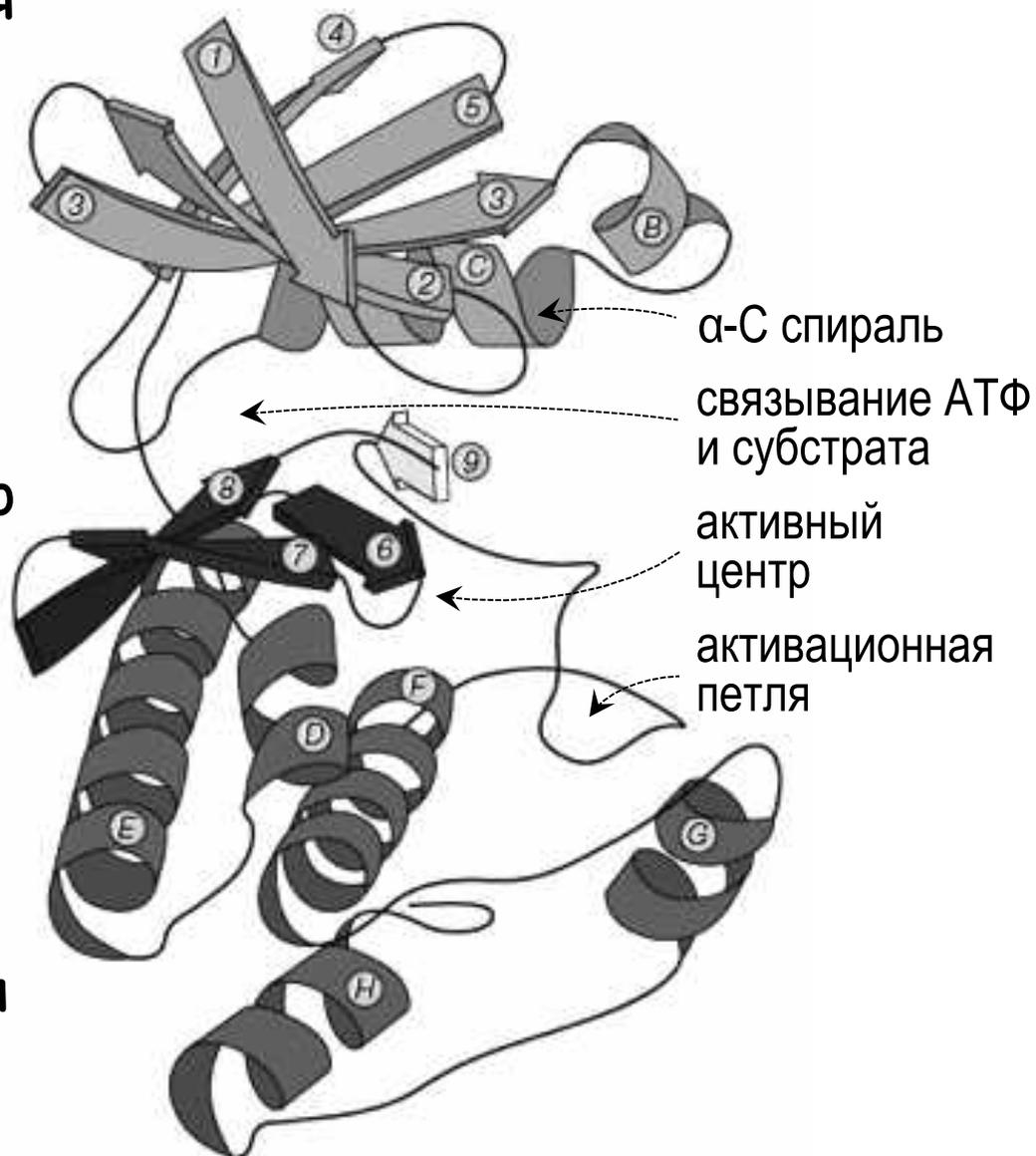
Прототипной киназой является протеинкиназа А (РКА). Структура ее каталитического домена была выяснена первой и оказалась общей для большинства протеинкиназ, наиболее гомологичные из которых объединяют в группу АGC-киназ (протеинкиназ А, G и С), подчеркивая сходство их пространственных конформаций и механизмов действия. Первичные структуры каталитических доменов также гомологичны для большинства протеинкиназ; они состоят приблизительно из 270 аминокислотных остатков. Каталитические субъединицы всех этих протеинкиназ построены из двух глобулярных доменов, называемых N- и С-долями, и разделенных шарнирным участком ([рис. 50](#)). N-доля меньше по размеру, чем С-доля. В отсутствие субстрата N-доля находится в "открытом" состоянии и очень подвижна. При связывании субстрата она фиксируется в закрытом состоянии. Координация Mg^{2+} -АТФ происходит в глубине щели между N- и С-долями при участии нескольких остатков, консервативных для всех АGC-киназ. Для всех этих ферментов характерны бисубстратная кинетика и кислотно-основной катализ на основе консервативного остатка, соответствующего Asp-166 протеинкиназы А.

N-доля построена преимущественно β -складками, но имеет обязательную консервативную α -спираль, которая участвует в связывании нуклеотида (α -С на [рис. 50](#)). Последние исследования также выявили стабилизирующую функцию α -А-спирали, которая не показана на [рис. 50](#), так как не попала в эту кристаллическую структуру. Она располагается вертикально на задней стороне изображенной структуры и соединяет N- и С-доли, координируя их взаимное расположение. В свою очередь, α -А-спираль стабилизируется за счет миристоилирования N-концевой части полипептидной цепи, расположенной в N-доле. Этот миристоильный якорь не служит для закрепления протеинкиназы на мембране, как это бывает в случае многих других белков. Он погружен в гидрофобный карман в N-доле, тем самым фиксируя положение α -А-спирали.

N-доля

шарнир

C-доля

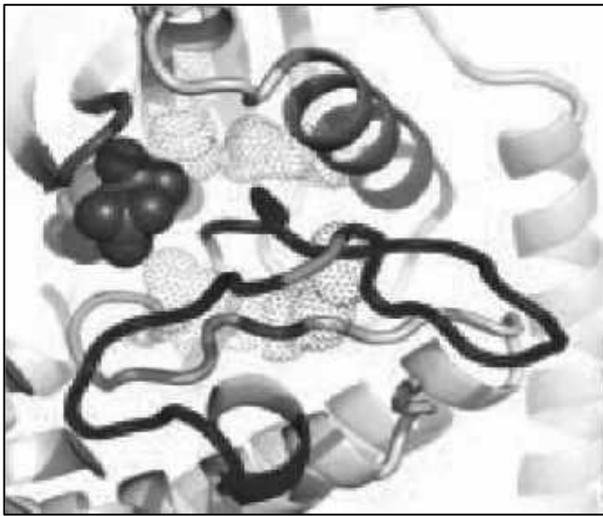


Шарнирный участок связывает N- и C-доли, но обеспечивает их относительную подвижность. Он состоит из трех β -слоев (6-8 на [рис. 50](#)) и дополнительной β -складки 9. Именно шарнирный участок формирует активный центр протеинкиназ: каталитический центр располагается между β -складками 6 и 7, а субстрат-связывающий участок – между β -складками 8 и 9. В активном ферменте связанный субстрат оказывается прямо напротив нуклеотида, координированного на нижней поверхности N-доли, а каталитический центр сбоку и между ними. Катализ становится возможным только тогда, когда все три этих участка оказываются достаточно сближенными друг с другом. Сближение происходит последовательно при связывании субстратов.

C-доля построена преимущественно α -спиралями и выполняет, главным образом, регуляторную и опорную функции. Регуляция связана с наличием активационной петли, которая закрывает доступ в активный центр фермента и препятствует связыванию субстратов ([рис. 50 и 51](#)). Механизм активации большинства протеинкиназ предусматривает смещение активационной петли и открытие доступа к активному центру.

Активация протеинкиназ происходит за счет открытия доступа к активному центру. Большинство протеинкиназ пребывает в неактивной конформации и переходит в активную конформацию в процессе внутриклеточной передачи сигнала. Регуляторный участок все время свободен, он принимает сигнал и вызывает такое изменение всей молекулы белка, при котором регуляторный и каталитический домены расходятся и открывается доступ в активный центр. Выделяют два способа стерической активации. Первый связан с фосфорилированием внутри активационной петли, второй – со снятием аутоингибирования при связывании активирующих молекул, таких как адаптерные белки и вторичные посредники. Любое из этих воздействий ведет к смещению активационной петли, расположенной в C-доле фермента. Как правило, активация затрагивает не только "вход" в активный центр, но и конформацию его субстрат-связывающего кармана. Например, в случае РКА фосфорилированию подвергается Thr-197 активационной петли. Это вызывает локальное перемещение α -C-спирали в N-доле, способствуя взаимоориентации остатков Glu-91 и Lys-72, необходимых для правильной координации молекулы АТФ (см. [рис. 51](#)). Конформация "включенного" (активного) состояния обычно похожа у разных протеинкиназ, но "выключенного" существенно отличается и используются разные механизмы для того, чтобы его поддерживать. Поэтому механизмы активации разных протеинкиназ отличаются (см. ниже).

Связывание нуклеотида (как правило АТФ) происходит внутри щели, образуемой N- и C-долями и точно соответствующей размеру нуклеотида. Связанный нуклеотид стабилизируется в активном центре так называемой Р-петлей, расположенной в N-доле. Р-петля координирует фосфатные группы нуклеотида (отсюда и ее название), а также ион Mg^{2+} , который, в свою очередь,



Элементы активного центра:



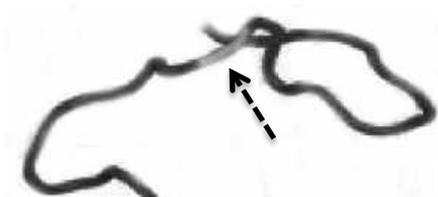
P-петля и связанный нуклеотид



α -C-спираль



Каталитическая петля



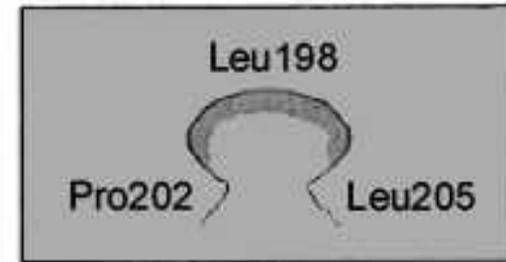
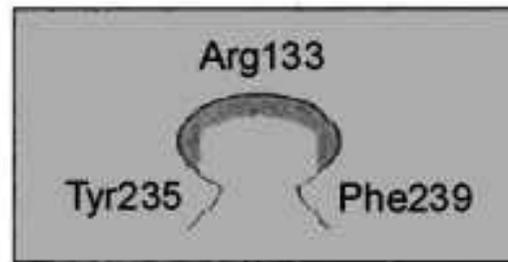
Активационная петля
и треонин-197 (стрелка)

координирует β - и γ -фосфаты нуклеотида. P-петля содержит специфический мотив GxxxxGK(T/S), где X – любая аминокислота, а K – лизин, который крайне важен для связывания нуклеотидного фосфата. Глицины (G) обеспечивают боковые изломы, способствуя формированию петли. Именно из-за них P-петля называется также глициновой. Она ограничена β -складкой с одной стороны и α -спиралью с другой. Эти структуры поддерживают и ориентируют P-петлю в нуклеотид-связывающей щели протеинкиназ.

Активный центр РКА показан на [рис. 51](#) в виде стереопары при взгляде со "входа" на его "дно". Глициновая петля находится вглубине слева вверху; она удерживает нуклеотид. Напротив нее, сверху и правее центра, находится α -С-спираль N-доли; она располагается в передне-заднем направлении. На переднем плане расположена более темная активационная петля, видно как она она закрывает вход в активный центр. В середине этой петли находится фосфорилируемый треонин-197, но сама фосфатная группа не показана. Каталитическая петля располагается позади активационной, левее и ниже центра. Ключевые для катализа остатки выделены как электронные плотности: Lys-72 третьей β -складки находится выше нуклеотида, а Glu-91 – рядом в α -С-спирали; нижний ряд составляют остатки каталитической петли – Asp-166 слева и Arg-165 справа. Взаимная координация Lys72 и Glu91, контролируемая положением α -С-спирали, необходима для правильного связывания нуклеотида. Остаток фосфата, связанный с Thr-197 РКА, нейтрализует заряд радикала Arg-165, вызывая смещение остатка Asp-166, который непосредственно участвует в переносе фосфатной группы с нуклеотида на белковый субстрат.

Связывание субстрата достигается за счет его точечной координации в той же щели между N- и С-долями, но на нижней части и ближе ко входу. В этой координации существенную роль играют природа и положение определенных аминокислотных остатков в первичной структуре субстрата, окружающей фосфорилируемый остаток. Например, в таких классических субстратах, как РКИ (5-24) и пептидный субстрат кемпид в контакт с РКА вступают несколько остатков ([рис. 52](#)). При этом инвариантными оказываются два остатка аргинина в положениях минус 3 (P-3) и минус 2 (P-2) от фосфорилируемого остатка серина или заменяющего его аланина ([рис. 52](#)). Взаимодействие с субстратом носит электростатический характер: положительно заряженные радикалы аргининов P-3 и P-2 притягиваются отрицательно заряженными боковыми радикалами глутаминовой кислоты в РКА. Эти остатки высококонсервативны и в других белках, узнаваемых и фосфорилируемых РКА, а также, в той или иной степени, и в субстратах других АGC-киназ. Кроме того, при связывании субстрата возникают и дополнительные контакты. Например, псевдосубстратный пептидный ингибитор РКИ (5-24) располагается в активном центре РКА продольно, формируя множественные контакты. Помимо ключевых остатков Arg, гидрофобные радикалы ингибитора также вносят существенный вклад. Они попадают в гидрофобные карманы активного центра,

гидрофобные карманы



PKI (5-24)



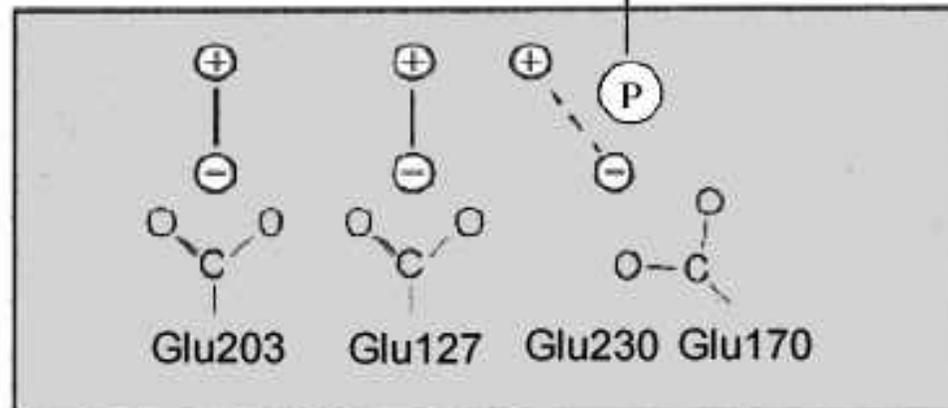
кемптид



консенсус

...RRXSX...

заряженные радикалы



которые сформированы ароматическими остатками фермента (см. [рис. 53](#)). Всего возникает много таких контактов; они определяют субстратную специфичность (избирательность) протеинкиназ по отношению к тому или иному субстрату. Аминокислотные остатки, образующие эти контакты, формируют так называемые *консенсусные последовательности узнавания*, которые могут сильно различаться для разных киназ. Положение консенсусных остатков в первичной и третичной структуре активного центра служит важной информацией для поиска новых низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ. Тем не менее одних теоретических расчетов оказывается для этого недостаточно. Для правильной ориентации и связывания субстрата оказывается необязательным, чтобы все возможные контакты были замкнуты и некоторыми из них можно пренебречь. Это объясняет толерантность к аминокислотным заменам в некоторых позициях. Именно благодаря этому явлению ферменты не обладают абсолютной специфичностью. Напротив, они обеспечивают эффективный катализ за счет индуцированных взаимодействий и постепенного изменения конформации фермент-субстратного комплекса. В противном случае полного совпадения ("ключ-замок"), высокая энергия связывания фермент-субстратного комплекса полностью нивелирует то снижение энергии активации, которое достигает фермент в процессе катализа.

В процессе катализа происходят последовательные изменения конформации протеинкиназы А и формируются переходные фермент-субстратные комплексы. При связывании аналогов нуклеотида или пептидного субстрата они оказались довольно стабильны и их удалось получить в кристаллическом состоянии. Каталитический цикл РКА, воссозданный по этим структурным данным, показан на [рис. 53](#). Свободный апофермент находится сверху в полностью "открытой" конформации. Переходные комплексы с одним из субстратов показаны в центре верхней панели, они частично "закрыты". РКІ (5-24) представляет собой субстратный пептид, в котором фосфорилируемый серин заменен на остаток аланина. Внизу показан тройной комплекс фермента с псевдосубстратным пептидом и нуклеотидом. Он стабилизирован фторидом алюминия и находится в полностью "закрытой" конформации. Синим отмечена Р-петля, конформация которой сильно меняется в процессе катализа. Пространственные изменения Р-петли относительно каталитической петли отдельно показаны на нижней панели на [рис. 53](#). Хорошо видно как в процессе закрытия субстрат-связывающей щели нуклеотид постепенно смещается в сторону каталитической петли, а γ -фосфат АТФ приближается к остатку Asp-166, с которым он должен вступить во взаимодействие.

Структурная гомология различных киназ иллюстрирует единый принцип функционирования этих ферментов. Каталитический домен липидной РІЗ-киназы имеет строение и пространственную конформацию, аналогичную РКА. Это позволяет РІЗ-киназе фосфорилировать не только липиды, но и белки, т.е. быть одновременно и протеинкиназой. Строение, аналогичное прототипным АРС-

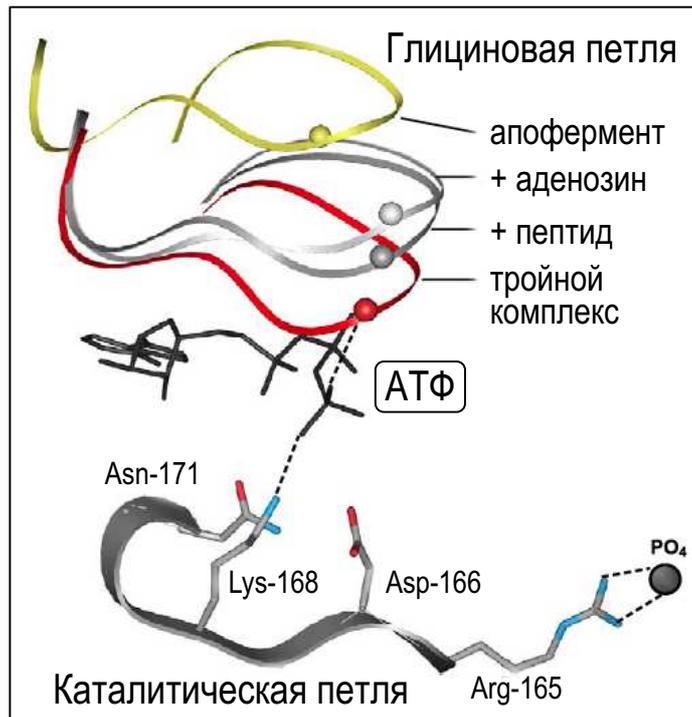
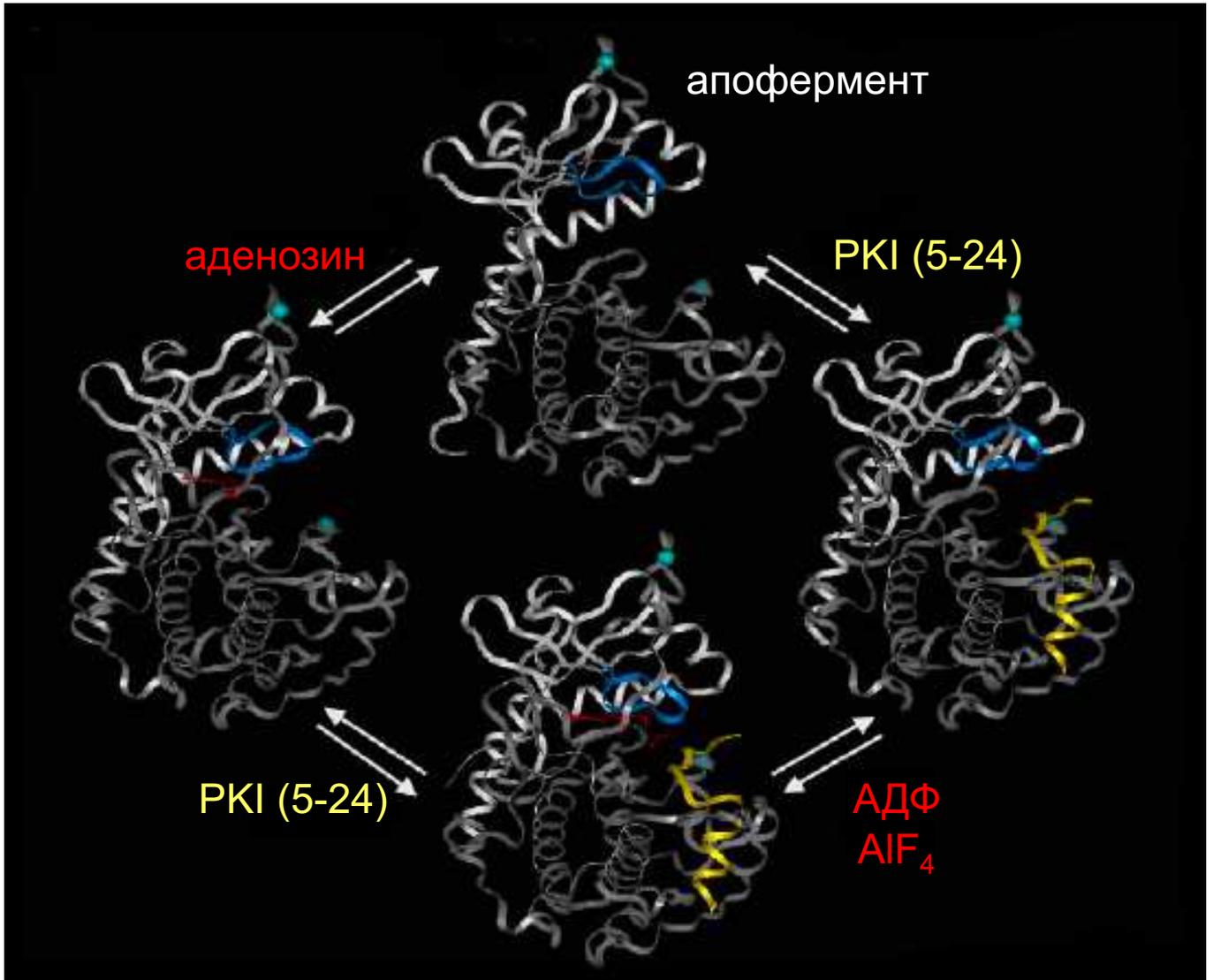
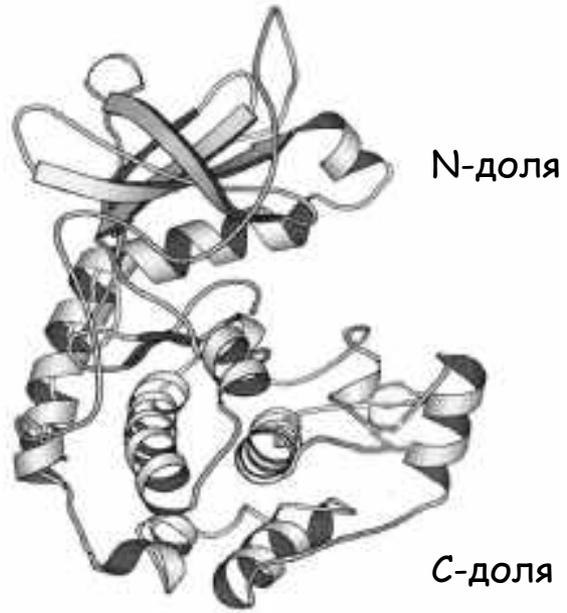
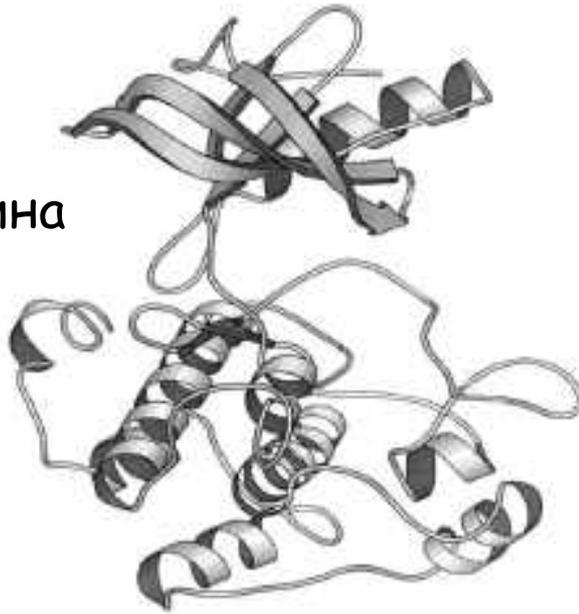


Рисунок 53

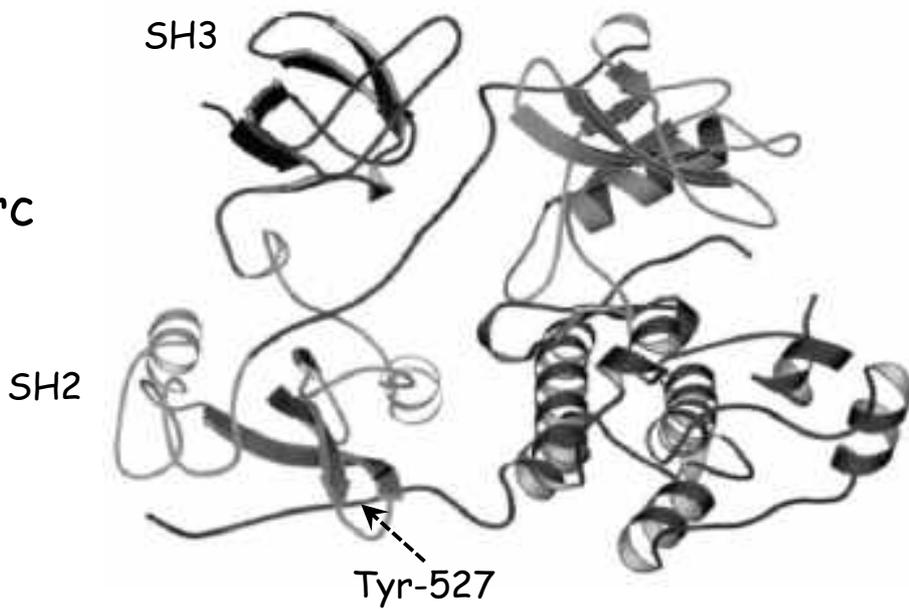
Протеинкиназа А



Рецептор инсулина



c-Src



киназам, имеют и тирозиновые киназы (рис. 54). В кристаллической структуре тирозинкиназного домена рецептора инсулина (в центре) сохраняется двудоменная организация, соответствующая С- и N-долям каталитического домена прототипной протеинкиназы А (она для сравнения показана сверху), а также все ключевые структурные и регуляторные элементы: Р-петля, критичные для катализа остатки Asp и Asn, и активационная петля, содержащая три тирозиновых остатка (Tyr-1158, Tyr-1162 и Tyr-1163). При активации рецептора один из них (Tyr-1162) подвергается автофосфорилированию. Внизу на рис. 54 показана пространственная структура цитозольной тирозиновой киназы c-Src, фосфорилированной по С-концевому регуляторному остатку Tyr-527. Каталитическая часть c-Src имеет тот же принцип строения, а основные отличия обеспечивает уникальный регуляторный домен. В результате фосфорилирования Tyr-527 фермент приобретает "сложенную" конформацию, в которой реализуются два важных события. Во-первых, Tyr-527 вступает во внутримолекулярное взаимодействие с SH2 доменом. Во-вторых, это провоцирует связывание SH3 домена с длинным линкером, расположенным между SH2 и киназным доменом. Вместе эти взаимодействия фиксируют c-Src в неактивном состоянии. Активация c-Src в клетке осуществляется или за счет дефосфорилирования Tyr-527 или путем связывания адаптерных белков с SH2 и/или SH3-доменом и освобождения линкерного полипептида.

Аллостерическая активация протеинкиназ происходит, как и в случае многих адаптерных белков, внутримолекулярно за счет снятия аутоингибирования. Наличие у них относительно обособленного регуляторного домена делает возможным создание "сложенной" конформации молекулы; при этом доступ в активный центр закрыт. В то же время, остается открытым регуляторный участок, который принимает сигнал и вызывает такое изменение всей молекулы белка, при котором два домена расходятся и доступ в активный центр открывается. В качестве такого сигнала выступают фосфорилирование/дефосфорилирование (вне активационной петли) (рис. 55А) или связывание других сигнальных молекул (рис. 55Б).

Пример первого механизма дает рассмотренная выше активация c-Src, а также активация протеинкиназы Raf-1 под действием малой ГТФ-азы Ras в контексте MAP-киназного каскада (рис. 56). Неактивный Raf-1 находится в "сложенной" конформации. Эта конформация стабилизирована адаптерным белком 14-3-3, который связан с несколькими фосфорилированными остатками во втором регуляторном домене Raf-1. Активированный Ras взаимодействует с N-концевым доменом Raf-1 и рекрутирует его на мембрану, где фосфатаза PP2A дефосфорилирует вышеуказанные остатки. Белок 14-3-3 диссоциирует и открываются активирующие участки внутри третьего регуляторного домена. Другие протеинкиназы, независимо активированные рецепторами (такие как Src, PAK и PKB/Akt) фосфорилируют два расположенных рядом

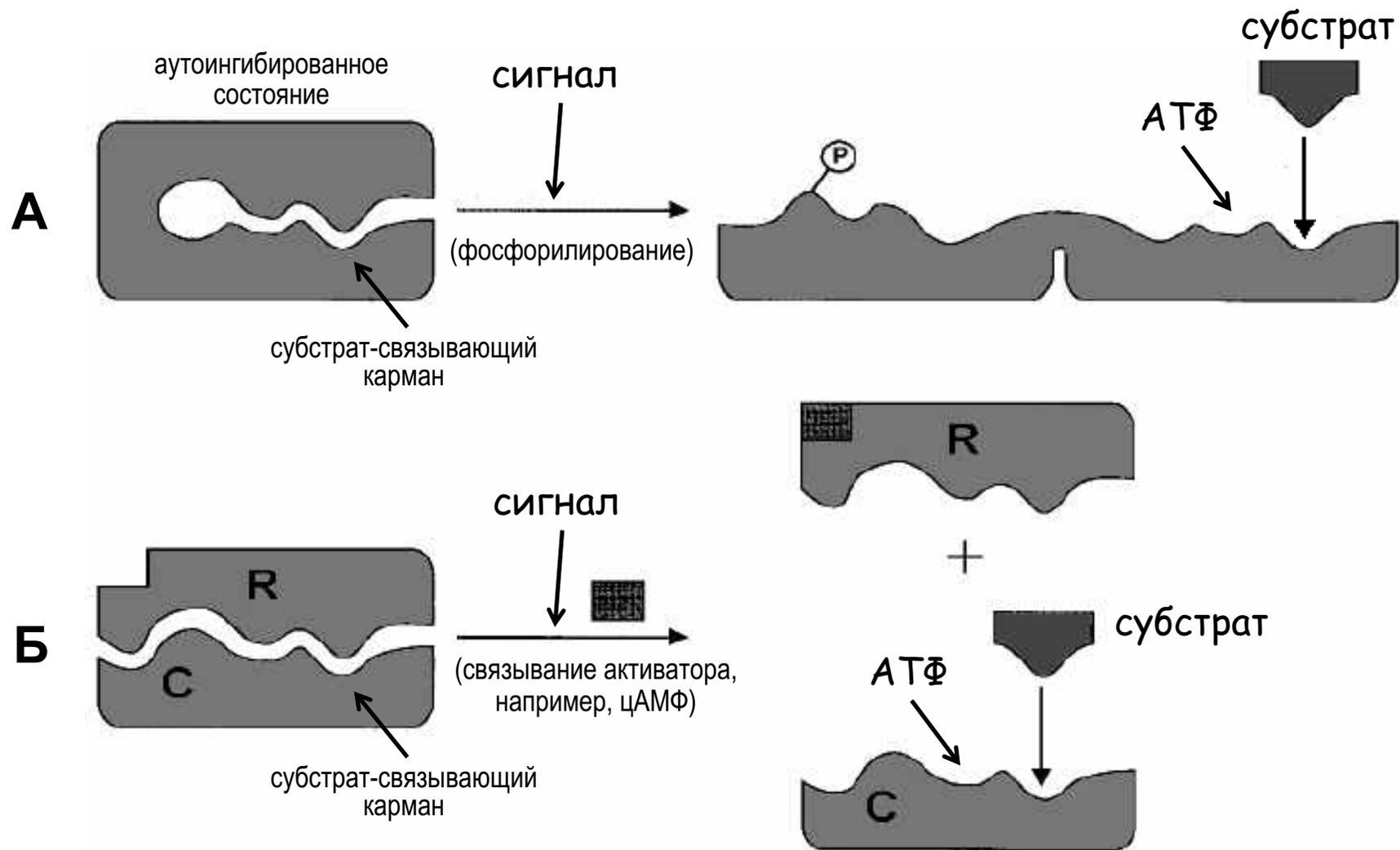


Рисунок 55

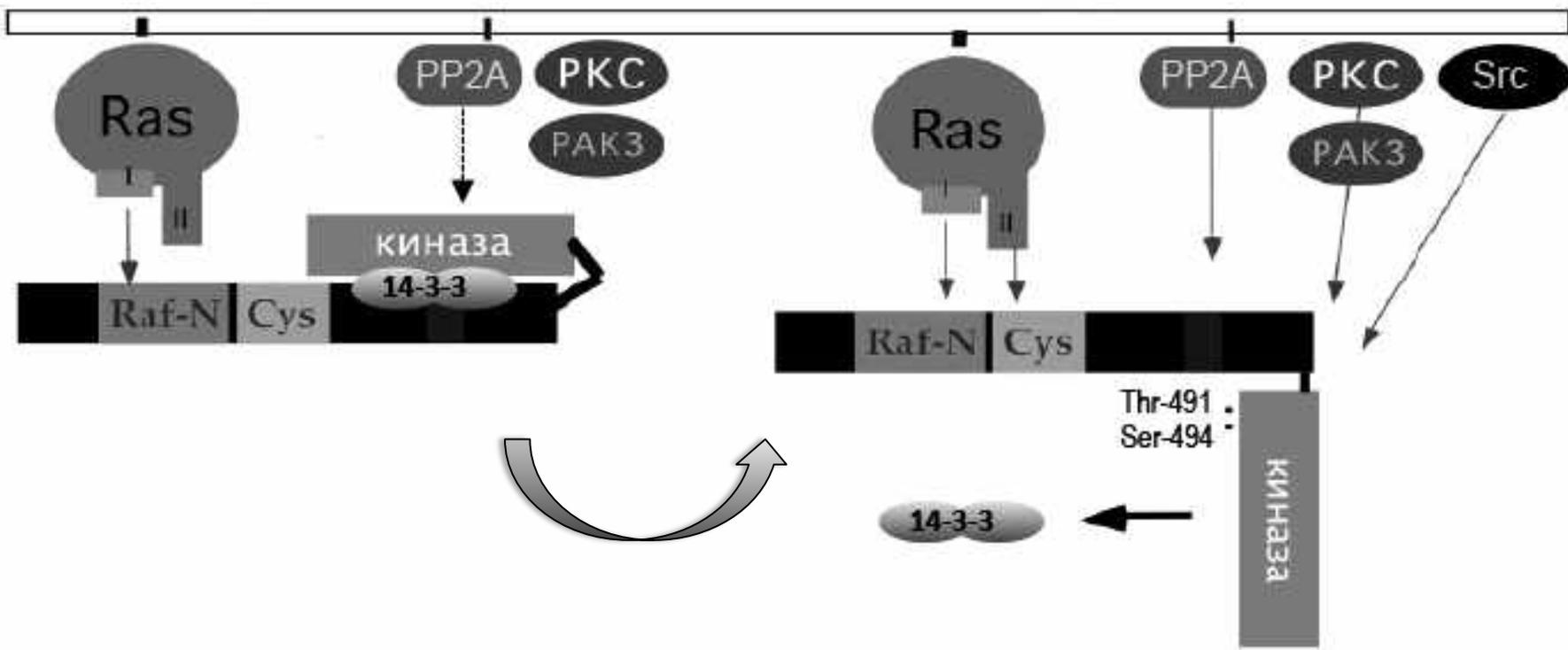
ключевых остатка (это Thr-491 и Ser-494 в Raf-1), что ведет к полному разворачиванию молекулы Raf-1 и снятию аутоингибирования с его киназного домена.

Протеинкиназа А является классическим примером второго способа активации. Апофермент РКА представляет собой тетрамер из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц, в котором регуляторные блокируют связывание субстрата с каталитическими. Связывание цАМФ в аллостерическом центре регуляторной субъединицы, лежащем в стороне от межсубъединичного интерфейса, так изменяет конформацию холофермента, что каталитические субъединицы диссоциируют от регуляторных и приобретают способность связывать субстрат (рис. 55Б). Похожим образом активируется и цГМФ-зависимая протеинкиназа. Однако, она является димером, в котором каждая из субъединиц содержит каталитический и регуляторный домен.

Другой иллюстрацией служит киназа легких цепей миозина (КЛЦМ). Она фосфорилирует остаток Ser-19 в регуляторных легких цепях миозина, что позволяет актину взаимодействовать с миозином, активировать его АТФ-азу и инициировать сокращение. В С-концевой части КЛЦМ находится регуляторный сегмент, который состоит из частично перекрывающихся аутоингибиторной и кальмодулин-связывающей последовательностей. Первая гомологична первичной структуре легких цепей в области Ser-19 и блокирует активный центр КЛЦМ, формируя "сложенную" конформацию фермента. При стимуляции поверхностных рецепторов в цитоплазме повышается концентрация ионов Ca^{2+} ; они связываются и активируют кальмодулин. Ca^{2+} -кальмодулин взаимодействует с регуляторным сегментом КЛЦМ и вызывает диссоциацию аутоингибиторной последовательности от активного центра КЛЦМ, делая возможным связывание легких цепей миозина и фосфорилирование Ser-19.

Фосфатазы нейтрализуют действие киназ

Протеинфосфатазы, как и киназы, могут быть серин-треониновыми (Ser/Thr), тирозиновыми (Tyr) или двойной специфичности. Отдельные классы составляют гистидиновые и липидные фосфатазы. Специфичность сигнальных каскадов и обратимая природа фосфорилирования предполагают, что количество киназ и фосфатаз в геноме человека должно быть одинаковым. Однако удивительно, что фосфатаз существенно меньше, чем киназ: их насчитывается всего лишь около 140. При этом основную долю составляют тирозиновые (107), а не серин-треониновые фосфатазы (около 30). Таким образом, число тирозиновых киназ и тирозиновых фосфатаз примерно совпадает, но количество каталитических субъединиц серин-треониновых фосфатаз на порядок меньше, чем соответствующих киназ. Такое несоответствие возникает из-за того, что серин/треониновые фосфатазы построены из нескольких субъединиц, а разнообразие определяется количеством регуляторных субъединиц и числом их комбинаций с каталитическими.



Рисункок 56

Тирозиновые фосфатазы могут быть рецепторными и нерцепторными, тогда как серин/треониновые разделяют на несколько групп в зависимости от структуры и каталитических особенностей. Основы этой классификации заложил сэр Филип Коэн (Philip Cohen), который 20 лет возглавлял лабораторию по исследованию фосфорилирования белков в университете г. Данди, Шотландия (Medical Research Council Protein Phosphorylation Unit) и до сих пор является одним из основных авторитетов в этой области. Интересно, что с 1992 по 2003 он был вторым, а в промежутке от 1999 до 2009 г. – первым в списке по количеству цитирований в области биохимии. Этот показатель ярко свидетельствует о том, какое место занимают вопросы внутриклеточной сигнализации в современной биохимии и клеточной физиологии.

Существует 3 вида серин/треониновых протеинфосфатаз: PPP (phosphoprotein phosphatases), PPM (металл-зависимые фосфатазы) и аспартатные (CTD) фосфатазы (рис. 57). Наиболее обширный класс PPP включает 7 групп фосфатаз: PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 и PP7. Все они имеют несколько субъединиц. Те фосфатазы, которые регулируют метаболизм клетки, относятся к типу 1 (PP1) или 2 (PP2). Среди последних выделяют металл-независимые PP2A (большинство), PP2B (кальцинейрин) и PP2C (Mg^{2+} -зависимые).

Фосфатазы PPP имеют каталитический домен размером около 30 кДа, внутри которого находятся важные для катализа консервативные остатки (рис. 57). Кальцинейрин (PP2B) несет особый С-концевой домен, в состав которого входят кальмодулин-связывающая (CBD) и аутоингибиторная (AI) последовательности. Механизм активации PP2B во многом напоминает активацию киназы легких цепей миозина. В неактивном ферменте CBD и AI "сложены" на спиральный домен ВВН так, что закрывают субстрату доступ в активный центр; ВВН стабилизирует эту конформацию. Активация происходит при связывании Ca^{2+} /кальмодулина, который нарушает взаимодействие ВВН с CBD и AI, в результате чего аутоингибиторная последовательность уходит в сторону. Сходным образом ведет себя и фосфатаза PP5. Она тоже находится в неактивной "свернутой" конформации, которую поддерживает взаимодействие N-концевого тетрапептидного повтора (TPR) с С-концевой спиралью α -J. Аутоингибирование устраняется при разворачивании третичной структуры фермента после связывания белков-активаторов с TPR-доменом.

Фосфатазы PPM (например, PP2C и фосфатаза пируватдегидрогеназного комплекса) используют для катализа ионы металлов (Mn^{2+} и Mg^{2+}). В отличие от PPP, у них нет регуляторных субъединиц, но они имеют дополнительные домены и консервативные последовательности, обеспечивающие субстратную специфичность (рис. 57).

Аспартатные фосфатазы используют механизм катализа с участием аспартата. Единственный известный субстрат – С-концевой домен РНК-полимеразы II типа (CTD), который содержит

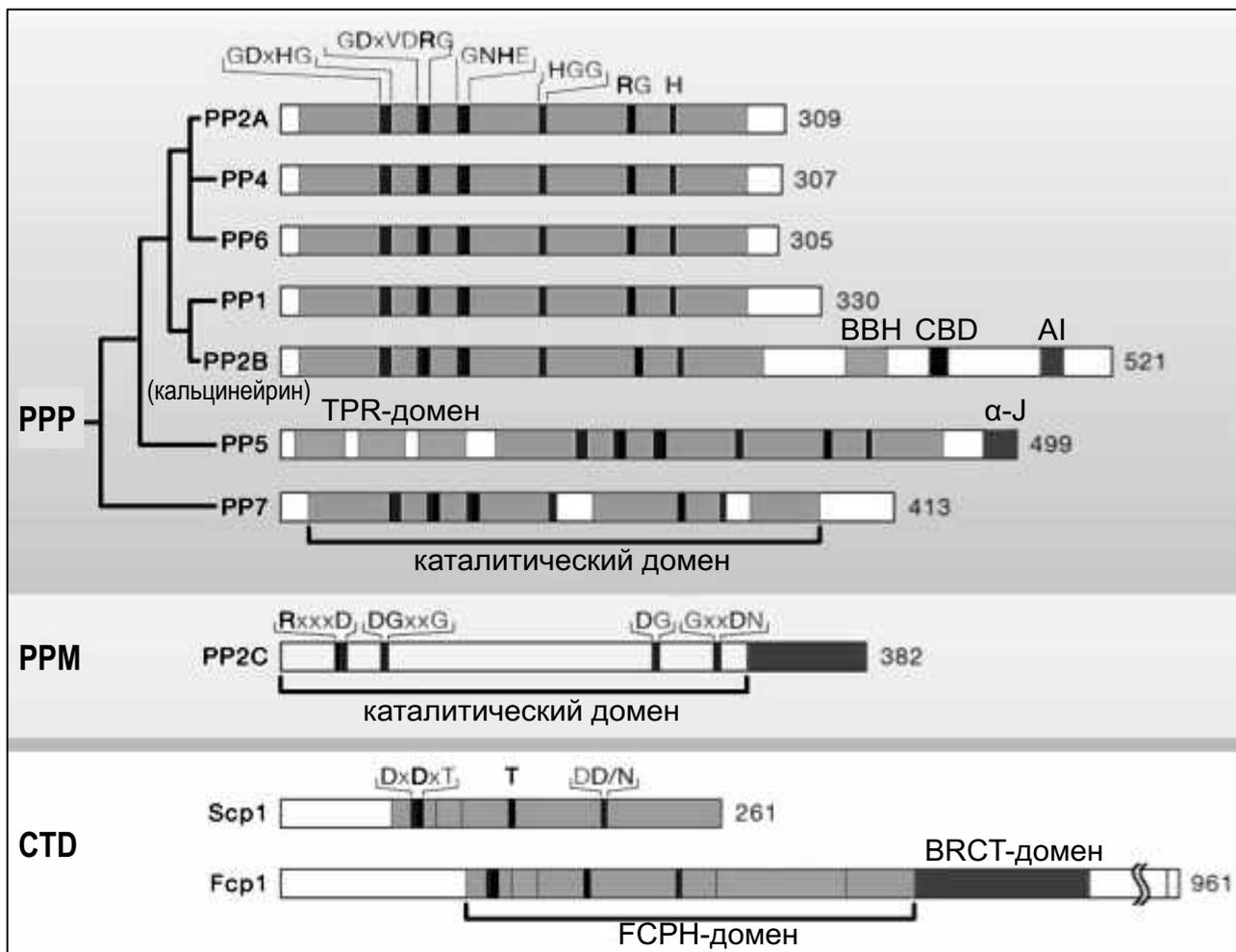


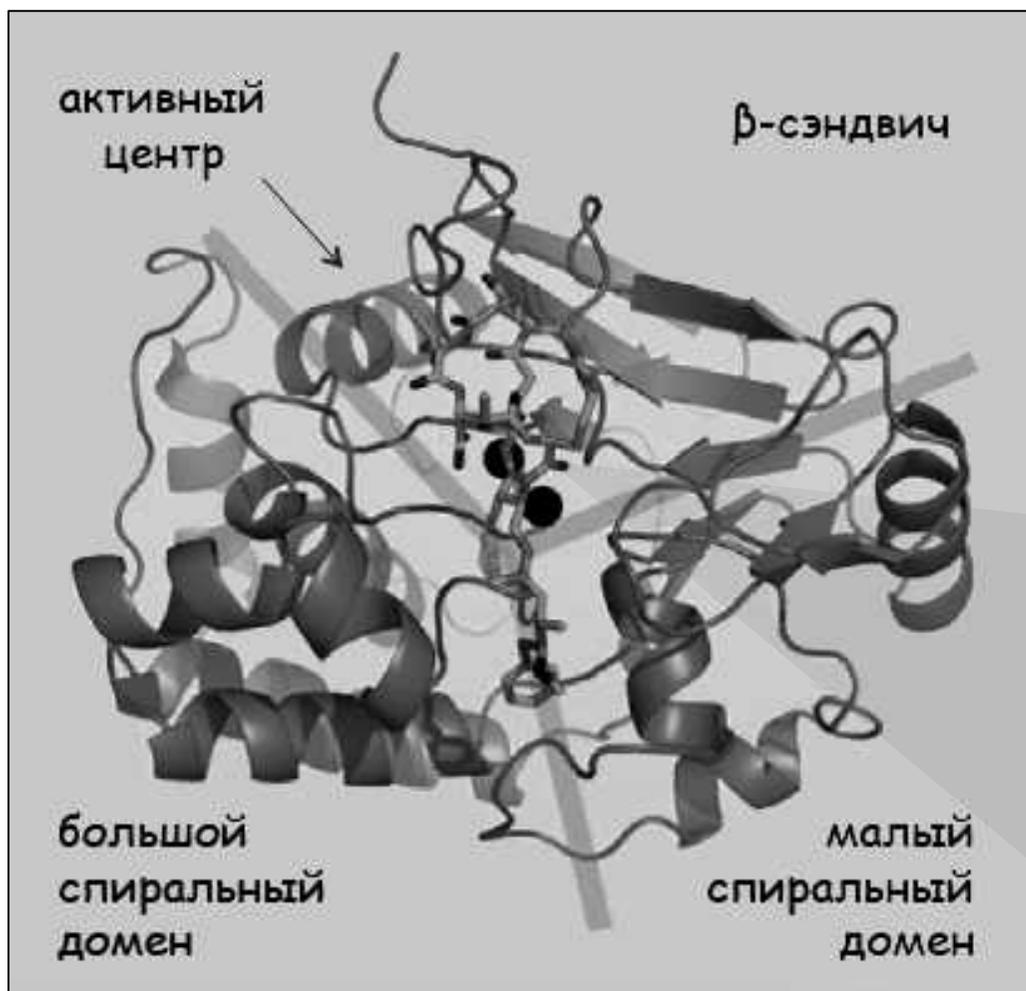
Рисунок 57

тандемные повторы гептапептида с большим содержанием серина и определяет альтернативное название этого класса фосфатаз как STD-фосфатаз. Дефосфорилирование этих остатков вызывает диссоциацию кэпирующих белков из комплекса элонгации и повышает транскрипционную активность РНК-полимеразы II типа. Все STD-фосфатазы имеют характерный каталитический домен, который назван FCPH по гомологии с фосфатазой дрожжей Fcp1, где он был впервые найден. Второй характерной структурой является BRCT домен гомологии с Ca²⁺-каналами BRCA1 (рис. 57).

Активный центр, общий для всех PPP фосфатаз, представлен на рис. 58. Пространственная структура каталитической субъединицы протеинфосфатаз первого типа (PP1c) показана в виде ленточной диаграммы слева, внутри активного центра находится высокоаффинный ингибитор оокадаевая кислота, которая использована для стабилизации кристалла белка. Три домена PP1c формируют Y-образную канавку, в которой скоординированы ионы Mn²⁺ и Fe²⁺ (пара темных шариков в центре структуры). Эта область молекулы увеличена справа. В нее входят шесть консервативных остатков; именно они координируют ионы металлов. Сверху в таблице показано положение этих остатков в первичной структуре PPP фосфатаз.

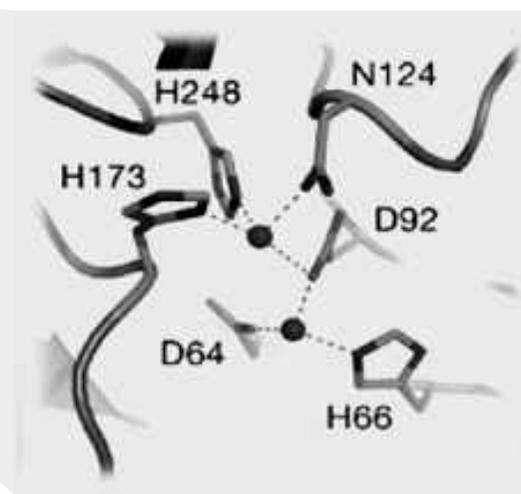
Регуляция активности большинства фосфатаз обеспечивается их регуляторными субъединицами. Классическим примером PP1-фосфатаз служит фосфатаза миозина. Она имеет трехсубъединичный состав. Каталитическая субъединица (38 кДа PP1c) является общей для нее и всех других PP1-фосфатаз. Главной регуляторной выступает МУРТ – миозин-связывающая субъединица (*myosin phosphatase targeting*, 110 кДа), а дополнительной – малая субъединица M20 (20 кДа), функции которой пока неясны. МУРТ выполняет каркасную функцию (см выше), непосредственно взаимодействуя с миозином и связывая PP1c своим N-концевым, а M20 – C-концевым доменом. Она направляет PP1c к миозину и увеличивает ее активность, а также дополнительно усиливает ее взаимодействие с миозином за счет малой субъединицы M20, которая сама на активность PP1c не влияет. Как и у других PP1-фосфатаз, МУРТ определяет субстратную специфичность общей для всех каталитической субъединицы PP1c, а также служат точкой приложения большинства регуляторных воздействий. Аналогичным образом действует гликоген-связывающая субъединица фосфатазы гликогенсинтазы, гликогенфосфорилазы и киназы фосфорилазы, регулирующих метаболизм гликогена в печени. Известно около 100 разных регуляторных субъединиц PP1c-фосфатаз. Они направляют PP1c в разные компартменты клетки – эндоплазматический ретикулум, мембрану клетки, микротрубочки и цитоскелет.

Кристаллография комплекса PP1c и N-концевого домена МУРТ проясняет структурную основу высокой субстратной специфичности и принципы регуляции фосфатазы РЛЦ миозина (рис. 59).



PP1	D64	H66	D92	N124	H173	H248
PP2A	D57	H59	D85	N117	H167	H241
PP2B	D90	H92	D118	N150	H199	H281
PP4	D54	H56	D82	N114	H164	H238
PP5	D242	H244	D271	N303	H352	H427
PP6	D53	H55	D81	N113	H163	H237
PP7	D84	H86	D113	N149	H197	H303

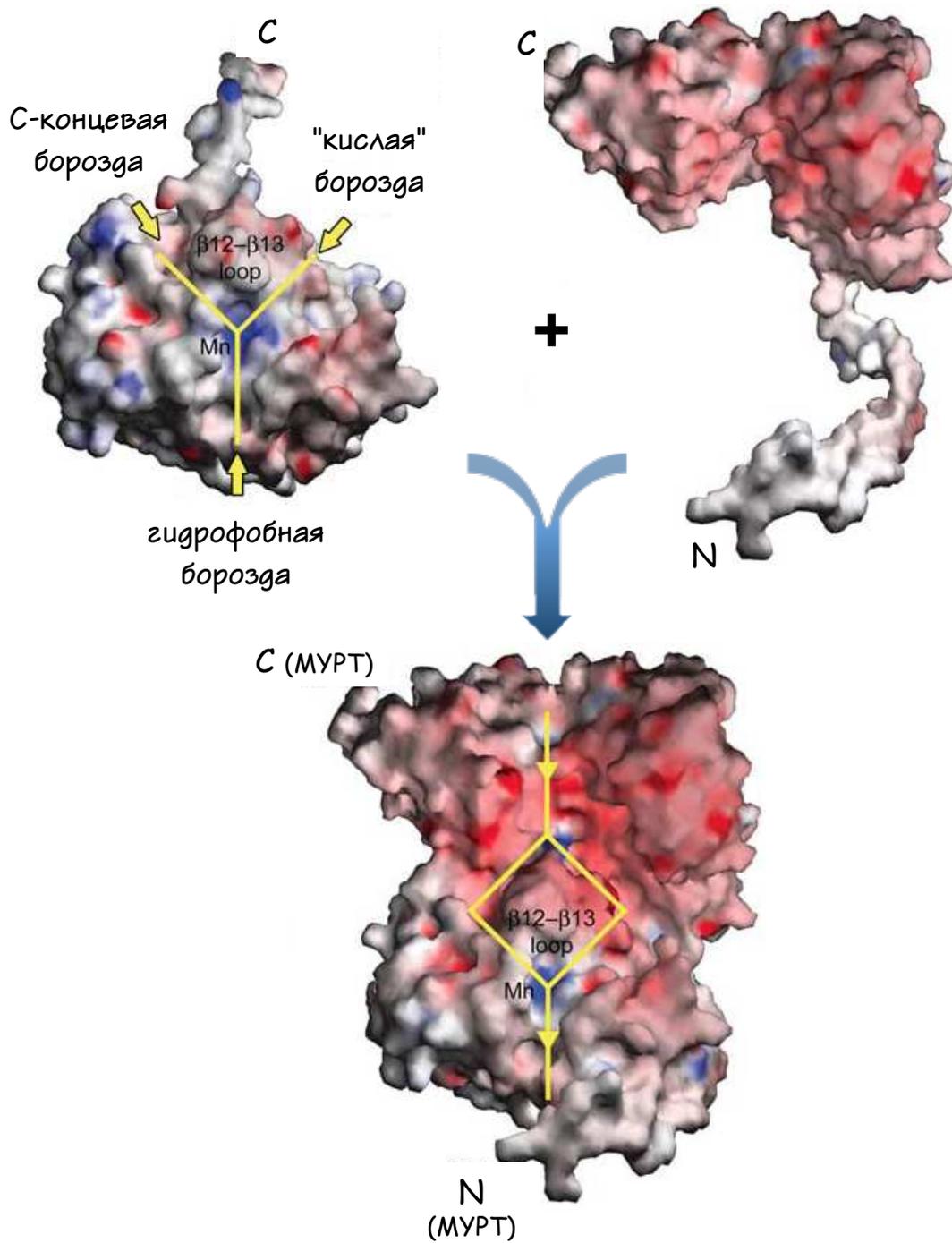
Активный центр PPP фосфатаз



Активный центр PP1c имеет Y-образную форму, три ветви которой являются углублениями белковой глобулы, сходящимися в точке связывания дефосфорилируемого остатка Ser-19 в регуляторных легких цепях (РЛЦ) миозина. Нижняя борозда содержит гидрофобные остатки и связывает гидрофобный N-конец МУРТ и гидрофобную область РЛЦ, расположенную к С-концу от Ser-19, фиксируя эти взаимодействия. Однозначная координация РЛЦ в активном центре достигается взаимодействием отрицательных остатков правого углубления ("кислой борозды") с положительно заряженными остатками РЛЦ, лежащими к N-концу от Ser-19. Связывание с МУРТ дополнительно структурирует и удлиняет эту борозду так, что ее форма почти полностью совпадает с конфигурацией РЛЦ, обеспечивая специфичность связывания комплекса PP1c-МУРТ с миозином. Белковая последовательность вокруг остатков Thr-696 и Thr-853 (внизу на [рис. 59](#)), фосфорилируемых Rho-киназой, ZIP-киназой и ILK, имеет сходное с РЛЦ распределение заряженных и гидрофобных остатков. Считается, что фосфорилированный Thr-696 связывается с активным центром фосфатазы и выключает ее активность путем аутоингибирования, тогда как фосфорилирование Thr-853 нарушает взаимодействие компонентов фосфатазного комплекса.

Фосфатазы PP2A существуют в двух видах – гетеродимерных апоферментов и гетеротримерных холоферментов. Это наиболее распространенная группа фосфатаз и в некоторых тканях они составляют до 1% клеточного белка. Коровая часть PP2A состоит из каталитической (С) и каркасной субъединицы (известной также как А или PR65). Каждая из них имеет по две изоформы (α и β), причем α -изоформы почти на порядок больше β . Такой коровый афермент объединяется с разными регуляторными субъединицами, образуя холофермент. Регуляторные субъединицы разделяются на 4 семейства: В (также известны как В55 или PR55), В' (В56 или PR61), В'' (PR48/PR72/PR130), и В''' (PR93/PR110). Каждое семейство насчитывает от 2 до 5 изоформ, они кодируются разными генами и, в свою очередь, могут иметь несколько сплайс-вариантов. Таким образом, как и в случае PP1-фосфатаз, каталитическая часть у PP2A общая, а разнообразие и субстратную специфичность придают регуляторные субъединицы.

Каркасные А-субъединицы есть только у PP2A. Они содержат 15 тандемных повторов типа HEAT (huntingtin-elongation-A subunit-TOR) и формируют вытянутую подковообразную структуру ([рис. 60](#)). Каждый HEAT повтор содержит две антипараллельных α -спирали, которые соединены петлей из очень консервативных остатков. В полной структуре эти петли образуют своеобразный "хребет". Каталитические субъединицы связываются с повторами 11-15, а регуляторные – на противоположном конце подковы, но различным образом. Например, В-субъединица узнает HEAT повторы 1-7, а В'-субъединица – повторы 2-8. В составе холофермента В- и С-субъединицы взаимодействуют, но количество контактов сильно варьирует в зависимости от типа В-субъединицы ([рис. 60](#)).

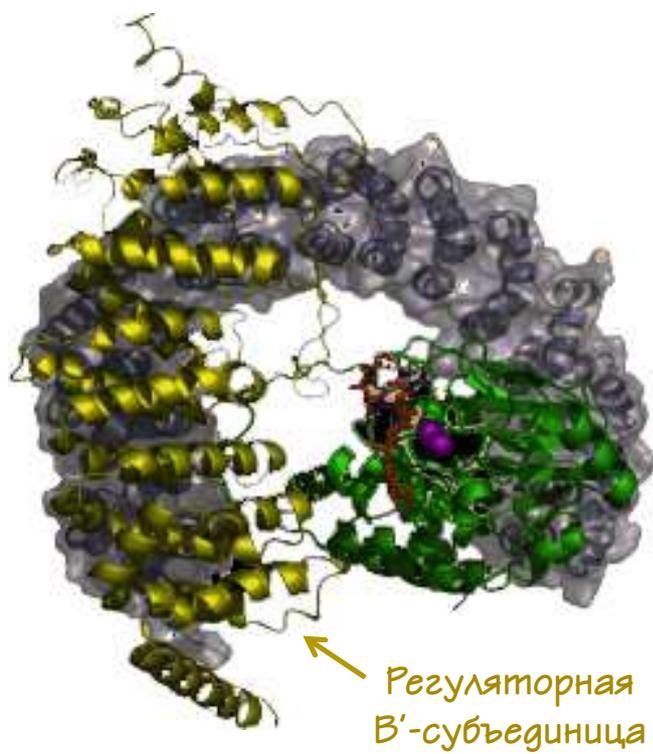
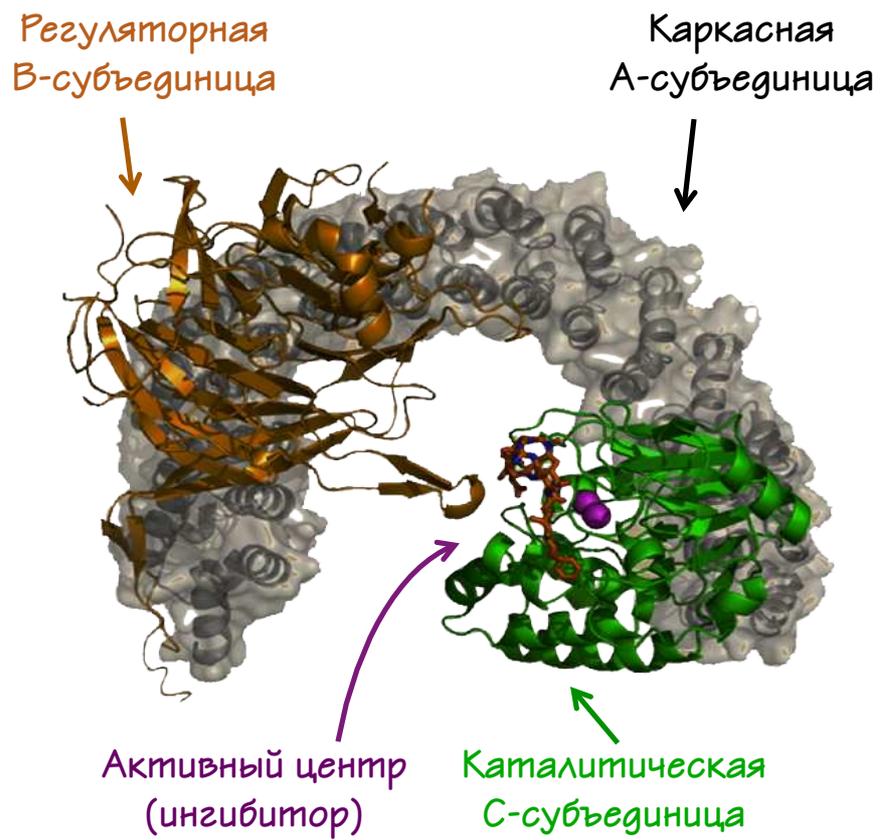


МУРТ { **Q**R**K**A**R**S**R**L**M**R**Q**S**R**R**S****I**^{p(695)}**T**Q**G**V**T**L**I**T

P**K**S**I****R****E****R**R**R**P**R**E**K**R**R**S**I**^{p(850)}**G**V**S**F**W**T

РЛЦ **K**R**A****K****A****K****T****T****K****K**R**P****Q**R**A**T**S**^{p(19)}**N**V**F**A**M**F

Рисунок 59



Выключение рецепторов происходит в несколько этапов

Время жизни активного рецептора определяется константой равновесия лиганд-рецепторного комплекса. Клетка контролирует это равновесие преимущественно за счет изменения скорости диссоциации лиганда. Это часто бывает необходимо чтобы избежать избыточной стимуляции при высоком гормональном фоне или плохо метаболизирующими веществами, например алкалоидами, лекарственными и другими чуждыми организму соединениями.

Выделяют 4 основных стадии выключения рецепторов (рис. 61). Первая реакция на избыточную активацию рецептора наступает достаточно быстро и представляет собой пост-трансляционную модификацию внутри его цитоплазматического домена. Как правило, такой модификацией служит фосфорилирование одного или нескольких остатков. Кроме этого, рецептор может подвергаться алкилированию, пренилированию или убиквитинированию. В совокупности, эти модификации приводят к снижению сродства рецептора к лиганду или, другими словами, увеличению скорости диссоциации лиганда. Поэтому это явление именуется *десенситизацией* рецептора, т.е. потерей его чувствительности к лиганду.

Фосфорилирование и убиквитинирование создают предпосылки для связывания с рецепторами определенных каркасных белков, которые собирают на них комплексы эндоцитозной машинерии. В результате рецепторы эндоцитируют, их плотность и количество на поверхности клетки падает. Это явление обозначается как *даунрегуляция* рецепторов. В процессе даунрегуляции снижается как число лиганд-связывающих участков, так и количество лиганда вокруг клетки. Как ни странно, последнее иногда может быть важным и представлять часть физиологического механизма. Так происходит в случае направленного движения фибробластов в область раны, где эти клетки синтезируют внеклеточный матрикс и тем самым репарируют повреждение. Эти клетки движутся посредством хемотаксиса, а хемоаттрактом им служит тромбоцитарный фактор роста (PDGF), который в избытке образуется в очаге повреждения. Фибробласты активно поглощают его путем эндоцитоза, протекающем преимущественно на переднем крае движущихся клеток. В результате локальная концентрация PDGF вокруг задней части клетки падает и непрерывно поступающий спереди PDGF создает градиент, направляющий движение клеток. В дополнение к даунрегуляции, этот механизм также наглядно иллюстрирует необходимость восстановления числа рецепторов на поверхности клетки – без этого преимущественное связывание лиганда на фронтальной мембране и восприятие хемотактического градиента стало бы невозможным.

Рециклирование представляет собой процесс возвращения рецепторов на внешнюю мембрану. Этому предшествуют два важных события; оба происходят пока рецептор находится в составе эндосом. Во-первых, лиганды диссоциируют от рецепторов и инактивируются (рис. 61). Во-

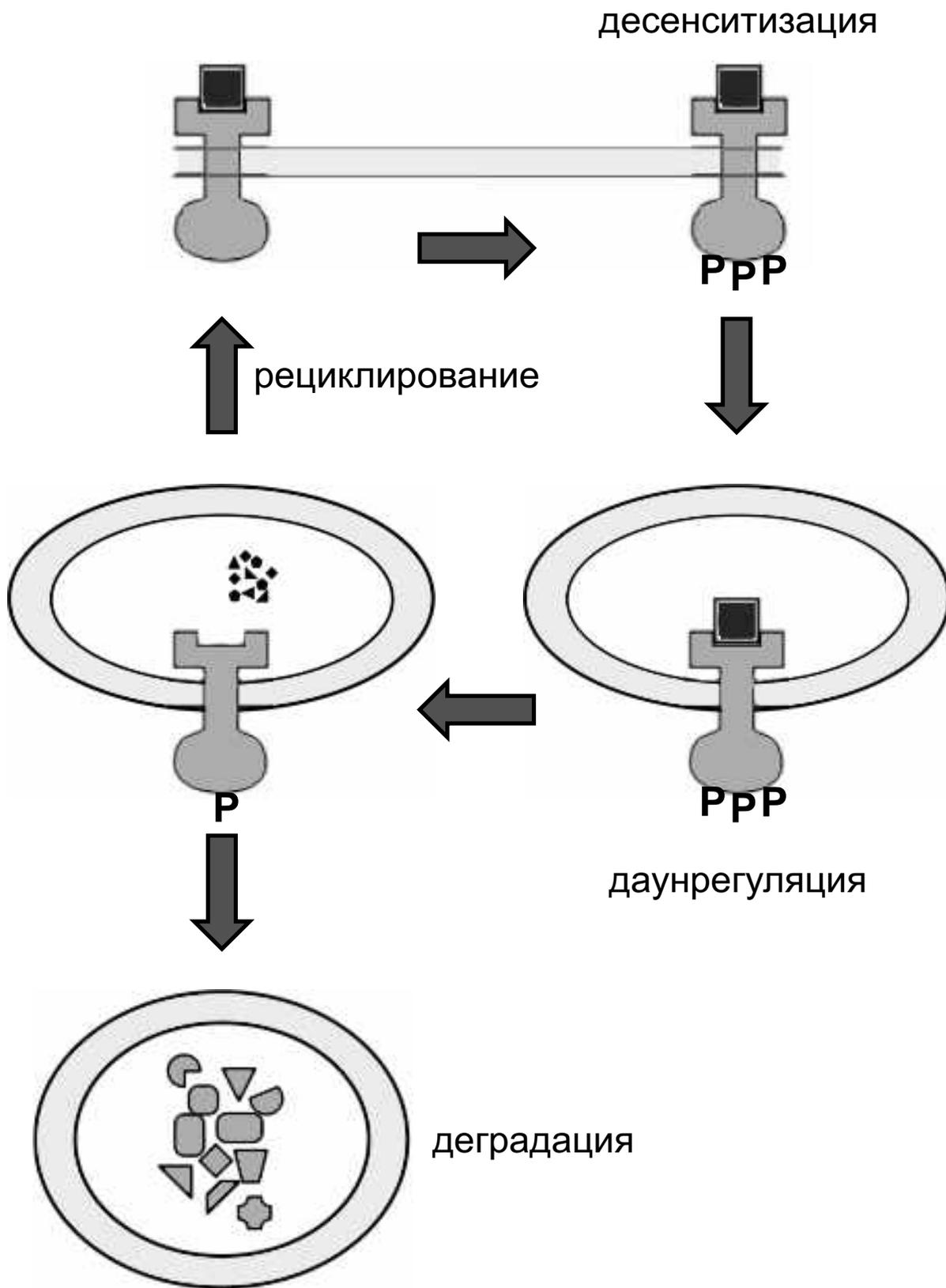


Рисунок 61

вторых, рецепторы подвергаются дефосфорилированию, что возвращает им чувствительность к лигандам. После этого происходит так называемая "сортировка" эндосом, в результате которой часть эндосом направляется назад к плазматической мембране и сливается с ней, экспонируя находящиеся в них рецепторы. К этому моменту эти рецепторы дефосфорилированы и свободны от лиганда, т.е. полностью идентичны тем, которыми они были до выключения. Другая часть рецептор-содержащих эндосом сливается в цитоплазме с лизосомами и рецепторы подвергаются необратимой *деградации*. Возможно, по каким-то причинам эти рецепторы остаются устойчивы к дефосфорилированию или диссоциации лиганда и поэтому уничтожаются клеткой. С другой стороны, деградации могут подвергаться только те рецепторы, которые обеспечивают избыточный сигнал от гормона, или те рецепторы, которые закончили свой жизненный цикл.

Интернализация рецепторов путем рецептор-зависимого эндоцитоза происходит тремя базовыми способами (рис. 62). Клатрин-зависимый эндоцитоз запускается очень быстро после активации рецептора. В зависимости от типа рецептора, с ним взаимодействуют специальные адаптерные белки, например AP-2, Eps15, Cbl или CIN85/Ruk, а также каркасные белки типа β -аррестина. Как правило, эти белки содержат PH-домены, которые позволяют им связываться с мембраной через PIP2 или PIP3, и давать сигнал к эндоцитозу в той части мембраны, где находится рецептор. Эти белки также взаимодействуют с клатрином, который рекрутируется в область скопления рецепторов и покрывает внутреннюю поверхность участка мембраны (*membrane coating*). Из-за особой структуры клатрина, известной как трискелион, эти участки втягиваются, образуя окаймленные клатрином ямки (*clathrin-coated pits*, CCP). Увеличиваясь и отрываясь внутрь клетки под действием моторного белка динамина, они образуют клатрин-покрытые везикулы (*clathrin-coated vesicles*, CCV). Время жизни этих везикул очень мало: как только они отрываются от мембраны, клатриновая оболочка диссоциирует и распадается. Этот процесс активно регулируется белками HSC70 и оксилином, поэтому продолжается всего 2-3 минуты. Образующиеся в результате непокрытые везикулы сливаются или друг с другом, формируя ранние эндосомы, или с уже сформировавшимися ранними эндосомами.

Клатрин-независимый эндоцитоз может происходить с участием или без участия кавеолина – белка, выстилающего более крупные ямки в мембране, образованные плотными липидными структурами (плотами или рафтами, от англ. rafts) (рис. 62). В обобщенном виде, кавеолин-зависимый эндоцитоз происходит аналогично клатрин-зависимому. Отрыв везикул от мембраны внутрь клетки в обоих случаях осуществляет молекулярный мотор динамин.

Если мембранные плоты большие и жесткие, кавелин и клатрин неспособны согнуть мембрану и создать углубления. В этом случае к плотам присоединяется актиновый цитоскелет, который

Рафтовый эндоцитоз

Клатрин-
зависимый
эндоцитоз

Кавеолин-
зависимый
эндоцитоз

Клатрин/кавеолин-
независимый
эндоцитоз

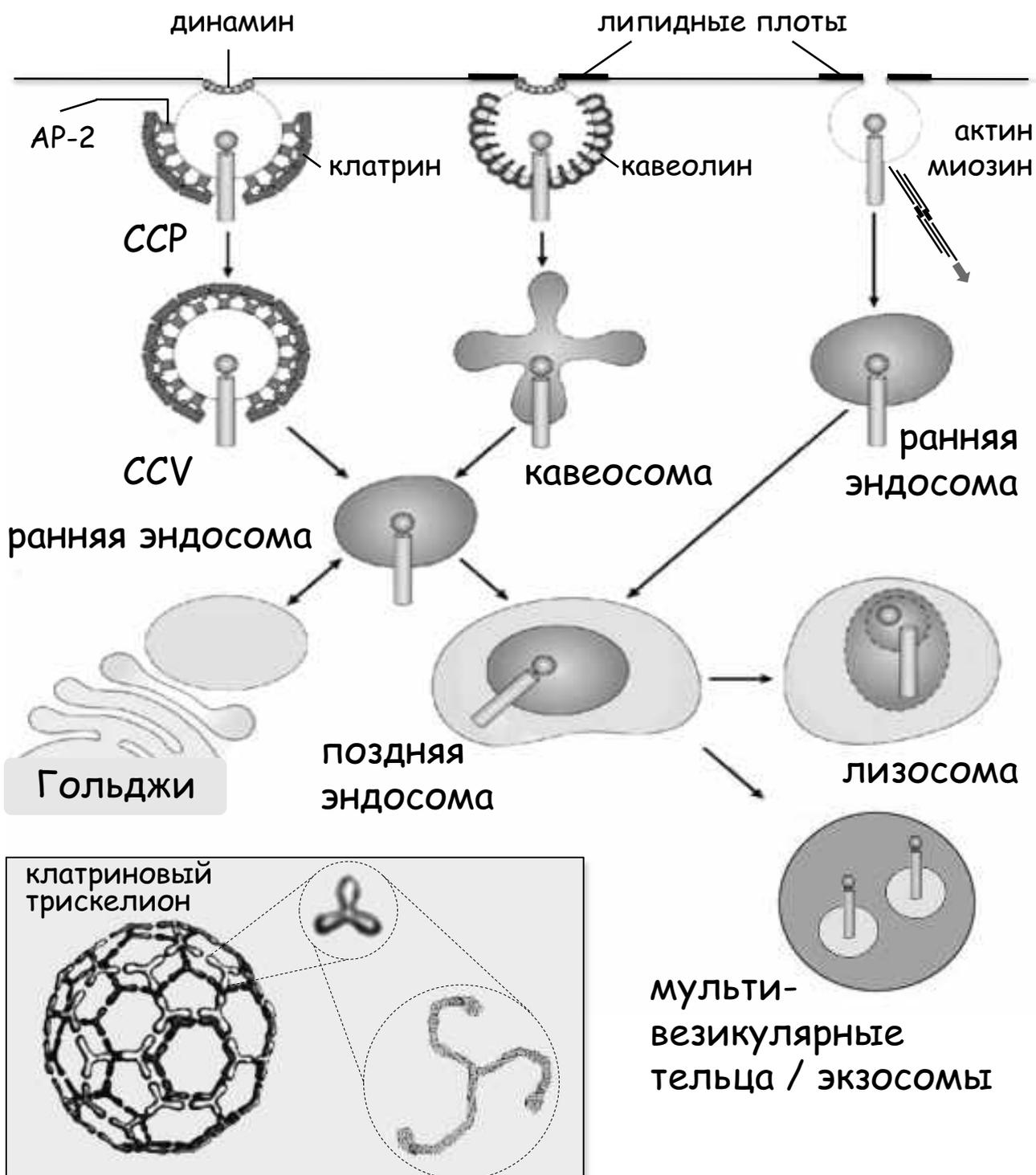


Рисунок 62

принудительно втягивает в клетку большие фрагменты мембраны клатрин/кавеолин-независимым образом, и за счет работы миозиновых моторов (рис. 62).

Процесс сортировки и траффика (направленного перемещения) везикул и эндосом в цитоплазме регулируется малыми ГТФ-азами семейства Rab. Это самая многочисленная группа малых ГТФ-аз, что еще раз подчеркивает значимость этого процесса. Разные Rab-белки преимущественно связывают эндосомы определенного "возраста", т.е. времени, прошедшего после их образования. С "возрастом" состав эндосом изменяется, и не только в отношении находящихся в них рецепторов и лигандов, но и по набору ассоциированных сигнальных молекул. К числу последних относятся факторы обмена гуаниловых нуклеотидов Rab-белков, которые изменяют активность этих ГТФ-аз и, тем самым, регулируют активность ассоциированных белков и их замену. Это приводит к тому, что Rab-белки как бы передают эндосомы с "рук на руки" моторным белкам и их регуляторам, обеспечивающим принудительный транспорт эндосом по цитоскелету (в основном, по микротрубочкам). Простая диффузия везикул по цитоплазме крайне затруднена и практически не происходит. С одной стороны, это заставляет клетку, а с другой стороны дает ей возможность внимательно и динамично регулировать долю рециклирующих и деградирующих эндосом, а также оставлять часть из них в виде поздних эндосом и так называемых мультивезикулярных телец. Последние являются результатом вторичного эндоцитоза в составе эндосом и представляют собой везикулы внутри везикул (рис. 62). Хотя функции этих структур остаются во многом загадкой, есть данные о том, что внутренние везикулы могут содержать все еще активные поверхностные рецепторы или специфические сигнальные комплексы. Кроме того, эти вторичные везикулы рассматриваются в настоящее время как резервуары, содержащие наборы микро-РНК, специально сформированные клеткой для отправки во внешнюю среду в виде так называемых экзосом или микровезикул.

Присутствие в эндосомах эндоцитированных рецепторов, связанных с лигандом, позволяет клетке поддерживать активность ассоциированных с ними сигнальных комплексов и каскадов. В этом отношении наиболее активными являются ранние эндосомы, время жизни которых составляет около 40 минут. В течение этого времени активность рецептора поддерживается либо за счет еще не метаболизовавшего лиганда, либо за счет работы специальных механизмов обратной связи внутри активированных рецепторами каскадов. Эти механизмы подробнее обсуждаются в последующих разделах. Помимо них, сигнальные комплексы могут формироваться избирательно на эндосомах *de novo* и использовать для этого свой набор сигнальных молекул. Примером могут служить Р13-киназы III класса, которые отвечают за образование Р1Р3 и организацию сигнального каскада исключительно на эндосомах, тогда как Р13-киназы I и II класса связаны с плазматической мембраной и поверхностными рецепторами.

Сигнальные эндосомы запускают свои уникальные каскады, которые отличны от тех, что связаны с плазматической мембраной. Такие эндосомы часто именуется сигналосомами. Характерные для них каскады базируются на эндосомальных белках и (фосфо)липидах, а также все основные типы мембранных рецепторов за исключением LGIC (рис. 63). После интернализации рецепторов, сопряженных с тримерными G-белками, с ними часто остается связанным β -аррестин (рис. 63А). Он служит каркасным белком для MAP-киназ, собирая на себе их каскад и направляя его активность на цитозольные мишени, в то время как несвязанные с ним MAP-киназы в основном фосфорилируют транскрипционные факторы и другие белки, имеющие ядерную локализацию. В случае тирозинкиназных рецепторов на ранние эндосомы приходит белок p18, специфичный для липидных плотов эндосом (рис. 63Б). Он активирует сборку сигнального комплекса MAP-киназ на основе каркасных белков MP1 и p14 и такой комплекс долго сохраняет свою активность на поверхности поздних эндосом. Цитокиновые рецепторы трансформирующего фактора роста β (TGF- β R) после интернализации взаимодействуют с PIP3-связывающим белком SARA (SMAD anchor for receptor activation) и вызывают фосфорилирование и диссоциацию связанного с ним белка SMAD2 (рис. 63В). Фосфорилированный SMAD2 вступает во взаимодействие со SMAD4 и этот комплекс транслоцируется в ядро, где оказывает свое транскрипционное действие. Кроме того, с эндосомами взаимодействует другой белок – эндофин, который связывает PIP3, а также TGF- β R и SMAD4, способствуя образованию комплекса SMAD2–SMAD4. Наконец, рецептор не обязательно должен присутствовать в эндосомальных сигнальных комплексах, как в случае PIP3, который синтезируется PI3-киназами III класса локально и независимо от рецепторов. Этот PIP3 привлекает специфичные для эндосомального компартмента каркасные белки (например EEA1), которые содержат FYVE или PX домены взаимодействия с фосфоинозитидами (рис. 63Г).

Интеграция и регуляция

Интеграция определяется как сведение нескольких сигналов, поступающих по своим каналам, к определенному набору или последовательности стереотипных ответных реакций клетки. Этот принцип объясняет, по крайней мере частично, почему число внешних сигналов и их разновидностей существенно превышает количество конечных клеточных ответов. Последние можно свести к нескольким общим реакциям, таким как деление, движение, апоптоз, секреция, изменение метаболизма и некоторые другие. Каждая из них развивается в ответ на воздействие различных внешних сигналов. Например, растворимые хемоаттрактанты и нерастворимые белки внеклеточного матрикса вызывают однотипные двигательные реакции, которые опосредованы сходными механизмами проведения сигнала внутри клеток. Это означает, что клетка умеет интегрировать информацию от разных воздействий для того, чтобы дать скоординированный ответ. Вместе с тем, такой ответ является сбалансированным результатом (фактически

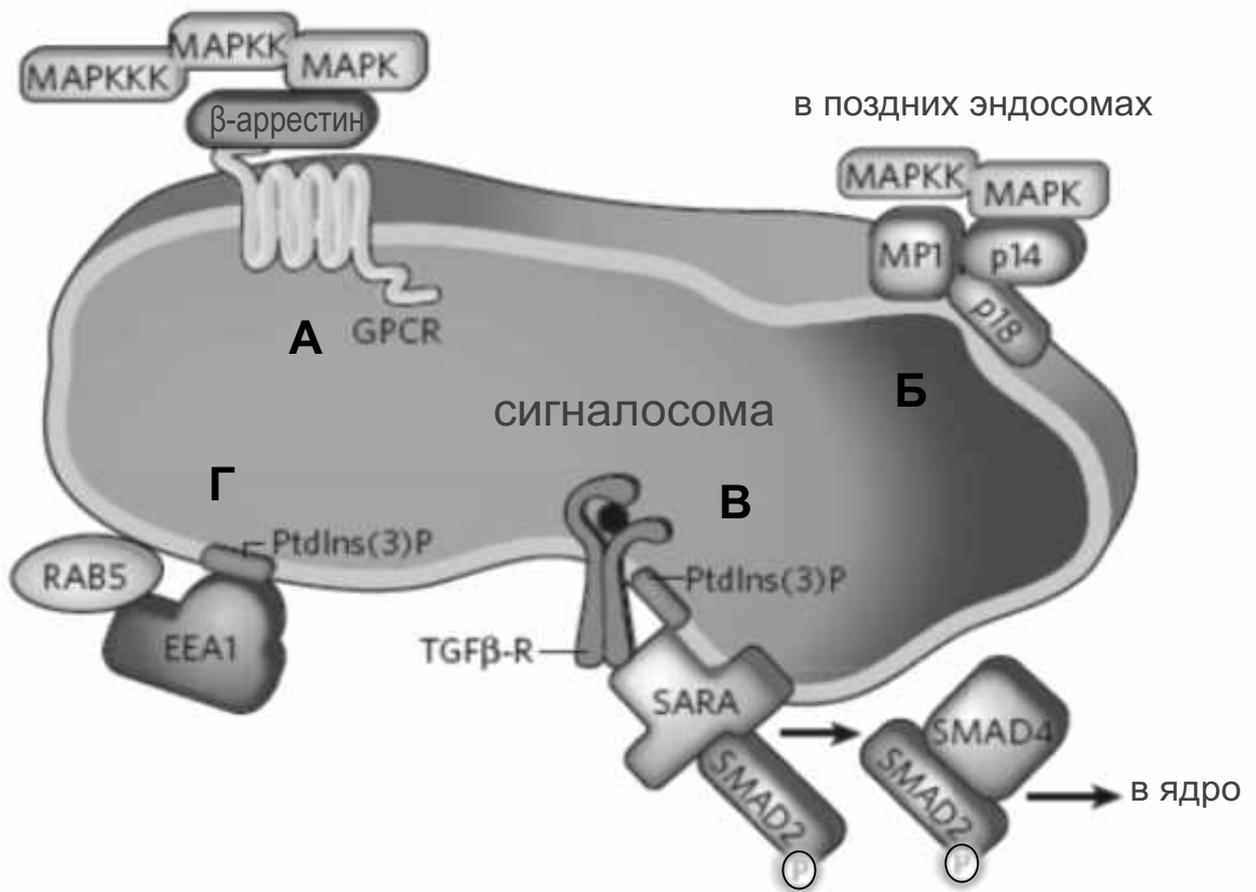
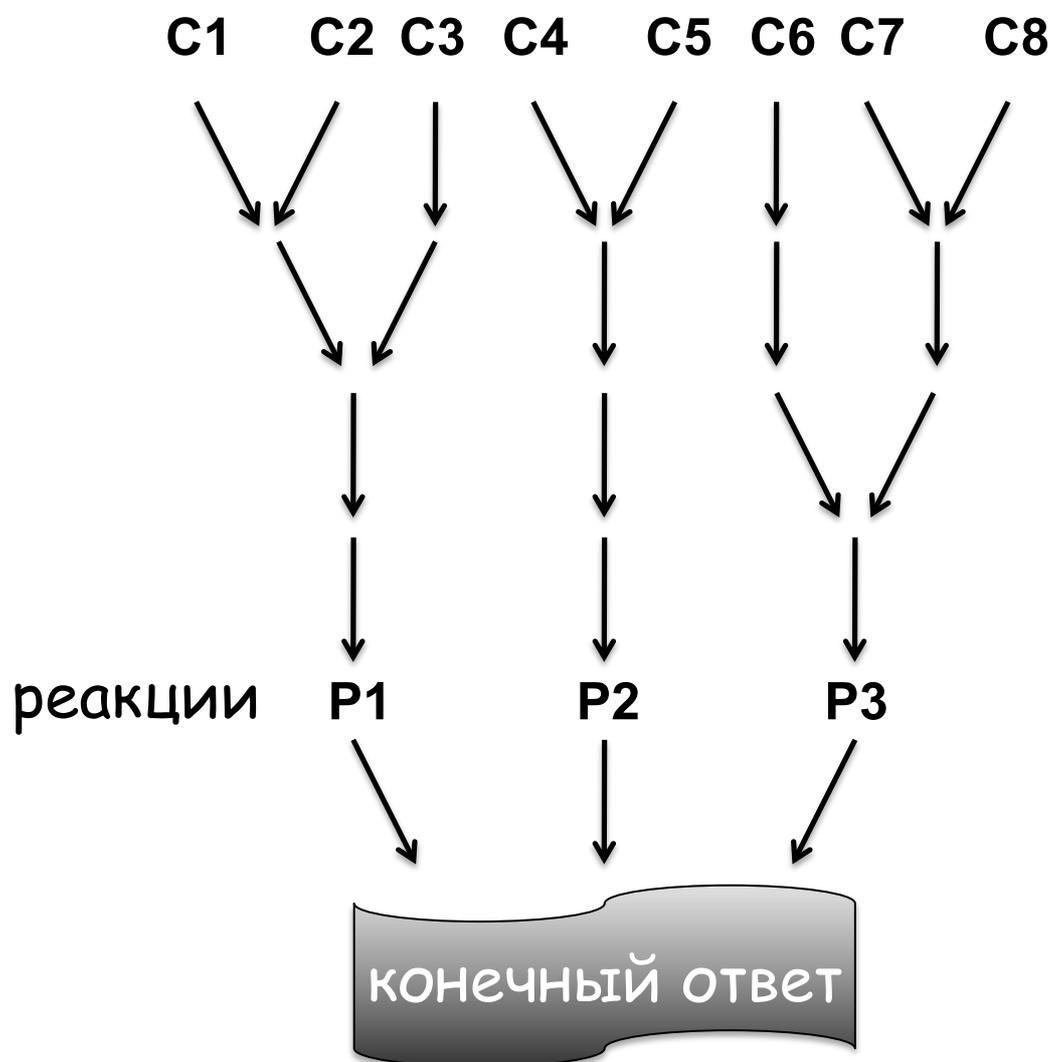


Рисунок 63

СТИМУЛЯТОРЫ



суперпозицией отдельных реакций) от активации нескольких сигнальных механизмов, в том числе интегрированных (рис. 64). Это позволяет клетке реагировать адекватно, изменяя параметры своих реакций.

Внутриклеточные реакции на внешние стимулы различаются по типу, расположению в клетке, силе и длительности. Если первые два параметра можно контролировать достаточно просто, то это не столь очевидно в отношении двух последних. Действительно, тип реакции можно определить набором ее исполнителей; избирательно доставить сигнал только к ним и обеспечить активацию в клетке по принципу "все-или-ничего". Нужного расположения в клетке тоже можно добиться достаточно просто путем принудительной локализации компонентов доставляющего сигнал каскада и/или исполнителей этой реакции в клетке. Однако существенно сложнее контролировать силу и длительность клеточных реакций. Кроме того, оказывается, что эти два параметра являются не только количественными характеристиками реакции, но и могут определять ее качественно. Например, известный из физиологии мышечного сокращения феномен тетанического сокращения является следствием чрезмерно интенсивной кальциевой сигнализации внутри клетки. При этом не изменяется тип реакции (сокращение), но меняется ее вид и возникают мышечные судороги. Длительность активации сигнальных каскадов может менять и тип клеточного ответа, например, переключая его с деления на дифференцировку, или с роста на апоптоз. Классическим примером такого переключения является переход клеток феохромоцитомы PC12 с роста на нейрональную дифференцировку при изменении длительности активации Erk-MAP-киназного каскада (рис. 65).

Регуляция позволяет клетке решить вопросы, связанные с изменением силы и длительности потока информации, проходящего по сигнальным цепям. Изменение активности отдельных сигнальных молекул служит для этого инструментом. Результат таких воздействий распространяется вдоль сигнальной цепи, поскольку она, в сущности, представляет собой ряд сопряженных реакций. Если в такой системе возникают обратные связи, то в зависимости от их характеристик, результат перестает быть однозначно предсказуем и конечный ответ может быть усилен, ослаблен или приобретать самоподдерживающийся характер. Подробнее такие примеры рассмотрены ниже.

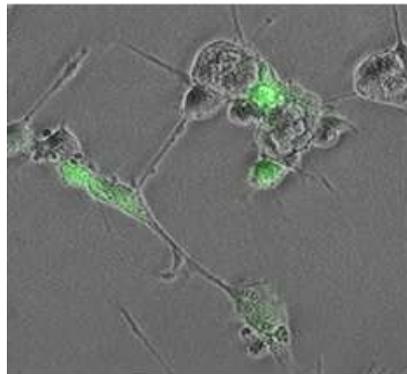
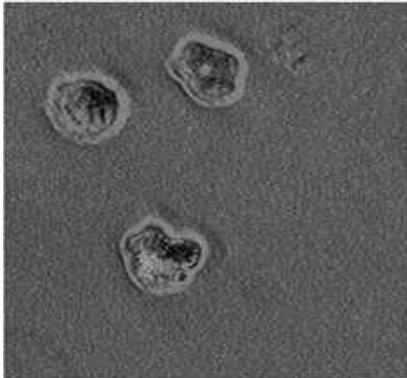
Разные рецепторы используют одинаковые сигнальные каскады

Принцип интеграции сигналов проиллюстрирован на рис. 66 на простейшем примере сведения сигналов от двух разных мембранных рецепторов. Возможны два варианта такой интеграции, которые напоминают логические операции 'AND' и 'OR'. В первом случае интеграция зависит от "детекторов совпадения", которые активируются только тогда, когда получают сразу оба (или несколько) входящих сигнала (рис. 66А). Каждый из каскадов приводит к фосфорилированию одного остатка общего белка-мишени Y, но этот белок переходит в активное состояние только

клетки PC12

рост

дифференцировка



EGF

NGF

0 2 5 10 30 60

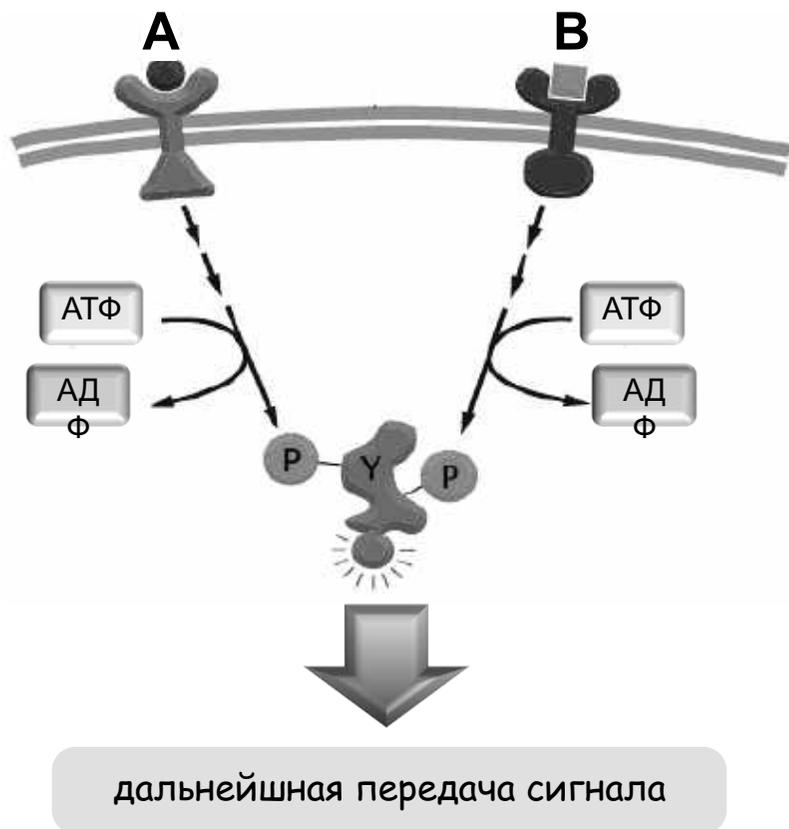
0 2 5 10 30 60 (min)



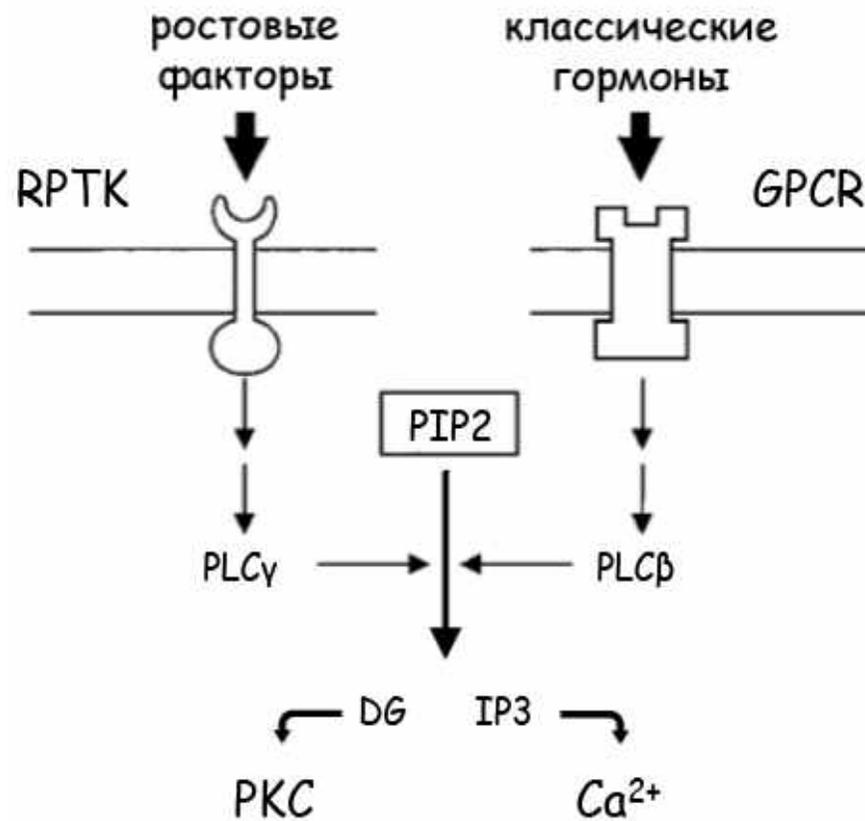
pMAPK1/2
(42,44 kD)

MAPK2
(42 kD)

А



Б



когда фосфорилированы оба остатка сразу. В другом случае (рис. 66Б) и тирозинкиназные рецепторы (RPTK), и $\alpha 2$ -адренэргические рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR), одинаково хорошо стимулируют в клетках фосфоинозитидный обмен. При этом RPTK напрямую активируют фосфолипазу C γ , а GPCR опосредовано активируют фосфолипазу C β за счет $\beta\gamma$ -субъединиц тримерного G-белка. Любая из фосфолипаз расщепляет фосфатидил-инозитол-4,5-бисфосфат (PIP₂) в плазматической мембране, что ведет к накоплению растворимого инозитолтрифосфата (IP₃) и остающегося в мембране диацилглицерола (ДАГ). Конечный результат активации обоих рецепторов одинаков и полностью аддитивен: IP₃ вызывает выход Ca²⁺ из внутриклеточных депо, ДАГ активирует протеинкиназу C (PKC).

Другим примером, более сложным по количеству участников, является активация общих MAP-киназных каскадов тирозинкиназными рецепторами факторов роста и цитокиновыми рецепторами (рис. 67). И в том, и в другом случае интегратором является малая ГТФ-аза Ras, которая запускается фактором обмена нуклеотидов SOS и адаптерными белками, взаимодействующими с рецепторами. Тот же каскад MAP-киназ активируют и рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками; для передачи сигнала они используют каркасный белок β -аррестин.

Таким образом, в настоящее время уже не вызывает сомнений, что разные по структуре и способу действия рецепторы используют сходный репертуар сигнальных молекул и действуют через ограниченный набор общих сигнальных каскадов. Это означает, что во время передачи сигнала клетка интегрирует информацию от разных воздействий, чтобы дать скоординированный ответ. Концепция "один рецептор – отдельный каскад", считавшаяся ранее очевидной, сейчас не выдерживает давления и фактически полностью опровергнута.

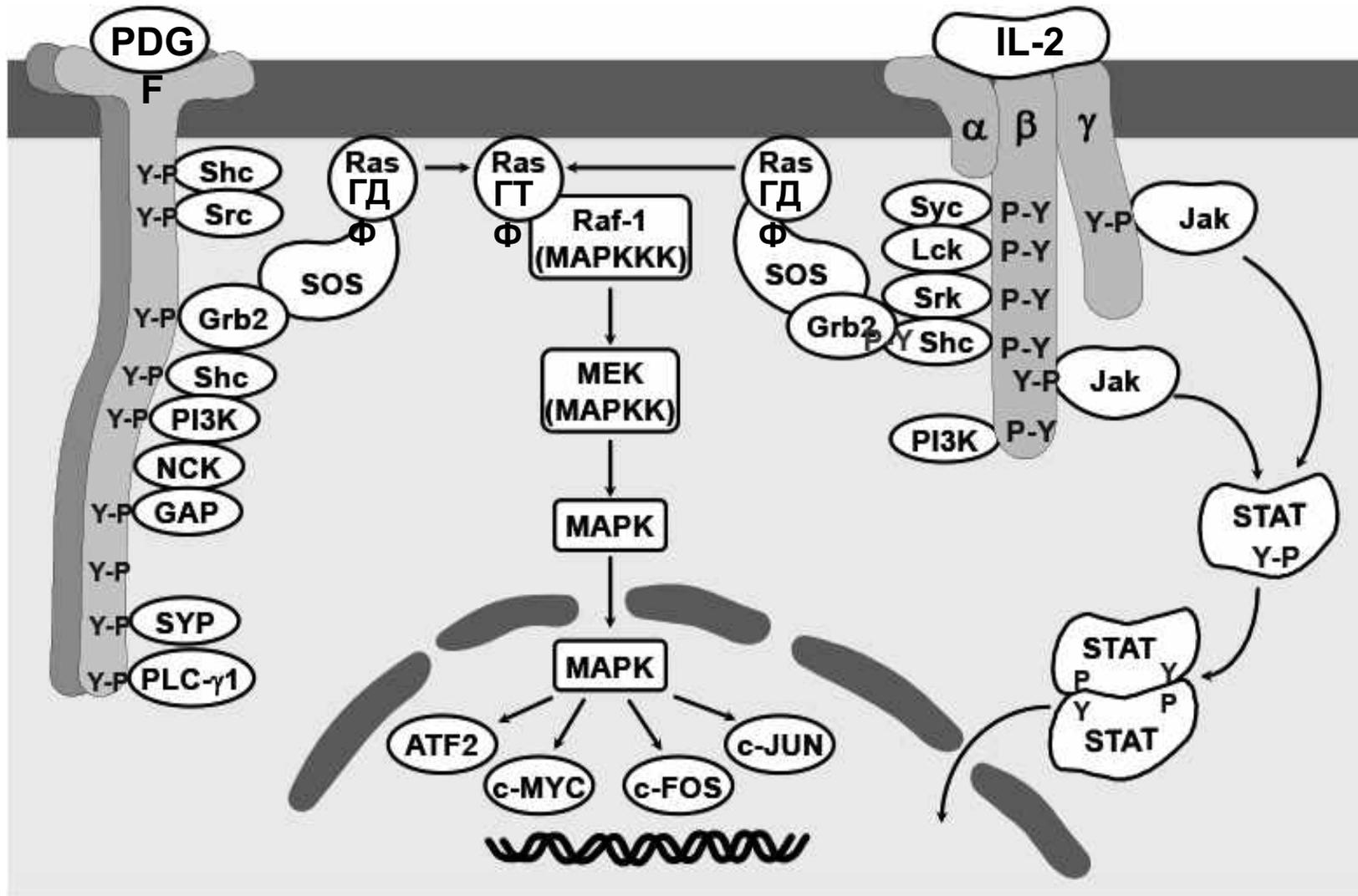
Обратные связи регулируют активность сигнальных каскадов

Эффективность и длительность активации сигнальных каскадов регулируются в клетке двумя способами (рис. 68). Первый заключается в организации "обратных" регуляторных связей, выполняющих функции реостата. Второй состоит в создании "боковых" регуляторных петель путем привлечения дополнительных регуляторных молекул из других сигнальных систем клетки.

Обратные связи – это специфические возвратные механизмы в сигнальных каскадах, которые поддерживают, усиливают или гасят активность предыдущих звеньев в цепочке сопряженных реакций, ключевых для протекания каскада. Как правило, "петли" обратной связи устроены принципиально так же, как и в метаболических цепочках ферментативных реакций, где их регуляторная активность зависит от количества продукта или дистального метаболита (рис. 68А). В этом случае продукт аллостерически регулирует активность фермента, как правило,

Тирозинкиназный
рецептор факторов роста

Цитокиновый рецептор



катализирующего одну из первых реакций. Начальное положение таких ферментов в метаболической цепочке связано с необходимостью избежать протекания лишних реакций. Как правило, регулируемые ферменты контролируют реакции, имеющие большой термодинамический потенциал ($\Delta G'$) и равновесие которых сильно сдвинуто в сторону образования продукта. В противном случае, воздействие на активность фермента будет одинаково влиять как на прямую, так и на обратную реакцию, которые фермент катализирует в равной степени. Классическими примерами такой регуляции являются отрицательные обратные связи, подавляющие активность первых ферментов гликолиза или цитратсинтазы цикла Кребса под действием АТФ и восстановленных никотинамидных коферментов.

В сигнальных каскадах началом цепочки служит рецептор, а в качестве ее продукта выступает активированная мишень (рис. 68Б). Механизм обратной регуляции может быть аллостерическим (изменение активности ферментов-передатчиков сигнала) или стерическим (изменение белок-белковых взаимодействий компонентов сигнальных цепочек). Примерами такой регуляции являются обратные связи с участием фосфатаз в MAP-киназных каскадах и, в более сложных случаях, элементов других сигнальных каскадов (см. ниже).

На рис. 68В приведен пример прямой боковой регуляторной "петли", однако обратные боковые "петли" тоже могут возникать. Специфика "боковых" петель заключается в их относительной обособленности от основной сигнальной цепочки (каскада). Если даже такая боковая "петля" активируется независимо от основного каскада, но тем же рецептором (и агонистом), она может существенно менять динамику передачи сигнала по основному каскаду. Реализация обратных и боковых "петель" часто связана с формированием сигнальных сетей и с участием как минимум двух разных сигнальных каскадов. Сигнальные сети и примеры обратной регуляции разбираются в одном из следующих разделов этой главы.

Фактор времени проявляется тогда, когда схема эксперимента включает измерение "временной зависимости" реакций системы при воздействии стимулятора. Часто оказывается, что активность сигнальных молекул не возрастает монотонно при стимуляции, достигая плато, а затем не падает до базального уровня при прекращении действия стимула. Активность сигнальных каскадов может иметь сложный профиль, показывая наличие двух и более пиков активации, разделенных периодами рефрактерности. При этом продолжительность этих "волн" активации может выходить за рамки времени стимуляции. Более того, даже кратковременная стимуляция клеток может вызывать долгую активацию сигнальных каскадов и длительную клеточную реакцию. Хорошим примером служит способность ростовых факторов стимулировать многочасовую реакцию деления клеток после кратковременного воздействия всего лишь в течение 5-10 минут. Другим примером

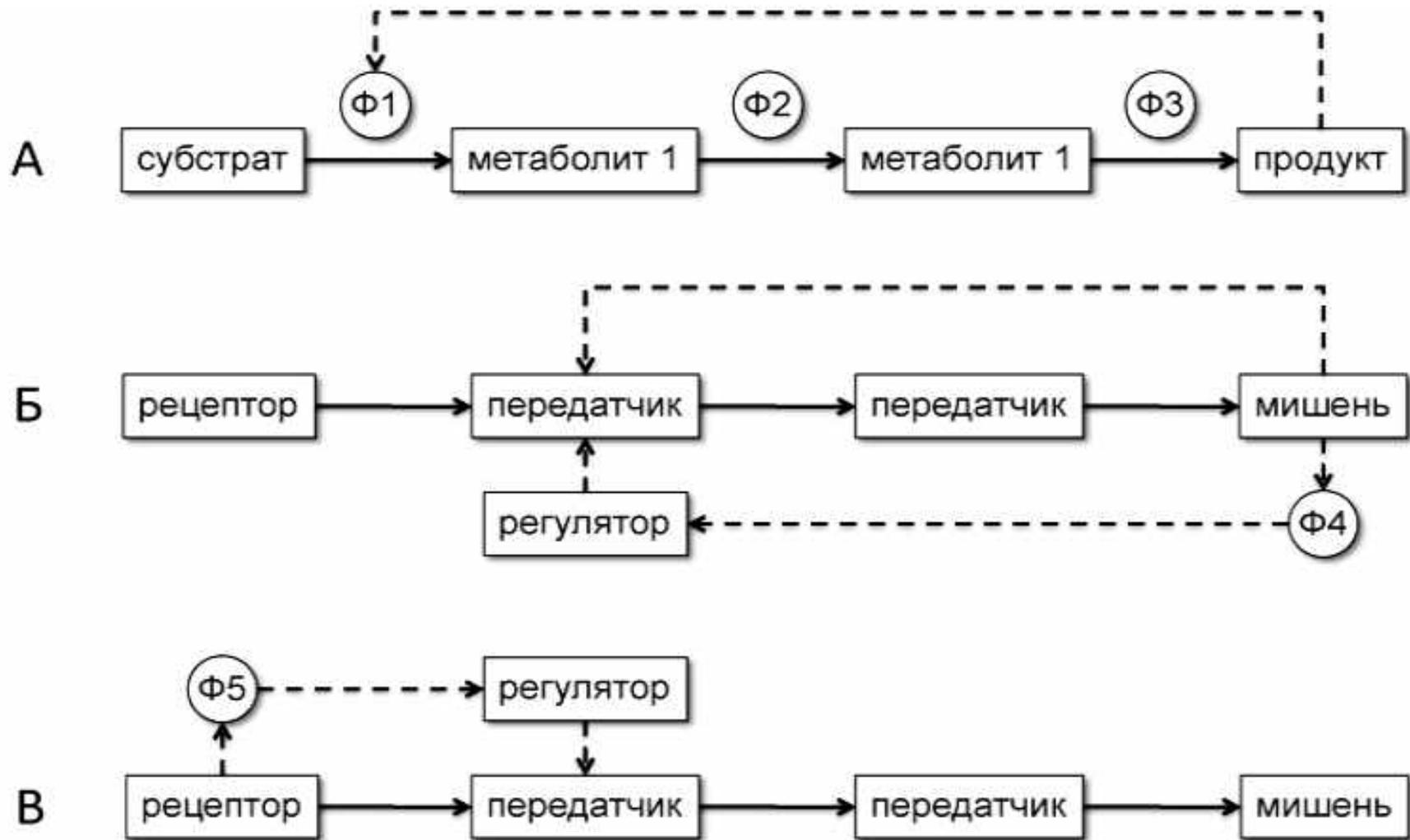


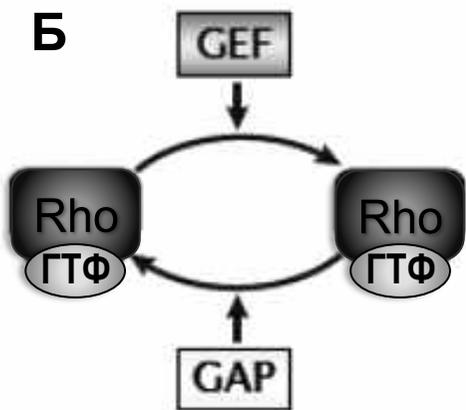
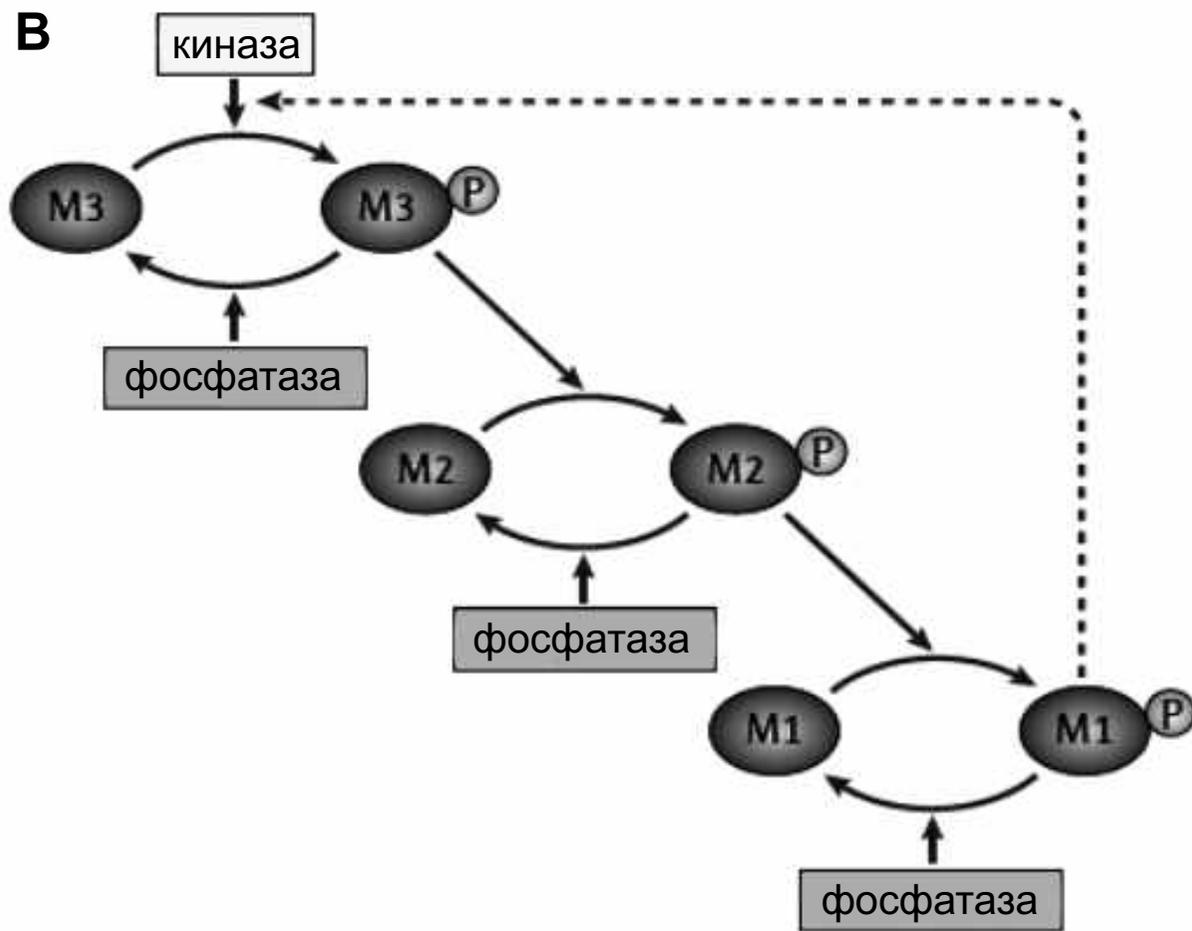
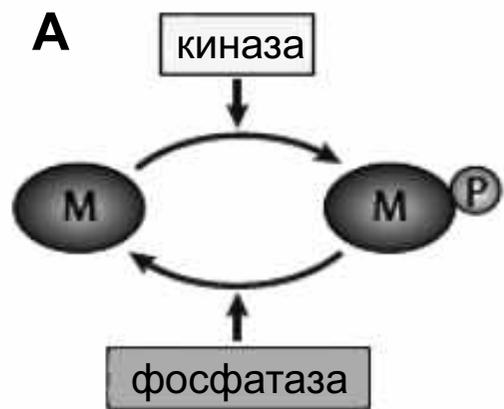
Рисунок 68

является способность сосудистых гладких мышц развивать вазоспазм и поддерживать сокращение долгое время (более часа), хотя активность сигнальных каскадов и активирующих механизмов падает к тому времени до базального уровня.

Субстратные циклы нужны для эффективной регуляции

Субстратные циклы (рис. 69) являются универсальными и повторяющимися элементами многих биологических систем, включая внутриклеточные системы передачи сигнала. Они служат точками приложения регуляторных воздействий. Простейший субстратный цикл представляет собой обратимое взаимопревращение субстрата и продукта, такое как фосфорилирование (рис. 69А). Более сложный субстратный цикл включает один или несколько промежуточных этапов как, например, в ГТФ-азном цикле активации G-белка (рис. 69Б). В любом случае, прямой процесс (или реакция) практически всегда уравновешен обратным превращением. При этом понятие "уравновешен" означает принципиально различную природу прямой и обратной реакций, а не их простую химическую обратимость. Так, для прямого процесса фосфорилирования субстрата под действием некой киназы обратной реакцией служит дефосфорилирование продукта под действием фосфатазы, как на рис. 69А. Для ионных токов обратным процессом является выкачивание ионов из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум или наружу из клетки за счет работы мембранных помп. Важно, что в обоих случаях прямой и обратный процесс катализируют разные ферменты и часто только один из процессов является энергозависимым. Энергозависимость позволяет сделать химическую реакцию практически необратимой, а регуляция активности катализирующего ее фермента позволяет эффективно направлять протекание всего процесса в прямом или обратном направлении. В биохимии такие циклы называют субстратными, или футильными. Хотя последнее название является традиционным, оно явно неудачное, так как не отражает истинного назначения футильных циклов, которым является регуляция.

Практически все сигнальные каскады клетки включают G-белковые переключатели на начальных этапах передачи сигнала, и многие используют фосфорилирование в качестве каскадного элемента. Поэтому для большинства внутриклеточных сигнальных систем характерно наличие нескольких последовательно расположенных субстратных циклов, как схематично представлено на рис. 69В. Такой принцип устройства позволяет осуществлять очень эффективную регуляцию сигнальных каскадов путем реципрокного воздействия на ферменты, катализирующие прямой и обратный процессы. Наличие двойного контроля обеспечивает возможность очень быстрого и значительного изменения баланса при небольших воздействиях на систему. Моделирование таких систем (например, передачи сигнала от рецептора EGF по MAP-киназным каскадам) показывает, что обратные связи работают, подавляя внутренние шумы и повышая стабильность регуляторной

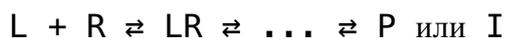


петли. Если они очень сильные или каскад очень чувствительный, то обратные связи могут обеспечивать осцилляторное поведение системы (см. ниже).

Наиболее известны *три субстратных цикла в гликолизе* (рис. 70). Во всех классических учебниках по общей биохимии первый из них (фосфорилирование глюкозы) формально рассматривается как начальный этап гликолиза. Однако фактически он таковым не является, поскольку не специфичен для гликолиза и также используется для других метаболических превращений глюкозы (обмен гликогена, пентозофосфатный шунт и пр.). Поэтому его регуляция связана, главным образом, с поступлением глюкозы в клетку, где фосфорилирование играет роль "запирательного" механизма. Наиболее значимым для регуляции гликолиза/глюконеогенеза является второй цикл – образование фруктозо-1,6-бисфосфата и его дефосфорилирование обратно во фруктозо-6-фосфат. Этот цикл находится на входе в гликолиз и регулируется сложным образом с участием метаболитов и бисфункционального фермента (БиФ), который образует и расщепляет специальный регулятор – фруктозо-2,6-бисфосфат (Ф-2,6-БФ). Активность БиФ находится под реципрокным гормональным контролем со стороны инсулина и адреналина, а также катаболитов – АТФ, АМФ и цитрата. Третий субстратный цикл находится на входе в глюконеогенез и обеспечивает его реципрокную аллостерическую регуляцию за счет метаболитов – фруктозо-1,6-бисфосфата, аланина, ацетил-КоА, АДФ и соотношения АМФ/АТФ. Ацетил-КоА и аланин являются главными прямыми продуктами пирувата: первый образуется в результате окислительного декарбоксилирования, а второй – при переаминировании пирувата для его переноса в печень (аланиновый цикл). Избыток этих соединений сигнализирует клетке о достаточности энергетических ресурсов и необходимости перевода поступающей глюкозы в гликоген – форму запаса. Аналогичную функцию выполняет цитрат – продукт первой реакции конденсации в цикле Кребса, и показатель степени его загрузки.

Ионные сигнальные системы имеют осцилляторный характер

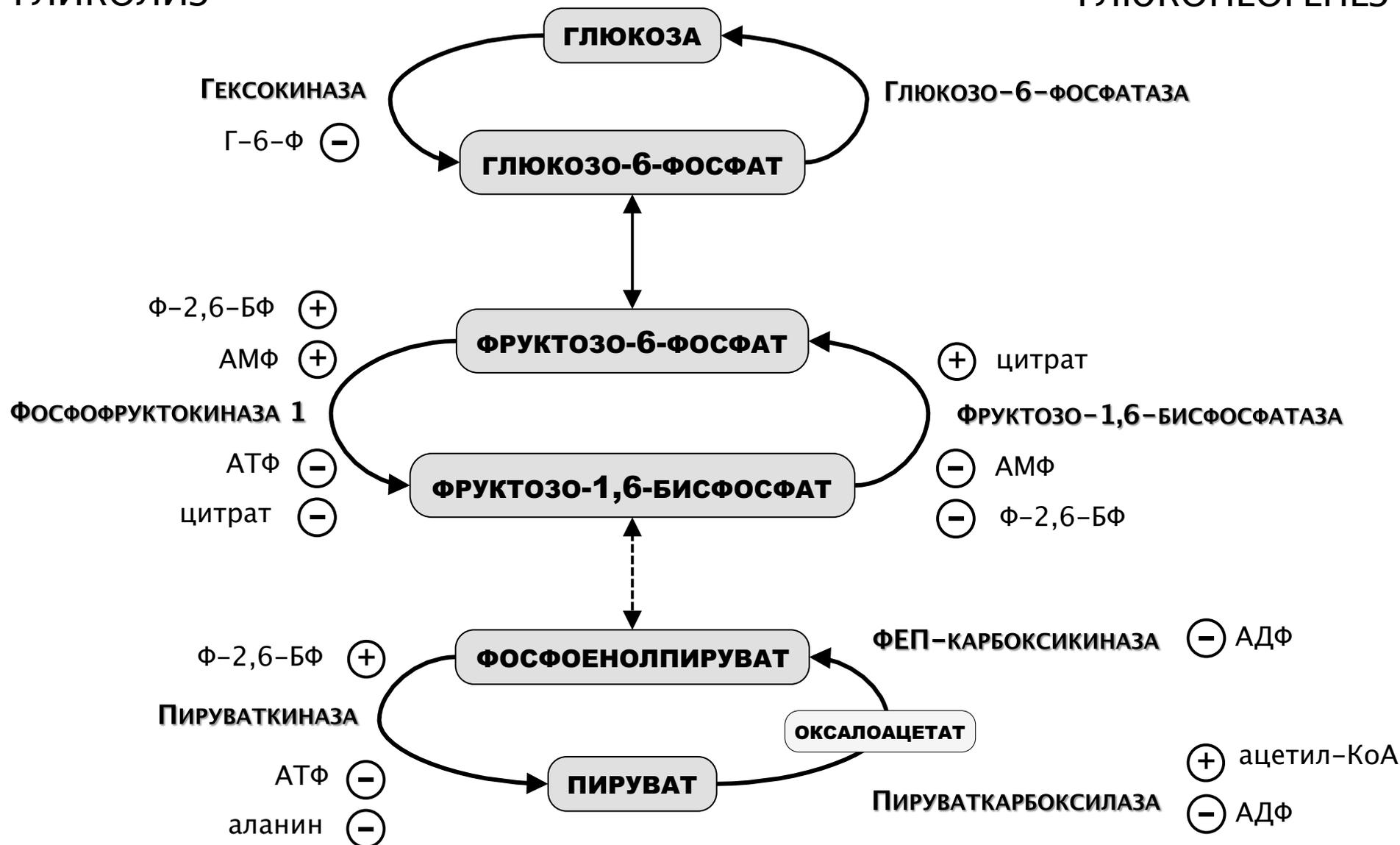
Интуитивно кажется очевидным, что интенсивность внешних воздействий определяет реакцию биологической системы так, что чем сильнее воздействие, тем ярче проявляется ответ. Например, если лиганд L связывается с рецептором R и вызывает фосфорилирование некоего компонента сигнального каскада P, или вход ионов I в клетку, то [P] и [I] будут пропорциональны [L] :



Другими словами, ожидается, что степень фосфорилирования P или концентрация иона I в цитоплазме будет тем выше, чем больше гормона подействовало на клетку или большее число рецепторов было активировано. Этот "фактор силы" доминирует при дизайне многих биохимических, клеточных и физиологических экспериментов. Исследователь прежде всего

ГЛИКОЛИЗИЗ

ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ



Рисуюнок 70

определяет, и зачастую ограничивается, измерением "дозовой зависимости" реакций системы, т.е. силы ее ответов на возрастающие концентрации стимулятора при фиксированном времени воздействия. Этот подход работает для большинства конечных клеточных ответов, но не всегда справедлив для промежуточных реакций внутриклеточных сигнальных систем. Если эти реакции используют обратные связи, они могут иметь иную динамику, чем общий ответ, который является результатом их суммирования. Поэтому следует с осторожностью оценивать действие агонистов, антагонистов и ингибиторов на амплитуду реакций сигнальных молекул клетки в фиксированный момент времени после добавления. Для каждого из исследуемых веществ следует определять не только "дозовую", но и "временную" зависимость активации сигнальных каскадов, изменения ионных токов и внутриклеточного распределения сигнальных молекул.

Наличие обратных связей и субстратных циклов в сигнал-передающих системах позволяет существенно изменять их динамику, т.е. временной профиль активации. Если обратные связи работают на десенситизацию рецептора (снижение его сродства к лиганду), то уровень фосфорилирования P (или концентрация I) будет изменяться нелинейно. В простейшем случае эта зависимость будет колоколообразной. Однако в реальности она может принимать и еще более сложную форму, если точкой приложения обратной регуляции служит субстратный цикл или несколько циклов. При этом суммарный ответ системы может оставаться пропорциональным по "фактору силы", являясь результатом суммирования отдельных промежуточных реакций. В более сложных случаях даже конечный ответ системы может также приобретать характер осцилляций, или продолжаться дольше, чем действие вызывающего его стимула.

"Фактор времени" проявляется тогда, когда схема эксперимента включает измерение "временной зависимости" реакций системы при воздействии стимулятора. Часто оказывается, что активность сигнальных молекул не возрастает монотонно при стимуляции, достигая плато, а затем не падает до базального уровня при прекращении действия стимула. Она может иметь сложный профиль, показывая наличие двух и более пиков активации, разделенных периодами рефрактерности. При этом число и продолжительность "волн" активации может превышать период стимуляции. Более того, даже конечная клеточная реакция может продолжаться дольше, чем действие стимулятора. Хорошим примером служит способность ростовых факторов вызывать многочасовую реакцию деления клеток при кратковременном воздействии всего лишь в течение 5-10 минут. Другим примером является способность сосудистых гладких мышц развивать вазоспазм и поддерживать сокращенное состояние в течение долгого времени (более часа), хотя активность сигнальных каскадов и активирующих механизмов задолго до этого падает до базального уровня. Подробнее эти примеры рассматриваются в следующих разделах.

Осцилляторный характер сигнальных систем хорошо прослеживается в случае вышеупомянутых ионных токов (рис. 71). Кальциевый ответ клетки является классическим примером, который был обнаружен и исследован Майклом Берриджем (Michael Berridge) около 25 лет назад. Он наглядно показывает как волновые параметры служат для "оцифровки" внешнего сигнала и его перевода в количественную информацию об интенсивности и продолжительности требуемого ответа. Потенциал действия или рецепторная стимуляция вызывают череду транзиторных всплесков Ca^{2+} в цитоплазме; при этом их амплитуда не зависит от силы воздействия и числа активированных рецепторов. Изменения концентрации стимулятора влияют только на частоту, но не на амплитуду кальциевых осцилляций в гепатоцитах (рис. 71А) и клетках инсулиномы (рис. 71Б). Такая картина обнаружена и во многих других клетках. Когда частота осцилляций становится больше определенного значения, они сливаются и кальциевый ответ становится непрерывным (рис. 71Б, снизу). Так же, как и в случае тетанического сокращения скелетных мышц, суммарная реакция вполне соответствует ожидаемой: при усилении стимуляции она становится пропорционально интенсивнее. Эта пропорциональность отчетливо заметна по конечному ответу гладкомышечных клеток в составе мышечного волокна. Они отвечают типичной "дозовой зависимостью" силы сокращения, которая имеет сигмоидальный характер в полулогарифмической шкале (рис. 71В). Учитывая осцилляторный характер сигнал-проводящей системы, следует заключить, что сила развиваемого сокращения зависит от частоты, а не амплитуды, одиночных кальциевых ответов.

Осциллятор – понятие условное; оно обозначает некий физический механизм, обеспечивающий периодичность сигнала. В случае кальция, это периодические повышения его концентрации в цитоплазме. Различают два вида таких осцилляторов, в зависимости от того, поступают ли ионы в клетку извне (мембранный осциллятор) или из внутриклеточных депо (цитозольный осциллятор) (рис. 72). *Мембранные осцилляторы* зависят от открытия или закрытия потенциал-управляемых или рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны. Их открытие приводит ко входу ионов Ca^{2+} в клетку. В свою очередь, они вызывают открытие Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, выкачивающих K^+ наружу и гиперполяризующих мембрану. Гиперполяризация ведет к закрытию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и постепенному возвращению системы в исходное состояние. Вызванное этим переходом закрытие K^+ -каналов ведет к деполяризации, которая снова вызывает открытие Ca^{2+} -каналов. *Цитозольные осцилляторы* предполагают участие фосфоинозитидной сигнализации или первичного входа Ca^{2+} в клетку извне. Выход Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров запускается каскадом сигналов, берущих начало от рецептора на клеточной мембране и приводящих к образованию инозитол-1,4,5-трисфосфата (InsP_3). Он связывается со специальными рецепторами на эндоплазматическом ретикулуме – рецептором инозитолтрисфосфата (InsP_3R) и рианодиновым рецептором (RyR), которые и вызывают выход

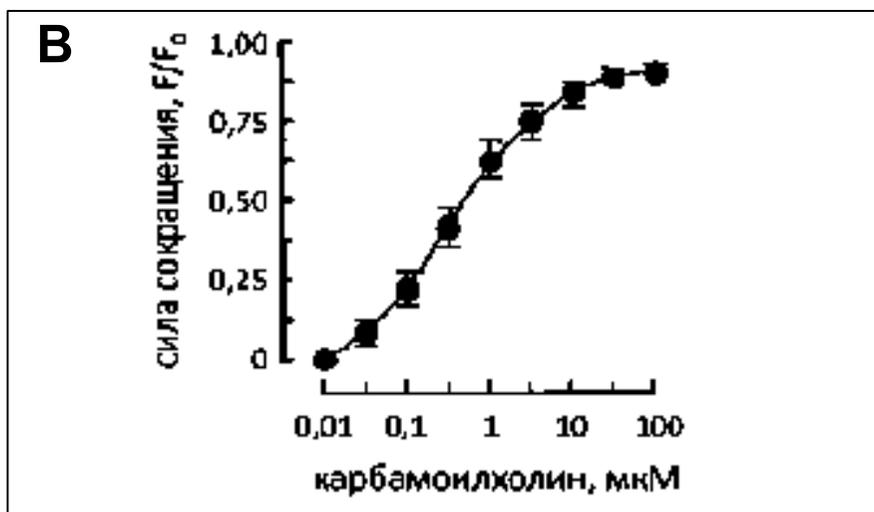
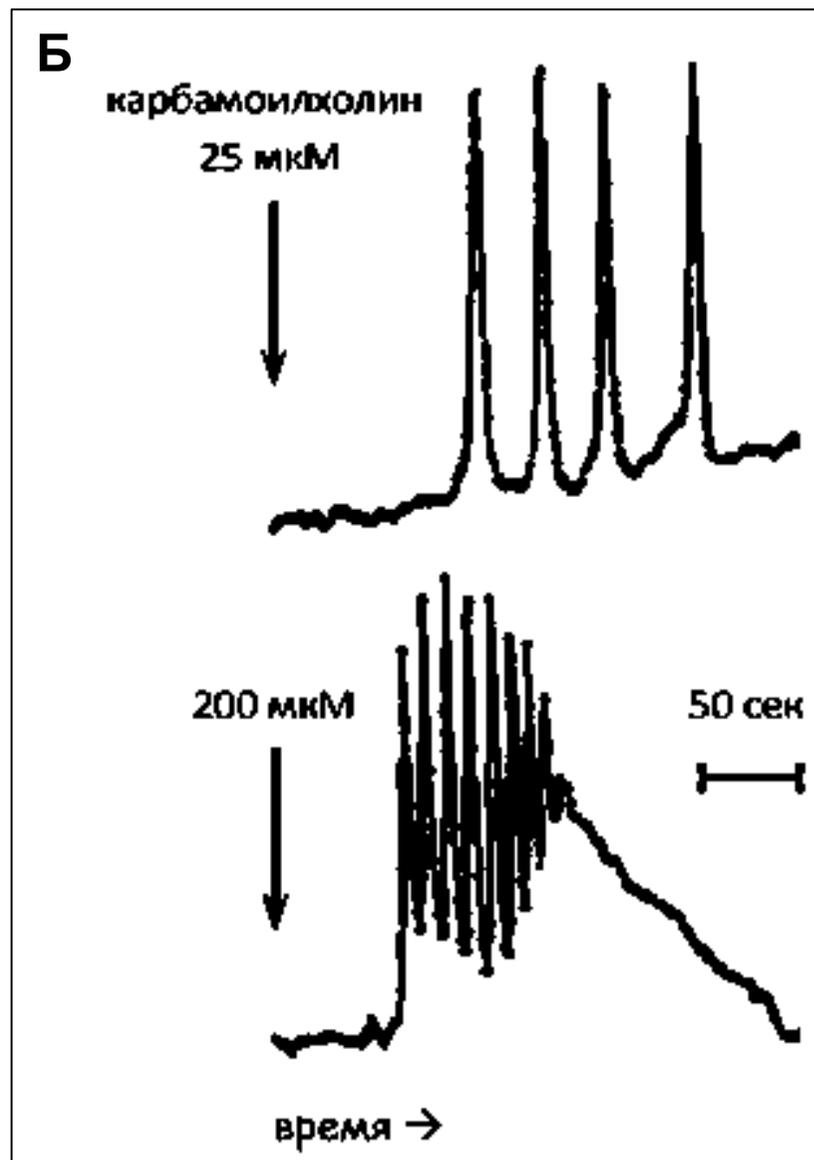
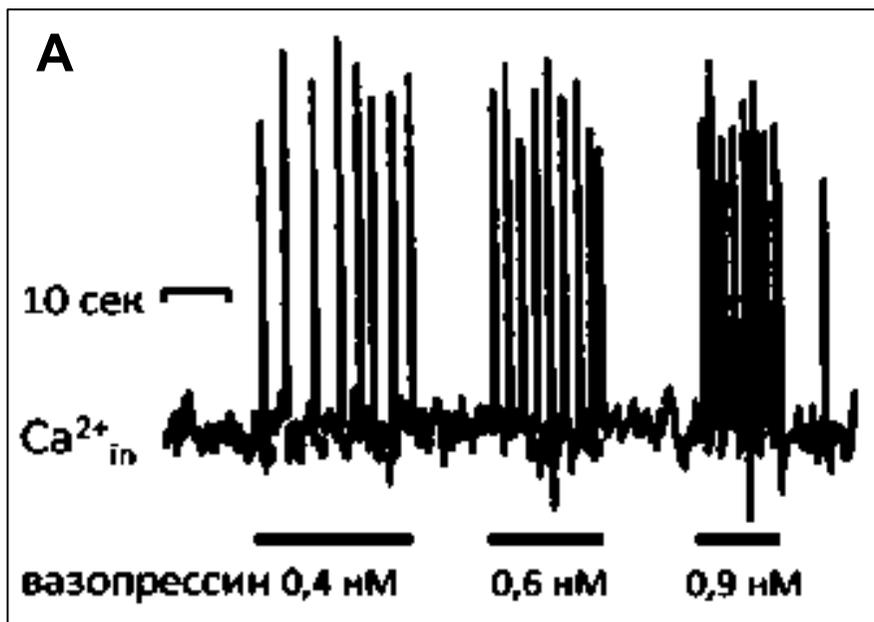


Рисунок 71

Ca^{2+} . Поскольку активность RyR зависит от Ca^{2+} , то он играет ключевую роль в Ca^{2+} -индуцируемом выходе Ca^{2+} (CICR) из ретикулума. Обрато в депо Ca^{2+} закачивает Ca^{2+} -АТФ-аза эндоплазматического ретикулума, активность которой регулирует фосфоламбан. Ca^{2+} -регулируемые ионные K^+ -каналы или Cl^- -каналы обеспечивают сопряжение цитозольных осцилляторов с мембранными и мембранным потенциалом (рис. 72). Процесс энергозависимого закачивания ионов Ca^{2+} из цитоплазмы в ретикулум и их выход по градиенту обратно по-сути представляет собой субстратный цикл, находящийся под контролем вышеуказанных ферментов и их регуляторов – вторичных посредников.

Частота и длительность – ключевые параметры осцилляторных систем

Из приведенных выше примеров следует, что субстратные циклы можно рассматривать как физическую основу регуляции. Они представляют собой элементарные регуляторные единицы, которые придают сигнал-проводящим системам осцилляторный характер. В момент перевода внешнего сигнала во внутренний, информация о его силе кодируется частотой осцилляций. Амплитуда внутреннего сигнала, по-существу, не имеет значения и отдельную осцилляцию можно рассматривать как элементарный бит информации. Таким образом клетка как бы "оцифровывает" поступающую извне информацию, обрабатывает ее, и снова переводит в привычную форму "дозовой зависимости" конечного ответа от интенсивности первичного стимула (рис. 73). Кроме частоты, другим независимым параметром этого волнового механизма служит продолжительность осцилляций. Этот параметр отражает число непрерывных циклов в колебательной системе, но не *длину волны*, которая обратно пропорциональна частоте волны. Логично, что продолжительность колебаний должна указывать на длительность пребывания системы в активном состоянии.

Компьютерное моделирование элементарных сигнальных систем дает удивительные результаты и математически подтверждает осцилляторный характер сигнализации. Наличие положительной обратной связи внутри одного субстратного цикла позволяет системе вести себя в некоторых условиях как *бистабильный включатель* (рис. 74А). Бистабильность определяется как наличие двух энергетически выгодных (стабильных) состояний. Эти состояния необязательно одинаковы (симметричны) по потенциальной энергии, но всегда разделены энергетическим барьером, численно равным энергии активации системы, необходимой для перехода из одного из них в другое. Ярким примером бистабильности являются прионные белки. Они устойчиво существуют в нормальной конформации и в определенных условиях спонтанно претерпевают полный переход в неправильную (прионную) конформацию. Последняя обычно не более устойчива, чем нормальная, но обратный переход как правило невозможен из-за низкой активности корректирующего белка шаперона. В случае сигнальной системы бистабильный включатель формируется на основе

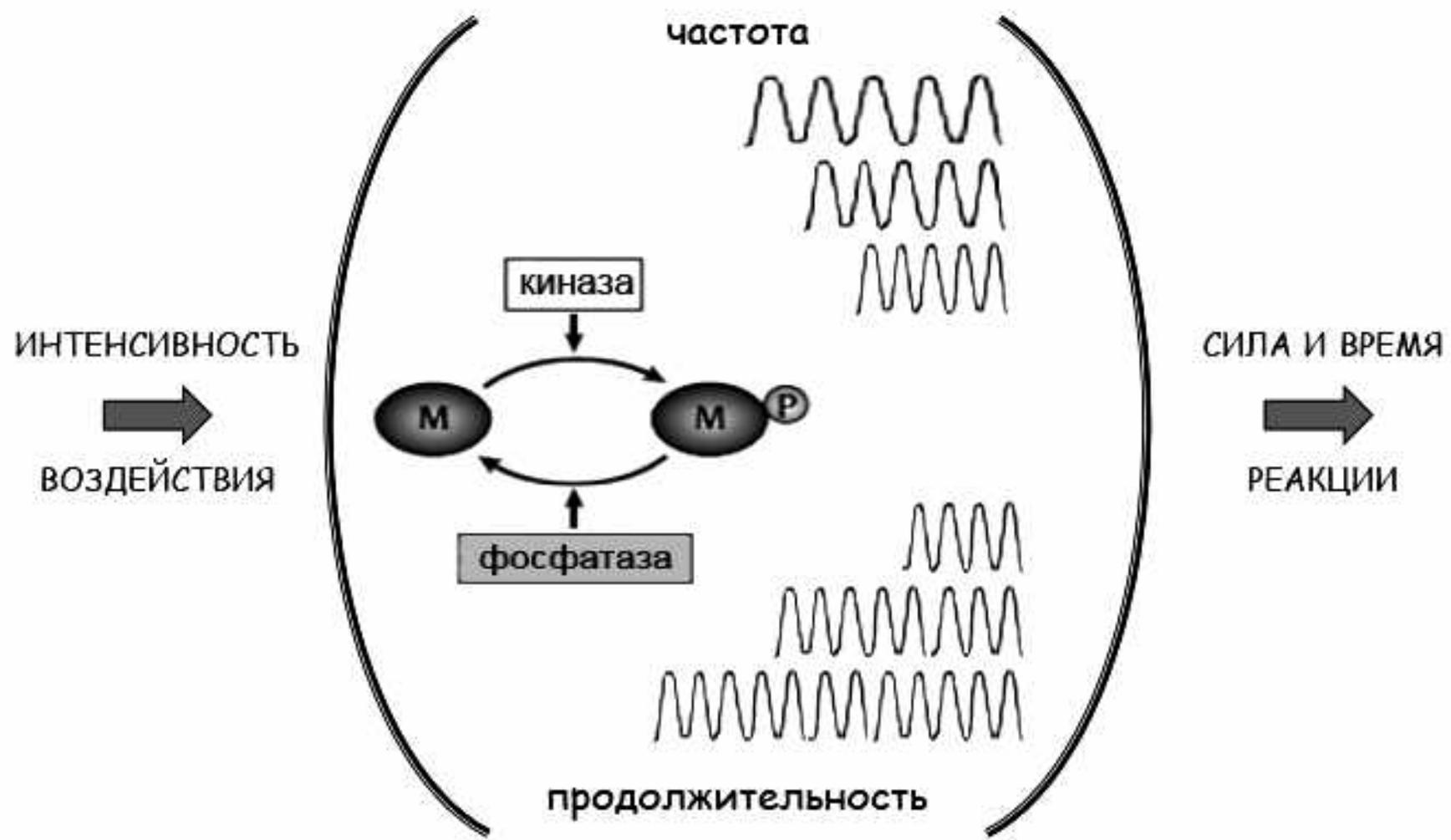
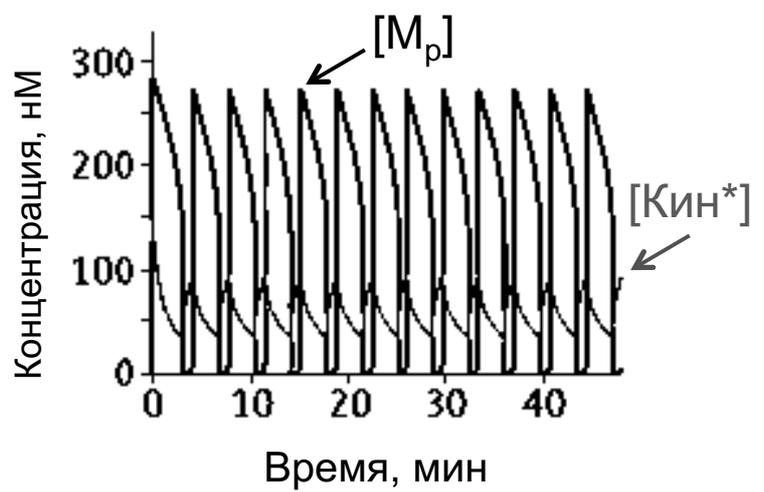
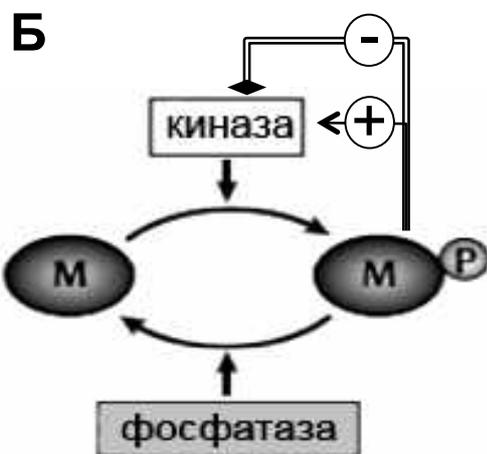
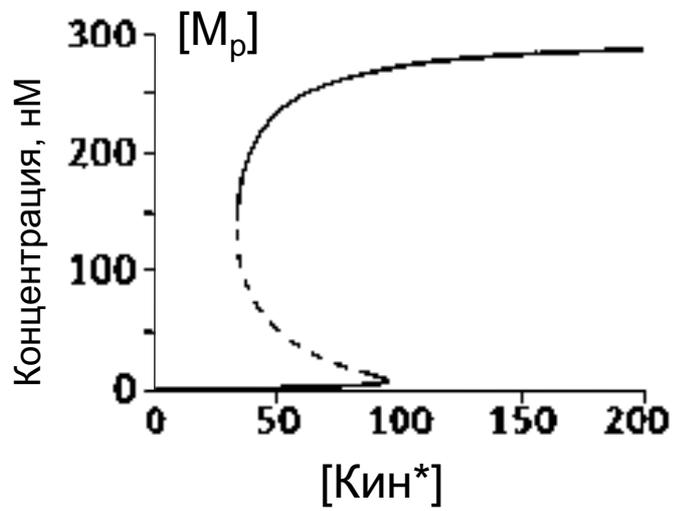
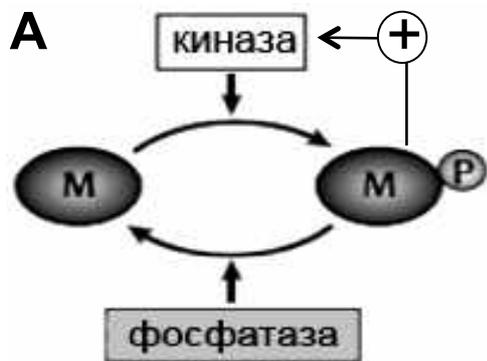


Рисунок 73



субстратного цикла и обратной связи так, что обеспечивает системе быстрый и полный переход из выключенного во включенное состояние (рис. 74А). При низкой активности обратной "петли" система выключена. Количество фосфорилированного продукта (M_p) накапливается медленно и требует значительного количества активной киназы (Кин*). При достижении некоего порогового значения $[M_p]$ включается положительная обратная связь от M_p к киназе и возникает гистерезис: скорость образования и количество M_p резко возрастают при значительно более низких $[Кин*]$. Система переходит в стабильно включенное состояние. Следует отметить что отрицательная обратная связь от M_p к фосфатазе будет действовать аналогично положительной к киназе.

Наличие в субстратном цикле двух разнонаправленных обратных связей позволяет чередовать включение и выключение сигнальной цепи (рис. 74Б). Например, если продукт M_p усиливает ферментативную активность киназы, но подавляет ее экспрессию или вызывает деградацию, то субстратный цикл становится *осциллятором*. При этом продолжительность индивидуального осцилляторного всплеска зависит от величины задержки отрицательного обратного воздействия по отношению к положительному. Аналогичный осциллятор возникает тогда, когда M_p активирует как киназу, так и фосфатазу, но с разной степенью задержки.

Теоретически, сигнальная система, содержащая бистабильный включатель и субстратный цикл, в определенных условиях может переходить в *самоподдерживающийся режим* (рис. 75). В этом случае включатель запускает систему (например, активация рецептора), а обратные связи, приложенные к субстратному циклу, поддерживают его активность и системы в целом. С этого момента участие включателя становится не обязательным и активность системы поддерживается на некотором уровне за счет сторонних источников энергии, которые восполняют неизбежные энергопотери и делают работу самоподдерживающийся режим термодинамически возможным. Такими источниками могут быть классические макроэрги, которые используются сигнальными протеинкиназами, опосредующими действие обратных связей.

Логично предположить, что реализация такой самоподдерживающейся системы, как показана на рис. 75, крайне опасна для клетки. Один раз запустившись извне, она может работать автономно неограниченное время: положительная обратная связь к киназе исключает необходимость ее повторной активации от рецептора. По-видимому, чтобы этого избежать, клетка редко использует положительные обратные связи к киназам. Напротив, преимущественно используются отрицательные обратные или боковые связи, *ингибирующие фосфатазы*. Как правило, активность фосфатаз не выключается полностью, и это сохраняет необходимость прямого фосфорилирования. Это означает, что активность киназы должна поддерживаться, хотя бы и на низком уровне, для того, чтобы удерживать систему активной. Отключение киназы вслед за инактивацией рецептора

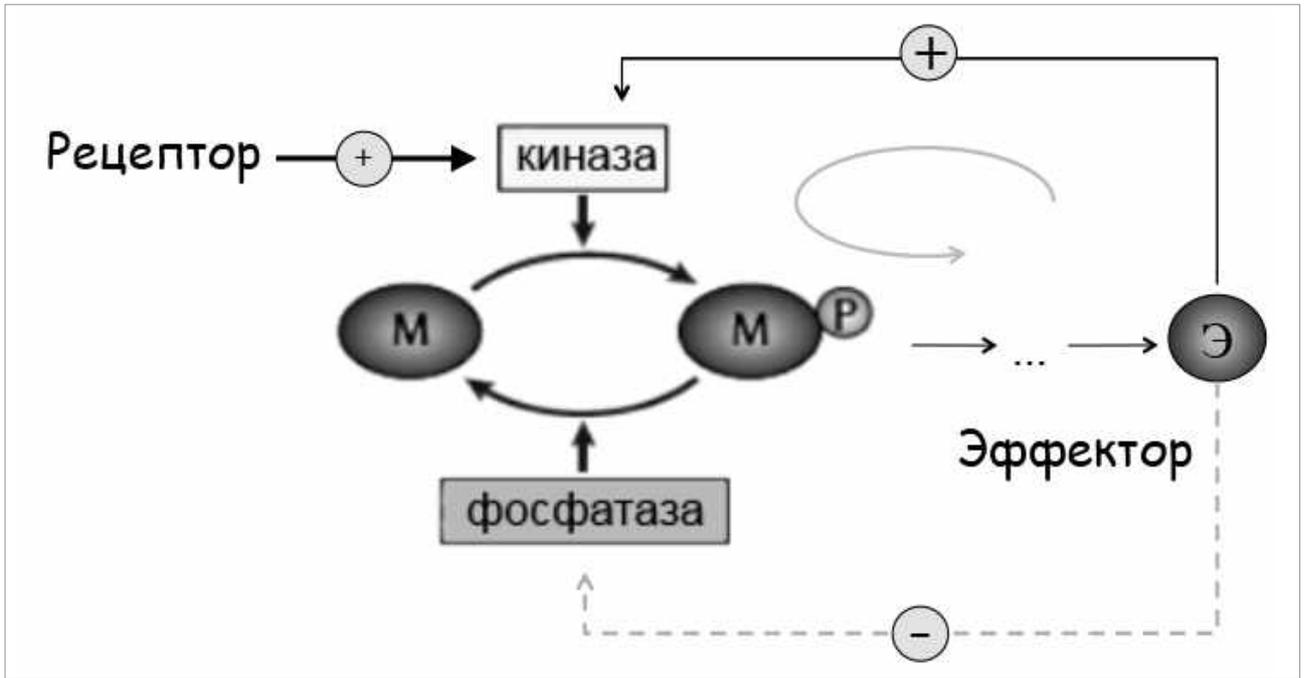


Рисунок 75

медленно, но неизбежно, влечет за собой выключение системы благодаря остаточной активности фосфатазы. Таким образом, обратная регуляция фосфатаз, а не киназ, предохраняет систему от попадания в автономный, постоянно включенный, режим.

В следующих разделах рассматриваются физиологические примеры регуляции длительности клеточных реакций с использованием субстратных циклов, обратных и боковых связей, и в том числе фосфатаз в качестве мишеней. Все они являются вариациями общего случая, показанного на [рис. 75](#), и проиллюстрированы на [рис. 76А](#) для тонического сокращения артериальных сосудов, на [рис. 76Б](#) для инсулиновой резистентности и на [рис. 76В](#) для направленной миграции клеток.

Гипертония и вазоспазм как результат инактивации фосфатазы субстратного цикла

Способность к развитию *тонического сокращения*, т.е. к пребыванию долгое время в сокращенном состоянии, может быть причиной таких патологических состояний, как гипертоническая болезнь, инфаркт миокарда и инсульт, астма, нарушения пищеварительной и репродуктивной систем и др. В гладкомышечных клетках артериальных сосудов сокращение запускается агонистами, как правило, $\alpha 1$ -адренорецепторами. Рецепторы сопрягаются с сократительным аппаратом за счет Ca^{2+} -зависимой сигнализации, приводящей к активации миозинового мотора. Передача сигнала включает повышение уровня свободного Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), фосфорилирование сигнальных молекул и регуляторных белков сократительного аппарата. Последним, и ключевым, событием служит фосфорилирование единственного остатка в регуляторных легких цепях (РЛЦ) миозина, которое позволяет моторному домену миозина взаимодействовать с актином. Актин выступает кофактором миозина, более чем в 1000 раз ускоряя реакцию гидролиза АТФ за счет сброса продуктов реакции из активного центра фермента.

Подробнее, *активация гладкомышечного сокращения* происходит следующим образом ([рис. 77А](#)). Поверхностные рецепторы, сопряженные с G_q и $G_{12/13}$ тримерными G-белками (см. следующую главу) активируют, соответственно, фосфолипазу C (PLC) и малую ГТФазу Rho. Фосфолипаза C расщепляет фосфатидилинозитол-3,4-бисфосфат (PIP2) на диацилглицерин (DG) и инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP₃). Последний вызывает выход Ca^{2+} из ретикулума. В цитоплазме кальмодулин (CaM) связывает ионы Ca^{2+} и, после этого, киназу легких цепей миозина (КЛЦМ). В результате этого взаимодействия ингибиторная последовательность КЛЦМ диссоциирует из ее активного центра и КЛЦМ приобретает способность фосфорилировать РЛЦ миозина и активировать миозин Ca^{2+} -зависимым образом. Параллельно, DG активирует протеинкиназу C (PKC). Классические изоформы этого фермента (α , β , и γ) дополнительно требуют Ca^{2+} для активации, но так называемые "новые" изоформы PKC (δ , ϵ , η , и θ) активируются только за счет DG. Кроме них, в

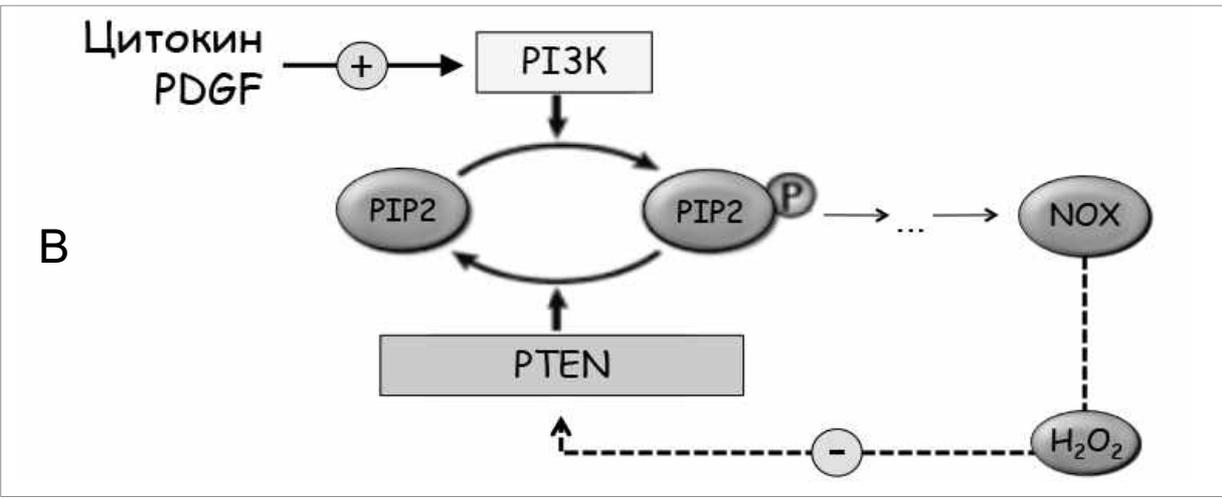
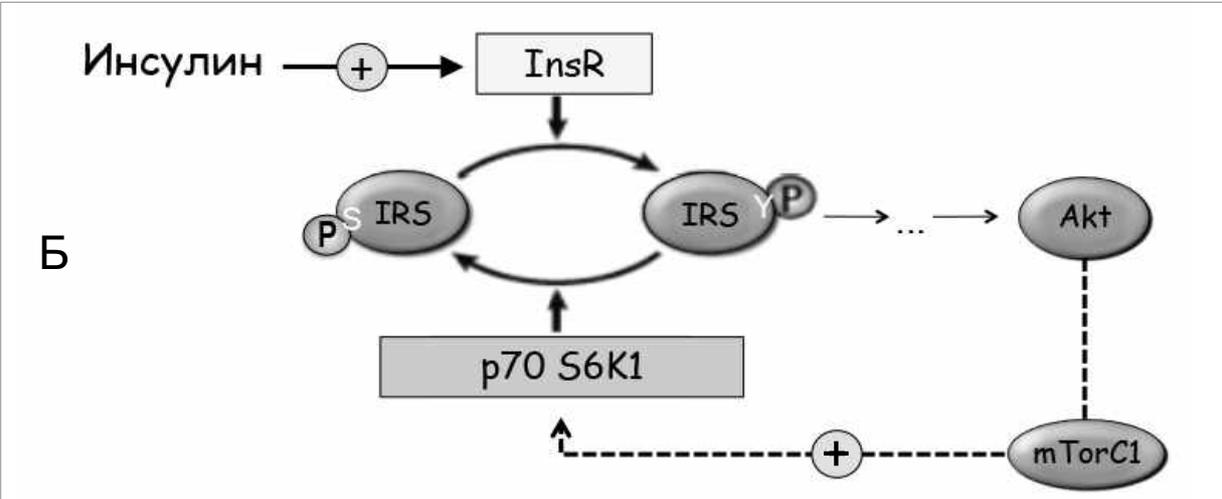
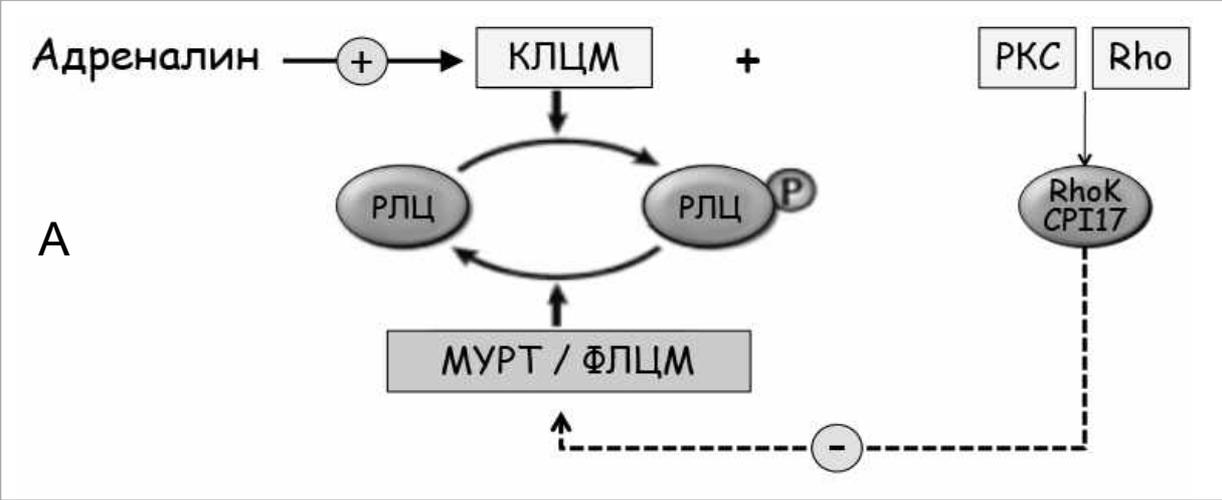


Рисунок 76

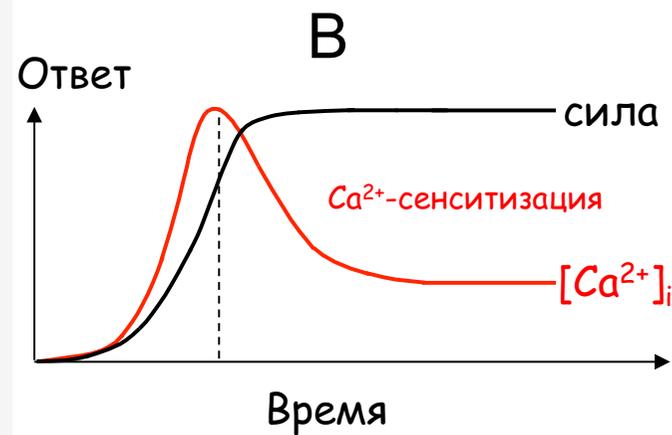
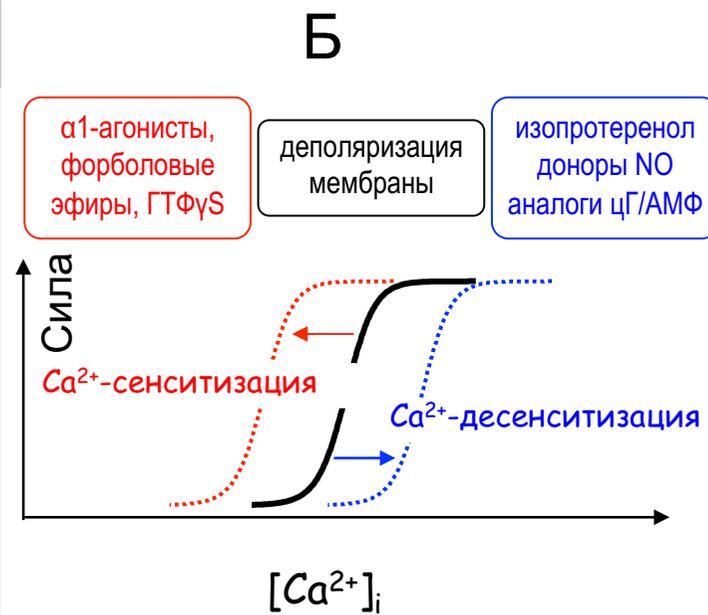
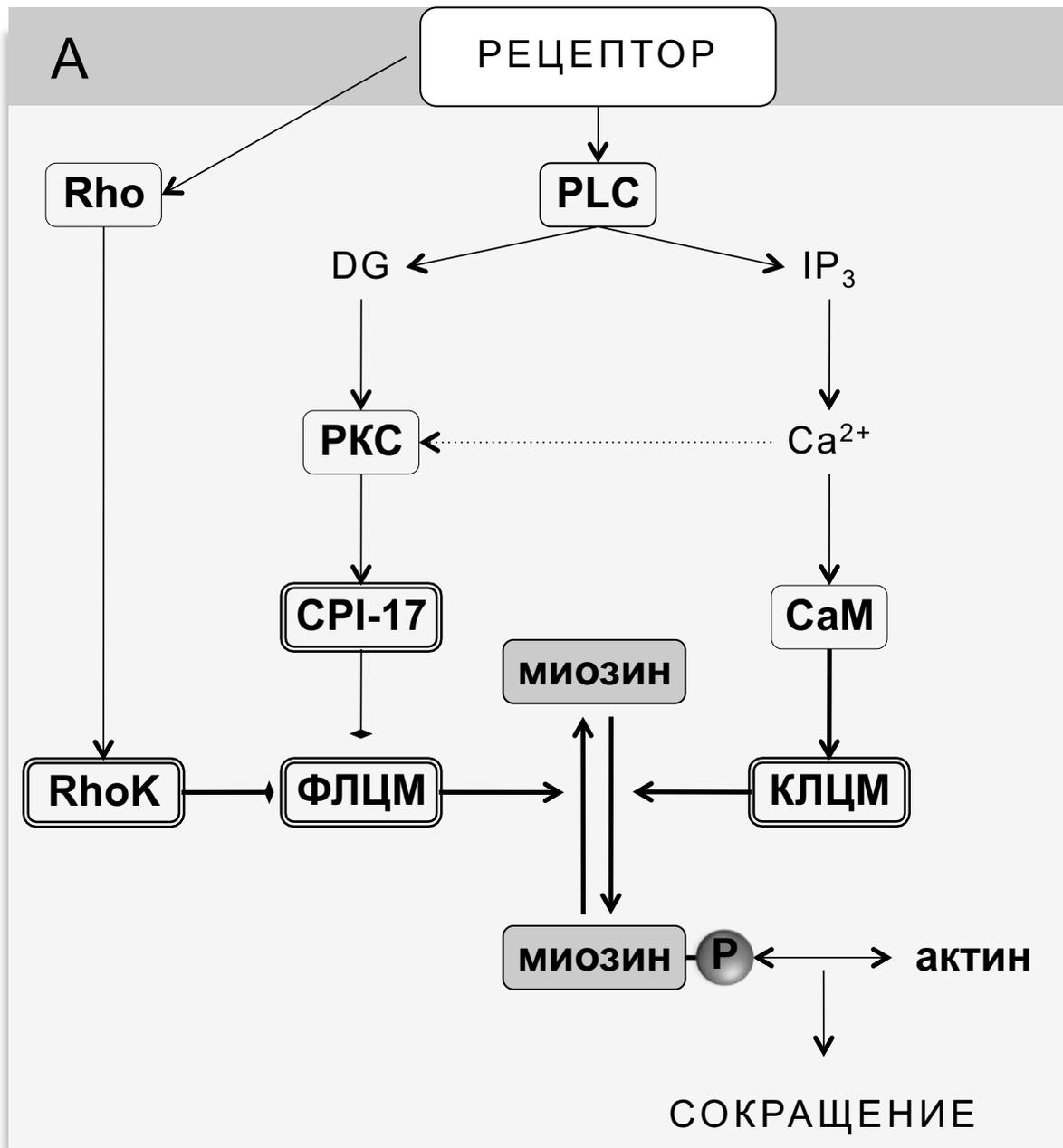
Ca^{2+} -независимой активации сокращения гладких мышц участвует малая ГТФ-аза Rho, главным эффектором которой является RhoK – Rho-активируемая киназа, или Rho-киназа.

Вместе, Rho-киназа и РКС опосредуют *Ca²⁺-независимую ветвь регуляции* сокращения (рис. 77А). Конечной мишенью активируемых ими каскадов является МУРТ – регуляторная (каркасная) субъединица фосфатазы легких цепей миозина (ФЛЦМ), структура которой была рассмотрена выше. Rho-киназа может также прямо фосфорилировать РЛЦ миозина, способствуя основной активации миозина под действием КЛЦМ. Однако главное ее действие направлено на фосфорилирование МУРТ по остаткам треонинов 696 и 853, что ведет к ингибированию ФЛЦМ по механизму, описанному выше (см. раздел Фосфатазы предыдущей главы).

Известный к настоящему времени *механизм действия РКС* совершенно иной, но также основан на ингибировании активности ФЛЦМ (рис. 77А). Он включает фосфорилирование специального ингибитора ФЛЦМ, белка CPI-17 (17 kDa C-kinase Potentiated Inhibitor). Название этого белка отражает его способность активироваться путем фосфорилирования под действием РКС. В результате этой модификации CPI-17 приобретает способность в 1000 раз сильнее ингибировать каталитическую субъединицу миозиновой фосфатазы. По-видимому, при этом используется тот же молекулярный механизм аутоингибирования, как и в случае фосфорилированного Thr-696 МУРТ. Интересно, что в структуре CPI-17 присутствует специальный тирозиновый остаток, который препятствует ФЛЦМ дефосфорилировать CPI-17. Это означает, что отдельный сигнальный каскад может контролировать дефосфорилирование и длительность ингибирующего действия CPI-17 в клетках. Скорее всего, фосфатазами CPI-17 служат PP2A или PP2C.

Фосфобелки-ингибиторы являются, по-видимому, универсальным инструментом, используемым разными клетками для регуляции активности фосфатаз 1 типа. Фосфорилирование ингибитора-1 (I-1) и белка DARPP-32 цАМФ-зависимой протеинкиназой превращает их в мощные блокаторы фосфатаз PP1c, которые играют важную роль в работе дофаминергических синапсов головного мозга и при формировании долговременной памяти. Ингибитор-2 (I-2) найден во многих тканях; он фосфорилируется под действием так называемых ацидотропных киназ (казеинкиназ СК1 и СК2, киназы гликогенсинтазы GSK-3), однако его функции более сложны и не до конца выяснены. CPI-17 характерен только для гладких мышц, причем уровень его экспрессии высок в тех из них, которые обладают склонностью к тоническому сокращению и Ca^{2+} -сенситизации сокращения.

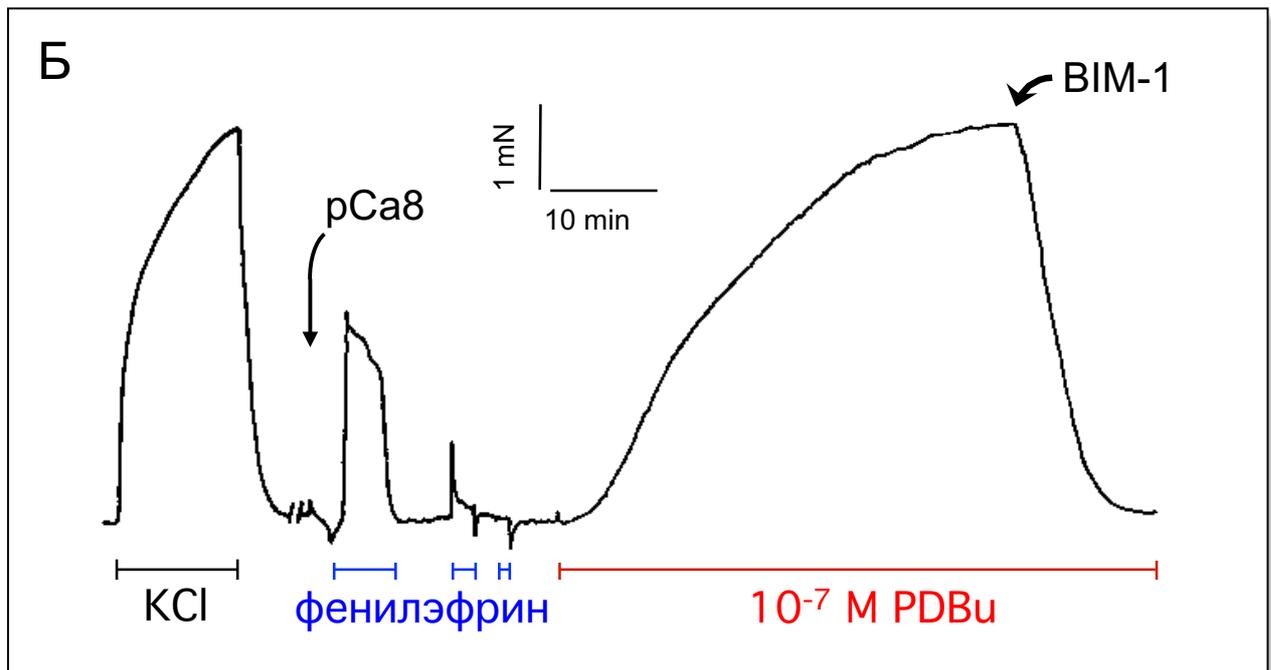
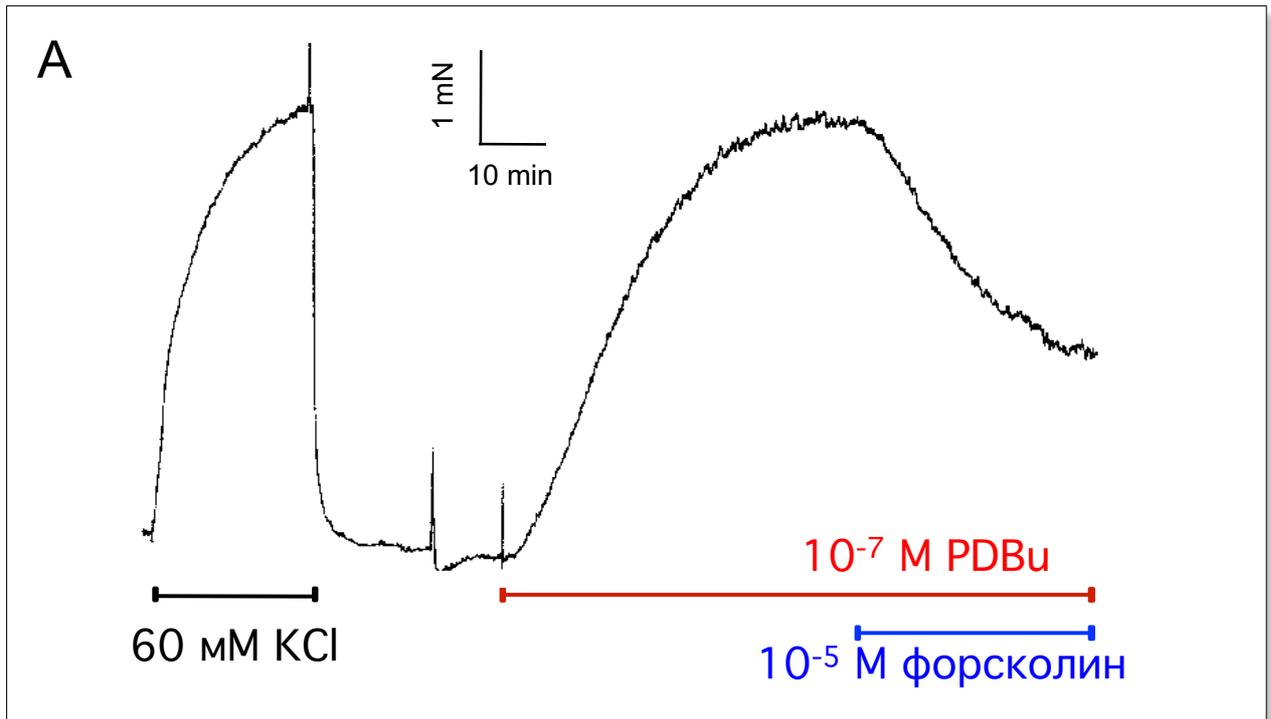
КЛЦМ – классический Ca^{2+} /кальмодулин-зависимый фермент, поэтому сила сокращения гладких мышц во многом определяется уровнем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и степенью фосфорилирования миозина. Именно на изменение зависимости силы сокращения от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ направлены регуляторные воздействия со стороны рецепторов и внутриклеточных сигнальных систем, в том числе с участием Rho-киназы и



РКС. Они так изменяют эту зависимость, что значительно более сильное сокращение развивается при меньших $[Ca^{2+}]_i$, или наоборот, Ca^{2+} теряет способность адекватно стимулировать сокращение (рис. 77Б). В физиологии эти явления принято обозначать, соответственно, как повышение или понижение чувствительности сократительного аппарата к $[Ca^{2+}]_i$, или, кратко, Ca^{2+} -сенситизацией и Ca^{2+} -десенситизацией. Изменяя Ca^{2+} -чувствительность сократительного аппарата, гладкая мышца как бы "имитирует" изменения $[Ca^{2+}]_i$ при ее фактическом постоянстве.

В эксперименте зависимость сокращения от $[Ca^{2+}]_i$ обычно определяют стандартным способом, делая акцент на "факторе силы" и проводя измерения в момент достижения плато силового ответа. При этом $[Ca^{2+}]_i$ измеряют используя Ca^{2+} -чувствительные зонды (например, Fura-AM), способные проникать в клетку, или частично демембранируют (пермеабелизуют) мышечные препараты, чтобы иметь возможность поддерживать в них заданную концентрацию Ca^{2+} . Полученные данные представляют графически как зависимость максимальной силы (в некий момент времени после стимуляции) от $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 77Б). Другой, значительно более редкий, вариант представляет собой временную развертку одиночной реакции (рис. 77В), когда акцент делается на "фактор времени". Сложность таких экспериментов связана не только с их длительностью, но и с "затуханием" (run-down) реакций системы вследствие ее пребывания в искусственных условиях. Однако выполнение адекватных контролей позволяет увидеть как Ca^{2+} -сенситизация происходит по ходу развития сокращения, поскольку она отстает от быстрого первичного, Ca^{2+} -зависимого ответа. По мере активации внутриклеточных Ca^{2+} -сенситизирующих механизмов, сила сокращения долгое время поддерживается на одном уровне при значительном снижении $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 77В).

На рис. 78 показана временная развертка реальной сократительной реакции кольцевого препарата аорты крысы на добавление форболового эфира (PDBu) – прямого активатора РКС. Максимальная сила развиваемого сокращения практически идентична силе контрольного сокращения, которое вызвано деполяризацией мембраны под действием KCl. Необратимый активатор аденилатциклазы форсколин вызывает частичное расслабление, что отражает релаксирующий эффект циклических нуклеотидов (рис. 78А). Последовательная обработка такого препарата несколькими порциями фенилэфрина (агонист α_1 -адренорецепторов) ведет к опорожнению внутриклеточных депо и истощению запасов Ca^{2+} . Это хорошо заметно по неспособности последних порций фенилэфрина стимулировать сокращение за счет такой мобилизации Ca^{2+} (рис. 78Б). Однако и в этих условиях PDBu стимулирует сокращение, по силе сопоставимое с контрольной реакцией на KCl. Это сокращение целиком зависит от РКС, так как полностью устраняется специфическим ингибитором РКС, бисиндолилмалеимидом (BIM-1).



Таким образом, в сигнальной системе регуляции тонического сокращения гладких мышц сосудов (рис. 78А) присутствуют главный субстратный цикл (фосфорилирование и дефосфорилирование миозина) и регуляторная "боковая петля" (от РКС и Rho-белка), подавляющая активность фосфатазы субстратного цикла. Действие этой петли повышает чувствительность сократительного аппарата к ионам Ca^{2+} , что выражается в повышении степени фосфорилирования миозина, длительности и силы сокращения в условиях снижения активности рецептора и концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Именно так проявляются гипертоническая болезнь и длительный сосудистый спазм. Ингибиторы Rho-киназы, системно введенные в кровоток, эффективно снижают давление и препятствуют развитию агонист-зависимых сосудистых спазмов. Специфического ингибитора белка CPI-17 пока не существует, но ингибиторы РКС оказывают сходное действие, хотя имеют больше побочных эффектов. Скорее всего, ингибиторы ФЛЦМ будут наиболее эффективны как антигипертензивные препараты, но они пока не разработаны.

Обратная связь контролирует метаболические эффекты инсулина

Инсулин является анаболическим гормоном. Он запускает синтез белка и жирных кислот, а также стимулирует поступление глюкозы в мышечные и жировые клетки и синтез в них гликогена. Отличительной особенностью сигнализации от инсулинового рецептора является использование каркасного белка IRS. IRS запускает сигнальные каскады, характерные для всех тирозинкиназных рецепторов. Однако его основной мишенью является PI3-киназный каскад, который ведет к протеинкиназе В (РКВ), известной также как Akt. Именно РКВ/Akt играет центральную роль в метаболических эффектах инсулина. Стимуляция инсулином синтеза белка достигается за счет последующей активации рибосомальной киназы S6K1, а также регулятора фактора инициации трансляции 4E-BP1. Синтез жиров стимулируется при активации пируватдегидрогеназы (образует ацетил-КоА из пирувата) и ацетил-КоА карбоксилазы (образует малонил-КоА из ацетил-КоА), а также за счет дифференцировки преадипоцитов в адипоциты (через транскрипционные факторы PPAR γ и SREBP1). Захват глюкозы ускоряется за счет перемещения на внешнюю мембрану переносчика глюкозы ГЛЮТ4. Синтез гликогена стимулируется путем ингибирования киназы фосфорилазы и активации гликогенсинтазы. Помимо этих метаболических эффектов, РКВ/Akt задействована в регуляции клеточного цикла (на уровне "сверочных точек" – checkpoints), апоптоза (фосфорилируя и инактивируя апоптогенный белок BAD), выживания (через транскрипционный фактор FOXO3), аутофагии (действуя на ключевые регуляторы ATG13 и ULK1), ангиогенеза (через промотор гипоксического фактора HIF1 и синтез VEGF – главного активатора эндотелиальных клеток) и миграции клеток (активируя РКС-альфа и полимеризацию-деполимеризацию актина на лидирующем крае).

В общих чертах *внутриклеточные механизмы действия инсулина* были описаны выше и показаны на [рис. 3](#) и [рис. 45](#). Более подробно сигнализация от инсулинового рецептора приведена на [рис. 79](#). Связывание инсулина с рецептором вызывает самофосфорилирование рецептора по остаткам тирозина и прикрепление к нему белка IRS. После этого IRS фосфорилируется рецептором по нескольким остаткам тирозина. Фосфорилированный IRS заякоривает регуляторную субъединицу PI3-киназы (p85), к которой присоединяется каталитическая субъединица (p110). PI3-киназа катализирует превращение PIP2 в PIP3, что вызывает переход PKB/Akt из цитозоля на мембрану, где она использует PH-домен чтобы прикрепиться к PIP3. Одновременно к мембране привлекается фосфоинозитид-зависимая киназа PDK1, которая также содержит PH-домен и тоже заякоривается на PIP3. PDK1 активирует PKB/Akt, фосфорилируя ее по остатку Thr-308, расположенному в активационной петле. После этого PKB/Akt способна фосфорилировать набор субстратов, вызывая часть вышеупомянутых клеточных реакций. Для того, чтобы фосфорилировать оставшуюся часть субстратов, PKB/Akt должна быть дополнительно фосфорилирована по остатку Ser-473, который находится в так называемой гидрофобной последовательности киназы. Это фосфорилирование осуществляет второй комплекс mTOR (mTORC2), активность которого контролируется не только рецептором инсулина, но и рецепторами ростовых факторов. Фосфорилирование Ser-473 сообщает PKB/Akt дополнительное субстратное узнавание и возможность фосфорилировать FOXO3, PKC-альфа и, возможно, белок AS160, который запускает транслокацию ГЛЮТ4 на плазматическую мембрану.

Гамартин/тубериновый комплекс белков TSC1/TSC2 ограничивает избыточный рост клеток, но его генетические дефекты приводят к гиперактивации первого комплекса mTOR (mTORC1) и развитию туберозного склероза, или болезни Бурневилля. Для этого заболевания характерно появление в разных органах (главным образом в нервной ткани) множества мелких доброкачественных опухолей (туберсов), развитие психических расстройств и эпилепсии. Прогноз этого заболевания неблагоприятный и обычно больные не живут более 20-25 лет, умирая в детском возрасте. TSC1/TSC2 являются факторами активации ГТФазы (GAP) малого G-белка *Rheb*, отвечающего за активацию mTORC1 ([рис. 79](#)). При этом PKB/Akt, активированная PDK1, фосфорилирует и блокирует TSC2. В результате этого ГТФ-аза Rheb дольше остается активной, так же как и регулируемый ею mTORC1. Комплекс mTORC1 является важным регулятором липидного обмена, хотя соответствующие механизмы действия mTORC1 до сих пор остаются во многом неясными. Он стимулирует активность ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот и транскрипционных факторов, запускающих дифференцировку клеток-предшественников в адипоцитарном направлении.

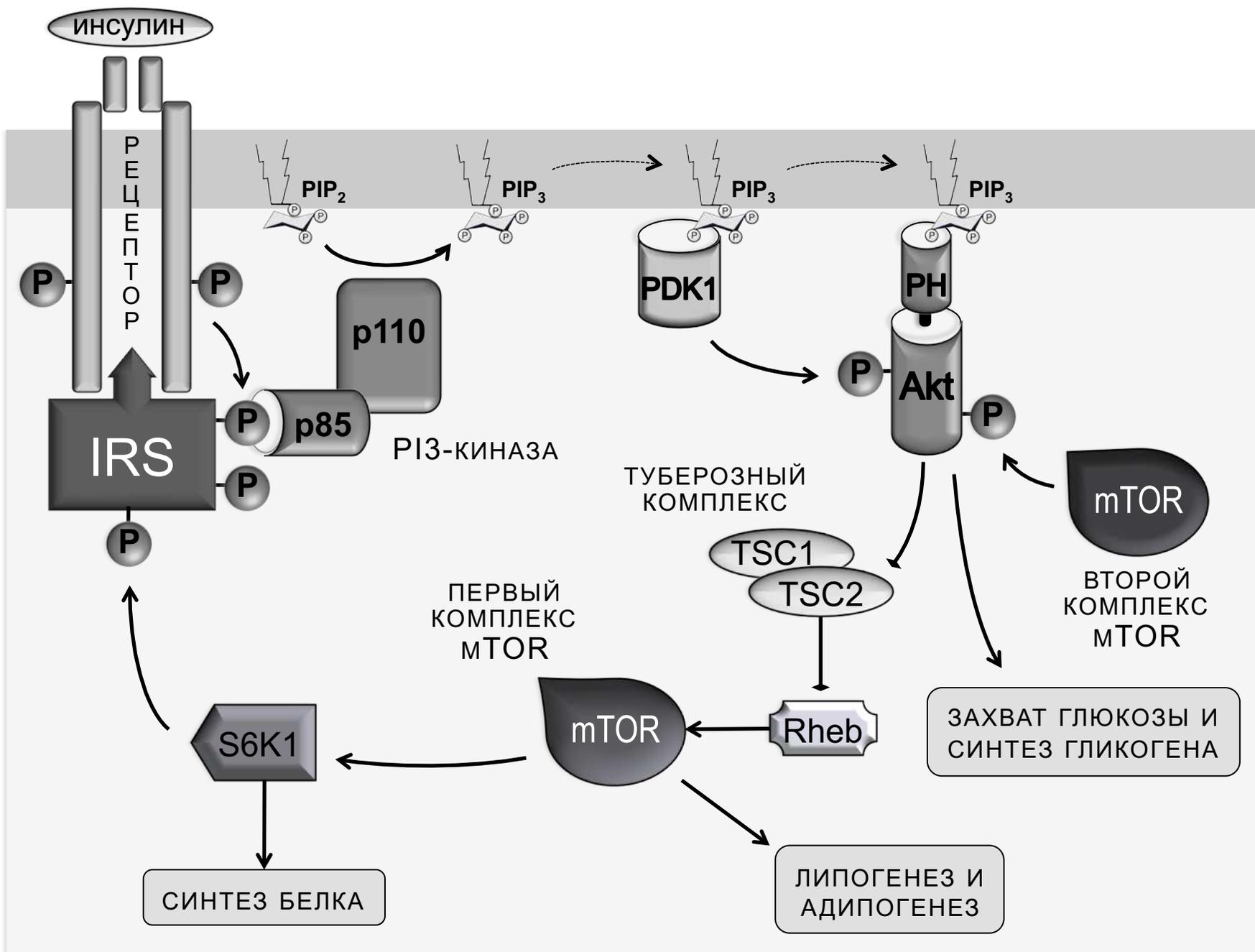


Рисунок 79

Рибосомальная киназа S6K1 считается основным эффектором mTORC1. Она запускает синтез белка, инициируя рибосомальную трансляцию мРНК. Кроме того, она опосредует отрицательную обратную связь, с помощью которой mTORC1 инактивирует белок IRS и ослабляет проведение сигнала от инсулинового рецептора (рис. 79). Это достигается за счет фосфорилирования IRS по остаткам серина. Важно, что помимо S6K1, действие обратной петли в разных тканях реализуют и другие протеинкиназы, в том числе сам mTORC1, нетипичные изоформы протеинкиназы C (PKC- λ и $-\zeta$, которые не требуют ионов Ca^{2+} и диацилглицерина для активации), а также JNK-MAP-киназы (в ответ на окислительный стресс и действие воспалительных цитокинов). Механизм ингибирования IRS может быть разным и зависит от положения фосфорилируемого остатка в молекуле IRS. На N-конце IRS расположен PH-домен, с помощью которого он прикрепляется к мембране. За ним следует PTB домен, посредством которого IRS взаимодействует с рецептором инсулина. Фосфорилирование остатков, находящихся в составе PH-домена, препятствует взаимодействию IRS с мембраной клетки. Фосфорилирование внутри PTB-домена ослабляет связывание IRS с рецептором. В третьем случае фосфорилирование запускает деградацию IRS, а в четвертом – нарушает его связывание с эффекторами, препятствуя передаче сигнала внутрь клетки.

В результате этих воздействий уровень фосфорилирования IRS по тирозину снижается и его связь с PI3-киназным каскадом ухудшается. Это должно приводить к снижению активации PKB/Akt и mTORC1, отключению обратной петли и восстановлению сигнализации от рецептора инсулина. По-видимому, в норме этот механизм обеспечивает периодичность метаболической активации и ее взаимосвязь с физиологическим ритмом приема пищи. Однако патологически долгая активация обратной петли нарушает передачу сигнала от инсулинового рецептора и приводит к развитию инсулиновой резистентности.

Инсулиновая резистентность представляет собой патофизиологическое состояние, при котором клетки теряют способность адекватно реагировать на действие инсулина. Эта ситуация возникает когда активность петли отрицательной обратной связи поддерживается аномально высокой, что обусловлено, в основном, дополнительной активацией mTorC1. Инсулин по-прежнему продолжает связываться с рецептором, активируя его и стимулируя фосфорилирование по тирозину. Однако нарушается передача сигнала к IRS (или непосредственно от IRS), снижается активность PI3-киназного каскада и уровень фосфорилирования остатка Thr-308 в PKB/Akt. Как следствие, способность инсулина вызывать транслокацию GLUT4 на мембрану падает и транспорт глюкозы в клетки не стимулируется. В результате уровень глюкозы в крови остается высоким и секреция инсулина β -клетками поджелудочной железы компенсаторно увеличивается. Дальнейшее усиление инсулиновой резистентности (т.е. поддержание обратной петли в аномально активном

состоянии) ведет к полной потере способности инсулина стимулировать захват глюкозы, развитию диабета 2 типа и комплекса метаболических нарушений, называемых метаболическим синдромом.

Таким образом, в сигнальной системе рецептора инсулина присутствует субстратный цикл и отрицательная обратная связь от mTorC1 к IRS. Обратная регуляция направлена на выключение передачи сигнала; она опосредована киназой, которая не входит в субстратный цикл, но не фосфатазой. Риск перехода системы в постоянно включенный режим отсутствует. Однако переход обратной петли в высокоактивное состояние, напоминающее самоподдерживающийся режим, наблюдается при метаболическом синдроме и диабете 2 типа. Путем активации mTorC1 в нем могут участвовать воспалительные цитокины, АМФ-зависимая киназа (которая служит сенсором питательных веществ) и продукты окислительного стресса (митохондриального, лизосомального или иного происхождения). Точный механизм этого явления пока неизвестен.

Направленная миграция клеток требует множественных обратных связей

Хемотаксис определяется как движение клеток в направлении хемоаттрактанта - растворимого химического соединения, который обычно формирует градиент концентраций во внешней среде. Этот процесс включает три основных этапа. Во-первых, клетка определяет направление градиента, регистрируя хемоаттрактант с помощью поверхностных рецепторов. Естественно, большее число рецепторов активируется на лидирующем крае клеток – том, что обращен в сторону градиента. Во-вторых, сигнал, полученный от рецепторов, направляется к актиновому цитоскелету, запуская его перестройку. По дороге сигнал усиливается так, чтобы создавался ощутимый внутренний градиент сигнальных молекул. Клетка интерпретирует его как направление движения, а также использует эти же сигнальные молекулы, чтобы с их помощью организовать разные механические процессы и расположить их вдоль оси внутреннего градиента. В результате этого на третьем этапе клетка поляризуется, а на ее лидирующем крае запускается процесс быстрого ремоделирования актиновых филаментов. Происходит быстрая полимеризация и многоточечное разветвление актиновых филаментов в направлении передней мембраны, что обеспечивает ее проталкивание. Как следствие, клетка начинает движение в направлении внутреннего и, соответственно, внешнего градиента за счет перемещения цитоплазмы из центра на передний край. Клетка прикрепляется к окружающему матриксу с помощью интегринов – специальных адгезивных комплексов, которые сопрягают цитоскелет с матриксными белками. Контролируемые градиентом сигнальных молекул, эти комплексы формируются впереди и ослабляются сзади, что обеспечивает закрепление переднего и отрыв заднего края клетки.

Такой тип движения называется амебоидным. В той или иной степени, он характерен для всех типов клеток, но наиболее ярко проявляется у белых клеток крови – *нейтрофилов, моноцитов и*

макрофагов. Их задачей является поиск и уничтожение чужеродных бактерий и патогенов, инфекционных агентов, остатков умерших и поврежденных клеток. Для хемотаксиса они используют рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками плазматической мембраны. Эти небольшие по размеру клетки слабо адгезируют и поэтому движутся с большими скоростями, до 10 микрон в минуту. Они легко меняют форму и проникают в узкие промежутки между окружающими клетками или компонентами внеклеточного матрикса за счет амебоидного движения. Их отличает высокая чувствительность к хемоаттрактантам, за счет которой они эффективно определяют их низкие концентрации и направление дальних и пологих градиентов. Более того, они способны одновременно распознавать несколько градиентов различных хемоаттрактантов, что помогает им избирательно направляться в различные участки инфекций и воспаления в организме под контролем широкого спектра различных цитокинов, зачастую формирующих перекрывающиеся градиенты. Вместе с тем, эффективность хемотаксиса растет с увеличением концентрации хемоаттрактанта только до определенного уровня, после достижения которого она падает. Поэтому лейкоциты могут переключать миграцию по механизму, известному как последовательная навигация, который позволяет им направленно проходить значительные расстояния до нужных мест в организме.

Мезенхимальные клетки, такие как фибробласты и гладкомышечные клетки, гораздо крупнее (50–200 мкм в распластанном виде). Они сильнее адгезируют и поэтому передвигаются значительно медленнее, со скоростями порядка 0,25–1 мкм/мин. При движении в трехмерном матриксе они используют протеолитическую деградацию матрикса за счет секретируемых металлопротеиназ. Главными хемоаттрактами фибробластов являются ростовые факторы, а хемотактическими рецепторами – классические рецепторные тирозинкиназы. В отличие от нейтрофилов, эти клетки менее чувствительны к хемоаттрактантам и поддерживают направление только в крутых градиентах внешних стимулов.

Регуляция обратными связями изучена в меньшей степени в отношении хемотаксиса, но очевидно, что она является неотъемлемой частью хемотактической сигнализации. Необходимо уметь фокусировать, усиливать и поддерживать сигнал на переднем крае клетки, а также адаптировать его к изменениям внешнего градиента. Действительно, клетки должны обладать эффективной системой пост-рецепторного усиления сигнала чтобы эффективно "чувствовать" низкие концентрации хемоаттрактанта и распознавать его пологие градиенты. Для этого наиболее эффективным способом является использование ферментов и вторичных посредников. Кроме того, механика клеточного движения требует длительного поддержания внутриклеточных градиентов сигнальных молекул. Это особенно важно в случае мезенхимальных клеток. Время поляризации и формирования псевдоподии (выдвижения переднего края клетки) составляет у них

20-40 минут. Это означает, что внутриклеточный градиент сигнальных молекул должен поддерживаться в течение всего этого времени. Поскольку для вторичных посредников характерна высокая скорость метаболизма (см. [рис. 36](#)), то необходимо поддерживать на высоком уровне активность синтезирующих их ферментов, что весьма эффективно достигается с использованием положительных обратных связей.

Хемотактическая сигнализация организована сходным образом в разных клетках. Рецепторы передают информацию о внешних сигналах через мембрану к малой ГТФазе Ras и PI3-киназе – двум основным маршрутизаторам хемотактического сигнала внутри клетки. Основная функция Ras заключается в активации PI3-киназы и передаче сигнала к малым ГТФазами Rho-семейства. В отличие от рецептора инсулина, рецепторы ростовых факторов не используют каркасный белок IRS и прямо связывают регуляторную субъединицу PI3-киназы. Для полной активации PI3-киназы этого недостаточно и ей необходимо взаимодействие с Ras. Для этого PI3-киназа имеет и использует специальную последовательность – RBD (Ras-binding domain), с помощью которой она формирует тройной комплекс с Ras и рецептором. Помимо PI3-киназы и Ras в хемотактической сигнализации участвуют фосфолипазы A2 и C, MAP-киназы, и второй комплекс mTOR. Фосфолипаза A2 "разжижает" мембрану лидирующего края, облегчая ее выдвижение, фосфолипаза C запускает сигнальную ветвь к PKC и Ca^{2+} , MAP-киназы, по-видимому, регулируют адгезивные свойства клеток. Наконец, Rho-белок действует на заднем крае, регулируя сборку сократительных стресс-фибрилл, необходимых для подтягивания задней части клетки.

PI3-киназный каскад играет ключевую роль в хемотаксисе; он регулирует как направление, так и скорость движения клеток. Образующий PI3-киназой PIP₃ определяет высокую чувствительность к изменениям внешнего градиента и является главным усилителем и "дирижером" двигательного аппарата псевдоподий. Если PIP₃ не начинает синтезироваться в образующейся псевдоподии, то она быстро ретрактирует и клетка не перемещается. Появление же PIP₃ приводит к стабилизации псевдоподии, увеличению ее размеров и движению фибробласта в эту сторону. Накоплению этого мембранного вторичного посредника на лидирующем крае клетки способствует не только транслокация PI3-киназы в этот компартмент, но и обратное перемещение на заднюю мембрану фосфатазы PTEN, которая расщепляет PIP₃ до PIP₂. PTEN содержит PH-домен, который специфичен к PIP₂ и обеспечивает локализацию этой фосфатазы в участках мембраны, обедненных PI3-киназой и преимущественно содержащих продукт своей активности.

В клетках амебы отчетливо прослеживается двухфазный характер динамики актина на переднем крае, который отражает сигнал, приходящий от хемотактических рецепторов. Такую же динамику перехода на периферию клетки показывают белки, которые содержат PH-домен, узнающий PIP₃.

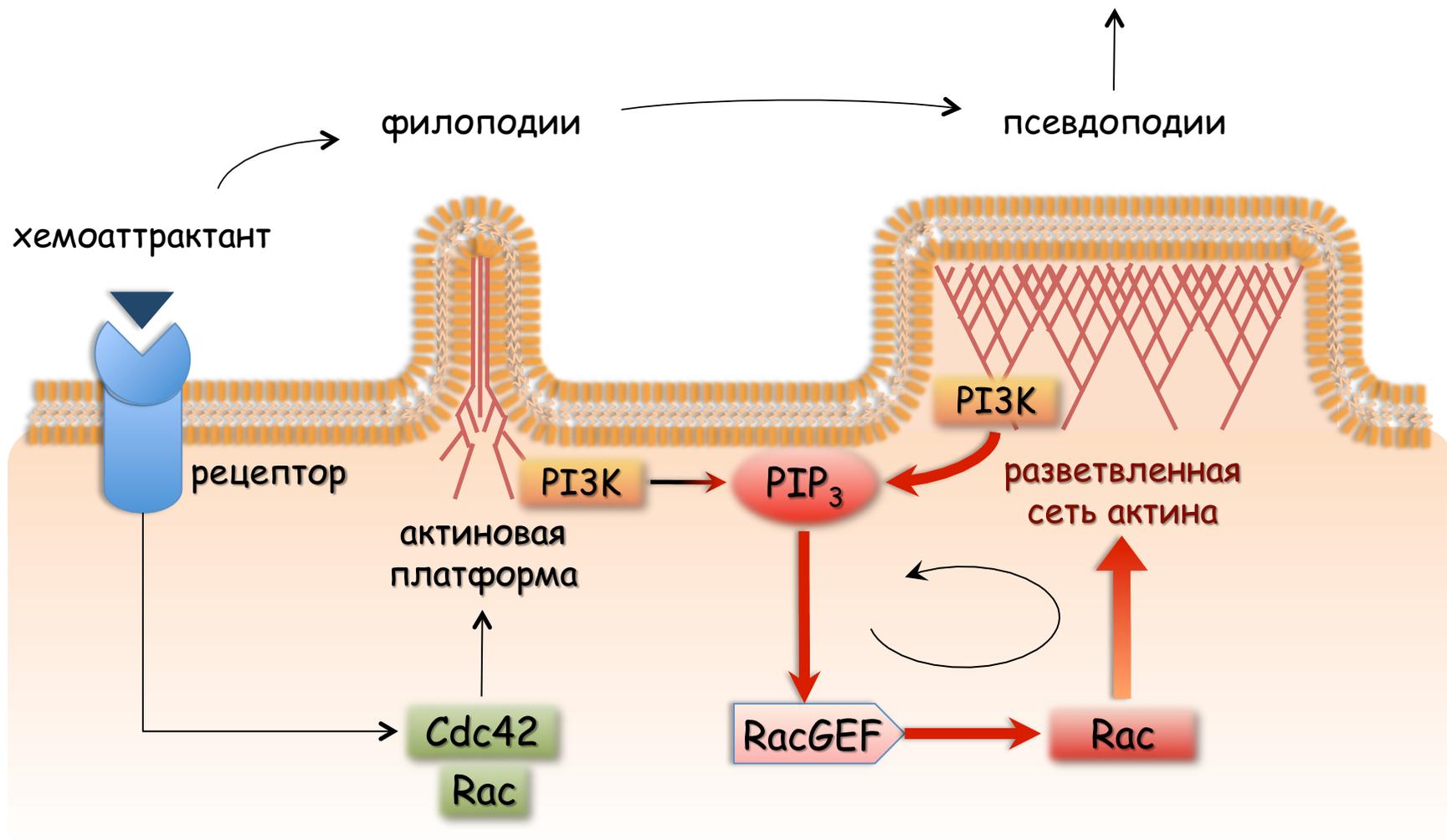


Рисунок 80

В отличие от событий, происходящих в первой фазе, события, что идут во второй, блокируются ингибиторами PI3K. Считается, что двухфазный характер динамики актина отражает включение механизма обратной связи (рис. 80). Первую фазу инициируют непосредственно рецепторы и опосредуют малые ГТФазы Cdc42 и Rac. На этой стадии нет значительных компонентов усиления сигнала, так как она обеспечивается в основном за счет белок-белковых взаимодействий. Cdc42 организует короткоживущие полимеры актина; они формируют локальную актиновую платформу.

На основе локальной актиновой платформы образуются короткие филоподии и создается другая регуляторная петля с участием полимерного актина, PI3-киназы и PIP3. Именно она отвечает за вторую фазу активации динамики актина. PIP3 рекрутирует на мембрану набор факторов GEF для малой ГТФазы Rac, поскольку большинство из них содержит РН-домены. Эти факторы активируют Rac-белок. Rac является мастер-регулятором полимеризации актина и формирования псевдоподий, которые обеспечивают движение. Полимерный актин закрепляет на себе PI3-киназу, и та запускает автокаталитическую петлю, приводящую к массивной продукции PIP3 и активации Rac. Таким образом, полимеризация актина необходима в обе фазы, но PI3K и PIP3 нужны только для работы второй петли.

Активный Rac-белок участвует в создании еще одной, но уже "боковой" регуляторной петли (рис. 81). Эта ГТФаза одновременно является активатором сборки НАДФН-оксидазного белкового комплекса на плазматической мембране клетки. НАДФН-оксидаза образует супероксид-анион радикал; он служит предшественником активных форм кислорода (АФК) и их более стабильного продукта, пероксида водорода H_2O_2 . Внутриклеточный механизм действия H_2O_2 состоит в том, что он окисляет остатки цистеина в активных центрах некоторых белков-мишеней. Узкий спектр мишеней H_2O_2 объясняется тем, что с ним взаимодействуют только ионизированные сульфидные группы, окруженные положительно заряженными аминокислотами. В клетке большинство SH-групп восстановлено и только их небольшая часть диссоциирована в белках, которые имеют в активном центре консенсусную последовательность аминокислот Цис-X-X-X-X-X-Арг (где X – любая аминокислота). Вследствие особого микроокружения, сульфгидрильная группа такого цистеина имеет низкую константу диссоциации и при физиологическом pH диссоциирует до тиолат-аниона, который может быть окислен H_2O_2 .

Главными мишенями H_2O_2 в клетке считаются тирозиновые фосфатазы, которые используют остаток Цис при катализе. Многие из них, включая основную фосфатазу тирозинкиназных рецепторов РТР-1В, имеют нужную последовательность и микроокружение, вследствие чего их каталитический цистеин окисляется под действием H_2O_2 . Это событие временно инактивирует фосфатазы, поскольку окисленные цистеины довольно быстро восстанавливаются специальными

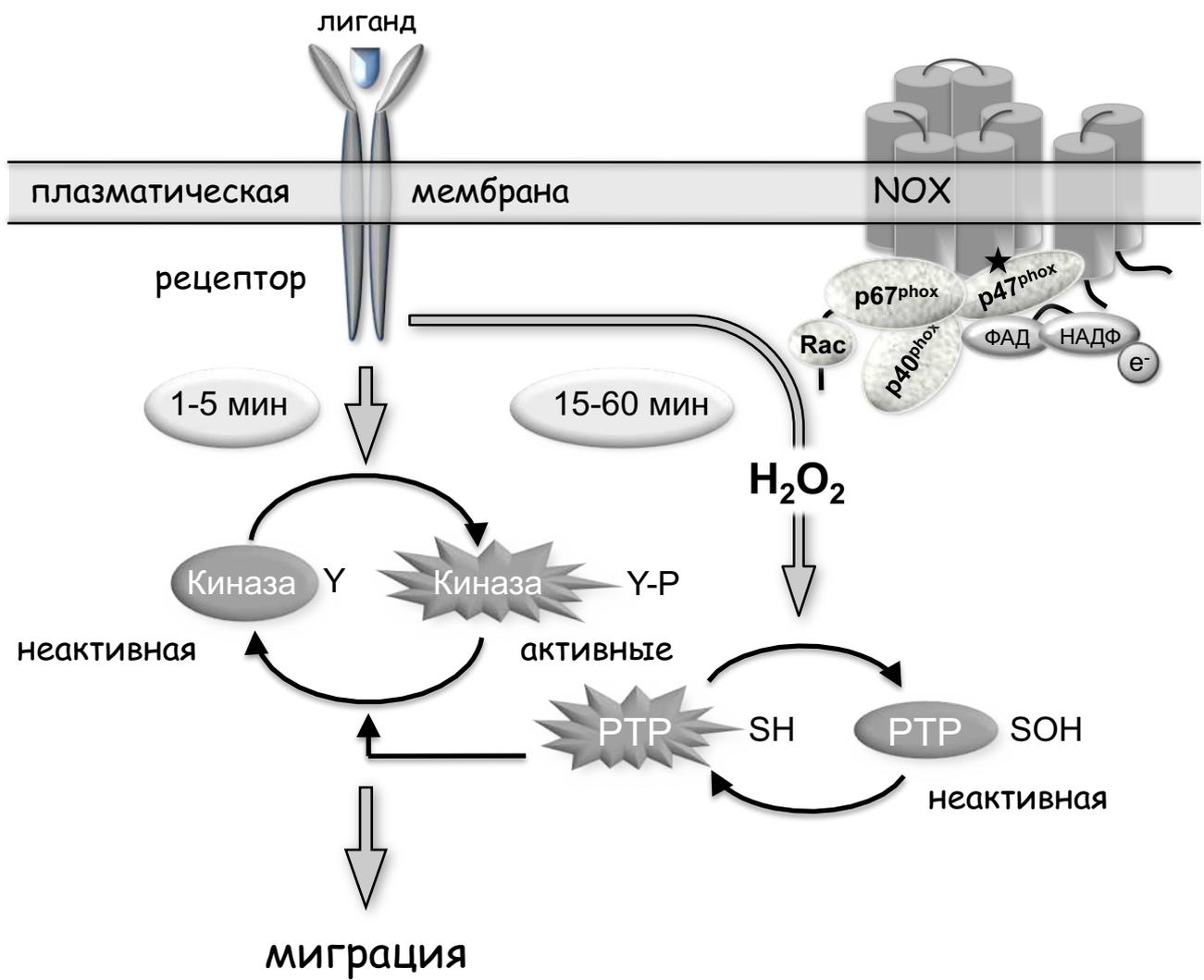


Рисунок 81

белками – пероксиредоксинами, тиоредоксинами и глутатионом. Временно инактивируя фосфатазы, H_2O_2 усиливает и поддерживает сигнализацию от тирозинкиназных рецепторов по общему механизму, показанному на [рис. 81](#). Обратимость и высокая селективность действия в сочетании с быстрым гормон-зависимым синтезом и распадом под действием каталазы делают H_2O_2 реальным кандидатом во вторичные посредники.

Помимо тирозиновых фосфатаз, к числу мишеней H_2O_2 относится фосфатаза PTEN, которую H_2O_2 окисляет и инактивирует. Пероксид водорода накапливается в псевдоподиях мигрирующих клеток и выявляется там в течение долгого времени с помощью прижизненных биосенсоров ([рис. 82](#)). Это означает, что H_2O_2 поддерживает высокий уровень PIP3 на лидирующем крае направленно мигрирующей клетки. Действительно, любые воздействия, нарушающие работу мембранных НАДФН-оксидаз или инактивирующих H_2O_2 , ингибируют движение фибробластов ([рис. 82](#)). Нейтрофилы тоже используют H_2O_2 для того, чтобы направленно двигаться в области тканевых повреждений.

Таким образом, механизм действия H_2O_2 при миграции клеток суммирован на [рис. 76В](#). Он не привязан к конкретному рецептору и используется теми из них, которые активируют НАДФН-зависимую продукцию H_2O_2 . Также как и в предыдущих примерах, в сигнальной системе этих рецепторов присутствует субстратный цикл и отрицательная обратная связь к фосфатазе. Она действует по принципу двойного отрицания и активирует хемотактическую систему клетки.

Отношение $A_{405\text{nm}}/A_{488\text{nm}}$

