

ОСНОВЫ БИОСИГНАЛИЗАЦИИ:

Ca²⁺ / ФОСФОИНОЗИТО- ЛОВАЯ СИСТЕМА МЕССЕНДЖЕРОВ

Лиганды:
адреналин, глюкагон,
АКТГ, соматостатин, вазопрессин,
паратиреоидный гормон, ПГ E1 и др.



GPCR
(рецепторы, сопряженные с G-белком)
или семиспиральные рецепторы

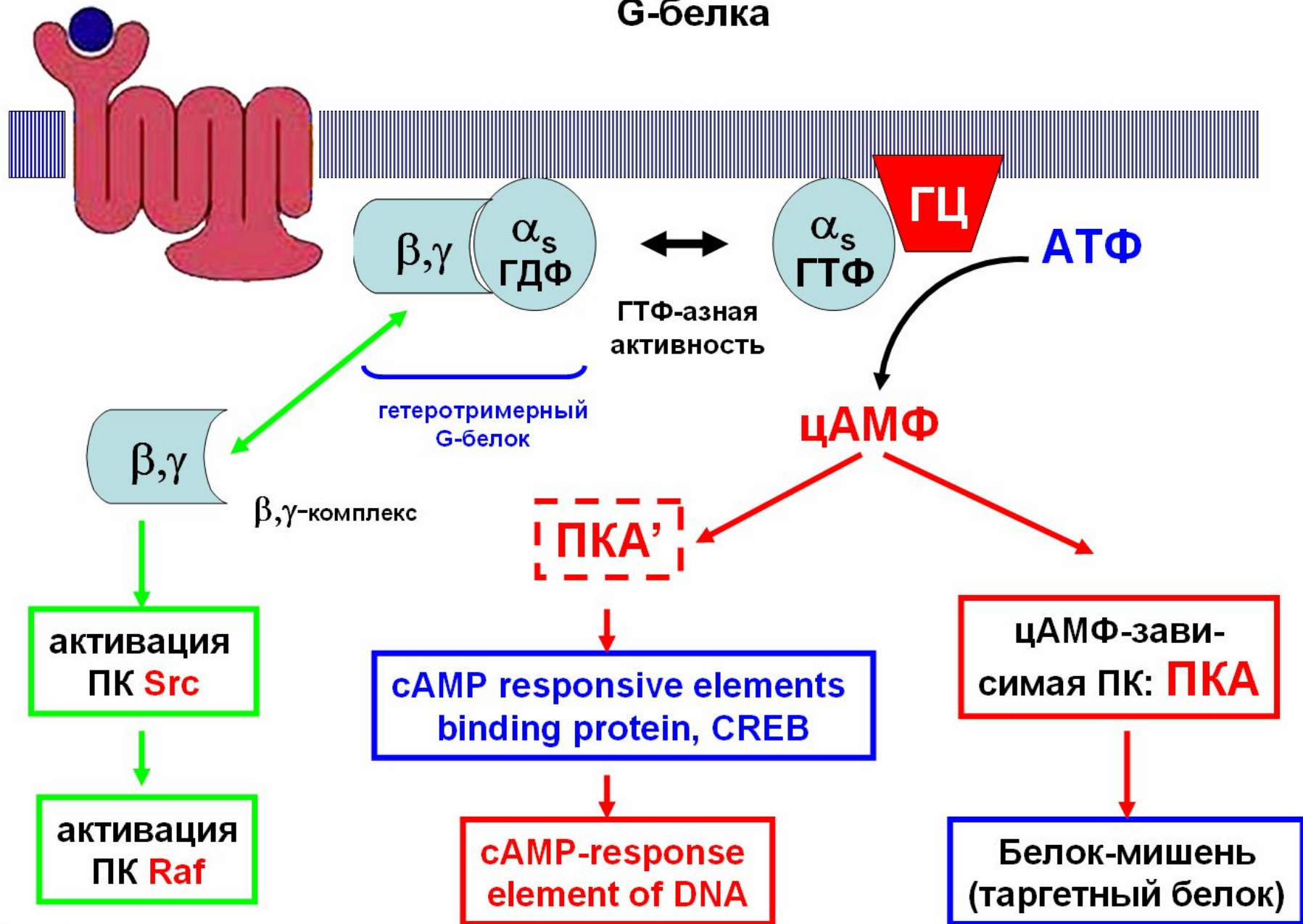


**1. Внутриклеточный
сигнальный путь,
опосредуемый цАМФ**
[с участием $G\alpha_s$ / $G\alpha_i$ типов
 α -субъединицы гетеро-
тримерного G-белка]



**2. Внутриклеточный
сигнальный путь,
опосредуемый
 Ca^{2+} / Фосфоинозитолом**
[с участием $G\alpha_q$ типа
 α -субъединицы гетеро-
тримерного G-белка]

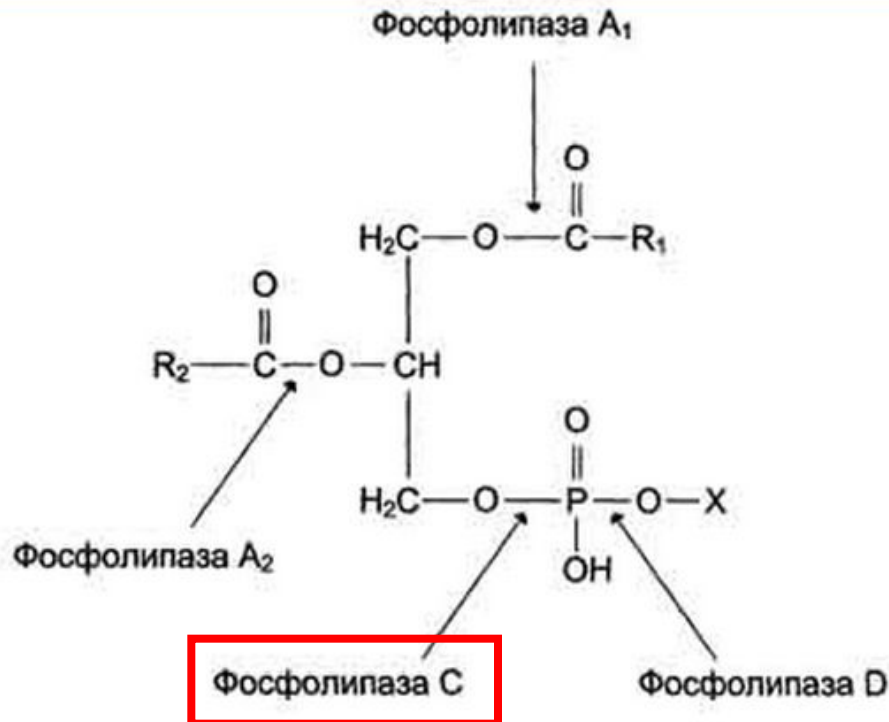
Пути передачи сигнала посредством гетеротримерного G-белка



Ca²⁺ / фосфоинозитоловая система сигнальной трансдукции

GPCR

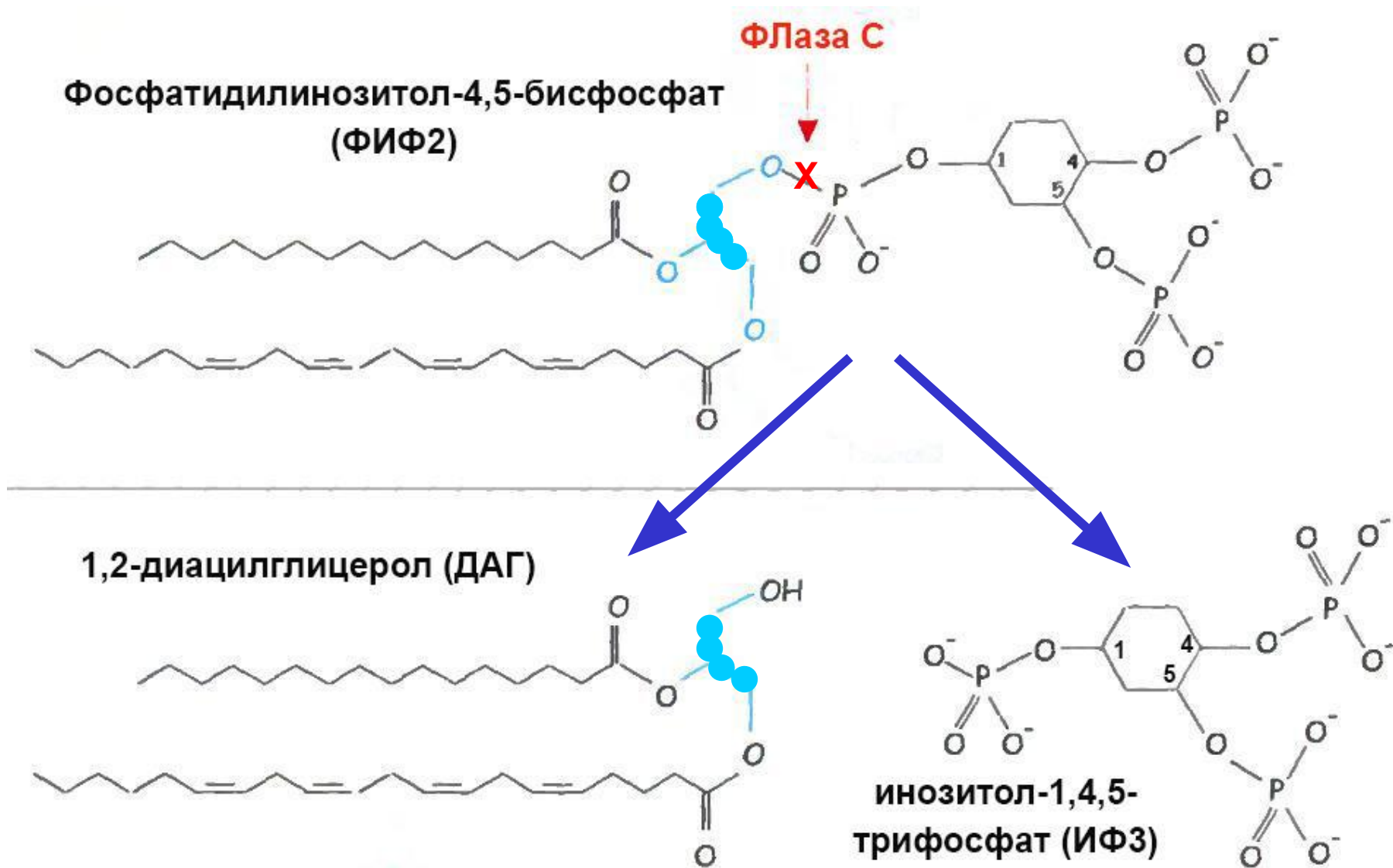
Активация G α_q – субъединицы G-белка
(замена ГДФ на ГТФ в нуклеотид-связывающем центре)



Активация ФЛазы C,
связанной с плазматической
мембраной: специфический
субстрат фосфатидинози-
толбисфосфат (ФИФ2)

Точки действия различных типов
фосфолипаз (ФЛаз)

Образование диацилглицерола и инозитолтрифосфата с участием **фосфолипазы С**



Липид-модифицирующие ферменты

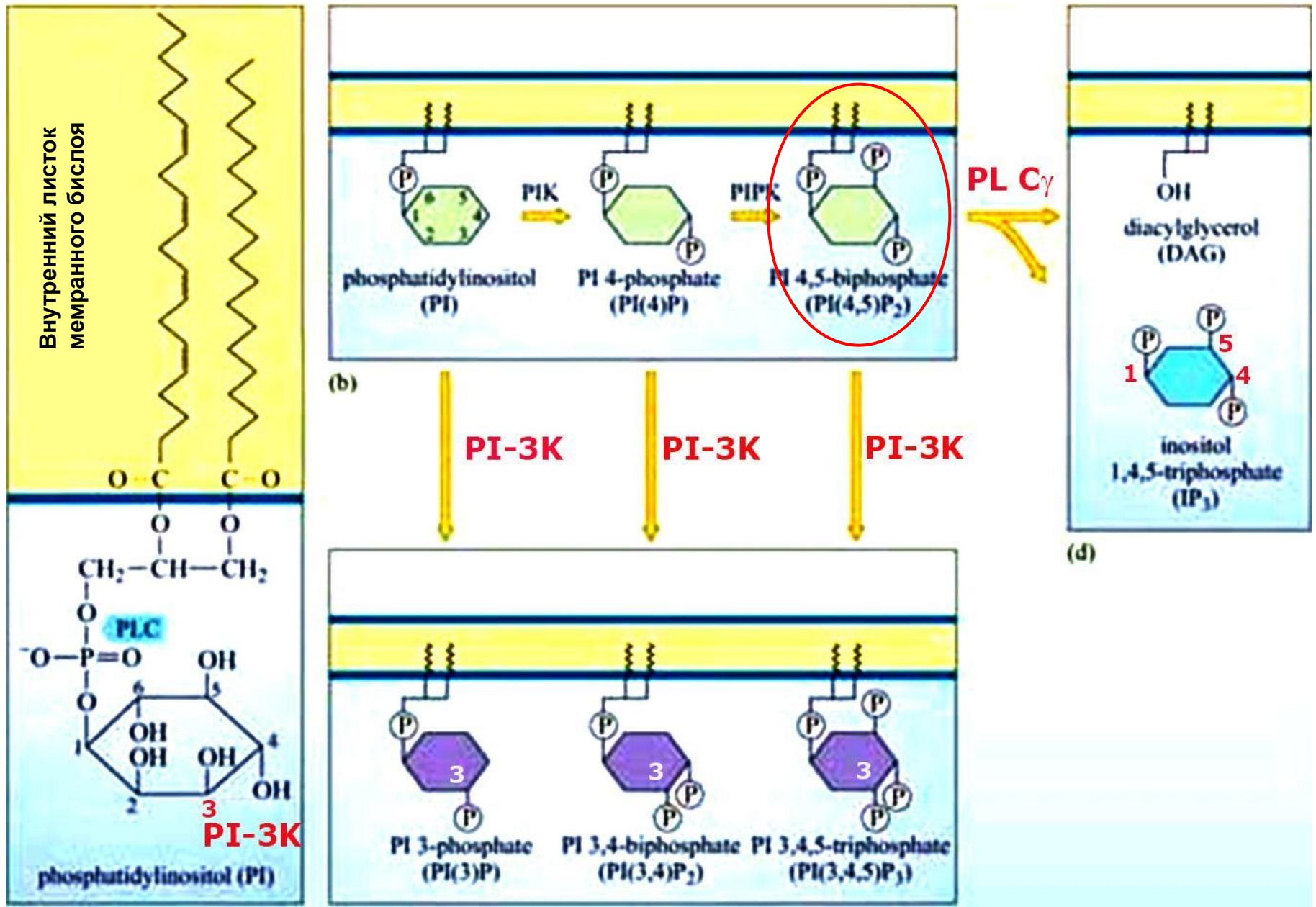
Внутренний слой цитоплазматической мембраны – компартмент, где с участием **липид модифицирующих ферментов** (связанных с мембраной) из **инозитолфосфата (ИФ)** образуются:

1. Вторичные мессенджеры липидной природы (**ДАГ** и **ИФ3**): образуются с участием **ФЛазы C β** .
2. Другие биоактивные производные, фосфорилированные в **позиции-3** по инозитолу, не являются вторичными мессенджерами. Образуются с участием **фосфатидинозитол-3-киназы (PI-3K, ФИ-3K)**.

Эти ферменты активируются в результате стимуляции соответствующих мембранных рецепторов: **ФЛазы C β** посредством **GPCR**; **ФИ-3K** – посредством **рецепторов с тирозинкиназной активностью**.

Инозитолфосфат (ИФ) – «прародитель» всех этих производных и вторичных мессенджеров (**ДАГ** и **ИФ3**).

Образование производных фосфатидинозитола с участием **ФЛ C γ** и **ФИ-3К**



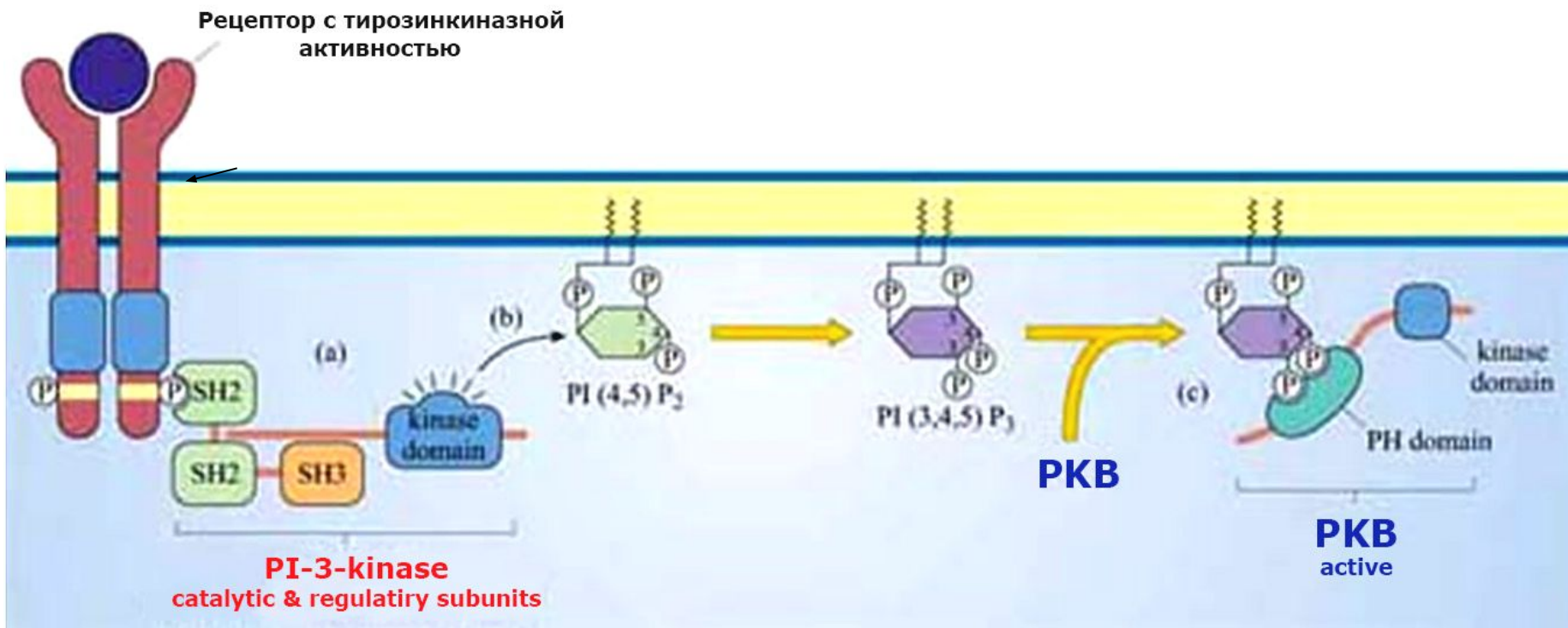
Жирнокислотные цепи молекулы ИФ внедрены в цитозольный слой плазматической мембраны. Его инозитольное кольцо проецировано в сторону цитозоля. С3, С4 и С5-атомы инозитольного кольца могут быть фосфорилированы липидными киназами (например, **ФИ-3К**).

ФИ-3-киназа активируется в мембране посредством рецептора с тирозинкиназной активностью (РТК). В результате, один из SH2-доменов регуляторной субъединицы киназы связывается с фосфотирозином на цитозольном домене рецептора.

Каталитическая субъединица **ФИ-3К** фосфорилирует PI(4,5)P2 с образованием продукта - PI(3,4,5)P3. Так создаются временные докинг-участки для различных белков, содержащих PH-домены.

PI(3,4,5)P3 приобретают способность связывать белки, содержащие PH-домен. Один из таких белков – **серин-треониновая киназа – ПКВ** или **Akt**. Активное состояние ПКВ/Akt – принципиально важно для обеспечение проведения сигналов, необходимых для выживания клетки (для противодействия апоптозу).

Роль ФИ-3К в образовании PI(3,4,5)P₃ и активации протеинкиназы В (ПКВ)



ФЛАЗА C β удерживается на внутренней поверхности плазматической мембраны благодаря наличию у неё **PH-домена**, взаимодействующего с **ФИ-1,4,5-Ф3**.

Вторичные мессенджеры липидного происхождения: ДАГ и ИФ3

Вторичный мессенджер: инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ3).

Гидрофилен благодаря –q, которые сообщают ему три фосфорильные группы. Переходит в цитоплазму клетки и взаимодействует с Ca^{2+} -каналами в мембране ЭР (**ИФ3-рецептор, ассоциированный с Ca^{2+} -каналом**), стимулируя выброс Ca^{2+} в цитоплазму. Увеличение концентрации Ca^{2+} способствует активации **серин-треониновой протеинкиназы С (ПКС)**.

Для поддержания кальциевого гомеостаза избыток Ca^{2+} удаляется. ИФ3 дефосфорилируется цитозольными специфическими фосфатазами и отделяется от Ca^{2+} -каналов. Каналы закрываются.

Вторичный мессенджер: 1,2-диацилглицерол (ДАГ). Молекула гидрофобна, в силу чего остается во внутреннем слое клеточной мембраны. Благодаря латеральной диффузии, ДАГ встречается с неактивной серин-треониновой ПКС, которая рекрутируется во внутренний слой мембраны из цитоплазмы. **ДАГ - единственный естественный активатор ПКС.**

Повышенная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме приводит к связыванию ионов с регуляторными субъединицами ПКС. Это сообщает молекуле фермента $+q$, что позволяет ПКС связываться с несущими $-q$ головками ФС, выступающими над внутренней поверхностью плазматической мембраны.

Т.о., **активация ПКС происходит на внутренней поверхности плазматической мембраны только под воздействием ДАГ в присутствии Ca^{2+} (кооперативность эффектов).** Действие ИФЗ и ДАГ являются **синергичными** – итог: активация ПКС.

Схема активации протеинкиназы С

EXTRACELLULAR

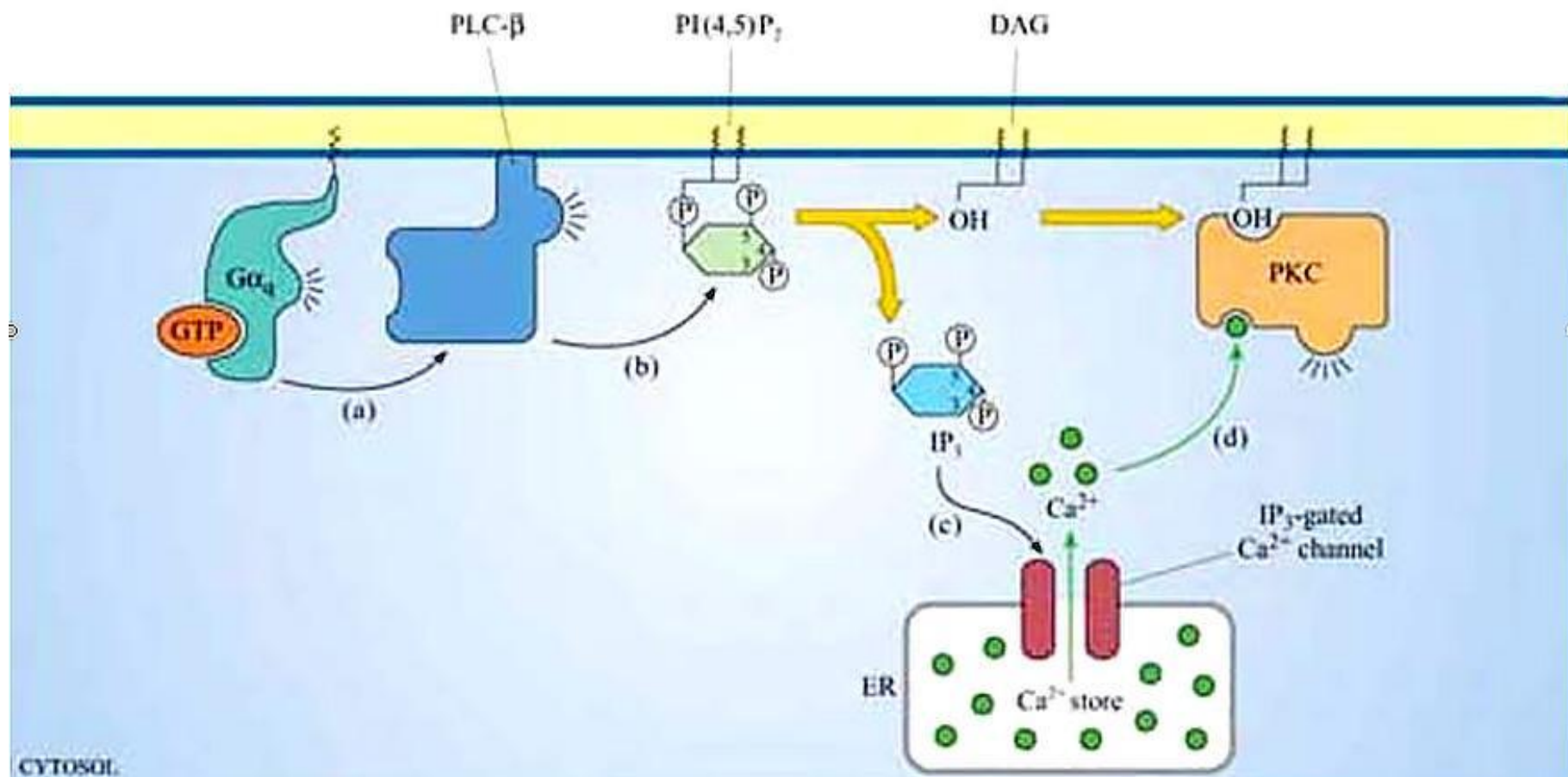
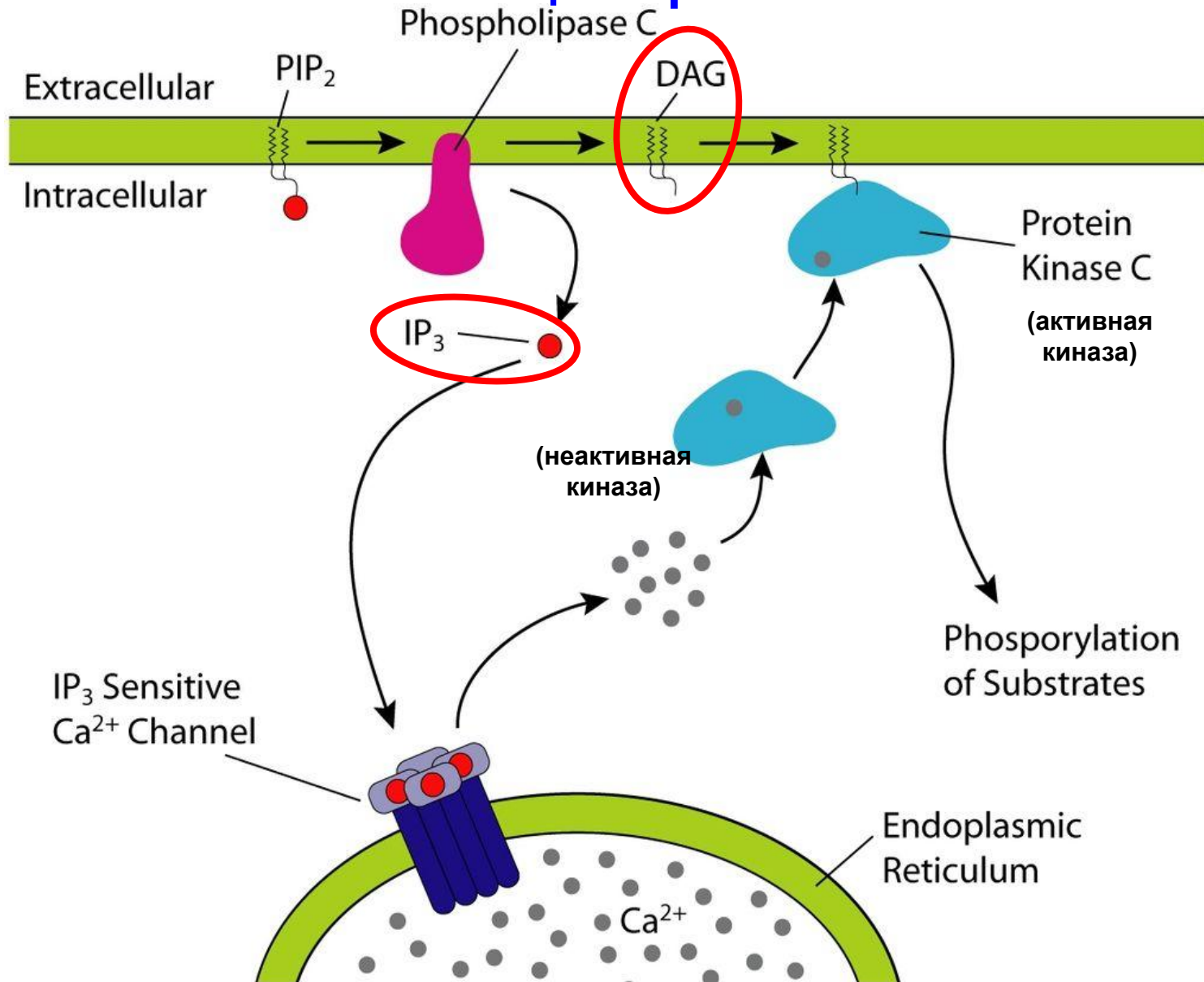


Схема активации протеинкиназы C



Структура и свойства ПКС

Фермент является мономером с массой 77 кДа.

Полипептидная цепь включает 670-690 аминокислотных остатков. Состоит из 2-х компактных доменов:

1. Регуляторный домен – гидрофобен, располагается ближе к N-концу цепи. Тут имеются сайты для связывания Ca^{2+} и ДАГ.
2. Каталитический (киназный) домен - более гидрофилен, находится на C-конце полипептидной цепи.

Для ПКС характерен длительный период активности, которая сохраняется, даже если первоначальный сигнал пропал или снизилась [Ca^{2+}]. Причина – постоянное образование дополнительного ДАГ из ФХ с участием ФЛазы С.

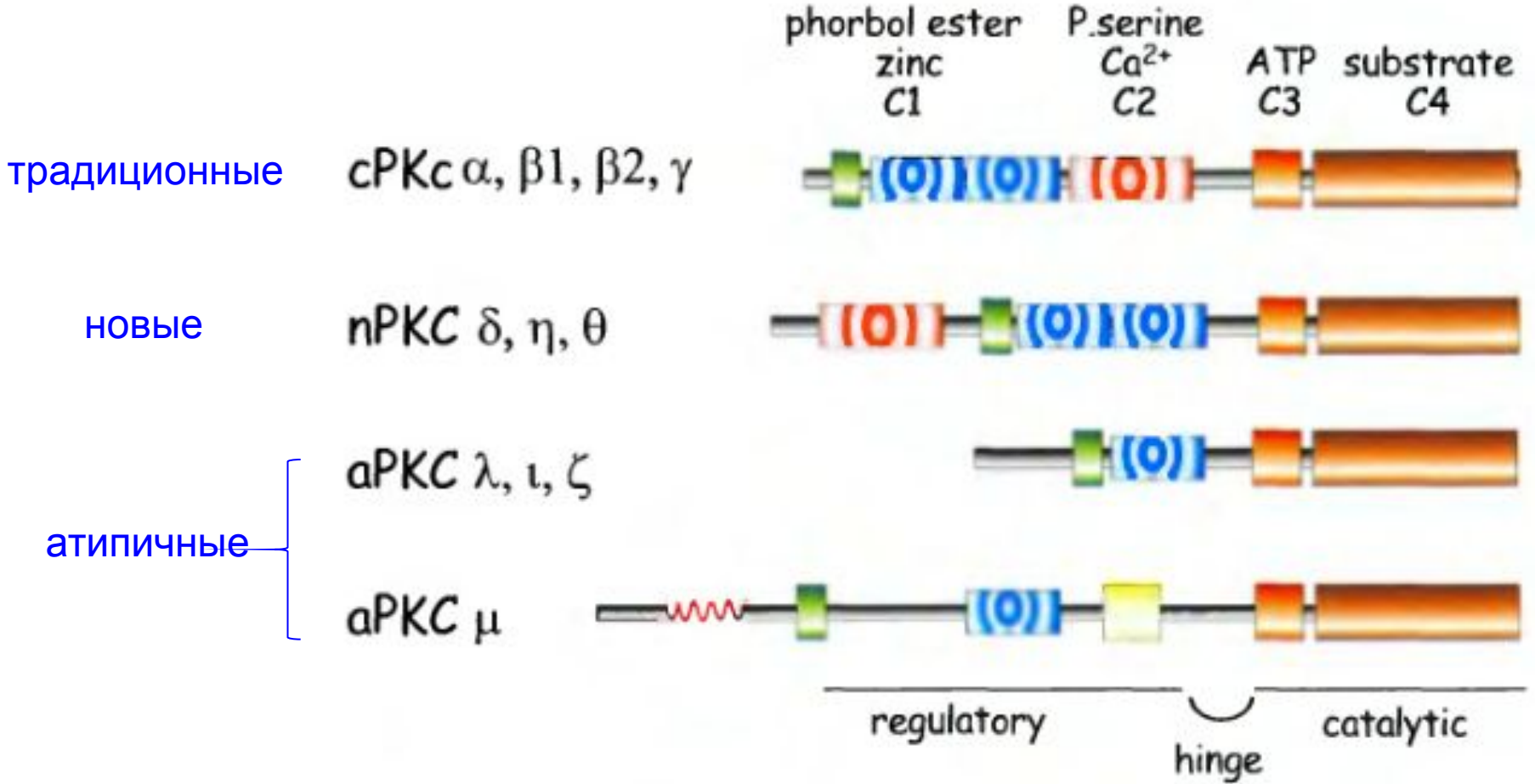
ПКС делят на три подсемейства в зависимости от сходства первичной структуры (доменов) и способу активации:

а). **Классические формы ПКС** (активируются **ДАГ** и Ca^{2+} , нуждается в **ФС**, активируются **форболовыми эфирами**). Изоформы: α , β , γ .

б). **Новые формы ПКС** (активируются **ДАГ**, нуждается в **ФС**, но независимы от Ca^{2+}). Изоформы: δ , ϵ , η .

в). **Атипичные формы ПКС** (нуждается в **ФС**, но **не чувствительны** к ДАГ и Ca^{2+}). Изоформы: λ , τ , ζ , μ .

Схемы строения молекул подсемейств ПКС



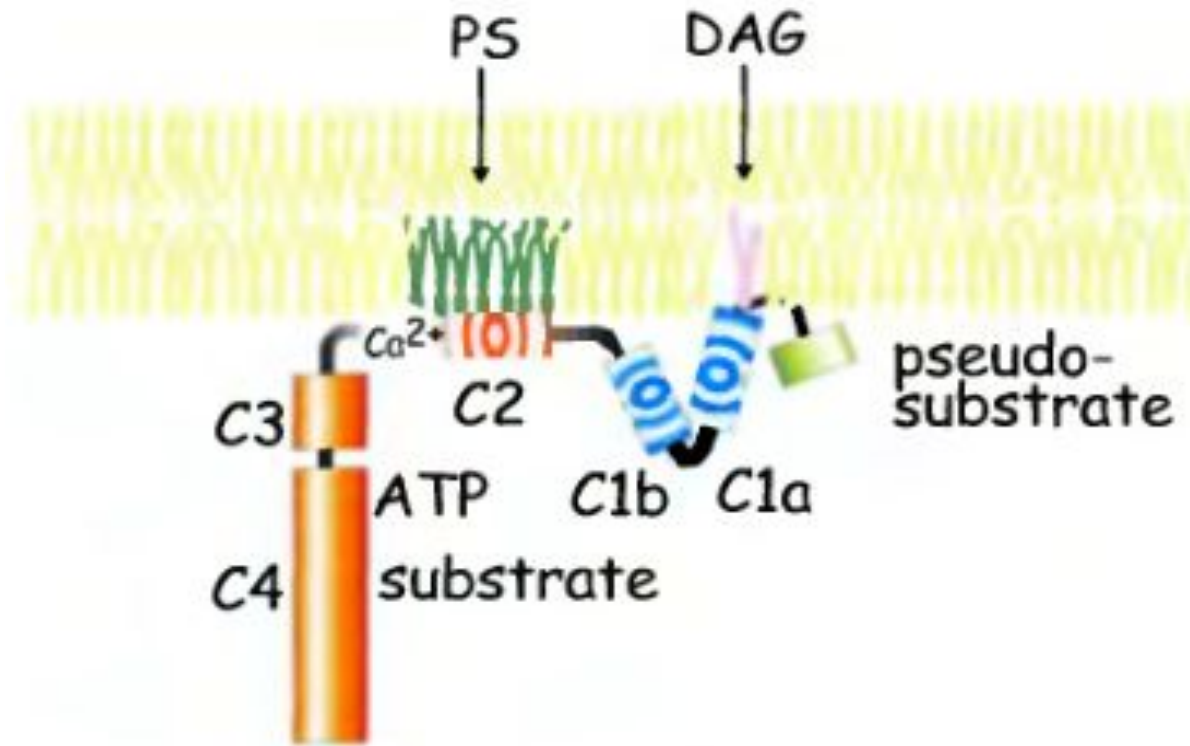
C1 – C4 – консервативные домены фермента.

Красные полосы – Ca²⁺-связывающие домены.

Синие полосы – области, богатые цистеином.

В одном типе клетки могут присутствовать разные типы ПКС.

Домены ПКС



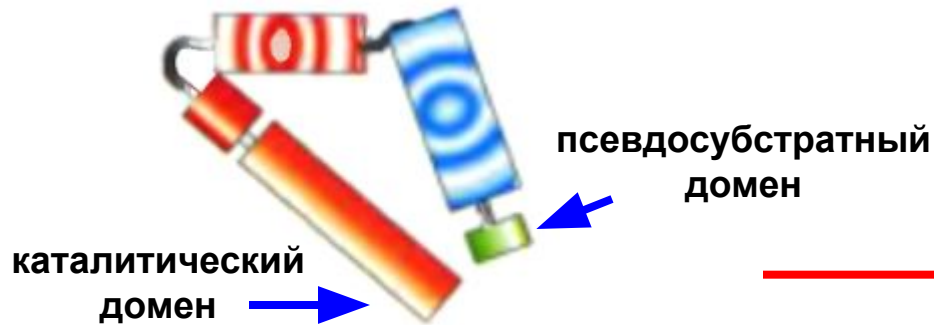
Домен C1 – обеспечивает взаимодействие с ДАГ.

Домен C2 – участвует в связывании фермента с ФС внутреннего слоя мембраны.

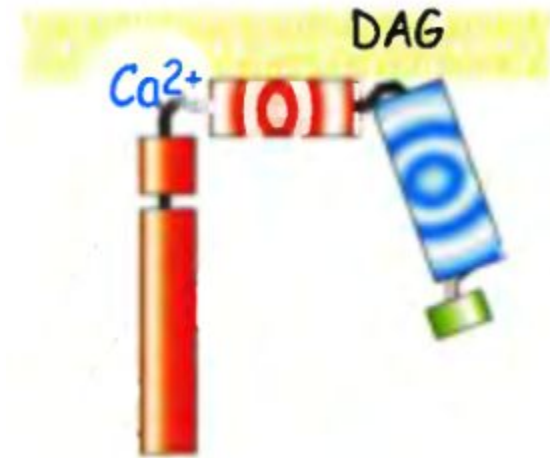
Домены C3 и C4 – каталитические домены.

В отсутствии активирующих киназу стимулов, **псевдосубстратный домен** связан с **каталитическим доменом** – конформация, которая лишает фермент активности.

неактивная конформация ПКС



активная конформация ПКС



При низких $[Ca^{2+}]$ и в отсутствии ДАГ, киназа находится в растворимом состоянии в цитоплазме.

Псевдосубстратный домен связан с субстрат связывающим сайтом. Повышение $[Ca^{2+}]$ способствует связыванию с Ca^{2+} и присоединению ПКС к ФС мембраны. Взаимодействие с ДАГ вызывает диссоциацию псевдосубстратного домена, что активирует ПКС. (интрастерическая регуляция)

Представители семейства ПКС участвуют в:

- клеточном делении (модуляция активации Ras-Raf-МАР-сигнального пути, отвечающего за стимуляцию митозов и пролиферацию клеток);
- секреции;
- экзоцитозе;
- транспорте ионов;
- сокращении гладкой мускулатуры;
- экспрессии генов.

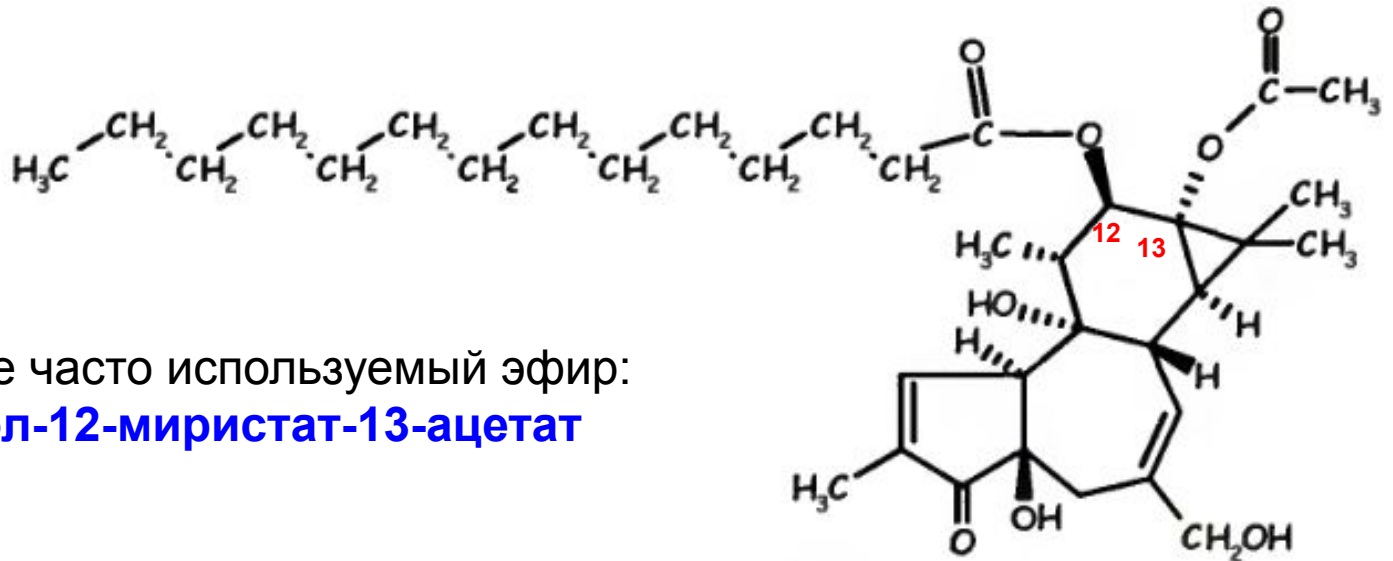
Одна из изоформ **атипичной ПКС (ПКС-ζ)** способна запускать сигнальный путь, опосредуемый **ядерным транскрипционным фактором *kB* (NFkB)**. **NFkB** присутствует во всех клетках организма человека и животных.

NFkB – активирует экспрессию 100 – 300 генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации, апоптоза, воспалительной и аутоиммунной реакций и др.

NFkB – гетеродимер (белки **p50** и **p65**). В покоящейся клетке **NFkB** находится в цитоплазме в неактивной форме: комплекс **p50 / p65 / IκB** (**IκB** – ингибирующий белок). Под действием **ПКС-ζ** активируется киназа **IKK** (**IκB kinase**). **IKK** фосфорилирует ингибитор **IκB**, который сразу же покидает гетеродимер и **NFkB** становится активным транскрипционным фактором.

Сигнальный путь, опосредуемый **NFkB**, срабатывает в течение считанных минут, поскольку не требует синтеза белка de novo: транскрипционный фактор всегда присутствует в цитоплазме (в неактивной форме). Такой срочный ответ необходим для своевременной реакции клетки на воздействии патогенного или повреждающего фактора.

Мощными активаторами классической формы **ПКС** являются **форбол и его эфиры (ФЭ)** – соединения растительного происхождения.



Наиболее часто используемый эфир:
форбол-12-миристан-13-ацетат

ФЭ связываются с регуляторным доменом ПКС и активируют её в концентрациях, на 3 порядка меньших, чем ДАГ. Благодаря химической структуре (ксенобиотик), **ФЭ** разрушаются *in vivo* чрезвычайно медленно.

В присутствии **ФЭ** **сигнальная система оказывается в перманентно включенном состоянии - пролиферация клеток перестаёт быть контролируемой**. В этом причина выраженной способности **ФЭ** провоцировать развитие злокачественных опухолей. **ФЭ – опухолевые промоторы.**

Прекращение передачи сигнала по пути фосфатидинозитола и Ca^{2+}

Путь: Инактивация вторичных мессенджеров

Эффекты **ИФ3** прекращаются с помощью фосфатаз, дефосфорилирующих это соединение.



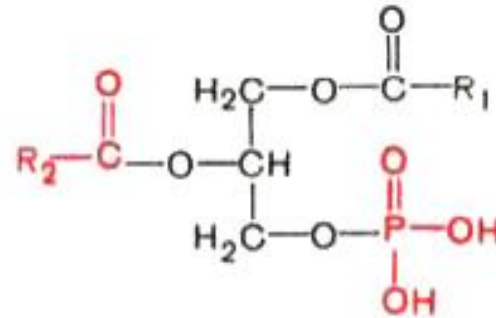
Последовательное 3-х этапное дефосфорилирование ИФ3 приводит к образованию циклического спирта – инозитола, который м.б. субстратом для синтеза ФИ (фосфатидинозитола).

Эффекты **ДАГ** могут быть ограничены двумя механизмами:

а). действие **ДАГ-киназы**, которая фосфорилирует ДАГ до **фосфатидной кислоты (ФК)**:



(превращение 30% ДАГ)



Фосфатидная кислота

б). Действие **ДАГ-липазы** - гидролиз мессенджера с отщеплением арахидоновой кислоты:



На следующем этапе происходит расщепление 2-арахидоноил-глицерола на **арахидоновую кислоту** и **глицерол**.

ФК участвует во многих процессах:

- * предшественник синтеза многих липидов;
- * локально усиливает кривизну мембраны – участие в эндо- и экзоцитозе;
- * участвует во внутриклеточной сигнализации, рекрутируя из цитоплазмы некоторые белки (сфингозинкиназу).

Арахидоновая кислота и ее производные формируют отдельную группу сигнальных молекул: **простагландинов**, **лейкотриенов** и **тромбоксанов**.

II путь: Дефосфорилирование эффекторного белка протеинкиназы **С**. С участием специфических фосфатаз (протеинфосфатаз).

Благодарю за внимание

