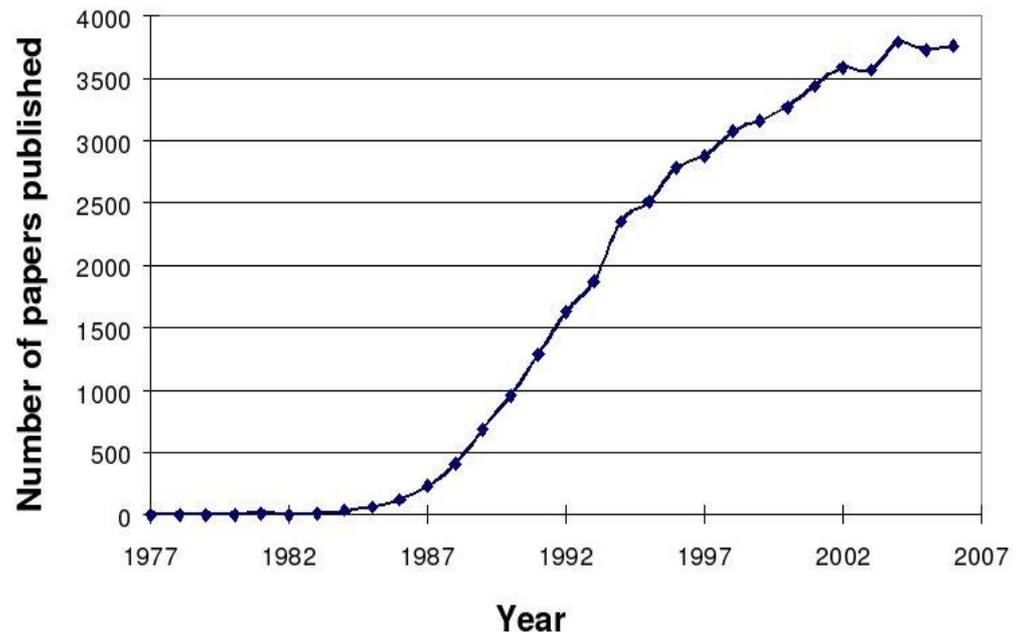


# **Система мессенджеров в сигнальной трансдукции**

Все типы клеток получают регуляторные сигналы из окружающей среды, декодируют их и передают во внутриклеточное пространство к соответствующим молекулам-мишеням.

**Сигнальная трансдукция (signal transduction)** – передача регуляторного сигнала внутри клетки. Происходит с помощью различных сигнальных путей с участием молекул мессенджеров и белков-посредников.

Термин «signal transduction» появился в научных журналах в 1972 г.



## Сигнальные молекулы.

Эндогенные молекулы, управляющие метаболизмом клеток: несут информацию для:



Прекращение внешней сигнализации (либо потеря клеткой способности воспринимать внешние сигналы) приводит к запуску программируемой гибели такой клетки (апоптоз).

**Регуляторные (управляющие) сигналы поступают в двух направлениях:**

**1. Снаружи □ внутрь.**

**Метаболизм каждого типа клеток определяет комплект рецепторов, воспринимающих сигналы, предназначенные именно этому типу клеток (в соответствии с её функциональной специализацией).**

**2. Изнутри □ к наружи.**

**Определенные типы клеток сами секретируют сигнальные молекулы. Эти молекулы действуют на:**

- близлежащие клетки (цитокины, паракринный эффект);**
- на большие расстояния (гормоны, эндокринный эффект).**

Каждый тип клеток имеет специфический **набор (комплект, паттерн) рецепторов**. Это даёт возможность каждому типу клеток **специфически отвечать на одновременное воздействие нескольких типов сигнальных молекул**, «выбирая» из этого потока сигналов только те, которые важны для её жизнедеятельности.

Комплект рецепторов **для данного типа клеток – величина постоянная** (сформировался в ходе эволюции). Число рецепторов и их аффинность к лигандам может изменяться (элемент регуляции метаболизма).

Внеклеточные сигнальные молекулы (**первичные мессенджеры**) действуют как на коротких, так и на длинных дистанциях:

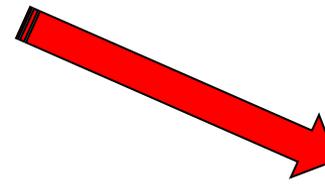
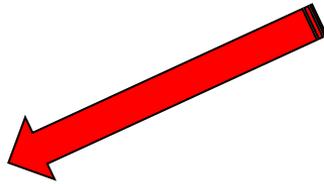
**Короткие дистанции:**

- **прямой контакт** клеточных мембран;
- **паракринная сигнализация**: одни клетки секретируют сигнальные молекулы, которые действуют на соседние однотипные клетки (сигнальные молекулы не поступают в кровоток);
- **аутокринная сигнализация** – передача сигнальной молекулы самой себе - посредством рецепторов к этой молекуле, которые клетка несёт на своей собственной поверхности.

**Длинные дистанции:**

- **синаптическая передача эл. сигнала** вдоль аксона с высвобождением в синапсе нейромедиатора/нейротрансмиттера;
- **эндокринная сигнализация**: химический сигнал (лиганд) – синтезируется в эндокринных железах и секретируется в кровоток, с помощью которого лиганд доставляется к клеткам-мишеням.

# Сигнальные молекулы – **мессенджеры** (от англ. «*messenger*» - *посланник*)



**Первичные мессенджеры:**  
молекулы, несущие регуляторный (информационный) сигнал для клетки из внешней среды.  
**Действуют во внеклеточном пространстве.**

**Вторичные мессенджеры:**  
молекулы, которые передают регуляторный (информационный) сигнал от первичных мессенджеров к внутриклеточным молекулам-мишеням (исполнительным молекулам).  
**Действуют внутри клетки.**

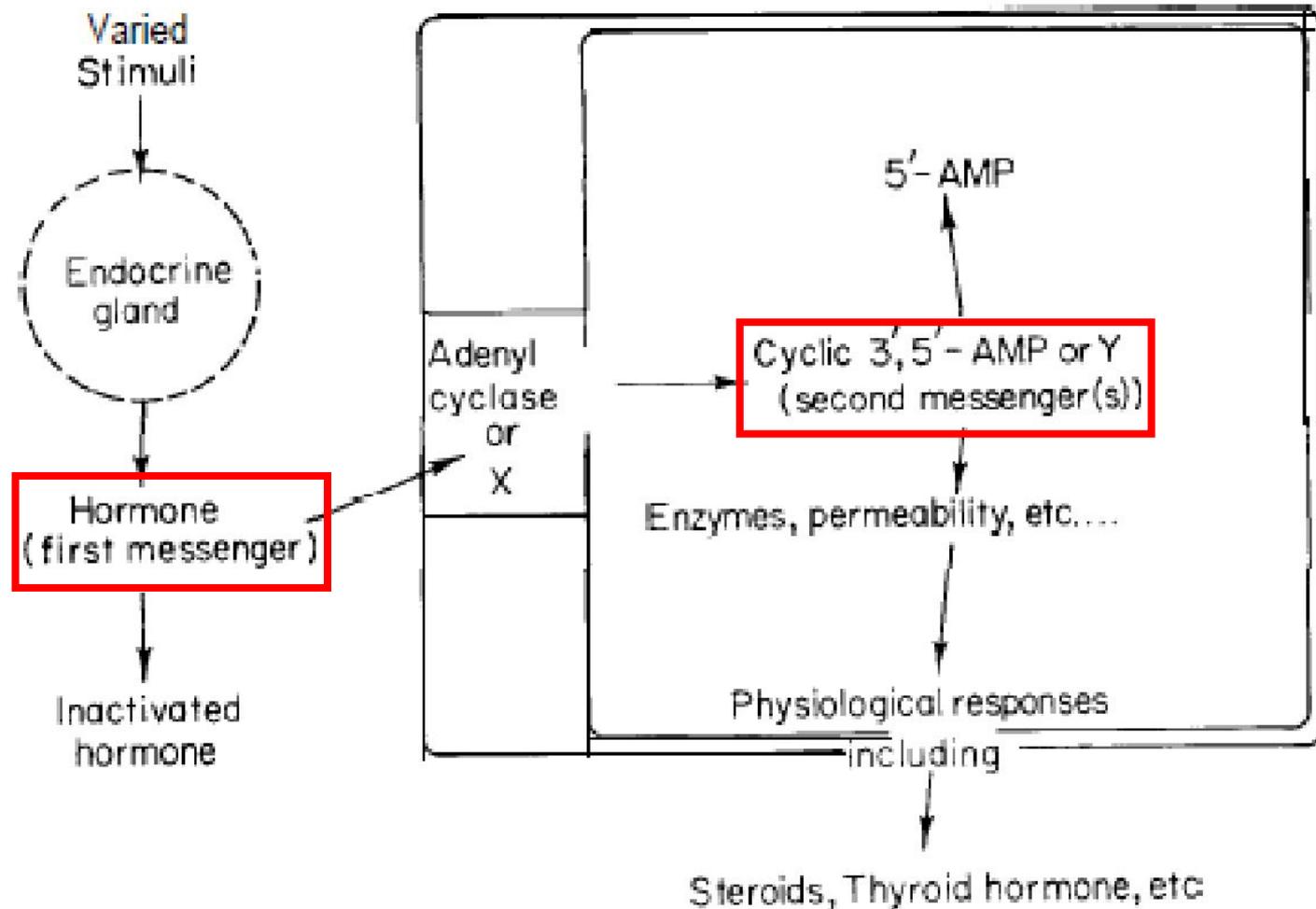


**Эрл Уилбур Сазерленд**  
(Earl Wilbur Sutherland)  
1915-1974

**Концепция первичных и вторичных мессенджеров** была сформулирована в первой половине 60-х годов XX в. в ходе изучения молекулярных механизмов передачи регуляторного сигнала от глюкагона или адреналина на внутриклеточный ферментативный каскад *гликогенфосфоорилазы* печени и мышц.

**Нобелевская премия по физиологии и медицине (1971 г.) «... за открытия, касающиеся механизмов действия гормонов».**

Э. Сазерленд открыл «посредническую» роль цАМФ во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов глюкагона и адреналина к гликогенфосфоорилазе: цАМФ активирует протеинкиназу, которая переводит фермент в активную форму.



Схема, иллюстрирующая концепцию первичного и вторичного мессенджеров. (Из статьи [Sutherland E. W. & Robison G. A. The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. Pharmac. Rev., 1966, 18, 145-161.](#))

**Первичные мессенджеры** – группа **эндогенных сигнальных биомолекул (лигандов)**, имеющих различное химическое строение, действующие на клетку путем **высокоаффинного связывания со специфическими рецепторами** (поверхностными или внутриклеточными) и способные **активировать механизм передачи регуляторного сигнала внутрь клетки**. **Внутри клетки не проникают.**

**Основные группы первичных мессенджеров:**

**1. Гормоны.** Синтезируются специализированными органами или клетками, отдаленными от клеток-мишеней. Транспортируются от места синтеза к местам действия по крови. Действуют посредством **высокоаффинного связывания со специфическими рецепторами**.

**2. Факторы роста.** Несут митогенный сигнал - стимулируют митоз и деление клеток. Для факторов роста у клеток есть специфические рецепторы. Факторы роста способны инициировать апоптоз и дифференцировку клеток. Действуют, как правило, на небольшом расстоянии – на соседние клетки (паракринно). В отличие от гормонов, эффекты факторов роста могут длиться несколько суток.

**3. Цитокины (IL, IFN, TNF, CSF).** Внеклеточные, сравнительно небольшой массы белки (10 – 30 кДа). Регулируют: функции клеток иммунной и гемopoэтической систем, переносят межклеточные сигналы в очаге воспаления, участвуют в эмбриональном развитии многих тканей. Действуют, в основном, паракринно, но могут и эндокринно.

**4. Нейромедиаторы (нейротрансмиттеры)** . Их выделение и связывание происходит внутри синаптической щели. Эффект медиатора (возбуждающий или тормозящий), определяется природой ионного канала, сопряженного с рецептором нейромедиатора.

**5. Вазоактивные агенты.** Гистамин, серотонин и брадикинина, а также эйкозаноиды: простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Все они служат для повышения проницаемости стенок сосудов в очаге воспаления для проникновения из кровотока лейкоцитов. Действуют паракринно и аутокринно.

**Вторичные мессенджеры** – малые гидрофильные молекулы, быстро и в больших количествах синтезируются внутри клетки в ответ на активацию рецептора первичными мессенджерами.

**Служат для внутриклеточной передачи и усиления сигнала.** Действуют в течение короткого времени и инактивируются различными способами.

**Основные свойства вторичных мессенджеров:**

- имеют относительно небольшую молекулярную массу, что позволяет мессенджеру быстро диффундировать по цитоплазме;
- способны быстро разрушаться (в соответствии со временем передачи сигнала), либо, как ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , быстро откачиваться из цитоплазмы до исходной концентрации:  $10^{-7}$  М.

## Семейство вторичных мессенджеров

**1. цАМФ.** Синтезируется с участием аденилатциклазы из АТФ. Синтез происходит быстро, но непродолжительно. **цАМФ** – аллостерический активатор **цАМФ-зависимой протеинкиназы А (ПКА)**.

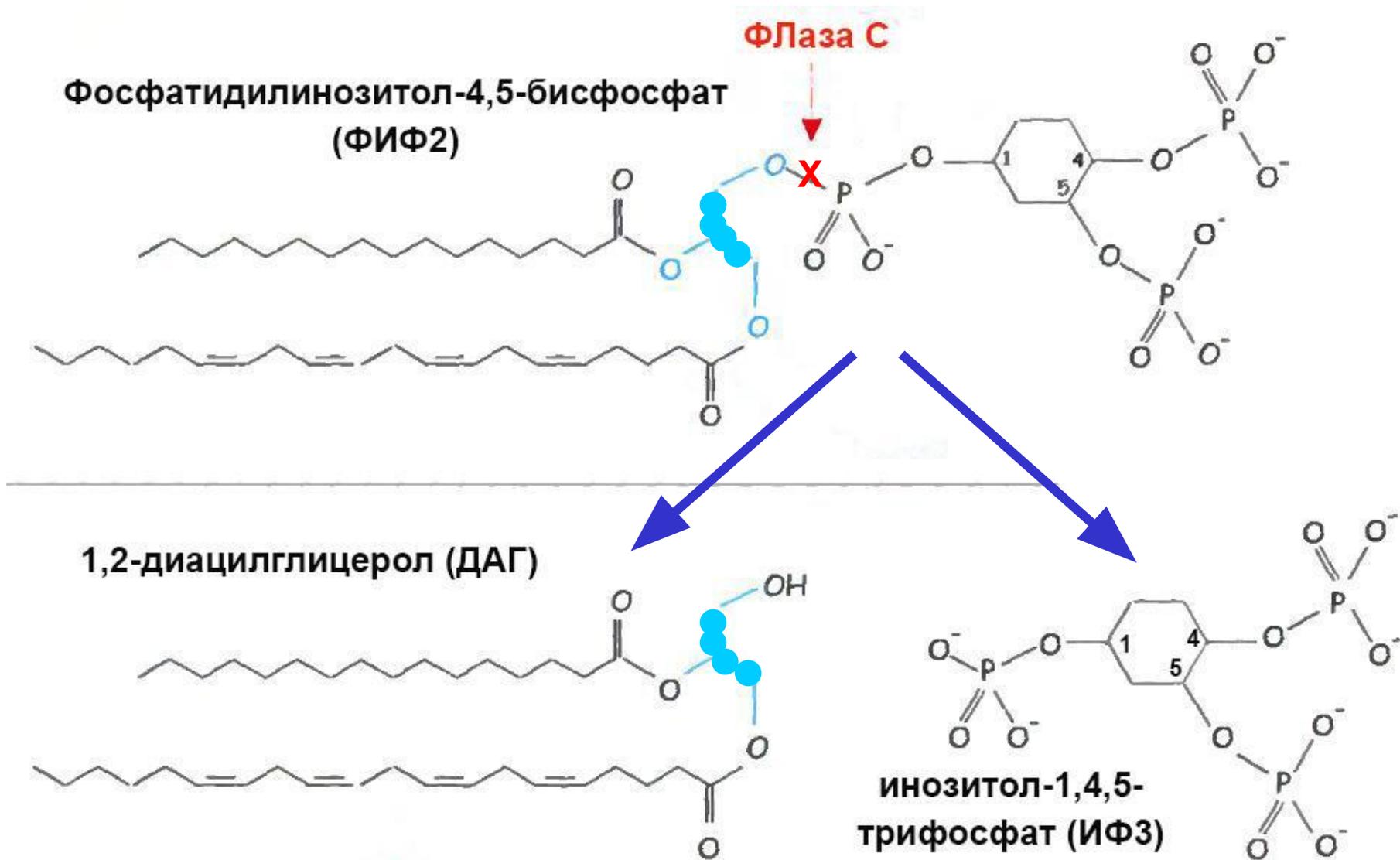
**2. цГМФ.** Синтезируется двумя разновидностями гуанилатциклазы - мембранной и растворимой в цитоплазме.

**Мембранный фермент** активируется артериальным натрийуретическим фактором и кишечным пептидом – гуанилином. Активатор **растворимой формы фермента** – внутриклеточный оксид азота (NO).

**3. Диацилглицерол (ДАГ).** Является первым продуктом действия фосфолипазы С (ФЛазы С) на мембранный (минорный) фосфолипид **фосфатидинозитол-2-фосфат (ФИФ2)**. Будучи гидрофобным, ДАГ остаётся во внутреннем слое плазматической мембраны. Там ДАГ взаимодействует с серин-треониновой протеинкиназой С (**ПКС**) и активирует её.

**4. Инозитол-3-фосфат (ИФ3)** – второй продукт, образуемый ФЛазой С. Является отщепленным головным концом **ФИФ2**. Благодаря отрицательному заряду, ИФ3 гидрофилен. Он диффундирует по цитоплазме и связывается с **ИФ3-активируемыми  $Ca^{2+}$ -каналами** мембран ЭР, чем стимулирует выход  $Ca^{2+}$  в цитоплазму. Увеличение  $[Ca^{2+}]$  также необходимо для активации **ПКС**: неактивная **ПКС** локализована в цитоплазме. Присоединив  $Ca^{2+}$ , **ПКС** встраивается в цитоплазматическую мембрану, связываясь с заряженной головкой ФС (-q).

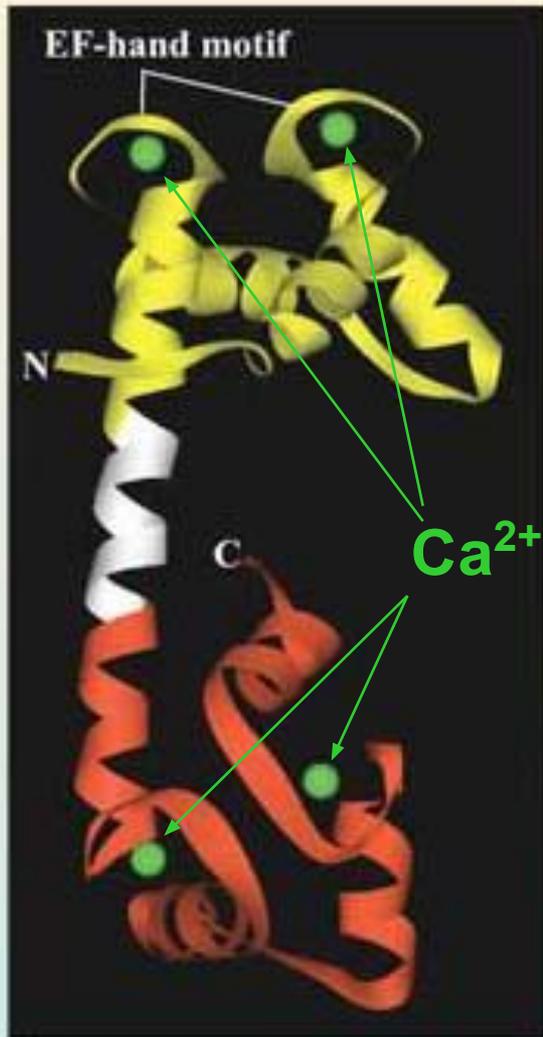
# Образование диацилглицерола и инозитолтрифосфата с участием фосфолипазы С



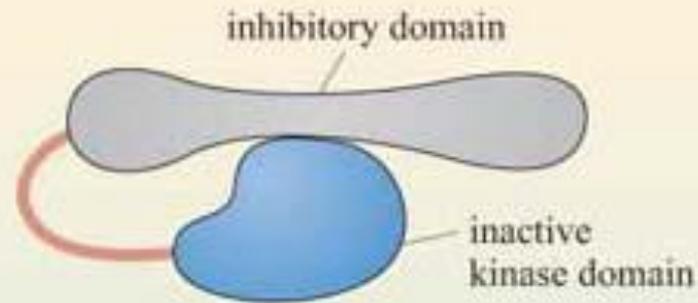
**5. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$ .** В цитоплазме нестимулированной клетке  $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$  М. Во всех клетках повышение  $[\text{Ca}^{2+}]$  до величины  $10^{-6}$  М, происходит в ответ на стимуляцию рецепторов, сопряженных с G-белком, что приводит к образованию ИФЗ (см. выше). Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  действуют:

- а). прямо со специфическими сайтами в молекулах ПК, образующих определенное семейство (например: ПКС);
- б). опосредованно, с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим белком **кальмодулином**. Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин (связывает 4 иона  $\text{Ca}^{2+}$ ) активирует ПК, принадлежащие к другому семейству: к **кальмодулин-зависимым ПК**.

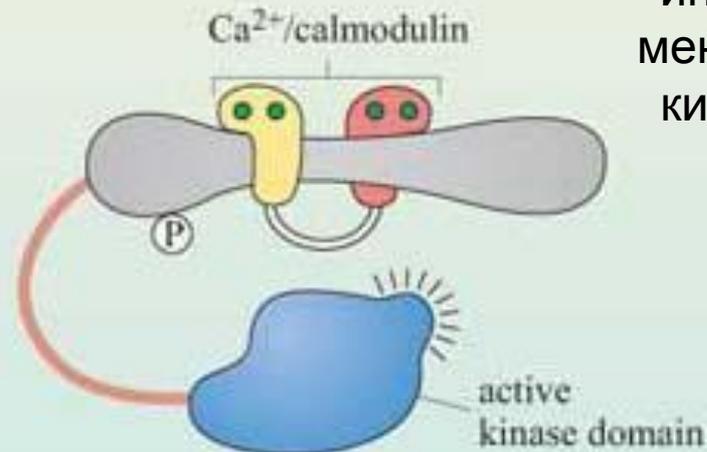
# Роль кальмодулина (CaM) в активации CaM-зависимой киназы



(a)



(i) inactive CaM kinase II



(ii) active CaM kinase II

(b)

Фосфорилирование ингибиторного домена стабилизирует киназу в активном состоянии.

Полную инактивацию CaM-киназы вызывает **специфическая фосфатаза** - отщепляет фосфорильную группу от ингибиторного домена.

**6. Оксид азота (NO).** Это газообразное соединение, являющееся свободным радикалом (имеет неспаренный электрон), что придает ему высокую реакционную способность: время жизни  $\leq 6-10$  с. NO самая «маленькая» молекула среди известных вторичных мессенджеров.

NO синтезируется из аргинина с участием фермента **NO-синтазы**. Три изоформы NO-синтазы: две формы конститутивные: **eNOS** (эндотелий сосудов) и **nNOS** (нервная система) и одна форма – индуцибельная (**iNOS**). iNOS появляется при воспалении, иммунных и некоторых других реакциях в макрофагах и в ряде других клетках (гепатоцитах). NO легко проникает через мембрану и влияет на соседние клетки без участия рецепторов. NO может действовать как аутокринно (в той же клетке), так и паракринно (диффундировать к соседним клеткам).

Мишень NO - растворимая (цитоплазматическая) **гуанилатциклаза**. Необычность этого фермента: он катализирует образование вторичного мессенджера – цГМФ, но активируется другим вторичным мессенджером – NO. Мишенью цГМФ является протеинкиназа G (PKG).

# I. Основные структурные элементы мембранных рецепторов (рецепторов клеточной поверхности)

Рецепторы - **гликопротеиды**. Распознав специфический лиганд (первичный мессенджер) и связавшись с ним, **рецептор изменяет свою конформацию**, что необходимо для передачи сигнала внутрь клетки на молекулу-мишень, часто с помощью вторичного мессенджера.

**Внеклеточный домен.** Его формирует N-конец цепи, функция – распознать и связаться с молекулой первичного мессенджера.

**Трансмембранный домен.** Состоит из одной или нескольких  $\alpha$ -спиралей (ацетилхолиновый рецептора формирует трансмембранную пору или ионный канал). При связывания лиганда домен меняет свою конформацию, влияя на конформацию внутриклеточного домена, либо пропускает специфический ион.

**Внутриклеточный (цитоплазматический) домен.** Формирует C-конец цепи, функция - передача сигнал от первичного мессенджера внутрь клетки. Два пути:

- домен связывается с внутриклеточными сигнальными белками (посредниками), которые доставляют сигнал к месту - молекуле-мишени;
- домен может сам обладать ферментативной активностью, либо связывается с внутриклеточным ферментом и активирует его.

# Классификация рецепторов клеточной поверхности (рецепторов клеточной мембраны)

1. **Рецепторы, сопряженные с G белками** (G-protein coupled receptors – GPCR) или семиспиральные рецепторы.
2. **Каталитические рецепторы** – обладают собственной тирозин- и серин/треонин-протеинкиназной активностью, либо гуанилатциклазной активностью.
3. **Рецепторы не каталитические** – после активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами, активируя их.
4. **Регулируемые ионные каналы** (лиганд-активируемые ионные каналы).

# 1. Рецепторы, сопряженные с G белками (G-protein coupled receptors – GPCR) или семиспиральные рецепторы.

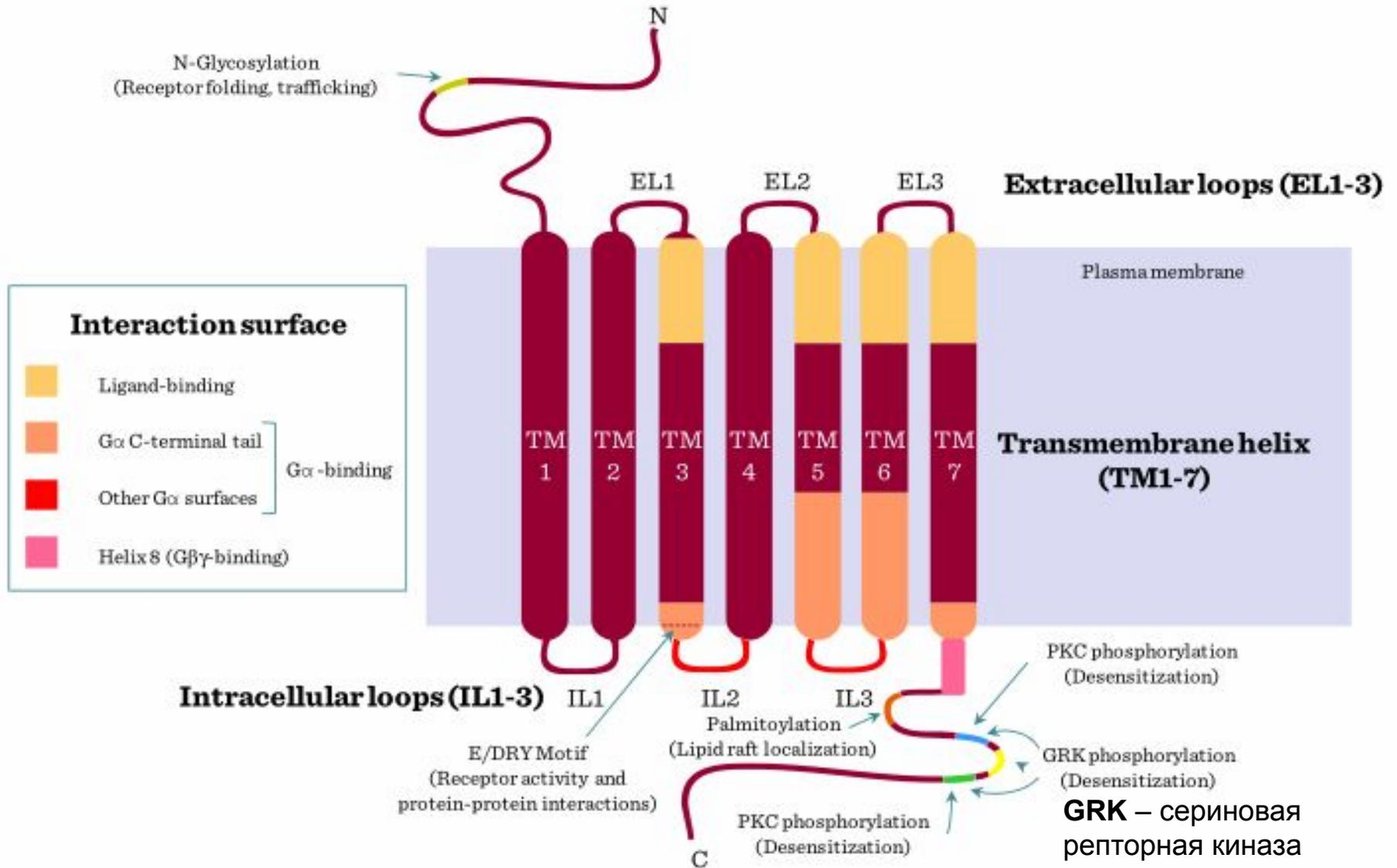
Образованы одной полипептидной цепью, 7 раз пронизывающей мембрану. Трансмембранные фрагменты –  $\alpha$ -спирали (20-28 гидрофобных аминокислот).

Самый эволюционно древний класс рецепторов, известно около тысячи различных лигандов (в т.ч. к этому классу относятся «орфан-рецепторы»). Типичные лиганды: адреналин, норадреналин, пептидные гормоны (в т.ч. глюкагон) - действуют через  $\beta$ -адренорецепторы, а также нейропептиды, дофамин, опиоиды.

После активации рецепторы обретают способность взаимодействовать с гетеротримерными G-белками, которые связаны с внутренним липидным слоем плазматической мембраны. G-белки состоят из трех субъединиц:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -. Их активация приводит к диссоциации  $\alpha$ -субъединицы от  $\beta, \gamma$ -димера. Основной эффект оказывает  $\alpha$ -субъединица (её разновидности):

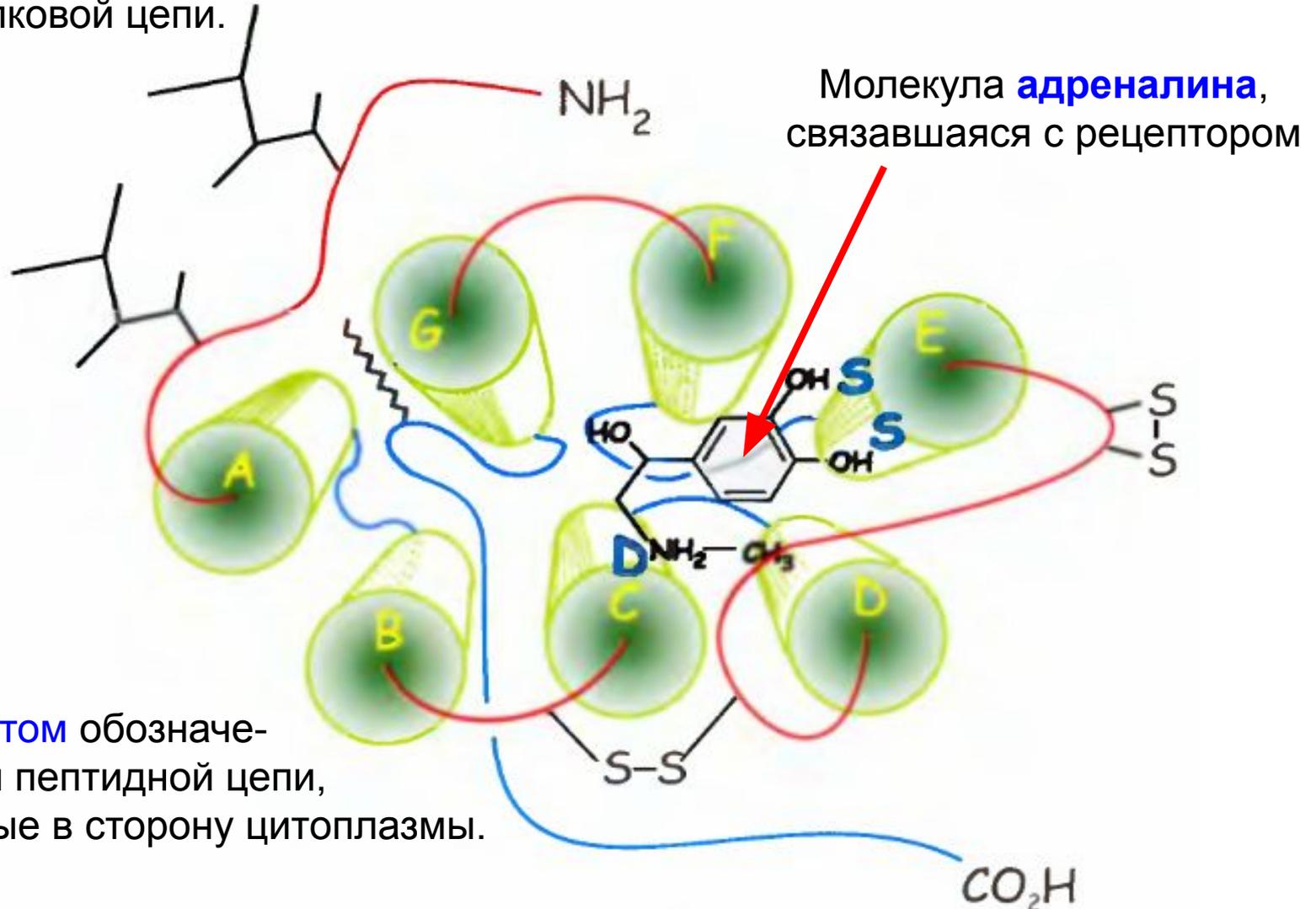
- а). влияет на активность аденилатциклазы, которая синтезирует цАМФ ( $G_s$  и  $G_i$ -белки, содержащие  $G\alpha_s$  - и  $G\alpha_i$  – субъединицы).
- б). активирует Флазу  $C\gamma$  : синтез ДАГ и ИЗФ ( $G\alpha_q$ -белки).

# Строение GPCR-рецептора (плоскостная модель)



## 3D-модель GPCR - рецептора

Плоскость слайда – соответствует наружной поверхности клеточной мембраны. **Красным цветом** обозначены участки пептидной цепи, обращенные во внеклеточное пространство. **Зеленые цилиндры** – трансмембранные  $\alpha$ -спиральные участки белковой цепи.



## 2. Каталитические рецепторы – обладают собственной тирозин- или серин/треонин-протеинкиназной активностью (рецептор-ассоциированные киназы) и гуанилатциклазной активностью.

Вторая по численности группа рецепторов после GPCR. Рецепторы имеют один трансмембранный домен. В результате связывания с лигандом, конформация всей молекулы рецептора меняется, что приводит к димеризации рецептора и «включению» во внутриклеточных доменах **собственной ферментативной активности**:

2.а. протеинкиназной (ПК) активности (тирозинкиназной активности);

2.б. гунилатциклазной (ГЦ) активности.

## 2.а. Рецепторы с тирозинкиназной активностью.

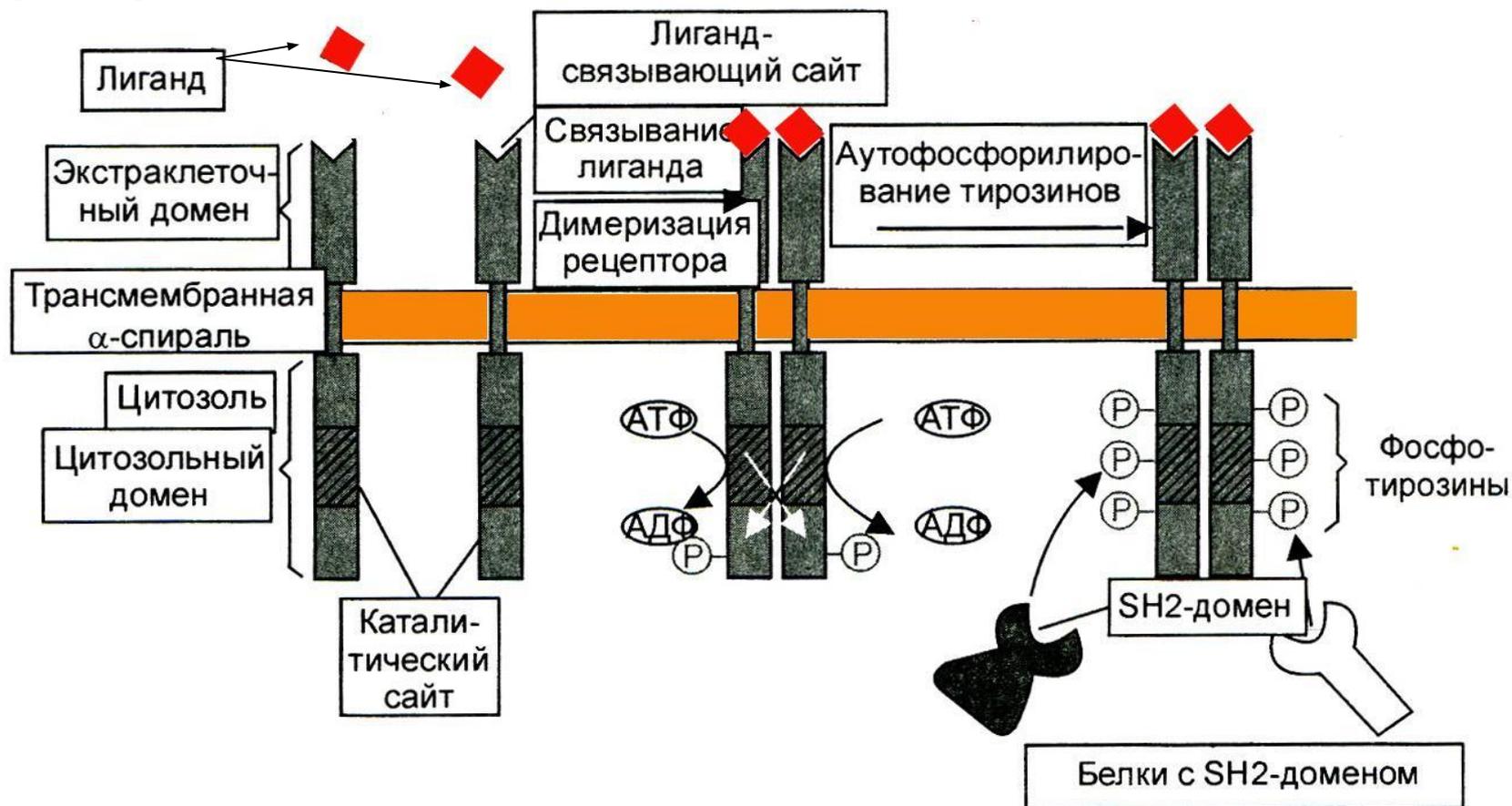
Важнейшие лиганды: **инсулин** и **различные факторы роста**.

Характерное проявление их активации и изменения конформации – образование димеров. Как **гомодимеров** (простое усиление сигнала), так и **гетеродимеров** - **два разных рецептора из этого же класса** (увеличение числа внутриклеточных сигнальных путей, запускаемых одним лигандом).

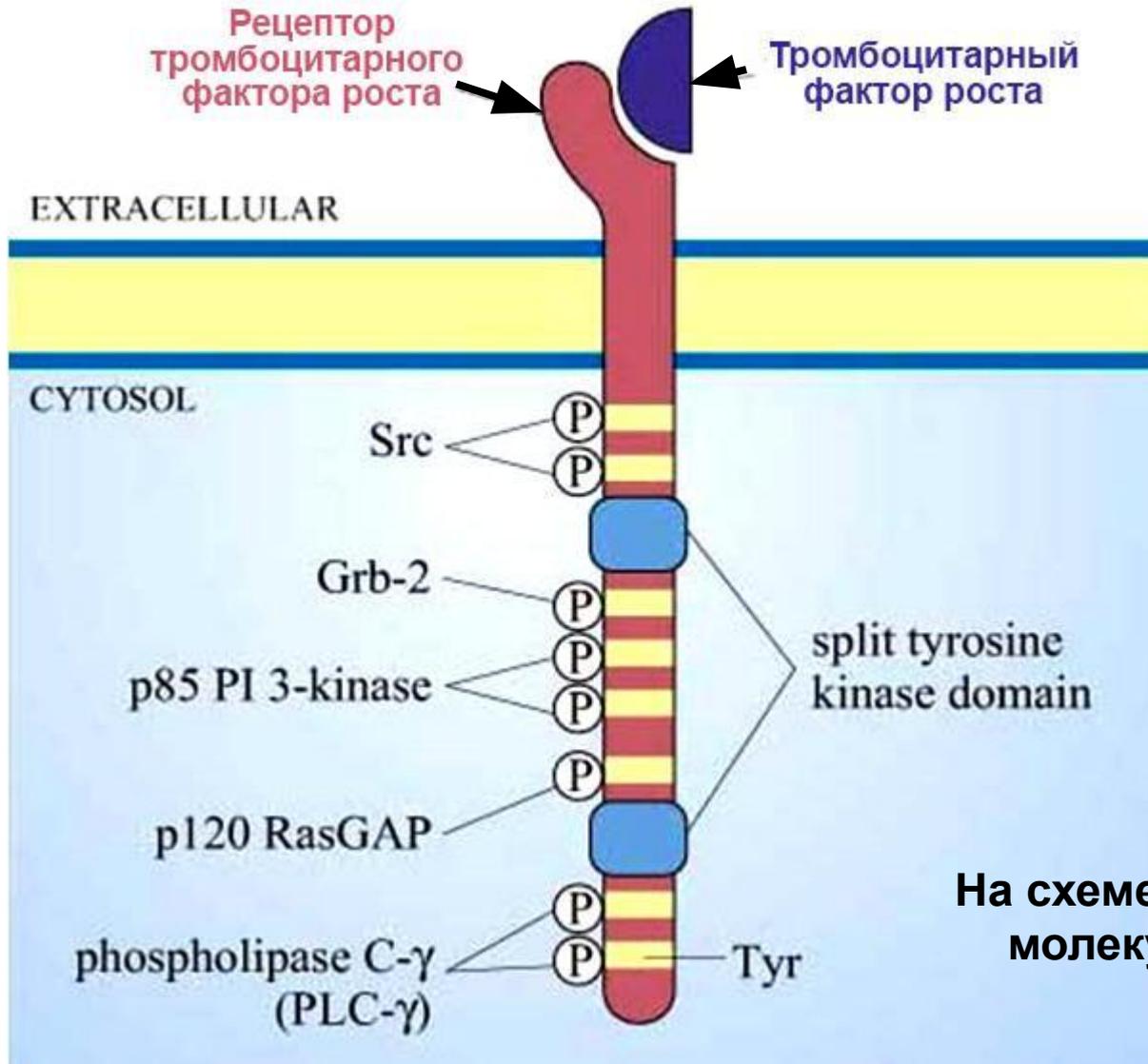
В результате димеризации рецепторов, в их цитозольных доменах «включается» тирозинкиназная активность. Благодаря ей происходит аутофосфорилирование остатков тирозина цитозольных доменов - на их поверхности появляются **фосфотирозины (докинг-участки)**, по которым связываются различные внутриклеточные сигнальные **белки – посредники**, содержащие **SH2-домены**.

# Схема активации рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью

Связывание лиганда с рецептором → димеризация → активация собственной тирозинкиназной активности → аутофосфорилирование остатков тирозина на поверхности цитозольных доменов рецепторов.



# Образование нескольких фосфорилированных остатков тирозина на цитозольном домене активированного рецептора к тромбоцитарному фактору роста (результат аутофосфорилирования)



Фосфорилированные остатки тирозина, образуют **участки связывания (докинг-участки)** для внутриклеточных сигнальных белков (показаны на рисунке), содержащих **SH2-домены**.

SH2-домены распознают фосфотирозины.

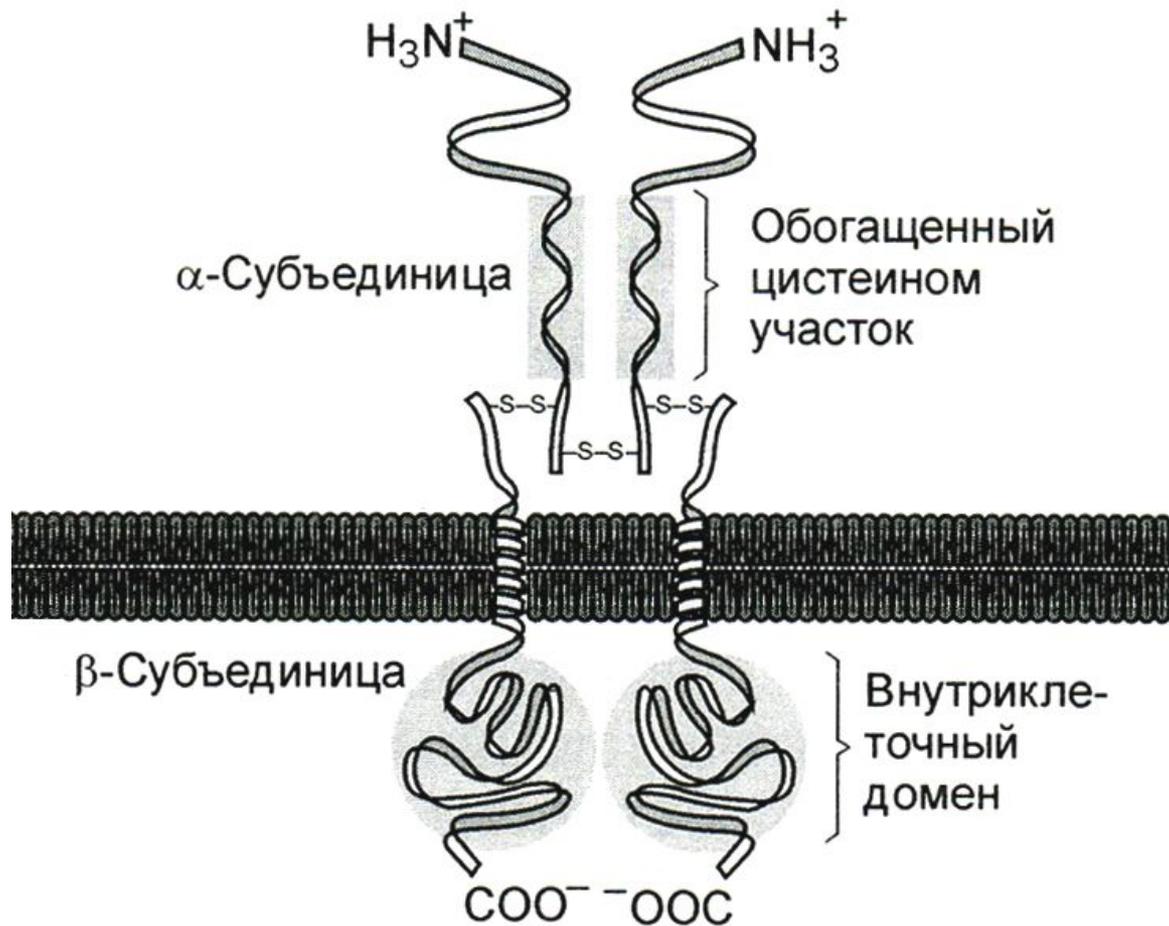
На схеме показана одна из двух молекул димера рецептора

**Пример гетеродимера**: классический рецептор к фактору роста эпидермиса (ФРЭ) + его разновидность (**ErbB-3**) = **ФРЭ + ErbB-3**. Фосфотирозины в **ErbB-3** распознаются SH2–доменами в составе **фосфатидилинозитол-3-киназы**, которая при этом активируется: два пути, включаемые одним лигандом – вактором роста эпидермиса.

**NB:** Тирозинкиназная активность м.б. «выключена» в результате фосфорилирования внутриклеточного домена рецептора по остаткам серина и треонина под действием ПКА и ПКС.

Рецептор инсулина – изначально является тетрамером:  
**2 $\alpha$ -субъединицы** (распознавание и связывание гормона) и  
**2 $\beta$ -субъединицы**, соединённые **-S-S- мостиками**.

### Рецептор инсулина



**2.6. Рецепторные гуанилатциклазы (ГЦ)** – катализируют синтез **вторичного мессенджера цГМФ (гуанозин-3'5'-монофосфата)**

Рецептор локализован в цитоплазматической мембране. Цитозольный домен обладает активностью ГЦ: **ГТФ**  $\square$  **цГМФ**

Рецептор имеет две изоформы.

1 изоформа: лиганд - **артериальный натрийуретический фактор (АНФ)**. **АНФ** высвобождается из эндотелиоцитов предсердий, когда существенно увеличивается объем перекачиваемой сердцем крови. **АНФ** действует на клетки собирательных трубочек почек и увеличивает в них концентрацию цГМФ. В результате почки усиливают выделение ионов  $\text{Na}^+$  (и воды). Потеря воды снижает объем крови, что ослабляет стимул, вызвавший выделение **АНФ**.

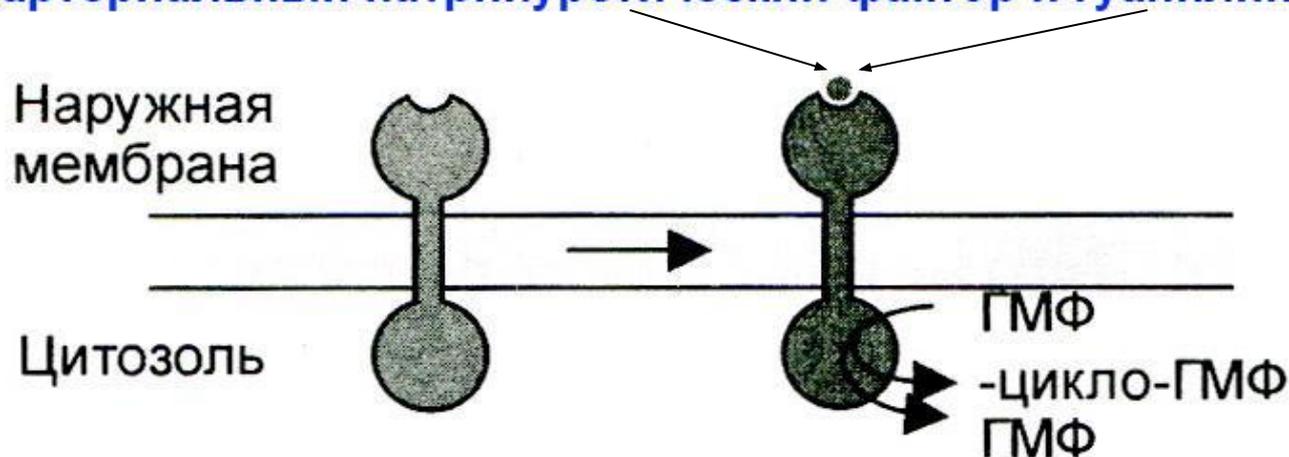
В кровеносных сосудах цГМФ действует на гладкую мускулатуру цГМФ, вызывает вазодилатацию.

2 изоформа: лиганд – **гуанилин**. Это пептид, выделяемый эпителиоцитами кишечника. Гуанилин регулирует секрецию ионов  $\text{Cl}^-$  в кишечнике.

Рецептор гуанилина способен взаимодействовать с эндотоксином *E. coli* и другими грам-отрицательными бактериями. В результате усиливается секреция ионов  $\text{Cl}^-$ , что уменьшает реабсорбцию воды из кишечника - возникновение диареи.

## Рецепторная гуанилатциклаза

(артериальный натрийуретический фактор и гуанилин)



**цГМФ** активирует **цГМФ-зависимую ПК (PKG, ПКГ)**, которые фосфорилируют в белках-мишенях остатки серина и треонина.

**цГМФ** – разрушается специфической **цГМФ-фосфодиэстеразой**.

### 3. **Рецепторы не каталитические** – после активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами. Рецептор рекрутирует внутриклеточные киназы. (Рецепторы цитокинов)

Связывание лиганда с рецептором изменяет его конформацию и вызывает димеризацию. Типичные лиганды этого класса рецепторов: **цитокины**. Цитозольные домены рецептора приобретают способность нековалентно взаимодействовать с внутриклеточными **протеинкиназами** и активировать их:

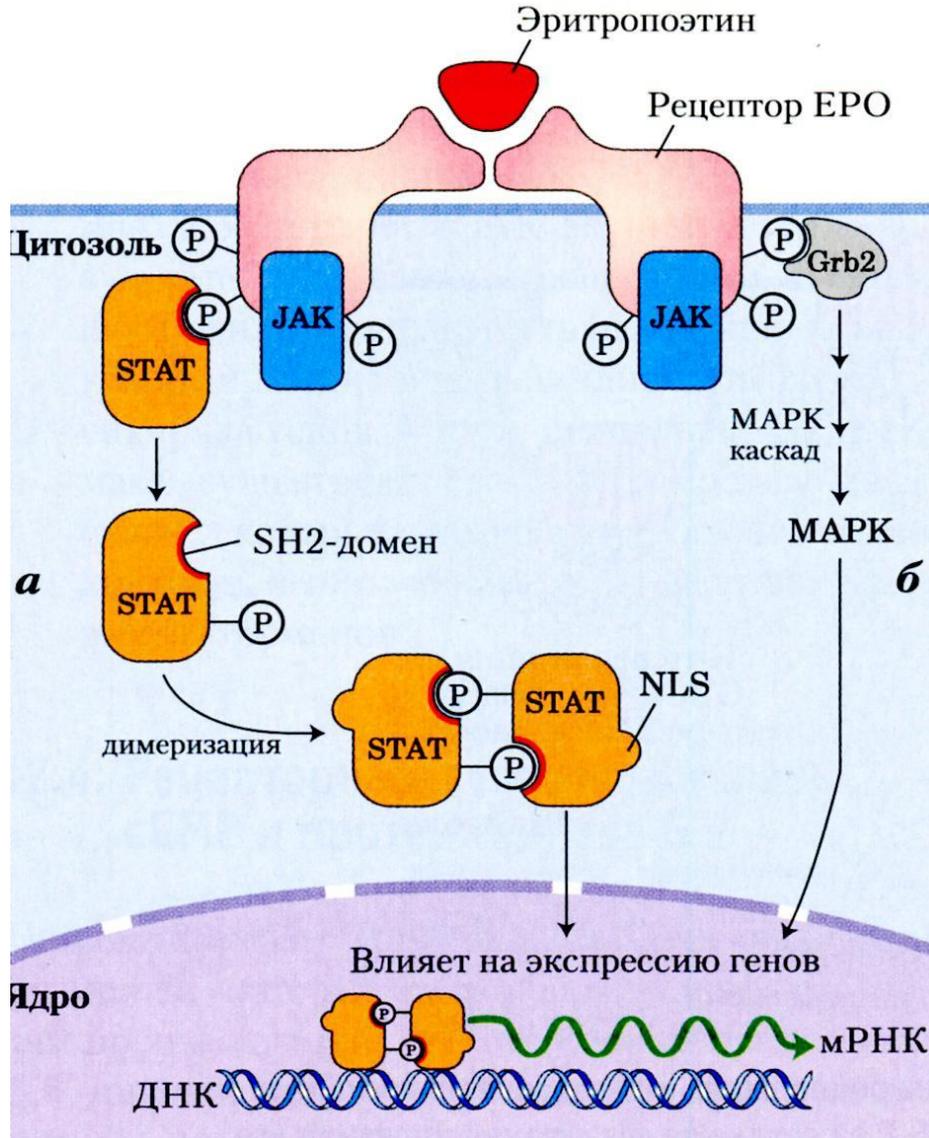
- с тирозиновой киназой **Src** (прикрепелена к внутреннему слою плазматической мембраны);
- с тирозиновой киназой **Янус-киназой (JAK)**, растворима в цитоплазме, содержит два активных центра: киназный и псевдокиназный).

Обе киназы фосфорилируют остатки тирозина в составе цитозольных доменов рецептора. Фосфотирозины нужны для связывания внутриклеточных **белков-посредников** (имеющих SH2-домены), которые передают сигнал «вниз по течению» к молекулам-мишеням.

**JAK** действуют посредством **транскрипционных факторов: STAT - signal transducers and activation transcription** ). Неактивный **STAT** находится в цитоплазме. Связывание **STAT** с фосфотирозином рецептора создаёт условия для его фосфорилирования с участием **JAK**. [**JAK** сначала фосфорилирует остатки тирозина в рецепторе, затем в **STAT**]. Активный (фосфорилированный) **STAT** образует гомодимер, который проникает в ядро и вызывает экспрессию специфических генов.

**Важно:** к фосфотирозинам цитозольного домена рецептора цитокина эритропоэтина (образовавшимся с участием JAK) может также присоединяться белок **Gbr2 (Growth factor receptor-bound protein 2)** . После фосфорилирования с участием **JAK**, **Gbr2** запускает **MAPK-каскад** (подобно инсулину), что также изменяет экспрессию специфических генов. Ещё один пример того, как **один цитокин может одновременно запускать два сигнальных внутриклеточных пути: JAK-STAT-путь и MAPK-каскад.**

# Схема инициации двух сигнальных путей эритропоэтином путём образования гетеродимера из рецепторов с различными свойствами



**Путь а)** – активирует синтез белков, необходимых для созревания эритроцитов.

**Путь б)** – JAK активирует белок Grb-2, что запускает MAPK-каскад

#### 4. Регулируемые ионные каналы (лиганд-активируемые ионные каналы или каналы, сопряженные с рецептором).

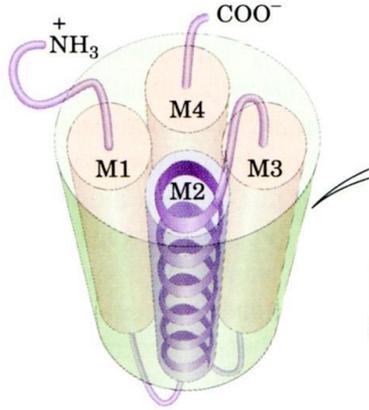
Типичный пример: **н-ацетилхолиновый рецептор**.

Молекула рецептора имеет бочкообразный силуэт и образована пятью субъединицами (**2 $\alpha$** ,  **$\beta$**  -,  **$\gamma$** - и  **$\delta$** - субъединицы). В состав каждой субъединицы входит по 4  $\alpha$ -спирали. Их С- и N- концы обращены в цитоплазму. Субъединицы окружают одну трансмембранную пору. Есть два участка для связывания двух молекул **ацетилхолина**, расположенных на двух  $\alpha$ -субъединицах со стороны поры. Ниже расположена «заслонка», образуемая  $\alpha$ -спиралью. При связывании с ацетилхолином, рецептор претерпевает конформационную перестройку, что вызывает смещение «заслонки» - пора открывается и ионы  $\text{Na}^+$  входят в цитоплазму.

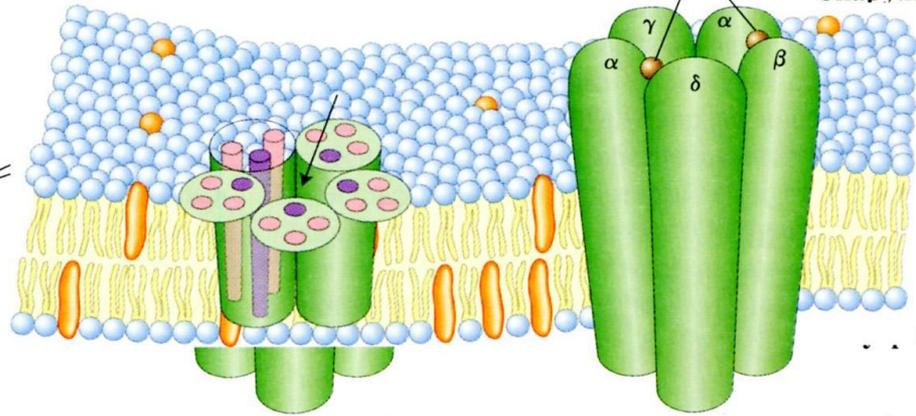
Ионные каналы **открываются на несколько миллисекунд**, но за это время через канала проходит поток ионов,  **$V=10$  млн. ионов/с**.

# Схема работы регулируемого н-ацетилхолином ионного канала

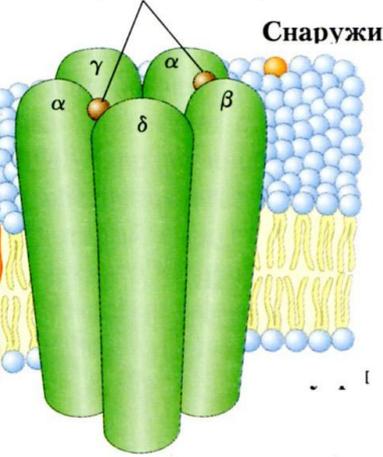
**а** Субъединица содержит четыре трансмембранные  $\alpha$ -спирали



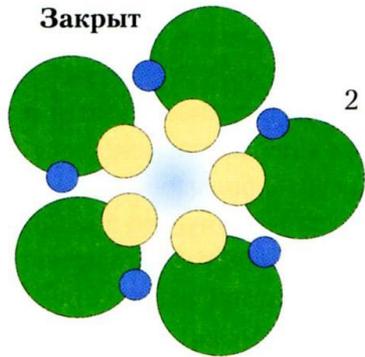
**б** Канал окружают амфифильные спирали M2



**в** Сайты связывания ацетилхолина

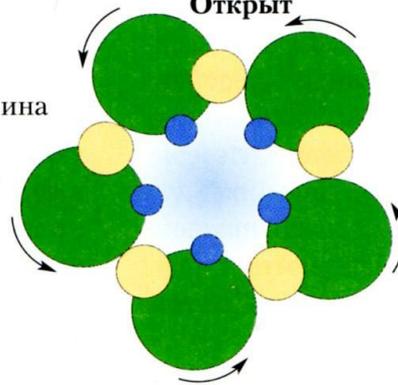


**г** **Закрит**



2 Ацетилхолина

**Открыт**



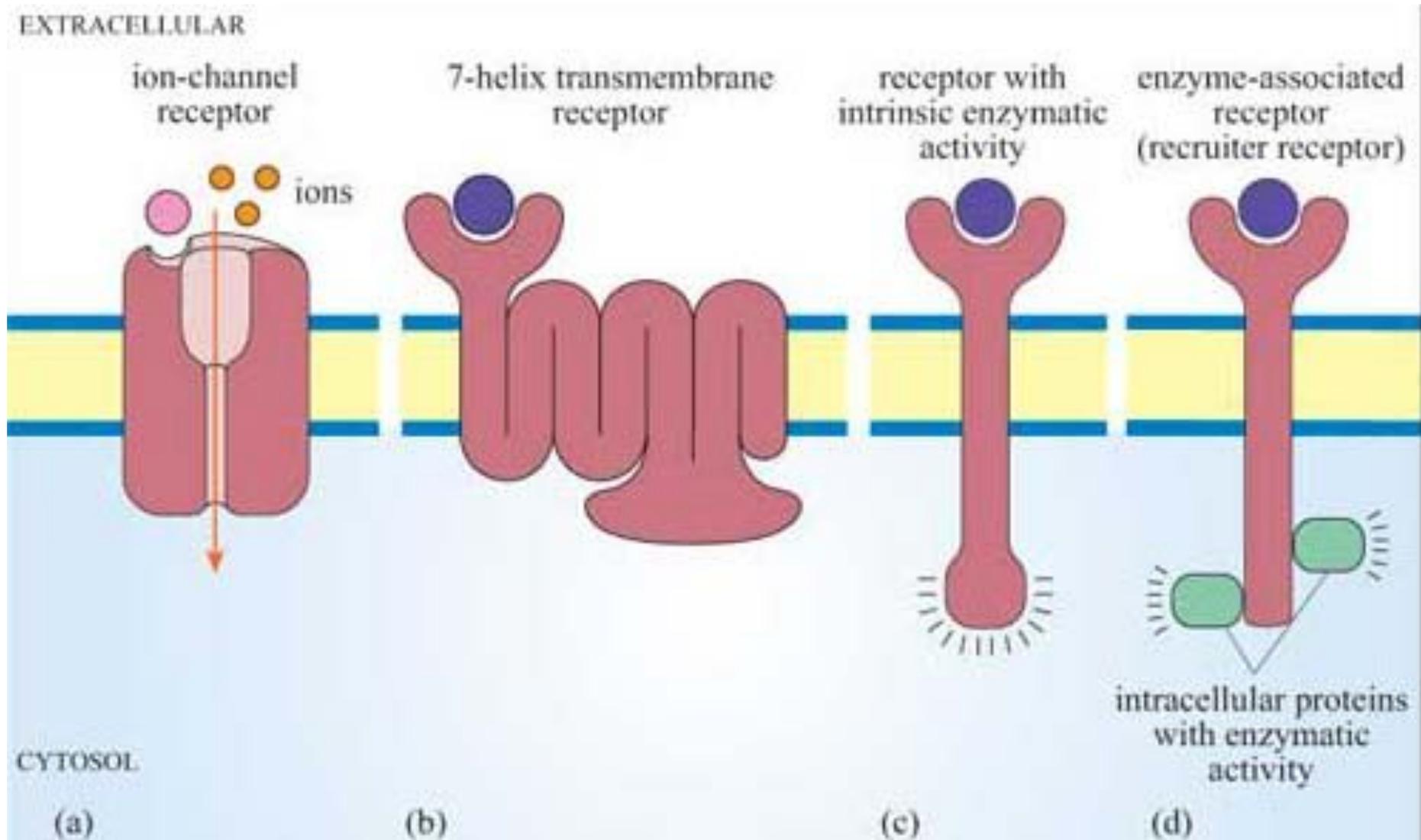
В спирали M2 крупные гидрофобные боковые цепи остатков Leu закрывают канал.

Связывание двух молекул ацетилхолина вызывает проворачивание спиралей M2.

Теперь в канал обращены полярные остатки меньшего размера.

Связывание лиганда приводит к повороту спирали M2, что увеличивает диаметр канала – появляется проход для ионов.

# Четыре основных класса рецепторов цитоплазматической мембраны



## Основные механизмы активации мембранных рецепторов

1. Конформационная перестройка (рецепторы-ионные каналы и GPCR);
2. Димеризация (рецепторы с собственной ферментативной активностью и рецепторы, рекрутирующие внутриклеточные ферменты).

## Основные механизмы инактивации мембранных рецепторов

1. **Деградация лиганда.** Холинэстераза разрушает ацетилхолин, связанный со своим рецептором.
2. **Секвестрация лиганда.** Лиганд связывается с **внеклеточным белком**, содержащим лиганд-связывающий домен. Такой белок удаляет лиганд с рецептора.
3. **Десенситизация рецептора.** GPCR может быть фосфорилирован по остаткам серина в цитозольном домене при помощи внутриклеточной PKC. По этим участкам связывается внутриклеточный белок **аррестин**. **Комплекс рецептор-аррестин уже не способен передавать сигнал «низ по течению».** Комплекс рецептор-аррестин поглощается путём эндоцитоза.

## II. Внутриклеточные рецепторы

Связывают **малые, липофильные молекулы**, которые легко преодевают барьер цитоплазматической мембраны: **стероидные** и **тиреидные гормоны**, а также **витамин Д**. Локализация: цитоплазма, поверхность ядра и внутри ядра.

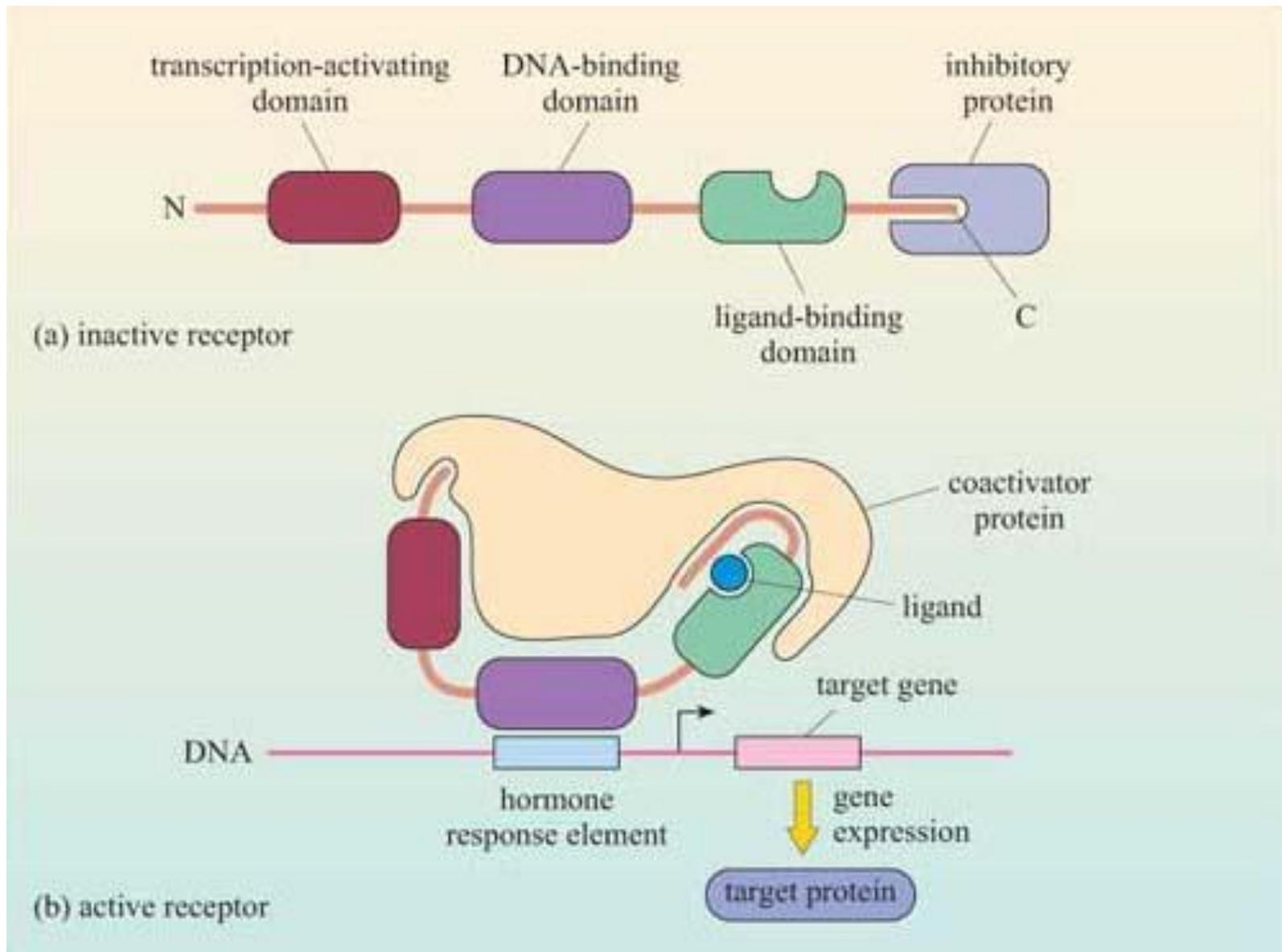
### Строение рецептора:

- **домен** для распознавания и связывания лиганда
- ДНК-связывающий **домен**
- **домен** активации транскрипции

В отсутствии лигандов, рецепторы находятся в неактивной конформации (поддерживается с помощью **ингибирующих белков – шаперонов/Hsp**). Связывание лиганда индуцирует активную конформацию рецептора, что сопровождается диссоциацией ингибирующего белка. Активированный лиганд-рецепторный комплекс диффундирует в ядро где связываться с участком ДНК посредством своего ДНК-связывающего домена. Помимо этого, лиганд-рецепторный комплекс способен связываться с другими белками: белками-коактиваторами транскрипции.

Участок ДНК, с которым связывается комплекс лиганд-рецептор, является промотер-регионом таргетного гена и называется **гормон-респонсивным элементом = hormone response element (HRE)**.

# Внутриклеточный рецептор и механизм его активации лигандом



# ТРАНСДУКЦИЯ СИГНАЛА ВНУТРИ КЛЕТКИ ПОСРЕДСТВОМ ВТОРИЧНОГО МЕССЕНДЖЕРА - цАМФ

Гормоны, увеличивающие внутриклеточную концентрацию **цАМФ**: **адреналин** (мышцы) и **глюкагон** (печень, адипоциты). В адипоцитах **глюкагон** стимулирует липолиз (гидролиз ТАГ с участием гормончувствительной **ТАГ-липазы**).

**Адренаин** действуют посредством  **$\beta$ -адренорецепторов** (разновидность **GPCR**). **Глюкагон** – посредством другой разновидности **GPCR**.

Активированный лигандом **GPCR**, изменяет конформацию, что сообщает его цитозольному домену способность взаимодействовать с **гетеротрименным G-белком** и активировать его. Известны:  **$G\alpha_s$**  и  **$G\alpha_i$** -белки (стимуляторы и ингибиторы **аденилатциклазы, АЦ**), а также  **$G\alpha_q$** -белки – активаторы **ФЛазы С- $\gamma$** . Иными словами, активация **GPCR** запускает не менее 2-х сигнальных путей:

- путь **цАМФ**;
- путь  **$Ca^{2+}$ /фосфатидилинозитола**.

$\alpha$ -субъединица в составе G-белков содержит **нуклеотид-связывающий сайт** для **гуаниновых нуклеотидов (ГДФ/ГТФ)**. Активация **G<sub>s</sub>**-белка состоит в замене **ГДФ** на **ГТФ** в этом сайте, что происходит благодаря контакту с цитозольным доменом активированного рецептора GPCR. Комплекс **ГТФ- $\alpha$ -субъединица** отделяется от  **$\beta,\gamma$ -димера** и активирует **АЦ** (синтез цАМФ происходит в пределах нескольких секунд).

G-белки обладают собственной **ГТФазной активностью**: ГТФ  $\square$  ГДФ. Спустя несколько минут после активации АЦ, собственная ГТФаза в составе активной  $\alpha$ -субъединицы превращает ГТФ в ГДФ. Это индуцирует «самосборку» гетеротримерного G-белка (неактивного) и проведение сигнала от гормона прерывается – **самовыключение G-белка**.

аденилатциклаза (АЦ)

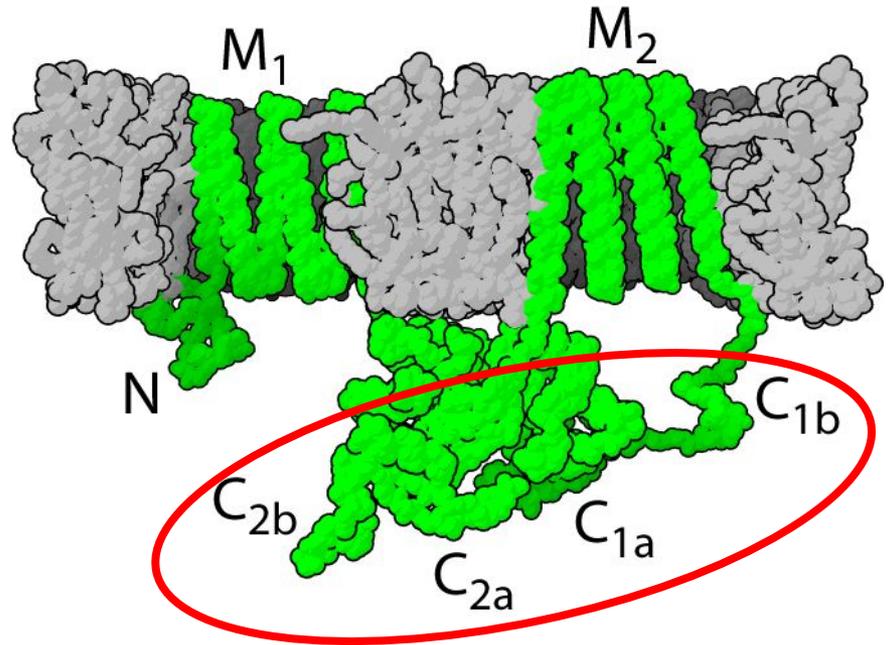
АТФ



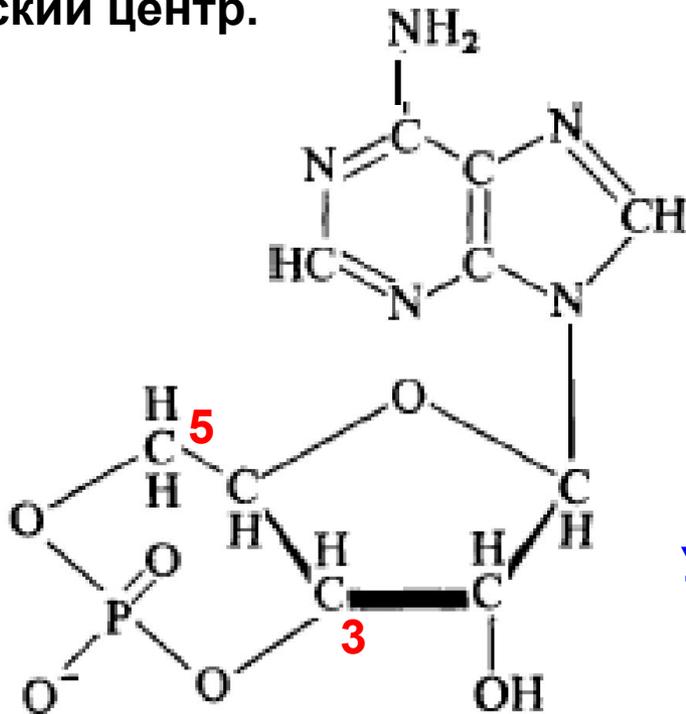
циклический-3'5'-АМФ + ФФН

ГТФ- $\alpha$ -субъединица  $G_s$ -белка

АЦ – трансмембранный белок: 12 трансмембранных сегментов (6 сегментов  $\times$  2,  $M_1$  и  $M_2$ ) и цитозольный сегмент, С). Области  $C_1$  и  $C_2$  цитозольного фрагмента формируют каталитический центр.



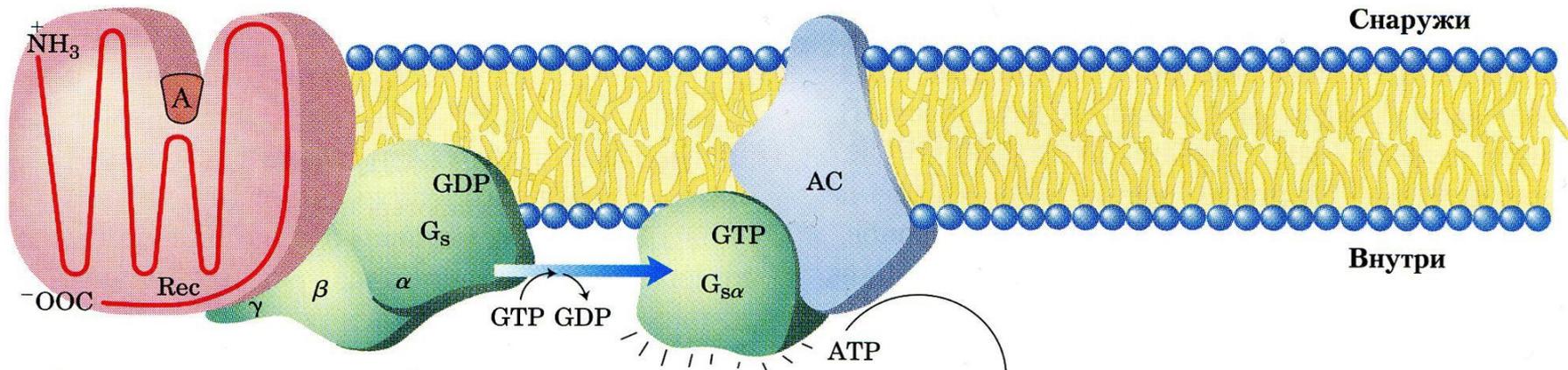
цитоплазма



Структура молекулы цАМФ.  
Установлена Д. Липкиным в 1959 г. (США).  
Первоначально биофункции молекулы  
оставались не известными.

# Механизм повышения внутриклеточной концентрации цАМФ под влиянием адреналина

① Адреналин присоединяется к специфическому рецептору.



② Занятый рецептор вызывает замещение GDP, связанного с  $G_s$ , на GTP, активирующий  $G_s$ .

③  $G_s$  ( $\alpha$ -GDP GTP) придвигается к аденилатциклазе и активирует ее.

④ Аденилатциклаза катализирует образование сАМФ.

⑤ сАМФ активирует РКА.

⑥ Фосфорилирование клеточных белков протеинкиназой А (РКА) вызывает клеточный ответ на действие адреналина.

⑦ сАМФ разлагается, прекращается активация РКА.

фосфодиэстераза циклических нуклеотидов

5'-AMP

В ответ на действие соответствующего стимула **концентрация цАМФ** в цитозоле **увеличивается в 20 раз в течении нескольких секунд.**

# Строение и функционирование ПКА

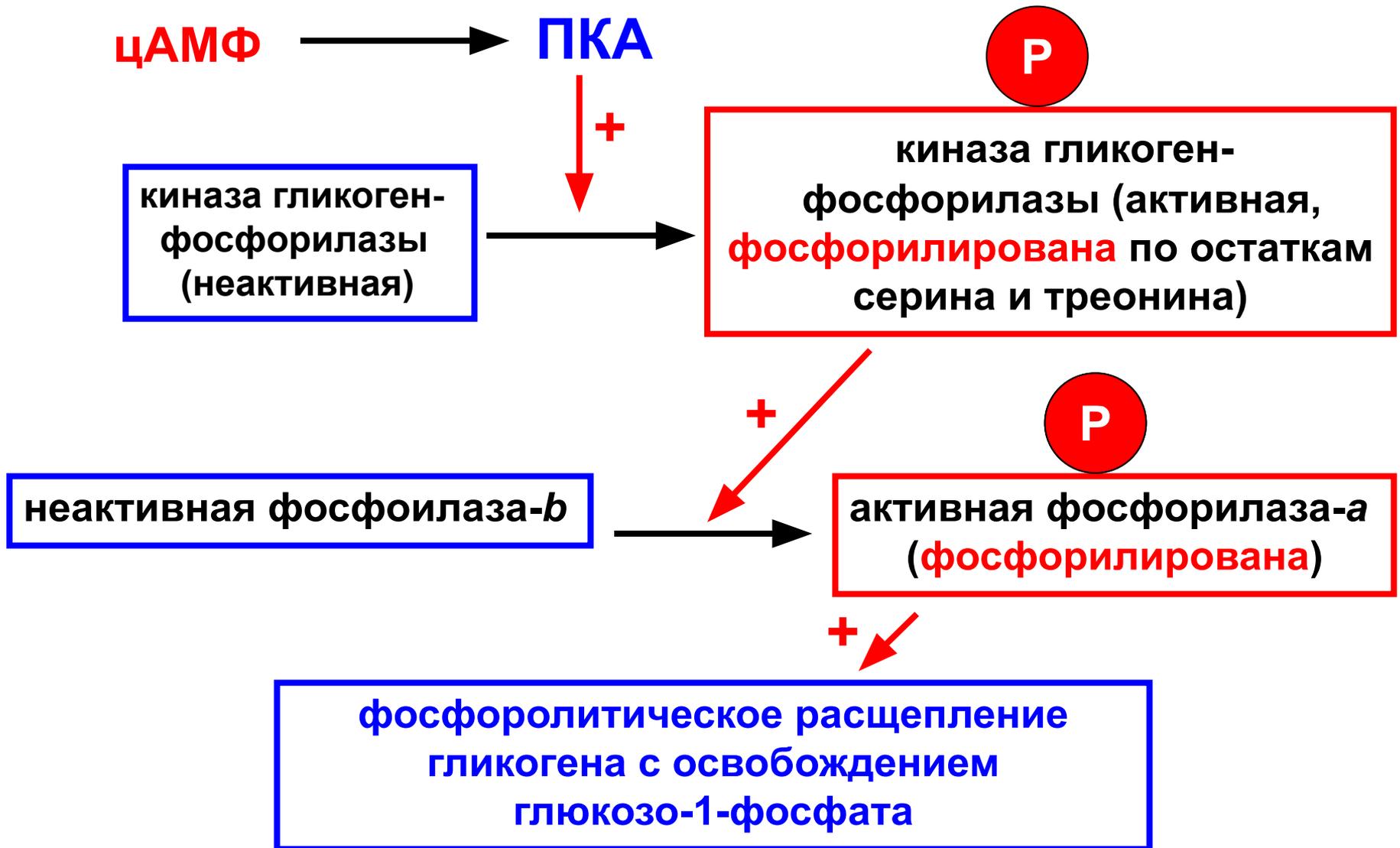
Молекула **ПКА** состоит из 2 **регуляторных (R)** и 2 **каталитических (C)** субъединиц.

Тетрамёрный комплекс **2R2C** неактивен: аутоингибирующий домен в **R** - субъединице занимает субстратсвязывающие центры в каждой из **C** – субъединиц.

В результате связывания **двух молекул цАМФ** с каждой из **R** – субъединиц, последние претерпевают конформационные изменения в результате которых комплекс 2R2C диссоциирует, освобождая **две активированные каталитические C – субъединицы**.

Активированная ПКА распознает в белках-мишенях особые, **консенсусные последовательности аминокислот** и фосфорилирует там остатки **серина** и **треонина**.

# цАМФ-зависимая протеинкиназа А (ПКА), серин/треониновая



## Белки, заякоривающие протеинкиназу А (АКАР – A kinase anchoring proteins).

Эти белки обеспечивают физическую связь между каталитической субъединицей (С) ПКА и специфической внутриклеточной структурой. *Например*: связывание и удерживание ПКА с микротрубочками и актиновыми микрофиламентами клеточного скелета, с  $Ca^{2+}$ -каналами, с митохондриями и ядром.

Благодаря различным заякоривающим белкам, содержащимся в различных типах клеток, цАМФ получает возможность в одних клетках стимулировать фосфорилирование белков в митохондриях, а в других клетках – фосфорилировать актиновые филаменты.

Иными словами, ПКА «привязана к нужным белкам»; цАМФ её активирует, а ПКА, фосфорилируя «нужный» белок, изменяет его активность. *Близкое расположение цАМФ-активируемых ферментов к «месту» их действия, по-видимому, важно для максимальной скорости ответа.*

В клетках-мишенях каждого типа экспрессируется **собственный набор протеинкиназ А и киназа-активируемых путей.**

**Одна система передачи информации может быть использована для контроля нескольких специфических биохимических процессов.**

## Усиление сигнала от гормонов, действующих посредством вторичного мессенджера цАМФ.

1 молекула гормона активирует 1 молекулу РЕЦЕПТОРА, который активирует несколько G-белков. Каждая молекула G-белка стимулирует несколько молекул АЦ. Каждая молекула АЦ синтез множество молекул цАМФ. цАМФ активирует одну молекулу ПКА, каждая из которых активирует множество мишеней: фосфорилаз гликогена. Итог каскада – **усиление гормонального сигнала на несколько порядков.**

Это объясняет, почему для эндокринной регуляции требуется очень низкая концентрация гормона в крови – как правило,  $10^{-10}$  М.

# Механизмы прекращения сигнализации посредством рецептора и синтеза цАМФ:

1. Включение собственной ГТФазной активности  $\alpha$ -субъединицы, наступает через несколько минут после активации рецептором  $G_s$ -белка. Замена ГТФ на ГДФ в составе  $\alpha$ -субъединицы приводит к потере её активности и сборке неактивного гетеротримерного  $G_s$ -белка;
2. Снижение концентрации адреналина в крови приводит к диссоциации комплекса гормон – рецептор;
3. Рецептор (находящийся в форме комплекса с гормоном) фосфорилируется по цитозольному домену специфической ПКС, что лишает рецептор способности контактировать с  $G_s$ -белком и активировать его. Окончательная инактивация рецептора происходит с участием белка **аррестина**: комплекс фосфорилированный рецептор-аррестин поглощается клеткой путем **эндоцитоза**.

4. Сама цАМФ разрушается с участием специфической фосфодиэстеразы:



5. Специфические фосфатазы **дефосфорилируют** ферменты, активированные ПКА.

Т.о., **цАМФ образуется в пределах секундных интервалов времени**. Если не происходит постоянного образования всё новых комплексов гормон — рецептор, ответ также быстро прекращается. **Реакции, запускаемые цАМФ, быстрые, но скоротечные.**

# Участие цАМФ в регулировании транскрипции белков.

цАМФ способна имитировать действие стероидных и тиреоидных гормонов, тем самым, вносить **долговременные изменения** в жизнедеятельность клетки.

Гены, регулируемые цАМФ, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**: это последовательности, которые при стимуляции действуют в качестве энхансеров транскрипции.

Стимуляция цАМФ-чувствительных элементов идёт с участием специфической цАМФ-зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует белок, связывающий цАМФ-чувствительные элементы (**cAMP responsive elements binding protein, CREB**). Активированный **CREB** действует как транскрипционный фактор и связывается с цАМФ-чувствительными элементами ДНК.

цАМФ-регулируемые гены, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**. **CREB** активируют **элементы**, которые действуют как энхансеры транскрипции. Гены, транскрибируемые при участии **CREB**, различаться в зависимости от типа клеток.

# Участие цАМФ в регулировании транскрипции белков

цАМФ способна имитировать действие стероидных и тиреоидных гормонов, тем самым, вносить **долговременные изменения** в жизнедеятельность клетки.

цАМФ-регулируемые гены, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**. CREB активируют **элементы**, которые действуют как энхансеры транскрипции. Гены, транскрибируемые при участии CREB, различаются в зависимости от типа клеток.

