

Многообразие внутриклеточных каскадов в клетке

Слева направо:

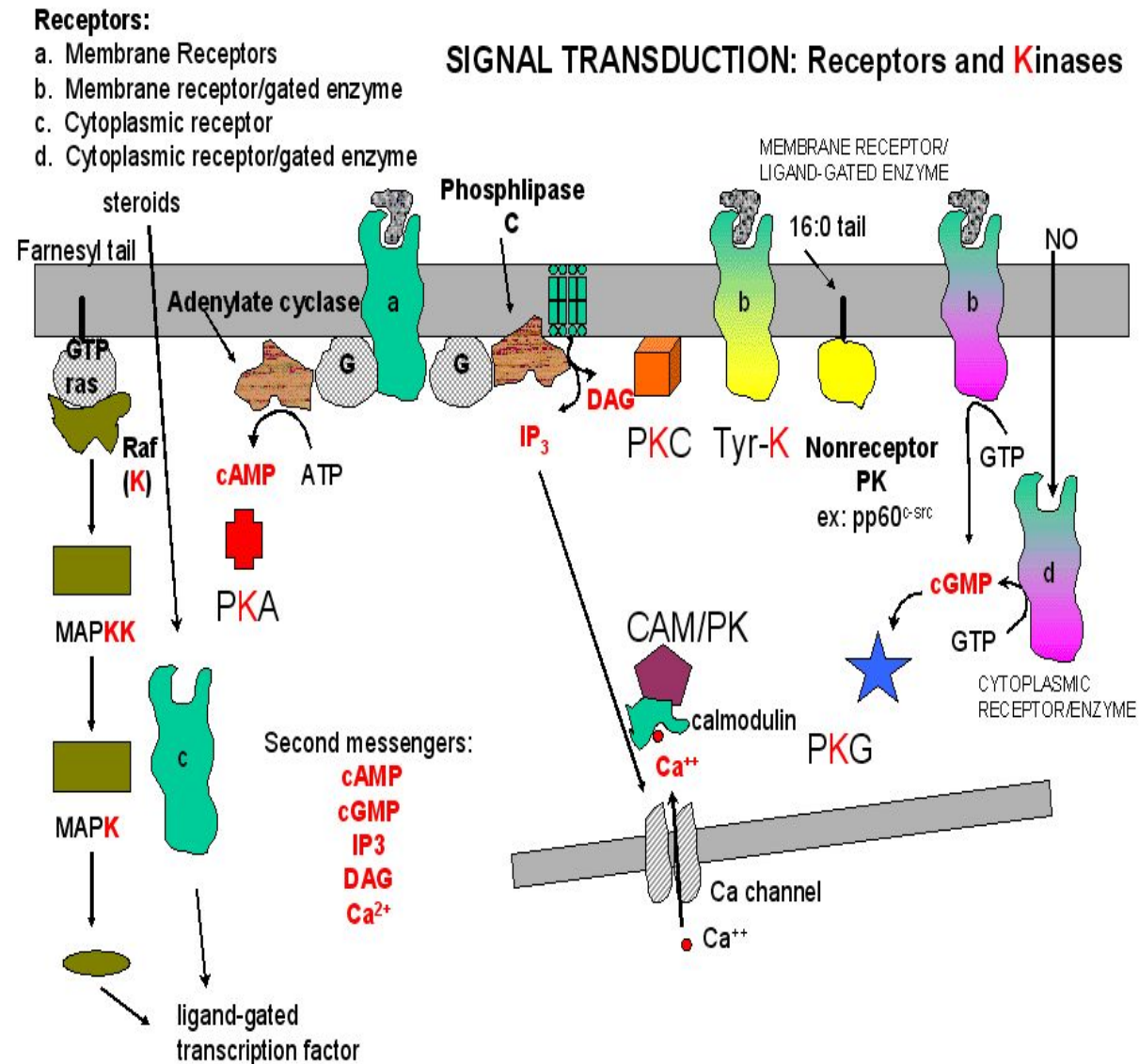
Цитоплазматический
и ядерный пути для стероидов

Мембранный цАМФ путь

Мембранный ИФ3 путь

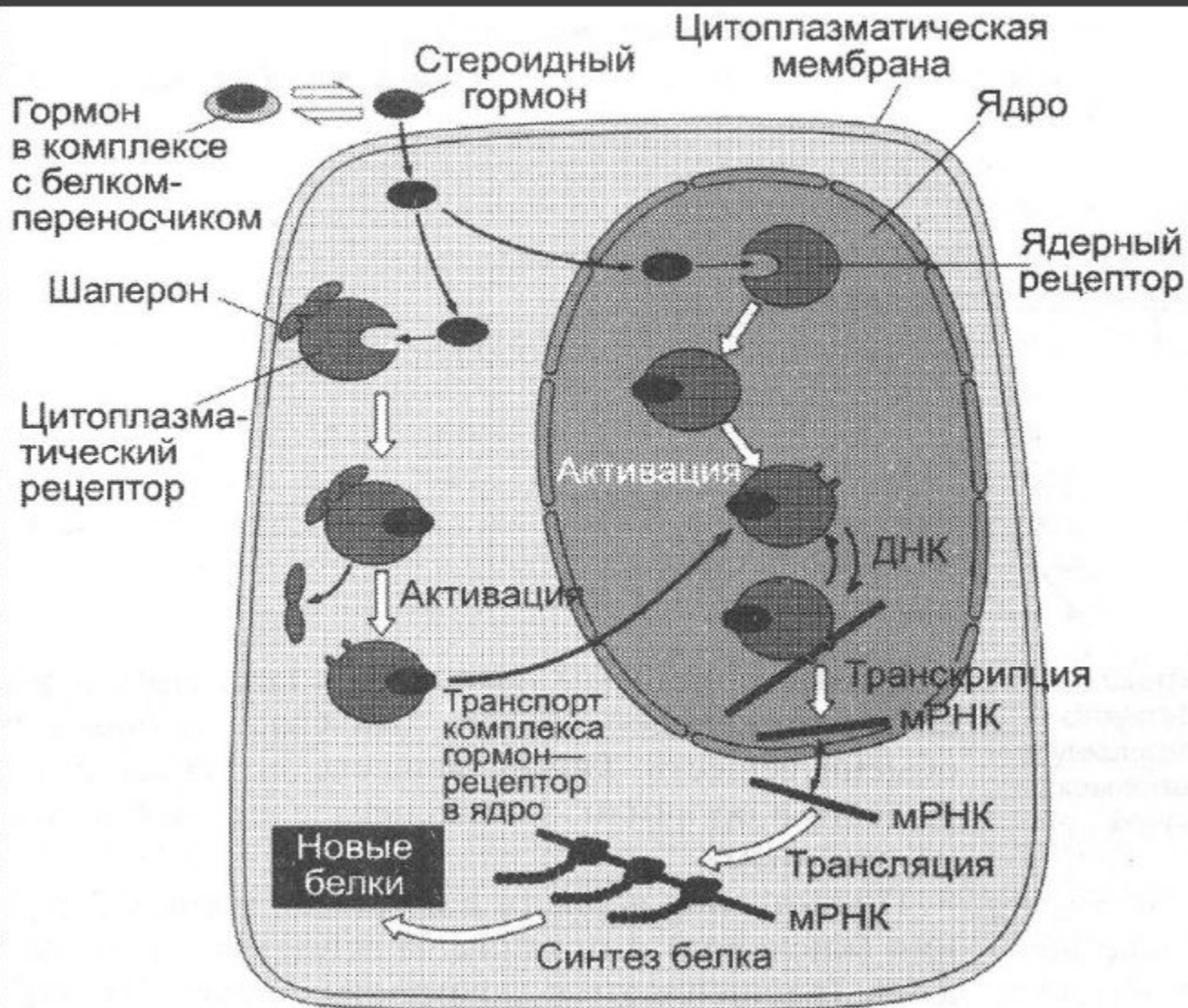
Тирозинкиназный путь

Мембранный и
цитоплазматический цГМФ
путь

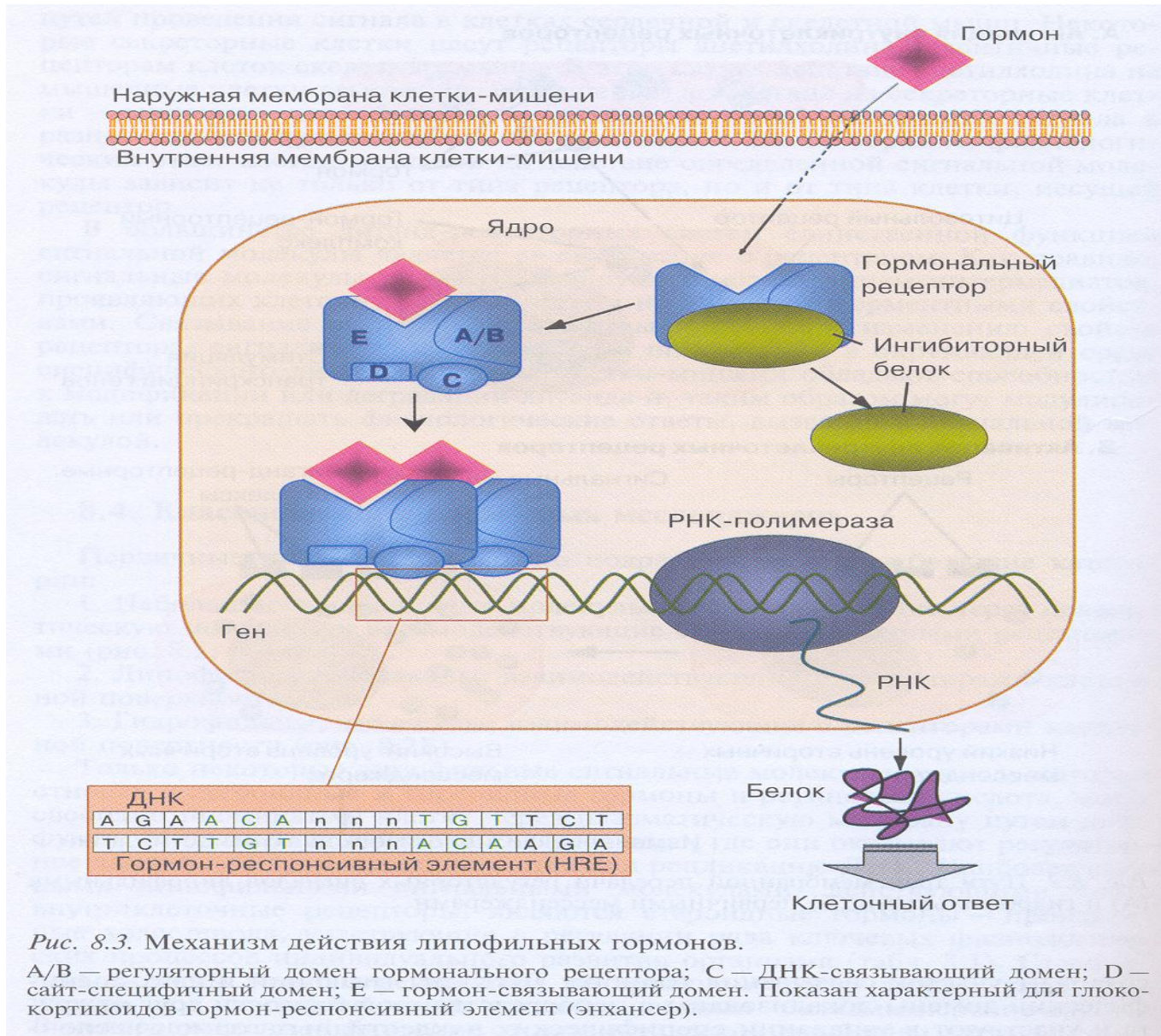


Передача сигнала липофильными гормонами

РЕАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНЫХ (ЯДЕРНЫХ) ЭФФЕКТОВ ЛИПОФИЛЬНЫМИ ГОРМОНАМИ РАЗНЫХ ГРУПП



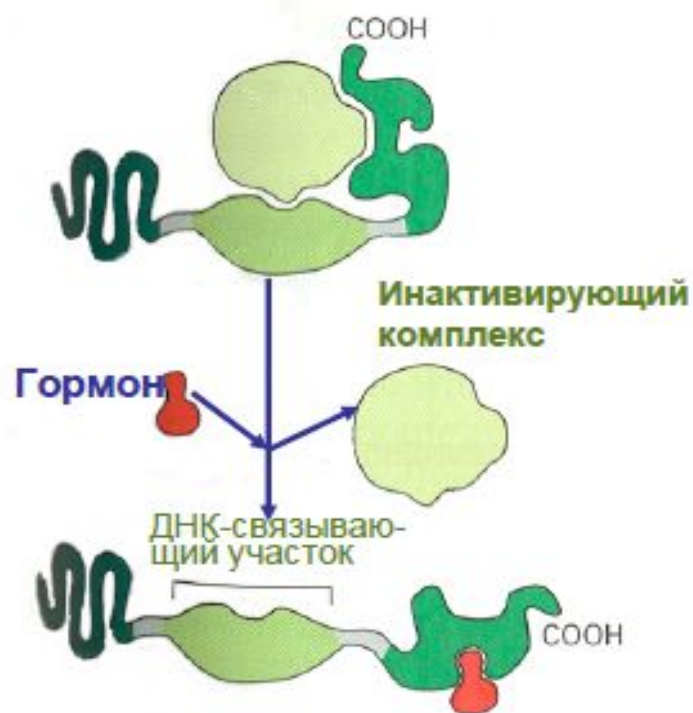
Передача сигнала посредством внутриклеточных рецепторов



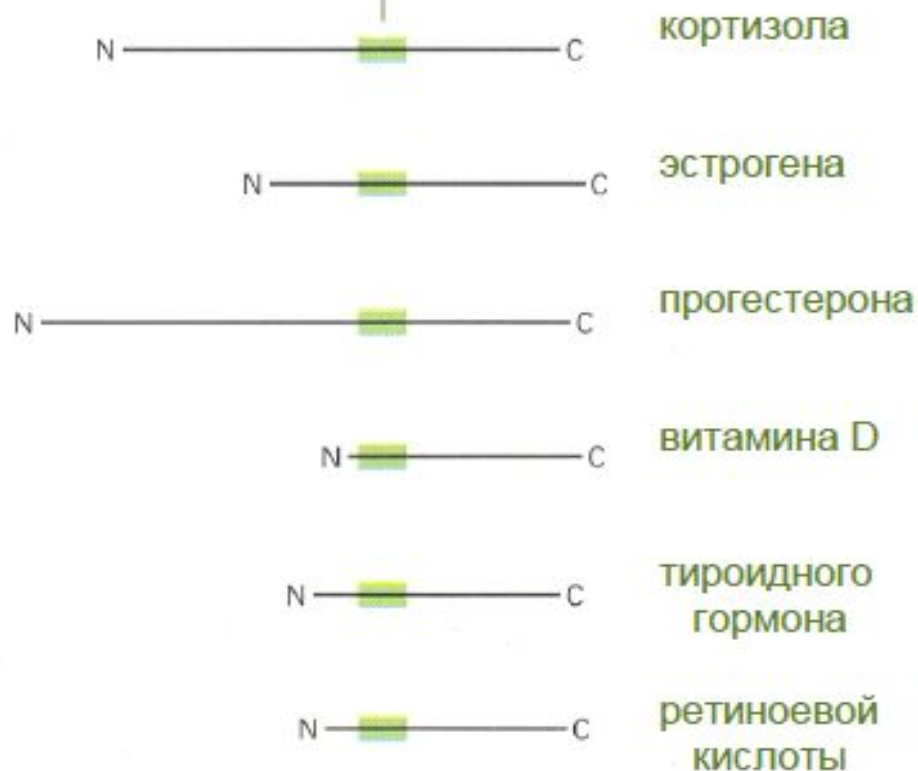
Механизм действия стероидных гормонов (СГ)

1. СГ → СГ + белок-переносчик → по кровотоку к клетке-мишени → диссоциация комплекса → диффузия СГ внутрь клетки-мишени → связывание с рецептором в цитоплазме или ядре.
2. Рецептор (Рц) СГ (50-120 кДа) содержит несколько доменов: гормонсвязывающий (Е), ДНК-связывающий (С), сайт-специфический домен (D). Домены участвуют в узнавании гормон-респонсивных элементов (HRE) и связывании Р с ДНК. Регуляторный домен А/В содержит участки связывания с различными компонентами клеточного ядра для компарментализации Рц.
3. В неактивном состоянии РцСГ находится в комплексе с белком-ингибитором.
4. СГ + белок-ингибитор (БТШ 90) → связывание с Рц → конформационные изменения → диссоциация комплекса → димеризация Рц → повышение сродства к ДНК → комплексы РцСГ связываются с энхансерными участками ДНК (HRE) → инициация транскрипции → синтез белков

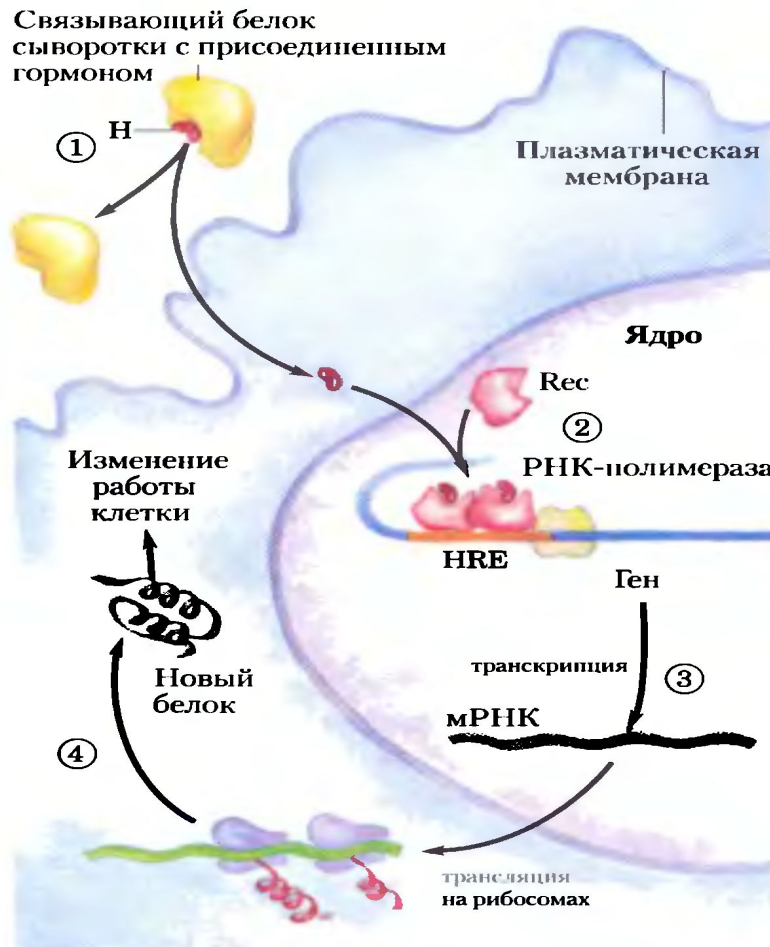
Внутриклеточные рецепторы жирорастворимых гормонов



**ДНК-связывающий домен
в различных рецепторах:**



Механизм регуляции экспрессии генов посредством стероидных и тиреоидных гормонов, ретиноидной кислоты и витамина Д



① Гормон (Н), перенесенный к ткани-мишени связывающими белками сыворотки, диффундирует через плазматическую мембрану и связывается со своим специфическим рецепторным белком (Rec) в ядре.

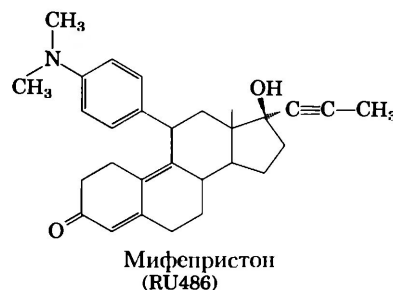
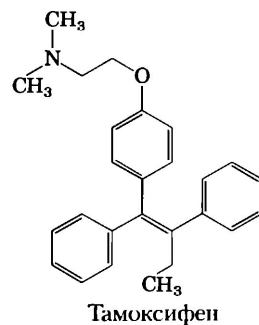
② Связывание гормона изменяет конформацию Rec; он образует гомо- или гетеродимеры с другими комплексами гормон-рецептор и присоединяется к специфическим регуляторным участкам, называемым элементами гормонального ответа (HRE) на ДНК, по соседству со специфическими генами.

③ Рецептор привлекает белки-коактиваторы или корепрессоры и вместе с ними регулирует скорость образования мРНК.

④ Изменившийся уровень продукта регулируемого гормоном гена представляет собой клеточный ответ на действие гормона.


 Специфичность взаимодействия стероид–рецептор используется при лечении рака молочной железы препаратом **тамоксифеном**. При некоторых видах рака груди деление раковых клеток обусловлено постоянным присутствием гормона эстрогена. Тамоксифен конкурирует с эстрогеном за связывание с рецептором эстрогена, но комплекс тамоксифен–рецептор оказывает слабый эффект или не оказывает никакого действия на экспрессию генов. Тамоксифен — антагонист эстрогена и введенный после хирургического вмешательства или при химиотерапии гормонзависимого рака молочной железы замедляет или останавливает рост оставшихся раковых клеток. Другой аналог стероидов препарат **мифепристон (RU486)** применяется для прерывания беременности на ранних сроках. Как антагонист гормона прогестерона RU486 связывается с рецептором прогестерона и блокирует действие гормона, необходимое для имплантации оплодотворенной яйцеклетки в матку. ■

Некоторые эффекты, связанные с действием стероидов, происходят настолько быстро, что кажется маловероятным, что это результат изменения синтеза белка по классическому механизму действия стероидных гормонов с участием ядерных рецепторов. Например, опосредованное эстрогеном расширение кровеносных сосудов, как известно, не зависит от транскрипции генов или синтеза белка, поскольку при действии стероида происходит уменьшение концентрации cAMP. Такие эффекты, вероятно, достигаются за счет какого-то другого механизма передачи сигнала.



- Стероидные гормоны проникают в клетку и связываются со специфическими рецепторными белками.
- Комплекс гормон–рецептор присоединяется к специфическим участкам ДНК, элементам гормонального ответа и взаимодействует с другими белками, регулируя экспрессию соседних генов.
- Определенное действие стероидных гормонов достигается посредством других более быстрых сигнальных путей.

Вторичные посредники

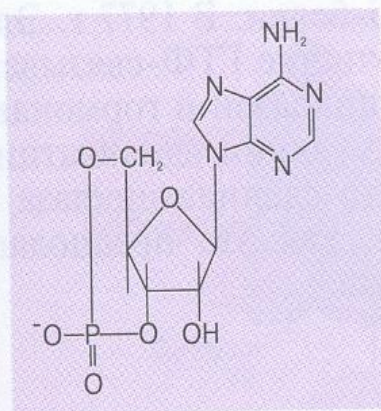
Пути образования и проведение сигнала (цАМФ, цГМФ, NO, липидные мессенджеры)

Вторичные посредники – это низкомолекулярные вещества, небелковой природы, **образуются и действуют внутри клеток**, и обеспечивают передачу сигнала **от рецептора к мишеням** в клетке. ВП **синтезируются *de novo* или хранятся во внутриклеточных депо**, выходя в цитоплазму при активации рецепторов.

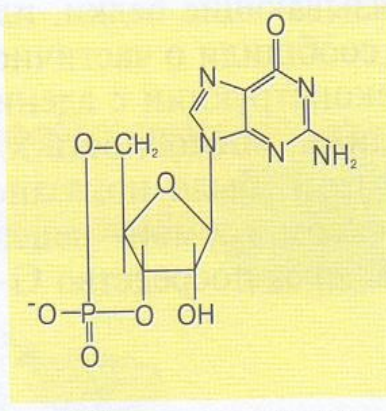
Критерии, предъявляемые к ВП:

- 1) ВП действуют **внутри** клетки;
- 2) в клетке имеется **механизм синтеза и метаболизма** ВП;
- 3) в неактивированной клетке концентрация ВП **низкая и резко увеличивается** при активации рецепторов.
- 4) ВП **значительно усиливает** первичный сигнал;
- 5) в клетке должны существовать **специфические мишени** ВП;
- 6) антагонисты действия ВП должны **блокировать** эффект активации рецептора;
- 7) ВП **компарментализован** в клетке, что направляет и ограничивает сигнал.

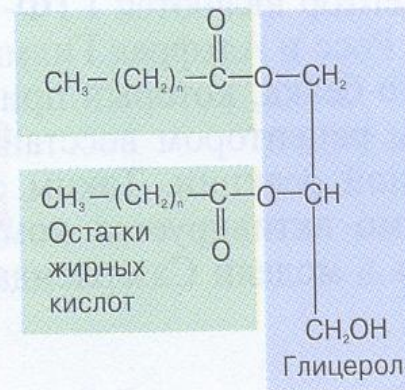
Вторичные мессенджеры: циклические нуклеотиды (цАМФ, цГМФ), мембранные липиды и их производные (ИФ3, ДАГ), ионы (Ca^{2+}), оксид азота, гидропероксид



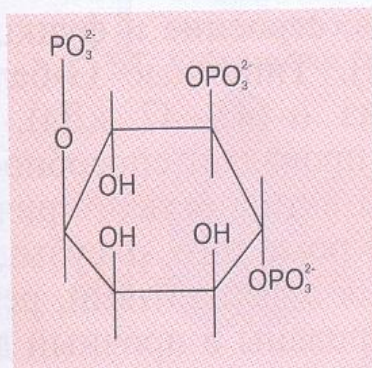
3',5'-циклический АМФ



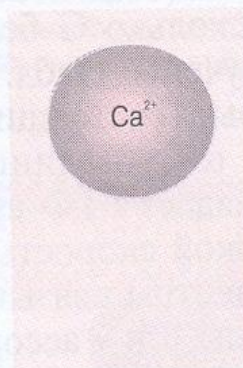
3',5'-циклический ГМФ



1,2-диацилглицерол



Инозитол-1,4,5-трифосфат



Ион кальция

**Оксид
азота**



$\text{NO}^\bullet$

Гидропероксид

Рис. 8.18. Химические структуры важнейших вторичных мессенджеров.

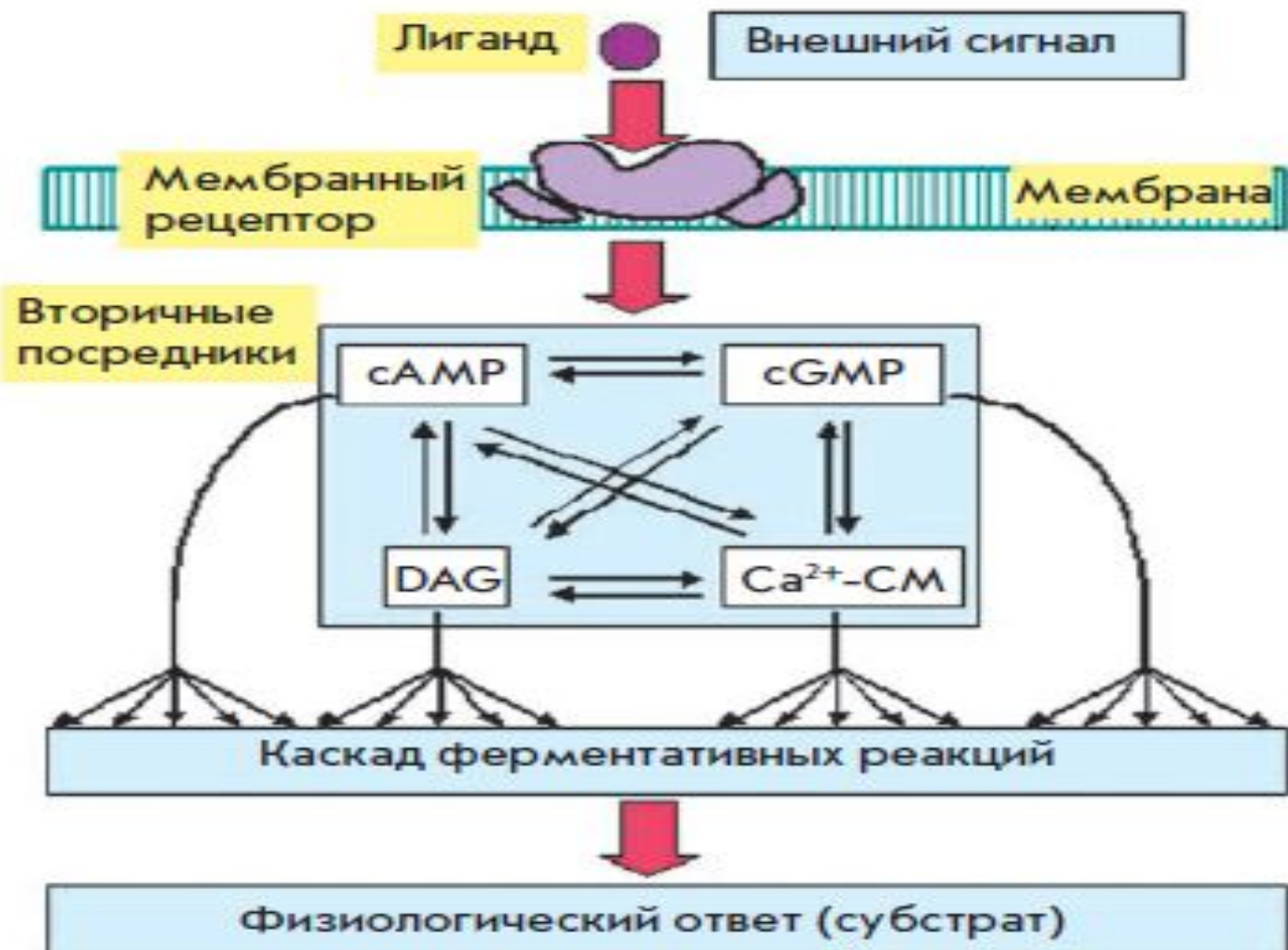


Рис. 1. Основные этапы передачи сигнала, опосредуемого вторичными посредниками, внутрь клетки.

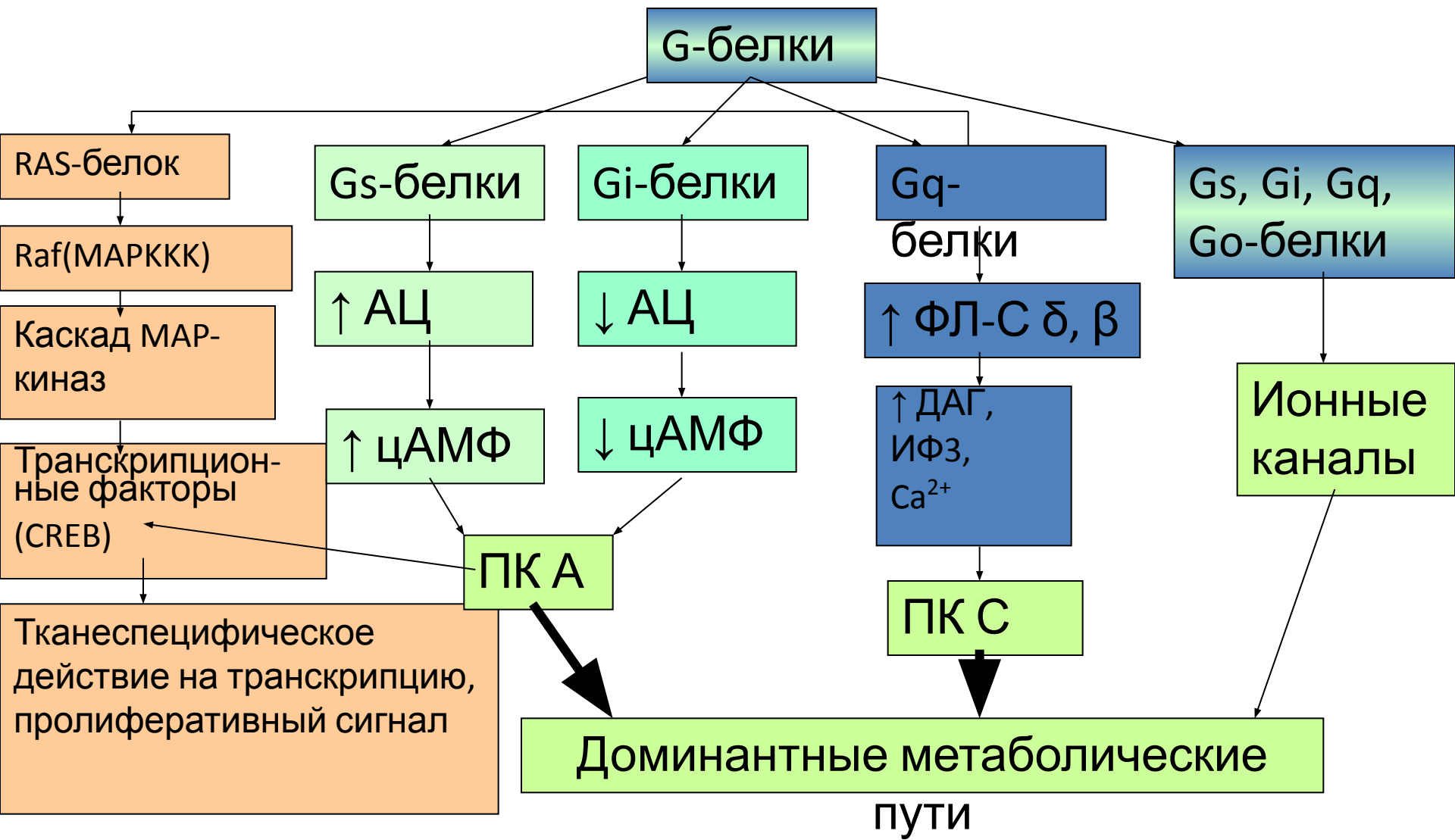
Ключевые этапы передачи сигнала посредством **ВП являются общими для регуляторных систем:**

**агонист→рецептор→эффекторный
белок→вторичный
посредник→модулируемый
белок→физиологический эффект**

Эффекторные белки – это белки, запускающие образование **вторичных посредников.**

GPCRs передают сигнал на эффекторные молекулы – аденилатциклазу, фосфолипазу C, фосфолипазу A2, цГМФ-специфическую фосфодиэстеразу и несколько типов ионных каналов.

Пути проведения метаболического и пролиферативного сигнала рецепторами, сопряженными с G-белками



Существует **2 пути**, с помощью которых GPCRs запускают образование вторичных посредников:

1. **cAMP – путь:**

активация GPCRs → активация **G_s - и G_i -белков** → активация аденилатциклазы (AC) → синтез cAMP → активация PKA → фосфорилирование ФТ → экспрессия генов

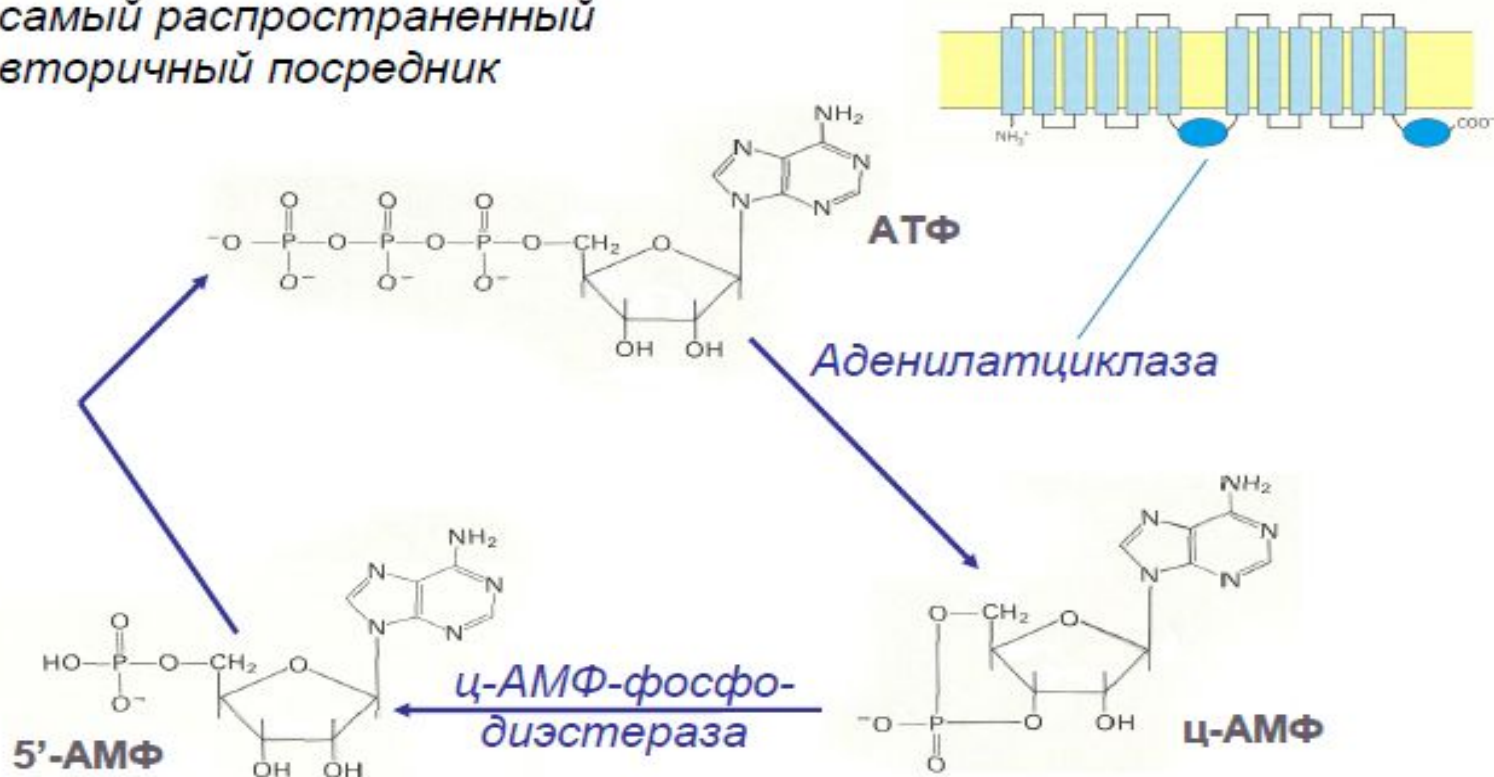
2. **Ca^{2+} /ДАГ- путь:**

GPCRs → активация **G_q -белков** → активация фосфолипазы C β (PLC β) → образование фосфоинозитол – 1,4,5- трифосфата (IP $_3$) → выход ионов Ca^{2+} из ЭПР;
PLC β → образование диацилглицерола (ДАГ) → активация PKC → фосфорилирование мишеней

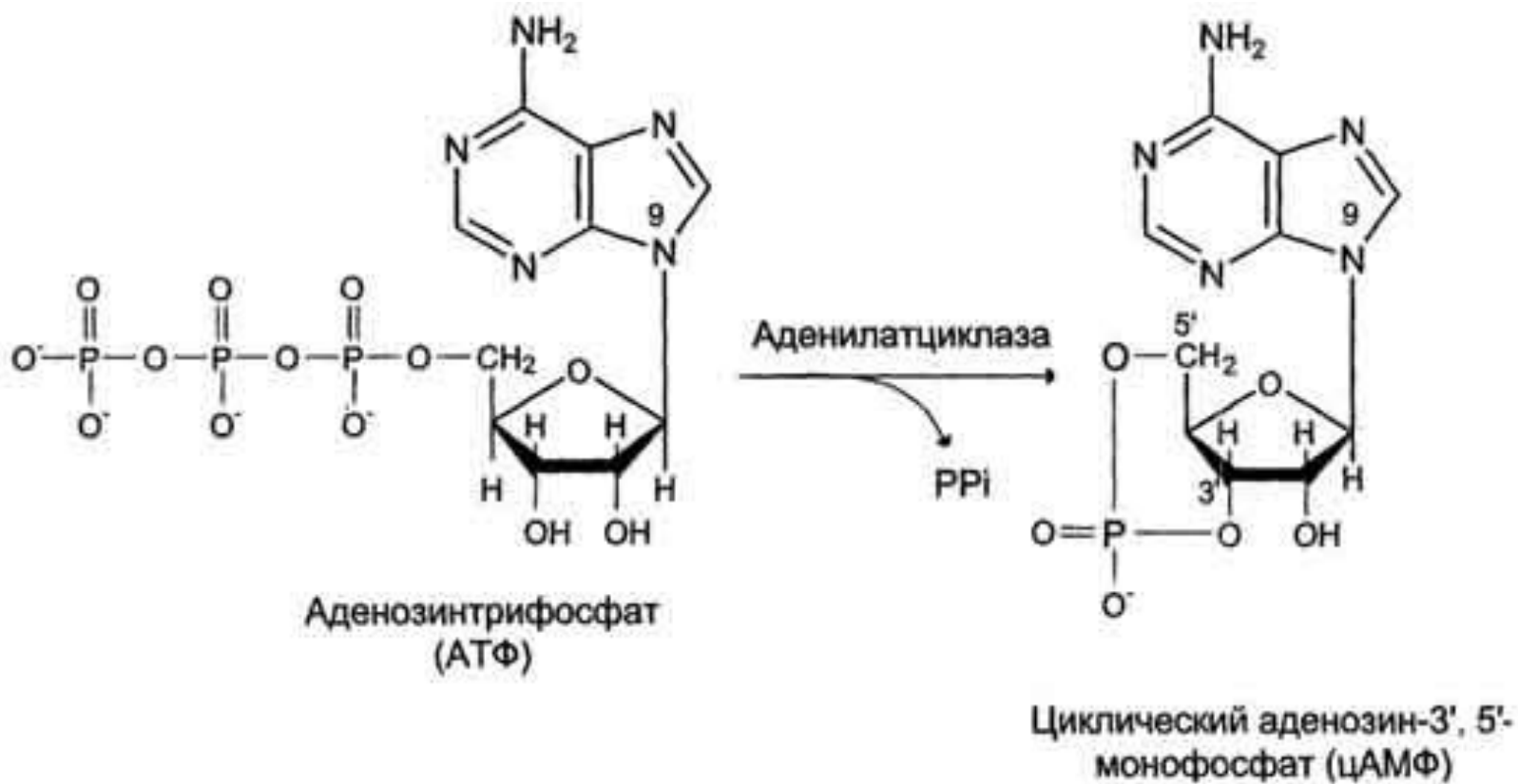
Циклический АМФ (цАМФ) - важнейший ВП, это вещество «влияет на все – от памяти до кончиков пальцев» (Э.Сазерленд)

Образование и распад цАМФ

*Циклический АМФ -
самый распространенный
вторичный посредник*



Образование цАМФ



Характеристика аденилатциклазы (АЦ)

1. Интегральный белок плазматической мембраны
2. Гликопротеин, М – 110-180 кДа
3. Полипептидная цепь содержит 12 трансмембранных доменов
4. Два домена Т1(М1) и Т2(М2) состоят из 6 трансмембранных спиралей, N- и С-концы экспонированы в цитозоль
5. Каталитическая часть (цитоплазматическая) включает 2 домена **K1** и **K2**, образующие участки связывания для АТР и α -субъединицы G_s и G_i - белков

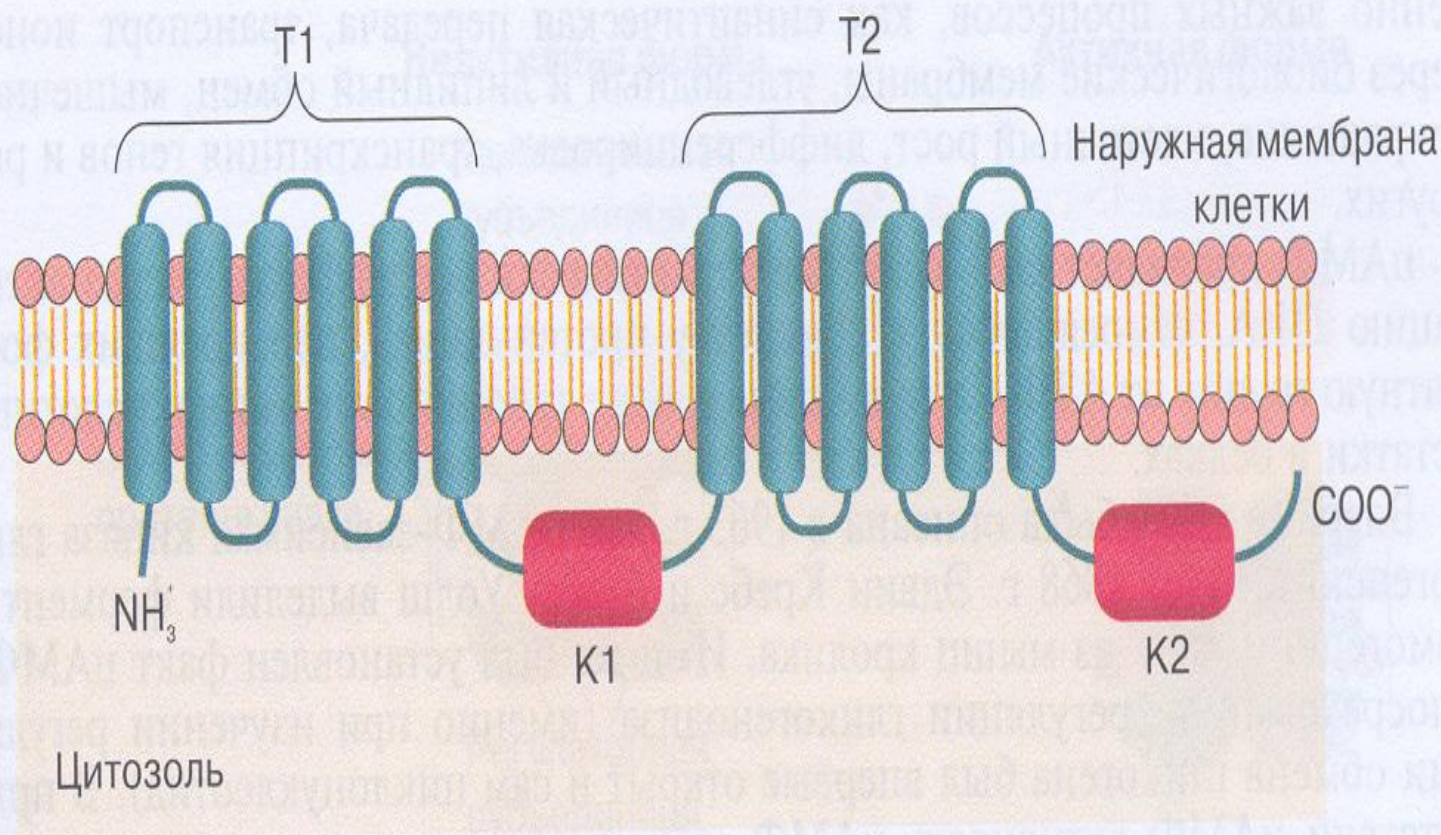
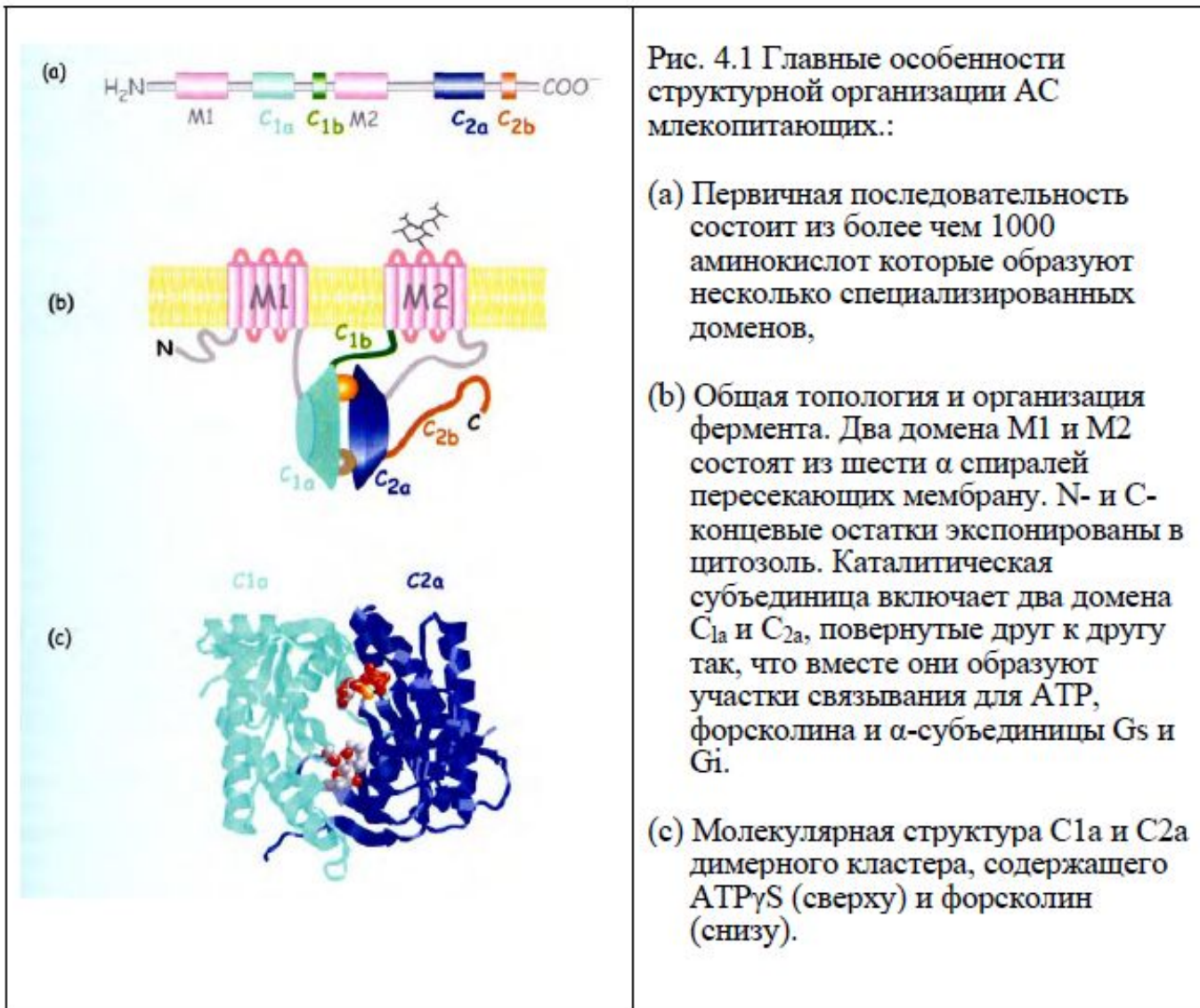
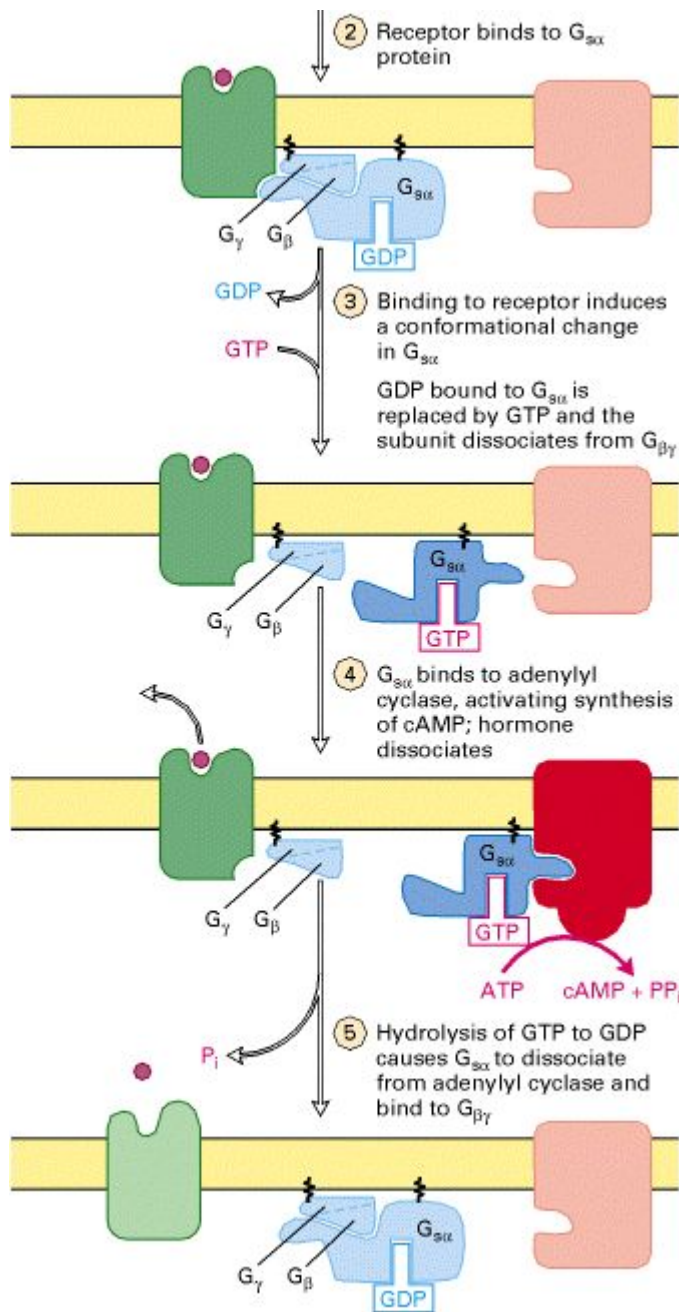


Рис. 8.23. Схематическое изображение мембранной организации аденилатциклазы. T1, T2 — трансмембранные гидрофобные домены. K1, K2 — каталитические домены.





Упрощенная схема активации АЦ вследствие связывания гормона (адреналин, глюкагон) с рецептором, сопряженным с G-белком

**Активируют
аденилатциклазу**

**-АКТГ
-АДГ
-Кальцитонин
-Кортиколиберин
-ФСГ
-ЛГ
-Глюкагон
-Адреналин (β -
адренэргические
рецепторы)
-ТТГ**

**Ингибируют
аденилатциклазу**

**-ацетилхолин
-адреналин (α 2-
адренэргические
рецепторы)
-ангиотензин II
-соматостатин**

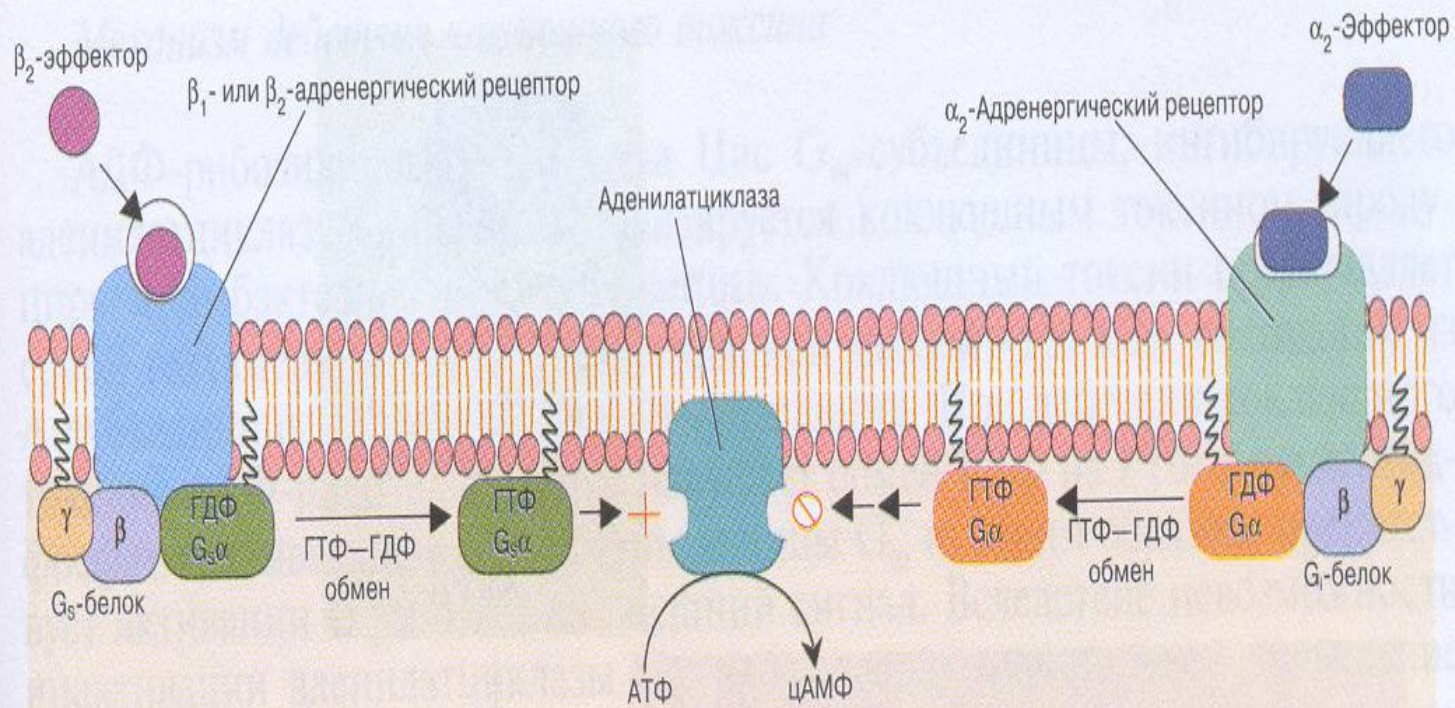


Рис. 8.20. Трансмембранная передача регуляторных сигналов через адренергические рецепторы, сопряженные с активирующими (G_s) и ингибирующими (G_i) G-белками.

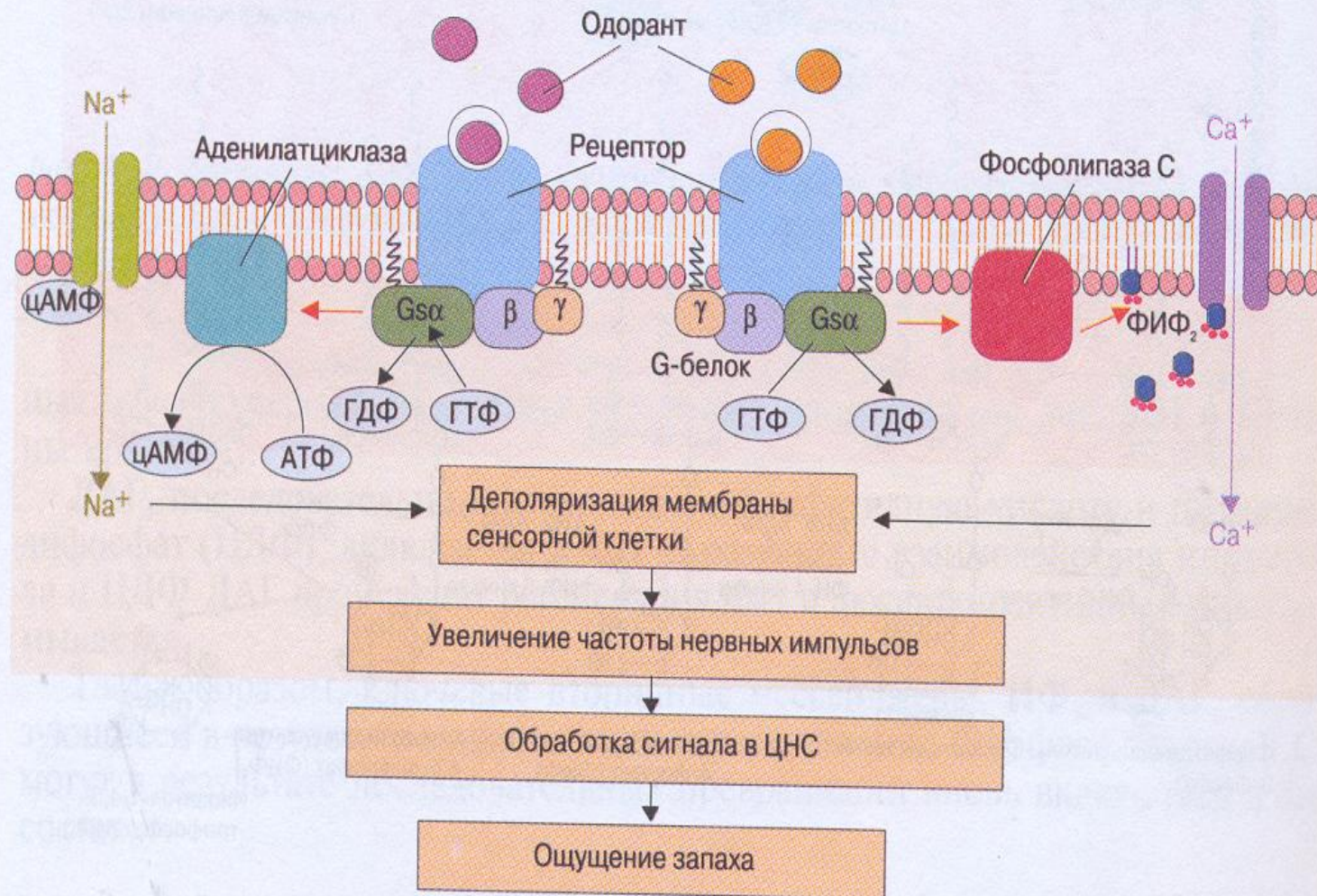


Рис. 8.34. Механизмы восприятия запахов с участием рецепторов, сопряженных с G-белками, активирующими аденилатциклазу и фосфолипазу С.

Передача сигнала через обонятельные рецепторы

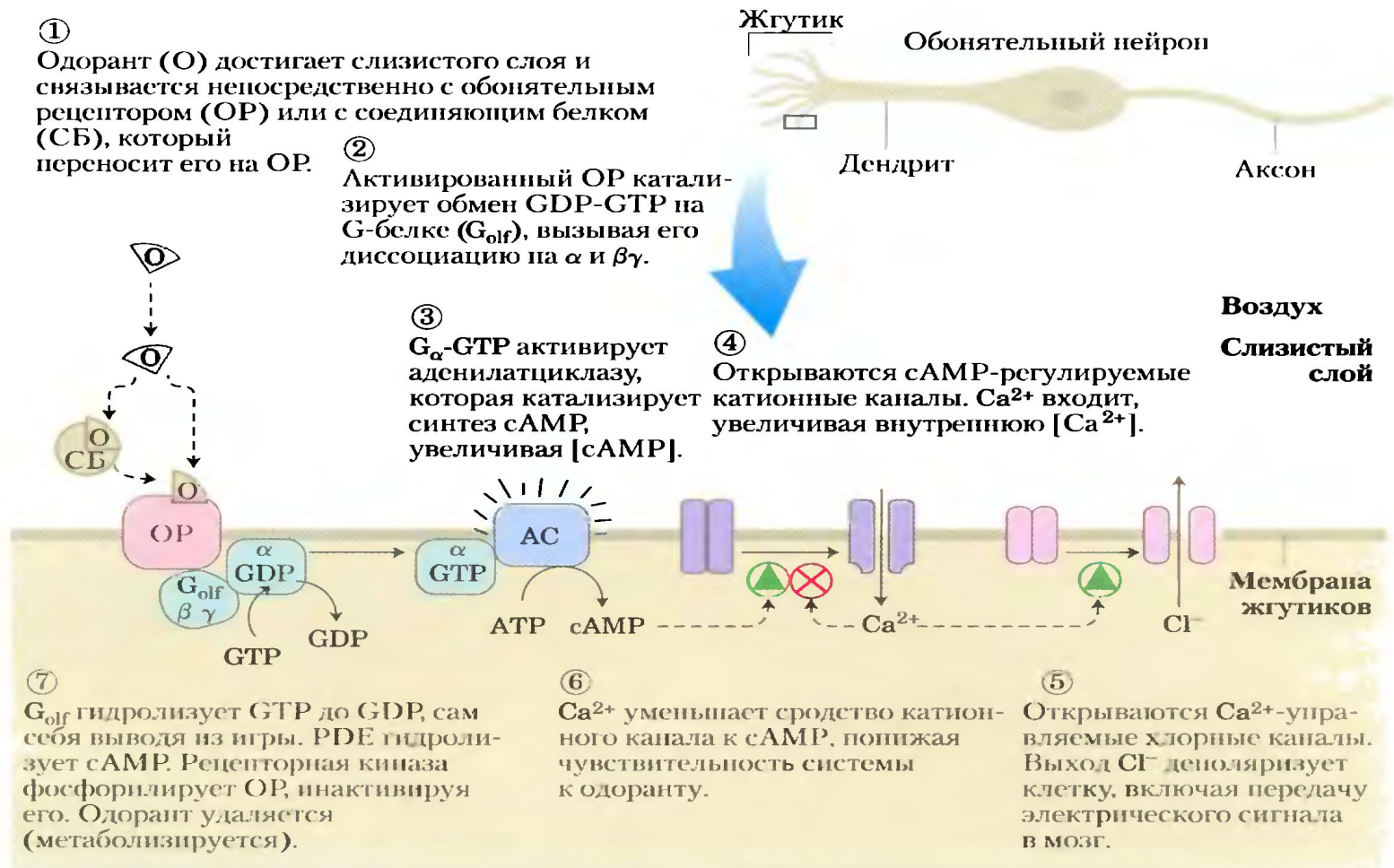


Рис. 12-40. Молекулярный уровень восприятия запахов. Эти взаимодействия происходят в жгутиках обонятельных рецепторных клеток.

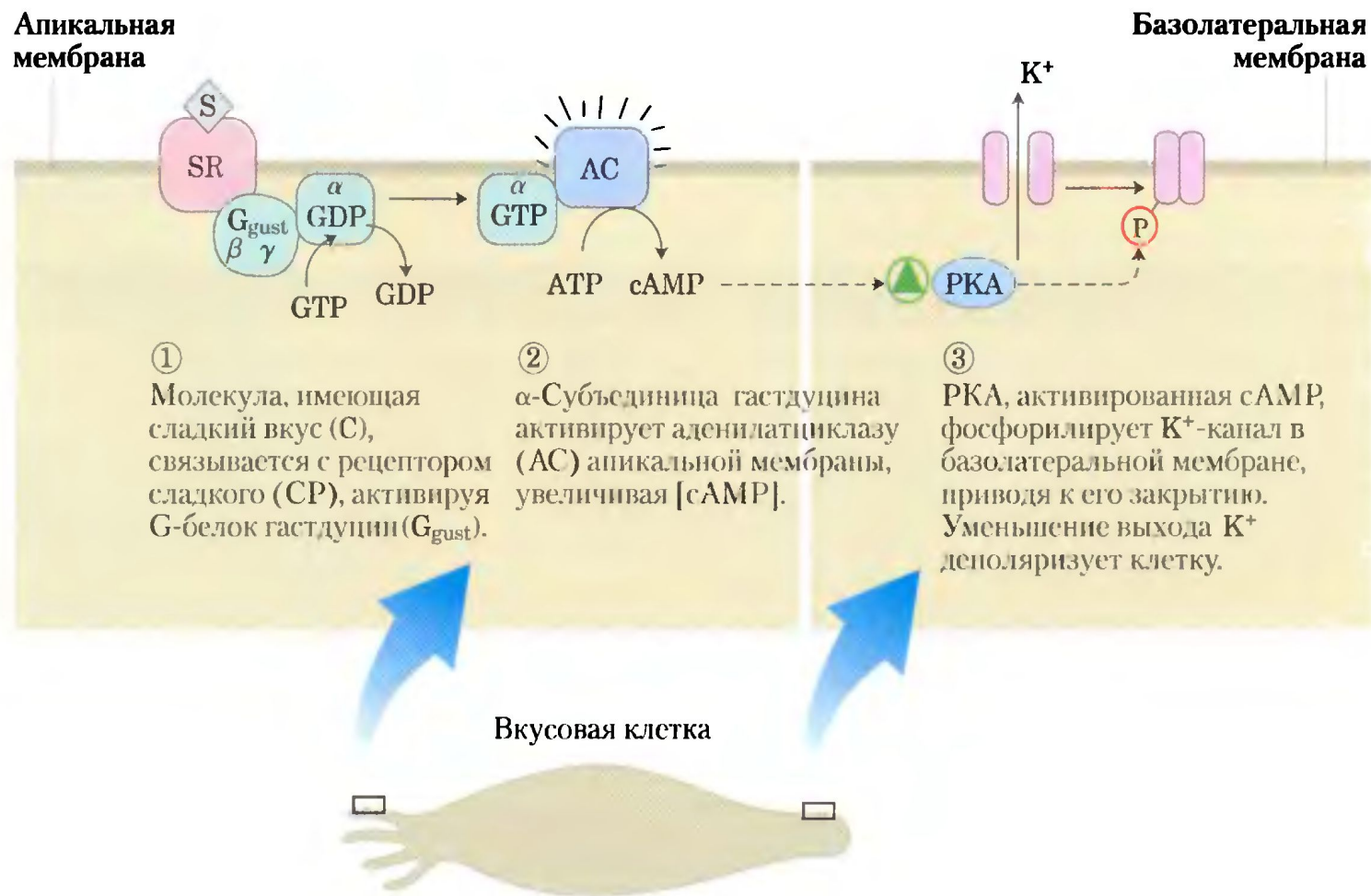
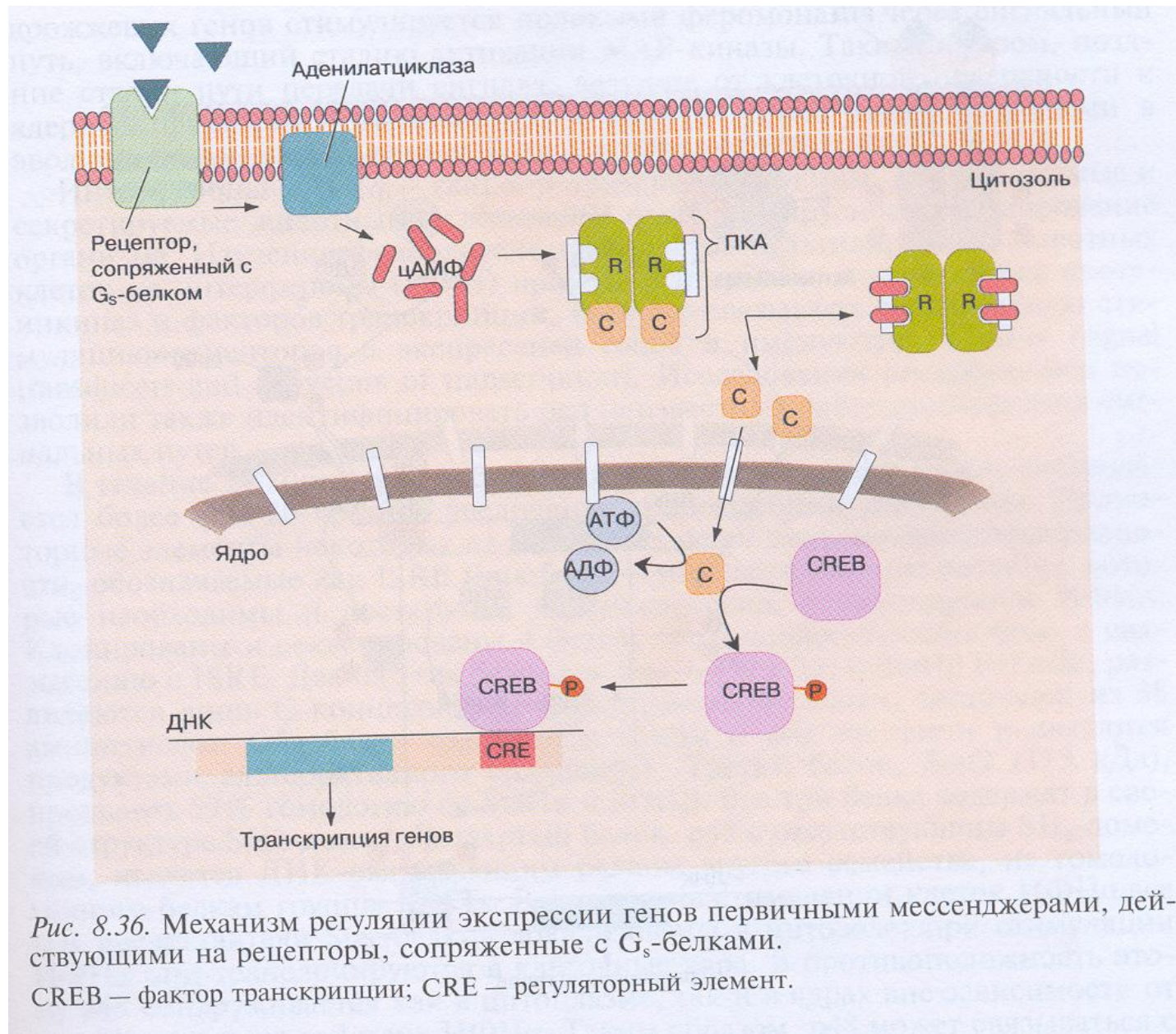


Рис. 12-41. Механизм передачи вкусового сигнала от сладких веществ.



Образование вторичного посредника цГМФ катализируется **гуанилатциклазами**

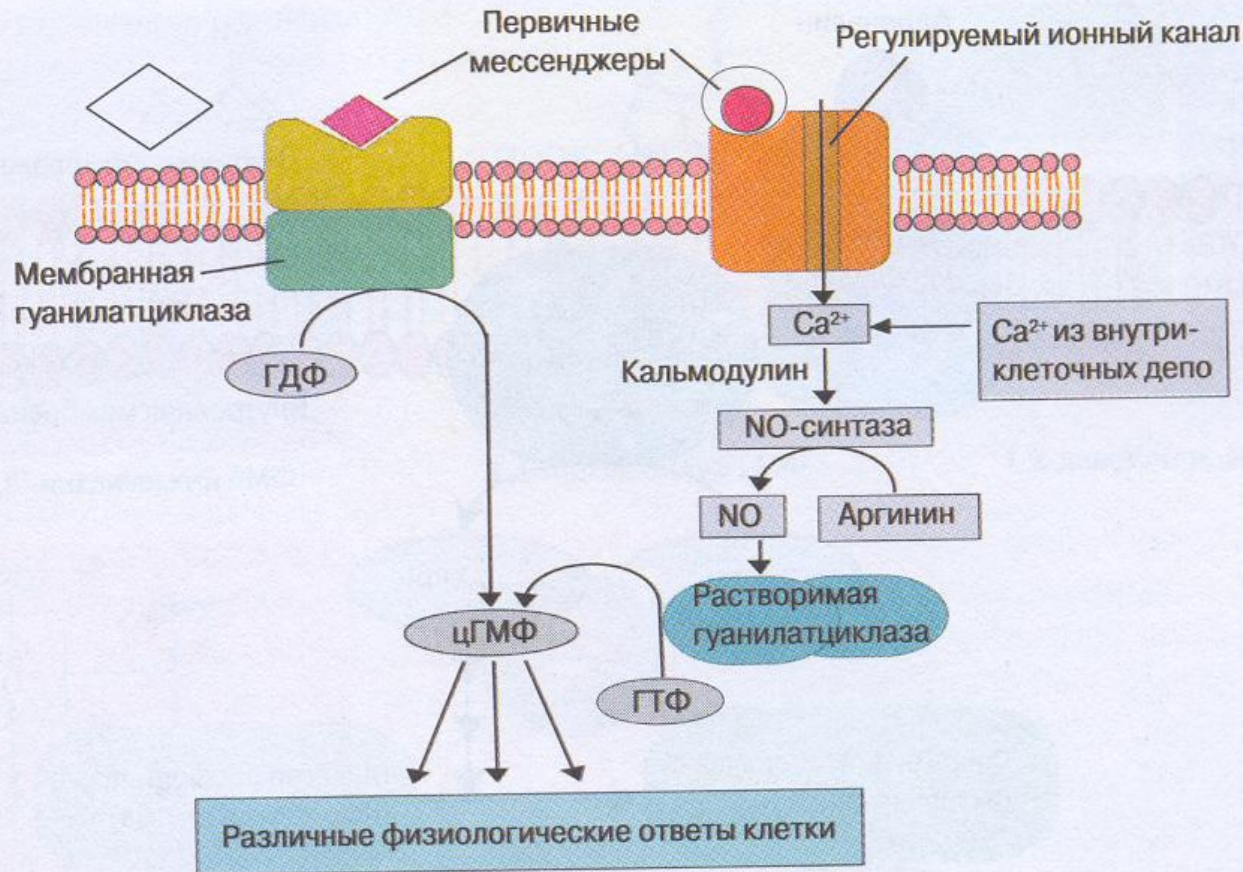
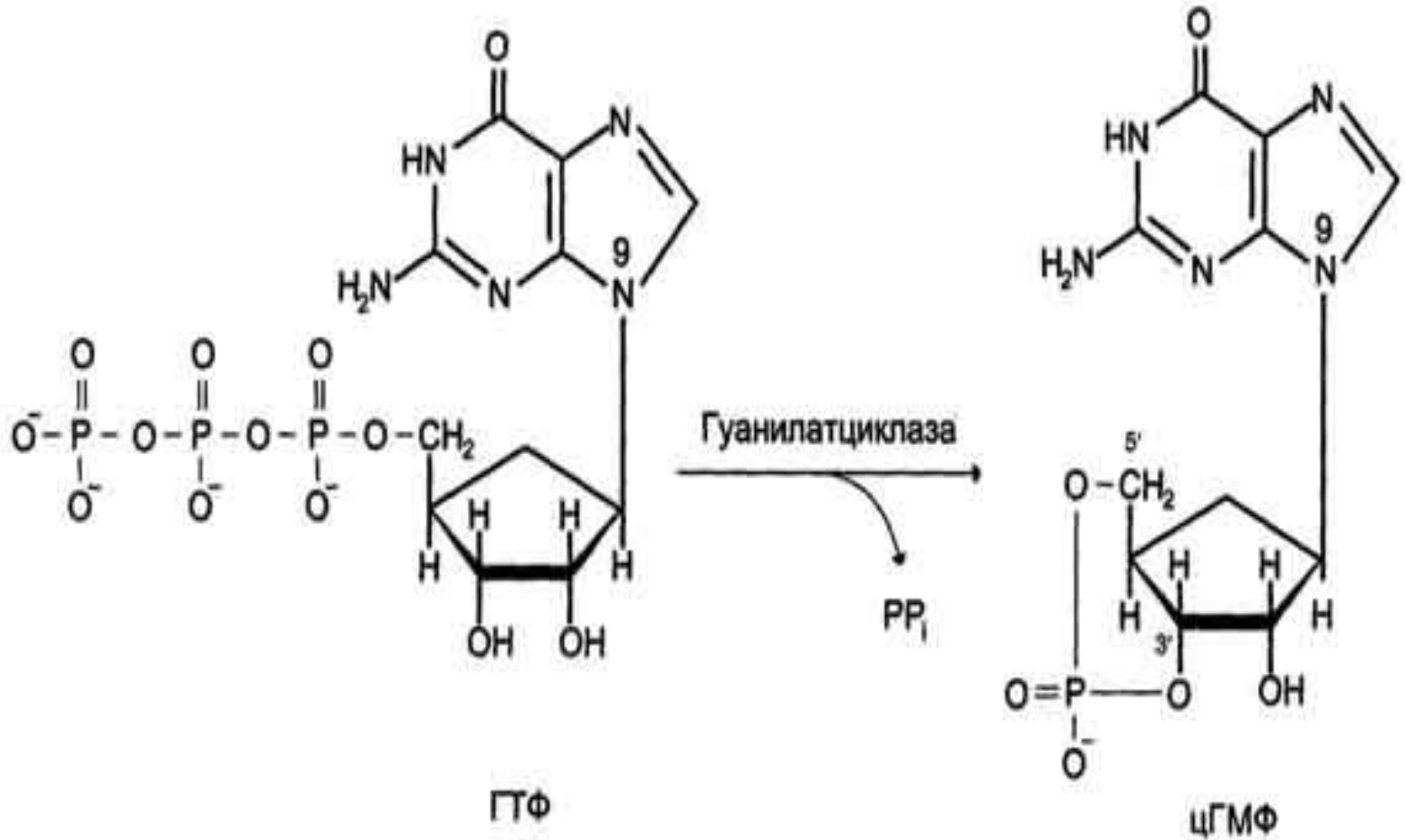


Рис. 8.16. Схематическая иллюстрация механизмов активации двух форм гуанилатциклазы первичными мессенджерами.

Образование цГМФ



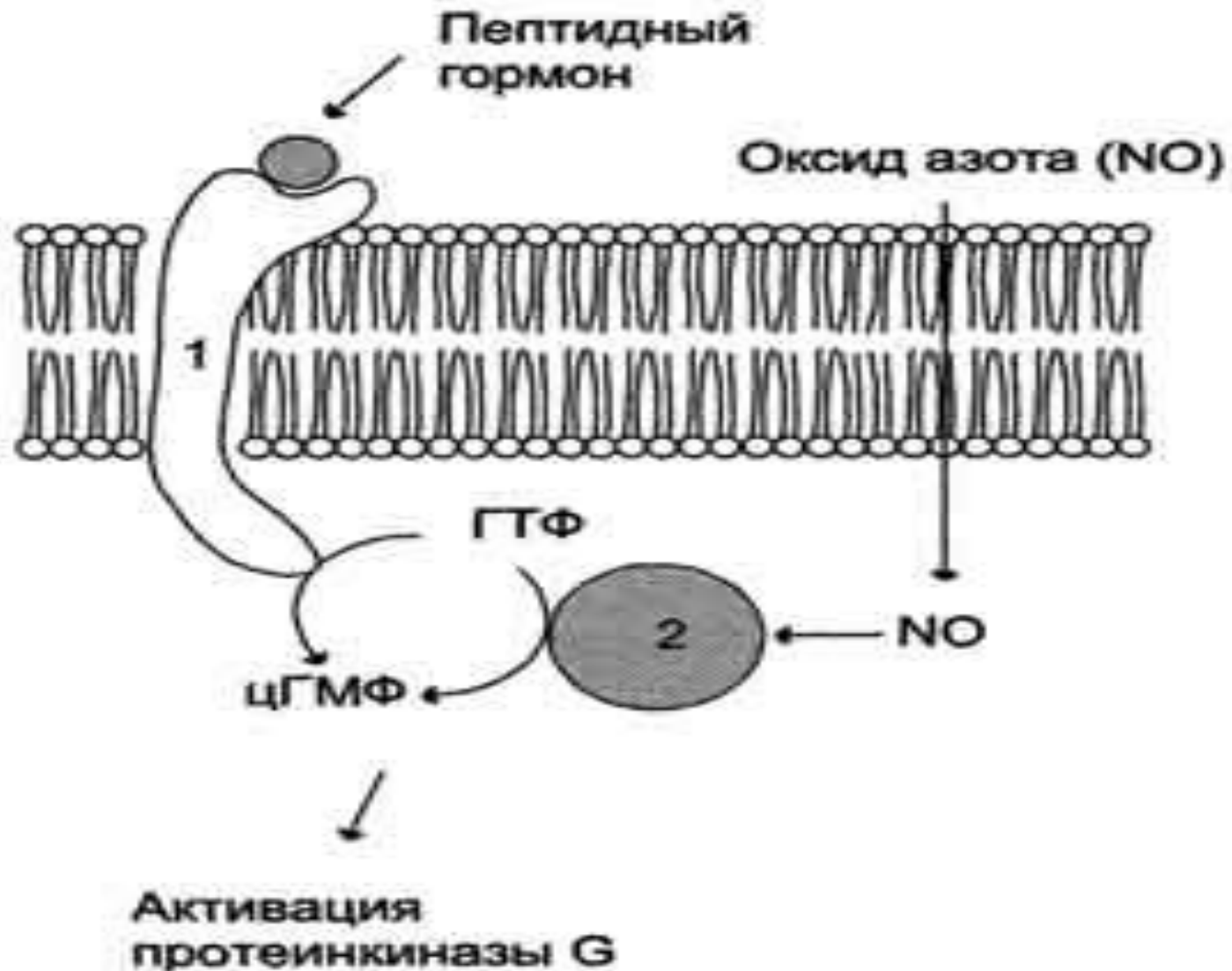
Гуанилатциклазы (ГЦ)

1. ГЦ катализирует образование вторичного посредника цГМФ из ГТФ.
2. В клетке имеется 2 формы ГЦ – мембраносвязанная (мГЦ) и растворимая (рГЦ).
3. Соотношение форм ГЦ в тканях разное: в клетках кишечника – 90% мГЦ, в легких и печени – 20% мГЦ.
4. рГЦ - димер ($\alpha + \beta$ -сб.), простетическая группа – гем, активируется NO и АФК.
5. мГЦ – трансмембранный гликопротеин, относится к рецепторам, сопряженным с ферментативной активностью. Различают 3 изоформы мГЦ, которые активируются различными регуляторами: **предсердным натрийуретическим фактором, натрийуретическим пептидом мозга, кишечным пептидом гуанилином.**
6. В клетках выявлено 3 типа эффекторных белков, с которыми взаимодействует цГМФ: цГМФ-зависимая ПК (ПКГ), цГМФ-регулируемые ионные каналы, цГМФ-зависимая фосфодиэстераза.

Механизм действия цГМФ

Молекулярные мишени для цГМФ	Тип клеточного ответа	Примеры
Ионные каналы	Изменение проницаемости	Фоторецепторы: открываются катионные каналы Почки: ингибируется Na-канал
цГМФ-зависимые протеинкиназы	Фосфорилирование	Гладкомышечные клетки: [Ca] Тромбоциты: [Ca]
цГМФ-активируемая фосфодиэстераза	Снижение [цАМФ]	Сердце: уменьшается поток ионов Ca Гиппокамп: уменьшается поток ионов Ca (формирование памяти)
цГМФ-ингибируемая фосфодиэстераза	Увеличение [цАМФ]	Гладкомышечные клетки: [Ca] Тромбоциты: [Ca]

Регуляция активности мембранной и цитозольной ГЦ



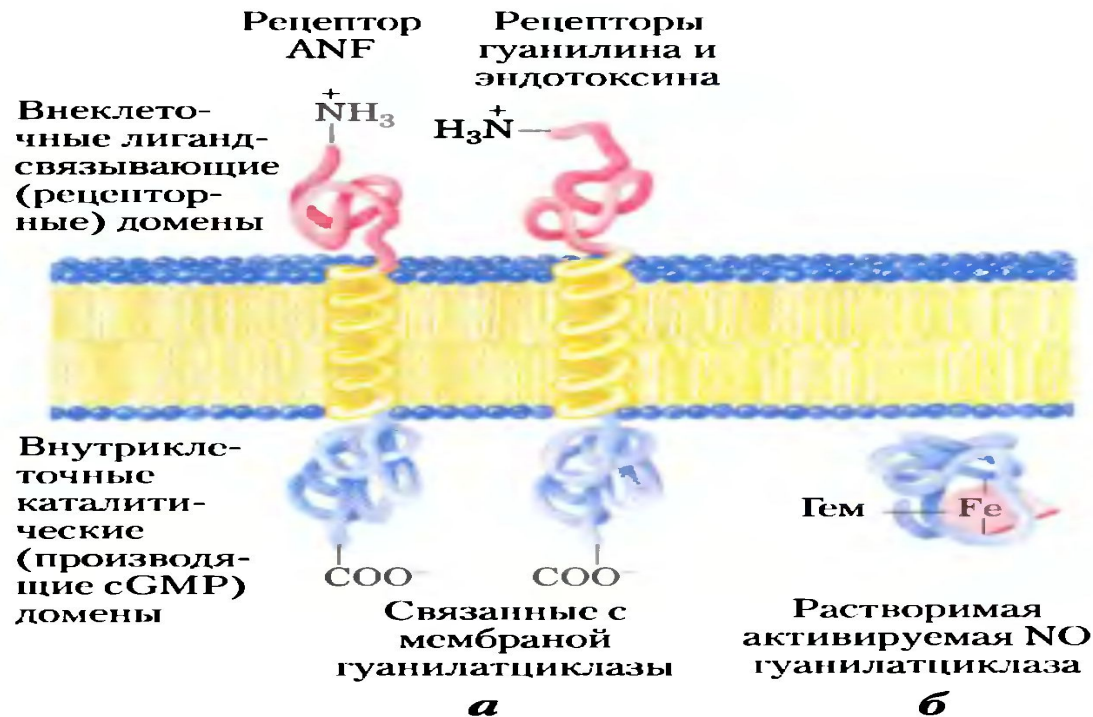
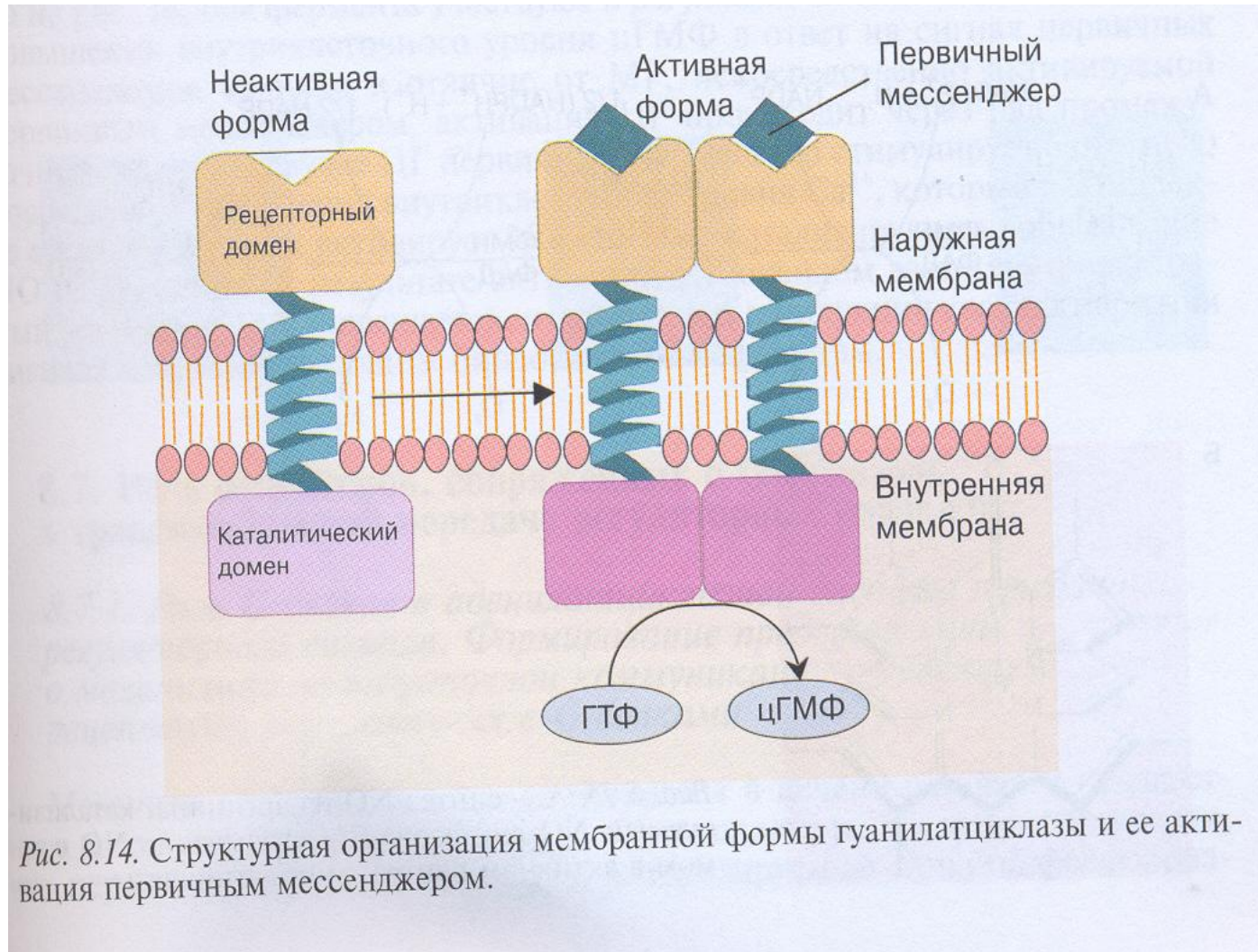


Рис. 12-20. Два изофермента гуанилатциклазы, участвующие в передаче сигнала. а) Один изофермент существует в двух похожих пронизывающих мембрану формах, активирующихся внеклеточными лигандами: атриальным натрийуретическим фактором (ANF) (рецепторы в клетках собирательных трубочек почек и гладкой мускулатуры кровеносных сосудов) и гуанилином (рецепторы в клетках эпителия кишечника). Рецептор гуанилина является также мишенью одного из видов бактериального эндотоксина, который вызывает сильную диарею. **б)** Другой изофермент растворим и активируется внутриклеточным монооксидом азота (NO); эта форма находится во многих тканях, в том числе в гладкой мускулатуре сердца и кровеносных сосудов.

Структура мембранной гуанилатциклазы



Структура растворимой ГЦ

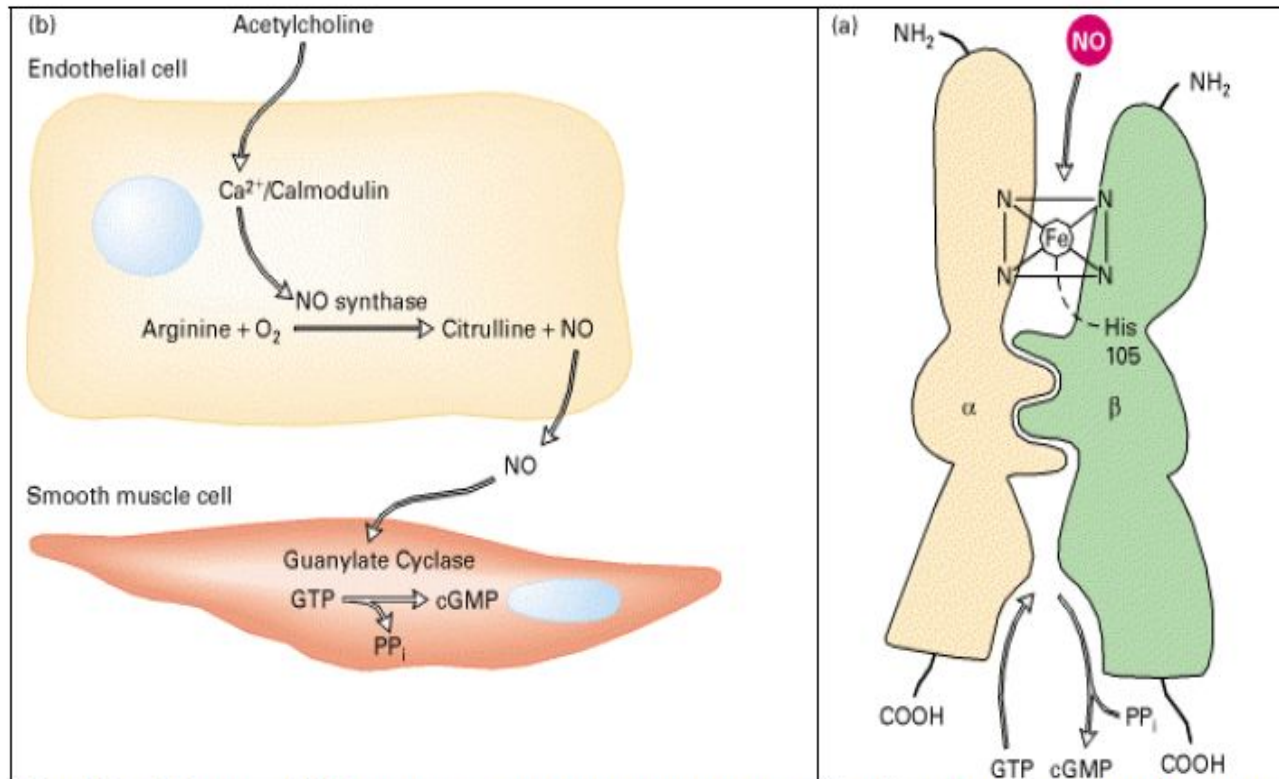
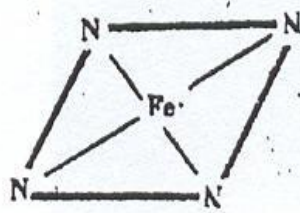


Рис.5.8. NO и cGMP-зависимая передача сигнала. (а) Схематическое изображение структуры растворимой гуанилатциклазы. Связывание NO с гемовой группой стимулирует ферментативную активность, приводя к преобразованию GTP в cGMP. (б) Синтезированный в клетках эндотелия NO дифундирует в соседние гладкомышечные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

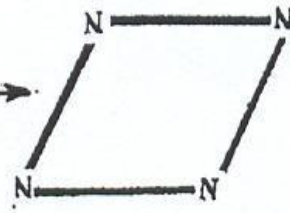
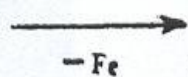
Схема активации растворимой гуанилатциклазы оксидом азота

ФЕРРО-ПРОТОПОРФИРИН 1X

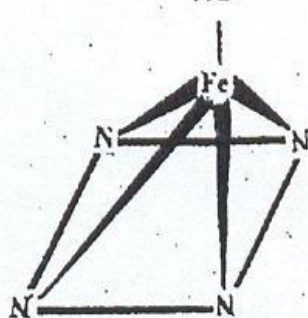
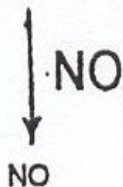
ПРОТОПОРФИРИН 1X



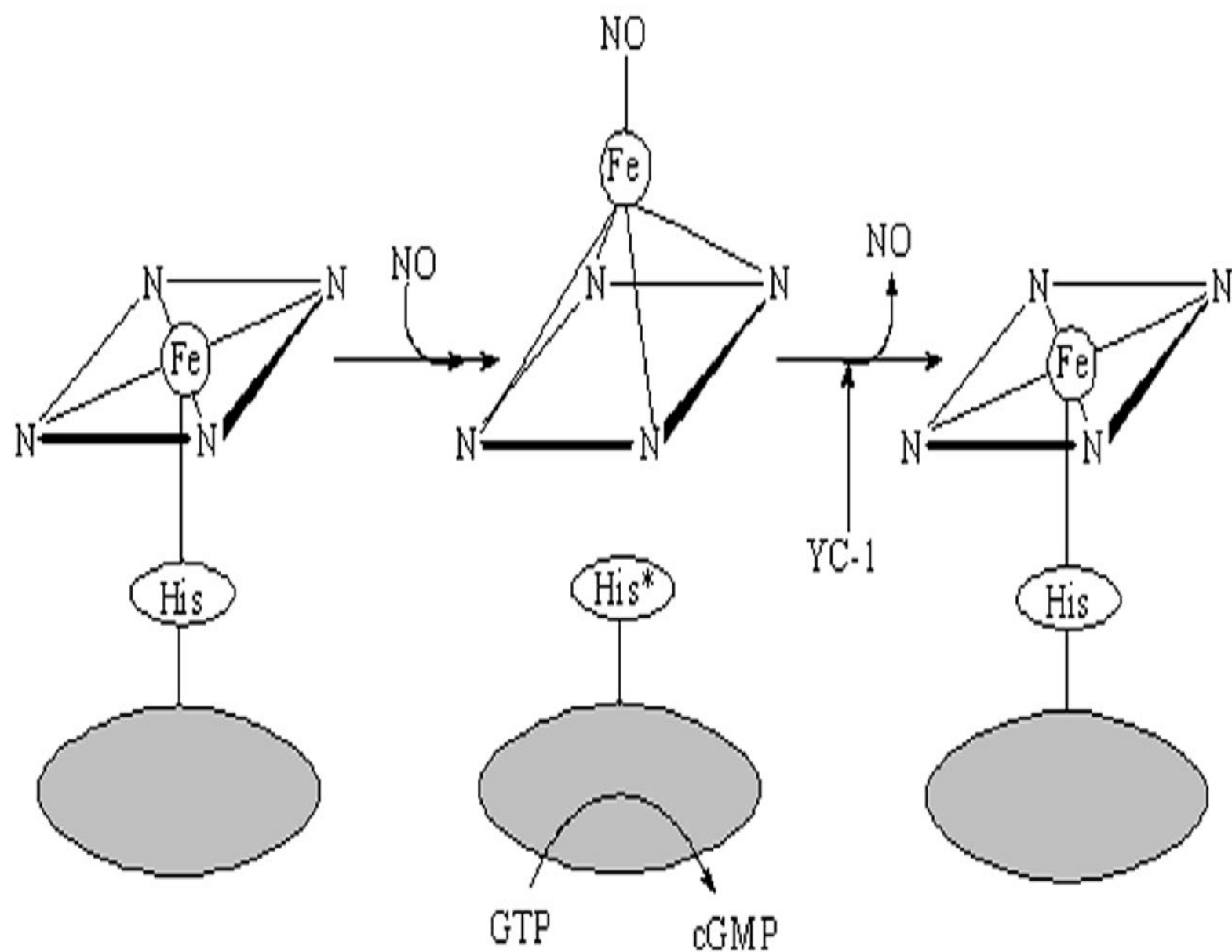
НЕАКТИВИРОВАННАЯ



АКТИВИРОВАННАЯ



АКТИВИРОВАННАЯ



Активации растворимой гуанилатциклазы оксидом азота (NO)

1. В неактивированном состоянии гем гуанилатциклазы связан координационно с четырьмя атомами азота центрального кольца гема, а также образует пятую координационную связь с His-105 β -субъединицы.
2. Взаимодействие с NO приводит к образованию неустойчивого шести координационного гистидин-гем-NO промежуточного продукта. При этом атом железа гема выступает из плоскости порфиринового кольца и разрывается связь между His-105 и железом гема. Образуется **пятикоординационный нитрозил-гемовый комплекс** — истинный активатор растворимой гуанилатциклазы.
3. YC-1 замедляет диссоциацию NO от гуанилатциклазы и повышает чувствительность фермента к активации оксидом азота.
YC-1 (3-(5'-оксиметил-2'-фурил)-1-бензилиндазол), который является не только NO-независимым активатором фермента, но и усиливает активацию фермента донорами оксида азота.

NO и цГМФ-зависимые сигнальные пути

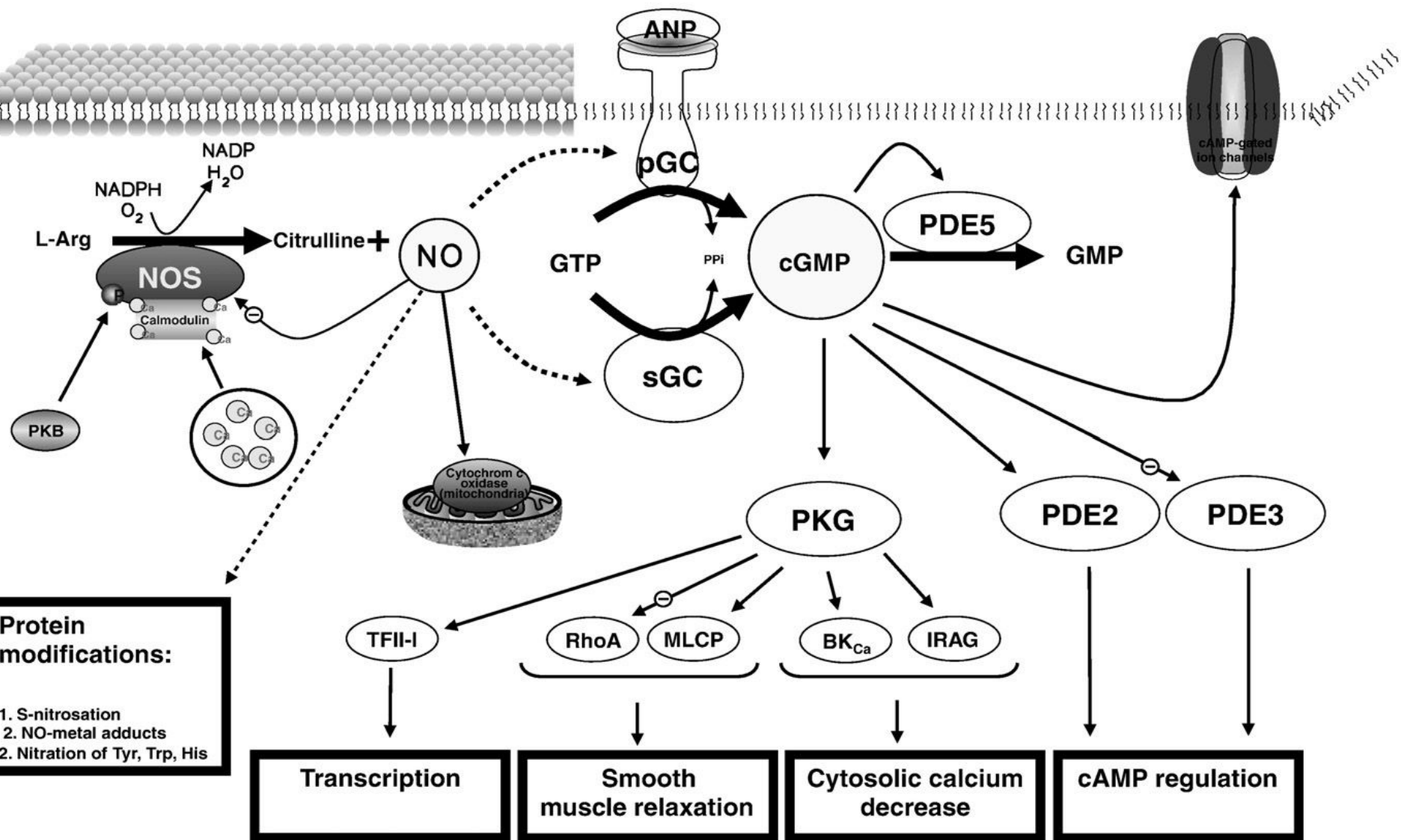
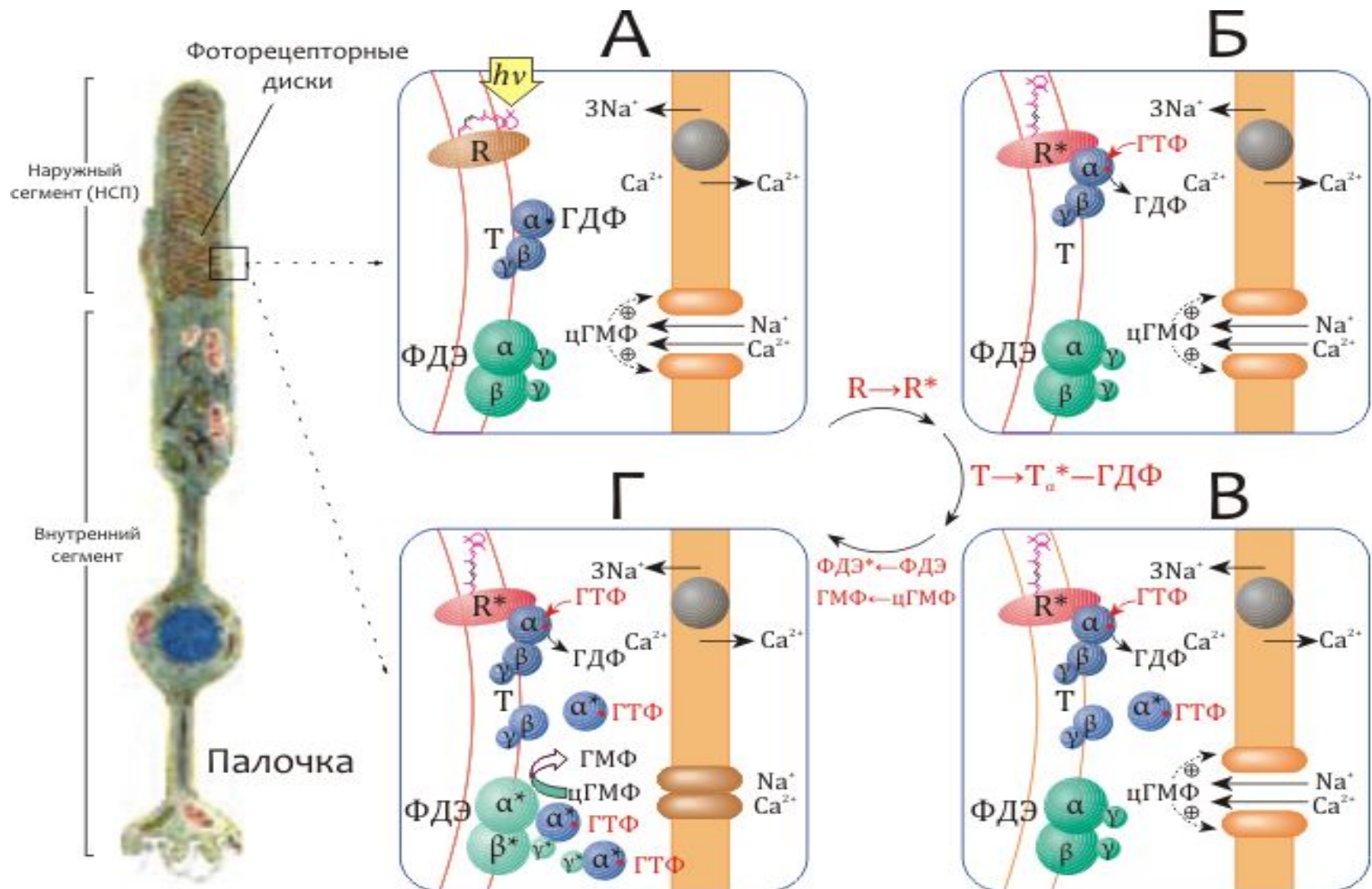


Схема активации зрительного каскада и регуляция цГМФ-активируемых натриевых каналов



цГМФ и гуанилатциклазы (Нельсон, Кокс, 2011)

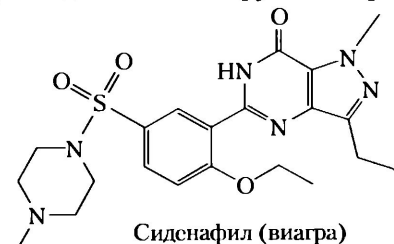
В разных тканях циклический GMP переносит разную информацию. В почках и кишечнике он индуцирует изменения ионного транспорта и удержание воды; в сердечной мышце (тип гладкой мускулатуры) он передает сигнал о расслаблении; в мозге он может принимать участие как в развитии, так и в работе взрослого мозга. Гуанилатциклаза в почках активируется гормоном **атриальным натрийуретическим фактором (ANF, от англ. atrial natriuretic factor)**, который высвобождается в предсердии, когда сердце увеличивается при увеличении объема крови. Переносимый кровью в почки ANF активирует гуанилатциклазу в клетках собирательных трубочек (рис. 12-20, а). В результате увеличивается концентрация сGMP, что стимулирует усиленное выведение почками Na^+ и, следовательно, воды, обусловленное изменением осмотического давления. Потеря воды уменьшает объем крови, противодействуя стимулу, который вначале привел к секреции ANF. В гладкой мускулатуре сосудов также расположена ANF-рецепторная гуанилатциклаза; при связывании со своим рецептором ANF вызывает расслабление (вазодилатацию) кровеносного сосуда, что увеличивает ток крови при уменьшении кровяного давления.

Похожая рецепторная гуанилатциклаза плазматической мембране клеток эпителия кишечника активируется кишечным пептидом **гуанилином** (рис. 12-20, а), который регулирует секрецию Cl^- в кишечнике. Этот рецептор является также мишенью устойчивого к нагреванию пептидного эндотоксина, вырабатываемого *Escherichia coli* и другими грамотрицательными бактериями. Увеличение концентрации сGMP, вызванное действием эндотоксина, увеличивает секрецию Cl^- и, как следствие, уменьшает реабсорбцию воды кишеч-

Молекула NO сравнительно слабо поляризована, поэтому она может проникать сквозь плазматическую мембрану без помощи переносчика. В клетках-мишенях NO связывается с гемовой группой гуанилатциклазы и стимулирует образование сGMP. В сердце сGMP снижает силу сокращений путем стимуляции ионных насосов, удаляющих Ca^{2+} из цитозоля.

■ Вызванная NO релаксация сердечной мышцы и есть тот самый ответ, который наблюдается при приеме таблеток нитроглицерина или других вазодилаторов для снятия боли при **стенокардии**, когда из-за заблокированных коронарных артерий сердечные сокращения происходят при недостатке кислорода. Монооксид азота нестабилен, и его действие кратковременно: за несколько секунд он окисляется до нитрита или нитрата. Вазодилаторы вызывают длительную релаксацию сердечной мышцы, так как они разлагаются в течение нескольких часов, обеспечивая постоянное поступление NO. Значение нитроглицерина как средства лечения стенокардии было обнаружено в 1860-х гг. по счастливой случайности на предприятиях, производящих нитроглицерин в качестве взрывчатки. Рабочие, страдающие стенокардией, сообщали, что их состояние существенно улучшалось во время рабочей недели, а в выходные дни болезнь возвращалась. Врачи, лечившие этих рабочих, слышали эту историю так часто, что стали искать причинно-следственные связи — так появилось лекарство.

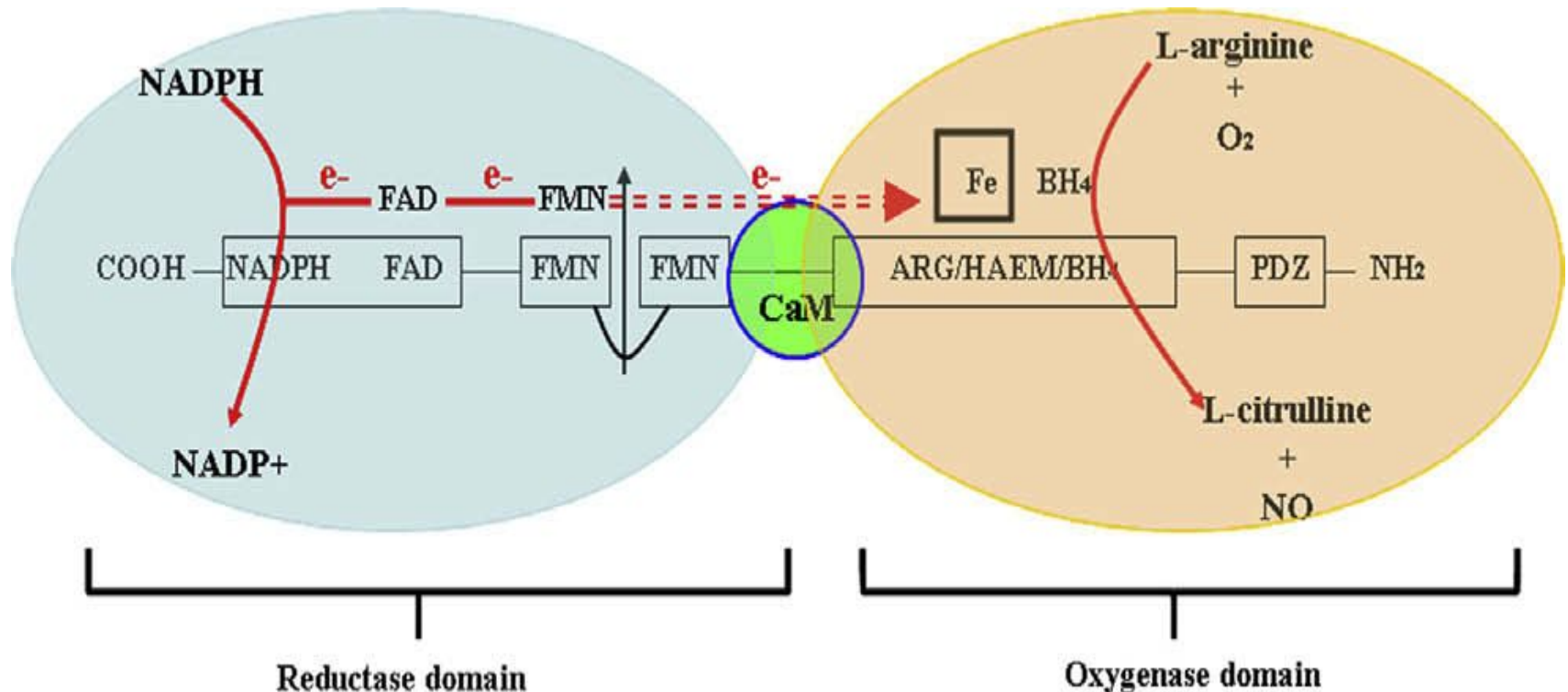
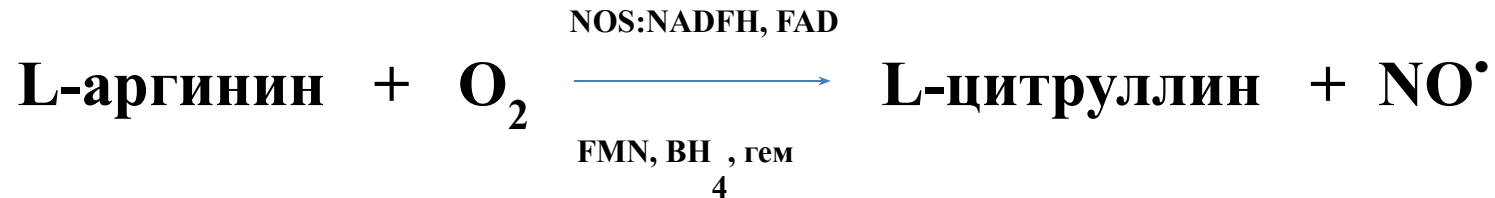
Эффекты, связанные с усиленным синтезом сGMP, уменьшаются после прекращения действия стимула, так как специфическая фосфодиэстераза (сGMP-PDE) превращает сGMP в неактивный 5'-GMP. У человека существует несколько изоформ сGMP-PDE с разным распределением по тканям. Изоформа в кровеносных сосудах пениса ингибируется лекарством силденафилом (виагра), которое таким образом поддерживает повышенный уровень сGMP после однократного действия стимула. Это является причиной применения этого лекарства для лечения нарушений эрекции. ■



Циклический сGMP имеет и второй механизм действия в глазу позвоночных: он вызывает открытие ион-специфических каналов в колбочках и палочках сетчатки. Мы вернемся к этой

NO как вторичный посредник.

Биосинтез оксида азота и структура нейрональной NOS



Строение NO-синтазы

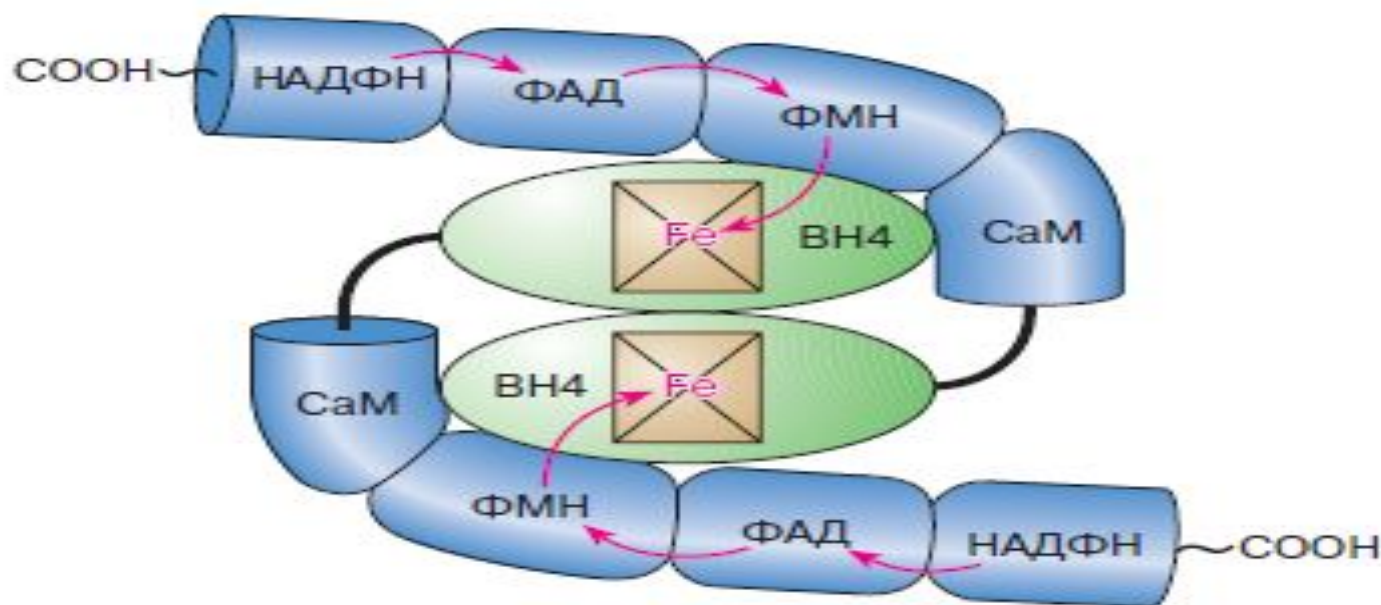


Рис. 1. Схематическое представление строения NO-синтазы. Фермент является димером, состоящим из двух одинаковых белковых молекул, каждая из которых связана с необходимыми для работы фермента кофакторами: НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата, ФАД – флавинадениндинуклеотид, ФМН – флавинмоноклеотид, гемовая группа, содержащая железо (Fe), кальмодулин (CaM) и тетрагидробиоптерин (BH4). Связь между белковыми субъединицами происходит в области их N-конца, где с ними связаны гемовые группы. Стрелками показан перенос электронов

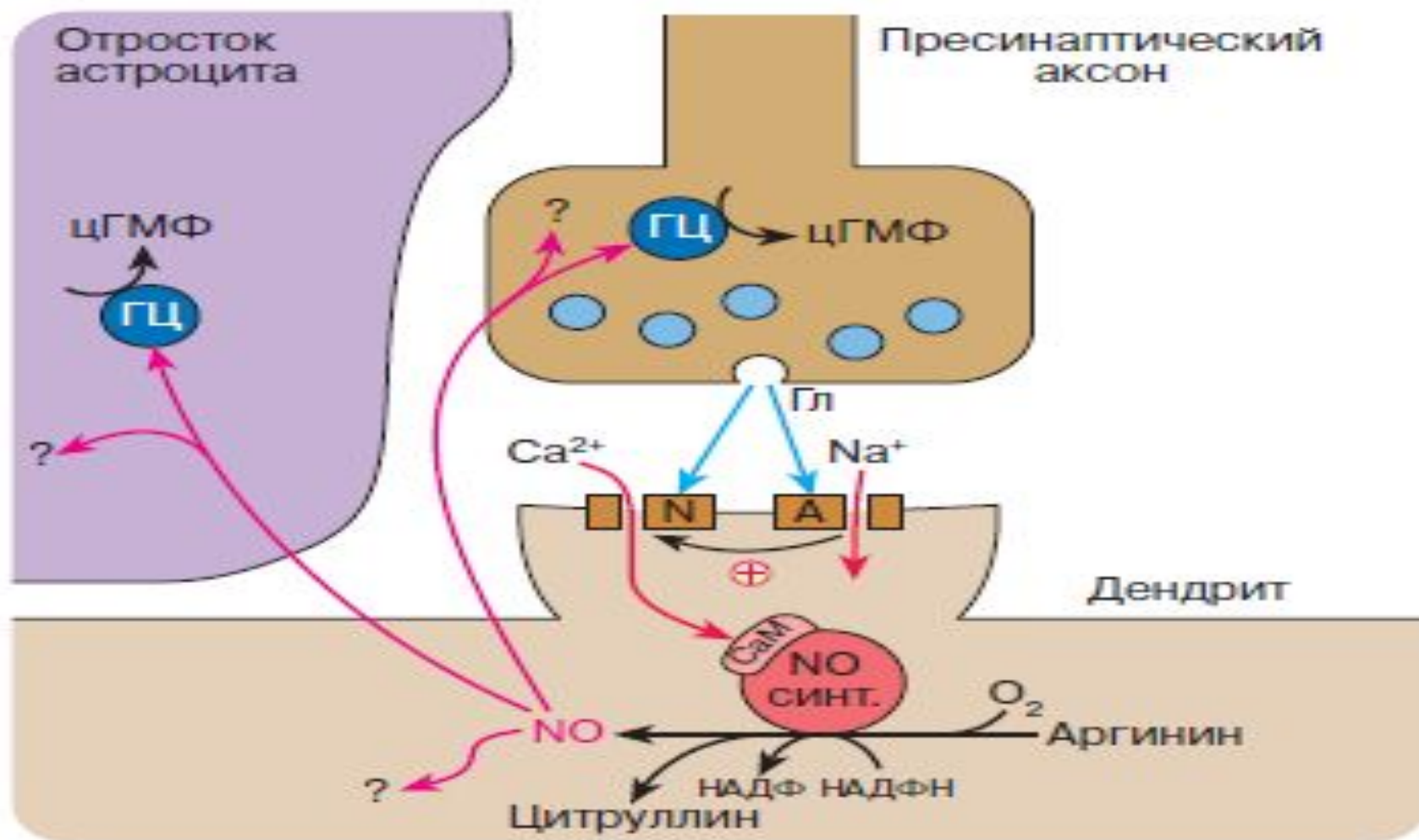
Активность NOS регулируется :

- Фосфорилированием
 - ПКА
 - ПКС
 - Са/кальмодулин-зависимой киназой
- Дефосфорилированием
 - фосфатазой 1
- Диссоциацией димерной формы, мономерная форма NOS приобретает **супероксидсинтетазную** активность (становится прооксидантным ферментом)

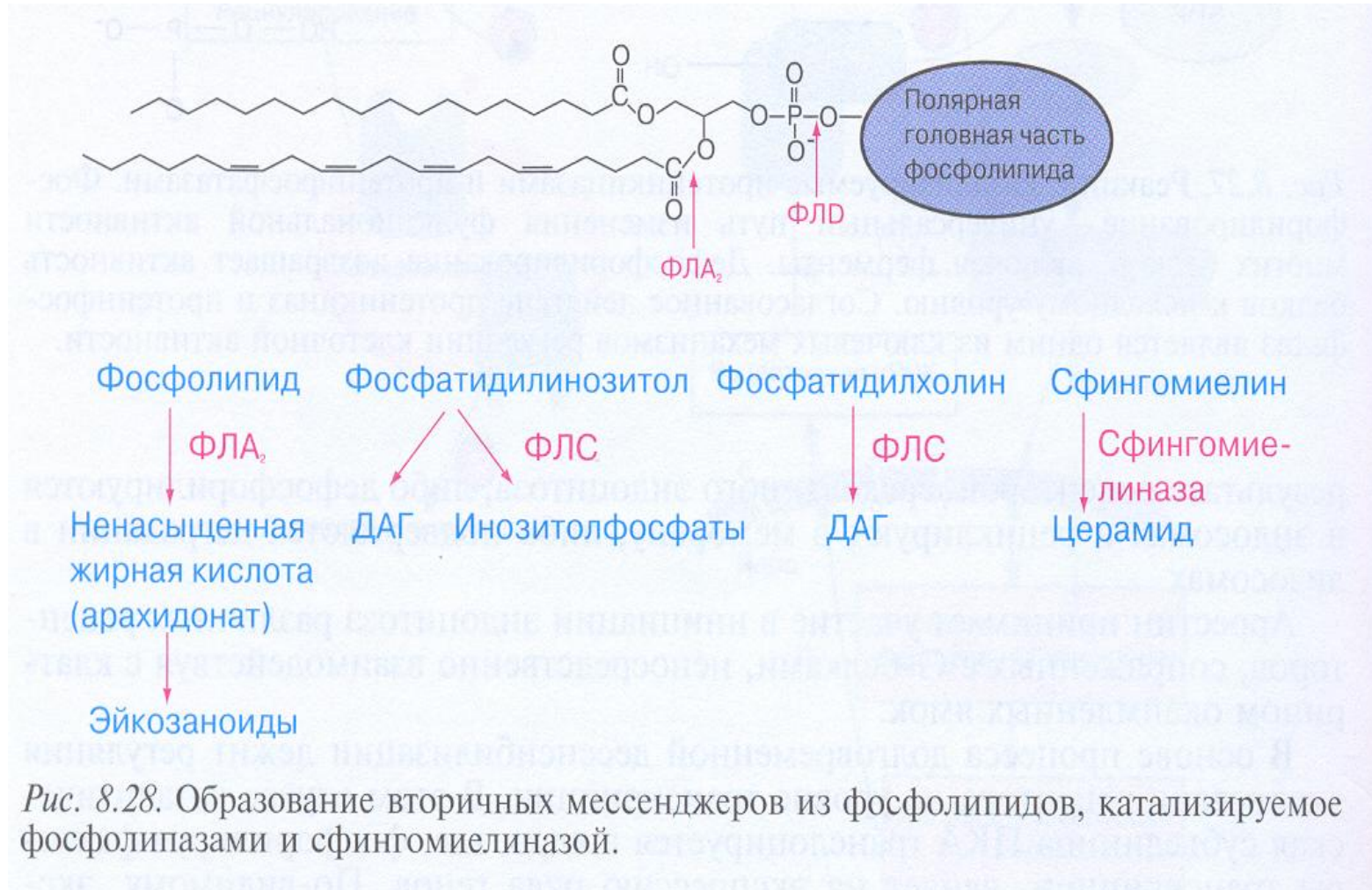
NO запускает различные downstream пути и регулирует:

- вазодилатацию
- нейротрансмиссию
- макрофагальную цитотоксичность
- релаксацию гладкомышечных клеток ЖКТ
- бронходилатацию
- модуляцию ЭТЦ митохондрий
- модуляцию апоптоза
- снижение концентрации цитоплазматического Ca^{2+}
- цАМФ-зависимые процессы

Роль NO в работе возбуждающего нейрона



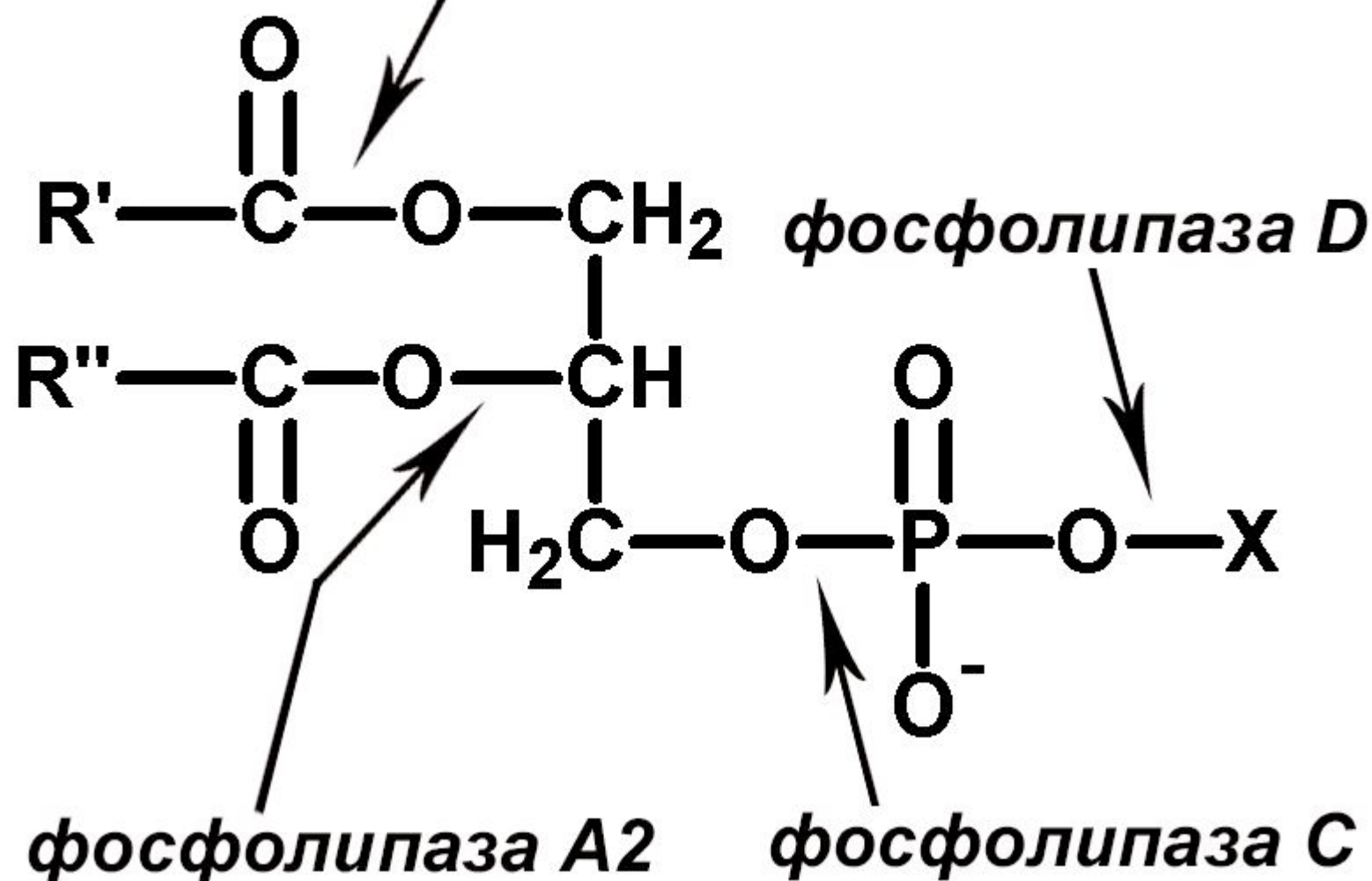
Липидные вторичные посредники образуются путем расщепления эфирных связей фосфолипидов фосфолипазами



Характеристика фосфолипаз (ФЛ)

1. ФЛ - гидролазы, катализирующие катаболизм глицерофосфолипидов. Различают: 1) секреторные ФЛ (панкреатический сок); 2) клеточные ФЛ.
2. Клеточные ФЛ: A_1 , A_2 , C, D, различаются по специфичности к отщепляемой группе, Ca^{2+} -зависимые.
3. ФЛС катализирует расщепление фосфоэфирной связи в глицерофосфолипидах, выделено 10 изоформ, все имеют гидрофобный домен или гидрофобный якорь для ассоциации с мембраной.
4. Многие ФЛ специфичны относительно фосфоинозитолов. При гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата ($ФИФ_2$) образуются продукты диацилглицерол (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфат ($ИФ_3$), служащие вторичными посредниками в трансмембранной передаче сигнала по инозитолфосфатному пути. Субстратом ФЛ может быть фосфатидилхолин.

фосфолипаза A1



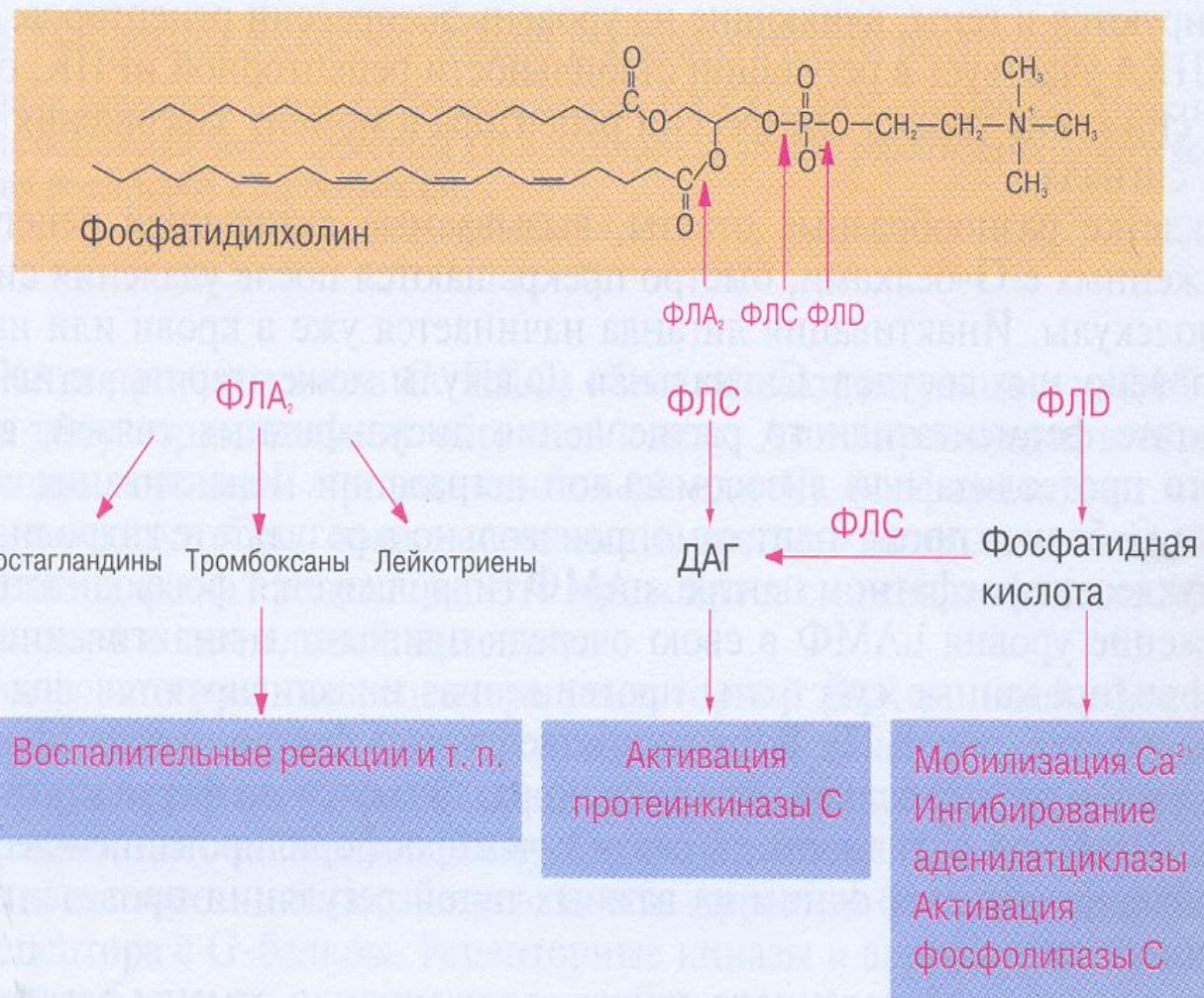


Рис. 8.29. Образование вторичных мессенджеров из фосфатидилхолина под действием фосфолипаз.

Роль фосфолипазы A₂ в синтезе эйкозаноидов

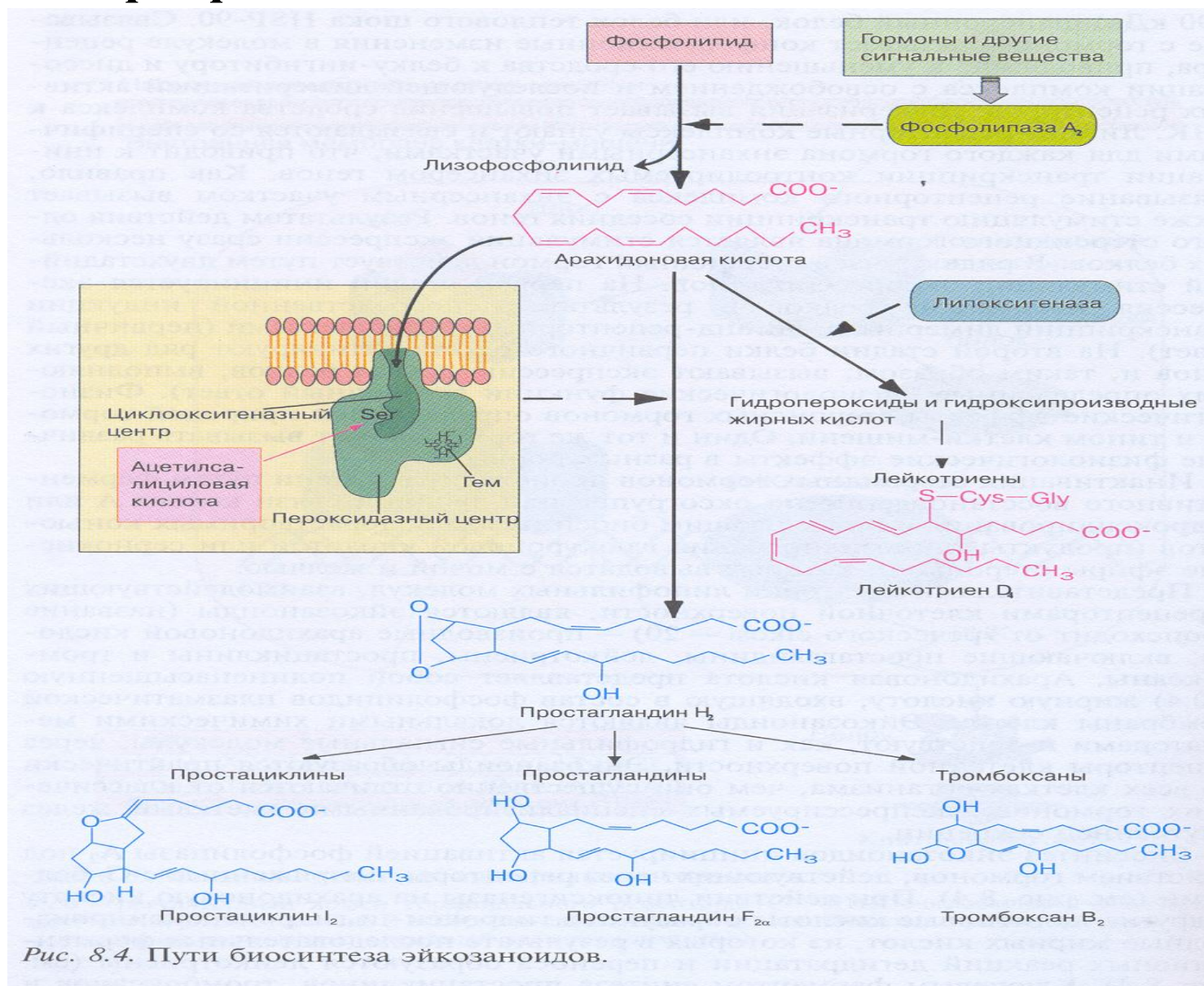
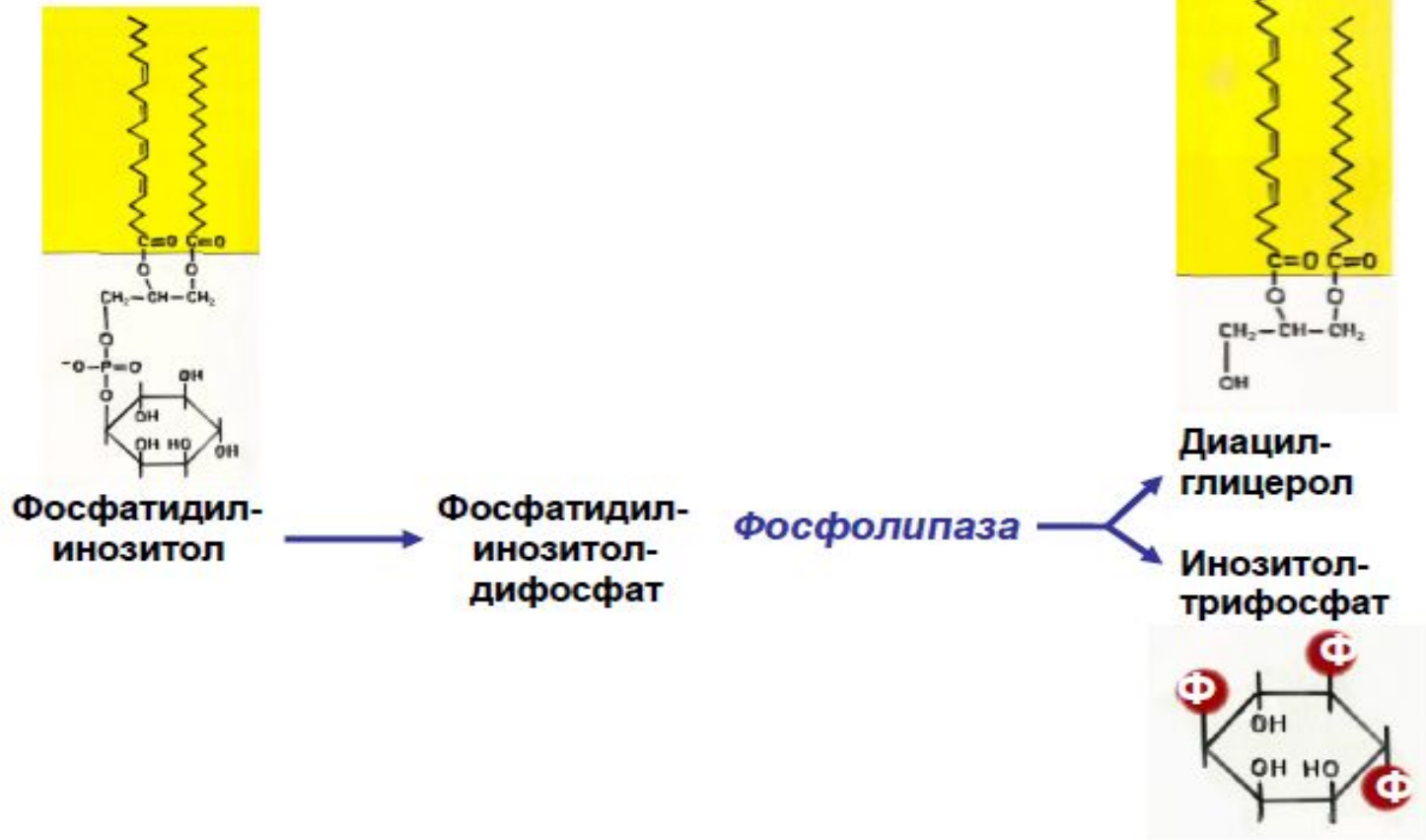


Рис. 8.4. Пути биосинтеза эйкозаноидов.

Мембранные липиды и их производные: инозитол-1,4,5-трифосфат и 1,2-диацилглицерол

Фермент фосфолипаза синтезирует два вторичных посредника: мембранный и цитозольный



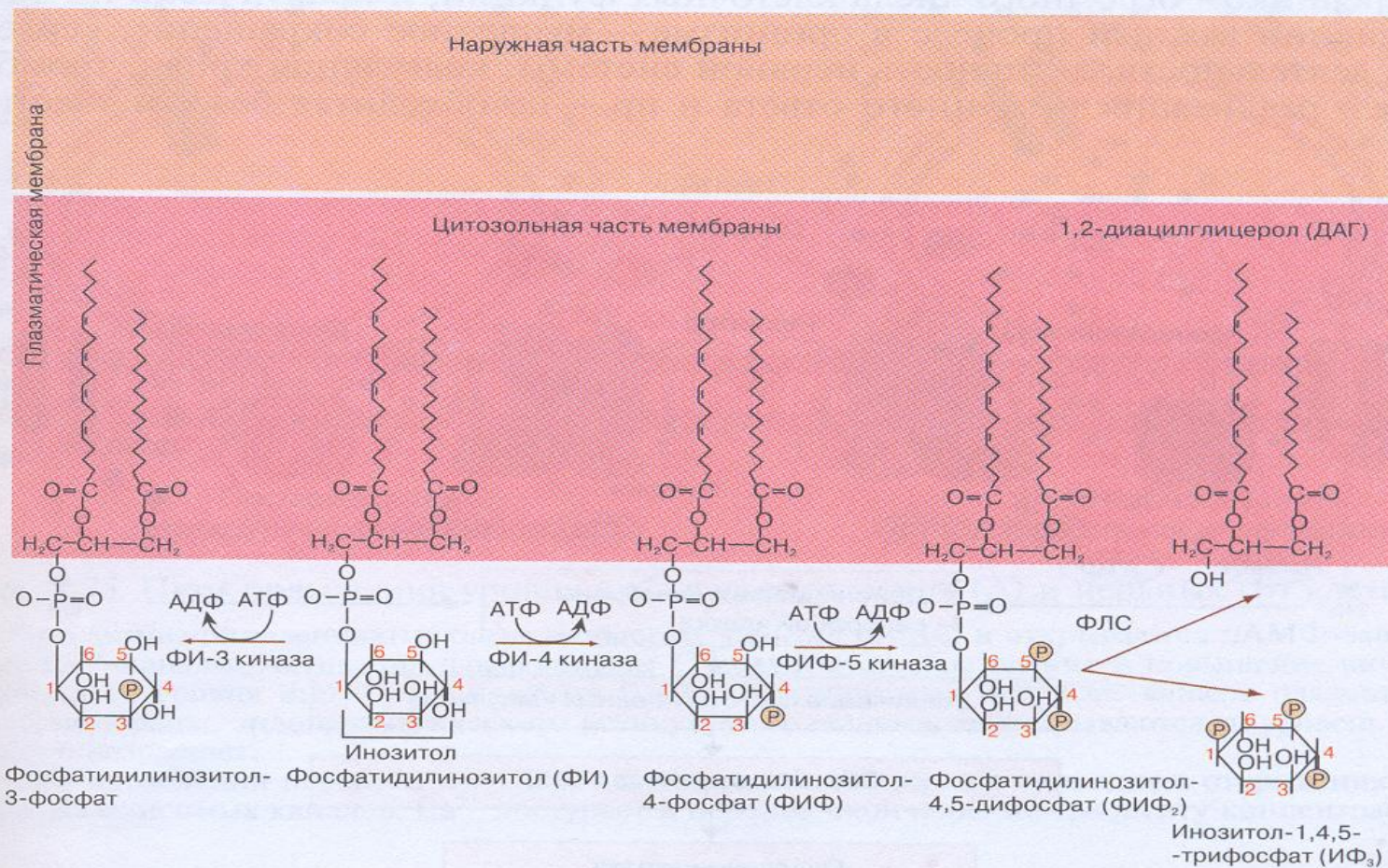


Рис. 8.33. Синтез производных фосфатидилинозитола плазматической мембраны, катализируемый ассоциированными с мембраной киназами. Гидролиз ФИФ_2 , катализируемый ФЛС, приводит к образованию вторичных мессенджеров ДАГ и ИФ₃.

Синтез производных фосфатидилинозитола в плазматической мембране, гидролиз ФИФ2 фосфолипазой С

ФИ-4-киназа → ФИ → ФИ-4-фосфат (ФИФ) → ФИ
-5-киназа → ФИ-4,5-дифосфат (ФИФ2) → ФЛС →
два вторичных посредника (ВП):
→ **диацилглицерол (ДАГ)** (мембранный ВП)
→ **инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ3)** (цитозольный
ВП)

Характеристика фосфолипазы С

1. Известно 3 класса ФЛС: **ФЛС β** , **ФЛС γ** , **ФЛС δ** , которые включают 16 изоформ.
2. **ФЛС β** активируется **G-белками** (αG_q , $\beta\gamma G_i$, G_o); **ФЛС γ** активируется фосфорилированием **рецепторной тирозинпротеинкиназой (РТП)**.
3. **Активация ФЛС γ** : активация РТП $\rightarrow$ димеризация рецептора $\rightarrow$ трансавтофосфорилирование остатков Тир на цитоплазматическом домене рецептора $\rightarrow$ создание «посадочных» мест для ФЛС γ $\rightarrow$ закрепление ФЛ вблизи субстрата, встроенного в плазматическую мембрану.
4. **Структура ФЛС**: каталитический домен, разделенный на две части – X и Y, домены PH, C2, EF-руки. ФЛС δ включает только эти домены.
В ФЛС β имеется длинный C-конец, связывающий ее с мембраной для регуляции αG_q .
В ФЛС γ X и Y компоненты каталитического домена разделены доменами SH2 и SH3.

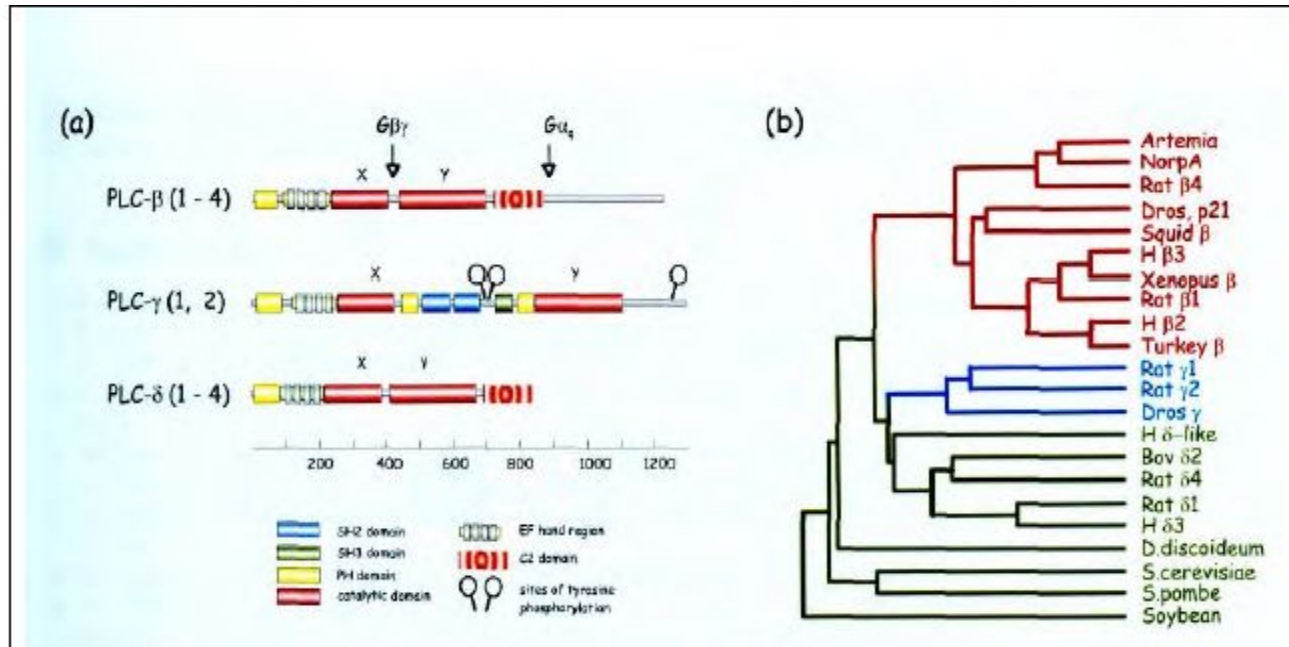
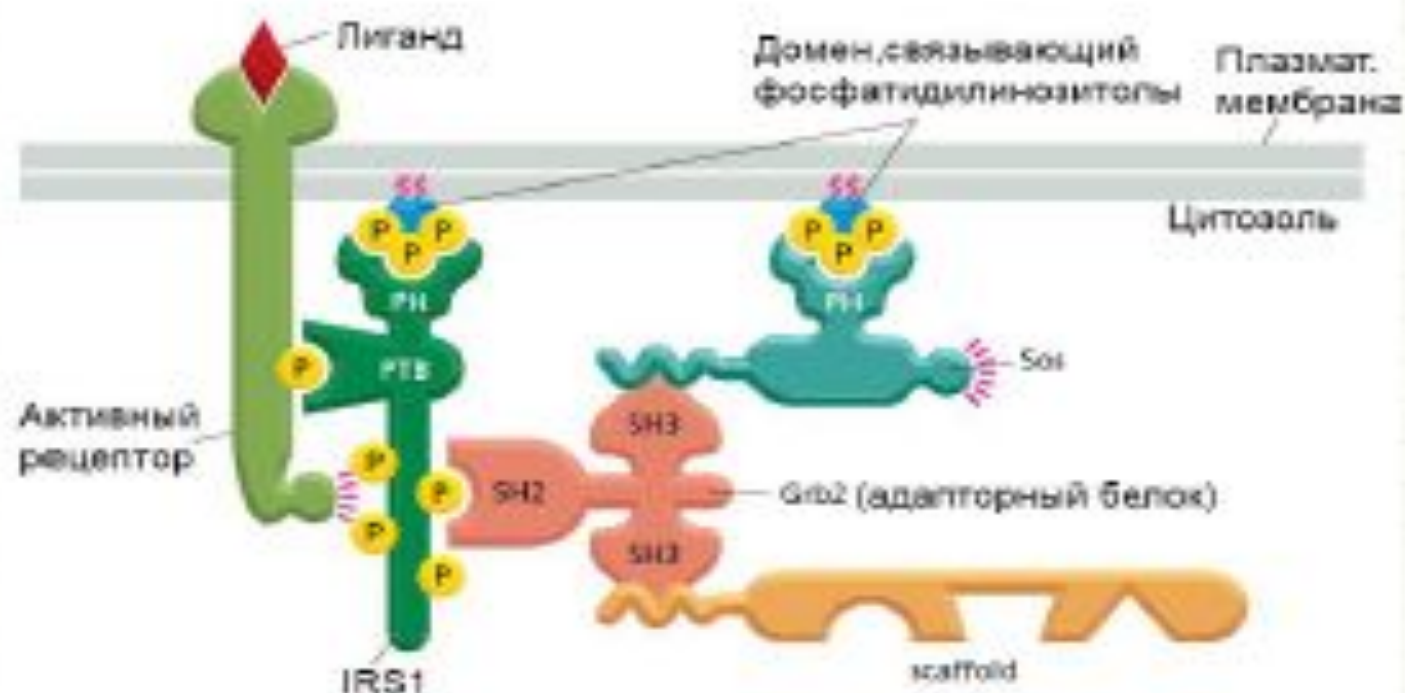


Рис 4.6 Организация доменов в аминокислотной последовательности PLC (PLC): (a) Выделены главные структурные домены. Во всех PLC каталитический домен разделен на две части обозначенные как X и Y. PLC δ имеет самую простую архитектуру и состоит только из доменов PH, C2 и EF-hand, которые присутствуют и 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 тирозиновыми киназами (b)

Специальные домены — инструмент связи между молекулами



SH2 и PTB связывают участки с фосфотирозином
 SH3 и WW связывают участки богатые пролином
 PDZ домен связывается с гидрофобными аминокислотами C-концов
 PH связывается с разными фосфатидилинозитолами
 FYVE домены связывают фосфатидилинозитол 3-фосфат)

Механизм связывания с мембраной и активация ФЛС

1. Начальное **связывание ФЛС с мембраной** происходит через **домен РН** (сродство к фосфатидилинозитолам).
2. Приведение каталитического участка **в контакт с субстратом:**
 - домен C2 $\rightarrow$ ФЛС δ ;
 - домен C2 + αG_q , $\beta\gamma G_i$, $G_o \rightarrow$ ФЛС β
 - домены SH2 (взаимодействие с фосфоТир РТП), домен SH3 (взаимодействие с пролиновыми мотивами РН и каталитического доменов) $\rightarrow$ ФЛС γ

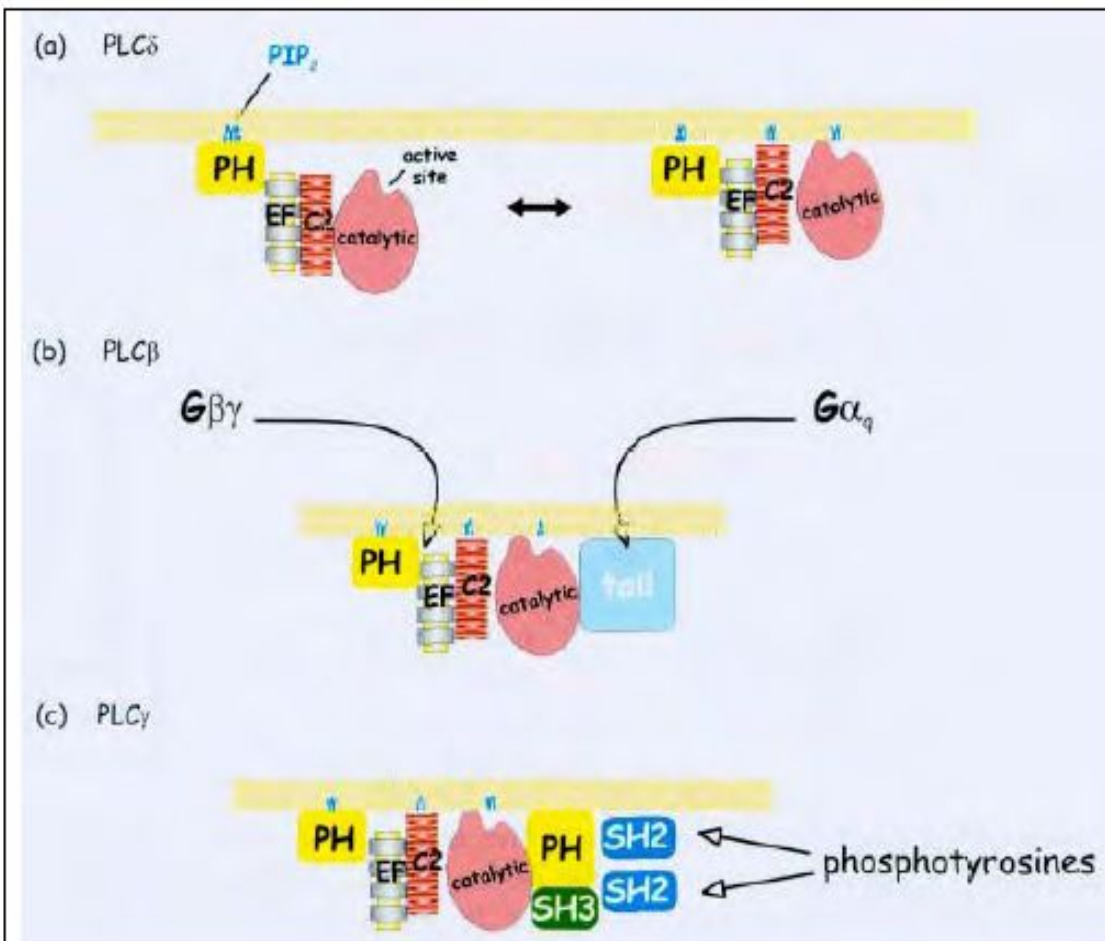


Рис. 4.7 Механизмы связывания с мембраной и активации PLC.

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 дополнительно взаимодействия с субъединицами G $\beta\gamma$ или G α_q , (c) PLC γ взаимодействует с фосфотирозинами рецептора через SH2 домены.

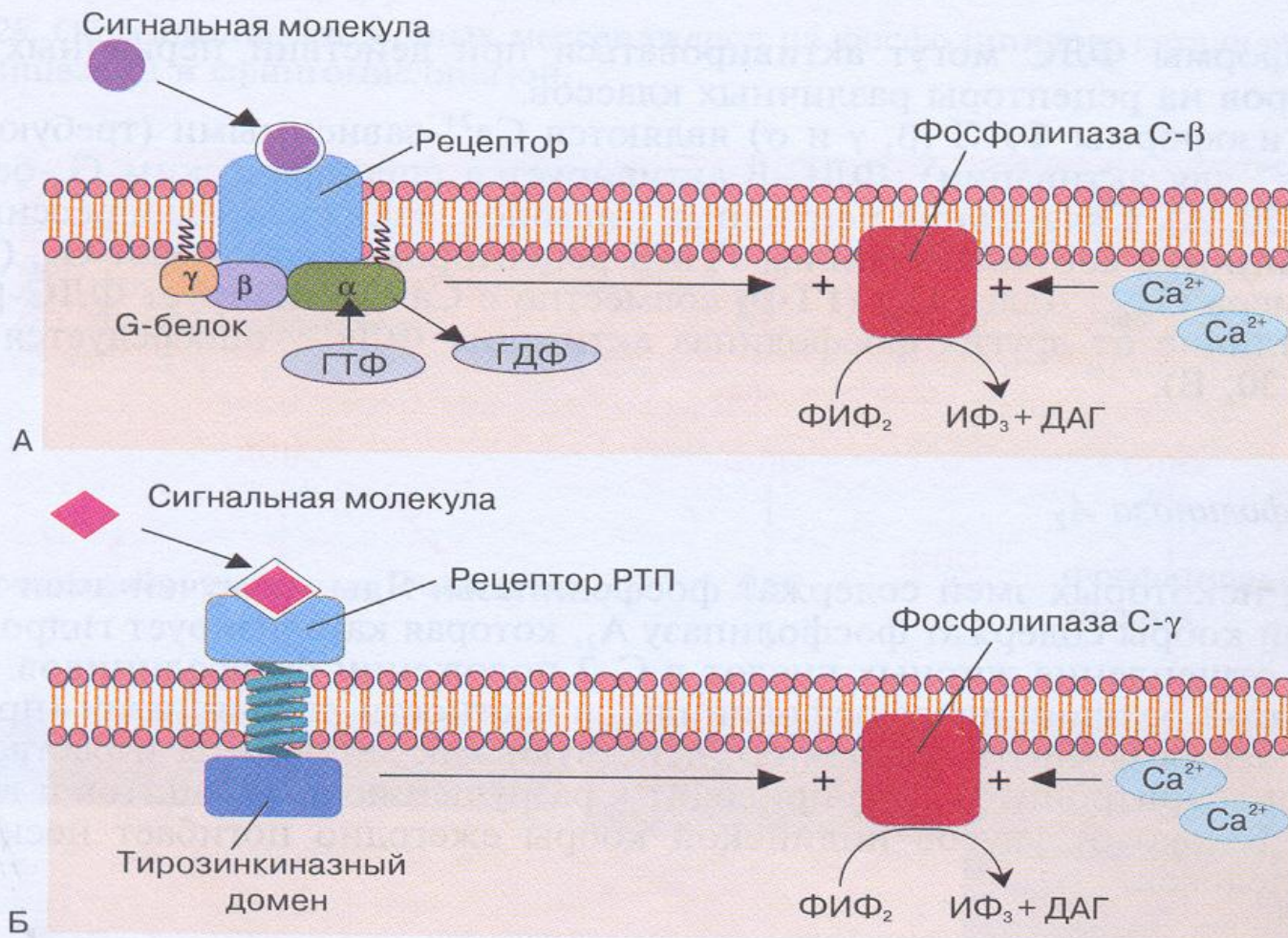
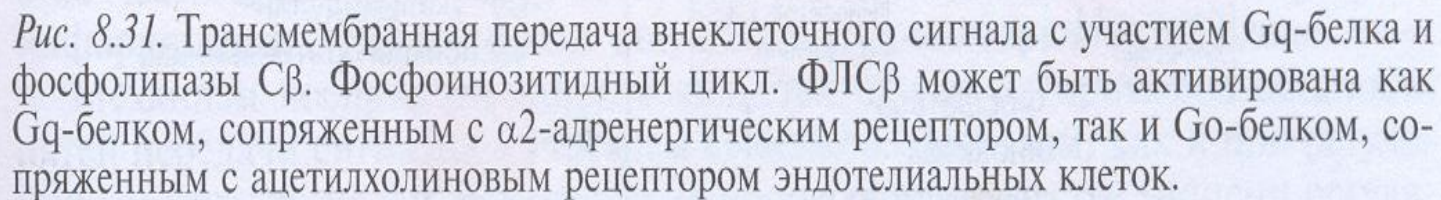


Рис. 8.30. Активация фосфолипазы C β белком Gq, сопряженным с 7TMS-рецептором (А), и фосфолипазы C γ , опосредуемая рецептором РТП (Б).



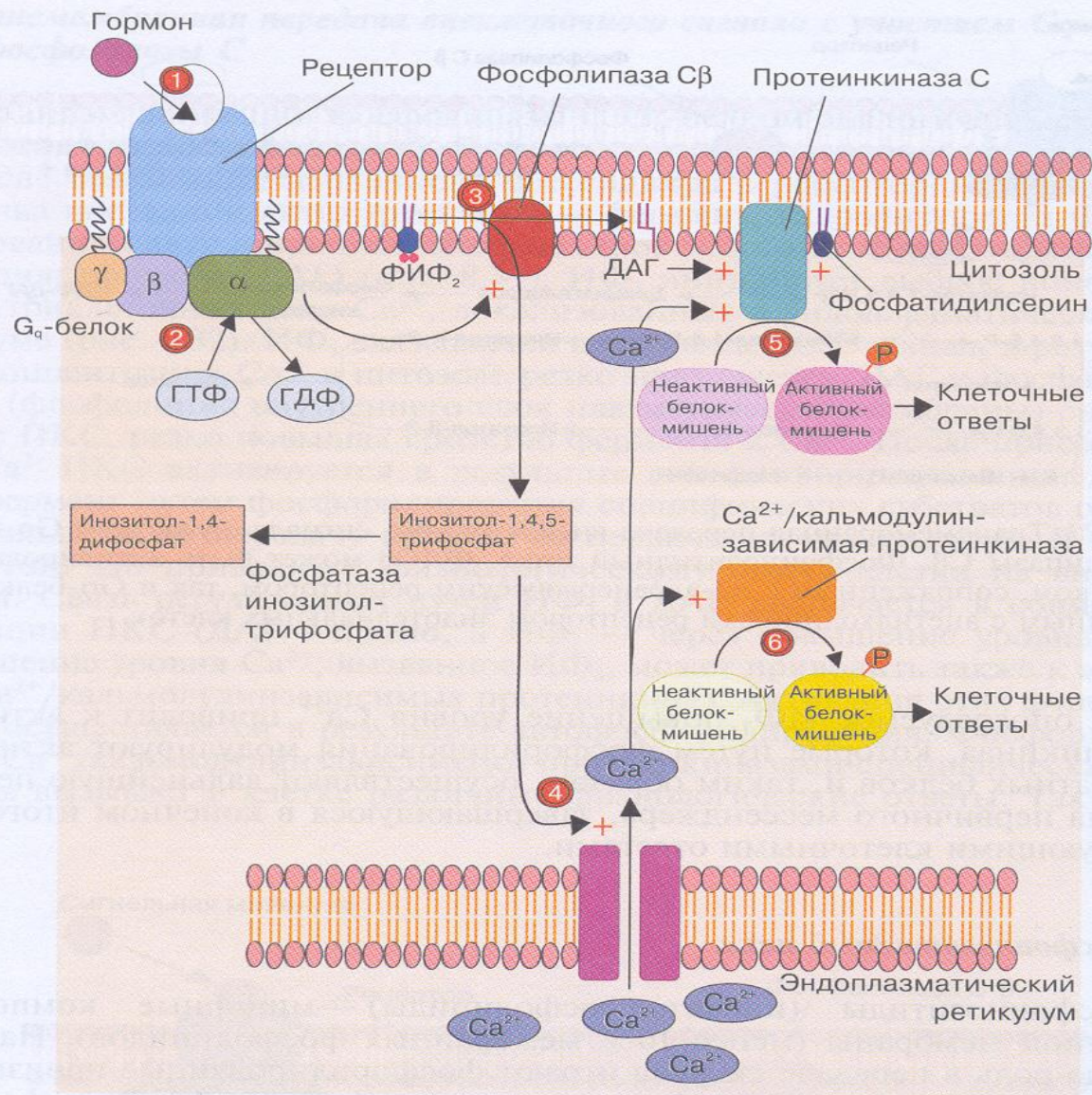
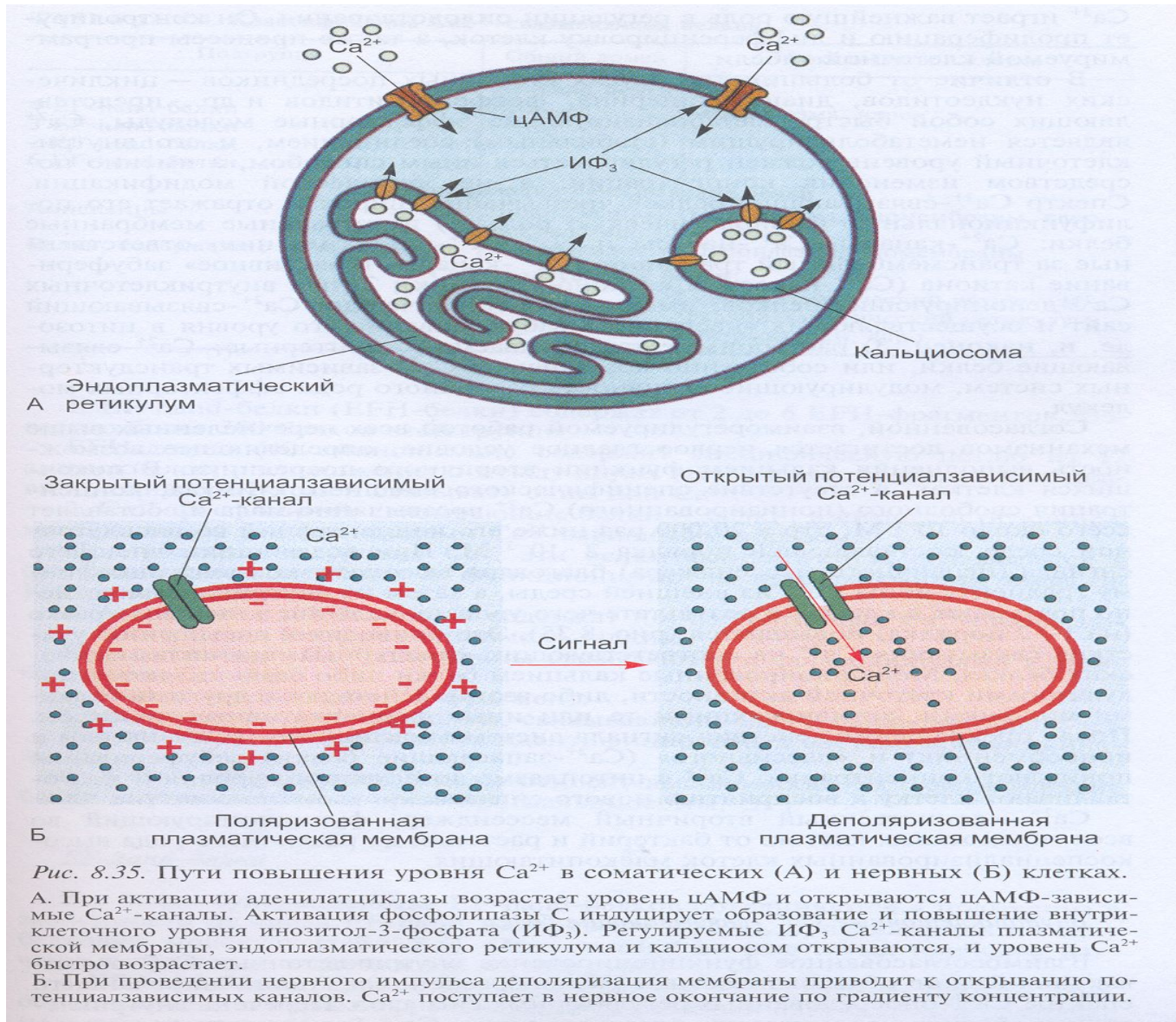


Рис. 8.32. Механизм передачи регуляторного сигнала, опосредованный G_q-белком, активирующим фосфолипазу Cβ. Номерами отмечены этапы прохождения сигналов.

Ca^{2+} -единственный вторичный посредник, функционирующий во всех типах живых клеток



Ca²⁺ - ключевой вторичный посредник

Различают **3 состояния** Ca²⁺ в клетках нескелетообразующих тканей:

1. Ca²⁺, локализованный **внутри клеточных органелл** (ЭПР, митохондрии, ядро, секреторные гранулы, лизосомы);
2. **Хелатированный** Ca²⁺, т.е. ассоциированный с анионом или цитоплазматическим Ca-связывающим белком;
3. **Свободный**, или ионизированный Ca²⁺, находящийся в равновесии с хелатированным.
4. Свободный Ca²⁺ (0,1%) – **универсальный вторичный посредник** (мышечное сокращение, сердечная деятельность, активность нервной системы, коагуляция крови, тромбогенез, иммунный ответ, пролиферация, дифференцировка, апоптоз, оплодотворение)

Особенности Ca^{2+} как вторичного посредника

1. Ca^{2+} - **неметаболизируемый** (стабильный) катион и его внутриклеточный уровень регулируется путем **изменения концентрации**, а не химической модификацией.

2. Ca^{2+} , связывающие белки делятся на:

- **1) интегральные мембранные белки** (Ca -каналы, Ca -насосы, $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -ионообменник), осуществляют **«активное» забуферивание Ca^{2+}** ;
- **2) пул внутриклеточных Ca -депонирующих белков** (имеют специфический Ca -связывающий сайт), осуществляют **«пассивное» забуферивание** уровня Ca^{2+} в цитозоле;
- **3) растворимые («триггерные») Ca -связывающие белки** — компоненты Ca -зависимых сигнальных систем, регулирующих активность эффекторных молекул.
- в покое концентрация Ca^{2+} в клетке мала, под действием первичного мессенджера Ca^{2+} из среды и депо поступает в цитозоль, его концентрация $\uparrow$, после выключения сигнала системы «активного» и «пассивного» забуферивания $\downarrow$ концентрацию Ca^{2+} до нормы.

Внутриклеточные Ca^{2+} -связывающие белки определяют Ca^{2+} -опосредованные сигналы

Выделяют 3 группы Ca^{2+} -связывающих белков:

1. EF-hand-белки (цитоплазма, ядро)- содержат EFH-фрагмент (2-6)

EFH-домен (40 А), содержит петлю из 12 А, расположенную между двумя (Е и F) α -спиралями, связывает 1 ион Ca^{2+}

2. Ca^{2+} -фосфолипид-связывающие белки (цитоплазма, биомембрана, ядро):

- аннексины
- белки, содержащие C2-фрагмент

3. Ca^{2+} -запасающие белки – (кальцисомы - ЭПР, СПР, митохондрии, ядро)

Ca^{2+} - связывающие белки

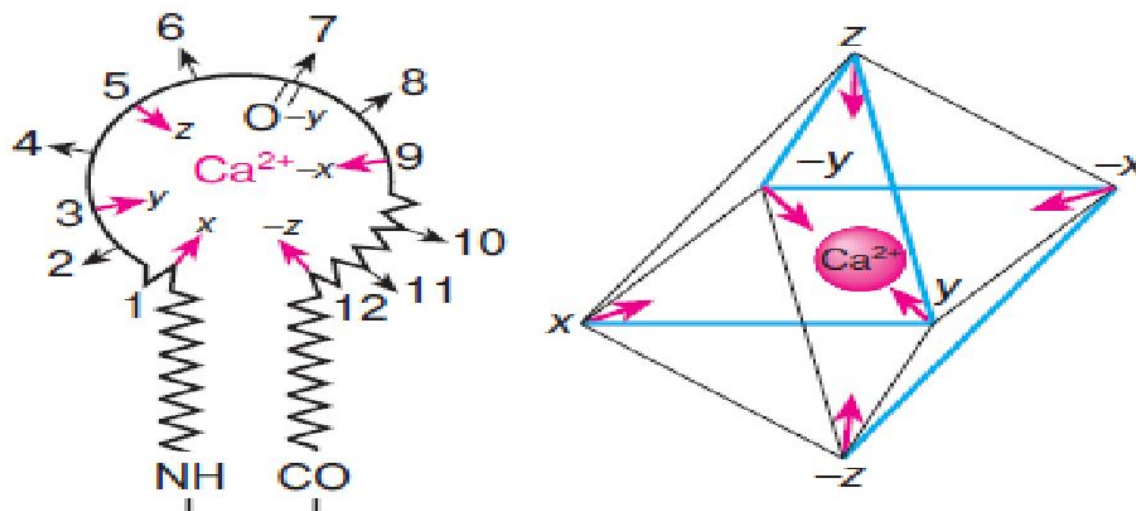


Рис. 3. Схема строения Ca -связывающих петель. Слева – двумерное изображение Ca -связывающей петли. Показаны две α -спирали, ограничивающие петлю с N- и C-концов. Заглавными буквами латинского алфавита и стрелками, повернутыми внутрь петли, обозначены аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в связывание Ca^{2+} (остатки 1, 3, 5, 7, 9 и 12). Справа – упрощенная пространственная структура Ca -связывающей петли. Жирными линиями выделен ход полипептидной цепи. Заглавными буквами латинского алфавита обозначены вершины октаэдра

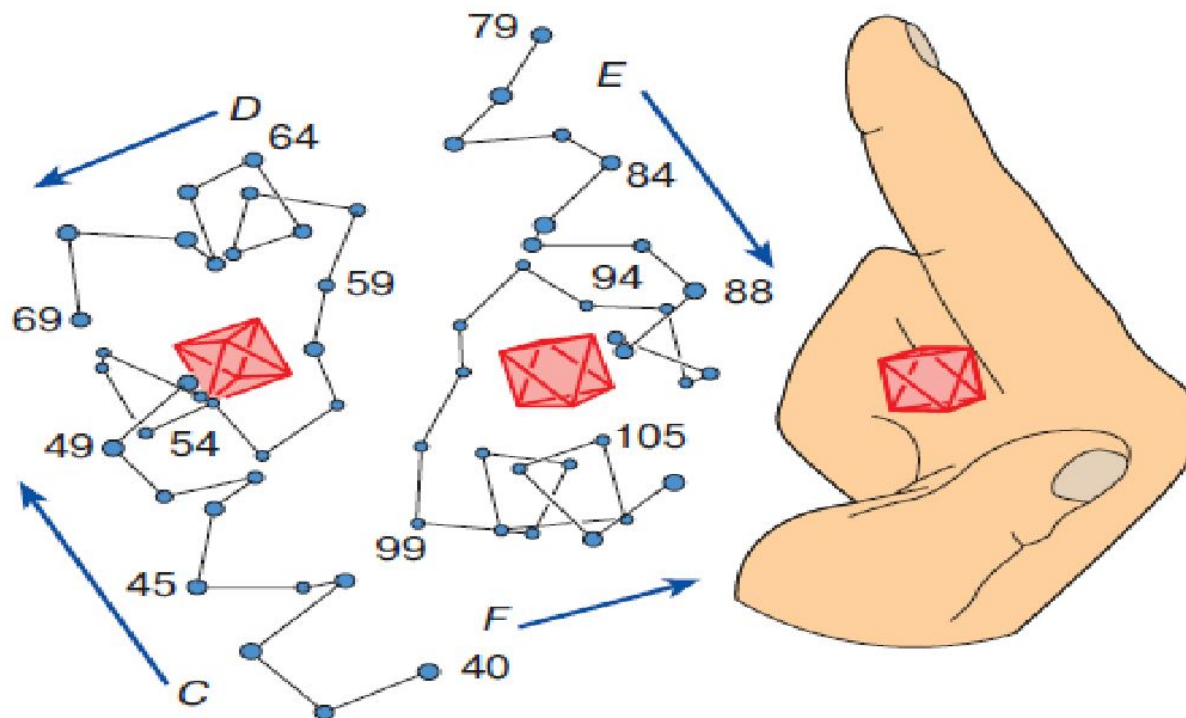
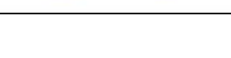


Рис. 2. Схема строения двух Са-связывающих центров парвальбумина. На левой части рисунка показан ход полипептидной цепи с обозначением номеров аминокислотных остатков. Стрелками с заглавным буквами латинского алфавита обозначены α -спиральные участки. Два октаэдра в центре петель изображают координационные сферы ионов кальция (по [4] с изменениями)

Таблица 1. Классификация Са-связывающих белков*

Название	Локализация	Функции	Строение
Белки с двумя EF-центрами			
Кальбиндин (S-100D)	Кишечник	Сорбция Ca^{2+}	
Семейство S-100, S-100A1	Мозг	Связь с цитоскелетом	
Метастазин S-100A4	Метастазирующие ткани	Фактор роста (?)	
Кальгидаррин S-100C	Гладкие мышцы	Регуляция сокращения (?)	
Белки с тремя EF-центрами			
Парвальбумины	Мышцы	Регуляция сокращения	
Онкомодулин	Плацента, опухоли	(?)	
Аквеорин	Кишечнополостные	Биолуминесценция	
Белки с четырьмя EF-центрами			
Кальмодулин	Повсеместно	Многообразные	
Тропонин С	Сердечные и скелетные мышцы	Регуляция сокращения	
Регуляторные легкие цепи миозина	Мышцы	Регуляция сокращения	
Щелочные легкие цепи миозина	Мышцы	Регуляция сокращения	
Рековерин/визинин	Палочки и колбочки сетчатки	Фоторецепция	
Белки с шестью EF-центрами			
Кальбиндин 26 кДа	Кишечник	Сорбция Ca^{2+}	
Кальретинин	Нейроны	(?)	

* Дугами с Ca^{2+} внутри отмечены участки, способные связывать кальций, дуги без Ca^{2+} внутри обозначают участки, потерявшие способность связывать кальций, красные линии слева и справа от дуг – α -спиральные участки.

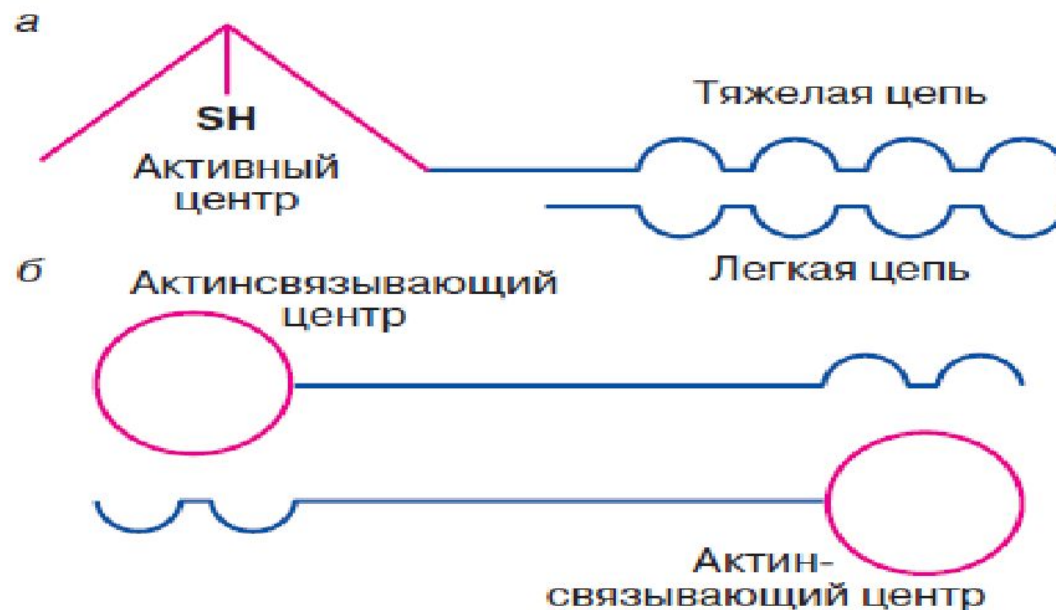


Рис. 4. Схема строения калъпаина (а) и α -актинина (б). Тяжелая цепь калъпаина содержит в своем составе активный центр (открытый треугольник) и четыре Са-связывающие петли. С тяжелой цепью связана легкая цепь, содержащая также четыре Са-связывающие петли (изображены в виде дуг). α -Актинин представляет собой гомодимер. Каждый мономер имеет на одном конце актинсвязывающий центр (большой шарик), а на другом конце – две EF-руки (две дуги)

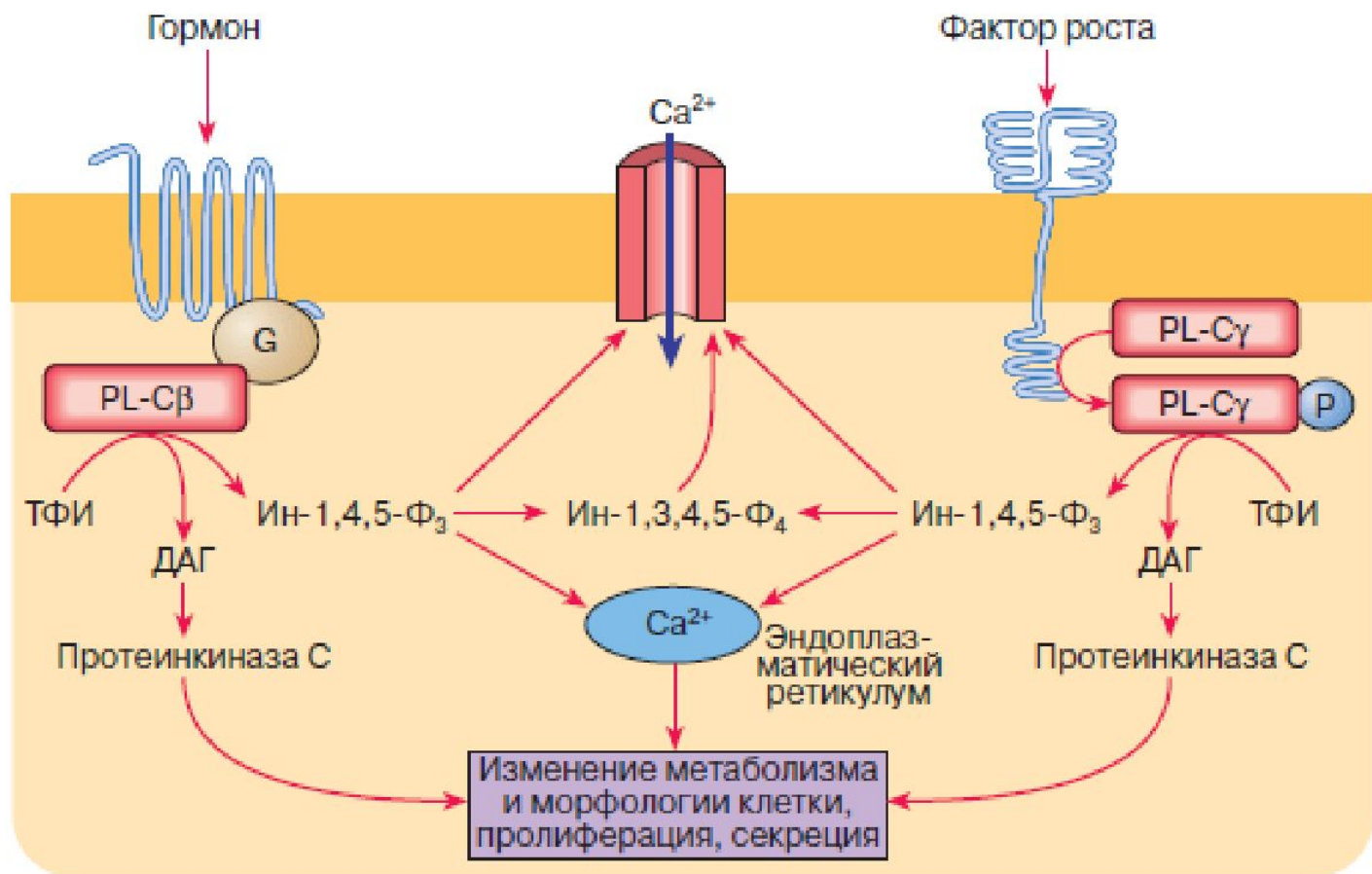


Рис. 2. Механизмы активации фосфолипазы С (PL-C) гормонами и факторами роста. G – ГТФ-связывающий G-белок, P – неорганический фосфат, $\text{Ин-1,3,4,5-}\Phi_4$ – инозитолтетроксифосфат. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Ниже приведены наиболее изученные Са-связывающие белки млекопитающих.

Белок	Функция в клетке
Кальмодулин	Активатор аденилатциклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, киназы легких цепей миозина и др.
Тропонин С	Регулятор сокращения скелетных и сердечной мышц
Фосфолипаза С, специфичная в отношении фосфоинозитидов	Образует инозитол-1,4,5-трисфосфат и диацилглицерин
Кальцинейрин В	Фосфатаза фосфобелков
Кальпаин	Протеаза
α -Актинин	Актинсвязывающий белок
Парвальбумин	Буфер Ca^{2+}
Фосфолипаза A_2	Образует арахидоновую кислоту
Киназа С	Сериновая и треониновая протеинкиназа
Аннексин	Регулятор экзо- и эндоцитоза, ингибитор фосфолипазы A_2
Ca^{2+} -активируемый К-канал	Вызывает гиперполяризацию мембраны
Рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата	Вызывает выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума
Рецептор рианодина	Вызывает выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник	Осуществляет выход Ca^{2+} из клетки в обмен на вход Na^+
Ca^{2+} -АТФаза	Осуществляет активный транспорт Ca^{2+} из клетки или в цистерны эндоплазматического ретикулума
Гельзолин	Изменяет структуру актина
Виллин	Структурирует актиновые филаменты
Кальсеквестрин	Буфер Ca^{2+}
Кальретикулин	Регулятор глюкокортикоидных рецепторов

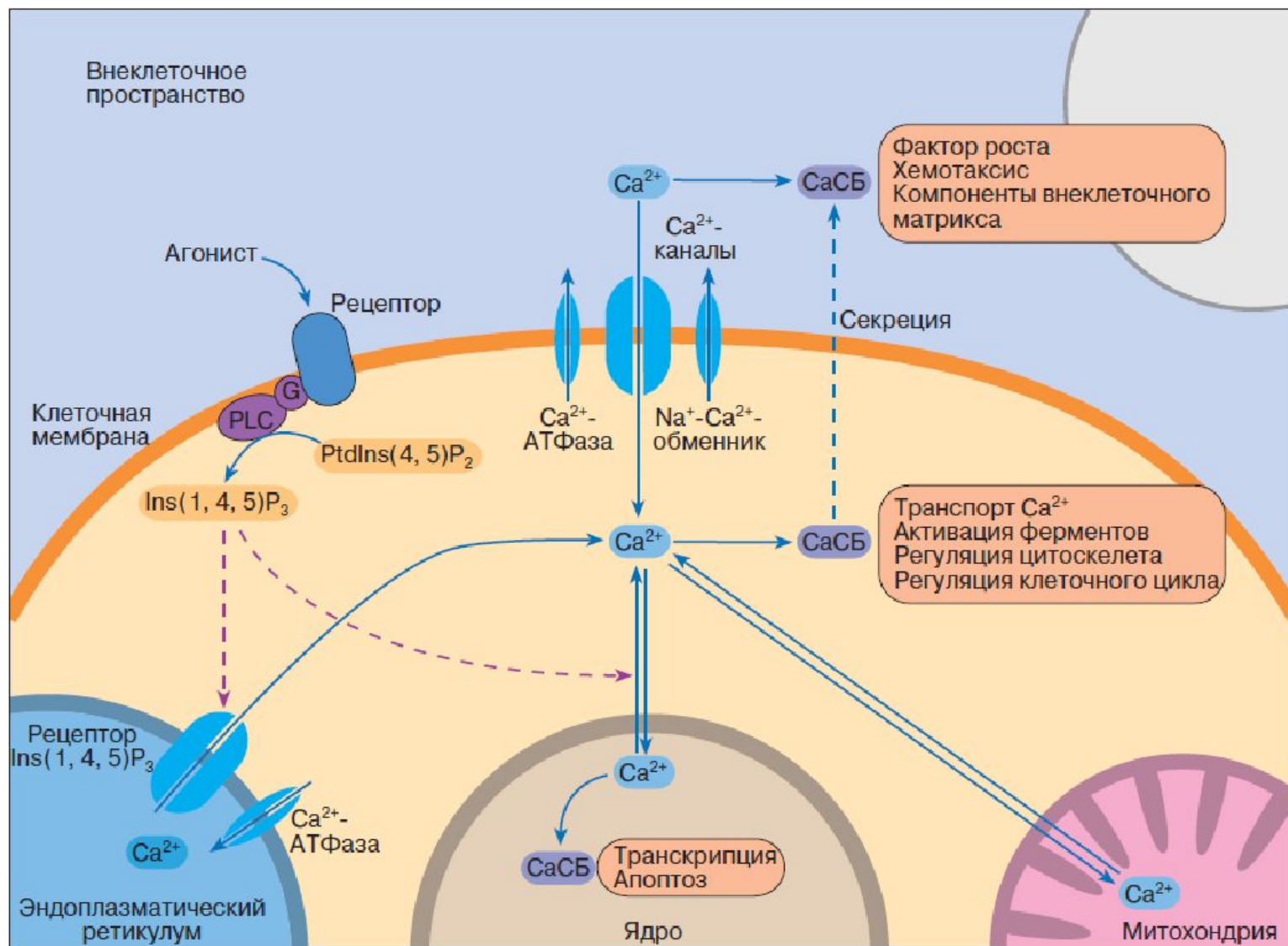


Рис. 1. Участие Ca-связывающих белков в передаче внутри- и внеклеточных сигналов. Использованные сокращения: Ins(1,4,5)P₃, инозитол 1,4,5-трифосфат; PtdIns(4,5)P₂, фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат; PLC, фосфолипаза C; G, ГТФ-связывающие белки; CaCB, Ca-связывающие белки (по [2] с изменениями)

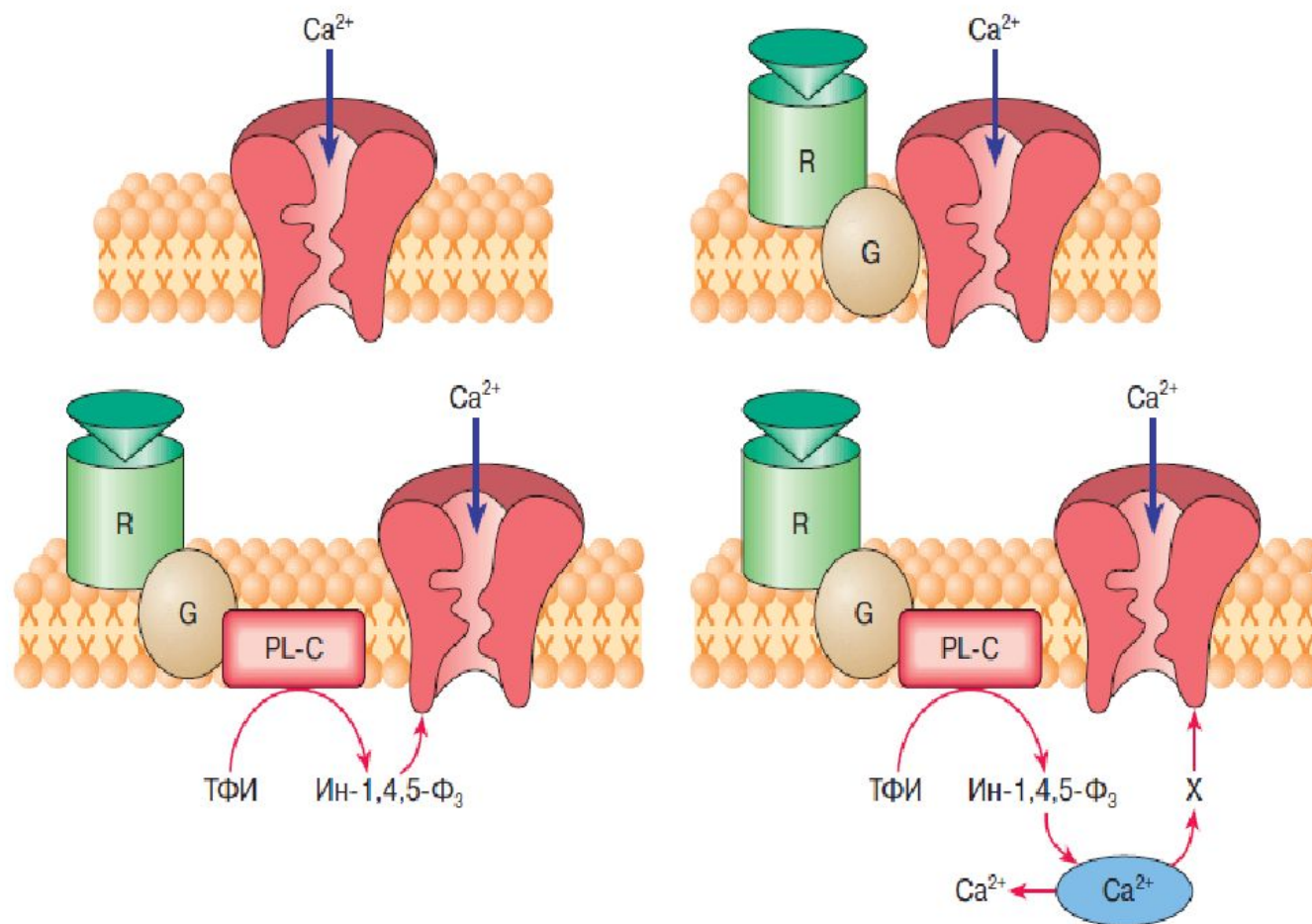
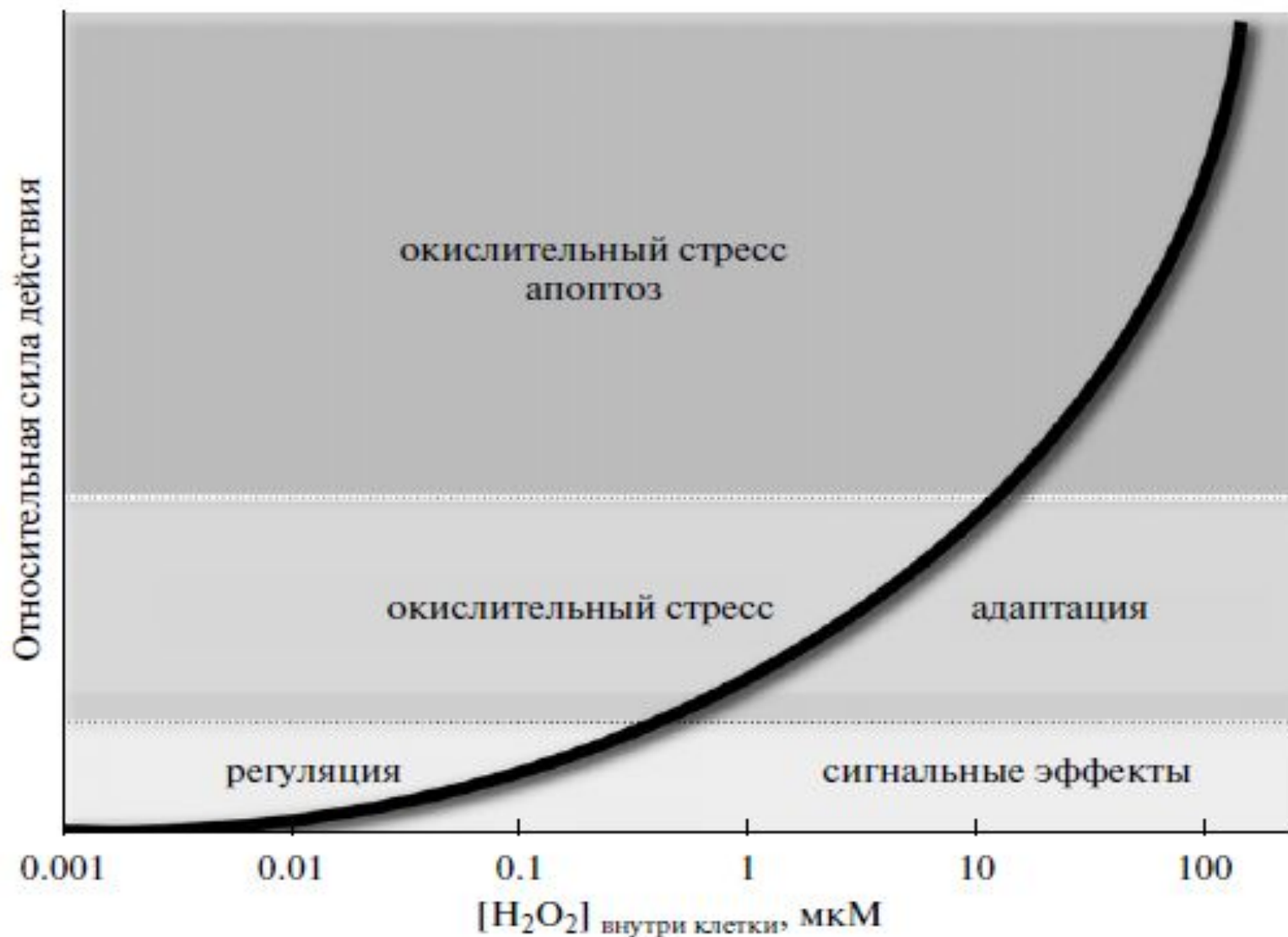


Рис. 3. Четыре типа Са-каналов в цитоплазматической мембране. Левый верхний – потенциалуправляемый Са-канал, остальные – рецепторуправляемые Са-каналы (см. описание в тексте). R – рецептор, X – гипотетический вторичный посредник, образующийся вследствие выхода Са²⁺ из ретикулума. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА КАК НОВЫЙ ВТОРИЧНЫЙ ПОСРЕДНИК



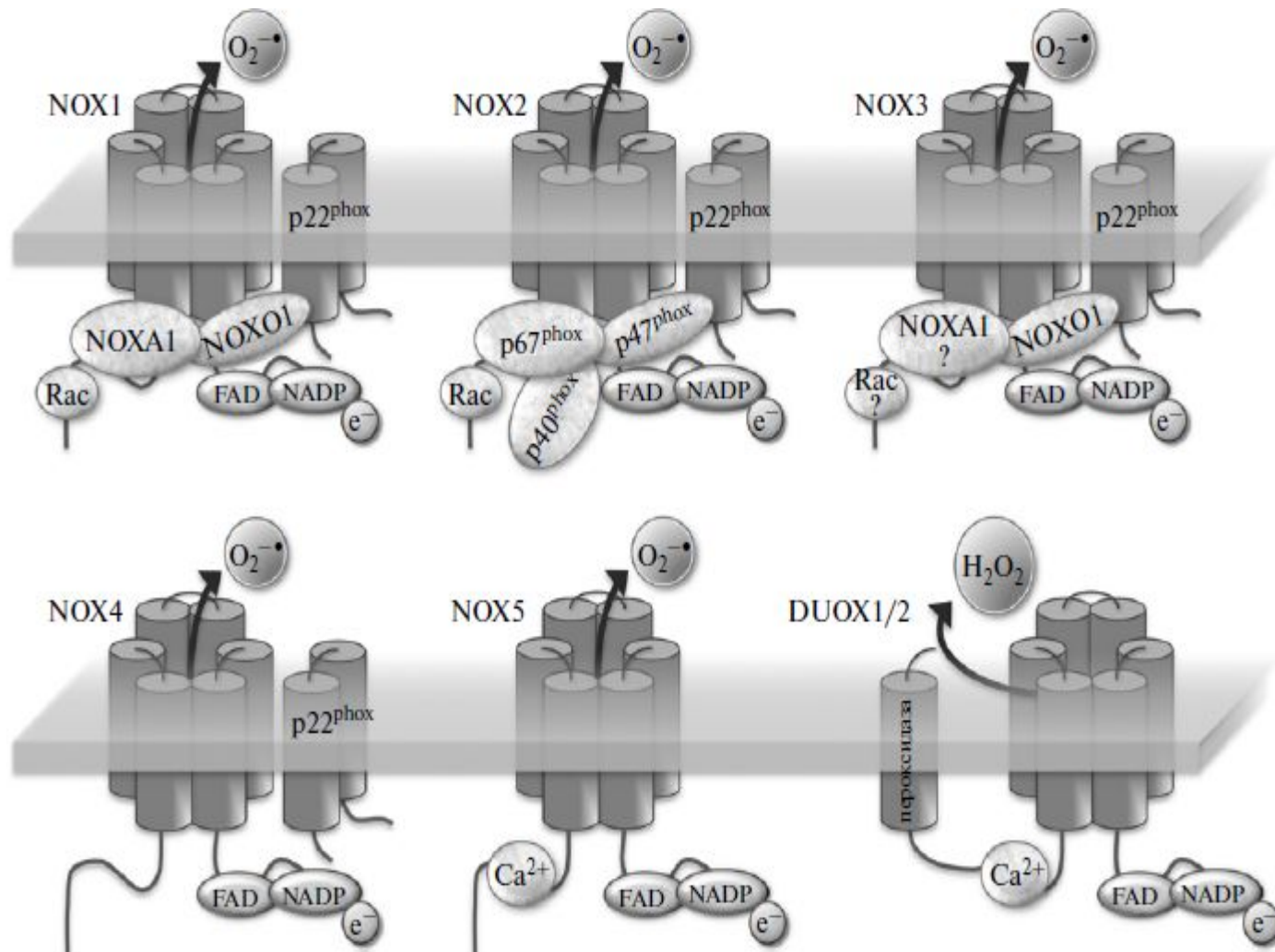
Источники перекиси водорода в клетке:

1. НАДФН-оксидаза
2. Электрон-транспортная цепь митохондрий
3. Электрон-транспортная цепь микросом
4. Ксантиноксидоредуктаза (КОР)
5. Супероксиддисмутаза

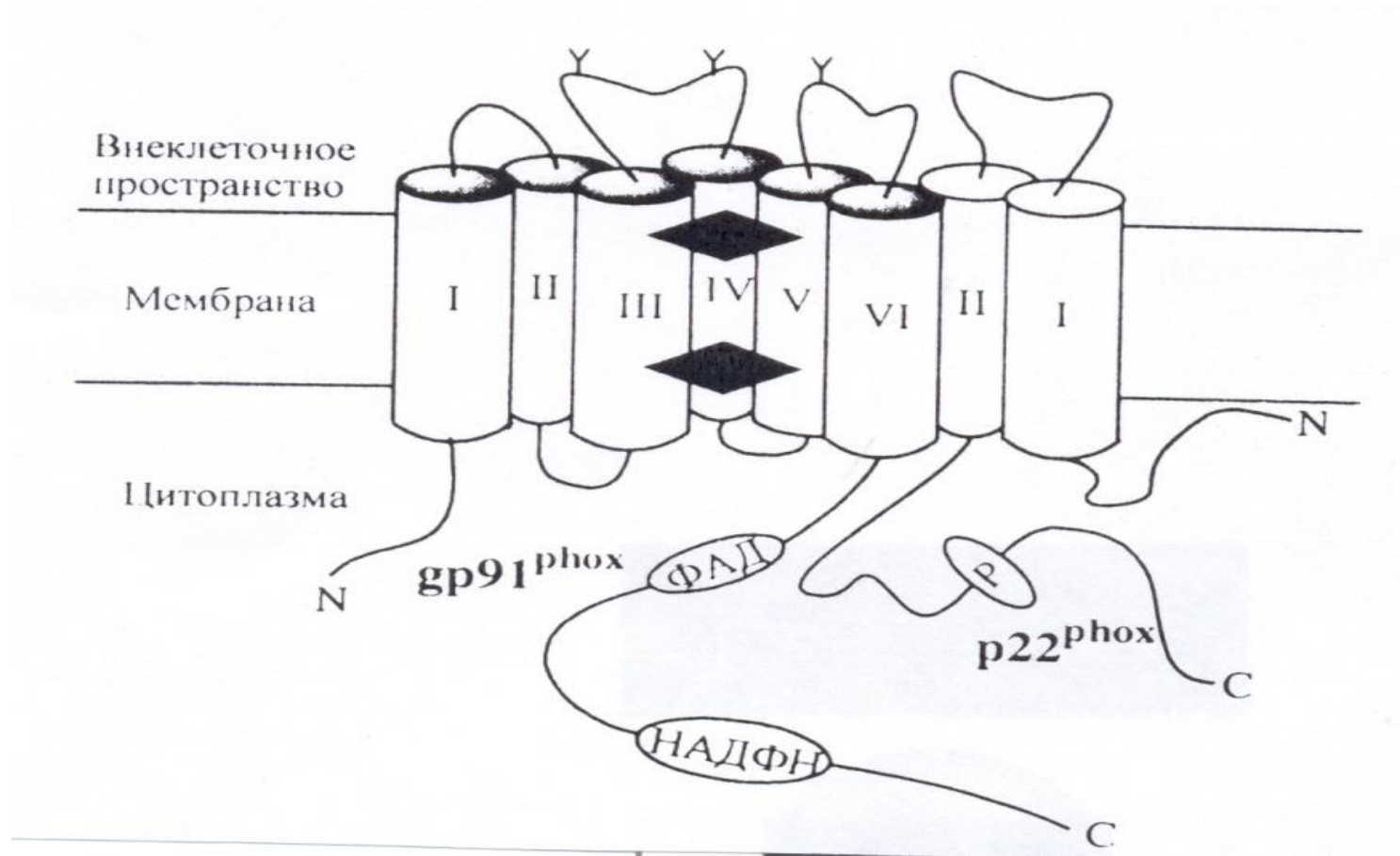
Пути удаления перекиси водорода:

1. Каталаза
2. Глутатионпероксидаза
3. Пероксиредоксины

Образование перекиси водорода НАДФН-оксидазой



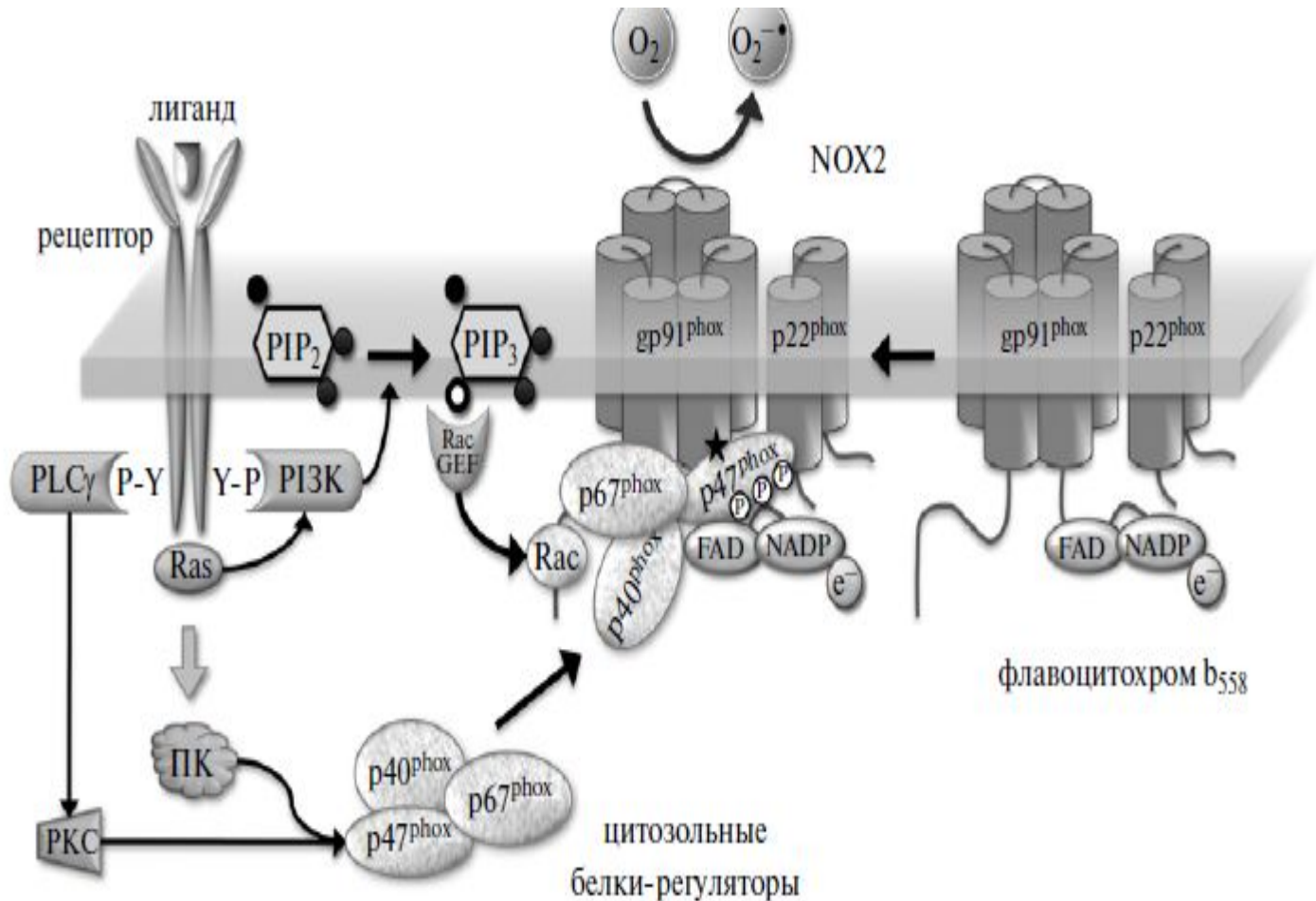
Строение флавоцитохрома b_{558}



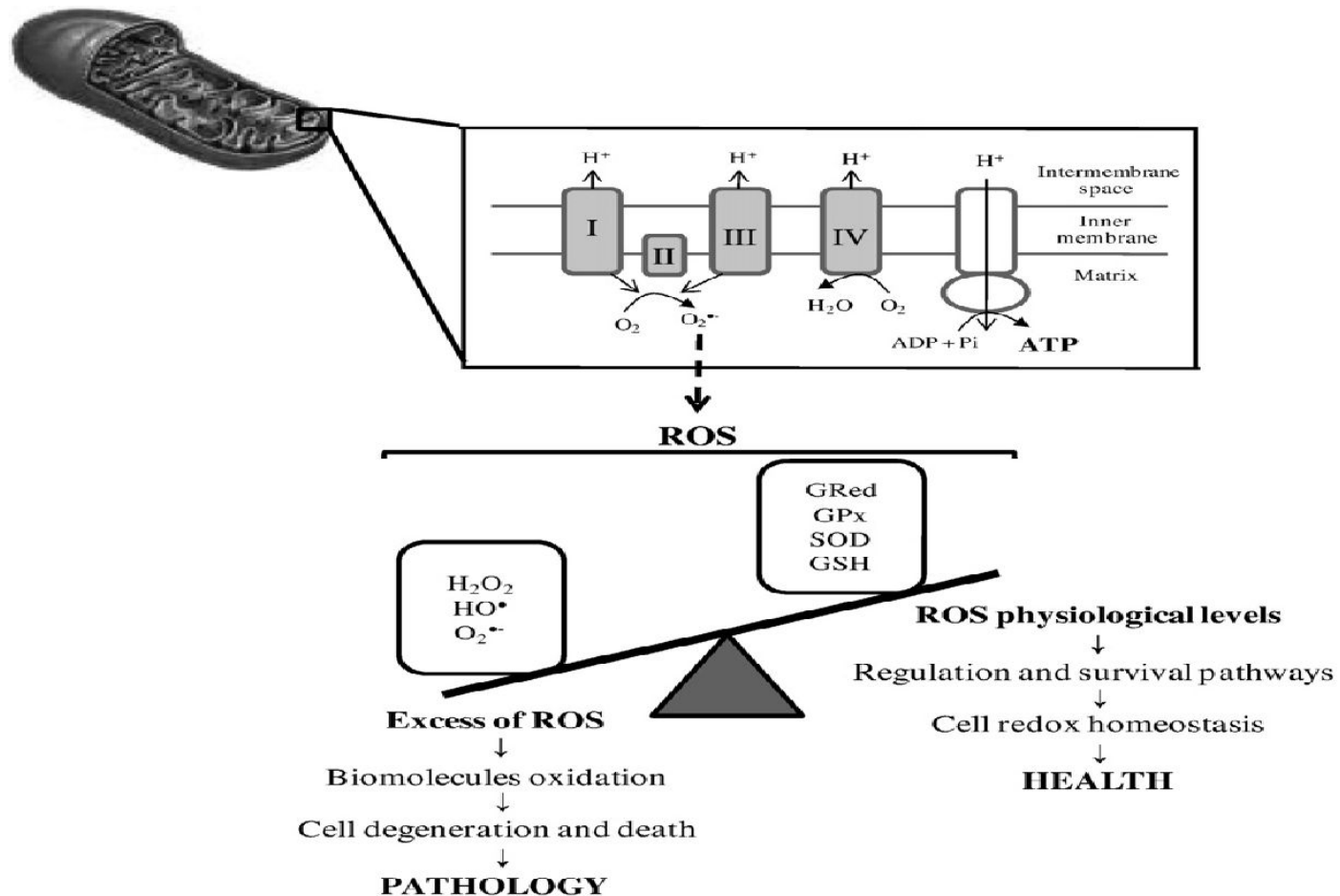
Механизм активации NOX1-3 на плазматической мембране:

лиганд→РТП→ФЛСγ→ПКС→фосфорилирование цитозольных белков-регуляторов→сборка НАДФН-оксидазного комплекса→продукция $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2

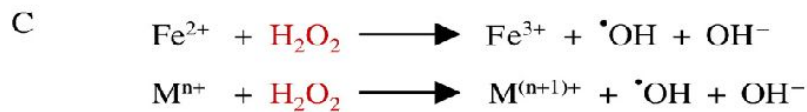
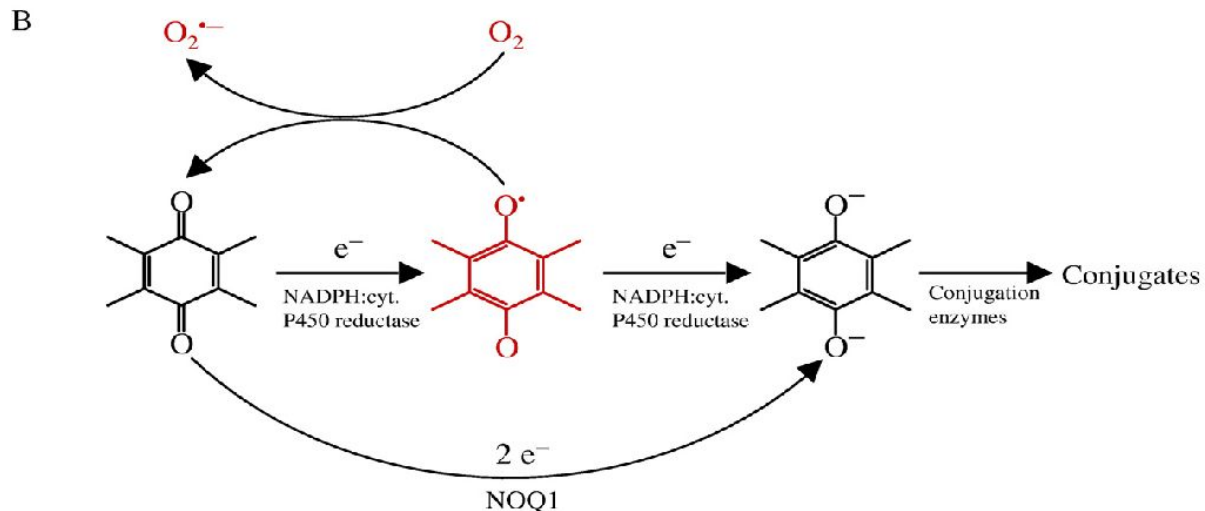
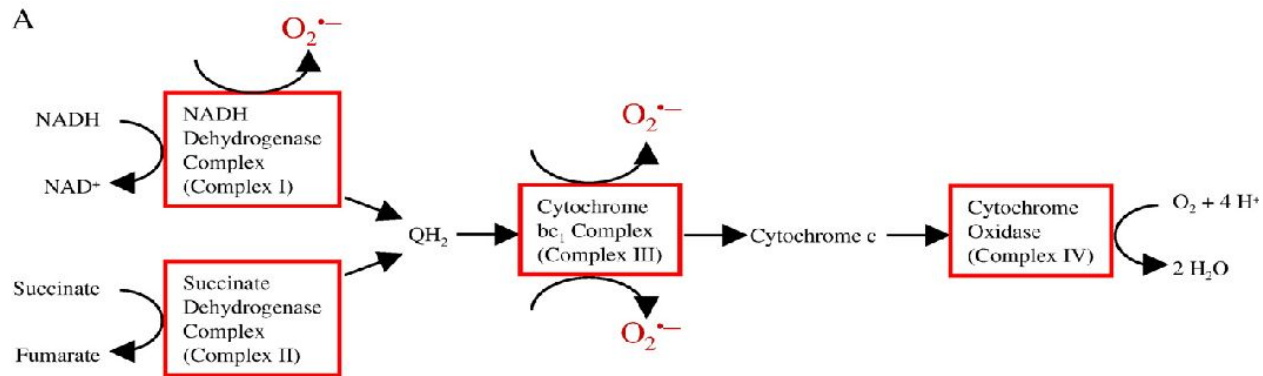
лиганд→РТП→Ras-белок→ПК→фосфорилирование цитозольных белков→сборка НАДФН-оксидазы



Электрон-транспортная цепь митохондрий (5-6% АФК)



Продукция супероксида и перекиси водорода в митохондриях

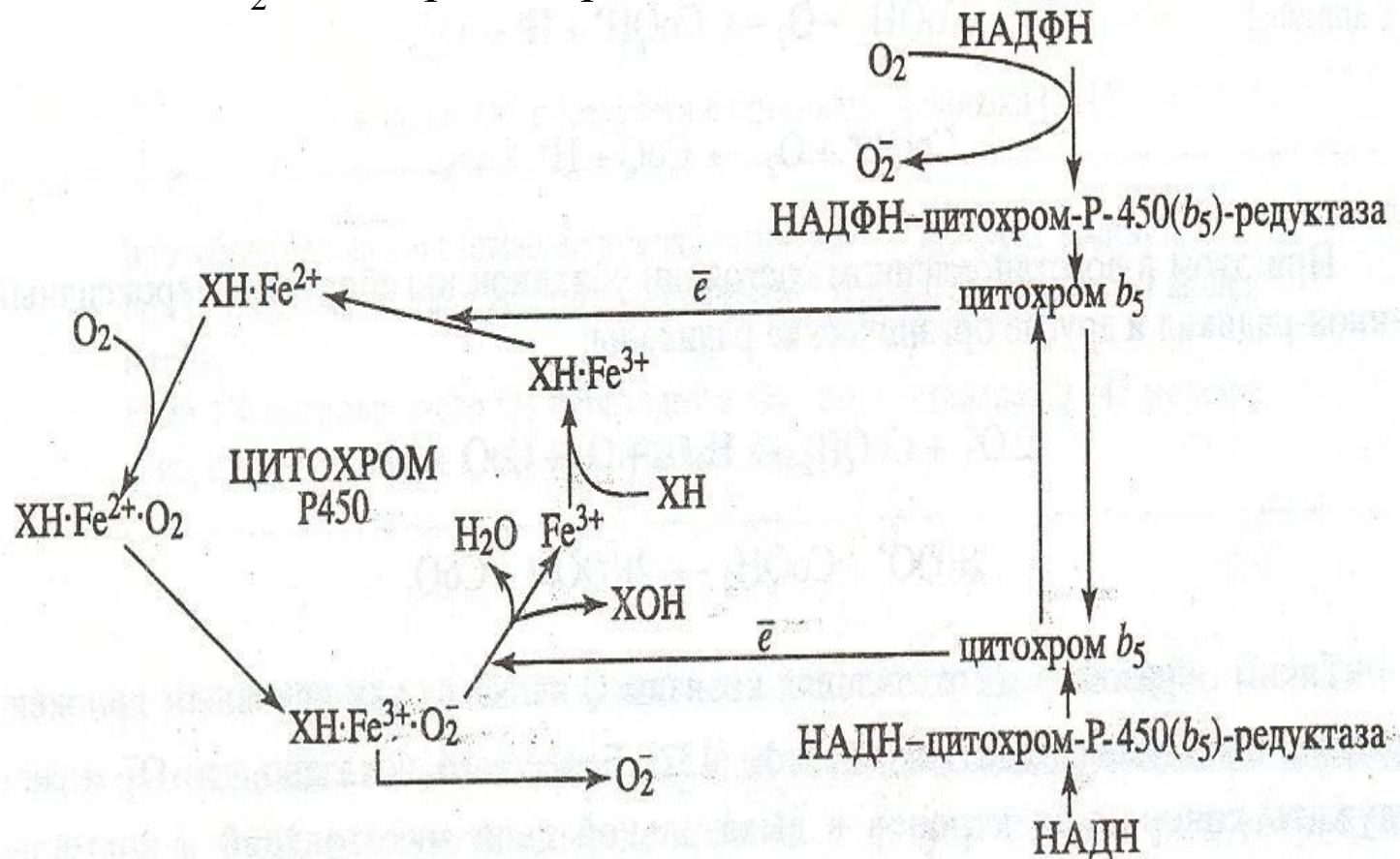


Образование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в системе микросомального окисления (75% АФК)

Главной функцией монооксигеназ является детоксикация ксенобиотиков путем гидроксилирования:



X – ксенобиотик, AH_2 – донор электронов.



Ксантиноксидоредуктаза – источник **перекиси **водорода** в клетке**

Ксантиноксидоредуктаза представлена двумя изоформами: **ксантиндегидрогеназой (КД)** и **ксантиноксидазой (КО)**.

КД $\leftrightarrow$ КО – это группа из двух близких по структуре Mo^{6+} и Fe^{2+} -содержащих ферментов. Данные изоферменты локализованы в большинстве органов, обладают широкой субстратной специфичностью. Они окисляют пурины (через гипоксантин и ксантин до мочевой кислоты), пиримидины, адреналин, дегидрируют НАДН, НАДФН.

Схема катаболизма пуринов, катализируемого ксантиноксидоредуктазой. **Ксантиноксидаза** – источник перекиси водорода

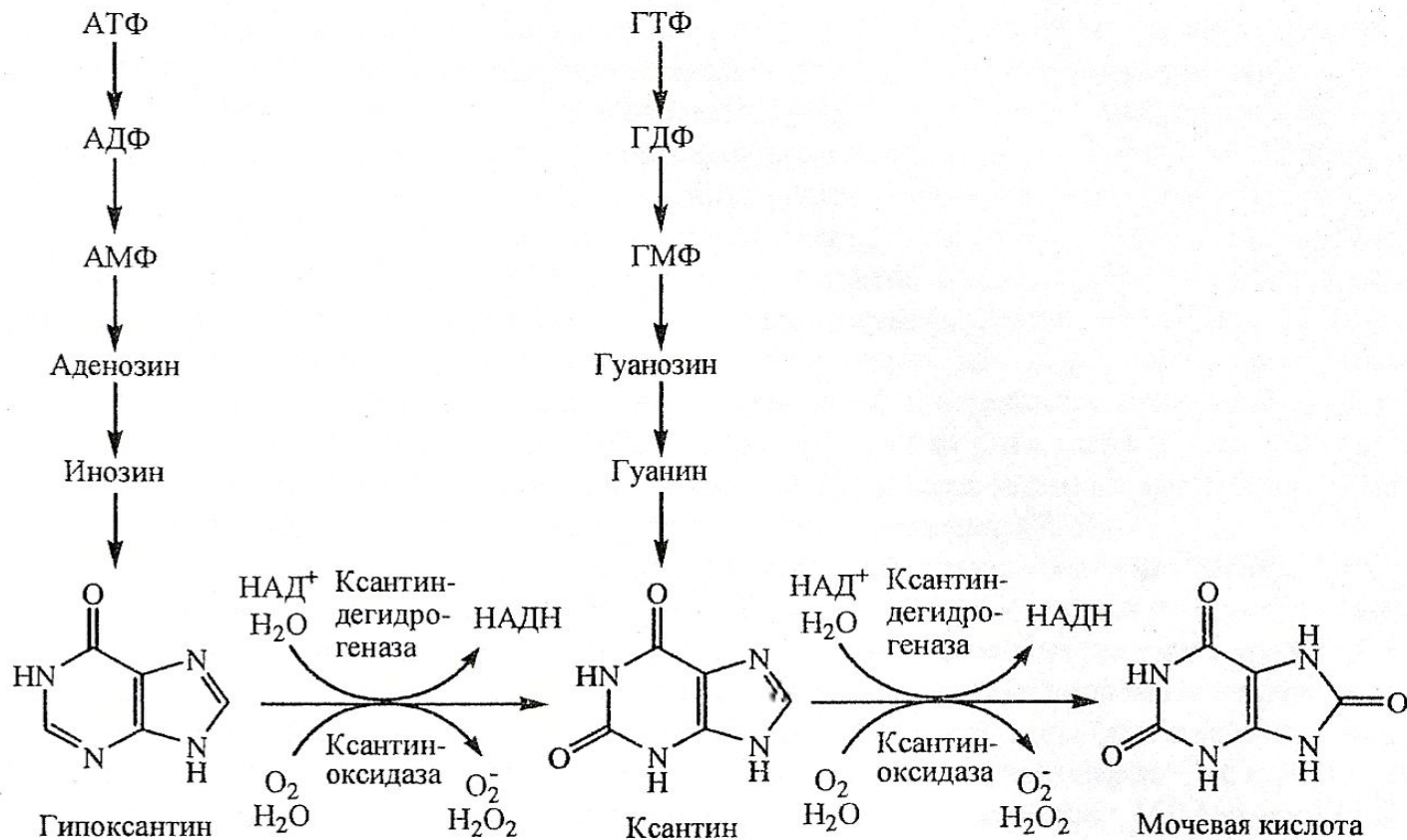
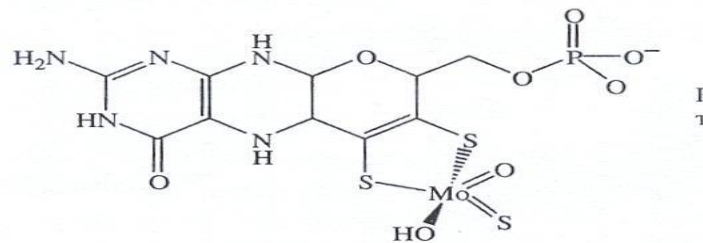
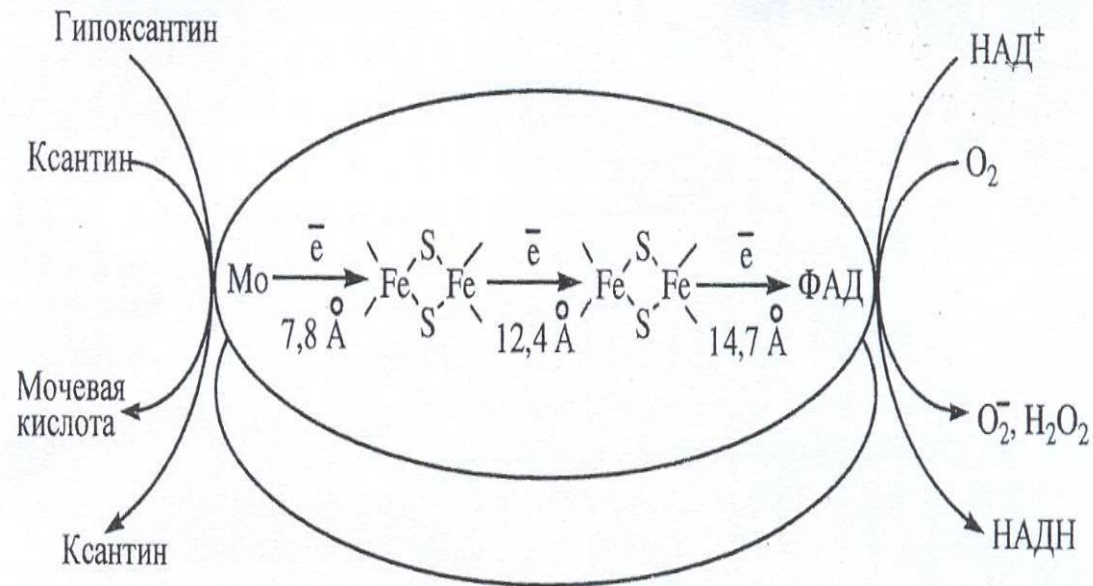


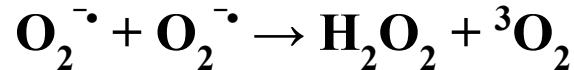
Схема функционирования ксантиноксидоредуктазы



F
T

Супероксиддисмутазы

Супероксиддисмутазы (СОД) – суперсемейство ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз и катализирующих реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала с образованием **перекиси водорода** и кислорода:



СОД присутствуют у всех аэробных организмов.

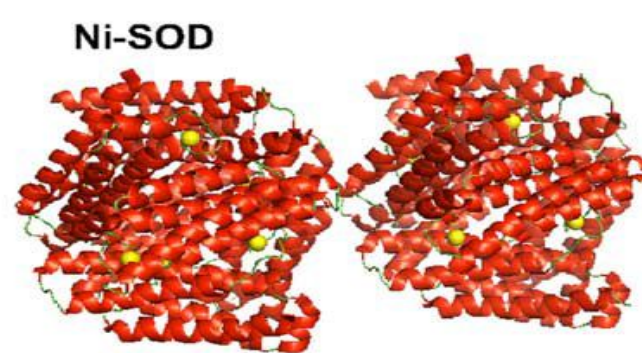
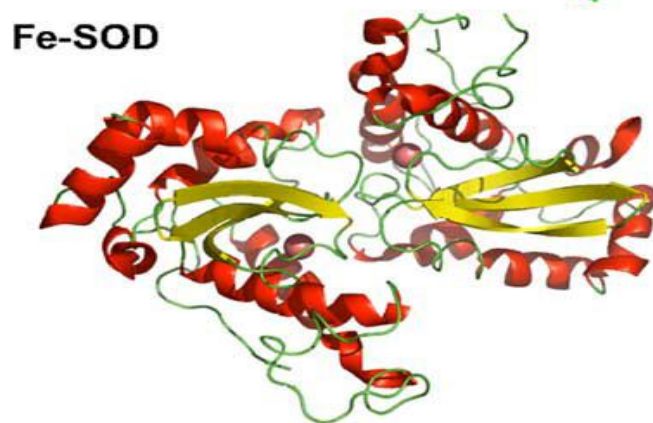
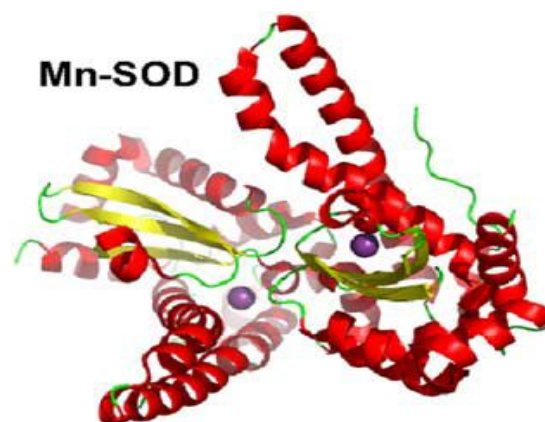
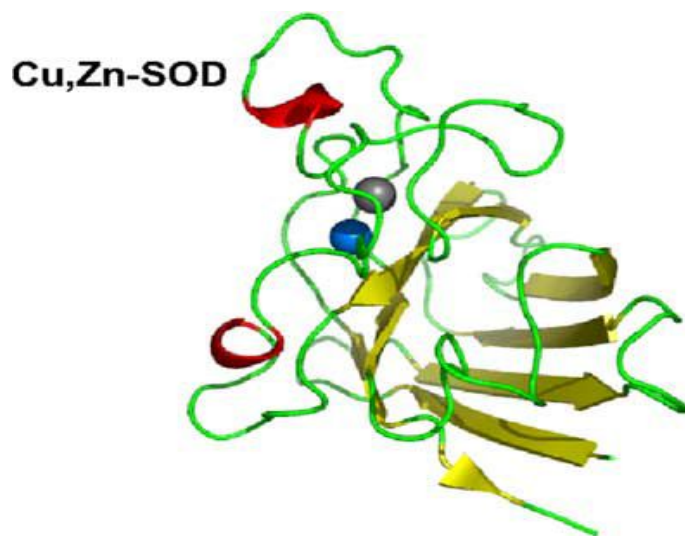
СОД (эритрокупреин) была открыта Мак-Кордом и Фридовичем в 1969 г.

СОД классифицируют по строению активного центра и структурной организации молекулы.

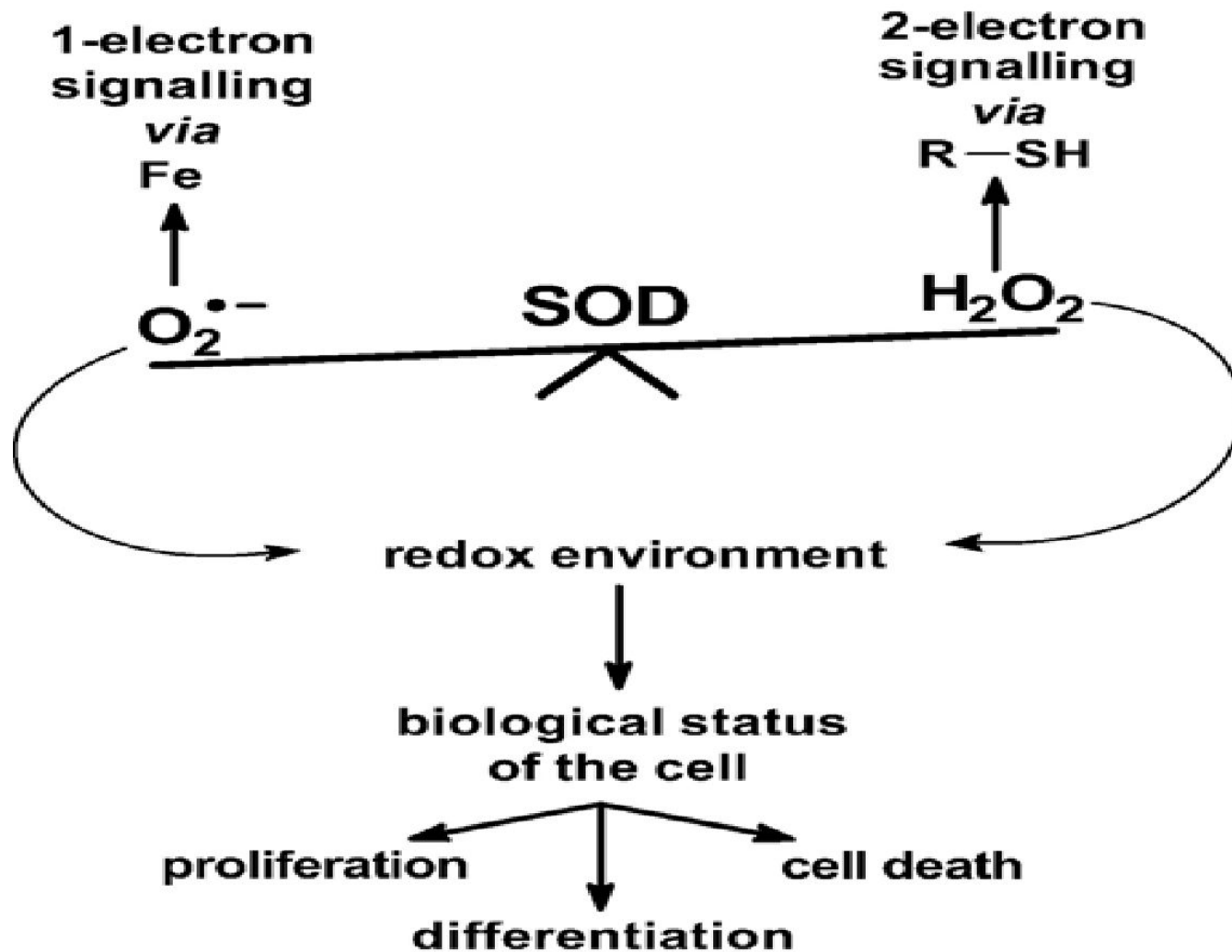
Выделяют 3 семейства СОД:

- Cu,Zn-СОД (эукариоты, хлоропласты растений, бактерии)
- Fe-СОД, Mn-СОД (прокариоты, митохондрии эукариот, хлоропласты)
- Ni-СОД (Streptomyces, цианобактерии)

Структура различных изоферментов СОД

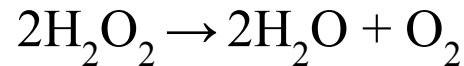


Мn-СОД и АФК- сигналинг

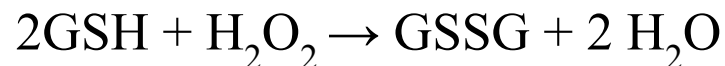


Элиминация перекиси водорода в клетке осуществляется ферментативным путем:

1. **Каталаза** – гемсодержащий внутриклеточный фермент (тетрамер):

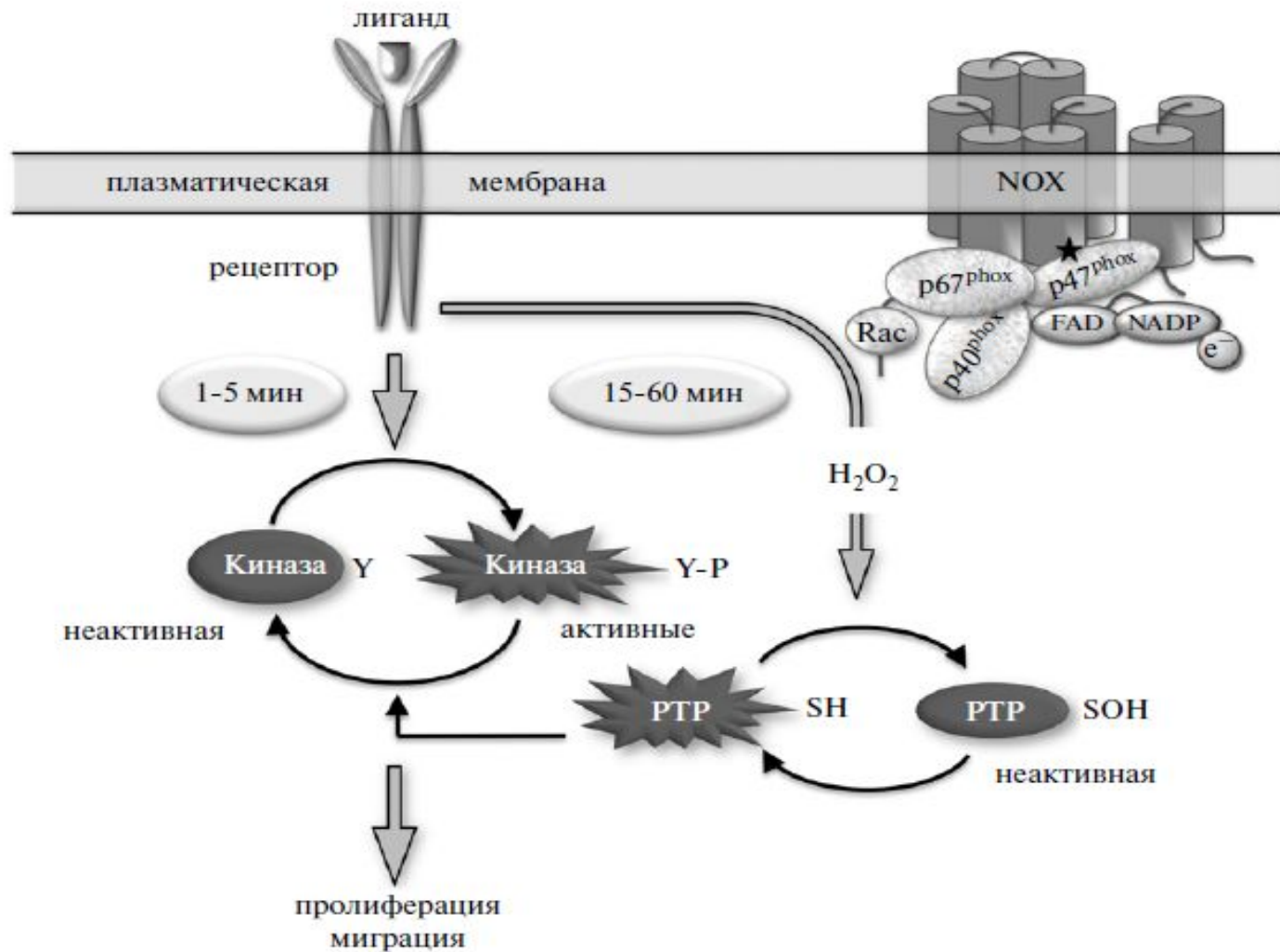


2. **Глутатионпероксидаза** – конститутивное семейство ферментов, которые способны **восстанавливать** органические и неорганические гидропероксиды до гидроксисоединений или других восстановленных эквивалентов. Имеются селеновые и неселеновые ГПО. Селеновые ГПО содержат в активном центре селеноцистеин, который вовлекается в каталитический цикл.



3. **Пероксиредоксины** – цитозольные белки, обладающие пероксидазной активностью, которые имеют фиксированные цистеиновые остатки на концах молекул, восстанавливают H_2O_2

Предполагаемый механизм действия перекиси водорода и ее мишени в клетке: тирозиновые фосфатазы (ингибирование), тирозиновые киназы (активация)



Дополнительные слайды

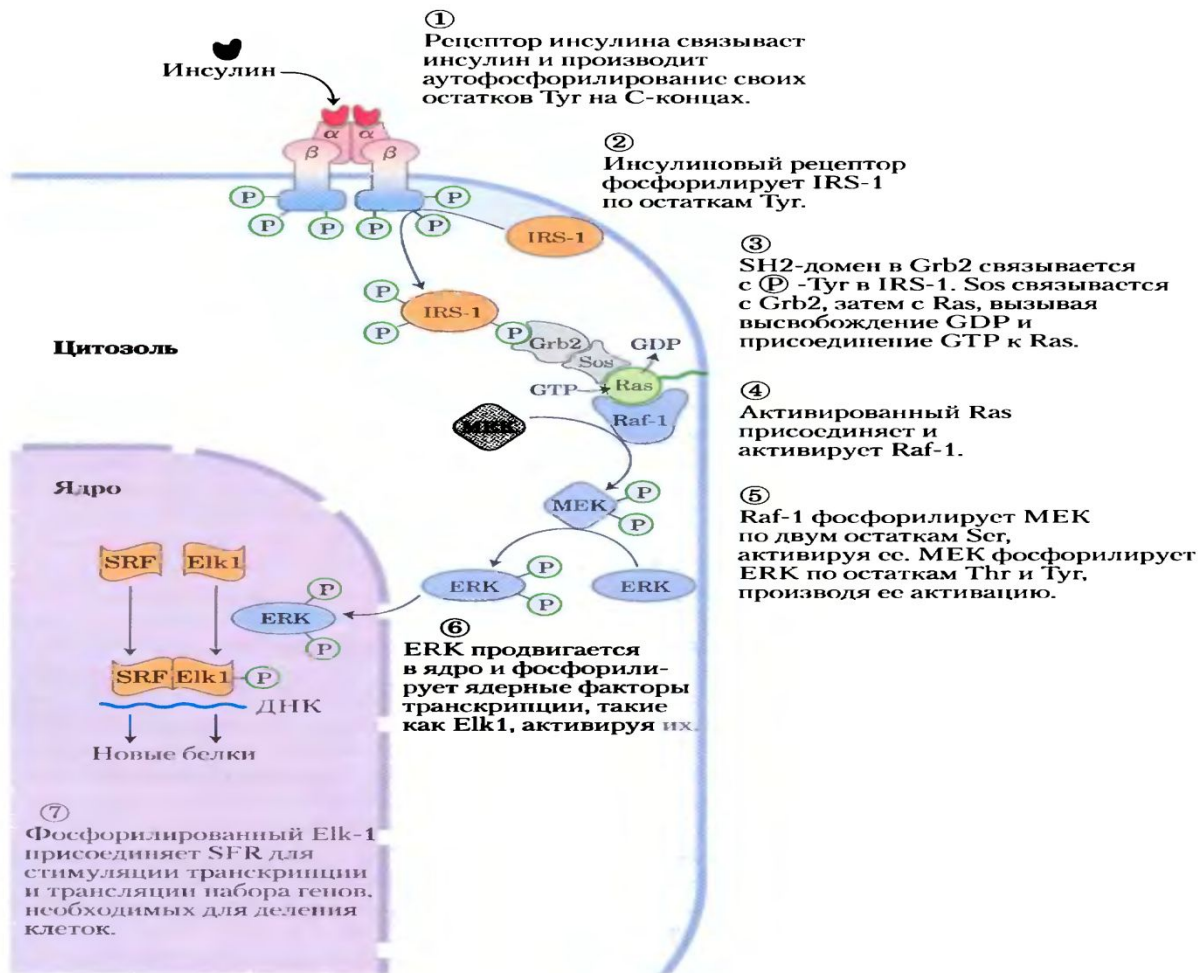


Рис. 12-15. Регуляция экспрессии генов инсулином. Рецептор инсулина (INS-R) состоит из двух α -цепей, расположенных на внешней стороне плазматической мембраны, и двух β -цепей, которые пересекают мембрану и выступают с внутренней стороны. Связывание инсулина с α -цепями вызывает конформационную перестройку, которая делает возможным аутофосфорилирование остатков Тир в С-концевом домене β -субъединиц. Аутофосфорилирование активирует тирозинкиназный домен, который затем катализирует фосфорилирование других белков-мишеней. Сигнальный путь, по которому инсулин регулирует экспрессию специфических генов, состоит из каскада протеинкиназ, каждая из которых активирует следующую. Рецептор инсулина является тирозинспецифичной киназой; другие киназы (все окрашены в голубой цвет) фосфорилируют остатки Ser или Thr. MEK — киназа с двойной специфичностью, которая фосфорилирует остатки Tyr и Thr в ERK (от англ. *extracellular regulated kinase* — внеклеточная регулируемая киназа); MEK — киназа, активируемая митогеном и активирующая ERK; SRF — сывороточный фактор отклика (англ. *serum response factor*).

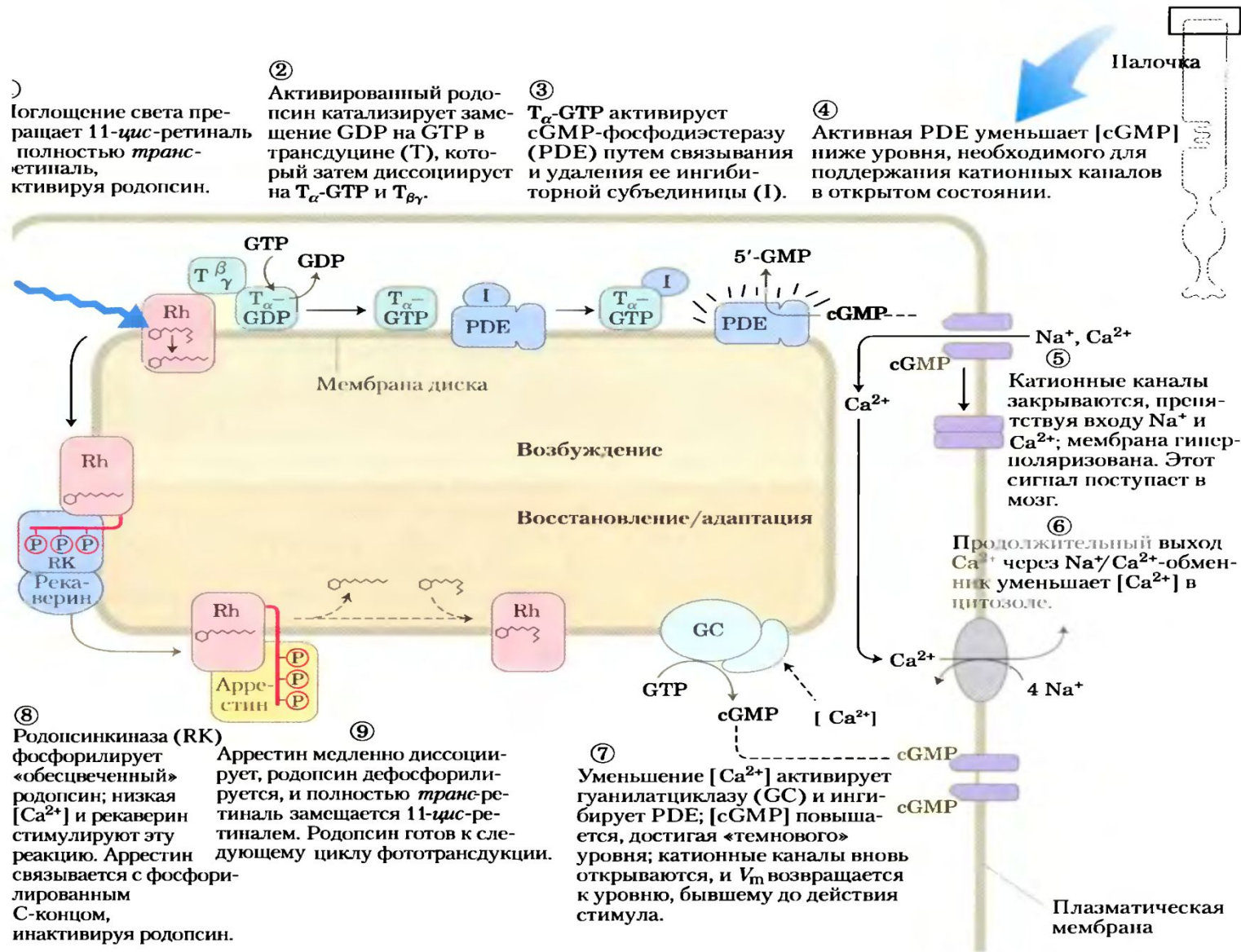


Рис. 12-38. Молекулярные «последствия» поглощения фотона родопсином в наружном сегменте палочки. Вверху (стадии ①–⑤) — возбуждение; внизу (стадии ⑥–⑨) — восстановление и адаптацию после освещения.

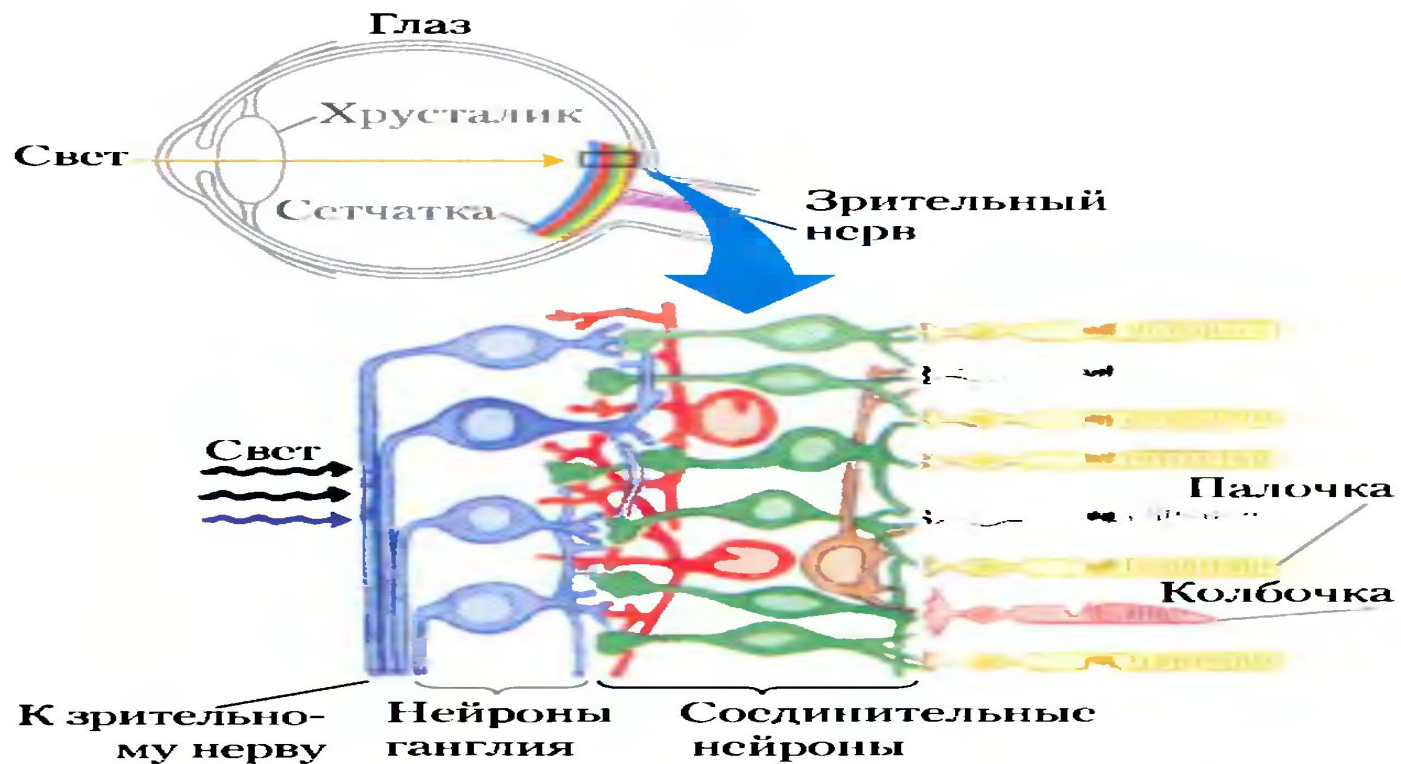


Рис. 12-35. Восприятие света глазом позвоночного. Хрусталик глаза фокусирует свет на сетчатке, которая состоит из слоев нейронов. Первичные фотосенсорные нейроны — это палочки (желтый цвет), которые отвечают за ночное зрение и зрение с высоким разрешением, и колбочки трех подтипов (розовый цвет), которые обеспечивают цветовое зрение. Палочки и колбочки образуют синапсы с несколькими видами соединительных нейронов, которые передают и интегрируют электрические сигналы. В конце концов эти сигналы проходят через зрительный нерв от нейронов ганглия в мозг.

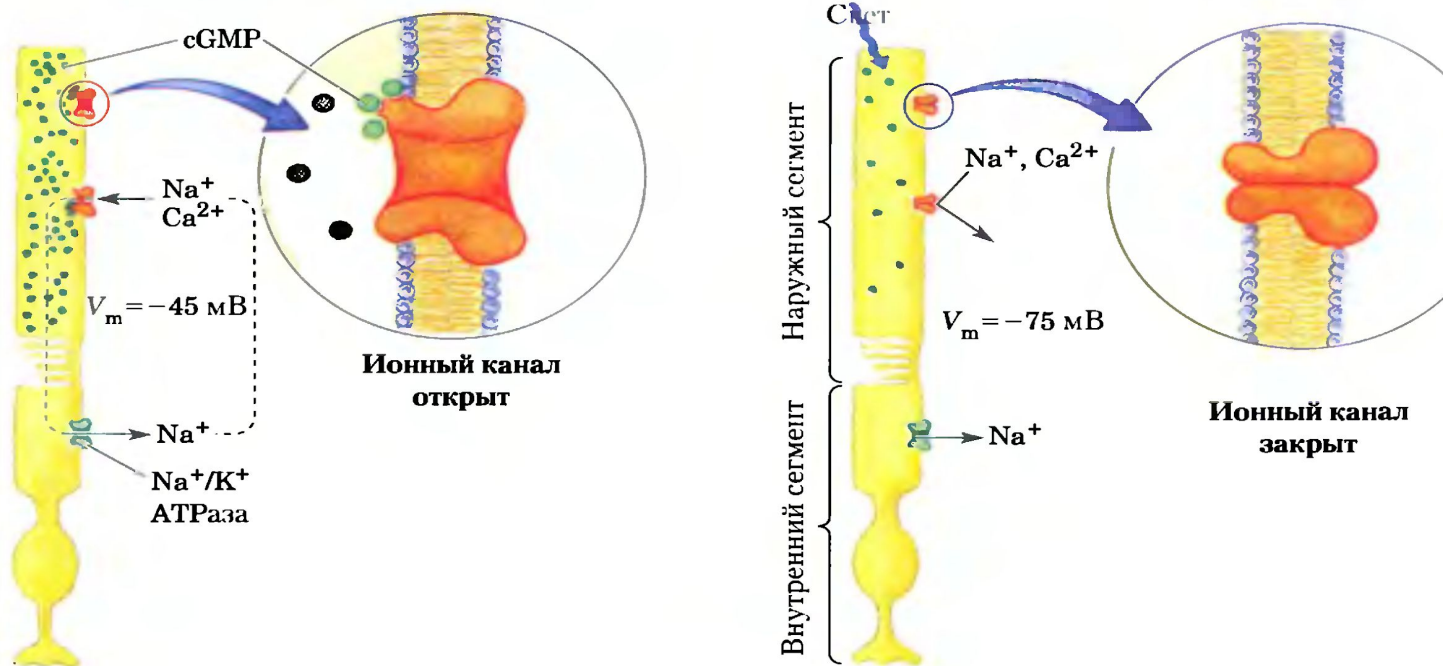


Рис. 12-36. Индуцированная светом гиперполяризация палочек. Палочка состоит из внешнего сегмента, который заполнен стопками мембранных дисков (здесь не показаны), содержащими фоторецептор родопсин, и внутреннего сегмента, в котором находятся ядро и другие органеллы. Колбочки имеют похожую структуру. Во внутреннем сегменте АТФ приводит в действие Na^+/K^+ -АТФазу, которая создает трансмембранный электрический потенциал, выкачивая наружу 3 Na^+ на каждые 2 K^+ , закачиваемые внутрь. Мембранный потенциал уменьшается из-за потока Na^+ и Ca^{2+} , поступающих в клетку через cGMP-регулируемые катионные каналы плазматической мембраны наружного сегмента. Поглощая свет, родопсин запускает процесс деградации cGMP (зеленые точки) в наружном сегменте, что приводит к закрытию катионного канала. В отсутствие входа катионов через этот канал клетка гиперполяризуется. Этот электрический сигнал передается в мозг посредством разных нейронов, показанных на рис. 12-35.



Химик Джон Дальтон (известный как автор атомной теории) страдал цветовой слепотой. Он считал вероятным, что стекловидное тело его глаз (жидкость, которая заполняет глазное яблоко позади хрусталиков) имело голубую окраску в отличие от бесцветной жидкости в нормальных глазах. Он предложил, чтобы после его смерти его глаза были проанализированы на предмет определения цвета стекловидного тела. Его желание было исполнено. Через день после смерти Дальтона в июле 1844 г. Джозеф Рэнсом извлек его глаза и обнаружил, что стекловидное тело было абсолютно бесцветным. Как и многие ученые, Рэнсом неохотно выбрасывал образцы. Он поместил глаза Дальтона в сосуд с консервантом (рис. 1), где они оставались в течение полутора столетий.

И вот в середине 1990-х гг. английские молекулярные биологи взяли образцы сетчатки глаз Дальтона и выделили ДНК. Используя генные последовательности, известные для опсинов красных и зеленых фотопигментов, они амплифицировали соответствующие

последовательности (применяя методики, описанные в гл. 9) и определили, что у Дальтона был ген опсина для красного фотопигмента, но не было гена опсина для зеленого фотопигмента. Дальтон был дихроматом, не различавшим зеленый цвет; это заболевание называют дальтонизмом по имени ученого. Так через 150 лет после смерти ученого начатый им эксперимент по проверке гипотезы о причине его цветовой слепоты был, наконец, завершен.

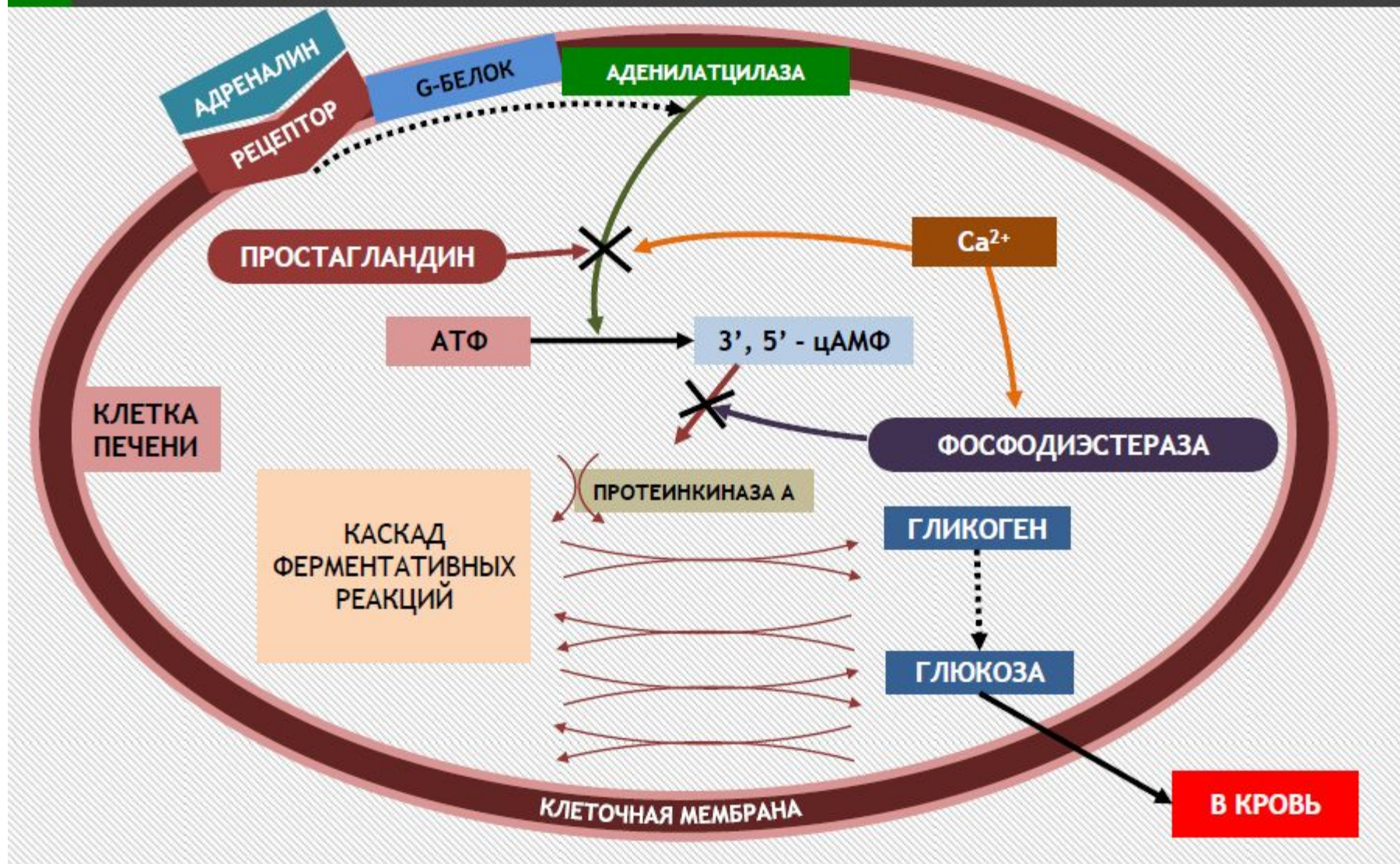


Рис. 1. Глаза Дальтона

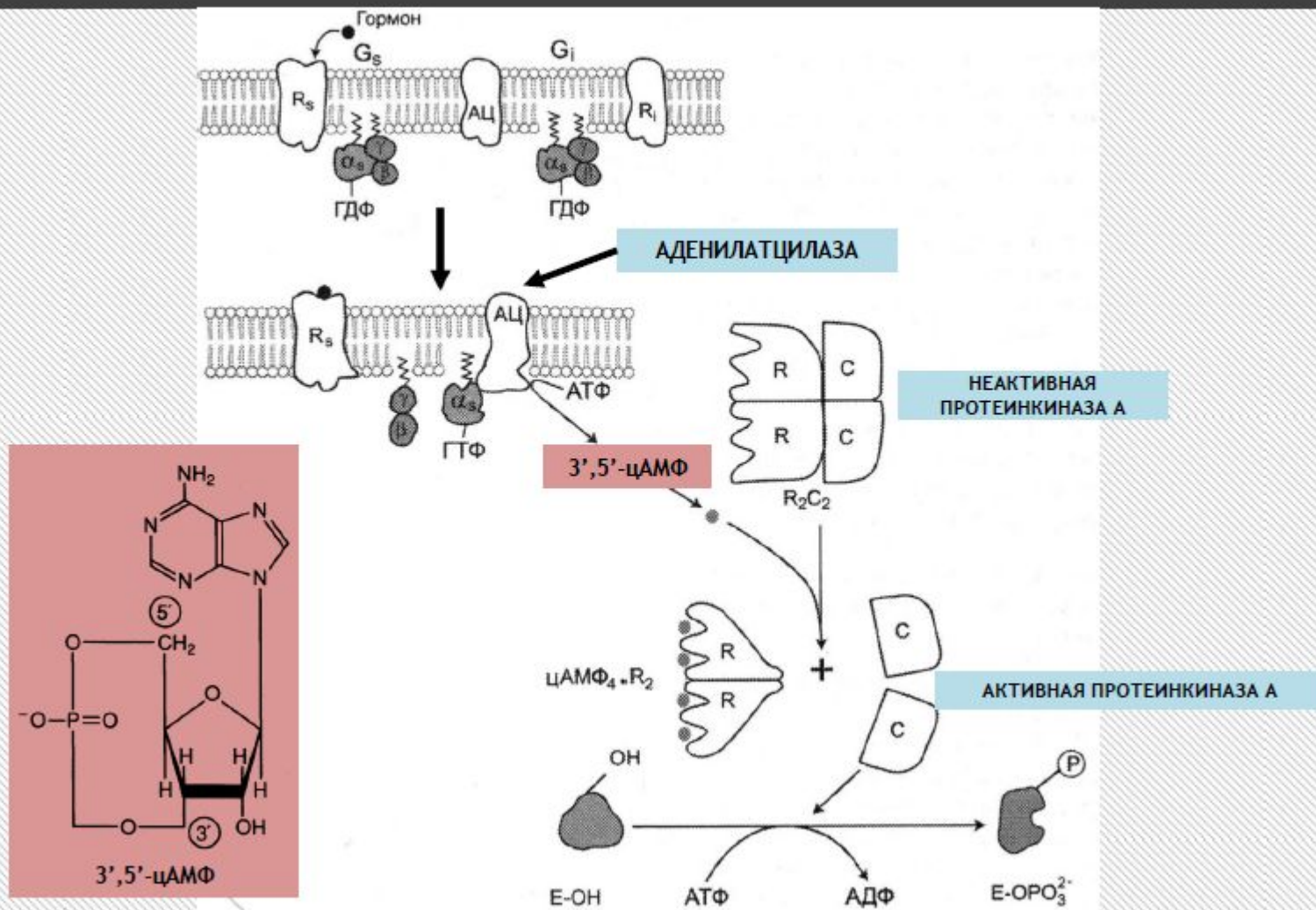
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АДРЕНАЛИНА

ПРОСТАГЛАНДИН - «АВАРИЙНЫЙ ВЫКЛЮЧАТЕЛЬ»

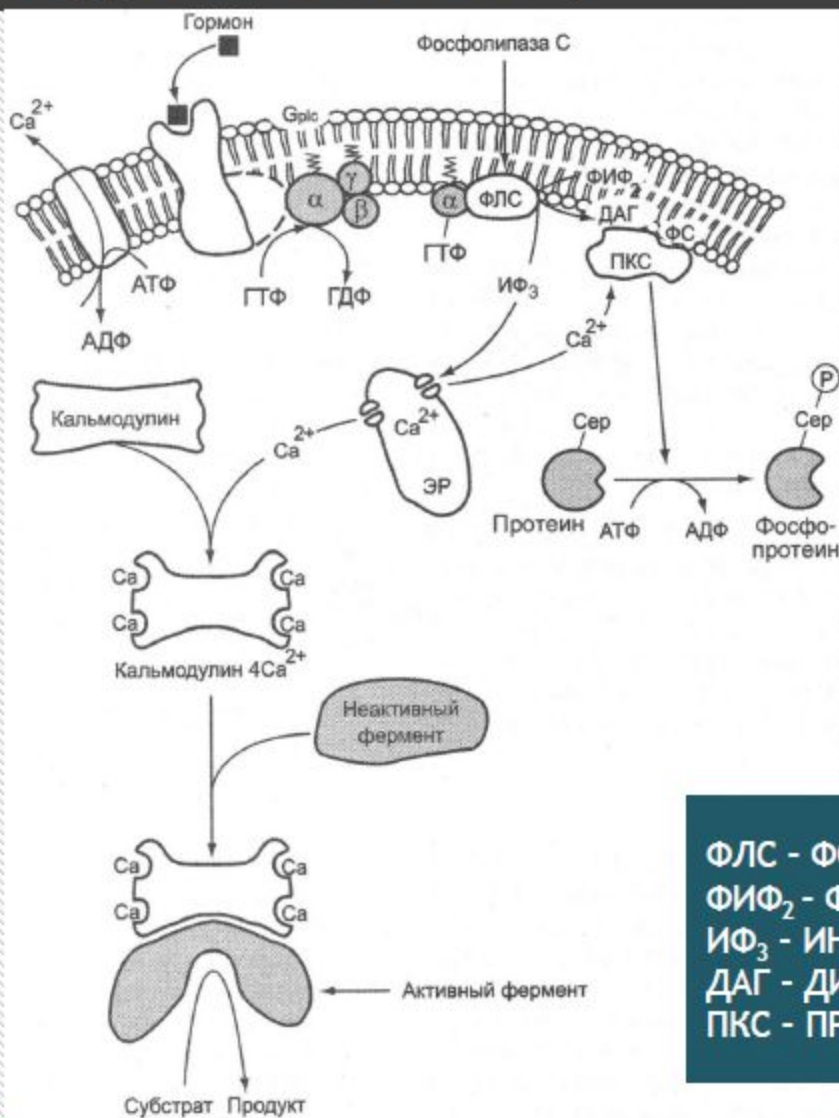
ФОСФОДИЭСТЕРАЗА - РАЗРУШАЕТ цАМФ



СИСТЕМА цАМФ (ДЛЯ ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ)



ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ (ДЛЯ ПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ)



ФЛС - ФОСФОЛИПАЗА С
 ФИФ₂ - ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-4,5-БИСФОСФАТ
 ИФ₃ - ИНОЗИТОЛТРИФОСФАТ
 ДАГ - ДИАЦИЛГЛИЦЕРОЛ
 ПКС - ПРОТЕИНКИНАЗА С