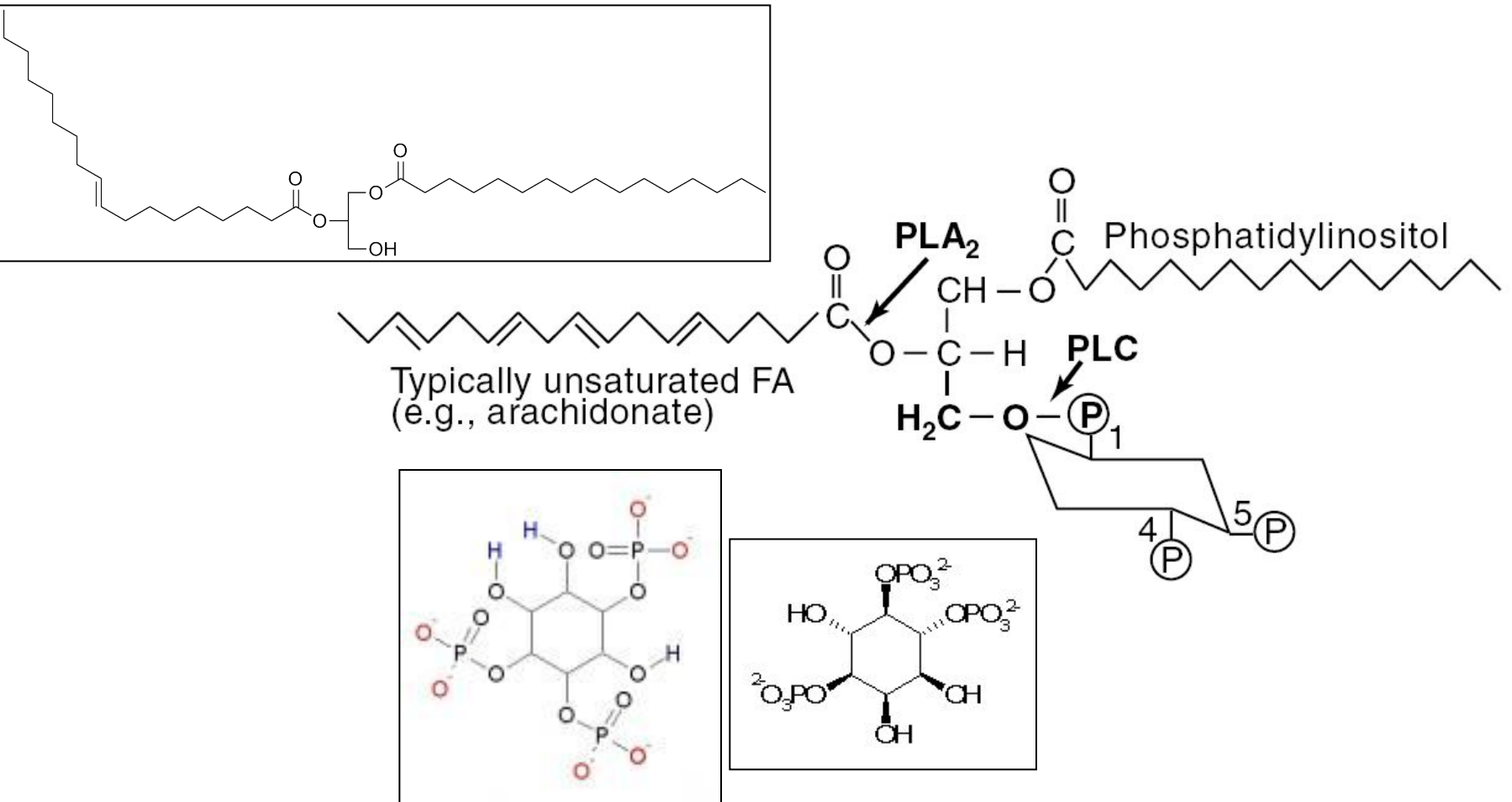


Вторичные посредники: производные липидов

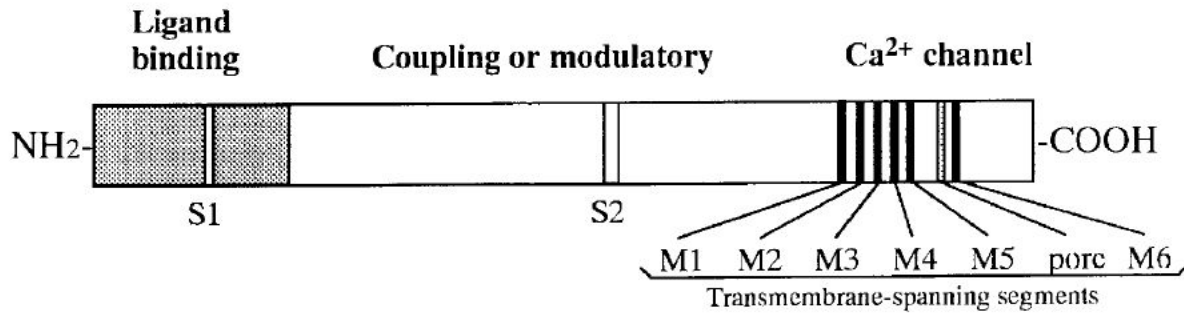
Диацилглицерол (ДАГ) и **ИФ₃** являются производными мембранных липидов. Они синтезируются из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (ФИФ₂).

ФИФ₂ разрезается **фосфолипазой С**, которая активируется Gq-белками и Ca²⁺. В результате ФИФ₂ разделяется на две молекулы (**ДАГ** и **ИФ₃**), каждая из которых функционирует как вторичный посредник.



ИФ3- рецептор

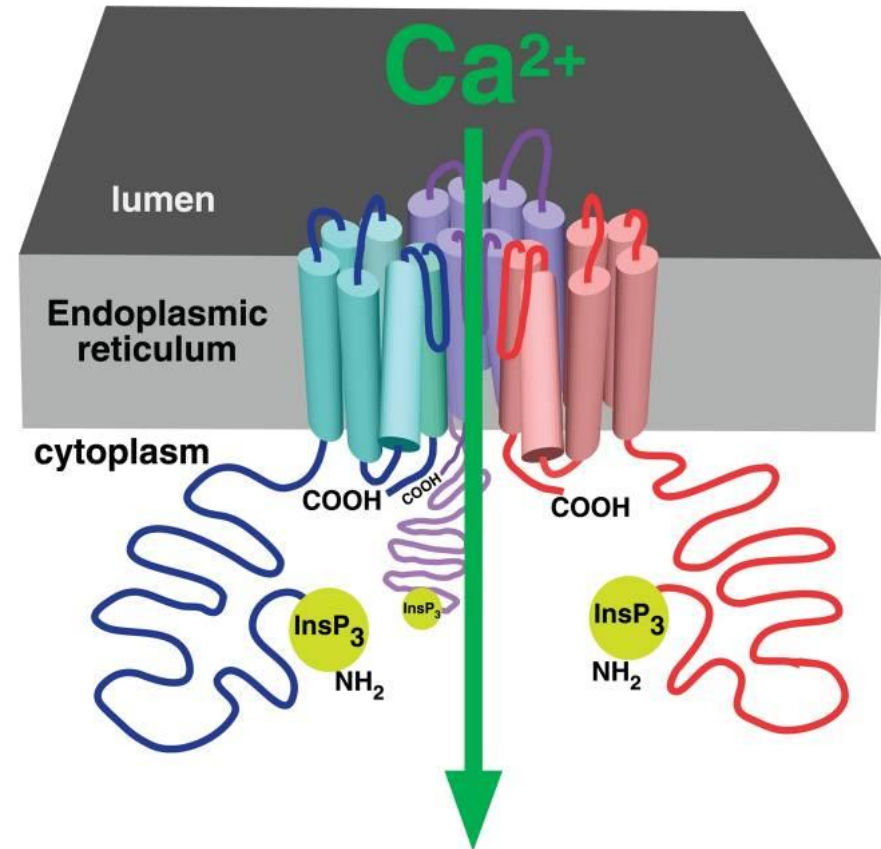
Domain structure



Состоит из 4-х субъединиц-доменов (тетрамер)

Структура домена:

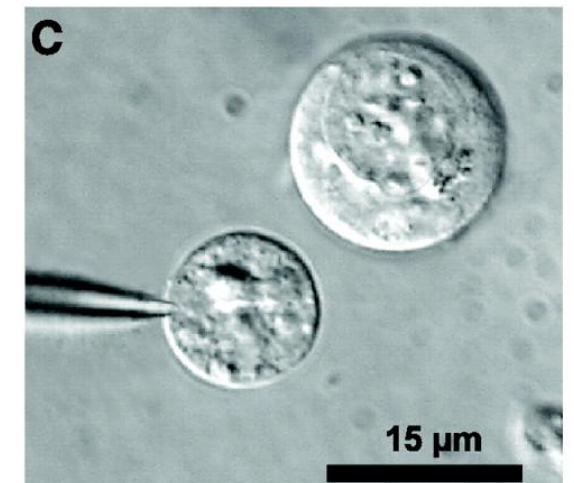
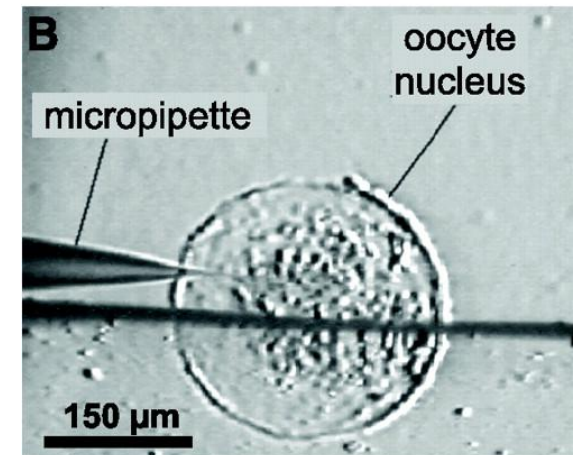
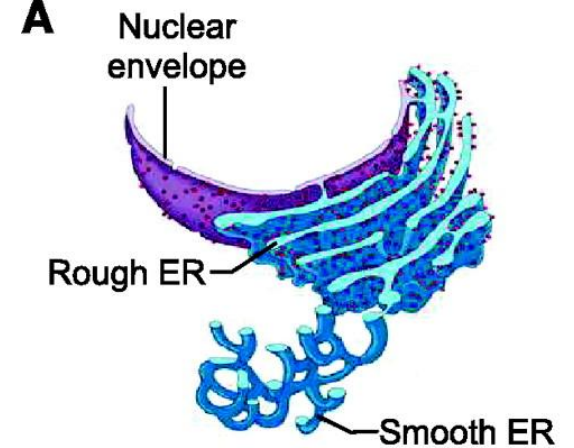
- сайт связывания с ИФ3
- сайт сцепления
- типичный Ca²⁺-канал (6 трансмембранных сегментов)



Nuclear patch-clamp electrophysiology.

A: schematic of cell nucleus, illustrating that the outer membrane of the double-membrane nuclear envelope is continuous with the endoplasmic reticulum (ER), with the lumen between the two membranes continuous with the ER lumen.

Patch-clamping isolated *Xenopus* oocyte nucleus (B) and insect Sf9 cell nucleus (C) visualized on the stage of a patch-clamp microscope, with patch pipettes forming giga-ohm seals on the outer nuclear membrane. Horizontal shadow over the *Xenopus* nucleus is the edge of a stabilizing piece of coverslip. Intact Sf9 cell is also present in C.



Article Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels

Minimize 

TABLE 1. Permeability and conductance properties of the InsP_3R

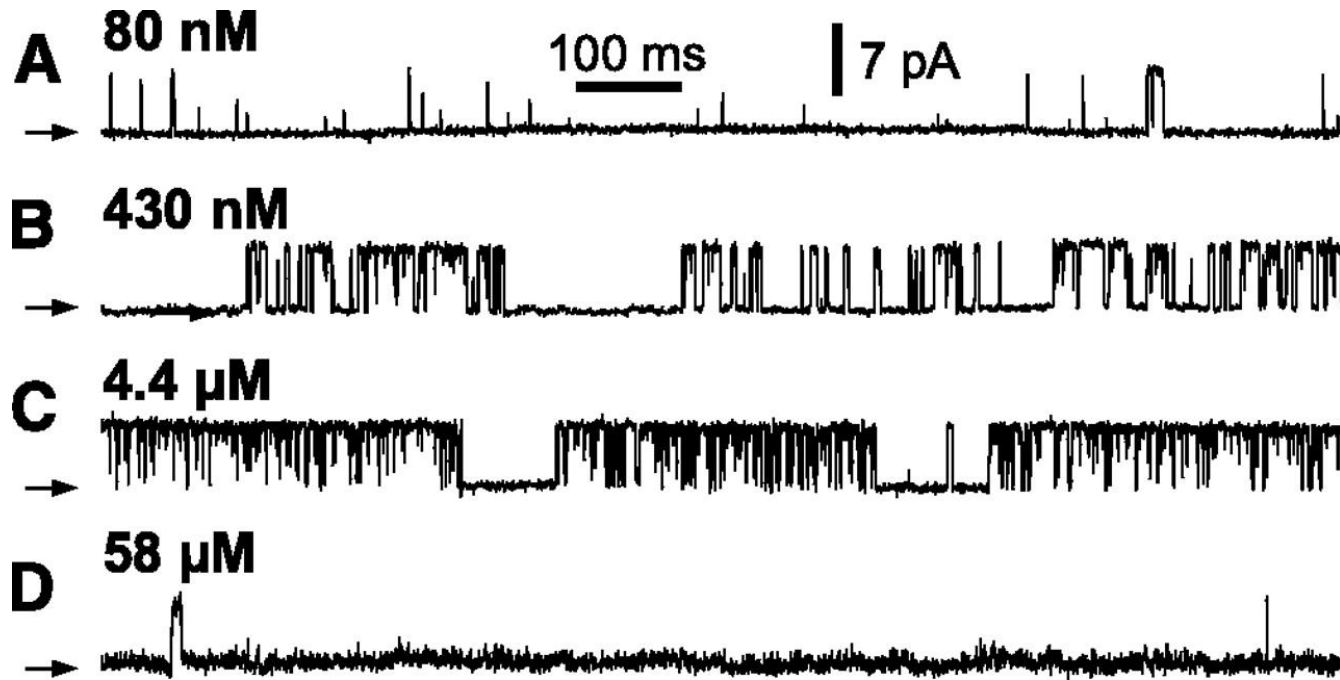
InsP ₃ R Channel	Permeability (P) Sequence					Reference Nos.
	P _{Ca²⁺}	P _{Ba²⁺}	P _{Mg²⁺}	P _{K⁺}	P _{Cl⁻}	
<i>Xenopus</i> InsP ₃ R-1 [*]	7.6 :	4.3 :	3.2 :	1 :	0.23	276, 277
Sf9 InsP ₃ R [*]	10 :		6.8 :	1 :	0.2	196
Rat InsP ₃ R-1 [†]	5.2 :	5.7 :		1		294
Rat InsP ₃ R-1 [†]		6.3 :		1		33
Recombinant rat InsP ₃ R-1 [‡]	4.3 :			1 :	0.07	42
Recombinant rat InsP ₃ R-3 [‡]	5.6 :			1 :	0.2	284
Sheep RyR2	6.5 :	5.8 :	5.9 :	1		473

InsP ₃ R Channel	Conductance (G) Sequence, pS					Reference Nos.
	G _{Ba²⁺}	G _{Sr²⁺}	G _{Ca²⁺}	G _{Mg²⁺}	G _{Mn²⁺}	
Rat InsP ₃ R-1 [†]	85 :	77 :	53 :	42 :	17	33, 438

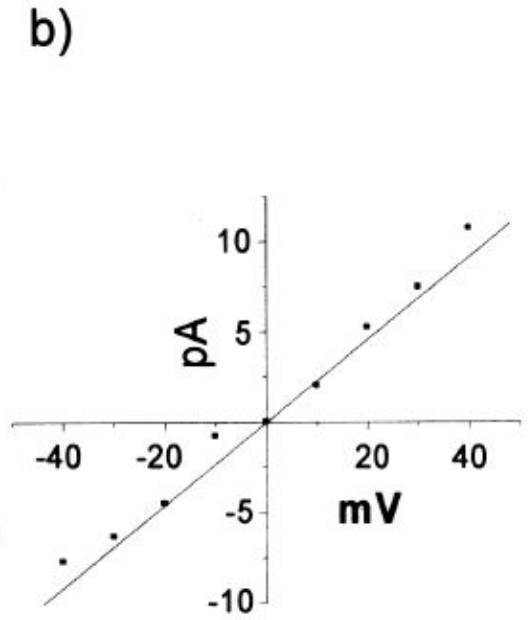
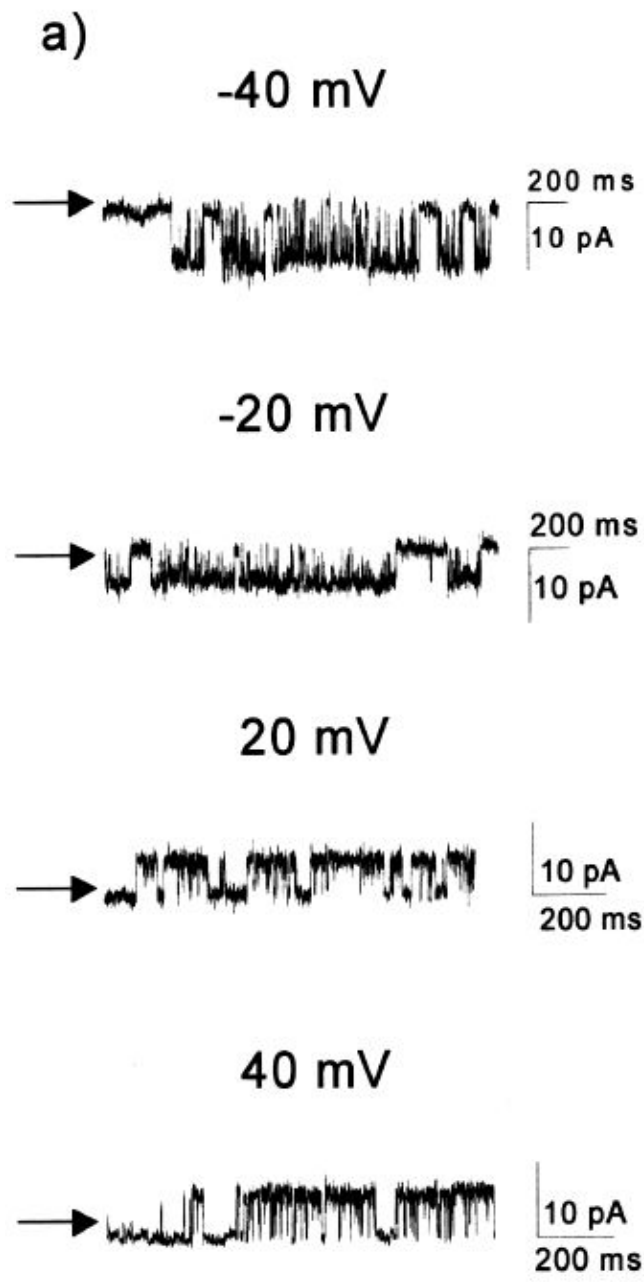
^{*} Endogenous channel in nuclear envelope.

[†] Reconstituted from cerebellar microsomes; presumably the type 1 isoform.

[‡] Expressed recombinant channel recorded in nuclear envelope.



Typical single-channel current traces of X-InsP₃R-1 in various cytoplasmic Ca²⁺ concentrations and saturating 10 μ M InsP₃. Current traces were recorded during nuclear patch-clamp experiments at cytoplasmic Ca²⁺ concentrations as tabulated, in 0.5 mM free ATP. All current traces in this and other graphs were recorded at 20 mV. Arrows indicate closed-channel current level in all current traces. Channel open probability (P_o) was evaluated for the single-channel patch-clamp experiments yielding the current traces shown in A, B, C, and D of 0.008, 0.50, 0.89, and 0.002, respectively.



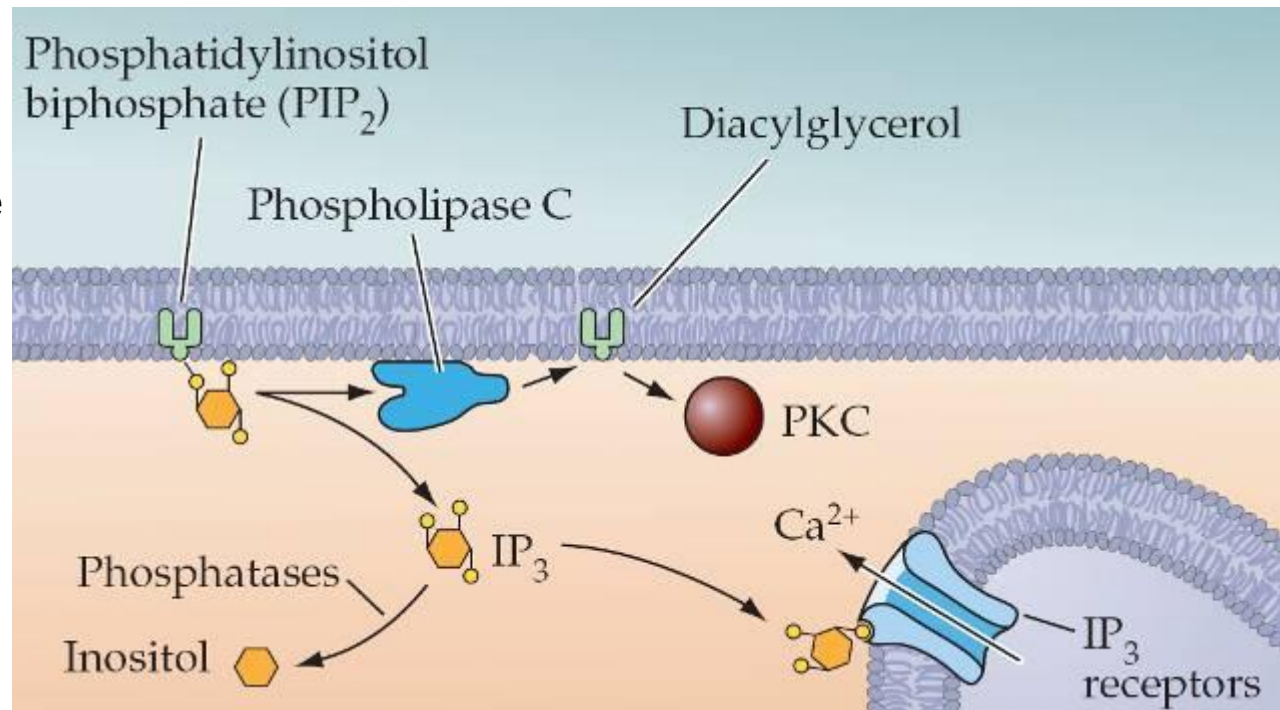
Вторичные посредники: производные липидов

ДАГ остается в мембране и активирует **протеинкиназу С**, которая фосфорилирует свои субстратные белки как в мембране, так и за ее пределами.

ИФ₃ покидает мембрану и диффундирует в цитозоле. ИФ₃ связывается со своим рецептором, локализованным в мембране эндоплазматического ретикулума. В результате открываются Ca²⁺-каналы, пропускающие Ca²⁺-ток из цистерн внутриклеточных депо в цитоплазму. Таким образом, ИФ₃, как внутриклеточный сигнал, производит еще один вторичный посредник (в данном случае, **третичный посредник!**) - Ca²⁺.

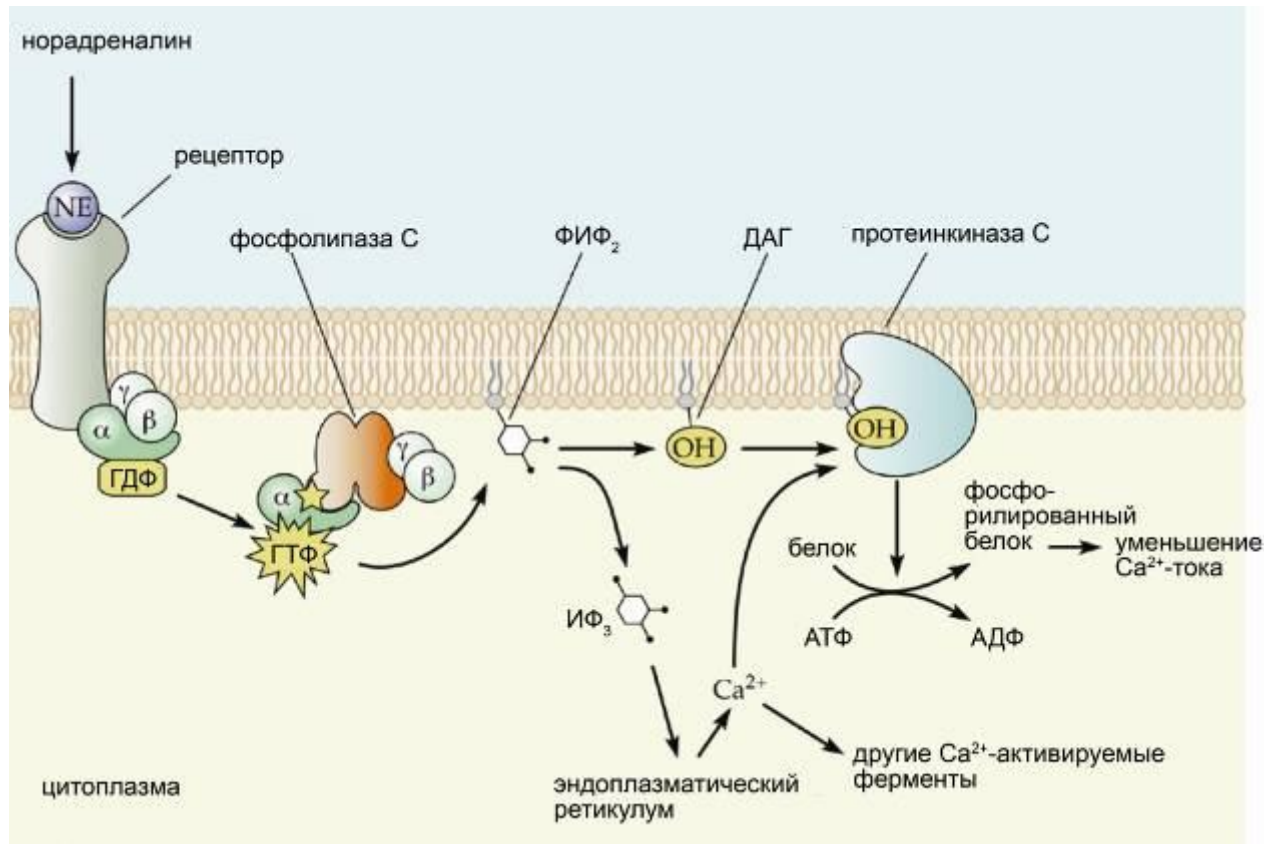
Действие ДАГ и ИФ₃ заканчивается в результате их enzymатического преобразования в инертные формы, например, фосфатазы отщепляют фосфатные остатки от ИФ₃, превращая его в инозитол.

Такие инертные формы могут быть рециклированы для синтеза новых молекул ИФ₂.



Активация фосфолипазы С

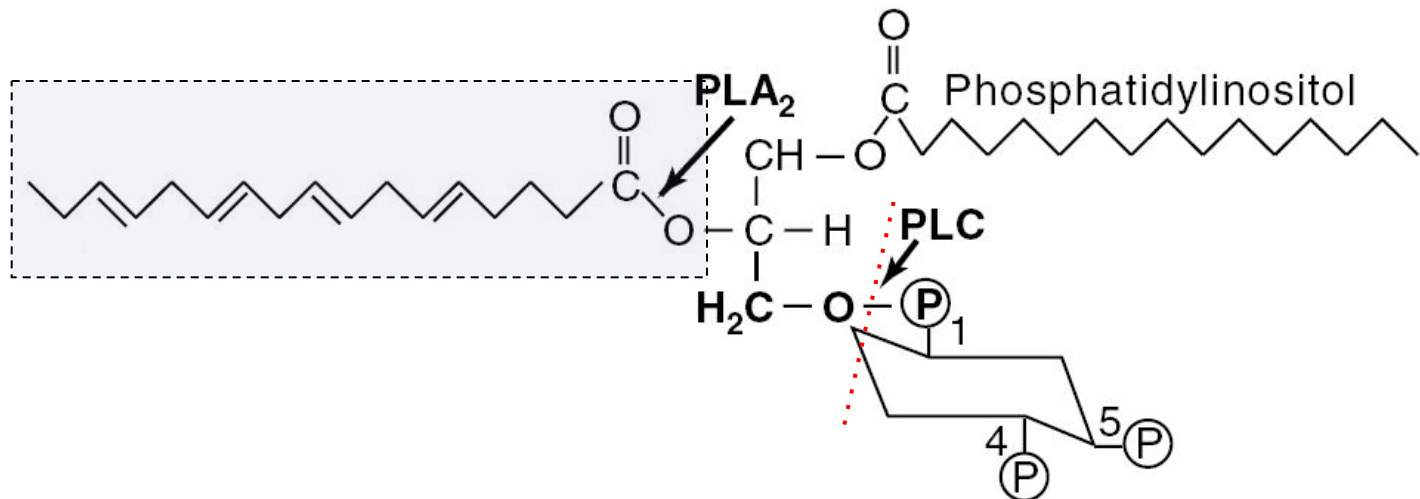
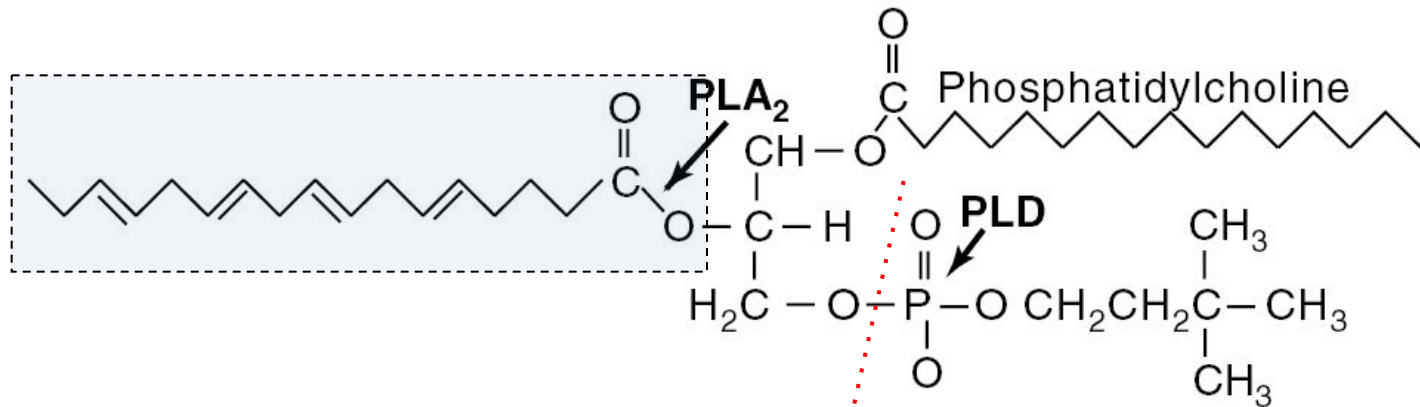
Норадреналин (NE) активирует цепи внутриклеточной сигнализации с участием внутриклеточных липидов в роли вторичных посредников. Норадреналин, связываясь с рецептором, через G-белок активирует **фосфолипазу С**, которая гидролизует фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат (ФИФ₂) с образованием двух вторичных посредников - **ИФ₃** и **ДАГ**. ИФ₃, связываясь со своими рецепторами на мембранах эндоплазматического ретикулума, вызывает высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо в цитоплазму. Увеличение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ активирует **протеинкиназу С**. ДАГ также активирует **протеинкиназу С**.



Вторичные посредники: арахидоновая кислота

синтез и производные

ДАГ (отделен **красным** пунктиром) является источником еще одного вторичного посредника липидного происхождения. Некоторые G-белки активируют цитоплазматическую **фосфолипазу A₂ (PLA₂)**, которая отделяет от ДАГ жирную кислоту, как правило, **арахидоновую кислоту** (выделена рамкой).



Вторичные посредники: арахидоновая кислота синтез и производные

ДАГ является источником еще одного вторичного посредника липидного происхождения. Некоторые G-белки активируют цитоплазматическую **фосфолипазу A₂**, которая отделяет от ДАГ жирную кислоту, как правило, **арахидоновую кислоту**.

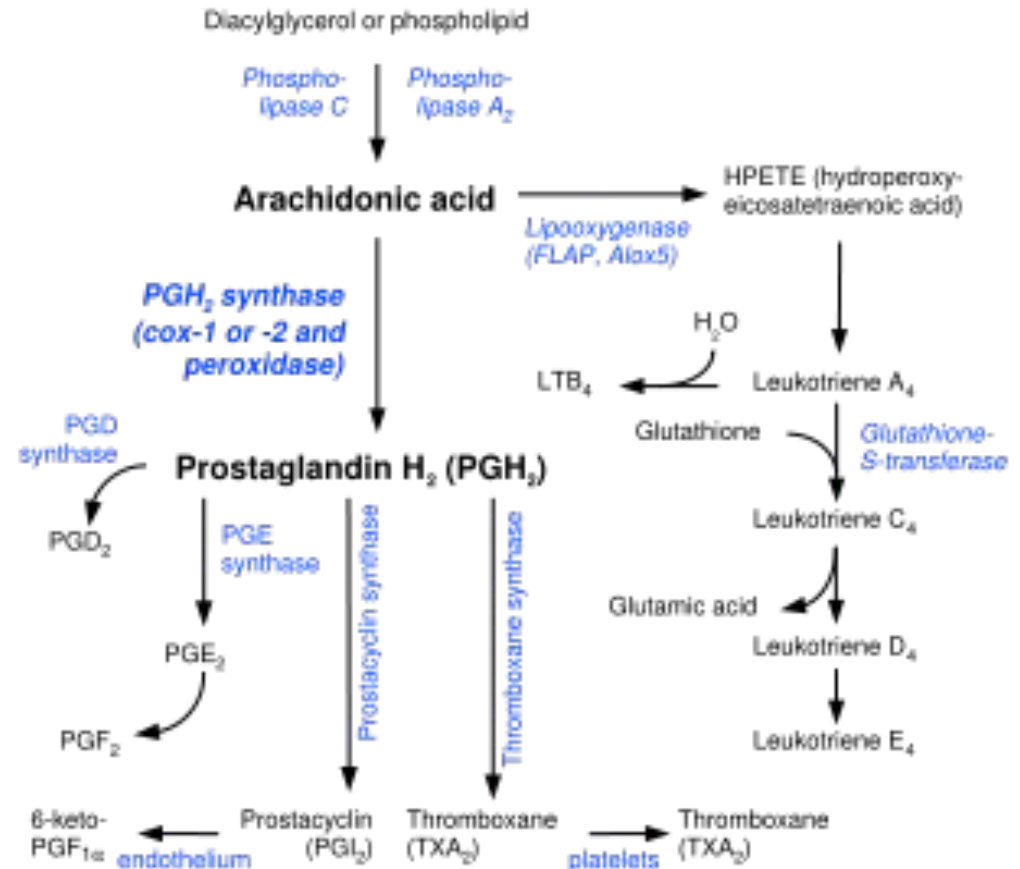
Рядом ферментов (**липоксигеназ**, **циклооксигеназ**) арахидоновая кислота преобразуется в свои многочисленные производные, например:

- две **HPETE** (*Hydro-Peroxy-Eikoba-Tetra-Enoic acid*),

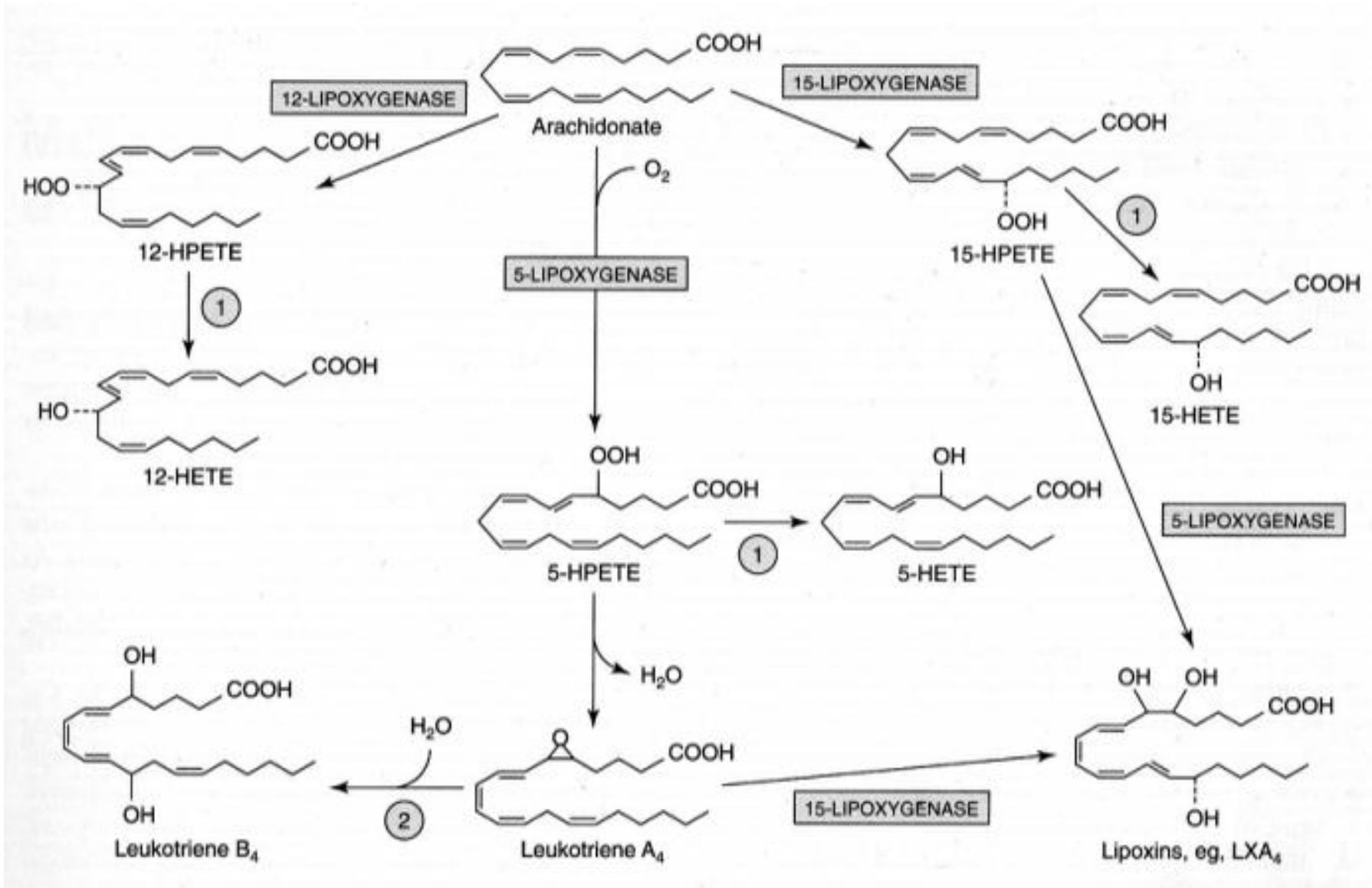
- **лейкотриены**,

- **простогландины**,

которые являются третичными посредниками.



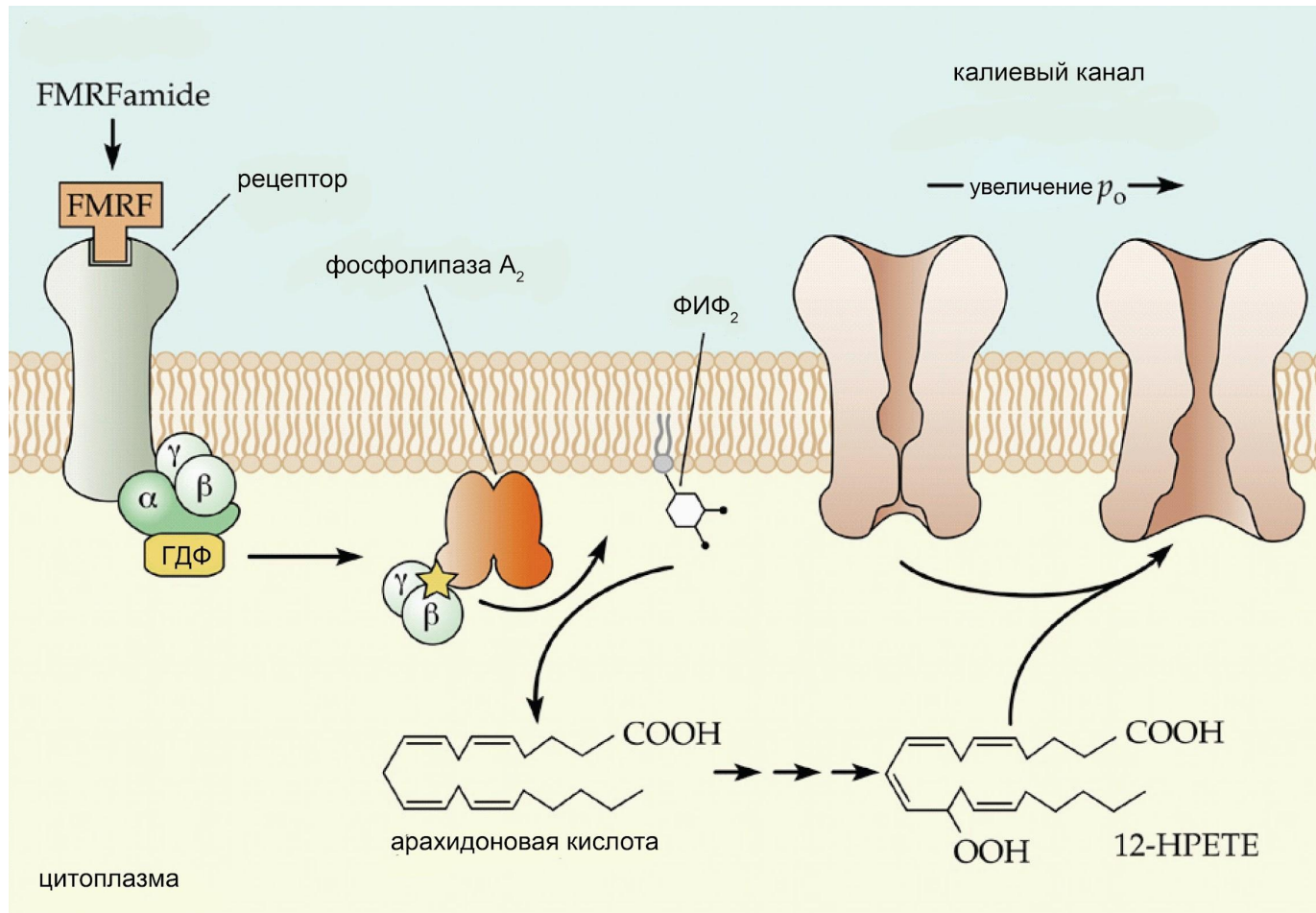
Вторичные посредники: арахидоновая кислота синтез и производные



Вторичные посредники: арахидоновая кислота

ДАГ является источником еще одного вторичного посредника липидного происхождения.

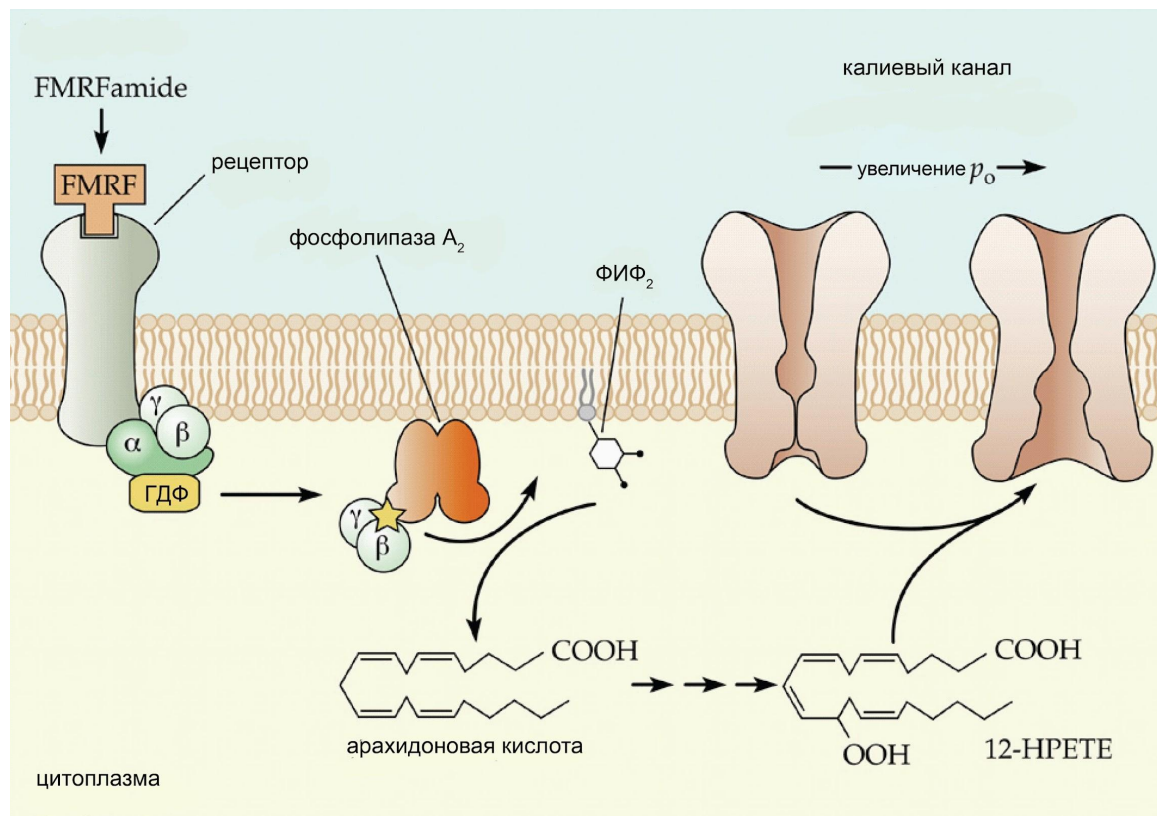
Некоторые G-белки активируют цитоплазматическую фосфолипазу A_2 , которая отделяет от ДАГ жирную кислоту, как правило, **арахидоновую кислоту**.



Вторичные посредники: арахидоновая кислота

Арахидоновая кислота активирует протеинкиназу C, которая в свою очередь фосфорилирует ионные каналы.

Производные арахидоновой кислоты оказывают специфические физиологические эффекты. Например, 12-HPETE связывается с K^+ -каналами, увеличивая вероятность их открытия.

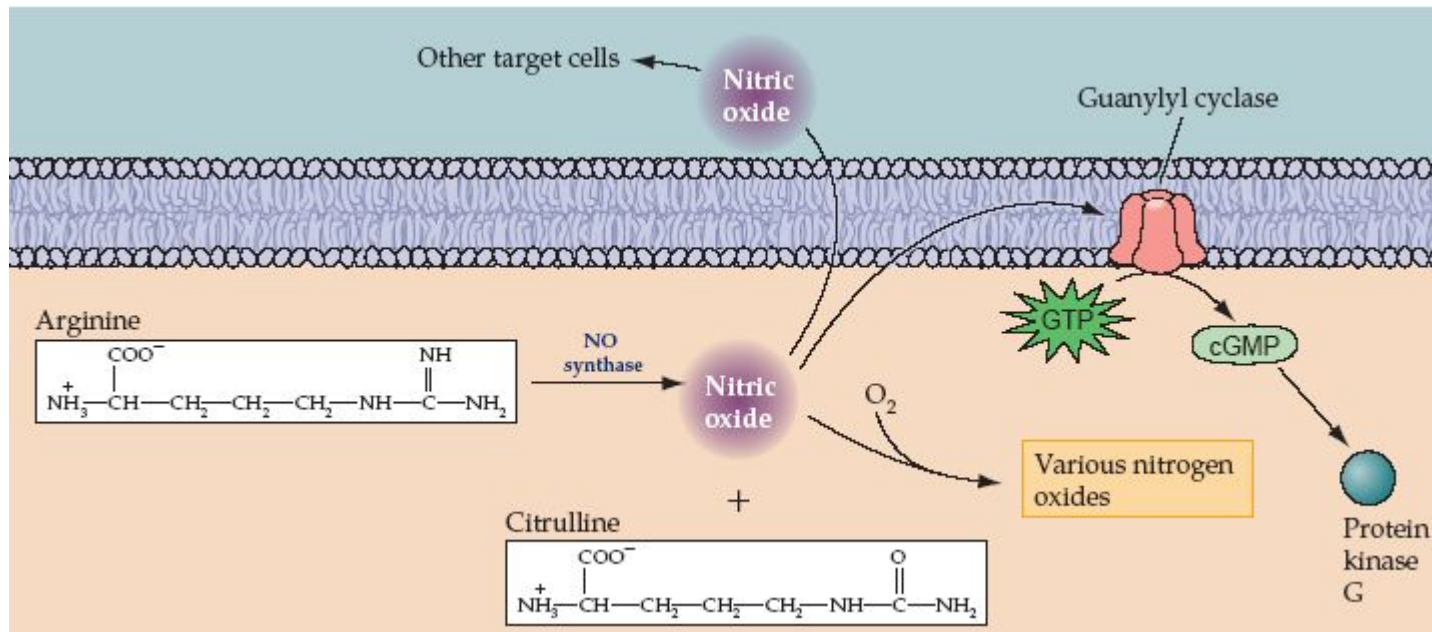


NO - вторичный посредник нежели необычный медиатор

NO синтезируется NO-синтазой, которая в нейронах регулируется Ca^{2+} /калмодулином.

NO напрямую активирует ассоциированную с мембраной гуанилатциклазу. цГМФ активирует цГМФ-зависимую протеин киназу.

Фосфорилирование K^+ -каналов приводит к их открытию, а также к запуску Ca^{2+} -насосов, что приводит к гиперполяризации мышечных клеток и их расслаблению.



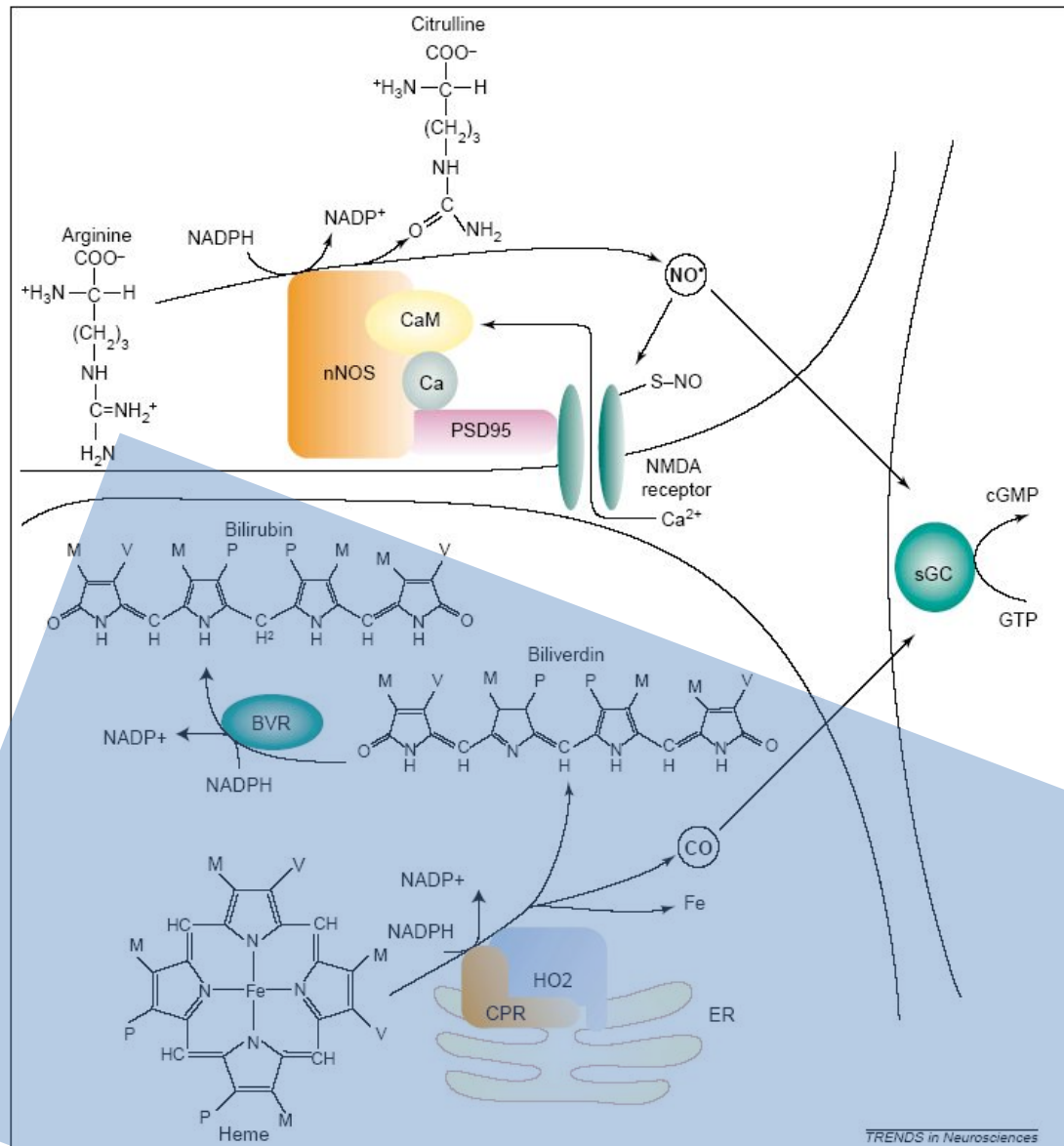
Каскад вторичного посредника NO

When the NMDA receptor is activated, Ca^{2+} enters the cytosol, binds to calmodulin (CaM), and activates nNOS.

nNOS uses oxygen and the reducing equivalents of NADPH to catalyze the conversion of arginine to citrulline and NO. NO is a short-lived, freely diffusible radical.

Besides generating free radicals such as peroxynitrite, NO can nitrosylate proteins directly by reacting with free cysteines. When the NMDA receptor is nitrosylated, NMDA-evoked currents are diminished, possibly providing negative feedback for NO production.

NO also activates soluble guanyl cyclase, which converts GTP to cGMP.



Вторичные посредники: CO

Свойства монооксида углерода (CO) схожи со свойствами NO.

CO продуцируется в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов **оксигеназой гема**, которая активируется при фосфорилировании **протеинкиназой C**.

Также как и NO легко растворимый в воде и липидах CO диффундирует в ближайшие гладкомышечные клетки и активирует **гуанилатциклазу**, которая активирует **цГМФ-зависимую протеинкиназу**.

Фосфорилирование K^+ -каналов приводит к их открытию, а также к запуску **Ca^{2+} -насосов**, что приводит к **гиперполяризации** гладкомышечных клеток и их расслаблению (как и в случае NO).

В мозге обнаружена специфическая форма оксигеназы гема, что предполагает участие CO в сигнализации между нейронами в ЦНС.

Каскад вторичного посредника CO

Heme has a highly conjugated porphyrin ring with an iron atom chelated in the center and three different substituents on the outside (M = methyl, V = vinyl, P = propionate).

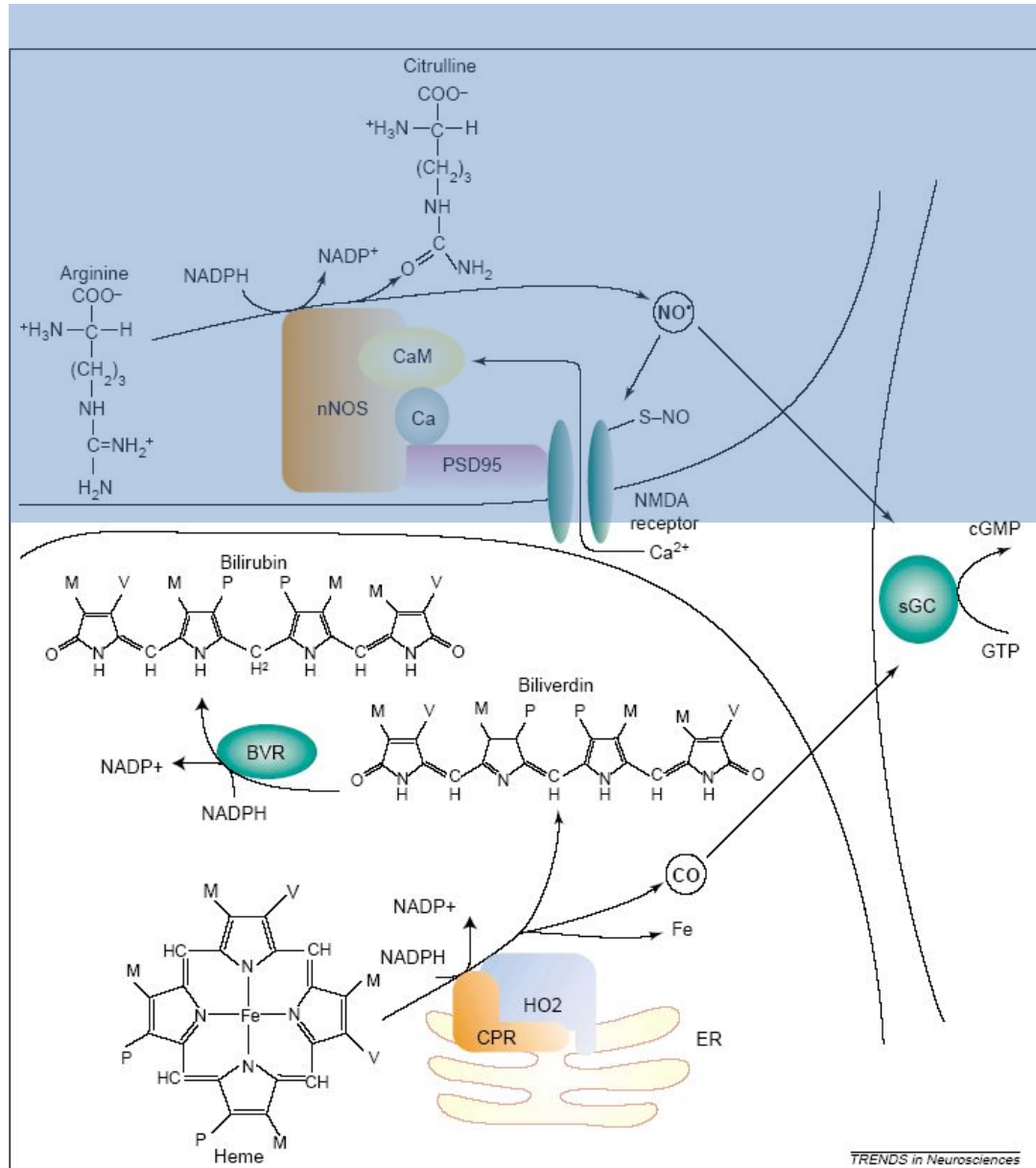
Heme oxygenase-2 (HO2) is a 36 kDa protein with a short hydrophobic C-terminus that anchors it to the endoplasmic reticulum (ER).

Together with NADPH and cytochrome P450 reductase (CPR), it catalyzes a mixed oxidation–reduction reaction in which the α -meso bridge of heme is cleaved, releasing an iron atom and producing biliverdin and CO.

Biliverdin is rapidly reduced to bilirubin by biliverdin reductase (BVR).

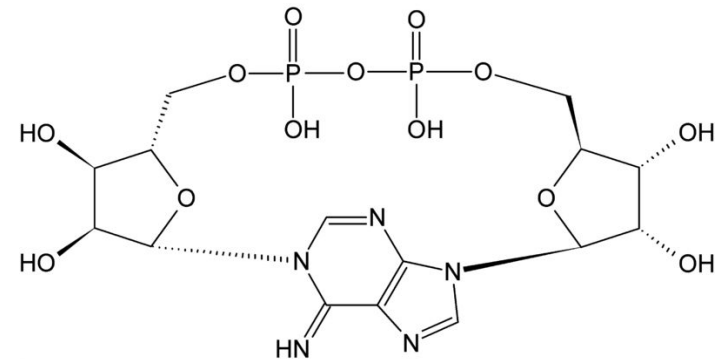
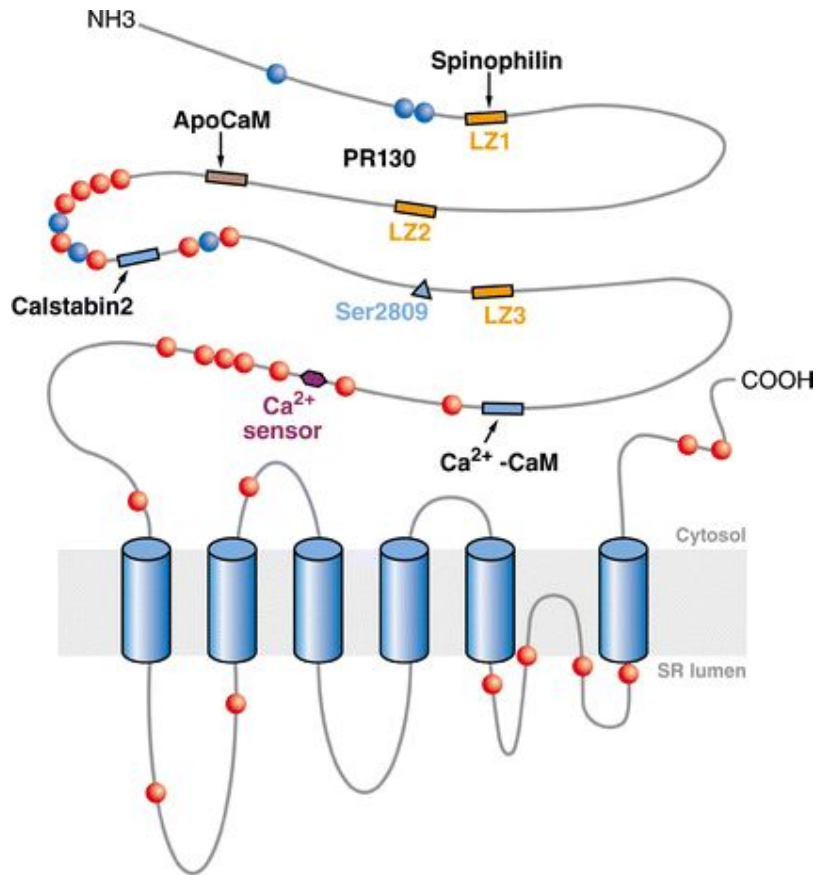
CO, another freely diffusible diatomic gas, binds to and activates sGC.

Both CO and NO bind to the heme moiety of sGC.



Еще вторичные посредники

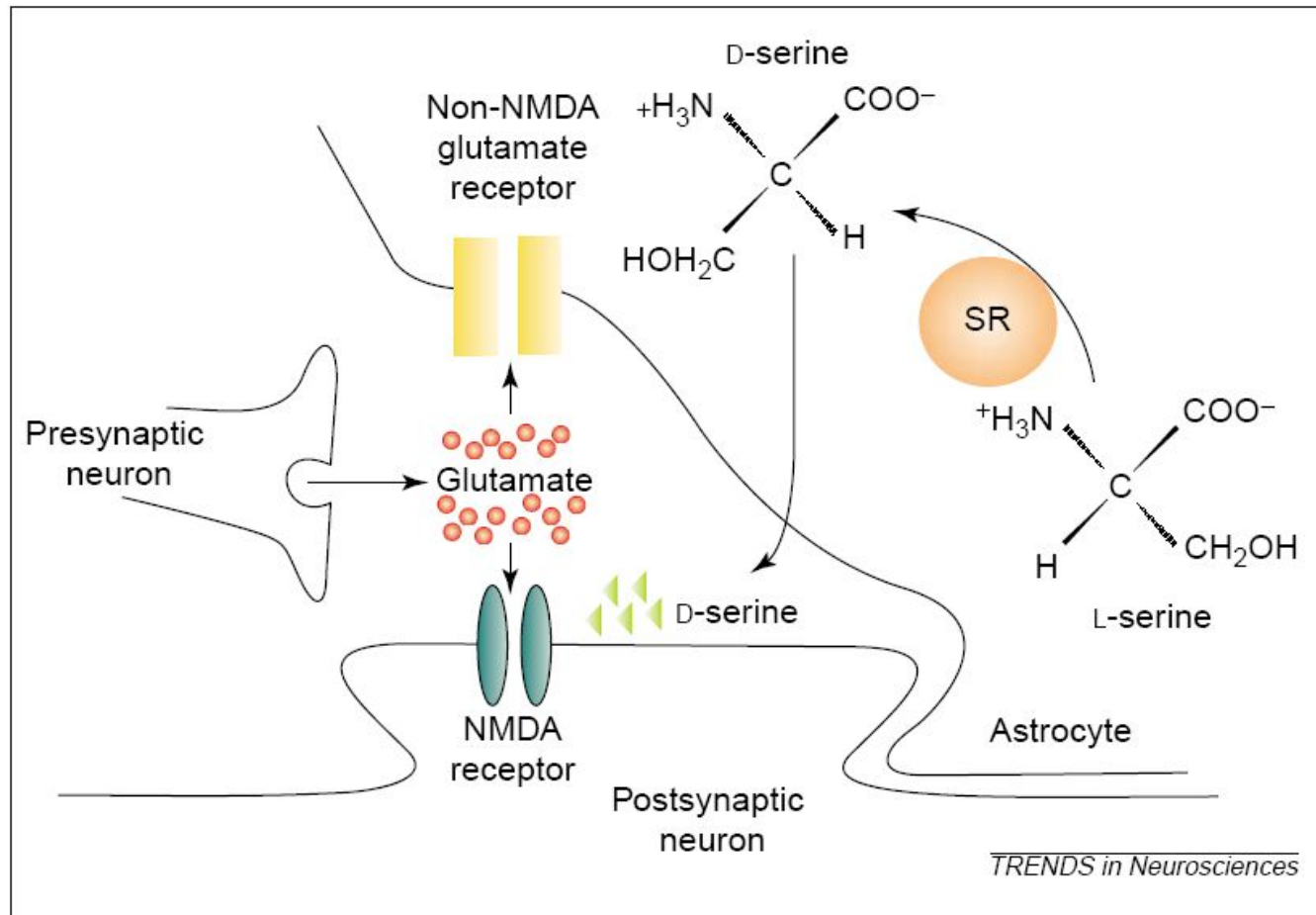
В сердце и поджелудочной железе рианодиновый рецептор активируется вторичным посредником - **циклической АДФ-рибозой** (*Cyclic ADP-ribose*)



Еще вторичные посредники

D-serine is a co-agonist at the NMDA receptor.

Type II astrocytes ensheath synapses containing NMDA receptors. In these astrocytes, D-serine is synthesized from L-serine, by a cytosolic enzyme, serine racemase (SR). When the presynaptic neuron releases glutamate, it acts not only on the postsynaptic neuron, but also on the surrounding astrocyte. Activation of the astrocytes non-NMDA glutamate receptors releases D-serine, which binds to the NMDA receptor at the same site as glycine. The concerted binding of D-serine and glutamate results in opening of the NMDA receptor channel.

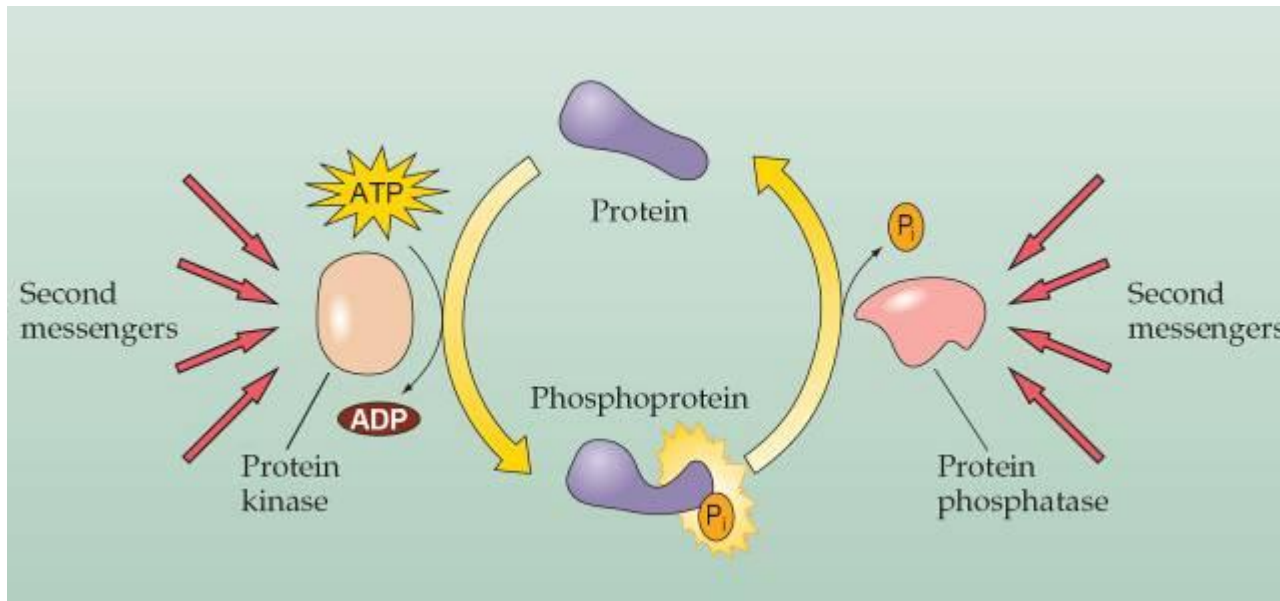


Некоторые киназы, активируемые через системы вторичных посредников

Вторичные посредники регулируют нейронные функции, модулируя состояние внутриклеточных белков через их **фосфорилирование**.

Белки фосфорилируются большим числом **протеин киназ**; фосфатные группы отщепляются от белков **протеин фосфатазами**.

Степень фосфорилирования белка-мишени отражает баланс между конкурирующей активностью **киназ** и **фосфатаз**.



Субстраты киназ и фосфатаз включают ферменты, лиганд-зависимые рецепторы, ионные каналы и структурные белки.

Некоторые киназы: эффекты фосфорилирования

Субстраты киназ и фосфатаз включают ферменты, лиганд-зависимые рецепторы, ионные каналы и структурные белки.

Фосфорилирование вызывает специфические изменения функций белков-мишеней - увеличение или уменьшение:

- 1) **каталитической** активности ферментов;
- 2) **проводимости** ионных каналов;
- 3) **десенситизации** рецепторов.

Обычно фосфорилирование вызывает **конформационные** изменения или изменяет **взаимодействие** с другими белками.

Некоторые киназы: группы киназ и фосфатаз

Протеин киназы и фосфатазы действуют

- на сериновые и треониновые остатки (сериновые/треониновые киназы и фосфатазы)
- или на тирозиновые остатки (тирозиновые киназы и фосфатазы) белков-мишеней.

Некоторые из этих ферментов специфически действуют на один или несколько белков-мишеней, в то время как другие являются многофункциональными и действуют на большое число субстратных белков.

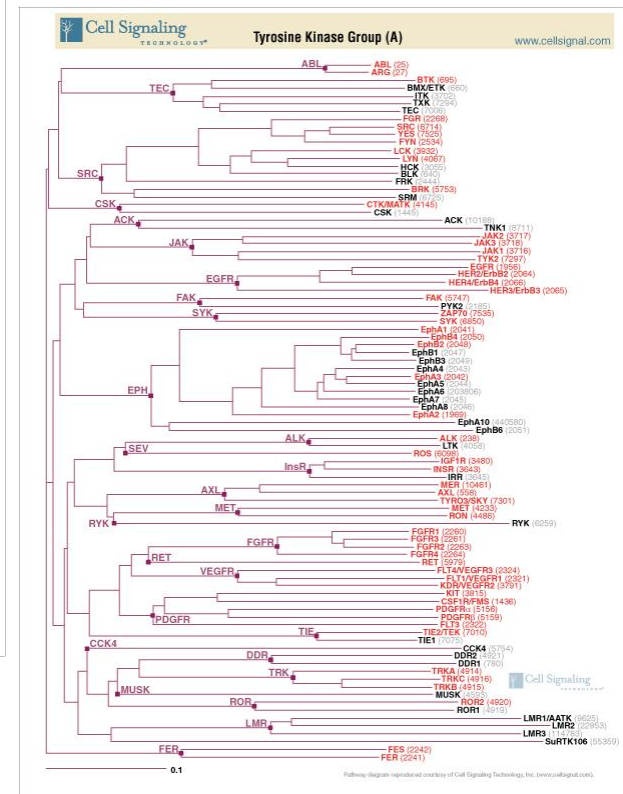
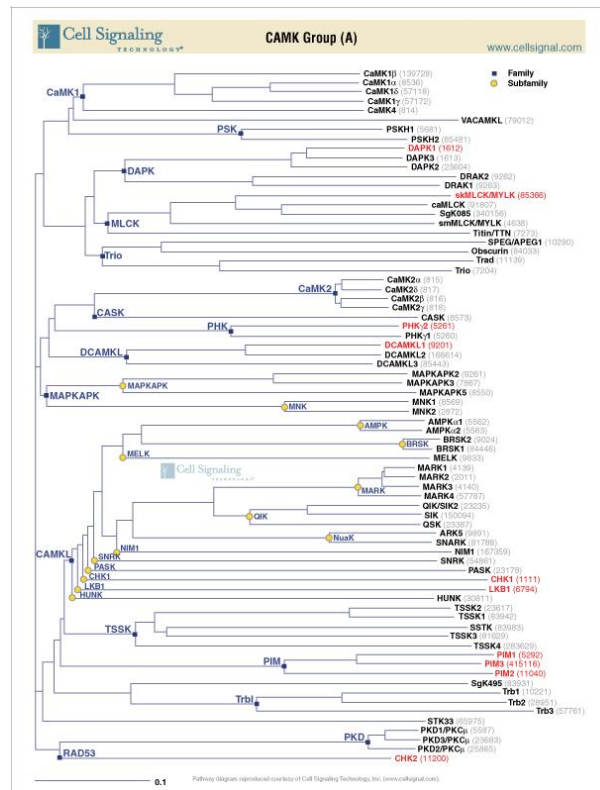
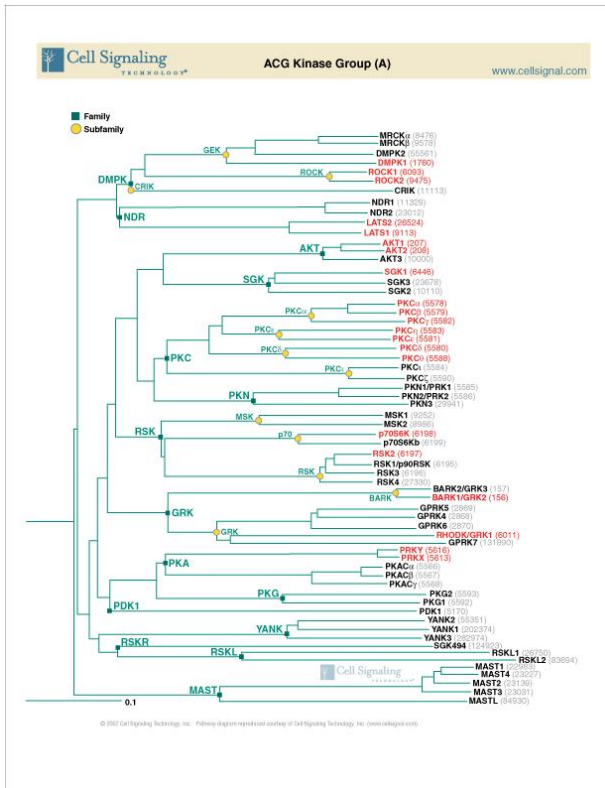
Активность киназ и фосфатаз может регулироваться либо с участием вторичных посредников (цАМФ, Ca^{2+} и других), либо внеклеточными химическими сигналами (например, факторами роста).

Чаще всего вторичные посредники активируют серин/треониновые киназы и фосфатазы,
а внеклеточные сигналы - тирозиновые киназы и фосфатазы.

В мозге представлены тысячи протеинкиназ, но только малая их часть функционирует как регуляторы в путях нейронной сигнализации.

Киназы, активируемые через системы вторичных посредников

В мозге представлены тысячи протеинкиназ, но только малая их часть функционирует как регуляторы в путях нейронной сигнализации.

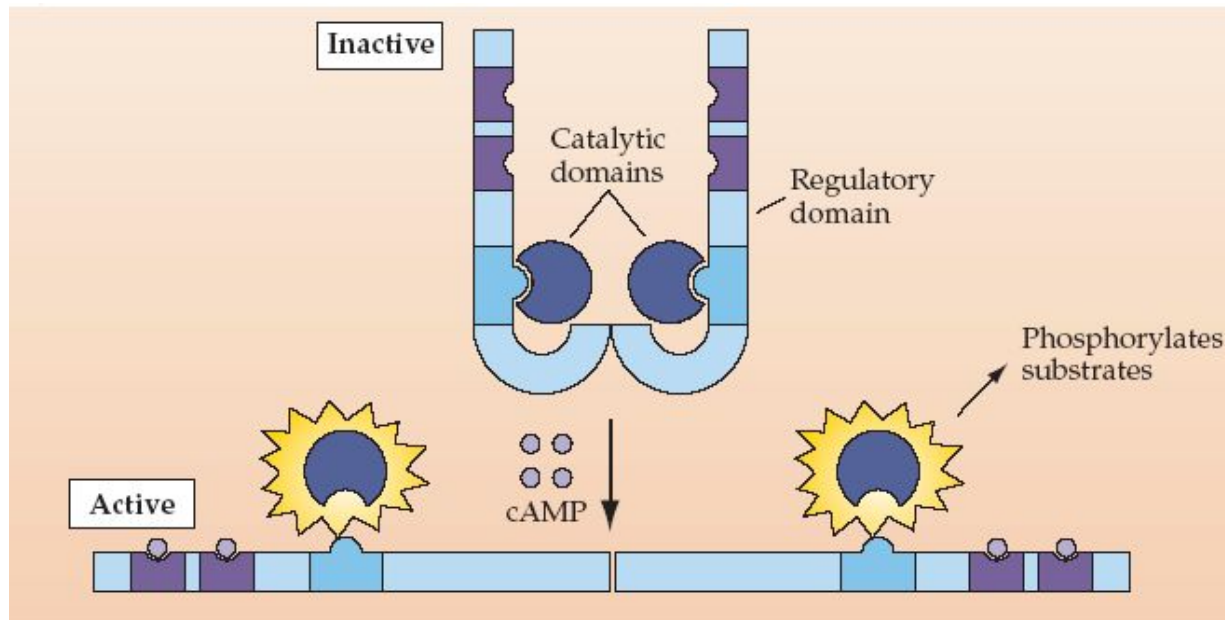


цАМФ-зависимая протеин киназа (ПКА) (англ., cAMP-dependent protein kinase, PKA)

активируется при увеличении концентрации цАМФ. Увеличение концентрации цАМФ может происходить при угнетении активности **фосфодиэстеразы**, которая утилизирует цАМФ.

Эта киназа представляет собой тетрамер, состоящий из двух **каталитических** и двух **тормозных** (регуляторных) субъединиц.

цАМФ активирует ПКА путем связывания с регуляторными субъединицами, что приводит к отсоединению их от каталитических субъединиц, в результате чего последние освобождаются от тормозного действия.



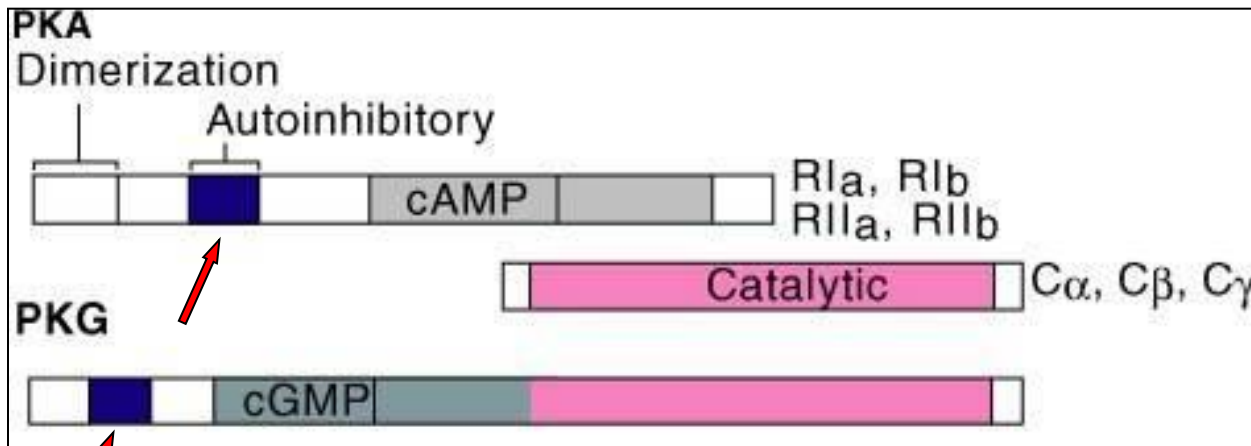
цГМФ-зависимая протеин киназа (ПКГ) (англ., cGMP-dependent protein kinase, PKG)

активируется при увеличении концентрации цГМФ. Увеличение концентрации цГМФ может происходить при угнетении активности **фосфодиэстеразы**, которая утилизирует цГМФ.

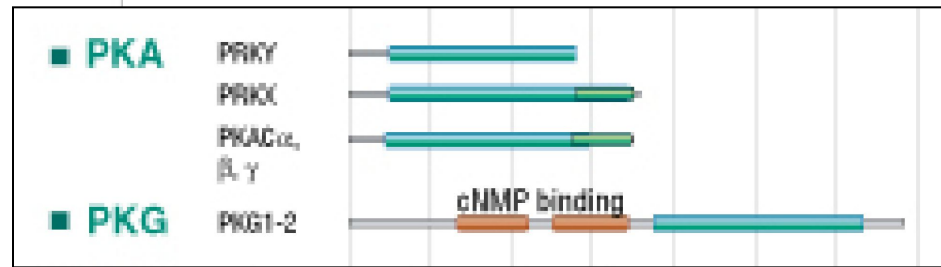
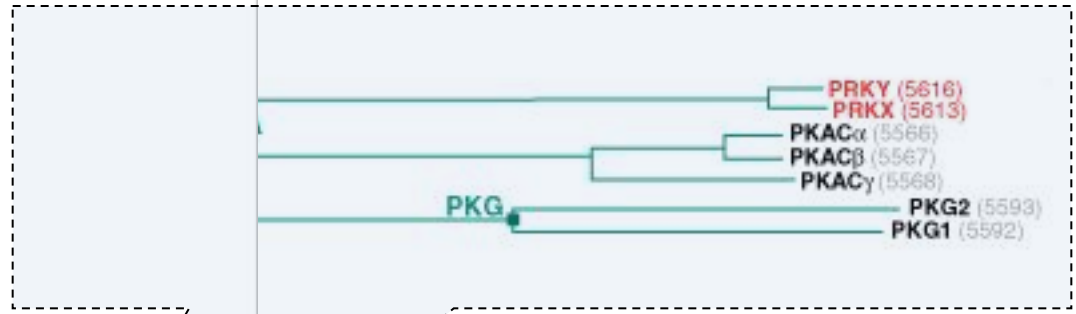
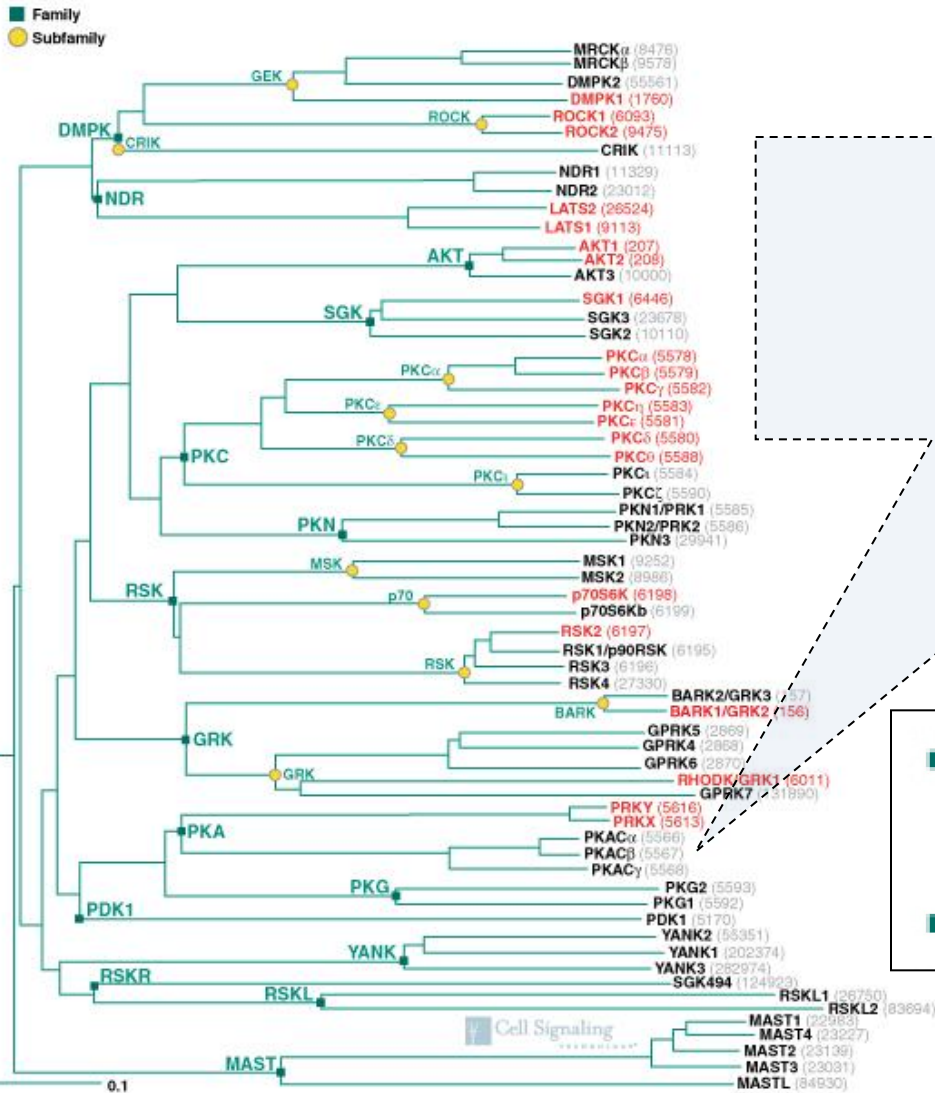
Представляет собой **гомодимер**, состоящий из двух идентичных субъединиц, включающих **каталитический** и **тормозный** (регуляторный) домены. Домен **N-терминали** обеспечивает гомодимеризацию и подавление активности киназы (аутоингибирование, *autoinhibitory*) в отсутствие цГМФ.

Две молекулы цГМФ активируют ПКГ путем связывания с двумя неидентичными сайтами регуляторного домена, что приводит к конформационным изменениям и освобождению каталитического домена от тормозного действия **N-терминали**.

Изоформа **ПКГ-I** преимущественно локализована в цитоплазме, а **ПКГ-II** – прикреплена к плазматической мембране.



цАМФ(цГМФ)-зависимые протеин киназы (РКА, РКГ)



Ca^{2+} /калмодулин-зависимая протеинкиназа типа II (*Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type II, CaMKII*)

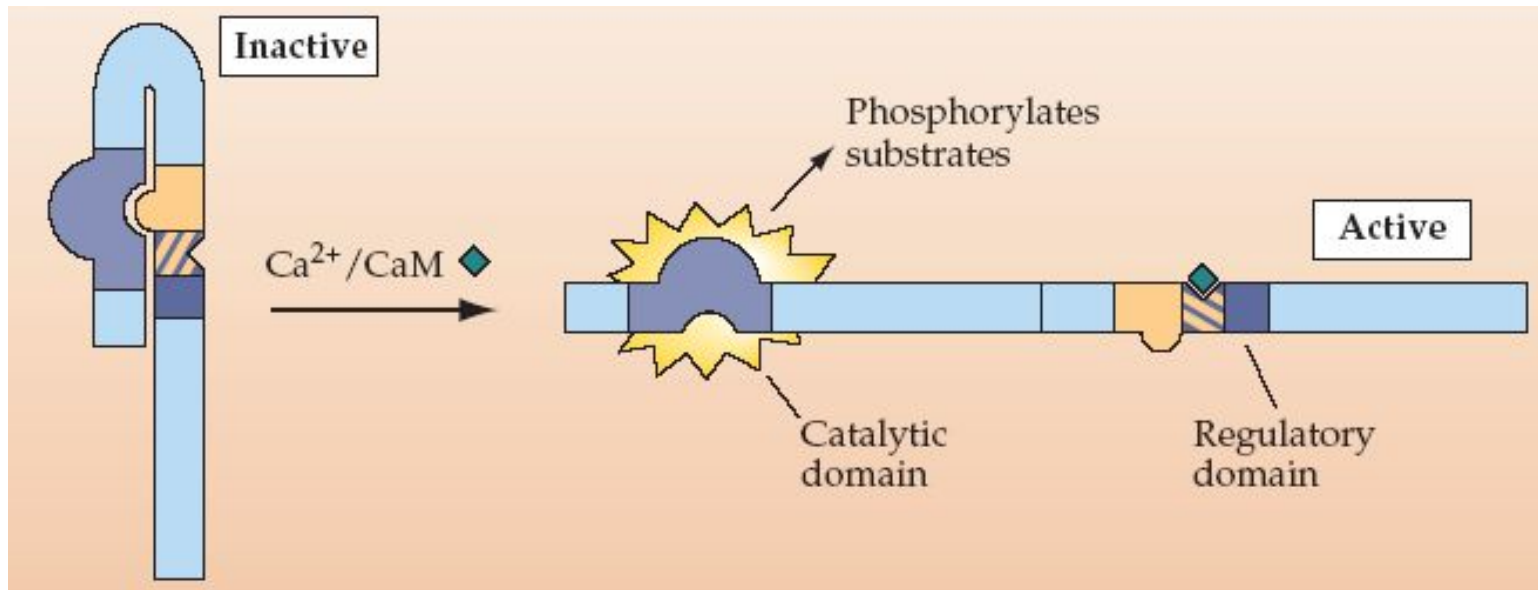
регулируется комплексом Ca^{2+} /калмодулин.

Является серин/треониновой протеин киназой.

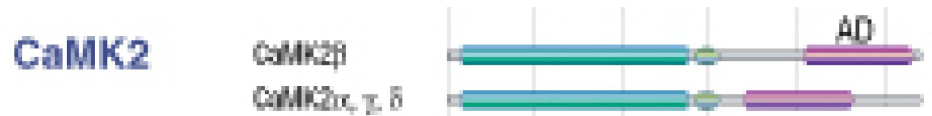
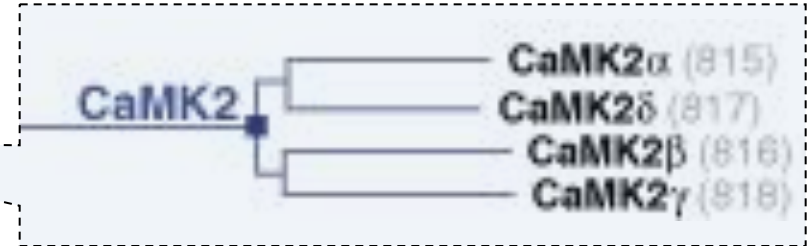
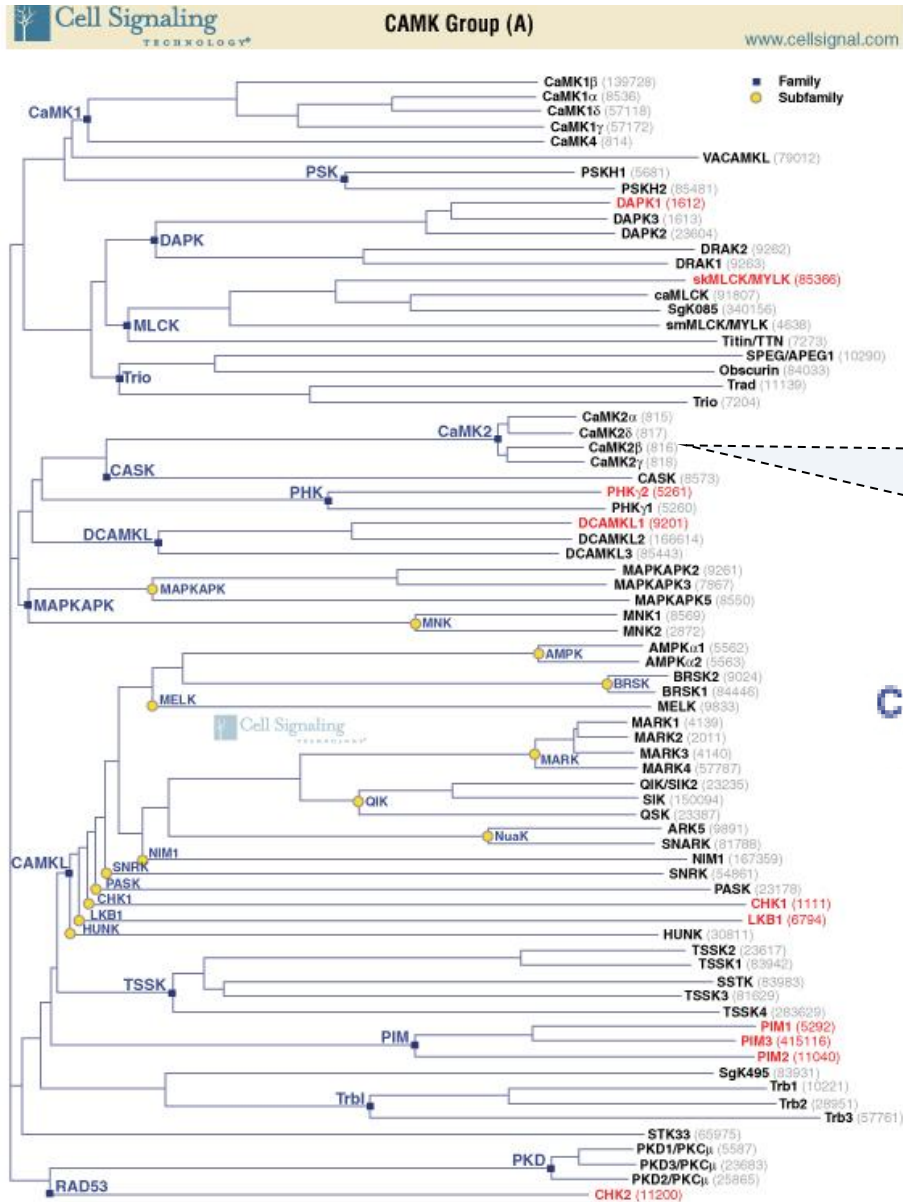
Существуют две формы данной киназы:

- **специализированные** фосфорилируют миозин, вызывая сокращение мышц;
- **многофункциональные** выполняют множественные функции.

Регуляторная и каталитическая субъединицы составляют одну молекулу.



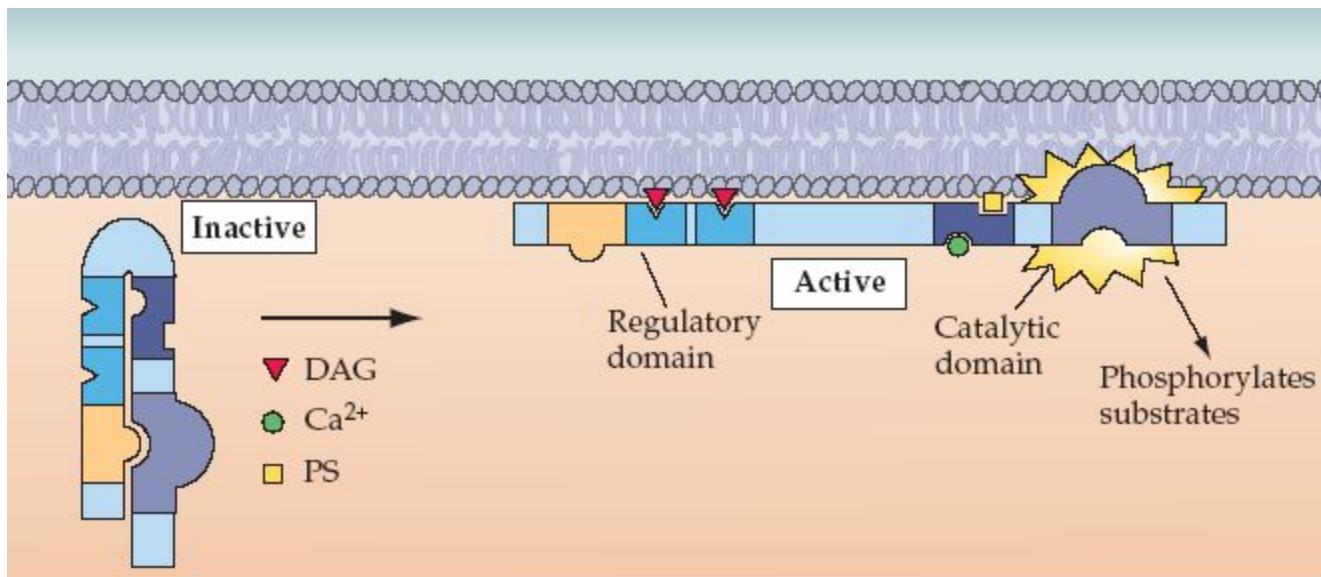
Ca²⁺/калмодулин-зависимая протеинкиназа типа II



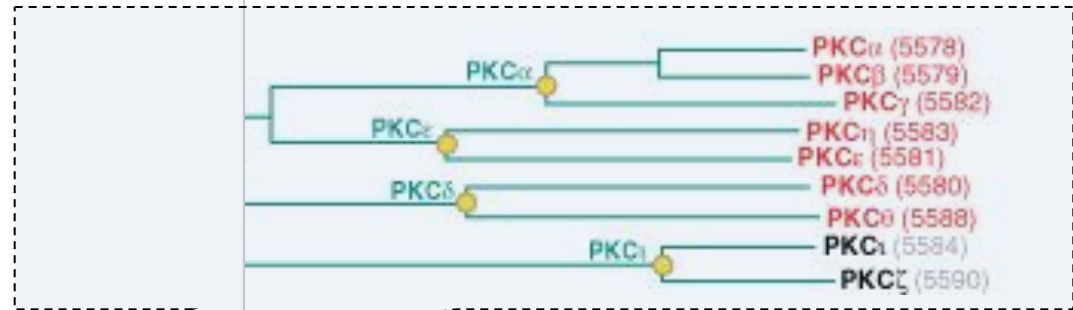
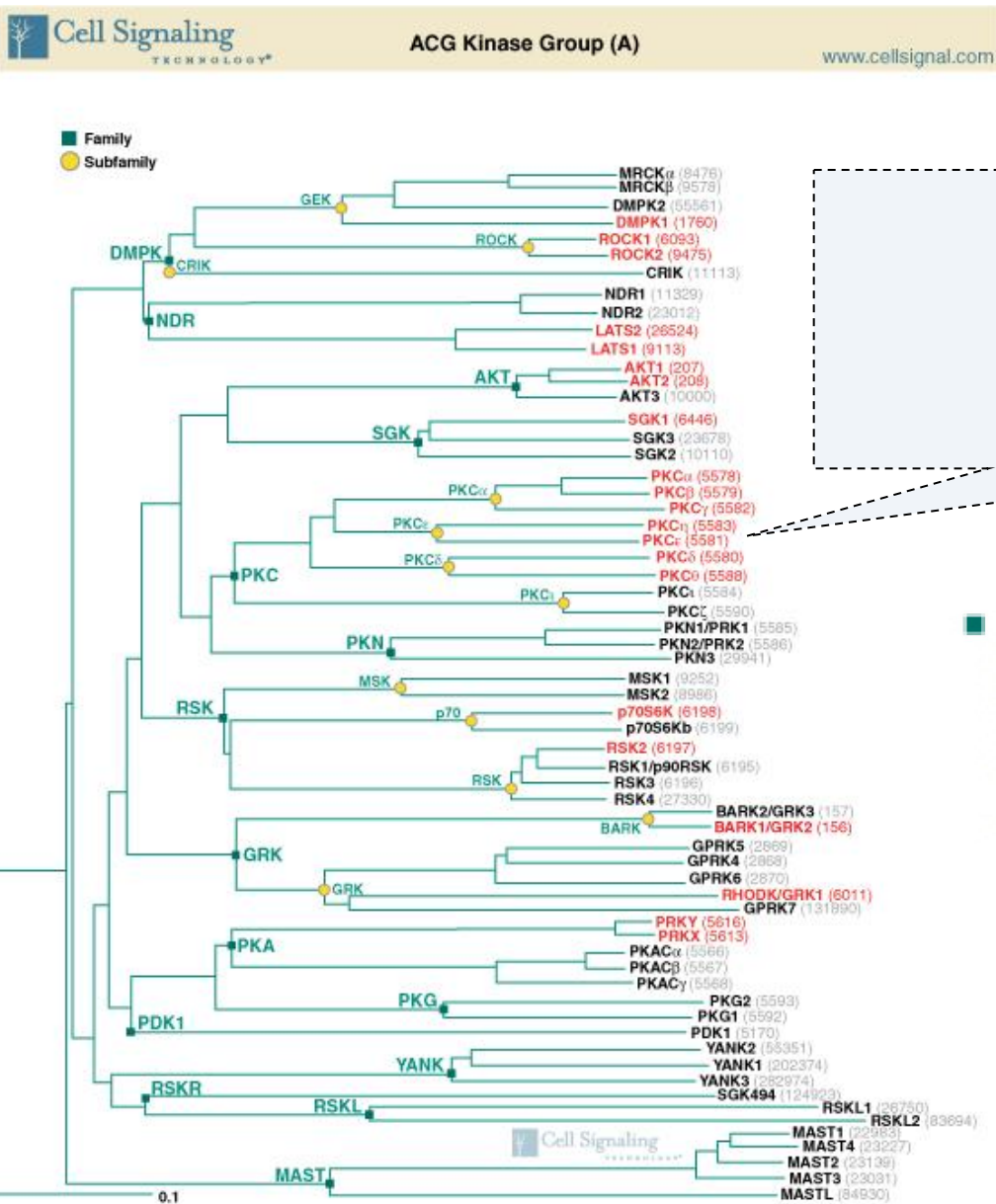
Протеин киназа С (ПКС) (англ., *protein kinase C*, ПКС)

активируется в присутствии Ca^{2+} , ДАГ и фосфолипида **фосфатидилсерина (PS)**.

Регуляторная и каталитическая субъединицы составляют одну молекулу.

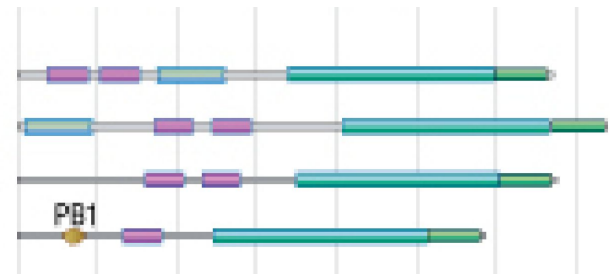


Протеин киназа С (ПКС) (англ., *protein kinase C*, PKC)



PKC

- PKC α PKC α , β , γ
- PKC δ PKC δ , θ
- PKC ϵ PKC ϵ , η
- PKC ζ PKC ζ , ι



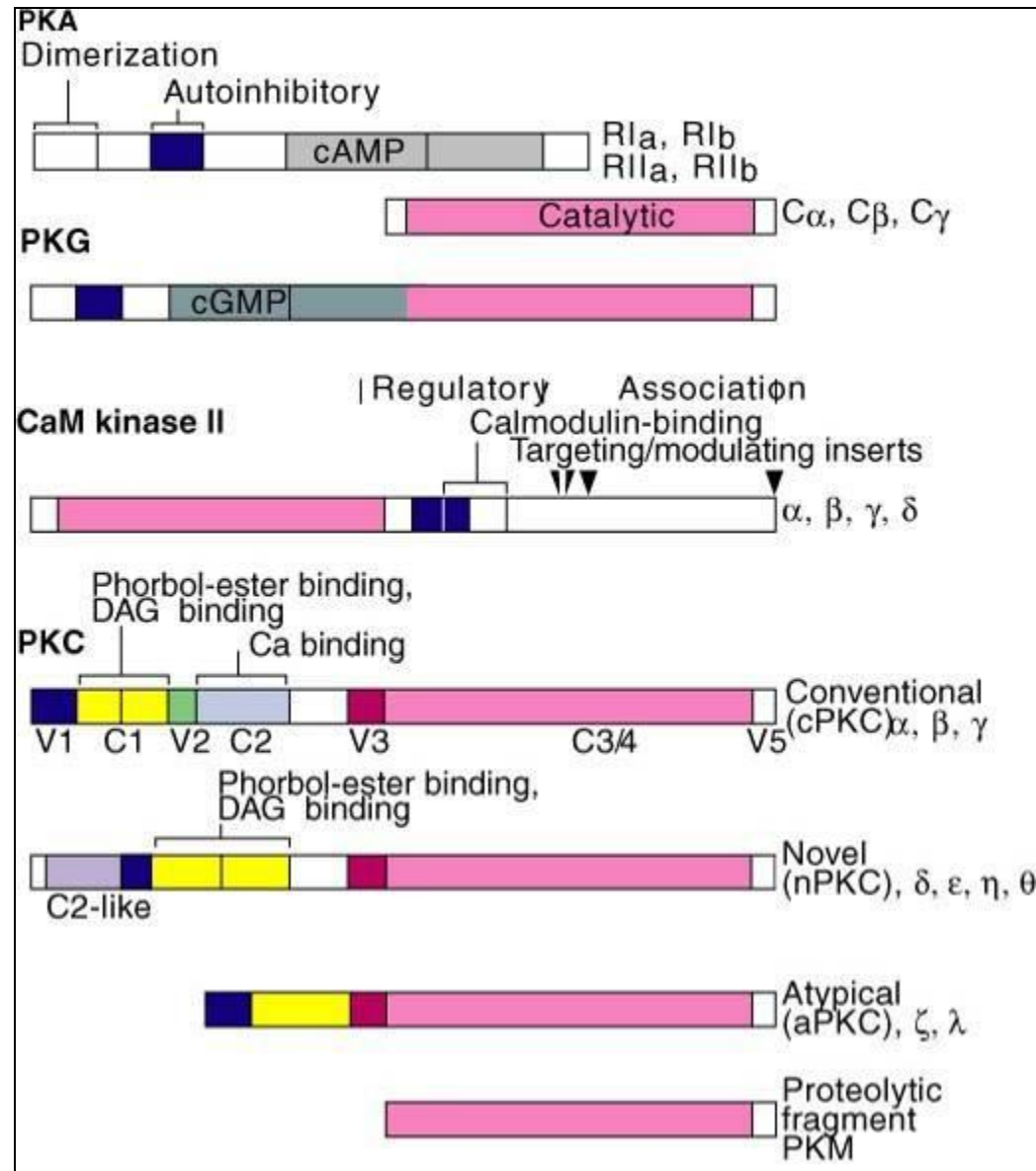
Различные киназы, активируемые через системы вторичных посредников

Domain structure of protein kinases. Protein kinases are encoded by proteins with recognizable structural sequences that encode specialized functional domains.

Each of the kinases [PKA, PKG, CaM (Ca²⁺-calmodulin-dependent) kinase II, and PKC] has **homologous catalytic domains** that are kept inactive by the presence of an autoinhibitory segment (blue lines).

Regulatory domains contain sites for binding second messengers such as cAMP, cGMP, Ca²⁺-calmodulin, DAG, and Ca²⁺-phosphatidylserine.

Alternative splicing creates additional diversity.



Тирозинкиназы (*tyrosine kinases*)

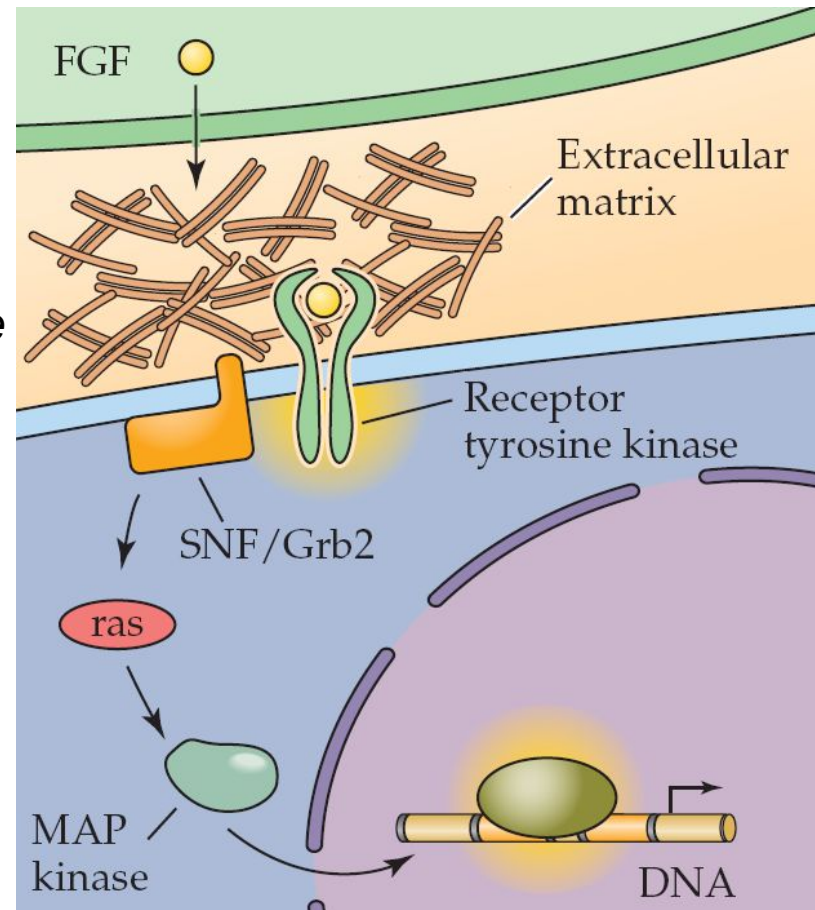
активируется либо **внеклеточными сигналами**, либо **G-белками**.

Участвуют в каскадах, обеспечивающих **рост клеток** и их **дифференциацию** путем передачи внеклеточного сигнала в **клеточное ядро**, что приводит к экспрессии генов.

Существует два класса тирозиновых протеинкиназ, которые фосфорилируют тирозиновые остатки белков-мишеней.

Рецепторная тирозинкиназа (*receptor tyrosine kinase*) является трансмембранным белком с **внеклеточным рецепторным доменом**, который связывается с белковыми лигандами (факторами роста, нейротрофическими факторами или цитокинами), и **внутриклеточным каталитическим доменом**, который фосфорилирует субстратные белки.

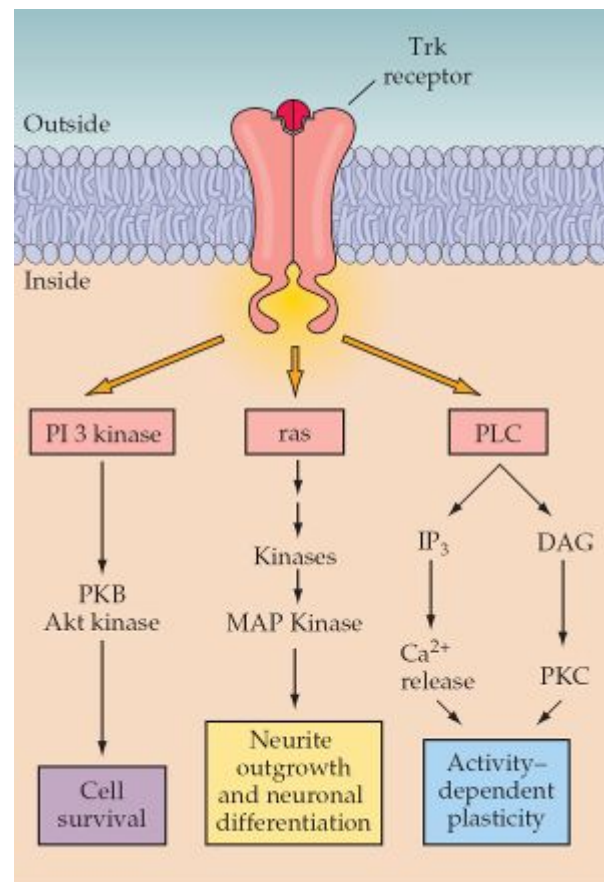
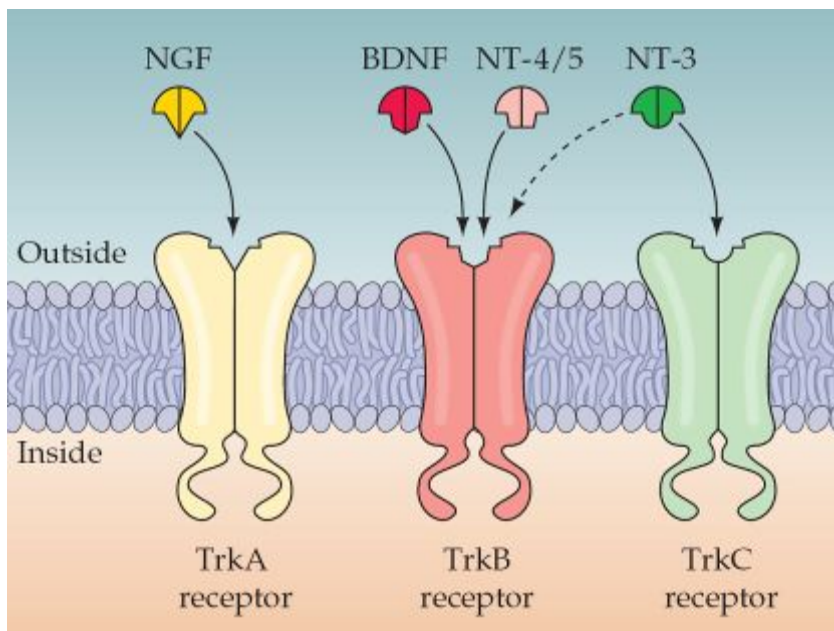
FGF - fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов



Рецепторная тирозинкиназа (*receptor tyrosine kinase*)

Известно три рецептора **рецепторной тирозин киназы**:

Рецептор	Лиганд
TrkA	NGF (nerve growth factor)
TrkB	BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-4/5 (neurotrophin-4/5)
TrkC	NT-3 (neurotrophin-3)

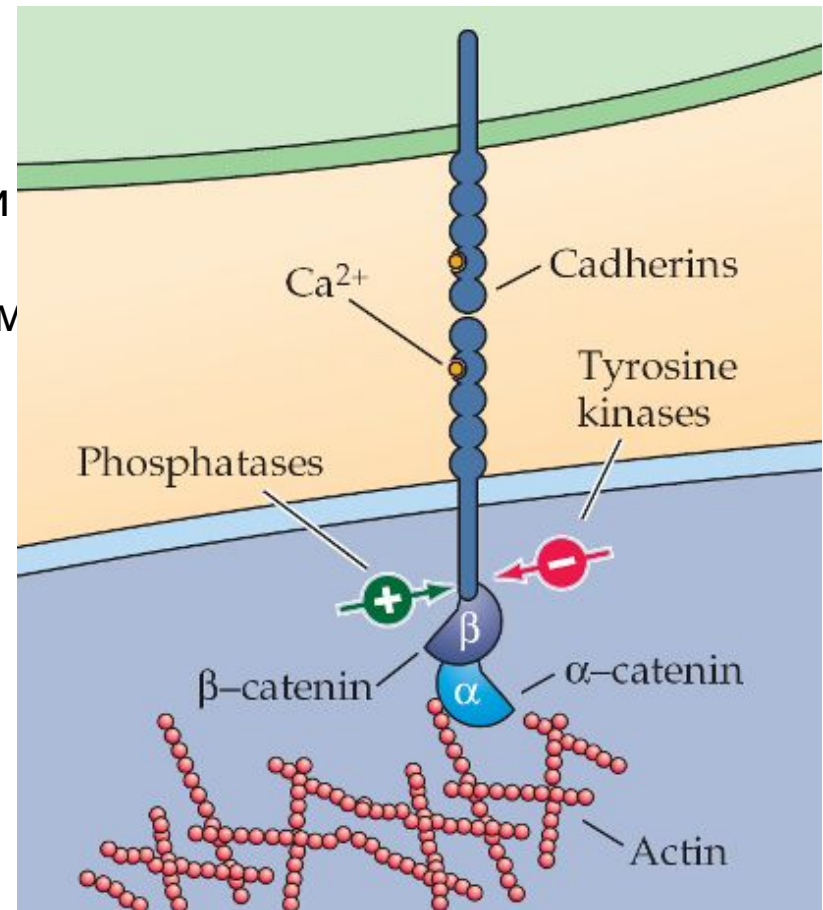


Белковая тирозинкиназа (*protein tyrosine kinase*)

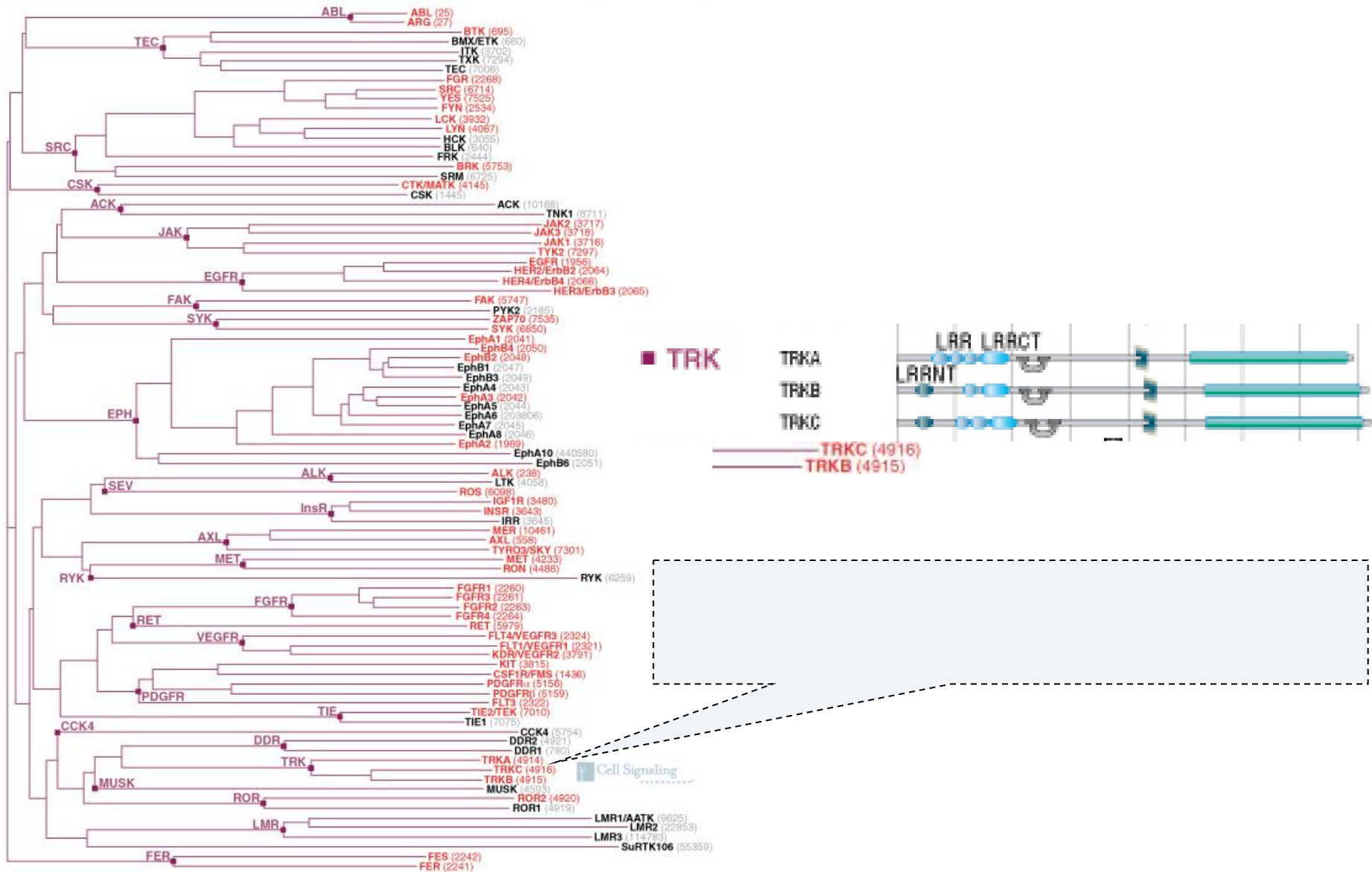
Существует два класса тирозиновых протеин киназ, которые фосфорилируют тирозиновые остатки белков-мишеней.

Нерецепторные тирозин киназы (*protein tyrosine kinase*) находятся в цитоплазме или ассоциированы с мембраной и непрямо (через G-белки) активируются внеклеточными сигналами.

Фосфорилирование тирозиновых остатков киназами встречается значительно реже, чем фосфорилирование сериновых/треониновых остатков.



Тирозинкиназы (*tyrosine kinases*)



Митоген-активируемые протеин киназы (МАПК) (Mitogen-activated protein kinase, MAPK)

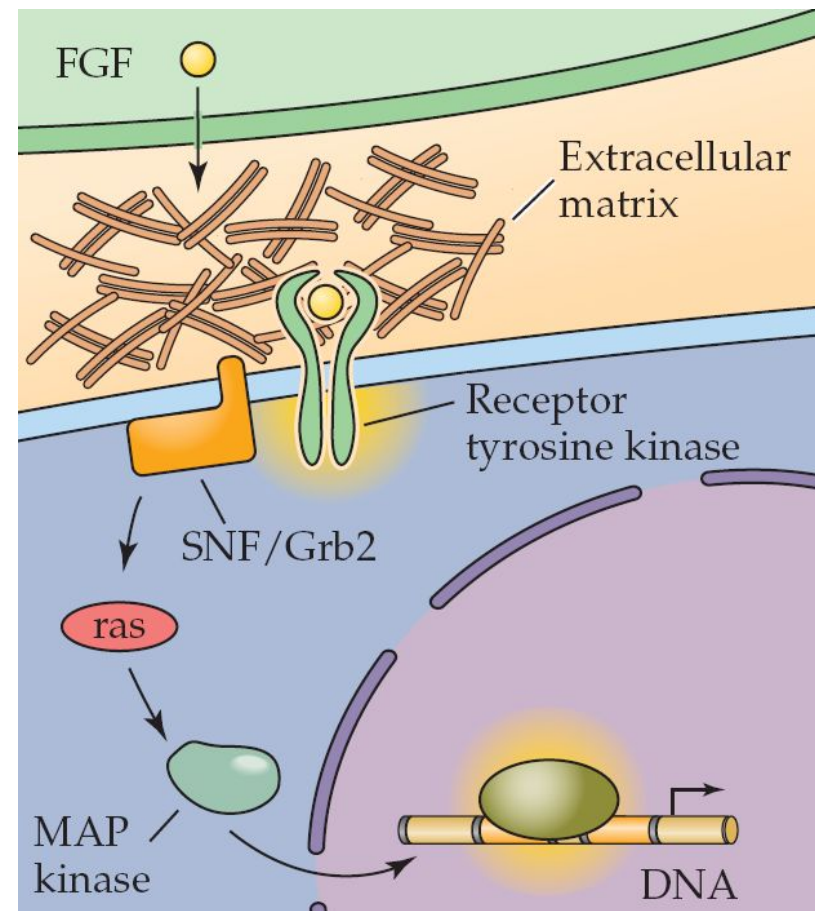
Активируются как **вторичными посредниками**, так и при **фосфорилировании** другими киназами. Принимают участие в регуляции **роста клеток** и **фактора транскрипции**.

Внешним сигналом, который включает каскады МАПК, является **фактор роста (FGF, fibroblast growth factor)**, который активирует **рецепторную тирозин киназу**.

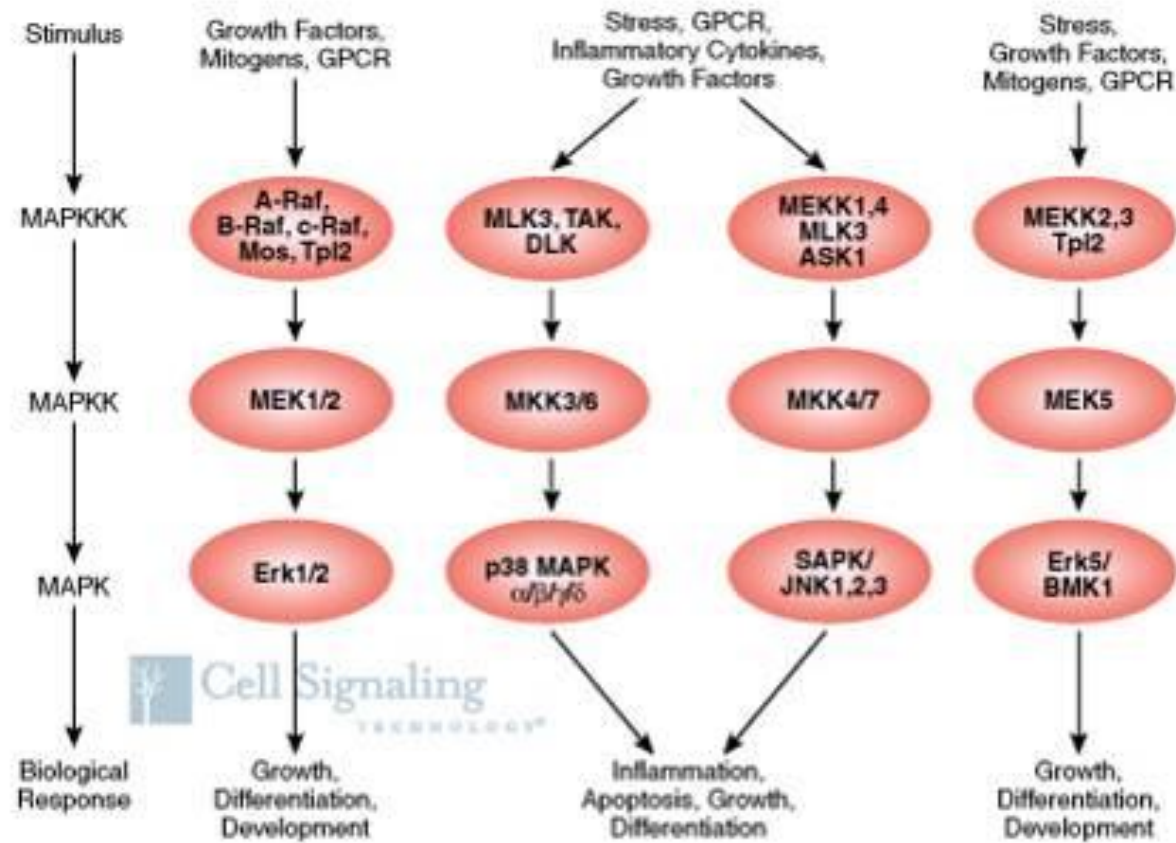
Эта киназа активирует **мономерные G-белки (ras)**, которые активируют МАПК.

Далее МАПК фосфорилирует белок **фактор транскрипции**, который регулирует **экспрессию генов**.

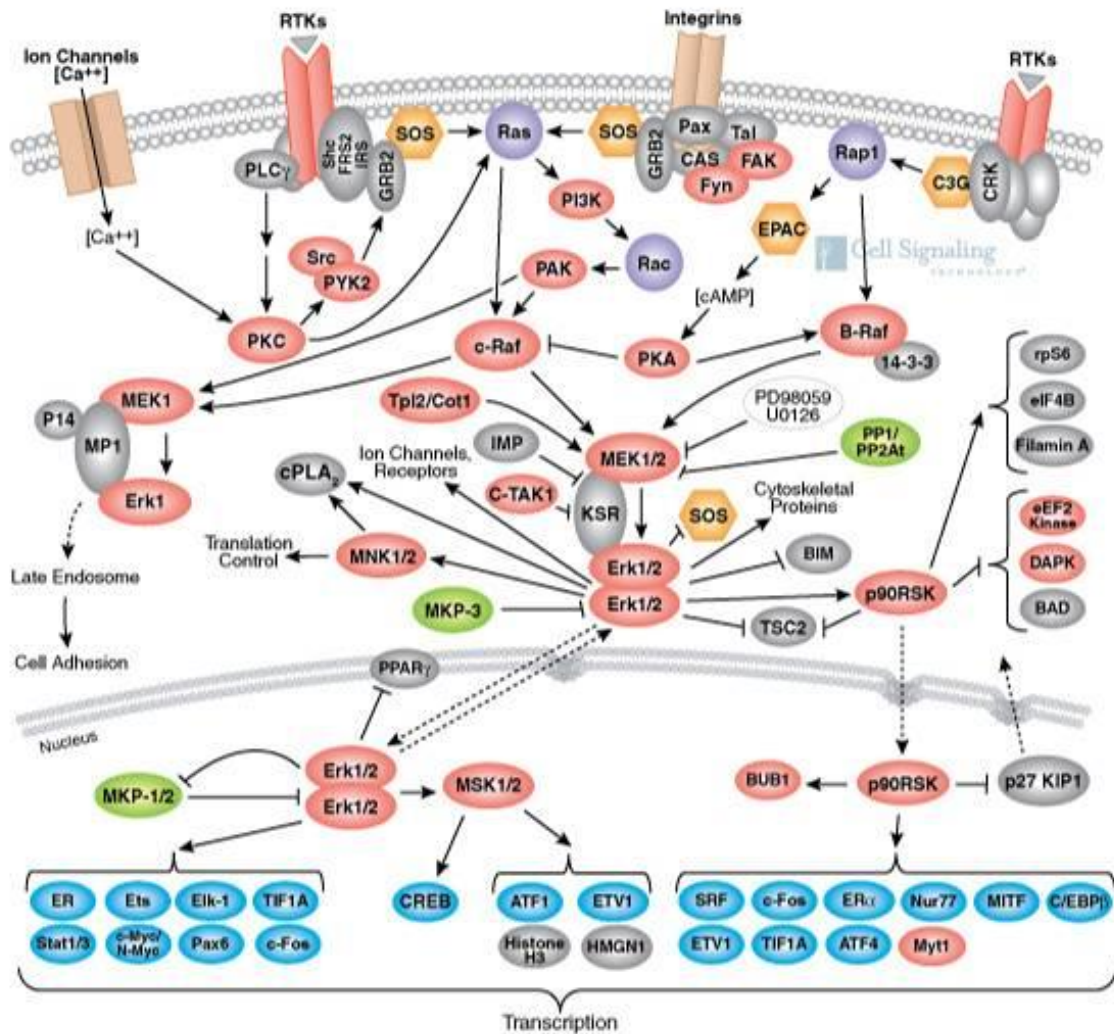
Среди других белков-мишеней этой киназы встречаются различные ферменты (другие протеин киназы) и белки цитоскелета.



Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades



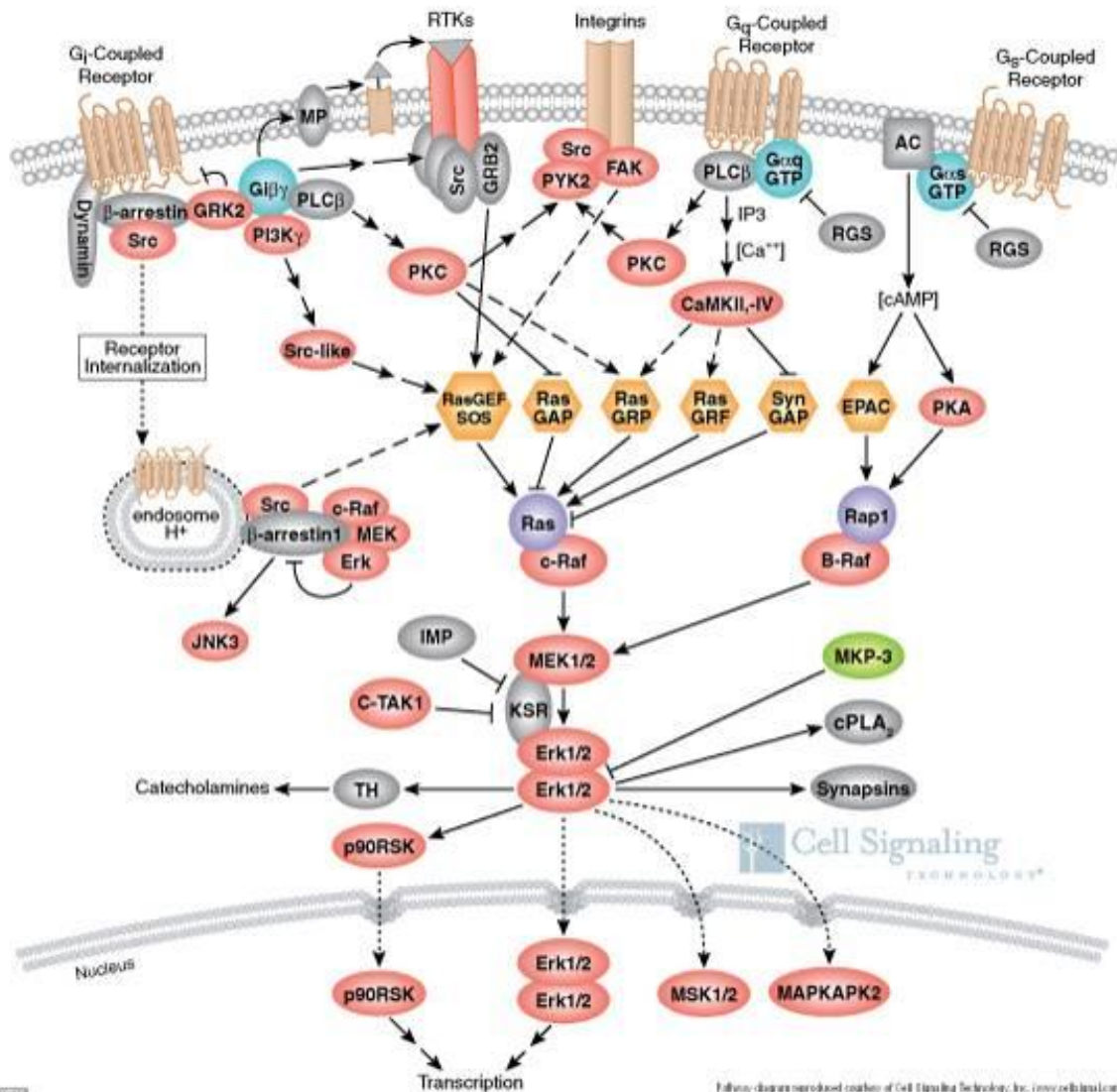
MAPK/ERK in Growth and Differentiation



Followy diagram reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com).



G-Protein Coupled Receptor Signaling to MAPK/ERK



Cell Signaling TECHNOLOGY

KEY

Kinase	Direct Stimulatory Modification	Transcriptional Stimulation
Phosphatase	Direct Inhibitory Modification	Transcriptional Inhibition
Transcription Factor	Multistep Stimulatory Modification	Translocation
	Multistep Inhibitory Modification	Separation of Subunits or Cleavage Products
	Tentative Stimulatory Modification	Joining of Subunits
	Tentative Inhibitory Modification	

Pathway diagram reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. www.cellsignal.com

Фосфатазы (PP от англ., *Protein Phosphatase*)

Выделяют сериновые/треониновые, тирозиновые и двойственные фосфатазы.

Наиболее изученными являются сериновые/треониновые фосфатазы, которые дефосфорилируют соответствующие остатки, - PP-1, PP-2A, PP-2B (кальцинейрин), PP-2C и немногочисленные PP-4 (-5, -6, -7).

Подразделение на группы основано на субстратной специфичности фосфатаз, хотя все фосфатазы имеют широко перекрывающуюся субстратную специфичность.

Группа PP-2 подразделяется на А, В и С по субстратной специфичности, числу субъединиц и зависимости от катионов (Ca^{2+}).

У эукариот 98% фосфорилирования происходит на сериновых/треониновых остатках.

Более, чем 90% активности серинового/треонинового фосфорилирования белков обеспечивается фосфатазами PP-1 и PP-2A.

Фосфатазы

Все фосфатазы **не** характеризуются высокой субстратной специфичностью по сравнению с протеин киназами.

PP1 дефосфорилирует широкий ряд субстратных белков и доминирует в клетках млекопитающих. Эта фосфатаза регулируется некоторыми ингибиторными белками, представленными в нейронах.

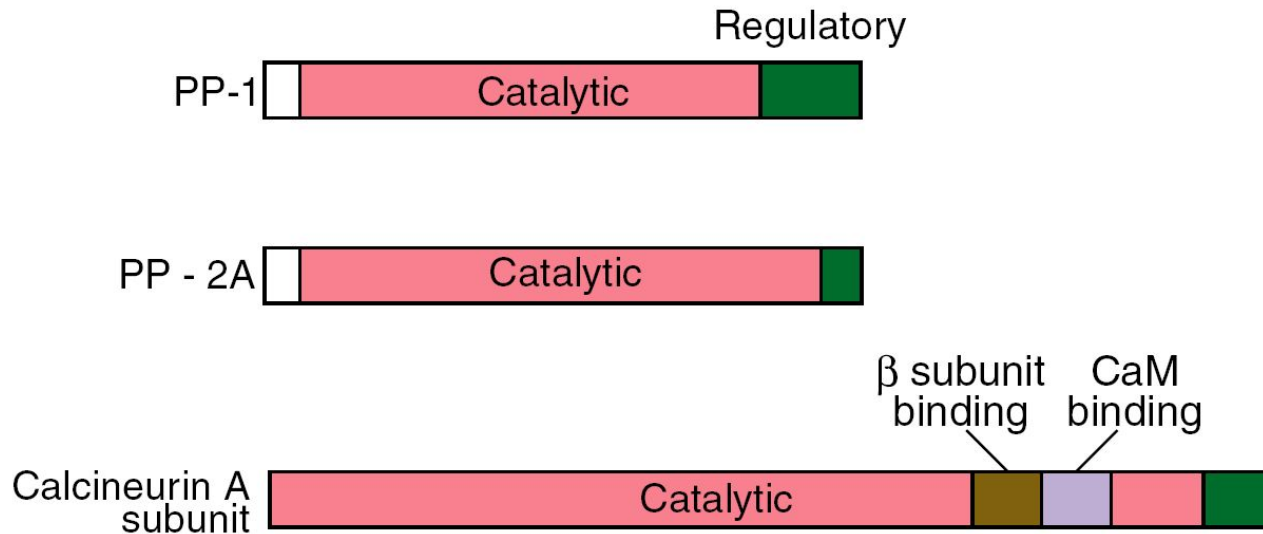
PP2A состоит из нескольких субъединиц и дефосфорилирует большой ряд субстратных белков, который перекрывается с субстратами PP1.

PP2B (кальцинейрин) широко представлена в нейронах. Активируется комплексом **Ca²⁺/калмодулин**. Кальцинейрин состоит из каталитической и регуляторной субъединиц. Каталитическая единица напрямую активируется **Ca²⁺/калмодулином**, который вытесняет ингибиторный регуляторный домен.

Кальцинейрин не дефосфорилирует **CaMK II**, несмотря на то, что оба фермента активируются **Ca²⁺/калмодулином**.

Фосфатазы

Domain structure of the catalytic subunits of some Ser/Thr phosphatases. The three major phosphoprotein phosphatases, PP-1, PP-2A, and PP-2B (calcineurin), have homologous catalytic domains but differ in their regulatory properties.



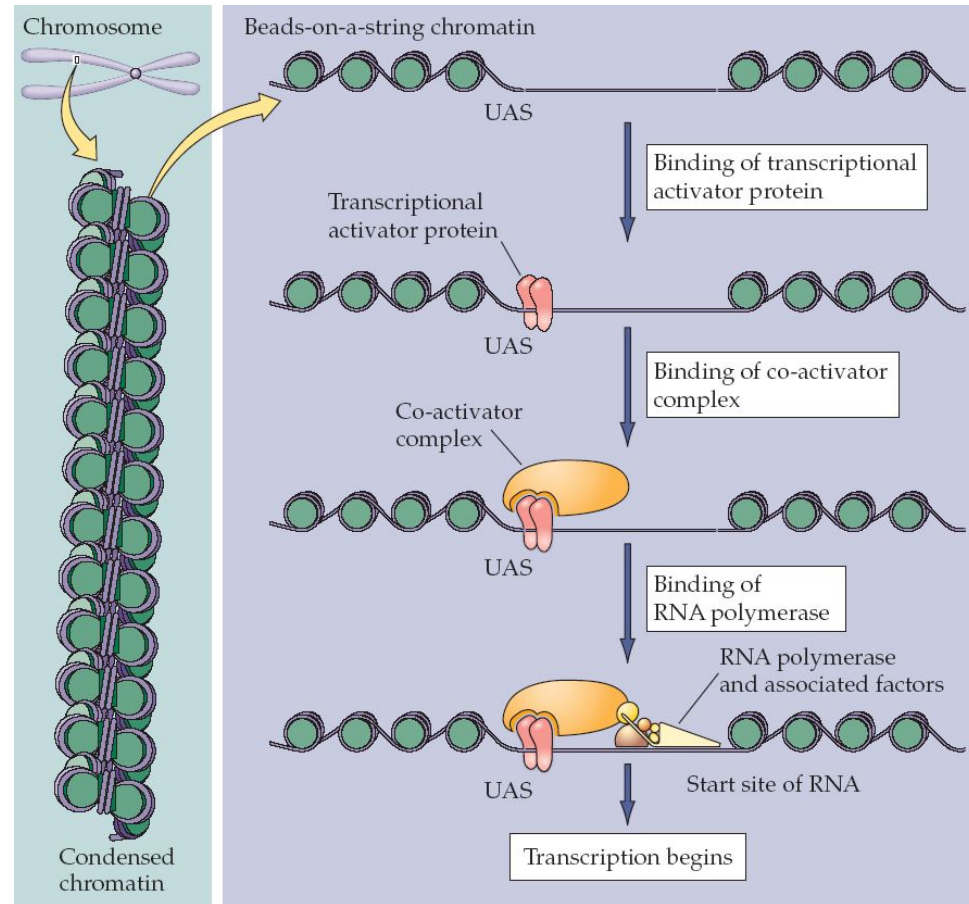
Сигнализация в ядро

Вторичные посредники активируют синтез новой РНК и, соответственно, белков.

Первым шагом для синтеза РНК является образование на хроматине сайтов для РНК-полимеразы и фактора транскрипции.

Белки активации транскрипции присоединяются к специальным местам связывания, которые расположены в молекуле ДНК рядом с местом начала гена нужного белка.

Каскады передачи внутриклеточного сигнала регулируют экспрессию генов, конвертируя белки активации транскрипции из неактивной в активную форму, которые способны связываться с ДНК.

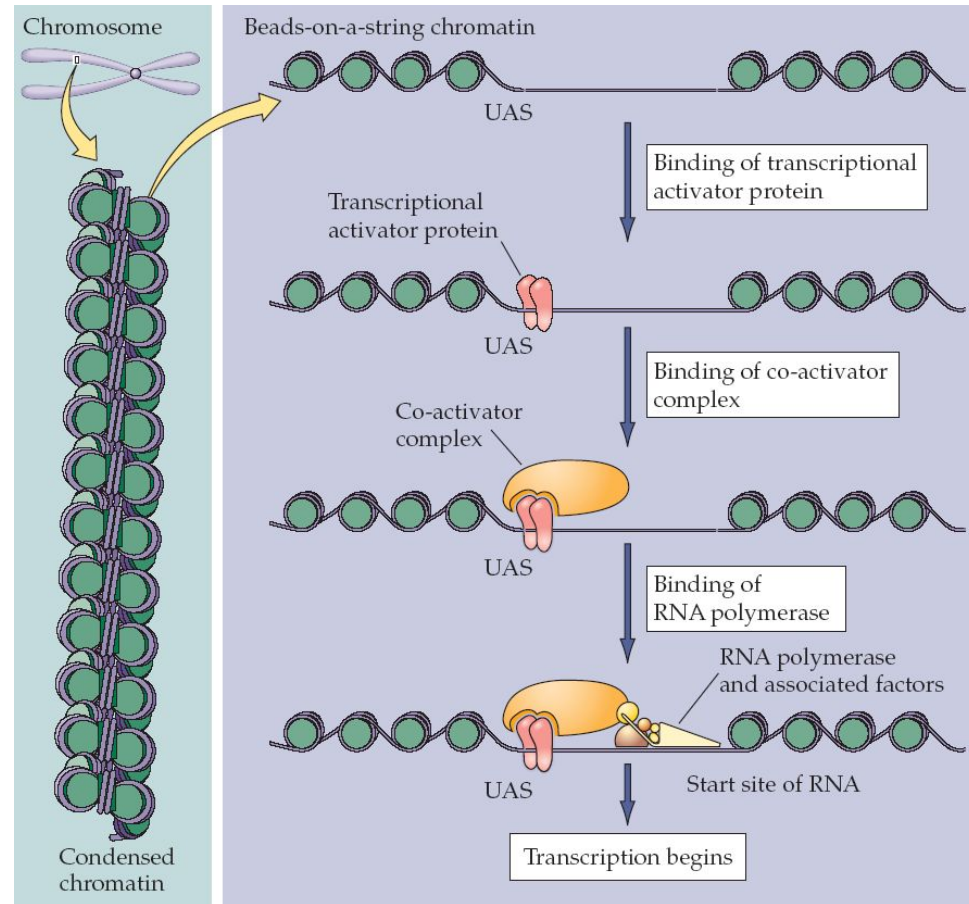


Сигнализация в ядро

Steps involved in transcription of DNA into RNA.

Condensed chromatin (left) is decondensed into a beads-on-a-DNA-string array (right) in which an upstream activator site (UAS) is free of proteins and is bound by a sequence-specific transcriptional activator protein (transcription factor).

The transcriptional activator protein then binds co-activator complexes that enable the RNA polymerase with its associated factors to bind at the start site of transcription and initiate RNA synthesis.



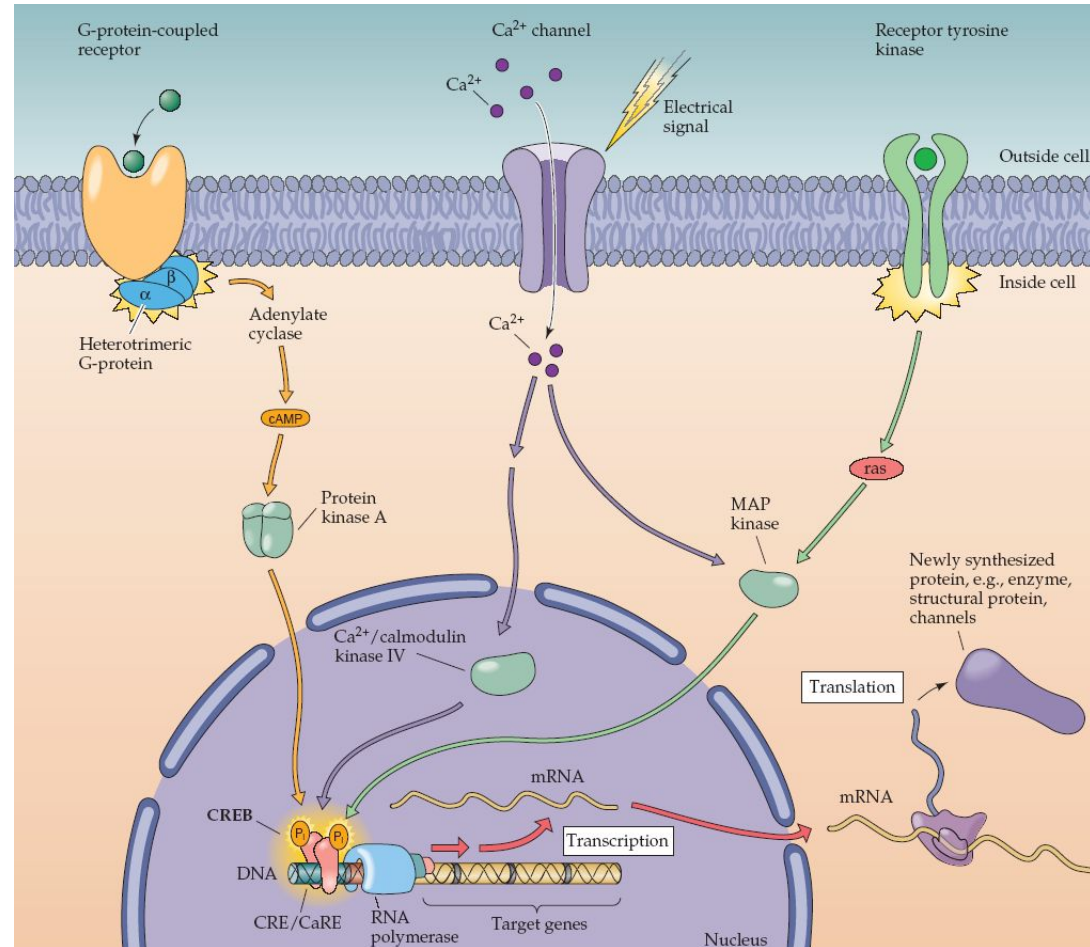
Сигнализация в ядро

CREB (cAMP Response Element Binding protein) является повсеместным фактором транскрипции.

CREB связывается со своим специальным местом на ДНК.

В нестимулированной клетке CREB не фосфорилирован и не имеет достаточной транскрипционной активности.

При фосфорилировании его транскрипционная активность значительно возрастает.



Сигнализация в ядро

Фосфорилирование CREB

осуществляется несколькими путями:

1) с участием цАМФ-зависимой ПКА;

2) с участием Ca^{2+} , активирующего Ca^{2+} /калмодулин киназу IV;

3) с участием Ca^{2+} и мономерного G-белка (*ras*), активирующих МАПК.

