

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(Сеченовский Университет)**

**Институт фармации им. А.П. Нелюбина  
Кафедра биотехнологии**

**Методические материалы по дисциплине:**

**Регуляция клеточной активности**

**основная профессиональная образовательная программа высшего  
профессионального образования - программа специалитета**

**06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика**

## **Лекция №1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ И СУБМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТКИ.**

Основные характеристики клетки как структурной и функциональной единицы живых организмов. Характерные особенности клеток прокариот. Характерные особенности клеток эукариот. Понятие о клеточных органеллах. Строение и функции клеточных органелл. Сходство и различия растительной и животной клеток. Ядро и ядрышко клетки. Организация и функции ядрышка.

### ***Прокариоты***

Не имеют ограниченного мембраной ядра.

Аналог ядра – структура, состоящая из ДНК, белков и РНК.

Генетическая система (генофор) закреплена на клеточной мембране и соответствует примитивной хромосоме.

При удвоении генофора его две копии расходятся, увлекаемые растущей клеточной мембраной. Митоз у прокариот отсутствует.

Лишены: хлоропластов, митохондрий Гольджи, центриолей.

Рибосомы отличаются по числу белков и коэффициенту седиментации от эукариотических рибосом.

Основной компонент клеточной стенки у многих прокариот – гликопротеин муреин.

Считают, что начало эволюции положено ~ 4 млрд лет назад  
1,5 млрд лет назад появление эукариот  
20 млн лет назад – предки человека дреопитеки  
10 тыс лет – древнейший город Иерихон

### ***Организация клеток эукариот***

**Плазматическая мембрана** отделяет цитоплазму от окружающей среды.

**Другие клеточные мембраны** отделяют внутреннюю часть органелл от цитозоля.

Структурной основой биологических мембран является фосфолипидный бислой.

**Основные функции:**

- 1) регулирование поступления питательных веществ в клетку;
- 2) выведение продуктов обмена;
- 3) поддержание осмотического давления и ионного состава цитозоля;
- 4) обеспечение мест закоривания для различных элементов цитоскелета;
- 5) обеспечение межклеточных контактов и сигнальных взаимодействий между клетками.

Важнейшую роль в этих процессах играют мембранные белки.

**Ядра эукариотических клеток** – крупнейшие органеллы, окруженные двойной мембраной (внутренней и наружной), каждая из которых состоит из липидного бислоя, содержащего множество различных белков.

Обе ядерные мембраны соединены ядерными порами, соединяющими ядро и цитозоль.

Ядро несет генетическую информацию, и его главной функцией является синтез РНК.

В делящемся ядре ДНК хранится в виде хромосом в компактизованном виде. В покоящемся ядре – в дисперсном состоянии.

Геном человека содержит 46 хромосом (22 пары аутомосом и две половые хромосомы XY). Y-хромосома достается от отца, X-хромосома – от матери.

Сколько молекул ДНК содержит одна хромосома? – Каждая хромосома образуется из одной длинной молекулы ДНК.

Ядро содержит суборганеллу – ядрышко.

**Ядрышко** – центр образования рибосом (рис.).

Ядрышко – специфическая область ядра с диффузной структурой, лишенная собственной мембраны.

При начале митоза ядрышки исчезают (по мере конденсации хромосом) и в конце деления (телофаза) образуются вновь, когда возобновляется синтез рибосомных РНК.

Миниатюрные ядрышки возникают на участках хромосом, содержащих гены рибосомной РНК (у человека такие участки локализованы на 10 хромосомах). В составе ядрышка петли ДНК, содержащие гены рРНК, с высокой скоростью транскрибирующиеся РНК-полимеразой I, называются ядрышковыми организаторами.

**Цитозоль** – жидкая часть цитоплазмы, окружающая органеллы.

Первоначально полагали, что цитозоль – жидкий суп, в котором плавают органеллы клетки.

Цитозоль содержит **цитоскелет**, состоящий по крайней мере из 3-х типов фибрилл:

- 1) микротрубочек (20 нм Ø), содержащих тубулин;
- 2) актиновых микрофиламентов (7 нм Ø);
- 3) промежуточных филаментов (10 нм Ø).

Функции цитоскелета:      а) поддержание формы и подвижности клеток;  
   б) обеспечение сайтов закоривания для клеточных структур и органелл.

**Цитозоль** многих клеток содержит тельца включения, не связанные с мембраной.

Например:

Мышечные клетки и гепатоциты содержат тельца включения гликогена (полимер глюкозы) – запасная форма.

Адиipoциты (жировые клетки) содержат в цитозоле крупные капли триацилглицеролов (запасная форма жирных кислот).

**Цитозоль**, как главное место метаболизма, содержит большое количество различных ферментов.

**Эндоплазматический ретикулум (ЭР)** – представляет собой разветвленную сеть замкнутых мембранных везикул.

Наиболее важные функции: синтез мембранных липидов и белков.

**Гладкий ЭР** является местом синтеза и метаболизма жирных кислот и фосфолипидов. Наиболее развит в гепатоцитах печени.

Ферменты гладкого ЭР печени обеспечивают детоксикацию вредных веществ (канцерогены, пестициды и т.п.) путем их химической модификации. Модификация увеличивает водорастворимость токсинов и позволяет выводить их из организма.

**Шероховатый ЭР** – области ЭР, покрытые связанными с мембраной рибосомами.

В цитоплазме существуют две популяции рибосом – связанные с ЭР и свободные.

Связанные с ЭР рибосомы локализованы на обращенной к цитоплазме поверхности ЭР и заняты синтезом белков, которые сразу же переносятся внутрь ЭР.

Свободные рибосомы не прикреплены ни к какой мембране и производят все остальные белки, кодируемые ядром.

Связанные и свободные рибосомы идентичны по строению и функции.

### Аппарат Гольджи (комплекс Гольджи).

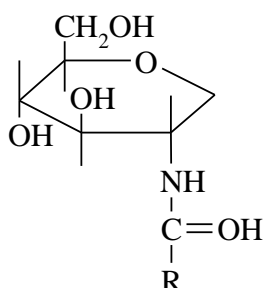
Локализован вблизи ядра.

Состоит из стопки уплощенных цистерн.

Со стопками ассоциирована масса мелких везикул (пузырьков), ограниченных мембраной. Везикулы (пузырьки Гольджи) переносят белки и липиды в аппарат Гольджи и транспортируют их из него и между остальными цистернами. Многие везикулы являются окаймленными (покрыты клатрином – белком трискелетной структуры).

Белки и липиды в составе везикул попадают в стопку Гольджи с цис-стороны, а покидают ее с транс-стороны, направляясь в другие компартменты в уже модифицированном виде (гликозилирование, метилирование, фосфорилирование, ацилирование и т.д.) вместе с пузырьками, образующимися на транс-стороне.

Формирование гликопротеинов идет путем связывания с аспарагином (N-гликозилирование).



Существует о-гликозилирование по серину.

В Гольджи белки подвергаются посттрансляционным модификациям (гликозилированию, метилированию, ацилированию и т.д.). Затем в составе везикул модифицированные (зрелые) белки направляются в различные компартменты клетки.

Лизосомы – мембранные везикулы, содержащие кислые гидролазы (оптимум pH–5, именно такой pH поддерживается в лизосомах).

Известно ~ 40 ферментов лизосом (протеазы, нуклеазы, гликозидазы, липазы, фосфолипазы, фосфатазы и сульфатазы).

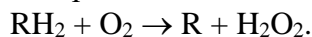
Кислый pH поддерживается в лизосомах протонным АТФ-зависимым насосом, локализованным в мембране.

Основная функция – расщепление биомолекул.

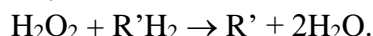
Пероксисомы, или микротельца, окружены только одной мембраной и не содержат, в отличие от митохондрий и хлоропластов, ДНК и рибосом.

Подобно митохондриям, пероксисомы являются центрами утилизации кислорода в клетке. В пероксисомах печени происходит окисление (детоксикация) этанола до уксусного альдегида.

Пероксисомы содержат один или более ферментов, использующих молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от некоторых субстратов в окислительной реакции с образованием перекиси водорода:

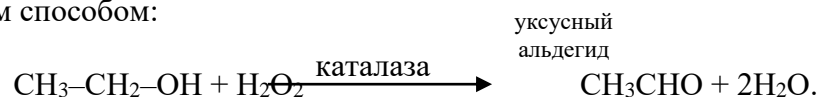


Каталаза использует H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, образованную другими ферментами в пероксисоме, для окисления множества субстратов (фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида и спирта с помощью «окислительной» реакции:

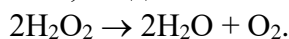


Этот тип реакций особенно важен для клеток печени, где обезвреживаются ядовитые вещества.

Почти половина этанола, который мы выпиваем, окисляется до ацетальдегида (уксусного альдегида) этим способом:



Кроме того, когда в клетке накапливается избыток  $H_2O_2$ , каталаза превращает ее в воду:



**Митохондрии и хлоропласты** – энергопреобразующие органеллы.

Несут две функции: 1) осуществляют процессы переноса электронов, в результате которых энергия реакций окисления преобразуется в энергию АТФ; 2) Мембраны образуют большие внутренние компартменты, в которых осуществляются другие ферментативные реакции.

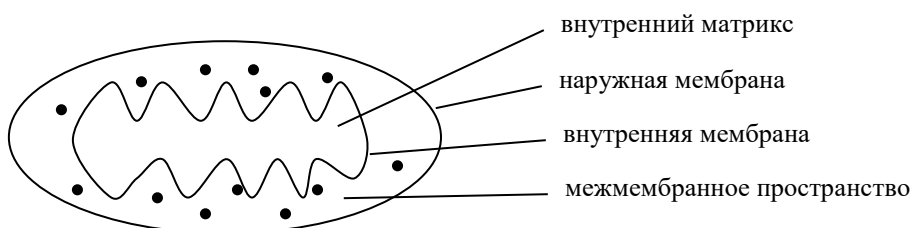
В митохондриях метаболизм сахаров (и жирных кислот) доводится до конца: пируват (гликолиз), как и жирные кислоты (Ац-КоА), окисляются молекулярным кислородом ( $O_2$ ) до  $CO_2$  и  $H_2O$  с образованием АТФ, причем очень эффективно:

гликолиз (анаэробное окисление) 1 мол. глюкозы  $\rightarrow$  2 мол. АТФ;

цикл Кребса (аэробное окисление) 1 мол. глюкозы  $\rightarrow$  36 мол. АТФ.

Хлоропласты тоже эффективные мишени для выработки АТФ, но источником энергии для хлоропластов служит солнечный свет, а не углеводы и жирные кислоты.

**Митохондрии** – цилиндрические органеллы, окруженные двумя высокоспециализированными мембранами. Эти мембраны образуют внутренний матрикс и межмембранное пространство.



Внутренняя мембрана образует складки – кристы.

Хлоропласты содержат третий компартмент – стопки тилакоидов, где и происходит фотосинтез.

Хлоропласты и митохондрии содержат ДНК, РНК и рибосомы (стр. 485 Уотсон) и таким образом могут частично синтезировать свои внутренние белки. Другую часть белков получают из цитоплазмы.

Хлоропласты и митохондрии никогда не образуются de novo, а всегда путем деления уже существующих органелл.

В большинстве случаев делятся на протяжении всей интерфазы и, таким образом, каждая из них делится независимо от всех остальных и всей клетки.

**Лейкопласты** – бесцветные пластиды в растительных клетках.

Состоят из двух элементарных мембран; внутренняя из них, врастая в строму, образует тилакоиды.

Лейкопласты, также как и хлоропласты, содержат ДНК и рибосомы.

Содержат ферменты синтеза и распада запасных веществ (масла, крахмал и белки).

В различных лейкопластах могут накапливаться крахмал, масла и белки.

Кроме того, в одном и том же лейкопласте могут накапливаться разные вещества.

Лейкопласты могут превращаться в хлоропласты.

**Центриоли** – органоиды клеток животных и некоторых растений.

Могут входить в митотический аппарат клетки.

Функции centrioles в делении неясны (участвуют в формировании веретена деления).

Центриоль имеет форму полого цилиндра, построенного из 9 (3) триплетов микротрубочек. Центриоль окружена тонковолокнистым матриксом.

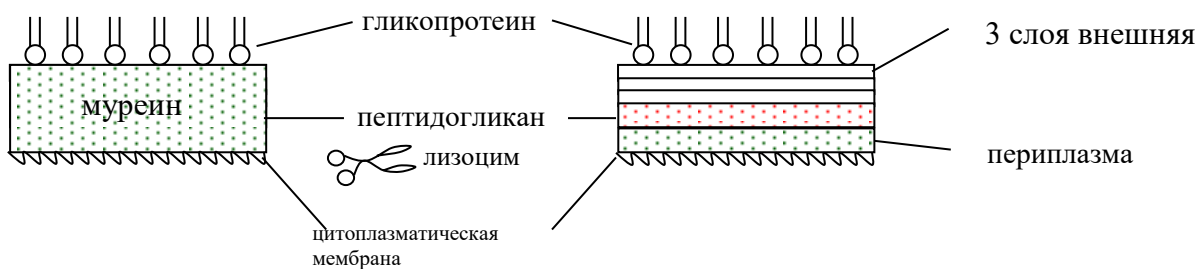
**Мезосомы** – мембранные структуры, образующиеся путем впячивания плазматической мембраны.

Предполагают, что участвуют в образовании клеточных перегородок, а также репликации и сегрегации ДНК.

Клеточная оболочка окружает протопласт.

А – грамположительные

Б – грамотрицательные (*E. coli*)



У грамположительных пептидогликан составляет до 95% массы клеточной стенки.

У грамотрицательных очень тонкий пептидогликановый слой, и имеют трехслойную липопротеиновую мембрану (ее компонент гликолипид (ЛПС) обуславливает антигенные свойства клетки).

Пептидогликан может быть легко разрушен лизоцимом.

**Вакуоли** – органеллы растительных клеток, занимающие до 90% объема клетки.

Вакуоли – пузырьки, заполненные жидкостью и отделенные от цитоплазмы однослойной мембраной, именуемой тонопластом.

Близки к лизосомам животных клеток – содержат гидролитические ферменты.

Функции вакуолей (разнообразны):

- 1) запасание питательных веществ (углеводы, белки, липиды);
- 2) хранение отходов;
- 3) регуляция тонуса клеток (тургорного давления);
- 4) лизосомальные функции;
- 5) увеличение размеров клетки (при росте клеток заполнение пространства).

В одной и той же клетке часто присутствуют вакуоли с различными функциями (например, запасющей и лизосомальной).

## **Лекция №2. МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ ПОСРЕДСТВОМ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ И КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.**

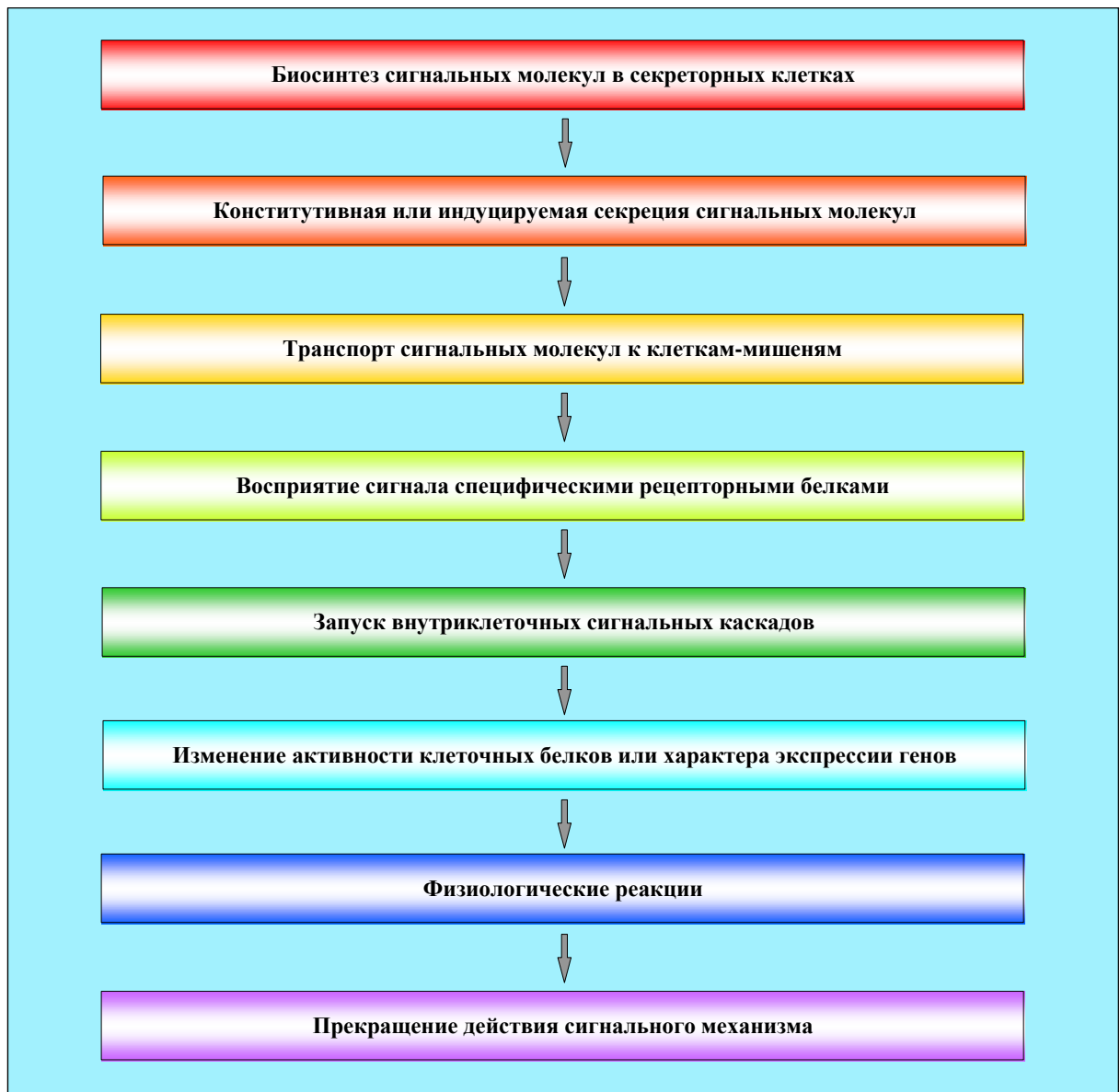
*Типы межклеточной сигнализации в животных организмах. Функциональное назначение эндокринной, паракринной и контактной межмолекулярных сигнализаций.*

В процессе эволюции у многоклеточных организмов выработался сложный механизм межклеточных взаимодействий, осуществляемый с помощью секретируемых сигнальных молекул, выполняющих функции первичных мессенджеров – факторов роста, гормонов, лимфокинов, нейромедиаторов, липидов, простагландинов, аминокислот и др.

Передача сигнала от одной клетки к другой происходит путем взаимодействия сигнальных молекул со специфическими рецепторами, локализованными на поверхности или в цитозоле воспринимающей сигнал клетки. Взаимодействие сигнальной молекулы с рецептором вызывает запуск внутриклеточных биохимических сигнальных каскадов, действие которых приводит к проявлению различных физиологических реакций. Межклеточные взаимодействия могут также осуществляться с помощью молекул, локализованных на плазматической мембране контактирующих клеток, однако наиболее распространенным типом сигнализации у многоклеточных организмов является сигнализация с помощью секретируемых первичных мессенджеров. Среди многочисленных первичных мессенджеров ведущая роль в регуляции клеточной активности принадлежит гормонам, факторам роста, интерлейкинам, интерферонам и нейромедиаторам. Большинство первичных мессенджеров относится к цитокинам – низкомолекулярным соединениям пептидной природы, продуцируемым многими типами клеток и обладающим способностью модулировать их активность. Цитокины представляют собой секретируемые сигнальные молекулы, действующие на клетки, локализованные в непосредственной близости от места секреции (паракринное или аутокринное действие). В связи со спецификой действия цитокины, за исключением интерлейкина-1, отличаются низким уровнем содержания в крови. К цитокинам относятся небольшие (50-200 аминокислотных остатков) гликозилированные или негликозилированные сигнальные белки – факторы роста, интерфероны и интерлейкины (лимфокины и монокины). Цитокины секретируются большинством типов клеток и являются средством их взаимодействия. Действуя на клеточные рецепторы, цитокины индуцируют через сигнальные каскады активацию факторов транскрипции (энхансеров или сайленсеров), которые путем взаимодействия со специфическими

последовательностями ДНК в промоторах активируют или подавляют транскрипцию генов.

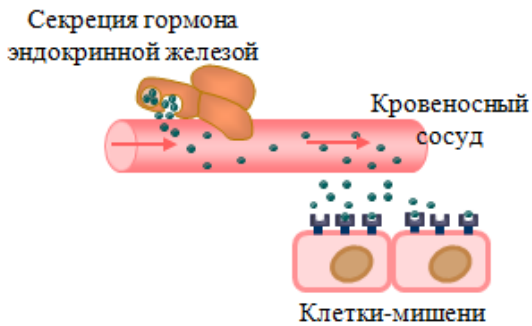
Межклеточные взаимодействия представляют собой сложные процессы, осуществляемые в результате последовательного и согласованного действия целого ряда физиологических механизмов (рис. 1).



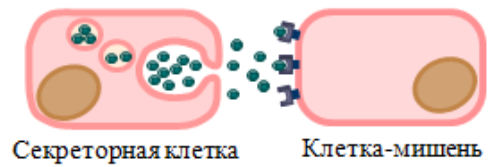
У животных организмов, в зависимости от расстояния, на которое распространяется действие секретируемых сигнальных молекул, выделяют четыре основных типа сигнализации – эндокринную, паракринную, аутокринную и синаптическую (рис. 2). В случае эндокринной сигнализации в качестве сигнальных молекул выступают гормоны, которые переносятся кровотоком и действуют на клетки-мишени, находящиеся на значительном удалении от места их синтеза клетками эндокринных желез.

## 1. Сигнализация с помощью секретируемых первичных мессенджеров

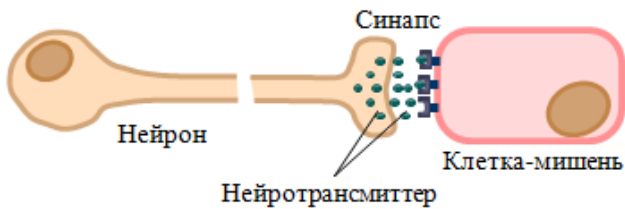
### а) Эндокринная сигнализация



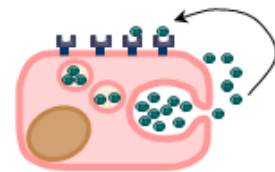
### б) Паракринная сигнализация



### в) Синаптическая сигнализация

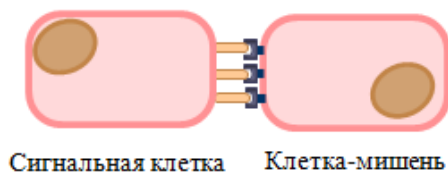


### г) Аутокринная сигнализация



## 2. Контактная сигнализация

### а) Посредством мембранных белков



### б) Посредством щелевых соединений

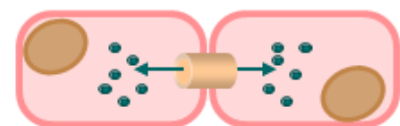


Рис. 2. Общие схемы межклеточной сигнализации в животных организмах.

При паракринной сигнализации выбрасываемые секреторной клеткой во внеклеточное пространство сигнальные молекулы (локальные медиаторы) действуют на близлежащие клетки-мишени. Радиус действия секретируемых локальных медиаторов, как правило, не превышает 1 мм, поскольку они чрезвычайно быстро связываются с

элементами внеклеточного матрикса (ВКМ), рецепторами поверхности плазматической мембраны, поглощаются клетками или разрушаются во внеклеточном пространстве.

При аутокринной сигнализации клетки отвечают на действие ими же секретлируемых сигнальных молекул. Этим путем действуют многие факторы роста. Культивируемые *in vitro* клетки животного происхождения секретлируют факторы роста, которые аутокринно стимулируют их рост и пролиферацию. Опухолевые клетки также интенсивно секретлируют факторы роста, которые стимулируют бесконтрольную пролиферацию не только самих опухолевых клеток, но и пролиферацию клеток, окружающих опухоль, например, эндотелиальных клеток сосудов, что вызывает привлечение и рост кровеносных капилляров в направлении опухоли и является мощным фактором, способствующим ее ускоренной прогрессии.

Синаптическая передача характерна только для нервной системы. При этом типе межклеточного взаимодействия сигнальные молекулы – нейромедиаторы – доставляются непосредственно к регулируемым клеткам с помощью нейрональных аксонов, длина которых в некоторых случаях достигает 1 м. Передача сигнала происходит в специфическом межклеточном контакте – синапсе, в котором окончание аксона, секретлирующее нейромедиатор, и поверхность регулируемой клетки разделены синаптической щелью шириной ~50 нм. Нейромедиатор диффундирует через синаптическую щель, связывается со специфическими рецепторами поверхности регулируемой клетки, активирует их и таким образом индуцирует каскадный механизм внутриклеточной передачи сигнала, приводящий к тем или иным физиологическим реакциям. Примерами синаптической сигнализации может служить химический этап проведения нервного импульса в синапсах нервных клеток или нервно-мышечных соединениях.

Одни и те же первичные мессенджеры могут принимать участие в различных типах межклеточной сигнализации. Например, некоторые пептиды функционируют как в качестве нейромедиаторов (синаптическая сигнализация), так и в качестве системных гормонов (эндокринная сигнализация). Некоторые факторы роста, например, эпидермальный фактор роста (EGF), могут экспрессироваться на поверхности клетки в составе внеклеточного домена трансмембранного белка–предшественника. При этом EGF, локализованный на поверхности мембраны, может непосредственно связываться с рецептором клетки-мишени и индуцировать в ней прохождение внутриклеточного сигнального каскада (контактная сигнализация). Высвобождаемый в результате ограниченного протеолитического расщепления внеклеточного домена белка–

предшественника растворимый EGF может действовать уже в качестве эндокринной или паракринной сигнальной молекулы на пространственно удаленные клетки.

Наиболее важную координирующую функцию в организме выполняют эндокринная и синаптическая сигнализация. Оба этих типа сигнализации отличаются рядом характерных особенностей.

Одни и те же первичные мессенджеры могут принимать участие в различных типах межклеточной сигнализации. Например, некоторые пептиды функционируют как в качестве нейромедиаторов (синаптическая сигнализация), так и в качестве системных гормонов (эндокринная сигнализация). Некоторые факторы роста, например, эпидермальный фактор роста (EGF), могут экспрессироваться на поверхности клетки в составе внеклеточного домена трансмембранного белка–предшественника. При этом EGF, локализованный на поверхности мембраны, может непосредственно связываться с рецептором клетки-мишени и индуцировать в ней прохождение внутриклеточного сигнального каскада (контактная сигнализация). Высвобождаемый в результате ограниченного протеолитического расщепления внеклеточного домена белка–предшественника растворимый EGF может действовать уже в качестве эндокринной или паракринной сигнальной молекулы на пространственно удаленные клетки.

Наиболее важную координирующую функцию в организме выполняют эндокринная и синаптическая сигнализация. Оба этих типа сигнализации отличаются рядом характерных особенностей.

При эндокринной сигнализации гормоны секретируются во внеклеточное пространство, диффундируют к капиллярам, разносятся с током крови по всему организму, через капилляры вновь проникают во внеклеточное пространство и лишь затем диффундируют к специфическим рецепторам на поверхности клеток-мишеней. Таким образом, скорость распространения гормона определяется скоростью диффузии и кровотока. При эндокринной сигнализации специфичность действия гормона определяется соответствием его химической структуры структуре рецептора, которые подходят друг к другу как ключ к замку. Характерными особенностями эндокринной сигнализации являются низкая скорость передачи регуляторного сигнала (минуты), обусловленная значительным удалением клетки-мишени от места синтеза гормона, а также низкие действующие концентрации и высокое сродство к рецептору ( $K_d$   $10^{-8}$ - $10^{-11}$  М), являющиеся следствием сильного разбавления гормонов в процессе транспорта.

При синаптической сигнализации достигается значительно более высокая скорость передачи и специфичность сигнала. Хотя нейротрансmissão складывается из двух этапов – электрического, протекающего с очень высокой скоростью ( $>100$  м/с), и химического,

более медленного, определяемого скоростью диффузии нейромедиатора через синаптическую щель, – химический этап передачи сигнала также протекает достаточно быстро (<1 миллисекунды) вследствие небольшого расстояния, разделяющего пре- и постсинаптические мембраны. К характерным особенностям синаптической сигнализации относятся: высокая скорость передачи сигнала; высокая специфичность и точность сигнала в пространстве и во времени (определяется непосредственным контактом нервного окончания и клетки-мишени); возможность импульсной регуляции активности клетки-мишени за счет быстрого удаления нейромедиатора из синаптической щели посредством его ферментативной деградации или реутилизации нервным окончанием; высокие действующие концентрации и, соответственно, низкое сродство нейромедиатора к рецептору ( $K_d \sim 10^{-4}$  М).

Очевидно, что в процессе развития многоклеточных организмов выработались системы межклеточной сигнализации различного функционального назначения. Отличия в эффективности действия этих систем могут быть связаны с различиями во времени их появления в процессе эволюции.

Благодаря уникальной химической природе определенным сигнальным молекулам строго соответствуют вполне определенные типы рецепторов. Секреторные клетки выделяют во внеклеточное пространство различные сигнальные молекулы, а клетки-мишени, несущие комплементарные рецепторы, «улавливают» эти молекулы и отвечают определенными физиологическими реакциями. Большинство клеток животных специализировано для выполнения определенных функций и имеет характерный набор рецепторов, который позволяет реагировать на сигналы, запускающие или модулирующие эти функции. В некоторых случаях сигнальные молекулы одного вида могут оказывать различное действие на клетки различных тканей. Например, ацетилхолин уменьшает частоту и силу сердечных сокращений, но стимулирует сокращение скелетной мускулатуры. Это связано с различием типов рецепторов ацетилхолина, представленных на поверхности клеток сердечной и скелетной мышцы. Некоторые секреторные клетки и клетки скелетных мышц несут идентичные рецепторы ацетилхолина, однако его действие на мышечные клетки вызывает их сокращение, а на секреторные клетки – секрецию. Это объясняется наличием разных внутриклеточных путей проведения сигнала в разных клетках при идентичности рецепторов. Таким образом, физиологические реакции клеток-мишеней на действие определенной сигнальной молекулы зависят не только от типа рецептора, но и от типа клетки, несущей рецептор.

В большинстве лиганд-рецепторных систем единственной функцией сигнальной молекулы является активация рецептора. Как правило, сигнальные молекулы не

метаболизируют с образованием интермедиатов, проявляющих физиологическую активность, и не обладают ферментными свойствами. Связывание сигнальной молекулы приводит к изменению свойств рецептора, сигнализирующего клетке о присутствии в окружающей среде специфического лиганда. Многие клетки-мишени обладают способностью к модификации или деградации лиганда и, таким образом, они могут модулировать или прекращать физиологические реакции, вызванные сигнальной молекулой.

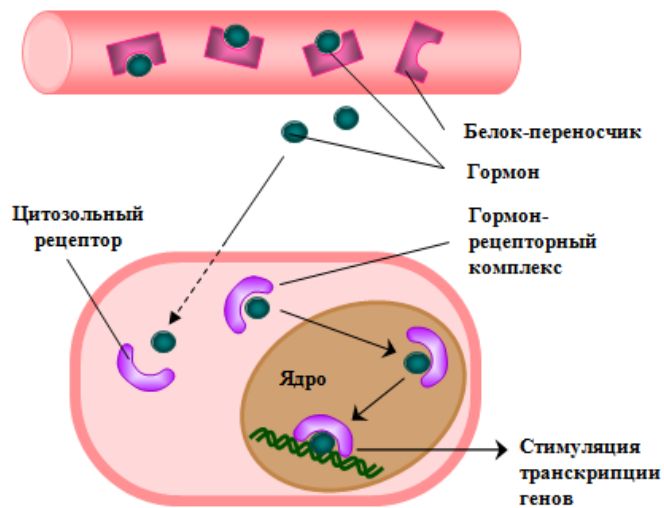
### ***Трансмембранная передача сигнала липофильных и гидрофильных первичных мессенджеров.***

Первичные мессенджеры можно подразделить на три категории:

1. Небольшие липофильные молекулы, диффундирующие через плазматическую мембрану и взаимодействующие с внутриклеточными рецепторами (рис. 3 А);
2. Липофильные молекулы, взаимодействующие с рецепторами клеточной поверхности;
3. Гидрофильные молекулы, взаимодействующие с рецепторами клеточной поверхности (рис. 3 Б).

Только некоторые липофильные сигнальные молекулы, к числу которых относятся стероидные и тиреоидные гормоны, а также ретиноевая кислота, могут свободно проникать в клетку через плазматическую мембрану путем диффузии. Мишенью их действия является ядро, где они оказывают регуляторное влияние на транскрипцию генов или репликацию ДНК. Наиболее важными липофильными сигнальными молекулами, действующими через внутриклеточные рецепторы, являются стероидные гормоны – производные холестерина, участвующие в регуляции ряда ключевых физиологических процессов. Стероидные гормоны могут перемещаться по кровяному руслу лишь в виде комплексов со специфическими плазматическими белками-переносчиками. В непосредственной близости от плазматической мембраны клетки-мишени гормон отделяется от транспортного белка и диффундирует внутрь клетки. В типичной клетке-мишени присутствует от 1000 до 10 000 рецепторов, обладающих высоким сродством ( $K_d$   $10^{-8}$ - $10^{-10}$  М) и избирательностью в отношении определенных стероидных гормонов. В зависимости от типа рецептора местом его локализации в отсутствие гормона может быть цитоплазма или ядро. Рецепторы стероидных гормонов являются довольно крупными белками (мол. масса 50-120 кДа), проявляющими высокую степень структурной гомологии и включающими ряд доменов (рис. 4).

### А. Активация внутриклеточных рецепторов



### Б. Активация рецепторов клеточной поверхности

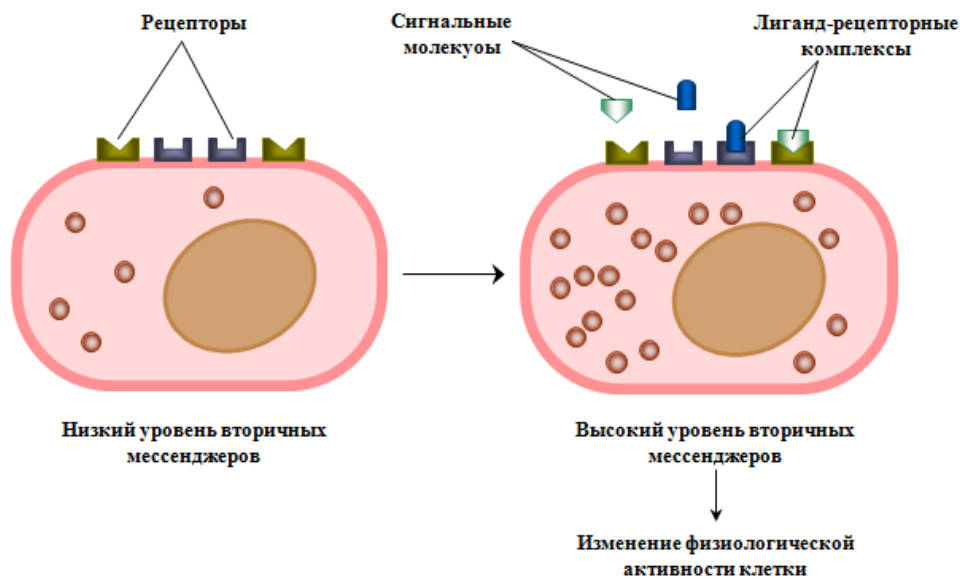


Рис. 3. Пути трансмембранной передачи регуляторных сигналов липофильными (А) и гидрофильными (Б) первичными мессенджерами.

Лиганд-связывающий домен содержит участок связывания гормона; ДНК-связывающий домен и домен дополнительной активации ДНК локализованы в непосредственной близости друг от друга и участвуют в узнавании специфических нуклеотидных регуляторных последовательностей и связывании рецептора с ДНК. Рецепторы стероидных гормонов содержат участки связывания с различными

компонентами клеточного ядра, по-видимому, необходимыми для обеспечения транслокации и соответствующей внутриядерной компартиментализации рецептора. Регуляторные последовательности представляют собой короткие симметричные участки цепей ДНК, которые служат энхансерами транскрипции. Ген, регулируемый гормоном, может содержать несколько (2-5) энхансерных участков, причем они могут располагаться как до начала кодирующей последовательности, так и непосредственно в области локализации гена.

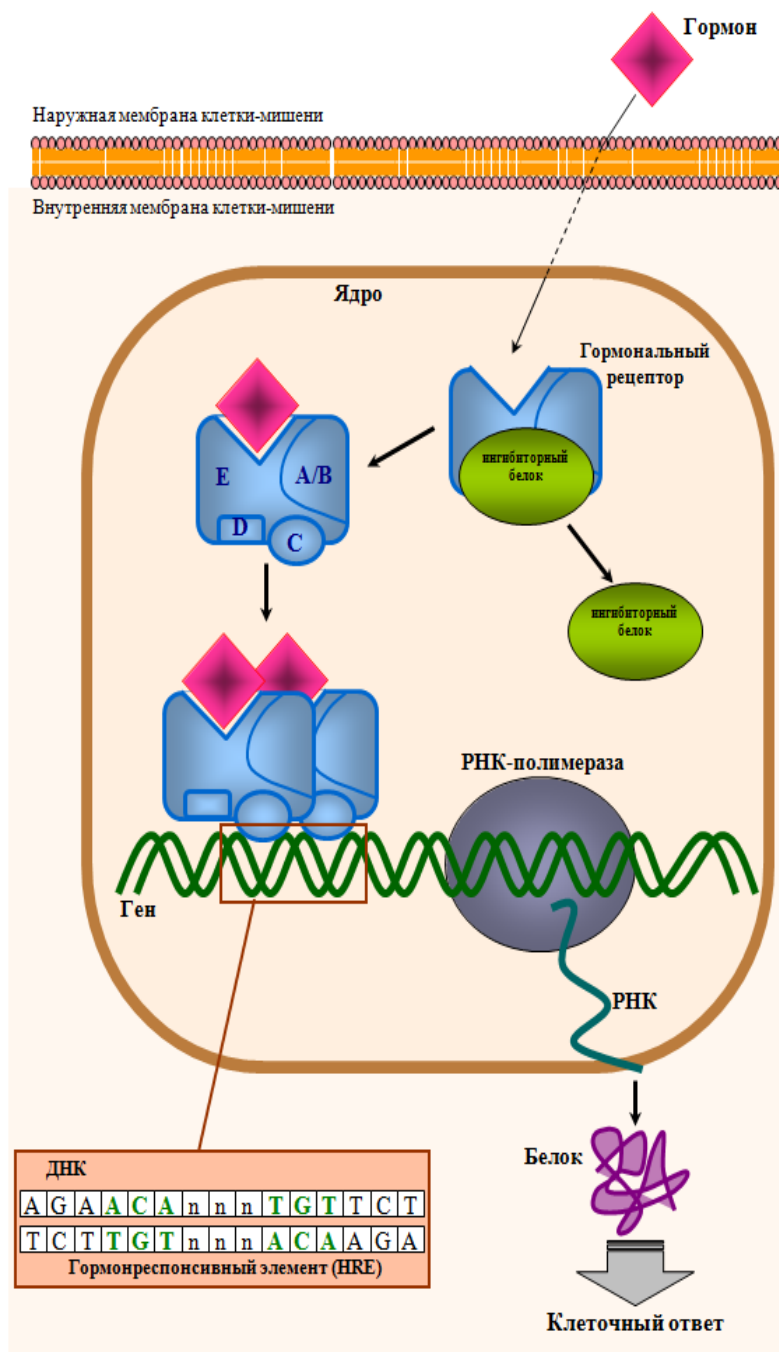


Рис. 4. Механизм действия липофильных гормонов. А/В – регуляторный домен гормонального рецептора; С – ДНК-связывающий домен; D – сайт-специфичный домен; Е – гормон-связывающий домен. Показан характерный для глюкокортикоидов гормонреспонсивный элемент (энхансер).

В неактивном состоянии рецептор стероидного гормона присутствует в клетке в виде комплекса с белком-ингибитором. В случае эстрогенов и глюкокортикоида кортизола белком-ингибитором служит крупный (мол. масса ~90 кДа) шаперонный белок, или белок теплового шока HSP 90. Связывание с гормоном вызывает конформационные изменения в молекуле рецептора, приводящие к уменьшению его сродства к белку-ингибитору. После отделения белка HSP 90 происходит димеризация лиганд-рецепторных комплексов, которые связываются со специфичными для каждого гормона энхансерными участками. Это приводит к инициации транскрипции контролируемых энхансером генов. Как правило, связывание рецепторного комплекса с энхансерным участком вызывает стимуляцию транскрипции ряда генов, поэтому результатом действия одного стероидного гормона является стимуляция экспрессии сразу нескольких белков. В некоторых случаях стероидный гормон действует путем двустадийной стимуляции экспрессии генов. На первой стадии иницируется экспрессия нескольких белков в результате непосредственной индукции транскрипции лиганд-рецепторными комплексами (первичный ответ). На второй стадии белки первичного ответа активируют ряд других генов и, таким образом, вызывают экспрессию других белков, выполняющих в клетке определенные функции (вторичный ответ). Физиологические эффекты стероидных гормонов определяются природой гормона и типом клетки-мишени. Действие одного и того же гормона на клетки различающихся между собой тканей может вызывать совершенно различные физиологические реакции.

Инактивация стероидных гормонов происходит в печени путем ферментативного восстановления (по оксогруппе или двойной связи кольца А) или гидроксирования с последующим биосинтезом водорастворимых конъюгатов (продукты гликозилирования глюкуроновой кислотой или сернокислые эфиры стероидов), которые выводятся с мочой и желчью.

Представителями категории липофильных молекул, взаимодействующих с рецепторами клеточной поверхности, являются эйкозаноиды (название происходит от греческого слова «eikosi», означающего число 20 и указывающего на количество атомов углерода, входящих в состав эйкозаноидов) – производные арахидоновой кислоты, включающие простагландины, лейкотриены, простаглицлины и тромбоксаны. Арахидоновая кислота представляет собой полиненасыщенную (20:4) жирную кислоту, входящую в состав фосфолипидов плазматической мембраны клеток. Эйкозаноиды являются локальными химическими медиаторами и действуют, как и гидрофильные сигнальные молекулы, через рецепторы клеточной поверхности (рис. 5). Эйкозаноиды образуются практически во всех клетках организма, чем существенно отличаются от

классических гормонов, экспрессируемых специализированными клетками желез внутренней секреции.

Биосинтез эйкозаноидов инициируется гормонами, действующими на рецепторы, сопряженные с G-белками. При связывании гормона с рецептором происходит активация G-белка, который в свою очередь активирует фосфолипазу A<sub>2</sub>, осуществляющую расщепление мембранных фосфолипидов с образованием свободной арахидоновой кислоты. При действии липоксигеназы на арахидоновую кислоту и другие полиеновые кислоты образуются гидрокси- и гидропероксипроизводные жирных кислот, из которых в результате последовательных ферментативных реакций дегидратации и переноса образуются лейкотриены. Ключевым ферментом синтеза простагланцинов, тромбоксанов и простагландинов является простагландинсинтаза – сложноорганизованный фермент, локализованный во внутреннем фосфолипидном слое плазматической мембраны. Молекула простагландинсинтазы содержит гем-связывающий центр, а также каталитические центры –циклооксигеназный и пероксидазный. Общим путем биосинтеза эйкозаноидов (кроме лейкотриенов) является двустадийная реакция превращения арахидоновой кислоты под действием простагландинсинтазы в простагландин H<sub>2</sub>. В результате специфических ферментативных превращений простагландина H<sub>2</sub> образуется все многообразие простагланцинов, простагландинов и тромбоксанов. Эйкозаноиды участвуют в регуляции целого ряда важнейших физиологических процессов. Они стимулируют сокращение гладкомышечной ткани, болевые и воспалительные реакции, биосинтез стероидных гормонов и активацию различных липаз, секрецию желудочного сока, гормонов и мукоидов, агрегацию тромбоцитов, передвижение лейкоцитов и т.д.

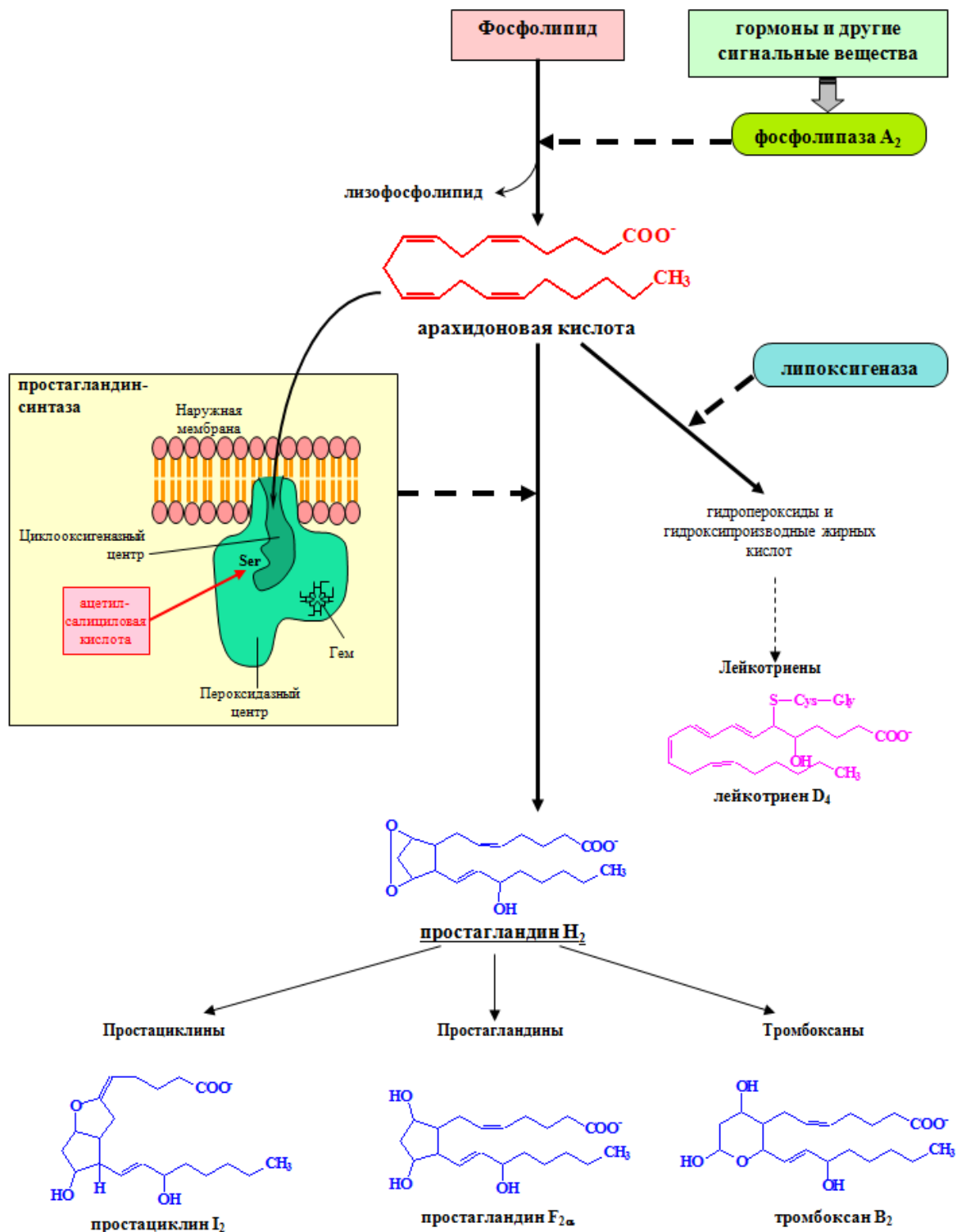


Рис. 5 Пути биосинтеза эйкозаноидов.

Наиболее изученной группой эйкозаноидов являются простагландины. Эти гормоноподобные первичные мессенджеры содержат в своей структуре циклопентановое кольцо и синтезируются из арахидоновой кислоты во всех тканях млекопитающих. Известно по меньшей мере 16 различных простагландинов, которые проявляют биологическое действие посредством связывания со специфическими рецепторами клеточной поверхности, инициирующего прохождение внутриклеточных сигнальных

каскадов, вызывающих различные физиологические реакции. Ряд характерных особенностей простагландинов существенно отличает их от классических гормонов:

1. Их синтез происходит во всех типах тканей, а не в специализированных эндокринных клетках;
2. Секреция простагландинов идет конститутивно с невысокой скоростью. Скорость секреции возрастает при поступлении регуляторных сигналов;
3. В отличие от других липофильных гормонов, простагландины действуют через рецепторы клеточной поверхности, сопряженные с G-белками;
4. Небольшая дальность действия сближает простагландины с локальными медиаторами – гистамином и нейромедиаторами.

Простагландины действуют как локальные биорегуляторы, связываясь с мембранными рецепторами в непосредственной близости от места их синтеза. Регуляторное действие простагландинов распространяется как на синтезирующие их клетки (аутокринное действие), так и на близлежащие клетки (паракринное действие).

Биологические функции простагландинов весьма разнообразны и включают регуляцию сокращения гладкомышечной ткани кровеносных сосудов, матки, бронхов, участие в секреции гормонов и мукоидов, влияние на метаболизм костной ткани, периферическую нервную и иммунную системы, передвижение лейкоцитов и агрегацию тромбоцитов.

Простагландины являются также эффективными лигандами болевых рецепторов. Ацетилсалициловая кислота и некоторые другие жаропонижающие препараты являются специфическими ингибиторами простагландинсинтазы, необратимо инактивирующими фермент путем ацилирования остатка серина вблизи активного центра. Этим объясняется болеутоляющее и жаропонижающее действие аспирина и подобных ему препаратов. В желудке ацетилсалициловая кислота подавляет биосинтез простагландинов, стимулирующих выделение мукоидов, защищающих слизистую оболочку от действия протеолитических ферментов. Поэтому продолжительный прием аспирина может вызвать язвенную болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки.

Простагландины инактивируются в течение нескольких секунд после секреции во внеклеточное пространство путем окисления гидроксигрупп и восстановления двойных связей. Благодаря столь быстрой инактивации дальность действия простагландинов весьма ограничена.

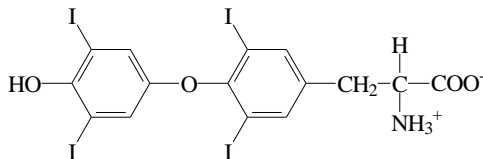
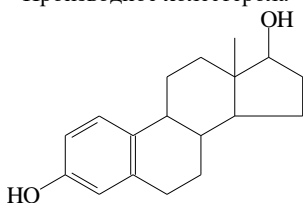
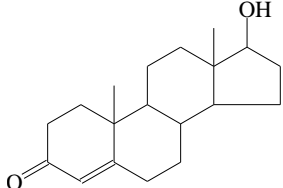
***Основные классы внеклеточных сигнальных молекул: локальные химические медиаторы; гормоны; нейромедиаторы. Классификация первичных мессенджеров по***

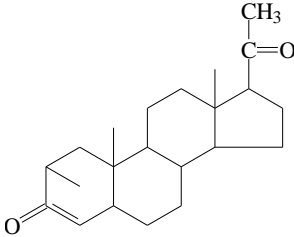
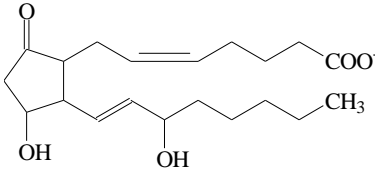
**растворимости в воде. Характеристика гидрофобных и гидрофильных сигнальных молекул.**

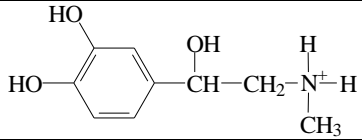
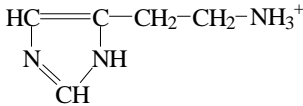
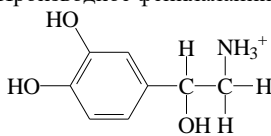
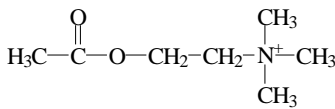
К гидрофильным сигнальным молекулам (первичным мессенджерам), взаимодействующим с рецепторами клеточной поверхности, относятся различные пептидные гормоны, цитокины (факторы роста, интерлейкины (лимфокины и монокины) и интерфероны), нейромедиаторы и др. (табл. 1). В отличие от липофильных первичных мессенджеров, гидрофильные не могут проникать в клетку через плазматическую мембрану. В клетку гидрофильные мессенджеры могут попадать лишь после специфического связывания с соответствующим рецептором на поверхности плазматической мембраны и запуска механизма рецепторопосредованного эндоцитоза. При этом механизмом биологического действия этих мессенджеров является индукция прохождения внутриклеточных сигнальных каскадов, приводящих в конечном итоге к тем или иным физиологическим реакциям. Начальным этапом запуска подобных каскадов является связывание мессенджера с рецептором.

Таким образом, в отличие от внутриклеточных рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов, рецепторы клеточной поверхности не участвуют непосредственно в регуляции экспрессии генов, а лишь передают сигнал первичного мессенджера через плазматическую мембрану.

Таблица 1. Основные физиологические функции некоторых представителей класса сигнальных молекул – первичных мессенджеров.

Сигнальная молекула	Локализация	Природа соединения	Физиологические эффекты
<b>Липофильные</b>			
Тиреоидный гормон (тироксин)	Щитовидная железа	Производное тирозина 	Повышение метаболической активности большинства клеток
Эстрадиол	Яичники, плацента	Производное холестерина 	Влияние на развитие и поддержание женских вторичных половых признаков; созревание и циклическая активность придаточных органов половой системы
Тестостерон	Семенники	Производное холестерина 	Влияние на развитие и поддержание мужских вторичных половых признаков и созревание придаточных органов

Прогестерон	Яичники (желтое тело), плацента	Производное холестерина 	Регуляция подготовки матки к беременности, сохранение беременности, развитие альвеолярной системы молочных желез
Простагландин PGE <sub>2</sub>	Клетки многих типов	Производное арахидоновой кислоты 	Болевые реакции, сокращение гладкой мускулатуры
<b>Гидрофильные</b>			
<b>Гормоны (эндокринная регуляция)</b>			
Инсулин	β-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы	Белок (~ 6 кДа) (α-цепь – 21 аминокислота, β-цепь – 30 аминокислот)	Стимуляция утилизации глюкозы, а также синтеза липидов и белков
Соматостатин	Гипоталамус	Пептид (14 аминокислот)	Подавление секреции соматотропина передней долей гипофиза
Гормон роста (соматотропин)	Передняя доля гипофиза	Белок (22,9 кДа, 191 аминокислота)	Стимуляция синтеза в печени соматомедин-1
Соматомедин-1 (инсулиноподобный фактор роста 1)	Преимущественно в печени	Белок (~ 8,4 кДа, 70 аминокислот)	Стимуляция дифференцировки мышечной, жировой и хрящевой ткани, участвует в регуляции метаболизма Ca <sup>2+</sup> и фосфатов
Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Передняя доля гипофиза	Белок (~ 4,7 кДа, 39 аминокислот)	Стимулирует синтез кортизола корой надпочечников и мобилизацию жирных кислот из жировых клеток
Паратгормон	Паращитовидные железы	Белок (~ 10 кДа, 84 аминокислоты)	Усиливает резорбцию кости, как следствие – повышает уровень Ca <sup>2+</sup> и фосфата в крови; усиливает реабсорбцию почками Ca <sup>2+</sup> и Mg <sup>2+</sup> и уменьшает реабсорбцию фосфата
Эпидермальный фактор роста	Клетки эпителиального и мезенхимального происхождения	Белок (~6 кДа)	Стимулирует пролиферацию эпидермиса и других клеток
Тиреолиберин	Гипоталамус	Пептид (3 аминокислоты)	Стимуляция синтеза тиреотропного гормона передней долей гипофиза
Тиреотропный гормон (ТТГ)	Передняя доля гипофиза	Белок (~ 24,5 кДа, α-цепь – 92 аминокислоты, β-цепь – 112 аминокислот)	Стимулирует синтез тироксина в щитовидной железе и мобилизацию жирных кислот из жировых клеток
Адреналин	Мозговое вещество надпочечников	Катехоламин	Стимуляция распада гликогена в печени и мышцах.

			Мобилизация жиров
<b>Локальные химические медиаторы (паракринная регуляция)</b>			
Гистамин	Тучные клетки	Производное гистидина 	Участие в воспалительных реакциях. Вызывает расширение и увеличение проницаемости кровеносных сосудов
Фактор роста нервов	Кожа, ткани, иннервируемые симпатическими нервами	Белок (~ 14 кДа, состоит из двух идентичных цепей по 118 аминокислот каждая)	Регуляция роста и поддержание жизнеспособности нейронов
<b>Нейротрансмиттеры (синаптическая передача)</b>			
Глицин	Нервные окончания	Аминокислота ${}^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Тормозный медиатор в ЦНС
$\gamma$ -аминомасляная кислота	Нервные окончания	Аминокислота ${}^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	—
Энкефалин	Нервные окончания	Пептид (5 аминокислот)	Торможение передачи болевых сигналов в ЦНС
Норадреналин	Нервные окончания	Производное фенилаланина 	Возбуждающий и тормозный медиатор ЦНС и периферической нервной системы
Ацетилхолин	Нервные окончания		Возбуждающий медиатор в нервно-мышечном соединении; возбуждающий и тормозный медиатор в ЦНС и периферической нервной системе

### **Лекция №3. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ.**

Классы белковых рецепторов клеточной поверхности. Особенности и функциональная характеристика каналобразующих, каталитических рецепторов и рецепторов, сопряженных с G-белками.

В зависимости от механизма передачи внеклеточного сигнала белковые рецепторы клеточной поверхности подразделяют на четыре основных класса (рис. 6).

1. Рецепторы, сопряженные с G-белками (рис. 6а). После связывания лиганда с рецептором активируется G-белок, который активирует или ингибирует ферменты, генерирующие специфические вторичные мессенджеры. Через G-белки также осуществляется регуляция ионных каналов, заключающаяся в изменении мембранного потенциала. Примеры лигандов: адреналин, серотонин, глюкагон.

2. Регулируемые ионные каналы (рис. 6б). Связывание с лигандом приводит к изменению конформации рецептора, позволяющему специфическим ионам проходить через канал. Результатом активации канала является изменение мембранного потенциала или внутриклеточного уровня вторичных мессенджеров.

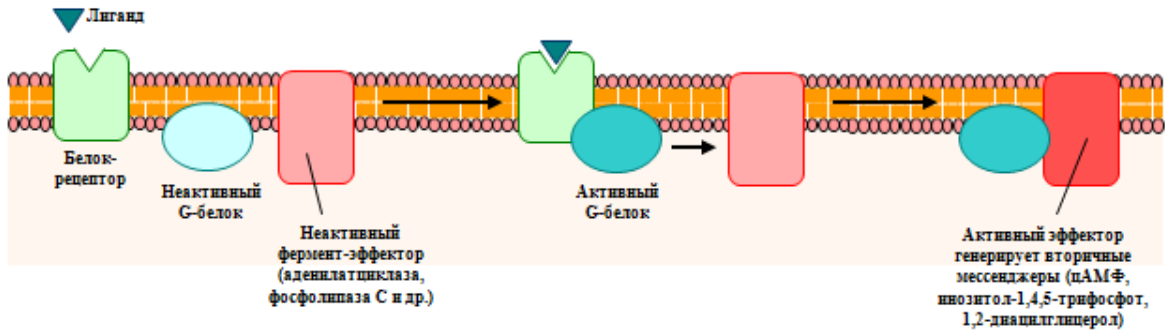
Пример: ацетилхолиновый рецептор в нервно-мышечном соединении, регулируемые  $Ca^{2+}$ -каналы эндоплазматического ретикулума.

3. Рецепторы, не проявляющие каталитической активности, но ассоциированные с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами (рис. 6в).

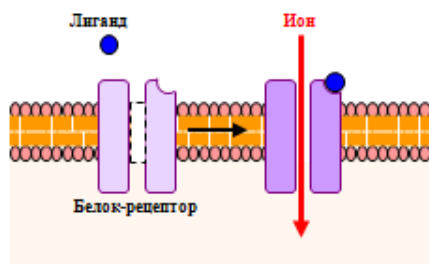
Связывание с лигандом приводит к димеризации мономерных рецепторов, которые взаимодействуют с одной (или более) цитозольной тирозиновой протеинкиназой и активируют ее.

Примером могут служить рецепторы многих цитокинов, интерферонов и некоторых ростовых факторов. Иногда эти рецепторы классифицируют как суперсемейство цитокиновых рецепторов.

а) Рецепторы, сопряженные с G-белком (адреналин, глюкагон, серотонин)



б) Регулируемые ионные каналы (ацетилхолин)



в) Рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназой (эритропоэтин, интерфероны)

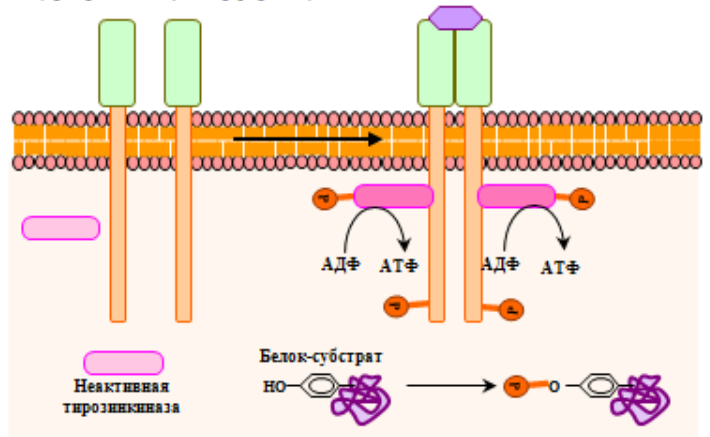


Рис. 6. Основные классы рецепторов клеточной поверхности.

4. Каталитические рецепторы проявляющие ферментативную активность.

Этот класс включает несколько типов рецепторов:

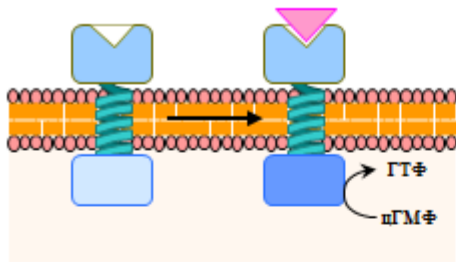
а) Рецепторы проявляющие (после связывания с лигандом) гуанилатциклазную активность (рис. 6г);

б) Рецепторы проявляющие фосфатазную активность (рис. 6д);

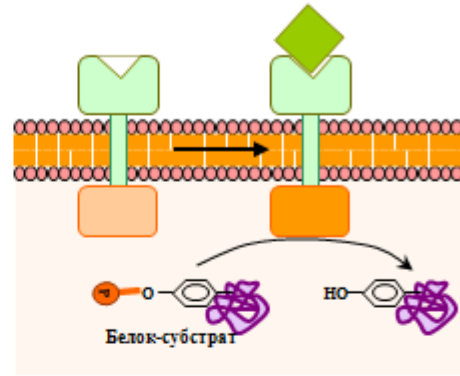
В обоих случаях ферментативную активность проявляет цитоплазматический домен рецепторов.

в) Рецепторы, проявляющие протеинкиназную активность (рис. 6е, ж):

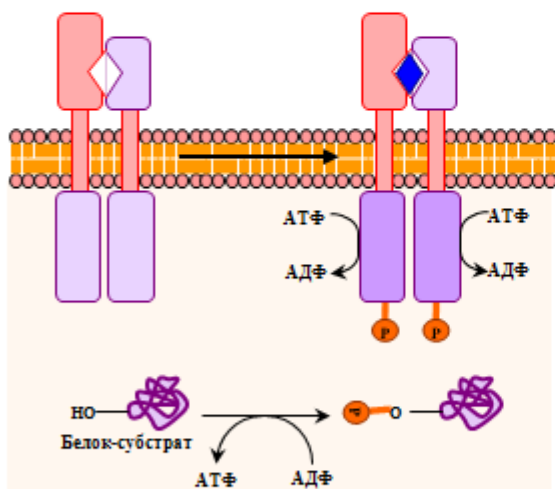
г) Рецепторная гуанилатциклаза  
(основной фактор предсердия)



д) Рецепторная тирозинфосфатаза  
(лейкоцитарный белок CD45)



е) Рецепторные серин/треонинкиназы  
(трансформирующий фактор роста β)



ж) Рецепторные тирозинкиназы  
(инсулин, эпидермальный фактор роста)

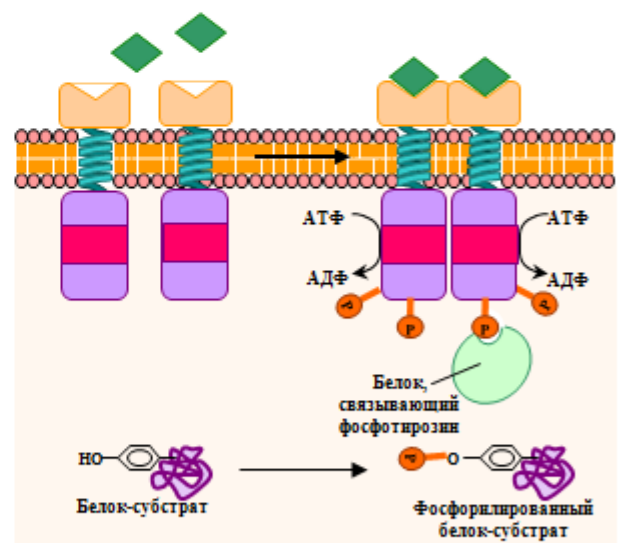


Рис. 6 (продолжение). Основные классы рецепторов клеточной поверхности.

- рецепторы, проявляющие серин/треонинкиназную активность (рис. 6е). К этому классу относится рецептор ТФРβ. При активации рецептора ТФРβ происходит автофосфорилирование каталитических доменов димера с последующим фосфорилированием и активацией цитозольных факторов транскрипции Smad. В ядре Smad индуцируют транскрипцию определенных генов, вызывая таким образом физиологические ответы на действие ТФРβ.
- рецепторы, проявляющие тирозинкиназную активность (РТП) (рис. 6ж). Рецепторы инсулина и многих ростовых факторов являются тирозиновыми протеинкиназами, активируемыми после взаимодействия с лигандами (рис. 6е,

ж) и проявляющими способность к автофосфорилированию или субстратному фосфорилированию.

Связывание с лигандом приводит к димеризации рецепторов и активации их каталитических цитозольных доменов и автофосфорилированию. Способность к автофосфорилированию является характерной особенностью этих рецепторов. Автофосфорилирование тирозиновых протеинкиназ приводит к формированию на их поверхности сайтов связывания для нескольких цитозольных белков и ферментов. Связывание пространственно приближает эти ферменты к их субстратам локализованным в плазматической мембране или примембранной области. В некоторых случаях эти ферменты генерируют после связывания с каталитическим доменом рецептора вторичные мессенджеры. Помимо автофосфорилирования, РТП могут фосфорилировать различные субстратные белки по остаткам тирозина и таким образом изменять их активность.

Помимо классификации, основанной на механизме передачи внеклеточных сигналов, рецепторы, опосредующие трансмембранные сигнальные процессы, подразделяют на три суперсемейства в зависимости от количества трансмембранных сегментов:

1. Интегральные мембранные рецепторы с 7 трансмембранными сегментами (7TMS рецепторы). Во внеклеточном домене этих рецепторов имеется центр узнавания специфических лигандов, а внутриклеточный домен содержит центр узнавания G-белка.

2. Каталитические рецепторы с одиночным  $\alpha$ -спиральным трансмембранным сегментом и вне- и внутриклеточными глобулярными доменами. Внеклеточный домен содержит центр узнавания лиганда; внутриклеточный домен обладает каталитической активностью.

3. Олигомерные ионные каналы состоят из ассоциированных белковых субъединиц, каждая из которых содержит несколько трансмембранных сегментов. Эти олигомерные структуры представляют собой лиганд-зависимые ионные каналы. Связывание со специфическим лигандом обычно открывает ионный канал. Часто в качестве лигандов регулируемых ионных каналов выступают нейротрансмиттеры.

#### **Лекция №4. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ ТИРОЗИНКИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ**

Строение и физиологическая роль каталитических рецепторов, проявляющих тирозинкиназную активность. Димеризация и активация рецепторов тирозинкиназ путем трансфосфорилирования. Механизм трансмембранной передачи внеклеточного сигнала с участием рецепторной тирозинкиназы и Ras-белка. Этап протеинкиназного каскада передачи внешнего регуляторного сигнала, следующий за активацией Ras-белка. Сигнальный путь, вовлекающий тирозинкиназные рецепторы и ГТФ-связывающий белок Ras в активацию факторов транскрипции и стимуляцию экспрессии генов.

Каталитические рецепторы, проявляющие тирозинкиназную активность, представляют важнейший класс рецепторов, лиганды которых могут быть как растворимыми, так и мембраносвязанными пептидными факторами роста или гормонами (инсулин, ЭФР). Главными функциями РТП являются: каскадная передача сигналов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток, а также процессы клеточного метаболизма.

РТП были открыты в 70-х годах прошлого столетия, а механизм передачи ими регуляторного сигнала разъяснен лишь в последующие десятилетия.

Каталитические рецепторы РТП состоят из: гликозилированного внеклеточного домена, содержащего центр связывания с лигандом; одиночной гидрофобной трансмембранной  $\alpha$ -спирали (трансмембранный домен); цитозольного домена, включающего центр тирозинкиназной активности (рис. 7). Связывание лиганда в большинстве случаев приводит к димеризации неактивных мономерных рецепторов с последующим трансавтофосфорилированием тирозиновых остатков цитозольных доменов димера. Субъединицы некоторых РТП, включая тетрамерный инсулиновый рецептор, ковалентно связаны друг с другом. Хотя эти рецепторы присутствуют в клетке в виде димеров или тетрамеров даже в отсутствие лиганда, присоединение лиганда является необходимым условием для автофосфорилирования рецептора. Фосфотирозиновые остатки активированных РТП играют ключевую роль в дальнейшей передаче сигнала от первичного мессенджера к внутриклеточным сигнальным молекулам. Некоторые РТП, помимо автофосфорилирования, могут фосфорилировать субстратные белки, которые являются элементами различных сигнальных путей.

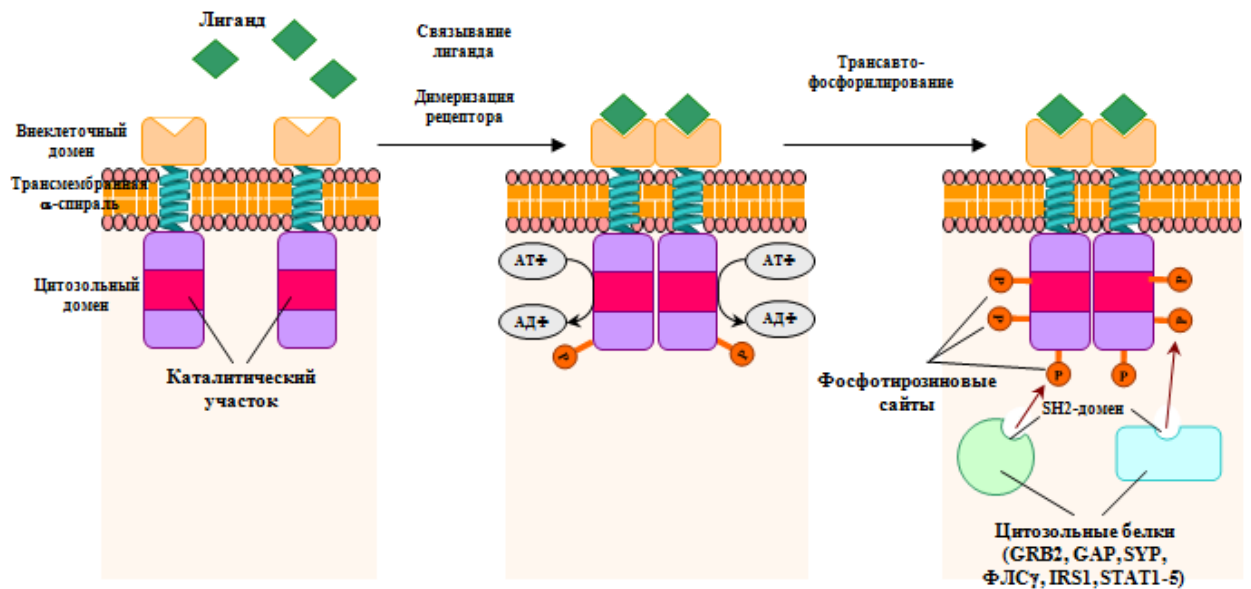


Рис. 7. Активация, димеризация и трансавтофосфорилирование рецепторных тирозинкиназ. Цитозольные белки и ферменты, несущие консервативный домен SH2, узнают специфические фосфотирозиновые сайты

## Белки, участвующие в начальных этапах каскадной передачи регуляторного сигнала через РТП

### SH2-белки

После автофосфорилирования цитоплазматический домен активированного рецептора приобретает способность к связыванию с различными белками, опосредующими передачу внеклеточного сигнала:

- адапторными белками GRB2 и Shc;
- эстафетным белком IRS1;
- GAP (белком, активирующим ГТФазу);
- протеинфосфатазами SYP и Ship (фосфатаза ИФ<sub>5</sub>);
- ферментами синтеза производных фосфатидилинозитола: фосфатидилинозитол-3 киназой и фосфолипазой C<sub>γ</sub>;
- факторами транскрипции STAT1–5;
- белком окаймленных ямок клатрином (не содержит SH2-домена);
- структурным белком тензином (фокальная адгезия).

Все эти белки связываются с различными фосфотирозиновыми остатками на РТП через консервативный домен, называемый SH2 (Src homology domain). Название происходит от гомологии с доменом цитозольной тирозинкиназы, кодируемой онкогеном src. SH2-домены различных белков довольно консервативны и близкогомологичны. С их помощью SH2-белки связываются с различными участками внутриклеточного домена рецептора, в которых локализованы фосфотирозиновые остатки. Уникальная аминокислотная последовательность SH2-доменов индивидуальных белков обуславливает их специфичность в отношении связывания того или иного фосфотирозинового остатка.

### **Ras-белок**

Ras-белок является ключевым компонентом сигнальных путей, связанных с РТП. Он служит своеобразным внутриклеточным “переключателем”, способным запускать и отменять внутриклеточный каскад передачи сигнала (рис. 8). Активное и неактивное состояния Ras-белка периодически сменяют друг друга. В неактивном состоянии Ras-белок присутствует в клетке в виде комплекса Ras•ГДФ, однако связывание определенных факторов роста или других лигандов с их рецепторами индуцирует формирование активного комплекса Ras•ГТФ. Этому предшествует связывание Ras-белка с Sos-белком, которое приводит к конформационным изменениям в молекуле Ras-белка и снижению сродства к ГДФ, а сродство к ГТФ, напротив, резко возрастает. Результатом этих событий является замещение ГДФ на ГТФ в нуклеозидфосфат-связывающем центре Ras-белка и формирование активного комплекса Ras•ГТФ. После активации Ras-белка комплекс Sos•Ras•ГТФ распадается, и Ras•ГТФ участвует в дальнейших этапах передачи регуляторного сигнала путем активации серин/треониновой киназы Raf. Ras-белок является ГТФазой, гидролизующей ГТФ с низкой скоростью; в активном состоянии он пребывает до тех пор, пока не произошло расщепление ГТФ. Гидролиз ГТФ приводит к регенерации неактивного комплекса Ras•ГДФ, причем присутствие GAP-белка ускоряет этот процесс в сотни раз, что позволяет рассматривать GAP-белок как фактор инактивации Ras-белка. Хотя Ras-белок и G $\alpha$ -субъединицы типичных G-белков являются ГТФазами, участвующими в передаче регуляторного сигнала, они проявляют низкую гомологию и заметно различаются молекулярной массой. Кроме того, в отличие от G-белков, для функционирования Ras-белка необходимо присутствие еще двух белков – Sos и GAP. Мутантные Ras-белки многих типов опухолей являются продуктами онкогенов, связывающими, но не способными гидролизовать ГТФ. Поэтому Ras-онкобелки

постоянно активны, что и является одной из причин злокачественной трансформации клеток.

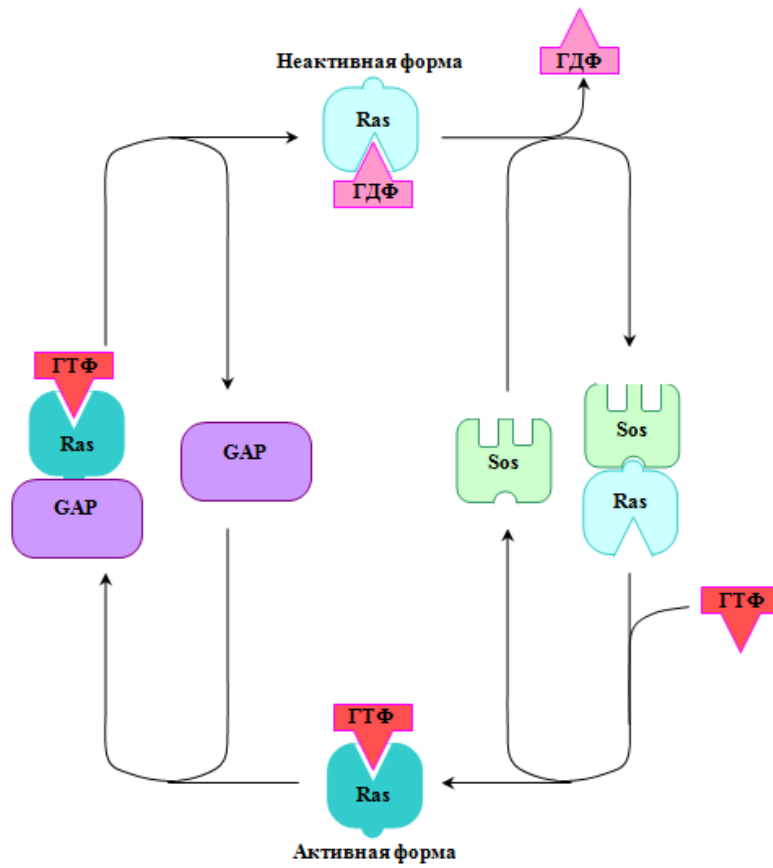


Рис. 8. Циклическое взаимопревращение неактивной (Ras•ГДФ) и активной (Ras•ГТФ) форм Ras-белка. Sos – белковый фактор обмена гуанинового нуклеотида; GAP – белок, активирующий ГТФазу.

Ras-белки играют центральную роль в передаче сигналов от многих РТП к серин/треониновым киназам, контролирующим процессы клеточного роста и дифференцировки.

### Механизм каскадной передачи регуляторного сигнала с участием РТП

Механизм действия Ras-белка на примере активации рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) приведен на рис. 9.

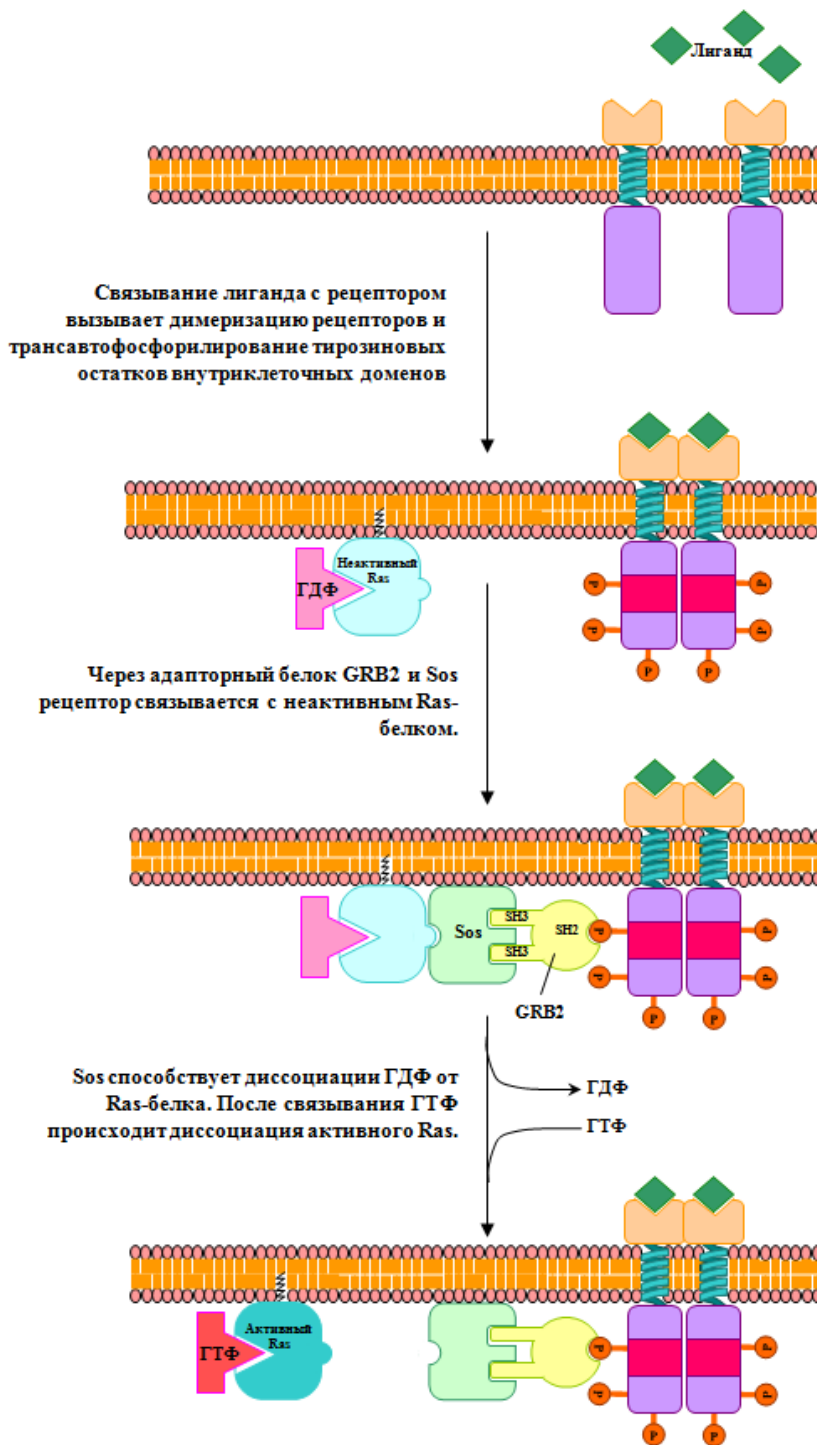


Рис. 9. Механизм трансмембранной передачи внеклеточного сигнала с участием рецепторной тирозинкиназы и Ras-белка.

После связывания с лигандом и автофосфорилирования рецептора два цитозольных белка GRB2 и Sos обеспечивают связь рецептора с Ras-белком и его активацию. SH2 домен белка GRB2 связывается со специфическим участком цитозольного домена рецептора, несущим фосфотирозиновый остаток. Белок GRB2 также содержит два специфических SH3 домена, которые связываются с Sos-белком и вызывают конформационную

перестройку и активацию последнего. Таким образом, белок GRB2 функционирует как адапторный белок для рецептора ЭФР. В активной форме Sos функционирует как фактор обмена ГДФ на ГТФ в нуклеозидфосфат-связывающем центре Ras-белка. Связывание белков Sos и Ras вызывает переход последнего в активную ГТФ-связывающую форму, которая затем “запускает” протеинкиназный каскад, приводящий в конечном итоге к изменению характера экспрессии генов. Комплекс, включающий рецептор РТТ, GRB2 и Sos, формируется на цитозольной поверхности плазматической мембраны, причем Ras-белок закорен в мембране. В этой цепи передачи сигнала как белок GRB2, так и Sos обладают способностью к специфическому связыванию сразу с двумя белками, что и обеспечивает стабилизацию комплекса. Активация рецептора приводит к смене цитоплазматической локализации белка Sos на примембранную, где Sos может связываться и активировать Ras.

После активации Ras-белка происходит дальнейшая передача регуляторного сигнала, включающая несколько этапов (рис. 10):

1. Активированный Ras-белок связывается с N-концевым доменом серин/треониновой протеинкиназы Raf.

2. Протеинкиназа Raf связывается с тирозин/сериновой протеинкиназой MEK и активирует ее путем фосфорилирования.

3. Протеинкиназа MEK, в свою очередь, активирует путем фосфорилирования серин/треониновую протеинкиназу MAP. При этом фосфорилированию подвергается по одному сериновому и тирозиновому остатку протеинкиназы MAP.

4. Протеинкиназа MAP фосфорилирует множество различных субстратных белков, включая и факторы транскрипции, участвующие в регуляции экспрессии ключевых белков клеточного цикла и дифференцировки. Результатом такого фосфорилирования может являться изменение внутриклеточного метаболизма, секреторной, пролиферативной, миграционной активности клетки, а также целого ряда других физиологических функций. Активация MAP-киназы в ответ на внеклеточные сигналы является высококонсервативным путем киназного каскада во всех эукариотических клетках. Возникает вопрос, каким образом достигается специфичность сигнала, если в ответ на стимуляцию клеток всегда активируется MAP-киназный каскад? Во-первых, различные гормоны могут запускать MAP-киназный путь в различных типах клеток, в зависимости от набора рецепторов которыми они обладают. Хотя различные сигнальные молекулы индуцируют MAP-киназный каскад, они часто вызывают различные клеточные ответы, наблюдаемые в различных типах клеток. Это может быть связано с активацией дополнительных сигнальных путей в некоторых клетках, различиями в спектре факторов

транскрипции или других белков, активируемых протеинкиназой MAP, различиями в субстратах активированных белков в зависимости от типа регулируемых клеток.

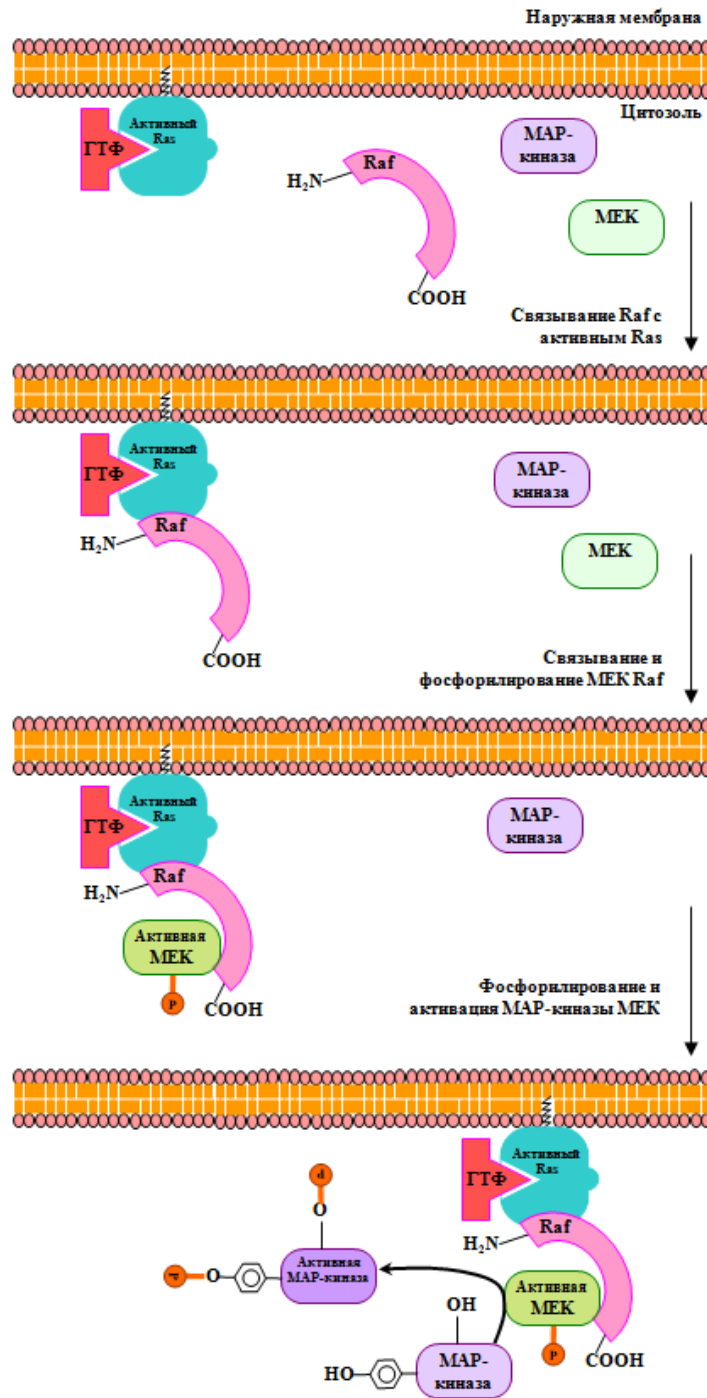


Рис. 10. Этап протеинкиназного каскада передачи внешнего регуляторного сигнала, следующий за активацией Ras.

## **Обобщенный путь трансмембранной передачи регуляторных сигналов рецепторными тирозинкиназами**

Передача регуляторного сигнала через систему РТП/Ras является консервативным механизмом, складывающимся из ряда последовательных этапов:

1. Связывание с лигандом приводит к димеризации рецепторов и активации цитозольных протеинкиназных доменов РТП, которые подвергаются трансавтофосфорилированию по остаткам тирозина;

2. Домен SH2 адапторного белка GRB2 связывается со специфическими фосфотирозинкиназными остатками аминокислотной последовательности активированной РТП;

3. SH3 домены GRB2 специфично связываются с цитозольным белком Sos, принимающим участие в обмене ГДФ на ГТФ в гуанозинфосфат-связывающем центре Ras-белка;

4. Связывание белка Sos с Ras•ГДФ приводит к изменению конформации Ras и снижению его сродства к ГДФ. ГТФ замещает ГДФ в нуклеозидфосфат-связывающем центре Ras-белка с образованием активного комплекса Ras•ГТФ. Все этапы активации Ras-белка происходят в примембранной области;

5. Активированный Ras-белок связывается с N-концевым доменом цитозольной протеинкиназы Raf, фиксируя фермент в примембранной области;

6. C-концевой участок протеинкиназы Raf связывается с MEK и активирует ее путем фосфорилирования;

7. Протеинкиназа MEK фосфорилирует и активирует протеинкиназу MAP;

8. Протеинкиназа MAP фосфорилирует различные субстратные белки, включая определенные факторы транскрипции, что приводит к проявлению физиологических ответов на действие первичного мессенджера. Внутриклеточная регуляция активности субстратных белков осуществляется посредством согласованного действия механизмов фосфорилирования–дефосфорилирования.

Большинство рецепторов РТП передает сигнал по вышеописанному пути, однако существуют и вариации. Например, рецептор ТцФР, хотя и является РТП, лишен сайта связывания с GRB-2. Тем не менее, стимуляция рецептора ТцФР приводит к активации Ras. Кроме того, как указывалось выше, для некоторых РТП характерно непосредственное фосфорилирование субстратных белков каталитическими доменами рецептора.

## Типы РТП

Различают три основных типа рецепторов РТП (рис. 11).

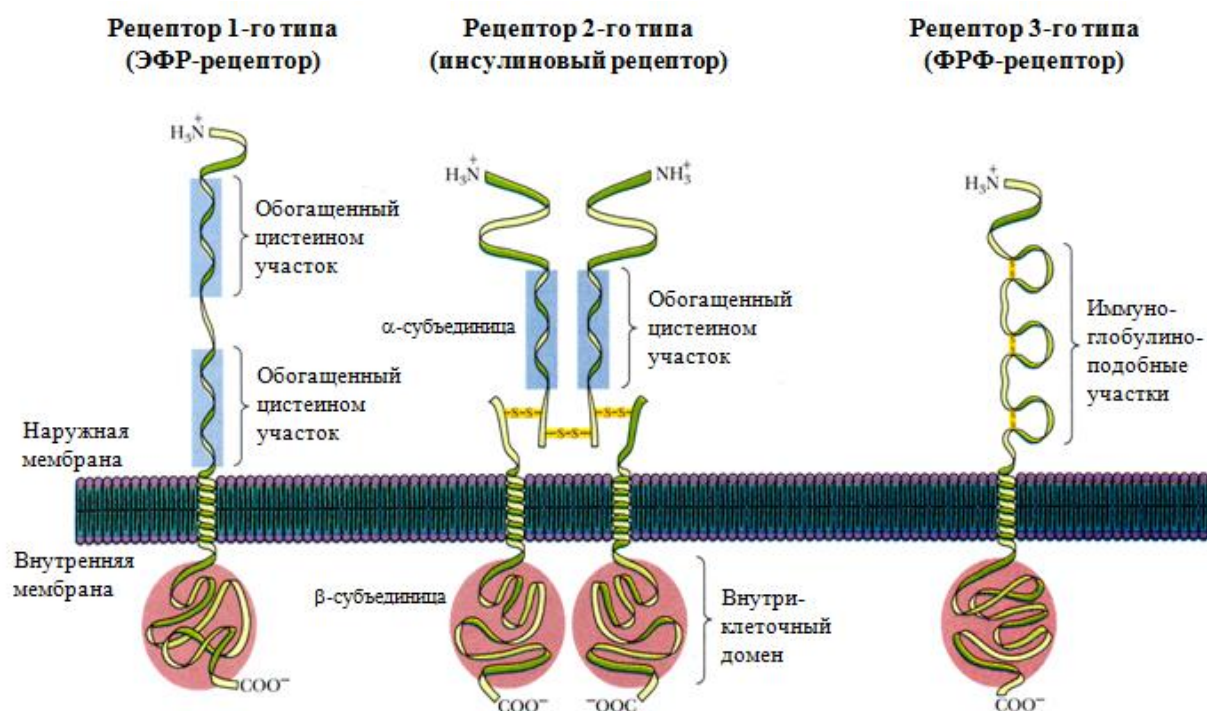


Рис. 11 Три основных типа рецепторных тирозинкиназ.

К рецепторам 1-го типа относят РТП, подобные рецептору ЭФР. В неактивированном состоянии рецепторы 1-го типа являются мономерами и содержат во внеклеточном N-концевом домене два обогащенных цистеином участка, в которых локализованы сайты гликозилирования. Внеклеточные домены рецепторов 1-го типа отличаются различной степенью гликозилирования. Трансмембранный домен рецептора представлен  $\alpha$ -спиралью. Внутриклеточные C-концевые домены РТП всех трех типов включают центры, проявляющие тирозинкиназную активность и регуляторные участки, содержащие сайты автофосфорилирования.

К рецепторам 2-го типа относятся РТП, подобные рецептору инсулина. Они являются гликопротеинами, включающими два вида субъединиц, составляющих тетрамер ( $\alpha_2\beta_2$ ).  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы синтезируются в виде одиночной полипептидной цепи вместе с N-концевой сигнальной последовательностью. Последующий протеолитический процессинг приводит к разделению  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц.  $\beta$ -субъединица состоит из 620

аминокислотных остатков и является интегральным трансмембранным белком с одиночной трансмембранной  $\alpha$ -спиралью. N-концевая часть молекулы  $\beta$ -субъединицы локализована снаружи, а C-концевая - внутри клетки.  $\alpha$ -субъединица состоит из 735 аминокислотных остатков и является внеклеточным белком.  $\alpha$ -субъединицы связаны с  $\beta$ -субъединицами и друг с другом тремя дисульфидными связями. Участок связывания с инсулином локализован во внеклеточном домене рецептора в области обогащенных цистеином участков  $\alpha$ -субъединиц.

В группу рецепторов 3-го типа входят рецепторы, подобные рецепторам ФРФ и ТцФР. Характерной особенностью рецепторов 3-го типа является наличие трех (в случае рецептора ФРФ) или пяти (рецептор ТцФР) иммуноглобулиноподобных участков во внеклеточном домене.

### - РТП как аллостерические ферменты

Поскольку внеклеточный и внутриклеточный домены РТП соединены лишь одиночной трансмембранной  $\alpha$ -спиралью, возникает вопрос о механизме сигнала от первичного мессенджера к внутриклеточному, каталитическому домену рецептора. Как видно на рис. 12, передача сигнала осуществляется посредством димеризации или ассоциации (в случае рецептора инсулина) рецепторов, которая инициируется после связывания сигнальной молекулы рецептором. Взаимодействие сигнальной молекулы с рецептором вызывает конформационные изменения во внеклеточном домене, индуцирующие ассоциацию рецепторов. Ассоциация рецепторов создает возможность для взаимодействия внутриклеточных доменов, приводящего к активации каталитических центров и транс-автофосфорилированию. В случае рецепторов 2-го типа, связывание сигнальной молекулы индуцирует внутримолекулярное взаимодействие между  $\alpha\beta$ -частями рецепторного комплекса. Таким образом, рецепторы РТП можно рассматривать в качестве трансмембранных аллостерических ферментов.

Автофосфорилирование по остаткам тирозина, позволяет РТП проявлять активность даже после диссоциации сигнальной молекулы от рецептора. Инактивация каталитического рецептора может достигаться посредством фосфорилирования остатков серина или треонина во внутриклеточном домене. Подобное инактивирующее фосфорилирование катализируют протеинкиназы А и С, что указывает на прямую связь между сигнальными путями, опосредованными РТП и рецепторами, сопряженными с G-белками, активация которых приводит к изменению внутриклеточного уровня вторичных мессенджеров (цАМФ, ИФ<sub>3</sub>, ДАГ и Ca<sup>2+</sup>) и активации протеинкиназ А и С.

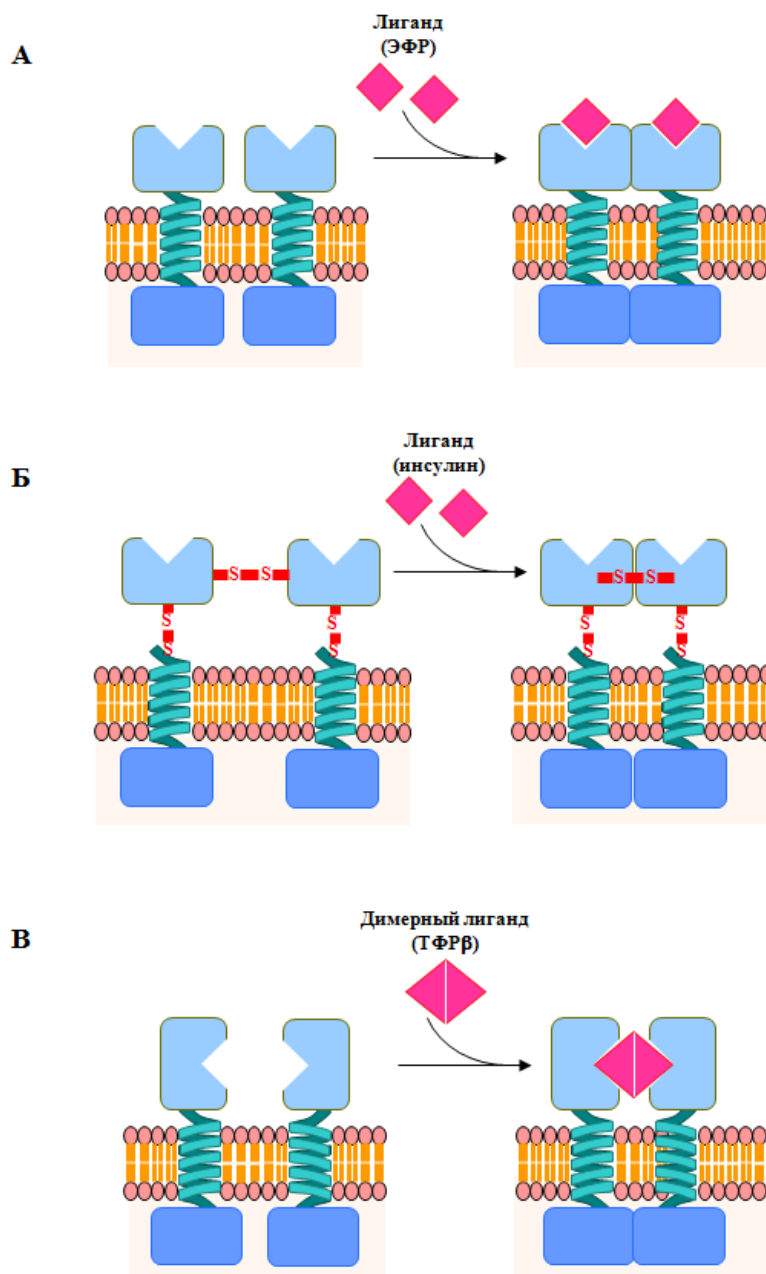


Рис. 12. Различные типы ассоциации и активации рецепторов РТП, вызванной лиганд-рецепторными взаимодействиями. А – рецептор ЭФР; Б – рецептор инсулина; В – рецептор ТФР $\gamma$ .

### РТП - продукты онкогенов

В опухолевых клетках нередко обнаруживаются аномальные каталитические рецепторы, проявляющие неконтролируемую протеинкиназную активность и являющиеся продуктами онкогенов. Хорошими примерами аномальных каталитических рецепторов являются продукты онкогенов *erbB*, *erbA* и *neu*. Вирусный онкоген *VerbB* (эритробластоз и саркомы у птиц) кодирует рецептор, близкогомологичный рецептору ЭФР, но

лишенный лиганд-связывающего участка. Клетки с такими дефектными рецепторами не реагируют на внешние сигналы, а их рецепторы проявляют конститутивную протеинкиназную активность, следствием которой является неконтролируемая клеточная пролиферация. Вероятно, что онкоген *VerbB* является продуктом частичного захвата вирусом нормального гена ЭФР-рецептора.

Онкоген *erbA* кодирует измененную форму рецептора тиреоидного гормона, проявляющую аномальную активность. Онкоген *neu* (опухоль нервной системы крысы), кодирует аномальный тирозинкиназный рецептор, отличающийся от нормального только одним аминокислотным остатком в трансмембранном домене белка (замена Вал на Глу). Эта аминокислотная замена вызывает постоянную тирозинкиназную активность онкорепцептора и как следствие, неконтролируемый рост клеток. Таким образом, продемонстрированная связь дефектов рецепторов и нарушения пролиферативной активности клеток наглядно иллюстрирует важную роль РТП в регуляции клеточной пролиферации.

Вообще, продуктами большинства онкогенов являются протеинкиназы – ферменты, фосфорилирующие белки по тирозину, серину и треонину. Уже одно это свидетельствует о чрезвычайно важной роли фосфорилирования в процессах передачи сигнала и регуляции клеточной активности. Нарушения, связанные с фосфорилированием внутриклеточных белков, часто являются причиной онкологических заболеваний, и поэтому детальное знание механизмов, вызывающих эти нарушения, является необходимым условием для разработки эффективных противоопухолевых терапевтических стратегий.

### **Характерные особенности каталитических рецепторов**

Ряд характерных особенностей каталитических рецепторов существенно отличает их от других мембранных белков:

1. Каталитические рецепторы являются аллостерическими ферментами, активный центр которых расположен на внутренней стороне мембраны;
2. При связывании лиганда и димеризации лиганд-рецепторных комплексов, каталитический домен рецептора активируется и переносит терминальную фосфатную группу от АТФ на гидроксильную группу тирозинового остатка определенного белка-мишени или каталитического домена (автофосфорилирование);
3. Во многих случаях автофосфорилирование рецептора повышает его каталитическую активность;

4. Передача сигнала первичного мессенджера осуществляется не по одиночной трансмембранной  $\alpha$ -спирали, а в результате взаимодействия двух цитоплазматических доменов рецепторов (в результате димеризации рецептор приобретает каталитическую активность);

5. Автофосфорилирование рецептора, с одной стороны, повышает его тирозинкиназную активность, а с другой – является сигналом к рецепторопосредованному эндоцитозу лиганд-рецепторных комплексов;

6. Рецепторопосредованный эндоцитоз играет важную роль как в инактивации сигнальных молекул, так и в регуляции плотности рецепторов на клеточной поверхности;

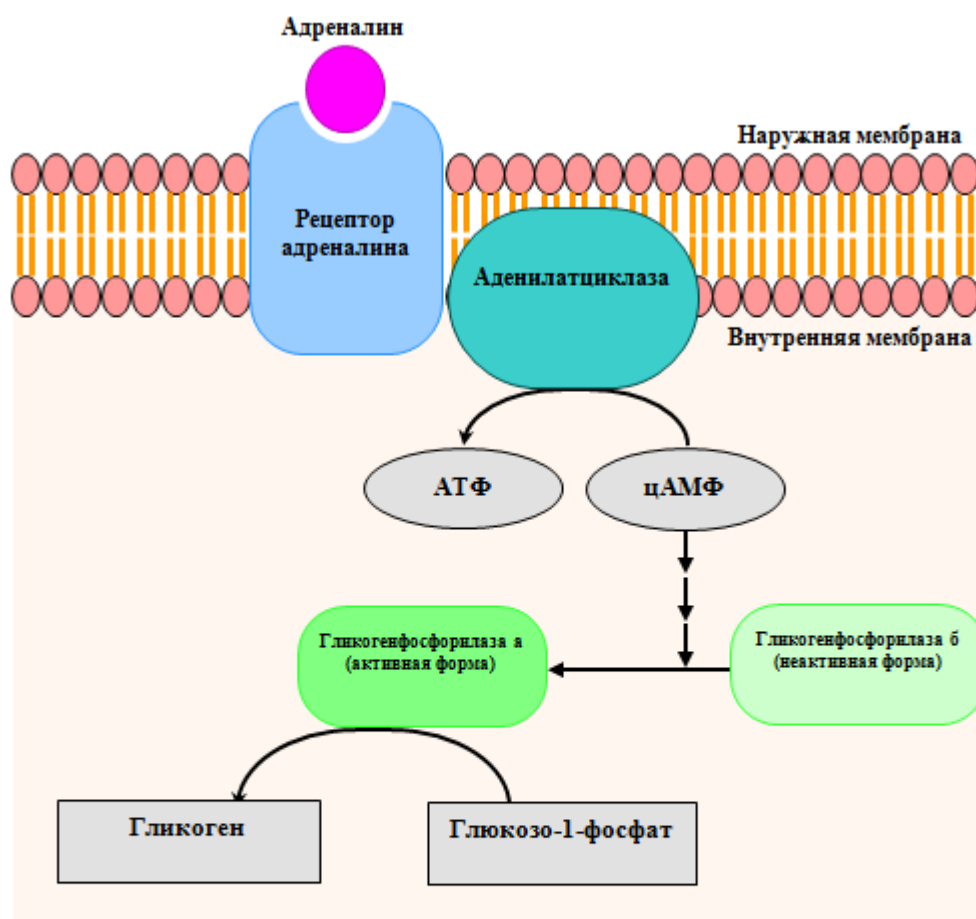
7. Перенос активированного тирозинкиназного домена в новые компартменты клетки, происходящий в процессе рецепторопосредованного эндоцитоза, также может являться существенным для сигнального процесса.

## Лекция №5. РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКАМИ (RG). ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ G-БЕЛКОВ.

В настоящее время описано и хорошо изучено несколько сотен рецепторов, сопряженных с G-белками. Большинство из этих рецепторов индуцирует внутриклеточную систему каскадной передачи регуляторных сигналов путем активации аденилатциклазной системы. Представления о механизмах активации аденилатциклазной системы при гормональной стимуляции клеточных рецепторов были сформированы еще в середине 50-х годов прошлого столетия американским ученым Эрлом Сазерлендом, изучавшим механизмы индукции и регуляции распада гликогена в клетке.

Механизм стимуляции распада гликогена в печени оставался неизвестным до тех пор, пока Э. Сазерленд и его коллеги не продемонстрировали, что первый этап распада гликогена, катализируемый гликогенфосфорилазой, стимулируется адреналином и глюкагоном. Было показано, что активация фосфорилазы обусловлена АТФ-зависимым фосфорилированием фермента. Э. Сазерленд также продемонстрировал, что фосфатаза из печени инактивирует фосфорилазу путем дефосфорилирования. Значительным прорывом явилось наблюдение Э. Сазерленда, касающееся необходимости присутствия мембранных клеточных фрагментов для гормональной активации фосфорилазы *in vitro*. На основании этого было высказано предположение, что именно связывание гормона с мембранным рецептором активирует синтез или высвобождение некой субстанции, которая вызывает фосфорилирование фосфорилазы. В 1956 г. было показано, что этой субстанцией является аденозин-3',5'-монофосфат, известный теперь как циклический АМФ (цАМФ).

Реакция синтеза цАМФ из АТФ катализируется интегральным мембранным ферментом аденилатциклазой. Э. Сазерленд предполагал, что гормон – это первичный мессенджер, сигнализирующий о необходимости распада гликогена в клетке, и поэтому он назвал цАМФ вторичным мессенджером. Механизм действия первичного мессенджера, как его понимал Э. Сазерленд в 1960 г., представлен на рисунке.

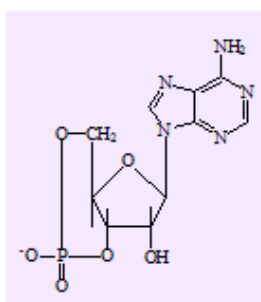


Упрощенная модель Э. Сазерленда, описывающая механизм действия гормонов.

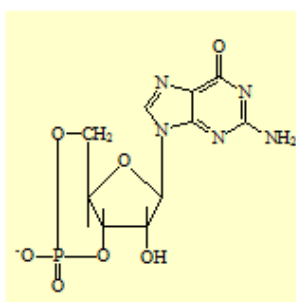
Согласно модели Э. Сазерленда, гормон вызывает различные внутриклеточные реакции без проникновения в клетку. После связывания с рецептором действие гормона опосредуется изменением внутриклеточного уровня цАМФ, который, собственно, и вызывает изменения метаболизма и физиологические реакции. Впоследствии идеи Э. Сазерленда нашли свое подтверждение во многих работах, которые продемонстрировали, что, действительно, в целом ряде процессов, регулируемых гормонами, цАМФ выступает в роли вторичного мессенджера. В 1971 г. Э. Сазерленд получил Нобелевскую премию за выдающиеся достижения в разъяснении механизма действия гормонов с участием цАМФ, выступающего в качестве вторичного мессенджера. Со времени открытия Э. Сазерлендом цАМФ также был идентифицирован и интенсивно изучался ряд других вторичных мессенджеров, играющих важную роль в регуляции клеточной активности.

Таблица. Внутриклеточные вторичные мессенджеры.

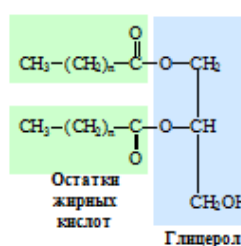
Мессенджер	Источник	Эффект
цАМФ	Аденилатциклаза	Активирует протеинкиназы
цГМФ	Гуанилатциклаза	Активирует протеинкиназы; Регулирует ионные каналы; Регулирует фосфодиэстеразы
Ca <sup>2+</sup>	Ионные каналы в эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране	Активирует протеинкиназы и Ca <sup>2+</sup> -зависимые белки
ИФ <sub>3</sub> (инозитол-1,4,5-трифосфат)	Действие фосфолипазы С на фосфатидилинозитол	Активирует Ca <sup>2+</sup> -каналы
ДАГ (диацилглицерол)	Действие фосфолипазы С на фосфатидилинозитол	Активирует протеинкиназу С
Фосфатидная кислота	Мембранный компонент и продукт ФЛД	Активирует Ca <sup>2+</sup> -каналы; Ингибирует аденилатциклазу
Церамид	Действие ФЛС на сфингомиелин	Активирует протеинкиназы
Оксид азота (NO)	NO-синтаза	Активирует гуанилатциклазу; Индукцирует расслабление гладких мышц
Циклическая АДФ-рибоза	Синтаза цАДФ-рибозы	Активация Ca <sup>2+</sup> -каналов



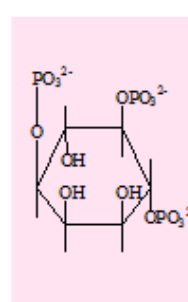
3',5'-циклический АМФ



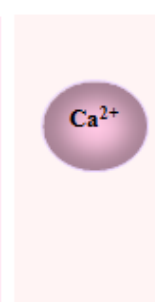
3',5'-циклический ГМФ



1,2-диацилглицерол



Инозитол-1,4,5-трифосфат



Ион кальция

### Химические структуры важнейших вторичных мессенджеров.

Первоначально Э. Сазерленд полагал, что аденилатциклаза активируется непосредственно лиганд-рецепторным комплексом. Однако впоследствии выяснилось, что медиаторами проведения гормональных сигналов через рецептор являются ассоциированные с внутренней поверхностью клеточной мембраны ГТФ-связывающие белки, или G-белки. В 1977 г. американские ученые Эллиотт Росс и Альфред Гилман

сообщили о частичной очистке G-белка, который при реконструкции с аденилатциклазой и гормональным рецептором восстанавливал способность к стимуляции аденилатциклазной реакции. Таким образом было показано, что аденилатциклаза не прямо активируется комплексом гормон-рецептор, как это предполагалось в модели Э. Сазерленда, а через посредство G-белка. Начатые Э. Сазерлендом работы по исследованию механизма действия адреналина в последующие годы были продолжены рядом научно-исследовательских коллективов, и в настоящее время механизм действия адреналина в отношении регуляции синтеза и распада гликогена в печени детально разъяснен.

### ***Регуляторные G-белки***

В настоящее время известно несколько G-белков, строение и функции которых относительно хорошо изучены. Типичные G-белки представляют собой гетеротримеры состоящие из  $\alpha$ - (45-47 кДа),  $\beta$ - (35 кДа) и  $\gamma$ - (7-9 кДа) субъединиц.  $\alpha$ -субъединица проявляет способность к связыванию ГДФ или ГТФ и обладает ГТФ-азной активностью, причем гидролиз ГТФ происходит с невысокой скоростью. Кроме того,  $\alpha$ -субъединицы различных G-белков имеют центры связывания с ферментами, регулируемые G-белками. Субъединицы  $\beta$  и  $\gamma$  ассоциированы в прочный димерный комплекс и связаны с мембраной, обеспечивая закрепление G-белка на ее внутренней поверхности.

Таблица. G-белки и их физиологические эффекты.

<b>G-белок</b>	<b>Локализация</b>	<b>Стимулы</b>	<b>Эфektor</b>	<b>Эффекты</b>
G <sub>s</sub>	Печень	Адреналин, глюкагон	Аденилатциклаза	Распад гликогена
G <sub>s</sub>	Жировая ткань	Адреналин, глюкагон	Аденилатциклаза	Распад жиров
G <sub>s</sub>	Почки	Антидиуретический гормон	Аденилатциклаза	Сохранение воды
G <sub>i</sub>	Сердце	Ацетилхолин	K <sup>+</sup> -канал	Снижение частоты и силы сердечных сокращений
G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>	Нейроны мозга	Энкефалины, эндорфины, опиоиды	Аденилатциклаза K <sup>+</sup> - и Ca <sup>2+</sup> -каналы	Изменение электрической активности нейронов
G <sub>q</sub>	Гладкомышечные клетки сосудов	Ангиотензин	Фосфолипаза C	Мышечное сокращение, повышение кровяного давления
G <sub>olf</sub>	Нейроэпителиальные клетки слизистой оболочки носа	Одоранты	Аденилатциклаза	Ощущение запаха
Трансдукцин (G <sub>t</sub> )	Палочки и колбочки сетчатки	Свет	Фосфодиэстераза cGMP	Визуальная детекция сигнала

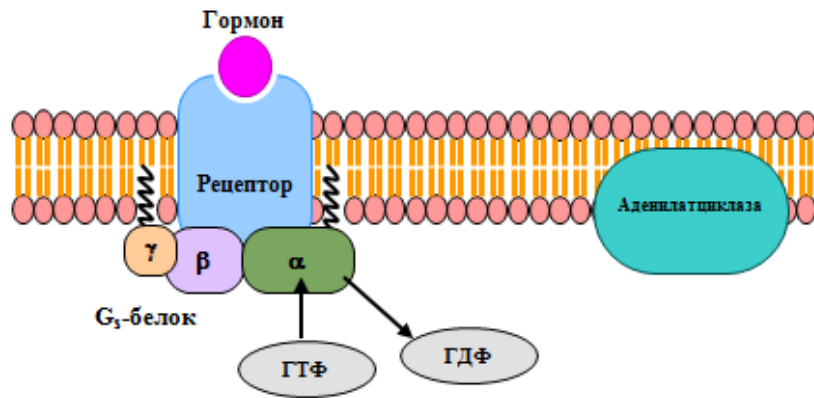
За исключением Ras-белков, участвующих в стимуляции клеточной пролиферации факторами роста,  $\alpha$ -субъединицы известных G-белков близкородственны;  $\beta$ -субъединицы либо идентичны, либо очень близки по структуре;  $\gamma$ -субъединицы часто существенно различаются.

Ras-белки представляют собой ГТФ-связывающие одиночные полипептиды (молекулярная масса  $\sim 21$  кДа), гомология которых с другими G-белками незначительна. С типичными G-белками Ras-белки сближает способность к гидролизу ГТФ и участие во внутриклеточной передаче регуляторных сигналов путем активации ферментов. В настоящее время идентифицировано более 20 типов  $\alpha$ -субъединиц, кодируемых 17 различными генами, 6  $\beta$ - и 12  $\gamma$ -субъединиц гетеротримерных G-белков.

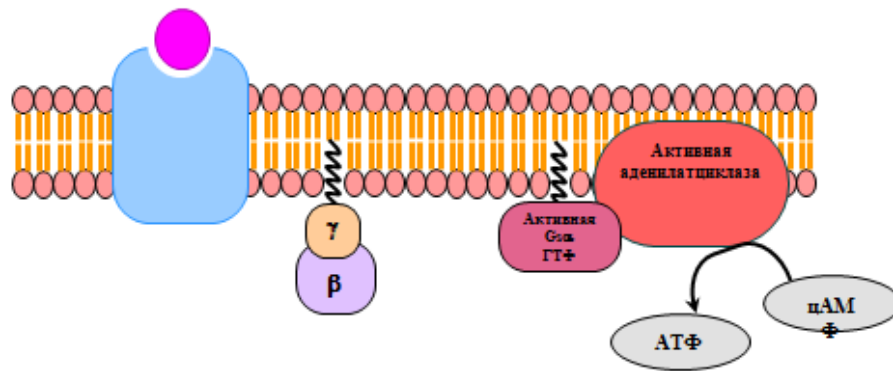
Нуклеозидфосфат-связывающий центр  $\alpha$ -субъединицы, входящей в состав неактивного тримера  $G_{\alpha\beta\gamma}$ , занят ГДФ. Связывание гормона с рецептором вызывает конформационные изменения, приводящие к быстрому замещению ГДФ на ГТФ в нуклеозидфосфатном центре  $\alpha$ -субъединицы (рис. 19). Связывание ГТФ приводит к диссоциации активной  $\alpha$ -субъединицы от комплекса  $\beta\gamma$ . В дальнейшем  $\alpha$ -субъединица ассоциирует с регулируемым белком, таким как аденилатциклаза. Связывание с  $G_{\alpha}(\text{ГТФ})$  активирует аденилатциклазу, которая катализирует образование цАМФ из АТФ до тех пор, пока  $G_{\alpha}(\text{ГТФ})$  остается в комплексе с ферментом. Поскольку  $G_{\alpha}$  проявляет ГТФазную активность, гидролиз ГТФ возвращает  $\alpha$ -субъединицу в неактивную конформацию, что вызывает диссоциацию комплекса  $G_{\alpha}(\text{ГТФ})$ •аденилатциклаза и инактивацию аденилатциклазы. Свободная  $\alpha$ -субъединица вновь присоединяется к димерному комплексу  $\beta\gamma$ , и таким образом происходит регенерация неактивного гетеротримерного комплекса  $G_{\alpha\beta\gamma}$ .

У прокариот рецептор связывается с аденилатциклазой непосредственно, без участия G-белка, поэтому количество синтезированного цАМФ определяется, в основном временем, в течение которого лиганд связан с рецептором. Диссоциация лиганда от рецептора является сигналом к инактивации аденилатциклазы.

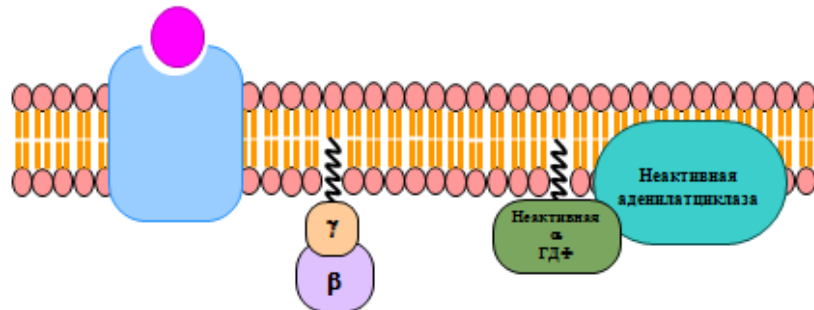
У эукариот в процессе эволюции выработался более сложный многоступенчатый механизм передачи сигнала с участием тримерного G-белка, играющего роль интерфейса, сопрягающего рецептор и фермент. Выработка этого механизма у высокоорганизованных организмов вероятно является следствием необходимости усиления сигнала, а также наличия дополнительных уровней контроля процессов гормональной стимуляции.



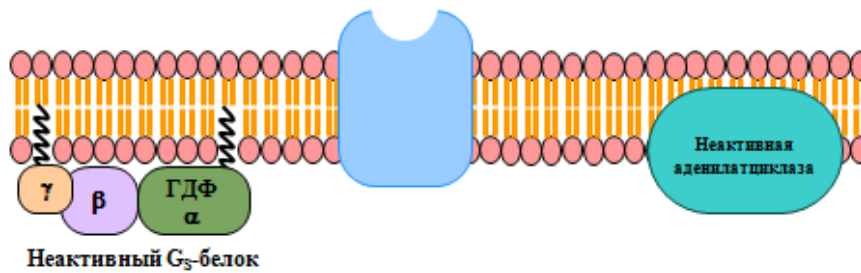
Стадия 1. Связывание лиганда с рецептором приводит к замещению ГДФ на ГТФ в нуклеозидфосфат-связывающем центре  $G_{s\alpha}$ . Субъединица  $G_{s\alpha}$ (ГТФ) отделяется от  $\beta\gamma$  и активирует аденлатциклазу.



Стадия 2. ГТФазная активность  $G_{s\alpha}$  приводит к медленному гидролизу ГТФ и инактивации  $G_{s\alpha}$  и аденлатциклазы.



Стадия 3. Отделение  $G_{s\alpha}$  (ГДФ) от аденлатциклазы и восстановление исходной тримерной структуры  $G_s$ -белка.



Механизм передачи гормонального сигнала через рецептор, сопряженный с  $G_s$ -белком.

В сигнальных системах, действующих с участием G-белков, существует несколько возможностей усиления и регуляции уровня гормонального сигнала:

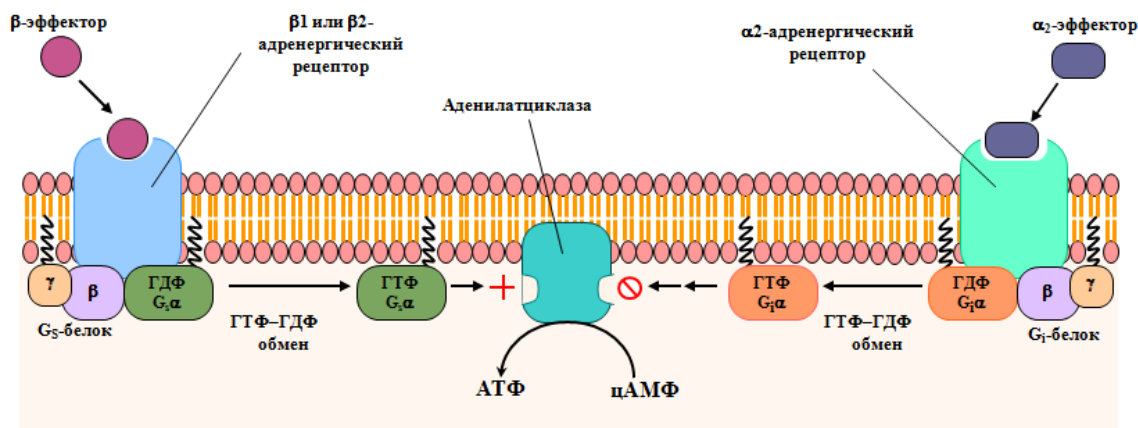
- Один рецептор, ассоциированный с гормоном, может активировать последовательно ряд G-белков и таким образом несколько молекул аденилатциклазы;
- Активированный G-белок, прежде чем произойдет гидролиз ГТФ, остается активным в течение 10-15с даже после отделения лиганда. За это время активированная G-белком аденилатциклаза катализирует синтез множества молекул цАМФ;
- Существует возможность регуляции активности рецепторов и G-белков путем их ковалентной модификации;
- Регуляция уровня экспрессии G-белка также может являться средством усиления гормонального сигнала.

Наличие у эукариот дополнительного звена регуляции на уровне G-белков приводит к тому, что связывание гормонов даже с очень небольшим числом рецепторов, вызывает значительное увеличение внутриклеточного уровня цАМФ. Совместно рецептор гормона, G-белок и аденилатциклаза составляют так называемую аденилатциклазную систему трансмембранного проведения внеклеточного сигнала.

### ***Стимулирующее и ингибирующее действие G-белков***

Рецепторопосредованные процессы передачи внеклеточных сигналов через G-белки могут носить как стимулирующий, так и ингибирующий характер в отношении ферментов, регулируемых G-белками. Различные типы рецепторов специфично взаимодействуют либо со стимуляторным ( $G_s$ ), либо с ингибиторным ( $G_i$ ) G-белком. Например, катехоламиновые гормоны, в частности адреналин, связываются с четырьмя различными типами адренергических рецепторов:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ . В то время как связывание первичного мессенджера с  $\alpha_1$ -рецепторами не оказывает эффекта на аденилатциклазу, связывание с  $\beta_1$  или  $\beta_2$ -рецепторами стимулирует, а с  $\alpha_2$ -рецептором ингибирует фермент. Таким образом, один и то же первичный мессенджер может как повышать, так и понижать уровень цАМФ в зависимости от типа рецептора, представленного на поверхности клетки. Характер сигнала, передаваемого рецептором, в свою очередь зависит от типа G-белка с которым он взаимодействует ( $G_s$  или  $G_i$ ). Так,  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -рецепторы специфично взаимодействуют с  $G_s$ -белком, а  $\alpha_2$ -рецепторы - только с  $G_i$ -белком. Как видно на рисунке,  $G_s$ -белок оказывает стимулирующее действие на

аденилатциклазу согласно механизму подробно описанному выше. В случае  $G_i$ -белка связывание гормона с рецептором также запускает обмен ГТФ  $\rightarrow$  ГДФ в нуклеотидном центре  $G_{i\alpha}$  и диссоциацию  $G_{i\alpha}$  (ГТФ) от  $G_{i\beta\gamma}$ . Ингибирование аденилатциклазы является результатом связывания  $G_{i\alpha}$  (ГТФ) с ферментом.



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

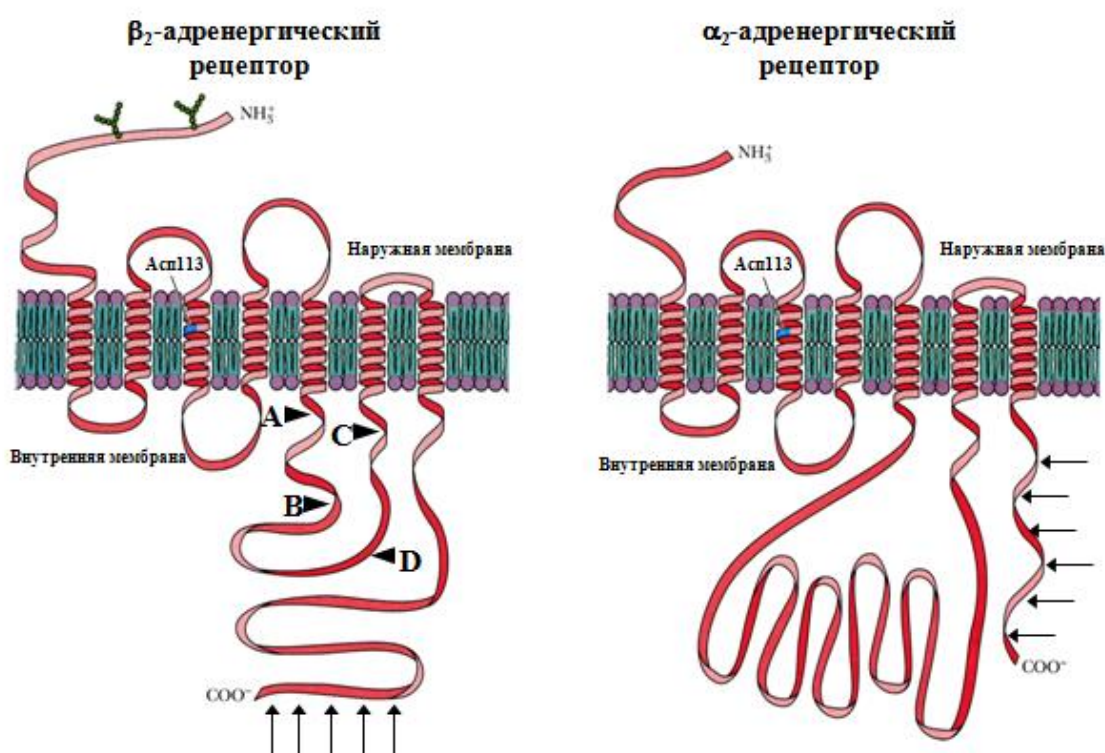
### ***Патологии, связанные с ковалентными модификациями G-белков. Механизм действия холерного и коклюшного токсинов***

Грамм-отрицательная бактерия *Vibrio cholerae* вызывает холеру, тяжело протекающую болезнь, сопровождающуюся сильной диареей и приводящую к быстрой смерти, если не проводится своевременная терапия и не восполняются значительные потери жидкости организмом. Холерный токсин представляет собой белок с мол.массой  $\sim 87$  кДа, состоящий из двух А-субъединиц (А1 и А2), связанных дисульфидной связью, и пяти В-субъединиц. Функция В-субъединиц заключается в узнавании клеток хозяина. А1-субъединица (22 кДа) катализирует АДФ-рибозилирование  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$ -белка по Арг201. АДФ-рибозилирование ингибирует ГТФ-азную активность субъединицы  $G_{s\alpha}$ , что приводит к ее конститутивной активации. Субъединица  $G_{s\alpha}$ , вследствие потери регуляторных свойств, также конститутивно активирует аденилатциклазу. Все эти события приводят к непрерывному генерированию цАМФ и аномальному повышению внутриклеточного уровня этого ключевого вторичного мессенджера, участвующего в регуляции целого ряда физиологических процессов. Резкое изменение уровня цАМФ приводит к проявлению типичных симптомов холеры – нарушению водно-солевого баланса, массивному выходу  $Na^+$  и воды из клеток кишечника, быстрому обезвоживанию тканей и диарее.



действии коклюшного токсина АДФ-рибозилирование нарушает обмен ГДФ на ГТФ, в нуклеозидфосфат-связывающем центре субъединицы  $G_{i\alpha}$  и таким образом препятствует активации  $G_{i\alpha}$  в ответ на внешний сигнал. Вследствие невозможности инактивации аденилатциклазы  $G_{i\alpha}$  наблюдается значительное повышение внутриклеточного уровня цАМФ. В отличие от холеры, коклюш является системной инфекцией и поэтому нарушение нормальной регуляции активности аденилатциклазы ощущается в тканях по всему телу.

### *Рецепторы, сопряженные с G-белками (7TMS-рецепторы)*



Строение и мембранная организация  $\beta_2$ - и  $\alpha_2$ -адренергических рецепторов. АВ и CD – пептидные фрагменты, участвующие в связывании с G-белком. Стрелками обозначены сайты фосфорилирования рецептора. Асп – сайт связывания биогенных аминов.

Все G-белки, функционирующие в различных системах (аденилатциклазной, фосфодиэстеразной, фосфолипазной и др.) эволюционно родственны и близкородственны. В связи с этим их рецепторы также отличаются высокой структурной гомологией. В настоящее время известно более 1000 представителей семейства 7TMS-рецепторов, большинство из которых функционирует в аденилатциклазной системе передачи внеклеточных сигналов. Все 7TMS-рецепторы состоят из одиночной

полипептидной цепи, семикратно пронизывающей мембрану и имеющей сайты фосфорилирования на С-концевом участке молекулы (как правило 5 сайтов). Степень гликозилирования внеклеточного N-концевого участка рецепторов может существенно варьировать.

Почти все 7TMS-рецепторы содержат в N-концевой части аминокислотной последовательности несколько остатков аспарагина – потенциальных сайтов гликозилирования. Гидрофобные трансмембранные домены 7TMS-рецепторов связаны тремя внеклеточными и тремя внутриклеточными петлями. Каждый трансмембранный домен рецептора состоит из 20-25 аминокислотных остатков, образующих  $\alpha$ -спираль. Лиганд-связывающий сайт катионных катехоламинов (дофамин, норадреналин, адреналин) локализован внутри гидрофобного кора рецептора. В экспериментах по сайт-специфичному мутагенезу было продемонстрировано, что замена остатка Asp113 на Asn или Гли приводит к драматическому снижению сродства рецептора к лигандам. Остаток Asp присутствует в составе гидрофобного кора всех рецепторов, связывающих биогенные амины, но отсутствует у рецепторов, лигандами которых амины не являются. Вероятно, в процессе лиганд-рецепторного взаимодействия карбоксильная группа Asp113 выступает в роли противоиона для ионизированной амидной группы катехоламинов.

Трансмембранные домены 7TMS-рецепторов чередуются с шестью промежуточными петлями, протяженностью от 10 до 40 аминокислотных остатков каждая. Третья внутриклеточная петля и С-концевая последовательность состоят более чем из 150 аминокислотных остатков. С-концевая последовательность 7TMS-рецепторов содержит цистеиновые остатки, способные связывать пальмитат через тиоэфирную связь (пальмитоилирование). Предположительно, ковалентно связанные пальмитиновые остатки встраиваются в мембранный бислой, формируя четвертую цитоплазматическую петлю. В процессе связывания рецептора с  $G_s$ -белком участвует до 10 аминокислотных остатков N-концевого и С-концевого фрагментов третьей внутриклеточной петли.

В настоящее время большое количество 7TMS-рецепторов клонировано и определена их аминокислотная последовательность.

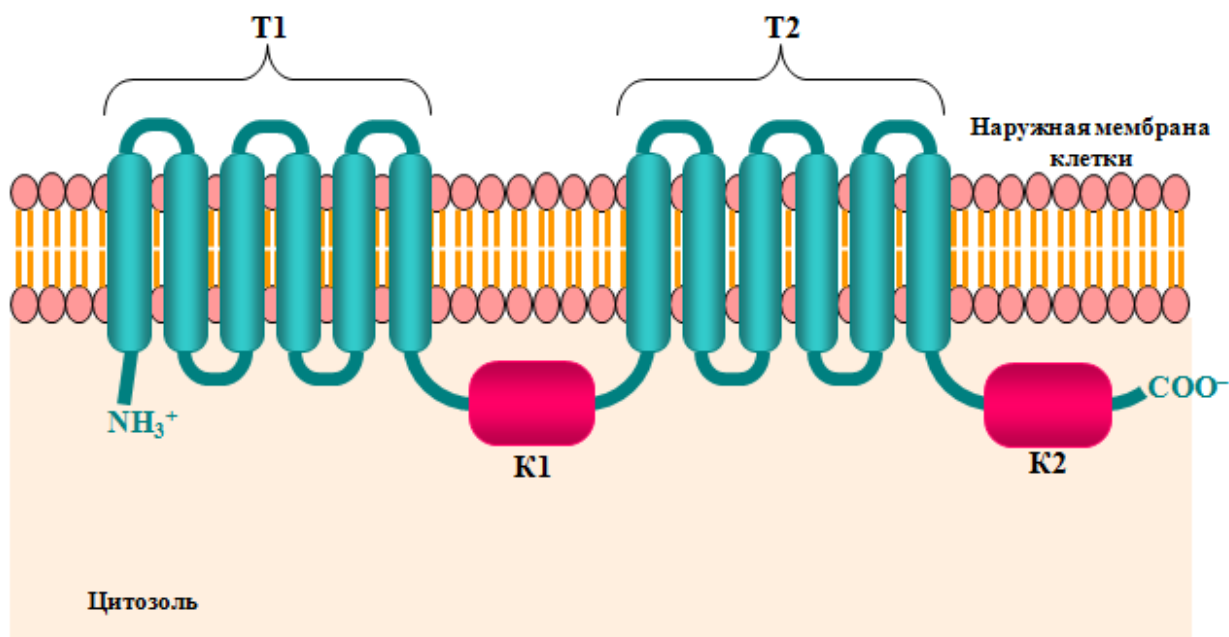
### *Аденилатциклаза*

Хотя данный фермент был открыт почти одновременно с цАМФ, до середины 80-х годов прошлого столетия он оставался наименее изученным компонентом аденилатциклазной системы трансмембранного проведения внеклеточного сигнала. Причиной этого является низкое содержание фермента в мембранной фракции (10% от содержания G-белка) и крайняя лабильность фермента в солюбилизованном состоянии.

В 1985 г. фермент был выделен с помощью аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда активатора аденилатциклазы растительного дитерпена - форсколина. В конце 80-х г.г. был успешно клонирован ген аденилатциклазы и определена первичная структура белка. В течение последующих лет были клонированы гены как минимум 10 различных форм фермента млекопитающих, молекулярная масса которых составляет 120–150 кДа. Было продемонстрировано, что в качестве регуляторов активности изоформ аденилатциклазы могут выступать не только регуляторные G-белки ( $G_{sa}$ ,  $G_{\beta\gamma}$ ,  $G_{i\alpha}$ ,  $G_{o\alpha}$ ,  $G_{za}$  и др.), но и  $Ca^{2+}$ , комплекс  $Ca^{2+}$ /кальмодулин, кальцинейрин, протеинкиназы А и С. По-видимому, наличие изоформ аденилатциклазы и различных механизмов их активации связано с тканевой локализацией этих форм, где каждая из них выполняет специфические функции.

Характерной особенностью всех известных изоформ аденилатциклазы является способность к активации  $\alpha$ -субъединицей  $G_s$ -белка, причем действие  $G_s$ -белка является доминирующим фактором стимуляции.

Для всех клонированных форм аденилатциклазы характерна общая топографическая структура молекулы, включающая короткую цитоплазматическую N-концевую последовательность, два больших гидрофобных трансмембранных домена (Т1 и Т2) и два цитоплазматических каталитических домена (К1 и К2), содержащих нуклеотид-связывающий сайт и составляющих каталитический кор фермента. Между последовательностями гидрофобных доменов различных форм аденилатциклазы отмечается низкая гомология, тогда как степень гомологии каталитических доменов довольно высока (50-90%). Наиболее консервативные участки локализованы в N-концевой части последовательности каждого цитоплазматического домена. В 1995 г. У. Тангу и А. Джилману удалось экспрессировать растворимый каталитический гетеродимер К1–К2 и показать, что инкубируемые вместе неактивные К1- и К2-гомодимеры спонтанно образуют каталитически активные К1–К2-гетеродимеры, чувствительные к стимулирующему действию субъединицы  $G_{sa}$ (АТФ) и специфического активатора аденилатциклазы растительного дитерпена форсколина. Функционально активные гетеродимеры могут быть также получены при смешивании препаратов К1- и К2-доменов различных изоформ фермента. Это свидетельствует о сложной организации нативной аденилатциклазы, в составе которой каталитические домены функционируют в виде димерного комплекса.



Схематическое изображение мембранной организации аденилатциклазы. T1, T2 – трансмембранные гидрофобные домены. K1, K2 – каталитические домены.

### ***цАМФ-зависимая протеинкиназа (ПКА)***

Следующим за аденилатциклазой звеном передачи внеклеточного регуляторного сигнала является протеинкиназа А, активируемая вторичным мессенджером цАМФ и являющаяся его главной внутриклеточной мишенью. Именно активация протеинкиназ вторичными мессенджерами и последующее фосфорилирование ими самых разнообразных клеточных белков обуславливают весь спектр физиологических эффектов, вызываемых сигнальными молекулами. Речь идет о регуляции таких глобальных, жизненно важных процессов, как синаптическая передача, транспорт ионов через биологические мембраны, углеводный и липидный обмен, мышечное сокращение, клеточный рост, дифференцировка, транскрипция генов и ряд других.

цАМФ проявляет свое действие (практически все эффекты) через активацию ПКА, относящейся к семейству протеинкиназ, переносящих фосфатную группу от АТФ на сериновые и реже треониновые аминокислотные остатки в белках.

Впервые ПКА была описана в 1963 г. как цАМФ-зависимая киназа гликогенсинтазы. В 1968 г. Эдвин Кребс и Донал Уолш выделили фермент в гомогенном виде из мышц кролика. Ими же был установлен факт цАМФ-опосредованной регуляции гликогенолиза

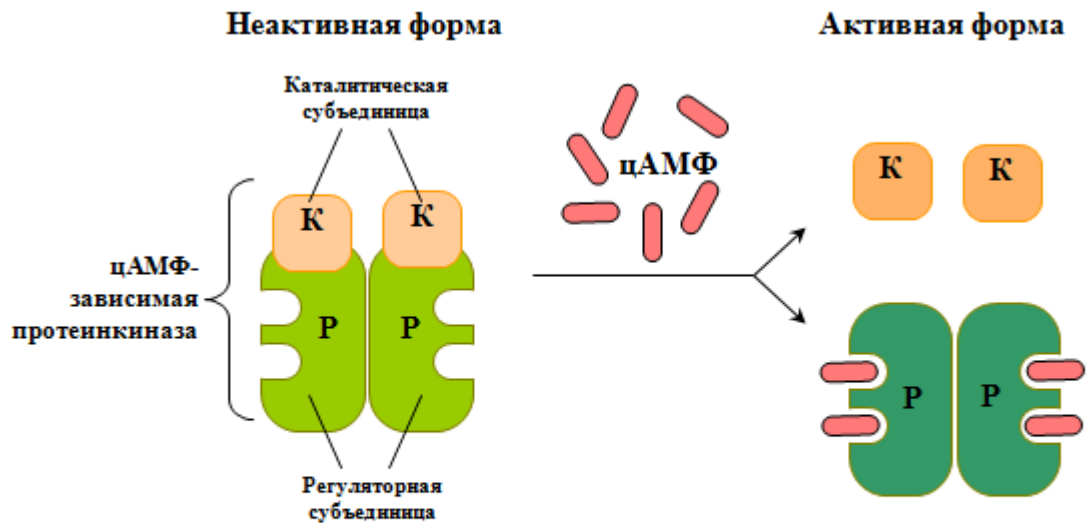
(именно при изучении регуляции обмена гликогена был впервые открыт и сам циклонуклеотид). В присутствии цАМФ активность цАМФ-зависимой протеинкиназы возрастала более чем в 20 раз, а активность киназы фосфорилазы – в 5-10 раз. При этом в отличие от гликогенсинтазы, активность которой в результате фосфорилирования ингибировалась, фосфорилирование киназы фосфорилазы, напротив, вызывало ее активацию. Таким образом, цАМФ стимулировал распад гликогена и ингибировал его синтез в мышцах (аналогичный механизм действует в печени). Концентрация цАМФ, необходимая для полумаксимальной активации протеинкиназы, составляла  $10^{-7}$ М.

Более подробно действие ПКА может быть проиллюстрировано на двух примерах:

1. При стрессе в кровь выбрасывается адреналин, запускающий в клетках-мишенях аденилатциклазный каскад. Активированная аденилатциклаза генерирует цАМФ, который, в свою очередь, вызывает активацию ПКА. Далее ПКА фосфорилирует киназу фосфорилазы и активирует ее. Активная киназа фосфорилазы активирует гликогенфосфорилазу путем фосфорилирования. Гликогенфосфорилаза отщепляет молекулы глюкозы от гликогена в виде глюкозо-1-фосфата. Глюкозо-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, который окисляется в реакциях гликолиза с образованием АТФ, что обеспечивает энергию для интенсивной работы мышц. Таким образом реализуется ответ на стрессовое воздействие, вызывающее, например, страх.

2. Повышение уровня цАМФ может также стимулировать транскрипцию ряда генов. В регуляторных участках последовательности ДНК присутствуют сайты связывания факторов транскрипции, контролирующих транскрипцию определенных генов. Фосфорилирование некоторых факторов транскрипции ПКА приводит к активации транскрипции соответствующих генов. Например, цАМФ «включает» ген пептидного гормона соматостатина, который подавляет секрецию соматотропина передней долей гипофиза. Соматотропин, или гормон роста, стимулирует синтез в печени соматомедина, вызывающего рост мышц и костей. Таким образом может осуществляться гормональная регуляция пролиферативной активности клеток определенных тканей.

В отсутствие циклонуклеотида ПКА млекопитающих представляет собой неактивный тетрамер, состоящий из двух регуляторных субъединиц (Р) и двух каталитических субъединиц (К). В 1983 г. впервые были установлены полные аминокислотные последовательности, исследована молекулярная структура и идентифицированы функционально важные домены субъединиц фермента.



### Субъединичная организация и механизм активации цАМФ-зависимой протеинкиназы.

Механизм активации ПКА сводится к следующему: присоединение двух молекул цАМФ к каждой из регуляторных субъединиц фермента вызывает уменьшение ее сродства к каталитической субъединице в  $10^4$ - $10^5$  раз и приводит к диссоциации комплекса  $R_2K_2$  на гомодимер  $R_2$  и две свободные К-субъединицы, проявляющие ферментативную активность. Таким образом, присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам снимает ингибирование активности каталитических субъединиц, и цАМФ при этом действует как аллостерический эффектор.

В настоящее время известно две основные изоформы Р-субъединицы млекопитающих: РI (43 кДа) и РII (45 кДа), каждая из которых имеет свои подтипы: РI $\alpha$ , РI $\beta$ , РII $\alpha$ , РII $\beta$ . Все они являются продуктами экспрессии четырех различных генов. В зависимости от вида организма и типа ткани экспрессируется тот или иной тип регуляторной субъединицы. Так, РI $\alpha$  экспрессируется во многих тканях, в то время как РII $\beta$  лишь в некоторых (ЦНС, нейроэндокринные ткани, легкие и яичники).

Активация любой из изоформ Р-субъединиц ПКА приводит к соответствующему физиологическому ответу клетки. Очищенные Р-субъединицы, выделенные из нормальных тканей, образуют гомодимер, взаимодействуя друг с другом, главным образом, через N-концевые аминокислотные последовательности. Тип регуляторной субъединицы (РI или РII), входящей в состав нативного холофермента, определяет принадлежность цАМФ-зависимой протеинкиназы, соответственно, к I или II типу. В каждой Р-субъединице присутствуют сайты связывания цАМФ.

Важной особенностью ПКА является способность холофермента к автофосфорилированию. При этом автофосфорилированию подвергается только регуляторные субъединицы II типа. Перенос  $\gamma$ -фосфатной группы АТФ на сериновые остатки РII осуществляет К-субъединица. Способность холофермента ПКА II типа к автофосфорилированию является критерием, позволяющим быстро различать два типа протеинкиназы. Вероятно, что присоединение анионной фосфатной группы повышает чувствительность холофермента к диссоциирующему влиянию цАМФ. Подтверждением этому служит десятикратное снижение сродства регуляторных субъединиц РII к каталитическим в результате фосфорилирования.

Каталитически активная К-субъединица ПКА является одной из самых низкомолекулярных среди всех известных протеинкиназ. Это глобулярный белок (40 кДа), состоящий из 350 аминокислот, N-конец которого миристоилирован.

К-субъединица состоит из двух доменов, один из которых содержит  $Mg^{2+}$ - и АТФ-связывающий центры, а второй – центр связывания субстратного белка.

Взаимодействие ПКА с  $Mg^{2+}$ , АТФ и фосфорилируемым белком осуществляется по механизму двухтактного замещения и приводит к включению одного моля фосфата на один моль фермента. При последующей инкубации этот фосфат переносится на гидроксильную группу белкового субстрата с регенерацией исходной дефосфоформы фермента.

Для каталитической (К) субъединицы (40 кДа) млекопитающих показано существование трех основных изоформ:  $K\alpha$ ,  $K\beta_1$ ,  $K\beta_2$  и  $K\gamma$  ( $K\beta_1$  и  $K\beta_2$  – продукты альтернативного сплайсинга мРНК). Преобладающие  $K\alpha$ ,  $K\beta_1$  и  $K\beta_2$ - субъединицы экспрессируются фактически во всех тканях человека, в то время как  $K\gamma$  специфична только для семенников. В отсутствие цАМФ Р-гомономер образует холофермент с любой из изоформ К-субъединицы приблизительно с равным сродством ( $\sim 0,2$  нмоль).

В тканях млекопитающих гомодимеры четырех изоформ Р-субъединицы и три изоформы К-субъединицы способны образовывать в общей сложности 24 разновидности холофермента.

Пул ПКА в клетке компартментализован, т.е. неоднородно распределен по отдельным внутриклеточным структурам. После активации ПКА и последующей диссоциации фермента на Р- и К-компоненты эти субъединицы могут транслоцироваться в различные клеточные компартменты.

Внутриклеточная компартментализация I и II типов холофермента ПКА принципиально различна. Так, РI-изоформы (РI $\alpha$  и РI $\beta$ ) преобладают в цитоплазме и отсутствуют в ядре, в то время как 75% содержания РII-изоформ (РII $\alpha$  или РII $\beta$ )

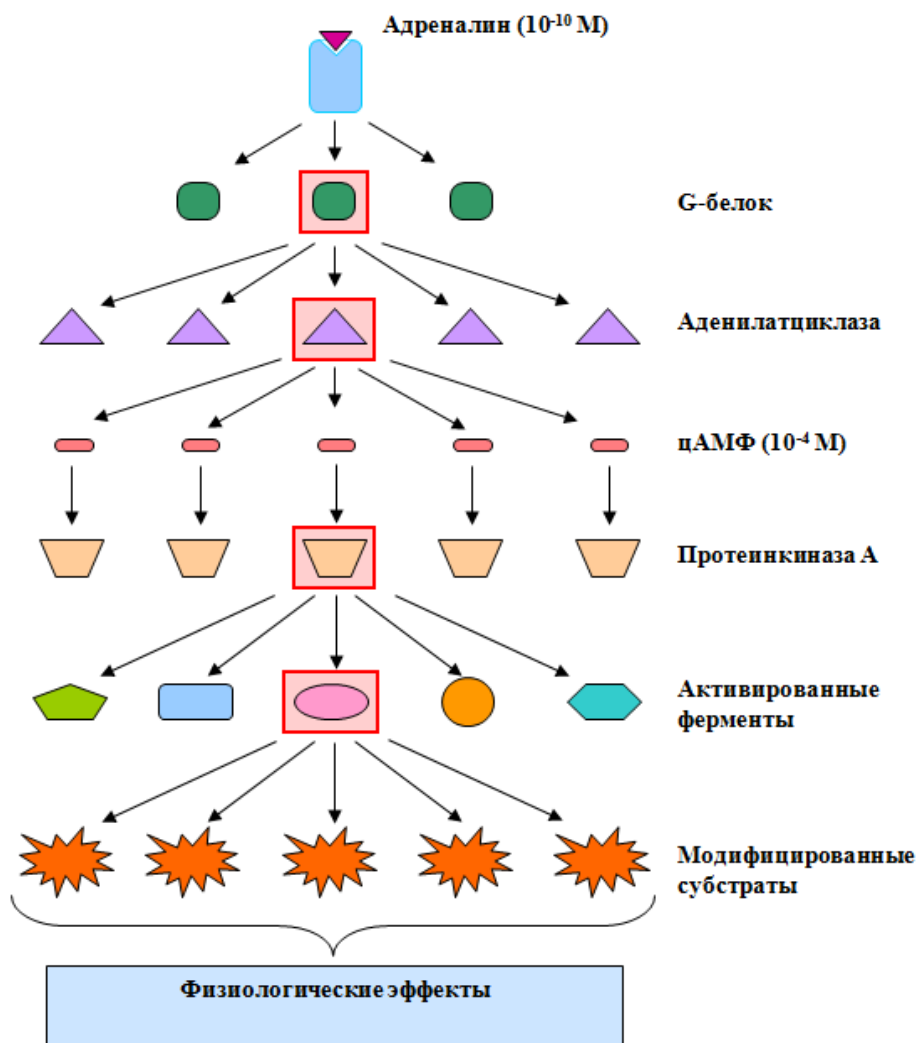
ассоциировано с плазматической мембраной, элементами цитоскелета, секреторными гранулами, аппаратом Гольджи, центросомами и ядром.

Длительное повышение внутриклеточной концентрации цАМФ приводит к постепенному увеличению содержания К-субъединицы в ядре и фосфорилированию ядерных белков, в том числе факторов транскрипции (CREB), влияющих, в свою очередь, на активность генов. При этом увеличение содержания холофермента PKA в ядре не происходит. Основным механизмом транслокации К-субъединицы, в ядро является диффузия через поры ядерной мембраны. Однако, существуют факты, свидетельствующие о более сложном характере процесса ядерной транслокации К-субъединицы, однако, механизм такого рода транслокации до настоящего время неизвестен.

Очевидно, что компартментализованное внутриклеточное распределение PKA является важнейшим регуляторным механизмом, определяющим специфичность и эффективность сигнала, опосредованного вторичным мессенджером цАМФ.

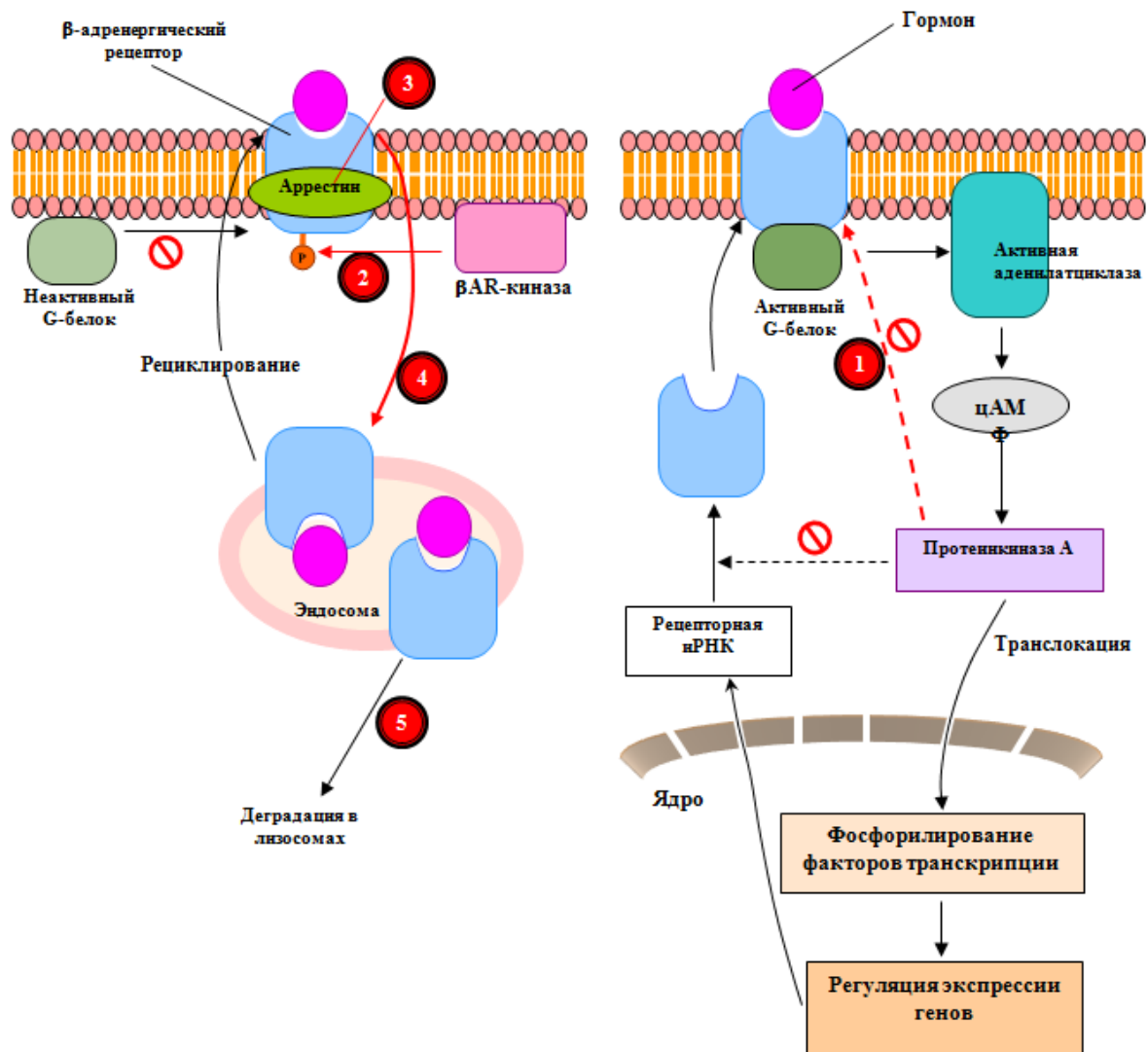
### ***Механизмы усиления и отмены гормональных сигналов***

В процессе эволюции многоклеточных организмов были выработаны механизмы адаптации и усиления гормонального сигнала. Поскольку при эндокринном типе сигнализации до достижения ткани-мишени первичные мессенджеры претерпевают сильное разбавление в крови и интерстициальной жидкости, клетка должна обладать способностью к улавливанию очень слабых сигналов. Действительно, многие типы клеток обладают способностью реагировать на очень низкие концентрации сигнальных молекул в интерстициальном пространстве. Это связано с наличием внутриклеточного механизма каскадного усиления гормонального сигнала. При связывании сигнальной молекулы с рецептором происходит трансмембранная передача сигнала в клетку не по цепи, а через каскад последовательных реакций, приводящих к значительному усилению сигнала, вызывающему физиологический ответ клетки. Связывание одной молекулы адреналина с рецептором, после активации нескольких молекул G-белка и аденилатциклазы, индуцирует синтез большого числа молекул цАМФ и активацию множества молекул PKA. Каждая молекула PKA активирует множество молекул других ферментов, фосфорилирующих множество субстратных белков. Практически на каждом этапе каскада происходит усиление сигнала, и первоначально слабый сигнал распространяется в клетке подобно все увеличивающейся волне до тех пор, пока не будет вызван соответствующий физиологический ответ. Чем больше этапов присутствует в подобном каскаде, тем большее усиление сигнала возможно.



Механизм каскадного усиления регуляторного сигнала.

При нарушении нормального функционирования эндокринных желез и длительном повышении концентрации сигнальных молекул в интерстициальной жидкости в действие вступают механизмы адаптации, выражающиеся в регуляции чувствительности клетки к внешнему стимулу. При длительном гормональном воздействии адаптация проявляется в форме десенситизации, или потери способности клеток-мишеней реагировать на внешний стимул с прежней чувствительностью.



Механизмы десенситизации  $\beta$ -адренергических рецепторов. Инактивация рецептора путем фосфорилирования PKA (1),  $\beta$ AR-киназой (2). Инактивация путем присоединения белка аррестина (3) и эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов (4). Деградация рецепторов в лизосомах (5).

Десенситизация клетки может достигаться с помощью ряда механизмов. Механизмом временного удаления рецептора служит рецепторопосредованный эндоцитоз лиганд-рецепторных комплексов. Впоследствии рецептор может быть возвращен на поверхность плазматической мембраны путем его рециклирования из эндосомного компартмента клетки. В случае использования другого механизма десенситизации избыточные рецепторы, поступившие в клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза, полностью разрушаются в лизосомах. Альтернативным путем обеспечения десенситизации клетки является инактивация рецептора или G-белка путем химических модификаций или связывания с ингибирующими белками. Известные механизмы десенситизации могут носить как кратковременный, так и долговременный характер.

Кратковременная десенсибилизация реализуется либо в результате действия различных протеинкиназ, либо рецепторопосредованного эндоцитоза:

1) ПКА и протеинкиназа С (ПКС) обеспечивают регуляцию цАМФ-сигнала по типу отрицательной обратной связи. Активированные в ответ на стимуляцию гормоном протеинкиназы (А или С) фосфорилируют специфические остатки Сер, локализованные в третьем цитоплазматическом и С-концевом доменах рецептора. Это приводит к снижению чувствительности рецептора к сигнальной молекуле.

2) Фосфорилирование рецептора рецепторной  $\beta$ AR-киназой. Фосфорилированию подвергается только активированный рецептор. В данном случае фосфорилирование Сер в С-концевом домене рецептора позволяет специфическому цитоплазматическому белку аррестину (М.м. ~45 кДа) связаться с рецептором и инактивировать его. Аррестин блокирует взаимодействие рецептора с G-белком. Рецепторные киназы и аррестин являются цитозольными белками, которые транслоцируются в мембрану только в момент связывания с активируемым рецептором.

3) Как говорилось выше, рецепторы, удаленные с поверхности клетки в результате рецепторопосредованного эндоцитоза, либо дефосфорилируются в эндосомах и рециклируются в мембрану, либо подвергаются деградации в лизосомах.

Аррестин принимает участие в инициации эндоцитоза различных рецепторов, сопряженных с G-белками, непосредственно взаимодействуя с клатрином окаймленных ямок.

В основе процесса долговременной десенсибилизации лежит регуляция экспрессии рецептора на уровне транскрипции. В этом случае каталитическая субъединица ПКА транслоцируется в ядро, где, фосфорилируя факторы транскрипции, влияет на экспрессию ряда генов. По-видимому, экспрессируются и гены, влияющие на уровень экспрессии рецепторов. Кроме того, ПКА участвует в регуляции стабильности рецепторной иРНК, обеспечивая снижение уровня экспрессии рецептора в момент завершения проведения сигнала.

### ***Отмена регуляторного сигнала***

В клетке разнообразные ответы, вызываемые активацией рецепторов, сопряженных с G-белками, быстро прекращаются после удаления сигнальной молекулы. Инактивация лиганда начинается уже в крови или на стенках кровеносных сосудов. Сигнальная молекулы может терять активность в результате ферментативного расщепления дисульфидных связей, внеклеточного протеолиза или лизосомальной деградации. Инактивация  $\alpha$ -субъединиц G-белков происходит самопроизвольно в результате

гидролиза ГТФ в их нуклеозидфосфатном центре. цАМФ гидролизуеться фосфодиэстеразой, а снижение уровня цАМФ, в свою очередь, приводит к инактивации ПКА. Фосфорилированные субстраты протеинкиназ инактивируются под действием фосфатаз. В большинстве случаев фосфо- и дефосфоформы ферментов и других белков значительно различаются по ферментативной и функциональной активности, в связи с чем фосфорилирование–дефосфорилирование является одним из важных путей регуляции проведения внеклеточного сигнала.

В результате согласованного действия механизмов отмены регуляторного сигнала клетка возвращается в состояние готовности к восприятию последующих сигналов.

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН  
ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 4E4C8F6C0D0FDC62FAAF7108E6CEFD6A  
Владелец: Глыбочко Петр Витальевич  
Действителен: с 19.05.2025 до 12.08.2026