

Зинченко В.П., Долгачева Л.П.

Внутриклеточная сигнализация

Пушино, 2003

Электронная версия учебного пособия Зинченко В.П. и Долгачевой Л.П. «Внутриклеточная сигнализация» подготовлена в Электронном издательстве «Аналитическая микроскопия» (регистрация издательства в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовой информации Эл №77-6072 от 4 февраля 2002 г.) под редакцией проф. А.Ю.Буданцева
Подготовка материала: редактор 1 категории Т.М.Бондарь
Администратор Сервера <http://cam.psn.ru> : Р.В.Гуркин

© Электронное издательство «Аналитическая микроскопия»



Об авторах

Валерий Петрович Зинченко, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации ИБК РАН, руководитель магистерской программы "Физиология клетки" учебного центра Биологии клетки Пуш.ГУ

Долгачева Людмила Петровна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, доцент учебного центра «Биология клетки» Пуш.ГУ, Учебное пособие составлено на основе курса лекций по внутриклеточной сигнализации читаемый авторами в Пуш.ГУ

От редакции

Оглавление

Введение

- Глава 1. **Экстраклеточные сигналы, первичные мессенджеры** (гормоны, цитокины, факторы роста, нейротрансмиттеры, феромоны, пурины)
- Глава 2. **Рецепторы** (*K_d*, ионотропные рецепторы-каналы. Рецептор с тирозинкиназной активностью, рецепторы к факторам роста. Серпентиновые рецепторы сопряженные с G белком. Мускариновые рецепторы. Адренорецепторы. Ядерные рецепторы)
- Глава 3. **G-белки** (G-белки – это семейство гуанин-нуклеотидсвязывающих белков, передающих сигнал с мембранных рецепторов на определенные эффекторные молекулы в клетке. 80% первичных мессенджеров (гормоны, нейротрансмиттеры, нейромодуляторы) взаимодействуют со специфическими рецепторами, которые связаны с эффекторами через G-белки.
- Глава 4. **Эффекторные молекулы** (В системе сигнализации эффекторными называют молекулы, которые запускают образование внутриклеточных посредников. Рецепторы сопряженные с G-белком передают сигнал на такие эффекторные молекулы, как аденилатциклазу (АЦ), фосфолипазу C (ФЛС), фосфолипазу A₂ (ФЛА₂), сGMP-специфическую фосфодиэстеразу фоторецепторов, и несколько типов ионных каналов)
- Глава 5. **Основные вторичные мессенджеры, их метаболизм** (Глава носит справочный характер. В ней приведены структурные формулы и реакции образования основных вторичных мессенджеров, участвующих в системах передачи сигналов. Приведены схемы изменения метаболизма фосфоинозитидов при действии стимула, увеличение цитозольного Ca²⁺ с участием IP₃- и рианодинового рецепторов)
- Глава 6. **Ca²⁺-транспортирующие системы клетки** (Особая роль Ca²⁺ как вторичного мессенджера и большое количество Ca²⁺-транспортирующих систем, принимающих участие в регуляции уровня Ca²⁺ в клетке позволяют выделить кальциевую систему сигнализации в отдельную область внутриклеточной сигнализации. В данном разделе подробно рассмотрены Ca²⁺-транспортирующие системы и механизмы регуляции уровня Ca²⁺ в клетках)
- Глава 7. **Фосфорилирование белков как механизм переключения функционирования клеток** (Первые указания на то, что фосфорилирование белков является важным регулятором ферментативной активности, появились в то время, когда регуляторная роль нековалентных взаимодействий субстратов, кофакторов и конечных продуктов реакций была уже хорошо установлена. Классический пример регуляция активности фосфоорилазы 5'-АМР (положительная) и глюкозо-6-фосфатом (отрицательная).

Глава 8. **Фосфатазы** (*Процесс дефосфорилирования является таким же важным, как и процесс фосфорилирования, и соответственно, протеинфосфатазы являются интегральными компонентами сигнальных систем, управляемых протеинкиназами. В ряде случаев дефосфорилирование возвращает белки обратно в состояние покоя.*)



Внутриклеточная сигнализация

Зинченко В.П., Долгачева Л.П.

История развития учения о внутриклеточных сигналах и словарь.

Введение

Основные биологические функции клетки реализуются посредством взаимодействия экстраклеточного стимула (**первичного мессенджера**) с **рецептором** на поверхности клетки и передачи сигналов внутрь клетки. Изучение биофизических и биохимических механизмов передачи и усиления слабых сигналов является одной из основных задач биологии клетки. Их знание необходимо для понимания механизмов формирования функционального ответа клеток в норме, его регуляции и коррекции при патологических состояниях.

Основной **целью курса** внутриклеточной сигнализации является получение учащимися фундаментальных знаний и современных представлений о механизмах управления клеточными функциями и отдельными метаболическими процессами в клетке. В основные **задачи курса** входит изучение систем внутриклеточной сигнализации обеспечивающих передачу сигналов при рецептор-зависимой активации клеточных функций, таких как пролиферация, дифференцировка, секреция, агрегация, рост и движение, возбуждение, хемо и фоторецепция. Изложены известные пути передачи сигналов с рецепторов и механизмы усиления этих сигналов. Подробно описаны типы рецепторов, механизмы сопряжения рецепторов с **эффекторными молекулами** производящими вторичные мессенджеры, типы эффекторных молекул, механизмы производства и функции самих мессенджеров. Курс включает ознакомление с современными методами и аппаратурой исследования интактных клеток. В ряду других учебных дисциплин данный курс является базовым и создает основу для дальнейшей специализации в области исследования вышеперечисленных процессов. Курс тесно сочетается с такими курсами как биология клетки, кинетика и регуляция внутриклеточных процессов, механизмы рецепции. Описание путей передачи сигнала при сенсорной рецепции, а также путей передачи сигнала в ядро при пролиферации и дифференцировке клеток не вошло в данный курс, поскольку оно подробно представлено в параллельных курсах «Механизмы сенсорной рецепции» и «Рост и движение клеток. Клеточный цикл».

Выражение *signal transduction* впервые отмечено в биологической литературе в 1974 г. [1], а в названии статьи в 1979 [2,4].

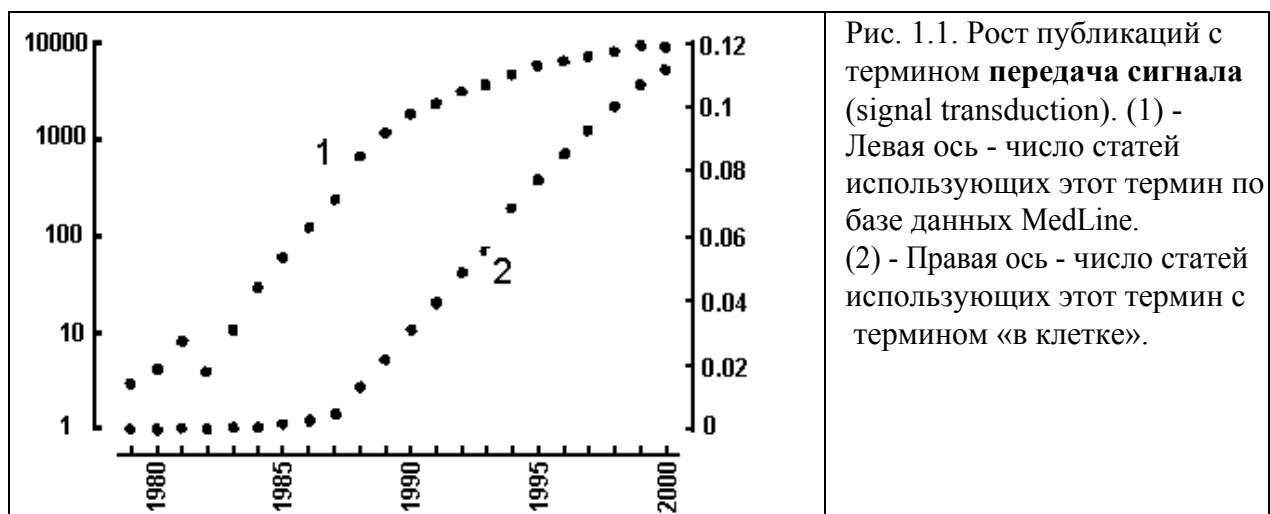


Рис. 1.1. Рост публикаций с термином **передача сигнала** (signal transduction). (1) - Левая ось - число статей использующих этот термин по базе данных MedLine. (2) - Правая ось - число статей использующих этот термин с термином «в клетке».

Из рис.1.1. видно, что внутриклеточная сигнализация – наука достаточно молодая,

возникшая вначале 80-х годов. Ее возникновение связано с такими открытиями как участие фосфолипидов (в первую очередь фосфоинозитидов), G-белков и протеинкиназы С в системе передачи сигнала с рецепторов. В это же время были разработаны уникальные оптические методы исследования одиночных интактных клеток, включая методы анализа изображения и конфокальную микроскопию.

Глава 1

Экстраклеточные сигналы, первичные мессенджеры: гормоны, цитокины, факторы роста, нейротрансмиттеры, феромоны, пурины.

В качестве **агониста рецептора** клетка может использовать специально синтезированные соединения пептидной природы или использовать свои внутриклеточные метаболиты, которые отсутствуют в экстраклеточной среде. Кофермент АТФ и глутамат, действующие экстраклеточно, являются мощными нейротрансмиттерами.

Природные экстраклеточные лиганды, которые взаимодействуют с рецепторами и активируют их, называют первичными мессенджерами. Они могут быть подразделены на гормоны, нейротрансмиттеры, цитокины, лимфокины, факторы роста, хемоаттрактанты т.д. Каждый из этих терминов представляет класс агентов, действующих достаточно специфично. Тем не менее, существуют примеры многофункциональности первичных мессенджеров: АТФ и глутамат являются нейротрансмиттерами, когда они секретируются в синапсах. Гормоны пищеварительного тракта, такие как гастрин, холецистокинин и секретин в центральной нервной системе осуществляют многообразные функции нейромодуляторов, влияя на высвобождение других нейротрансмиттеров. Соматостатин, идентифицированный первоначально как агент гипоталамуса, подавляющий секрецию гормона роста, также функционирует в центральной нервной системе как нейротрансмиттер и нейромодулятор. Более того, он является паракринным агентом для клеток поджелудочной железы и гормоном для печени. Фактор роста тромбоцитов TGF β действует также как хемоаттрактант и как ингибитор роста. Тромбин является фактором роста, но также вовлекается в свертывание крови как активатор функции тромбоцитов.

Гормоны. Химические мессенджеры, которые переносятся посредством кровотока от органа, где они производятся к органу, который они регулируют. Физиологические потребности организма должны контролировать их повторное производство и циркуляцию повсюду в теле. Гормоны можно подразделить на несколько классов:

Малые водорастворимые молекулы. Гистамин, адреналин.

Пептидные гормоны. К числу пептидных гормонов, которые могут содержать от 3 до 200 аминокислотных остатков, относятся все гормоны гипоталамуса и гипофиза, а также инсулин и глюкагон, секретируемые поджелудочной железой.

Факторы роста. В настоящее время известно около 50 белков-лигандов и 14 семейств рецепторов.

Цитокины. Локальные пептидные гормоны, регулирующие парокринную и аутокринную функции. Интерлейкины, интерфероны, фактор некроза опухоли (TNF).

Липофильные молекулы имеющие рецепторы на поверхности клеток. Простагландины.

Липофильные молекулы, имеющие внутриклеточные рецепторы. Стероидные и тироидные гормоны (гормоны щитовидной железы). Их основное отличие в том, что они способны проникать внутрь клетки и взаимодействовать с внутриклеточными рецепторами.

Нейротрансмиттеры. Несколько семейств, включая (ацетилхолин, ГАМК, допамин) и (вазопрессин, брадикинин).

Барьер плазматической мембраны

Гормоны являются главным образом **гидрофильными** веществами и не способны проникнуть через мембраны. Мембраны клеток, хотя и очень тонкие (3-6 нм), но являются непроницаемыми к ионам и полярным молекулам. Хотя ионы K⁺ могут достигать

диффузионного равновесия на этом расстоянии в воде приблизительно за 5 мсек, им потребуется приблизительно 12 дней (280 час) чтобы продифундировать через фосфолипидный бислой (при одинаковых условиях температуры, и т.д.). Даже к маленьким молекулам типа мочевины, проницаемость мембран - приблизительно в 10^4 раз ниже, чем к воде. Так, для гормона типа адреналина скорость проникновения слишком мала, чтобы ее измерить. За немногими исключениями (стероидные гормоны), гормоны не нуждаются в проникновении в клетки - мишени.

Гормоны обычно высвобождаются в малых количествах в местах, удаленных от органов-мишеней. При попадании в кровь они разбавляются и подвергаются действию ферментов. Многие из них циркулируют как комплексы со специфическими связывающими белками, что понижает их свободную концентрацию. В результате этого их уровень вблизи клетки-мишени достаточно низкий, и, следовательно, клеточные рецепторы должны обладать высокой аффинностью. Другая важная деталь состоит в том, что хотя клетка-мишень может взаимодействовать с гормоном в течение миллисекунд, но полное время ответа длится от секунд до часов.

Факторы роста

Первые публикации о возможности поддержания в живом состоянии фрагментов биологической ткани *in vitro* появились 90 лет назад, но рутинное культивирование отдельных клеток стало возможным менее 50 лет назад. Успешное поддержание процесса деления клеток млекопитающих зависит от компонентов среды культивирования. Традиционно среда для культивирования состоит из питательных веществ и витаминов в забуференном солевом растворе. Ключевым компонентом является сыворотка животных, например, эмбриональная бычья сыворотка. Без такой добавки наибольшая часть культивируемых клеток не будут воспроизводить собственную ДНК и, следовательно, не будут пролиферировать. Позже был изолирован полипептид с молекулярной массой 30 кД, секретируемый тромбоцитами, обладающий митогенными свойствами. Он был назван фактором роста произведенным тромбоцитами (PDGF). PDGF является членом семейства факторов роста, содержащего свыше 40 полипептидов: инсулин (5,7 кД), фактор роста эпидермиса (6 кД) и трансферрин (78 кД) и др. Как и в случае с гормонами, факторы роста взаимодействуют с соответствующими рецепторами с высокой степенью аффинности и могут инициировать множественные эффекты: от процессов регуляции роста, дифференцировки и экспрессии генов до инициирования апоптоза. Эффекты факторов роста, в отличие от гормонов, могут продолжаться в течение нескольких дней.

Цитокины

Параллельно с открытием факторов роста было идентифицировано несколько экстраклеточных сигнальных белков, взаимодействующих с клетками иммунной системы. В связи с тем, что они активировали или модулировали пролиферативные свойства клеток этого класса, они были названы иммуноцитокинами. После того, как стало известно, что эти соединения взаимодействуют не только с клетками иммунной системы, их название сократилось до цитокинов. Цитокины включают в себя некоторые факторы роста, такие как интерфероны, фактор некроза опухоли α (TNF α), ряд интерлейкинов, колонии стимулирующий фактор (CSF) и многие другие. Хемокины являются цитокинами, которые инициируют локальное воспаление в результате вовлечения инфламаторных (воспалительных) клеток в процесс хемотаксиса, а далее в процесс активации их функции.

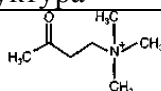
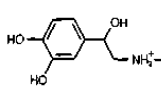
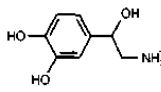
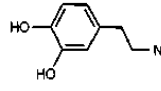
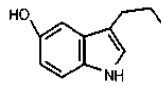
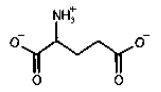
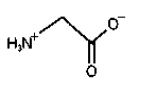
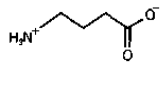
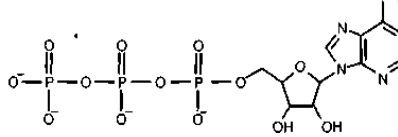
Вазоактивные агенты

Физическое повреждение тканей или повреждение, вызванное инфекцией, генерирует воспалительный ответ. Эта реакция является защитным механизмом, в котором специализированные клетки (в основном лейкоциты), действуя согласованным образом, удаляют причины и продукты разрушения. Этот процесс является комплексным взаимодействием между клетками и рядом экстраклеточных мессенджеров. Среди них присутствуют цитокины, которые индуцируют воспаление (провоспалительные медиаторы) или уменьшают его (антивоспалительные медиаторы). Расширение сосудов и местное увеличение проницаемости сосудов облегчает проникновение лейкоцитов и

уменьшает местный отек. Агенты, запускающие этот процесс, включают гистамин (секретируемый тучными клетками), серотонин (секретируемый тромбоцитами) и провоспалительные медиаторы, такие как брадикинин.

Эйкозаноиды являются другим важным семейством вазоактивных соединений. Они являются производными арахидоновой кислоты. Термин эйкозаноиды произошел от греческого слова, означающего число 20, поскольку арахидоновая кислота и многие ее производные содержат 20 углеродных атомов. Сюда входят простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Они являются короткоживущими соединениями и действуют на близких расстояниях в качестве потенциальных паракринных или аутокринных агентов, контролируя многие физиологические и патологические клеточные функции. Лекарственный препарат аспирин обладает противовоспалительными и болеутоляющими свойствами, потому что он ингибирует ключевой фермент пути образования простагландинов.

Таблица 1.1. Нейротрансмиттеры

Тип	Трансмиттер	Структура
Производные тирозина или триптофана	Ацетилхолин	
	Адреналин (Эпинефрин)	
	Норадреналин (Норэпинефрин)	
	Дофамин	
	Серотонин	
Аминокислоты	Глутамат	
	Глицин	
	ГАМК	
Пурины	АТФ	
Нейропептиды	Энкефалины	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
	Ангиотензин	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
	Сматостатин	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser

Нейротрансмиттеры и нейропептиды.

Нейротрансмиттеры являются также первичными мессенджерами, но их высвобождение и определение в химических синапсах сильно отличается от эндокринных сигналов. В пресинаптической клетке, везикулы, содержащие нейротрансмиттер, высвобождают собственное содержимое локально в очень маленький объем синаптической щели. Высвобожденный транзиттер затем диффундирует через щель и связывается с рецепторами на постсинаптической мембране. Диффузия является медленным процессом, но пересечение такой короткой дистанции, которая разделяет пре- и постсинаптические нейроны (0,1 мкм или меньше), происходит достаточно быстро и позволяет осуществлять быстрые коммуникации между нервами или между нервом и мышцей.

В таблице 1.1. приведена структура нескольких наиболее важных нейротрансмиттеров. В центральной нервной системе глутамат является главным возбуждающим транзиттером, тогда как ГАМК и глицин ингибирующими. Самая выдающаяся роль ацетилхолина реализуется в нейромышечной передаче, где он является возбуждающим транзиттером. Известно, что ацетилхолин может оказывать как возбуждающее, так и ингибирующее действие. Это зависит от природы ионного канала, который он регулирует при взаимодействии с соответствующим рецептором.

Органы и ткани как эндокринные железы (пример).

В настоящее время считают, что почти все органы и ткани живого организма секретируют в межклеточное пространство и кровь гормоны и биологически активные соединения, с помощью которых осуществляются взаимодействия, объединяющие клетки и ткани организма в единое целое.

Методы молекулярной биологии: клонирование и секвенирование фрагментов ДНК, методы гибридизации мРНК позволяют получать через экспрессию генов новые белковые гормоны и их рецепторы в разных тканях. Сравнительно недавно был открыт новый гормон белой жировой ткани – **лептин**. Этот гормон был открыт в результате исследования гена ожирения (ген *ob*), локализованного в проксимальной части хромосомы 6 мыши, и его сцепленности с другими известными маркерами (*Rax4*) и маркером длины рестрикционных фрагментов (*D6Rck13*). Далее было показано, что ген *ob* экспрессируется в основном в адипоцитах белой жировой ткани, которые секретируют синтезируемый ими гормон лептин в кровь. Основным органом мишенью лептина является центральная нервная система, через воздействие на которую лептин снижает аппетит, стимулирует использование липидов в энергетическом обмене и уменьшает запасы жира в жировых депо.

Содержание лептина в циркулирующей крови людей четко коррелирует с массой тела, и поэтому чем больше масса жировой ткани, тем больше она секретирует гормона в кровь. Известно, что ген рецептора лептина человека локализован на хромосоме 1. Анализ аминокислотной последовательности продемонстрировал наличие гомологичного участка с субъединицей рецепторов интерлейкина-6 и других цитокинов. Идентифицировано три различных варианта рецептора: 1) растворимый рецептор лептина, 2) связанный с мембраной рецептор лептина, который имеет короткий внутриклеточный домен и не способен осуществлять трансдукцию гормонального сигнала, и 3) связанный с мембраной рецептор, имеющий длинный внутриклеточный домен и способный передавать гормональный сигнал. Рецептор лептина с длинным цитоплазматическим доменом наиболее активно экспрессируется в гипоталамусе и в меньшей степени в других тканях. Он содержит последовательности, которые определяют взаимодействие цитоплазматического домена с киназой Януса (JAK - Janus kinase-) и белками активаторами транскрипции (STAT - signal transducers and activators of transcription). Эта форма рецептора путем фосфорилирования активирует белки: STAT-3, STAT-5 и STAT-6.

Связывание лигандов с рецепторами

При концентрации $1 \cdot 10^{-10}$ М число молекул агониста в объеме клетки диаметром 12 мкм составит 60 молекул. Обычно рецепторы имеют не очень высокую константу

связывания лиганда порядка 10^{-7} - 10^{-8} М. Хотя для феромонов она достигает величин до 10^{-15} М. Такая невысокая константа нужна для облегчения прекращения стимуляции. Однако из-за большого коэффициента усиления в системе сигнализации обычно при связывании агониста с двумя процентами рецепторов происходит максимальная стимуляция функционального ответа (рис.1.2.). Например, активация инсулином окисления глюкозы в адипоцитах. Возникает вопрос, зачем нужны остальные 98 процентов рецепторов? Возможно, избыток рецепторов необходим для ответа на низкие концентрации гормона, не имеющего высокого сродства к рецептору. Одно из следствий такого взаимодействия агониста с рецептором является необходимость введения отрицательной обратной связи в систему усиления (образования вторичных мессенджеров). Т.к. в случае появления избытка агониста появится избыток вторичных мессенджеров, что уже не будет усиливать ответ, а лишь затягивать его во времени, что может быть не нужно или токсично. В этих случаях должен включаться механизм уборки вторичного мессенджера, например активация фосфодиэстеразы при действии теофиллина. На рис 1.2. приведены примеры зависимостей связывания лигандов с рецептором и функционального ответа от концентрации лиганда. Показано, что для максимальной активации функции необходимо связывание лиганда с небольшим количеством рецепторов. Связывание лиганда с рецептором характеризуется константой диссоциации (K_d) и концентрацией лиганда, вызывающей полумаксимальный ответ (EC_{50}), речь о которых пойдет в следующем разделе.

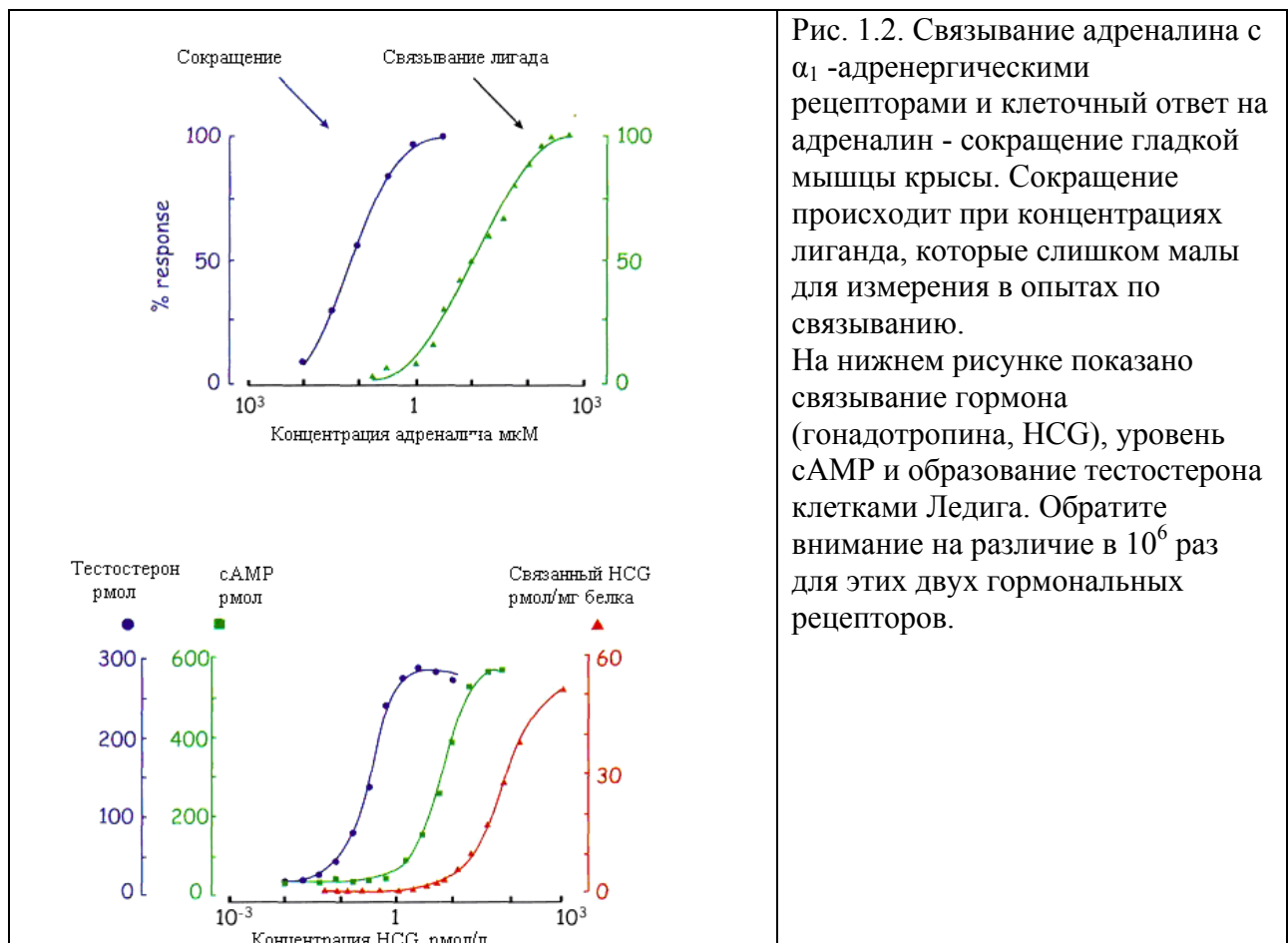


Рис. 1.2. Связывание адреналина с α_1 -адренергическими рецепторами и клеточный ответ на адреналин - сокращение гладкой мышцы крысы. Сокращение происходит при концентрациях лиганда, которые слишком малы для измерения в опытах по связыванию. На нижнем рисунке показано связывание гормона (гонадотропина, НСГ), уровень сАМР и образование тестостерона клетками Ледига. Обратите внимание на различие в 10^6 раз для этих двух гормональных рецепторов.

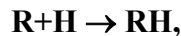
Глава 2

Рецепторы

Кd, ионотропные рецепторы-каналы. Рецептор с тирозинкиназной активностью, рецепторы к факторам роста. Серпентиновые рецепторы сопряженные с G белком. Мускариновые рецепторы. Адренорецепторы. Ядерные рецепторы

Восприятие клетками внешних сигналов происходит, в основном, благодаря взаимодействию некоторых факторов (стимулов, лигандов) с определенными рецепторами, расположенными на поверхностной мембране клеток. Несмотря на огромное разнообразие стимулов и рецепторов существует всего несколько универсальных сигнальных систем, передающих информацию различным клеточным органеллам и запускающих определенные физиологические процессы в клетке.

Гормоны связываются с рецепторами высокоспецифичным образом и с высокой аффинностью. Связыванию гормона с рецептором осуществляется за счет слабых взаимодействий – ионных, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Специфичность рецептора можно охарактеризовать по его способности распознавать лиганды. Рецептор к инсулину, например, связывает инсулин, но не другие пептидные гормоны. Связывание гормона может выглядеть как простая обратимая реакция



которая может быть описана следующим уравнением:

$$K_D = [R][H] / [RH],$$

где [R] и [H] – концентрации свободного рецептора и гормона (лиганда), соответственно, и [RH] - концентрация комплекса рецептор-гормон. K_D , константа диссоциации комплекса рецептор-лиганд, характеризует сродство рецептора к лиганду. Уравнение связывания можно дополнить:

$$[RH] / R_T = 1 / (1 + K_D / [H])$$

где R_T – сумма свободных и связанных рецепторов: $[R] + [RH]$. Уравнение подобно уравнению Михаэлиса-Ментен, используемому для анализа ферментативных реакций. Более низкому значению K_D соответствует более высокое сродство рецептора к его лиганду. Значение K_D эквивалентно концентрации лиганда, при которой половина рецепторов связана с лигандом.

Как правило, число рецепторов в суспензии клеток или их фрагментов определяют по связыванию с содержащим радиоактивную метку гормоном. Для многих рецепторов, взаимодействующих с гормонами, концентрация лиганда, необходимого для генерации максимального клеточного ответа, меньше значения, необходимого для насыщения всех рецепторных молекул клетки (Рис.1.2).

Рецепторы, взаимодействующие с гормонами, трудно идентифицировать и очистить, главным образом из-за того, что их относительное содержание очень мало. Поверхность типичной клетки содержит 10000 – 20000 рецепторов к отдельному гормону, что соответствует $\approx 10^{-6}$ от общего белка клетки или $\approx 10^{-4}$ от белка плазматической мембраны. Для выделения рецепторов прежде всего следует солиubilизировать интегральные белки мембраны с помощью неионного детергента. Солиubilизированный таким образом рецептор далее может быть очищен с помощью аффинной хроматографии. В этом случае лиганд соответствующего рецептора химически связывается со специальной матрицей

(например, полистироловые шарики). Далее грубая фракция мембранных белков пропускается через такую колонку. И только рецептор свяжется со своим лигандом.

Тем не менее, для многих гормонов количество рецепторов на клеточной поверхности слишком мало для того, чтобы получать их с использованием аффинной хроматографии. Поэтому ключевые рецепторные белки могут быть получены с помощью ДНК-клонирования и других рекомбинантных ДНК методов.

Рецепторы - каналы

В настоящее время установлено, что весьма важным моментом трансмембранной передачи сигналов является изменение транспорта и внутриклеточной концентрации различных ионов. Одной из основных систем, приводящих к изменению внутриклеточной концентрации ионов, являются селективные ионные каналы биомембран, представляющие собой интегральные мембранные белки, способные при определенных внешних воздействиях (изменение потенциала на мембране, действие медиатора или гормона) избирательно менять проницаемость мембраны для конкретного вида ионов.

Ацетилхолиновые рецепторы

Нейротрансмиттер ацетилхолин высвобождается из везикул в пресинаптических нервных терминалях и связывается как с никотиновыми, так и мускариновыми рецепторами на поверхности клетки. Эти два типа ацетилхолиновых рецепторов значительно отличаются как по структуре, так и по функциям. Ацетилхолиновый никотиновый рецептор является одновременно и ионным каналом, т.е. относится к рецепторам-каналоформерам, тогда как ацетилхолиновый мускариновый рецептор относится к классу серпентиновых рецепторов, осуществляющих передачу сигнала через гетеротримерные G- белки.

Никотиновые рецепторы. Рецептор – ионный канал

Наиболее хорошо изученным рецептором-ионным каналом является ацетилхолиновый никотиновый рецептор (рис.2.1., 2.2.) Свое название никотиновый ацетилхолиновый рецептор получил из-за его сродства к никотину. Никотин связывается непосредственно с α -субъединицей рецептора и стимулирует открывание неспецифического катионного канала, сформированного различными комбинациями $\alpha 2$, β , γ , δ и ϵ субъединиц.

В нейромышечной системе ацетилхолин действует через никотиновые холинергические рецепторы и вызывает сокращение скелетной мускулатуры. Он также передает сигнал внутри нервной системы. Эти рецепторы являются неспецифическими ионными каналами, которые проводят Na^+ и K^+ . Антагонистом для никотиновых рецепторов является тубокурарин. Никотиновые рецепторы являются членами суперсемейства мембранных белков, которые включают ионотропные рецепторы для серотонина (5-гидрокситриптамин, 5-НТ), для глицина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Глициновые и ГАМК рецепторы являются анионными каналами. Все они обладают одинаковыми свойствами – один и тот же белок является и рецептором и ионным каналом.

В специализированных тканях никотиновый рецептор представлен в огромных количествах, возможно, поэтому он является наиболее изученным. Так, например, при нейромышечной передаче события развиваются следующим образом. Ацетилхолин, секретируемый из пресинаптической мембраны в синаптическую щель, взаимодействует с рецепторами постсинаптической мембраны. Это позволяет Na^+ входить через никотиновые каналы, вызывая, таким образом, локальную деполяризацию, которая приводит, в конечном счете, к сокращению мышцы.

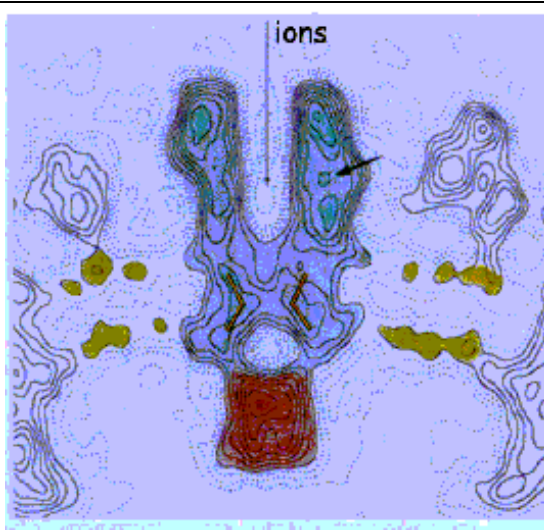


Рис. 2.1 Разрез ацетилхолинового рецептора. Рецептор изображен синим, фосфолипидные головки мембраны желтым и прикрепленный цитоплазматический белок розовым. Рецептор приблизительно 12 нм длиной выдвинут приблизительно на 6.5 нм во внеклеточное и на 1.5 нм во внутриклеточное пространство. Узкая пора (длинная стрелка) диаметром ~2 нм сформирована кольцом из пяти α спиралей. Участок связывания АХ выглядит как карман (короткая стрелка) в α -субъединице и расположен приблизительно в 5 нм от ворот.

(По данным Найджела Унвина, MRC Лаборатория Молекулярной Биологии, Кембриджа.)

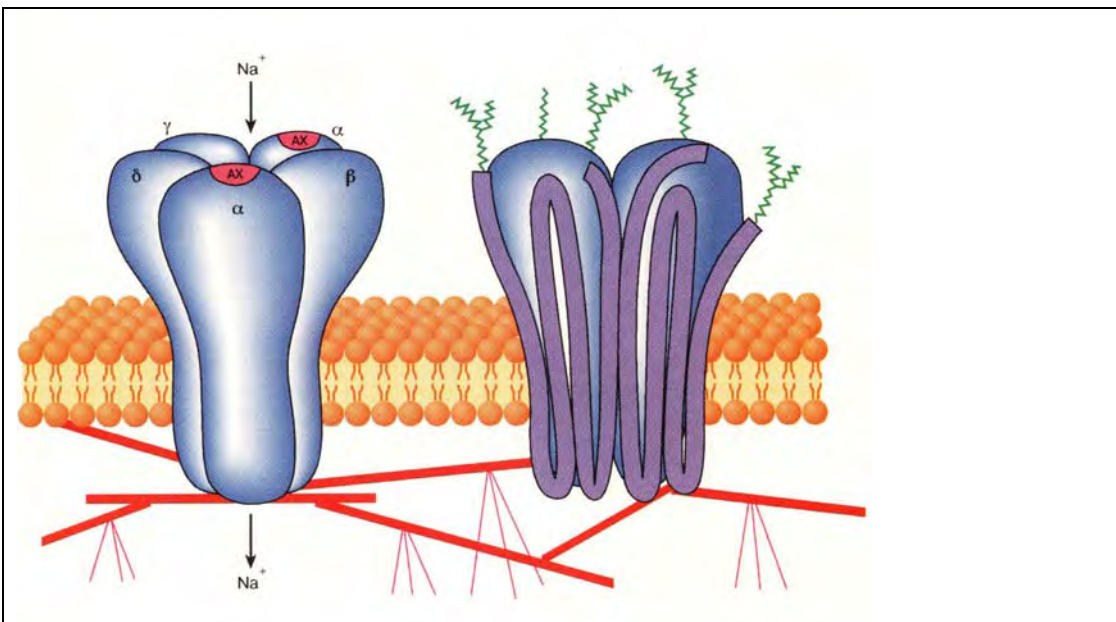


Рис. 2.2. Структура холинергического рецептора никотинового типа, формирующего ионный канал. Субъединицы, полипептидные цепи которых четыре раза пронизывают липидный бислой, с внешней стороны гликозилированы, а внутри взаимодействуют с белками тубулинового и актинового цитоскелета. Связывание АХ с двумя α -субъединицами холинергического рецептора вызывает конформационные изменения в олигомерном комплексе, в результате чего Na^+ входит внутрь клетки.

Рецепторы с тирозинкиназной активностью.

Рецепторы к Факторам Роста.

Тирозинкиназные (ТК) рецепторы играют ведущую роль в процессах роста, развития и дифференцировки клеток. Их лиганды-факторы роста (GF) иногда называют митогенами, потому что они стимулируют рост клетки и ее прохождение через митоз. GF представляют собой полипептиды, состоящие из 50-100 аминокислот. Каждый тип GF

связывается с внеклеточным доменом его собственного специфического рецептора и наоборот, не связывается с рецепторами для других факторов роста. Этот экстраклеточный домен рецептора может рассматриваться как карман, в который соответствующий фактор роста "вставляется" как ключ в замок. Так, эпидермальный фактор роста (EGF) может связаться на поверхности клеток только с EGF рецептором, но не с рецептором к PDGF (фактор роста тромбоцитов), который может также быть экспонирован на поверхности этих клеток.

Тирозинкиназный рецептор состоит из четырех основных доменов. Экстраклеточный домен участвует в связывании лиганда и получении внешнего сигнала. Связывание агониста вызывает конформационные изменения, которые активируют цитоплазматический тирозинкиназный домен (290 аминокислот). Этот домен определяет биологический ответ и передает сигнал внутрь клетки. Трансмембранный домен однократно пронизывает мембрану и соединяет вне- и внутриклеточные домены.

На рис 2.3 приведена схема активации EGF рецептора. Различные рецепторы содержат один или более регуляторных доменов, представленных терминальным COOH-участком или дополнительным киназным фрагментом. На регуляторных доменах расположены множественные участки аутофосфорилирования, к которым присоединяются как адаптерные белки, так и эффекторные молекулы (рис 2.4).

На основании сходства структурных элементов в настоящее время выделяют 14 различных семейств тирозинкиназных рецепторов. Различие между семействами в основном проявляется в структуре их экстраклеточных доменов (рис 2.5).

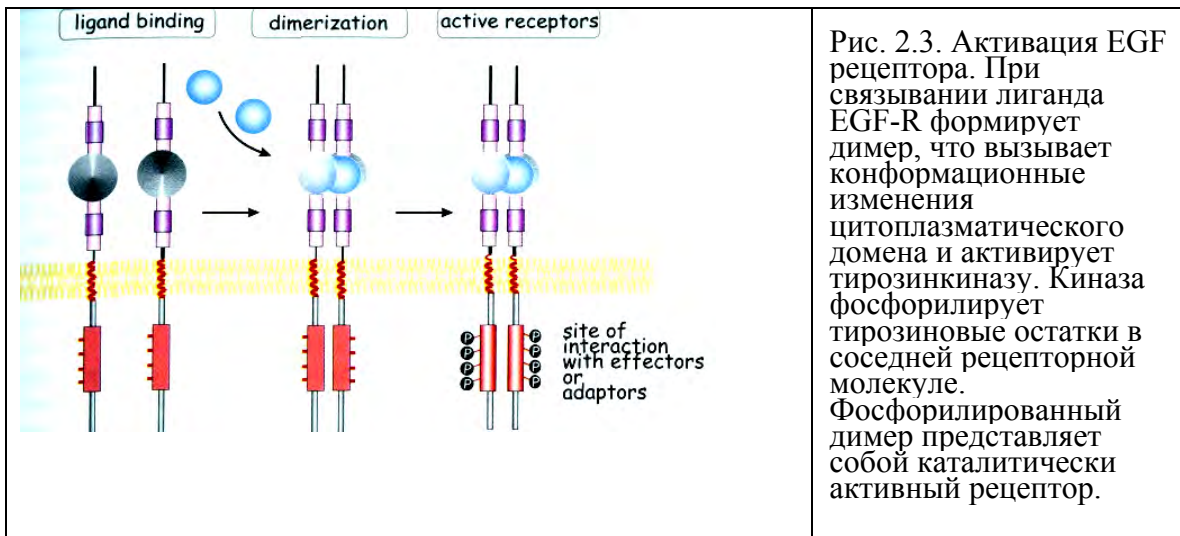


Рис. 2.3. Активация EGF рецептора. При связывании лиганда EGF-R формирует димер, что вызывает конформационные изменения цитоплазматического домена и активирует тирозинкиназу. Киназа фосфорилирует тирозиновые остатки в соседней рецепторной молекуле. Фосфорилированный димер представляет собой каталитически активный рецептор.

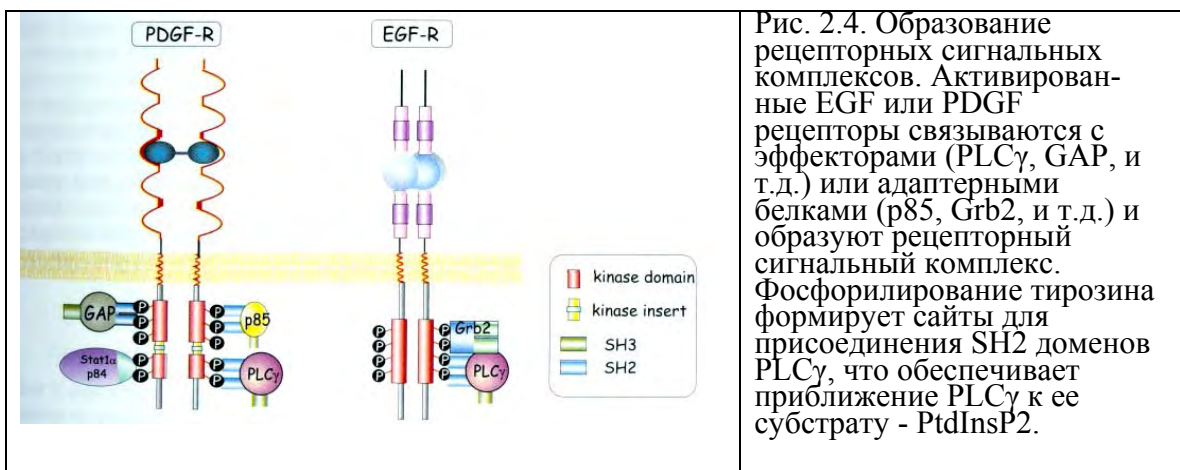


Рис. 2.4. Образование рецепторных сигнальных комплексов. Активированные EGF или PDGF рецепторы связываются с эффекторами (PLC γ , GAP, и т.д.) или адаптерными белками (p85, Grb2, и т.д.) и образуют рецепторный сигнальный комплекс. Фосфорилирование тирозина формирует сайты для присоединения SH2 доменов PLC γ , что обеспечивает приближение PLC γ к ее субстрату - PtdInsP2.

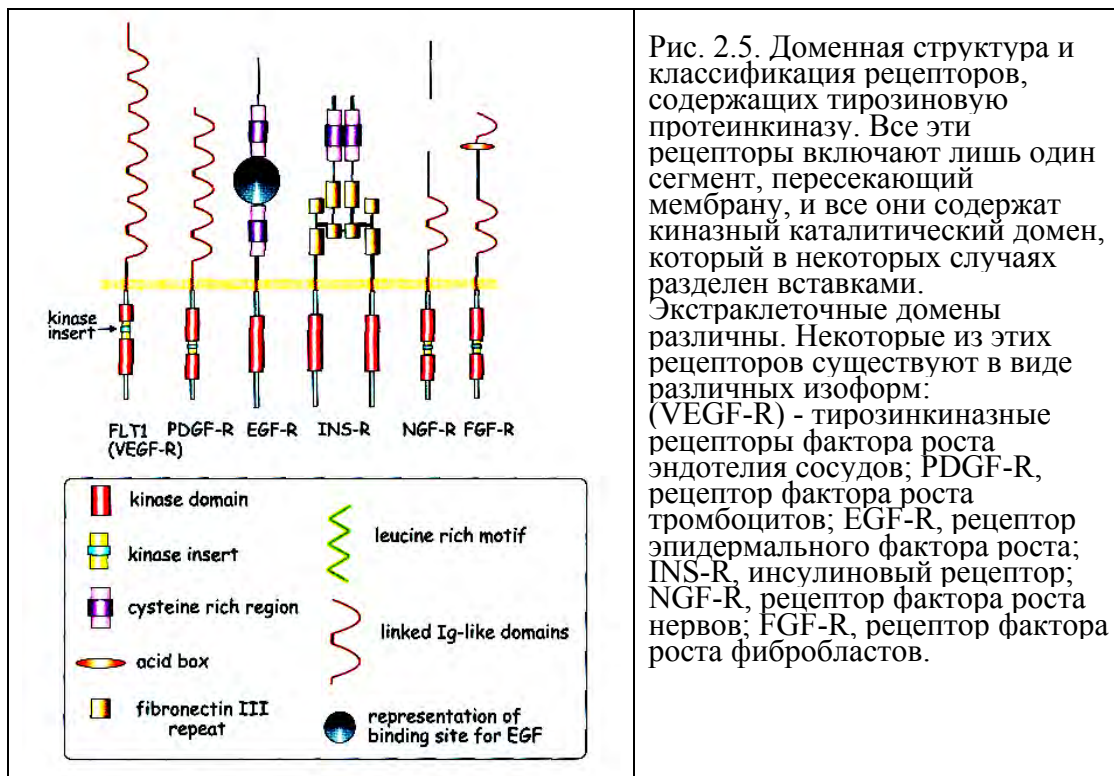


Рис. 2.5. Доменная структура и классификация рецепторов, содержащих тирозиновую протеинкиназу. Все эти рецепторы включают лишь один сегмент, пересекающий мембрану, и все они содержат киназный каталитический домен, который в некоторых случаях разделен вставками. Экстраклеточные домены различны. Некоторые из этих рецепторов существуют в виде различных изоформ: (VEGF-R) - тирозинкиназные рецепторы фактора роста эндотелия сосудов; PDGF-R, рецептор фактора роста тромбоцитов; EGF-R, рецептор эпидермального фактора роста; INS-R, инсулиновый рецептор; NGF-R, рецептор фактора роста нервов; FGF-R, рецептор фактора роста фибробластов.

Группа рецепторов с участками, богатыми цистеином:

1. Семейство рецепторов эпидермального фактора роста (EGF) содержит во внеклеточной области 2-3 участка, богатых цистеином.
2. Семейство рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста содержит во внеклеточной области гетеротетрамеры – это субъединицы 2α и 2β , связанные дисульфидными связями. В экстраклеточной области этих рецепторов присутствует только один участок, богатый цистеином.
3. Семейство рецепторов фактора роста гепатоцитов представляет собой гетеродимер, состоящий из α и β субъединиц, присутствует также один участок, богатый цистеином.

Семейство с иммуноглобулинподобными доменами во внеклеточной области и дополнительным регуляторным участком в тирозинкиназном домене:

1. Рецепторы фактора роста тромбоцитов содержат 5 таких доменов.
2. Рецепторы фактора роста фибробластов содержат 3 домена.
3. Рецепторы фактора роста нервов содержат два домена и участки, богатые лейцином.

Рецепторы без собственного каталитического тирозинкиназного домена (бимолекулярные тирозинкиназные рецепторы)

Эти рецепторы при активации связываются с цитоплазматическими тирозинкиназами и образуют сигнальный комплекс:

1. Рецепторы цитокинов.
2. Рецепторы антигенов на Т- и В-лимфоцитах.
3. F_c – рецепторы.

В качестве субъединиц сигнального комплекса выступают цитоплазматические тирозинкиназы семейства src и jak.

Механизм функционирования

Связывание лиганда → димеризация → активация тирозинкиназы → аутофосфорилирование С-концевых остатков тирозина → образование участков для связывания белков-субстратов, содержащих SH2- SH3- домены (src homology domain).

SH2- SH3- домены опосредуют белок-белковые взаимодействия в сигнальных путях, активируемых тирозинкиназами.

SH2- компактный глобулярный домен (100 аминокислотных остатков), взаимодействует с белками, содержащими фосфорилированный остаток тирозина в определенной аминокислотной последовательности.

SH3- компактный глобулярный домен (60 аминокислотных остатков), взаимодействует с белками, содержащими пролин и гидрофобные остатки.

Основные группы белков, содержащих SH2- SH3- домены:

I-я группа (белки, имеющие ферментативную активность или известные функции):

1. Цитоплазматические тирозинкиназы семейства Src, Abl, Csk (SH2-домен и SH3- домен).
2. Фосфолипаза C γ (два SH2-домена и SH3- домен).
3. GAP-120 белок, активирующий ГТФазу gas белка (SH2-домен и SH3- домен).
4. Тирозинфосфатазы PTP1C (два SH2-домена) и PTP1D (SH-PTP2/SYP) (два SH2-домена).
5. Регуляторная субъединица p-85 фосфатидилинозитол-3-киназы (два SH2-домена и SH3- домен).

II-я группа (адаптерные белки, состоящие исключительно из SH2- SH3- доменов:

Белок Shc (SH2-домен), белок Nck (SH2-домен, три SH3-домена), белок Crk (SH2-домен, два SH3-домена), Grb2 (growth-factor-receptor-binding protein), связывающийся с рецепторами ростовых факторов (SH2-домен, два SH3-домена).

Трансмембранная передача сигнала

Связывание фактора роста с экстраклеточным доменом его рецептора - только начало сигнального процесса. Связывание лиганда меняет конформацию рецептора. Как уже отмечалось, рецепторы факторов роста имеют экстраклеточный лиганд-связывающий N-концевой домен (эктодомен), соединенный одиночным трансмембранным доменом со специализированным С-концевым доменом-ферментом в цитоплазме. Последний становится активным всякий раз, когда экстраклеточный домен рецептора связывает лиганд - GF. В случае многих GF рецепторов, этот цитоплазматический домен-фермент проявляет протеинкиназную активность.

По определению киназы - это ферменты, которые присоединяют фосфатные группы к их субстратам. Протеинкиназа переносит гаммафосфат от АТФ на белок - субстрат, производя, таким образом, акт фосфорилирования этого белка. В случае GF рецепторов, фосфорилируются тирозиновые остатки белка-субстрата, который взаимодействует с, или лежит вблизи, цитоплазматического домена GF рецептора. Соответственно, эти рецепторы называют рецепторами, имеющими протеинтирозинкиназную активность (чтобы отличить их от многих других протеинкиназ, которые выполняют другие сигнальные функции и прикрепляют фосфаты к сериновым или треониновым остаткам белков).

Последовательность событий при этом следующая:

GF лиганд связывается с экстраклеточной областью его рецептора. Это приводит к активации тирозинкиназного домена в цитоплазматическом конце рецептора. Тирозинкиназа становится активной и фосфорилирует ряд цитоплазматических субстратных белков, которые в свою очередь становятся активными или изменяют функцию вследствие того, что они стали фосфорилированными. Они затем посылают сигналы далее в клетку таким образом, что это в конечном счете приводит к росту клетки и делению (рис 2.6, 2.7).

Заметим, что самому GF лиганду нет необходимости физически транспортироваться в клетку для того, чтобы произошла трансмембранная передача сигнала. Все дальнейшие события передачи сигнала к его конечной мишени в ядре также осуществляются, не смотря на то, лиганд остается во внеклеточном пространстве.

Существует несколько механизмов активации тирозиновых рецепторов. Исходно молекулы (пара которых и составляет рецептор) могут диффундировать латерально в плоскости клеточной мембраны. Связывание GF способствует димеризации таких молекул и формированию рецептора. Часто сам GF имеет два рецептор-связывающих центра, выполняя функцию мостика между двумя субъединицами, такой мостик стабилизирует образовавшуюся пару. Димеризация экстраклеточных доменов в свою очередь стягивает цитоплазматические домены обеих субъединиц, приводя их в тесный контакт. Это позволяет тирозинкиназе одной рецепторной молекулы фосфорилировать киназный домен другой, что вызывает изменение его трехмерной структуры – активацию. Таким образом, связывание лиганда приводит к тому, что обе половинки рецептора фосфорилируют и активируют друг друга. Как только они активируются, они переходят к фосфорилированию множества близлежащих цитоплазматических субстратных белков, которые затем передают сигнал далее в клетку.

После связывания лиганда многие рецепторы путем эндоцитоза убираются внутрь клетки (интернализуются в эндосомы) Вначале на поверхности мембраны происходит образование окаймленных ямок, которые продолжают впячиваться внутрь клетки и превращаются в окаймленные пузырьки. Потеряв окаймляющий чехол, эти пузырьки сливаются с другими, образуя промежуточные пузырьки с гладкой поверхностью, называемыми эндосомами, которые в свою очередь сливаются с лизосомами.

Биологическое значение процесса интернализации EGF-рецепторных комплексов в литературе трактуется неоднозначно. Некоторые авторы рассматривают его как простой механизм десенситизации клетки по отношению к действующему фактору. Однако результаты всесторонних исследований функционального состояния интернализованного рецептора противоречат этой концепции. К настоящему времени получены морфологические и биохимические доказательства того, что интернализированный рецептор EGF сохраняет свою связь с лигандом вплоть до попадания в лизосомы.

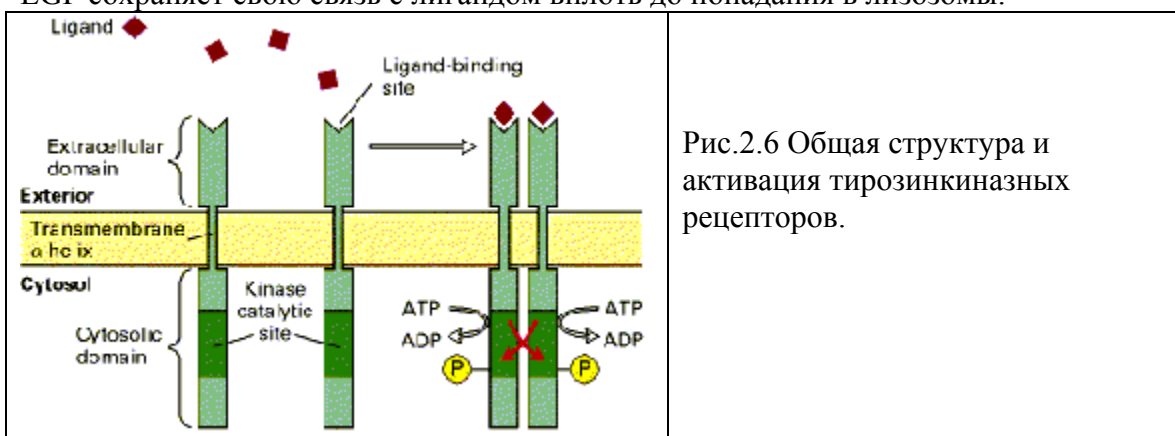


Рис.2.6 Общая структура и активация тирозинкиназных рецепторов.

Связывание лиганда (здесь EGF) (в общем случае мономер) вызывает конформацию рецептора, что приводит к его димеризации. Лиганды других рецепторов могут быть димерами. Они связываются с двумя субъединицами рецептора, притягивая их друг к другу. В обоих случаях субъединица с киназной активностью фосфорилирует по тирозину соседнюю субъединицу вблизи каталитического участка. Таким образом, тирозиновые остатки цитозольного домена обоих рецепторов автофосфорилируются.

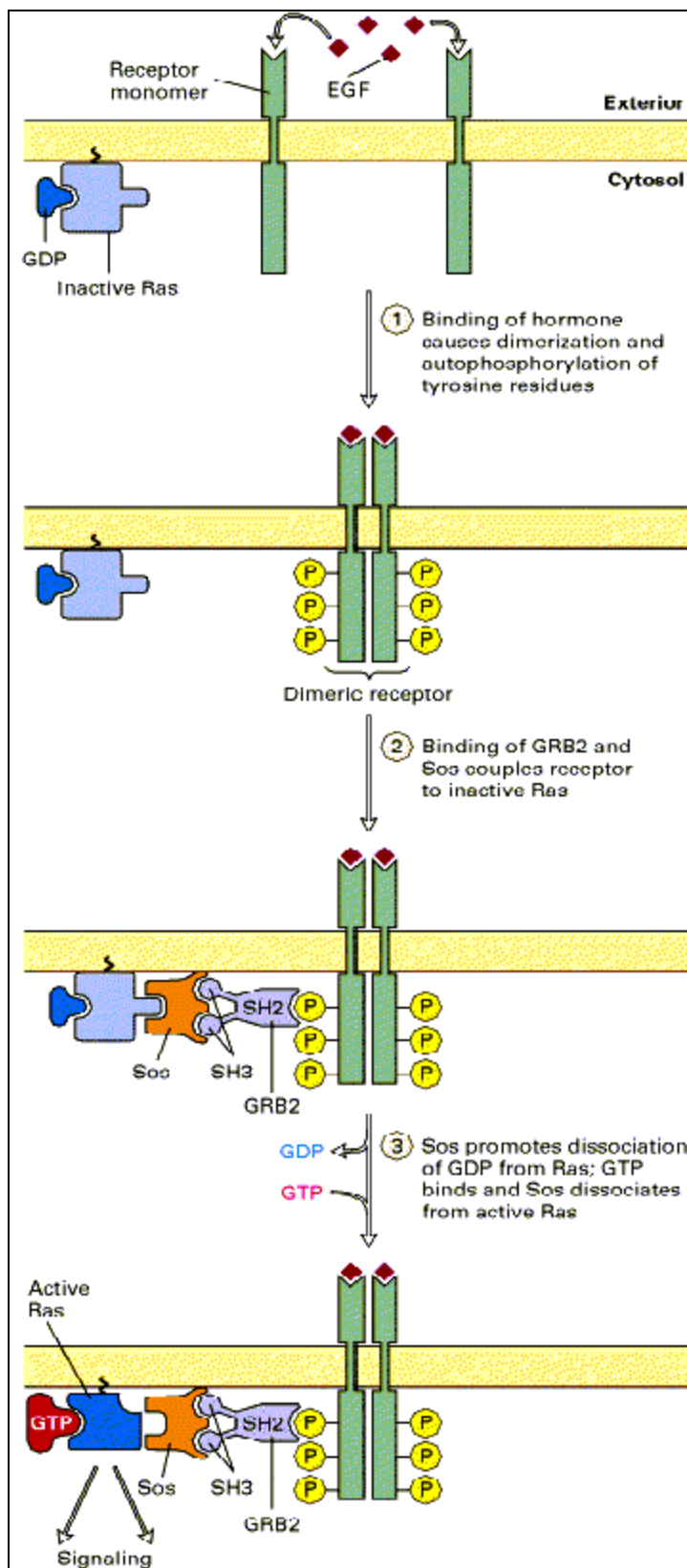


Рис.2.7 Активация Ras при связывании EGF с тирозинкинасным рецептором (ТКР).

Адаптерный белок GRB2 связывается со специфическим фосфотирозином на активном ТКР и с Sos, который в свою очередь взаимодействует с неактивным Ras*GDP. Гуанин нуклеотид-обменивающий фактор Sos вызывает диссоциацию GDP от Ras и образование активной формы Ras*GTP, которая диссоциирует от рецепторного комплекса. Заметим, что Ras прикреплен к мембране гидрофобным якорем.

Рецепторы, сопряженные с G белком (серпентиновые рецепторы).

Большинство рецепторов относятся к семейству семикратно пересекающих мембрану серпентиновых (змееподобных) рецепторов. Эти рецепторы выполняют разнообразные биологические сигнальные функции. К ним относятся рецепторы вкусовых клеток. Сотни

различных разновидностей рецепторов, находящихся на клетках обонятельных луковиц нашего носа передают информацию относительно присутствия лигандов-ароматов. Серпентиновые рецепторы имеют очень древнее происхождение. Их используют, например, клетки дрожжей, которые выделяют необходимые для спаривания полипептидные факторы и распознают их с помощью поверхностных рецепторов, представляющих собой все те же семикратно пересекающие мембрану серпентиновые рецепторы (рис.2.8.). Уникальная структура лиганд-связывающих участков серпентиновых рецепторов позволяет связывать лиганды различной природы и молекулярной массы (рис 2.9.) .

Адреналин

Лиганд эпинефрин, также известный как адреналин, освобождается надпочечниками при стрессе. Высвобожденный адреналин распространяется повсюду с током крови и адсорбируется на определенных рецепторах на поверхности клеток в различных тканях тела, вызывая реакцию, которую сравнивают с ощущением “борьбы и полета”. Эта реакция увеличивает частоту сердечных сокращений, уменьшает отток крови к внутренним органам, увеличивает приток крови к скелетным мышцам, увеличивает уровень глюкозы в крови, заставляет печень и клетки мышц расщеплять гликоген и вырабатывать глюкозу. Как адреналин вызывает все эти ответы? Действуя как лиганд, он связывается с рецепторами, экспонированными на поверхности разнообразных типов клеток повсюду в организме. Эти рецепторы называются β -адренергическими и являются серпентиновыми. Как и в случае с рецепторами фактора роста, адреналин не проникает в клетку. Активность серпентиновых рецепторов не зависит от димеризации рецепторов.

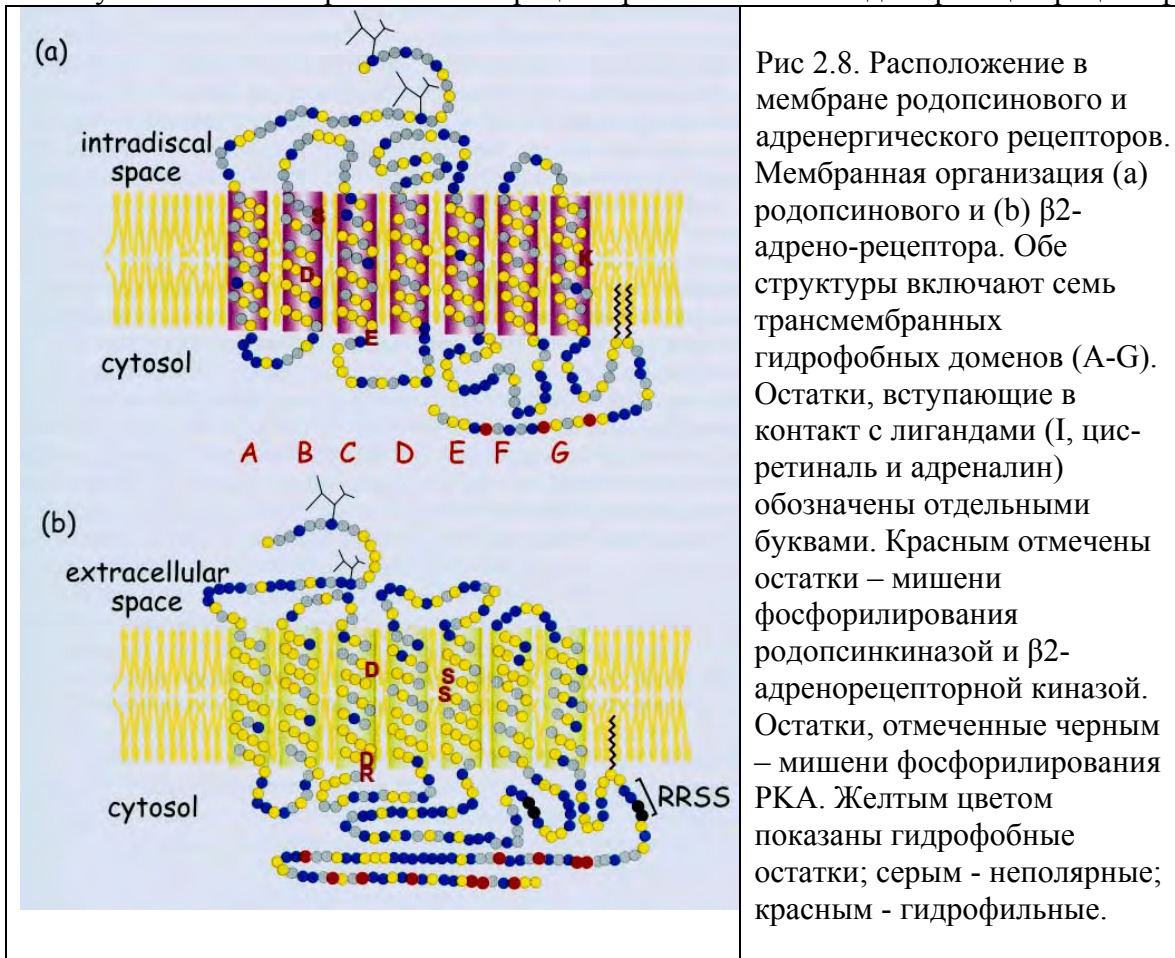


Рис 2.8. Расположение в мембране родопсинового и адренергического рецепторов. Мембранная организация (a) родопсинового и (b) β 2-адрено-рецептора. Обе структуры включают семь трансмембранных гидрофобных доменов (A-G). Остатки, вступающие в контакт с лигандами (I, цис-ретиналь и адреналин) обозначены отдельными буквами. Красным отмечены остатки – мишени фосфорилирования родопсинкиназой и β 2-адренорецепторной киназой. Остатки, отмеченные черным – мишени фосфорилирования РКА. Желтым цветом показаны гидрофобные остатки; серым - неполярные; красным - гидрофильные.

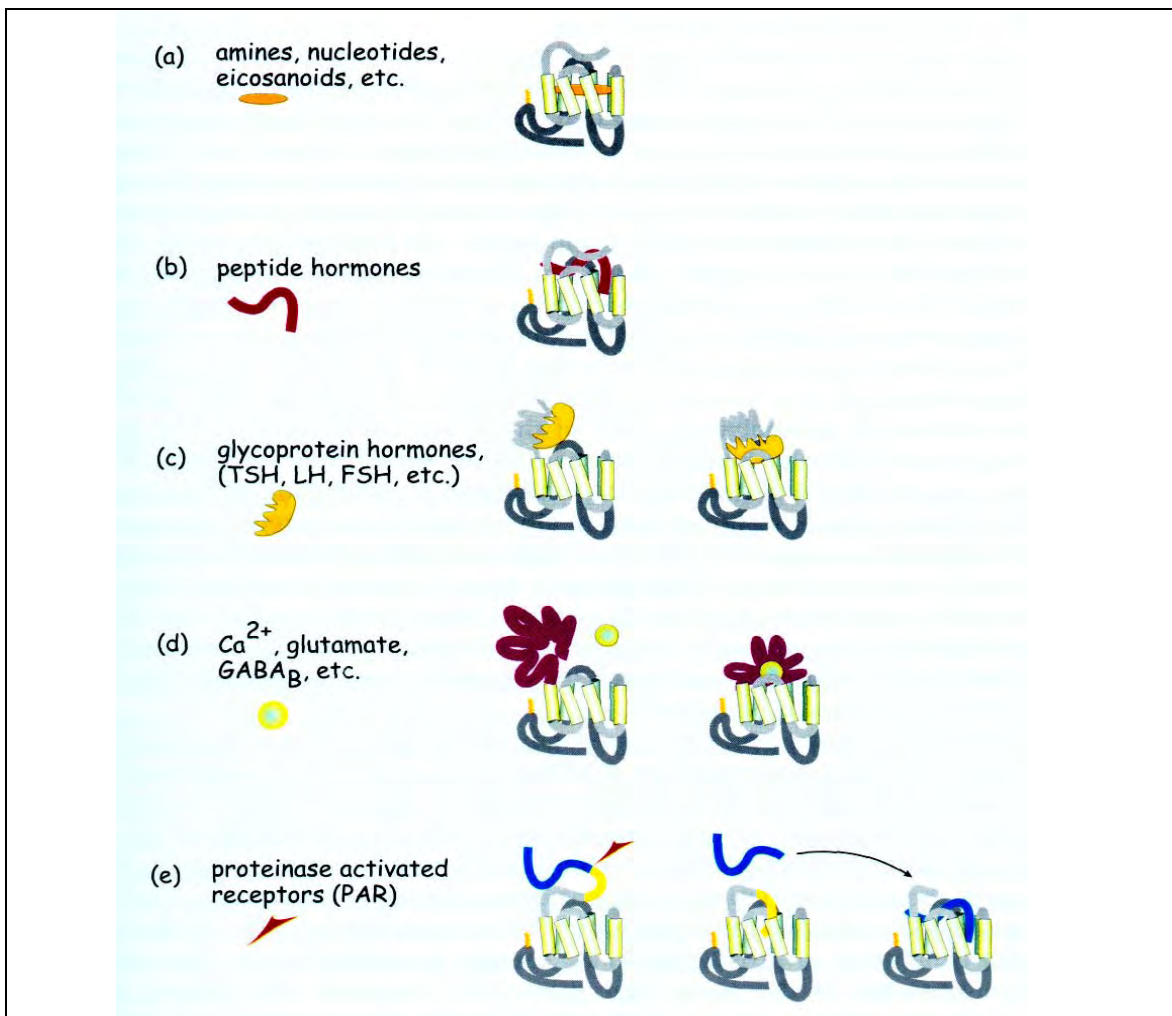


Рис. 2.9 Различные лиганды и лиганд-связывающие участки серпентиновых рецепторов. Рецепторы 7ТМ типа регулируют различные эффекторные молекулы и отвечают на лиганды, имеющие различные молекулярные массы в широком диапазоне от 32 для Ca^{2+} до более чем 10^2 кД для гликопротеинов. Большинство обычных низко - молекулярных гормонов (типа адреналина и ацетилхолина) связывается с участками внутри гидрофобного ядра (а). Пептидные и белковые лиганды присоединяются к внешней поверхности рецептора. (b, c). Некоторые лиганды низкого молекулярного веса, Ca^{2+} и аминокислоты (глутамат, ГАМК) связываются с длинными участками на N-конце, индуцируя их переход в новую конформацию, в которой длинный участок взаимодействует с рецептором (d). В случае рецепторов, активируемых отрезающей протеазой (e), новый N конец действует как автолиганд. Отрезанный пептид может также взаимодействовать с другим рецептором.

Мускариновые рецепторы

Семейство мускариновых рецепторов впервые было обнаружено благодаря их способности связывать алкалоид мускарин, выделенный из ядовитых грибов (*Amanita muscaria*). Мускариновые рецепторы были изначально разделены фармакологически на M1 и M2 типы, на основании различия в их чувствительности к пирензепину, оказавшемуся селективным антагонистом M1 рецептора. Показано, что стимуляция M1 рецептора активирует фосфолипазу C, приводя к высвобождению вторичного мессенджера инозитол 3-фосфата и последующей мобилизации внутриклеточного кальция. Показано также, что ингибирование M2 рецептора подавляет активность аденилатциклазы, приводя

к уменьшению внутриклеточного уровня сАМР. Мускариновые рецепторы можно разбить на подтипы в соответствии с их способностью мобилизовать внутриклеточный кальций (m1,m3,m5) или ингибировать аденилатциклазу (m2,m4). Подтипы m1, m3 и m5 рецептора активируют фосфолипазы A₂, C и D, тирозинкиназу и вход кальция. Подтипы M2, M4 также увеличивают активность фосфолипазы A₂.

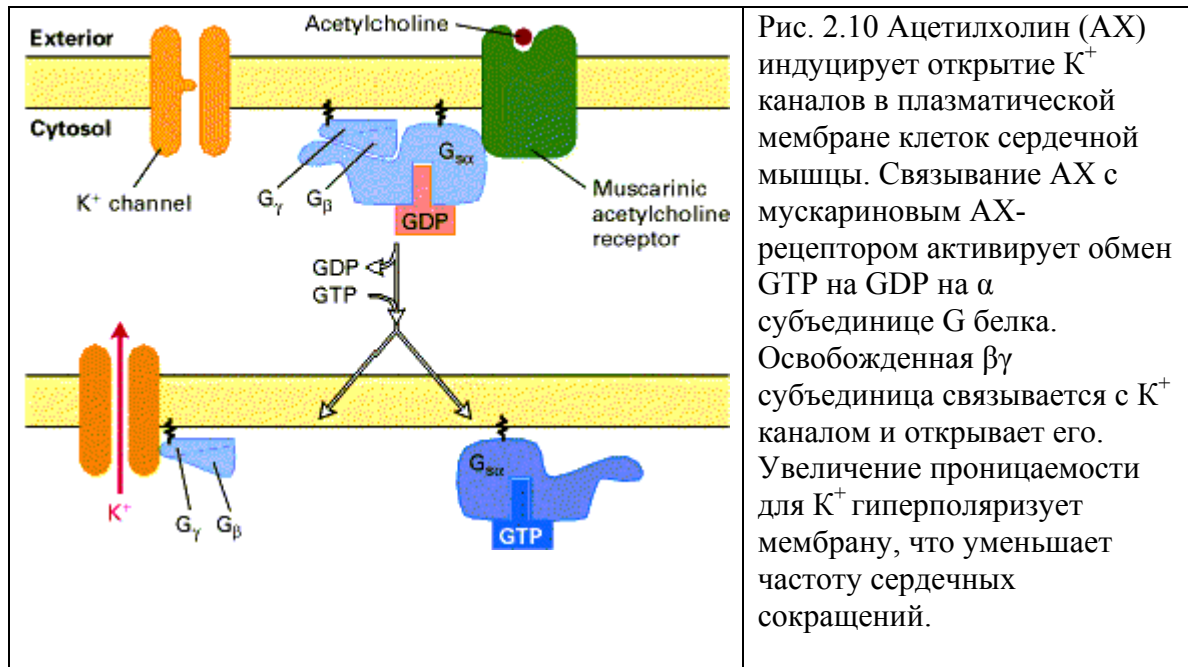


Рис. 2.10 Ацетилхолин (АХ) индуцирует открытие K⁺ каналов в плазматической мембране клеток сердечной мышцы. Связывание АХ с мускариновым АХ-рецептором активирует обмен GTP на GDP на α субъединице G белка. Освобожденная βγ субъединица связывается с K⁺ каналом и открывает его. Увеличение проницаемости для K⁺ гиперполяризует мембрану, что уменьшает частоту сердечных сокращений.

В передаче сигнала с β-адренергического рецептора участвуют белки, названные (по причинам, которые станут ясными ниже) G белками. Следует отметить, что NH₂ концевой участок рецепторов, связывающих G-белки, находится на экстраклеточной стороне мембраны и содержит потенциальные места гликозилирования. Существенная роль гликозилирования в связывании лиганда была показана посредством мутационного анализа мускариновых рецепторов. С-концевой участок локализован на цитоплазматической стороне плазматической мембраны и содержит высококонсервативные цистеиновые остатки, характерные для всего семейства G-белок связывающих рецепторов.

В неактивном состоянии G белки обычно находятся вблизи рецептора. Фактически они представляют собой комплекс, сформированный из 3-х различных субъединиц, названных α, β и γ. До активации все три субъединицы связаны вместе. Когда рецептор активируется присоединением лиганда, на α субъединице происходит обмен GDP на GTP (откуда и термин G белок). Два состояния G белка (on или off) определяются гуаниновым нуклеотидом, который он в данный момент связывает. Неактивный G белок связывает GDP, активный связывает GTP. Будучи в активном состоянии, G белок передает сигналы далее в клетку. Однако G белок остается в активном состоянии только в течение короткого периода времени (секунды или меньше), после чего он дефосфорилируется его собственной GTP-азой. Этот гидролиз представляет механизм отрицательной обратной связи, который обеспечивает кратковременность нахождения G белка в активном состоянии. В последние годы выяснены механизмы участия βγ субъединицы G белка в регуляции активности K⁺ и Ca²⁺ каналов. На рис 2.10. показана схема регуляции βγ субъединицей K⁺ канала плазматической мембраны сердечной клетки. βγ субъединица участвует также в механизме десенситизации рецепторов (рис.2.11.)

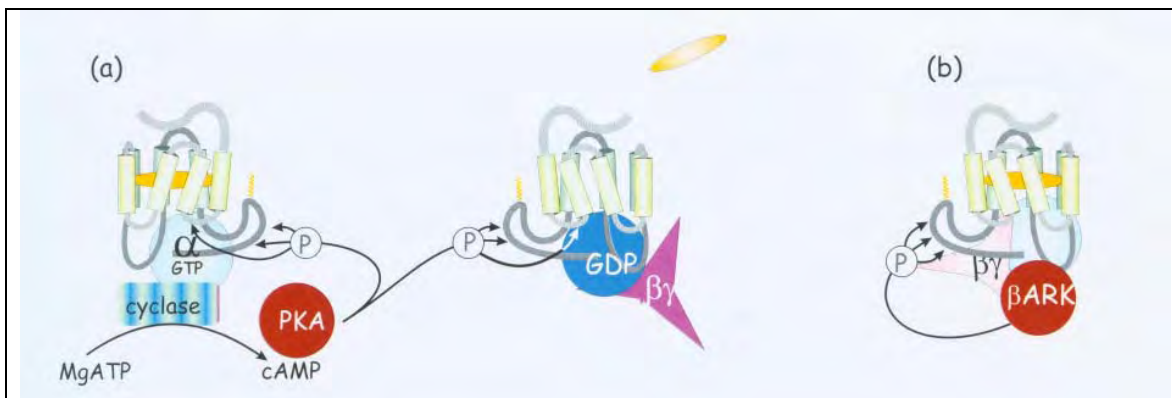


Рис. 2.11 Десенситизация рецепторов фосфорилированием:

(а). При умеренной стимуляции генерация сАМР приводит к фосфорилированию всех белков (включая молекулы рецептора), имеющих последовательность, являющуюся субстратом сАМР зависимой протеинкиназы (-RRSS-).

Фосфорилирование рецепторов происходит независимо от их занятости агонистом, так что следствием является общее понижение активности всех рецепторов, которые регулируют производство сАМР.

(б). При сильной стимуляции $\beta\gamma$ -субъединицы, связанные с рецептором, действуют как якорь для растворимой рецепторной киназы (β ARK в случае β -адренергических рецепторов), которая фосфорилирует только эти рецепторы.

Усиление в каскадах передачи сигналов

В течение короткого периода своей активности аденилатциклаза производит несколько сотен молекул сАМР. После того, как произведенные молекулы сАМР активируют протеинкиназу А, она фосфорилирует и активирует фермент гликогенфосфорилазу, которая расщепляет гликоген до глюкозо-1-фосфата. Протеинкиназа А фосфорилирует также гликогенсинтазу, что приводит к ингибированию ее активности и, таким образом, предотвращает преобразование освобожденной глюкозы в гликоген (рис.2.12). Эти два эффекта вместе обеспечивают мобилизацию глюкозы через расщепление гликогена, запасенного в печени.

В этом каскаде происходит огромное усиление сигнала. Одна молекула адреналина может вызвать активацию сотен α субъединиц G белков. Каждая из них в свою очередь будет активировать аденилатциклазу, которая в свою очередь синтезирует сотни молекул сАМР. сАМР активирует протеинкиназу А, которая модифицирует сотни молекул-мишеней в клетке.

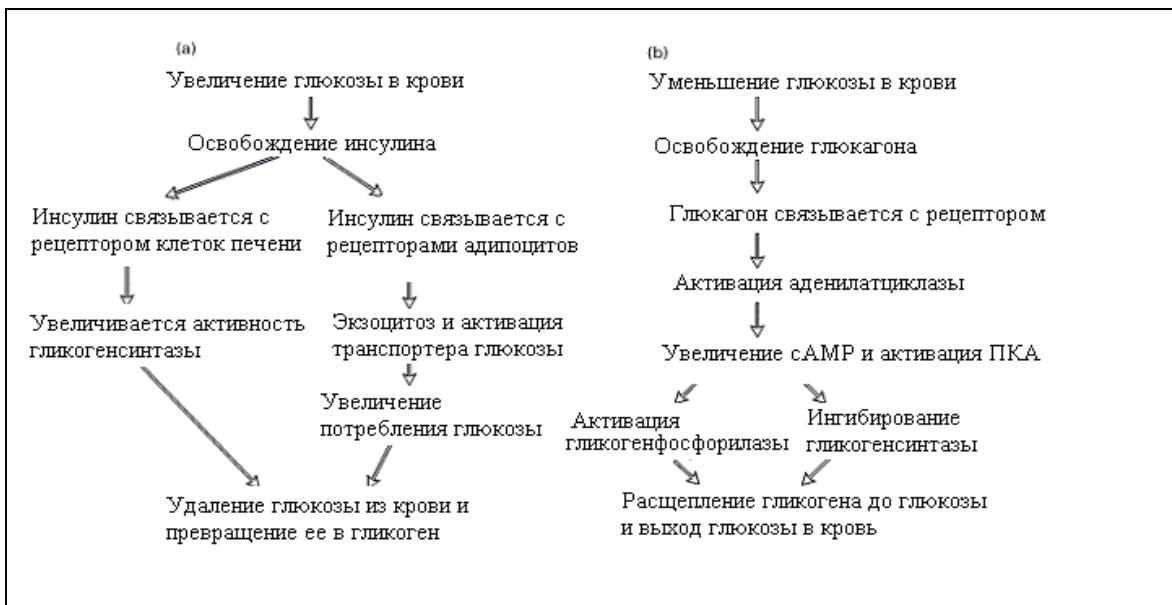


Рис. 2.12 Регуляция уровня глюкозы в крови противоположным действием инсулина и глюкагона. (а) Инсулин вызывает увеличение потребления глюкозы в мышечных клетках и адипоцитах и стимулирует превращение глюкозы в гликоген, в печени. (б) Глюкагон стимулирует расщепление гликогена в печени. Этот эффект определяется сАМР.

Ядерные рецепторы

Ядерные рецепторы представляют собой ДНК-связывающие транскрипционные факторы с консервативной доменной организацией, активность которых контролируется липофильными лигандами, фосфорилированием и взаимодействиями с другими белками. Большинство ядерных рецепторов локализовано (независимо от наличия лиганда) почти исключительно в клеточном ядре, тогда как основная часть рецепторов стероидов в отсутствие лиганда может находиться в цитоплазме. Независимо от типа рецептора соответствующий лиганд вызывает внутриядерное перераспределение рецепторов между нуклеоплазмой и хроматином. Рецепторы стероидов способны связываться в цитоплазме с белками теплового шока (Hsp), которые препятствуют транспорту рецептора через ядерную мембрану.

Регуляция активности ядерных рецепторов фосфорилированием. Ядерные рецепторы могут быть субстратами для многих протеинкиназ, что обеспечивает контроль активности рецепторов со стороны других регуляторных факторов, включая ауто-, пара- и эндокринные факторы и факторы регуляции клеточного цикла. Фосфорилируемые остатки преимущественно локализуются в А/В-домене рецепторов. Рецепторы стероидных гормонов, такие как GR, являются гетерогенными по характеру фосфорилирования. Фосфорилируемые аминокислотные остатки рецепторов узнаются разными протеинкиназами: циклинзависимыми киназами (CDK), митоген активируемыми протеинкиназами (МАРК), казеинкиназой II (СКII), кальмодулинзависимой протеинкиназой II (CaMKII), киназой 3 гликогенсинтазы (GSK3), ДНК-зависимой протеинкиназой (DNA-PK) и др. Фосфорилирование по разным сайтам ведет к разным (даже противоположным) изменениям функциональной активности рецепторов.

Особенности некоторых ядерных рецепторов

Среди ядерных рецепторов наиболее изученными являются рецепторы активаторов пролиферации пероксисом (PPARs). Эти белки играют ключевую роль в регуляции энергообмена и липидного обмена. Также известно, что ряд противодиабетических,

гиполипидемических и противовоспалительных лекарственных препаратов оказывают свое действие через PPARs. PPAR α интенсивно экспрессируется в сердце, печени, почках, кишечнике, буром жире, т.е. в тканях с высокой скоростью β -окисления жирных кислот. Экспрессия PPAR α контролируется стрессорными воздействиями, глюкокортикоидами, инсулином. PPAR β экспрессируется более широко, включая мозг, почки, кишечник, клетки Сертоли. Изоформы PPAR γ экспрессируются тканеспецифично: PPAR γ 1 много в селезенке, кишечнике, белом жире, а PPAR γ 2 – предпочтительно в белом и буром жирах. PPAR α активируется жирными кислотами, эйкозаноидами, карбапростациклином, нестероидными противовоспалительными препаратами, лейкотриеном B₄ (LTB₄). PPAR β и PPAR γ активируются общими для всех PPAR лигандами (докозагексеновой кислотой, некоторыми простагландинами). PPAR γ специфически активируется тиазолидиндионами – группой противодиабетических лекарств, метаболитом простагландинов – простагландином J₂ (PGJ₂), полиненасыщенными жирными кислотами и нестероидными противовоспалительными препаратами (например, ибупрофен). Кроме низкомолекулярных лигандов регуляторами активности PPARs могут служить протеинкиназы MAPK.

Члены группы **ROR** функционируют как мономеры. ROR β экспрессируются главным образом в нейрональной ткани, связанной с сенсорной, нейроэндокринной и лимбической системами. ROR γ экспрессируется преимущественно в скелетных мышцах, печени, почках, адипоцитах. Экспрессия ROR α распространена значительно шире: в структурах мозга, гипофизе, адипоцитах, печени, хряще, коже, семенниках. Полагают, что природным высокоаффинным лигандом ROR является гормон эпифиза мелатонин. Высокоэффективными лигандами ROR являются противовоспалительные препараты группы тиазолидиндионов.

LXR α экспрессируются преимущественно в печени, а также в кишечнике, почках, селезенке. **LXR β** экспрессируется повсеместно. Селективными активаторами служат оксистеролы. Оксистеролы являются промежуточными продуктами в синтезе стероидов и желчных кислот. В адипоцитах и перитонеальных макрофагах экспрессируются **LXR α** и **LXR β** , участвующие в регуляции обмена липидов.

FXR активируется высокими концентрациями фарнезола - промежуточного продукта синтеза холестерина. Сильными индукторами **FXR** являются желчные кислоты .

PXR экспрессируются преимущественно в печени и кишечнике. Активаторами являются антибиотик рифампицин, агонисты и антагонисты глюкокортикоидов и других стероидных гормонов. Через **PXR** эти лиганды стимулируют экспрессию генов семейства цитохромов P450 3A, участвующих в гидроксилировании стероидных лекарств и других ксенобиотиков. Природные высокоаффинные лиганды **PXR** пока не выявлены.

Известные лиганды для **CAR** рецепторов (андростанол, андростерол) не повышают, а снижают транскрипционную активность рецептора, вызывают диссоциацию комплексов рецептора с коактиватором.

HNF4 α интенсивно экспрессируется в печени и ряде других органов, в отличие от **HNF4 γ** , который в печени не экспрессируется. Лигандами для **HNF4 α** служат ацил-СоА-тиоэферы длинноцепочечных жирных кислот.

Такие соединения как 9-*цис*-ретиноевая кислота, нециклические терпеноиды (например, промышленный загрязняющий агент – метопрен или продукт распада хлорофилла - фитановая кислота) специфически связывают и активируют рецепторы **RXR** (α , β , γ). **RXR** может действовать в виде гомодимеров **RXR /RXR** или гетеродимеров с другими ядерными рецепторами. Известно, что разрушение гена **RXR α** приводит к дефектам морфогенеза плаценты, сердца, глаза и гибели эмбрионов. Разрушение гена **RXR β** сопровождается нарушениями сперматогенеза и преждевременным морфогенезом альвеол

легких. Повреждение гена RXR γ приводит к нарушению функций гиппокампа, связанных с ориентацией в пространстве и памятью.

Рецепторы группы TR2 функционируют преимущественно как репрессоры транскрипции, взаимодействуя с ДНК как гомо- или TR2 /TR4-гетеродимеры. Эти рецепторы получили свое название благодаря высокому уровню их экспрессии в семенниках.

Рецепторы TLX экспрессируются преимущественно в эмбриональном переднем мозге.

COUP-TF выступают в роли транскрипционных репрессоров, тормозящих активирующее действие многих ядерных рецепторов.

Рецепторы группы ERR широко представлены в организме, взаимодействуют с ДНК в виде мономеров и гомодимеров.

Рецепторы стероидных гормонов GR, MR, PR и AR взаимодействуют с белком теплового шока Hsp90, экранирующим ДНК-связывающий домен (DBD) рецепторов. Гормон-лиганд вызывает отделение Hsp90.

Рецепторы подсемейства NGFI-B экспрессируются в гипофизе, надпочечниках, печени, но в большей степени в клетках нервной системы и составляют часть немедленного ответа на такие стимулы, как ростовые факторы и деполяризация. Ядерная локализация, связывание с ДНК и транскрипционная активность NGFI-B могут регулироваться фосфорилированием.

SF1 экспрессируется преимущественно в стероидогенных тканях, а также в гипоталамусе и гипофизе. Транскрипционная активность этого рецептора регулируется фосфорилированием, например, под действием гормональных стимулов, усиливающих образование cAMP.

GCNF экспрессируется преимущественно в половых клетках и играет важную роль в эмбриогенезе.

Рецепторы DAX-1 и SHP отличаются от других рецепторов отсутствием типичного домена DBD. DAX-1 узнает шпильковые структуры ДНК, а SHP не взаимодействует с ДНК. DAX-1 экспрессируется в гипоталамусе, гипофизе, надпочечниках и гонадах.

Глава 3. G-белки

G-белки – это семейство гуанин-нуклеотидсвязывающих белков, передающих сигнал с мембранных рецепторов на определенные эффекторные молекулы в клетке. 80% первичных мессенджеров (гормоны, нейротрансмиттеры, нейромодуляторы) взаимодействуют со специфическими рецепторами, которые связаны с эффекторами через G-белки.

Структура и свойства

1. G-белки - гетеротримеры, в которых α -субъединица прочно связана с димером $\beta\gamma$ (рис 3.1).
2. Все известные α -субъединицы (мол. масса 40-50кД) гомологичны, и у большинства из них одинаковые (или очень сходные) β -субъединицы (мол. масса 35кД) и γ -субъединицы (мол. масса 8кД).
3. α -субъединица определяет специфичность связывания G-белка с рецептором и эффектором, уникальна для каждого G-белка.
4. α -субъединица связывает и гидролизует GTP (GTP-аза).
5. α -субъединица содержит высоко консервативный домен связывания и гидролиза GTP (18 аминокислот из 350-395).
6. Выявлены участки связывания гуаниновых нуклеотидов и участки взаимодействия с рецепторами (С-конец) и $\beta\gamma$ -димерами (N-конец).
7. Выявлены участки ADP-рибозилирования (аргинин-202) при действии холерного токсина и коклюшного токсина.

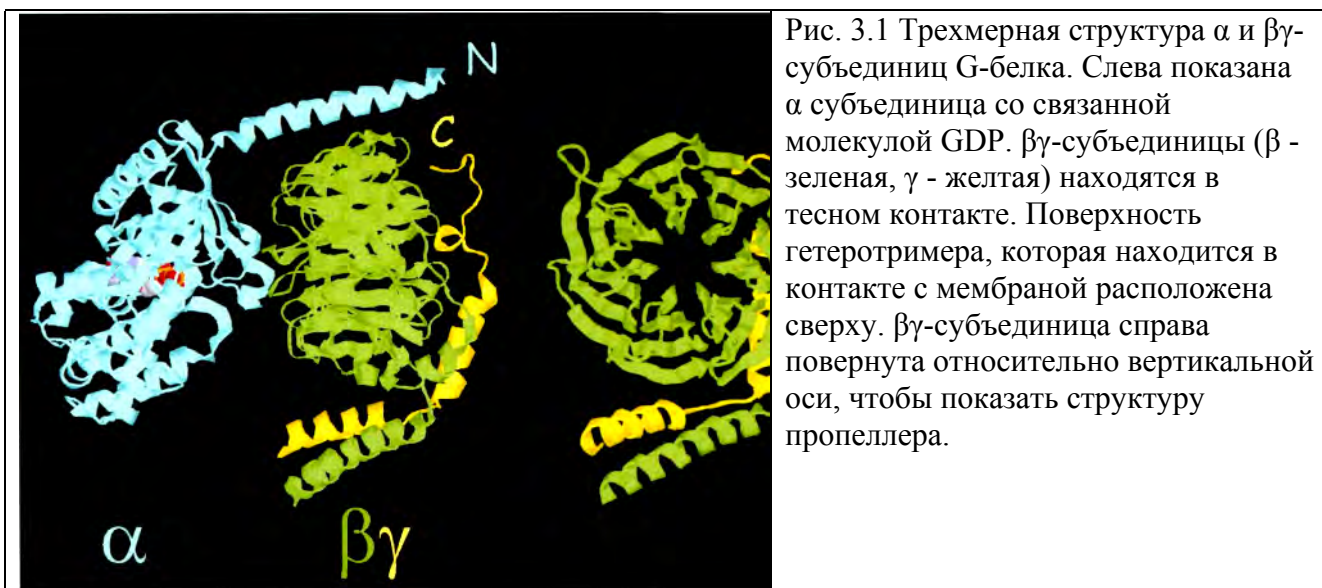


Рис. 3.1 Трехмерная структура α и $\beta\gamma$ -субъединиц G-белка. Слева показана α субъединица со связанной молекулой GDP. $\beta\gamma$ -субъединицы (β - зеленая, γ - желтая) находятся в тесном контакте. Поверхность гетеротримера, которая находится в контакте с мембраной расположена сверху. $\beta\gamma$ -субъединица справа повернута относительно вертикальной оси, чтобы показать структуру пропеллера.

Примеры действия некоторых типов G-белков:

G_s - α_s - активация аденилатциклазы (AC) .

G_i - α_i - инактивация AC

G_p - ? - активация фосфоинозитид специфичной PLC.

G_o a_o - главный G-белок головного мозга; может регулировать ионные каналы

Трансдуцин - T_a - активация cGMP-фосфодиэстеразы в палочках сетчатки позвоночных .

Исторически первыми были открыты гетеротримерные G-белки, которые воспринимают сигнал с рецепторов семь раз пронизывающих плазматическую мембрану (трансмембранные протеины 7TMR). Позже были открыты мономерные G-белки, как продукты Ras-

протоонкогенов (см ниже). Ранее считали, что общий механизм активации состоит в диссоциации α - и β -субъединиц. Оказалось, что для большинства рецепторов этого может не происходить. G-белок находится в комплексе с эффектором и рецептором. Диссоциация G-белка от рецептора действительно происходит. Таким образом, комплекс рецептора с агонистом может активировать несколько комплексов G-белков с эффекторами. В этом состоит первый каскад усиления. Концентрация GTP в клетке около 100мкМ. Основные эффекторы G-белков - аденилатциклаза и фосфолипаза C. GTP-азная активность α -субъединицы регулируется: 1) усиливается при связи с эффектором фосфолипазой C; 2) регулируется семейством RGS белков (регулятор G-белок сигнализации), которых не менее 20 и которые взаимодействуют с α -субъединицей и усиливают гидролиз GTP. В основном это маленькие белки (меньше 220 аминокислотных остатков), но есть и большие (до 1400 аминокислотных остатков) со структурными доменами, такими как DH, PH, PTB, PDZ и т.д. Эти домены позволяют им взаимодействовать с другими белками системы передачи сигнала. Аналогичные белки-регуляторы есть и для Ras-белков – это семейство белков, активирующих GTP-азу (GAPs). Одна из функций G-белков состоит в модулирующем влиянии на сродство рецептора к агонисту. Это важно в тех случаях, когда существуют два агониста. Например, у окситоцинового рецептора GTP γ S (негидролизуемый аналог GTP) вызывает падение сродства к пептидному гормону и увеличивает сродство к стероидному гормону прогестерону.

G-белки довольно консервативны - для тысяч рецепторов существует только 16 генов α -субъединиц у животных, которые дают около 20 продуктов. α -субъединицы у крыс и людей отличаются на одну аминокислоту из 394. Существуют 5 подтипов β - и 12 подтипов генов γ -субъединиц, но не все комбинации белков существуют в природе. У каждого G-белка может быть несколько мишеней (эффекторных молекул). Наибольшее число мишеней, по-видимому, имеет G_o-белок.

$\beta\gamma$ -субъединицы

Фосфорилирование рецепторов является одним из механизмов регуляции их активности. $\beta\gamma$ -субъединицы G-белков могут осуществлять отрицательную обратную связь, активируя протеинкиназы, которые фосфорилируют 7TM рецепторы. Эти протеинкиназы называются G-белок сопряженными рецепторными киназами (GRK). К GRK протеинкиназам относятся родопсинкиназа и β -адренергическая киназа. Фосфорилирование приводит к удалению рецептора эндоцитозом. Например, мускариновые и адренорецепторы, фосфорилированные по серину и треонину на C- концевом домене, становятся мишенью для связывания аррестина, что подготавливает их для удаления эндоцитозом. Обычно на C-конце рецептора есть несколько участков для фосфорилирования различными протеинкиназами. Известно, что слабый стимул (низкая концентрация агониста) активирует протеинкиназу A, а сильный стимул активирует β -ARK протеинкиназу, которая, фосфорилируя рецептор, прерывает передачу сигнала на аденилатциклазу и прекращает производство сAMP. Фосфорилирование, осуществляемое протеинкиназой A происходит тогда, когда занято 10% рецепторов. При этом фосфорилирование уже других, не занятых, рецепторов приводит к освобождению $\beta\gamma$ -субъединиц и соответствующему фосфорилированию другой протеинкиназой β -ARK.

Функции $\beta\gamma$ -субъединиц

Они обеспечивают локализацию, эффективное связывание и деактивацию α -субъединиц, регулируют сродство рецепторов к их активирующим лигандам, понижают способность GDP к диссоциации от α -субъединицы (стабилизация инактивированного состояния), открывает мускариновый K⁺-канал в сердце, закрывают Ca²⁺ канал в пресинаптической мембране, активируют фосфолипазу A₂ и некоторые изоформы фосфолипазы C, регулируют сродство рецептора к агонисту.

Из истории открытия G-белков:

1. 1971г – впервые показана необходимость GTP для стимуляции аденилатциклазы глюкагоном.

- 1981г – выделен белок G_t -трансдуцин, связывающий родопсин с фосфодиэстеразой cGMP фоторецепторов.
- 1983г – выделен GTP-связывающий белок G_s , сопрягающий стимулирующие рецепторы с аденилатциклазой.
- 1985-1988гг – показано, что фосфолипаза C и фосфолипаза A_2 регулируются гормонами и нейротрансмиттерами через G_p -белки.
- В настоящее время G-белки разделены на несколько типов: четыре G_s , три G_i , G_o , $G_{z/x}$ (центральная нервная система и селезенка), G_t (трансдуцин), G_{olf} (обонятельные нейроэпителиальные клетки).

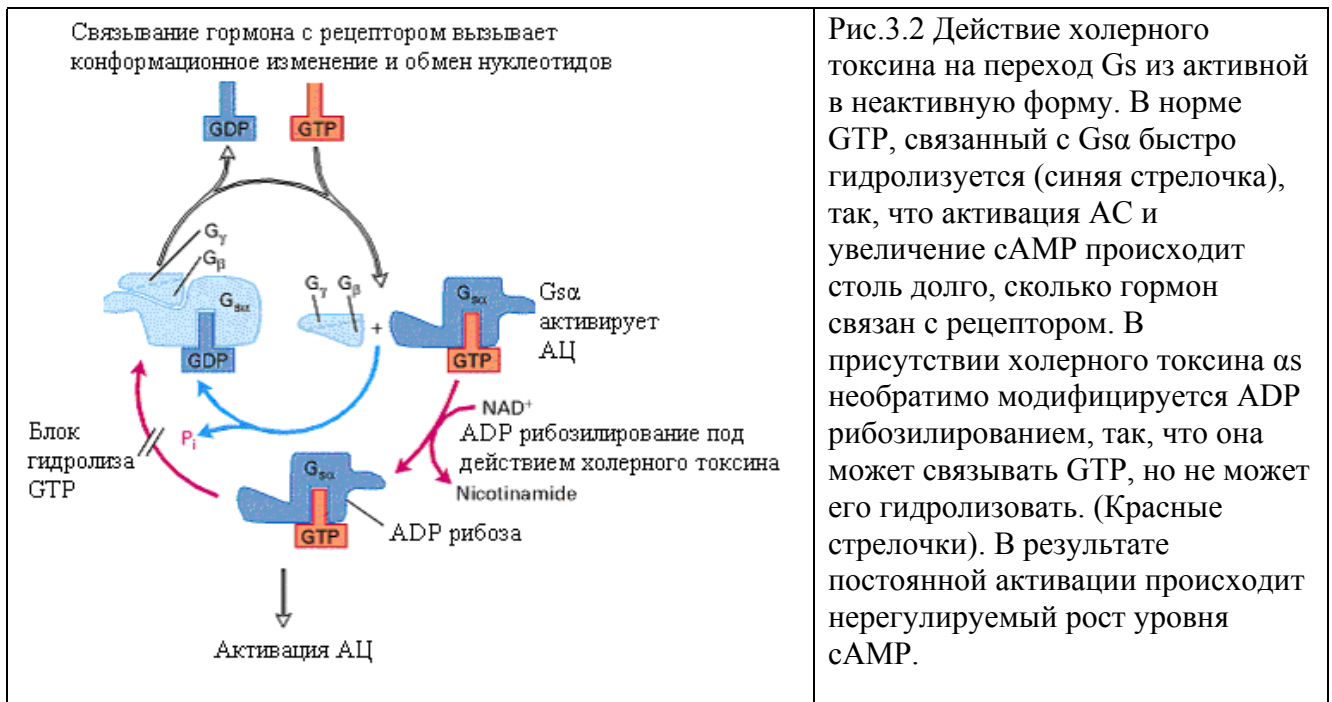
Связь G-белков с мембраной

G-белки локализованы на внутренней поверхности плазматической мембраны. Первичная структура всех субъединиц G-белков не содержит гидрофобных, пронизывающих мембрану доменов.

- Ассоциации G-белков с мембраной содействует ацилирование жирнокислотными радикалами. Выявлено два типа липидных модификаций субъединиц G-белков: миристоилирование и изопренилирование белковой цепи.
- Показано для α -субъединиц G_o - и G_i -белков посттрансляционное миристоилирование со стороны N-конца.
- Для $\beta\gamma$ -субъединиц также показаны посттрансляционные модификации (ацилирование).
- Выявлены три последовательные посттрансляционные модификации, ответственные за связывание gas-белков с мембраной.
- Очищенные α -субъединицы проявляют гидрофильные свойства (без $\beta\gamma$ -комплекса не могут связываться с искусственными фосфолипидными пузырьками).

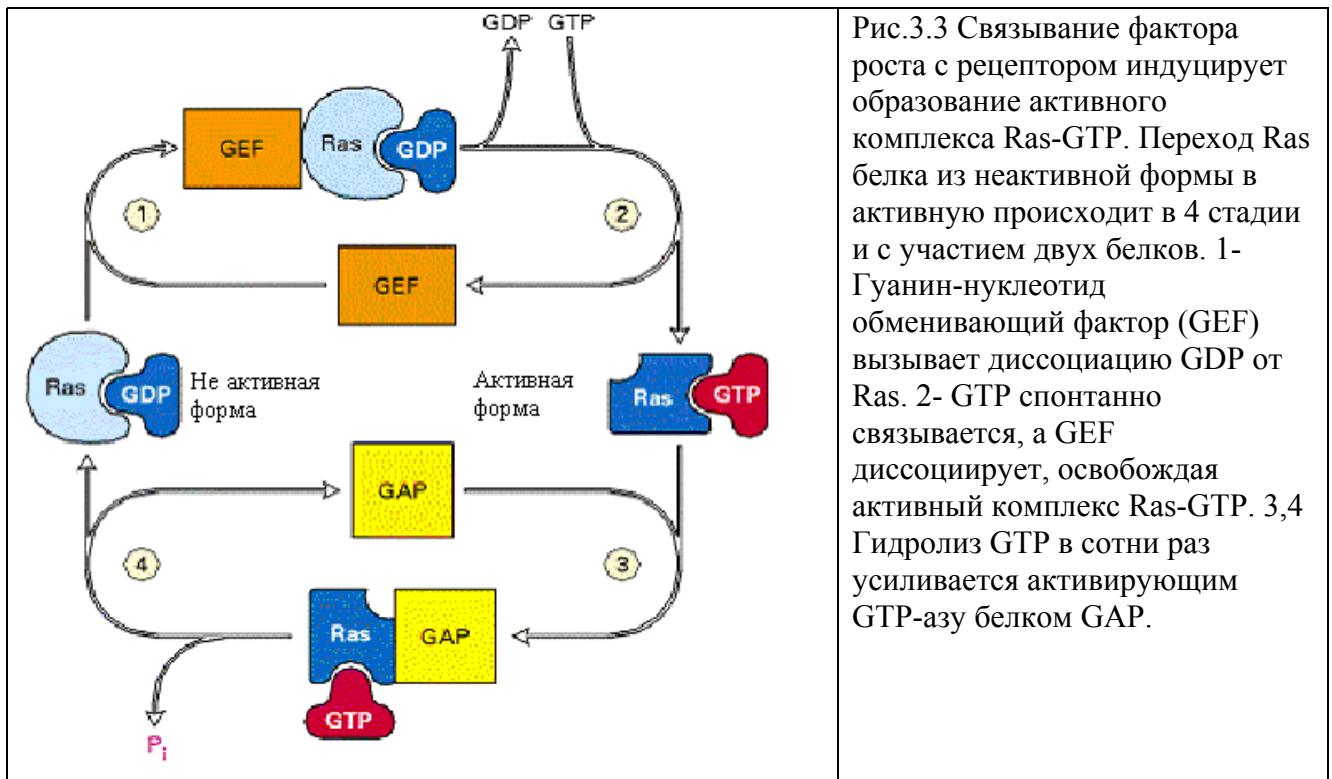
ADP-рибозилирование G-белков:

- ХТ (холерный токсин) приводит к постоянной активации аденилатциклазы (подавляя GTP-азную активность α_s -субъединицы) (Рис.3.2)
- КТ (коклюшный токсин) тоже вызывает ADP-рибозилирование α -субъединицы. Однако в этом случае модификация G-белка препятствует его взаимодействию с рецепторами, поэтому при активации рецептора АС не ингибируется.



Ras-белки

Мономерные GTP-связывающие белки открыты как продукты онкогенов. Ras-белки часто упоминают как протоонкогенные продукты, т.к впервые они были открыты как трансформирующие продукты группы, связанной с ретровирусами. Ras-белки участвуют в стимуляции клеточного деления факторами роста (рис. 3.3.). Все они являются одноцепочными полипептидами, длиной в 189 аминокислотных остатков и связаны с плазматическими мембранами клеток с помощью липидных участков (посттрансляционных) на С-конце. Все они связывают гуаниновые нуклеотиды (GTP и GDP) и все они являются GTP-азами. Относительно GTP-азной активности как функции, усиление которой ведет к трансформации клеток, необходимо отметить, что в чистой системе скорость гидролиза чрезвычайно мала ($K=5 \times 10^{-4}$ /сек). Однако в клетке существуют белки, взаимодействующие непосредственно с Ras, и при этом скорость гидролиза возрастает многократно (на 5 порядков). Эти активирующие GTP-азу (GAP) белки способны подавить даже митогенное действие фактора роста. Поэтому, уменьшая активность GAP белка, можно вызвать митогенный сигнал, что и происходит в Т- и В-лимфоцитах и адипоцитах. Механизм активации белком GAP GTP-азы состоит в образовании временного стехиометрического комплекса, т.е. GAP-Ras. Неонкогенные формы (с- Ras) представлены во всех клетках. Они являются регуляторами их роста и дифференцировки.



Консервативность

Последовательности белков весьма схожи. Например, первые 164 аминокислотных остатка N-Ras человека и Ras цыпленка отличаются только по двум позициям, последовательности первых 80 аминокислотных остатка N-Ras человека и D-Ras дрозофилы идентичны. Ras белки принадлежат к большому семейству GTP-связывающих белков. Все члены обладают некоторой гомологичной последовательностью и подразделяются на различные группы, называемые Ras, Rho, Rab, Ran и Arf. В пределах каждого подсемейства наблюдается более сильная гомология. Известно более 70 таких белков, но все это из библиотеки ДНК – т.е. это простор для исследований. Основной путь исследования - экспрессия мутантных форм и наблюдение изменений какой-либо функции и ее проявление в фенотипе.

Посттрансляционная модификация Ras-белков

Это событие происходит в результате удаления 3-х концевых аминокислот и метилирования нового С-конца и липидной модификации цистеина, находящегося в гипервариабельной области С-конца. Эта модификация обеспечивает сильную связь с внутренней поверхностью плазматической мембраны.

Функции Ras

Микроинъекции антител (для нейтрализации нативного клеточного Ras) предотвращают рост и клеточное деление. Однако митогенез не является единственным результатом активации Ras. В некоторых типах клеток дифференцировка является результатом активации Ras. В клетках PC12 введение продукта онкогена Ras обеспечивает сигнал для роста аксона. Как Ras контролирует все это пока далеко не ясно. Известно, что Ras располагается в центре сети взаимодействующих путей, он активируется непосредственно и косвенно несколькими рецепторами, и с другой стороны, он влияет на большое количество последующих событий. Удивительно то, что такой маленький белок, как Ras, может взаимодействовать со многими другими белками. Ras активирует протеинкиназы Raf и фосфатидилинозитол 3-киназы. Raf является первым членом каскада киназ, которые приводят к активации ERK и отсюда к транскрипции генов.

Глава 4. Эффекторные молекулы

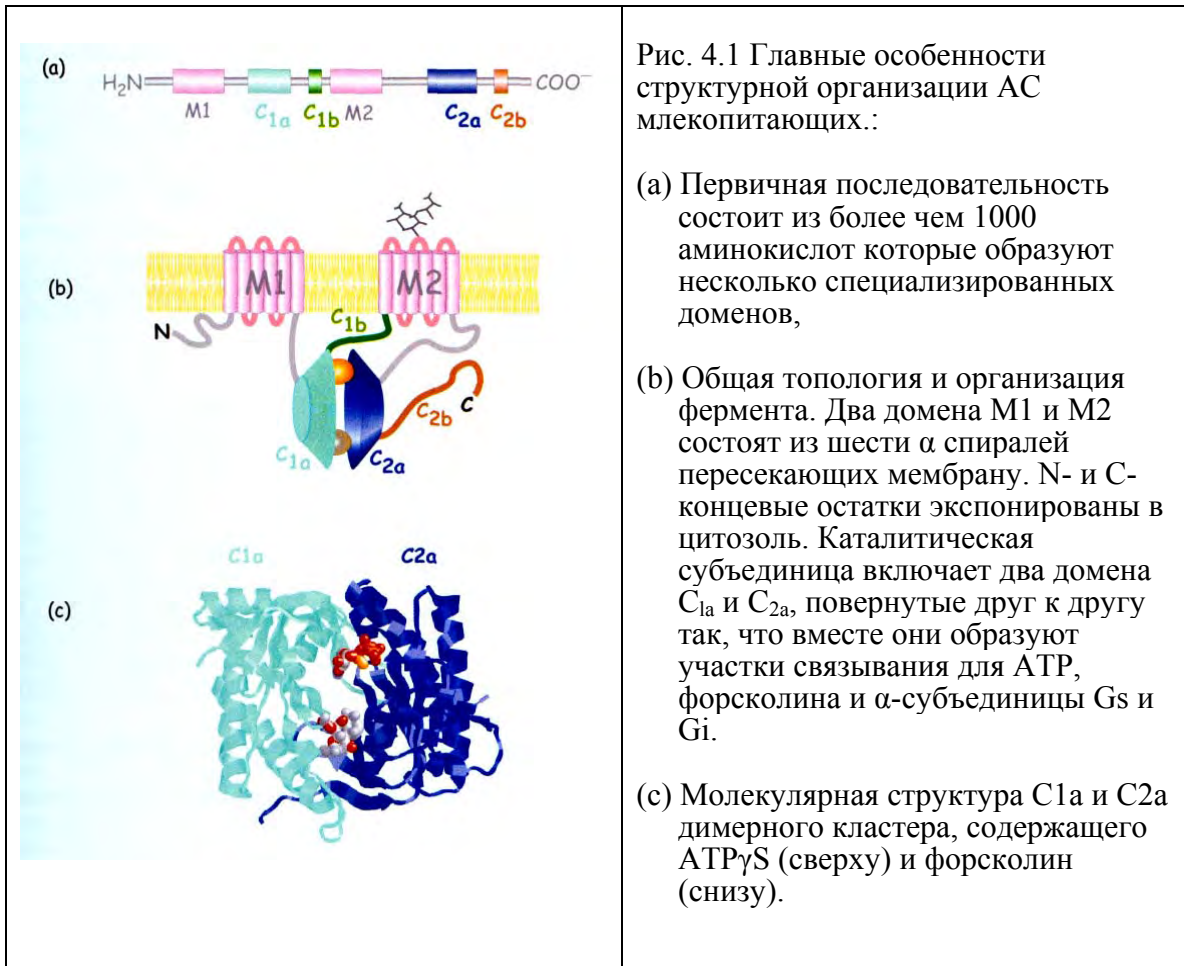
В системе сигнализации **эффекторными** называют молекулы, которые запускают образование внутриклеточных посредников. Рецепторы сопряженные с G-белком передают сигнал на такие эффекторные молекулы, как аденилатциклаза (AC), фосфолипаза C (PLC), фосфолипаза A₂ (PLA₂), сGMP-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, и несколько типов ионных каналов.

Существуют два основных механизма, с помощью которых рецепторы клеточной поверхности, сопряженные с G-белками, запускают образование внутриклеточных посредников. В обоих вариантах связывание внеклеточного лиганда изменяет конформацию цитоплазматического домена рецептора, это изменение передается на G-белок и активирует его. Затем активированный G-белок взаимодействует с определенными ферментами плазматической мембраны. В некоторых случаях G-белок взаимодействует не с ферментом, а с ионным каналом. В сAMP-пути Gs-белок активирует фермент аденилатциклазу, которая синтезирует сAMP. В Ca²⁺-пути активируется PLC, гидролизующая фосфолипид PIP₂ с образованием растворимого посредника IP₃, который освобождает ионы Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума.

Аденилатциклаза и сAMP

Впервые сAMP был обнаружен Сазерлендом в 1957 году, когда он показал на гепатоцитах новорожденных крыс, что эффект норадреналина или глюкагона обусловлен низкомолекулярным устойчивым к нагреванию соединением. Сейчас известно, что у взрослых крыс сигнал адреналина или глюкагона передается через рецепторы, сопряженные с фосфолипазой C. Уже позднее было показано, что при росте и развитии крыс с 6 по 60 день после рождения экспрессия β-рецепторов в печени падает, а α1-увеличивается. Однако молекулярное описание появилось лишь в 1990 году.

Гормонрегулируемые аденилатциклазы являются интегральными белками плазматической мембраны. Существуют и растворимые формы фермента, к которым относят AC бактерий и AC спермы плекопитающих AC – это гликопротеины с мол.массой от 110 до 180 кД и числом аминокислотных остатков от 1064 до 1248. Полипептидная цепь содержит 12 гидрофобных трансмембранных доменов (6х2, по 20-22 аминокислотных остатка), образующих структуры похожие на канал, но не проявляющие какой-либо канальной активности (рис.4.1). Гидрофобные домены объединены в две группы (по 6 в каждой). Между этими группами со стороны цитоплазмы вставлен фрагмент полипептидной цепи (43 кД). С наружной стороны эти участки невелики и содержат места для N-гликозилирования. N и C концы расположены с цитоплазматической стороны. Большой домен (38 кД) расположен со стороны С-конца. АТФ-связывающий участок выявлен методом моделирования и анализа мутаций в области Р-сайта. Показано, что Lys-923 и Asp-1000 из C₂-домена взаимодействуют с N₁ и N₆ аденинового кольца АТФ, а Gln-417 из С₁-домена участвует в ориентации Lys-923. Mg²⁺-связывающий участок содержит два остатка Asp.



Активаторами АС являются α-субъединица G_s-белка и СаКМ. Активация АС происходит вследствие образования комплекса с α-субъединицей G_s-белка (рис4.2). β-адренэргические рецепторы активируют АС, а α₂-адренэргические рецепторы ингибируют ее. β-рецепторы действуют через стимулирующий G_s-белок, а α₂-рецепторы - через ингибиторный G_i-белок, который содержит тот же βγ-комплекс, что и G_s-белок, но другую α-субъединицу (G_{iα}). Будучи активирован, α₂-адренэргический рецептор взаимодействует с G_i-белком, приводя к замене GDP на GTP в участке связывания гуаниновых нуклеотидов на α-субъединице. При этом, как полагают, α-субъединица отделяется от βγ и обе эти субъединицы участвуют в ингибировании АС: G_{iα} непосредственно подавляет активность АС, тогда как βγ связывают свободные G_{iα} и, как следствие, прекращается активирующее влияние на АС.

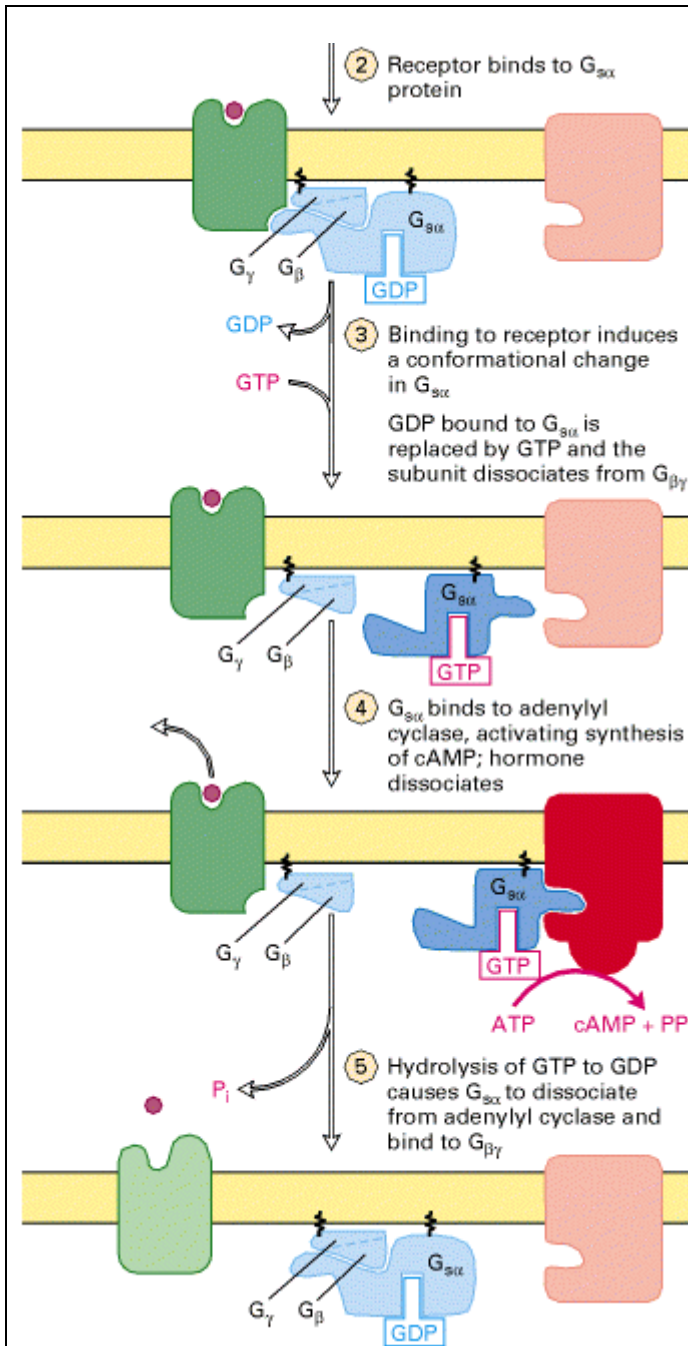


Рис. 4.2. Упрощенная схема активации АС вследствие связывания гормона (адреналин, глюкагон) с рецептором, сопряженным с G белком. Вслед за связыванием лиганда с рецептором Gs белок передает сигнал на эффекторную молекулу (АС). Связывание активированного рецептора с $G_{s\alpha}$ вызывает диссоциацию GDP и его замещение GTP. $G_{s\alpha}$ переходит из неактивной, связанной с GDP формы, в активную, связанную с GTP. Диссоциация активной формы освобождает α субъединицу, которая непосредственно активирует АС. Активация длится короткое время, поскольку GTP быстро гидролизует (стадия 5). Обе субъединицы связаны с липидами мембраны ковалентными связями.

Холерный токсин повышает уровень cAMP. В результате действия этого токсина происходит ADP-рибозилирование (перенос АDR-рибозы) $G_{s\alpha}$ -субъединицы, что приводит к подавлению ее GTP-азной активности. В случае же коклюшного токсина (продукта бактерий, вызывающих коклюш) происходит также ADP-рибозилирование α -субъединиц Gi и Go, но не Gq. Однако в этом случае модификация Gi-белка препятствует его взаимодействию с рецепторами, поэтому при активации рецептора АС не ингибируется.

На рис.4.3 приведена схема механизмов активации различных изоформ АС.

В настоящее время клонировано 9 изоформ АС. Активность АС регулируются не только α -субъединицами G-белков, но и другими сигналами. Они могут либо усиливать, либо подавлять друг друга. В некоторых случаях, (а) активация АС типов II, IV и VII субъединицами α_s и $\beta\gamma$ происходит с высокой степенью синергичности так, что заметная активация происходит только, когда два рецептора различного класса активированы одновременно. С другой стороны, их фосфорилирование РКС приводит к длительному сохранению состояния готовности фермента к стимуляции $G\alpha_s$. Другие изоформы, V и VI типа ингибируются фосфорилированием РКА (b). Они также ингибируются Ca^{2+} и рецепторами, сопряженными с G белками. Циклазы типа I, III и VIII (c) активируются комплексом Ca^{2+} КМ и ингибируются $\beta\gamma$ -субъединицами. Активатор АС форсколин действует синергично с $G\alpha_s$. (Некоторые эффекты форсколина связаны с его действием на ферменты, имеющие сходную структуру, такие как транспортер глюкозы и потенциал-зависимый K^+ канал.

Часто при иммунопреципитации R выделяется в комплексе с G белком или в комплексе эффектор + G белок. Причем, R выделяется в комплексе с различными G белками в зависимости от состояния их активации. Из этого следует, что один тот же R может взаимодействовать с различными эффекторами и вообще Лиганд+R+G+Эффектор это структурный ансамбль.

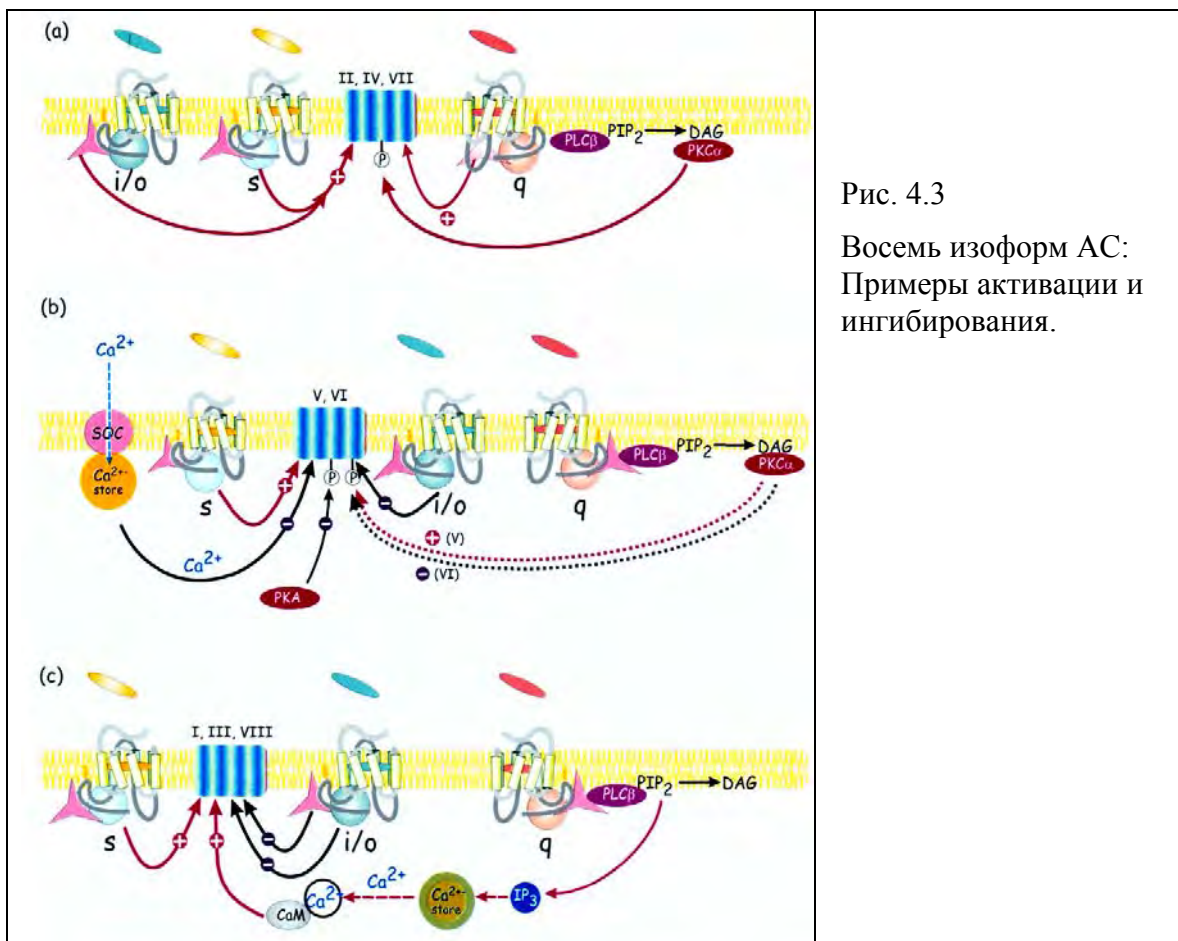
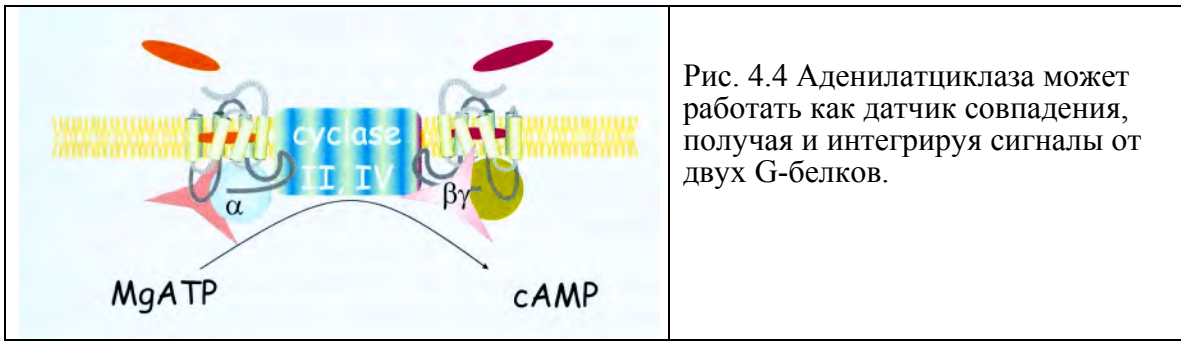
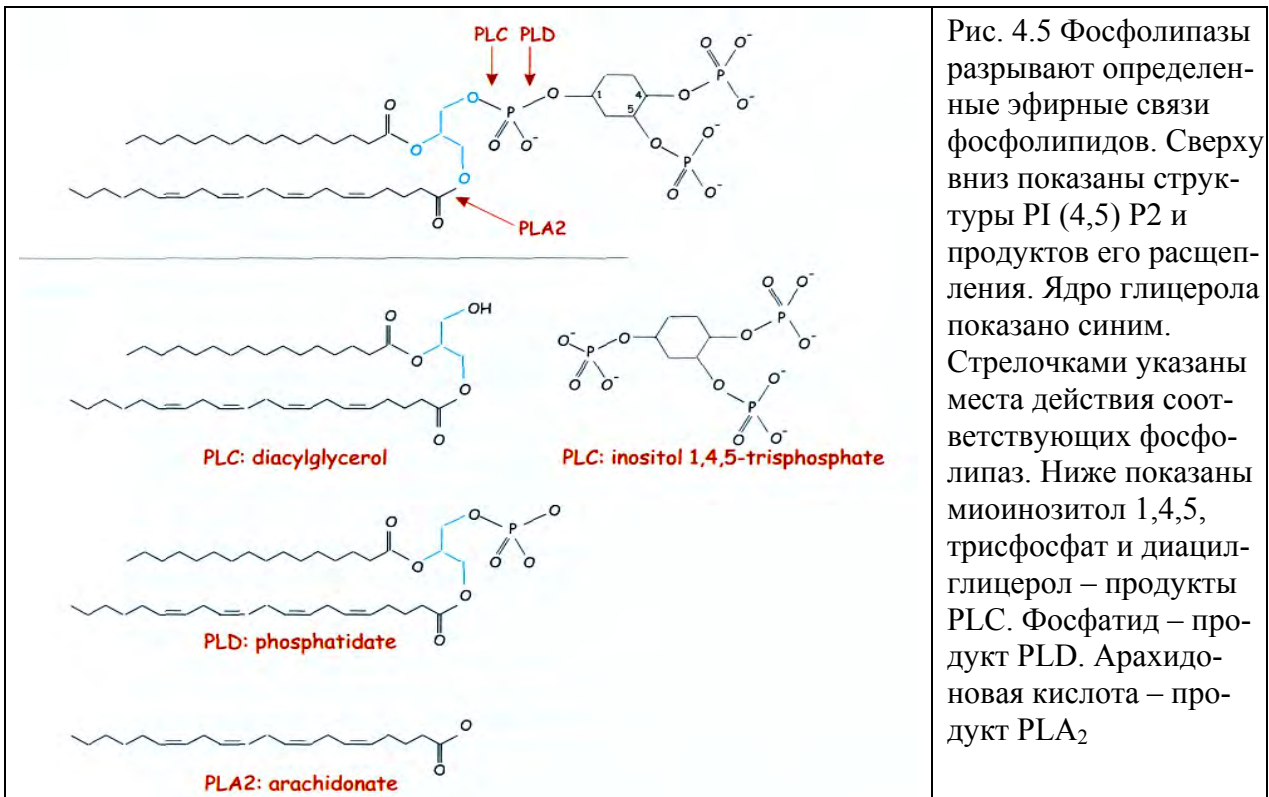


Рис. 4.3
Восемь изоформ АС:
Примеры активации и
ингибирования.



Фосфолипазы



Фосфолипаза C

Многочисленные экстраклеточные сигнальные молекулы, включая различные гормоны, нейромедиаторы, факторы роста, иммуноглобулины, антигены и др., при взаимодействии со своими рецепторами вызывают активацию фосфолипазы C (PLC). При взаимодействии лиганда с рецептором активирующий PLC сигнал может передаваться специальным G-белком. Активированная PLC катализирует расщепление мембранного фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP₂) на инозитолтрифосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG) (рис.4.5). Диацилглицерол связывается и стимулирует

протеинкиназу C, а в результате связывания IP_3 с активируемым им Ca^{2+} каналом (IP_3 рецептором) происходит выход кальция из эндоплазматического ретикулума.

На рис.4.5 показаны места разрыва связей при действии различных фосфолипаз .

Всего известно три класса PLC: PLC β , PLC γ и PLC δ , которые включают в себя около 16 ферментов (рис.4.6). Изофермент ранее обозначавшийся как PLC α , вероятно представляет собой продукт протеолитического расщепления PL δ 1. Первые два класса активируются при стимуляции рецепторов на плазматической мембране, тогда как способ активации PLC δ 1 остается неясным, и возможно она регулируется уровнем цитозольного кальция. PLC δ (самая маленькая из PLC) присутствует в дрожжах, *Dictyostelium discoideum* и цветковых растениях). PLC β активируется G-белками (αG_q , $\beta\gamma G_i$ и G_o), PLC γ фосфорилированием тирозинкиназой. Связывание рецептора фактора роста с лигандом приводит к димеризации рецептора и автофосфорилированию остатков Tyr на цитоплазматическом домене рецептора, которые создают "посадочные" места для PLC γ , и таким образом закрепляют фосфолипазу вблизи ее субстрата встроенного в цитоплазматическую мембрану.

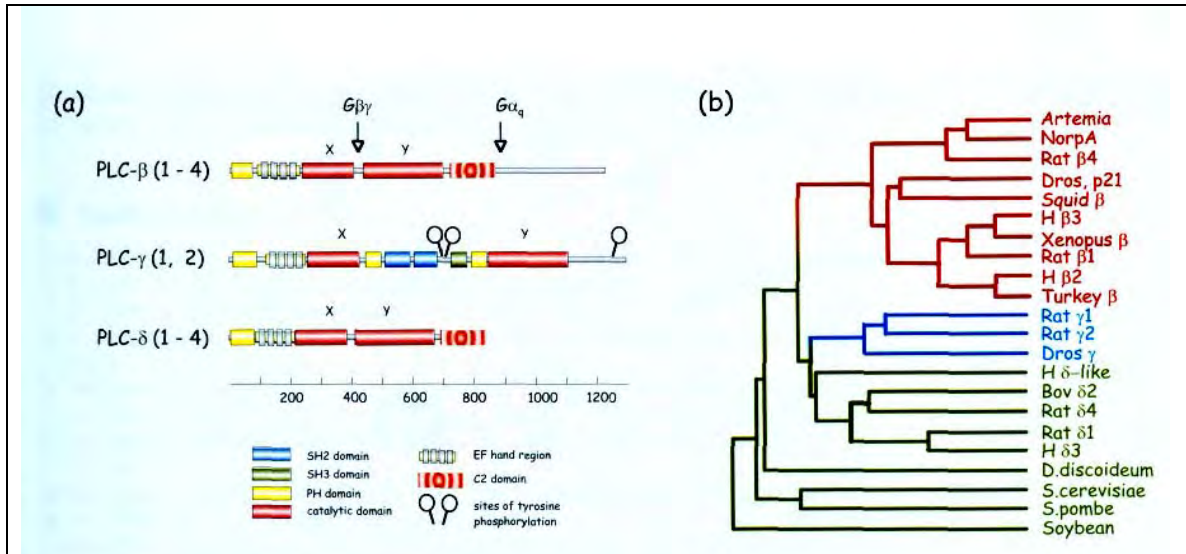


Рис 4.6 Организация доменов в аминокислотной последовательности PLC (PLC): (a) Выделены главные структурные домены. Во всех PLC каталитический домен разделен на две части обозначенные как X и Y. PLC δ имеет самую простую архитектуру и состоит только из доменов PH, C2 и EF-hand, которые присутствуют и в других структурах. Длинный C конец (примерно 500 аминокислот) PLC β связывает ее с мембраной для регуляции α субъединицей G-белка. В PLC γ X и Y компоненты разделены большой последовательностью (больше чем 500 аминокислот), которая включает два домена SH2 и SH3. Они определяют взаимодействие PLC γ с фосфорилированным рецептором факторов роста и другими сигнальными молекулами. Шпильками отмечены места фосфорилирования рецепторными тирозинами (b)

На рис.4.7 показаны механизмы связывания и активации различных изоформ PLC.

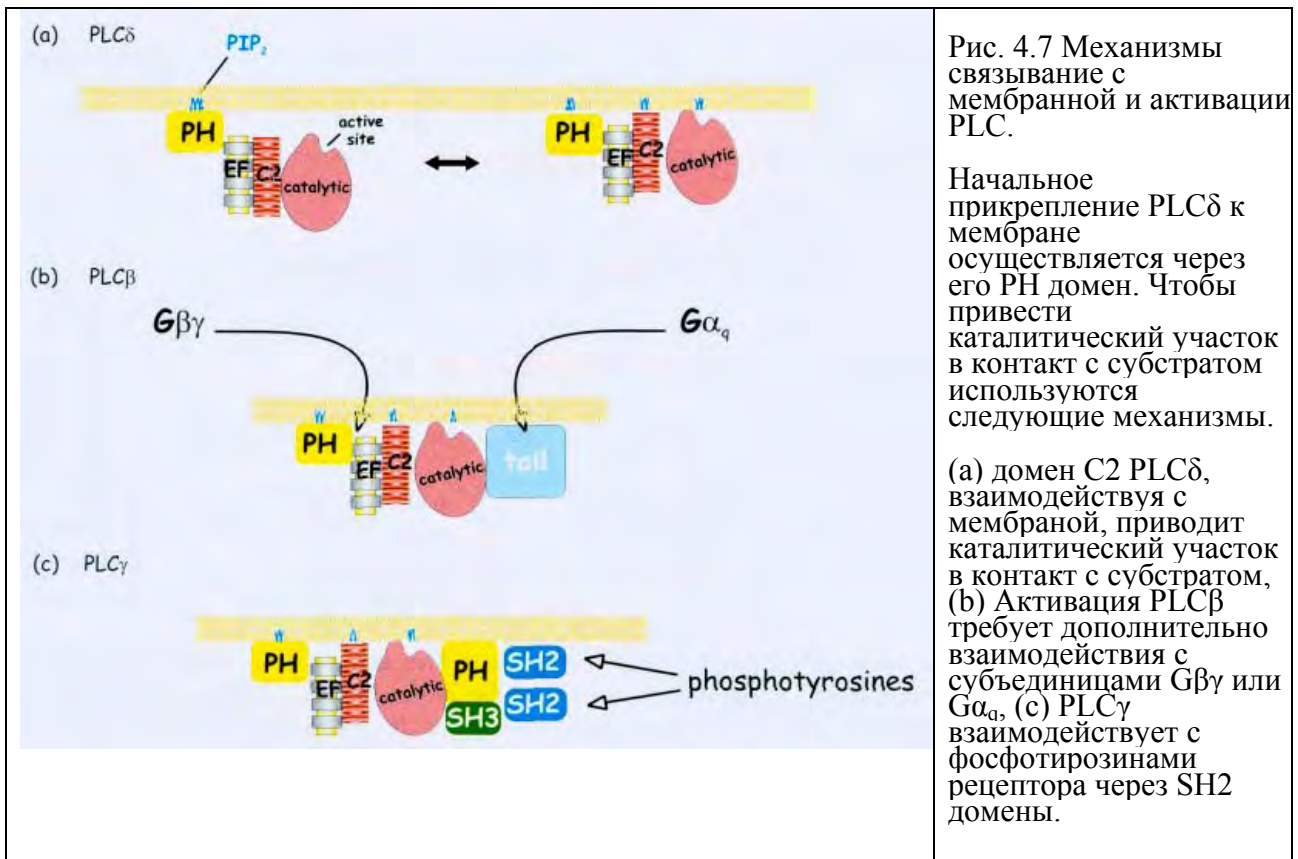


Рис. 4.7 Механизмы связывания с мембраной и активации PLC.

Начальное прикрепление PLC δ к мембране осуществляется через его PH домен. Чтобы привести каталитический участок в контакт с субстратом, используются следующие механизмы.

(a) домен C2 PLC δ , взаимодействуя с мембраной, приводит каталитический участок в контакт с субстратом, (b) Активация PLC β требует дополнительного взаимодействия с субъединицами G $\beta\gamma$ или G α_q , (c) PLC γ взаимодействует с фосфотирозинами рецептора через SH2 домены.

Фосфолипаза A₂ (PLA₂) – большое суперсемейство с существенными различиями в регуляции. Фосфолипазы A₂ являются эстеразами, которые специфически катализируют сложноэфирную связь в положении sn-2 (между жирной кислотой и диацил-фосфоглицеридом), в результате чего образуется арахидоновая кислота (AA) и соответствующий лизофосфолипид (рис.4.5). Арахидоновая кислота затем преобразуется в целый ряд биологически активных эйкозаноидов, в число которых входят простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, эпоксиды и гидроксикоизотетраеновые кислоты. Лизофосфолипиды обладают детергент-подобными свойствами и таким образом быстро реагируют в мембране. До настоящего времени механизм G-белок-связанной рецептор-опосредованной активации производства AA рассматривался как результат комбинированного действия двух ферментов. Как известно, фосфолипаза C производит диацилглицерол, который впоследствии диацилируется диглицеридлипазой, что приводит к высвобождению арахидоновой кислоты. В настоящее время принято, что рецептор-стимулируемое высвобождение арахидоновой кислоты происходит преимущественно через активацию фосфолипазы A₂ и что фосфатидилхолин является первичным субстратом. Показано, что в передаче сигнала от рецептора к фосфолипазе A₂ участвуют G-белки.

В настоящее время клонирована высокомолекулярная (85 кД) цитозольная фосфолипаза A₂ (сPLA₂), параметры которой подтверждают ее большую роль в высвобождении арахидоновой кислоты и передаче сигналов. Эти ферменты весьма важны для процессов

передачи сигнала, т.к. продуцируют такие высокоактивные молекулы, как эйкозаноиды и фактор активации тромбоцитов (PAF). PLA₂ делятся на две большие группы: внутриклеточные – Ca²⁺-зависимые (цитозольные, 85 кД) и секретируемые – Ca²⁺-зависимые, низкомолекулярные (14 кД), которые для катализа используют гистидин и аспарат. Внеклеточные растворимые фосфолипазы A₂ найдены в поджелудочной железе млекопитающих. Недавно выделены и клонированы Ca²⁺-независимые фосфолипазы (752 аминокислотных остатка). Другим источником фосфолипаз A являются яды змей и пчел.

Структура фосфолипаз A.

Фосфолипазы A являются одиночными полипептидами, содержащими 125-130 аминокислот. 20 аминокислот высококонсервативны. Они, возможно, играют особую структурно-функциональную роль. Половину этих аминокислот составляют остатки цистеина. Молекулярная масса мономеров фосфолипаз равна 14 кД. Фосфолипазы A содержат типичные для молекул белков структурные блоки - α-спирали и β-складчатые структуры. Присутствуют также участки белковой молекулы, называемые "беспорядочными спиралями" (random coil). Для структуры молекул фосфолипаз A характерно наличие дисульфидных связей. Например, фосфолипаза A из поджелудочной железы быка содержит 5 α-спиралей, 1 антипараллельную складчатую β-структуру и 7 дисульфидных связей. За некоторым исключением, эти 7 дисульфидных связей имеются во всех фосфолипазах A и имеют большое значение для поддержания структуры и активности ферментов. В соответствии со спецификой первичной структуры фосфолипазы A разделяются на две группы. Ферменты первой группы всегда содержат дисульфидную связь между аминокислотами Цис-11 и Цис-77. В ферментах второй группы эту связь выполняет солевой мостик между Лиз-11 и Глу-77, что свидетельствует о том, что близкое расположение α-спирали и β-структуры имеет важное функциональное значение. Тем не менее, фосфолипазы A 2-й группы также имеют 7 дисульфидных связей, т.к. содержат "дополнительный мостик", соединяющий середину С-спирали с С-концом очень длинного хвоста, который также является характерным для ферментов 2-й группы. Кроме того, в фосфолипазах 2-й группы отсутствует Д-спираль (элапидная петля или петля кобры), имеющаяся у ферментов 1-й группы. Третичная структура фосфолипаз A обоих классов весьма сходна. Аминокислотные остатки Гис-48, Тир-52, Тир-73 и Асп-99 являются высококонсервативными и определяют каталитическую активность фосфолипаз A₂. N-концы молекул белков также консервативны и важны для распознавания границы раздела липид-вода. Аминокислотная последовательность Ca²⁺-связывающего участка фосфолипаз A₂ (остатки 25-35) также отличается консерватизмом.

Ряд фосфолипаз A имеет выраженное пресинаптическое нейротоксическое действие. Нейротоксические фосфолипазы, которые входят в состав ядов гремучих змей, отличаются наличием положительно заряженных аминокислот (Арг-65 и Лиз-69), а нетоксичные фосфолипазы содержат отрицательно заряженные аминокислоты. Токсичные и нетоксичные фосфолипазы имеют различную четвертичную структуру. В ядах гремучих змей токсичная фосфолипаза связана с нетоксичной β-субъединицей, способствующей связыванию токсинов со специфическими мишенями. Один из наиболее эффективных токсинов змей - тайпоксин - содержит гетеротримеры abg. Токсичной является только α-субъединица, тогда как, β- и γ-субъединицы играют вспомогательную роль.

Механизмы регуляции активности фосфолипаз А. Зависимость активности фосфолипаз А от ионов Ca^{2+} и ПКС.

Фосфолипазы А являются Ca^{2+} -зависимыми ферментами - они активируются при миллимолярной концентрации Ca^{2+} . Активность фосфолипаз А увеличивается при действии агентов, повышающих внутриклеточную концентрацию свободного Ca^{2+} . Показано, что ионы Ca^{2+} играют существенную роль в активации фосфолипаз А тромбоцитов человека и крысы, эндотелиальных клеток. Фосфолипазы С и Д менее чувствительны к Ca^{2+} чем фосфолипаза А. В последнее время обнаружены фосфолипазы А с более высокой молекулярной массой (97 кД из мембран щеточной каемки желудка, и 85 кД из цитозоля макрофагоподобных клеток мышей линии RAW 264.7, мозга крысы, тромбоцитов человека) активируемые Ca^{2+} в низких, субмикромольных концентрациях. Эти ферменты нечувствительны к бромфенацилбромиду, известному блокатору фосфолипаз А. Получены данные о том, что Ca^{2+} инициирует в целых клетках транслокацию и связывание с мембраной высокомолекулярных фосфолипаз. При активации рецепторов сопряженных с фосфолипазой С образуется диацилглицерол, который через активацию протеинкиназы С стимулирует PLA_2 (рис4.8).

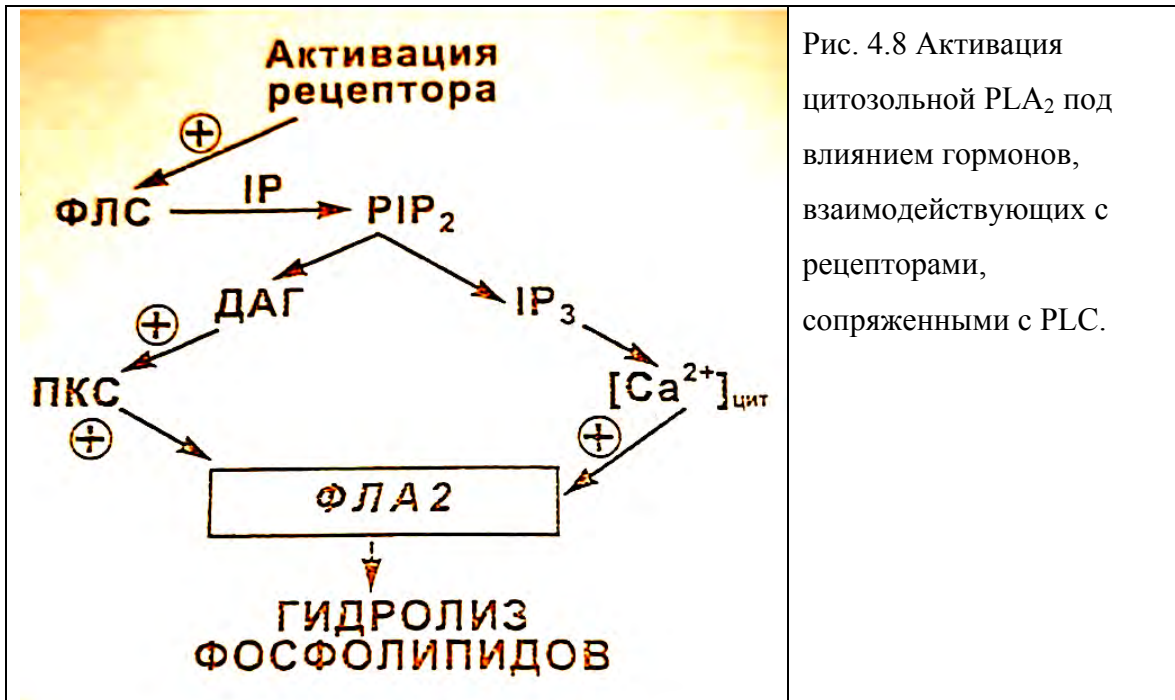


Рис. 4.8 Активация цитозольной PLA_2 под влиянием гормонов, взаимодействующих с рецепторами, сопряженными с PLC.

Зависимость активности фосфолипаз А от рН. Обнаружено, что фосфолипаза А активируется при повышении рН внутри клетки. Таким образом, защелачивание цитозоля, часто наблюдаемое при активации клеток, может дополнительно стимулировать этот фермент. При этом оптимальные значения рН для функционирования фермента весьма высоки (7,8-9,5).

Другие модуляторы. Одним из агентов, вызывающих структурные перестройки мембранных липидов, является диацилглицерол. Показано, что длинноцепочечные ненасыщенные диацилглицеролы, индуцирующие фазовые превращения фосфолипидов, стимулируют активность различных фосфолипаз А. Показано, что глюкокортикоиды

вызывают синтез белков, ингибирующих фосфолипазу А. Эти белки были названы липокортинами. Липокортины обладают мол.массой порядка 40 кД, связывают ионы Ca^{2+} , содержат участки гликозилирования и фосфорилируются различными киназами. В экспериментах, выполненных на целых клетках, показано, что липокортин образует комплекс с фосфолипазой А и что фосфолипаза А освобождается при активации клетки и фосфорилировании липокортина. Установлено, что липокортины I и II сходны с семейством внутриклеточных белков, участвующих в процессах экзоцитоза и способных связываться с кислыми фосфолипидами в присутствии Ca^{2+} . К этому семейству относятся следующие белки: аннексины, хромобиндины, кальцимедины, кальпактины, калелектрины, эндонексины. Аннексины, относящиеся к семейству Ca^{2+} - и фосфолипидсвязывающих белков, блокируют фосфолипазу А. Фосфорилирование и дефосфорилирование липомодулина, осуществляемые специфической тирозинкиназой и щелочной фосфатазой, могут регулировать метаболизм фосфолипидов. Эффективным блокатором внеклеточных фосфолипаз А является п-бромфенацилбромид. **Бромфенацилбромид** необратимо модифицирует (алкилирует) остаток гистидина Гис-48, входящий в состав активного центра фермента. Митохондриальная фосфолипаза А ингибируется местными анестетиками типа нуперкаина.

В последние годы получены данные, позволяющие рассматривать АА и ее продукты в качестве еще одной системы вторичных посредников. Во многих случаях показано, что АА и ее производные могут взаимодействовать с другими системами передачи информации в клетке, модулируя их сигналы. Обнаружено, что АА или ее продукты могут влиять на активность фосфолипазы С (PLC), аденилатциклазы (AC), гуанилатциклазы (ГЦ), протеинкиназы С (ПКС) и приводить к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Различают несколько механизмов освобождения АА из фосфолипидов мембран, в которых принимает участие PLA_2 :

1. Наиболее прямой механизм включает в себя непосредственное освобождение АА из мембранных фосфолипидов под действием PLA_2 . PLA_2 катализирует гидролиз сложноэфирной связи между АА и глицерофосфолипидом в положении sn-2. Эти фосфолипиды включают в себя фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитиды, фосфатидную кислоту и плазмалогены. В результате гидролиза образуются свободная АА и лизофосфолипиды.
2. Диацилглицерол может активировать протеинкиназу С, которая в свою очередь стимулирует PLA_2 , катализирующую освобождение АА из фосфолипидов.
3. Образование АА в результате активации мембранных рецепторов (например, рецепторов эпидермального фактора роста), приводящей к стимуляции связанной с ними тирозинкиназы, которая в свою очередь непосредственно активирует PLA_2 . Образование свободной АА в результате действия PLA_2 ингибируется производными гидроксibenзилидинмалонитрила, известными как "тирфостины" и являющимися специфическими блокаторами тирозинкиназы эпидермального фактора роста.
4. Диацилглицерол может фосфорилироваться диацилглицеролкиназой с образованием фосфатидной кислоты. АА освобождается из фосфатидной кислоты под действием фосфолипазы A_2 . Ингибитором 1,2-диацилглицеролкиназы служит соединение R59022.
5. Совместное действие фосфолипазы A_2 и лизофосфолипазы, приводящее к освобождению АА из мембранных фосфолипидов.

Метаболизм арахидоновой кислоты (АА)

Свободная АА легко окисляется с образованием очень широкого спектра биологически активных соединений: *простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов, различных гидроксикислот*. Известны три энзиматических пути окисления АА с участием мембранно-связанной циклооксигеназы, цитоплазматических липоксигеназ и эпоксигеназ (цитохром-Р-450-подобных ферментов). Тип окисления АА определяется набором ферментов, который содержит данная клетка.

Циклооксигеназный путь окисления АА. Циклооксигеназа является гемсодержащим мембрано-связанным ферментом с мол. массой 70 кД. Для окисления АА циклооксигеназой необходим молекулярный кислород. Метаболизм АА по циклооксигеназному пути начинается с включения двух атомов кислорода в молекулу АА и образования нестабильных промежуточных продуктов - эндоперекисей.

Включение первого атома кислорода в молекулу АА приводит к образованию 11-гидропероксиэйкозатетраеновой кислоты (11-ГПЭТЕК). Включение второго атома кислорода приводит к образованию 15-гидроперокси-9,11-эндоперекиси с циклопентановым кольцом - простагландин G₂ (ПГ-G₂). В результате пероксидазной активности циклооксигеназы ПГ-G₂ может восстанавливаться до второго нестабильного промежуточного соединения эндоперекиси - простагландина H₂ (ПГ-H₂). ПГ-H₂ неэнзиматически расщепляется с образованием ПГ-E₂ и ПГ-D₂. ПГ-H₂ может превращаться в ПГ-F_{2α}. Кроме того, при действии простагландин-I₂-синтазы эндоперекиси могут превращаться в ПГ-I₂ или простагландин, а при действии тромбоксан-A₂-синтазы - в тромбоксан A₂ (ТК-A₂). ПГ-I₂ и ТК-A₂ являются нестабильными, но имеющими важные биологические свойства соединениями.

Простагландины высвобождаются из клеток преимущественно с помощью известного простагландинового транспортера. Время жизни тромбоксана и простагландина достаточно мало – от секунды до нескольких минут, поэтому путь от места синтеза до мишени должен быть достаточно коротким. В настоящее время известно не менее 9 рецепторов для простагландинов. Четыре подтипа рецепторов (EP₁ - EP₄) связывают ПГ-E₂, два подтипа (DP₁ и DP₂) связывают ПГ-D₂, рецептор подтипа FP взаимодействует с простагландином ПГ-F_{2α}, IP-рецептор связывает простагландин ПГ-I₂ и рецептор подтипа TP тромбоксан ТК-A₂.

Простагландиновые рецепторы относятся к серпентиновым рецепторам и локализованы они, главным образом, в плазматической мембране. Так называемые релаксирующие рецепторы IP, DP₁, EP₂ и EP₄ осуществляют передачу сигнала через G_S-белки и, соответственно, увеличение сАМР. К рецепторам, активация которых вызывает сокращение, относятся EP₁, FP и TP. В этом случае сигнализация осуществляется через G_q-опосредованное увеличение внутриклеточного кальция. EP₃ относят к ингибирующим рецепторам, осуществляющим передачу сигнала через белок G_i и уменьшение синтеза сАМР. И только рецептор DP₂ относится к группе рецепторов-хемоаттрактантов.

Таблица 4.1

Простагландины	Рецепторы серпентиновые		Вторичный мессенджер	эффект
ПГ-E ₂	EP ₁ -	G _q	Рост Ca ²⁺	сокращение
ПГ-E ₂	EP ₂ и EP ₄	G _S -белки	Рост сАМР	релаксирующие
ПГ-E ₂	EP ₃ -	G _i	Уменьшение сАМР	

ПГ-Д ₂	DP ₁	G _S -белки	Рост cAMP	релаксирующие
ПГ-Д ₂	DP ₂			
ПГ-F _{2α}	FP	G _q	Рост Ca ²⁺	сокращение
ПГ-I ₂	IP	G _S -белки	Рост cAMP	релаксирующие
тромбоксан ТК-A ₂	TP	G _q	Рост Ca ²⁺	сокращение

Широко используемыми **ингибиторами** циклооксигеназы являются нестероидные противовоспалительные агенты: индометацин, аспирин, анальгин, бутадион, амидопирин, ибупрофен и кетопрофен. Установлено, что аспирин избирательно ацетилирует остаток Сер-530 циклооксигеназы, что блокирует доступ АА к субстратсвязывающему участку фермента.

Липоксигеназный путь окисления АА. Липоксигеназы представляют собой цитоплазматические ферменты, катализирующие включение одной молекулы кислорода в АА с образованием гидропероксипроизводных - гидропероксиэйкозатетраеновых кислот (ГПЭТЭК). Наибольшее значение имеет метаболизм АА, связанный с активностью 5-липоксигеназы, приводящей к образованию биологически активных лейкотриенов. Эти липоксигеназы обладают NH₂-терминальным доменом, который связывает два иона кальция. Лейкотриены являются медиаторами аллергических и воспалительных процессов. Лейкоциты являются одним из главных источников лейкотриенов. При окислительном метаболизме АА под действием фермента 5-липоксигеназы образуется нестабильное соединение – лейкотриен А₄. Это промежуточное соединение является субстратом для двух различных ферментов: лейкотриен А₄-гидролазы и лейкотриен С₄-синтазы, дающих LTB₄ и LTC₄. Далее под действием глутаминил-трансферазы LTC₄ превращается в лейкотриен LTD₄. Затем лейкотриен LTD₄ под действием пептидазы превращается в лейкотриен LTE₄.

Лейкотриены могут быть подразделены на два класса в зависимости от их химической структуры и биологической активности а) цистеинил-лейкотриены (лейкотриен С₄, лейкотриен D₄ и лейкотриен E₄.) содержат различные аминокислотные остатки и б) лейкотриены содержащие дигидрокислоту – лейкотриен В₄.

В отличие от циклооксигеназы, присутствующей в конститутивной и индуцируемой формах в большинстве типов клеток, 5-липооксигеназа – менее распространенный фермент. Лейкоциты являются одним из главных источников лейкотриенов.

Наряду с мобилизацией АА для синтеза лейкотриенов требуется активация 5-липооксигеназы. Это обеспечивается активацией клеток и стимуляцией входа внеклеточного кальция. Стимуляция такого рода приводит к транслокации цитозольного или ядерного растворимого фермента (5-липооксигеназы) в мембрану ядерной оболочки. Далее происходит взаимодействие фермента с интегральным белком FLAP (18 kD), который обеспечивает взаимодействие с субстратом. Показано, что активация 5-липооксигеназы обеспечивается митоген-активируемой протеинкиназой I, таким образом, фосфорилирование вызывает активацию и транслокацию в ядерную мембрану.

Фосфолипаза Д.

PLD катализирует гидролиз фосфолипидов, продуцируя фосфатидную кислоту (РА) (рис.4.5). Стимуляция PLD происходит при воздействии на клетки гормонами и факторами роста. Фосфатидная кислота является биологически активной молекулой, и

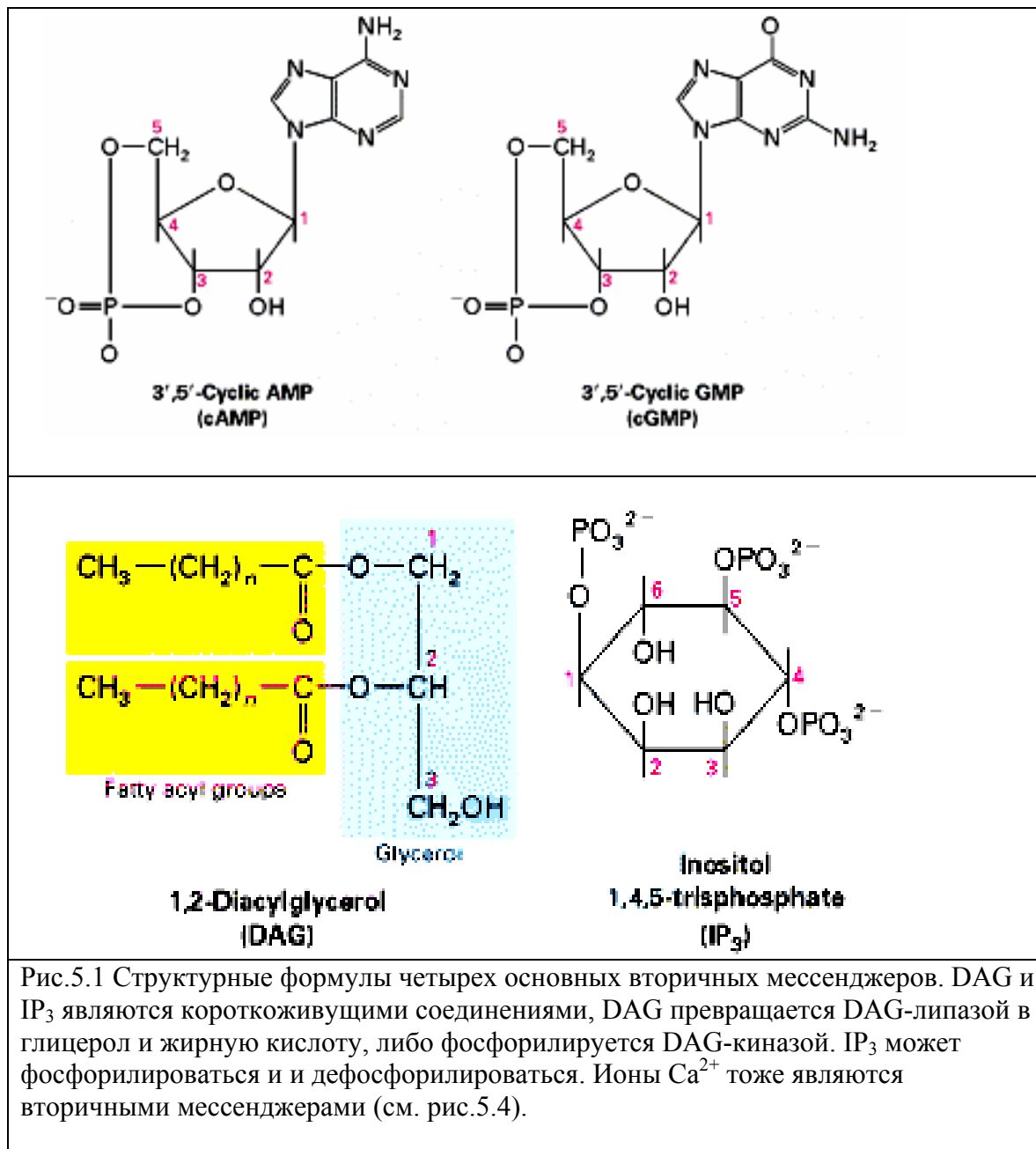
может быть превращена с помощью фосфогидролазы в диацилглицерол - активатор PKC. PLD млекопитающих локализована в мембране и высокоспецифична для фосфатидилхолина. Известно, что PLD активируется через сигнальные пути, связанные с G-белками, Ca^{2+} , ненасыщенными жирными кислотами, PKC или TирK. Маленькие G-белки (Smg) семейства Arg активируют PLD. PLD также катализирует реакцию трансфосфатидилирования, в которой короткие цепи первичных спиртов преобразуются в полярные группы головы для генерации фосфатидилалкоголя. Например, добавление к клеткам этанола или пропранолола приводит к образованию фосфатидилэтанола или фосфатидилпропранолола. Активация PLD, опосредованная через мускариновые рецепторы, была показана для следующих клеток: астроциомные клетки мозга крысы, нейробластома человека, синаптосомы собаки. В большинстве изученных клеток PLCи PLD обычно стимулируются одновременно. Также показано, что для полной активации PLD необходим диацилглицерол и Ca^{2+} . Прямое связывание PLD с мускариновыми рецепторами через G-белки не показано.

В настоящее время получены доказательства, что не только фосфатидилинозитол 4, 5-бисфосфат, но и другие мембранные фосфолипиды деградируют, что приводит к клеточной активации. Показано, что фосфатидилхолин гидролизуется как фосфолипазой С, так и фосфолипазой Д.

Глава 5. Основные вторичные мессенджеры, их метаболизм

Глава носит справочный характер. В ней приведены структурные формулы и реакции образования основных вторичных мессенджеров, участвующих в системах передачи сигналов. Приведены схемы изменения метаболизма фосфоинозитидов при действии стимула, увеличение цитозольного Ca^{2+} с участием IP_3 - и рианодинового рецепторов.

Ниже приведены структурные формулы основных вторичных мессенджеров (рис.5.1.), реакции образования PIP_2 , IP_3 и DAG в инозитольном цикле (рис 5.2, 5.3). cAMP и cGMP образуются из ATP и GTP действием соответствующих циклаз.



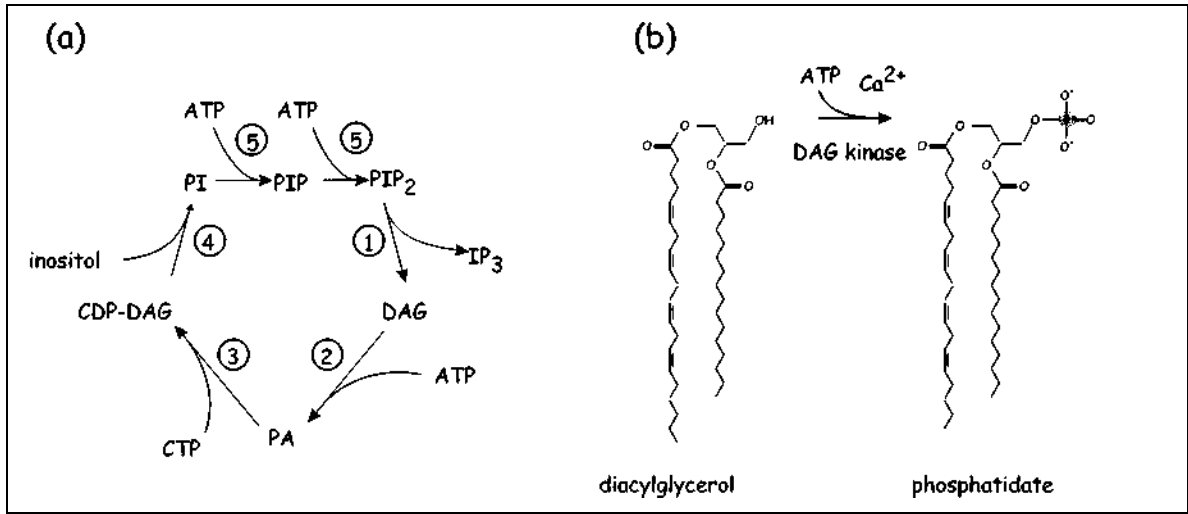


Рис.5.2. (а) Реакции инозитольного цикла: (б) Диацилглицеролкиназа (DAG kinase) прекращает активацию РКС, фосфорилируя DAG: (а) Цифрами отмечены ферменты катализирующие соответствующую реакцию: 1 - фосфолипаза С; 2 - диацилглицеролкиназа; 3 - CDP-диацилглицеролсинтаза; 4 - PI синтаза; 5 - PI киназа. (б) показаны структуры DAG и фосфатидной кислоты.

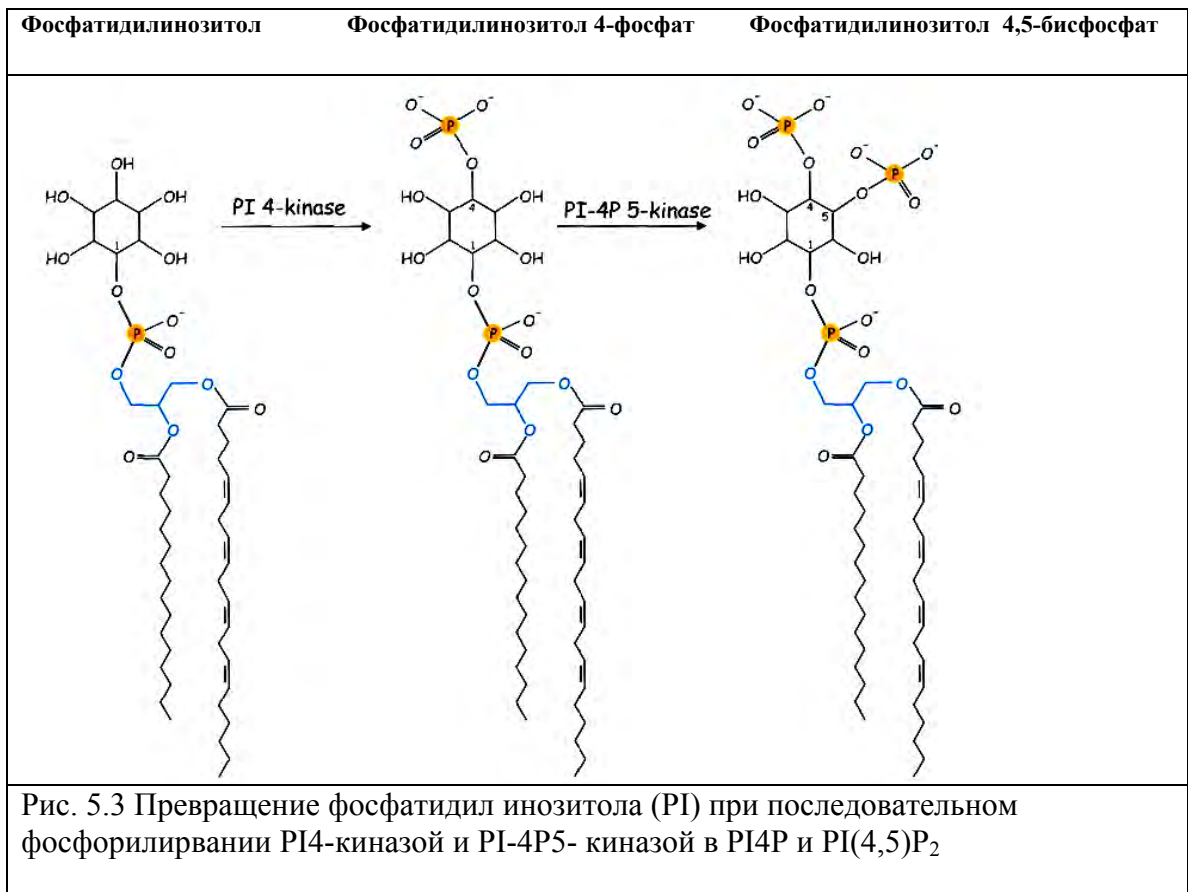


Рис. 5.3 Превращение фосфатидил инозитола (PI) при последовательном фосфорилировании PI4-киназой и PI-4P5- киназой в PI4P и PI(4,5)P₂

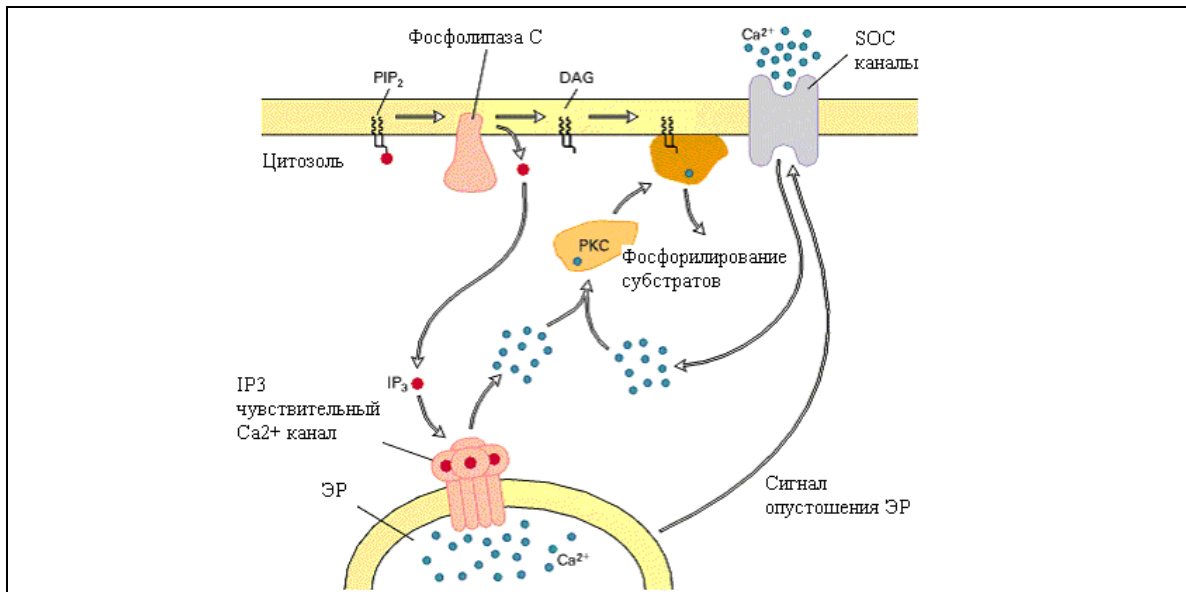


Рис.5.4 Увеличение цитозольного Ca^{2+} через PI сигнальный путь. Связывание гормона с рецептором приводит к активации G белка (Gq), который активирует PLC по механизму аналогичному активации АЦ. PLC гидролизует PIP_2 до IP_3 и DAG . IP_3 дифундирует через цитозоль и взаимодействует с IP_3 рецепторным каналом эндоплазматического ретикулума, вызывая выброс Ca^{2+} в цитозоль. Опустошение ЭР от Ca^{2+} активирует вход Ca^{2+} в клетки через специальные кальциевые каналы (SOC). Повышение цитозольного Ca^{2+} вызывает переход PKC из цитозоля в мембрану, где она активируется DAG. Активированная PKC фосфорилирует ряд ферментов и рецепторов, изменяя их активность.

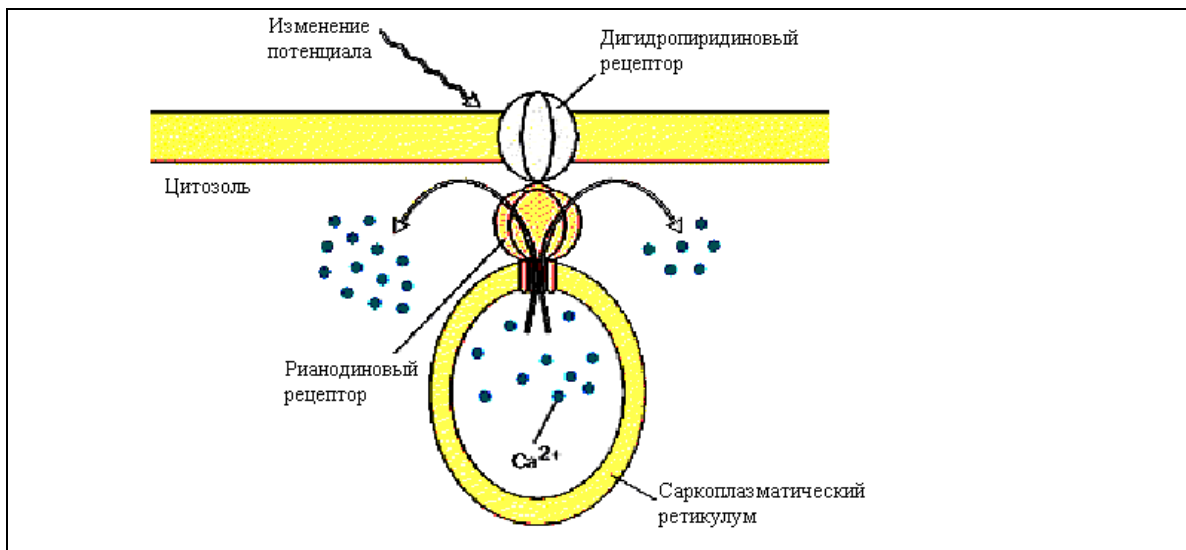


Рис.5.5 Мобилизация Ca^{2+} рианодинным рецептором (RR) в скелетной мышце. Потенциал-зависимый дигидропиридиновый рецептор в плазматической мембране контактирует с RR локализованным в мембране саркоплазматического ретикулума. В ответ на изменение потенциала в структуре дигидропиридинового рецептора происходят конформационные изменения, которые вызывают конформационные изменения в структуре RR, открывая Ca^{2+} каналы. [Адаптировано из M. J. Berridge, 1993, *Nature* 361:315.]

Лигандом RR является сADPрибоза (рис. 5.6).

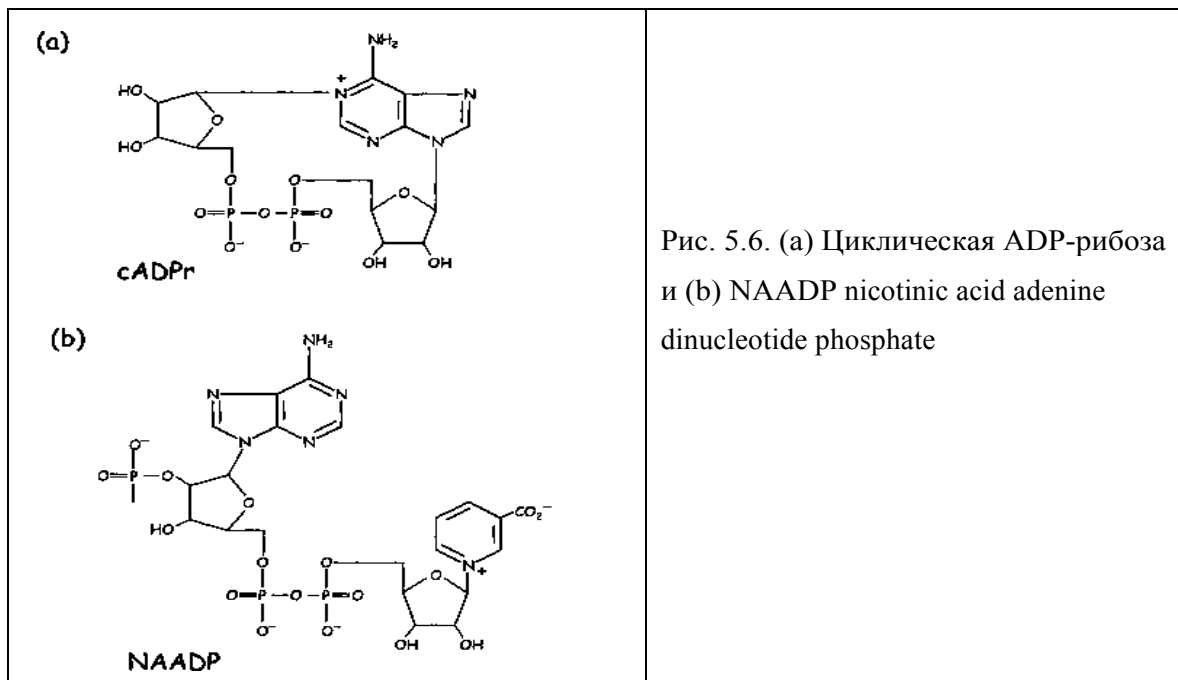


Рис. 5.6. (а) Циклическая ADP-рибоза и (b) NAADP nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate

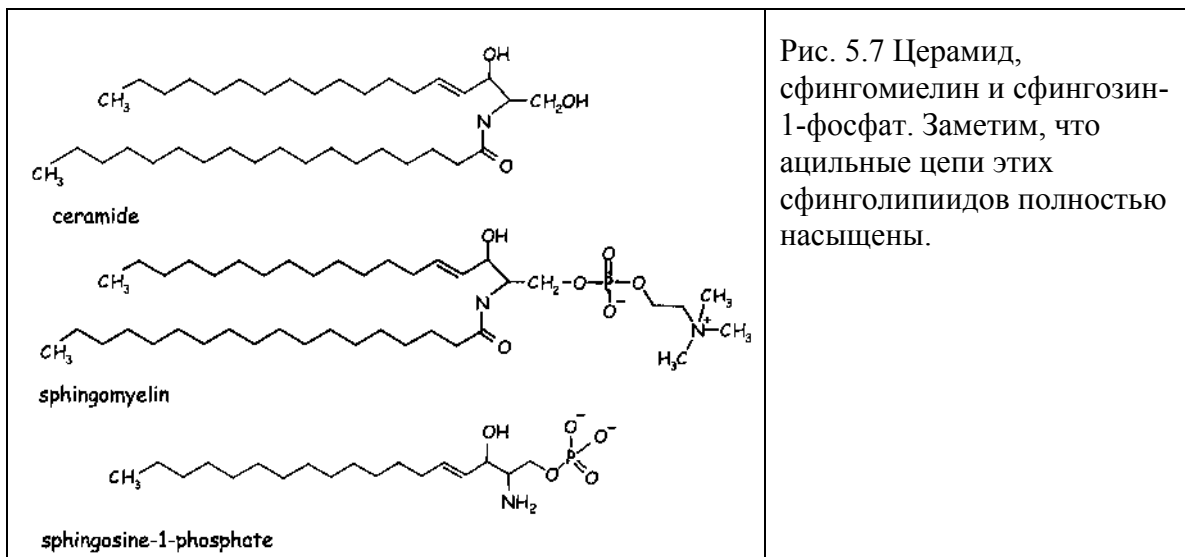
Регуляция уровня Ca^{2+} cADPr, NAADP и метаболитами сфинголипидов. IP_3 является основным Ca^{2+} -мобилизующим мессенджером. Однако существуют и другие мессенджеры, которые также мобилизуют Ca^{2+} из внутриклеточных структур. Два из них являются нуклеотидами: циклическая ADP рибоза (cADPr) и nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). Их структура показана на рис.5.6 Оба эти соединения образуются одним ферментом ADP-рибозил циклазой, взаимодействующей с разными субстратами NAD^+ и NADP^+ соответственно.

Показано, что cADPr вызывает выброс Ca^{2+} через канал RR типов 2 и 3 (но не типа 1). Похоже, что взаимодействие не прямое, а через вспомогательный белок. На яйцах морского ежа показано, что этим белком является кальмодулин. Образование ADPr из NAD^+ определяется увеличением цитозольного cGMP. Это происходит при активации гуанилатциклазы NO. cGMP активирует цитозольную форму ADP-рибозилциклазы, которая производит cADPr. С другой стороны увеличение cAMP, активирует мембран-связанную форму фермента, которая взаимодействует с NADP^+ и производит NAADP. Этот нуклеотид в концентрациях 10-50 нмол/л также вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Эти мессенджеры взаимодействуют, по крайней мере в начале с депо, расположенными в кортикальных структурах, тогда как IP_3 -чувствительные структуры как правило находятся в более глубоких областях клетки.

Метаболиты сфинголипидов

Высокоафинные рецепторы для определенной области некоторых иммуноглобулинов (FcεRI в тучных клетках и, FcγRI в макрофагах) передают сигнал через тирозинкиназы, которые фосфорилируют PLD, производящую фосфатидат, который, в свою очередь, активирует сфингозинкиназу. Ее субстрат сфингозин является продуктом расщепления сфингомиелина и превращается в сфингозин-1-фосфат (Рис.5.7). Этот фосфорилированный липид, как предполагают, является Ca^{2+} -мобилизующим агентом в некоторых клетках. В этом вопросе есть некоторые несоответствия в той части, что сфингозин-1-фосфат может связываться с G белок-сопряженными рецепторами, связанными с PLC.

Сфингозин киназа может активировать вход Ca^{2+} , зависимый от истощения ЭР, поскольку каналы такого входа (CRAC) ингибируются сфингозин. Активация киназы приведет к снятию этого ингибирования.



NO синтаза

Одно из наиболее удивительных открытий последнего десятилетия – установление роли NO как внутриклеточного мессенджера. Он образуется при окислении L-аргинина гемовым белком - NO-синтазой (NOS). NO обладает свойствами классического мессенджера. Быстро диффундирует, является короткоживущим, может легко пересекать мембрану, попадать в соседние клетки без участия рецепторов и активировать в них ряд процессов. В мышечных нейронах кишечной ткани nNOS активируется входом Ca^{2+} . Образованный NO диффундирует в соседние гладко мышечные клетки, где активирует растворимую гуанилатциклазу, произведенный ею cGMP, активирует PKG, что приводит к понижению уровня Ca^{2+} и расслаблению мышцы (рис.5.8). В сердечно-сосудистой ткани eNOS в клетках эндотелия активируется Ca^{2+} похожим образом, что приводит к расслаблению гладкой мускулатуры сосудов и уменьшению кровяного давления. В ЦНС nNOS расположена вблизи NMDA глутаматного рецептора, поэтому она может быстро и интенсивно отвечать на вход Ca^{2+} при открытии канала.

NO может либо усиливать интенсивность процессов, либо подавлять их. Примером подавления процесса при активации NOS является эффект NO на Ca^{2+} гомеостаз. Многие эффекты NO обусловлены cGMP и последующей активацией PKG. Она может фосфорилировать и инактивировать PLC и IP_3 рецептор и модулировать SOC каналы. Она также ингибирует освобождение Ca^{2+} во многих клетках (но не в эндотелии и печени). Наконец в яйцах морского ежа генерация cADP-рибозы – активатора RR является cGMP-зависимым. Как эти действия координируются, не известно.

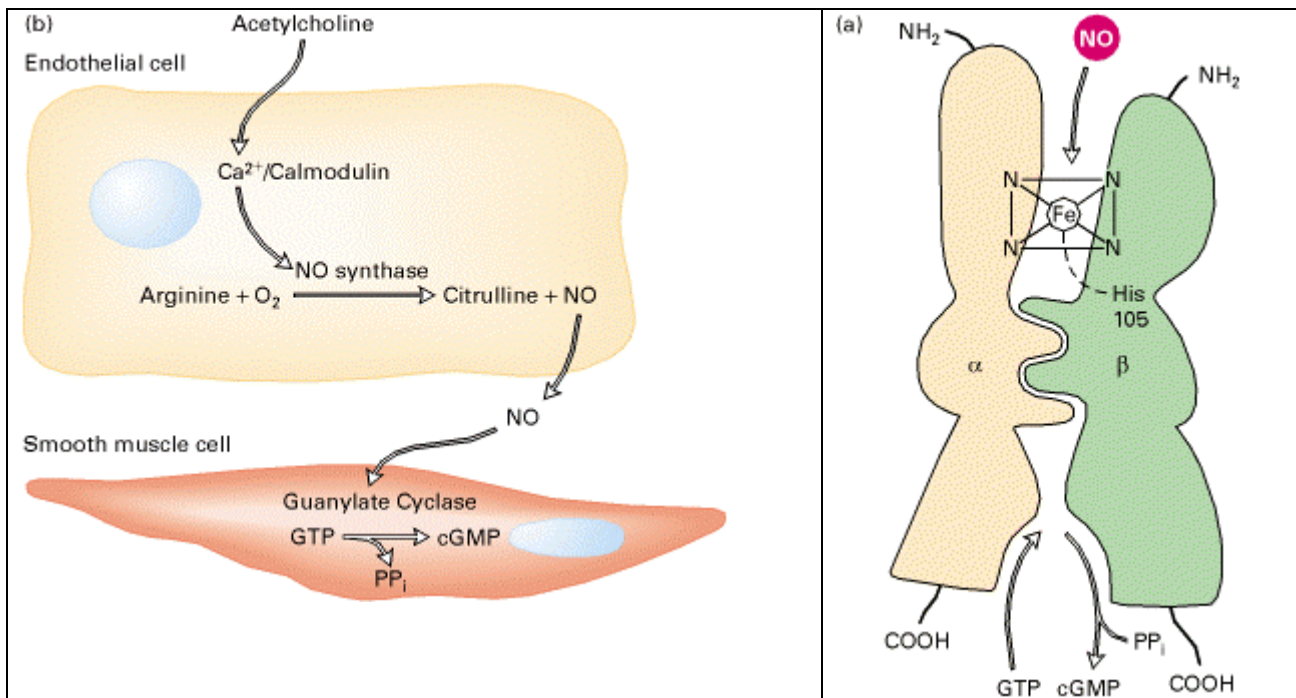


Рис.5.8. NO и cGMP-зависимая передача сигнала. (a) Схематическое изображение структуры растворимой гуанилатциклазы. Связывание NO с гемовой группой стимулирует ферментативную активность, приводя к преобразованию GTP в cGMP. (b) Синтезированный в клетках эндотелия NO диффундирует в соседние гладкомышечные клетки и активирует в них гуанилатциклазу. Увеличение уровня cGMP приводит к расслаблению мышцы и расширению сосудов. [Рис (a) из А. Hobbs, 1997, *Trends Pharmacol. Sci.* **18**:484; рис (b) из С. S. Lowenstein et al., 1994, *Ann. Intern. Med.* **120**:227].

Глава 6. Ca^{2+} -транспортирующие системы клетки

Особая роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера и большое количество Ca^{2+} -транспортирующих систем, принимающих участие в регуляции уровня Ca^{2+} в клетке позволяют выделить кальциевую систему сигнализации в отдельную область внутриклеточной сигнализации. В данном разделе подробно рассмотрены Ca^{2+} -транспортирующие системы и механизмы регуляции уровня Ca^{2+} в клетка.

Введение

Поддержание низкой концентрации ионов кальция чрезвычайно важно для нормального функционирования клетки, поскольку длительное повышение уровня кальция в цитозоле приводит к гибели клетки. Большинство Ca^{2+} -регулируемых процессов в клетке происходит при изменении концентрации Ca^{2+} в диапазоне 10^{-7} - 10^{-6} М, тогда как концентрация Ca^{2+} во внеклеточной среде близка к 10^{-3} М. С другой стороны, мембранный потенциал эукариотических клеток в покое составляет от -40 до -90 mV (внутри минус). Таким образом, катионы, такие как Ca^{2+} , будучи распределены согласно электрохимическому градиенту, должны присутствовать в цитоплазме в гораздо более высоких концентрациях, чем 10^{-7} М. Следовательно, в клетках имеются механизмы, которые выводят ионы Ca^{2+} наружу.

Эукариотические клетки содержат системы транспорта Ca^{2+} в плазматической мембране, в митохондриях и в эндоплазматическом ретикулуме. Как правило, плазматическая мембрана содержит три системы: Ca^{2+} -каналы, специфичную АТФазу и Na^+ - Ca^{2+} обменник.

Вход Ca^{2+} в клетки по градиенту концентрации осуществляется, в основном, по Ca^{2+} -каналам плазматической мембраны. Выход Ca^{2+} осуществляется Ca^{2+} -АТФазой и Na^+ - Ca^{2+} обменником. Уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ поддерживается также Ca^{2+} -АТФазой эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондриальными Ca^{2+} -транспортирующими системами. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитоплазме происходит при открывании кальциевых каналов и входе кальция по градиенту концентраций. Повышение уровня Ca^{2+} опосредует такие реакции клетки как освобождение нейромедиатора в нервном синапсе, расщепление гликогена при воздействии адреналина на клетки мышц, апоптоз, сократительную активность мышечных волокон, и многие другие.

Некоторые патологии, такие как гипертония и сердечная недостаточность могут быть связаны с нарушением транспорта Ca^{2+} . Однако, кратковременное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ необходимо для регуляции активности Ca^{2+} -зависимых ферментов в ответ на разнообразные факторы: гормоны, нейромедиаторы, факторы роста и антигены. Ca^{2+} -каналы являются рецепторами некоторых внеклеточных и внутриклеточных стимулов. Каналы-рецепторы имеют специальные участки в своей структуре, необходимые для связывания лигандов или служащие сенсорами для некоторых стимулов. Примерами таких структур являются потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы, рианодинотический и IP_3 рецепторы.

1. Кальциевые каналы

1.1. Кальциевые каналы плазмалеммы

Наиболее важными мембранными структурами, контролирующими поток Ca^{2+} через поверхностную мембрану, являются Ca^{2+} -каналы. При активации каналы образуют мгновенные ионселективные поры, через которые ионы Ca^{2+} проникают внутрь клетки по направлению градиента концентрации. Существует три основных типа кальциевых каналов, классифицированные на основе их регуляторных механизмов - потенциал-управляемые (voltage-operated channels-VOC или Voltage-gated Ca^{2+} -channel - VGCC), рецептор-управляемые (receptor-operated channels-ROC), и управляемые опустошением ретикулярных кальциевых депо (store-operated channels-SOC).

1.1.1. Потенциал-управляемые кальциевые каналы (*Voltage-gated Ca²⁺-channel; VGCC, или Voltage operated channel; VOC*)

Свойства. Потенциал-управляемые каналы впервые были обнаружены в электровозбудимых клетках. Они характеризуются тем, что при потенциале покоя (-70-80 мВ) находятся в неактивном состоянии, а их активация происходит при сдвиге потенциала в положительную область, т.е. при деполяризации мембраны. Часто VOC находят там, где Ca²⁺ запускает секрецию, т.е. не только в электровозбудимых, но и эндокринных клетках. Идентифицировано несколько типов VOC, различающихся по чувствительности к мембранному потенциалу и фармакологическим веществам, а также по проводимости: L-, T-, N- и P-типы. Первые два типа каналов получили название по длительности инактивации, а два последних по типу клеток, где они были обнаружены. L-тип Ca²⁺-каналов найден практически во всех электровозбудимых, и во многих электронеовозбудимых клетках. Каналы L-типа (символ L обозначает long-lasting, т.е. долгоживущие), будучи активированы, сохраняют это состояние довольно долго. Их повторяющиеся открывание обеспечивают длительный кальциевый ток через мембрану. Характерным признаком кальциевых каналов L-типа является их чувствительность к дигидропиридинам и другим кальциевым антагонистам. Каналы T-типа (от английского слова transient – кратковременный) открываются при существенно более отрицательном по сравнению с каналами L-типа мембранном потенциале и быстро инактивируются. Для активации каналов T-типа также требуется кратковременная гиперполяризация, необходимая для того, чтобы снять эффект инактивации. Через каналы T-типа в клетки поступает быстрая составляющая кальциевого тока. Эти два типа кальциевых каналов осуществляют вход Ca²⁺ в клетки сердца. В нейронах обнаружен третий тип кальциевых каналов N-типа (N означает neuron). N-каналы активируются при переходе от очень отрицательных значений мембранного потенциала к сильной деполяризации и регулируют секрецию нейромедиаторов. Ток кальция через такие каналы в пресинаптических окончаниях ингибируется норадреналином через альфа-адренорецепторы. Каналы P-типа выявленные первоначально в нейронах Пуркинью (от чего и происходит их название), присутствуют в гранулярных клетках и в гигантских аксонах кальмара. По-видимому, эти каналы также регулируют секрецию нейромедиаторов. Каналы L (нейронный подтип)-, T-, N-, P/Q-, и недавно описанный R-тип индуцируют выброс нейротрансмиттера из пресинаптического окончания нейрона.

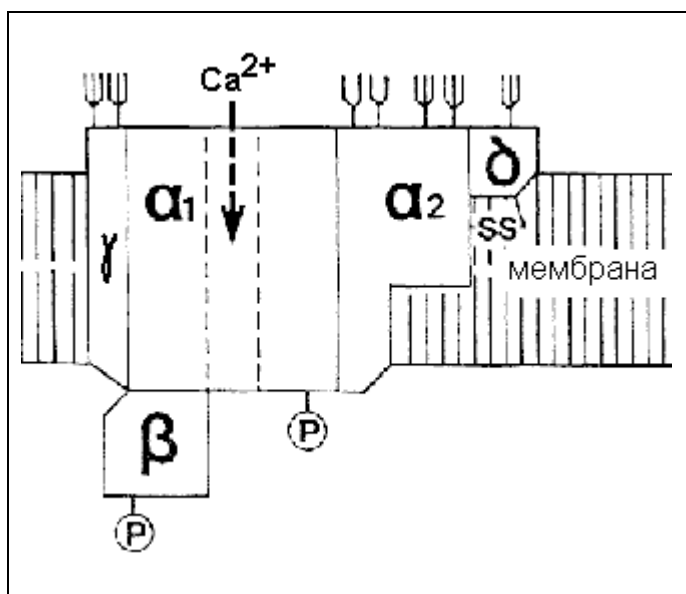


Рис. 6.1 Субъединичная структура потенциал-управляемого кальциевого канала. Указаны места фосфорилирования (P), гликозилирования (Ψ, Υ) и дисульфидный мостик (-SS-).

Структура. VGCC скелетных мышц состоит из пяти субъединиц: α₁ (175 кД), α₂ (143 кД), β (54 кД) и γ (30 кД), и δ (27 кД), которые связаны друг с другом нековалентными связями, а α₂ и δ еще и дисульфидными мостиками (рис.6.1). Все пять субъединиц кодируются четырьмя генами, поскольку α₂ и δ образуются в результате протеолитического расщепления одного пептида. Субъединица α₁ образует проводящий канал, несет сенсор

потенциала и участок связывающий дигидропиридин. Эта субъединица является основной функциональной единицей и состоит из четырех повторяющихся мотивов с шестью трансмембранными доменами (сегментами) в каждом (рис. 6.2).

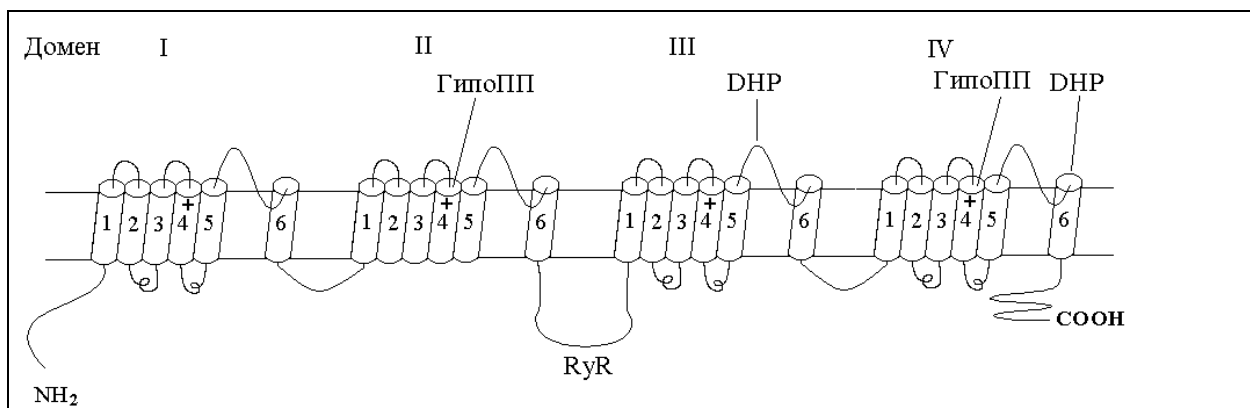


Рис. 6.2 Строение субъединицы α_1 потенциал-управляемого кальциевого канала. Сенсоры напряжения обозначены как "+". Указаны область взаимодействия с RyR, и точечные мутации (замена His на Arg), коррелирующие с периодическим параличом.

Можно представить себе следующий механизм перехода Ca^{2+} через канал: сначала катион связывается с отрицательно заряженными остатками Glu в устье канала, а затем проходит по порообразующей структуре канала. Сегмент 4, по-видимому, служит сенсором потенциала. При деполяризации мембраны происходит сдвиг чувствительного сенсора вызывающий конформационное изменение и открывание канала. Было показано, что внешняя петля между сегментами 5 и 6 в домене III и участок сегмента 6 домена IV образуют рецептор для дигидропиридинов (DHP). Известно, что участок, ответственный за сопряжение VGCC с риаудиновым рецептором (RyR) локализован в цитоплазматической петле между доменами II и III. Основная изоформа субъединицы α_1 (175 кД) в скелетных мышцах образуется в результате протеолитического расщепления предшественника α_1 (212 кД). Субъединицы β и α_2 также как и α_1 имеют сайты фосфорилирования, что указывает на их регуляторную роль в активности канала.

Таблица 6.1 Характеристики потенциал-управляемых кальциевых каналов.

Тип канала	порог активации	Распределение	Антагонист
L (long, медленная инактивация), α_1S , α_1C , α_1D	-10 мВ	скелетные, гладкие и сердечные мышцы, эндокринные клетки, некоторые нейроны	верапамил, нифедипин, нимодипин, нитрендипин, дилтиазем, лоперамид, ω -агатоксин IIIA, кальцисептин
T (transient, быстрая инактивация), α_1G , α_1H	-70 - -60 мВ	сердце, нейроны, эндокринные клетки	неполное ингибирование (примерно на 30%) ω -агатоксином IVA
N (neuronal), α_1B	-40 - -30 мВ	только в нейронах	лоперамид, ω -конотоксин GVIA, ω -конотоксин MVIIIC, ω -агатоксин IIIA, ω -граммотоксин SIA
P/Q (purkinje), α_1A		только в нейронах	ω -агатоксин IVA, ω -конотоксин MVIIIC, ω -граммотоксин SIA

VGCC скелетных мышц называют также дигидропиридиновым рецептором (DHPR) из-за его чувствительности к 1,4-дигидропиридинам. Некоторые дигидропиридины действуют как активаторы (в частности Bay K 8644), тогда как другие как ингибиторы. Дигидропиридиновые рецепторы скелетных мышц отличаются от каналов L-типа в других тканях. В скелетных мышцах DHPR находятся в инвагинациях плазматической мембраны - так называемых Т-трубочках (рис. 6.3).

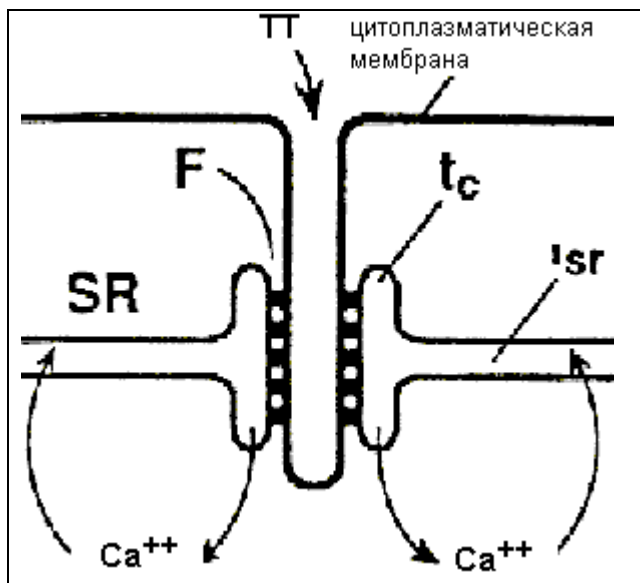


Рис. 6.3 Схема контакта между цитоплазматической мембраной (сарколеммой) и сарко/эндоплазматическим ретикуломом. TT (transverse tubule)- поперечная трубочка, SR - саркоплазматический ретикулум, tc - терминальная цистерна, l_{sr} - продольная трубочка SR, F - так называемая область "ножки" (foot-region).

На цитоплазматической стороне участка (называемого триадой), где плазматическая мембрана тесно соприкасается с терминальными цистернами саркоплазматического ретикула, DHPR образуют непосредственные контакты с расположенными на SR риаодиновыми рецепторами. Преобладающая точка зрения заключается в том, что физический контакт между DHPR и RyR отвечает за сопряжение импульса деполяризации с механическим сокращением. Механическая модель предполагает, что при деполяризации мембраны Т-трубочки движение зарядов (предполагается, что это движение электроразряженных аминокислотных остатков рецептора) в сенсоре напряжения непосредственно передается в конформационное изменение RYR, которое, в свою очередь, приводит к открыванию канала RyR. В других тканях, как, например, сердечной или гладкомышечной DHPR и RyR не соприкасаются непосредственно друг с другом. Электромеханическое сопряжение происходит в этом случае за счет входа Ca²⁺ в цитоплазму через канал DHPR и активации RyR вследствие повышения [Ca²⁺]_i. Непосредственное сопряжение DHPR и RyR в скелетных мышцах обеспечивает быстрый (за миллисекунды) механический ответ на потенциал действия, что, по-видимому, не является существенным для гладких и сердечных мышц. Хотя в некоторых скелетных мышцах только часть RyR сопряжена с DHPR, тогда как другая часть остается свободно распределенной на SR, и, очевидно, служит для усиления выхода Ca²⁺ из SR. VGCC L-типа блокируются некоторыми органическими азотосодержащими липофильными соединениями: производными 1,4-дигидропиридина (нифедипин, нитрендипин), фенилалкиламинами (верапамил, D-600), производными бензотиазепа (дилтиазем), а также специфическим ингибитором каналов L-типа кальцисептином. Участки связывания дигидропиридина находятся с внешней стороны мембраны, а участки связывания верапамила и дилтиазема на цитоплазматической стороне канала [1]. Кроме того, VGCC блокируются катионами металлов, которые имеют большее сродство связывания с каналом, нежели Ca²⁺. Наиболее эффективными блокаторами VGCC являются лантаноиды, действующие в микромолярных концентрациях. Отмечалось, что эффективность блокирования зависит от радиуса катиона, чем меньше радиус, тем эффективнее блокирование. Следует отметить, что ряд катионов, таких, как, например Mn²⁺, рассматриваемых как блокаторы кальциевых каналов, могут входить в некоторые клетки, и этот вход ингибируется Ni²⁺, из чего следует, что VGCC могут быть проницаемы для некоторых катионов-блокаторов.

Регуляция. Известно, что G-белки, сопряженные с пуринорецепторами, являются отрицательными регуляторами каналов VGCC N- и P/Q-типов [2]. Отрицательная регуляция может быть как опосредованной через вторичные мессенджеры, такие как cAMP и cGMP (уровень которых зависит от активности G-белков), так и прямой – в результате непосредственного взаимодействия G-белка с VGCC. Показано, что субъединица $G_{\beta\gamma}$ также может взаимодействовать с каналом и модулировать его активность [3]. Действие cAMP и cGMP на VGCC, в свою очередь, опосредовано соответствующими cAMP- и cGMP-зависимыми протеинкиназами. Активация мускаринового рецептора m2 вызывает ингибирование VGCC L-типа, тогда как повышение cGMP, индуцированное норадреналином, ингибирует VGCC L-типа посредством активации PKC. Фосфорилирование субъединицы α_1 cAMP-зависимой и CaM-зависимой протеинкиназами увеличивает проводимость каналов L-типа. Тогда как, норадреналин-индуцированное повышение cGMP ингибирует VGCC L-типа посредством активации cGMP-зависимой протеинкиназы. Таким образом, cAMP-зависимая и CaM-зависимая протеинкиназы оказывают активирующее действие на VGCC L-типа, а cGMP-зависимая протеинкиназа и протеинкиназа C ингибируют проводимость этого канала. Различное действие протеинкиназ на активность каналов объясняется тем, что протеинкиназы имеют различные сайты фосфорилирования на канале. Таким образом, VGCC могут служить мишенями для разных сигнальных каскадов, и их действие может быть как аддитивным, так и взаимонейтрализующим. Наконец, активность каналов могут регулировать жирорастворимые вторичные мессенджеры, такие как, например, липоксигеназные метаболиты арахидоновой кислоты. Эффект арахидоновой кислоты зависит от типа клеток и типа каналов: в одних случаях этот эффект ингибирующий, тогда как в других случаях, напротив, активирующий.

1.1.2. Рецептор- управляемые каналы (receptor-operated channels, ROC).

К рецептор-управляемым относятся Ca^{2+} каналы, которые активируются исключительно по рецептор-опосредованному пути, а не в результате деполяризации плазматической мембраны. Различают три подгруппы рецептор-управляемых ионных каналов, участвующих в транспорте Ca^{2+} .

1.1.2.1. Истинные рецептор-управляемые каналы

К этой подгруппе относятся каналы, в которых рецептор либо сам выполняет функцию канала, либо непосредственно взаимодействует с канальной структурой. Примером такого канала является **никотиновый холинорецептор**, который представляет собой неселективный катионный канал. Канал проницаем для Ca^{2+} , однако в физиологических условиях он транспортирует преимущественно Na^+ и K^+ . К числу истинных рецептор-управляемых каналов относятся каналы, активируемые глутаминовой кислотой (**NMDA-рецепторы**) и адениновыми нуклеотидами (**P₂-пуринорецепторы**). Ca^{2+} каналы, активируемые глутаминовой кислотой через рецепторы, агонистом которых является N-метил-D-аспартат (NMDA), в электрофизиологическом плане изучены подробно. Условиями открытия канала являются связывание глутамата с рецептором и деполяризация мембраны, приводящая к удалению Mg^{2+} , который является блокатором канала. Это достигается совместным действием двух агонистов - нейротрансмиттеров, один деполяризует клетку и готовит ее к взаимодействию с глутаматом. **Glu** может делать и то и другое сам, активируя вначале AMPA рецепторы, обеспечивающие деполяризацию постсинаптической клетки. Механизм работы ацетилхолиновых и Glu рецепторов хорошо известен. Рецептор находится в непосредственном контакте с малоселективным катионным каналом, и активация рецептора приводит к открыванию канала.

Активируемые **адениновыми нуклеотидами** кальциевые каналы были зарегистрированы первоначально в гладкомышечных клетках ушной артерии кролика. Сопряженные с P₂-

пуринорецепторами каналы были обнаружены в макрофагах, в тромбоцитах, сердце. ATP/ADP-активируемые Ca^{2+} каналы широко распространены в клетках животных. На рис.6.4 показаны основные каналы, принимающие участие в регуляции уровня Ca^{2+} в цитозоле.

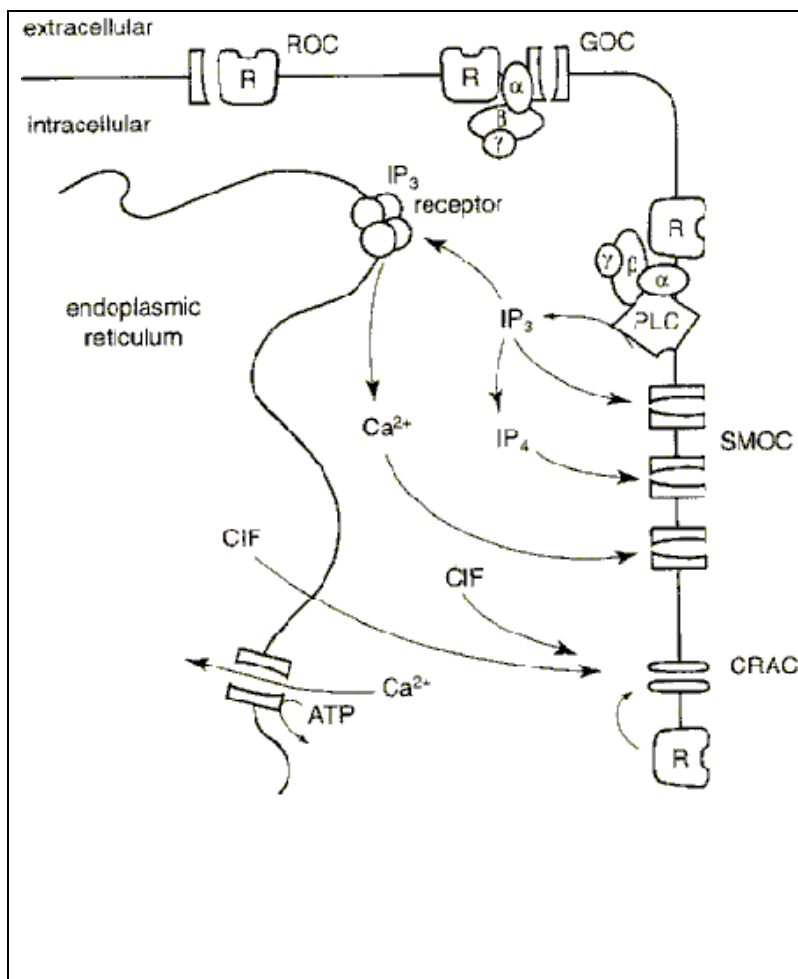


Рис. 6.4 Механизмы и пути входа Ca^{2+} в клетку при активации рецептора. Вход Ca^{2+} может происходить через рецептор-оперируемые каналы (**ROC**), G-белок-оперируемые каналы (**GOC**), каналы, активируемые вторичными мессенджерами - second-messenger-operated channel (**SMOC**) и каналы, регулируемые высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо - Ca^{2+} -release-activated channel (**CRAC**). Представлены 3 типа SMOC: 1) активируемые инозитол-1,4,5-трифосфатом (**IP₃**); 2) инозитол-1,3,4,5-тетрафосфатом (**IP₄**); и **Ca²⁺**. CRAC может быть активирован фактором входа Ca^{2+} (**CIF**) или прямым взаимодействием с мембранным рецептором (**R**).

1.1.2.2. Ca^{2+} -каналы, активируемые вторичными посредниками.

В эту подгруппу входят Ca^{2+} каналы, сопряжение которых с рецепторами происходит при участии вторичных посредников (second messenger-operated channels-SMOC). В качестве активаторов Ca^{2+} -транспортирующих каналов плазматической мембраны могут выступать инозитол-1,4,5-трифосфат, инозитол-1,3,4,5-тетрафосфат, ионы Ca^{2+} и циклические нуклеотиды (сGMP и сAMP).

Данные о влиянии продуктов фосфоинозитидного метаболизма на ионную проницаемость плазматической мембраны очень фрагментарны. Из активируемых вторичными посредниками проводящих Ca^{2+} каналов лучше всего исследованы сGMP/сAMP-чувствительные каналы. Они представляют собой низкоселективные катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами с внутренней стороны мембраны. Впервые эти каналы были обнаружены в палочках сетчатки (Fesenko et al., 1985), а затем их существование было показано в колбочках сетчатки (Nakamura & Gold, 1987). В фоторецепторных клетках эти каналы активируются под действием сGMP. Чувствительные к циклическим нуклеотидам каналы относятся к типу лиганд-активируемых каналов. Они открываются при непосредственном связывании с ними циклических нуклеотидов - сGMP (фоторецепторы) и сAMP/сGMP (обонятельные нейроны), без участия протеинкиназ. Каналы образованы одним полипептидом с молекулярной массой около 75 кД. Анализ аминокислотных последовательностей показывает, что в молекуле чувствительных к циклическим нуклеотидам каналов имеется шесть трансмембранных доменов и, по крайней мере, один участок гликозилирования с

наружной стороны мембраны. В функционально активном состоянии cAMP/cGMP-чувствительные каналы представляют собой гомоолигомер, образованный четырьмя или пятью 75 кД-полипептидами.

1.1.2.3. Ca²⁺-каналы, регулируемые высвобождением Ca²⁺ из внутренних депо (store-release-activated channel, CRAC).

Гипотеза о сопряжении входа наружного Ca²⁺ с его высвобождением из внутриклеточных кальциевых депо была выдвинута в 1981 году (Casteels & Droogmans, 1981) и затем получила свое дальнейшее развитие в работе Патни (Putney, 1986). Суть гипотезы первоначально заключалась в том, что после высвобождения Ca²⁺ из эндоплазматического ретикула и других чувствительных к гормонам эндогенных кальциевых хранилищ, их последующее заполнение происходит не только за счет обратного транспорта Ca²⁺ из цитоплазмы АТРазами, но и в результате прямого поступления туда внеклеточного Ca²⁺. Предполагалось, что образуется физический контакт между плазматической мембраной и мембраной внутриклеточных резервуаров Ca²⁺. В месте контакта образуется пора, через которую и пополняются внутриклеточные кальциевые депо. Согласно обсуждаемой гипотезе, необходимым условием активации входа Ca²⁺ по такому механизму является опустошение эндоплазматического ретикула или других хранилищ эндогенного кальция. Впоследствии все-таки установилось мнение, что кальций входит сначала в цитозоль, и потом закачивается во внутриклеточный пул, повышение концентрации Ca²⁺ в котором приводит к прекращению входа. Каким образом может осуществляться сопряжение между входом Ca²⁺ и внутриклеточными резервуарами, совершенно неясно. Неизвестен также механизм транспорта Ca²⁺ через плазматическую мембрану. Первоначально канал емкостного входа CCE1 (гены *trp* и *trp1*) был выделен из фоторецепторных клеток *Drosophila* [4]. Недавно его близкие гомологи были выделены из клеток мозга млекопитающих [5].

Предполагается, что в активации этих каналов участвует некий мобильный фактор, высвобождающийся из опустошенного ER. На роль фактора выдвигались почти все субстанции, которые могут модулировать Ca²⁺-каналы, такие как G- белки ингибируемые коклюшным токсином, малые G-белки, cGMP, различные липиды, протеинкиназы и другие вещества. Наиболее интересным из предполагаемых кандидатов является фактор входа Ca²⁺ - CIF, выделенный из лимфоцитов, который представляет собой фосфорилированный анион и индуцирует вход Ca²⁺ в Т-лимфоцитах, макрофагах и фибробластах. Предполагается, что CIF высвобождается или образуется во внутриклеточных пулах при их опустошении.

1.2. Ca²⁺-каналы внутриклеточных структур

Выход Ca²⁺ из ER, помимо активации потенциалом действия в возбудимых клетках, также запускается каскадом сигналов, берущих начало от рецептора на клеточной мембране и приводящих к образованию инозитолтрифосфата (IP₃). Кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума - IP₃- рецептор и рианодиновый (R) рецептор являются тетрамерами, состоящими из больших субъединиц с молекулярной массой 310 и 565 кД, соответственно. Наличие некоторых общих последовательностей с наибольшей гомологией в области трансмембранного домена IP₃- и Ry-рецепторов определяет их способность к взаимодействию с одними и теми же агентами. Так, кофеин, сильный активатор рианодинового рецептора, оказывает слабое ингибирующее действие на IP₃-рецептор, а ингибитор IP₃-активируемого канала - гепарин является слабым активатором рианодинового рецептора. Было отмечено также влияние арахидоновой кислоты и лейкотриенов на внутриклеточные каналы. Общим и функционально наиболее важным участком этих рецепторов является Ca²⁺-связывающий сайт, обеспечивающий Ca²⁺-индуцируемое активирование и ингибирование рецепторов. Оба рецептора активируются низкими концентрациями Ca²⁺ и подавляются высокими, причем связывание специфического активатора увеличивает чувствительность к Ca²⁺. При этом IP₃- рецептор чувствителен к изменению Ca²⁺ в области наномолярных концентраций Ca²⁺, а рианодиновый рецептор - в более широком диапазоне, (рис. 6.8).

1.2.1. Рианодиновый рецептор

Рианодиновый рецептор (RyR) в мышечных клетках выполняет важнейшую функцию сопряжения потенциала действия с мышечным сокращением. В скелетных мышцах рианодиновые рецепторы активируются посредством специализированного механизма прямого электромеханического сопряжения, а сокращение сердечной мышцы запускается по механизму Ca²⁺-индуцированного выброса Ca²⁺.

Обнаружено три изоформы рианодинового рецептора: RyR1, RyR2 (обладающий 66% гомологией с RyR1) и RyR3, кодируемые тремя разными генами. Изоформа 1 найдена в скелетной мышце, 2- в сердце и некоторых нервных клетках, 3- в мозге, мышцах и невозбудимых клетках. RyR имеют несколько мест регуляции, которая осуществляется Ca²⁺, АТФ, кальмодулином (КМ), иммунофилином и кальцинеурином. Рецептор фосфорилируется СаКМ-зависимой протеинкиназой II (СаКМПК II) и дефосфорилируется кальцинеурином. В скелетных мышцах RyR1 расположен на цистернах СР примыкающих к цитоплазматической мембране и его длинный цитоплазматический "хвост" (так называемый "foot"-регион, или "ножка") соприкасается с дигидроперидиновым рецептором (DHPR) на плазмалемме (рис.6.5b). Однако, непосредственное функциональное взаимодействие между RyR и DHPR на молекулярном уровне еще не показано. Обсуждается вопрос об участии третьего белка в образовании контакта между RyR и DHPR.

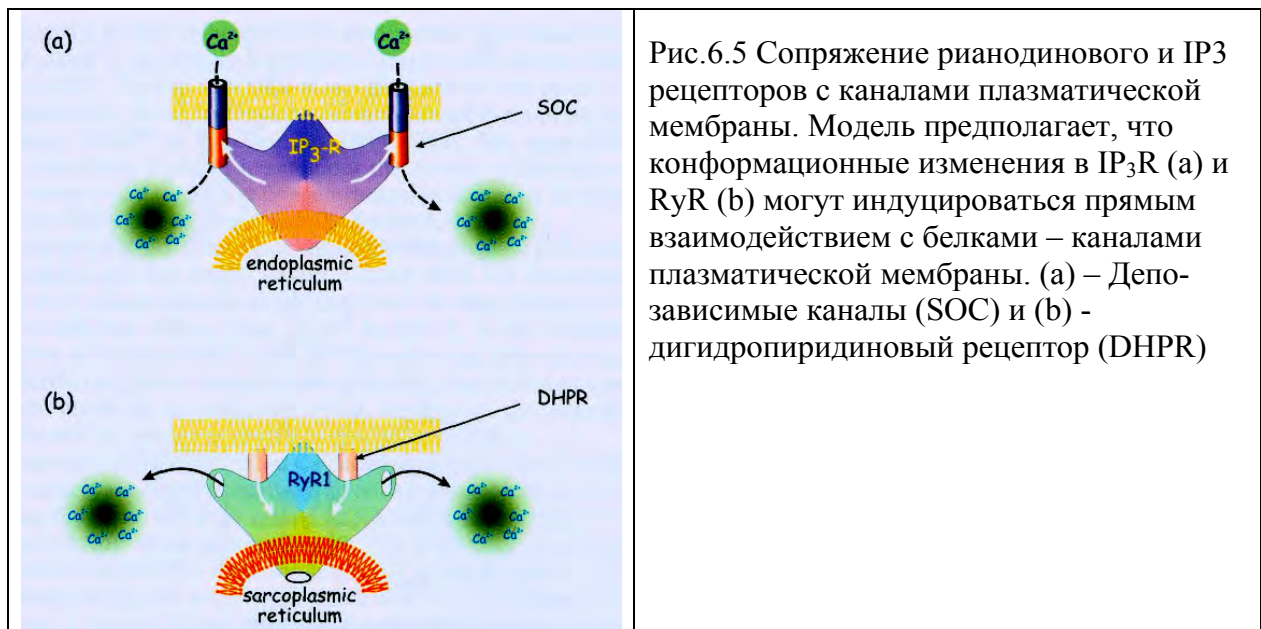


Рис.6.5 Сопряжение рианодинового и IP₃ рецепторов с каналами плазматической мембраны. Модель предполагает, что конформационные изменения в IP₃R (a) и RyR (b) могут индуцироваться прямым взаимодействием с белками – каналами плазматической мембраны. (a) – Депо-зависимые каналы (SOC) и (b) - дигидропиридиновый рецептор (DHPR)

Согласно разным структурным моделям С-конец RyR содержит от 4 до 10 (12) трансмембранных доменов, формирующих мембранную пору. Активность RyR модулируется растительным алкалоидом рианодином из коры *Ryania speciosa*, что и определило его название. На каналы изолированные из мышц позвоночных и ракообразных рианодин в концентрациях от нМ до мкМ оказывает активирующее влияние, тогда как в концентрациях выше 100 мкМ он вызывает полное закрывание каналов. Было постулировано, что рианодин связывается с каналом в открытом состоянии. Физиологическим активатором рианодинового рецептора, в частности его сердечной изоформы и рианодин-чувствительного Ca²⁺-канала яйцеклеток морских ежей является циклическая АДР-рибоза (сADPR) - наиболее мощный из известных Ca²⁺-высвобождающих агентов. Полумаксимальное высвобождение Ca²⁺ в гомогенатах яйцеклеток морских ежей наблюдается при наномолярных концентрациях сADPR, что на порядок ниже, чем для IP₃. Крутая зависимость активности RR от концентрации Ca²⁺ (см рис. 6.8) позволяет говорить о механизме выброса Ca²⁺ в присутствии сADPR как о **Ca²⁺-индуцированном выходе Ca²⁺**. сADPR синтезируется из NAD⁺ АДР-рибозилциклазами, обнаруженными в клетках многих млекопитающих и беспозвоночных. Сама сADPR быстро гидролизует в клетках, при этом продукт ее гидролиза, АДР-рибоза ингибирует рианодин-чувствительные Ca²⁺-каналы. Продукция сADPR стимулируется сGMP, что позволило предположить возможность его функционирования в качестве внутриклеточного мессенджера. Другая молекула nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) образуется при действии того же фермента АДР-рибозилциклазы, но субстратом является не NAD⁺, а NADP⁺.

СаКМ-зависимая протеинкиназа фосфорилирует все три изоформы рецептора, что приводит к его активации. Показано, что РКА и сGMP-зависимая протеинкиназа также способны фосфорилировать этот же сайт. Фосфорилирование этого сайта сАМР-зависимой протеинкиназой, в частности при стимуляции β-адренорецептора, активирует сердечную изоформу RyR. Генерация Ca²⁺-сигнала с участием сADPR, в настоящее время показана для ряда тканей и клеток, для млекопитающих и растений. У млекопитающих активация секреции везикул ацинарными клетками поджелудочной железы и секреции инсулина β-клетками весьма чувствительны к подъему Ca²⁺, вызванному именно этим циклическим нуклеотидом.

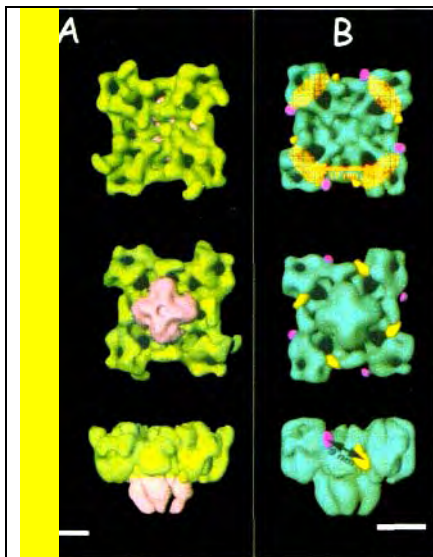


Рис. 6.6 (А) Трехмерная реконструкция структуры рианодинового рецептора из скелетной мышцы. Трансmemбранная часть окрашена розовым, цитоплазматическая - зеленым. Справа (В) показана локализация кальмодулина (желтый) и FKBP12 (фиолетовый). Этот связывающий иммуносупрессор FK506 белок, с мол. массой 12 кД, известный под названием иммунофилин, является интегральной частью структуры рецептора и может взаимодействовать с фосфатазой кальцинеурином. Оранжевым отмечена область взаимодействия с дигидропиридиновым рецептором. Масштабный указатель 10 нм.

1.2.2. Высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо под действием инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3).

IP_3 -рецептор является внутриклеточным Ca^{2+} -каналом активируемым IP_3 . Стимуляция ряда рецепторов на поверхности плазмалеммы их агонистами приводит к активации фосфолипазы C (PLC). Активная PLC расщепляет Ptd InsP₂ на диацилглицерол (DAG) и IP_3 , вызывающий высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных пулов через IP_3 -рецептор (IP_3R).

Молекулярная структура рецепторов инозитол 1,4,5-трисфосфата.

Рецепторы инозитол 1,4,5-трисфосфата проявляют заметное сходство в организации с RyR. Как уже отмечалось, все члены этих двух семейств являются тетрамерами, состоящими из больших субъединиц с молекулярной массой 310 и 560 кД, соответственно. Значительная степень гомологии между двумя семействами обнаруживается в домене, локализованном в COOH-конце, который шестикратно пронизывает мембрану и участвует в образовании канала. Оба типа каналов имеют геометрическую форму "цветной капусты" (вид в профиль) или розетки (вид спереди), приблизительно одинаковой ширины порядка 20 нм, но разной высоты: 10 и 18 нм для IP_3 и рианодинового рецептора, соответственно. Белок состоит из восьми трансмембранных доменов, формирующих проводящий канал для катионов. Вся остальная часть молекулы располагается на цитоплазматической стороне, где имеются места связывания IP_3 , Ca^{2+} , АТФ, а также два остатка Ser, фосфорилируемых PKA и PKG.

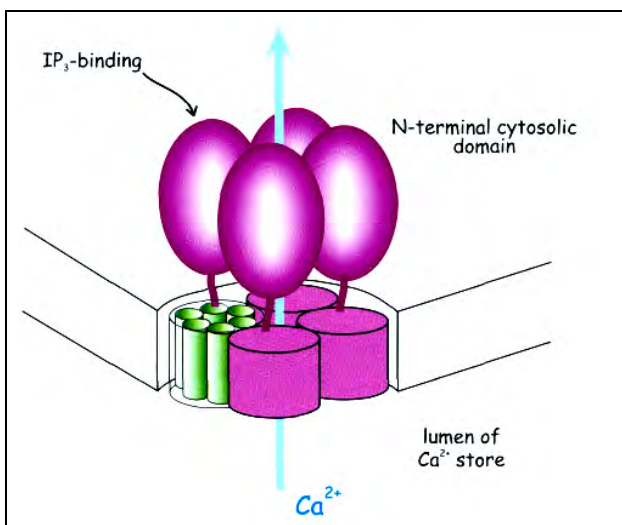


Рис 6.7. IP_3 рецептор Ca^{2+} канал

Было показано, что PKC и CaMKPK также фосфорилируют IP_3R , встроенный в липидные везикулы. IP_3 -рецептор, выделенный из мозжечка, может быть фосфорилирован сAMP-

зависимой протеинкиназой, РКС и СаКМРК II. Фосфорилирующая активность этих трех протеинкиназ аддитивна: каждая из них фосфорилирует IP₃-рецептор, добавляя фосфатный остаток в своем собственном участке молекулы белка. Аминокислотная последовательность IP₃-рецептора высоко консервативна, между белками мыши и крысы различие выявлено только в 21 аминокислотном остатке из 2749. В IP₃-рецепторе, два домена (с N-конца) обращены в сторону цитоплазмы. В наружном домене молекулы расположен участок связывания IP₃, в то время как примембранный домен является необходимым для контакта с мембраной и изменения конформации рецептора, которое вызывается связыванием IP₃, и приводит к открыванию канала. СООН-концевой участок молекулы, который ориентирован в цитозоль, также включен в контроль открывания канала. СООН-концевая последовательность включает цистеин, через который может быть опосредован стимулирующий эффект таких соединений, как окисленный глутатион и тимеросал. Идентифицированы два участка, богатых глицином, которые, как предполагается, являются регуляторными местами связывания АТР. Четыре состояния проводимости канала можно объяснить, по-видимому, тетрамерной структурой белкового комплекса IP₃-рецептора. Полагают, что тетрамерной структуре IP₃-рецептора соответствует четыре Са²⁺-канала с проводимостью 20 пСм каждый в составе одного белкового комплекса.

Факторы, влияющие на высвобождение Са²⁺ из внутриклеточных депо под действием IP₃.

Основное влияние на проводимость канала оказывает связывание Са²⁺, и IP₃. В большинстве клеток млекопитающих полумаксимальная концентрация IP₃, вызывающая высвобождение Са²⁺, лежит в пределах 0,1-2 мкМ. Лишь в редких случаях сродство к IP₃ выше.

Высвобождение Са²⁺ из внутриклеточных депо мало зависит от температуры - на препаратах пермеабелизованных макрофагов и гепатоцитов оно наблюдалось даже при снижении температуры до 0-4°C. Блокирование каналов гепарином объясняется его взаимодействием с участками связывания IP₃.

Действие на кальциевый выброс по некоторым сообщениям является высококооперативным. Кинетические характеристики согласуются с данными о гомоолигомерной структуре кальциевого канала, который в нативном виде представляет собой комплекс из четырех одинаковых субъединиц.

Выход Са²⁺ через ионные каналы сопровождается переносом заряда, для компенсации которого необходим противоток другого иона. Этот противоток обеспечивается ионами калия, входящими внутрь везикул из цитоплазмы. Блокатор К⁺-каналов тетраэтиламмоний подавляет выход Са²⁺.

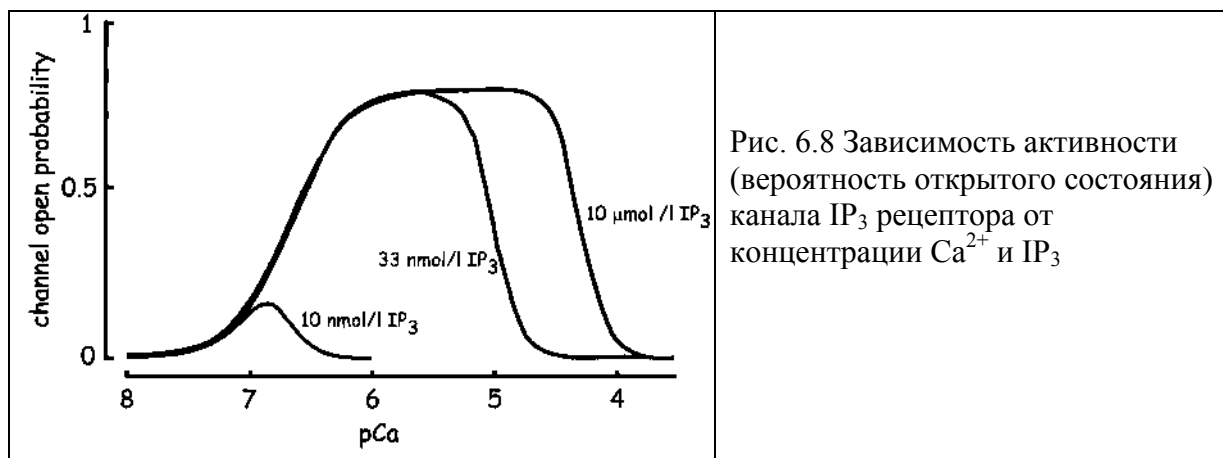


Рис. 6.8 Зависимость активности (вероятность открытого состояния) канала IP₃ рецептора от концентрации Са²⁺ и IP₃

Индукционное IP₃ высвобождение Са²⁺ зависит от концентрации Са²⁺ в среде. Выброс Са²⁺ потенцируется субмикромольными концентрациями ионов кальция и подавляется с ростом их концентрации. Связывание [³H]-IP₃ с рецепторами мембран мозжечка обратимо ингибируется Са²⁺ - полумаксимальное ингибирование наблюдается в

присутствии 300 нМ Ca^{2+} . При 10 мкМ концентрации Ca^{2+} связывание IP_3 полностью подавляется. Ca^{2+} -зависимое ингибирование связывания IP_3 с рецептором опосредовано белком - кальмедином. В периферических нервах кальмедин отсутствует или его содержание значительно ниже, чем в центральной нервной системе. Чувствительность RyRs к кальцию тоже колоколообразная. Закрытие канала при микромолярных концентрациях кальция препятствует полному опустошению ретикулума и ограничивает амплитуду Ca^{2+} сигнала в цитозоле.

Биохимические исследования идентифицировали специфические места связывания АТФ на каждой субъединице IP_3R с аффинностью 17 мкМ. Добавление АТФ изменяет вероятность открывания и проводимость каналов. АТФ также способен “вытеснять” IP_3 из IP_3 -специфических сайтов, подтверждая тем самым, что в характерных для клеток миллимолярных концентрациях АТФ может эффективно конкурировать с IP_3 .

2. Кальциевые насосы внешней и внутренних мембран клетки.

2.1. Ca^{2+} -АТРАЗЫ плазмалеммы. АТРАЗы типа РМСА

В цитоплазме покоящихся клеток концентрация ионизированного Ca^{2+} по разным оценкам варьирует от 50 до 200 нМ, что на четыре порядка ниже концентрации Ca^{2+} в плазме крови и во внеклеточной жидкости. Основной вклад в поддержание низкой концентрации цитоплазматического Ca^{2+} вносят кальциевые АТРАЗы внутриклеточных мембран (гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, так называемых кальциосом, некоторых других внутриклеточных замкнутых мембранных структур) и плазматической мембраны клеток. Ca^{2+} -АТРАЗы плазмалеммы переносят Ca^{2+} с цитоплазматической стороны во внешнюю среду, а Ca^{2+} -АТРАЗы внутриклеточных компартментов в люмен органелл. Кальциевые АТРАЗы являются молекулярным насосом использующим для переноса ионов и молекул против электрохимического градиента энергию гидролиза АТР. Они относятся к так называемому E_1, E_2 -классу транспортных АТРАЗ. В этот же класс входят Na^+, K^+ -АТРаза и H^+, K^+ -АТР-аза кишечника. Для этой группы ферментов характерно образование в ходе реакции фосфорилированного интермедиата (по аспартатному остатку), поэтому их еще обозначают как АТРАЗы Р-типа. E_1 Р-фосфорилированный интермедиат не следует путать с фосфорилированием Ca^{2+} -АТРАЗ Ca^{2+} /кальмодулин-киназой, процессом, который увеличивает активность насоса без изменения его сродства к Ca^{2+} . Ca^{2+} -АТРаза плазматических мембран впервые была описана в эритроцитах человека и позднее обнаружена в других типах клеток.

Такие АТРАЗы блокируются ортованадатом, имитирующим фосфат, который связывается с аспартатом АТРАЗы и блокирует ее в "псевдофосфорилированном" состоянии. Возле Asp лежит последовательность: Asp*-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu(Ile)-Thr инвариантная среди Р-АТРАЗ. Все представители этого типа АТРАЗ имеют довольно сходную топологию: 10 трансмембранных доменов (ТМ), и два больших цитоплазматических домена между 2 и 3, 4 и 5 ТМ. Р-тип в свою очередь делят на пять филогенетических групп: группа I - АТРАЗы транспортирующие ионы тяжелых металлов; группа II - Ca^{2+} -АТРАЗы, Na^+, K^+ - АТРАЗы и H^+, K^+ -АТРАЗы; группа III - H^+ -АТРАЗы и Mg^{2+} -АТРАЗы; группа IV - фосфолипидные АТРАЗы; и группа V - АТРАЗы без определенной специфичности. При работе АТРАЗы происходит цикл структурных изменений фермента. Первый шаг - это связывание Ca^{2+} -АТРАЗой двух ионов кальция с константой порядка 10^{-6} М (рис. 6.9)

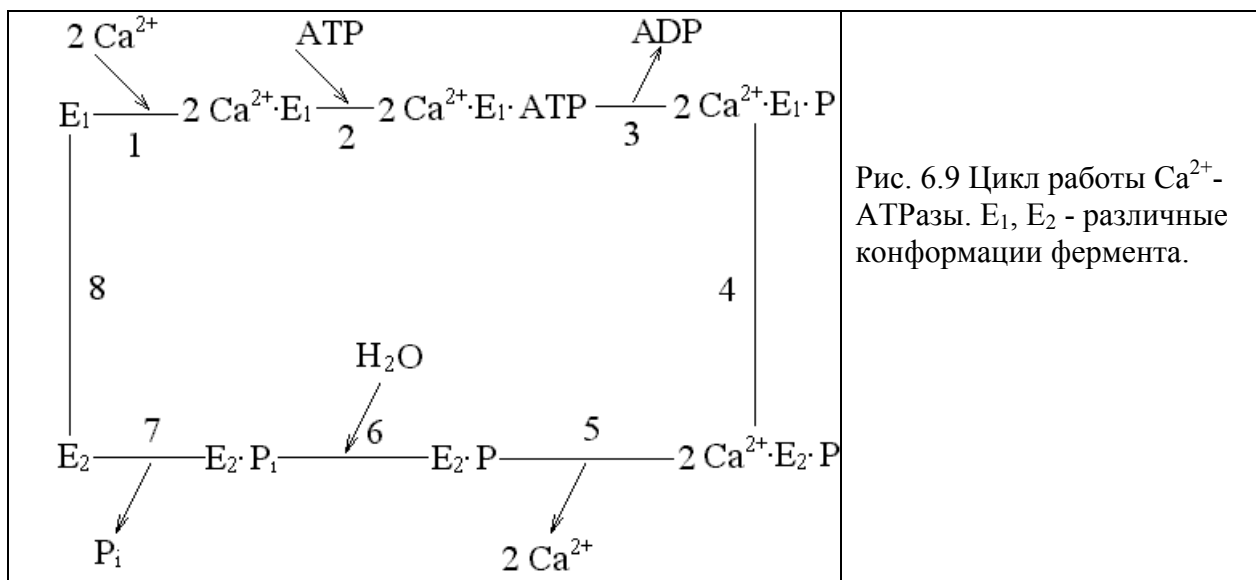


Рис. 6.9 Цикл работы Ca^{2+} -АТРАЗы. E_1, E_2 - различные конформации фермента.

Эта константа примерно в 30000 раз выше для Ca^{2+} чем для Mg^{2+} , что позволяет Ca^{2+} -АТРАЗе с высокой селективностью отсортировать Ca^{2+} от Mg^{2+} . Связывание Ca^{2+} повышает сродство АТРАЗы к АТР, которая связывается с ферментом на втором шаге, причем АТР в физиологических условиях связывается как комплекс Mg^{2+} -АТР. На третьем шаге происходит перенос фосфатной группы с АТР на остаток Asp с образованием высокоэнергетической ковалентной связи, которая обуславливает

дальнейшие конформационные изменения фермента. Далее происходит перенос Ca^{2+} с цитоплазматической стороны на противоположную сторону. Можно предположить, что некоторые домены Ca^{2+} -АТРАЗы образуют гидрофильную пору закрытую с цис-стороны каким-то подвижным доменом фермента, сдвиг которого переносит Ca^{2+} в гидрофобную пору. Однако, последняя работа по рентгеноструктурному анализу, где было достигнуто атомное разрешение структуры, свидетельствует лишь об очень узкой щели, заполняемой только двумя ионами Ca^{2+} . Домены ТМ4-ТМ6 и ТМ8 образуют сайт связывания для двух ионов Ca^{2+} и ТМ6 образует сайт связывания для одной молекулы воды. С цитоплазматической стороны имеется довольно широкое устье доступное для семи молекул воды, через которое Ca^{2+} может подойти к трансмембранному участку. Таким образом, конформационные изменения фермента приводящие к переносу Ca^{2+} еще не выяснены. Ключевая стадия работы фермента (5), это уменьшение сродства к Ca^{2+} после его переноса. Уменьшение сродства приводит к диссоциации Ca^{2+} . В дальнейшем происходит отщепление фосфата от Asp (6) и его диссоциация (7), после чего фермент возвращается в нормальное состояние. Согласно опубликованным данным перенос Ca^{2+} сопровождается антипортом протонов H^+ [6].

Трансмембранные домены (ТМ) образованы гидрофобными α -спиралями (рис.6.10).

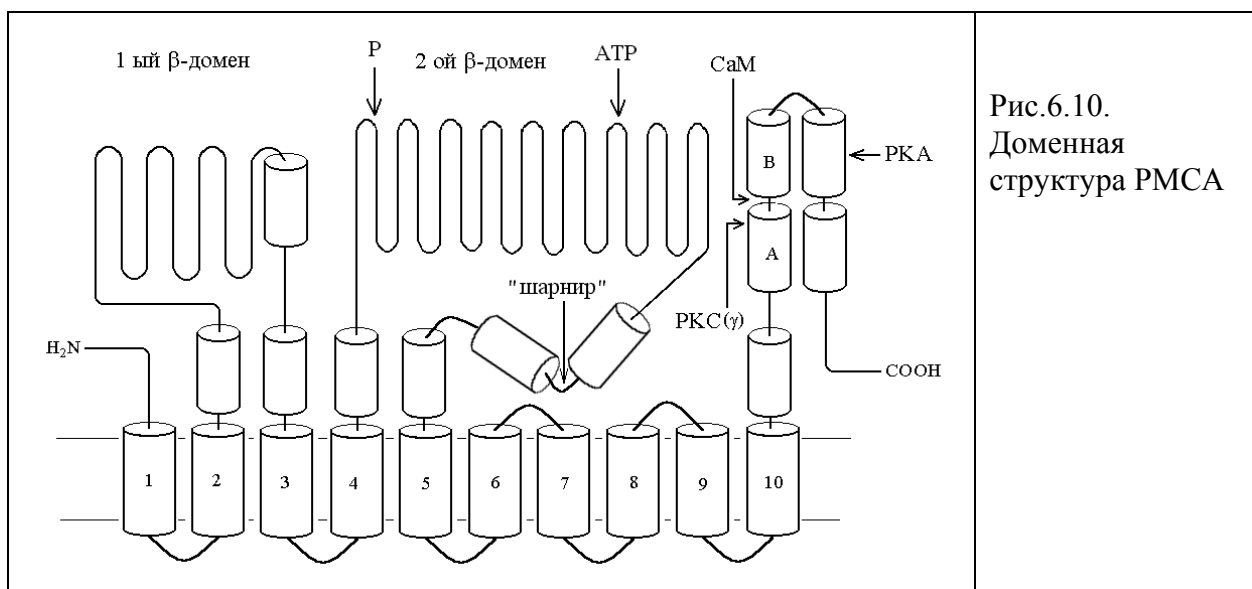


Рис.6.10.
Доменная структура РМСА

α -спиральные структуры С-конца могли бы образовывать одиннадцатый ТМ, однако, последние данные полученные в результате рентгеноструктурного анализа свидетельствуют только о десяти трансмембранных доменах [7]. Первые пять α -спиралей выступают в цитоплазму, образуя так называемый "стебель". В белке имеются два длинных цитоплазматических фрагмента между 2 и 3 ТМ и между 4 и 5 ТМ, образуемые в основном β -слоями с некоторым количеством α -спиралей. Первый β -домен соответствует "трансдуцирующему" домену других АТРАЗ Р-типа, который по мнению некоторых авторов сопрягает гидролиз АТФ с переносом Ca^{2+} , хотя механизм этого сопряжения остается непонятным. Мутации в консервативных участках этого домена приводят к ингибированию перехода E_1 - E_2 . Этот домен имеет низкоаффинный сайт связывания АТФ, P_i и ванадата, и вероятно играет регуляторную роль в активности Ca^{2+} -АТРАЗы. Второй β -складчатый домен содержит сайт фосфорилирования Asp-475 в РМСА 1b (Asp-351 в SERCA 1a) с окружающими аминокислотами консервативным почти во всех АТРАЗ Р-типа. В этом домене имеется также высокоаффинный сайт связывания АТФ и сайт связывания ингибитора Ca^{2+} -АТРАЗ флуоресцин-5'-изотиоционата (FITC). В С-терминальной части этого домена имеются две α -спирали, между которыми происходит сгибание (так называемый "шарнир"), при переносе связанной АТФ к месту ее гидролиза.

Таблица 6.2 Сравнение свойств АТРаза типа PMCA и SERCA.

Общие свойства Ca ²⁺ -АТРАЗ	PMCA	SERCA
Молекулярная масса	134 000	110 000
Отношение АТР/Ca ²⁺	1:1	1:2
Отношение Ca ²⁺ /H ⁺	1:1 (1:2?)	1:1, 2:3
Сродство к АТР (K _m) высокоаффинный сайт низкоаффинный сайт	1-2,5 мкМ 145-180 мкМ	
Сродство к Ca ²⁺ (K _m)	> 10 мкМ (в покое) < 0,5 мкМ (в активном состоянии)	830 нМ (SERCA2a) 360 нМ (в активном состоянии)
Активаторы	СаМ (K _d =1 нМ), РКА, РКС, полиненасыщенные жирные кислоты, кислые фосфолипид	РКА, РКС
Ингибиторы	ванадат (K _{1/2} =3 мкМ), La ³⁺ (K _{1/2} =1 мкМ)	ВНQ, тапсигаргин, тимеросал, ванадат, La ³⁺

Ca²⁺ АТРаза плазматической мембраны имеет K_d= 0.2 мкМ. Na/Ca обменник плазматической мембраны в сердце K_d= 0.5-1 мкМ

Характерной особенностью фермента из плазматических мембран является его активация кальмодулином (КМ), который увеличивает сродство АТРаза к Ca²⁺ и максимальную скорость реакции.

Активация происходит в результате непосредственного взаимодействия фермента с КМ, что позволило выделять Ca²⁺-АТРаза плазматических мембран методом аффинной хроматографии на иммобилизованном КМ. В первом β-складчатом домене в АТРазах типа PMCA содержится участок фермента, чувствительный (или рецепторный) к действию "автоингибиторного" СаКМ-связывающего участка. На С-терминальном "хвосте" расположен СаКМ-связывающий участок, взаимодействие которого с рецепторным участком приводит к ингибированию Ca²⁺-АТРаза. При связывании СаКМ (также как и делеции СаКМ-связывающего участка) Ca²⁺-АТРаза становится постоянно активной, вследствие разобщения СаКМ-связывающего участка и его рецепторного сайта. В гепатоцитах обнаружена изоформа PMCA с большей молекулярной массой и нечувствительная к КМ [8]. СаКМ-связывающий участок окружен регионами с отрицательными зарядами, функция которых не выяснена, но которые могли бы представлять Ca²⁺-связывающие сайты. АТРаза типа PMCA имеют сайты фосфорилирования РКА и РКС. Сайт фосфорилирования АТРаза РКС лежит на СаКМ связывающем участке. Показано, что фосфорилирование Ca²⁺- АТРаза плазмалеммы РКС и РКА повышает ее активность. В сарколемме сердца, скелетных мышц и в плазматических мембранах эритроцитов АТРаза активируется путем фосфорилирования сАМР-зависимой протеинкиназой. Известно четыре гена кодирующие соответственно четыре формы PMCA 1, 2, 3 и 4, экспрессирующиеся в различных тканях млекопитающих. Молекулярная масса Ca²⁺-АТРаза плазматических мембран равна 138 кД. Реконструированный в фосфолипидных везикулах фермент переносит один ион Ca²⁺ при гидролизе одной молекулы АТР. В отличие от АТРаза ЭР кальциевый насос плазмалеммы переносит Ca²⁺ в обмен на протоны в наиболее вероятной стехиометрии один к двум, т.е. по электронейтральному механизму. Помимо КМ, Ca²⁺-АТРаза плазмалеммы находится под контролем ряда других регуляторных факторов, действующих как с внутренней, так и с внешней стороны мембраны. В некоторых клетках показано, что Ca²⁺-АТРаза плазматической мембраны непосредственно регулируется гормонами через соответствующие рецепторы. Так, окситоцин ингибирует Ca²⁺-АТРаза плазматической мембраны миоэпителиальной, а инсулин - АТРаза адипоцитов.

2.2. Ca^{2+} -АТРАЗЫ ЭР/СР, SERCA

Все клетки млекопитающих, за исключением эритроцитов, содержат органеллы, способные аккумулировать Ca^{2+} против электрохимического градиента и энергозависимым образом.

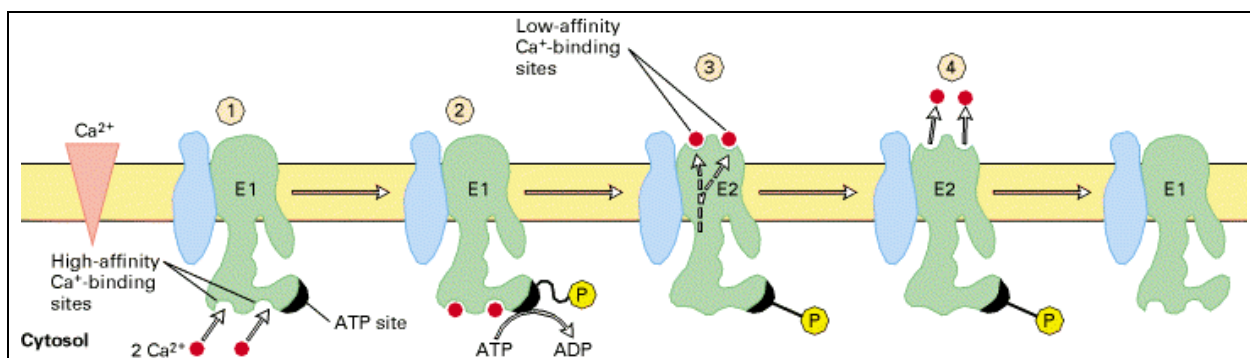


Рис.6.11 Модель механизма действия Ca^{2+} АТP-азы СР. Показана только одна из двух субъединиц. E1 и E2 являются альтернативными конформационными формами белка, в котором Ca^{2+} -связывающие участки находятся на цитозольной и внутренней поверхности ретикулярной мембраны соответственно. Ca^{2+} ионы (красные кружочки), $\sim\text{P}$ обозначает высокоэнергетическую ацил-фосфатную связь, P – низкоэнергетическую фосфоэфирную связь. [адаптировано из работ W. P. Jencks, 1980, *Adv. Enzymol.* **51**:75; W. P. Jencks, 1989, *J. Biol. Chem.* **264**:18855; and P. Zhang et al., 1998, *Nature* **392**:835.]

Структура Ca^{2+} -АТPаз ЭР/СР в значительной степени гомологична РМСА, однако, в отличие от них первые не обладают СаМ-связывающим доменом, и поэтому их активность не зависит от СаМ (таблица 4). Всего выделяют три типа Ca^{2+} -АТPаз ЭР/СР: SERCA1 экспрессируется исключительно в быстрых скелетных мышцах. Сплайсинговая изоформа SERCA2a экспрессируется со своим ингибитором фосфоламбаном в сердце и в медленных скелетных мышцах. Молекула фосфоламбана (25кД) состоит из 5 идентичных протомеров с молекулярной массой около 5 кД, пронизывающих мембрану СР и входящих в тесный контакт друг с другом внутри мембраны. Фосфоламбан связывает АТP в стехиометрии 1:1 и может фосфорилироваться как сАМP-зависимой протеинкиназой, так и Ca^{2+} -КМ-зависимой протеинкиназой. Полагают, что дефосфорилированный фосфоламбан связан с Ca^{2+} -АТPазой и ингибирует ее активность. Фосфорилирование фосфоламбана приводит к его отделению и активации АТPазы. Показано, что фосфоламбан в условиях совместной экспрессии с другими АТPазами способен ингибировать SERCA 1, но не SERCA 3, поскольку обе (SERCA 1 и SERCA 2) имеют участок связывания фосфоламбана, который следует за Asp-351. Фосфоламбан может фосфорилироваться протеинкиназами РКА, СаКМПК, РКС и сGMP-зависимой протеинкиназой. Возможно РКС фосфорилирует не только фосфоламбан, но и саму Ca^{2+} -АТPазу, активируя транспорт Ca^{2+} . SERCA 2b экспрессируется в гладких мышцах и в не мышечных тканях. SERCA3 обнаружена в ряде мышечных тканей и во многих не мышечных типах тканей: тимусе, селезенке, трахее, эмбриональной печени. Для исследования внутриклеточного транспорта Ca^{2+} используется ряд блокаторов SERCA - растительный сесквитерпен тапсигаргин, производное бензогидрохинона ВНQ и микотоксин циклопиазоновая кислота. Существует мнение, что тапсигаргин, блокирующий АТPазу на стадии E₂, является самым селективным, для АТPаз типа SERCA. Есть данные, что Ca^{2+} -АТPаз типа SERCA локализуется на везикулах ER как с IP₃-рецептором, так и с рианодиновым рецептором [9].

Во внутриклеточных мембранах млекопитающих выявлено несколько изоформ кальциевой АТPазы, из которых лучше всего изучены Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТPаза быстрых скелетных мышц и АТPаза миокардиального типа. Эти два вида транспортирующих Ca^{2+} -АТPаз изучены лучше всего, клонированы гены, кодирующие их аминокислотные последовательности, и при описании свойств Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТPаз из электроневозбудимых тканей АТPазы сердца и скелетных мышц обычно служат образцами для сравнения.

Поэтому представляется целесообразным дать их краткое описание. Молекулярная масса кальциевых АТРаз быстрых скелетных мышц и сердца составляет 110 кД. Анализ структуры кальциевых АТРаз обоих типов показывает, что в составе их молекул имеется 10 трансмембранных цепей, а их активный центр расположен с цитоплазматической стороны мембраны саркоплазматического ретикулума. В цитоплазматических фрагментах находится АТР-связывающий центр, остаток аспартата, по которому происходит фосфорилирование, и лежащий в непосредственной близости к первому трансмембранному сегменту Ca^{2+} -связывающий участок молекулы, в составе которого очень высоко содержание остатков глютаминовой кислоты. Сродство этого участка к Ca^{2+} составляет 10^{-7} - 10^{-6} М. Кальциевые АТРаза сердца и быстрых скелетных мышц имеют более, чем на 80% идентичный состав полипептидных цепей. Основное отличие Ca^{2+} -АТРаза миокардиального типа от фермента быстрых скелетных мышц заключается в том, что в саркоплазматическом ретикулуме сердца АТРаза регулируется фосфоламбаном. Кальциевые АТРаза внутриклеточных мембран электронеозбудимых клеток исследованы менее детально по сравнению с АТРазами скелетных мышц и сердца.

Внутриклеточные органеллы, характеризующиеся кислым содержанием, если они обладают $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обменником, могут накапливать Ca^{2+} , за счет градиента H^+ . Закачивание Ca^{2+} в обмен на протоны может происходить и без участия АТР, но есть данные, что $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обменник способен работать и как АТР-зависимый насос [10]. Существенную роль в закачку кальция могут принимать и мембраны ядра клетки, на мембране которого также были обнаружены АТРаза, аналогичные, если не идентичные SERCA [11].

В последнее время появилось много данных об АТРаза растений [12], подразделяемых на две группы: Ca^{2+} -АТРаза типа IIA, аналогичная SERCA в клетках животных, и Ca^{2+} -АТРаза типа IIB, соответствующая типу PMCA. АТРаза IIB также как и PMCA регулируется CaM, с той лишь разницей, что длинный цитоплазматический хвост с CaM-связывающим сайтом находится на N-конце. Среди АТРаз типа IIB выделяется подгруппа АТРаз, представители которой локализуются не на плазмалемме, как это характерно для PMCA из клеток животных, а на мембранах вакуолей. Вакуоли в растительных клетках являются основными кальций-запасующими органеллами. В общем АТРаза растений не придерживаются строгого распределения характерного для клеток животных: PMCA - только на плазмалемме, SERCA - только на эндомембранах. Так например, АТРаза типа IIA (SERCA) помимо вакуолей, внутренних мембран хлоропластов и ER встречается на цитоплазматической мембране. Снижение активности Ca^{2+} -АТРаза вызывает повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, и усиление сокращения мышц стенок кровеносных сосудов, что приводит к гипертоническому состоянию. Ca^{2+} -АТРаза чувствительна к поражению свободными радикалами, и в частности, к перекисному окислению липидами, при котором происходит окисление SH-групп, входящий в активный центр фермента. Поврежденная АТРаза не только перестает качать ионы кальция, но и превращается в канал для Ca^{2+} , позволяя ему входить в цитоплазму. Сердечная недостаточность также может быть обусловлена нарушением в работе АТРаза SERCA2a, также как и нарушением ее взаимодействия с фосфоламбаном.

В клетке имеются другие Ca^{2+} -транспортирующие системы, такие как $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник и Ca^{2+} -канал митохондрий.

3. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник.

Еще одной системой выведения Ca^{2+} из цитоплазмы является $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник. Этот механизм наиболее активен в мембранах электронеозбудимых тканей. В электронеозбудимых клетках также показано существование $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, однако скорость этого обмена там значительно меньше. При натрий-кальциевом обмене три иона Na^+ обмениваются на один Ca^{2+} . Эта система работает обратимо: при искусственном понижении внеклеточной концентрации Na^+ либо при повышении концентрации этого иона в цитоплазме может происходить вход Ca^{2+} снаружи в обмен на внутриклеточный натрий. Поскольку этот процесс является электрогенным, он в большой степени зависит от мембранного потенциала: деполяризация мембраны наряду с уменьшением трансмембранного градиента ионов натрия также способствует входу Ca^{2+} в клетку. Чаше

всего для подавления транспорта Ca^{2+} по этому механизму используют амилорид и его производные.

4. Транспорт Ca^{2+} митохондриями.

Первые сообщения, что изолированные митохондрии аккумулируют значительные количества Ca^{2+} , появились еще в конце 50-х, начале 60-х годов. И в течение длительного периода времени, в качестве важного, если не основного, внутриклеточного кальциевого депо, рассматривали митохондрии.

В митохондриях перенос иона осуществляется через канал по градиенту потенциала, образованного на мембране за счет метаболических процессов, например дыхания или гидролиза АТФ. При этом на мембране генерируется потенциал, и транспорт Ca^{2+} осуществляется по принципу электрофореза.

Кроме электрогенного унипорта, митохондрия экспрессирует электронейтральный антипорт, который выбрасывает Ca^{2+} в среду в обмен на H^+ или Na^+ . Na^+ зависимый механизм Ca^{2+} выхода был идентифицирован как $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ обменник. Ca^{2+} может быть заменен на Sr^{2+} , но не на Mn^{2+} , а Na^+ может быть заменен на Li . Натрий-зависимый механизм может быть подавлен для различного типа клеток следующими ингибиторами: трифторперазинном, дилтиаземом, верапамилом, клоназепамом, бепридиллом, амилоридом, тетрафенилфосфонием, дихлорбензамилом, Mg^{2+} , Mn^{2+} и др. Как было показано на МХ мозга его активность стимулируется этанолом. Антипорты, с одной стороны, препятствуют установлению электрохимического равновесия; а с другой стороны, они регулируют концентрацию Ca^{2+} в матриксе митохондрий ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) на основе установления кинетического равновесия между путями входа и выхода.

Сходство между термодинамическими свойствами Ca^{2+} токов сквозь плазматическую мембрану и митохондриальную мембрану (т.е. регулирование Ca^{2+} токов высоким электрохимическим потенциалом), навела на мысль, что митохондриальная Ca^{2+} -поглощающая система представляет собой канал. В основе этой гипотезы лежит наблюдение, что температурная зависимость митохондриального Ca^{2+} входа является схожей с таковой зависимостью для искусственного катионного канала (грамидинового) и совершенно отличной от других (например, нигерицинового и валиномицинового). Однако, белки, включенные в процесс накопления Ca^{2+} в митохондриях, до сих пор не обнаружены.

Так как повышенный уровень Ca^{2+} увеличивает активность ключевых метаболических ферментов митохондрии, считается, что обратимое поглощение Ca^{2+} в митохондрии координирует энергетическую продукцию для обеспечения нужд клетки.

5. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменник.

Описанное выше электрогенное поглощение Ca^{2+} , не является уникальным свойством митохондрий. Наоборот, другие внутриклеточные органеллы, характеризующиеся кислым содержанием, если они обладают $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменником, могут накапливать Ca^{2+} , за счет протонного потенциала. Работа $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменника определяется градиентом протонов и, по-видимому, не зависит от электрического потенциала на мембране. Закачивание Ca^{2+} в обмен на протоны может происходить и без участия АТФ, но есть данные, что $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обменник способен работать и как АТФ-зависимый насос.

Сравнительно недавно было обнаружено, что в ацинарных (гроздевидных) клетках поджелудочной железы, секретирующих амилазу, и в клетках околоушных слюнных желез аккумуляция Ca^{2+} везикулами, из которых происходит высвобождение Ca^{2+} в ответ на IP_3 , в значительной степени осуществляется по механизму кальций-протонного обмена.

6. Ca^{2+} -ионофоры - инструмент для исследования роли Ca^{2+} .

Кальциевые ионофоры, такие как иономицин, А23187 и 4-бromo-A23187, широко применяются для изучения регуляторной активности и гомеостаза Ca^{2+} в биологических системах. С их помощью можно проинициировать поступление Ca^{2+} в цитоплазму из внеклеточного пространства и из его внутриклеточных резервуаров. Природные Ca^{2+} -

ионофоры представляют собой антибиотики, источником которых являются различные виды актиномицетов рода *Streptomyces*.

Для того, чтобы молекула облегчала перенос ионов через гидрофобную мембрану (выполняла функцию ионофора), она должна обладать способностью образовывать комплекс с переносимым ионом (свойство, которое характеризует слабые кислоты и основания), растворяться в неполярной мембранной фазе (по крайней мере, в комплексе с ионом) и обеспечивать подвижность ионов в мембране. Другим общим свойством ионофоров является их способность определенным образом изменять конформацию при образовании комплекса с ионом. Циклические ионофоры так изменяют свою конформацию, что внутри молекул образуются полярные полости за счет переориентации лигандных полярных групп, а снаружи оказываются неполярные углеводородные группы. В результате такой перестройки комплекс с ионом становится гидрофобным, растворимым в неполярной среде.

Исследования физико-химических свойств A23187 и иономицина показывают, что в гидрофобной фазе A23187 образует электронейтральные комплексы с двухвалентными металлами (соотношение 2:1) и с ионами водорода (соотношение 1:1), а иономицин образует комплекс с Ca^{2+} в соотношении 1:1, обменивая его на ионы водорода. По сравнению с A23187, иономицин проявляет существенно большую избирательность в отношении ионов Ca^{2+} по сравнению с Mg^{2+} . 4-бromo-A23187 проявляет значительно меньшую активность как Ca^{2+} -ионофор по сравнению с иономицином и A23187. 4-бromo-A23187 является более высокоселективным ионофором для Zn^{2+} и Mn^{2+} , чем для Ca^{2+} . Было обнаружено, что комплексы 4-бromo-A23187 с Ca^{2+} (2:1) отличались низкой стабильностью, по сравнению с комплексами 4-бromo-A23187 с Zn^{2+} и Mn^{2+} (1:1). A23187 и иономицин осуществляют электронейтральный транспорт, однако в некоторых случаях ионофоры образуют относительно липофильные комплексы, несущие положительный заряд +1 или +2.

Кальциевые ионофоры оказывают неоценимую помощь в установлении роли Ca^{2+} в качестве вторичного мессенджера в клетках разных типов.

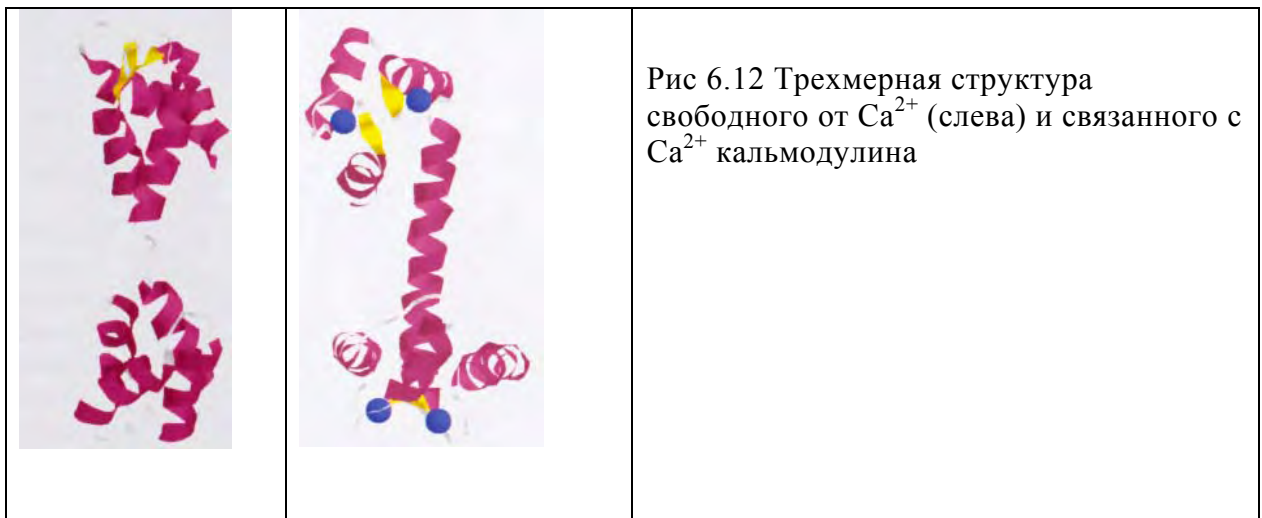
7. Ca^{2+} -связывающие белки

Для связывания Ca^{2+} многие белки имеют в своей структуре универсальные специфические места. Наиболее широко распространенные это EF-hand мотив и C2 домен. EF-hand мотив встречается в паре, где единичный мотив связывает один Ca^{2+} . Однако константы диссоциации Ca^{2+} различны и зависят от самого белка (10^{-7} и 10^{-5} М для EF-hand) и (10^{-6} - 10^{-3} М) для C2 домена. Около 100 известных белков обладают C2 доменом. C2 домен и EF-hand не единственные места связывания Ca^{2+} . Например, аннексин - фосфолипид-связывающий белок на внутренней поверхности плазматической мембраны и связан с цитоскелетом. Ca^{2+} каналы и Ca^{2+} АТФазы также имеют места связывания Ca^{2+} , отличные от C2 и EF-hand.

Кальмодулин обнаружен почти во всех клетках животных и растений. Типичная животная клетка содержит более 10^7 молекул КМ, что соответствует почти 1% всего клеточного белка. КМ функционирует как многоцелевой внутриклеточный рецептор для Ca^{2+} , участвующий в большинстве процессов, регулируемых этими ионами. Это консервативный одиночный полипептид (примерно 150 аминокислот), имеющий четыре высокоаффинных Ca^{2+} -связывающих центра. Кислый белок (17 кД), состоит из спиральной полипептидной цепи с 4-я Ca^{2+} -связывающими EF-hand (рис. 6.12). Сродство отдельных Ca^{2+} -связывающих участков 10^{-6} - 10^{-5} М. Ca^{2+} связывается кооперативно, так, что связывание первого Ca^{2+} увеличивает сродство соседнего участка. Это делает белок чувствительным к малым изменениям Ca^{2+} .

Аллостерическая активация кальмодулина кальцием аналогична активации А-киназы циклическим АМР. Отличие состоит в том, что комплекс Ca^{2+} -КМ сам по себе не обладает ферментативной активностью и действует, связываясь с другими белками. В некоторых случаях КМ служит постоянной регуляторной субъединицей ферментного комплекса (например, киназа фосфорилазы), но чаще всего связывание Ca^{2+} ведет к присоединению КМ к различным белкам-мишеням, приводя к изменению их активности.

Взаимодействуя с КМ, Ca^{2+} может изменять активность около 100 ферментов. К числу мишеней, регулируемых комплексом Ca^{2+} -КМ, относятся Ca^{2+} /КМ-зависимые протеинкиназы. В отсутствие связанного Ca^{2+} центральная спираль экранирована концевыми спиралью (рис.6.12). Связывание Ca^{2+} вызывает конформационные изменения, так, что происходит экспонирование гидрофобных участков терминальных и центральной спиралей. КМ связавший Ca^{2+} связывается с высоким сродством с белком-мишенью ($K_d \sim 10^{-9}$ мол/л). Для образования комплекса центральные остатки соединительного района разматываются из альфа спирали чтобы образовать петлю (шарнир), который позволяет молекуле обернуться вокруг белка-мишени. N и C терминальные области сближаются друг с другом и их гидрофобные поверхности связываются с ним подобно двум рукам, удерживающим канат. Это способствует тому, что альфа спиральная последовательность мишени попадает в центр гидрофобного туннеля. Следствием этого является сильное изменение конформации белка-мишени. Как только концентрация Ca^{2+} падает, комплекс диссоциирует, инактивируя белок. Однако есть и исключения. Так CaКМ-киназа II остается в активном состоянии после удаления Ca^{2+} .



Тропонин С является изоформой КМ. Он присутствует в поперечно-полосатых мышцах, где регулирует взаимодействие между актином и миозином. Подобно КМ он имеет две пары Ca^{2+} - связывающих EF-hands, локализованных на противоположных концах пептидной цепи. Сродство этих участков к Ca^{2+} лежит в области 10^{-5} и 10^{-7} М.

Белок **кальсеквестрин** (42 кД) и другой Ca^{2+} -связывающий белок с высоким сродством к Ca^{2+} (55 кД) локализируются во внутреннем объеме СР. Предполагают, что кальсеквестрин внутри терминальных цистерн СР связывает большую часть Ca^{2+} , поступающего в них при работе Ca^{2+} -АТФазы. Кальсеквестрин является кислым растворимым белком (40% в нем приходится на остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот), в терминальных цистернах скелетных мышц он составляет до 20% всего белка. Одна молекула кальсеквестрина способна связывать 43 иона Ca^{2+} . Полагают, что кальсеквестрин является основным Ca^{2+} -буфером в СР. В скелетных мышцах кальсеквестрин расположен в полости терминальных цистерн, в непосредственной близости к рианодин-чувствительному Ca^{2+} -каналу. Таким образом, кальсеквестрин не только служит буфером для Ca^{2+} внутри терминальных цистерн, но и концентрирует Ca^{2+} около Ca^{2+} -каналов, увеличивая тем самым скорость освобождения Ca^{2+} . Аналогичную буферную роль в ЭР немышечных клеток играет Ca^{2+} -связывающий белок - кальрегулин или кальретикулин (гликопротеин, 47кД, связывающий 20 мол Ca^{2+} на мол белка с низкой аффинностью ($K_d = 2\text{мМ}$)).

Ca^{2+} -/КМ-зависимые киназы

Среди ферментов контролируемых КМ можно выделить семейство Ca^{2+} КМ-зависимых киназ. Фосфоорилаза-киназа легких цепей миозина, которая активирует сокращение

гладких мышц и CaM-киназы I-IV. Все они взаимодействуют с КМ преобразуя Ca²⁺ сигнал в сигнал фосфорилирования.

Среди других Ca²⁺-КМ-зависимых ферментов необходимо отметить Ca²⁺КМ-чувствительную аденилатциклазу и фосфодиэстеразы. Регуляторная субъединица фосфатазы кальцинеурин В имеет 4 EF-hands и связывает Ca²⁺ с высоким сродством, но для активации фосфатазной активности еще требуется Ca²⁺-КМ в качестве регуляторной субъединицы.

NOS

NO образуется при окислении L-аргинина гемовым белком NO-синтазой. Существует три формы NOS: мембран-связанная (впервые выделенная из эндотелия) eNOS (или NOS III), впервые выделенная из мозга растворимая nNOS (or NOS I) и макрофагальная цитокин-индуцибельная iNOS (or NOS II). nNOS наиболее представлена в нервных клетках и скелетных мышцах. eNOS представлена почти во всех клетках. eNOS и nNOS являются Ca²⁺КМ-зависимыми ферментами и активируются в ответ на рост цитозольной концентрации Ca²⁺. Транскрипционно-регулируемая iNOS связывает КМ при низком уровне Ca²⁺, характерном для клеток в покое и постоянно активна.

Ca²⁺-зависимые ферменты, которые не регулируются КМ

КМ является основным Ca²⁺ сенсором и посредником ферментов, которые сами не являются Ca²⁺-связывающими белками. Однако, существуют множество ферментов, которые непосредственно связывают Ca²⁺ и отвечают на изменение его концентрации. Для выполнения этой функции они имеют участки с высоким сродством связывания для Ca²⁺ типа EF-hand или C2 домены. Другие Ca²⁺-связывающие белки служат в качестве Ca²⁺-буферов либо в цитозоле (с высоким сродством), либо в ЭР (с низким сродством). Рассмотрим некоторые характерные примеры.

Кальпаин – член широкого семейства цитозольных Ca²⁺-активируемых цистеиновых протеаз, обладающих структурой EF-hand. Она разрезает множество нутриклетонных белков, модифицируя их функции. Она участвует в нейродегенеративных процессах и апоптозе. Она также разрушает белки цитоскелета и другие примембранные белки. Действие этой нейтральной протеазы практически необратимо, что, по-видимому, является одной из причин опасности длительного повышения уровня Ca²⁺ в цитозоле. Для большей надежности кальпаин контролируется кальпастином, который не только ингибирует его активность, но также предотвращает его связывание с мембранами.

Синаптотагмин В нейронах и многих эндокринных клетках освобождение нейротрансмиттеров или гормонов экзоцитозом активируется увеличением внутриклеточного Ca²⁺. В этом процессе участвуют Ca²⁺-связывающие белки. Одним из многочисленных белков на поверхности секреторных везикул и секреторных гранул является синаптотагмин. Это трансмембранный белок, имеющий 2 C2 домена в цитозольной части, которая, по-видимому, является сенсором Ca²⁺ при экзоцитозе и как было показано связывает Ca²⁺ при физиологических концентрациях.

DAГ-киназа

Диацилглицерол (DAG) является коротко-живущим мессенджером вследствие его быстрого фосфорилирования DAG-киназой в форму фосфатида. Из 8 известных изоформ DAG-киназ две имеют EF-hand мотив и являются Ca²⁺-зависимыми.

Рековерин

Рековерин – Ca²⁺ сенсор в фоторецепции. Связанный с Ca²⁺ рековерин ингибирует родопсин киназу и т.о. регулирует фосфорилирование фоторецептора родопсина. Рековерин работает как меристоиловый выключатель. Из 4-х EF-hands только 2 связывают Ca²⁺ с высоким сродством (кажушаяся K_D = 17 нМ). Предполагают, что рековерин может существовать в 2-х состояниях. В одном, гидрофобная миристоиловая группа спрятана внутри белка, а в другом, экспонирована наружу. Ca²⁺ связывается в 10000 раз более прочно с последней формой и экспонированная миритоиловая группа способствует его связыванию с мембраной дисков сетчатки, где он удлиняет время жизни фотовозбужденного родопсина.

Белки цитоскелета

Почти каждая форма клеточной активации либо начинается с, либо сопровождается, либо заканчивается, по крайней мере, частичной, реорганизацией цитоскелета. Эти изменения могут быть существенными и даже определяющими компонентом клеточного ответа. В немышечных клетках реорганизация микрофиламентов цитоскелета (F-актина) контролируется многими белками, некоторые из которых связывают актин. Некоторые из которых, например, α -актинин и гельзолин чувствительны к концентрациям Ca^{2+} . Эти белки оказывают различное действие на цитоскелет. α -актинин является белком поперечных сшивок, а гельзолин является актин-разъединяющим белком. Сшивающее действие α -актинина (который имеет 2 EF-hands) ингибируется Ca^{2+} , а его последующее удаление из F-актина открывает доступ для гельзолина.

Литература

1. Ferrary, R., Cucchin, F., Bolognesi, R., Bachetti, T., Boraso, A., Bernocchi, P., Gaia, G., and Visioli, O. (1994) *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **8**, Suppl **3**, 565-575.
2. Currie, K.P., and Fox, A.P. (1997) *J. Neurosci.*, **17**, 4570-4579.
3. Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K.; Hille, B., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1996) *Nature*, **380**, 258-262.
4. Minke, B., and Selinger, Z. (1996) *Mol. Neurobiol.*, **12**, 163-180.
5. Vannier, B., Peyton, M., Boulay, G., Brown, D., Qin, N., Jiang, M., Zhu, X., Birnbaumer, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2060-2064.
6. Niggli, V., Adunyah, E.S., Penniston, J.T., and Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 395-401.
7. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647-655.
8. Lotersztajn, S., Hanoune, J., and Pecker, F. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 11209-15.
9. Poulsen, J.C., Caspersen, C., Mathiasen, D., East, J.M., Tunwell, R.E., Lai, F.A., Maeda, N., Mikoshiba, K., and Treiman, M. (1995) *Biochem. J.*, **307**, 749-758.
10. Schulz, I., Thevenod, F., Schnefel, S., and Schafer R. (1989) *Arzneimittel Forsch.*, **39**, 168-173.
11. Lanini, L., Bachs, O., and Carafoli, E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 11548-11552.
12. Geisler, M; Axelsen KB; Harper JF; Palmgren MG *Biochim Biophys Acta*, 2000 May, **1465**:1-2, 52-78.

Глава 7

Фосфорилирование белков как механизм переключения функциональной активности клеток

Первые указания на то, что фосфорилирование белков является важным регулятором ферментативной активности, появились в то время, когда регуляторная роль нековалентных взаимодействий субстратов, кофакторов и конечных продуктов реакций была уже хорошо установлена. Классический пример регуляция активности фосфорилазы 5'-АМР (положительная) и глюкозо-6-фосфотом (отрицательная). Оба они выступают в качестве аллостерических эффекторов-регуляторов и не принимают непосредственного участия в реакции катализируемой фосфорилазой. Позже выяснилось, что добавление одной фосфатной группы к фосфорилазе *b* также переводит фермент из неактивного в активное состояние. Таким образом, дополнительно к аллостерической регуляции ковалентная модификация фосфорилированием также изменяет активность ферментов. Хотя эти два механизма действуют через одинаковые конформационные изменения, фосфорилирование является основным механизмом при рецептор-зависимом ответе клеток на внешние воздействия, тогда как аллостерические эффекторы изменяют активность ферментов в ответ на изменение внутриклеточных условий. Обычно, изменение этих условий должно произойти в широких пределах (концентрация продукта или кофактора должна измениться значительно). В то время как фосфорилирование обеспечивает превращение очень слабого сигнала (концентрация гормона, связанного с рецептором) в большой сигнал (например, быстрая активация гликогенолиза). Однако недостаточная скорость процесса является узким местом контроля фосфорилированием. В тех случаях, когда нужно обеспечить высокую скорость изменения активности фермента (освобождение трансмиттера или сокращение мышц) на помощь приходит регуляция быстрым изменением концентрации Ca^{2+} (в мышцах фосфорилаза-киназа). Дополнительная роль фосфорилирования при этом состоит в увеличении сродства фермента к Ca^{2+} .

Важность фосфорилирования подтверждается тем фактом, что геном дрожжей содержит более 120 различных протеинкиназ (ПК). Считается, что геном человека содержит более 1000 ПК. 30% цитоплазматических белков содержат ковалентно связанный фосфат. Фосфорилирование модифицирует белки добавлением отрицательно заряженных групп к серинам, треонинам и реже к тирозинам. Эти нейтральные гидроксидные аминокислотные остатки типично экспонируются на поверхности и часто между регуляторными субъединицами белка. Фосфорилирование существенно меняет химические свойства белков. В результате белок становится способным распознать, связать, активировать, деактивировать, фосфорилировать или дефосфорилировать свои субстраты. Таким образом, фосфорилирование может включать и выключать ферменты.

Протеинкиназы

Вторичные посредники сАМР и Ca^{2+} действуют как аллостерические эффекторы - активируют определенные белки, присоединяясь к ним и изменяя их конформацию. Такими белками могут быть и протеинкиназы. Протеинкиназами называют ферменты, катализирующие перенос фосфата от АТФ к специфическому (серину, треонину, тирозину и т.д.) аминокислотному остатку. Протеинкиназы эукариот представляют собой суперсемейство гомологичных белков. Каталитический домен этого семейства состоит из 250-300 аминокислотных остатков. Киназные домены этой группы ферментов содержат 12 консервативных субдоменов и эти домены формируют общий каталитический остов структуры. Важнейшими представителями этого семейства являются серин-треониновые протеинкиназы и тирозиновые протеинкиназы. Известно несколько десятков протеинкиназ, для которых показано, что их каталитические домены гомологичны. Продукты примерно половины всех открытых до сих пор онкогенов - это протеинкиназы, фосфорилирующие белки-мишени по остаткам тирозина, серина или треонина.

Протеинкиназа А

Протеинкиназа, активность которой регулируется сАМР, называется протеинкиназой А (ПКА).

В 1968 г. Кребс с сотрудниками обнаружили сАМР-зависимую протеинкиназу, фосфорилирующую белки-мишени по серину или треонину. ПКА катализирует перенос конечного фосфата с АТР на определенные остатки серина и треонина. Ковалентное фосфорилирование этих остатков регулирует активность этих белков. сАМР-зависимые протеинкиназы А выделены из различных тканей. В неактивном состоянии ПКА - это комплекс, состоящий из двух регуляторных субъединиц (R), связывающих сАМР, и двух каталитических субъединиц (C) образующих четвертичную структуру типа R₂C₂. (рис. 7.1). Тетрамер стабилизирован взаимодействием между каталитическим участком и псевдосубстратной последовательностью на регуляторной субъединице которая очень похожа на последовательность, которая фосфорилируется на субстрате. При связывании регуляторной субъединицы неактивированного комплекса R₂C₂ с сАМР происходит его диссоциация и высвобождается активная каталитическая субъединица, способная фосфорилировать определенные белки субстраты. Для освобождения одной каталитической субъединицы необходимо связывание 2-х молекул сАМР с одной регуляторной субъединицей. Концентрация ПКА в клетках млекопитающих достаточно высока, чтобы связать практически весь сАМР и сделать его недоступным для гидролиза фосфодиэстеразой. Однако при диссоциации комплекса связывание сАМР с регуляторной субъединицей ослабевает, сАМР диссоциирует и становится доступной для фосфодиэстеразы, активность которой к тому же усиливается фосфорилированием ПКА. Возврат системы в исходное, не активированное состояние происходит после дефосфорилирования белка соответствующими фосфатазами. ПКА обнаружена во всех животных клетках. Почти все эффекты, вызываемые сАМР, реализуются благодаря ей. К настоящему времени известно несколько десятков ферментов, активность которых регулируется *in vivo* и *in vitro* за счет фосфорилирования протеинкиназами А. Обнаружено, что субстратами протеинкиназ А являются многие ядерные белки, в том числе гистоны; одна из фракций минорных белков микротрубочек из мозга (МАР-2); ряд мембранных белков мозга; Ca²⁺-АТРаза и фосфоламбан в саркоплазматическом ретикулуме и многие другие.

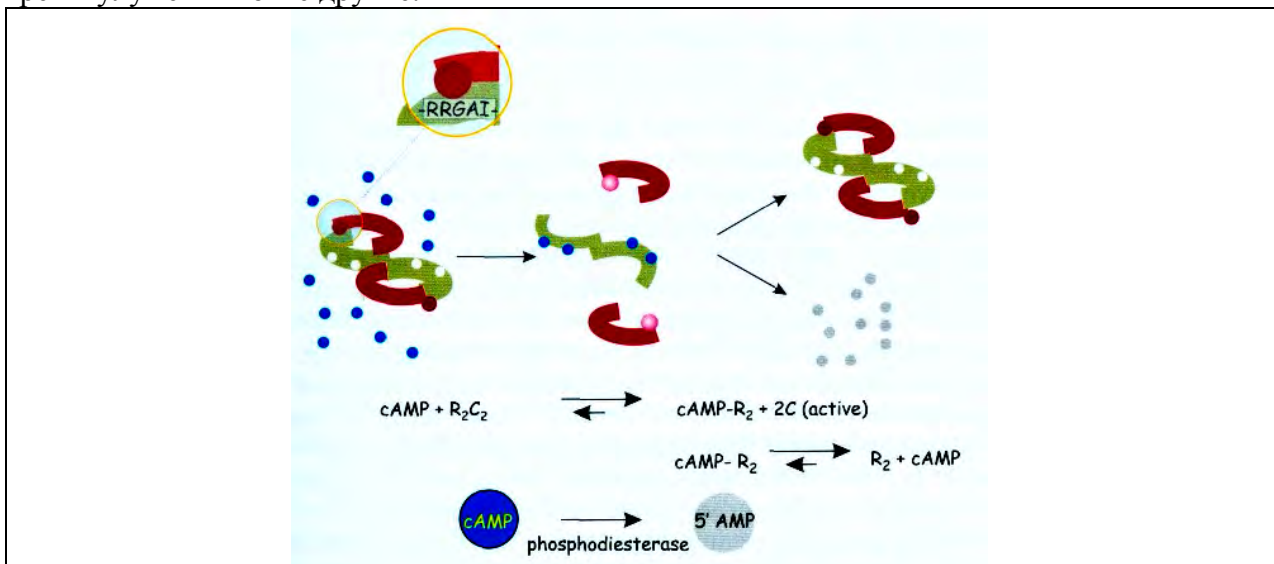


Рис. 7.1 Активация ПКА сАМР. При низких концентрациях сАМР фермент существует в неактивной форме тетрамера, состоящего из 2-х регуляторных компонент (зеленый), каждый из которых связывает две молекулы сАМР (синий) и двух каталитических субъединиц (красный). Эти две регуляторные компоненты связаны с каталитическими участками через псевдосубстратную последовательность. Псевдосубстратная последовательность на R субъединице блокирует каталитический центр на C субъединице. Эта последовательность –RRGAI– похожа на последовательность субстрата,

которая подвергается фосфорилированию (в которой место аланина занято серином). При связывании 4-х молекул сАМР с регуляторными субъединицами каталитические мономерные субъединицы освобождаются и их каталитические участки экспонируются для взаимодействия с реальным субстратом (розовый). Сродство регуляторных субъединиц к сАМР падает, она диссоциирует и превращается фосфодиэстеразой в 5'-АМР

Протеинкиназа С

При гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата фосфолипазой С происходит образование двух продуктов - инозитол-1,4,5-трисфосфата и диацилглицерина (DAG). Действие DAG направлено на протеинкиназу С. Этот фермент фосфорилирует целую серию белков по сериновым и треониновым остаткам и играет первостепенную роль в процессе передачи гормонального сигнала от агонистов, повышающих концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Для проявления активности ПКС нужны ионы Ca^{2+} и фосфолипиды (фосфатидилсерин). DAG активирует ПКС путем увеличения ее сродства к Ca^{2+} и фосфолипидам. Молекулярное клонирование выявило у млекопитающих семейство из 12 различных изоформ ПКС. Наиболее распространенными являются α , $\beta 1$ и $\beta 2$ (рис 7.2). В нервной ткани присутствует изоформа γ . Обнаружено также несколько изоформ ПКС (например, δ, ϵ), которые активируются DAG и не нуждаются в Ca^{2+} и фосфолипидах. Ионы Ca^{2+} и DAG активируют ПКС, поэтому синергизм в их действии реализуется уже и прежде всего на уровне этого фермента.

Было показано, что ПКС фосфорилирует α_1 -адренэргические, мускариновые холинэргические и другие рецепторы, изменяя их сродство к лигандам и взаимодействие с G-белком. Активаторами ПКС являются РМА и ряд других форболовых эфиров, которые легко проникают в клетку и, имея структурное сходство с DAG, взаимодействуют с тем же участком связывания на молекуле фермента.

На рис 7.3 и 7.4 показаны этапы активации и доменная архитектура обычной, связанной с мембраной ПКС.

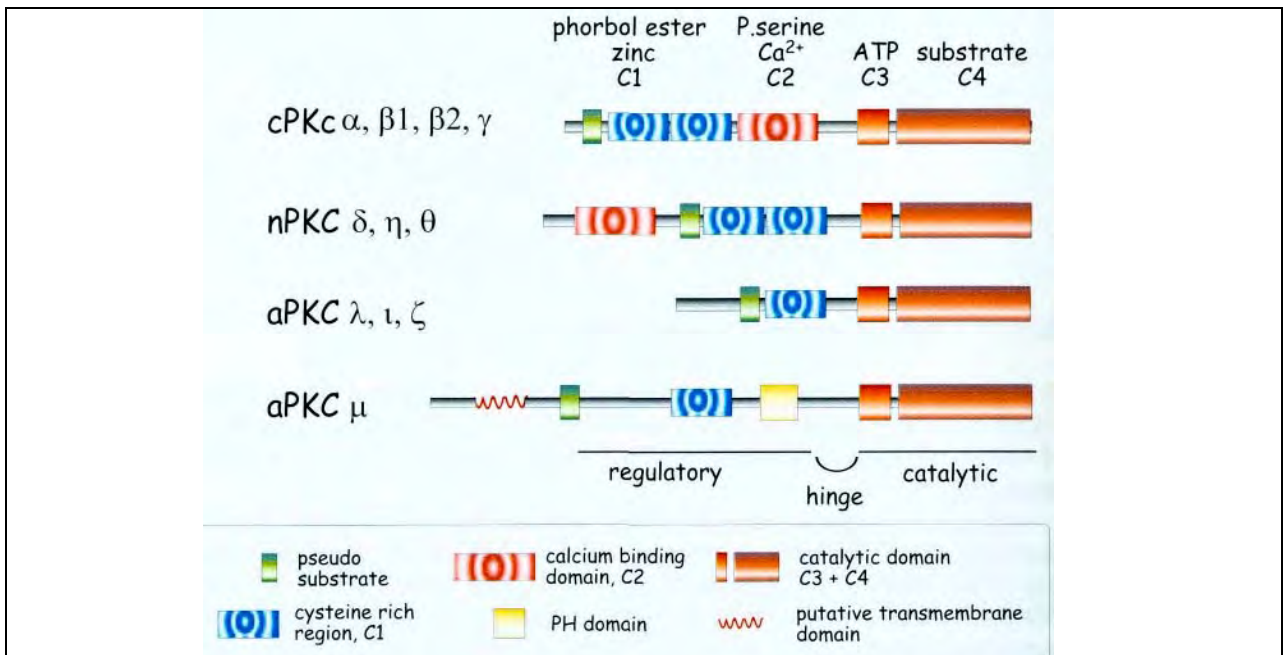


Рис.7.2 Доменная структура семейства протеинкиназ С. Семейство протеинкиназ С млекопитающих состоит из 12 членов разделенных на 3 подсемейства: обычные (с), новые (н) и атипичные (а). Они отличаются консервативными доменами C1, C2, C3, и C4. Белок состоит из регуляторных и католитических доменов, соединенных шарнирными областями (1 группа протеинкиназ: альфа, бета, гамма; 2- дельта, эта, тэта;

3- ламбда, йота, дзета; 4- мю). C1 содержит участок, который связывает два атома Zn^{2+} образуя место связывания для DAG и TPA. C1 может быть одинарным или двойным.

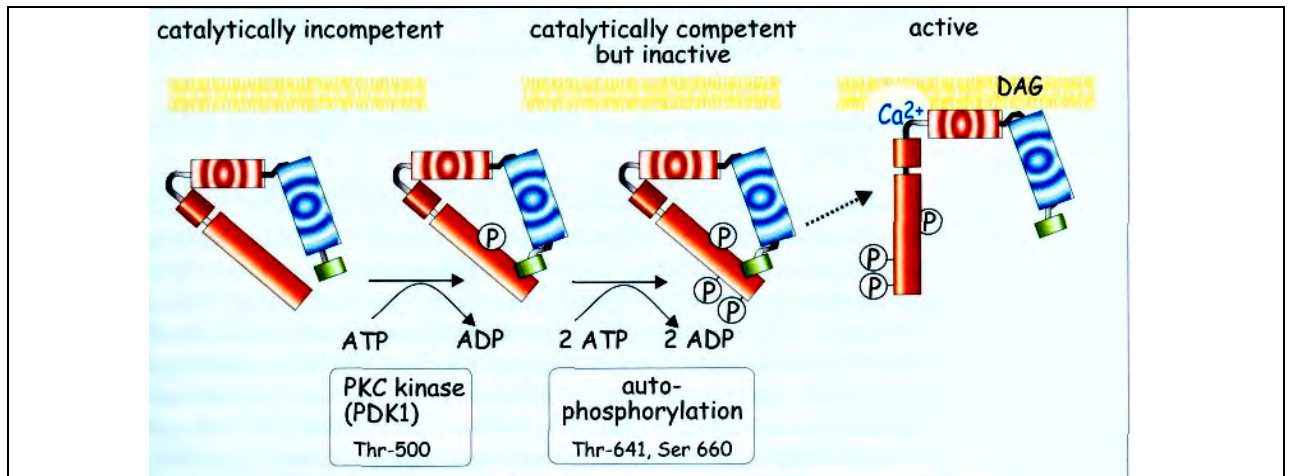


Рис. 7.3 Активация протеинкиназы С (PKC) требует фосфорилирования каталитического домена и отсоединения псевдосубстрата. Активация PKC происходит в 4 ступени. PKC синтезируется как предшественник 74 кДа. Исходно ее каталитический участок доступен для субстрата, но не активен. Далее следуют три различных фосфорилирования, переводя фермент в каталитически компетентное, но еще не активное состояние. Возможно, это делает PDK1-фосфолипид-зависимая киназа. Доступ субстрата предотвращается присоединением псевдосубстрата (зеленый) к каталитическому участку (красный). При связывании DAG и увеличении Ca^{2+} фермент прочно связывается с мембраной, псевдосубстрат отсоединяется от каталитического участка и он становится доступным для субстрата готов к фосфорилированию.

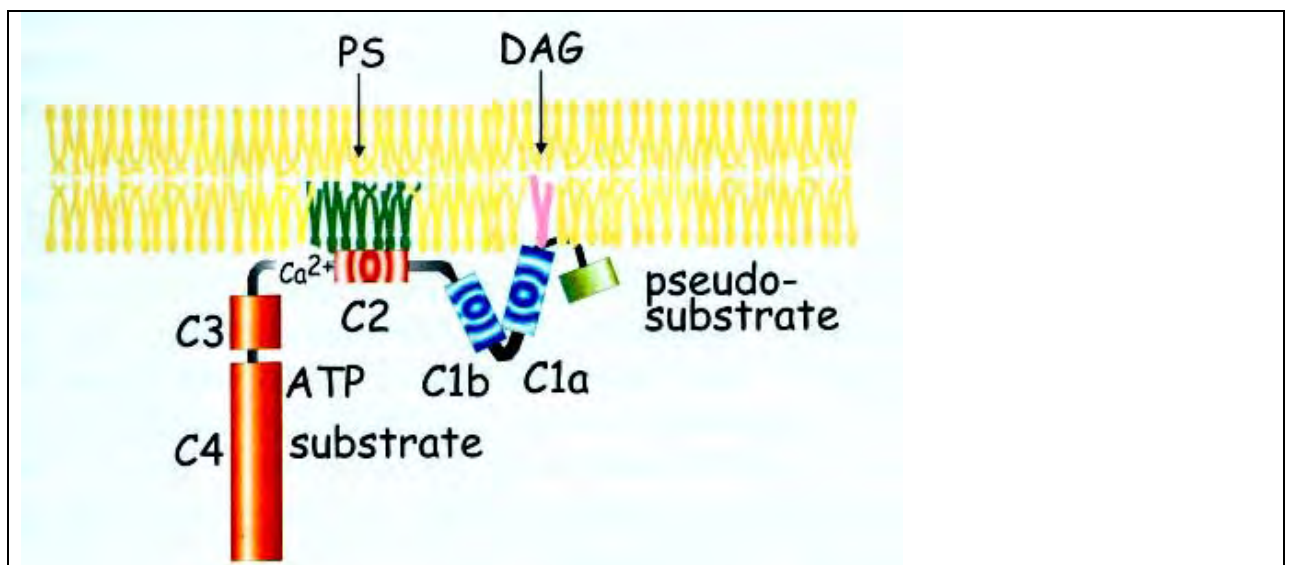


Рис. 7.4 Домены PKC. Консервативные домены C1-C4 являются функциональными модулями. C1 связывает DAG или форболовый эфир, C2 участвует в присоединении к отрицательно-заряженному фосфолипиду (фосфатидилсерин), которое усиливается связыванием Ca^{2+} . В некоторых изоформах присутствует это Ca^{2+} -связывающее место, ответственное за Ca^{2+} -зависимое связывание с липидом (PS). C3 и C4 являются каталитическими доменами. Шарнирное соединение между C1,C2 и C3,C4 при связывании PKC с мембраной становится легко доступной мишенью для протеолитических ферментов типа трипсина. Фрагмент, содержащий киназный домен открепляется от мембраны и постоянно активен.

В покоящихся клетках ПКС распределена диффузно в цитозоле. При активации клеток ТРА происходит перераспределение ПКС α и ϵ к клеточной мембране, ПКС α в ЭР, ПКС β 2 связывается с цитоскелетом, ПКС γ в Гольджи, ПКС ϵ в мембрану ядра

Тирозинкиназы

Семейство тирозин-специфических протеинкиназ относится к каталитическим белкам-рецепторам, однократно пронизывающим мембрану (рис. 7.5 и 7.6). Каталитический домен находится с внутренней стороны плазматической мембраны. При связывании лиганда они активируются и переносят фосфатную группу от АТФ на гидроксильную группу тирозинового остатка в определенных белках. К этому семейству протеинкиназ относятся рецепторы инсулина (рис. 7.7), многих ростовых факторов, включая тромбоцитарный фактор роста и фактор роста эпидермиса. Большинство других протеинкиназ фосфорилирует сериновые или, реже, треониновые остатки в белках.

При активации белок-рецептор с тирозинкиназной активностью фосфорилирует сам себя. В случае рецептора инсулина это самофосфорилирование повышает активность киназы по типу положительной обратной связи.

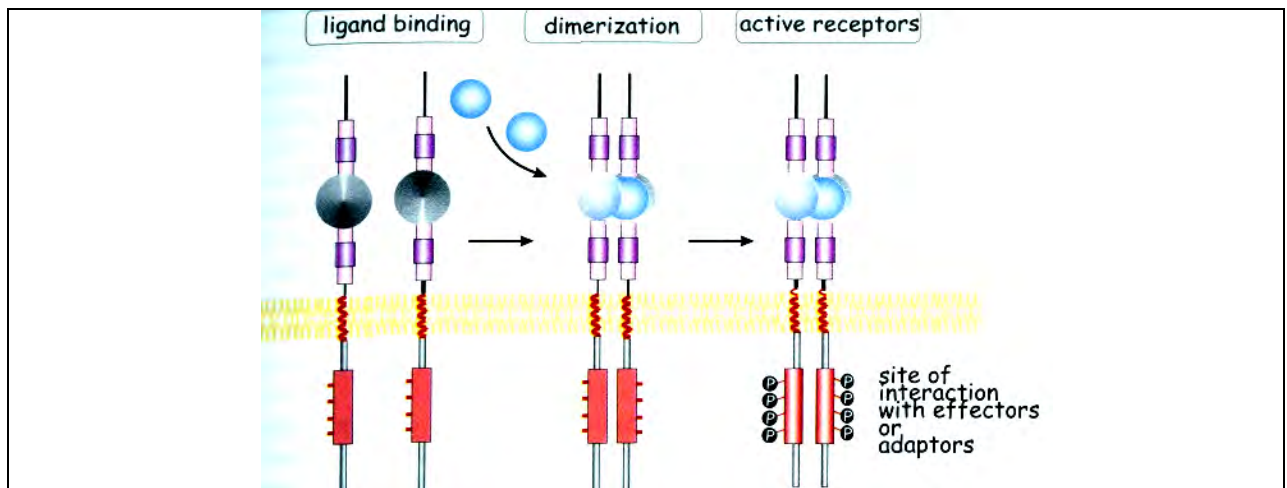


Рис. 7.5 Общая структура и активация тирозинкиназных рецепторов на примере активации EGF рецептора. Связывание лиганда (здесь EGF) (в общем случае мономер) вызывает конформацию рецептора, что приводит к его димеризации. Лиганды других рецепторов могут быть димерами. Они связываются с двумя рецепторами, притягивая их друг к другу. В обоих случаях субъединица с киназной активностью фосфорилирует по тирозину субъединицу соседнего рецептора вблизи каталитического участка. Таким образом, тирозиновые остатки цитозольного домена обоих рецепторов автофосфорилируются. Фосфорилированный димер представляет собой каталитически активный рецептор.

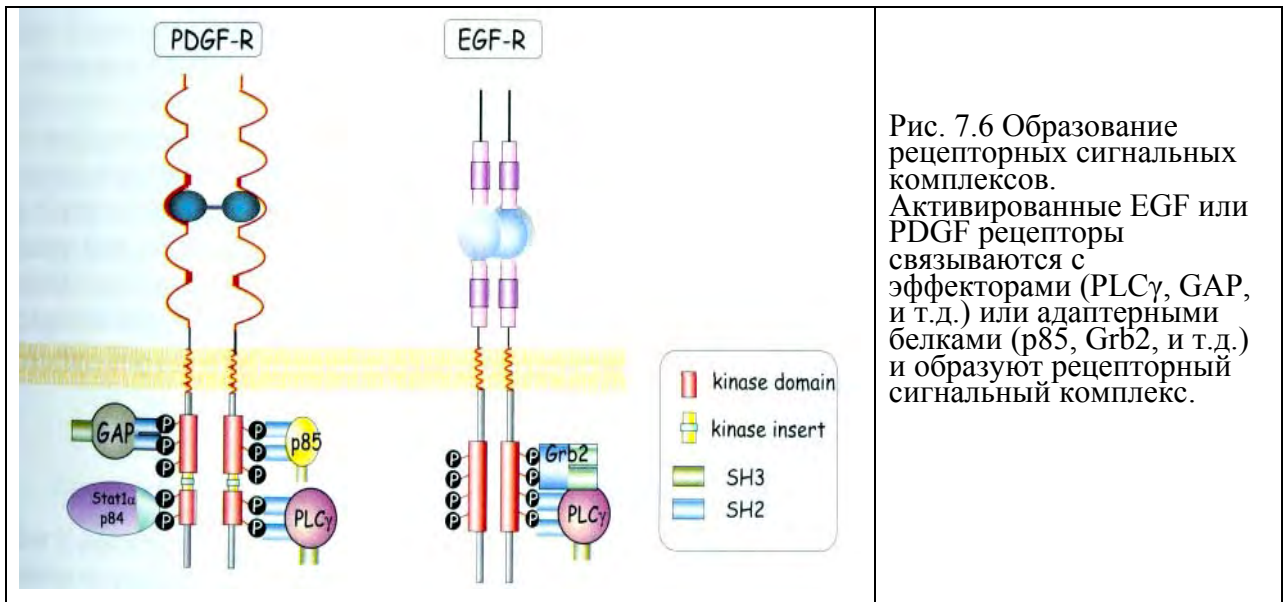


Рис. 7.6 Образование рецепторных сигнальных комплексов. Активированные EGF или PDGF рецепторы связываются с эффекторами (PLC γ , GAP, и т.д.) или адаптерными белками (p85, Grb2, и т.д.) и образуют рецепторный сигнальный комплекс.

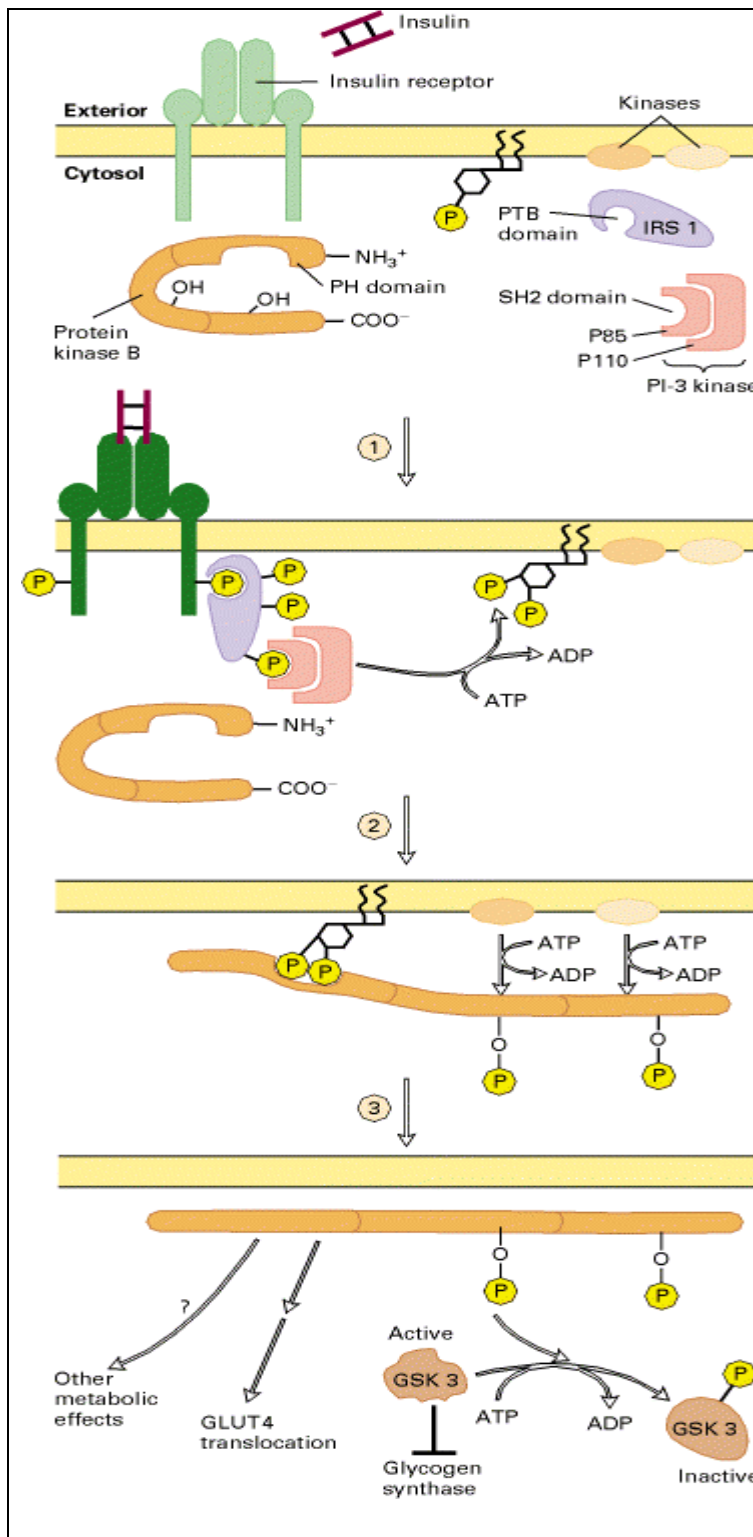


Рис. 7.7 Активация протеинкиназы В при действии инсулина. Инсулиновый рецептор является димерным тирозинкиназным рецептором.

1 - связывание инсулина с рецептором приводит к конформационным изменениям, которые вызывают автофосфорилирование. После того как IRS1 связывается с фосфотирозиновым остатком через РТВ домен, активированная киназа в цитозольном домене рецептора фосфорилирует IRS1. Одна субъединица PI-3 киназы связывается с рецептор-связанным IRS1 через свой SH2 домен, а другая субъединица затем фосфорилирует PI 4,5-P₂ и PI 4-P в PI 3,4,5-P₃ и PI 3,4-P₂ соответственно.

2 - Фосфоинозитиды связываются с PH доменом ПКВ, прикрепляя ее таким образом к мембране. Две мембран-связанные киназы фосфорилируют ассоциированную с мембраной ПКВ и активируют ее.

3 - активированная ПКВ освобождается из мембраны и стимулирует потребление глюкозы, активируя транспортер GLUT4 и синтез гликогена. Первое происходит вследствие транслокации транспортера глюкозы GLUT4 из внутриклеточных везикул в плазматическую мембрану. Второе, вследствие фосфорилирования ПКВ гликогенсинтазы-киназы 3 (GSK3), превращая ее из активной в неактивную форму. В результате GSK3-зависимое ингибирование гликогенсинтазы снимается, что приводит к стимуляции синтеза гликогена.

Кроме протеинкиназ, существуют киназы, которые могут фосфорилировать липиды. На (рис 7.8) приведен пример такого фосфорилирования в системе метаболизма фосфоинозитидов.

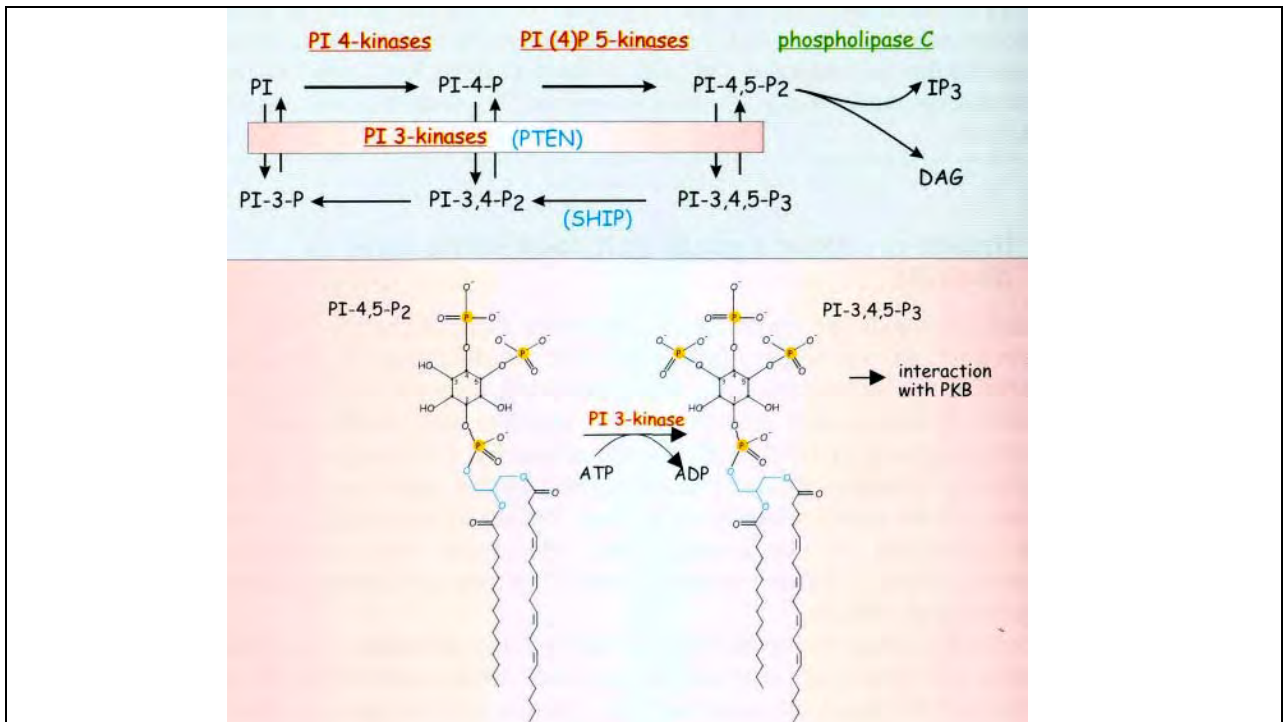


Рис. 7.8 Фосфоинозитид 3-киназы и генерация 3-фосфорилированных липидов.

PI 3 киназы фосфорилируют OH в 3-положение в инозитольном кольце фосфатидинозитольных липидов. Фосфорилированные в 3-OH положении инозитольные липиды не являются субстратами PLC. Фосфатазы PTEN and SHIP обращают реакцию. PH домен PKB взаимодействует преимущественно с PI(3,4,5)P₃.

Глава 8

Фосфатазы (не окончен)

Процесс дефосфорилирования является таким же важным, как и процесс фосфорилирования, и соответственно, протеинфосфатазы являются интегральными компонентами сигнальных систем, управляемых протеинкиназами. В ряде случаев дефосфорилирование возвращает белки обратно в состояние покоя. Хорошим примером является серин/треониновая фосфатаза PP1G, которая дефосфорилирует фосфоорилазу α , тем самым, завершая распад гликогена. Существует ряд белков (например, гликогенсинтаза, Src, c-Jun, p56, NF-AT), которые фосфорилированы в состоянии покоя, а в активное состояние переходят после процесса дефосфорилирования. В частности, фактор транскрипции c-Jun требует как дефосфорилирования серин/треониновых аминокислотных остатков вблизи участка, связывающего ДНК, так и фосфорилирования серинов в N-концевом участке для перехода полностью в активное состояние.

В эукариотической клетке около **30% процентов белков подвергаются фосфорилированию**. Обратимое фосфорилирование белков, катализируемое протеинкиназами и фосфопротеинфосфатазами, регулирует многие внутриклеточные процессы. Фосфопротеинфосфатазы подразделяются на три семейства – PPP, PPM, PTP. PPP и PPM включают фосфосерин- и фосфотреонин- специфичные ферменты, PPM – семейство фосфатаз, активируемых магнием. PTP – фосфотирозин-специфичные фосфатазы и фосфатазы двойной специфичности. PTP могут дефосфорилировать все три фосфосодержащих остатка аминокислот. Протеинфосфатаза типа PP2A входит вместе с PP1, PP4, PP6, PP2B, PP5 и PP7 в семейство PPP. Существует классификация, которая делит фосфатазы на 4 группы: PP1, PP2A, PP2B и PP2C по относительной неспецифичности

Растворимая протеинфосфатаза, специфичная для фосфотирозинов (PTP1B), впервые была выделена из человеческой плаценты в 1988 г. Определение ее аминокислотной последовательности и выделение участка ДНК, кодирующего каталитический домен, позволило выявить родственные гены и их продукты - новые неизвестные фосфатазы. Данные по клонированию показывают, что эти протеинтирозинфосфатазы относятся к семейству мультидоменных белков, имеющих сильные различия в структуре, что обеспечивает их многообразие. Их можно подразделить на две группы: трансмембранные или рецептороподобные PTPазы и цитозольные PTPазы. Ни те, ни другие не связаны с серин/треонин-специфичными фосфатазами. Это отличает протеинфосфатазы от семейства протеинкиназ, в котором серин/треониновые и тирозиновые киназы имеют общую родословную. В отличие от серин/треониновых фосфатаз, являющихся олигомерами, субъединичный состав которых определяет субстратную специфичность фермента, тирозиновые фосфатазы все относятся к мономерным ферментам. На рис. 8.1 приведена доменная организация тирозиновых фосфатаз.

Некоторые функциональные различия между протеинфосфатазами были выявлены после открытия их ингибиторов. Например, омега-3-пальмитиновая кислота (опухолесный промотор) является ингибитором PP1 и PP2A, тогда как циклоспорин (используется для инактивации Т-лимфоцитов и предотвращения отторжения трансплантированного органа) является селективным ингибитором PP2B (кальцинейрина).

Группа PP2A включает разнообразные ферменты из клеток млекопитающих, которые в основном находятся в цитозоле, хотя описаны и формы, связанные с ядрами, плазматической мембраной, микротрубочками и микрофиламентами.

Поскольку как рибосомальные белки, так и факторы трансляции подвергаются обратимому фосфорилированию, предполагается, что оно играет важную роль в регуляции трансляции.

Трансмембранные рецептороподобные фосфатазы. Эти фосфатазы классифицируются по структуре их экстраклеточных доменов, которые могут состоять как из очень коротких, так и разветвленных цепей. Разветвленные цепи похожи на лигандсвязывающие домены молекул адгезии (типа фибронектина), область физиологических функций которых очень широка. На основе сходства с лигандсвязывающими доменами молекул адгезии было высказано предположение, что экстраклеточные домены фосфатаз тоже играют рецепторную роль. **Однако ни лигандов для этих рецепторов, ни связанной с ними системы сигнализации пока не обнаружено.**

Цитозольные фосфатазы также классифицируются согласно их доменной структуре. Их субстратами являются белки ядра и цитоскелета. Важный подкласс составляют SHP-1 и SHP-2, обладающие SH2 доменами. Другие характеризуются присутствием последовательностей PEST (Pro-Glu/Asp-Ser/Thr) С-концевой половине молекулы. Также существуют подклассы фосфатаз двойной специфичности, которые могут дефосфорилировать как тирозиновые, так и серин/треониновые остатки. Весь подкласс называется VH1-подобными фосфатазами. Фосфатазы с двойной специфичностью обладают гомологией также с Cdc25 - регуляторами клеточного цикла дрожжей. Они активируют циклин-зависимые киназы-2 (Cdc2/CDK1) в результате дефосфорилирования соседних треониновых и тирозиновых остатков.

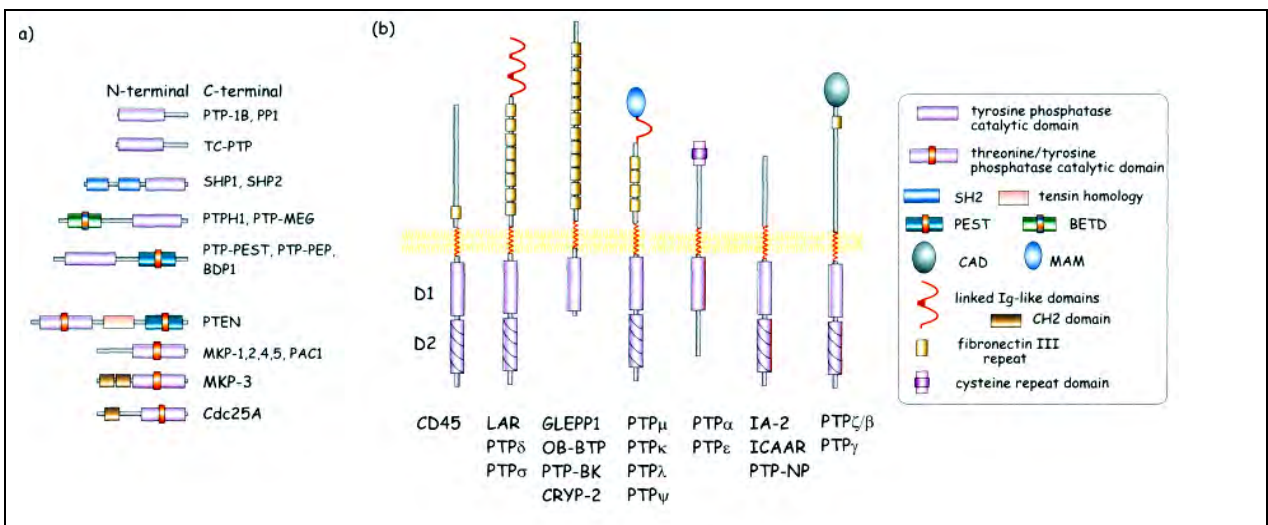


Рис. 8.1 Доменная организация тирозиновых фосфатаз: (а) Цитозольные тирозиновые фосфатазы делят на две группы: собственно тирозиновые и фосфатазы двойной специфичности, дефосфорилирующие сериновые, треониновые и тирозиновые остатки. Далее они подразделяются по присутствию различных гомологичных доменов, таких как SH2 или PEST, (б) Рецептороподобные тирозиновые фосфатазы. Отличаются по содержанию различных экстраклеточных доменов. Некоторые содержат особые экстраклеточные структуры, похожие на структуры в адгезионных молекулах или рецепторах факторов роста. Лиганды большинства этих рецептор-подобных фосфатаз не идентифицированы

Роль фосфатаз в передаче сигнала.

Вначале интерес к тирозиновым фосфопротеинфосфатазам был обусловлен надеждами на то, что они могут быть противоопухолевыми агентами, поскольку трансформирующие эффекты связаны с активацией тирозиновых протеинкиназ. Однако оказалось, что некоторые фосфатазы в действительности усиливают сигналы протеинкиназ.

Положительная регуляция .

Описание и клонирование большинства фосфатаз связано с исследованием клеток крови, поскольку систематика их поверхностных молекул была разработана значительно раньше, чем, например, стало ясно, что такая молекула как CD-45 является фосфатазой. Обычно активация TCR (Т-клеточного рецептора) приводит к активации растворимой тирозинпротеинкиназы Lck. Однако было замечено, что если в клетках отсутствует активная фосфатаза CD-45, то и протеинкиназа Lck остается неактивной и фосфорилирования по тирозину не происходит. Рассмотрим на примере CD-45 роль фосфорилирования и дефосфорилирования одного и того же белка в цепи усиления сигнала.

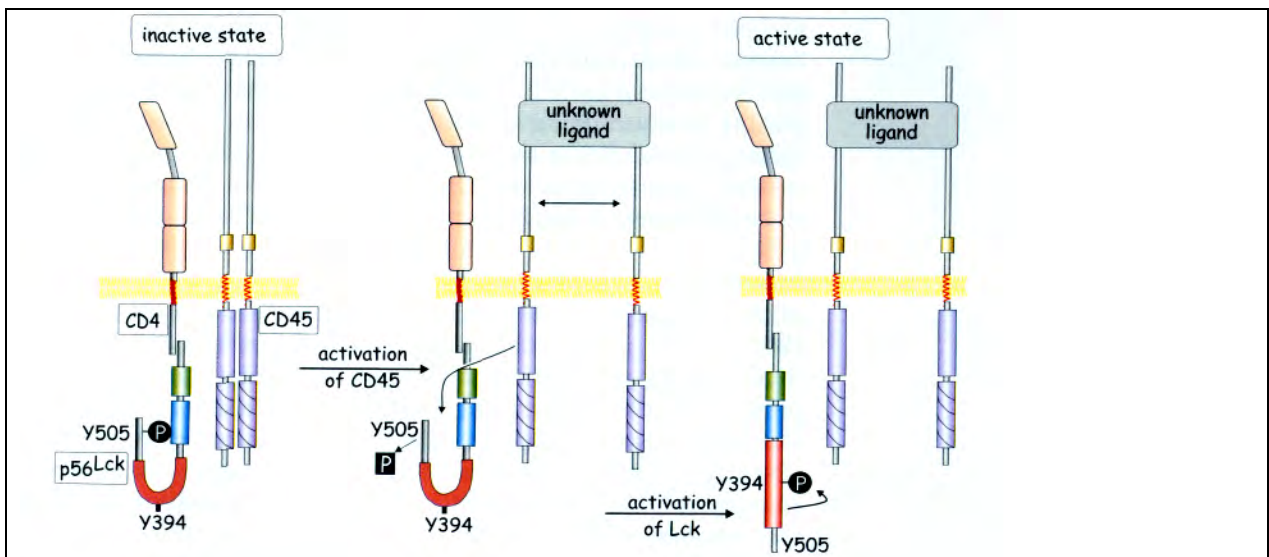


Рис 8.2 Активация Lck дефосфорилированием, осуществляемым CD45.

Lck, присоединенная к субъединице CD4 TCR, инактивирована в результате сцепления фосфотирозинового остатка (505) с её собственным доменом SH2. Активация CD45 неизвестным лигандом (возможно приводящая к разделению димеров фосфатазы) вызывает дефосфорилирование Y505 Lck, распрямление каталитического домена киназы и автофосфорилирование (Y394). После этого Lck способна фосфорилировать субстраты, такие как домены ITAM в α субъединицах TCR.

Из рис 8.2 видно, что для активации TCR, которая происходит в результате автофосфорилирования Y394, необходимо изменить конформацию домена, содержащего этот тирозиновый остаток. В этом изменении конформации и участвует фосфатаза CD-45. Оно происходит следующим образом: неизвестный агонист разделяет исходно димерный белок (фосфатазу CD-45) и ее мономер дефосфорилирует остаток Y505 протеинкиназы Lck в составе Т-клеточного рецептора. В результате дефосфорилирования участок, содержащий Y505, отходит от ингибировавшего его участка с SH2 доменом.

Примыкающий к нему киназный домен автофосфорилирует Y394. После этого киназа способна фосфорилировать другие субстраты.

SHP-2 (фосфатаза-2, гомологичная Src, изначально названная SH-PTP2 или Syp) широко распространена в тканях. Важность фосфатаз этого класса ясна из того, что разрушение гена, кодирующего SHP-2, вызывает раннюю смерть мышиных эмбрионов. Достаточно давно получены результаты, указывающие на возможную роль SHP-2 в клеточной сигнализации. Во-первых, гомологичный ген найден в дрозофиле, этот ген, ответственный за мутацию Corkscrew и кодирует тирозиновую фосфатазу Csw. Эта фосфатаза участвует в активации серин/треониновой киназы Draf (эквивалентна Raf у млекопитающих) и это предполагает, что фосфатаза обеспечивает передачу положительного сигнала при активации рецепторной тирозиновой киназы.

Отрицательная регуляция

В качестве примера рассмотрим фосфатазы MKP-1. Фосфатаза MAP-киназы (MKP-1) является продуктом одного из “ранних” генов (экспрессия таких генов достигает максимума в течение первых минут после добавления ростовых факторов и затем падает). Добавление сыворотки (содержащей ростовые факторы) к покоящимся клеткам приводит к быстрому фосфорилированию и активации MAP-киназы (другое название этой киназы – ERK). Процесс непродолжительный, но достаточный для индукции транскрипции ранних генов и вхождения в фазу G1 клеточного цикла. Активность фосфатазы двойной специфичности регистрируется в течение 20 мин, что совпадает по времени с дефосфорилированием и деактивацией MAP-киназы. Т.о. MKP-1 является негативным регулятором MAP-киназы, прерывающим сигнал от фактора роста (рис. 8.3) и, таким образом, экспрессию своего собственного гена. К тому же MKP-1 является субстратом MAP-киназы, которая и переводит ее в активное состояние. Помимо активации, фосфорилирование делает MKP-1 менее чувствительной к протеолизу, что позволяет ей сохраняться до тех пор, пока сохраняется активная (фосфорилированная) MAP-киназа

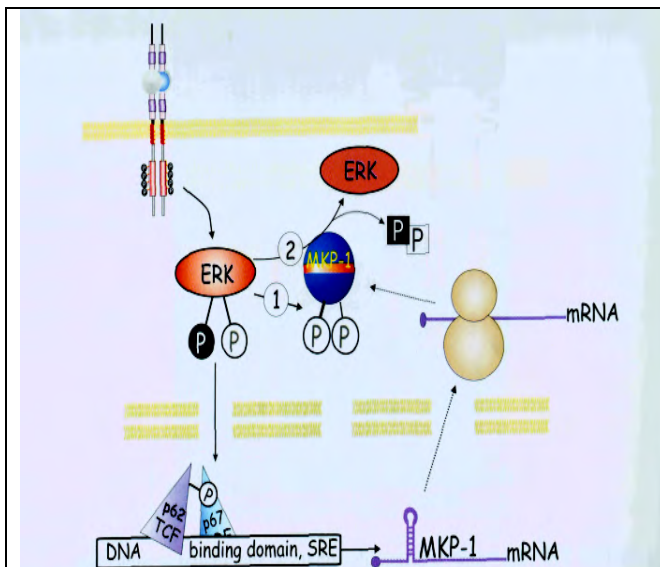


Рис. 8.3 MKP-1, отрицательный регулятор MAP киназ. При стимуляции рецептора фактором роста активируется киназа ERK и экспрессируется ген фосфатазы MKP-1. После трансляции mRNA синтезированный белок фосфорилируется киназой ERK и становится активным (1). Активная MKP-1 дефосфорилирует и инактивирует киназу ERK (2), прерывая т.о. сигнал от фактора роста.

Примеры функционирования фосфатаз.

G-субъединица фосфатазы PP1G имеет два места фосфорилирования. Фосфорилирование G-субъединицы фосфатазы PP1G делает возможным ее участие в передаче сигнала с различных рецепторов и в регуляции различных процессов (через адреналин и Ca^{2+} - активировать гликогенолиз, а через инсулин – синтез гликогена). В скелетных мышцах протеинкиназа A фосфорилирует сайт 2 G-субъединицы фосфатазы, а инсулин-стимулируемая протеинкиназа (ISPK) фосфорилирует сайт 1 G-субъединицы. Оба сайта локализованы на N-концевом регуляторном домене. Фосфорилирование сайта 1 (инсулин) приводит к активации PP1G и дефосфорилированию гликогенсинтазы (что увеличивает активность синтазы) и киназы фосфорилазы (подавляет активность киназы). И наоборот, адреналин вызывает фосфорилирование сайта 2, понижая стабильность димера PP1G в 10^4 раз, что приводит к высвобождению каталитической субъединицы в цитозоль, где она взаимодействует с белком-ингибитором. Регуляторная G-субъединица остается связанной с гликогеном. При подавленной фосфатазной активности фосфорилирование гликоген-метаболизирующих ферментов благодаря РКА сохраняется, (гликогенсинтаза подавлена и киназа фосфорилазы активирована). Дефосфорилирование сайта 2 фосфатазы PP1G и его реактивация опосредованы PP2A и Ca^{2+} -зависимой PP2B. Механизмы, которые контролируют активность фосфатазы (PP1) в печени и мышцах, различны. В печени активность G-субъединицы не контролируется фосфорилированием. Вместо ингибирования активности фосфатазы, необходимо подавить центр активности гликогенсинтазы, приводимой в действие фосфорилированной (активной) формой фосфорилазы.

Роль PP2B (кальцинейрина) в регуляции пролиферации Т-клеток.

В настоящее время известно, что фосфатаза PP2B широко распространена и присутствует во многих тканях. Первоначально она была идентифицирована как Ca^{2+} – связывающий белок нервной ткани, который был назван кальцинейрином. Только позже было установлено, что он обладает фосфатазной активностью, и что его регуляторная субъединица является Ca^{2+} – связывающим белком кальмодулином. Эта фосфатаза состоит из трех субъединиц: кальцинейрин A (каталитическая субъединица), кальцинейрин B (регуляторная кальмодулин-подобная субъединица) и непосредственно кальмодулин. B-субъединица определяет субстратную специфичность. Кальцинейрин может быть активирован либо в результате увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле, либо в результате фосфорилирования кальцинейрина B, последнее настолько увеличивает сродство к Ca^{2+} , что активация может происходить при концентрации Ca^{2+} , характерной для состояния покоя. Функциональная роль фосфатазы стала яснее благодаря использованию циклоспорина и FK506, применяемых для подавления иммунных ответов опосредованных Т-лимфоцитами.

с АМР-зависимая регуляция активности фосфатазы

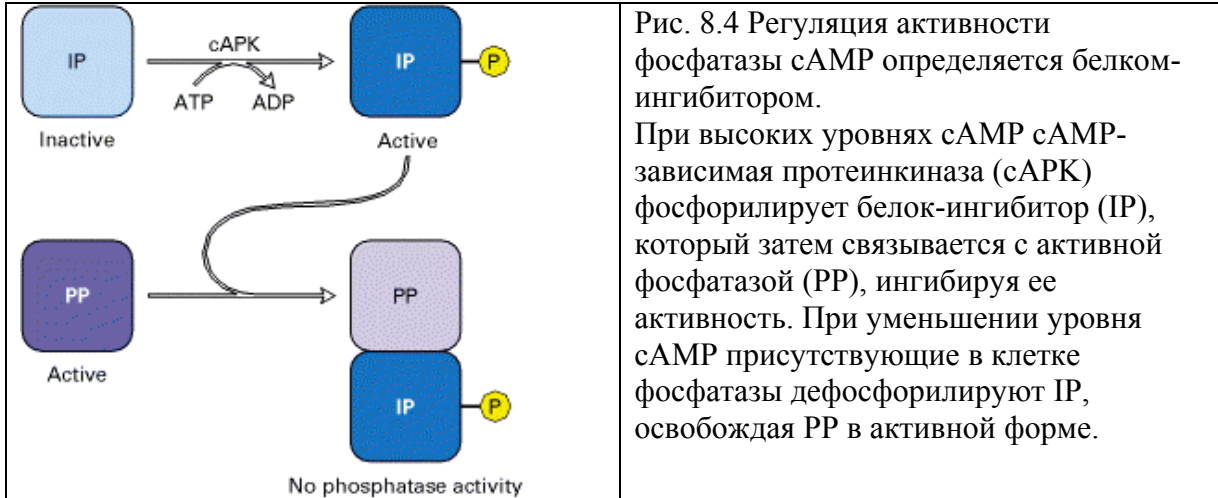


Рис. 8.4 Регуляция активности фосфатазы сАМР определяется белком-ингибитором.

При высоких уровнях сАМР сАМР-зависимая протеинкиназа (сАРК) фосфорилирует белок-ингибитор (IP), который затем связывается с активной фосфатазой (PP), ингибируя ее активность. При уменьшении уровня сАМР присутствующие в клетке фосфатазы дефосфорилируют IP, освобождая PP в активной форме.

Заключение

Участие фосфатаз в системах передачи сигналов, механизмы регуляции их активности в настоящее время недостаточно изучены. Предполагается, что в геноме млекопитающих закодировано 100-120 каталитических субъединиц фосфатаз, кроме того, существует большое количество регуляторных субъединиц, все это свидетельствует о большом количестве мишеней и регулируемых функций.