

# **ОСНОВЫ БИОСИГНАЛИЗАЦИИ:**

## **СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМОЙ ПРОТЕИНАКИНАЗЫ (МАПК)**

## **Митоген-активируемая протеинкиназа (МАП-киназа, МАПК)**

### **Mitogen-activated protein kinase pathway (МАПК-pathway)**

**Одним из элементов адаптации метаболизма клеток является запуск пролиферативных процессов.** Быстрый переход к пролиферации актуален в физиологических процессах: иммунный ответ, регенерация и функционировании стволовых клеток. Пролиферация важна также в процессах роста и формирования тканей и органов.

#### **Митогены (соединения, несущие пролиферативный сигнал):**

- цитокины (интерлейкины, интерфероны, ФНО и др.);
- ростовые факторы;
- некоторые гормоны (инсулин);
- медиаторы воспаления;
- некоторые физические факторы.

**Сигнальный путь (каскад) МАП-киназы – основной путь передачи пролиферативных сигналов. Он действует во всех известных типах клеток.**

**Путь МАП-киназы** начинается от **рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью**. На дистанции от рецептора до каскада из трёх протеинкиназ, фосфорилирующих и активирующих транскрипционные факторы, работают **ряд белков-посредников**, важнейшим из которых является **малый G-белок** (мономер) или **белок Ras (Rat sarcoma): Ras/МАП-киназный путь (Ras/MAPK-pathway)**.

**Путь МАП-киназы «выключен» (неактивен) в полностью дифференцированных и неделящихся клетках. При необходимости репарации поврежденной ткани МАП-каскад вновь активируется. Некоторые типы опухолей возникают при нарушении регуляции каскада (при не «выключении» каскада).**

**Помимо МАП-киназного пути, эффекты митогенов могут быть переданы посредством **цАМФ (ПКС), JAK – STAT- сигнального пути и др.****

# Этапы и механизмы формирования Ras/MAPK – сигнального пути

**1.** Взаимодействие **лиганда** (митогена) с **рецептором**, относящимся к классу рецепторов с собственной тирозин-киназной активностью. Рецепторы образуют гомодимер (гетеродимер), что изменяет конформацию цитозольных доменов и сближает их. В результате открывается собственная тирозин-киназная активность рецептора и происходит аутофосфорилирование остатков тирозина цитозольных доменов.

**2.** **Фосфотирозины** становятся **докинг-центрами**, с которыми связываются **адапторные белки**, посредством содержащихся в них **SH2-доменов (Src homology 2)**. **SH2-домены** обладают высоким сродством к аминокислотному окружению фосфо-тирозинов. Таким белком является белок **Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)**. Наряду с SH2-доменами, в **Grb2** содержатся **SH3-домены (Src homology 3)**. **SH3-домены** имеют высокое сродство к последовательности аминокислот в других белках, содержащих **остатки пролина** (левозакрученная полипролиновая спираль II типа).

3. Белок **Grb2**, через свой **SH2-домен** связан с фосфотирозином цитозольного домена рецептора. С помощью своего второго домена (**SH3-домена**), белок **Grb2** связывается со следующим белком «вниз по течению»: **SOS** (от **Son of Sevenless** – название мутации белка **GEF** у дрозофил) или **GEF** (**g**uanine nucleotide **e**xchange **f**actor). Эта способность делает белок **Grb2** поливалентным белком. **SOS/GEF** обменивает гуаниновые нуклеотиды в составе белка **Ras**.

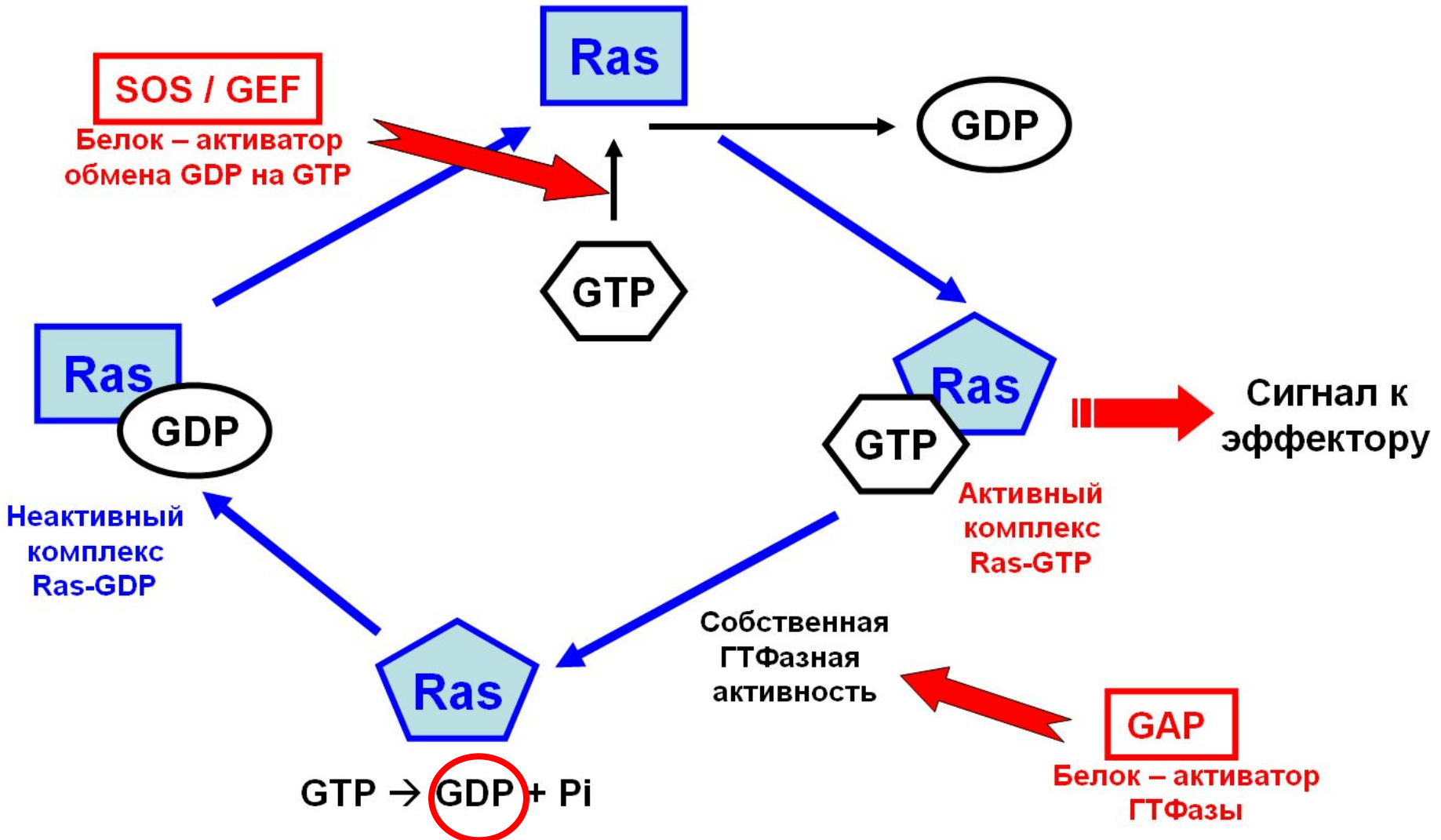
Белок **Ras** (**высокогомологичен  $\alpha$ -субъединице гетеротримерного G-белка**) связан с внутренним слоем плазматической мембраны. В неактивной конформации **Ras** содержит в нуклеотид-связывающем центре **ГДФ** (**Ras-ГДФ**). С помощью белка **SOS/GEF** **ГДФ** заменяется на **ГТФ** и белок **Ras** переходит в активную конформацию: **Ras-ГТФ**. Активированный **Ras** взаимодействует со следующим белком «вниз по течению»: с серин-треониновой киназой **Raf** – с первой из трёх протеинкиназ МАП-киназного каскада. В результате такого взаимодействия киназа **Raf** активируется.

Инактивация мономерного белка **Ras** происходит благодаря его собственной ГТФазной активности: гидролиз **ГТФ** до **ГДФ** + **Фн** в нуклеотид-связывающем центре. Исходно ГТФ-азная активность в Ras невелика. Стимулирует ГТФазную активность специальный белок **GAP** (**GTPase activating protein**): повышает ГТФазную активность более, чем в 100 раз.

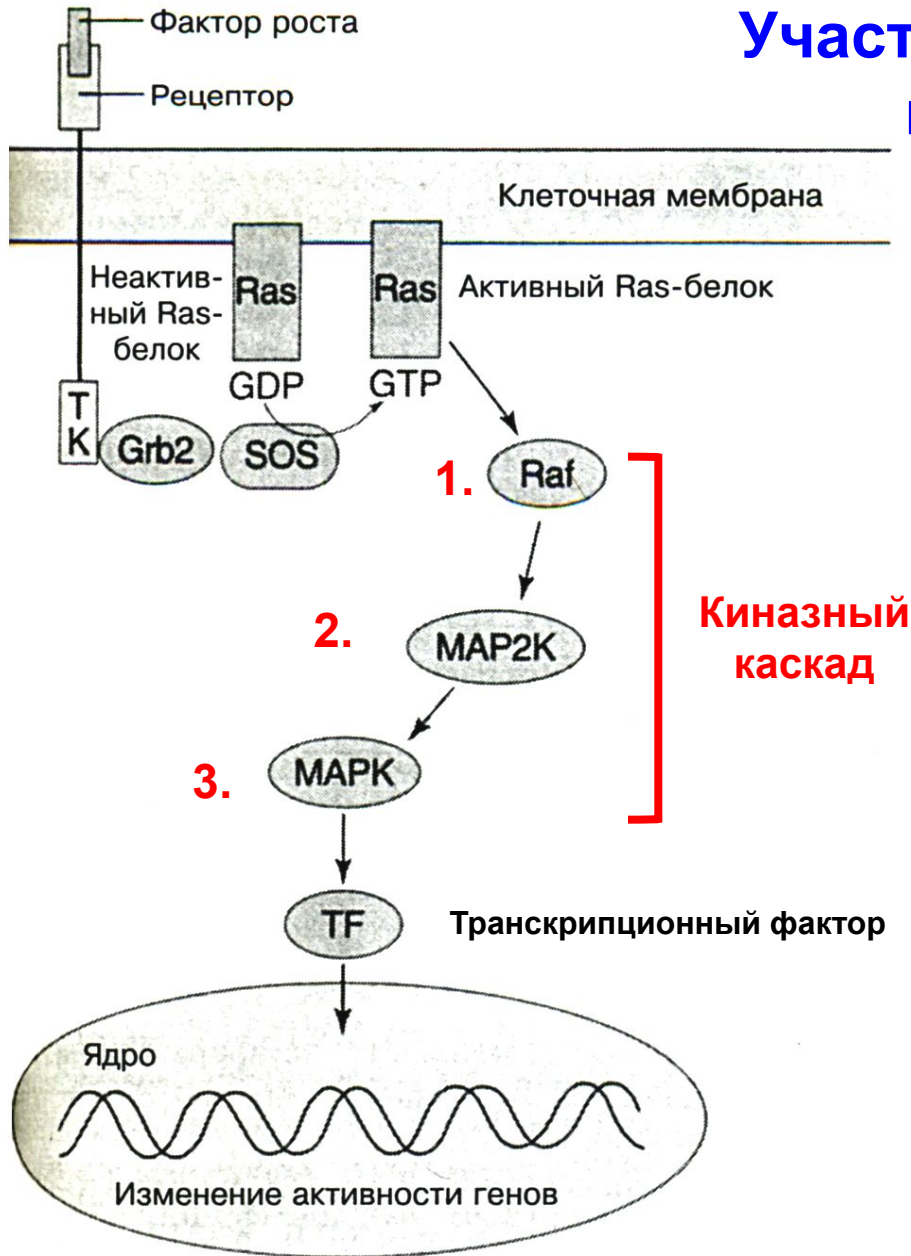
**NB:** Активированный белок **Ras** имеет и другие мишени:

- фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K);
- протеинкиназу C;
- другие белки.

# Схема активации / инактивации белка Ras (ГТФазный цикл)



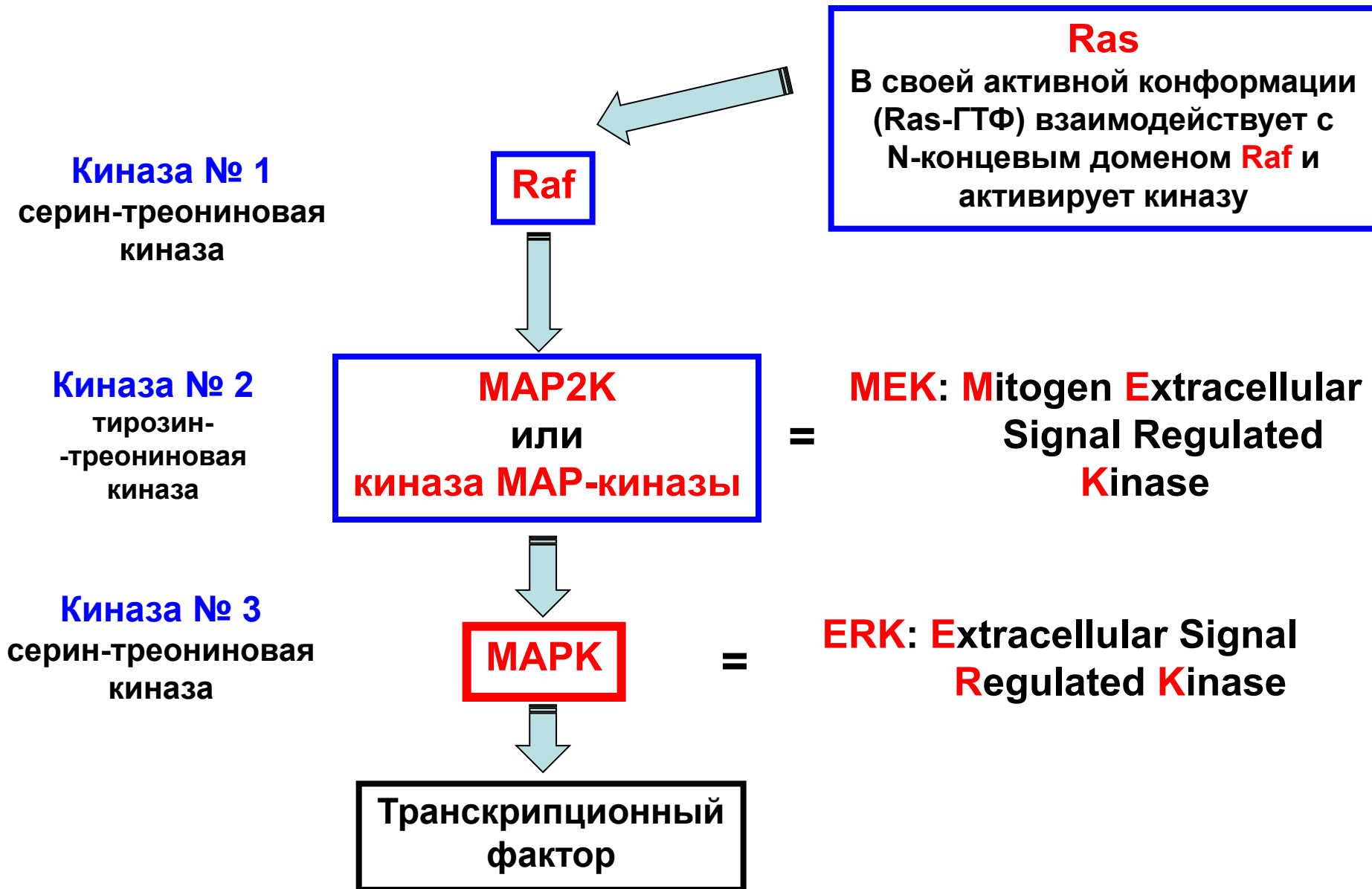
# Участие белка Ras в активации каскада МАП-киназы



Каскад (сигнальный путь) назван по имени последней (на схеме № 3) киназы: **митоген активируемой протеин киназы (МАПК)**. МАПК – серин-треониновая протеинкиназа. МАПК активируется с участием лежащей «выше по течению» тирозин-треониновой киназы - киназы МАП киназы (МАР2К, на схеме № 2).

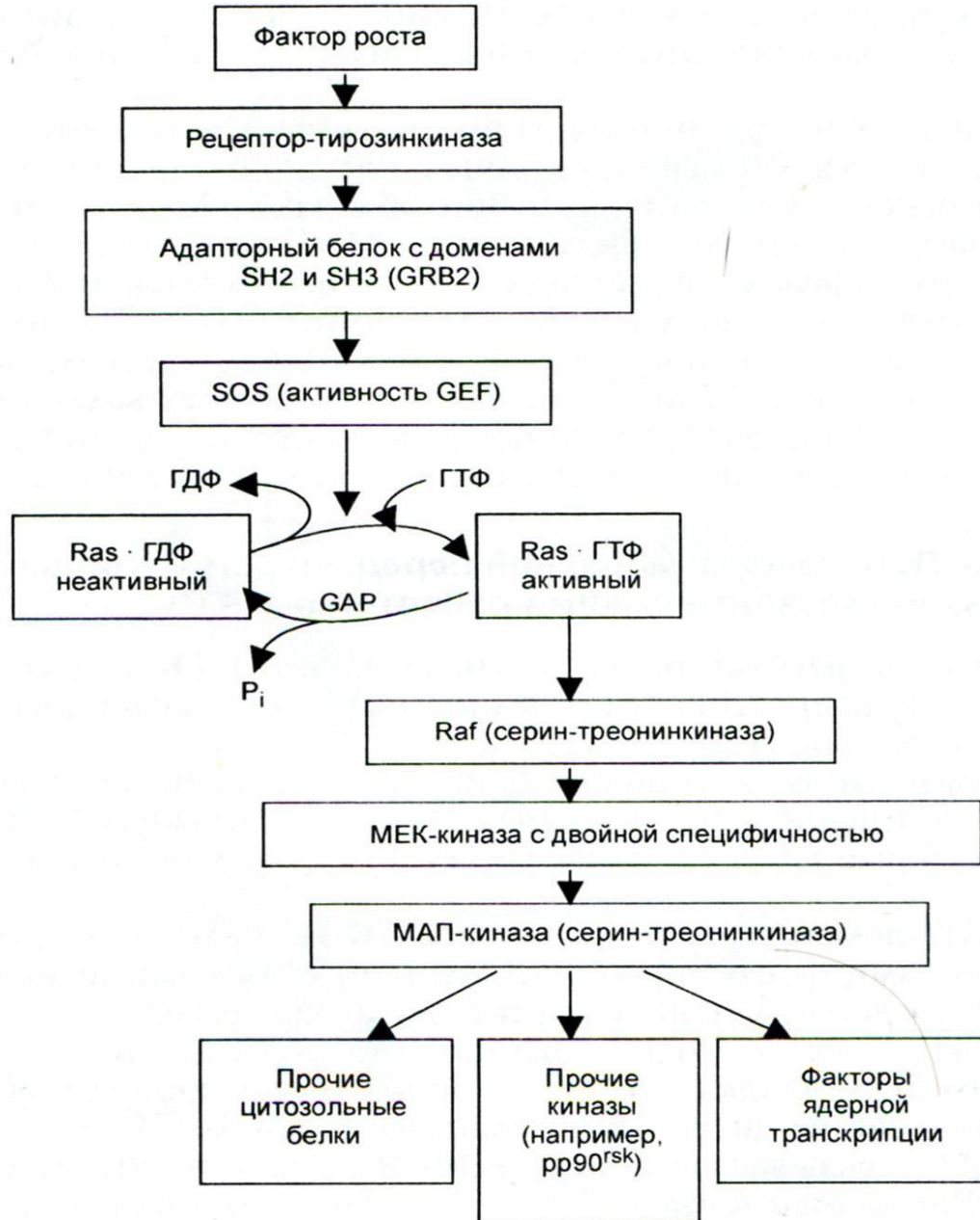


# Терминология названий протеинкиназ, составляющих МАРК-сигнальный путь





# СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ МАП-КИНАЗЫ



Активация **МАРК** приводит к её транслокации в ядро и последующему фосфорилированию транскрипционных факторов, которые отвечают за активность генов митоза, т.н. онкогенов (**c-fos**, **c-mys** и др.). Запускается процесс бласттрансформации, т.е. начнется серия митотических делений. Стимулируется рост, дифференцировка клеток и изменяется профиль экспрессии генов.

Разные гормоны запускают МАР-киназные каскады в разных типах клеток, которые отличаются набором поверхностных рецепторов.

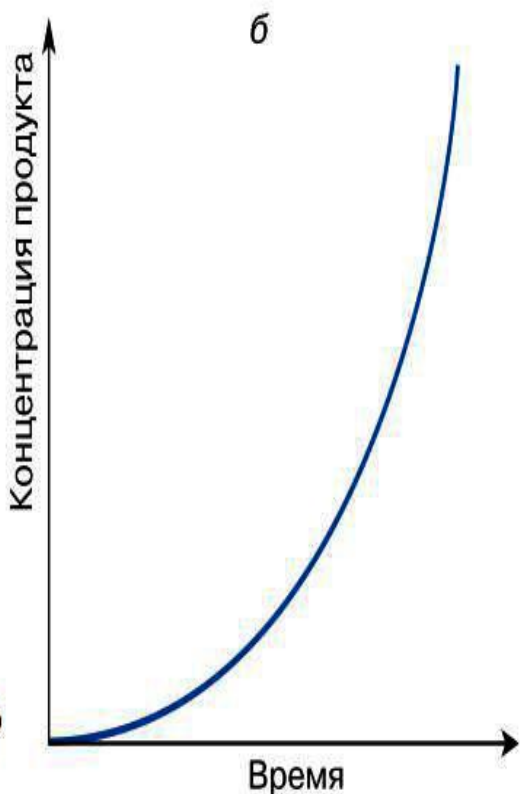
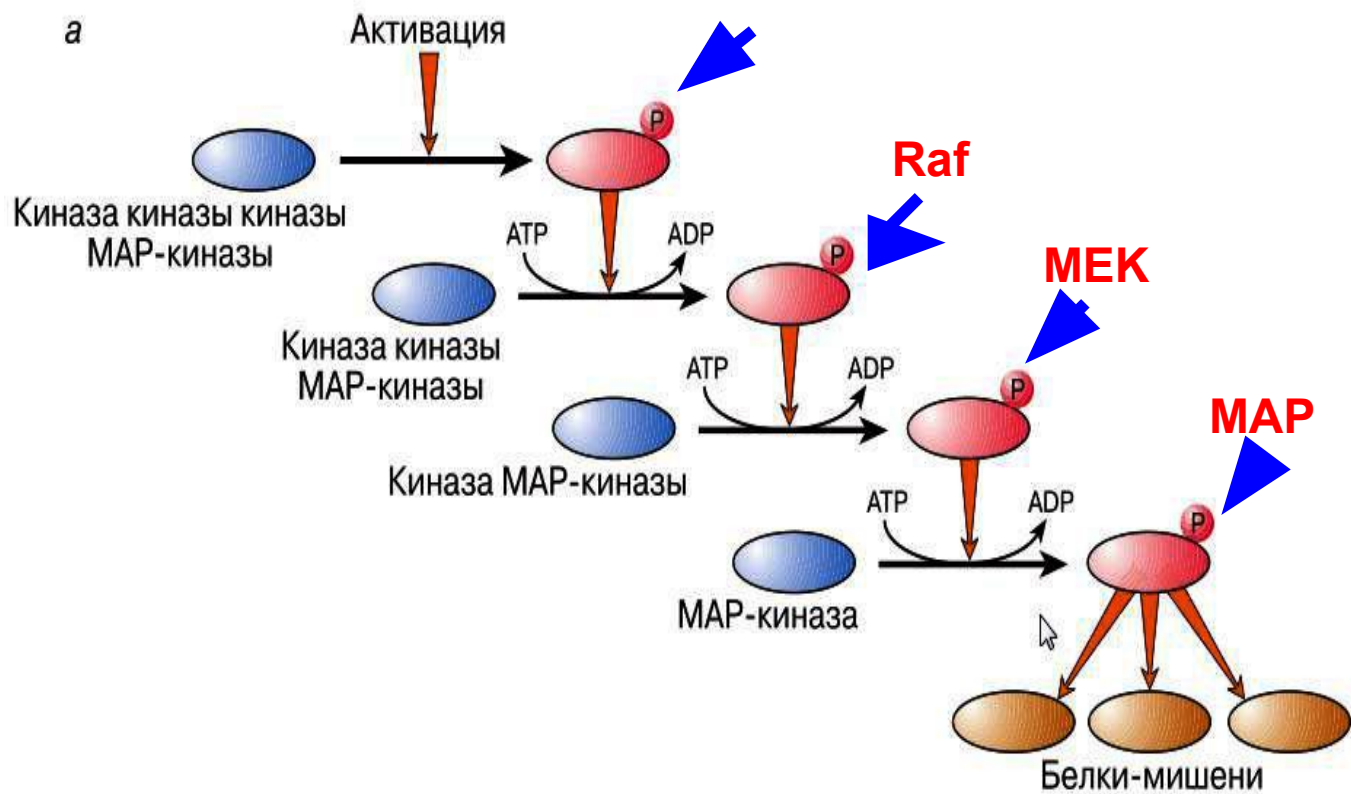
**Активированная МАРК** также способна фосфорилировать:

- другие внутриклеточные белки (цитоскелет и др.);
- другие протеинкиназы, влияя на их активность.

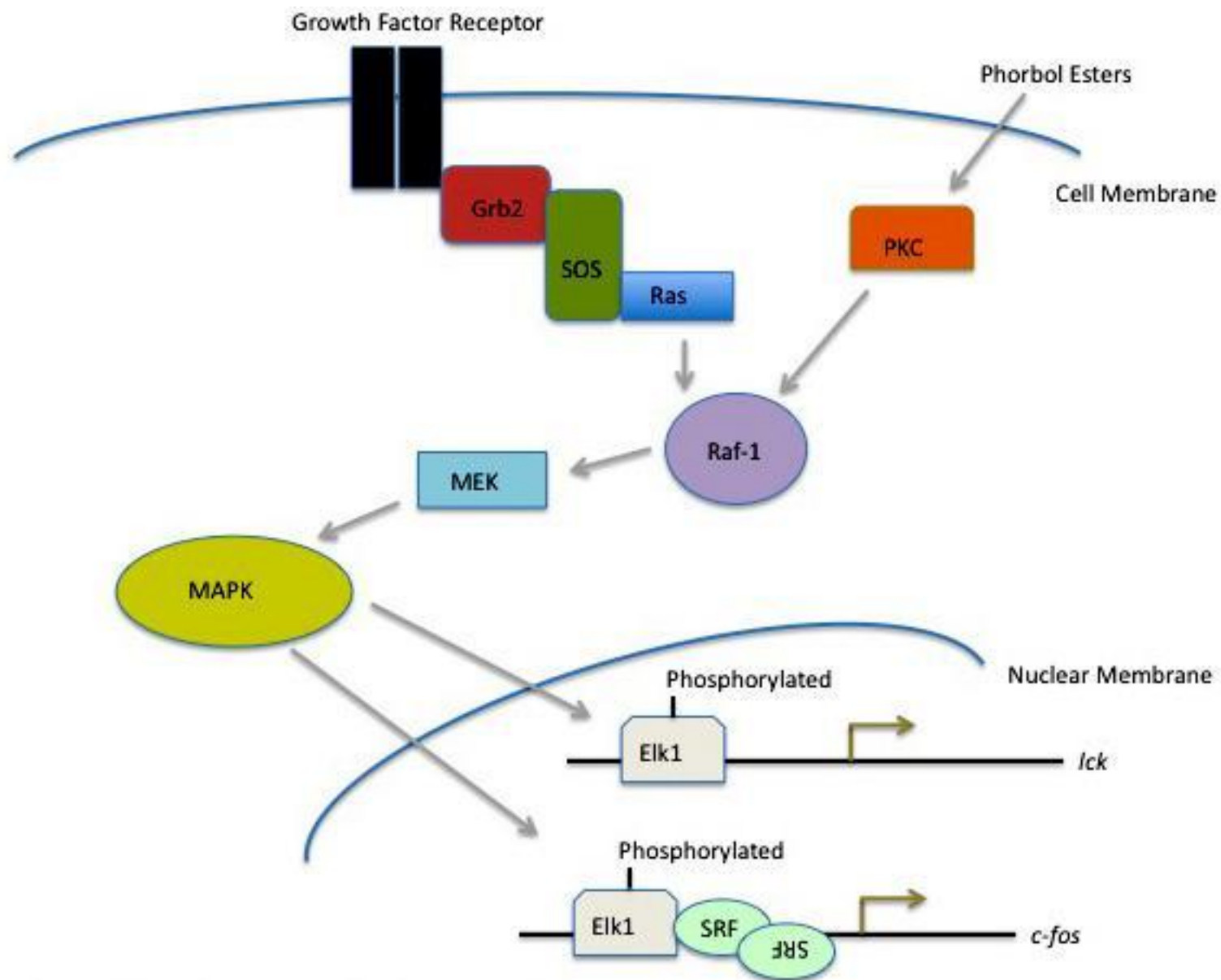
**Каскад киназ**, в котором каждая из киназ, лежащих «ниже по течению», активируется фосфорилированием с участием киназ, лежащих «выше по течению» – представляет собой **ещё один способ усиления сигнала**.

# ПРИНЦИП УСИЛЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛА В КАСКАДЕ ПРОТЕИНКИНАЗ

например, ПКС  
(Ras - активатор ПКС)



# АКТИВАЦИЯ КАСКАДА МАРК РАЗЛИЧНЫМИ ПУТЯМИ



## «Выключение» митогенной сигнализации:

- диссоциация комплекса лиганд – рецептор;
- дефосфорилирование цитозольных доменов рецептора клеточными фосфатазами;
- фосфорилирование цитозольных доменов **по остаткам серина и тиронина** (с участием **ПКА** и **ПКС**);
- другие специфические фосфо(тирозин-серин-треонин) фосфатазы удаляют остаток фосфорной кислоты из внутриклеточных белков (адаптерных и промежуточных протеинкиназ), снимая этим эффекты их фосфорилирования (активации).

Некоторые типы опухолей возникают при нарушении регуляции MAPK-сигнального каскада.

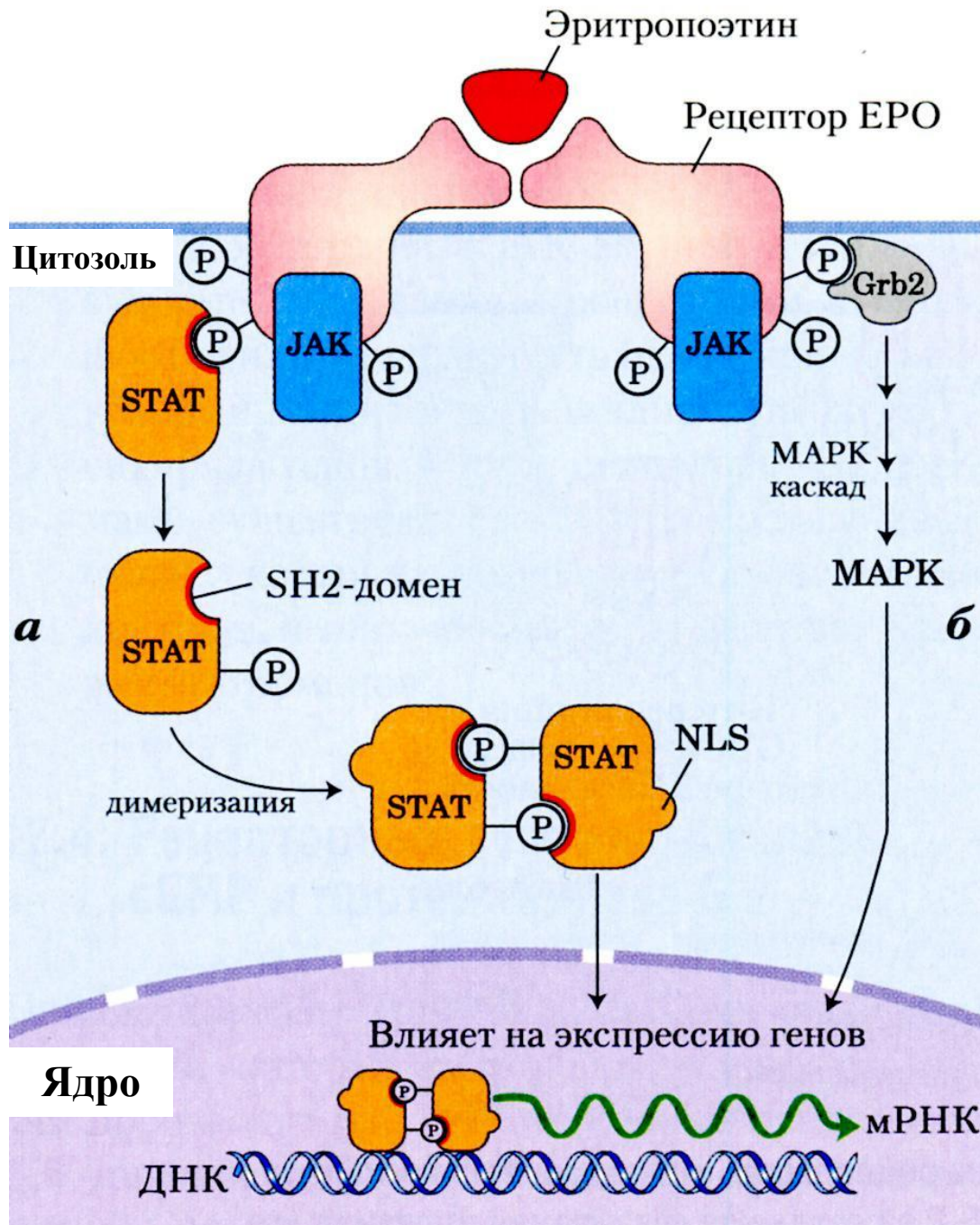
**Мутации генов**, кодирующих **цитоплазматический домен рецепторов** с собственной тирозинкиназной активностью, нарушает:

- тирозин-киназную активность цитозольных доменов рецептора;
- формирование на этом домене докинг-центров.

Эти нарушения вызывает аномальный клеточный ответ и приводят к неконтрольному росту мутантных клеток.

Многие **онкогены** вызывают мутацию генов, кодирующих рецепторы факторов роста.





## Два пути передачи митогенного сигнала посредством:

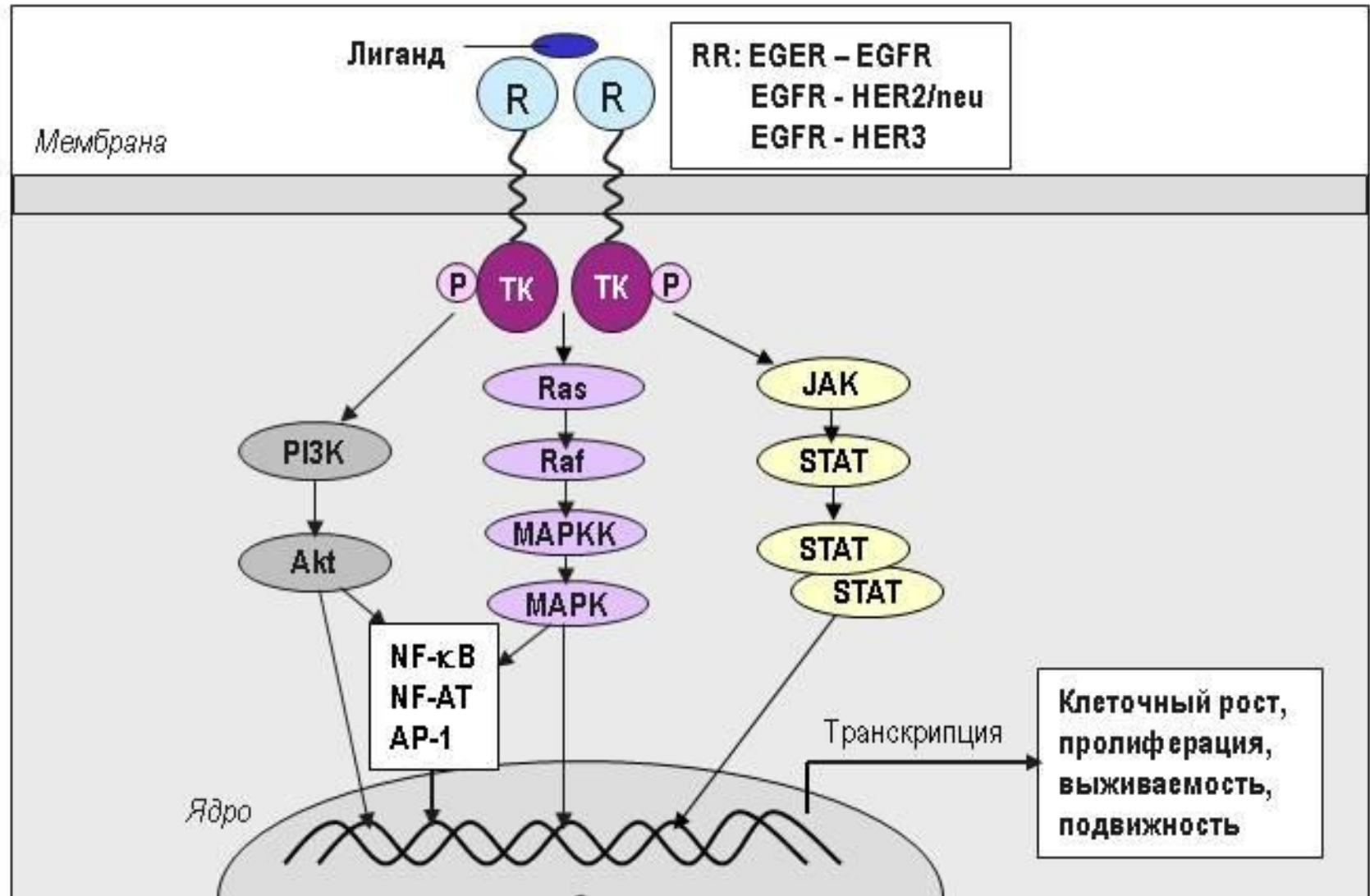
1). **ЖАК-СТАТ-сигнального пути (ветвь а).**

В молекуле STAT также присутствуют **SH2-домены**, распознающие фосфотирозины и связывающиеся с ними.

2). **МАРК-каскада (ветвь б).**

В разных типах клеток каскад может быть сопряжен с дополнительными сигнальными путями и активировать различные транскрипционные факторы.

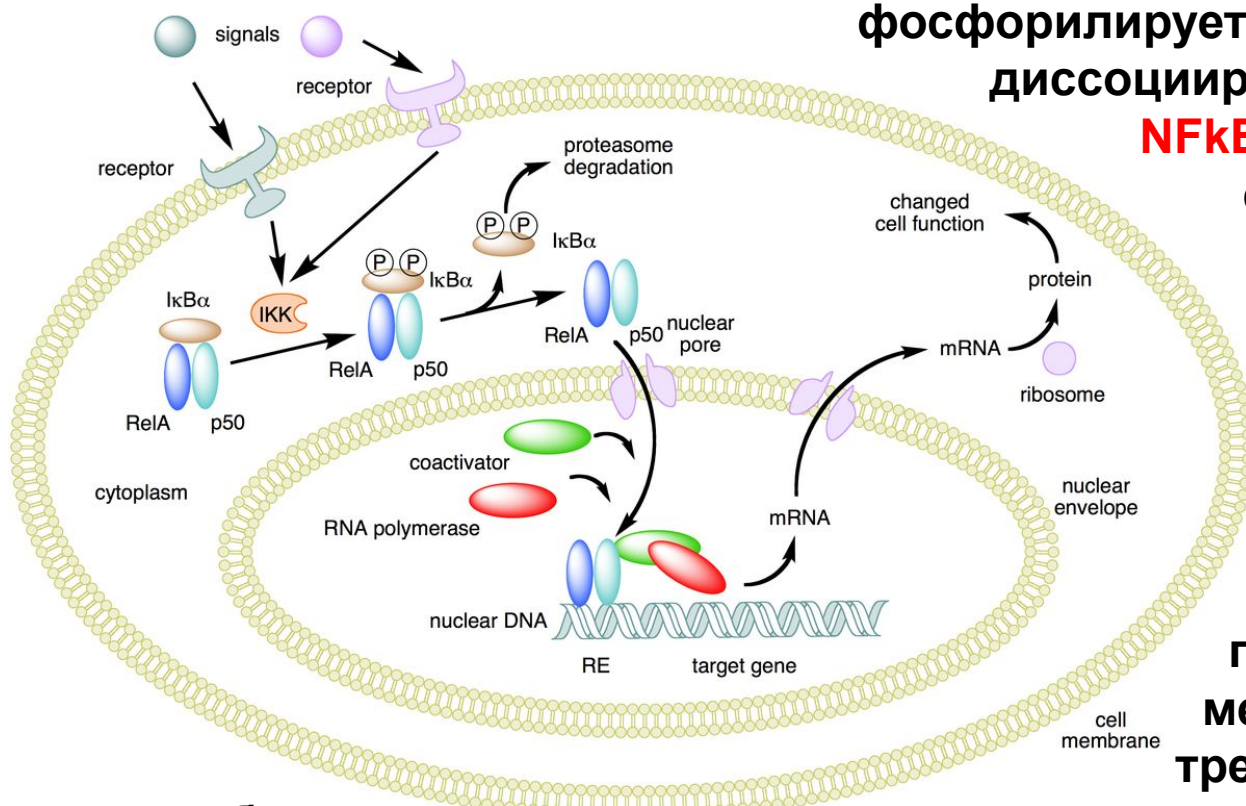
# Процессы, регулируемые эпидермальным фактором роста



# Третий путь передачи митогенного сигнала посредством ядерного транскрипционного фактора $\kappa B$ (nuclear factor kappa B = NF $\kappa$ B)

Неактивный **NF $\kappa$ B** (гетеродимер: p105+p50) существует в цитоплазме в комплексе с белком – ингибитором (**I $\kappa$ B**). Активация **рецепторов факторов роста** и/или **цитокинов** (посредством активации ПКВ или MAPK) фосфорилирует киназу **I $\kappa$ B** (**IKK**). Активированная **IKK**

фосфорилирует ингибитор (**I $\kappa$ B**), который диссоциирует из комплекса, а **NF $\kappa$ B** переходит в активное состояние.



новые белки, достаточно вызвать диссоциацию комплекса NF $\kappa$ B-ингибитор.

NF $\kappa$ B передаёт внешний сигнал в ядро очень быстро. Это обусловлено тем, что неактивный фактор (в комплексе с ингибитором) постоянно присутствует в цитоплазме. Для активации NF $\kappa$ B не требуется синтезировать

# СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ИНСУЛИНА

## Строение рецептора инсулина и механизм его активации

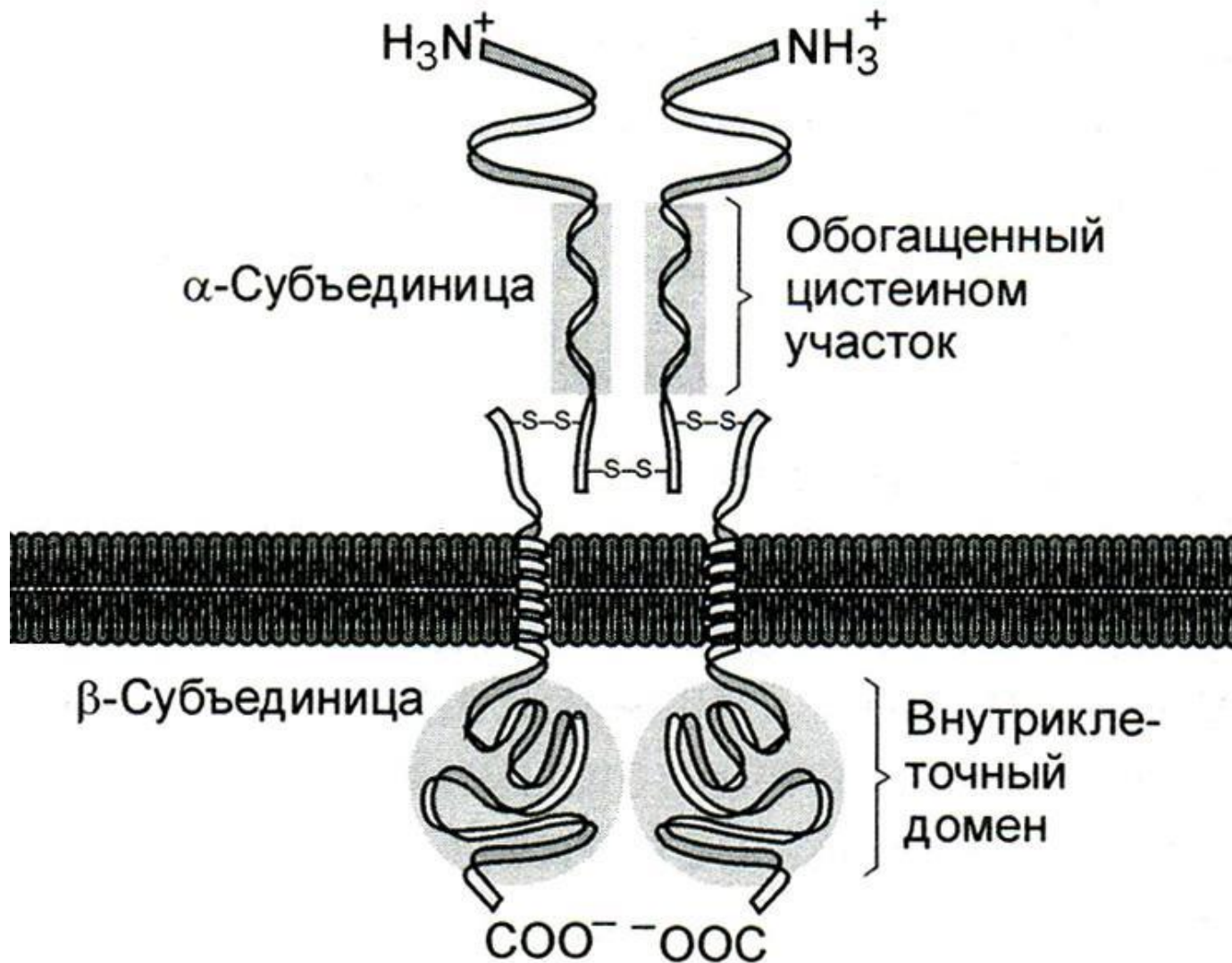
Рецептор инсулина **изначально является димером**: состоит из **2 $\alpha$ -** и **2 $\beta$ -субъединиц**. (Рецепторы факторов роста, в отличие от рецептора инсулина, димеризуются только после связывания с лигандом).

Две внеклеточные  **$\alpha$ -субъединицы** рецептора содержат гормон-связывающий домен. В результате связывания инсулина с ними рецептор активируется, что приводит к появлению тирозинкиназной активности в его цитозольных  **$\beta$ -субъединицах**. Это происходит благодаря запуску перекрестного аутофосфорилирования: одна  $\beta$ -субъединица фосфорилирует вторую  $\beta$ -субъединицу (и наоборот) по трем остаткам тирозина.

В результате аутофосфорилирования обеих  **$\beta$ -субъединиц**, в них происходят конформационные изменения: участок цепи цитозольного домена изменяет своё положение и **открывает активный центр тирозинкиназы**.



# Рецептор инсулина

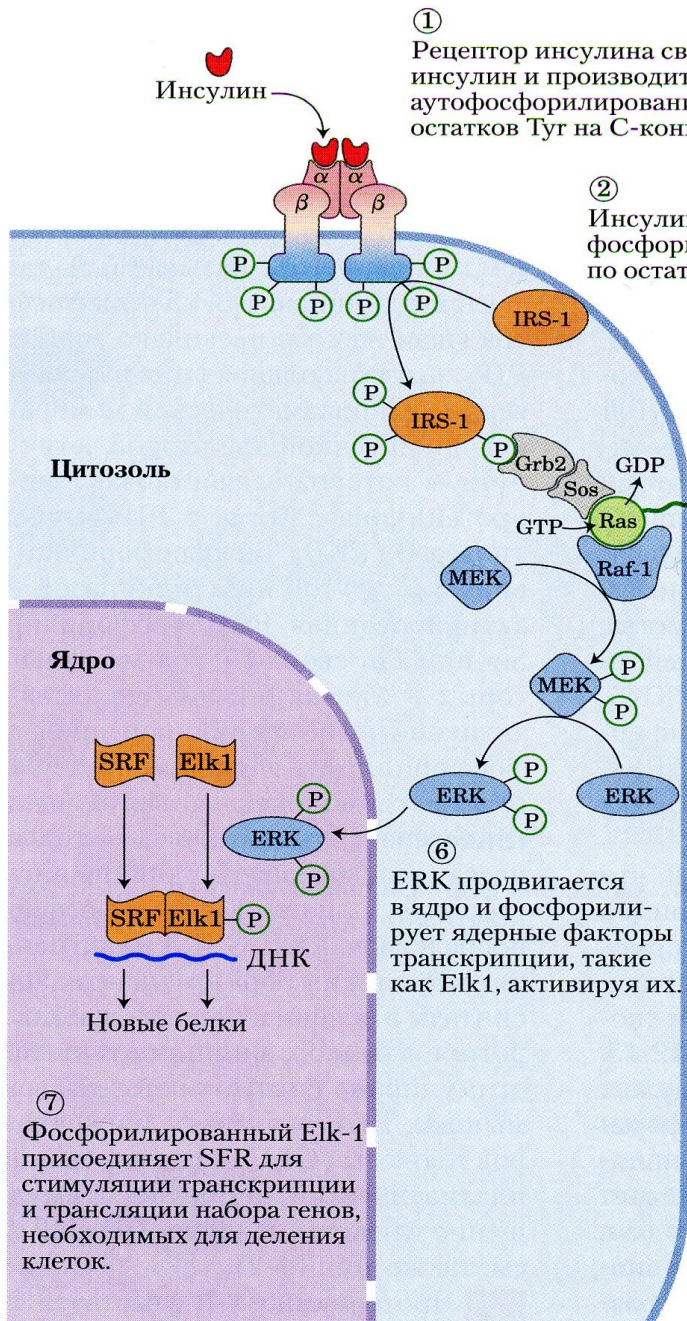


# РЕГУЛЯЦИЯ ИНСУЛИНОМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Активированный рецептор инсулина фосфорилирует по тирозину молекулу **субстрат рецептора инсулина-1** (**IRS-1** – **insulin receptor substrate-1**). **IRS-1** посредством своих фосфотирозинов связывается с SH2-доменом белка **Grb2**. Белок **Grb2** содержит второй тип домена - **SH3-домен** с высоким сродством к областям других белков, богатых пролином. С помощью этого домена белок **Grb2** связывается с белком **SOS/GEF**. Комплекс **Grb2-SOS/GEF** переводит белок **Ras** в активную конформацию (**Ras-ГТФ**). Белок **Ras** активирует **МАП-киназный каскад**.

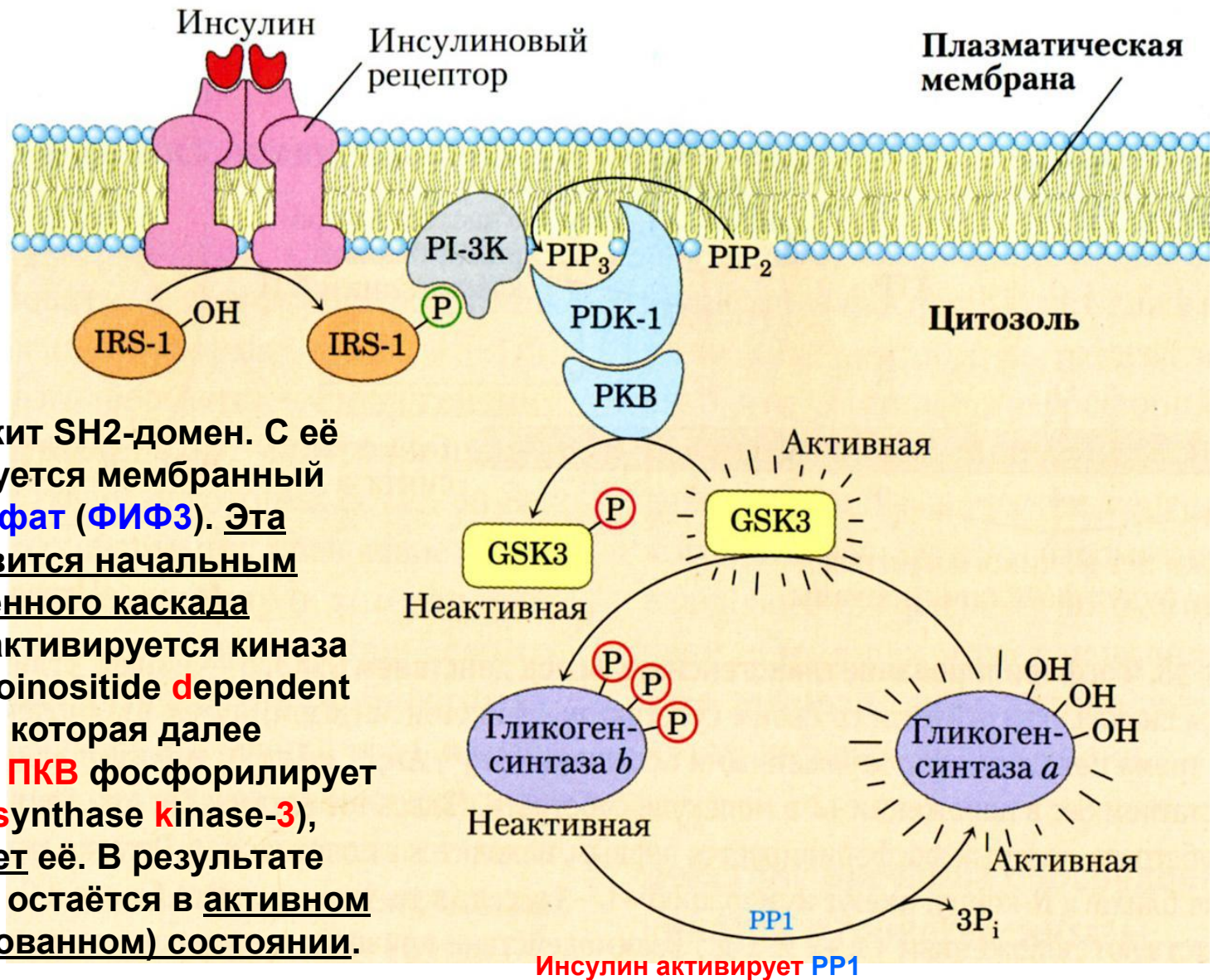
Активированная **ERK (МАПК)** проникает в ядро, где фосфорилирует и активирует транскрипционный фактор **Elk1**. Последний далее присоединяет белок **SRF** – (**serum response factor** – **сывороточный фактор ответа**) и этот комплекс (**Elk1/SRF**) активирует гены, необходимые для деления клетки.

# Схема регуляции экспрессии генов инсулином





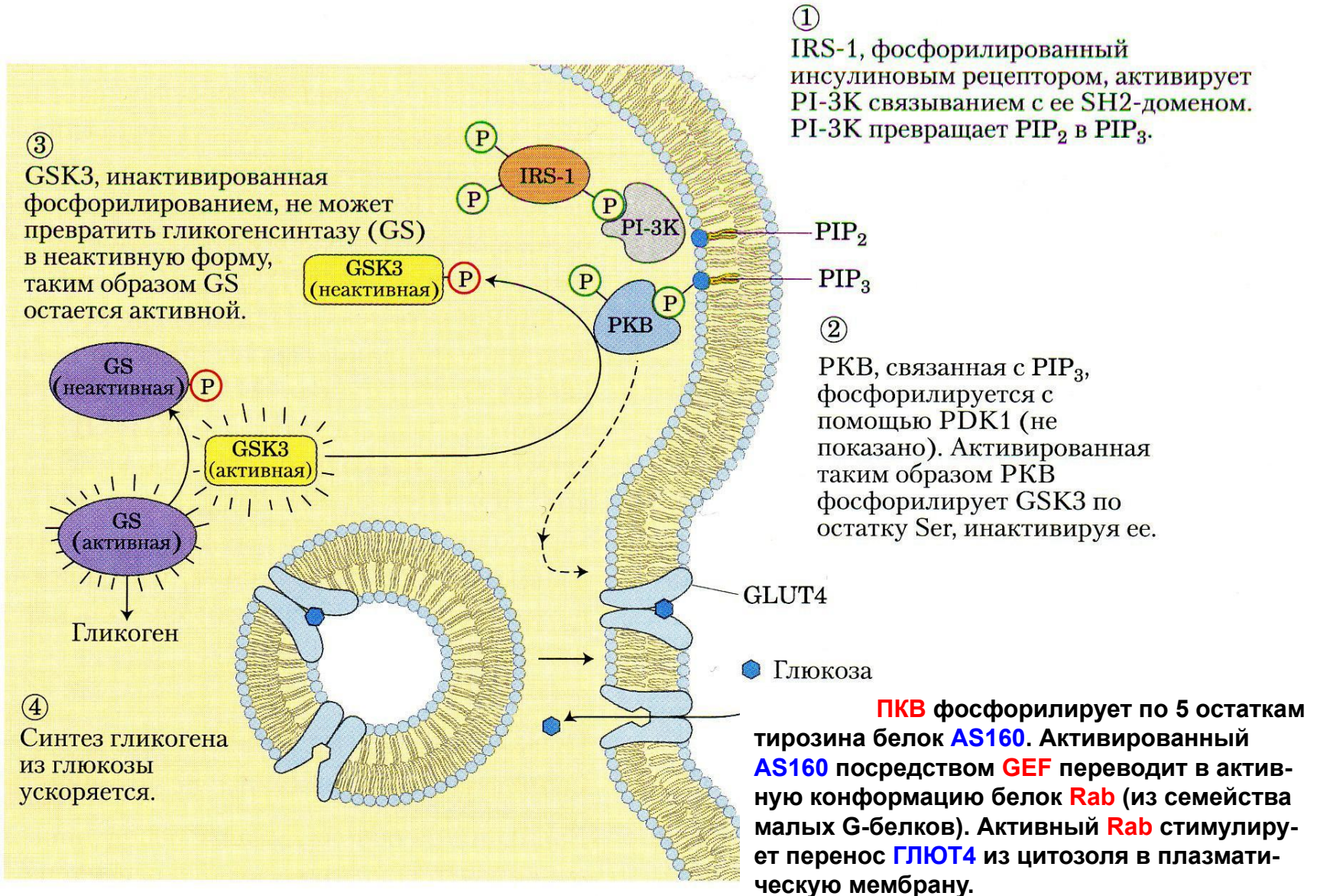
# Схема активации гликогенсинтетазы инсулином



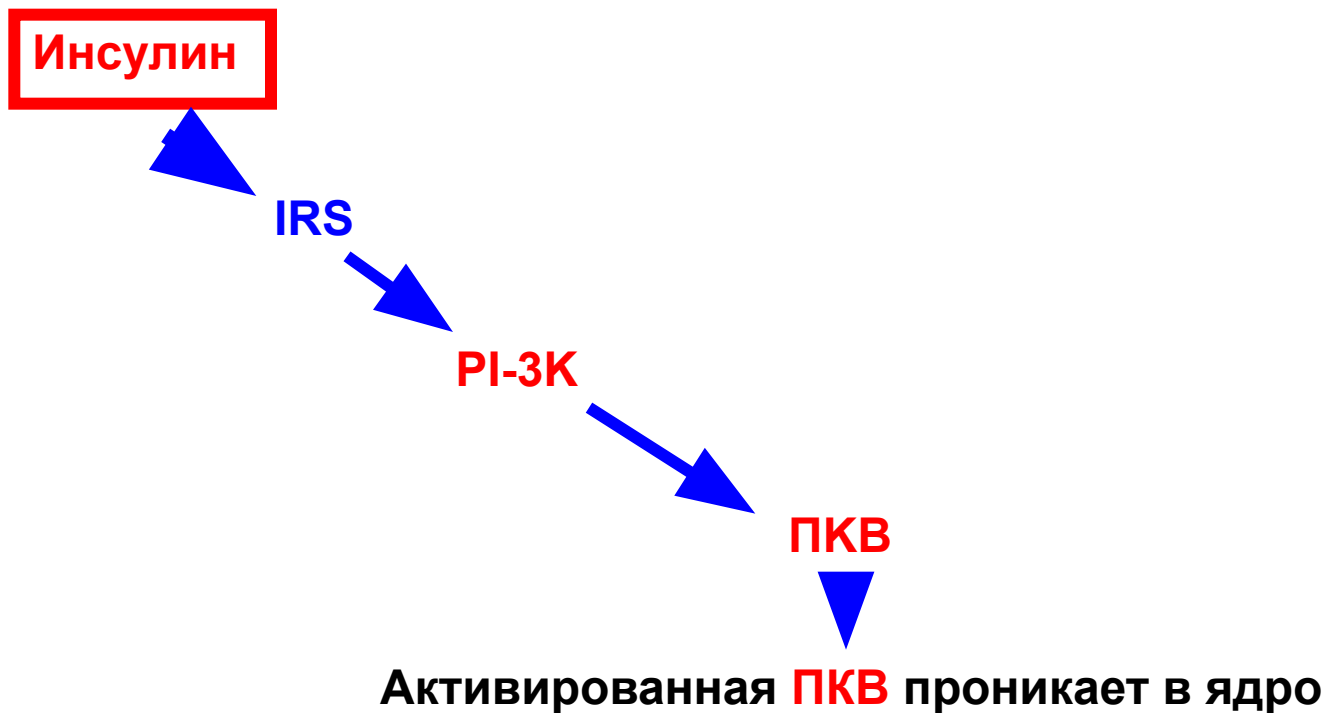
**ФИ-3К** содержит SH2-домен. С её помощью образуется мембранный **ФИ-3,4,5-трифосфат (ФИФ3)**. Эта молекула становится начальным пунктом собственного каскада киназ. Сначала активируется киназа **PDK-1** (3-phosphoinositide dependent protein kinase-1), которая далее активирует **ПКВ**. **ПКВ** фосфорилирует **GSK3** (glycogen synthase kinase-3), чем инактивирует её. В результате **гликогенсинтаза** остаётся в активном (нефосфорилированном) состоянии.



# Схема активации инсулином движения везикул, содержащих ГЛЮТ4, в плазматическую мембрану (посредством активации ПКВ)



# Схема подавления инсулином активности глюконеогенеза

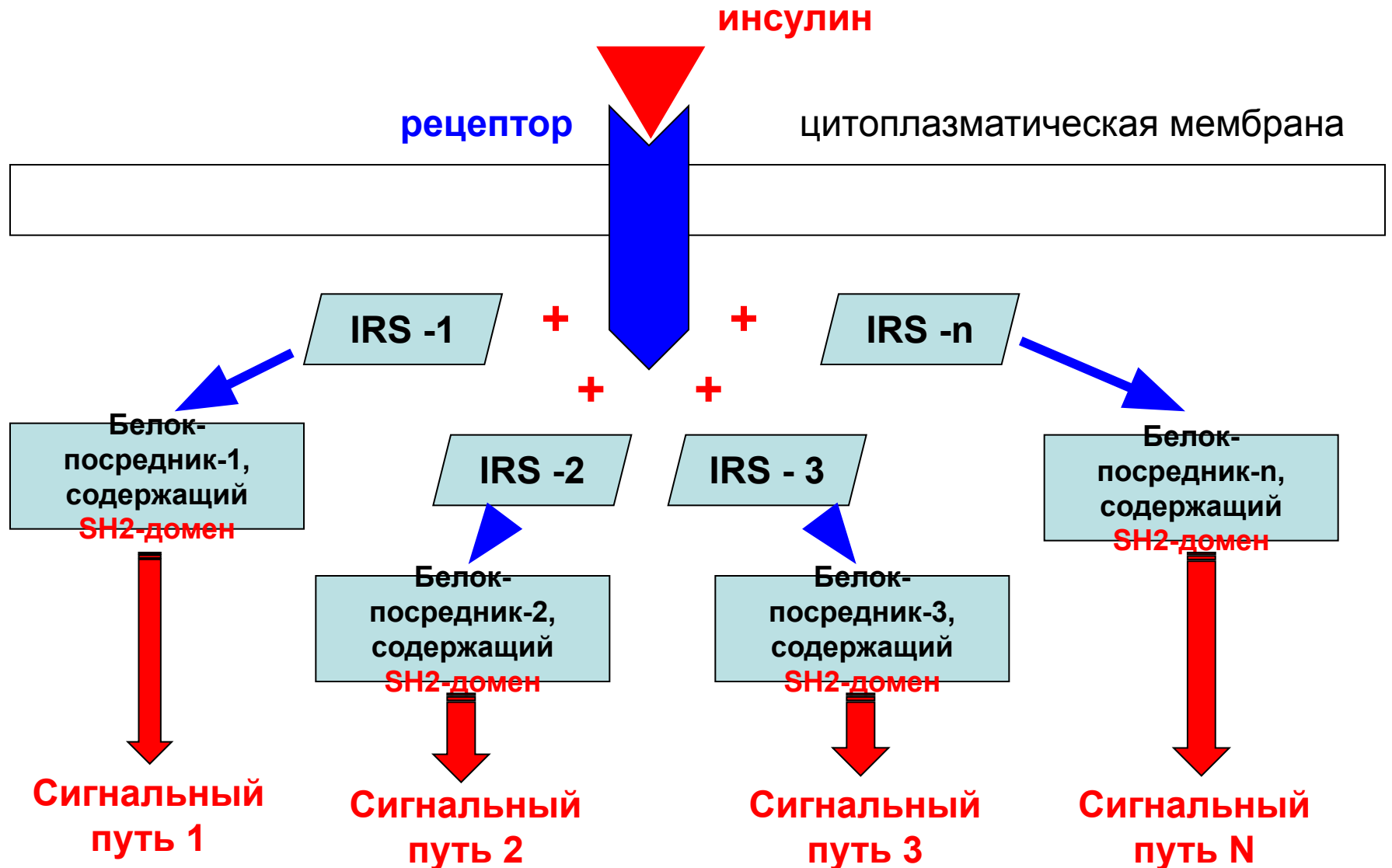


В ядре **ПКВ** фосфорилирует инсулин-респонсивный **транскрипционный фактор FOXO1** (forkhead box protein O1) по остаткам **серина/треонина**.

В результате этого **FOXO1** диссоциирует с инсулин-респонсивных участков генов, кодирующих **ключевые ферменты глюконеогенеза** (**ФЕП-карбоксикиназа** и **глюкозо-6-фосфатаза**).

Покинувший ядро фосфорилированный **FOXO1** в цитоплазме подвергается протеолитической деградации.

**Единый рецептор, действуя через разные представители семейства IRS, способен «включить» несколько разных сигнальных путей.**



**Благодарю за внимание**

