Міністерство освіти і науки України
Запорізький національний університет

Л.О. Омельянчик, Н.В. Колісник

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ГОРМОНАЛЬНОЇ ТА ЦИТОКІНОВОЇ РЕГУЛЯЦІЇ

Запоріжжя
2009

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Міністерство освіти і науки України
Запорізький національний університет

Л.О. Омельянчик, Н.В. Колісник

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ГОРМОНАЛЬНОЇ ТА ЦИТОКІНОВОЇ РЕГУЛЯЦІЇ

Рекомендовано
Міністерством освіти
і науки України
як навчальний посібник
для студентів
біологічних факультетів
університетів

Запоріжжя
2009

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

УДК 577.17: 577.1 (076)
О – 572

Рецензенти:

Рекомендовано Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для студентов вищих навчальних закладів
Лист ____ від _____

Омельянчик Л.О., Колісник Н.В.
О 572 Молекулярні механізми гормональної та цитокінової регуляції: Навчальний посібник. – Запоріжжя: Запорізький національний університет. 2009. – с.

ISBN
Тест анотації – до 500 д.з.

УДК 577.17: 577.1 (076)
О – 572

С Запорізький національний університет, 2009

ISBN Омельянчик Л.О., Колісник Н.В.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

АНОТАЦІЯ

Високий ступень диференціації складових компонентів організму вимагає відповідного рівня їхньої інтеграції й координації, без якого не може бути забезпечене існування живого організму як єдиного цілого з його здатністю до самостановлення, самозбереження й самовідтворення.

Це обставина еволюційне обумовила необхідність виникнення в багатоклітинному організмі особливого централізованого "управлінського" апарата. Його спеціальною функцією стала системна (міжклітинна) регуляція й програмування формування й роботи різних органів, тканин і клітин, тобто спрямоване приведення структури й діяльності окремих клітин у відповідність із потребами організму.

Спеціалізований управлінський апарат міжклітинної регуляції представлений у більшості тваринних організмів нервовою і ендокринною системами. Перша забезпечує швидкий і відносно короткочасний спосіб регуляції, друга – переважно більше повільний і тривалий контроль. Щоб скеровувати свою поведінку на користь організму, клітини багатоклітинного організму повинні володіти засобами досить складного спілкування між собою – засобами комунікації

Основною метою підручника “Молекулярні механізми дії гормонів і цитокінів» є надання студентам спеціалізації з біохімії та імунології сучасних уявлень про реалізацію гормонами та цитокінами механізмів управління клітинними функціями і окремими метаболічними процесами в клітинах. У підручнику надані поняття про гормони та цитокіни як первинні посередники, органи та клітини - мішені, як такі що мають специфічні рецептори до первинних посередників; типи мембранних, цитоплазматичних та ядерних рецепторів, механізми сполучення рецепторів з ефекторними молекулами, що виробляють вторинні посередники, типи ефекторних молекул, та відповідні регуляторні шляхи, яки вони опосередковують, молекулах- мішенях як заключних ланках у ланцюгах трансдукції гормональних та цитокінових сигналів.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

	Вступ	8
1	Загальні принципи молекулярних механізмів дії гормонів та цитокінів (загальні принципи комунікації клітин)…….	8
1.1.1	Гормони, цитокіни – позаклітинні сигнальні молекули. Загальна характеристика……..	10
1.1.2	Типи спеціалізованих сигнальних клітин. Різновиди внутрішньоклітинної сигналізації…...	12
1.1.3	Кожна клітина запрограмована відповідати на специфічні поєднання позаклітинних сигнальних молекул……. ……..	17
1.1.4	Різні клітини можуть по-різному відповідати на однакові позаклітинні сигнальні молекули …….	18
1.1.5	Концентрація молекули може бути швидко настроєна лише у випадку короткого часу її життя ……...	19
1.2 1.2.1 1.2.2	Ядерні рецептори – рецептори гідрофобних гормонів……. Гідрофобні гормони……. Принципові відмінності в передачі сигналу гідрофобними та гідрофільними гормонами…….	19 19 20
1.3 1.3.1	Рецептори клітинної поверхні…… Основні класи рецепторів клітинної поверхні та роль……	22 22
1.3.1.1 1.3.1.2 1.3.1. 3	Рецептори, сполучені з іонними каналами…… Рецептори, сполучені с G-білками……. Рецептори, сполучені із ензимами…….	23 23 23
1.3.1.4	Принциповий механізм передачі сигналів з рецепторів, сполучених з G-білками та ензимами	24
1.3.1.5	Взаємодії між внутрішньоклітинними сигнальними білками опосередковуються модульними доменами зв'язування ……...	31
1.3.2	Вплив концентрації позаклітинного сигналу на відповідь клітин ……..	32
1.3.3	Клітинна пам’ять ефектів деяких сигналів ……..	34
1.3.4	Шляхи регуляції клітинами чутливості до сигналу	

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

	…….	34
2 2.1	Передача сигналів через сполучені з g-білками рецептори клітинної поверхні …… Структура рецепторів, що сполучені з G-білками…….	35 35
2.2	Структура тримерних G-білків. Особливості активації……	36
2.3 2.3.1	Ефекторні молекули G-білків……. Аденілатциклаза. цАМФ-залежний сигнальний шлях……	40 40
2.3.1.1	Циклічний АМФ (цАМФ)……	42
2.3.1.2	Протеїнкіназа А – цАМФ-залежна протеїнкіназа А (ПКА)…….	44
2.3.2	Фосфоліпаза С. **І**нозитолфосфоліпідний та диацилгліцерол залежний сигнальний шлях …….	45
2.3.2.1	Фосфоліпаза С…….....	45
2.3.2.2	Інозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) – другий посередник…….	46
2.3.2.3	Диацилгліцерол (ДАГ) – другий посередник. Протеїнкіназа С…….	47
2.3.2.4 2.3.2.4.1	Ca^{2+} – повсюдний внутрішньоклітинний месенджер Шляхи регуляції рівня Ca^{2+} у цитоплазмі	48 48
2.3.2.4.2 2.3.2.4.3	Білки цитоплазми клітин, що зв'язують Ca^{2+}. Ca^{2+}/кальмодулін-залежні протеїнкінази (СаМ-кінази)	49 51
2.3.3	Безпосередня регуляція іонних каналів деякими G-білками	54
2.3.4	Загальні властивості сигнальних систем, яки приводяться в дію сполученними з G-білками рецепторами	56
2.3.5	Заключення відповідно рецепторів, що сполучені з G- білками……..	56
3 3.1	Передача сигналів через рецептори клітинної поверхні, сполучені з ензимами…….. Загальні властивості рецепторів, сполучених з	57

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

	ензимами	57
3.2	Класи сполучених з ензимами рецепторів	58
3.2.1	Рецепторні тирозинкінази. Сигнальні молекули. Структура рецепторів, сигнальні шляхи, що ініціюють рецепторні тирозинкінази. Сигнальні шляхи, що залежать від тирозинкінази	58
3.2.1.1	Фосфорильовані тирозини виконують роль сайтів приєднання для білків із SH 2-доменами	64
3.2.1.2	Білки Ras ……...	66
3.2.1.2.1	Ras – опосередковані каскади серин/треонінових фосфорилювань. MAP-кінази…….	67
3.2.1.2.2	Ras опосередковані каскади серин/треонінових фосфорилювань. PI-3-кінази……	70
3.2.1.2.1.2.1	Сигнальний шлях PI-3-кіназа/протеїнкіназа B	
3.2.1.3	Активність рецепторів, асоційованих з тирозинкіназами, залежить від наявності останніх у цитоплазмі …….	73
3.2.2	Активність рецепторів асоційованих з тирозинкіназами. Рецептори цитокінів……	76
3.2.2.1	Рецептори цитокінів, що активують сигнальний шлях Jak – STAT……..	77
3.2.2.2	Тирозинові протеїнфосфатази, що виконують роль рецепторів клітинної поверхні ……...	81
3. 2.3	Рецептори, сполучені з ензимами, які використовують тільки серин/треонінове фосфорилювання……..	83
3. 2.4	Рецепторні гуанілілциклази ……..	84
3.2.5	Розчинна гуанілатцикла. цГМФ та NO-опосередковані сигнальні шляхи……	85
3.2.8	Заключення відносно рецепторів, сполучених з ензимами …….	88
4	Індивідуальні завдання……	89
5	Питання тестового контролю……..	92
6	Еталони вірних відповідей……..	106
7	Література…….	107

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Вступ

Існування людини як виду залежить від можливості збереження життєво важливих функцій і здатності до розмноження. Ці процеси вимагають ретельної регуляції гомеостазу. Характерні риси більшості багатоклітинних організмів – диференціація й спеціалізація складових їхніх клітинних елементів. Так, в організмі хребетних тварин налічується багато мільярдів клітин, морфологічно й функціонально диференційованих на кілька десятків клітинних типів, що формують ряд високо спеціалізованих тканин, органів і систем. Такий ступінь диференціації складових компонентів організму вимагає високого рівня їхньої інтеграції й координації, без якого не може бути забезпечене існування живого організму як єдиного цілого з його здатністю до самостановлення, самозбереження й самовідтворення.

Це обставина еволюційоно обумовила необхідність виникнення в багатоклітинному організмі особливого централізованого "управлінського" апарата. Його спеціальною функцією стала системна (міжклітинна) регуляції й програмування формування й роботи різних органів, тканин і клітин, тобто спрямоване приведення їхньої структури й діяльності у відповідність із потребами організму.

В остаточному підсумку роль такого централізованого координуючого апарата в дорослому організмі зводиться до забезпечення сталості внутрішнього середовища організму, його гомеостазу.

Спеціалізований апарат міжклітинної регуляції представлений у більшості тваринних організмів нервовою і ендокринною системами. Перша забезпечує швидкий і відносно короткочасний спосіб регуляції, друга-переважно більше повільний і тривалий контроль.

Центральна нервова система здійснює свої регуляторні впливи на тканині найчастіше за допомогою нервових провідників, що передають нервові імпульси, ендокринна система-за посередництвом циркулюючих рідин (гуморально), що приносять специфічні ендокринні продукти.

Щоб скеровувати свою поведінку на користь організму, клітини багатоклітинного організму повинні володіти засобами досить складного спілкування між собою – засобами комунікації.

1 Загальні принципи молекулярних механізмів дії гормонів та цитокінів (загальні принципи комунікації клітин)

Механізми комунікації значною мірою залежать від

позаклітинних сигнальних молекул, які утворюються клітинами для передачі сигналів сусіднім або більш віддаленим клітинам (гормонів, цитокінів, оксиду азоту, оксиду вуглецю). Також необхідними для них є складні білкові системи, які дозволяють клітині специфічно відповідати на певний набір сигналів (рис. 1).

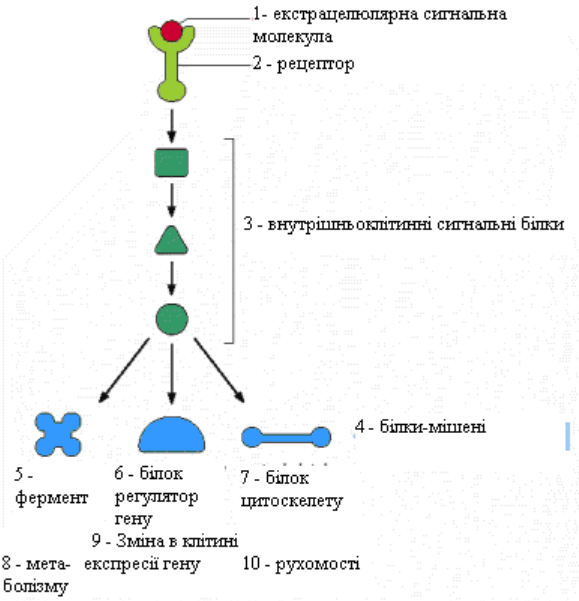


Рис. 1 – Загальна схема внутрішньоклітинного сигнального шляху

На рисунку 1 відображено простий внутрішньоклітинний сигнальний шлях, який активується позаклітинною сигнальною молекулою. Сигнальна молекула (1) зв'язується з рецепторним білком (2), який зазвичай занурений у плазматичну мембрану, активуючи у такий спосіб внутрішньоклітинний сигнальний шлях, опосередкований набором сигнальних білків (3). Нарешті, один із внутрішньоклітинних сигнальних білків взаємодіє з білком-мішенню (4), змушуючи його змінює поведінку клітини. [1 позаклітинна сигнальна молекула; 2 білок-рецептор; 3 внутрішньоклітинні сигнальні білки; 4 білки-мішені 5 – ензим метаболізму; 6 -білок-регулятор генів; 7 – білок цитоскелету; 8 - змінений метаболізм; 9 – змінена експресія генів; 10 – змінена

форма або рух клітини].

До цих білків належать рецепторні білки на поверхні клітини, які зв'язують сигнальну молекулу, і набір внутрішньоклітинних сигнальних білків, які розповсюджують сигнал до відповідних частин клітини. До внутрішньоклітинних сигнальних білків належать кінази, фосфатази, GTP-зв'язуючи білки і багато інших білків, із якими вони взаємодіють. Наприкінці кожного із сигнальних шляхів знаходяться білки-мішені, які модифікуються при активації шляху і змінюють поведінку клітини. Залежно від ефекту сигналу, білки-мішені можуть бути регуляторами генів, іонними каналами, компонентами метаболічних шляхів, частинами цитоскелету і так далі (рис. 1).

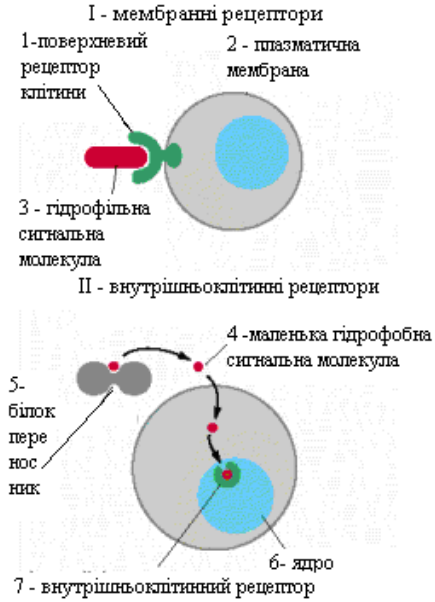
1.1.1 Гормони, цитокіни – позаклітинні сигнальні молекули. Загальна характеристика

У комунікації клітин вищих тварин беруть участь сотні типів сигнальних молекул. Це — білки, малі пептиди, амінокислоти, нуклеотиди, стероїди, ретиноїди, похідні жирних кислот і навіть розчинні гази, такі, як оксид азоту та моноксид вуглецю. Більшість сигнальних молекул виділяються сигналізуючими клітинами у позаклітинний простір шляхом екзоцитозу. Інші вивільняються шляхом дифузії через плазматичну мембрану, а деякі експонуються на клітинній поверхні, залишаючись міцно зв'язаними з нею.

Незалежно від природи сигналу, відповідь клітини-мішені на нього здійснюється за допомогою особливого *білка — рецептора*, який специфічно зв'язує сигнальну молекулу й ініціює після цього реакції відповіді. Позаклітинні сигнальні молекули діють у дуже низьких концентраціях (близько 10^{-8} М), а рецептори, які впізнають ці молекули, зазвичай зв'язують їх із високою афінністю (константа афінности Ка = 10^{8} моль/літр). У більшості випадків, ці рецептори є трансмембранними білками на поверхні клітини-мішені. При зв'язуванні позаклітинної сигнальної молекули (ліганду) вони активуються й генерують каскад внутрішньоклітинних сигналів, які впливають на поведінку клітини. В інших випадках, рецептори містяться всередині клітини-мішені, тому сигнальна молекула повинна увійти в клітину, щоб активувати їх. Для цього вона повинна бути достатньо малою й гідрофобною, щоб пройти через плазматичну мембрану шляхом дифузії (рис. 2).

This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

Рис. 2 – Зв'язування позаклітинних сигнальних молекул із рецепторами клітинної поверхні і внутрішньоклітинними рецепторами.



Більшість сигнальних молекул гідрофільні (3), отже не можуть прямо перетинати плазматичну мембрану. Натомість, вони зв'язуються з рецепторами клітинної поверхні (1), які генерують один або кілька сигналів всередині клітини-мішені. З іншого боку, деякі малі сигнальні молекули (4) можуть дифундувати через плазматичну мембрану і зв'язуються з рецепторами всередині клітини-мішені (7). Це відбувається у цитозолі або в ядрі (6). Багато з цих молекул є гідрофобними і майже нерозчинні у водному середовищі. Тому вони транспортуються у кровоплин та інші позаклітинні рідини у формі, зв'язаній з білком-переносником (5) Перш, ніж увійти в клітину-мішень, ці молекули дисоціюють від білків.

1.1.2 Типи спеціалізованих сигнальних клітин. Різновиди внутрішньоклітинної сигналізації

Різновиди внутрішньоклітинної сигналізації відображено на рис. 3.

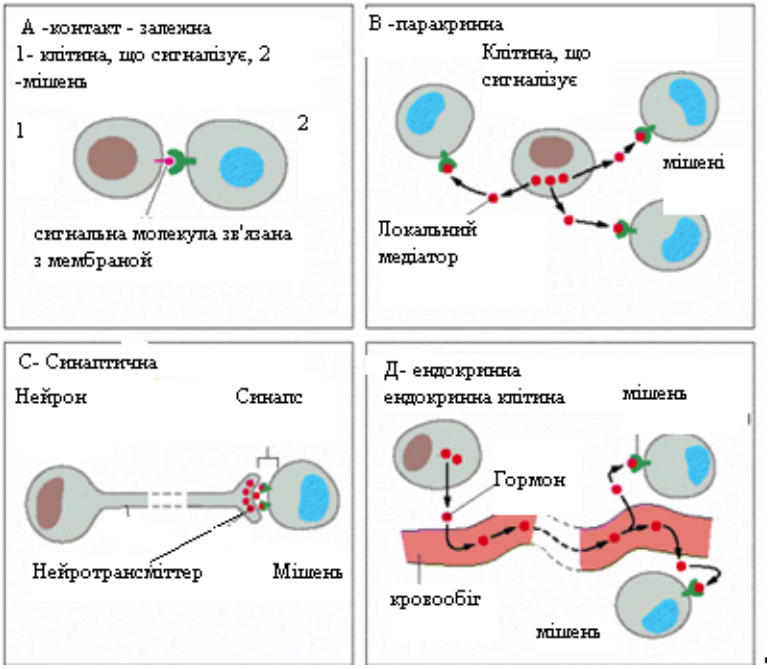


Рис. 3 -. Різновиди внутрішньоклітинної сигналізації.

Контакт-залежна сигналізація вимагає від клітини безпосереднього контакту між мембранами. (Б) Паракринна сигналізація залежить від сигналів, які вивільняються у позаклітинний простір і діють локально на сусідні клітини. (В) Синаптична сигналізація здійснюється нейронами, які передають електричні сигнали вздовж своїх аксонів і вивільняють на синапсах нейромедіатори. Синапси часто розташовані досить далеко від тіла клітини. (Г) Ендокринна сигналізація залежить від ендокринних клітин, які секретують гормони у кровоплин, із яким останні розносяться по всьому тілу. Багато спільних різновидів сигнальних молекул використовуються у паракринній, синаптичній та

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

ендокринній сигналізації. Суттєвими відмінностями цих механізмів є швидкість та вибірковість передачі сигналів до мішені.

Для великих і складних багатоклітинних організмів, передачі сигналів на близьких відстанях недостатньо, щоб координувати поведінку клітин. Тому у них еволюціонували групи спеціалізованих клітин, які виконують специфічну роль у комунікації між сильно віддаленими частинами тіла. Найбільш складними з них є нервові клітини, або нейрони, які зазвичай простягають довгі вирости — аксони, що дозволяють контактувати з віддаленими клітинами-мішенями. Коли нейрон активується сигналами із довкілля або від інших нервових клітин, він негайно надсилає електричні імпульси (потенціали дії) уздовж свого аксона. Коли імпульс досягає кінця аксона, він змушує розташовані там нервові закінчення вивільнити хімічний сигнал — нейромедіатор. Ці сигнали виділяються у спеціалізованих контактах клітин — хімічних синапсах, що забезпечують специфічну доставку нейромедіатора у постсинаптичну клітину-мішень (рис. 3В). Другий тип спеціалізованих сигнальних клітин, який контролює поведінку організму в цілому — це ендокринні клітини**.** Вони виділяють власні сигнальні молекули — гормони**,** у кровоплин. Ним гормони переносяться до клітин-мішеней, розташованих по всьому організму (рис. 3Г).

Механізми, які дозволяють ендокринним та нервовим клітинам координувати поведінку клітин у тварин порівнюються на рис. 4.

Оскільки ендокринна сигналізація залежить від дифузії та кровообігу, вона є відносно повільною. Натомість синаптична сигналізація може бути набагато швидшою, а також точнішою. Нервові клітини можуть передавати інформацію на великі відстані за допомогою електричних імпульсів, які досягають швидкостей до 100 метрів на секунду. Після вивільнення з нервового закінчення, нейромедіатор дифундує до клітини-мішені на відстані, меншій за 100 нм. Цей процес триває менше мілісекунди. Ще однією відмінністю між ендокринною та синаптичною сигналізацією є різниця в діючих концентраціях гормонів і нейромедіаторів. Гормони сильно розсіюються у кровоплині та міжклітинній рідині, тому повинні діяти у дуже малих концентраціях (найчастіше $< 10^{-8}$ М), натомість у випадку нейромедіаторів не відбувається такого розведення і вони можуть досягати високих локальних концентрацій. Для прикладу, концентрація ацетилхоліну в синаптичній щілині активного нервово-м'язового

сполучення становить близько $5x10^{-4}$ М. Крім цього, рецептори нейромедіаторів володіють відносно низькою афінністю щодо своїх лігандів, а це означає, що нейромедіатор може швидко дисоціювати від рецептора, припиняючи відповідь на сигнал. Більш того, після вивільнення у нервовому закінченні, нейромедіатор швидко

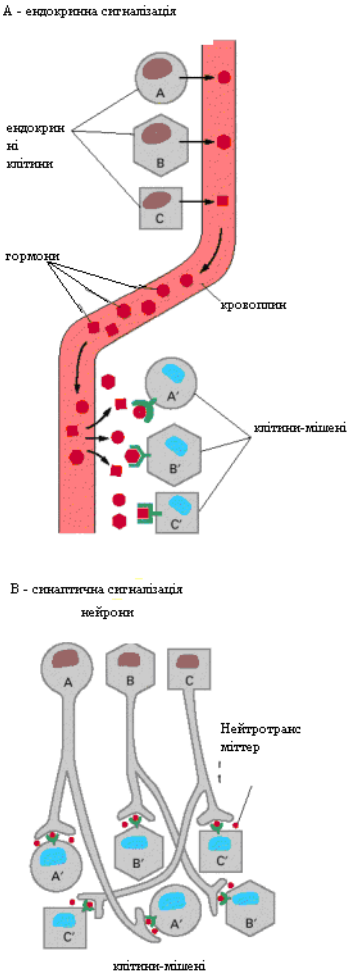


Рис. 4. – Відмінності між ендокринною та синаптичною сигналізацією.

У складних тварин, ендокринні та нервові клітини співпрацюють, координуючи розмаїті активності мільярдів клітин. У той час, як різні ендокринні клітини повинні використовувати відмінні гормони для специфічної комунікації зі своїми клітинами-мішенями, різні нервові клітини можуть використовувати один нейромедіатор і все одно високоспецифічно передавати сигнали. (А) Ендокринні клітини виділяють у кров гормони, які передають сигнали лише для специфічних клітин-мішеней, що їх упізнають. Клітини-мішені містять рецептори для зв'язування специфічних гормонів, які клітина “висмикує” із позаклітинної рідини. (Б) Специфічність синаптичної сигналізації виникає за рахунок синаптичних контактів між нервовою клітиною і специфічною клітиною-мішенню, якій вона передає сигнал. Зазвичай, лише клітина-мішень, сполучена за допомогою синапсу із нервовою клітиною, піддається дії нейромедіатора, вивільненого з

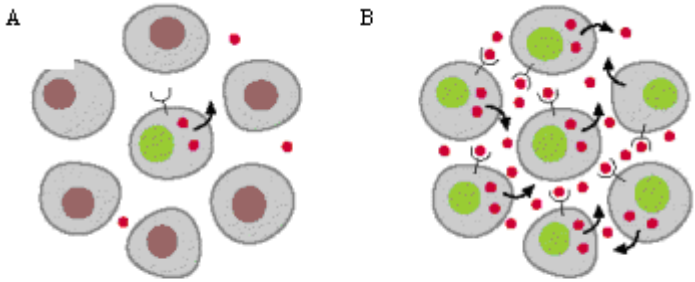
42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

нервового закінчення (хоча деякі нейромедіатори діють паракринно, виконуючи роль локальних медіаторів, що впливають на множинні клітини-мішені у ділянці. усувається із синаптичної щілини за допомогою специфічних гідролітичних ензимів, які руйнують його, або ж специфічних мембранних транспортних білків, які відкачують його назад у нервове закінчення або сусідні гліальні клітини. Отже, синаптична сигналізація є набагато точнішою, ніж ендокринна, як із часової, так і з просторової точки.

Клітини також можуть надсилати сигнали як до інших клітин такого ж типу, так і до самих себе. При такій автокринній сигналізації клітина секретує сигнальні молекули, які можуть зв'язуватися з її власними рецепторами. Наприклад, у процесі розвитку, після того, як клітина була спрямована на певний шлях диференціації, вона може почати секретувати автокринні сигнали, щоб підтримувати таке рішення.

Автокринна сигналізація (рис. 5) є найбільш ефективною, коли вона одночасно здійснюється сусідніми клітинами одного типу. Схоже, що вона використовується, щоб змусити групи ідентичних клітин приймати однакові рішення в процесі розвитку, тому автокринну сигналізацію вважають одним із можливих механізмів, що лежать в основі

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter



Група ідентичних клітин утворює вищу концентрацію секретованого сигналу (Б), ніж одна клітина (А)

Рис. 5.– Автокринна сигналізація. Група ідентичних клітин утворює вищу концентрацію секретованого сигналу, ніж одна клітина. Зв'язування цього сигналу рецептором однотипної клітини заохочує клітини до координованої групової відповіді. [А – одна сигналізуюча клітина отримує слабкий автокринний сигнал, В – у групі ідентичних сигнальних клітин, кожна отримує потужний автокринний сигнал].

“ефекту спільноти”, який спостерігається під час раннього розвитку. Він полягає у тому, що на сигнал індукції диференціації може відповісти лише група ідентичних клітин, але не одна ізольована клітина такого ж типу. Таким чином, автокринна сигналізація зумовлює координовані рішення груп ідентичних клітин.

На жаль, ракові клітини часто використовують автокринну сигналізацію для подолання нормальних механізмів контролю проліферації й виживання клітин. Утворюючи сигнали, які діють на їхні власні рецептори, ракові клітини можуть стимулювати власне виживання та проліферацію у таких місцях, де нормальні клітини неспроможні рости.

Ще одним способом координації активності сусідніх клітин є *щільні контакти* (рис. 6).

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

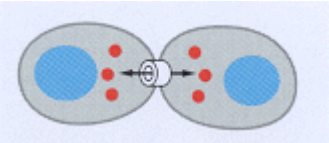


Рис. 6. – Сигналізація за допомогою щільних контактів.
Клітини, сполучені щільними контактами, можуть обмінюватися малими молекулами, включно із внутрішньоклітинними сигнальними молекулами, і можуть у такий спосіб координовано відповідати на позаклітинні сигнали

Щільні контакти являють собою спеціалізовані міжклітинні контакти, які можуть виникати між тісно зближеними плазматичними мембранами і безпосередньо сполучати цитоплазми клітин за допомогою вузьких водних каналів. Ці канали дозволяють обмін малими внутрішньоклітинними сигнальними молекулами (внутрішньоклітинними медіаторами), наприклад, Ca^{2+}, NO або цАМФ, але не макромолекулами білків чи нуклеїнових кислот. Отже, сполучені між собою щільними контактами клітини можуть безпосередньо спілкуватися між собою, не потребуючи подолання бар'єра, утвореного плазматичними мембранами.

Встановлено, що миші і люди, дефектні по одному з білків щільного контакту (конексину), страждають важкими вадами розвитку серця. Подібно до автокринної сигналізації, сполучення за допомогою щільних контактів допомагає сусіднім клітинам одного типу координувати свою поведінку. Специфічні функції комунікації за допомогою щільних контактів під час розвитку тварин залишаються нез'ясованими.

1.1.3 Кожна клітина запрограмована відповідати на специфічні поєднання позаклітинних сигнальних молекул

Типова клітина багатоклітинного організму отримує сотні різних сигналів із довкілля. Вони можуть бути розчинними, зв'язаними із позаклітинним матриксом або з поверхнею сусідньої клітини, і здатні діяти у багатьох мільйонах комбінацій. Клітина повинна вибірково відповідати на цю навалу сигналів, згідно із своїми специфічними рисами, набутими впродовж прогресивної спеціалізації у ході розвитку. Клітина може бути запрограмованою відповідати на одну комбінацію сигналів диференціацією, на другу — розмноженням,

а на ще іншу — здійсненням певної спеціалізованої функції, наприклад, скорочення або секреції

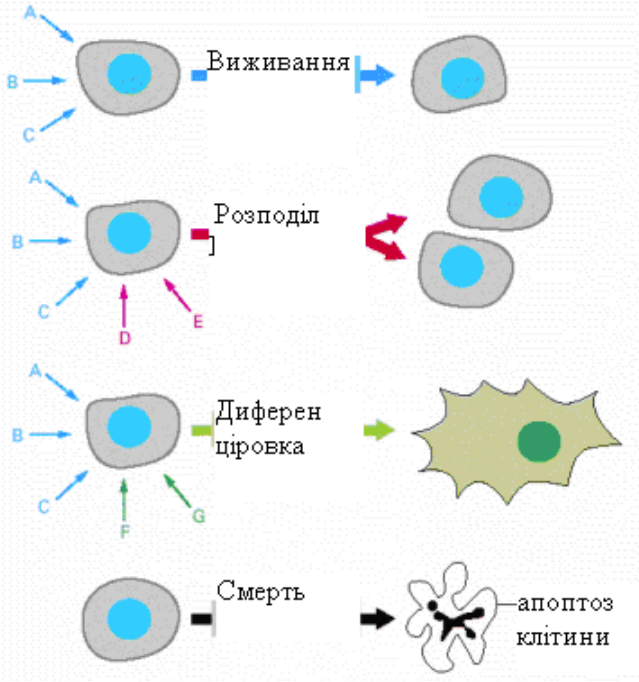


Рис. 7 – Залежність тваринної клітини від множинних внутрішньоклітинних сигналів.

Кожен із типів клітин виявляє набір рецепторів, який дозволяє йому реагувати на відповідну сукупність сигнальних молекул, утворених іншими клітинами. Ці сигнальні молекули співпрацюють у поєднаннях, регулюючи поведінку клітини. Як показано на рисунку 7 окрема клітина потребує множинних сигналів для виживання (сині стрілки) і додаткових сигналів для поділу (червоні стрілки) або диференціації (зелені стрілки). Якщо її позбавити відповідних сигналів виживання, клітина здійснює різновид самогубства, відомий, як програмована смерть клітини або апоптоз.

У принципі, сотні сигнальних молекул, які утворюються у тваринному організмі, можуть бути використані для створення майже необмеженого числа сигнальних комбінацій. Використання таких

поєднань для регуляції поведінки клітин дозволяє тварині високоспецифічно контролювати їх, використовуючи обмежений набір сигнальних молекул.

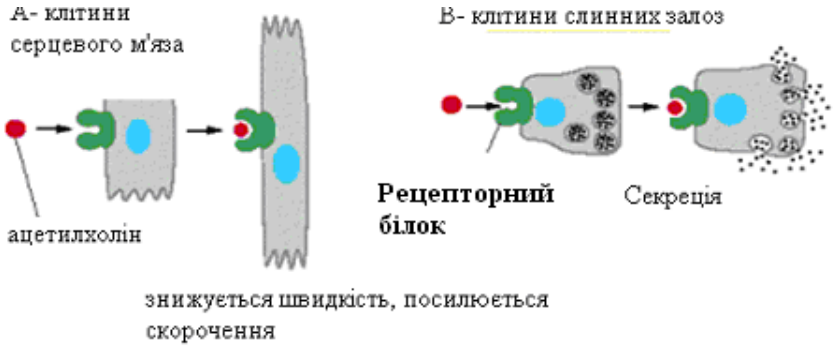


Рис. 8. Різноманітні відповіді, індуковані нейромедіатором ацетилхоліном.

Різні типи клітин спеціалізовані для відповіді на ацетилхолін різними шляхами. (А і В) У цих двох типів клітин, ацетилхолін зв'язується з подібними рецепторними білками, проте утворені внутрішньоклітинні сигнали інтерпретуються по-різному у клітинах, спеціалізованих для виконання різних функцій.

1.1.4 Різні клітини можуть по-різному відповідати на однакові позаклітинні сигнальні молекули

Існують різні специфічні способи реакції клітини на довкілля. Вони відрізняються відповідно до набору клітинних білків-рецепторів, які визначають здатність клітини відповідати на певну сукупність сигналів, а також за внутрішньоклітинними механізмами інтеграції та інтерпретації отриманих сигналів (рис. 1). Тому одна сигнальна молекула часто зумовлює відмінні ефекти для різних клітин-мішеней. Для прикладу, нейромедіатор ацетилхолін стимулює скорочення клітин скелетних м'язів, але знижує частоту і силу скорочення клітин серцевого м'яза. Це зумовлене відмінністю білків-рецепторів ацетилхоліну на клітинах скелетних м'язів від білків на клітинах серцевих м'язів. Проте відмінності у рецепторах не завжди пояснюють різницю в ефектах. У багатьох випадках, одна і та є сигнальна

молекула зв'язується з ідентичними рецепторами, але викликає дуже різні відповіді у різних типах клітин-мішеней. Це відображає відмінності внутрішніх клітинних апаратів, із якими сполучені рецептори (рис. 8).

1.1.5 Концентрація сигнальної молекули може бути швидко настроєна лише у випадку короткого часу її життя

У більшості дорослих тварин відповідь клітин спадає при зникненні сигналу. Ефект є тимчасовим, оскільки наслідки сигналу спричиняються зміною набору нестабільних молекул, що підлягають постійному кругообігу. Отже, як тільки сигнал зникає, заміщення старих молекул новими стирає усі сліди його дії. Звідси випливає, що швидкість відповіді клітини на усунення сигналу залежить від швидкості руйнування або кругообігу молекули, яка на цей сигнал впливає.

Швидкість кругообігу також визначає швидкість реакції на появу сигналу. Після значного зростання або зменшення швидкості синтезу молекул, час, необхідний для переходу наполовину від попередньої до нової рівноважної концентрації, співпадає з нормальним періодом напівжиття молекули, що дорівнює часові, необхідному для зменшення концентрації наполовину у випадку повної зупинки синтезу.

1.2 Ядерні рецептори – рецептори гідрофобних гормонів

1.2.1 Гідрофобні гормони

Деякі низькомолекулярні гідрофобні сигнальні молекули безпосередньо дифундують через плазматичну мембрану клітин-мішеней і зв'язуються із внутрішньоклітинними рецепторними білками. До цих молекул належать стероїдні гормони, тиреоїдні гормони, ретиноїди і вітамін D. Хоча всі вони різняться між собою за хімічною структурою і функціями, механізм дії у них спільний. Коли сигнальні молекули зв'язуються із своїми рецепторними білками й активують їх, останні зв'язуються із ДНК, регулюючи транскрипцію специфічних генів. Усі рецептори структурно споріднені і належать до надродини ядерних рецепторів. Вона дуже велика і також включає деякі рецепторні білки, що активуються внутрішньоклітинними метаболітами, а не секретованими сигнальними молекулами.

Усі стероїдні гормони, до яких належить кортизол, стероїдні статеві гормони, вітамін D (у хребетних) і гормон линьки екдизон (у

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

комах), синтезуються з холестеролу. Кортизол утворюється у корі надниркових і регулює метаболізм у багатьох типах клітин. Стероїдні статеві гормони утворюються в яєчках і яєчниках, вони відповідають за вторинні статеві ознаки, які відрізняють чоловіків від жінок. Вітамін D синтезується у шкірі у відповідь на світло. Після перетворення в активну форму у печінці або нирках він регулює метаболізм Ca^{2+}, посилюючи його поглинання у кишечнику і послаблюючи виділення у нирках. Тиреоїдні гормони, які утворюються із амінокислоти тирозину, збільшують швидкість метаболізму у широкому колі типів клітин, у той час як ретиноїди, зокрема ретиноєва кислота, утворюються з вітаміну А і виконують важливу роль локальних медіаторів під час розвитку хребетних. Хоча всі перелічені сигнальні молекули відносно нерозчинні у воді, вони транспортуються у крові та інших позаклітинних рідинах у розчинній формі, зв'язуючись із специфічними білками-переносниками і дисоціюючи від них перед переміщенням у клітину-мішень (рис. 2).

1.2.2 Принципові відмінності в передачі сигналу гідрофобними та гідрофільними гормонами

Поза докорінними відмінностями у способах передачі сигналу до клітин-мішеней, більшість водонерозчинних сигнальних молекул відрізняються від водорозчинних за *тривалістю свого перебування у* крові або тканинній рідині. Більшість розчинних у воді гормонів усуваються і/або руйнуються за кілька хвилин після потрапляння у кров, а локальні медіатори і нейромедіатори зникають із міжклітинного простору навіть швидше — за кілька секунд або мілісекунд. Натомість стероїдні гормони залишаються у крові впродовж кількох годин, а тиреоїдні — кілька днів. Унаслідок цього водорозчинні сигнальні молекули зазвичай опосередковують короткотривалі відповіді, а нерозчинні у воді — переважно довготривалі реакції.

Внутрішньоклітинні рецептори стероїдних і тиреоїдних гормонів, ретиноїдів та вітаміну D *зв'язуються зі специфічними послідовностями* ДНК, розташованими поряд із генами, які регулюються відповідним лігандом. Деякі рецептори, такі як кортизоловий, розташовані, головним чином, у цитозолі і потрапляють у ядро після зв'язування ліганду. Інші, наприклад, тиреоїдні та ретиноїдні рецептори, зв'язуються з ядерною ДНК навіть за відсутності

ліганду. *У кожному випадку, неактивні рецептори зв'язані з інгібіторними білковими комплексами,* а зв'язування ліганду змінює конформацію рецепторного білка, спричиняючи *дисоціацію інгібіторного комплексу*. Зв'язування ліганду також викликає зв'язування рецептором коактиваторних білків, які індукують транскрипцію генів. Транскрипційна відповідь зазвичай відбувається послідовними кроками: безпосередня активація невеликого числа специфічних генів відбувається у межах 30 хвилин і утворює первинну відповідь; білкові продукти цих генів у свою чергу активують інші гени, викликаючи затриману, вторинну відповідь і так далі. У такий спосіб, простий гормональний перемикач може спричинити дуже складну зміну картини експресії генів.

Відповіді на стероїдні і тиреоїдні гормони, вітамін D і ретиноїди, а також відповіді на позаклітинні сигнали в цілому, настільки ж визначаються природою клітини-мішені, як і природою сигнальної молекули. Багато типів клітин містять ідентичні внутрішньоклітинні рецептори, проте набір генів, які ними регулюються, відрізняється для кожного типу клітин. Причина цього полягає у тому, що для активації транскрипції необхідне зв'язування більше, ніж одного типу регуляторний білків. Тому внутрішньоклітинний рецептор може активувати ген лише за умови наявності правильного поєднання інших білків-регуляторів генів, а багато з них є специфічними до типу клітин. *Отже, кожен із перелічених гормонів індукує у тварин характерну сукупність реакцій із двох причин. По*-перше, лише певні типи клітин містять рецептори для нього. По-друге, кожен із цих клітинних типів містить своєрідне поєднання інших, специфічних до типу клітин, білків-регуляторів генів, які співпрацюють з активованим рецептором, регулюючи транскрипцію специфічних наборів генів.

1.3 Рецептори клітинної поверхні

1.3. 1 Основні класи рецепторів клітинної поверхні та їхня роль

До трьох найбільших класів рецепторів клітинної поверхні належать рецептори, сполучені з іонними каналами, G-білками та ензимами. (рис. 9).

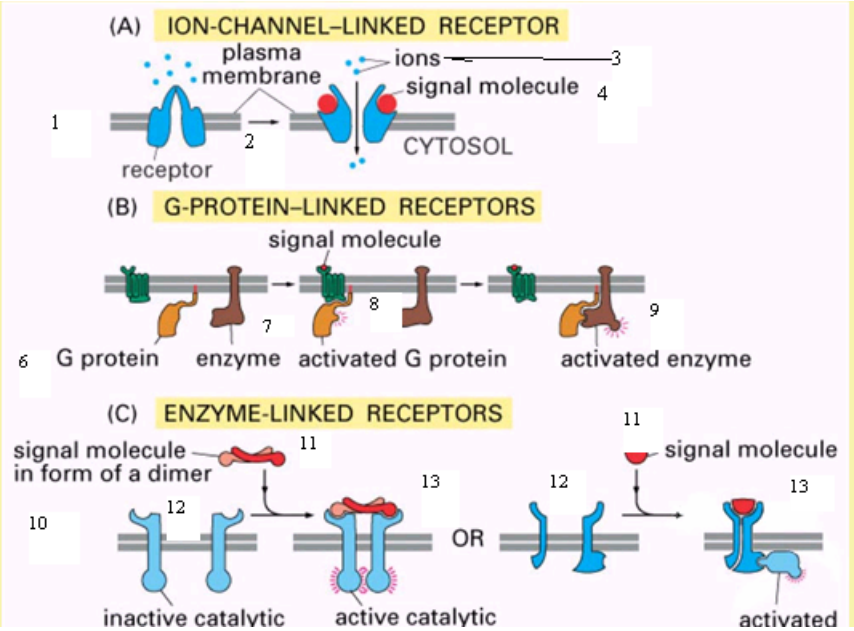


Рис. 9 – Три класи рецепторів клітинної поверхні. (А) Рецептори, сполучені з іонними каналами, (Б) із G - білками і (В) з ензимами. Багато рецепторів, сполучених з ензимами, володіють власною ензимною активністю (зліва), але частина з них залежить від асоційованих ензимів (справа).

[1– рецептори, сполучені з іонними каналами, 2 – плазматична мембрана, 3 –іони, 4 – сигнальна молекула, 5 – рецептори, сполучені з G – білками, 6 – G –білок, 7 – ензим, 8 – активований G –білок, 9 – активований ензим, 10 – рецептори, сполучені з ензимами, 11 –

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

сигнальна молекула у формі димеру, 12 – неактивний каталітичний домен, 13 – активний каталітичний домен].

Рецептори клітинної поверхні виконують роль передавачів (трансдукторів) сигналів. Вони перетворюють позаклітинний сигнал зв'язування ліганду у внутрішньоклітинні сигнали, які впливають на поведінку клітини-мішені.

1.3.1.1 Рецептори, сполучені з іонними каналами

Рецептори, сполучені з іонними каналами, також відомі, як медіатор-залежні іонні канали або іонотропні рецептори, задіяні у швидкій синаптичній передачі сигналів між електрично збудливими клітинами (рис. 9А). Такий тип сигналізації опосередковується невеликою кількістю нейромедіаторів, які тимчасово відкривають або закривають іонний канал, утворений білком, що їх зв'язує. В результаті на короткий час змінюється іонна проникність плазматичної мембрани, а отже — і збудливість постсинаптичної клітини. Рецептори, сполучені з іонними каналами, належать до великої родини гомологічних, багатопрохідних трансмембранних білків.

1.3.1.2 Рецептори, сполучені с G-білками

Рецептори, сполучені з G-білками, діють непрямим шляхом, регулюючи активність окремого, зв'язаного із плазматичною мембраною, білка-мішені, який може бути ензимом або іонним каналом. Взаємодія між рецептором та білком-мішенню опосередковується третім білком, тримерним GTP- зв'язуючим білком (G-білком) (рис. 9Б). У результаті активації білка-мішені може змінюватися концентрація одного або більше внутрішньоклітинних медіаторів (якщо білок-мішень є ензимом), або іонна проникність плазматичної мембрани (якщо він є іонним каналом). Задіяні внутрішньоклітинні медіатори у свою чергу впливають на поведінку інших сигнальних білків клітини. Усі рецептори, сполучені з G-білками, належать до великої родини негомологічних, семипрохідних трансмембранних білків.

1.3.1.3 Рецептори, сполучені із ензимами

Рецептори, сполучені із ензимами, після своєї активації самі функціонують, як ензими, або є безпосередньо зв'язаними із ензимами й активують їх (рис. 9В). Вони утворені однопрохідними трансмембранними білками, ліганд-зв'язуючий сайт яких

розташований поза межами клітини, а каталітичний або ензим-зв'язуючий сайт — усередині клітини. За структурою сполучені з ензимами рецептори є гетерогенними порівняно з іншими двома класами. Щоправда, більшість із них є протеїнкіназами або асоційовані з ними, а зв'язування ліганду цими рецепторами спричиняє фосфорилювання специфічних наборів білків у клітині-мішені.

Існують деякі поверхневі рецептори, які не потрапляють до жодного з перелічених класів. Утворення сигналів деякими з них залежить від внутрішньоклітинних процесів протеолізу.

1.3.1.4 Принциповий механізм передачі сигналів с рецепторів, сполучених з G-білками та ензимами

Сигнали, отримані на поверхні клітини рецепторами, сполученими з G-білками або ензимами, передаються усередину клітини за допомогою набору малих і великих внутрішньоклітинних сигнальних молекул. Утворений ланцюг внутрішньоклітинних сигнальних подій згодом впливає на білки-мішені, а вони відповідають за модифікацію поведінки клітини (рис. 1).

Поняття вторинних месенджерів, їхні властивості

Малі внутрішньоклітинні сигнальні молекули називаються низькомолекулярними внутрішньоклітинними медіаторами, або *вторинними месенджерами* (“первинні месенджери” — це позаклітинні сигнали). Вони утворюються у великих кількостях у відповідь на активацію рецептора і швидко дифундують від джерела, передаючи сигнал до інших частин клітини. Деякі із них, зокрема циклічний АМФ і Ca^{2+}, водорозчинні і дифундують у цитозоль, у той час, як інші, наприклад, диацилгліцерол, жиророзчинні і дифундують у площині плазматичної мембрани. У будь-якому випадку, вони передають сигнал, зв'язуючись із певними сигнальними білками або білками-мішенями і змінюючи їхню поведінку.

Внутрішньоклітинні сигнальні білки, класифікація

Великими молекулами є внутрішньоклітинні сигнальні білки. Багато із них передають сигнал у клітину, активуючи наступний сигнальний білок у ланцюгу або, утворюючи низькомолекулярні внутрішньоклітинні медіатори. Ці білки можна класифікувати за їхньою конкретною функцією, хоча багато з них потрапляють до більше, ніж однієї категорії (рис. 10):

- Білки-передавачі просто передають сигнал до наступного

компонента у ланцюгу.

- Білки-месенджери переносять сигнал від однієї частини клітини до іншої, наприклад, від цитозолю до ядра.
- Адапторні білки сполучають один сигнальний білок з іншим, але самі не передають сигналу.
- Білки-ампліфікатори (ефекторні білки), переважно ензими або іонні канали, значно посилюють отриманий сигнал, утворюючи великі кількості малих внутрішньоклітинних медіаторів, або, активуючи численні внутрішньоклітинні сигнальні білки, низхідні у сигнальному шляху. Якщо у ланцюгу передачі сигналу є багато стадій посилення, то його часто називають сигнальним каскадом.
- Білки-трансдуктори перетворюють сигнал в іншу форму. Прикладом є ензим, який утворює циклічний АМФ: він одночасно перетворює сигнал і посилює його, діючи одночасно як ампліфікатор і трансдуктор.
- Білки-розгалужувачі поширюють сигнал з одного сигнального шляху на інший.
- Білки-інтегратори отримують сигнали від двох або більше сигнальних шляхів та інтегрують їх перед тим, як передати далі.
- Латентні білки-регулятори генів активуються на поверхні клітини рецепторами і мігрують до ядра, щоб стимулювати там транскрипцію

Різні типи внутрішньоклітинних сигнальних білків по ходу сигнального шляху від рецептора на поверхні клітини відображено на рисунку 10. У цьому прикладі, сигнал передається всередину клітини за допомогою набору сигнальних білків і низькомолекулярних внутрішньоклітинних медіаторів, спричиняючи зміну в експресії генів. Сигнал en route (по шляху) посилюється, перетворюється (трансдукується) і розподіляється. Багато кроків можуть модулюватися іншими позаклітинними та внутрішньоклітинними сигналами, так, що кінцевий результат одного сигналу залежить від інших факторів, які впливають на клітину. Наприкінці, сигнальний шлях активує (або інактивує) білки-мішені, які змінюють поведінку клітини. У цьому прикладі, мішенню є білок-регулятор гена. Як показано на рис. 10 синім кольором, інші типи внутрішньоклітинних білків також виконують важливі ролі у внутрішньоклітинній сигналізації. Білки-модулятори модифікують активність внутрішньоклітинних

сигнальних білків і у такий спосіб регулюють силу передачі сигналу по шляху. Білки-якорі утримують специфічні сигнальні білки у точному місці клітини, приєднуючи їх до мембрани або цитоскелету. Скефолд-білки — це білки-адаптори і/або якорі, які зв'язують багато сигнальних білків разом у функціональному комплексі і часто забезпечують його специфічне розташування.

Багато із внутрішньоклітинних сигнальних білків поводяться, як молекулярні перемикачі: отримуючи сигнал, вони переходять із неактивного стану в активний, доки інший процес не вимкне їх. *Інактивація є настільки* ж важливою, як і активація. Щоб сигнальний шлях відновився після передачі сигналу і був готовим до нової передачі, кожна активована молекула у шляху повинна повернутися до вихідного неактивного стану.

Молекули перемикачі

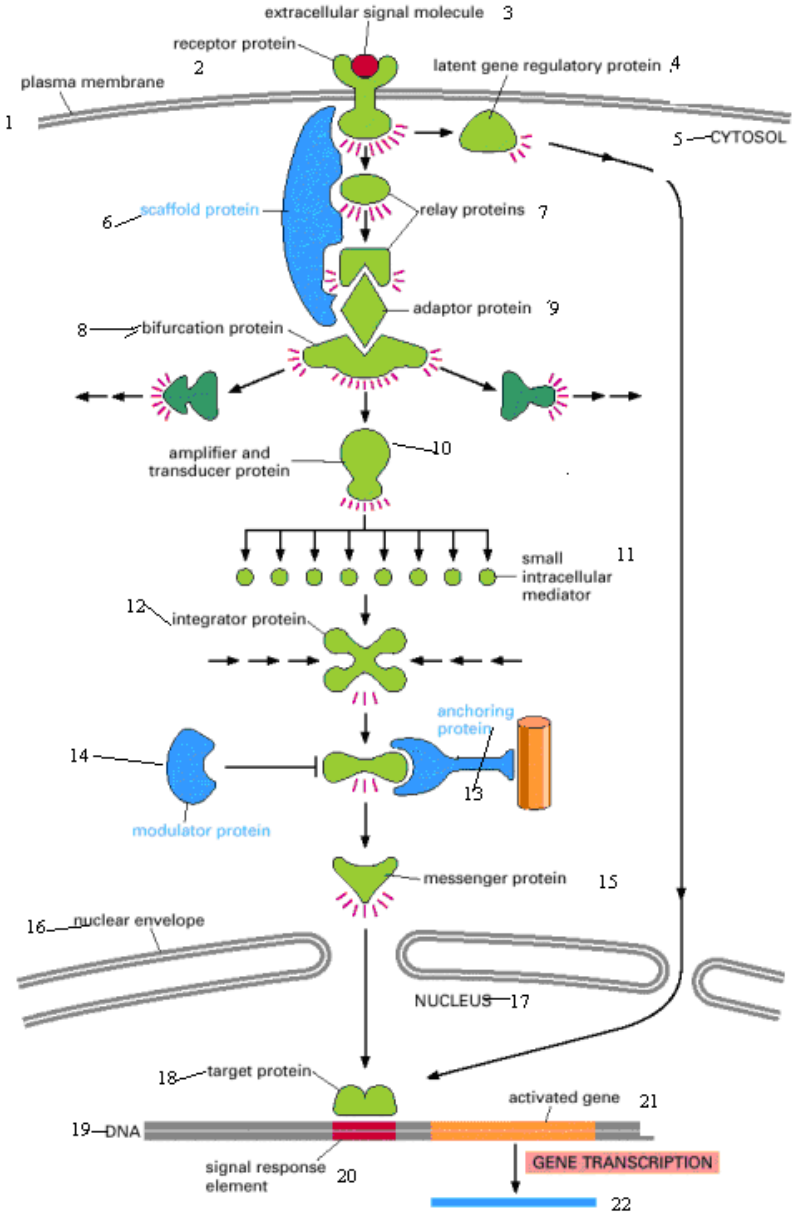
Молекулярні перемикачі поділяються на два основні класи, які діють за різними шляхами, хоча в обох випадках активність або неактивність білка визначається втратою або приєднанням фосфатної групи. До найбільшого класу входять білки, які активуються або інактивуються фосфорилюванням. Для цих білків, перемикання в одному напрямку відбувається за допомогою протеїнкінази, яка приєднує одну або більше фосфатних груп до сигнального білка, а в протилежному — за допомогою протеїнфосфатази, яка усуває фосфатні групи з білка (рис.11).

За приблизною оцінкою, у будь-який момент часу одна третина білків в евкаріотичній клітині фосфорильовані.

Багато із сигнальних білків, контрольованих фосфорилюванням, самі є протеїнкіназами, і часто вони організовані у каскади фосфорилювання. Одна протеїнкіназа, активована фосфорилюванням, фосфорилює наступну протеїнкіназу в послідовності, і так далі. У процесі передачі сигнал також може посилюватися і часом переходити до інших сигнальних шляхів. Два основні типи протеїнкіназ працюють, як внутрішньоклітинні сигнальні білки. Значна частина є серин/треоніновими кіназами, які фосфорилюють білки по залишкам серину і (рідше) треоніну. Інші — це тирозинові кінази, які фосфорилюють білки по залишкам тирозину. Подекуди трапляються кінази, які об'єднують ці функції. Секвенування геному виявило, що близько 2% наших генів кодують протеїнкінази, і є підстави вважати, що типова клітина ссавців містить кілька сотень різновидів протеїнкіназ.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter



42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Рис. 10 – Різні типи внутрішньоклітинних сигнальних білків по ходу сигнального шляху від рецептора на поверхні клітини.
У цьому прикладі, сигнал передається всередину клітини за допомогою набору сигнальних білків і низькомолекулярних внутрішньоклітинних медіаторів, спричиняючи зміну в експресії генів. Сигнал en route посилюється, перетворюється (трансдукується) і розподіляється. Багато кроків можуть модулюватися іншими позаклітинними та внутрішньоклітинними сигналами, так, що кінцевий результат одного сигналу залежить від інших факторів, які впливають на клітину (рис. 6). Наприкінці, сигнальний шлях активує (або інактивує) білки-мішені, які змінюють поведінку клітини. У цьому прикладі, мішенню є білок-регулятор гена.

[1– плазматична мембрана, 2 – білок-рецептор, 3 – позаклітинна сигнальна молекула, 4 – латентний білок-регулятор гена, 5 – цитозоль, 6 – скефолд-білок, 7 - білки-передавачі, 8 – білок-розгалужувач, 9 – адапторний білок, 10 – білок-ампліфікатор і трансдуктор, 11 – низькомолекулярний внутрішньоклітинний медіатор, 12 – білок-інтегратор, 13 – білок-якір, 14 – білок-модулятор, 15 – білок-месенджер, 16 – ядерна оболонка, 17 – ядро, 18 – білок-мішень, 19 – ДНК, 20 – елемент відповіді на сигнал, 21 –активований ген, 22 – транскрипція гена].

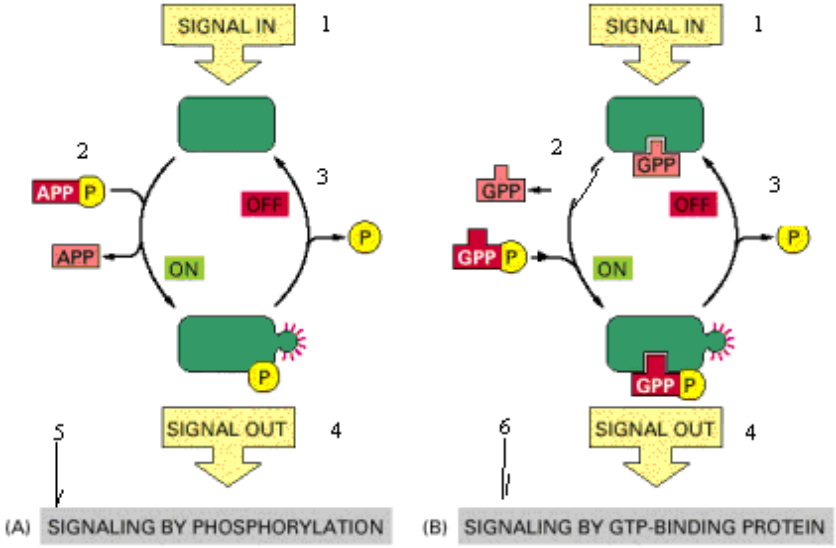


Рис. 11 – Два різновиди внутрішньоклітинних сигнальних білків, які виконують роль молекулярних перемикачів.
В обох випадках, сигнальний білок активується додаванням фосфатної групи та інактивується її усуненням. (А) Фосфат ковалентно приєднується до сигнального білка за допомогою протеїнкінази. (Б) У результаті індукції сигнальний білок обмінює зв'язаний GDP на GTP. Щоб підкреслити подібність двох механізмів, ATP показаний, як APPP, ADP, як APP, GTP, як GPPP, а GDP, як GPP.

[1 – вхід сигналу, 2 – активація, 3 – інактивація, 4 – вихід сигналу, 5 – сигналізація фосфорилюванням, 6 – сигналізація GTP - зв'язуючим білком].

За приблизною оцінкою, у будь-який момент часу одна третина білків в евкаріотичній клітині фосфорильовані.

Багато із сигнальних білків, контрольованих фосфорилюванням, самі є протеїнкіназами, і часто вони організовані у каскади фосфорилювання. Одна протеїнкіназа, активована фосфорилюванням, фосфорилює наступну протеїнкіназу в послідовності, і так далі. У процесі передачі сигнал також може посилюватися і часом переходити до інших сигнальних шляхів. Два основні типи протеїнкіназ працюють,

як внутрішньоклітинні сигнальні білки. Значна частина є серин/треоніновими кіназами, які фосфорилюють білки по залишкам серину і (рідше) треоніну. Інші — це тирозинові кінази, які фосфорилюють білки по залишкам тирозину. Подекуди трапляються кінази, які об'єднують ці функції. Секвенування геному виявило, що близько 2% наших генів кодують протеїнкінази, і є підстави вважати, що типова клітина ссавців містить кілька сотень різновидів протеїнкіназ.

Інший клас основних молекулярних перемикачів, задіяних у передачі сигналу — *це GTP-зв'язуючі білки*. Вони переходять із активного стану із зв'язаний GTP до неактивного зі зв'язаним GDP. В активному стані вони володіють власною GTPазною активністю і вимикають самі себе, гідролізуючи зв'язаний GTP до GDP (рис. 11Б). Існують два головні класи GTP-зв'язуючих білків — великі тримерні GTP-зв'язуючі білки (інша назва — G-білки), які передають сигнали від сполучених із ними рецепторів (рис. 11Б) і малі мономерні GTPази (їх також називають мономерними GTP-зв'язуючими білками). Останні також допомагають передавати внутрішньоклітинні сигнали, але крім цього вони задіяні у регуляції везикулярного транспорту і багатьох інших процесів в евкаріотичних клітинах.

Білки інтегратори

Складні форми клітинної поведінки, зокрема, виживання та проліферація клітин переважно стимулюються специфічними поєднаннями позаклітинних сигналів, а не окремими незалежно діючими сигналами (рис. 7). Отже, клітина повинна об'єднувати інформацію з різних сигналів, щоб приймати відповідні рішення: жити чи ні, ділитися чи ні, і так далі. Таке об'єднання зазвичай здійснюється білками-інтеграторами (рис. 10), які подібні до комп'ютерних мікропроцесорів: на основі множинних сигналів на вході вони утворюють сигнал на виході, який зумовлює необхідний біологічний наслідок.

Внутрішньоклітинні сигнальні комплекси збільшують швидкість, ефективність та специфічність відповіді

Зазвичай навіть один тип позаклітинного сигналу, який діє на один тип рецептора, сполученого із G-білком або ензимом, активує множинні паралельні сигнальні шляхи й у такий спосіб може впливати на багато аспектів поведінки клітини, зокрема, на її форму, метаболізм і експресію генів. Дійсно, ці два основні класи рецепторів клітинної поверхні часто активують одні й ті ж сигнальні шляхи і часто немає

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

очевидного пояснення, чому певний позаклітинний сигнал використовує один клас рецепторів, а не інший.

Складність систем, які відповідають на сигнали, із їхніми множинними ланцюгами сигнальних білків-передавачів, що взаємодіють між собою, вражає. Не зрозуміло, як окрема клітина спроможна виявляти специфічні відповіді на таку кількість різних позаклітинних сигналів, велика частина яких зв'язується із рецепторами одного класу й активує одні й ті ж сигнальні шляхи. Одна зі стратегій, які клітина застосовує для досягнення специфічності — це використання *скефолд-білків*, які організовують групи взаємодіючих сигнальних білків у сигнальні комплекси. Оскільки скефолд керує взаємодіями послідовно розташованих складових такого комплексу, сигнал може передаватися точно, швидко та ефективно. Більш того, уникається небажана перехресна передача сигналів між різними шляхами. Але, для ампліфікації сигналу та його розповсюдження на інші частини клітини принаймні частина складових сигнальних шляхів повинна вільно дифундувати.

В інших випадках, *сигнальні комплекси* виникають лише тимчасово, наприклад, при збиранні сигнальних білків навколо рецептора після його активації позаклітинною сигнальною молекулою. Часом цитоплазматичний хвіст рецептора фосфорилюється під час активації, після чого фосфорильовані амінокислоти виконують роль сайтів приєднання інших сигнальних білків. Ще один варіант — коли активація рецептора призводить до утворення модифікованих молекул фосфоліпідів у сусідній ділянці плазматичної мембрани, які рекрутують специфічні внутрішньоклітинні сигнальні білки. Усі сигнальні комплекси такого типу утворюються лише тимчасово й швидко розпадаються після дисоціації позаклітинного ліганду від рецептора.

1.3.1.5 Взаємодії між внутрішньоклітинними сигнальними білками опосередковуються модульними доменами зв'язування

Утворення як стабільних, так і тимчасових сигнальних комплексів залежить від цілого ряду висококонсервативних невеликих доменів зв'язування, які зустрічаються у багатьох внутрішньоклітинних сигнальних білках. Кожен із цих компактних білкових модулів зв'язується із певним структурним мотивом у білку (або ліпіді), із яким взаємодіє сигнальний білок. Завдяки цим модульним доменами сигнальні білки зв'язуються один з одним у різних поєднаннях, подібно

до блоків конструктора, утворюючи трьохвимірну мережу взаємодій, яка визначає маршрут сигнального шляху. Сполучення існуючих модульних доменів зв'язування у нових комбінаціях, очевидно полегшило швидку еволюцію нових сигнальних шляхів.

Наприклад, Src-гомологічні домени типу 2 *(SH2*) і фосфотирозин-зв'язуючі домени (PTB) зв'язуються з *фосфорильованими залишками тирозину* у певній пептидній послідовності активованих рецепторів або внутрішньоклітинних сигнальних білків. Src-гомологічні домени типу 3 (SH3) зв'язуються з *короткими пролін-багатими* амінокислотними послідовностями. *Плекстрин-гомологічні* домени (PH), уперше описані для білка плекстрину із тромбоцитів, зв'язуються із зарядженими голівками специфічних *фосфорильованих інозитолових фосфоліпідів*, які утворюються у плазматичній мембрані у відповідь на позаклітинні сигнали. У такий спосіб ці домени дозволяють білкам, які їх містять, приєднуватися до мембрани і взаємодіяти з іншими рекрутованими сигнальними білками. Деякі сигнальні білки виконують роль адапторів, які сполучають разом два білки у сигнальному шляху, і вони складаються виключно із двох або більше доменів зв'язування.

Вважають, що деякі поверхневі рецептори і внутрішньоклітинні сигнальні білки тимчасово скупчуються у специфічних мікродоменах ліпідного бішару плазматичної мембрани, збагачених на холестерол і гліколіпіди. Частина білків скеровується до цих ліпідних скупчень за допомогою ковалентно приєднаних молекул ліпідів. Як і скефолд-білки, ці *ліпідні скефолди* можуть забезпечувати швидкість та ефективність сигнального процесу, утворюючи сайти збирання та взаємодії сигнальних молекул

1.3.2 Вплив концентрації позаклітинного сигналу на відповідь клітин

Деякі клітинні відповіді на зовнішні сигнали поступово зростають у простій пропорції з концентрацією молекули. Первинні відповіді на стероїдні гормони часто підлягають цьому правилу, очевидно тому, що ядерний білок-рецептор гормонів зв'язує одну молекулу гормону, а кожна специфічна послідовність упізнавання в гені, який відповідає на стероїдний гормон, діє незалежно. Коли концентрація гормону зростає, концентрація активованих комплексів рецептор-гормон збільшується пропорційно, так само, як число комплексів, зв'язаних із специфічними послідовностями упізнавання у генах відповіді. Отже, відповідь клітини є поступовою і лінійною.

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

В той же час багато відповідей на зовнішні сигнали починаються більш різко із ростом концентрації сигнальної молекули. Деякі із них можуть навіть відбуватися за типом все-або-нічого, коли відповідь не виявляється нижче порогової концентрації сигналу й одразу досягає максимуму при перевищенні цієї концентрації. Що може лежати у молекулярній основі таких різких (або навіть за типом перемикача) відповідей на сигнали, які зростають?

Одним із механізмів загострення відповіді є вимога: щоб індукувати відповідь, макромолекула-мішень повинна зв'язати більше, ніж одну внутрішньоклітинну ефекторну молекулу або комплекс. Наприклад, для активації генів при деяких відповідях, індукованих стероїдними гормонами, потрібне одночасне зв'язування більше, ніж одного активованого комплексу рецептор-гормон із специфічними регуляторними послідовностями у ДНК. У результаті, коли зростає концентрація гормону, активація гена починається більш раптово, ніж у випадку, якщо для активації достатньо одного зв'язаного комплексу. Подібний кооперативний механізм часто діє у сигнальних каскадах, які активуються рецепторами клітинної поверхні. Так щоб активувалась цАМФ-залежна протеїнкіназа, кожна її молекула повинна зв'язати чотири молекули низькомолекулярного внутрішньоклітинного медіатора циклічного АМФ. Такі відповіді стають більш раптовими із ростом числа молекул, що кооперативно зв'язуються, а якщо їх кількість стає достатньо великою, можуть бути досягненні відповіді, які наближаються до типу все-або-нічого.

Відповіді також стають більш різкими, коли внутрішньоклітинна сигнальна молекула активує один ензим і одночасно пригнічує інший, який каталізує зворотну реакцію. Добре дослідженим прикладом цього поширеного типу регуляції є стимуляція використання глікогену у клітинах скелетних м'язів, індукована гормоном адреналіном (епінефрином). Зв'язування адреналіну з поверхневим рецептором, сполученим із G-білком, призводить до росту внутрішньоклітинної концентрації циклічного АМФ, який одночасно активує ензим, що прискорює використання глікогену і пригнічує ензим, який каталізує його синтез.

Усі перелічені механізми можуть зумовлювати відповіді, які різко зростають, проте всеодно завжди згладжені відносно концентрації позаклітинної сигнальної молекули. Але існує інший механізм, який може зумовлювати справжні відповіді типу все-або-нічого, коли перевищення сигналом критичного порогового

рівня викликає раптове перемикання у клітині. В основі усіх надпорогових відповідей типу все-або-нічого переважно лежить позитивний зворотній зв'язок. Цей механізм використовують нервові й м'язові клітини для утворення потенціалів дії у відповідь на нейромедіатори.

Наприклад, активація у нервово-м'язовому з'єднанні ацетилхолінових рецепторів, сполучених з іонними каналами, викликає потік Na^+ всередину клітини, який локально деполяризує плазматичну мембрану м'яза. Це викликає відкривання потенціал-залежних Na^+-каналів у тій же ділянці мембрани і посилює потік Na^+, який ще більше деполяризує мембрану, а отже, відкриває ще більше Na^+-каналів. Якщо початкова деполяризація перевищує певну порогову величину, позитивний зворотній зв'язок викликає вибуховий ефект “втечі”, утворюючи потенціал дії, який поширюється на цілу м'язову мембрану.

Механізм позитивного зворотного зв'язку із прискоренням також може опосередковуватися сигнальними білками-ензимами, а не іонними каналами. Для прикладу, припустимо, що певний внутрішньоклітинний сигнальний ліганд активує низхідний у шляху ензим, а дві або більше молекули продукту ензимної реакції зв'язуються з тим самим ензимом, знову активуючи його. У такому випадку за відсутності ліганду існує дуже низький рівень синтезу продукту. Він повільно зростає із збільшенням концентрації ліганду, поки вона не досягне певного порогового рівня, коли синтезованого продукту стає досить для самодостатньої активації ензиму. Тоді концентрація продукту раптово й сильно зростає. За допомогою цих та інших, не обговорюваних тут механізмів, клітина часто перетворює поступову зміну концентрації сигнального ліганду у моментальне перемикання, утворюючи відповідь типу все-або-нічого.

1.3.3 Клітинна пам’ять ефектів деяких сигналів

У деяких випадках ефект позаклітинного ліганду на клітину-мішень може залишатися надовго після зникнення сигналу. Щойно описана ензимна система позитивного зворотного зв'язку із прискоренням є одним із механізмів, ефект якого залишається у такий спосіб. Якщо така система вмикається надпороговим підвищенням концентрації внутрішньоклітинного ліганду, переважно вона залишиться увімкненою навіть після зникнення цього сигналу. Замість

того щоб правдиво відображати поточний рівень сигналу, система відповіді виявляє ефект пам'яті. Специфічний приклад цього протеїнкіназа, яка після активації Ca^{2+} фосфорилює себе та інші білки. Автофосфорилювання підтримує кіназу активною довго після того, як рівень Ca^{2+} повертається до норми, запам'ятовуючи початковий сигнал.

Тимчасові позаклітинні сигнали часто індукують більш довготривалі зміни у клітинах під час розвитку багатоклітинного організму. Деякі з цих змін залишаються на все життя організму. Зазвичай вони залежать від самоактивуючих механізмів пам'яті, які діють нижче по ходу сигнального шляху, на рівні транскрипції генів. Наприклад, сигнали, які зумовлюють диференціацію м'язових клітин, вмикають набір м'язоспецифічних регуляторних білків, які стимулюють транскрипцію власних генів і генів багатьох інших м'язових білків. У такий спосіб рішенні клітини стати м'язовою стає постійним.

1.3.4 Шляхи регуляції клітинами чутливості до сигналу

У процесі відповіді на різноманітні стимули клітини здатні виявляти однакові відносні рівні зміни сигналу у дуже широкому діапазоні інтенсивностей. Для цього клітини-мішені повинні підлягати оборотному процесу адаптації або десенситизації, коли тривала дія стимулу послаблює відповідь клітини на такий його рівень. При передачі хімічних сигналів, адаптація дозволяє клітинам відповідати на зміни концентрації сигнального ліганду (а не її абсолютне значення) у дуже широкому діапазоні. Загальний принцип полягає у негативному зворотному зв'язку із затримкою. Як наслідок сильної реакції, апарат, відповідальний за її утворення, модифікується таким чином, що вимикає сам себе. Але завдяки затримці перед тим, як спрацює негативний зворотній зв'язок, раптова зміна стимулу може бути сприйнятою, як сильний сигнал.

Втрата чутливості до сигнальної молекули може відбуватися декількома шляхами. У них часто використовується фосфорилювання білка, призначеного для інактивації, хоча існують й інші типи модифікацій. У випадку бактерійного хемотаксису, втрата чутливості залежить від метилування рецепторного білка. Поширеними є таки шляхи як. секвестрація рецептора, негативна регуляція рецептора, інактивація рецептора, інактивація сигнального білка, утворення білка -

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

інгібітору.

Наприклад, зв'язування лігандів поверхневими рецепторами може індукувати ендоцитоз останніх і їх тимчасове замикання в ендосомах. Індукований лігандом ендоцитоз рецепторів може зумовлювати їхнє руйнування у лізосомах. Цей процес називається негативною регуляцією рецепторів. В інших випадках, втрата чутливості може бути викликана швидкою інактивацією рецепторів, наприклад у результаті їхнього фосфорилювання, яке з короткою затримкою супроводжує активацію. Також десенситізація може спричинятися змінами білків, задіяними у передачі сигналу або утворенням інгібітору, який блокує процес трансдукції.

2. Передача сигналів через сполучені з G-білками рецептори клітинної поверхні

2.1 Структура рецепторів, що сполучені з G-білками

Рецептори, сполучені з G-білками, утворюють найбільшу родину рецепторів клітинної поверхні і зустрічаються у всіх евкаріотів. У ссавців їх виявлено кілька тисяч, зокрема, у миші тільки за нюх відповідають близько 1000. Рецептори, сполучені із G-білками, опосередковують відповідь на надзвичайно різноманітні сигнальні молекули, включно з гормонами, нейромедіаторами і локальними медіаторами. За структурою ці сигнальні молекули настільки ж різноманітні, як і за функцією: до їх списку належать білки і малі пептиди, а також похідні амінокислот і жирних кислот. Один і той самий ліганд може активувати багато різних представників родини рецепторів. Для прикладу, адреналін активує принаймні 9 окремих рецепторів, сполучених із G-білками, ацетилхолін — більше 5, і нейромедіатор серотонін — не менше 15.

Незважаючи на хімічне та функціональне різноманіття сигнальних молекул, які із ними зв'язуються, усі рецептори, сполучені з G-білками, подібні за структурою. Вони утворені одним поліпептидним ланцюгом, який, загортаючись, пронизує ліпідний бішар сім разів, і тому часом їх називають серпантинними рецепторами (рис. 12). Крім характерної орієнтації у плазматичній мембрані, вони володіють однаковим функціональним взаємозв'язком із G-білками, необхідними для передачі сигналів усередину клітини про наявність позаклітинного ліганду.

До надродини семипрохідних трансмембранних білків належить *родопсин* з ока хребетних, який активується світлом, а також велика

кількість нюхових рецепторів у носі хребетних. Інші представники цієї родини зустрічаються в одноклітинних організмів, наприклад, рецептори, які упізнають секретовані фактори спарювання у дріжджів. Фактично вважають, що сполучені з G-білками рецептори, які зумовлюють міжклітинну передачу сигналів у багатоклітинних організмів, еволюційне походять від сенсорних рецепторів їхніх одноклітинних евкаріотичних предків.

Важливо, що близько половини усіх відомих лікарських препаратів діють на сполучені з G-білками рецептори.

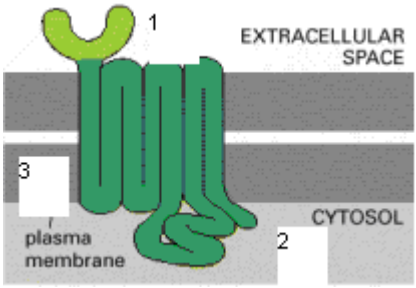


Рис. 12 – Рецептор, сполучений з G -білком.

Рецептори, які зв'язують білкові ліганди, мають великий позаклітинний домен, утворений частиною поліпептидного ланцюга, показаною *світло-зеленим* кольором. Цей домен, разом із деякими трансмембранними сегментами, зв'язує білковий ліганд. Рецептори малих лігандів, таких як адреналін, мають невеликі позаклітинні домени, і ліганд переважно зв'язується глибоко у площині мембрани у сайті, утвореному амінокислотами кількох трансмембранних сегментів.

[1– позаклітинний простір, 2 – цитозоль, 3 – плазматична мембрана].

2.2 Структура тримерних G-білків. Особливості активації

Коли позаклітинні сигнальні молекули зв'язуються із серпантинними рецепторами, в останніх відбувається конформаційна зміна, яка дозволяє їм активувати тримерні GTP-зв'язуючі білки (G-білки). G-білки приєднані до цитоплазматичного боку плазматичної

мембрани і виконують роль *молекул-передавачів*, які функціонально *сполучають рецептори з мембранними ензимами або іонними каналами*. Існують різні типи G-білків, яки специфічні до різних серпантинних рецепторів і певних наборів білків-мішеней у плазматичній мембрані. Але, усі вони подібні за структурою і працюють схоже.

G-білки складаються із трьох субодиниць — <alpha>, <beta> і <gamma> (рис. 13)

Рис. 13 – Структура G-білка

У нестимульованому стані <alpha>-субодиниця зв'язує GDP і G-білок є неактивним. Обидві субодиниці <alpha> і <gamma> містять ковалентно приєднані молекули ліпідів *(червоні),* які допомагають їм зв'язуватися із плазматичною мембраною, а <alpha>-субодиниця ще містить зв'язаний GDP

Після стимуляції активованим рецептором, <alpha>-субодиниця вивільняє зв'язаний GDP, місце якого тепер може зайняти GTP. Цей обмін спричиняє дисоціацію тримера на два активовані компоненти — *<alpha>-субодиницю* і *<beta><gamma>-комплекс.*

Ці два компоненти активуються різними шляхами після дисоціації тримерного G-білка. Зв'язування GTP спричиняє конформаційну зміну, яка впливає на поверхню <alpha>-субодиниці, асоційованої у тримері із <beta><gamma>-комплексом. Ця зміна зумовлює вивільнення останнього, але також надає <alpha>-субодиниці нової форми, яка дозволяє їй взаємодіяти з білками-мішенями; <beta><gamma>-комплекс не змінює своєї конформації, але частина його поверхні, раніше маскована <alpha>-субодиницею, стає доступною для взаємодії з іншим набором білків. *Мішенями дисоційованих компонентів G-білка є ензими або іонні канали плазматичної мембрани, які передають сигнал да*лі. <Alpha>-субодиниця володіє функцією GTPази і після того, як гідролізує GTP до GDP, вона реасоціює із <beta><gamma>-комплексом, відновлюючи неактивний G-білок і обертаючи процес активації (рис. 14). Час, впродовж якого <alpha>-субодиниця і <beta><gamma>-комплекс залишаються відокремленими і активними, переважно невеликий і залежить від

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

швидкості гідролізу зв'язаного Gтр<alpha>субодиницею. Виділена <alpha>-субодиниця є неефективною GTPазою і сама по собі інактивується лише за декілька хвилин. Зазвичай її інактивація проходить набагато швидше завдяки зв'язуванню іншого білка, в ролі якого може виступати білок-мішень або спеціальний білок-модулятор — *регулятор передачі сигналів G-білком (RGS).* RGS-білки виконують функцію специфічних до <alpha>- субодиниці *білків-активаторів GTPази (GAPs)* і вважається, що вони відіграють життєво важливу роль у завершенні відповідей, опосередкованих G-білками, у всіх евкаріотів. Геном людини кодує близько 25 RGS-білків, кожен із яких взаємодіє з певним набором G-білків.

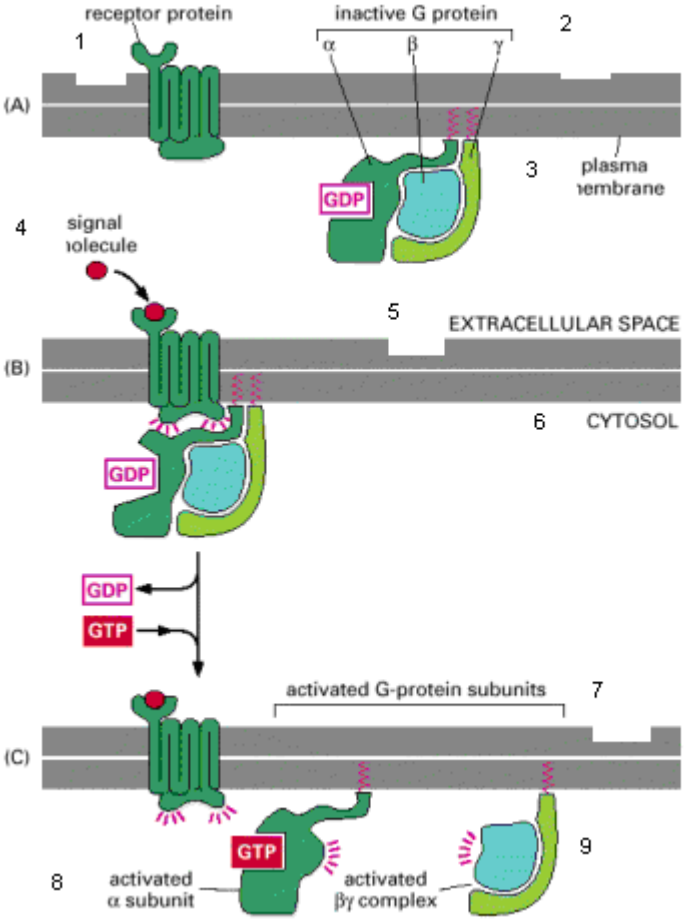


Рис. – 14 Розпад активованого G - білка на два сигнальних компонента. (А) У нестимульованому стані, рецептор і G - білок обидва є неактивними. Вони можуть бути як окремі об'єкти на плазматичній мембрані, а у деяких випадках асоційовані у попередньо утвореному комплексі. (Б) Зв'язування позаклітинного сигналу із рецептором змінює конформацію останнього, що у свою чергу впливає на конформацію G -білка, зв'язаного з рецептором. Після цього G - білок розпадається на два активні компоненти — <alpha>-субодиницю і <beta><gamma>-комплекс, які можуть регулювати

активність білків-мішеней на плазматичній мембрані. Рецептор залишається активним, поки зв'язана позаклітинна сигнальна молекула і тому може каталізувати активацію багатьох молекул G -білка.
[1 – рецепторний білок; 2 неактивний G –білок; 3 –плазматична мембрана; 4 – сигнальна молекула; 5 – позаклітинний простір; 6 – цитозоль; 7 – активовані субодиниці G –білка; 8 – активована <alpha>-субодиниця; 9 – активований <beta><gamma>-комплекс].

У таблиці 1 надано різноманіття <альфа> субодиниць у G-білках та їхні функції

Таблиця 1. Три основні родини тримерних G-білків

Родина	Деякі представники	Дія опосередковується	Функції
I	G_s	<alpha>	активує аденілілциклазу; активує Ca^{2+}-канали
	G_{olf}	<alpha>	активує аденілілциклазу в нюхових сенсорних нейронах
II	G_i	<alpha>	пригнічує аденілілциклазу
		<beta><gamma>	активує K^+-канали
	G_o	<beta><gamma>	активує K^+-канали; інактивує Ca^{2+}-канали
		<alpha> і <beta><gamma>	активує фосфоліпазу C-<beta>

	G_t (трансдуцин)	<alpha>	активує фосфодиестеразу циклічного GMP у фоторецепторах-паличках хребетних
III	G_q	<alpha>	активує фосфоліпазу C-<beta>
* Належність до родини визначається спорідненістю амінокислотних послідовностей <alpha>-субодиниць. Показані лише вибрані приклади. У ссавців описано близько 20 <alpha>-субодиниць та принаймні 4 <beta>-субодиниці і 7 <gamma>-субодиниць.			

2.3 Ефекторні молекули G-білків

2.3.1 Аденілатциклаза. цАМФ-залежний сигнальний шлях

Аденілілциклаза є великим багатопрохідним трансмембранним білком із каталітичним доменом на цитозольному боці плазматичної мембрани. У ссавців існує близько восьми ізоформ, більшість із яких регулюються G-білками і Ca^{2+}.

Субстрат ферменту АТФ. Активована аденілілциклаза каталізує утворення з АТФ циклічного АТФ й пірофосфату (рис.15).

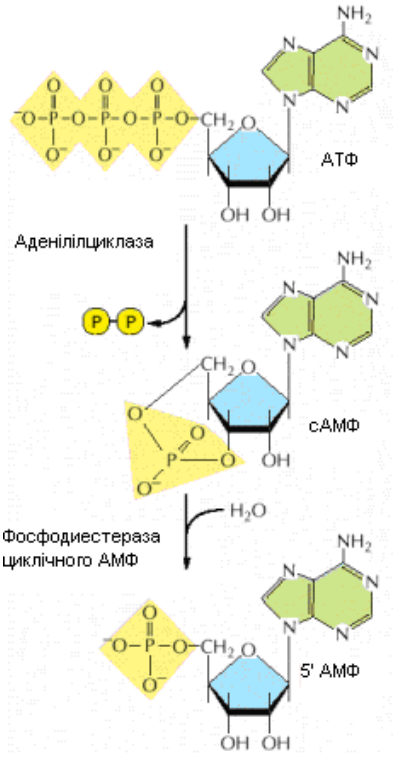


Рис. 15. – Синтез та деградація циклічного АМФ**.**

Синтез циклічного АМФ (сАМФ) каталізується ензимом аденілатциклазою. У цій реакції він синтезується шляхом циклізації з АТР, при цьому усуваються дві фосфатні групи у формі пірофосфату (Ф–Ф). Енергію для синтезу дає пірофосфатаза, яка гідролізує вивільнений пірофосфат до фосфату. Циклічний АМФ у клітині нестабільний, оскільки сам гідролізується специфічною фосфодиестеразою з утворенням 5'-AMP

Усі рецептори, які діють через циклічний АМФ, сполучені із стимулюючим G-білком (G_S), який активує аденілілциклазу й у такий спосіб збільшує концентрацію циклічного АМФ. Інший, інгібіторний G-білок (G_i), пригнічує аденілілциклазу, але він в основному діє шляхом прямої регуляції іонних каналів, а не знижуючи вміст циклічного АМФ. Хоча за регулювання циклази зазвичай відповідає <alpha>-субодиниця, часом у цьому задіяний і <beta><gamma>-комплекс, який може посилювати або знижувати активність ензиму, залежно від власного типу та ізоформи циклази.

Як G_S, так і G_i є мішенями для деяких важливих для медицини бактерійних токсинів. *Холерний токсин,* який утворює бактерія-збудник холери, є ензимом, що каталізує перенесення A DP-рибози з внутрішньоклітинного NAD^+ на <alpha>-субодиницю G_S. ADP-рибозилювання змінює <alpha>-субодиницю так, що вона більше не може гідролізувати зв'язаний GTP і залишається в активному стані, який нескінченно стимулює аденілілциклазу. В результаті рівні циклічного АМФ всередині клітин кишкового епітелію підвищуються

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

й спричиняють посилений витік Cl – і води в кишечник, що викликає важку діарею, характерну для холери. *Токсин коклюшу* з бактерії-збудника цього захворювання каталізує ADP-рибозилювання <alpha>-субодиниці G_i, запобігаючи її взаємодії із рецепторами. В результаті, <alpha>-субодиниця зберігає зв'язаний GDP і не може регулювати свої білки-мішені. Ці два токсини широко використовуються, як засоби для визначення того, якою із субодиниць опосередковується відповідь клітини на сигнал (G_S чи G_i).

Деякі з реакцій, зумовлених стимульованим G_S ростом концентрації циклічного АМФ, перелічені у табл. 1. Зрозуміло, що різні типи клітин по-різному відповідають на підвищення концентрації цАМФ, а будь-який певний тип клітин переважно відповідає на нього однаково, навіть якщо це збільшення індукується різними позаклітинними сигналами. Аденілілциклаза жирових клітин, для прикладу, активується принаймні чотирма гормонами і всі вони стимулюють розпад тригліцеридів (запасної форми жирів) до жирних кислот.

2.3.1.1 Циклічний АМФ (цАМФ)

Нормальна концентрація циклічного АМФ всередині клітини складає близько 10^{-7} М, але позаклітинний сигнал може викликати її росту більше, ніж у двадцять разів за кілька секунд. Така швидка відповідь вимагає, щоб швидкий синтез молекули був збалансованим її швидким руйнуванням або усуненням. Фактично, цАМФ синтезується з АТР зв'язаним із плазматичною мембраною білком аденілатциклазою **і** швидко й постійно руйнується однією або кількома фосфодиестеразами циклічного АМФ, які гідролізують циклічний АМФ до аденозин-5'-монофосфату (5'-АМФ).

Багато позаклітинних сигналів діють, збільшуючи вміст у клітині циклічного АМФ за допомогою посилення активності аденілатциклази, але не послаблюючи активність фосфодиестерази.

Багато позаклітинних сигналів діють, збільшуючи вміст у клітині циклічного АМФ за допомогою посилення активності аденілатциклази, але не послаблюючи активність фосфодиестерази. Аденілілциклаза є великим багатопрохідним трансмембранним білком із каталітичним доменом на цитозольному боці плазматичної мембрани. У ссавців існує близько восьми ізоформ, більшість із яких регулюються G-білками і Ca^{2+}. Усі рецептори, які діють через циклічний АМФ, сполучені із стимулюючим G-білком (G_S), який активує аденілілциклазу й у такий спосіб збільшує концентрацію циклічного АМФ. Інший, інгібіторний G-білок (G_i), пригнічує аденілілциклазу, але він в основному діє шляхом прямої регуляції іонних каналів (це ми обговоримо згодом), а не знижуючи вміст циклічного АМФ. Хоча за регулювання циклази зазвичай відповідає <alpha>-субодиниця, часом у цьому задіяний і <beta><gamma>-комплекс, який може посилювати або знижувати активність ензиму, залежно від власного типу та ізоформи циклази.

Як G_S, так і G_i є мішенями для деяких важливих для медицини бактерійних токсинів. *Холерний токсин,* який утворює бактерія-збудник холери, є ензимом, що каталізує перенесення A DP-рибози з внутрішньоклітинного NAD^+ на <alpha>-субодиницю G_S. ADP-рибозилювання змінює <alpha>-субодиницю так, що вона більше не може гідролізувати зв'язаний GTP і залишається в активному стані, який нескінченно стимулює аденілілциклазу. В результаті рівні циклічного АМФ всередині клітин кишкового епітелію підвищуються й спричиняють посилений витік Cl – і води в кишечник, що викликає важку діарею, характерну для холери. *Токсин коклюшу* з

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

бактерії-збудника цього захворювання каталізує АДФ-рибозилювання <alpha>-субодиниці G_i, запобігаючи її взаємодії із рецепторами. В результаті, <alpha>-субодиниця зберігає зв'язаний GDP і не може регулювати свої білки-мішені. Ці два токсини широко використовуються, як засоби для визначення того, якою із субодиниць опосередковується відповідь клітини на сигнал (G_S чи G_i).

Деякі з реакцій, зумовлених стимульованим G_S ростом концентрації циклічного АМФ, перелічені у табл. 2. Зрозуміло, що різні типи клітин по-різному відповідають на підвищення концентрації цАМФ, а будь-який певний тип клітин переважно відповідає на нього однаково, навіть якщо це збільшення індукується різними позаклітинними сигналами. Аденілілциклаза жирових клітин, для прикладу, активується принаймні чотирма гормонами і всі вони стимулюють розпад тригліцеридів (запасної форми жирів) до жирних кислот.

Таблиця 2 – Деякі з індукованих гормонами клітинних реакцій, опосередкованих циклічним АМФ.

Тканина-мішень	Гормон	Основна відповідь
Щитоподібна залоза	тироїд-стимулюючий гормон (TSH)	синтез та секреція тироїдного гормону
Кора наднирників	адренокортикотропний гормон (ACTH)	секреція кортизолу
Яєчники	лютеінізуючий гормон (LH)	секреція прогестерону
М'язи	адреналін	розпад глікогену
Кістки	паратгормон	розрідження кісток
Серце	адреналін	збільшення частоти та сили серцевих скорочень
Печінка	глюкагон	розпад глікогену
Нирки	вазопресин	резорбція води
Жирова тканини	адреналін, ACTH, глюкагон, TSH	розпад тригліцеридів

Особи з генетичними дефектами певних <alpha>-субодиниць

G_S-білків виявляють послаблені відповіді на певні гормони. Як наслідок, у них відбуваються метаболічні аномалії, ненормальний розвиток кісток і розумова відсталість.

2.3.1.2 Протеїнкіназа А – цАМФ-залежна протеїнкіназа А (ПКА)

Циклічний АМФ може прямо активувати певні типи іонних каналів у плазматичній мембрані деяких високоспеціалізованих клітин, але у більшості тваринних клітин його ефекти обумовлені, головним чином, активацією цАМФ-залежної протеїнкінази (РКА). Цей ензим каталізує вибіркове перенесення термінальної фосфатної групи із АТР на ОН-групи серину або треоніну білків-мішеней, регулюючи у такий спосіб їхню активність.

РКА зустрічається у всіх тваринних клітинах і відповідає, як вважають, за ефекти циклічного АМФ у більшості з них. Субстрати РКА різняться залежно від типу клітин, що пояснює таку помітну різницю в ефектах, які для них виявляє циклічний АМФ.

У неактивному стані РКА утворена комплексом двох каталітичних і двох регуляторних субодиниць

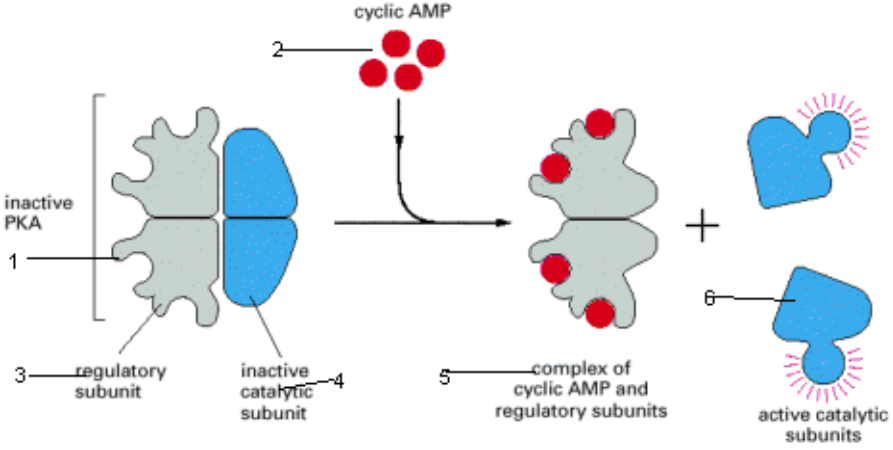


Рис. 16 – Активація сАМФ - залежної протеїнкінази.
[1 – неактивна РКА; 2 – циклічний АМФ; 3 – регуляторна субодиниця; 4 – неактивна каталітична субодиниця; 5 – комплекс циклічного АМФ із регуляторними субодиницями; 6 – активні каталітичні субодиниці].

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Зв'язування циклічного АМФ із регуляторними субодиницями викликає зміну їхньої конформації й дисоціацію від комплексу. Вивільнені каталітичні субодиниці активуються й можуть фосфорилювати молекули специфічних білків-субстратів (рис. 16). Регуляторні субодиниці РКА також важливі для локалізації кінази всередині клітини. Спеціальні *білки, що заякорюють РКА* одночасно зв'язуються з ними і мембраною або компонентом цитоскелету, таким чином прив'язуючи ензимний комплекс до певного субклітинного компартменту. Деякі з білків-якорів також зв'язують інші кінази і фосфатази, утворюючи сигнальний комплекс.

2.3.2 Фосфоліпаза С. Інозитолфосфоліпідний та диацилгліцерол залежний сигнальний шлях

2.3.2.1 Фосфоліпаза С

Багато сполучених із G-білками рецепторів виявляють свої ефекти, головним чином, через G-білки, які активують зв'язаний із плазматичною мембраною ензим фосфоліпазу С-<beta>. Деякі відповіді, які активуються таким шляхом, перелічені у таблиці 3.

Таблиця 3 – Відомі клітинні відповіді, у яких сполучені із G-білками рецептори активують інозитолфосфоліпідний сигнальний шлях.

Тканина-мішень	Сигнальна молекула	Основна відповідь
Печінка	вазопресин	розпад глікогену
Підшлункова залоза	ацетилхолін	секреція амілази
Гладенькі м'язи	ацетилхолін	скорочення
Тромбоцити	тромбін	агрегація

Фосфоліпаза діє на інозитолфосфоліпід (фосфоінозитид), який називається фосфатіділінозитол-4,5-біфосфатом [PI(4,5)P2] і в невеликих кількостях міститься у внутрішній частині ліпідного бішару плазматичної мембрани. Рецептори, які діють за допомогою цього інозитолфосфоліпідного сигнального шляху, головним чином, активують G-білок G_q, який у свою чергу активує фосфоліпазу

C-<beta>, дуже подібно до того, як G_S активує аденілілциклазу. Активована фосфоліпаза розщеплює $PI(4,5)P_2$ з утворення двох продуктів: інозитол-1,4,5-трифосфату і диацилгліцеролу. На цьому кроці сигнальний шлях розгалужується на дві гілки (рис.17).

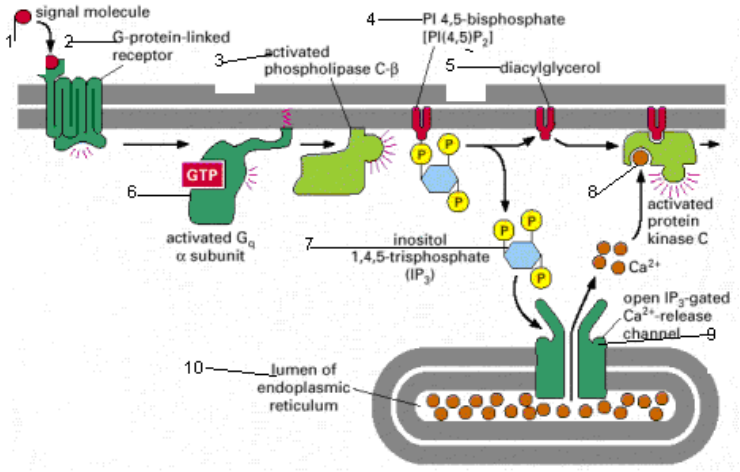


Рис. 17 – Дві гілки інозитолфосфоліпідного шляху.

Активований рецептор стимулює ензим, зв'язаний із плазматичною мембраною — фосфоліпазу C-<beta> через G -білок. Залежно від ізоформи ензиму, він може активуватися <alpha>-субодиницею G_q, як показано, <beta><gamma>-комплексом іншого G -білка, або обома. При гідролізі PI (4,5) P_2 активованою фосфоліпазою C-<beta> утворюються два внутрішньоклітинні медіатори. Інозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3), який дифундує через цитозоль і вивільняє Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму, зв'язуючись з IP 3 - залежними Ca^{2+} -каналами, розташованими у ній, і відкриваючи їх. Значний електрохімічний градієнт Ca^{2+} спричиняє витікання Ca^{2+} через мембрану у цитозоль. Диацилгліцерол залишається у плазматичній мембрані і, разом із фосфатиділсерином і Ca^{2+} активує протеїнкіназу C. Вона переміщається з цитозолю до цитозольного боку плазматичної мембрани. Із 11 або більше різних ізоформ PKC у ссавців принаймні 4 активуються диацилгліцеролом.

[1 – сигнальна молекула; 2 – рецептор, сполучений із G –білком; 3 – активована фосфоліпаза С -<beta>; 4 – PI-4,5-біфосфат [PI (4,5)P_2]; 5 – диацилгліцерол; 6 – активована <alpha>-субодиниця G_q; 7 – іноситол-1,4,5-трифосфат (IP_3); 8 – активована протеїнкіназа С; 9 – відкритий IP_3-залежний Ca^{2+} - канал; 10 – цистерна ендоплазматичного ретикулуму].

2.3.2.2 Іноситол-1,4,5-трифосфат (IP_3) – другий посередник

Іноситол-1,4,5-трифосфат (IP_3) — це мала водорозчинна молекула, яка після утворення у плазматичній мембрані швидко дифундує у цитозоль. Досягнувши ендоплазматичного ретикулуму (ER), IP3 зв'язується з IP3-залежними каналами вивільнення Ca^{2+} у мембрані ER і відкриває їх. Ca^{2+}, який зберігається в ER, вивільняється через відкриті канали, швидко збільшуючи свою концентрацію у цитозолі (рис. 19). Щоб припинити початкову відповідь на Ca^{2+}, діють кілька механізмів:

1) IP_3 швидко дефосфорилюється до IP2 специфічними фосфатазами;

2) IP_3 фосфорилюється до IP4, який може виконувати роль іншого внутрішньоклітинного медіатора;

3) Ca^{2+}, який потрапив у цитозоль, швидко викачується з нього, переважно назовні клітини.

2.3.2.3 Диацилгліцерол (ДАГ) – другий посередник. Протеїнкіназа С

У той час, як IP_3, утворений у результаті гідролізу PI(4,5)P_2, збільшує концентрацію Ca^{2+} у цитозолі, інший продукт розщеплення — диацилгліцерол, виявляє інші ефекти. Диацилгліцерол залишається зануреним у мембрану, де виконує дві потенційні ролі у передачі сигналів. По-перше, він може далі розщеплюватися з утворенням арахідонової кислоти, яка сама по собі може бути месенджером або може використовуватися для синтезу інших низькомолекулярних ліпідних месенджерів — ейкозаноїдів. Ейкозаноїди, наприклад, простагландини, утворюються у більшості типів клітин хребетних і володіють широким рядом біологічних активностей. Зокрема, вони беруть участь у больових та запальних реакціях, і більшість

протизапальних препаратів (наприклад, аспірин, ібупрофен і кортизон) діють, принаймні, частково, шляхом пригнічення синтезу простагландинів.

Другою і більш важливою функцією диацилгліцеролу є активація важливої серин/треонінової протеїнкінази С (РКС), назва якої вказує на залежність від Ca^{2+}. Початкове росту концентрації Ca^{2+} у цитозолі, індуковане IP_3, змінює РКС так, що вона транслокується з цитозолю на цитоплазматичну сторону плазматичної мембрани. Там вона активується комбінацією Ca^{2+}, диацилгліцеролу і негативно зарядженого мембранного фосфоліпіду фосфатидилсерину (рис. 17). Активована РКС фосфорилює білки-мішені, які різняться залежно від типу клітини. Принципи цього такі ж самі, як і для РКА, хоча білки-мішені у них різняться.

2.3.2.4 Ca^{2+} – повсюдний внутрішньоклітинний месенджер.

2.3.2.4.1 Шляхи регуляції рівня Ca^{2+} у цитоплазмі

Багато позаклітинних сигналів індукують росту рівня Ca^{2+} у цитозолі, і не лише ті, які діють через G-білки. Концентрація Ca^{2+} у цитозолі в нормі залишається дуже низькою ($\sim 10^{-7}$M), а у позаклітинній рідині ($\sim 10^{-3}$M) та цистернах ER — високою. Отже, існує сильний градієнт із тенденцією до переміщення Ca^{2+} у цитозоль через плазматичну мембрану й мембрану ER. При тимчасовому відкриванні Ca^{2+}-каналів у якійсь із цих мембран, відбувається сильний потік Ca^{2+} у цитозоль і росту його локальної концентрації у 10-20 разів, яке активує Ca^{2+}- залежні білки у клітині.

Передачу сигналів за допомогою Ca^{2+} опосередковують три основні типи каналів:

- Потенціалзалежні Ca^{2+}-канали у плазматичній мембрані, які відкриваються у відповідь на деполяризацію мембрани і дозволяють вхід Ca^{2+} у активовані нервові закінчення й запуск секреції нейромедіаторів.
- IP_3-залежні канали вивільнення Ca^{2+} дозволяють вихід Ca^{2+} із ER при активації інозитолфосфоліпідного сигнального шляху у щойно обговорений спосіб.

- Раянодинові рецептори (назва походить від їхньої чутливості до рослинного алкалоїду раянодина) реагують на зміни потенціалу плазматичної мембрани і вивільняють Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму, стимулюючи скорочення м'язових клітин. Вони також містяться в ER багатьох інших клітин, зокрема, нейронів, де можуть виконувати функцію передачі сигналів за допомогою Ca^{2+}.

Концентрація Ca^{2+} у цитозолі спочиваючих клітин утримується на низькому рівні за допомогою кількох механізмів. Найбільш помітною є Ca^{2+}- помпа, яка міститься у плазматичній мембрані усіх евкаріотичних клітин і використовує енергію гідролізу АТР для викачування Ca^{2+} із цитозолю. Такі клітини, як м'язові і нервові, містять у плазматичній мембрані додатковий білок для транспорту Ca^{2+} (антипортер), який сполучає витік Ca^{2+} із потоком Na^{+} всередину. Ca^{2+}-помпа у мембрані ER також виконує важливу роль в утриманні концентрації Ca^{2+} у цитозолі на низькому рівні. Вона дозволяє переміщення великих кількостей Ca^{2+} в ER із цитозолю проти крутого градієнту концентрації, навіть, якщо рівень Ca^{2+} у цитозолі низький. Крім цього, Ca^{2+}-помпа у внутрішній мітохондріальній мембрані, яка володіє низькою афінністю і високою місткістю, виконує важливу роль для повернення концентрації Ca^{2+} до норми після сигналу. Для переміщення Ca^{2+} із цитозолю вона використовує електрохімічний градієнт, утворений по боках цієї мембрани під час кроків перенесення електронів при окисному фосфорилюванні.

Чутливі до Ca^{2+} флуоресцентні індикатори, зокрема, екворин або fura-2, часто використовуються для спостереження за рівнем Ca^{2+} у цитозолі окремих клітин після активації інозитолфосфоліпідного сигнального шляху. Під час такого спостереження, початковий Ca^{2+}-сигнал часто виглядає маленьким і локалізованим в одному або кількох дискретних ділянках клітини. Ці сигнали називають Ca^{2+}-*спалахами* і вважають, що вони відображають місцеве відкривання окремих (або невеликих груп) каналів вивільнення Ca^{2+} із ER і відповідають елементарної одиниці кальцієвої сигналізації. Якщо позаклітинний стимул достатньо сильний та стійкий, локалізований

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

сигнал може поширюватися через цитозоль, як регенеративна хвиля Ca^{2+}, подібно до потенціалу дії в аксоні. Такий Ca^{2+}- пік зазвичай супроводжується серією наступних піків, кожен із яких зазвичай триває кілька секунд. Осциляції Ca^{2+} тривають настільки довго, наскільки поверхневі рецептори залишаються активованими.

У деяких випадках, залежна від частоти відповідь сама по собі є осциляторною. Наприклад, стимуляція позаклітинним сигналом клітин гіпофіза, які секретують гормони, індукує повторні піки Ca^{2+}, кожен із яких асоціюється з вибухом секреції гормонів. Залежна від частоти відповідь також може бути не осциляторною. Наприклад, у деяких типах клітин одна частота піків Ca^{2+} активує транскрипцію одного набору генів, а інша, вища — іншого. Як клітини відчувають частоту піків Ca^{2+} і відповідно змінюють свою реакцію? Механізм, Частота Ca^{2+}- осциляцій відображає силу позаклітинного стимулу і може перетворюватися у залежну від частоти клітинну відповідь імовірно, залежить від Ca^{2+}-чутливих білків, які змінюють свою активність у залежності від частоти піків Ca^{2+}. Цією визначною властивістю володіє описана нижче протеїнкіназа, яка виконує роль молекулярного запам'ятовуючого пристрою.

2.3.2.4.2 Білки цитоплазми клітин, що зв’язують Ca^{2+}

Ca^{2+}-зв'язуючі білки виконують роль передавачів Ca^{2+}-сигналів у цитозолі. Першим із відкритих білків такого типу був тропонін С із клітин скелетних м'язів. Близькоспоріднений Ca^{2+}- зв’язуючий білок кальмодулін міститься у всіх евкаріотичних клітинах, де він може складати близько 1% загальної маси білків. Кальмодулін функціонує, як багатоцілевий Ca^{2+}-рецептор, який опосередковує численні процеси, що регулюються Ca^{2+}. Він утворений висококонсервативним одинарним поліпептидним ланцюгом із чотирма високоафінними сайтами зв'язування Ca^{2+} (рис.18).

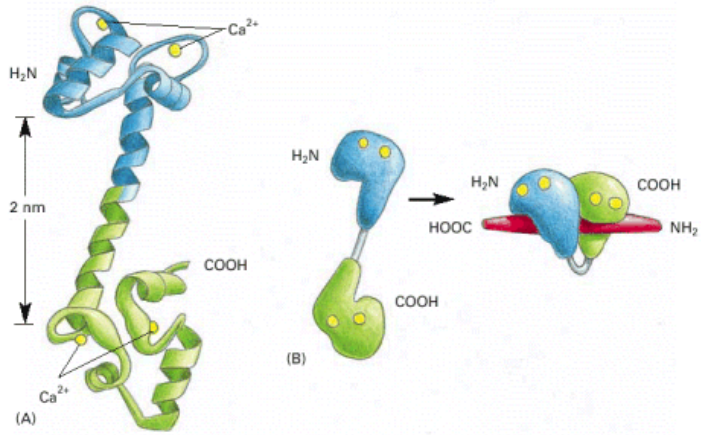


Рис. 18 – Структура Ca^{2+}/кальмодуліну.

(А) Молекула має форму гантелі із двома глобулярними кінцями, сполученими довгою відкритою <alpha>-спіраллю. Кожен із кінців має два Ca^{2+}-зв'язуючі домени із петлями по 12 амінокислот у яких бічні ланцюги аспарагінової і глутамінової кислот утворюють іонні зв'язки із Ca^{2+}. Два сайти зв'язування Ca^{2+} у С-кінцевій частині молекули мають у десять разів більшу афінність до Ca^{2+}, ніж сайти у N -кінцевій. У розчині ця молекула гнучка і набуває різних форм, від видовжених (показана) до більш компактних. (Б) Основна структурна зміна у Ca^{2+}/кальмодуліні відбувається при його зв'язуванні із білками-мішенями (у цьому прикладі, із пептидом, що містить Ca^{2+}/кальмодулін-зв'язуючий домен Ca^{2+} /кальмодулін-залежної протеїнкінази): Ca^{2+}/кальмодулін “склався”, щоб оточити пептид [1 нм]Після активації внаслідок зв'язування Ca^{2+}, кальмодулін підлягає конформаційній зміні. Оскільки для набуття активної конформації необхідне зв'язування двох або більше іонів Ca^{2+}, відповідь білка на збільшення концентрації Ca^{2+} відбувається за типом перемикача (рис. 10). Так, росту концентрації Ca^{2+} у десять разів зазвичай викликає посилення активації кальмодуліну у п'ятдесят разів.

У деяких випадках, кальмодулін виконує роль постійної регуляторної субодиниці ензимного комплексу, але переважно

приєднання Ca^{2+} дозволяє йому зв'язуватися з різними білками-мішенями у клітині, регулюючи їхню активність.

Коли активована молекула Ca^{2+}/кальмодуліну зв'язується зі своїм білком-мішенню, із нею відбувається помітна конформаційна зміна (рис. 18Б). До мішеней, регульованих зв'язуванням кальмодуліну, належать багато ензимів та мембранних транспортних білків. Ca^{2+}/кальмодулін, наприклад, зв'язує і активує мембранну помпу, яка викачує Ca^{2+} із клітини. Тому, якщо концентрація Ca^{2+} у цитозолі зростає, помпа активується і рівень Ca^{2+} повертається до норми.

2.3.2.4..3 Ca^{2+}/кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaM-кінази)

У той же час, більшість ефектів Ca^{2+} є не настільки прямими і здійснюються за участю білкових фосфорилювань, які каталізуються родиною Ca^{2+}/кальмодулін-залежних протеїнкіназ (CaM-кіназ). Подібно до PKA і PKC, вони фосфорилюють серини або треоніни у білках, а відповідь клітини-мішені так само залежить від набору присутніх у клітині білків-мішеней, регульованих CaM-кіназами. Першими з відкритих CaM-кіназ були кіназа легкого ланцюга міозину, яка активує скорочення гладеньких м'язів і кіназа фосфорилази, яка активує розпад глікогену. Вони володіють вузькою специфічністю до субстрату, хоча багато CaM-кіназ мають набагато ширше коло специфічності і, очевидно, відповідають за здійснення багатьох ефектів Ca^{2+} у клітинах тварин. Деякі з них фосфорилюють білки-регулятори генів, наприклад, обговорений раніше білок CREB, і у такий спосіб активують або пригнічують транскрипцію специфічних генів.

Найкраще вивченим прикладом такої багатофункціональної CaM-кінази є CaM-кіназа II, яка зустрічається у всіх тваринних клітинах, але особливо поширена у нервовій системі (рис. 19). У деяких ділянках мозку вона складає до 2% усієї білкової маси і досягає у синапсах високої концентрації. CaM-кіназа II має принаймні дві визначних властивості, споріднені між собою. По-перше, вона може функціонувати, як молекулярний запам'ятовуючий пристрій, перемикаючись в активний стан після взаємодії з Ca^{2+}/кальмодуліном і залишаючись активною навіть після зникнення Ca^{2+}-сигналу. Це відбувається тому, що кіназа, активована Ca^{2+}/кальмодуліном,

фосфорилює не тільки інші клітинні білки, але й сама себе (автофосфорилювання). В автофосфорильованому стані, ензим залишається активним навіть за відсутності Ca^{2+}, продовжуючи у такий спосіб кіназну активність набагато довше за початковий Ca^{2+}-сигнал активації. Активність підтримується, поки фосфатази не переможуть автофосфорилюючу активність ензиму і не

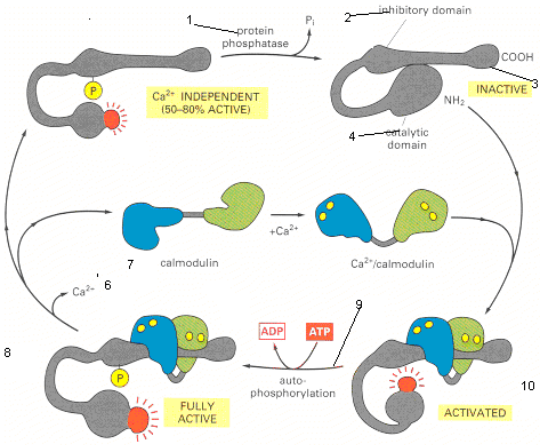


Рис. 19 – Активація CaM-кінази II.

Цей ензим утворений великим білковим комплексом із близько 12 субодиниць (відображено лише одна) Субодиниці належать до чотирьох гомологічних типів (<alpha>, <beta>, <gamma> і <sigma>), які експресуються у різних пропорціях у різних типах клітин. За відсутності Ca^{2+}/кальмодуліна ензим є неактивним, оскільки інгібіторний домен взаємодіє з каталітичним. Зв'язування Ca^{2+}/кальмодуліну змінює конформацію білка, дозволяючи каталітичному домену фосфорилювати інгібіторний домен сусідніх субодиниць комплексу, а також інших білків у клітині (не показані). Автофосфорилювання ензимного комплексу (шляхом взаємного фосфорилювання субодиниць) продовжує активність ензиму двома шляхами. По-перше, воно вловлює зв'язаний Ca^{2+}/кальмодулін так, що він не дисоціює із комплексу, поки рівні Ca^{2+} у цитозолі не повернуться до базальних принаймні на 10 секунд (не показані). По-друге, ензим переходить у Ca^{2+}- незалежну форму, тому кіназа залишається активною навіть після дисоціації Ca^{2+}/кальмодуліну. Активність зберігається, поки процес автофосфорилювання не переважиться протеїнфосфатазою.

[1 – протеїнфосфатаза; 2 – інгібіторний домен; 3 – неактивний; 4 – каталітичний домен; 5 – Ca^{2+}- незалежний (50-80% активності); 6 – кальмодулін; 7 – Ca^{2+}/кальмодулін;
8 – повністю активний; 9 – автофосфорилювання; 10 – активований].

вимкнуть її. У такий спосіб, активація СаМ-кінази II може виконувати функцію пам'яті про попередній пульс Ca^{2+} і, очевидно, відіграє важливу роль для деяких типів пам'яті та навчання у нервовій системі хребетних.

Алостерична активація кальмодуліну Ca^{2+} аналогічна алостеричній активації РКА циклічним АМФ, за винятком того, що Ca^{2+}/кальмодулін сам не володіє ензимною активністю, але діє, зв'язуючись з іншими білками. У деяких випадках, кальмодулін виконує роль постійної регуляторної субодиниці ензимного комплексу, але переважно приєднання Ca^{2+} дозволяє йому зв'язуватися з різними білками-мішенями у клітині, регулюючи їхню активність.

Коли активована молекула Ca^{2+}/кальмодуліну зв'язується зі своїм білком-мішенню, із нею відбувається помітна конформаційна зміна (рис. 19Б). До мішеней, регульованих зв'язуванням кальмодуліну, належать багато ензимів та мембранних транспортних білків. Ca^{2+}/кальмодулін, наприклад, зв'язує і активує мембранну помпу, яка викачує Ca^{2+} із клітини. Тому, якщо концентрація Ca^{2+} у цитозолі зростає, помпа активується і рівень Ca^{2+} повертається до норми.

Щоправда, більшість ефектів Ca^{2+} є не настільки прямими і здійснюються за участю білкових фосфорилювань, які каталізуються родиною Ca^{2+}/кальмодулін-залежних протеїнкіназ (СаМ-кіназ). Подібно до РКА і РКС, вони фосфорилюють серини або треоніни у білках, а відповідь клітини-мішені так само залежить від набору присутніх у клітині білків-мішеней, регульованих СаМ-кіназами. Першими з відкритих СаМ-кіназ були кіназа легкого ланцюга міозину, яка активує скорочення гладеньких м'язів і кіназа фосфорилази, яка активує розпад глікогену. Вони володіють вузькою специфічністю до субстрату, хоча багато СаМ-кіназ мають набагато ширше коло специфічності і, очевидно, відповідають за здійснення багатьох ефектів Ca^{2+} у клітинах тварин. Деякі з них фосфорилюють білки-регулятори генів, наприклад, обговорений раніше білок CREB, і у такий спосіб

активують або пригнічують транскрипцію специфічних генів.

Найкраще вивченим прикладом такої багатофункціональної СаМ-кінази є СаМ-кіназа II, яка зустрічається у всіх тваринних клітинах, але особливо поширена у нервовій системі. У деяких ділянках мозку вона складає до 2% усієї білкової маси і досягає у синапсах високої концентрації. СаМ-кіназа II має принаймні дві визначних властивості, споріднені між собою. По-перше, вона може функціонувати, як молекулярний запам'ятовуючий пристрій, перемикаючись в активний стан після взаємодії з Ca^{2+}/кальмодуліном і залишаючись активною навіть після зникнення Ca^{2+}-сигналу. Це відбувається тому, що кіназа, активована Ca^{2+}/кальмодуліном, фосфорилює не тільки інші клітинні білки, але й сама себе (автофосфорилювання). В автофосфорильованому стані, ензим залишається активним навіть за відсутності Ca^{2+}, продовжуючи у такий спосіб кіназну активність набагато довше за початковий Ca^{2+}-сигнал активації. Активність підтримується, поки фосфатази не переможуть автофосфорилюючу активність ензиму і не вимкнуть її. У такий спосіб, активація СаМ-кінази II може виконувати функцію пам'яті про попередній пульс Ca^{2+} і, очевидно, відіграє важливу роль для деяких типів пам'яті та навчання у нервовій системі хребетних. Миші, мутантні по специфічній для мозку субодиниці мають специфічні дефекти у здатності запам'ятовувати просторове розташування речей. Точкова мутація у гені СаМ-кінази II, яка усуває її сайт автофосфорилювання, але зберігає інші активності кінази цілісними, викликає той самий дефект навчання, що вказує на життєву важливість автофосфорилювання для цих тварин.

2.3.3 Безпосередня регуляція іонних каналів деякими G-білками

G-білки діють, не виключно регулюючи активність мембранозв'язаних ензимів, які змінюють концентрацію циклічного АМФ, інозитол 3 фосфату, ДАГ або Ca^{2+} у цитозолі.

У деяких випадках G-білки безпосередньо активують або інактивують іонні канали у плазматичній мембрані клітин-мішеней, змінюючи їхню проникність для іонів, а отже, і збудливість мембрани. Наприклад, ацетилхолін, який вивільняється блукаючим нервом, зменшує як частоту, так і силу серцевих скорочень. Цей ефект опосередковується окремим класом ацетилхолінових рецепторів, які

активують G_i. Активована <alpha>-субодиниця Gi пригнічує аденілілциклазу, а <beta><gamma>-комплекс зв'язується з K^+-каналами у плазматичній мембрані клітин серцевого м'яза і відкриває їх. Відкривання K^+-каналів ускладнює деполяризацію клітин і зумовлює інгібіторний ефект ацетилхоліну на серце. Ці рецептори, які можуть інактивуватися грибним алкалоїдом мускарином, називають мускариновими рецепторами ацетилхоліну, щоб відрізнити їх від зовсім інших нікотинових рецепторів ацетилхоліну — вони сполучені з іонними каналами у клітинах скелетних м'язів і нервів та можуть інактивуватися зв'язуванням нікотину і ацетилхоліну.

Інші тримерні G-білки регулюють активність іонних каналів менш прямо, стимулюючи їх фосфорилювання (наприклад, за допомогою РКА, РКС або CaM-кінази) або, спричиняючи утворення або руйнування циклічних нуклеотидів, які безпосередньо активують або інактивують іонні канали. Залежні від циклічних нуклеотидів іонні канали відіграють невід'ємну роль у сприйнятті запахів та зорі.

2.3.4 Загальні властивості сигнальних систем, яки приводяться в дію сполученними з G-білками рецепторами

Незважаючи на відмінності у молекулярних подробицях, сигнальні системи, які приводяться в дію сполученими з G-білками рецепторами, поділяють деякі риси і керуються подібними загальними принципами. Вони залежать від ланцюгів передачі, утворених внутрішньоклітинними сигнальними білками і малими внутрішньоклітинними медіаторами. Ці ланцюги передачі забезпечують численні можливості для посилення відповідей на позаклітинні сигнали.

Так, коли позаклітинна сигнальна молекула зв'язується із рецептором, який непрямо активує аденілілциклазу за допомогою G_S, один рецептор може активувати багато молекул G_S-білка, кожна з яких може активувати молекулу циклази. Кожна молекула циклази, у свою чергу, може каталізувати перетворення великого числа молекул АТР у циклічний АМФ. Подібний механізм посилення діє у інозитолфосфоліпідному шляху. У такий спосіб наномолярна (10^{-9}М) зміна концентрації позаклітинного сигналу може індукувати мікромолярні (10^{-6}М) зміни концентрації малого внутрішньоклітинного медіатора, наприклад, циклічного АМФ або Ca^{2+}. Оскільки ці медіатори діють, як алостеричні ефектори, які

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

активують специфічні ензими або іонні канали, то одна позаклітинна сигнальна молекула може спричинити зміну багатьох тисяч білкових молекул всередині клітини-мішені.

Будь-який каскад підсилення стимулюючих сигналів потребує наявності врівноважуючих механізмів на кожному його кроці, які відновлюють систему до спочиваючого стану після припинення стимуляції. Для цього клітини володіють ефективними механізмами швидкого руйнування (і ресинтезу) циклічних нуклеотидів, забуферення і усунення Ca^{2+} в цитозолі, а також інактивації ензимів відповіді та іонних каналів після їхньої активації. Це необхідно не тільки для припинення відповіді, але й також для визначення неактивного стану, із якого починається відповідь. Як ми побачили раніше, у загальному відповідь на стимул може бути швидкою лише тоді, коли механізми інактивації також швидкі. Кожен білок у ланцюгу передачі сигналів може бути окремою мішенню для регуляції, включно з рецепторами.

2.3.4 Загальні властивості сигнальних систем, яки приводяться в дію сполученними з G-білками рецепторами

У кожному з випадків, процес втрати чутливості залежить від фосфорилювання рецептора, за участю РКА, РКС, або представника родини кіназ сполучених із G-білками рецепторів (GRKs).

Існують три основні шляхи втрати чутливості цими рецепторами. Вони можуть:

зазнавати таких змін, що більше не можуть взаємодіяти з G-білками (інактивація рецепторів).

тимчасово переміщатися всередину клітини (інтерналізуватися), тому більше не доступні для ліганду (секвестрація рецепторів).

руйнуватися в лізосомах після інтерналізації (негативна регуляція рецепторів

2.3.5 Заключення відповідно рецепторів, що сполучені з G-білками

Рецептори, сполучені із G-білками можуть опосередковувати активацію або інактивацію ензимів, зв'язаних із плазматичною мембраною або іонних каналів, за участю G-білків. При стимуляції активованим рецептором, G-білок розпадається на <alpha>-субодиницю і <beta><gamma>-комплекс, які обидва можуть безпосередньо регулювати активність білків-мішеней у плазматичній мембрані. Деякі із сполучених із G-білками рецепторів активують або інактивують аденілілциклазу, змінюючи у такий спосіб внутрішньоклітинну концентрацію медіатора — циклічного АМФ. Інші активують фосфоінозитид-специфічну фосфоліпазу С (фосфоліпазу С-<beta>), яка гідролізує фосфатиділінозитол-4,5-біфосфат [PI(4,5)P_2] з утворенням двох низькомолекулярних внутрішньоклітинних медіаторів. Один із них — інозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3), який вивільняє Ca^{2+} із ER і збільшує його концентрацію в цитозолі. Інших — диацилгліцерол, який залишається в плазматичній мембрані і активує протеїнкіназу С (РКС). Зростання рівня cAMP або Ca^{2+} впливає на клітини, головним чином, стимулюючи протеїнкіназу А (РКА) і Ca^{2+}/кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaM-кінази), відповідно.

РКС, РКА і CaM-кінази фосфорилюють специфічні білки-мішені по серинах і треонінах і у такий спосіб впливають на їхню

активність. Кожен із типів клітин містить специфічні набори білків-мішеней, які регулюються у такий спосіб, дозволяючи клітинам формувати свою власну виразну відповідь на малі внутрішньоклітинні медіатори. Внутрішньоклітинні сигнальні каскади, які активуються сполученими із G-білками рецепторами, дозволяють потужне посилення реакцій, тому для кожної молекули позаклітинного сигнального ліганду, зв'язаної з рецептором, змінюються багато білків-мішеней.

Відповіді, опосередковані рецепторами, сполученими з G-білками, швидко припиняються при зникненні позаклітинного сигнального ліганду. Отже, <alpha>-субодиниця G-білка після індукції інактивує сама себе, гідролізуючи зв'язаний GTP до GDP, IP_3 швидко дефосфорилюється фосфатазою (або фосфорилюється кіназою), циклічні нуклеотиди гідролізуються фосфодиестеразами, Ca^{2+} швидко викачується із цитозолю, а фосфорильовані білки дефосфорилюються протеїнфосфатазами. Самі активовані рецептори фосфорилюються GRKs, що викликає зв'язування арестину, який від'єднує рецептори від G-білків і прискорює їх ендоцитоз.

3 Передача сигналів через рецептори клітинної поверхні, сполучені з ензимами

3.1 Загальні властивості рецепторів, сполучених з ензимами

Вперше цей тип рецепторів виявили за участю у відповідях на позаклітинні сигнальні білки, що прискорюють ріст, проліферацію, диференціацію або виживання клітин у тканинах тварин. Ці сигнальні білки часто відносять до збірної групи факторів росту і переважно вони діють, як локальні медіатори, у дуже низьких концентраціях (близько 10^{-9}–10^{-11}М). Відповіді на них найчастіше повільні (порядку годин) і потребують багатьох внутрішньоклітинних етапів передачі сигналів, які нарешті призводять до змін в експресії генів. Згодом виявилось, що рецептори, сполучені з ензимами, також опосередковують прямі і швидкі взаємодії з цитоскелетом, контролюючи пересування та зміну форми клітиною. Позаклітинні сигнали, які викликають такі швидкі реакції, часто не дифундують, але зв'язані з поверхнею, по якій переповзає клітина. Розлади у проліферації, диференціації, виживанні *та міграції клітин — це фундаментальні події, які можуть призводити до раку, і основну роль у цих різновидах захворювань відіграють саме аномалії у передачі сигналів через сполучені з*

ензимами рецептори.

Подібно до сполучених із G-білками рецепторів, сполучені з ензимами рецептори — це трансмембранні білки, ліганд-зв'язуючий домен яких знаходиться на зовнішній поверхні плазматичної мембрани. Але, замість асоціації з тримерним G-білком, їхній цитозольний *домен володіє власною ензимною активністю, або безпосередньо асоційований з ензимом*. Якщо сполучені із G-білками рецептори мають сім трансмембранних сегментів, то кожна із субодиниць сполученого з ензимом рецептора — переважно має один.

3.2 Класи сполучених з ензимами рецепторів

Досі ідентифіковано шість класів рецепторів, сполучених з ензимами:

1) рецепторні тирозинкінази фосфорилюють невелику групу внутрішньоклітинних сигнальних білків по специфічних залишках тирозину;
2) рецептори, асоційовані з тирозинкіназами, пов'язані з внутрішньоклітинними білками, що володіють тирозинкіназною активністю;
3) рецептор-подібні тирозинфосфатази усувають фосфатні групи із залишків тирозину специфічних внутрішньоклітинних сигнальних білків. (їх називають “рецептор-подібними”, оскільки ймовірні ліганди поки що не були ідентифіковані, і безпосередньо продемонструвати рецепторну функцію білків не вдалося);
4) рецепторні серин/треонінкінази фосфорилюють асоційовані латентні білки-регулятори генів по специфічних залишках серину або треоніну;
5) рецепторні гуанілілциклази безпосередньо каталізують утворення циклічного GMP у цитозолі;
6) рецептори, асоційовані з гістидинкіназами, активують “двокомпонентні” сигнальні шляхи, у яких кіназа фосфорилює сама себе по залишках гістидину і після цього безпосередньо переносить фосфат на другий внутрішньоклітинний сигнальний білок.

3.2.1 Рецепторні тирозинкінази. Сигнальні молекули. Структура рецепторів, сигнальні шляхи, що ініціюють рецепторні тирозинкінази. Сигнальні шляхи, що залежать від тирозинкінази

Найчисленнішій клас сполучених з ензимами рецепторів.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Активовані рецепторні тирозинкінази фосфорилюють самі себе.

До позаклітинних сигнальних білків, які діють за допомогою рецепторних тирозинкіназ, належить широке розмаїття секретованих факторів росту і гормонів. Це епідермальний фактор росту (EGF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), фактори росту фібробластів (FGFs), фактор росту гепатоцитів (HGF), інсулін, інсуліноподібний фактор росту 1 типу (IGF-1), фактор росту судинного ендотелію (VEGF), колоніестимулюючий фактор макрофагів (M-CSF) і всі нейротрофіни, зокрема, фактор росту нервів (NGF).

Багато зв'язаних із клітинною поверхнею сигнальних білків також діють за допомогою цих рецепторів. Найбільшим класом цих мембранозв'язаних лігандів є ефрини, які регулюють реакції клітинної адгезії та відштовхування, що керують міграцією клітин та аксонів у специфічних напрямках під час розвитку тварин. Рецептори ефринів — Eph-рецептори — найчисленніші серед рецепторних тирозинкіназ. Ефрини та Eph-рецептори незвичайні з тієї точки зору, що можуть одночасно діяти, як ліганд і рецептор. Після зв'язування з Eph-рецептором деякі ефрини не тільки активують його, але й самі активуються для передачі сигналів усередину ефрин-експресуючої клітини. У такий спосіб, взаємодія між білком-ефрином однієї клітини і Eph-білком іншої може призвести до двобічної передачі сигналу, яка змінює поведінку обох клітин. Така двонаправлена сигналізація між ефринами та Eph-рецепторами необхідна, зокрема, для того, щоб утримати клітини у певних частинах мозку, який розвивається, і не дозволити їм змішуватися із клітинами сусідніх ділянок.

За структурою рецепторні тирозинкінази можна поділити на більше, ніж 16 підродин, кожна з яких належіть до власної родини білкових лігандів. Кілька з таких родин, які працюють у ссавців, показані на рис. 20.

У кожному з випадків, зв'язування сигнального білка з позаклітинним ліганд-зв'язуючим доменом активує внутрішньоклітинний тирозинкіназний домен. При активації, останній переносить фосфатну групу з АТФ на певні тирозинові бічні ланцюги, як на самому рецепторі, так і на внутрішньоклітинних сигнальних білках, які згодом зв'язуються з фосфорильованим рецептором.

У випадку сполучених з ензимами рецепторів, два або більше ланцюги зближуються у мембрані, утворюючи димер або олігомер вищого порядку. У деяких випадках, олігомеризацію індукує зв'язування ліганду. В інших, вона відбувається ще до зв'язування, а

ліганд викликає лише переорієнтацію трансмембранних ланцюгів рецепторів.

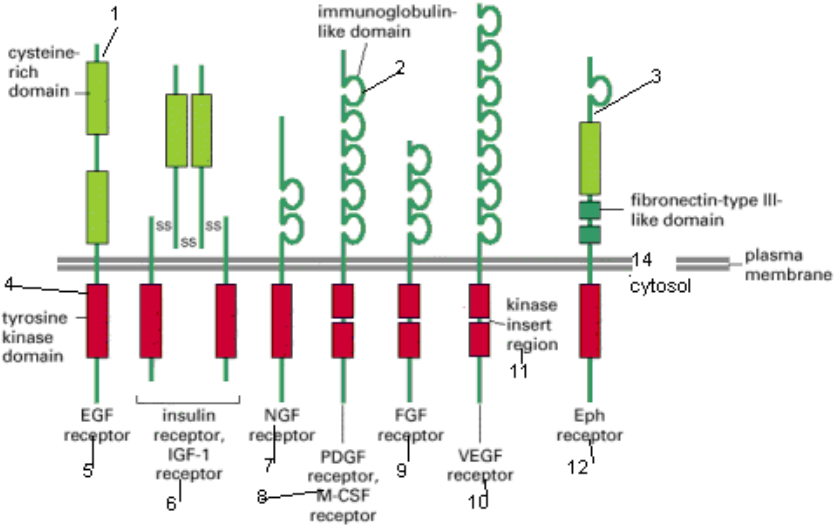


Рис. 20 – Сім підродин рецепторних тирозинкіназ.

[1 – цистеїн-багатий домен; 2 – імуноглобулін-подібний домен; 3 – фібронектин III типу-подібний домен; 4 – тирозинкіназний домен; 5 – рецептор EGF; 6 – рецептори інсуліну і IGF -1; 7 – рецептор NGF; 8 – рецептор PDGF і M – CSF; 9 – рецептор FGF; 10 – рецептор VEGF; 11 – ділянка-вставка кінази; 12 – рецептор Eph; 13 –цитозоль; 14 –плазматична мембрана].

Ліганди та функції цих родин (рис. 21) частково перелічені в таблиці 4.

Таблиця 4 – Деякі із сигнальних білків, які діють за участю рецепторних тирозинкіназ

Сигнальний ліганд	Рецептори	Деякі реакції
Епідермальний фактор росту (EGF)	рецептор EGF	стимулює проліферацію різних типів клітин
Інсулін	рецептор інсуліну	стимулює утилізацію вуглеводів і синтез

		білків
Інсуліноподібні фактори росту (IGF-1 та IGF-2)	рецептор IGF типу 1	стимулює ріст та виживання клітин
Фактор росту нервів (NGF)	TrkA	стимулює виживання та ріст деяких нейронів
Тромбоцитарні фактори росту (PDGF AA, BB, AB)	рецептори PDGF типу <alpha> і <beta>	стимулюють виживання, ріст та проліферацію різних типів клітин
Колонієстимулюючий фактор макрофагів (M-CSF)	рецептор M-CSF	стимулює проліферацію та диференціацію моноцитів/макрофагів
Фактори росту фібробластів (FGF-1 та FGF-24)	рецептори FGR (FGF-R 1– FGF-R 4 і множинні ізоформи кожного)	стимулюють проліферацію різних типів клітин; пригнічують диференціацію деяких клітин-попередників; індуктивні сигнали під час розвитку
Фактор росту судинного ендотелію (VEGF)	рецептор VEGF	стимулює ангіогенез
Ефрини (типи A і B)	Eph-рецептори (типів A і B)	стимулюють ангіогенез; скеровують міграцію клітин та аксонів

У кожному випадку, індукована переорієнтація цитозольних хвостів рецепторів ініціює внутрішньоклітинний процес передачі сигналів. У випадку рецепторних тирозинкіназ, перебудова дозволяє сусіднім кіназним доменам рецепторних ланцюгів перехресно фосфорилювати один одного по множинним тирозинам. Цей процес

називають автофосфорилюванням.

Зазвичай, щоб активувати рецепторну тирозинкіназу, ліганд повинен одночасно зв'язатися із двома сусідніми ланцюгами рецепторів. Для прикладу, PDGF є димером, який об'єднує разом два рецептори (рис. 21). Навіть деякі мономерні ліганди, зокрема, EGF, зв'язуються одночасно із двома рецепторами і безпосередньо сполучають їх. Натомість, також мономерні FGFs спершу

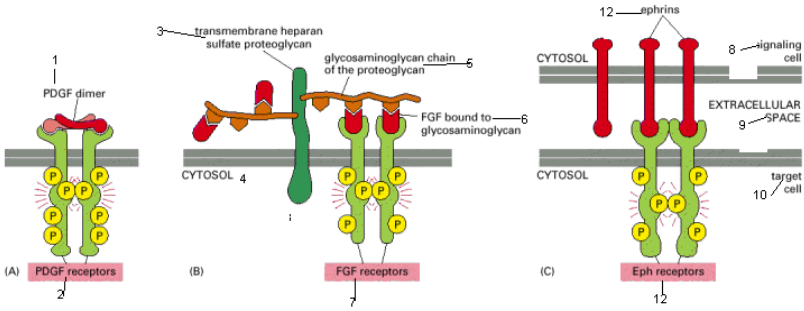


Рис. 21 – Три шляхи перехресного сполучення ланцюгів рецепторів сигнальними білками

мультимеризуються, зв'язуючись із гепарансульфатними протеогліканами, на поверхні клітини-мішені або у позаклітинному матриксу. У такий спосіб, вони можуть перехресно сполучати два сусідні рецептори (рис. 21 Б). При контакт-залежній сигналізації, ліганди утворюють кластери у плазматичній мембрані сигнальної клітини і так можуть перехресно сполучати рецептори клітини-мішені (рис. 21 В). Тому, якщо мембранозв'язані ефрини активують Eph-рецептори, розчинні ефрини виконають свою функцію лише в агрегованому стані.

Коли ланцюги рецепторів перехресно сполучаються, кіназні домени сусідніх рецепторів перехресно фосфорилюють один одного, стимулюючи кіназну активність рецепторів і створюючи сайти приєднання для внутрішньоклітинних білків. (А) Тромбоцитарний фактор росту (PDGF) — ковалентно з'єднаний димер, із двома рецептор-зв'язуючими сайтами, тому він може безпосередньо сполучати сусідні рецептори, ініціюючи внутрішньоклітинний

сигнальний процес. Димери PDGF утворені різними комбінаціями А- і В-ланцюгів і можуть активувати різні поєднання двох типів рецепторних ланцюгів PDGF (< alpha > і < beta >), які дещо різняться за сигнальними властивостями. (Б) Деякі мономерні ліганди, наприклад, фактори росту фібробластів (FGFs), кластерно зв'язуються із протеогліканами, після чого сполучають свої рецептори. Протеоглікани можуть міститися у позаклітинному матриксу, або, як тут показано, на поверхні клітини. Існує більше 20 типів FGFs і більше 4 типів рецепторів FGF. (В) Мембранозв'язані сигнальні білки, наприклад, ефрини, можуть перехресно сполучати свої рецептори, хоча є мономерами, оскільки утворюють кластери у плазматичній мембрані сигнальної клітини. Деякі ефрини (типу В) є трансмембранними білками (як показано), у той час, як інші (типу А), сполучені із мембраною за допомогою глікозилфосфотидилінозитолового (GPI) якоря. Переважно, ефрини типу А активують Eph -рецептори типу А, і ефрини типу В — рецептори типу В.

[1– димер PDGF; 2 – рецептори PDGF; 3 – трансмембранний гепарансульфатний протеоглікан; 4 – цитозоль; 5 – глікозаміноглікановий ланцюг протеоглікану; 6 – FGF, зв'язаний із глікозаміногліканом; 7 – рецептори FGF; 8 – сигнальна клітина; 9 – позаклітинний простір; 10 – клітина-мішень; 11 – Eph –рецептори; 12 – ефрини].

Автофосфорилювання цитозольних хвостів рецепторних тирозинкіназ сприяє процесу активації двома шляхами. По-перше, фосфорилювання тирозинів, які входять до кіназного домену, посилює кіназну активність ензиму. По-друге, фосфорилювання тирозинів за межами кіназного домену, створює високоафінні сайти приєднання для зв'язування багатьох внутрішньоклітинних сигнальних білків у клітині-мішені. Кожен із типів сигнальних білків зв'язується з іншим фосфорильованим сайтом активованого рецептора завдяки наявності специфічного фосфотирозинзв'язуючого домену, який крім фосфотирозину впізнає певні риси в оточенні поліпептидного ланцюга. Після зв'язування з активованою кіназою, сигнальний білок сам може фосфорилюватися по тирозинах і активуватися; в інших випадках, для активації приєднаного сигнального білка може бути достатньо самого зв'язування. *В загальному, автофосфорилювання виконує роль перемикача, який запускає тимчасове збирання великого внутрішньоклітинного сигнального комплексу,* який передає сигнали

по багатьох шляхах до численних точок призначення у клітині (рис. 22).

Оскільки різні тирозинкінази зв'язують різні поєднання цих сигнальних білків, вони викликають різні відповіді.

Рецептори для інсуліну та IGF-1 діють дещо інакше. Вони із самого початку існують у вигляді тетрамерів (рис. 21), і зв'язування ліганду, імовірно, індукує переорієнтацію трансмембранних ланцюгів рецепторів, так, що два кіназні домени зближуються. Більшість фосфотирозинових сайтів приєднання, утворених внаслідок зв'язування ліганду, містяться не на самому рецепторі, а на спеціалізованому білку-приєднувачі — субстраті інсулінового рецептора типу 1 (IRS-1). Активований рецептор спочатку автофосфорилює свої кіназні домени, потім вони фосфорилюють IRS-1 по множинних тирозинах, формуючи набагато більше сайтів приєднання, ніж могло б розміститися на самому рецепторі. Інші білки-приєднувачі використовуються подібним чином іншими рецепторними тирозинкіназами для збільшення розміру сигнального комплексу.

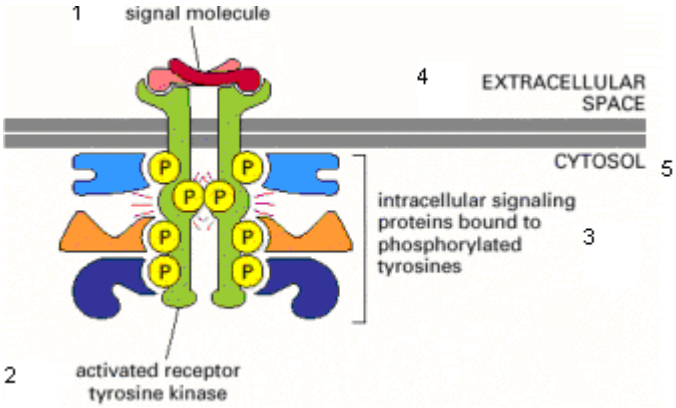


Рис. 22. – Приєднання внутрішньоклітинних сигнальних білків до активованої рецепторної тирозинкінази**.**

Активований рецептор і зв'язані з ним сигнальні білки можуть утворити сигнальний комплекс, який передає сигнали по множинним сигнальним шляхам.

[1 – сигнальна молекула; 2 – активована рецепторна тирозинкіназа; 3 – внутрішньоклітинні сигнальні білки, зв'язані із фосфорильованими

тирозинами; 4 – позаклітинний простір; 5 – цитозоль].

3.2.1.1 Фосфорильовані тирозини виконують роль сайтів приєднання для білків із SH 2-доменами

Цілий апарат внутрішньоклітинних сигнальних білків може зв'язуватися з фосфотирозинами на активованих рецепторних тирозинкіназах (або на спеціальних білках-приєднувачах, як IRS-1), допомагаючи передавати сигнал далі. Деякі з приєднаних білків є ензимами, наприклад, фосфоліпаза C-<gamma> (PLC-<gamma>), яка функціонує так само, як фосфоліпаза C-<beta> — активує інозитолфосфоліпідний сигнальних шлях, обговорений раніше у зв'язку зі сполученими з G-білками рецепторами. Через цей шлях, рецепторні тирозинкінази можуть збільшувати рівень Ca^{2+} у цитозолі. Набагато частіше, ці рецептори використовують передавальні ланцюги на основі білок-білкових взаємодій. Іншим прикладом ензиму, який приєднується до них, є цитоплазматична тирозинкіназа Src, яка фосфорилює інші сигнальні білки по залишках тирозину. Ще один приклад — фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI-3-кіназа), яка утворює специфічні ліпідні молекули у плазматичній мембрані, які приваблюють туди інші сигнальні білки.

Хоча внутрішньоклітинні сигнальні білки, які зв'язуються із залишками фосфотирозину на активованих рецепторних тирозинкіназах і білках-приєднувачах, різняться за структурою та функціями, переважно вони поділяють висококонсервативні фосфотирозин-зв'язуючі домени. Це або SH2-домени (від Src homology region — ділянка гомології до Src), вперше виявлені в білку Src, або, не так часто, PTB-домени (від phosphotyrosine-binding — фосфотирозин-зв'язуючі). Упізнаючи специфічні фосфорильовані тирозини, ці невеликі домени виконують роль модулів, які дозволяють білкам зв'язуватися з активованими тирозинкіназами, а також з багатьма іншими внутрішньоклітинними сигнальними білками, які тимчасово фосфорильовані по тирозинах (рис. 23). Багато сигнальних білків містять також інші модулі, які дозволяють їм специфічно взаємодіяти з іншими білками у процесі передачі сигналів. До них належить SH3-домен (також вперше відкритий у Src), який зв'язується з пролін-багатими мотивами у внутрішньоклітинних білках.

Не усі білки, які зв'язуються з активованими рецепторними тирозинкіназами за допомогою SH2-доменів, допомагають подальшій

передачі сигналу. Функція деяких із них — *послаблення сигнального процесу через негативний зворотній зв'язок.* Одним із прикладів є білок c-Cbl, який може приєднуватися до певних активованих рецепторів і каталізувати їхню кон'югацію з убіквітином. Убіквітинування викликає інтерналізацію і деградацію рецепторів — процес, який носить назву негативної регуляції рецепторів (рис. 12).

Деякі сигнальні білки складаються майже виключно з SH2 і SH3-доменів і функціонують у ролі адапторів, які сполучають фосфорильовані по тирозину білки з іншими білками, які не мають власних SH2-доменів. Адапторні білки допомагають сполучати активовані рецептори з важливим сигнальним білком Ras, розташованим у низхідній частині шляху. Ras виконує роль білка, яки перетворює і розгалужує сигнали, змінюючи їхню природу і передаючи їх по багатьох шляхах, включно *з головним сигнальним шляхом, який стимулює клітини до проліферації або диференціації.*

Мутації, які активують цей шлях, тобто стимулюють неадекватний поділ клітин, є причиною багатьох різновидів раку.

3.2.1.2 Білки Ras

Ras - білки належать до великої Ras - надродини мономерних GTPаз. До цієї родини також належать чотири інші підродини: родина Rho, задіяна у передачі сигналів від рецепторів клітинної поверхні до актинового цитоскелету та інших ділянок. і родина Rab, яка регулює переміщення внутрішньоклітинних транспортних міхурців.

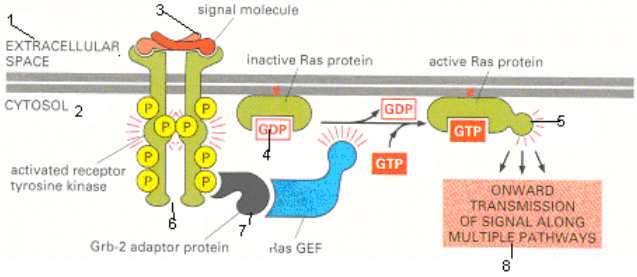


Рис. 23 Активація Ras активованою рецепторною тирозинкіназою.

Адапторний білок Grb-2 зв'язується зі специфічним фосфотирозином

рецептора і з фактором обміну гуанінових нуклеотидів (GEF), який стимулює обмін GDP, зв'язаного Ras, на GDP. Активований Ras активує кілька сигнальних шляхів.
[1 – позаклітинний простір; 2 – цитозоль; 3 – сигнальна молекула; 4 - неактивний білок Ras; 5 - активний білок Ras; 6 – активована рецепторна тирозинкіназа; 7 – адапторний білок Grb-2; 8 – подальша передача сигналу по багатьох шляхах]

Як і майже всі мономерні GTPази, Ras-білки містять ковалентно приєднану ліпідну групу, яка допомагає утримувати білок на цитозольній стороні плазматичної мембрани, де функціонує білок. Існує багато різних Ras -білків, які працюють у різних типах клітин. Оскільки механізм їхньої дії, очевидно, однаковий, то називають їх просто Ras.

Ras допомагає передавати сигнали від поверхні клітини до інших її частин. Для прикладу, він часто необхідний для передачі від рецепторної тирозинкінази до ядра сигналу, який стимулює проліферацію або диференціацію, змінюючи експресію генів. рецепторами клітинної поверхні. Фактично, Ras був вперше відкритий, як гіперактивний продукт мутантного гена ras, який викликав розвиток раку. Тепер ми знаємо, що близько 30% випадків раку у людини спричиняються гіперактивною мутацією ras.

Як і інші GTP-зв’язуючи білки, *Ras функціонує, як перемикач,* переходячи між двома відмінними конформаційними станами — активним із зв'язаним GTP і неактивним із зв'язаним GDP (рис. 11). *Активність Ras регулюється* двома класами сигнальних білків, які впливають на його перехід між активним та неактивним станами. Фактори обміну гуанінових нуклеотидів (GEFs) прискорюють обмін зв'язаного нуклеотиду, стимулюючи дисоціацію GDP і наступне поглинання GTP із цитозолю, активуючи Ras. GTPазоактивуючі білки (GAPs) збільшують швидкість гідролізу зв'язаного GTP білком Ras, інактивуючи його (рис. 32). Гіперактивні мутантні форми Ras стійкі до GAP-опосередкованої стимуляції GTPази, постійно залишаються у активному стані зі зв'язаним GTP і внаслідок цього спричиняють розвиток раку.

У принципі, рецепторні тирозинкінази можуть активувати Ras, активуючи GEF або інактивуючи GAP. Хоча деякі GAPs і зв'язуються безпосередньо (за допомогою своїх SH2-доменів) з активованими рецепторними тирозинкіназами (рис. 24), а GEFs — лише непрямим

шляхом, саме непряме сполучення GEF із рецептором відповідає за приведення Ras в активний стан. Фактично, втрата функції Ras - специфічним GEF викликає ефект, подібний до втрати функції самим Ras. Вважають, що активація інших Ras-подібних білків, включно з тими, що належать до родини Rho, відбувається також шляхом активації GEFs.

Цей шлях від рецепторних тирозинкіназ — не єдиний для активації Ras. Інші Ras GEFs активуються незалежно від Sos. Одна з них, яка міститься переважно у мозку, активується за допомогою Ca^{2+} та диацилгліцеролу і може пов'язувати сполучені з G-білками рецептори з активацією Ras.

Активований Ras у свою чергу *активує* різноманітні сигнальні *білки, що передають сигнал по кількох шляхах.* Одним із цих шляхів є каскад серин/треонінового фосфорилювання, висококонсервативний в евкаріотичних клітинах, від дріжджів до людини. Життєво-важливий компонент цього каскаду — новий тип протеїнкіназ, MAP-кіназа.

3.2.1.2.1 Ras опосередковані каскади серин/треонінових фосфорилювань. MAP-кінази

Як фосфорилювання тирозинів, так і активація Ras, зумовлена активованими рецепторними тирозинкіназами є короткотривалими. Тирозин-специфічні протеїнфосфатази швидко усувають фосфорилювання, а GAPs індукують інактивацію активованого Ras шляхом гідролізу зв'язаного GTP до GDP. Щоб стимулювати клітини до проліферації і диференціації, ці короткотривалі сигнальні події повинні бути перетворені у довготривалі, які можуть підтримати сигнал і передати його у ядро, де він змінить характер експресії генів. Активований Ras запускає це перетворення, ініціюючи послідовність *серин/треонінових фосфорилювань, які існують набагато довше, ніж тирозинові*. У цьому каскаді фосфорилювання беруть участь багато серин/треонінових кіназ, проте центральний модуль каскаду утворений трьома з них. Останній компонент послідовності — це активована мітогенами протеїнкіназа (MAP-кіназа).

Незвичайною рисою MAP-кінази є необхідність для її повної активації подвійного фосфорилювання по тирозину і треоніну, розділеним у білку однією амінокислотою. Обидва ці фосфорилювання каталізуються кіназою MAP-кінази, яка у Ras-сигнальному шляху ссавців називається MEK. Необхідність подвійного фосфорилювання

по тирозину і треоніну забезпечує збереження MAP-кінази в неактивному стані, поки вона не буде специфічно активована кіназою MAP-кінази (вона є єдиним субстратом останньої). Сама кіназа MAP-

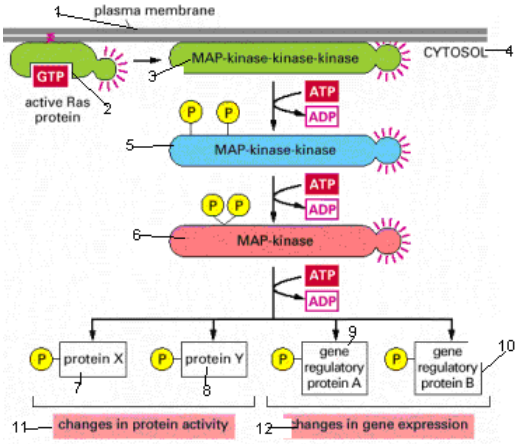


Рис.24 – MAP-кіназний шлях серин/треонін вих фосфорилювань, активований Ras

У всіх евкаріотів працюють множинні шляхи такого типу, які використовують структурно та функціонально споріднені білки. Кожен із цих шляхів сполучає позаклітинний стимул із різними клітинними відповідями. Шлях, активований Ras, починається кіназою кінази Map-кінази Raf, яка активує кіназу MAP-кінази Mek, яка у свою чергу активує MAP-кіназу Erk. Остання фосфорилює набір низхідних сигнальних білків, зокрема, інші кінази і білки-регулятори генів у ядрі. В результаті виникають зміни в експресії генів та активності білків, які спричиняють складні зміни у поведінці клітин

[1 – плазматична мембрана; 2 – активний білок Ras; 3 – кіназа кінази MAP-кінази; 4 –цитозоль; 5 – кіназа MAP-кінази; 6 – MAP-кіназа; 7 – білок X; 8 – білок Y; 9 – білок-регулятор гена A; 10 білок-регулятор гена – B; 11 – зміни активності білків; 12 – зміни експресії генів].

кіназа активується фосфорилюванням, яке каталізується перша кіназа у трьохкомпонентному модулі — кіназа кінази MAP-кінази. У Ras-сигнальному шляху ссавців вона називається Raf. Raf-кіназа активується активованим Ras.

Активна MAP-кіназа передає сигнал далі, фосфорилюючи різноманітні клітинні білки, включно з регуляторами генів та іншими кіназами (рис. 24). Наприклад, вона потрапляє у ядро, де фосфорилює один або більше компонентів комплексу-регулятору генів. Це активує транскрипцію набору найбільш ранніх генів, названих так, оскільки вони вмикаються в межах кількох хвилин після стимуляції клітини

зовнішнім сигналом, навіть, якщо синтез білків експериментально блокований хімічними препаратами. Деякі з цих генів кодують інші білки-регулятори генів, які активують інші гени, а цей процес потребує додаткового синтезу білків і більш тривалого часу. У такий спосіб по сигнальному шляху Ras – MAP-кіназа сигнали передаються з поверхні клітини до ядра і значно впливають на характер експресії генів. Серед генів, активованих цим шляхом є ті, що необхідні для проліферації клітин, наприклад, гени циклінів G1.

MAP-кінази зазвичай активуються лише тимчасово у відповідь на позаклітинні сигнали, і період їхньої активності може значно вплинути на природу відповіді. Для прикладу, коли EGF активує свої рецептори у лінії попередників нервових клітин, активність MAP-кінази досягає піку за 5 хвилин і швидко падає, тому клітини продовжують ділитися. Натомість, коли у тих самих клітинах активуються рецептори NGF, то активність MAP-кінази залишається високою впродовж багатьох годин, тому клітини перестають проліферувати і диференціюються у нейрони.

MAP-кінази інактивуються дефосфорилюванням, і для цього достатньо специфічного усунення фосфату з тирозину або треоніну. У деяких випадках, стимуляція позаклітинним сигналом індукує експресію фосфатази з подвійною специфічністю, яка усуває обидва фосфати та інактивує кіназу, що є різновидом негативного зворотного зв'язку. В інших випадках, стимуляція спричиняє більш швидке вимикання кінази вже наявними фосфатазами.

Трьохкомпонентні сигнальні модулі MAP-кінази діють у всіх тваринних клітинах, а також у дріжджах, причому різні модулі зумовлюють різні відповіді в одній клітині. Для прикладу, у дріжджах, що брунькуються, один із таких модулів спричиняє відповідь на феромони спарювання за допомогою <beta><gamma>-комплексу G -білка, інший — реакцію на голодання, а ще інший — на осмотичний шок. Деякі із трьохкомпонентних MAP-кіназних модулів використовують одну або більше спільних кіназ, і, незважаючи на це, активують різні ефекторні білки, викликаючи різні відповіді. Як клітини уникають перехресного зв'язку між різними паралельними сигнальними шляхами і забезпечують специфічність кожної відповіді? Одним із шляхів є використання скефолд-білків, які зв'язують частину або всі кінази у специфічному модулі з утворенням комплексу (рис. 10).

This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

3.2.1.2.2 Ras опосередковані каскади серин/треонінових фосфорилювань. PI-3-кінази

PI-3-кіназау яка передає клітинам сигнали до виживання і росту. Фермент утворює інозитолфосфоліпідні сайти приєднання у плазматичній мембрані.

Позаклітинні сигнали стимулюють клітини до поділу, частково внаслідок активації шляху Ras –MAP-кіназа. Але якби клітини продовжували б ділитися без росту, вони ставали б все меншими і згодом зникли б. Тому, для проліферації клітини повинні стимулюватися не тільки до поділу, але й до росту (збільшення). У деяких випадках обидві функції виконує один сигнальний білок, в інших — один сигнальний білок (мітоген) стимулює поділ, інший (фактор росту) — ріст клітин. В одному з основних сигнальних шляхів, що стимулює ріст клітин, задіяна фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI-3-кіназа). *Принциповою відмінністю цієї кінази є те, що вона фосфорилює не білки, але інозитолові фосфоліпіди*. Вона може активуватися рецепторними тирозинкіназами, а також багатьма іншими типами рецепторів клітинної поверхні, включно зі сполученими з G -білками.

Фосфатидилінозитол (PI) унікальний серед мембранних ліпідів завдяки своїй здатності піддаватися оборотному фосфорилюванню по множинним сайтам з утворенням набору різних інозитолових фосфоліпідів. Активована PI-3-кіназа каталізує фосфорилювання інозитолових фосфоліпідів по 3 позиції інозитолового кільця з утворенням ліпідів $PI(3,4)P_2$ або $PI(3,4,5)P_3$ (рис.26). $PI(3,4)P_2$ і $PI(3,4,5)P_3$ виконують роль сайтів приєднання для внутрішньоклітинних сигнальних білків, об'єднуючи їх у сигнальні комплекси, які передають сигнал у клітину з цитозольного боку плазматичної мембрани.

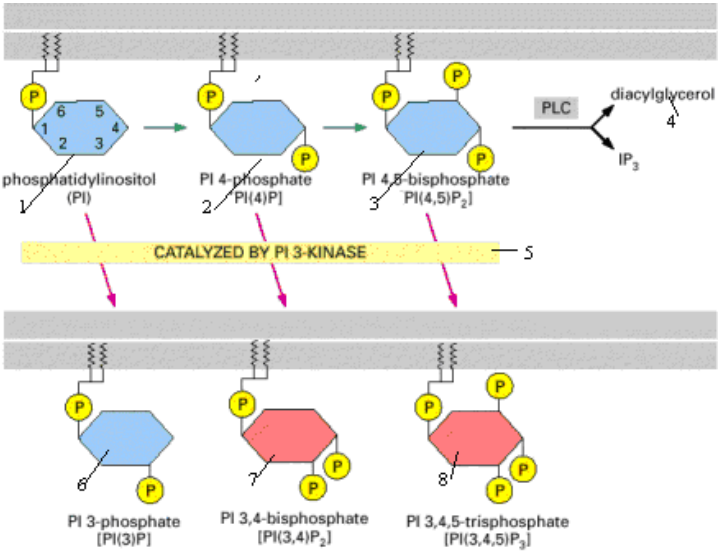


Рис. 25 – Утворення PI-3-кіназою інозитолфосфоліпідних сайтів приєднання.

PI-3-кіназа фосфорилює інозитолове кільце по 3 атому вуглецю, утворюючи показані знизу інозитолові фосфоліпіди. Два ліпіди, показані червоним, можуть виконувати роль сайтів приєднання для сигнальних білків із PH-доменами. Реакції фосфорилювання, показані зеленими стрілками, каталізуються іншими кіназами інозитолфосфоліпідів. Як обговорено раніше, фосфоліпаза C (PLC -< beta > або PLC -< gamma >) може розщеплювати PI(3,4)P2 з утворенням двох малих сигнальних молекул — диацилгліцеролу та інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3).

[1 - фосфатидилінозитол (PI); 2 – PI-4-фосфат [PI(4)P]; 3 – PI-4,5-біфосфат; [$PI(4,5)P_2$]; 4 – диацилгліцерол; 5 – каталізуються PI-3-кіназою; 6– PI-3-фосфат [PI(3)P]; 7 – PI-3,4-біфосфат [$PI(3,4)P_2$]; 8 – PI-3,4,5-трифосфат [$PI(3,4,5)P_3$].

Важливо відрізняти цю функцію інозитолових фосфоліпідів від розглянутої нами вище. Раніше ми побачили, що PLC -< beta > (у випадку сполучених із G - білками рецепторів) або PLC -< gamma > (у випадку рецепторних тирозинкіназ) розщеплюють $PI(4,5)P_2$ до

розчинного IP3 і мембранозв'язаного диацилгліцеролу. IP_3 вивільняє Ca^{2+} із ER, а диацилгліцерол активує PKC. Натомість, $PI(3,4)P_2$ і $PI(3,4,5)P_3$ не розщеплюються фосфоліпазами. Вони залишаються у плазматичній мембрані, поки їх не дефосфорилюють специфічні фосфатази інозитолових фосфоліпідів, які відщеплюють фосфат із 3 позиції інозитолового кільця. Мутації, які інактивують одну з таких фосфатаз (PTEN) і продовжують активність PI-3-кінази, зумовлюють розвиток раку і зустрічаються у багатьох випадках раку у людини. Результатом цих мутацій є продовження тривалості життя клітин, а це означає, що функція передачі сигналів за допомогою PI-3-кінази — забезпечення не тільки росту, але й виживання клітин.

Існують різні типи PI-3-кіназ. Одна із них, яка активується *рецепторними тирозинкіназами*, складається з каталітичної і регуляторної субодиниць. Регуляторна субодиниця — це адапторний білок, який зв'язується з фосфотирозинами активованих рецепторних тирозинкіназ за допомогою SH2-доменів. Друга PI-3-кіназа містить іншу регуляторну субодиницю і активується <beta><gamma>-комплексом тримерного G -білка, активованого зв'язуванням ліганду із відповідним рецептором. Каталітична субодиниця, подібна в обох випадках, також містить сайт зв'язування для активованого Ras, який дозволяє останньому безпосередньо стимулювати PI-3-кіназу.

Внутрішньоклітинні сигнальні білки зв'язуються з $PI(3,4)P_2$ і $PI(3,4,5)P_3$, утвореними активованою PI-3-кіназою, в основному за допомогою плекстрин-гомологічного (PH) домену, вперше виявленого у тромбоцитарному білку плекстрині. PH-домени містять близько 200 людських білків, зокрема, Sos, GEF, який активує Ras і деякі нетипові PKCs, активація яких не залежить від Ca^{2+}. Важливість цих доменів яскраво показують певні генетичні імунодефіцитні захворювання у мишей і людини, у яких мутація інактивує PH-домен цитоплазматичної тирозинкінази BTK. У нормі, коли рецептори антигенів на B-лімфоцитах (B-клітинах) активують PI-3-кіназу, утворені інозитолліпідні сайти приєднання притягують до цитозольного боку плазматичної мембрани BTK і PLC -< gamma >. Там ці два білки взаємодіють: BTK фосфорилює і активує PLC-<gamma>, яка розщеплює $PI(4,5)P_2$ до IP_3 і диацилгліцеролу, передаючи сигнал далі (рис. 25). Оскільки мутантна BTK не може зв'язуватися з ліпідними

сайтами приєднання, утвореними після активації рецептора, рецептори В-клітин не можуть передати їм сигнали проліферації і виживання, спричиняючи важкий імунодефіцит в утворенні антитіл.

3.2.1.2.1.2.1 Сигнальний шлях PI-3-кіназа/протеїнкіназа B

Одним із шляхів передачі PI-3-кіназою клітинам сигналів для виживання є непряма активація протеїнкінази В (PKB), інша назва — Akt. Ця кіназа містить PH-домен, який спрямовує її до плазматичної мембрани, коли там позаклітинним сигналом активується PI-3-кіназа.

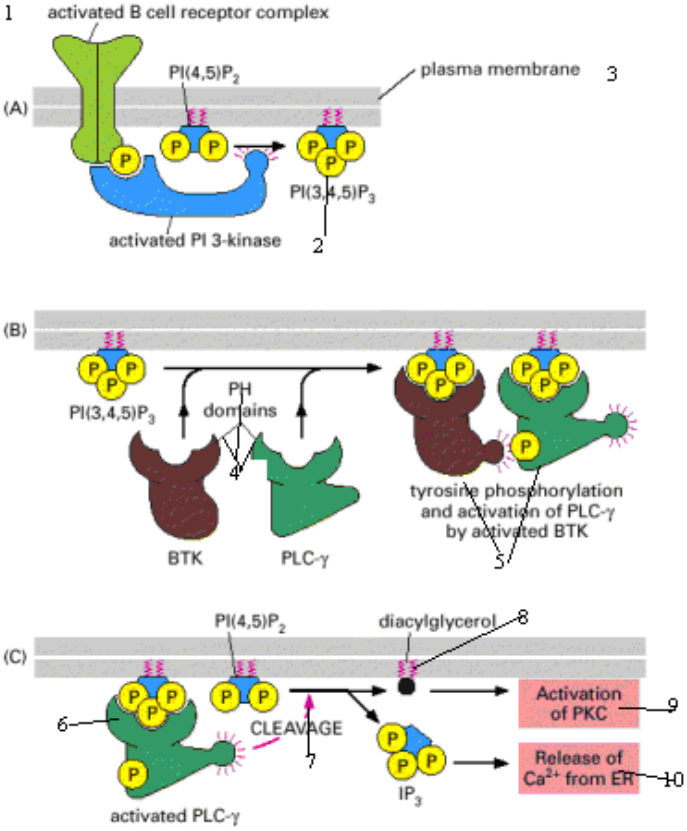


Рис.26. – Рекрутування сигнальних білків із PH-доменами до плазматичної мембрани під час активації B-клітин.
(A) PI-3-кіназа зв'язується з фосфотирозином активованого рецепторного комплексу B-клітини і активується для фосфорилювання інозитолового фосфоліпіду PI-4,5-біфосфата [PI(4,5) P_2] з утворенням PI-3,4,5-трифосфат [PI(3,4,5)P_3]. (Б) PI-3,4,5-трифосфат виконує роль сайту приєднання для двох сигнальних білків із PH-доменами, які потім взаємодіють один з одним. Це змушує цитоплазматичну тирозинкіназу BTK фосфорилювати і активувати PLC -< gamma > у мембрані. (B) Активована PLC -< gamma > потім розщеплює PI(4,5)P_2 з утворенням диацилгліцеролу та IP_3, які передають сигнал далі.

[1 – активований комплекс рецепторів B-клітини; 2 - активована PI-3-кіназа; 3 – плазматична мембрана; 4 - PH-домени; 5 – фосфорилювання тирозину і активація PLC -< gamma > активованою BTK; 6 – активована PLC -< gamma >; 7 – розщеплення; 8 – диацилгліцерол; 9 - активація PKC; 10 – вивільнення Ca^{2+} з ER]

Після зв'язування з PI(3,4,5)P_3 на цитозольній стороні мембрани, конформація PKB змінюється так, що вона може бути активована завдяки фосфорилюванню фосфатидилінозитол-залежною протеїнкіназою PDK1, яка рекрутується до мембрани таким самим способом. Активована PKB повертається у цитоплазму і фосфорилює численні білки-мішені. Один із них, BAD — це білок, що в нормі змушує клітини ставати на шлях програмованої смерті, або апоптозу. Фосфорилюючи BAD, PKB інактивує його, продовжуючи виживання клітин. PKB також сприяє виживанню клітин, інгібуючи інші активатори клітинної смерті, у деяких випадках пригнічуючи транскрипцію їхніх генів.

Шляхи передачі у клітині PI-3-кіназою сигналів росту (та загального посилення метаболізму) складні і досі слабко зрозумілі. Один із шляхів стимулювання факторами росту — посилення синтезу білків завдяки збільшенні ефективності трансляції певних мРНК рибосомами. *S6 -протеїнкіназа — частина одного із сигнальних шляхів від PI-3-кінази до рибосоми*. Вона фосфорилює та інактивує S6-субодиницю рибосом, що допомагає посилити трансляцію набору мРНК, які кодують рибосомальні білки та інші компоненти трансляційного апарату. Сама активація S6-кінази — це складний

процес, який залежить від PDK 1 та фосфорилювання багатьох сайтів білка. PDK 1 може фосфорилювати один із цих сайтів у відповідь на активацію PI-3-кінази.

На рис. 27 підсумовані п'ять паралельних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, які ми вже обговорили. Один із них приводиться в дію сполученими з G - білками рецепторами, два — рецепторними тирозинкіназами, а ще два — обома типами рецепторів.

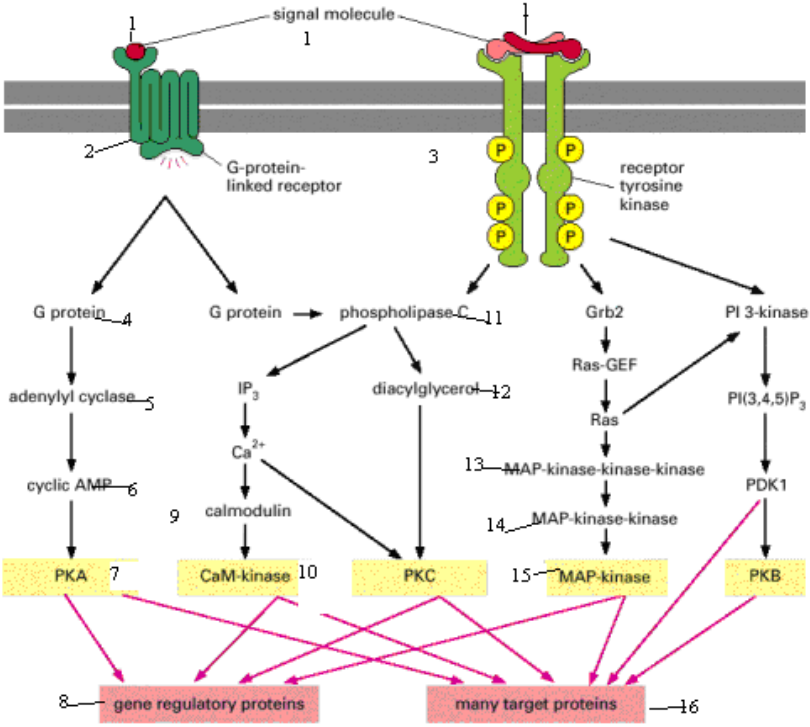


Рис. 27 – П'ять паралельних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, активованих сполученими з G - білками рецепторами і/або рецепторними тирозинкіназами.

У цьому схематичному прикладі, п'ять кіназ (затінених жовтим) наприкінці кожного шляху фосфорилюють білки-мішені (затінені червоним), причому деякі з мішеней фосфорилюються більше, ніж однією кіназою. Фосфоліпази С, активовані двома типами рецепторів, відрізняються за специфічністю. Рецептори, сполучені з G -білками,

активують PLC -< beta >, а рецепторні тирозинкінази — PLC -< gamma > (не показана).

[1 – сигнальна молекула; 2 – рецептор, сполучений із G -білком 3 – рецепторна тирозинкіназа; 4 – G –білок; 5 – аденілілциклаза; 6 – циклічний АМР; 7 – РКА; 8 – білки-регулятори генів; 9 – кальмодулін; 10 – СаМ-кіназа; 11 – фосфоліпаза С; 12 – диацилгліцерол; 13 – кіназа кінази МАР-кінази; 14 – кіназа МАР-кінази; 15 – МАР-кіназа; 16 – численні білки-мішені]

3.2.2 Активність рецепторів, асоційованих з тирозинкіназами

Активність багатьох рецепторів вимагає фосфорилювання по залишках тирозину, хоча вони й не містять очевидного тирозинкіназного домену. Дія цих рецепторів опосередковується асоційованими з ними цитоплазматичними тирозинкіназами, які фосфорилюють різні білки-мішені, часто включно із самими рецепторами за умови зв'язування ними ліганду. Тому ці рецептори функціонують дуже подібно до рецепторних тирозинкіназ, за винятком того, *що кіназний домен кодується окремим геном і нековалентно сполучається з поліпептидним ланцюгом рецептора*. Ще однією рисою подібності є потреба в олігомеризації рецепторів для функціонування.

Багато з цих *рецепторів пов'язані із представниками найбільшої родини цитоплазматичних тирозинкіназ ссавців — Src-родини протеїнкіназ*. Усі ці протеїнкінази містять SH2- і SH3-домени і локалізуються на цитоплазматичній стороні плазматичної мембрани, утримуючись там частково завдяки взаємодії із трансмембранними рецепторними білками, а частково — ковалентно приєднаними ліпідними ланцюгами. Різні представники родини асоціюються з різними рецепторами і фосфорилюють різні набори білків-мішеней, які, проте, частково перекриваються. У кожному випадку, кіназа активується при зв'язуванні позаклітинного ліганду з відповідними рецепторним білком. Сама Src, як і кілька інших представників родини, також може зв'язуватися з активованими рецепторними тирозинкіназами. У цих випадках, рецепторна та цитоплазматична тирозинкінази двобічне стимулюють каталітичну активність одна одної, посилюючи та продовжуючи дію сигналів.

Інший тип цитоплазматичних тирозинкіназ асоціюється з інтегринами, *основною родиною рецепторів, які забезпечують зв'язування клітини з позаклітинним матриксом*. Зв'язування

компонентів матриксу з інтегринами може активувати внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що впливають на поведінку клітини. Коли інтегрини скупчуються у точках контакту з матриксом, вони сприяють збиранню сполучень клітина-матрикс — фокальних контактів. Серед багатьох білків, які рекрутуються у ці сполучення — *цитоплазматична тирозинова кіназа фокальних контактів (FAK), яка зв'язується з цитозольним хвостом одної із субодиниць інтегрину за допомогою іншого білка цитоскелету*. Скупчені молекули FAK перехресно фосфорилюють одна одну, утворюючи фосфотирозинові сайти приєднання для Src-кінази. Після цього Scr і FAK фосфорилюють одна одну, а також інші білки, які збираються в місці контакту, включно з численними сигнальними білками з тих, що використовуються рецепторними тирозинкіназами. У такий спосіб ці дві кінази повідомляють клітині, що вона приєдналася до придатного субстрату, де може виживати, рости, ділитися, мігрувати і так далі.

Рецептори цитокінів — це підродина сполучених з ензимами рецепторів. Вони утворюють найбільший та найрізноманітніший клас рецепторів, які передають сигнал у клітину за допомогою цитоплазматичних кіназ. До цього класу належать рецептори для багатьох типів локальних медіаторів (збірна назва — цитокіни), а також рецептори для деяких гормонів, наприклад, гормону росту та пролактину.

3.2.2.1 Рецептори цитокінів, що активують сигнальний шлях Jak – STAT

Багато внутрішньоклітинних сигнальних шляхів ведуть від поверхневих рецепторів до ядра, де вони змінюють транскрипцію генів. Проте одним із найбільш безпосередніх є сигнальний шлях Jak–STAT. Вперше він був відкритий у дослідженнях ефектів інтерферонів. Ці цитокіни секретуються клітинами (особливо лейкоцитами) у відповідь на вірусну інфекцію. Активовані рецептори інтерферонів активують новий клас цитоплазматичних тирозинкіназ — Janus-кіназ (Jaks), назва яких походить від імені дволикого римського бога. Після цього Jacks фосфорилюють та активують набір латентних білків-регуляторів генів, STATs (від signal transducers and activators of transcription — перетворювачі сигналів та активатори транскрипції), що пересуваються у ядро та стимулюють транскрипцію специфічних генів. Шлях Jak – STAT активується більше, ніж 30 цитокінами та гормонами, які зв'язуються рецепторами цитокінів, частково

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

переліченими у табл. 5.

Табл. 5. Деякі сигнальні білки, дія яких опосередковується рецепторами цитокінів і сигнальним шляхом Jak-STAT.

Сигнальний ліганд	Рецептор-асоційовані Jaks	Активовані STATS	Деякі з відповідей
<gamma>-інтерферон	Jak1 і Jak2	STAT1	активує макрофаги; посилює експресію білків МНС
<alpha>-інтерферон	Tyk1 і Jak2	STAT1 і STAT2	збільшує стійкість клітин до вірусної інфекції
Еритропоетин	Jak2	STAT5	стимулює утворення еритроцитів
Пролактин	Jak1 і Jak2	STAT5	стимулює утворення молока
Гормон росту	Jak2	STAT1 і STAT5	стимулює ріст, індукуючи утворення IGF -1
GM - CSF	Jak2	STAT5	стимулює утворення гранулоцитів та макрофагів
IL-3	Jak2	STAT5	стимулює утворення незрілих клітин крові

Усі STATs також містять SH2-домен, який дозволяє їм *приєднуватися до специфічних фосфотирозинів деяких активованих рецепторних тирозинкіназ.*

Цитокінові рецептори складаються із двох або більше поліпептидних ланцюгів. Деякі з них специфічні до певних цитокінових рецепторів, а інші — спільні для кількох таких рецепторів. Практично усі цитокінові рецептори асоційовані з одним або кількома Jaks. Відомо чотири Jaks — Jak1, Jak2, Jak3 і Tyk1, асоційованих із певними рецепторами цитокінів. Для прикладу, рецептори для <alpha>-інтерферону асоційовані з Jak1 і Tyk2, а рецептори для <gamma>-інтерферону — з Jak1 і Jak2 (Таблиця 5). Відповідно, миші з дефектом по Jak1 не відповідають на жоден із цих інтерферонів.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Рецептор для гормону еритропоетину, який стимулює виживання, проліферацію та диференціацію клітин-попередників еритроцитів, асоційований лише з Jak 2. У мишей, дефектних по Jak2, розвиток еритроцитів не відбувається і вони гинуть у ранньому розвитку.

Зв'язування цитокінів індукує олігомеризацію рецепторних ланцюгів або їх переорієнтацію у раніше утвореному олігомері. У будь-якому випадку асоційовані Jaks зближуються достатньо, щоб перехресно фосфорилювати один одного, посилюючи активність власних тирозинкіназних доменів. Згодом Jaks фосфорилюють тирозини на цитокінових рецепторах, утворюючи фосфотирозинові сайти приєднання для STATs та інших сигнальних білків (рис.29).

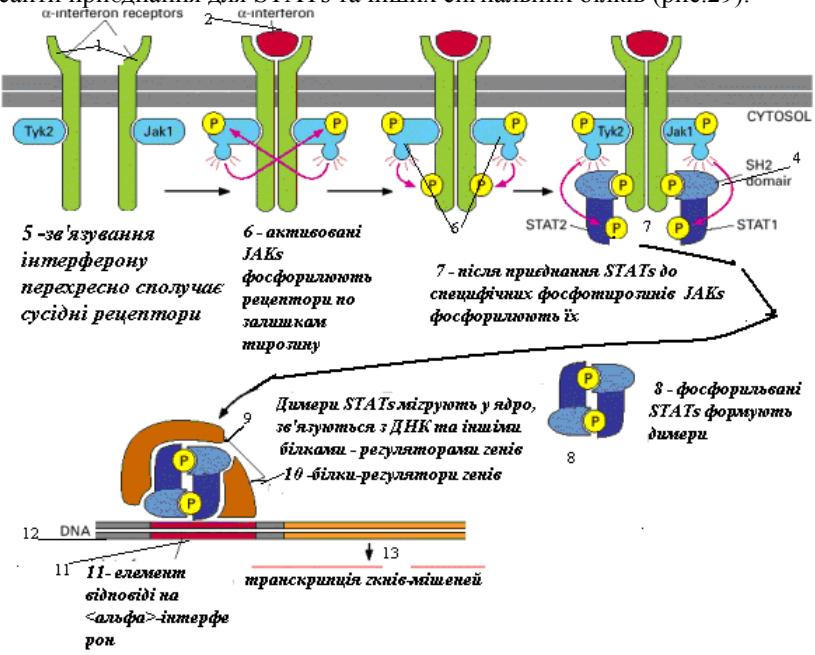


Рис. 28 – Сигнальний шлях JAK - STAT, активований інтерфероном. Зв'язування інтерферону спричиняє димеризацію двох окремих ланцюгів рецептора, або переорієнтовує ланцюги рецептора у попередньо сформованому димері. У будь-якому випадку, асоційовані Jaks зближуються так, що можуть фосфорилювати один одного по залишках тирозину, починаючи процес передачі сигналу. Два різних

рецепторних ланцюга асоційовані з різними Jaks (Tyk1 і Jak1) і рекрутують різні STATs (STAT1 і STAT2). STATs дисоціюють від рецепторів і при фосфорилюванні утворюють гетеродимери. Вони зв'язуються зі специфічними послідовностями ДНК у ядрі клітини, де разом з іншими білками-регуляторами генів індукують транскрипцію розташованих поряд генів.

[1 – рецептори <alpha>-інтерферону; 2 – <alpha>-інтерферон; 3 – цитозоль; 4 – SH2 –домен; 5 – зв'язування інтерферону перехресно сполучає сусідні рецептори, а JAKS перехресно фосфорилюють один одного по залишках тирозину; 6 – активовані JAKs фосфорилюють рецептори по залишках тирозину; 7 – після приєднання STATs до специфічних фосфотирозинів рецептора, JAKs фосфорилюють їх; 8 STATs мігрують у ядро, зв'язуються з ДНК та іншими білками-регуляторами генів; 9 – STATs дисоціюють від рецептора і димеризуються за допомогою SH2-доменів; 10 – інші білки-регулятори генів; 11 – елемент відповіді на <alpha>-інтерферон у гені-мішені; 12 –ДНК; 13 – транскрипція генів-мішеней].

Відомо про існування *семи STATs*, *SH2-домени* яких виконують подвійну функцію. По-перше, вони *дозволяють зв'язування STAT -білка з фосфотирозиновим сайтом приєднання на активованому цитокіновому рецепторі* (або рецепторній тирозинкіназі). Після цього Jaks фосфорилюють STAT по залишках тирозину, спричиняючи його дисоціацію від рецептора. По-друге, SH2-домен вивільненого STAT тепер може опосередковувати його зв'язування з фосфотирозином молекули іншого STAT, формуючи STAT-гомо- або гетеродимер. STAT-димер переміщається до ядра, де разом з іншими білками-регуляторами генів зв'язується із специфічними елементами відповіді у ДНК різних генів та стимулює їхню транскрипцію (рис. 28). Наприклад, під час відповіді на гормон пролактин, який стимулює утворення молока клітинами молочної залози, активований STAT5 стимулює транскрипцію генів, що кодують білки молока.

Рецептори цитокінів активують відповідні STAT-білки завдяки тому, що SH2-домен цих STATs упізнає лише специфічні фосфотирозинові сайти приєднання на цих рецепторах. Для прикладу, активовані рецептори <alpha>-інтерферону приєднують STAT1 і STAT2, а <gamma>-інтерферонові рецептори — лише STAT1. Якщо замістити SH2-домен <alpha>-інтерферонового рецептора відповідним

доменом <gamma>-інтерферонового, то активований гібридний рецептор приєднує білки STAT1 і STAT2, як сам <alpha>-інтерфероновий рецептор.

Реакції, опосередковані STATs, часто регулюються за допомогою негативного зворотного зв'язку. Крім активації генів, які здійснюють цитокін-індуковану відповідь, STAT-димери також можуть активувати гени білків-інгібіторів. У деяких випадках, білок-інгібітор зв'язується одночасно з активованими рецепторами цитокінів і STAT -білками, що блокує подальшу активацію STAT і допомагає припинити відповідь. В інших випадках, той самий результат досягається шляхом блокування функції Jak.

Крім того, активовані Jaks і STATs також повинні інактивуватися шляхом дефосфорилювання їхніх фосфотирозинів. Як і у всіх сигнальних шляхах, де використовується фосфорилювання тирозинів, дефосфорилювання здійснюється тирозиновими протеїнфосфатазами, які у процесі передачі сигналів є настільки ж важливими, як і тирозинові протеїнкінази, що приєднують фосфати.

3.2.2.2 Тирозинові протеїнфосфатази, що виконують роль рецепторів клітинної поверхні

Лише невелика кількість каталітичних субодиниць серин/треонінових фосфатаз відповідають за усунення фосфатних груп із фосфорильованих серинів та треонінів на білках. Натомість, геном людини кодує біля 30 тирозинових протеїнфосфатаз (PTPs). Як і тирозинові протеїнкінази, вони бувають у цитоплазматичній та трансмембранній формах, жодна з яких не споріднена із серин/треоніновими протеїнфосфатазами. Окремі тирозинові протеїнфосфатази виявляють надзвичайну специфічність до своїх субстратів, усуваючи фосфатні групи лише з певних фосфотирозинів у наборі певних фосфорильованих білків. У цілому, ці фосфатази забезпечують короткий час існування фосфорильованих тирозинів і їхній низький рівень у спочиваючих клітинах. Вони не просто постійно скасовують наслідки дії тирозинових протеїнкіназ, але відповідно регулюються, щоб діяти лише у відповідний момент відповіді на сигнал або циклу клітинного поділу.

Дві цитоплазматичні тирозинові протеїнфосфатази хребетних містять SH2-домени і, відповідно, *називаються SHP-1 і SHP-2* (рис. 30). SHP-1 допомагає припиняти деякі реакції на цитокіни у клітинах крові, дефосфорилюючи активовані Jaks. Відомо,

наприклад, що для активації Jak2 мутантними рецепторами еритропоетину, які не можуть рекрутувати SHP-1, потрібно набагато більше часу. Більш того, миші з дефіцитом по SHP -1 мають аномалії майже у всіх лініях клітин крові, підкреслюючи важливість SHP -1 у їхньому розвитку. SHP-1 і SHP-2 також допомагають припиняти реакції, опосередковані деякими рецепторними тирозинкіназами.

Існує багато трансмембранних *тирозинових протеїнфосфатаз,* проте *функції більшості з них невідомі.* Вважають, що принаймні частина із них є рецепторами, хоча це не було прямо показано і їх називають рецептор-подібними тирозинфосфатазами. Усі вони мають один трансмембранний сегмент і зазвичай місять два тирозинфосфатазні домени на цитозольному боці плазматичної мембрани. Важливим прикладом є білок CD45, який міститься на поверхні усіх білих клітин крові і обов'язковий для активації як B-, так і T-лімфоцитів чужорідними антигенами. Ліганд, який, імовірно, зв'язується з позаклітинним доменом білка CD45, поки що не ідентифіковано. Припускають, що деякі рецепторні тирозинкінази і

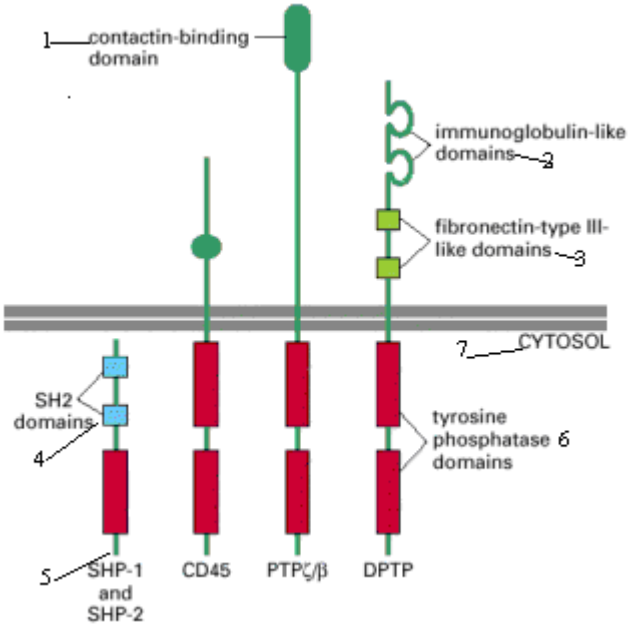


Рис. 29 – Деякі з тирозинових протеїнфосфатаз. Цитоплазматичні тирозинфосфатази SHP-1 і SHP-2 мають подібні структури із двома SH2-доменами. Три трансмембранні рецептор-подібні тирозинфосфатази мають два тандемно розташовані внутрішньоклітинні фосфатазні домени, причому той з них, що ближчий до мембрани, забезпечує більшу частину або всю каталітичну активність. DPTP — це білок Drosophila, інші — це білки ссавців.

[1 – контактин-зв'язуючий домен; 2 – імуноглобулін-подібні домени; 3 – фібронектин типу III-подібні домени; 4 – SH2-домени; 5 – SHP1 і SHP2; 6 – тирозинфосфатазні домени; 7 – цитозоль]

рецепторні тирозинфосфатази співпрацюють, зв'язуючи відповідні ліганди на клітинній поверхні, щоб максимально стимулювати дефосфорилювання певних внутрішньоклітинних сигнальних білків. При цьому кінази додають більше фосфатів, а фосфатази — усувають менше.

Деякі рецептор-подібні тирозинфосфатази виявляють риси білків клітинної адгезії і навіть можуть опосередковувати гомофільне зв'язування клітин у пробах на клітинну адгезію. Трансмембранні тирозинфосфатази також можуть виконувати роль сигнальних лігандів, які активують рецептори сусідньої клітини. Прикладом може бути тирозинова протеїнфосфатаза <zeta>/<beta>, яка експресується на поверхні певних гліальних клітин у мозку ссавців. Вона зв'язується з рецепторним білком контактином на нервових клітинах, що розвиваються, стимулюючи їх простягати довгі відростки.

3. 2.3 Рецептори, сполучені з ензимами, які використовують тільки серин/треонінове фосфорилювання

Ця група рецепторів безпосередньо фосфорилюють латентні білки-регулятори генів Smads, які мігрують у ядро, активуючи транскрипцію генів.

Дія сигнальних білків надродини TGF -<beta> зумовлюється рецепторними серин/треоніновими кіназами та Smads. Ці трансмембранні серин/треонінові кінази активують ще більш безпосередній сигнальний шлях до ядра, ніж шлях Jak-STAT.

Надродина трансформуючих факторів росту <beta> (TGF -<beta>) містить велику кількість структурно споріднених, секретованих, димерних білків. Вони діють у якості гормонів, або, більш звично, локальних медіаторів, регулюючи цілий ряд функцій у

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

всіх тварин. Під час розвитку, вони регулюють утворення профілів і впливають на різні типи поведінки клітин, зокрема, проліферацію, диференціацію, утворення позаклітинного матриксу і смерть. У зрілих організмах вони задіяні у репарації тканин та імунній регуляції, а також в інших процесах. До цієї надродини належать самі TGF -<beta>s, активіни і білки, задіяні у морфогенезі кісток (*bone morphogenetic proteins, BMPs).* Найбільшою родиною є BMPs.

Усі перелічені білки діють за допомогою сполучених з ензимами рецепторів, які належать до однопрохідних трансмембранних білків із серин/треонінкіназним доменом на цитозольному боці плазматичної мембрани. Існують два класи рецепторних серин/треонінових кіназ, — типу I і типу II, структурно подібні. Кожен із представників надродини *TGF -<beta> зв'язується із характеристичною комбінацією рецепторів типу I і типу II, які разом необхідні для передачі сигналів.* Зазвичай, спочатку ліганд зв'язується з гомодимером рецептора типу II, і активує його, після чого цей рецептор рекрутує, фосфорилює і активує гомодимер рецептора I типу, *утворюючи активний тетрамерний рецепторний комплекс.*

Після своєї активації рецепторний комплекс використовує стратегію швидкої передачі сигналу до ядра, дуже подібну до шляху Jak - STAT, який використовують рецептори цитокінів. Рецептор типу I безпосередньо зв'язується з латентним білком-регулятором генів із родини Smad і фосфорилює його. Назва цієї родини походить від перших двох виявлених її представників, Sma у C. elegans і Mad у Drosophila. Активовані рецептори TGF-<beta> і активінів фосфорилюють Smad2 або Smad3, а активовані рецептори BMPs — Smad1, Smad 5 або Smad8. По фосфорилюванню, один із цих Smads дисоціює від рецептора і зв'язується з Smad4. Останній може утворювати комплекси із будь-яким із вище перелічених активованих рецепторами Smads. Після цього Smad -комплекс переміщається у ядро, де з'єднується з іншими білками-регуляторами генів, зв'язується зі специфічними сайтами в ДНК та активує певний набір генів-мішеней.

Деякі із членів родини TGF-<beta> виконують роль градієнтних морфогенів під час розвитку, індукуючи різні відповіді у клітині, залежно від своєї концентрації.

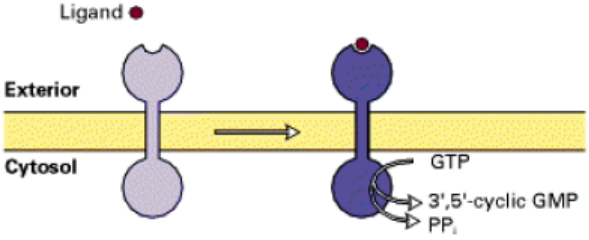
Як і у випадку шляху Jak-STAT, шлях Smad також часто регулюється за допомогою негативного зворотного зв'язку. До генів-мішеней, які активуються Smad-комплексами, належать ті, що

кодують інгібіторні Smads, зокрема, Smad6 і Smad7. Вони виконують роль приманок, зв'язуючись з активованими рецепторами типу I і запобігаючи зв'язуванню інших Smads. Це блокує утворення активних Smad комплексів та пригнічує відповідь на ліганд родини TGF-<beta>. Інші типи позаклітинних лігандів також можуть стимулювати утворення інгібіторних Smads, щоб протидіяти передачі сигналу TGF-<beta>-лігандом. Наприклад, <gamma>-інтерферон активує шлях Jak - STAT і утворені активні STAT-димери індукують появу Smad 7, який пригнічує TGF -<beta>-сигналізацію.

Представники родини TGF-<beta>, як і деякі з їхніх інгібіторів, зазвичай секретуються у формі неактивних попередників, які згодом активуються протеолітичним розщепленням.

3. 2.4 Рецепторні гуанілілциклази

Рецепторні гуанілілциклази — це однопрохідні трансмембранні білки з позаклітинним сайтом зв'язування для сигнальної молекули та внутрішньоклітинним гуанілілциклазним каталітичним доменом (рис. 32). Зв'язування сигнальної молекули активує утворення циклазним доменом циклічного GMP (cGMP). «Вниз за течією» мішенями цГМФ є ПКG, білки вентильних каналів для Na^+, Ca^{2+}, фосфодиестераза циклічних нуклеотидів. До сигнальних молекул, які використовують рецепторні гуанілілциклазні, належать натріуретичні пептиди (NPs) – родина структурно споріднених



Активація гуанілатциклази атріальним натрій уретичним пептидом

Рис. 30 – Мембранна гуанілатциклаза та її активація

секретованих сигнальних пептидів, які регулюють водно-сольовий баланс і розширюють кровоносні судини. Існує кілька різних типів NPs, зокрема, атріальний натріуретичний пептид (ANP) і мозковий

натріуретичний пептид (BNP). М'язові клітини передсердя секретують ANP при підвищенні кров'яного тиску. ANP стимулює нирки до секреції Na^+ і води, а також викликає розслаблення клітин гладеньких м'язів у стінках кровоносних судин. Обидва наслідки сприяють зниженню тиску крові.

Відкривають все більшу кількість рецепторних гуанілілциклаз, хоча у більшості випадків для них невідомий ліганд, що в нормі їх активує.

3.2.5 Розчінна гуанілатциклаза. цГМФ та NO-опосередковані сигнальні шляхи

Крім мембранозв'язаної гуанілатциклази в багатьох клітинах є розчинна гуанілатциклаза (рГЦ), що локалізується в цитозолі багатьох клітин. РГЦ складається з 2-х субодиниць – αβ. Кожна субодиниця має три домені: каталітичний, димеризації та регуляторний. Останній містить простетичну групу, яка представлена гемом.

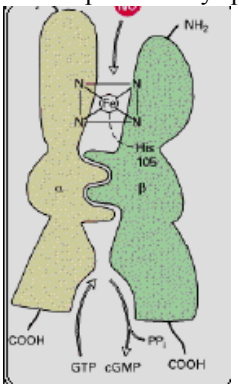


Рис. 31 – Розчинна гуанілатциклаза

Активність гуанілатциклази в різних тканинах не перевищує 1-2 пмоль мг/білка в 1 хв. Це, очевидно, украй низький вміст ферменту. Концентрація цГМФ у клітині також низка (в 4 -10 разів нижче концентрації цАМФ) - близько 10^{-7} М. При активації синтезу або придушенні розпаду цГМФ концентрація цього нуклеотиду в клітині звичайно підвищується в 3 - 8 разів.

Фермент каталізує утворення цГМФ – другого посередника, що активує протеїнкіназу G. Активатором розчинної гуанілатциклаза є NO.

Окис азоту синтезується сімейством із трьох ізоформ ферменту синтази окису азоту (Nitric Oxide Synthase - NOS ; КФ 1.14.13.39).

1. nNOS (також називаний тип 1), спочатку виявлений у нейрональних клітинах центральної й периферичної нервової системи;

2. iNOS (також відомий як тип 2 або macNOS), що, на відміну від nNOS й eNOS, не експресується постійно (конститутивне); синтез цього ферменту може бути індукований у клітинах різних типів;

3. eNOS (також відомий як тип 3), уперше ідентифікований у клітках ендотелія кровоносних судин.

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

NOS каталізує синтез NO з L-аргініну й молекулярного кисню при участі NADPH, іншим продуктом реакції є L-цитрулін. Фермент являє собою гомодимер, кожна із субодиниць якого складається з редуктазного домену, що окиснює NADPH, і оксигеназного домену, що містить гем. Між ними розрізняють ще коротку CaM-єднальну ділянку. Особливий інтерес до механізмів регуляції кожної з ізоформ ферменту обумовлений тим, що NO викликає плейотропні фізіологічні ефекти. Підвищене утворення NO пов'язане із процесом руйнування нервових клітин, що приводять до хвороби Альцгеймера, відторгненню трансплантатів, артритам, септичному шоку й іншим патологічним процесам. Нагромадження надлишкових кількостей NO зв'язано, як правило, з iNOS. Тому особливо актуальної є проблема селективного інгібірування кожної з ізоформ ферменту, й, у першу чергу, індуцибельної. У зв'язку із цим значні зусилля дослідників і спрямовані на вивчення механізмів регуляції активності ізоформ NOS.

На сьогоднішній день є наступна інформація щодо питання регуляції синтази окису азоту системою Ca^{2+}-CaM

1. CaM регулює активність нейрональної й ендотеліальної форм NOS ; в індуцибельної NOS він присутній у якості тісно зв'язаної субодиниці. Активність iNOS не залежить від концентрації іонів Ca^{2+}.

2. CaM регулює перенос електронів в NOS у двох точках: на флавіни й далі до гемової частини ферменту, причому цей вплив може бути функціонально розділено.

3. У регуляції ендотеліальної ізоформи ферменту бере участь білок кавеолін, що є антагоністом CaM.

NO є основним вазоділататором, що перешкоджає тонічному скороченню судин нейронального, ендокринного або локального походження.

Нейрональна й ендотеліальна NO синтази є ферментами зі стабільною активністю (тобто стаціонарними, конститутивними), у той час як активність макрофагальної або індуцибельної NO-синтази більшою мірою регулюється цитокінами. Ендотеліальна NO-синтаза стабільно експресується в ендотеліальних клітинах, крім цього, вона була виявлена в клітинах епітелію ниркових канальців, у пірамідних клітинах гіпокампу й в інших клітинах.

NO являє собою гідрофобний газ із хімічними властивостями, що роблять його дивно підходящим на роль внутрішньо - і міжклітинного посередника. Він може існувати у вигляді стабільного,

нейтрально зарядженого радикала (NO•) з ліпофільними властивостями й різко вираженою тенденцією взаємодіяти насамперед з молекулами, що володіють неспареним електроном, такими як супероксид аніон, залізо й молекулярний кисень. NO• може також піддаватися одноелектронному відновленню з утворенням нітроксил аніона (NO^-) або, втративши електрон, перетворюється в іон нітрозонія (NO^+).

Оксид азоту незворотньо інактивується реакцією з гемоглобіном (оксигенірованною і деокигенірованною формами) у просвіті кровоносної судини, супероксидним радикалом у стінці кровоносної судини, або киснем у вільному розчині. Реакція оксиду азоту з киснем супроводжується утворенням стабільних кінцевих продуктів нітриту й нітрату, які є непрямими маркерами концентрації оксиду азоту в організмі.

Визначення нітриту й нітрату, стабільних кінцевих продуктів оксиду азоту, у крові й інших біологічних рідинах роблять різними методами. При визначенні нітриту використається фотометричний метод. Тотальне визначення змісту нітриту й нітрату в плазмі крові також проводиться фотометричним методом, однак попередньо перетворюють нітрати в нітрити за допомогою покритого міддю кадмієвого стовпчика або редуктази. Останнім часом для визначення нітратів і нітритів у біологічних рідинах використаються високоефективна хроматографія і капілярний електрофорез.

NO – багатофункціональна ефекторна молекула. Основною його мішенню в клітині є розчинна гуанілатциклаза. NO• зв'язується із залізом каталітичної субодиниці ферменту, що приводить до росту активності гуанілатциклази й підвищенню усередині клітини цГМФ.

цГМФ активує ПКG, яка каталізує фосфорилювання залишків серину й треоніну в кальцієвих каналах клітини. Розслаблюючий ефект ПКG на гладеньки м'язи реалізується головним чином за допомогою контролю концентрації Ca^{2+} у цитозолі завдяки їхньому впливу на продукцію інозитол 1,4,5-трифосфату, активність кальцієвих АТФ-аз й активації Ca^{2+}-–залежних K^+ каналів. Є також дані про те, що NO може знижувати вхід Ca^{2+} у клітини гладеньких м’язів через L-тип кальцієвих каналів.

3.2.8 Заключення відносно сполучених з ензимами рецепторів

Існує п'ять класів сполучених з ензимами рецепторів: (1) рецепторні тирозинкінази, (2) рецептори, асоційовані з

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

тирозинкіназами, (3) рецепторні серин/треонінкінази, (4) трансмембранні гуанілілциклази, і (5) рецептори, асоційовані з гістидинкіназами. Крім цього, вважають, що деякі трансмембранні тирозинфосфатази, які усувають фосфати із фосфотирозинових бічних ланцюгів специфічних білків, функціонують, як рецептори, хоча для більшості з них ліганди невідомі. Перші два класи рецепторів є найбільш численними.

Зв'язування ліганду з рецепторними тирозинкіназами індукує перехресне фосфорилювання їхніх цитоплазматичних доменів по множинних залишках тирозину. Автофосфорилювання активує кінази, а також утворює набір фосфотирозинів, які виконують роль сайтів приєднання для набору внутрішньоклітинних сигнальних білків. Вони зв'язуються у цих місцях за допомогою своїх SH 2 (PTB) доменів. Частина приєднаних білків виконують роль адапторів, які сполучають рецептори з маленькою GTPазою Ras. Вона, у свою чергу, активує каскад серин/треонінових фосфорилювань, що сходяться на MAP-кіназі, яка передає сигнал у ядро, фосфорилюючи там регуляторні білки. Ras також може активувати інший білок, який приєднується до активованих тирозинкіназ — PI-3-кіназу. Вона утворює специфічні інозитолові фосфоліпіди, які виконують у плазматичній мембрані роль сайтів приєднання для сигнальних білків із PH-доменами, включно із протеїнкіназою B (PKB).

Дія рецепторів, асоційованих із тирозинкіназами, залежить від різних цитоплазматичних кіназ. До них належать представники родини Src, які асоціюються з багатьма типами рецепторів, і кіназа фокальних контактів (FAK), яка асоціюється з інтегринами у місцях фокальних контактів. Згодом цитоплазматичні тирозинкінази фосфорилюють розмаїті сигнальні білки, передаючи сигнал далі. Найбільшою родиною рецепторів у цьому класі є родина цитокінових рецепторів. Стимульовані зв'язуванням ліганду, вони активують цитоплазматичні тирозинкінази родини Jak, які фосфорилюють STAT -білки. STATs димеризуються, мігрують до ядра та активують транскрипцію специфічних генів. Рецепторні серин/треонінові кінази, які активуються сигнальними білками надродини TGF -< beta >, діють подібно. Вони безпосередньо фосфорилюють та активують Smads, які потім олігомеризуються з іншим Smad, мігрують у ядро і активують транскрипцію генів.

Хемотаксис бактерій здійснюється за допомогою асоційованих із гістидинкіназами хемотактичних рецепторів. При активації

зв'язуванням репеленту, рецептори стимулюють автофосфорилювання асоційованої протеїнкінази по залишках гістидину і наступне перенесення цього фосфату на білок-месенджер. Він передає сигнал до мотора джгутика, який змінює плавальну поведінку бактерії. Атрактанти діють на цю кіназу, а отже, і на плавання, протилежно.

- **І4 Індивідуальне завдання**

Знайдіть правильну відповідь на запитання та обґрунтуйте відповідь

- ***І1. Мембранні рецептори***

Рецептор-білок зв'язує гормон поза мембраною клітини й активує протеїнкиназу в клітині. Рецептор - периферійний або інтегральний мембранний білок?

2. Мембранні рецептори – периферійні або асоційовані з поверхнею подвійного ліпідного шару мембрани білки. Асоціація з гормоном приводить до звільнення ліпідного сигналу, що активує протеїнкинази.

3. Всі мембранні рецептори – інтегральні білки, що специфічно зв'язують сигнальні молекули й передавальний сигнал через подвійний шар ліпіду.

іі. Відповідь на сигнал

- Сигналізація між клітинами звичайно приводить до активації білка_____
- 1. Ліпаз
- 2. Киназ
- 3. Протеаз
- 4. Нуклеаз

- ***ІІІ. Реакції клітини на сигнал***

Що з наступного не є типовим і не пов'язане із сигналізацією в клітині?

1 Активація G-білків шляхом обміну GDP на GTP
1 Продукція других месенджерів цАМФ ІР3
3. Активація протеїнкиназ
4. Звільнення іонів кальцію з мембран клітин
5. Стимуляція апоптозу

IV. Види Сигналів

Клітина секретує фактори росту, які мають повільну швидкість дифузії,

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

і взаємодіють із іншими клітинами тільки в області безпосередньої близькості, це приклад _____ _ сигналізації

1. екзокринної
2. синаптичної
3. паракринної
4. контакту клітин

- ***VV. Стероїдні гормони***

Стероїдні гормони найбільш ймовірно зв'язуються з:

1. іонними каналами мембран
2. рецепторами мембран, що володіють ферментативною активністю
3. Рецепторами, сполученими з G-білками
4 цитоплазматичними або ядерними рецепторами

VI. ***Вторинні посередники***

Посилка сигналу через мембрану клітини може привести до утворення других посередників у цитоплазмі клітин. Яке з перерахованих нижче з'єднань може бути другим посередником?

1. цАМР
2. Ca^{2+}
3. IP3
4. NO (оксид азоту)
5. Усі перераховані

- ***VVII. Каскади протеїнкиназ***

Деякі рецептори для факторів росту активізують каскад протеїнкиназ, за участю багатьох ферментів, зі зміною експресії гена. Які з наступних тверджень про каскад протеїнкиназ є правильними?

1. Багатоетапність дозволяє підсилити сигнал
2. Зовнішні сигнали можуть привести до змін на рівні експресії гена
3. Багатоетапність, що приводить до активацій киназ, може привести до різних реакцій у клітинах залежно від наявності або відсутності білків-мішеней.
4. Багатоетапність в активації означає, що патологічні активаційні реакції клітини, типу росту, можуть привести до мутацій більше, ніж в одному гені.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

5. Усе вище згадане істинно.

- ***VVIII. G - білки***

Ендогенна GTPазна активність G-білків забезпечує:

1. Активацію ферментів шляхом забезпечення енергією
2. Синтез цGMP як другого посередника
3. Синтез GTP як джерела енергії.
4. Гідроліз GTP повертають G білки у вихідний не стимульований стан.

- ***IIX. Послідовність передачі сигналів***

У реакції боротьби або втечі, адреналін, що звільняє надниркovими залозами, зв'язується з мембранним рецептор на клітинах м'язів. Які з наступних подій є наслідком зв'язування ліганду?

1. Білок G активується, зв'язуючи ГТФ і активуючи аденілатциклазу, що каталізує утворення цАМФ.
2. Другий месенджер, цАМФ, активізує протеїнкиназу А, що інгібірує синтетазу глікогену й синтез глікогену.
3. Протеїнкиназа А активує киназу фосфорилази, що передає фосфат, на гликогенфосфорилазу. Реакції приводять до розпаду глікогену й продукції глюкозо-1-фосфата.
4. Глюкозо-1-фосфат стимулює гліколіз, роблячи енергію для скорочення м'яза.
5 Усе вищезгадане

X. Щілинні контакти

1. Прямі клітинні контакти, типу щілинних контактів, у тваринних клітинах дозволяють:
2. Обмінюватися другими посередниками між клітинами, яки прилягають друг до друга
3. Протеїнкиназний потік між клітинами координує активність клітин
4. Швидкий обмін генетичною інформацією між прилягаючими клітинами
5. Сформувати водонепроникний бар'єр між їхніми мембранами.

5 ПИТАННЯ ТЕСТОВОГО КОНТРОЛЮ

6. ***1***) Загальні властивості гормонів
7. Гормони секретуються ендокринними залозами

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

8. Ендокринні залози мають багату мережу кровоносних судин
9. Гормони, що продукують ендокринні залози, секретуються безпосередньо в кровообіг
10. Гормони переносяться кров'ю до клітин-мішеней, які розташовані як дуже близько, так і дуже далеко
11. На клітинках-мішенях гормони зв'язуються специфічними рецепторами
12. Твердження 3 - помилкове
13. Таких не має

2) Взаємодія гормонів на рівні рецепторів

1. Опонуючи

Один гормон опонує дії іншого гормону (Інсулін знижує рівень глюкози в крові, а глюкагон його підвищує)

2. Конкуруюча (можливо конкурувати на рівні одного й того ж рецептору, або дія гормонів реалізується через різні метаболічні шляхи)
3. Вона відсутня

2f) Що є гормони?

1. Гормони, це органічні сигнальні молекули – продукти лабораторного синтезу.
2. Гормони - органічні хімічні сигнальні молекули, яки синтезують й секретують в кровообіг ендокринні клітини.
3. Гормони регулюють, інтегрують і управляють широким спектром фізіологічних функцій.

3) Що э клітина-мішень?

1. Клітинки-мішені – це клітини ендокринних залоз, продукуючих і секретуючих попередники гормонів
2. Клітинами-мішенями називають клітини, які мають специфічні рецептори (єднальні сайти) для певного гормону.
3. При зв'язуванні гормону з рецептором клітині-мішені, у клітині індукується ланцюг реакцій, що змінюють швидкість і спрямованість метаболізму, експресію й рівень синтезу білка.

4) Що представляють рецептори гормонів?

1. Рецептори гормонів – це сайти зв'язування гормонів на клітинці-мішені (на поверхні клітини, у цитоплазмі або ядрі)
2. Рецептор активується тільки при зв'язуванні специфічного

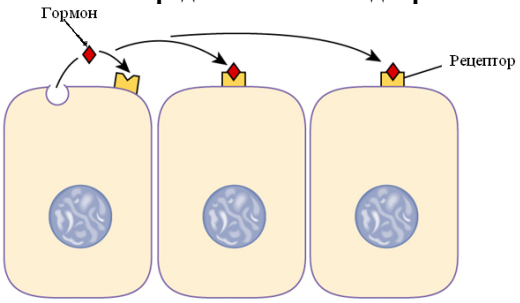
гормону. Якщо гормон не зв'язується зі своїм рецептором, то в клітині не виникає ніяких фізіологічних ефектів

3. Рецептори – це інтегральні білки мембранних структур клітин

5) Еволюція ендокринної системи

1. Імовірно, ендокринна система хребетних розвивалася від бактеріальних сигнальних систем (позаклітинних і внутрішньоклітинних)
2. Імовірно, примітивна ендокринна передача сигналів – звільнення клітиною хімічних сигналів, які сприймаються граничними клітинами (паракринна передача сигналів).
3. Ендокринна система хребетних - унікальна система, аналогів її немає в живому світі

6) Який тип передачі сигналів відображено на рисунку 1



дистантний
паракринний
аутокринний

Класи гормонів. На основі молекулярної структури й синтезу розрізняють

2 класи гормонів: стероїдні й пептидні

Стероїдні гормони мають загального попередника - холестерин.

Стероїдні гормони синтезують і продукують гонади й кора надниркових залоз.

Синтез стероїдних гормонів з холестерину здійснюється в ендоплазматичному ретикулумі й мітохондріях ендокринних клітин

До синтезу стероїдних гормонів здатні всі клітини еукаріот

8) Особливості синтезу стероїдних гормонів

Стероїдні гормони не накопичуються у везикулах ендокринних клітин, які їх продукують
У міру синтезу вони дифундують у кровообіг
Стероїдні гормони розчинні в ліпідах і їхні рецептори розташовані внутрішньоклітинне відповідно до клітин - мішеней (цитоплазма або ядро)
Стероїдні гормони накопичуються у везикулах ендокринних клітин, які їх продукують

9) Особливості синтезу гормонів пептидів та білків

1. Гормони - пептиди вільно не проходять через мембрани клітин (подвійні шари ліпідів), їх розглядають як водорозчинні.
2. Рецептори для гормонів - пептидів знайдені на поверхні їхніх клітин-мішеней
3. Пептидні гормони здатні проникати через зовнішню мембрану клітин і там зв'язуються з відповідним рецептором

10) Гормони контролюють:

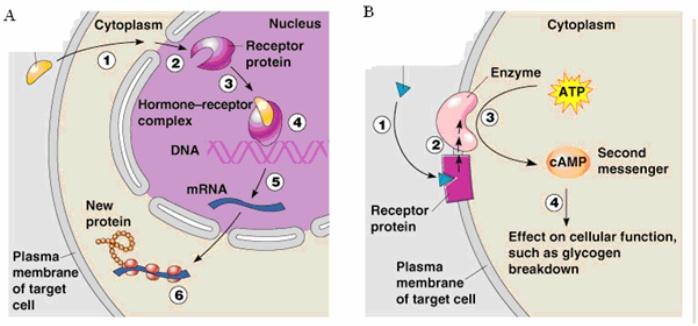
1. Ембріональний розвиток і диференціровку
2. Ріст клітин і рак
3. Метаболізм
4. Функцію серцево-судинної системи
5. Функцію нирок
6. Функцію кістякових м'язів
7. Репродуктивну функцію
8. Функцію імунного захисту
9. Функцію центральної нервової системи
10. Гормони контролюють тільки гомеостаз

11) Регуляторна дія стероїдних гормонів здійснюється таким шляхом:

1. Дифундують через плазматичну мембрану клітин-мішеней
2. Проникають у ядро
3. Зв'язуються зі специфічними білками ядра
4. Зв'язуються зі специфічним сайтом ДНК клітини
5. Активують гени й, як результат, – синтез нових білків
6. Стероїдні гормони мають рецептори на поверхні плазматичної мембрани клітин і Її дія реалізується відповідним чином

12) На якому з двох рисунків (А або В) відображено загальний

механізм дії гідрофільних гормонів?



13) Загальний алгоритм дії гідрофільних гормонів та цитокинів

1. Рецептори гідрофільних гормонів є як на мембрані, так і усередині клітин
2. Гідрофільні гормони зв'язуються з мембранним рецептором
3. Гормони не проникають у клітину
4. Зв'язування гормону ініціює активацію ефекторної молекули (ферменту)
5. Активна ефекторна молекула (фермент) каталізує утворення молекул другого посередника
6. Ініціюються додаткові внутрішньоклітинні зміни, що формують специфічну відповідь

14) Контроль секреції гормонів

1. Рівень гормонів у крові контролюється негативним зворотнім зв’язком
2. Секреція гормону припиняється при досягненні певного рівня його в крові
3. Зниження рівня гормону в крові стимулює підвищення його секреції
4. Рівень гормонів у крові контролює тільки рецепторний апарат клітин-мішеней

15) Етапи трансдукції сигналів з мембран, що опосередковані цАМФ

1. Гормональний сигнал (1-й посередник) зв’язується з рецептором плазматичної мембрани, який спряжений з G - білком

2. G- білок активізований, коли GTP витісняє GDP
3. G білки переміщаються уздовж мембрани (латеральна дифузія)
4. Активізують ефекторну молекулу фермент аденілілциклазу
5. активна аденілатциклаза каталізує утворення другого посередника - цАМФ із АТФ
6. cAMP як алостеричний ефектор активує протеїнкиназу А, що запускає каскад хімічних реакцій фосфорилування білків
7. Фосфоризовані білки або активуються, або інгібіруються
8. цАМФ є алостеричним ефектором протеїнкинази G
9. Зворотність реакцій фосфорилування визнають активовані з використанням того ж механізму фосфорилази

16) Специфічна відповідь клітини-мішені визначається

1. Зв'язуванням гормону з рецептором (перший обов'язковий крок)
2. Інші фактори
3. • Рівнем гормону в крові
4. • Кількістю рецепторів для гормону
5. Афінністю і специфічністю гормонального рецептора
6. Динамікою рецепторів – • клітина змінює рівень рецепторів при зміні рівня гормонів
7. збільшує при низом рівні й
8. скидає при високому рівні
9. Клітина не може регулювати кількість рецепторів

17) Взаємодія гормонів на рівні клітини-мішені

1. Пермісивна (що дозволяє) дія гормонів

– Одному гормону необхідна присутність іншого гормону, щоб забезпечити специфічний ефект
– Реалізація дії гормонів репродукції вимагає певного рівня гормонів щитовидної залози

2. Синергічна

– Посилення ефекту дії одного гормону дією іншого
Адреналін і глюкагон разом забезпечують кращий ефект звільнення глюкози печінкою, чим кожний окремо

3. Антагоністична

А) Присутність двох гормонів з однаковою спрямованістю на метаболізм робить менший ефект, чим кожний гормон окремо

Адреналін і глюкагон разом забезпечують знищуючий ефект звільнення глюкози печінкою, чим кожний окремо
В) - Один гормон опонує дії іншого
гормону
– Інсулін знижує рівень глюкози в крові, а глюкагон підвищує його
– Можлива конкурувати на рівні одного й того ж рецептору,
– Дія гормонів реалізується через різні метаболічні шляхи

18) Молекули, що зв'язують окремі гормони у тканих – мішенях:

1. Пептиди та гликоротеїни: рецептор на плазматичної мембрані, перенесення
Сигналу у клітину через сигнальний каскад, сигнальний шлях;
2. Стероїди: дифундують через мембрану, у цитоплазмі формують гормон-рецепторний комплекс, який переноситься в ядро
3. Похідні тирозину:
Катехоламіни – гідрофільні, взаємодіють із рецепторами мембран;
Тиреоїдні гормони дифундують у цитоплазму і формують гормон-рецепторний комплекс
4. Ейкозаноїди – гідрофобні, але мають рецептори на плазматичної мембрані клітин-мішеней
5. NO – газ, проникає через мембрани, але рецептора не має.
6. Ейкозаноїди як усі гідрофобні гормони мають рецептори в цитоплазмі

19) Рецептори гормонів

1) Пептиди, білки та ейкозаноїди мають рецептори на плазматичної мембрані клітин-мішеней
2) Стероїдні та тиреоїдні гормони мають рецептори в цитоплазмі клітин-мішеней
3) Оксид азоту (NO) не має рецепторів
4) Стероїдні гормони та оксид азоту мають спільні рецептори в цитоплазмі клітин-мішеней

20) Серед мембранних рецепторів виділяють такі:

1. Рецептори, що спряжені з іонними каналами
2. Рецептори, що спряжені з G-білками;
3. Рецептори, що спряжені з ферментативною активністю:

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

- цитоплазматичний домен рецептора – фермент
- цитоплазматичний домен рецептора активує фермент цитоплазми

4) Рецептори, що спряжені із транспортом сигнальної молекули в цитоплазму

21) Рецептор, сполучені з іонними каналами локалізовані

1. Переважно в нервовій системі й м'язах (нейротрансммітерні вентильні канали)
2. Ацетилхолінові вентильні катіонні канали.
3. 3) Ацетилхолін зв'язується з рецептором, змінює його конформацію.
4. Цей тип ацетілхолінових рецепторів широко представлений у м'язах
5. Цей тип рецепторів зустрічається у всіх тканинах

22)Яке стверджень помилкове?

1. Постсинаптичні *іонотропні* рецептори = рецептори, що спряжені с іонними каналами
2. Постсинаптичні метаботропні рецептори = рецептори, що спряжені з G- білками
3. Постсинаптичні рецептори спряжені тільки с іонними каналами

23) Особливості рецепторів, сполучених з G - білками

1. Представлені в клітинах усього організму
2. Утворять величезне сімейство, що має загальну структуру
3. Зв'язування ліганду з екстрацелюлярною частиною супроводжується зміною конформації інтрацелюлярної частини, яка взаємодіє з іншими білками (трансмембранна трансдукція сигналу)
4. Цей тип рецепторів представлений тільки в печінці й м'язах

24) G-білки – це

1. Гомотримери
2. Гетеротримери
3. До їхнього складу входять α-, β- та γ –субодиниці.
4. У неактивованому стані з α – субодиницею зв’язано GDP

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

5. Гідрофобні домени субодиниць – α – та γ- локалізовані у ліпідному шарі плазматичної мембрани

25) G-протеїни можуть

1. Активувати ферменти (Gαs і Gαq - протеїни)
2. Інгібірувати ферменти (Gαi - протеїни)
3. Активувати іонні канали (βγ - комплекс) ацетилхолінові рецептори, що є присутніми у нирках і серцевому м'язі
4. Інгібірувати транспорт катіонів у клітини мозку

26) Вимоги до других посередників

1. Низький рівень у клітині й короткий період напіврозпаду - дві обов'язкових властивості других посередників
2. Високий рівень у клітині й великий період напіврозпаду - дві обов'язкових властивості других посередників

27) Внутрішньоклітинні сигнальні каскади, що ініціюють G- білки

1. G- білок активує аденілатциклазу
2. Аденілатциклаза каталізує утворення цАМФ
3. Субстрат аденілатциклази – АТФ.Mg^{2+}
4. цАМФ – другий (внутрішньоклітинний) посередник
5. Субстрати аденілатциклази – АТФ.Mg^{2+} й білок, що фосфорилюється

28). цАМФ як другим посередник

1. має короткий період напіврозпаду
2. міститься в клітинах у низької концентрації
3. має тривалий період напіврозпаду

29). цАМФ як другий посередник

1. активує протеїнкиназу А (ПКА)
2. цАМФ активує ПКА як алостеричний позитивний ефектор
3. цАМФ активує ПКА шляхом фосфорилування

30). Активна ПКА каталізує

1. Фосфорилування залишків серину та треонину в білках цитоплазми або мембран

2. Фосфорилування білків цитоплазми або мембран – це процес переносу останньої групи фосфату з АТФ на гідроксильну групу серину та треонину.
3. Фосфорилування залишків тирозину в білках мембран

31) Трансдукція сигналів – це:
1. Зміна енергії сигналу та її переносників за участю рецепторів, ефекторних молекул, вторинних посередників, протеїнкиназ, активації протеїнів фосфорилуванням, відкриттям іонних каналі, шляхом зв'язування Са **2+.**
2. Посилення гормонального сигналу в клітині за участю великої кількості рецепторів мембран

32)Ампліфікація (посилення) сигналів із мембрани здійснюється головним чином
1. . Кількістю рецепторів на мембрані, що зв'язали гормон
2. участю в трансдукції сигналу ферментів, що генерують вторинні посередники
3. активацією другими посередниками ферментів протеїнкиназ

33)Фосфоліпаза С як ефекторна молекула
1. Фосфоліпаза С – мембранний фермент, його активація цитоплазматичними сигналами не можлива
2. Фосфоліпаза С активується G- білками, яки спряжені з рецепторами до катехоламінів, тиреотропного гормону, окситоцину, антидіуретичного гормону
3. Субстрат фосфоліпази С – фосфоінозитолфосфатиди мембран клітин
4. Продукти каталітичної дії фосфоліпази С – вторинні посередники діацилгліцерол (ДАГ) та інозитолтрифосфат (ІФ3)
5. ДАГ – алостеричний позитивний ефектор протеїнкинази С (ПКС)
6. ІФ3 – алостеричний ефектор кальцієвих каналів ЕПР, визначає звільнення іонів кальцію в цитоплазму
7. Іони кальцію - треті посередники; окремо та в комплексі з кальмодуліном посилюють активацію ПКС

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

34) Субстрати ПКС

1. Ras- білки – проліферація, диференціровка, трансформація клітин, смерть
2. Цитоплазматичні фактори транскрипції – проліферація, диференціровка, експресія генів, синтез білків
3. Фактори мітохондрій, що ініціюють апоптоз
4. Ферменти, що прискорюють катаболізм глюкози та жирних кислот

35 Рецептори цитокинів – це

1. Внутрішньоклітинне сімейство JAK білків
2. Інтегральні білки мембран, яки містять не менш як чотири домена: екстрацелюлярний, трансмембранний, цитоплазматичний та регуляторний
3. Структура екстра целюлярного домена відповідає конформації цитокинів
4. Цитоплазматичний домен спряжений з JAK білками
5. JAK білки – тирозинкинази, яки автоактивуються при рецепції цитокинів.
6. JAK –кинази каталізують ланцюг фосфорилування STAT-білків (стимулятори транскрипції та активації сигналів)
7. Останні визначають активацію транскрипції

36) Білки, які модифікуються при активації сигнального шляху й змінюють поведінку клітини, називають

1. Ефекторні білки
2. Білки мішені

37) Білками-мішенями можуть бути:

1. Регулятори генів,
2. іонні канали,
3. Компоненти метаболічних шляхів,
4. Частини цитоскелету та ін.
5. Внутрішньоклітинні рецептори гідрофобних гормонів

38) NO – як сигнальна молекула

1. Газ NO синтезується в тканинах шляхом дезамінування амінокислоти аргініну, яке каталізує ензим *NO - синтаза й виконує роль другого посередника*

2. Твердження про утворення NO в тканинах – велика помилка біохіміків 20 століття
3. Завдяки швидкому проходженню через мембрани, розчинений NO швидко дифундує із клітин, де утворився, у сусідні клітини.
4. Він діє лише локально, оскільки має короткий період напівжиття (близько 5–10 с) у позаклітинному просторі й швидко перетворюється до нітритів і нітратів під дією кисню та води.
5. У багатьох клітинах-мішенях, включно з ендотеліальними, NO зв'язується із залізом в активному центрі ензиму *гуанілілциклази,* стимулюючи його до утворення низькомолекулярного внутрішньоклітинного медіатора *циклічного GMP*
6. Ефекти NO можуть наступати за кілька секунд, оскільки нормальна швидкість кругообігу циклічного GMP є високою: швидка його деградація до GMP фосфодіестеразою постійно врівноважує його утворення з GTP гуанілатциклазою.
7. Препарат Віагра інгібірує фосфодіестеразу циклічного GMP у статевому члені, збільшуючи час, впродовж якого рівень циклічного GMP залишається підвищеним після індукції утворення NO локальними нервовими закінченнями.
8. Циклічний GMP, у свою чергу, утримує кровоносні судини релаксованими й відбувається ерекція.

***39). Моноксид вуглецю (CO)* як внутрішньоклітинний сигнал діє**

1. Монокосид вуглецю – чадний газ, він не може бути внутрішньоклітинним сигналом
2. Стимулює гуанілілциклазу, шляхом зв'язування із залізом у її складі

40) Стероїдні гормони, тиреоїдні гормони, ретиноїди *й* вітамін D як сигнальні молекули об'єднує

1. Хімічна структура,
2. Функції,
3. Механізм дії

41) Стероїдні гормони, тиреоїдні гормони, ретиноїди *й* вітамін D як сигнальні молекули мають такий механізм дії

1. Рецептори локалізовані внутрішньоклітинне, структурно споріднені й належать до надродини ядерних рецепторів.
2. Сигнальні молекули зв'язуються зі своїми

рецепторними білками й активують їх,

3. Активовані рецептори зв'язуються із ДНК і регулюють транскрипцію специфічних генів.

4. Рецептори стероїдних, тиреоїдних гормонів локалізовані в цитоплазмі, а в ретиноїдів і вітаміну D на плазматичної мембрані, тому вони мають різний механізм дії

***42) Рецептори, сполучені з ензимами* після своєї активації**

1. Ці рецептори відносяться до серпантинових рецепторів

2. Самі функціонують, як ензими

3. Безпосередньо зв'язані з ензимами й активують їх

4. Утворені однопрохідними трансмембранними білками

5. Ліганд - зв'язуючий сайт розташований поза межами клітини, а каталітичний або ензим-зв'язуючий сайт — усередині клітини.

6. За структурою сполучені з ензимами рецептори є гетерогенними

7. Більшість із них є тирозиновими протеїнкіназами або асоційовані з ними,

8. Зв'язування ліганду цими рецепторами ініціює фосфорилювання специфічних наборів білків у клітині-мішені

43) Великими молекулами в механізмах трансдукції сигналів є внутрішньоклітинні сигнальні білки

1. *Білки-передавачі* просто передають сигнал до наступного компонента в ланцюгу.

2. *Білки-месенджери* переносять сигнал від однієї частини клітини до іншої, наприклад, від цитозолю до ядра.

3. *Адапторні білки* сполучають один сигнальний білок з іншим, але самі не передають сигналу.

4. *Білки-ампліфікатори*, переважно ензими або іонні канали, значно посилюють отриманий сигнал, утворюючи великі кількості малих внутрішньоклітинних медіаторів, або, активуючи численні внутрішньоклітинні сигнальні білки, низхідні в сигнальному шляху. Якщо в ланцюгу передачі сигналу є багато стадій посилення, то його часто називають сигнальним каскадом**.**

5. *Білки-трансдуктори* перетворюють сигнал в іншу

форму. Прикладом є ензим, який утворює циклічний АМР: він одночасно перетворює сигнал і посилює його, діючи одночасно як ампліфікатор і трансдуктор.

6. *Білки-розгалужувачі* поширюють сигнал з одного сигнального шляху на інший.

7. *Білки-інтегратори* отримують сигнали від двох, або більше сигнальних шляхів та інтегрують їх перед тим, як передати далі.

8. *Латентні білки-регулятори генів* активуються рецепторами на поверхні клітини, і мігрують до ядра, щоб стимулювати там транскрипцію генів.

9. Інтегральні білки мембран

10. *Скефолд-білки* — це білки-адаптори й/або якорі, які зв'язують багато сигнальних білків разом у функціональному комплексі, і часто забезпечують його специфічне розташування

44) **Як клітини можуть регулювати свою чутливість до сигналу (шляхи десенситізації рецепторів)?.**

1. Зв'язування лігандів поверхневими рецепторами може індукувати ендоцитоз останніх і їхнє тимчасове замикання в ендосомах.

2. Індукований лігандом ендоцитоз рецепторів може зумовлювати їхнє руйнування в лізосомах. Цей процес називається *негативною регуляцією рецепторів.*

3. Швидка інактивація рецепторів у результаті їхнього фосфорилювання.

4. Змінами білків, задіяними в передачі сигналу

5. Утворенням інгібітора, який блокує процес трансдукції

6. Клітини не можуть регулювати свою чутливість до сигналу. Регуляція відбувається на рівні контролю концентрації

45) **Ca^{2+}-зв'язуючи білки клітин евкаріот**

1. Біля 100 білків
2. Кальмодулін
3. Тропонін С
4. Міозин
5. Кальсеквестрин

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

6. Кальрегулін

46) Кальмодулін

1. У всіх евкаріотичних клітинах міститься близькоспоріднений Ca^{2+}-зв'язуючий білок кальмодулін
2. Передавач Ca^{2+}-сигналів у цитозолі
3. Комплекс Са $^{2+}$– кальмодулін – фермент
4. Кальмодулін функціонує як багатоцілевий Ca^{2+}-рецептор, який опосередковує численні процеси, що регулюються Ca^{2+}.
5. Для набуття кальмодуліном активної конформації необхідне зв'язування двох або більше іонів Ca^{2+}
6. Відповідь білка на збільшення концентрації Ca^{2+} відбувається за типом перемикача

47) Ca^{2+}/кальмодулін-залежні протеїнкінази

1. Родина киназ, активність яких контролює комплекс Ca^{2+}-кальмодулін
2. Ці ферменти перетворюють Ca^{2+} сигнал у сигнал фосфорилування
3. Ca^{2+}-кальмодулін чутлива аденілатциклаза

48) До внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що починаються з мембранного рецептора відносяться

1. Шляхи, що опосередковані комплексом гормон-рецептор
2. цАМФ – опосередковані шляхи
3. цГМФ - опосредковані шляхи
4. цГМФ - і NO - опосередковані шляхи
5. Шляхи, що опосередковані ДАГ та ІФ3
6. Шляхи, що опосередковані білком Ras
7. Шляхи, опосередковані JAK

49) Особливості внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, яки опосередковані цГМФ (незалежними від NO), активує натрій уретичний фактор.передсердя – антагоніст альдостерону

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

1. Відсутність трансміттерного білка: рецептор і фермент, що утворює другий посередник – домени одного білка
2. Рецепторний домен гуанілілциклази експонований на зовнішній стороні мембрани, каталітичний - на внутрішній.
3. Каталітичний домен гуанілілциклази називають мембранозв'язанною гуанілілциклазою (МГЦ).
4. Активна МГЦ каталізує утворення цГМФ. Гідроліз цГМФ здійснює фосфодіестераза цГМФ.
5. Каталітичний домен гуанілілциклази називають розчинною гуанілілциклазою (МГЦ)
6. цГМФ алостеричний ефектор ПКG.

50) Особливості розчинної гуанілілциклази

1. Міститься в цитоплазмі
2. Активується NO
3. Активується G-білками
4. Каталізує утворення цГМФ

51) Який внутрішньоклітинний сигнальний шлях включає трьох ферментів: NO синтазу, розчинну гуанілілциклазу, та протеїнкиназу G?

1. Такий шлях не відомий
2. цГМФ- NO – опосередкований шлях

6 ЕТАЛОНИ ВІРНИХ ВІДПОВІДЕЙ

Питання	1	2	3	4	5	6	7
Відповідь	7	3	1	3	3	1	4
Питання	10	11	12	13	14	15	16
Відповідь	10	6	B	1	4	8	9
Питання	19	20	21	22	23	24	25
Відповідь	4	4	5	3	4	1	4
Питання	28	29	30	31	32	33	34
Відповідь	3	3	3	2	1	1	4
Питання	37	38	39	40	41	42	43
Відповідь	5	2	1	3	4	1	9
Питання	46	47	48	49	50	51	
Відповідь	3	3	1	5	3	1	

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

7 **ЛІТЕРАТУРА**

Основна:

1. Molecular biology of the cell / Alberts, B. (Bruce Alberts) ... [et al.] -- 4th ed. -- NewYork: Garland, 2002 – P.338–393.
2. Алешин Б. В., Юрина Н. А., Афанасьев Ю. И. Эндокринная система (эндокринные железы). В кн.: Гистология (под ред. Ю. И. Афанасьева и Н. А. Юриной). М.: Медицина, 1999 – С. 476-513.
3. Белясова Н.А.Биохимия и молекулярная биология: Учебное пособие для вузов.- М.: 2004.- 416 с.
4. Вайнтрауб Б. Д. Молекулярная эндокринология. М.: Медицина, 2003. – 467 с.
5. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д. Введение в теорию рецепторов. Минск: Наука и техника, 1986. – 199 с.
6. Дамбинова С. А., Каменская М. А. Молекулярные механизмы передачи импульса в мембранах нейронов. Ионные каналы, рецепторы. В кн.: Нейрохимия (под ред. И. П. Ашмарина и П. В. Стукалова). М.: НИИБМХ, 1996. – С. 246-295.
7. Дятловицкая Э. В., Безуглов В. В. Липиды как биоэффекторы. Введение //Биохимия, 1998. – 63. С. 3-5. 1.
8. Зинченко В.П. Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. – Пущино, Электронное издательство "Аналитическая микроскопия", 2003.– Сайт "Русское Поле Экспериментов.
9. Каменская М. А. Синаптическая передача. Медиаторы. В кн.: Нейрохимия (под ред. И. П. Ашмарина и П. В. Стукалова). М.: НИИБМХ, 1996.– С. 207-245.
10. Когтева Г. С, Безуглов В. В. Ненасыщенные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы//Биохимия. - 1998. – Т.63. – С. 6-15.
11. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб.: С.Петерб. ун-та, 2003 – 208 с.

12. Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.:МИА. 2003. – С. 301 – 403
13. Пальцев М. А., Иванов А. А. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина, 1995, 224 с.
14. Пішак В. П., Бажора Ю. Медична біологія. - Київ, - Нова книга, 2004 – 656 с.
15. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М. : МАИК "Наука / Интерпериодика",- 2002. – 446 с.

Додаткова:

1. Башкатова В. Г., Раевский К. С. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата//Биохимия, 1998. – 63. С. 1020-1028.
2. Безуглов В. В., Бобров М. Ю., Арчаков А. В. Биоактивные амиды жирных кислот//Биохимия, 1998.– Т. 63. – С. 27-37.
3. Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути//Биохимия, 1998. 63.– С. 966-975.
4. Ванин А. Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований// Биохимия, 1998. – 63. С. 867-869.
5. Волин М. С. и др. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия, 1998. – 63.– С. 958-965.
6. Горский А. К. Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота // *Б*иохимия, 1998. Т. 63. С. 870-880.
7. Страйер Л. Биохимия. М.: Мир, 1985. Т. 2, 3.
8. Ткачук В. А. Фосфоинозитидный обмен и осцилляция ионов Ca^{2+} // *Биохимия,* 1998, 63. С. 47-56.
9. Уайт А. и др. Основы биохимии. М.: Мир, 1982. Т. 2, 3. С. 541-1878.
10. Шпигель С. и др. Роль сфингозин-1-фосфата в росте, дифференцировке и смерти клеток // Биохимия, 1998. – Т.63. –

42This document was created by Unregistered Version of Word to PDF Converter

С. 83-88.
11. Тэйлор Б. С, Аларсон Л. Х., Биллиар Т. Р. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции // Биохимия,1998. – Т. 63. – С. 905-923.
12. Реутов В. П., Сорокина Е. Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия, 1998. – Т. 63.– С. 1029-1040.

42This document was created by Unregistered Version of
Word to PDF Converter

Навчальне видання
(українською мовою)
Омельянчик Людмила Олександрівна, Колісник Надія Василівна

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ГОРМОНАЛЬНОЇ ТА ЦИТОКІНОВОЇ РЕГУЛЯЦІЇ

Навчальний посібник для студентів
вищих навчальних закладів

Редактор
Технічний редактор
Коректор