



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Введение в рецепторологию

**организация и функционирование
клеточного рецепторного аппарата, основные
рецепторные функциональные системы**

Рецептор

макромолекулярный комплекс, способный специфически взаимодействовать с определенными эндо- и экзогенными веществами и приводить к определенному ответу клетки-эффектора

Общие свойства рецепторов

- Лигандсвязывающие свойства
- Конформационная изменяемость
- Олигомеризация (характерно для ряда классов рецепторов)
- Десенситизация

Основные классы сигнальных соединений (эндогенных лигандов)

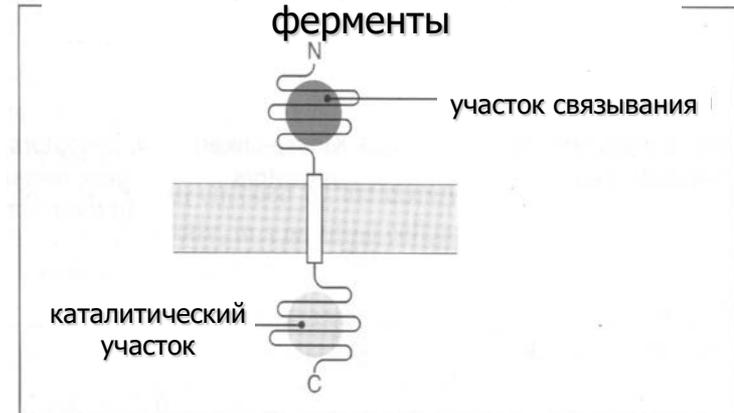
- Липиды (стероидные гормоны, ретиноиды, эйкозаноиды, фосфолипиды)
- Производные аминокислот (катехоламины, ГАМК, мелатонин и др.)
- Нуклеотиды (аденозин, АТФ, АДФ)
- Пептиды и белки (окситоцин, вазопрессин, либерины, статины, мотилин, глюкагон, ВИП и др.)

Рецепторные семейства

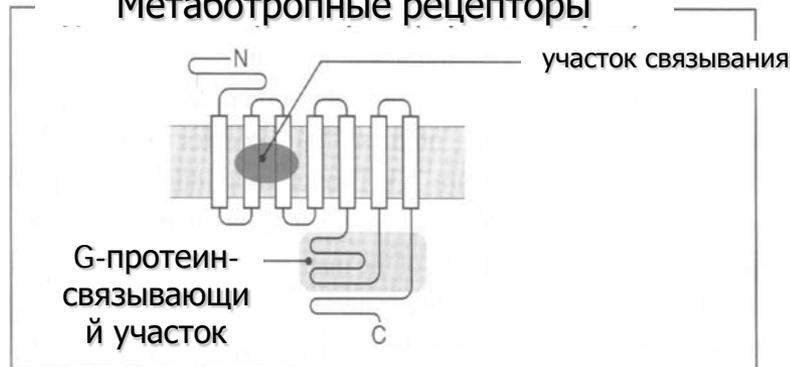
Ионотропные рецепторы



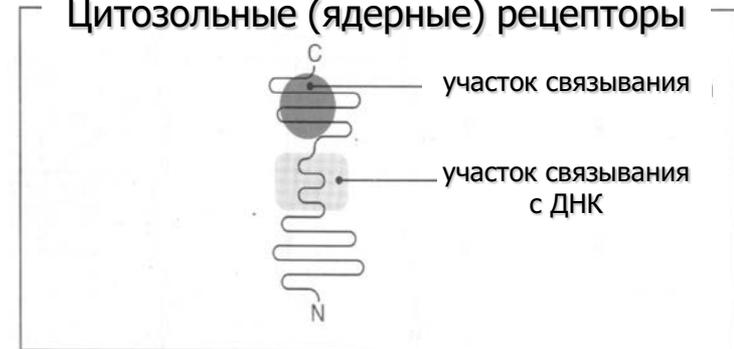
Рецепторы – трансмембранные ферменты



Метаботропные рецепторы



Цитозольные (ядерные) рецепторы

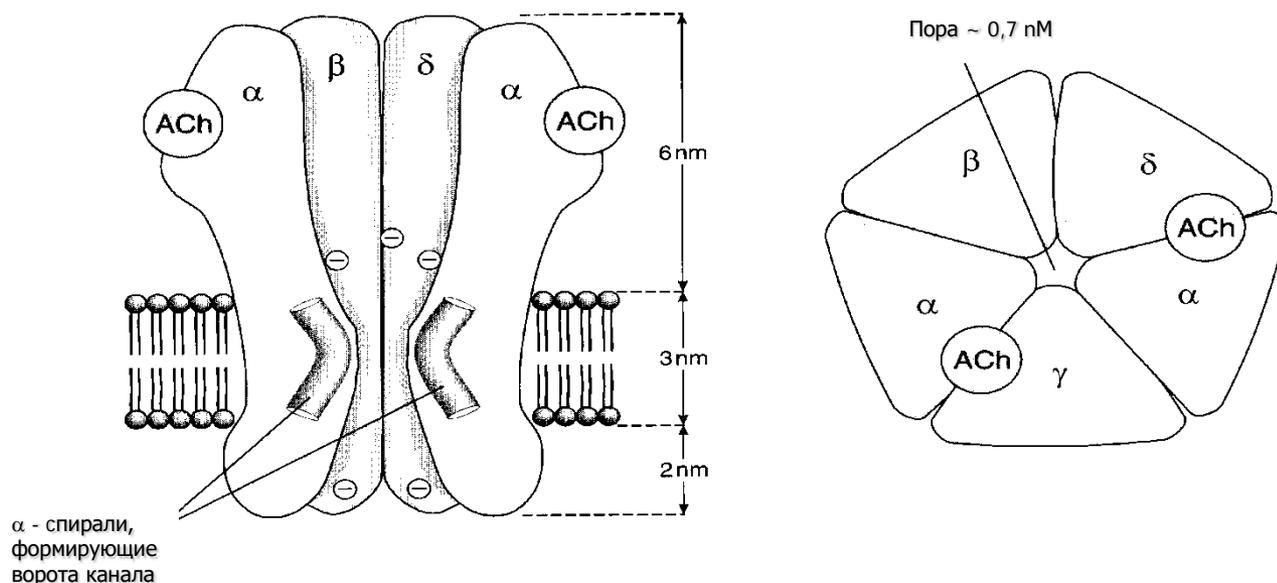


Ионотропные рецепторы

Мембранные рецепторно-канальные ансамбли. Активируются медиаторами, действующими исключительно на наружную поверхность клеточной мембраны.

- **Катионные**
- **Анионные**
- **Селективные**
- **Неселективные**

Строение ионотропных рецепторов



Строение Н-холинорецептора

Являются олигомерами, состоящими в большинстве случаев из 5 белковых субъединиц, формирующих центральный (внутренний) ион-проводящий канал (ионную пору)

СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Суперсемейство Cys-петлевых рецепторов

Рецептор	Ион-проводящий канал	Эндогенный активатор
GABA _A	Cl ⁻	ГАМК
GABA _C	Cl ⁻	ГАМК
Gly	Cl ⁻	Глицин
Н-холинорецептор	Na ⁺ , Ca ²⁺	Ацетилхолин
5-HT ₃	Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺	Серотонин

СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Суперсемейство глутаматных рецепторов

Рецептор	Ион-проводящий канал	Эндогенный активатор
NMDA	Na ⁺ , Ca ²⁺	N-метил-D-аспартат
AMPA	Na ⁺ , Ca ²⁺	α -Амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота (квисквалат)
Ka	Na ⁺ , Ca ²⁺	Каиновая кислота

Суперсемейство пуриновых рецепторов

Рецептор	Ион-проводящий канал	Эндогенный активатор
P2X ₁ – P2X ₇	Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺	АТФ, АДФ

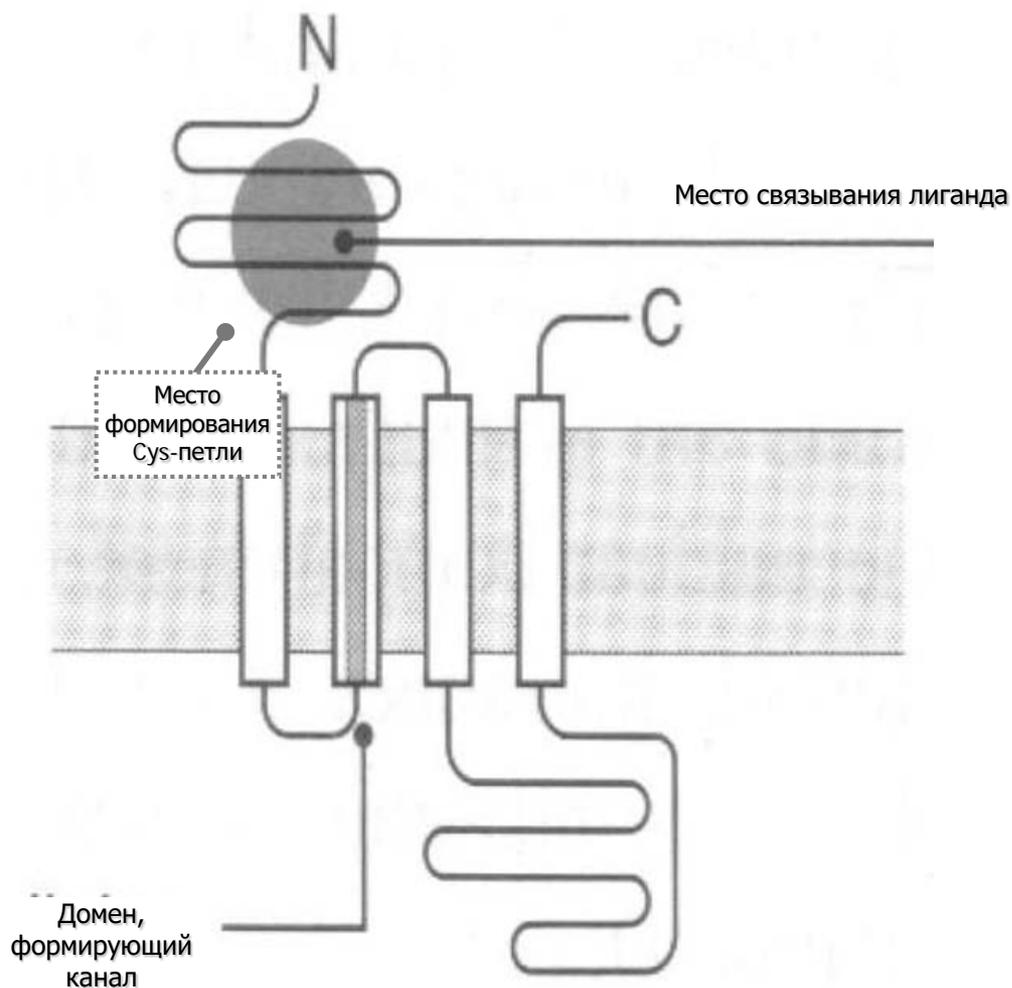
Строение Cys-петлевых рецепторов

Топология субъединицы N-холинорецептора

Каждая субъединица образует 4 трансмембранных сегмента (домена). Внеклеточно расположены С-концевая терминаль и N-концевой участок полипептидной цепи.

Внутренняя выстилка ионной поры формируется 2-ми трансмембранными доменами субъединиц

Характерной особенностью экстраклеточной N-концевой цепи для данного суперсемейства, является наличие петли, образуемой дисульфидной связью между двумя остатками цистеина.



Принципы функционирования ионотропных рецепторов

Агонист (**A**) обеспечивает функциональное объединение агонист-связывающего модуля (**R**) и ион-проводящего канала (**Ch**) в трехкомпонентный комплекс (**ACh**), который минуя неактивное состояние переходят в активированное (*****):

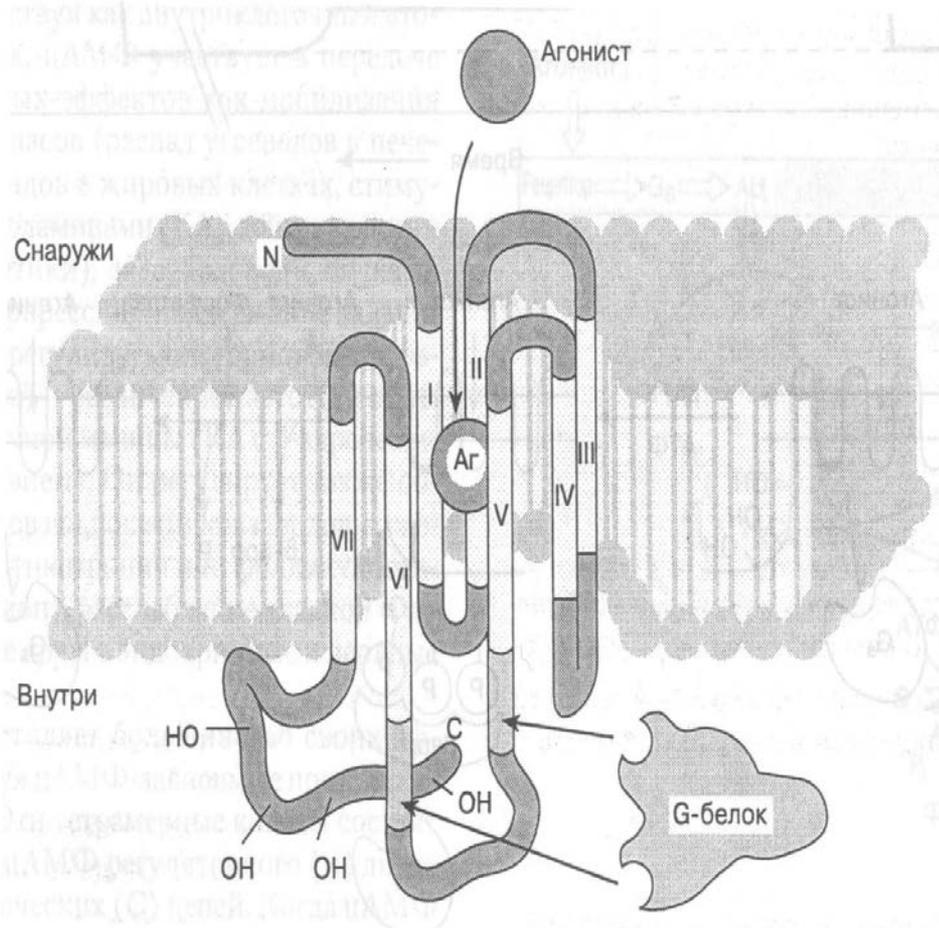


При активации, комплекс агонист-рецептор-канал переходит из закрытого состояния **ARCh** в состояние с малой пропускной способностью канала (**S***), затем со средней (**M***), а затем в полностью открытое состояние с тах ионным током (**L***):



При деактивации канал проходит обратно все стадии.

Строение метаботропных (G-белок-сопряженных) рецепторов



Лиганд-связывающий компонент рецепторной системы или собственно рецептор, представляет собой полипептидную цепь, пронизывающую плоскость мембраны 7 раз (7 трансмембранных доменов). N-конец полипептидной цепи расположен внеклеточно, а С-терминаль – внутриклеточно. Агонист связывается с сайтом, окруженным трансмембранными участками рецепторного белка. G-протеин взаимодействует с внутриклеточными сегментами рецептора, в области цитоплазматической петли между V и VI ТМ доменами.

G-белки и их эффекторы

Тип G-белка	Эффектор и сигнальный путь
G_s	↑ Аденилатциклаза ↑ цАМФ
$G_{i(1,2,3)}$	↓↓ Аденилатциклаза ↓ цАМФ
G_{olf} (обонятельный эпителий)	↑ Аденилатциклаза ↑ цАМФ
G_o	Ионные каналы
G_q	↑ Фосфолипаза C ↑ Инозитолтрифосфат ↑ Диацилглицерол
$G_{t1,t2}$ (рецепторы для фотонов)	↑ Фосфодиэстераза цГМФ ↓ цГМФ

Принципы функционирования G-белок-сопряженных рецепторов

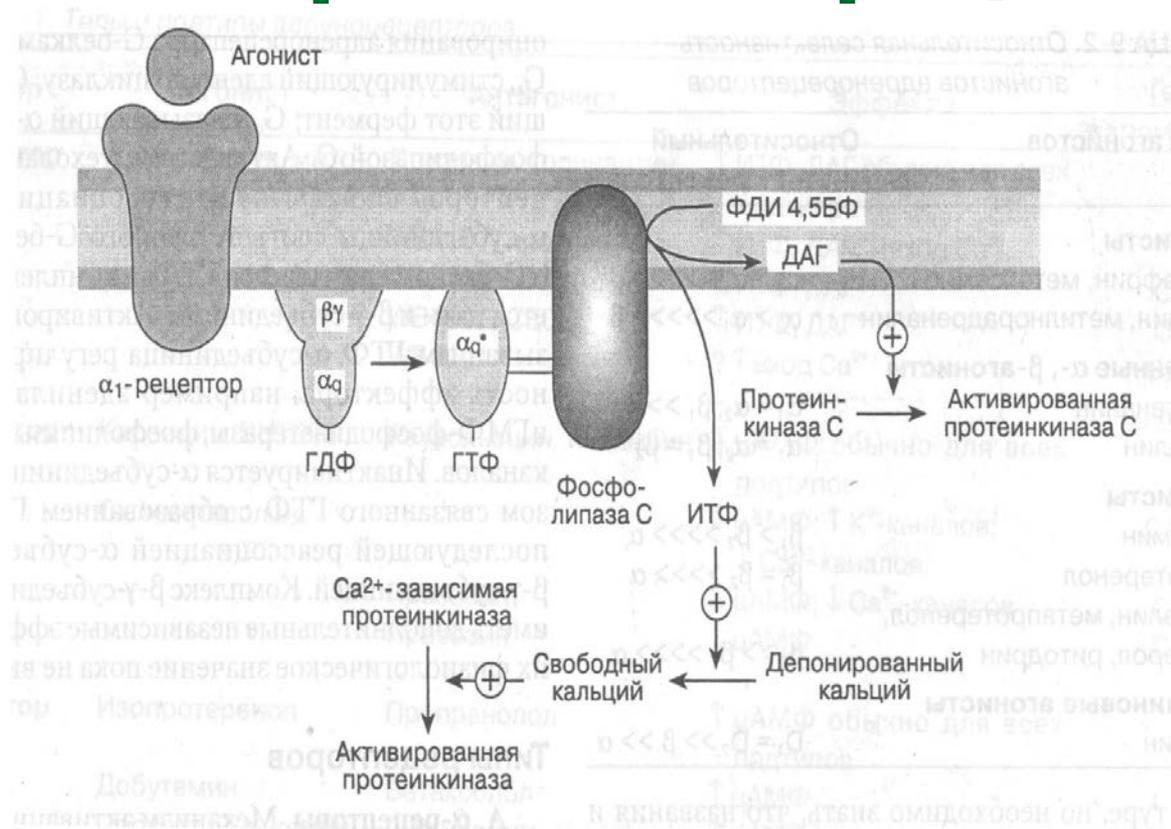


Схема активации G_q-протеин сопряженного рецептора (α_1 -адренорецептора)

Принципы функционирования G-белок-сопряженных рецепторов

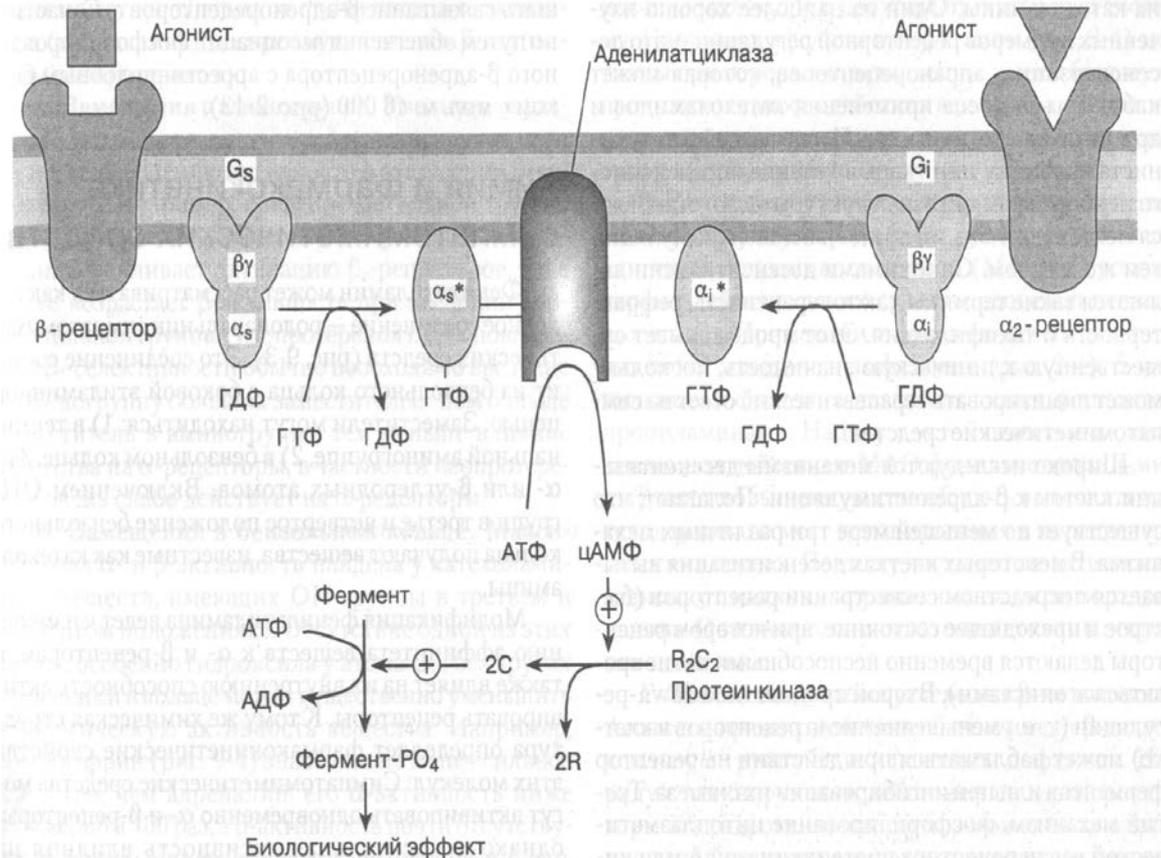
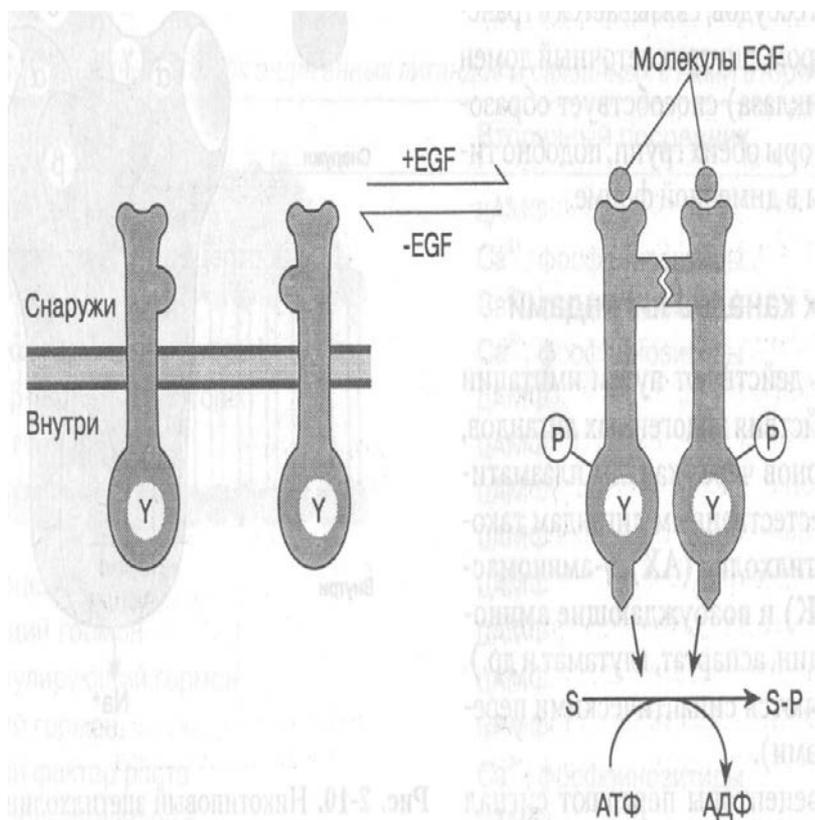


Схема активации G_i и G_s -протеин сопряженных рецепторов (β - и α_2 -адренорецепторов)

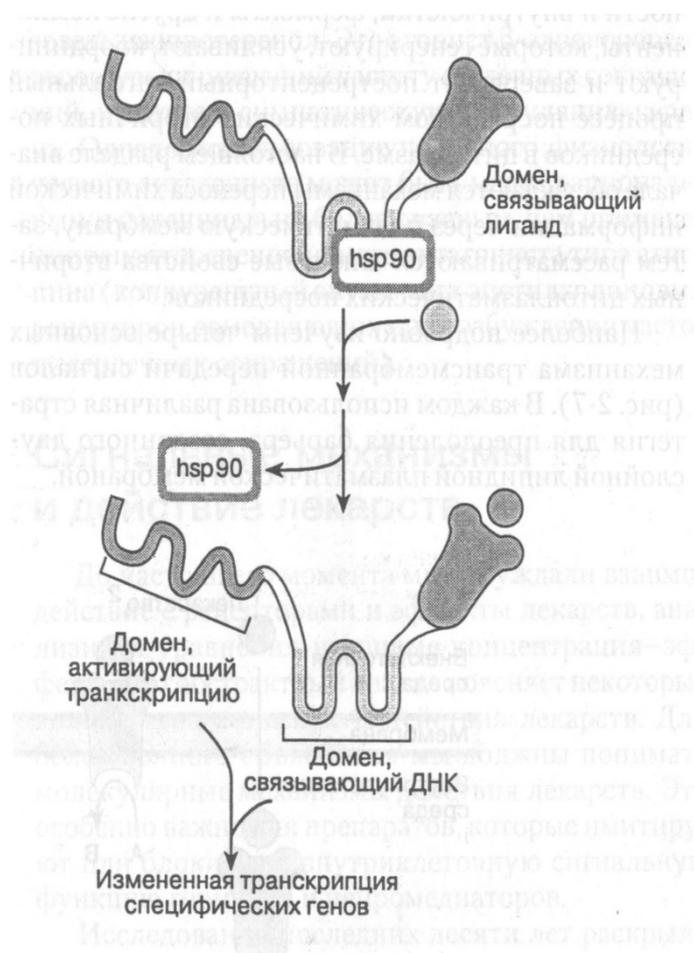
Строение и принципы функционирования рецепторов – трансмембранных ферментов



- Состоят из двух полипептидов, содержащих внеклеточный домен и цитоплазматический домен с ферментативной активностью (протеинкиназа - тирозин-, серинкиназа, гуанилатциклаза).
- После связывания активатора с внеклеточными доменами, рецептор переходит из неактивного мономерного в активное димерное состояние, при котором два рецепторных полипептида объединяются с помощью нековалентной связи в плоскости мембраны.
- Цитоплазматические домены фосфорилируются (P) в области специфического тирозинового остатка (Y) и стимулируется их ферментативная активность. В результате происходит фосфорилирование субстратного белка (S).

Строение и принципы функционирования цитозольных (ядерных) рецепторов

- Состоит из домена, связывающего лиганд, домена, связывающего ДНК и домена активирующего транскрипцию.
- В отсутствие активатора, рецептор связан с hsp 90-протеином, который нарушает нормальную упаковку рецептора.
- Активирующий лиганд, проникая через мембрану, связывается с соответствующим доменом рецептора и вызывает высвобождение hsp 90 белка.
- Это позволяет доменам связывающим ДНК и активирующим транскрипцию перейти в функционально-активную конформацию.
- Домен, связывающий ДНК содержит 2 петли с которыми ассоциированы атомы Zn (т.н. цинковые «пальцы»). Данными участками рецептор присоединяется к спирали ДНК, а домен, активирующий транскрипцию, вызывает повышение активности РНК-полимеразы, что приводит к продукции специфических РНК.



Основные методы изучения рецепторной активности химических соединений

Особенности рецепторного скрининга

- **Мишень - вариабельность рецепторных семейств**
- **Часто неотъемлемое взаимодействие с мембраной клетки**
- **Особенность димерных структур и ионотропных рецепторов**
- **Вариабельность возможного взаимодействия с рецептором**
- **Вариабельность типа фармакологического действия**
- **Кинетика взаимодействия**

Основные группы методов для детекции рецепторного действия

- **Основанные на флуоресцентных методах детекции**
- **Радиоизотопные**
- **Основанные на изменении конечного фармакологического ответа**

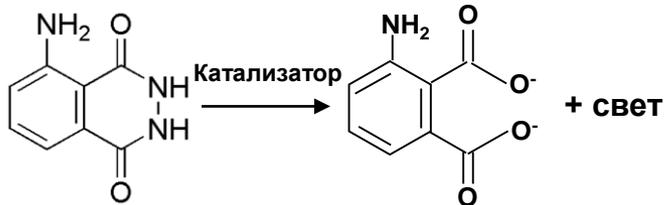
Люминесценция

Люминесценция – излучение света веществом, несвязанное с поглощением света



Хемилюминесценция

Люминол окисляется пероксидом водорода в присутствии гемоглобина



Люминол

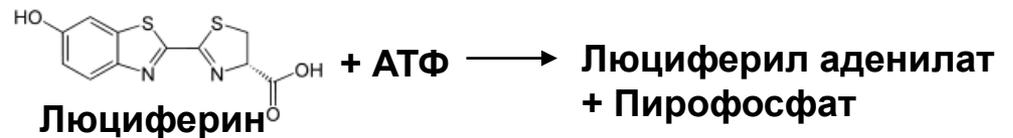
Оксисленный дианион 3-аминофталевой кислоты



Биолюминесценция

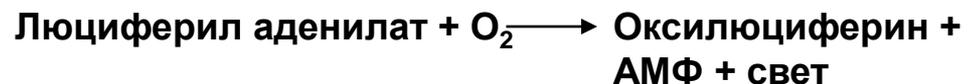
Свечение самки светлячка *Lampyris noctiluca*

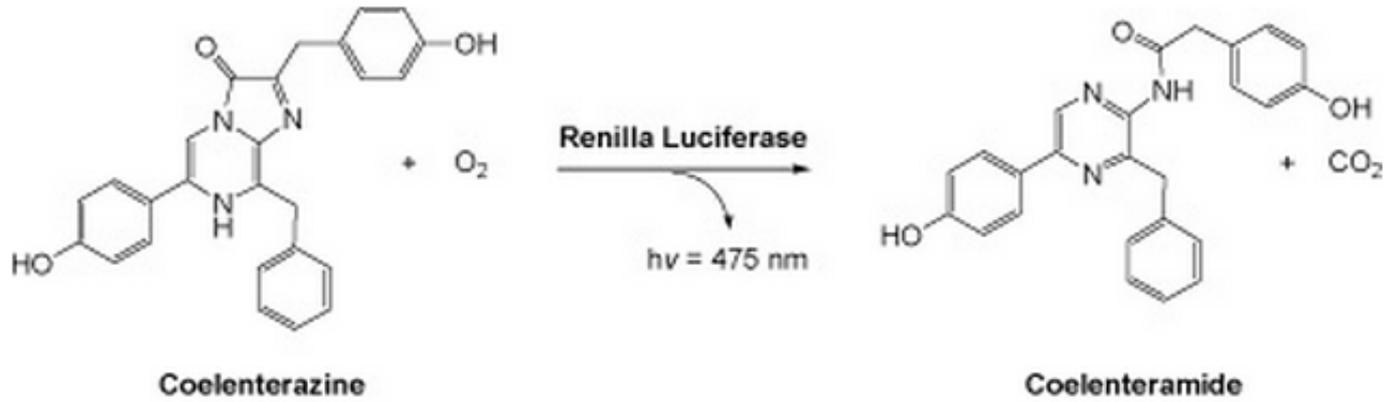
Катализируемая люциферазой реакция:



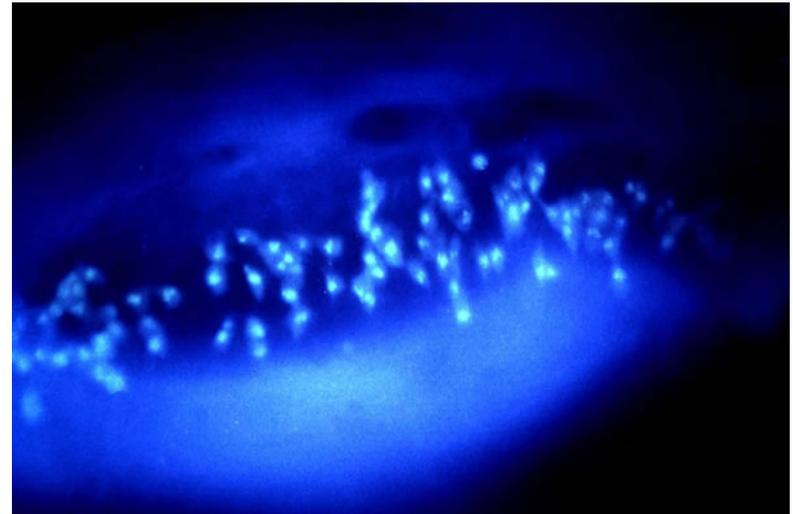
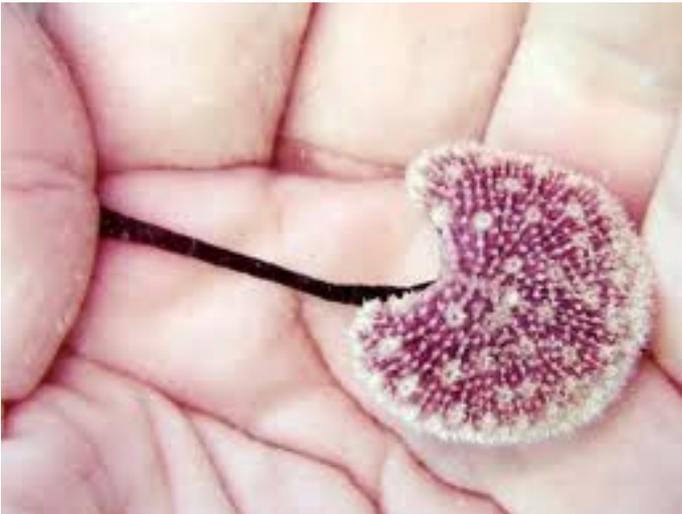
Люциферин

Люциферил аденилат + Пирофосфат





Коралл *Renilla reniformis*.
Продуцент люциферазы, синий
спектр

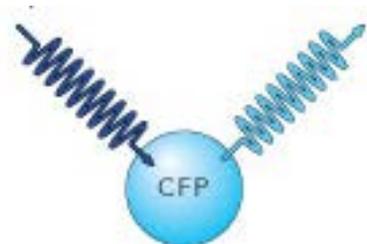


FRET

Förster (флуоресцентный) резонансный
перенос энергии (FRET) между
люминесцирующим *ДОНОРОМ* и
флуоресцирующим *акцептором*.

Принцип флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET)

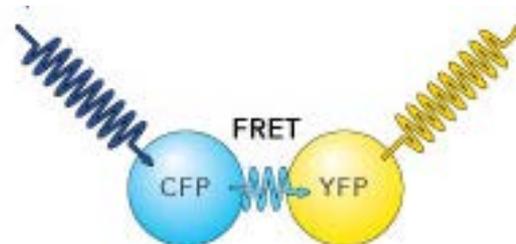
Источник
света



ДОНОР

АКЦЕПТОР

Источник
света



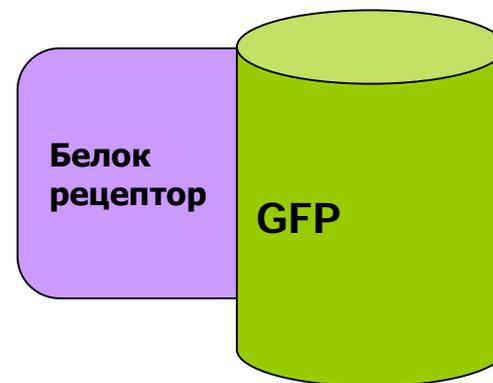
Резонансный
перенос энергии

FRET возможен только когда донор и акцептор сближены в пространстве

Белки А и В не взаимодействуют

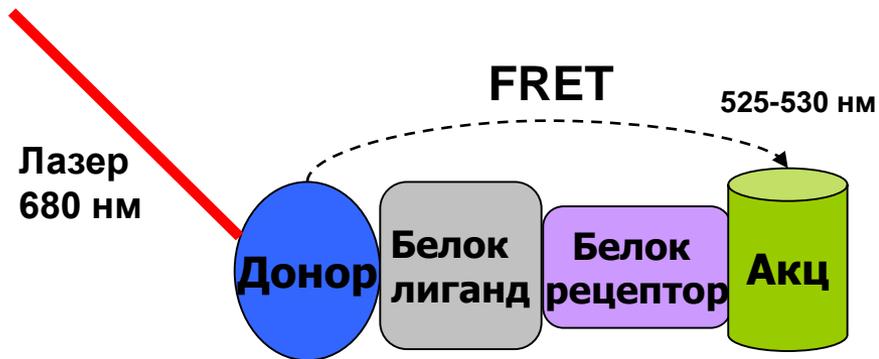


ДОНОР



АКЦЕПТОР

Белки А и В взаимодействуют

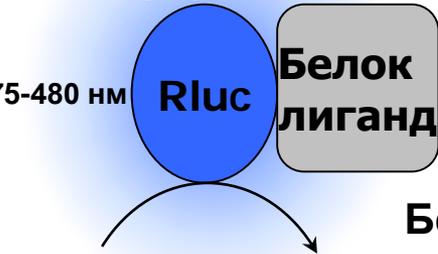


BRET

Биолюминисцентный резонансный перенос энергии (BRET) между люминесцирующим *ДОНОРОМ* и флуоресцирующим *акцептором*.

Биолюминесцентно-резонансный перенос энергии (BRET)

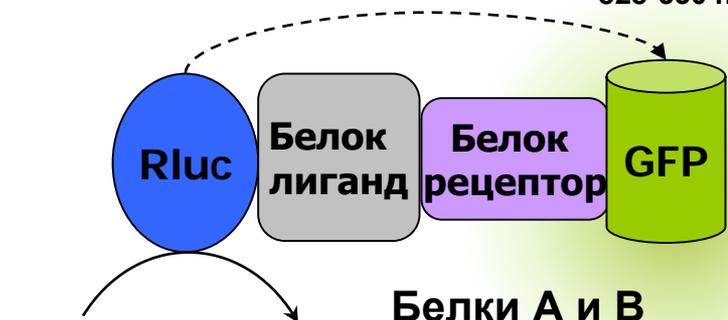
Люцифераза



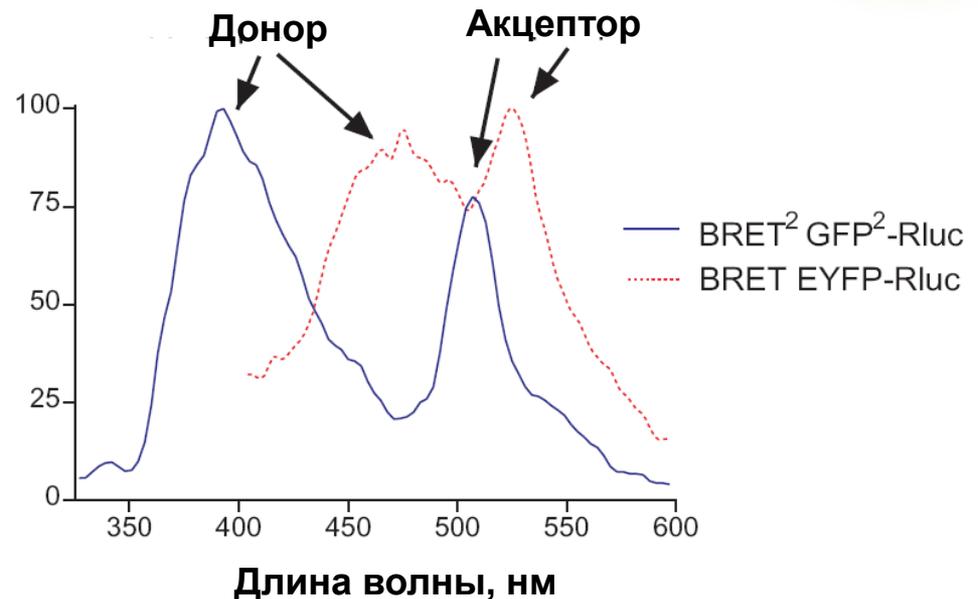
Белки А и В не взаимодействуют

BRET

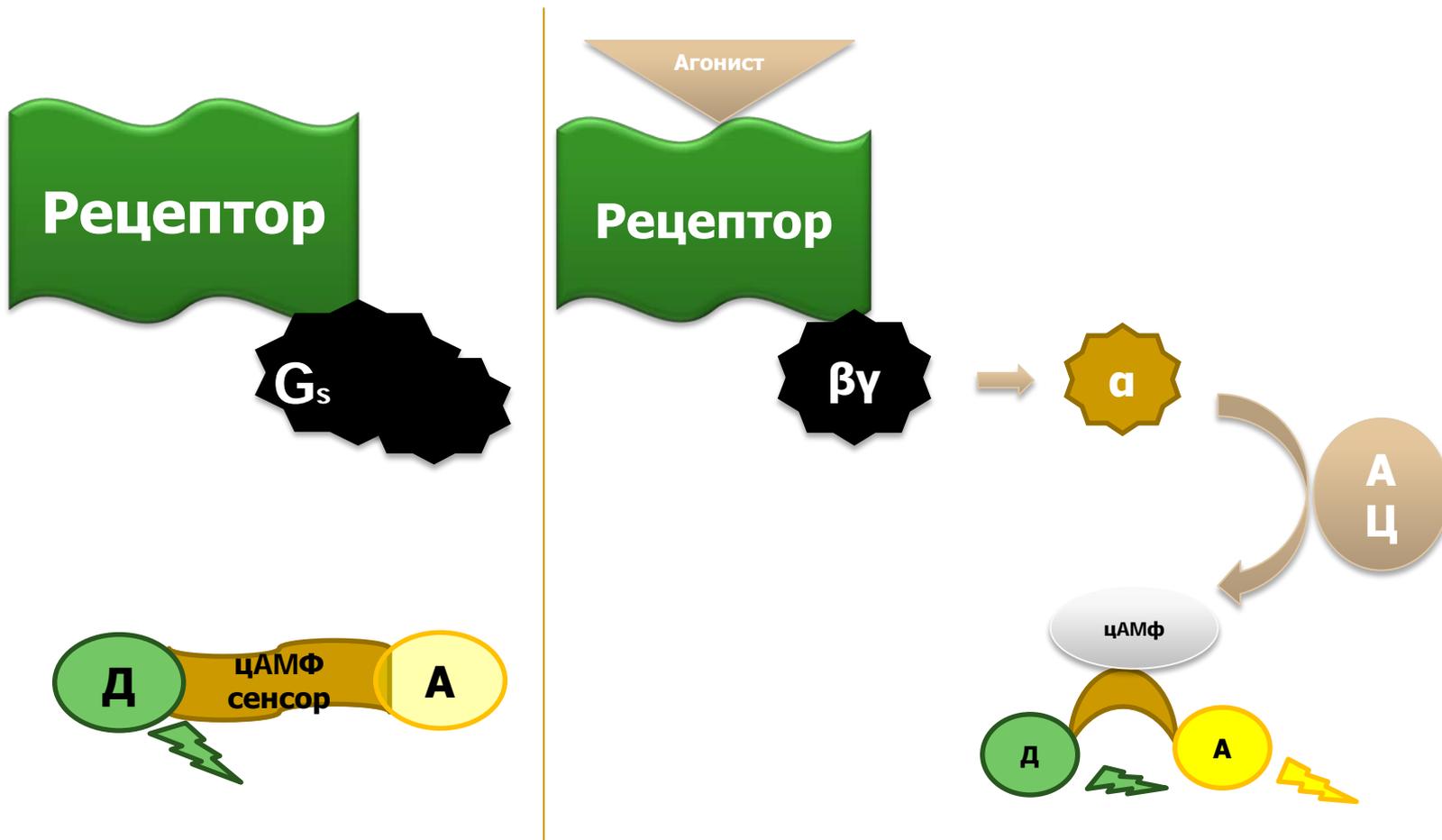
525-530 нм



Белки А и В взаимодействуют

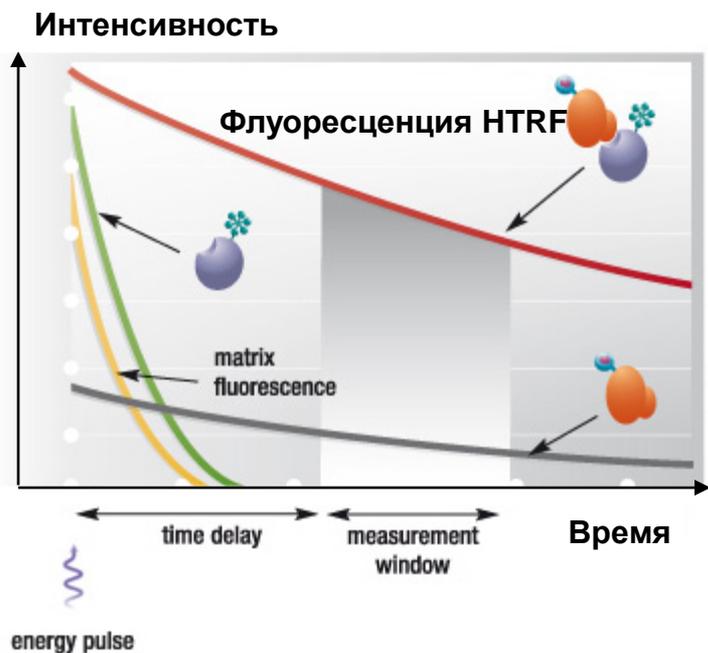


Изучение лиганд-зависимой активации с помощью измерения количества вторичных сигнальных молекул



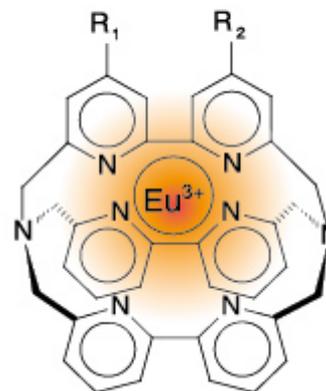
Флуоресцентно-резонансный перенос энергии, разрешённый во времени (TR-FRET)

HTRF[®] – Homogenous Time-Resolved Fluorescence (Cisbio Bioassays)



Доноры:
крипаты Tb²⁺ и Eu³⁺
тербий европий

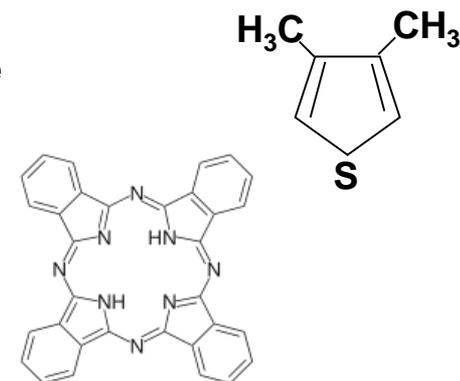
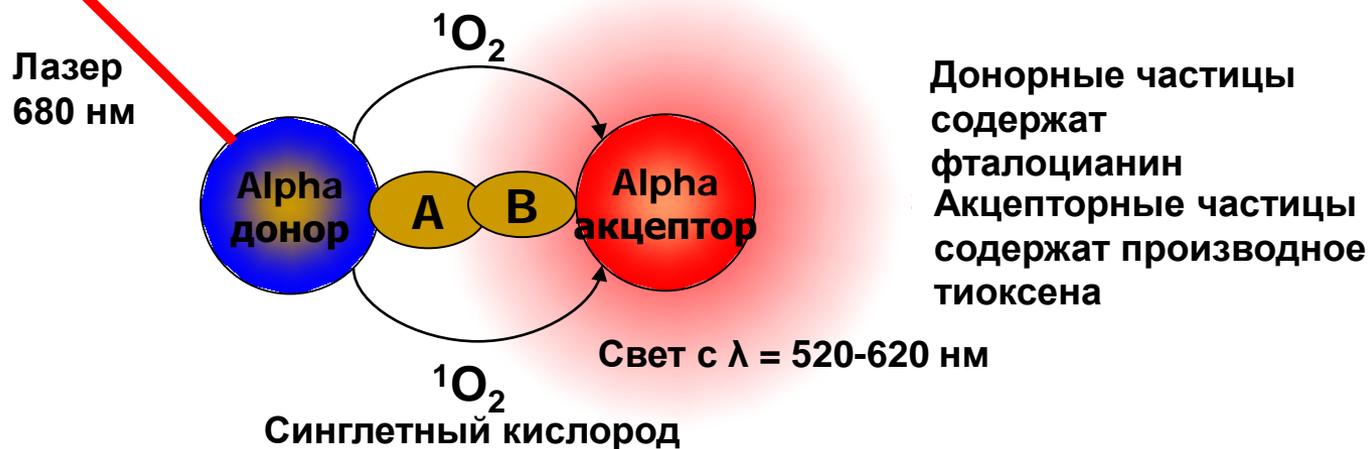
Europium Cryptate



Время жизни в
возбуждённом состоянии –
от 1 до 2 мс

Технология Alpha

Alpha – Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay



Протокол:

- Добавление к определяемому образцу акцепторных частиц, инкубация
- Добавление донорных частиц, инкубация
- Облучение лазером и измерение люминесценции

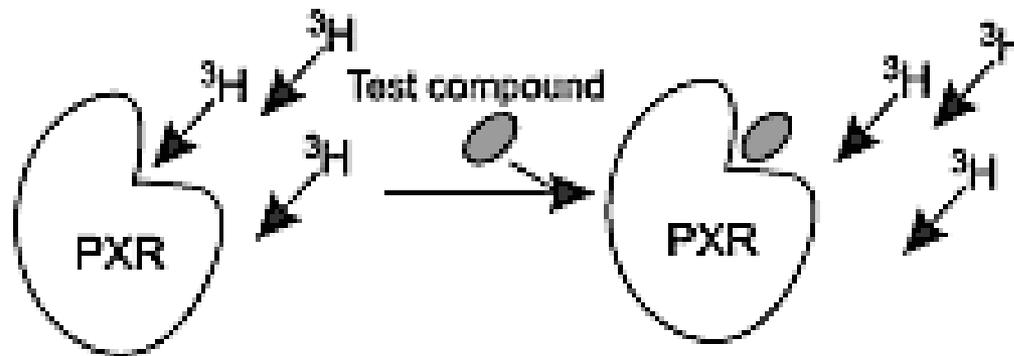
Другие методы оптического и флуоресцентного детектирования

- **АкваСкрин и ФотоСкрин (Ca²⁺-зависимый принцип люминисценции)**
- **Ca²⁺-зависимый принцип детекции (чувствительные красители семейства Fluo)**
- **FLIPR (принцип тушения флуоресценции)**
- **LANCE (принцип FRET)**

Радиолиганды

- *меченые радиоактивной меткой (тем или иным радиоактивным изотопом) достаточно высокоаффинные и селективные по отношению к некоторому желаемому подтипу рецепторов соединения*

Принцип вытеснения из места связывания



Радиолигандные методы



+

-

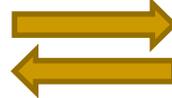
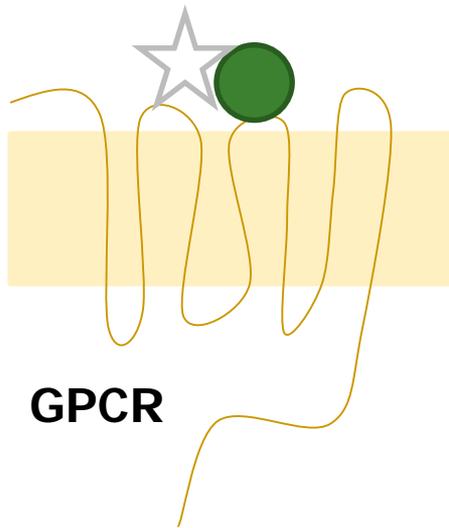
- Максимально идентичная химическая структура
- Прямой метод изучения связывания

- Безопасность!
- Изучение аффинности
- Конкурентный метод вытеснения

Измерение связывания с рецепторами, сопряжёнными с G-белками

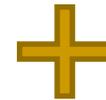
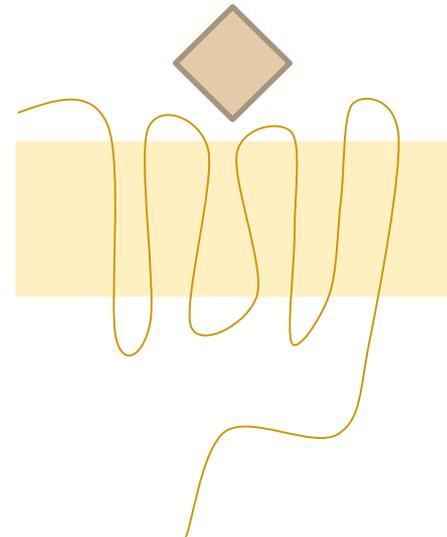
DELFIА TRF Assays – альтернатива радиоактивно-меченым лигандам

Eu-меченый лиганд



Исследуемое
вещество

Eu-меченый лиганд

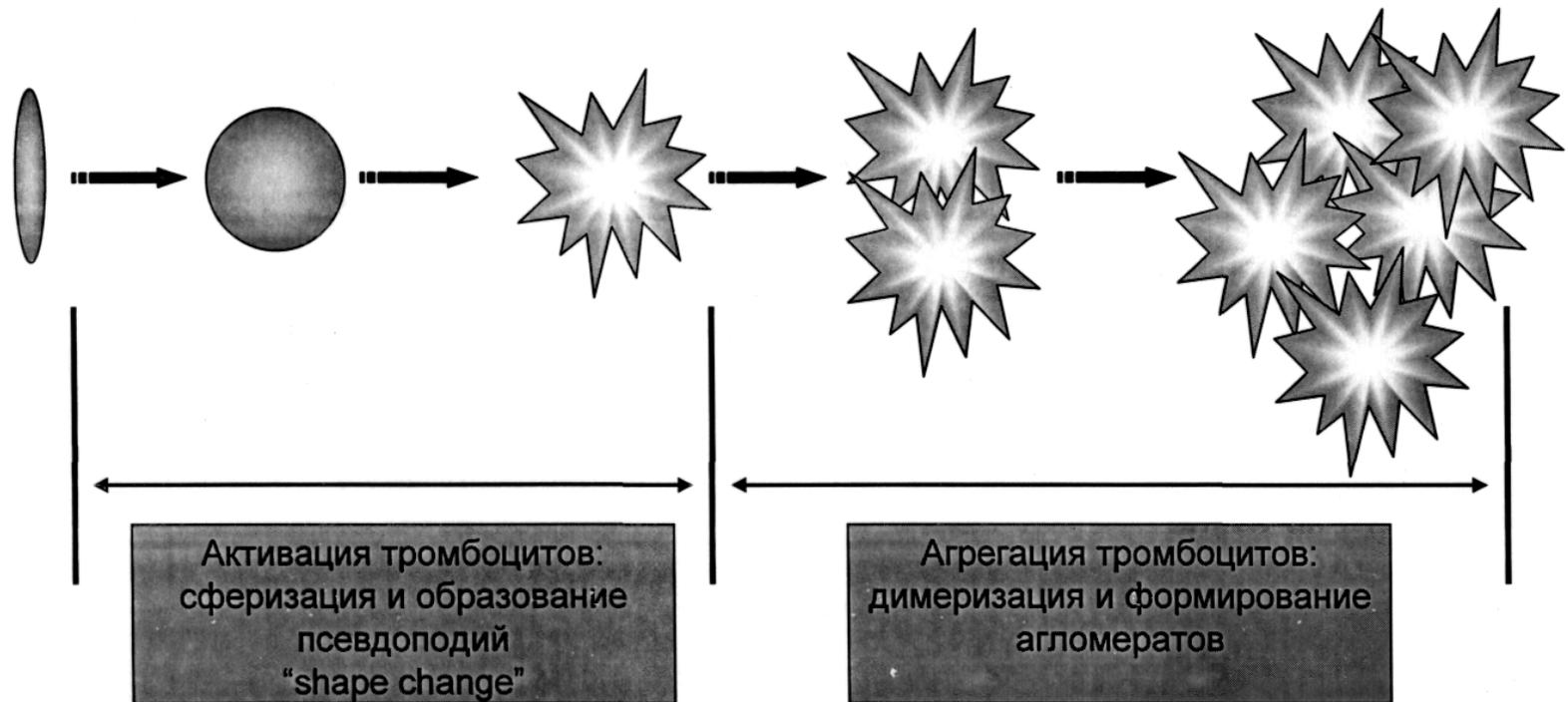


После инкубации вытесненный трейсер (метка) отфильтровывается, к фильтрату добавляется усиливающий раствор и измеряется флуоресценция.

Измерение уровня фармакологического ответа

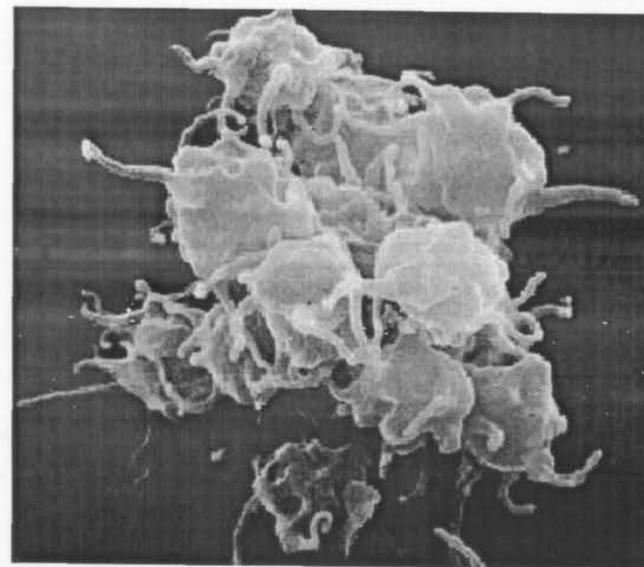
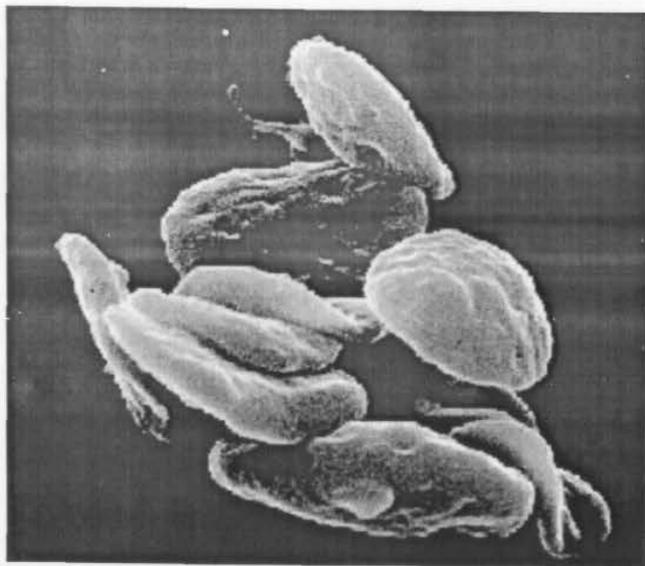
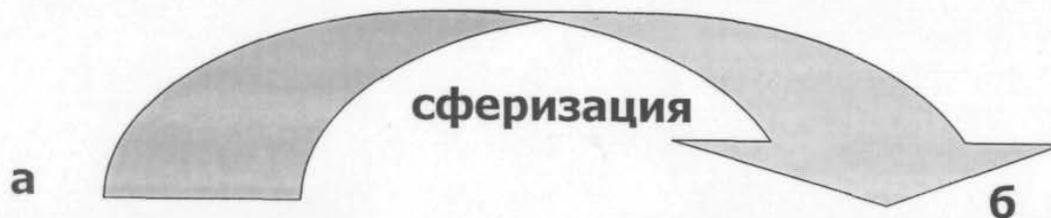
- **Косвенные методы**
- **Существенное влияние селективности фармакологических реагентов на результативность**
- **Возможность изучения вида активности**

Кинетика агрегации тромбоцитов

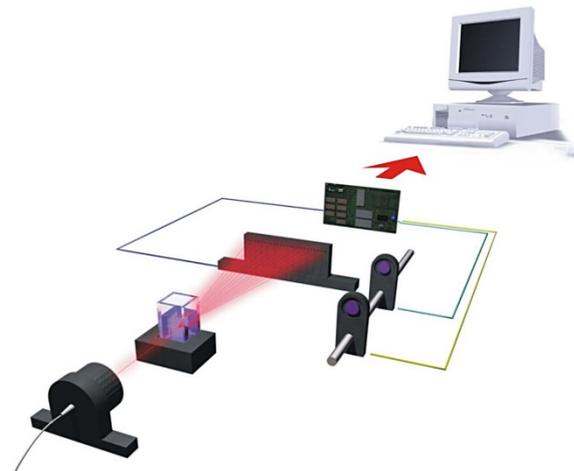
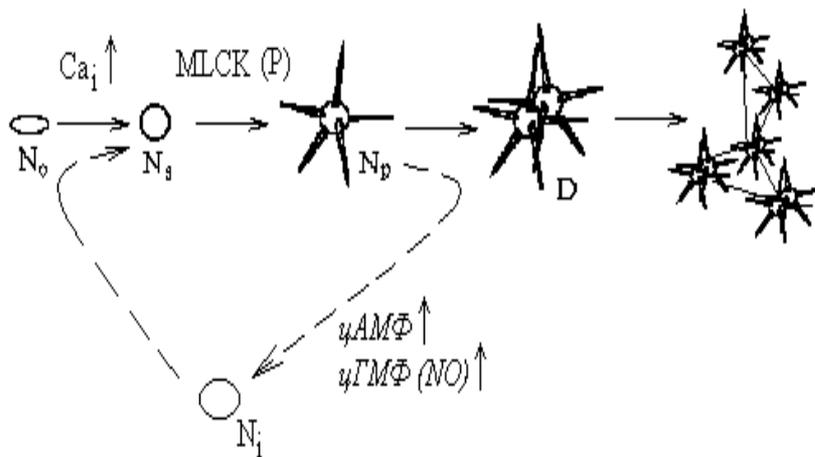


Тромбоциты человека в неактивном состоянии (а) и при активации (б)

(данные электронной микроскопии)



Лиганд-зависимая активация тромбоцитов



*Трансформация тромбоцитов при их возбуждении: N_0 -диски, N_s - сферизованные клетки, N_p - клетки с псевдоподиями, (первые две стадии - *shape change*), D - агрегаты (димеры), конечный процесс - свертывание (все клетки в едином агломерате).*

Серотонин (5-НТ)

- **Синтез** из 5- окситриптофана (источник- триптофан) в ЦНС (ядра шва), мозговом слое надпочечников, ЖКТ

- **Рецепторы:**

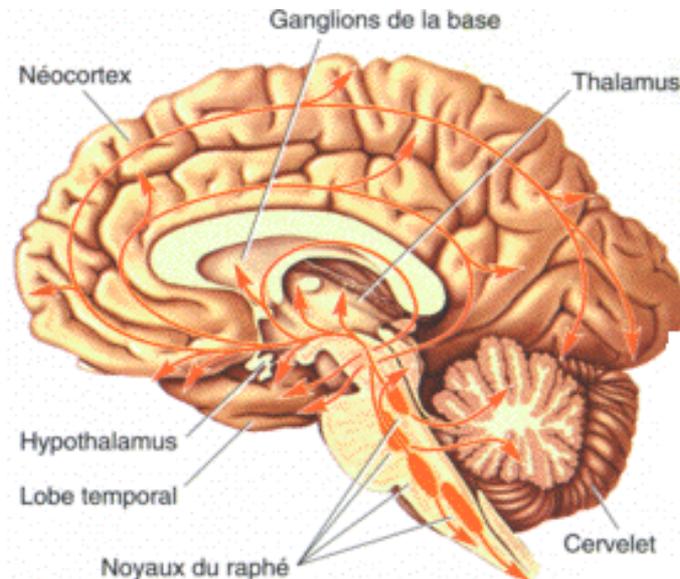
5-НТ₁: G_i белок

5-НТ₂: ИФЗ-путь

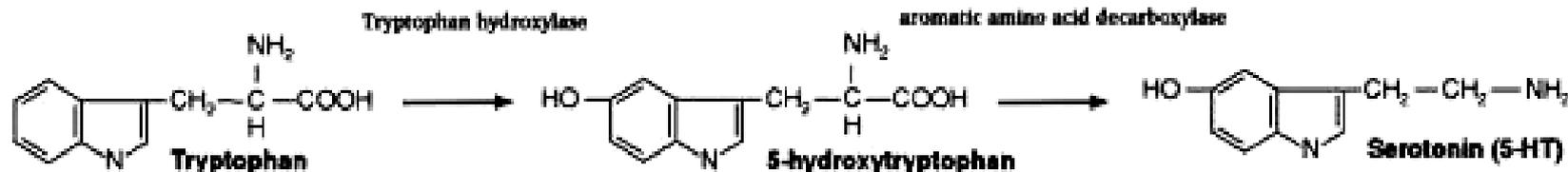
5-НТ₃ катионный канал

5-НТ₄₋₇ G_s белок

Блокаторы: ципрогептадин

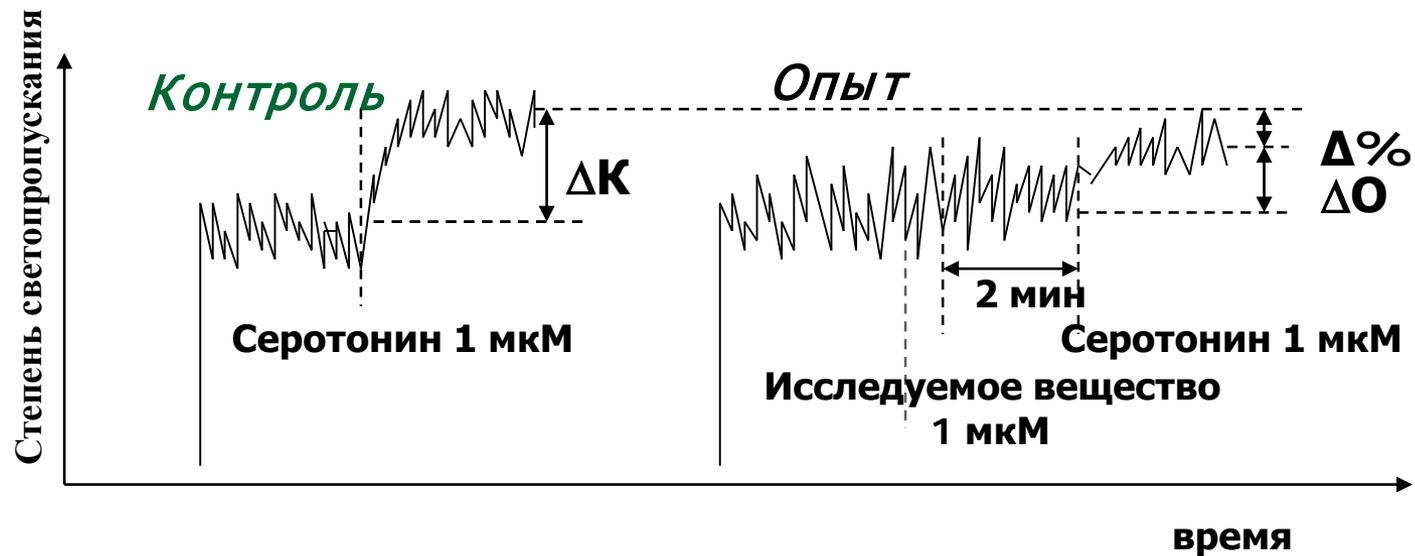


Роль: терморегуляция, сон, циркадные ритмы, тревожность, депрессия и агрессия, сенсорное восприятие (LSD=ДЛК диэтиламид лизергиновой к-ты из спорыньи; *синестезия*)



5-HT_{2A}-рецепторы тромбоцитов

- Gq-сопряженные
- Повышение Ca²⁺

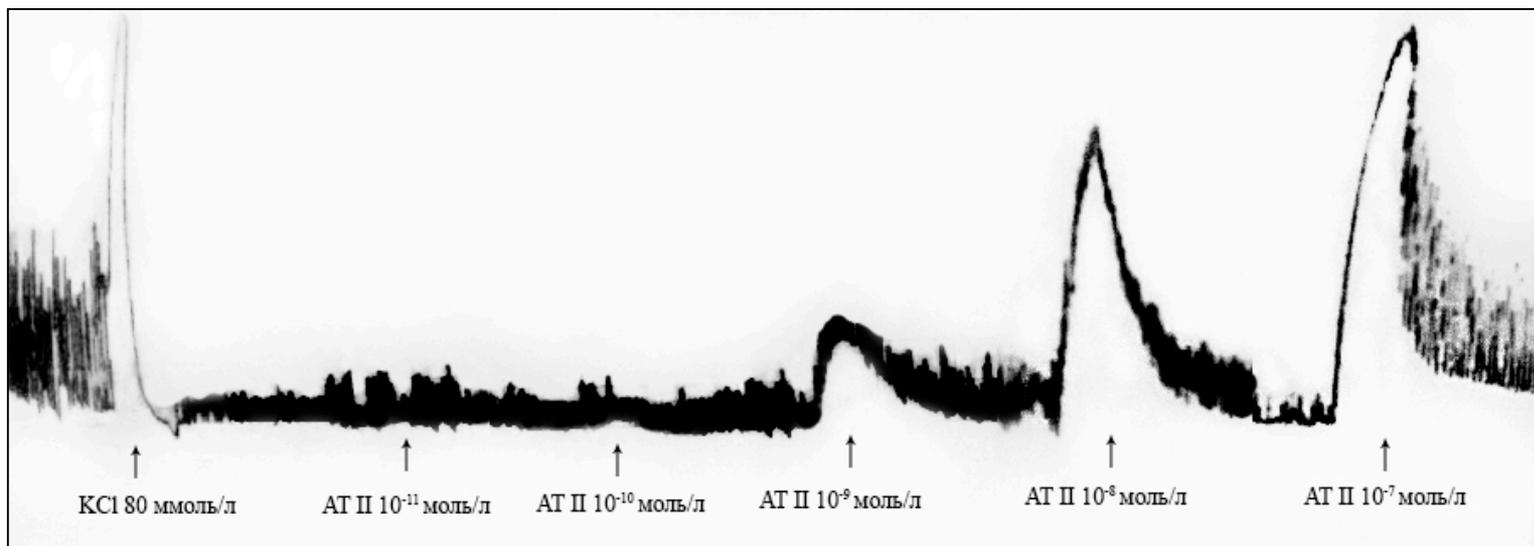
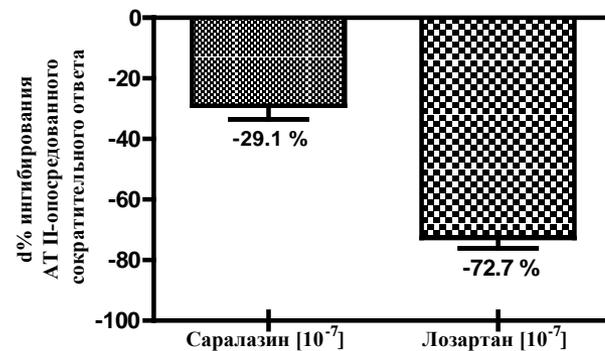


Примечания:

ΔK – изменение степени светопропускания на фоне серотонина;

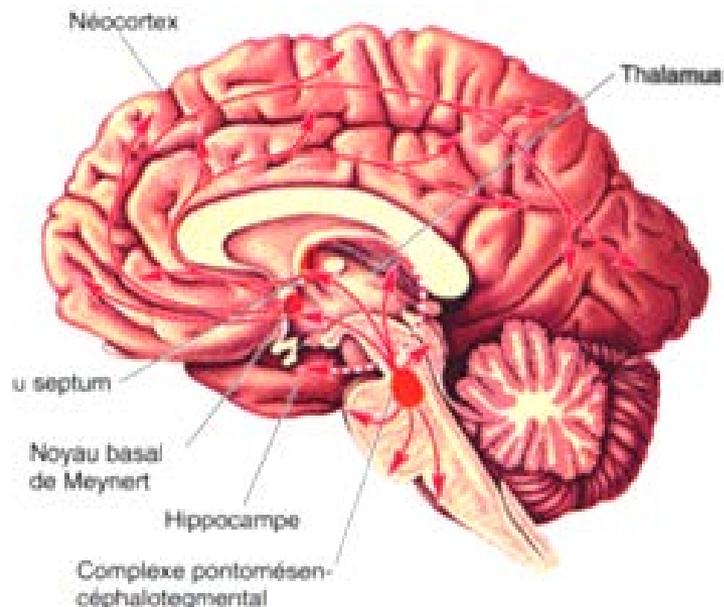
ΔO – изменения степени светопропускания на фоне исследуемого вещества и серотонина

AT₁-опосредованное сокращение изолированной *v. porta*



Ацетилхолин

- **Синтез из холина и ацетила-КоА**
- **в ЦНС (кора, таламус, хвостатое ядро, ретикулярная формация),**
- **вегетативных ганглиях**
- **мотонейронах.**



Рецепторы:

Н (никотиновые): Н1- мышечные, Н2- нейронные.

Действие на катионный канал,

Блокируются Д-тубокурарином.

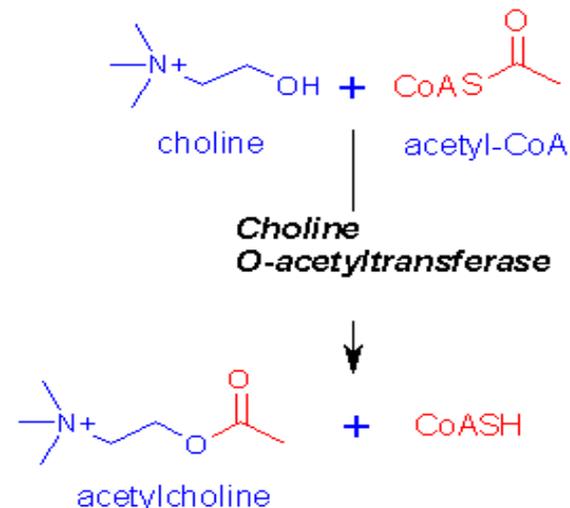
М (мускариновые):

М1, М2, М5 – действие на ИФ3 путь

М2 – действие на Gi (открытие K⁺ канала)

Блокатор – атропин (белладона)

Роль: движение, мнестические процессы (старческое слабоумие)



Гистамин

**Синтез из гистидина
в заднем гипоталамусе,
волокна – по всему мозгу, характерен
несинаптический выброс медиатора**

**Роль: регуляция общего метаболизма -
повышает уровень бодрствования, мышечная
активность, пищевое и половое поведение
(антигистаминовые препараты)**

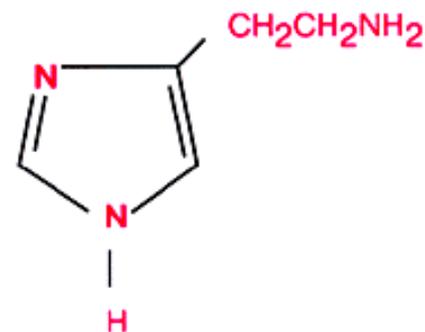
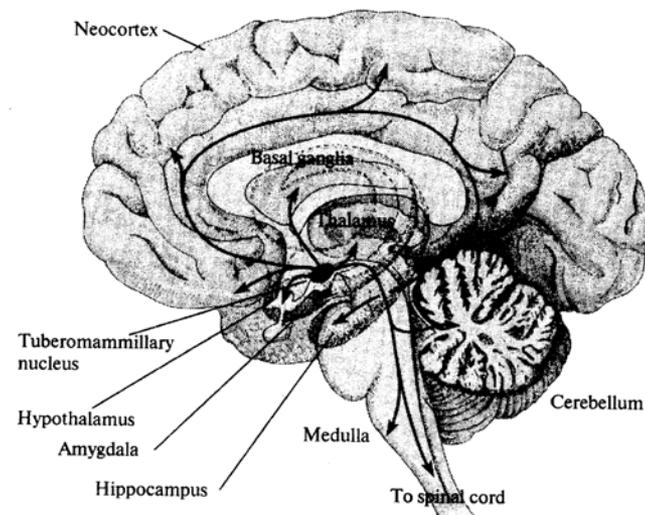
Рецепторы:

H_1 : ИФ₃ путь (+)

H_2 : G_s-белок

H_3 : G_i-белок

(пресинаптический)



гистамин

Кроме медиаторной роли выполняет функцию расширения сосудов, фактора воспаления, секреции желудочного сока