

КОНСПЕКТ

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩИХ СВОЙСТВ СИСТЕМ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКУ

Способность клетки отвечать на определенные сигналы зависит от наличия клеточных рецепторов, специфичных к определенным сигналам. После связывания сигнальной молекулы рецептор активируется; активированный рецептор затем опосредует все эффекты сигнальной молекулы на клетку.

Любая клеточная сигнальная система работает при наличии:

- экстраклеточных сигнальных молекул;
- рецептора (поверхностного или внутриклеточного);
- эффекторных белков;
- системы, осуществляющей модификацию внутриклеточных белков;
- системы, осуществляющей прерывание сигнала.

Экстраклеточные сигнальные молекулы, первичные мессенджеры: гормоны, цитокины, факторы роста, нейротрансмиттеры, феромоны, пурины. На рис. 1.1.1 приведена простейшая схема пути передачи внешнего сигнала в клетку.

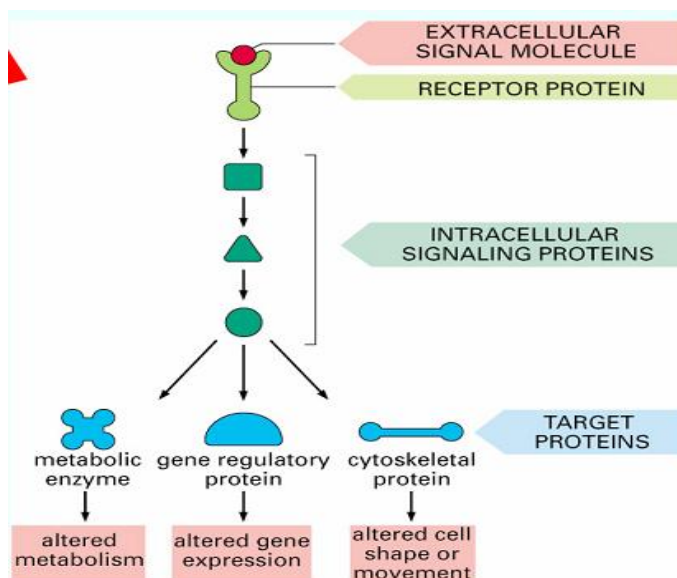


Рисунок 1.1.1 – Структура и функции сигнального пути

Рецепторы. Существуют три основных типа рецепторов, интегрированных во внешнюю клеточную мембрану (поверхностные рецепторы): 1) рецепторы, сопряженные с G-белками; 2) рецепторы - ионные каналы; 3) рецепторы, ассоциированные с ферментативной активностью (рис. 1.1.2).

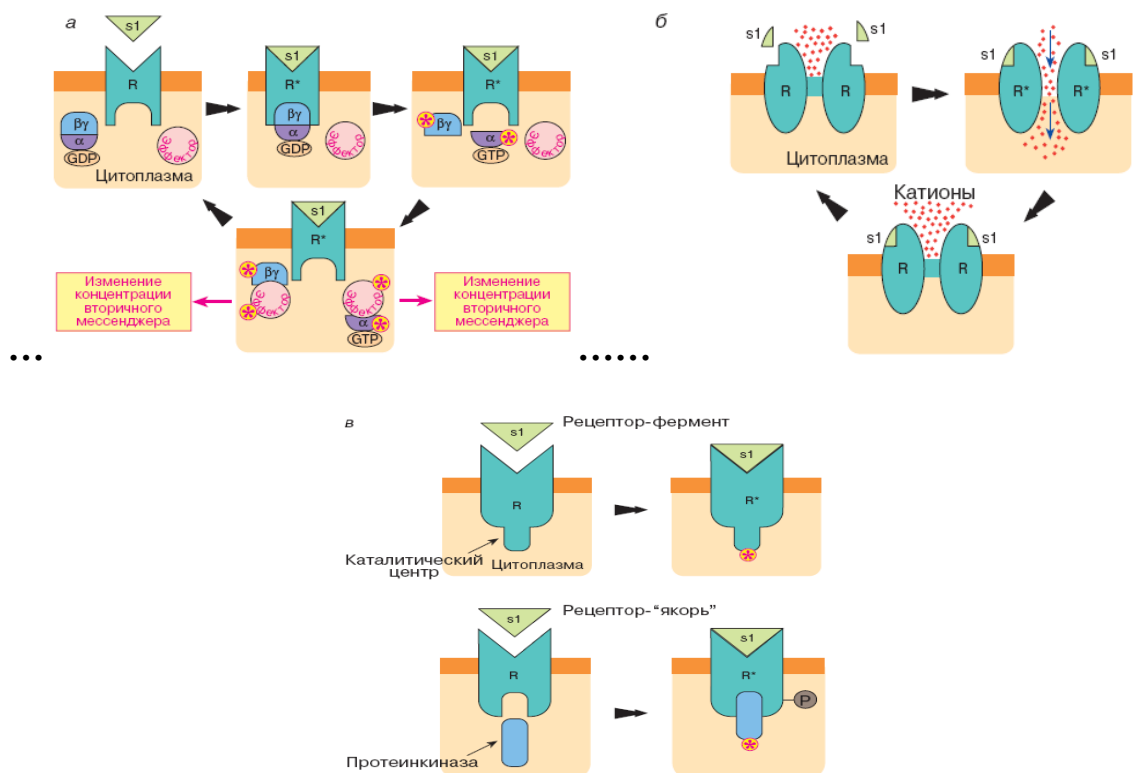


Рисунок 1.1.2 Поверхностные рецепторы: а) рецепторы, сопряженные с G-белками; б) рецепторы – ионные каналы; в) рецепторы, ассоциированные с ферментативной активностью

Сигнальными молекулами могут быть неполярные и полярные вещества. Неполярные вещества, например стероидные гормоны, проникают в клетку, проходя через липидный бислой. Полярные сигнальные молекулы в клетку не проникают, а связываются специфическими рецепторами клеточных мембран. К полярным сигнальным молекулам относят белковые гормоны (например, глюкагон, инсулин, паратгормон), нейромедиаторы (например, ацетилхолин, глицин, γ -аминомасляная кислота), факторы роста, цитокины, эйкозаноиды.

Система сигнальной трансдукции, опосредованная мембранными рецепторами, включает следующие события:

- взаимодействие рецептора с сигнальной молекулой (первичным посредником);
- активацию мембранного фермента, ответственного за образование вторичного посредника;
- образование вторичного посредника (сAMP, сGMP, ИФЗ, ДАГ или Ca²⁺);
- активацию вторичными посредниками специфических белков, главным образом, протеинкиназ, которые, в свою очередь, фосфорилируют различные белки-мишени, оказывая влияние на активность внутриклеточных процессов (рис. 1.1.3).

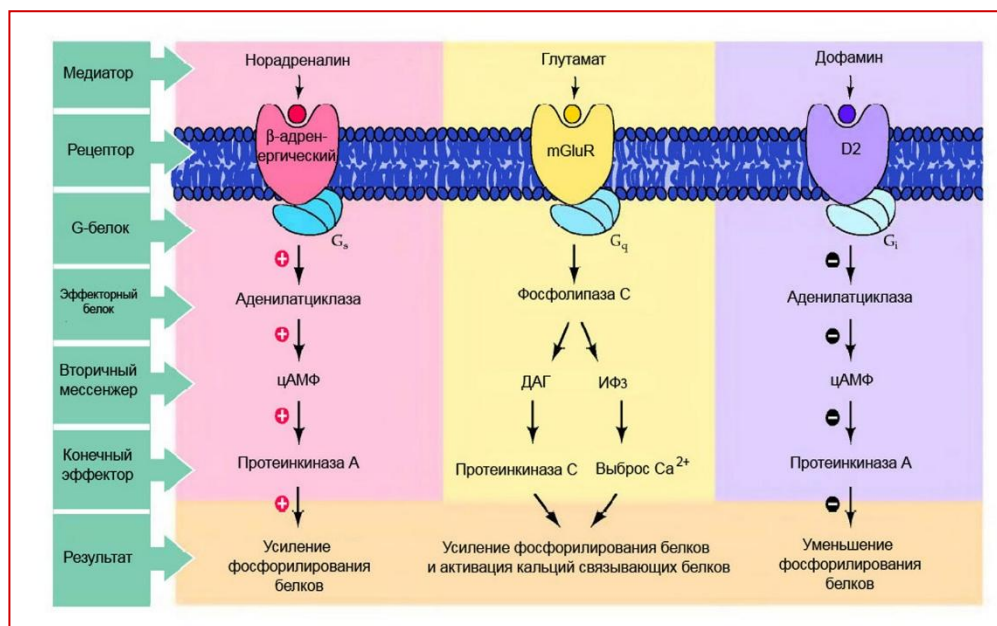


Рисунок 1.1.3 – Схемы сигнальных путей, опосредованных поверхностными рецепторами

Стероидные и тиреоидные гормоны, будучи гидрофобными по своей природе, способны проникать через плазматическую мембрану внутрь клетки, где они взаимодействуют с растворимыми рецепторными белками, локализованными в цито- и (или) нуклеоплазме.

Система сигнальной трансдукции, опосредованная внутриклеточными рецепторами, включает следующие события:

- преодоление гормоном билипидного слоя плазматической мембраны;
- взаимодействие гормона с рецептором приводит к изменению конформации рецептора и его активации;
- комплекс гормон-рецептор проходит в ядро, взаимодействует с регуляторной нуклеотидной последовательностью ДНК – респонсивным элементом;
- увеличивается (или уменьшается) доступность промотора для РНК-полимеразы;
- увеличивается (или уменьшается) скорость транскрипции генов-мишеней;
- изменяется (увеличивается или уменьшается) скорость трансляции соответствующих мРНК;
- изменяется количество белков, оказывающих влияние на метаболизм и функциональное состояние клетки (рис. 1.1.4).

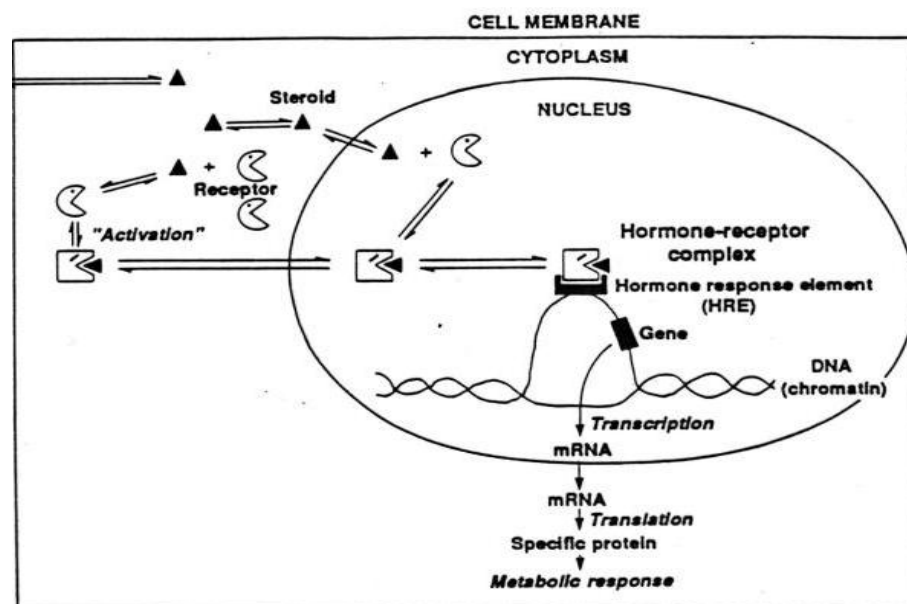


Рисунок 1.1.4. Схема сигнального пути, опосредованного внутриклеточным рецептором

В большинстве случаев процесс активации какого-либо метаболического процесса находится под контролем не одной, а нескольких систем внутриклеточной сигнализации, поэтому для клеточного ответа важна взаимосвязь этих систем.

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Са/полифосфоинозитидная (ПФИ) система имеет большую степень сложности по сравнению с аденилатциклазной (АЦ) мессенджерной системой. Начальный (трансмембранный) этап передачи гормонально-нейромедиаторного сигнала внутрь клетки в целом имеет сходство с системой сАМР-АЦ. В обеспечении этого процесса участвует рецептор плазматической мембраны, G_q -белок и ключевой фермент каскада – фосфолипаза С, которая генерирует вторичные мессенджеры (рис. 1.2.1).

Фосфолипаза С (ФЛ-С) – эффекторная молекула в данной мессенджерной системе, использует в качестве субстрата компоненты клеточной мембраны, в которую включен фермент. Ими являются полифосфоинозитолы – фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилинозитол-4-фосфат (ФИФ) и фосфатидилинозитол -4,5- дифосфат (ФИФ₂). ФЛ-С – фермент, проявляющий высокую специфичность. Он расщепляет только фосфатидилинозитолы и не действует на другие фосфолипиды.

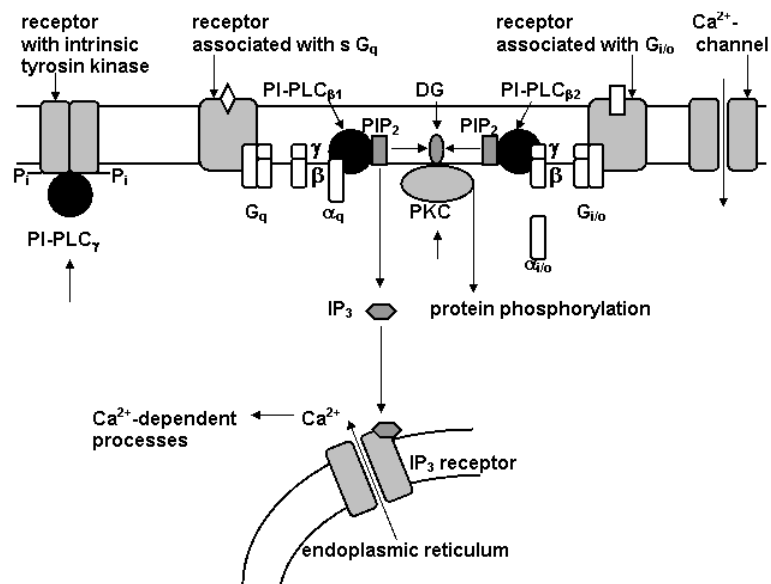


Рисунок 1.2.1 – Ca/полифосфоинозитидный мессенджерный каскад

Известны три семейства фосфолипазы C: β , γ и δ , включающих 16 ферментов. Внутри каждого семейства существуют подтипы, которые обозначаются подстрочной арабской цифрой, например, ФЛ- $C_{\beta 1}$ и т.д. Фосфолипазы семейства β и γ активируются при стимуляции рецепторов на плазматической мембране.

Фосфолипаза C_{β} и ФЛ- C_{γ} активируются различными путями, но при этом как ФЛ- C_{β} , так и ФЛ- C_{γ} образуют две мессенджерные молекулы – инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃) и диацилглицерола (ДАГ), дающих начало двум главным взаимодействующим друг друга ветвям процесса сигнальной трансдукции.

ИФ₃ является водорастворимым вторичным мессенджером, он диффундирует в цитоплазму, связывается с кальциевыми каналами и вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (ЭПР, митохондрии), повышает его концентрацию. Далее для поддержания Ca гомеостаза избыток Ca^{2+} должен быть удален. Для этого ИФ₃ дефосфорилируется цитозольными фосфатазами и отсоединяется от ионных каналов. Каналы закрываются. Избыток Ca^{2+} из цитоплазмы удаляется с помощью Ca-насосов, или в результате захвата Ca-связывающими белками (рис. 1.2.2). Фактически можно говорить о еще одной мессенджерной молекуле, образуемой в данной мессенджерной системе – катионах Ca^{2+} , концентрация которых повышается в ответ на внутриклеточное повышение концентрации ИФ₃.

ДАГ – гидрофобен и, видимо, способен лишь к латеральной диффузии в составе плазматической мембраны. Он активирует протеинкиназу C. Для этого также необходимы кислый фосфолипид фосфатидилсерин (ФС) и Ca^{2+} . Повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток при активации Ca/ПФИ-системы приводит к транслокации из цитоплазмы в клеточную мембрану протеинкиназы C. Это способствует ее активации ДАГ совместно с

промотором фосфатидилсерином, являющимся неотъемлемым мембранным компонентом.

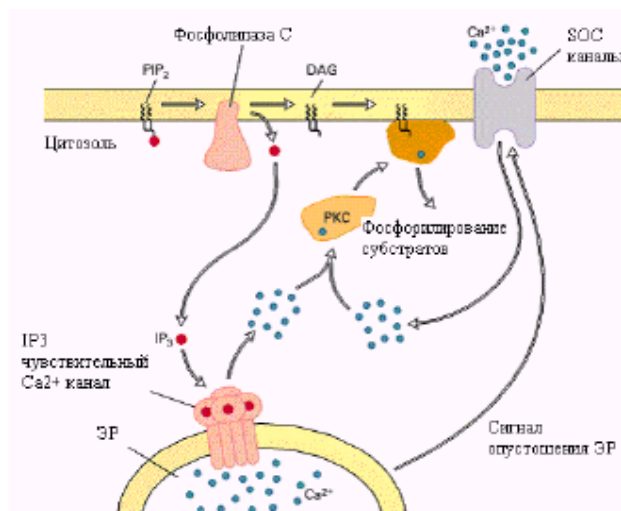


Рисунок 1.2.2 – Увеличение концентрации цитозольного кальция, опосредованное ПФИ мессенджерной системой

Регуляция различных клеточных процессов осуществляется через ПК-С, которая фосфорилирует различные белки. Протеинкиназа С переносит остатки γ -фосфата от АТФ на ОН-группу серина или треонина в полипептидной цепи. От остальных протеинкиназ данный фермент отличается определенной специфичностью в отношении белковых субстратов, а также сайтами фосфорилирования и механизмом активации.

Структура и свойства протеинкиназы С изучены довольно подробно. Фермент является мономером с М.м. 77 kDa. Полипептидная цепь включает 670-690 аминокислотных остатков. Состоит из 2-х компактных доменов, один из которых (меньшего размера) – гидрофобный регуляторный, второй, более гидрофильный – каталитический. Регуляторный домен ПК-С располагается ближе к N-концу, киназный (каталитический) домен находится на С-конце полипептидной цепи (рис. 1.2.3).

Протеинкиназы С делят на три категории в зависимости от кофакторов, требующихся для оптимальной фосфолипид-зависимой каталитической активности, внутриклеточной локализации, субстратной специфичности, распределению в тканях: классические формы, новые формы и атипичные формы ПКС (рис. 1.2.4). В одной клетке могут присутствовать разные типы ПКС.

Протеинкиназы С участвуют: в клеточном делении, секреции, экзоцитозе, переносе ионов, сокращении гладкой мускулатуры, экспрессии генов. Мощными активаторами ПК-С являются форболовые эфиры, известные как опухолевые промоторы. Форболовые эфиры действуют на ПК-С в концентрациях, почти на 3 порядка меньших, чем ДАГ. Ингибиторами ПК-С являются спермин и сфингозин.

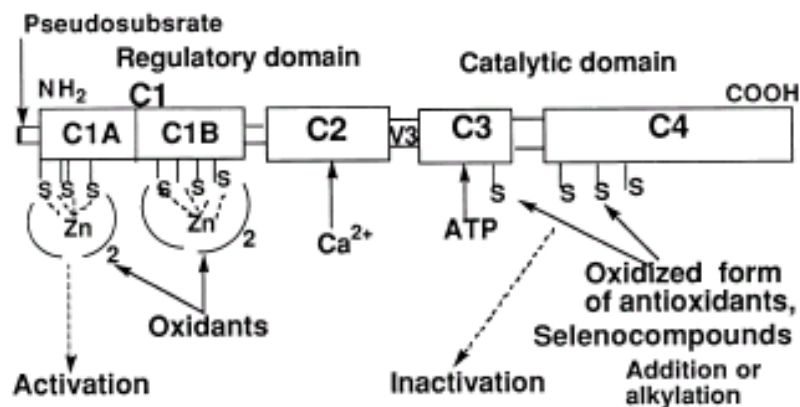


Рисунок 1.2.3 – Мультидоменная структура протеинкиназы C: сайты, чувствительные к окислению, присутствуют в регуляторном и каталитическом доменах

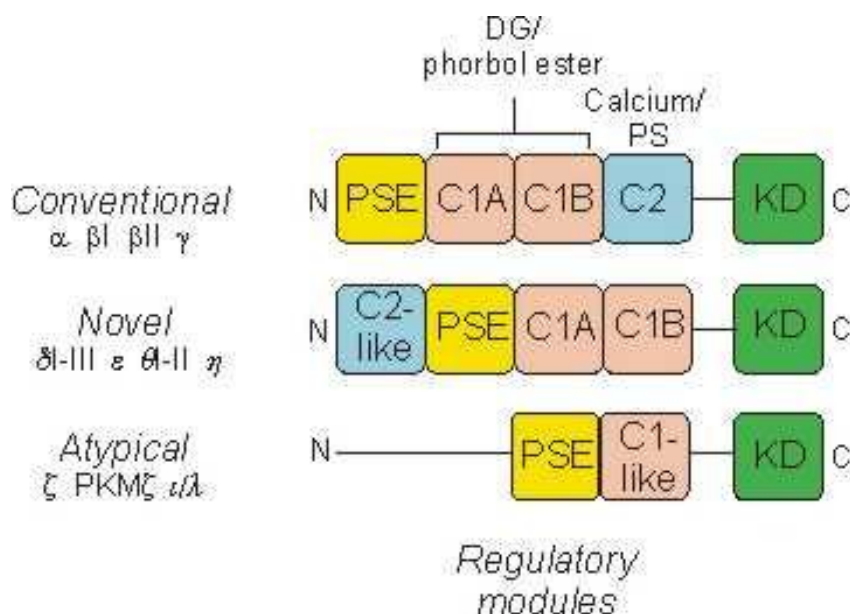
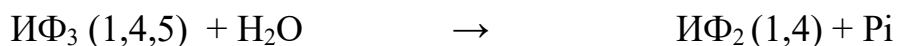


Рисунок 1.2.4 – Сходство и отличия структурной организации классической, новой и атипичной форм протеинкиназы C

Прекращение передачи сигнала в Ca/полифосфоинозитидной системе осуществляется двумя путями: инактивацией вторичных мессенджеров и дефосфорилированием эффекторных белков.

Влияние ИФЗ прекращается с помощью фосфатаз, дефосфорилирующих это соединение.

ИФ₃-5-фосфомоноэстераза



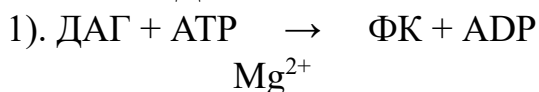
ИФ₃-5-фосфомоноэстераза в клетках, в основном связана с плазматической мембраной. Последовательное 3-х этапное

дефосфорилирование ИФ₃ приводит к образованию циклического спирта – инозитола, который является субстратом для синтеза ФИ.

ИФ₃ может путем фосфорилирования превращаться в ИФ₄, ИФ₅ или ИФ₆. Некоторые из этих соединений выполняют сигнальную функцию. Например, ИФ₄ (инозитол-1,3,4,5 - инозитолтетрафосфат) в некоторых клетках стимулирует выход кальция, возможно активируя Ca²⁺-каналы плазматической мембраны.

Действие ДАГ может ограничиваться двумя механизмами: 1) действием ДАГ-киназы, осуществляющей фосфорилирование ДАГ до фосфатидной кислоты; 2) действием ДАГ-липазы, осуществляющей гидролиз этого мессенджера с отщеплением арахидоновой кислоты.

ДАГ-киназа



Таким путем до 30% ДАГ может превратиться в клетке в фосфатидную кислоту. ДАГ-киназа в основном локализована в плазматической мембране клетки.

ДАГ-липаза



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

Оказалось, что продукты этих путей деградации ДАГ имеют свою важную роль в процессах функциональной активности клетки. Фосфатидная кислота может участвовать в регуляции входа Ca²⁺ в клетки. Арахидоновая кислота, освобождаемая из ДАГ диацилглицерол-липазой, и ее многочисленные продукты являются еще одной сигнальной системой в клетках.

СИГНАЛИЗАЦИЯ С УЧАСТИЕМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Гормоны, имеющие липофильную природу, способны проходить через плазматические мембраны и связываться с внутриклеточными (цитоплазматическими или ядерными) рецепторами. К липофильным относятся стероидные, тиреоидные гормоны, витамин D₃, ретиноиды. Стероидные гормоны – небольшие по молекулярной массе гидрофобные молекулы (М.м. 300), способные проходить через плазматическую мембрану путем простой диффузии. В цитоплазме клетки стероидный гормон каждого типа прочно, но обратимо связывается со своим специфическим рецепторным белком.

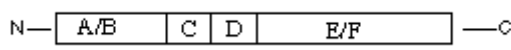
Тиреоидные гормоны (тироксин-Т₄ и трийодтиронин-Т₃), как и стероидные, легко диффундируют через липидную клеточную мембрану и

связываются внутриклеточными белками. Биологическое действие в основном осуществляется Т₃, в то время как Т₄ дейодируется, превращаясь в Т₃, который связывается с цитоплазматическим рецептором. Поскольку перечисленные гормоны липофильны, они транспортируются в крови в связанном с белками состоянии, и лишь незначительная их часть находится в свободной форме, имеют длительный период полураспада.

Рецепторы стероидных гормонов (СР) найдены в цитоплазме или ядре эукариотических клеток, они связываются и регулируют транскрипцию ДНК в комплексе со стероидными гормонами. Рецепторы для ряда гормонов имеют значительное структурное и функциональное сходство, но характеризуются различной специфичностью к ДНК, регуляцией и сродством к гормону.

Суперсемейство СР подразделяют на четыре функционально различных субсемейства (класса): класс I – классические рецепторы для глюкокортикоидов (GR, CORT), андрогенов (AR), минералокортикоидов (MR, включая ALDO рецепторы) и рецепторы к прогестерону (PR); класс II – включает рецепторы для тиреоидных гормонов, ретиноевой кислоты (T₃R, RAR, RXR) и вит. D₃ (VDR); класс III – для эстрогенов (ER) и нескольких орфановых рецепторов; класс IV – наименее изученные рецепторы, образующие комплексы с другими транскрипционными факторами. Для этого класса рецепторов окончательно не выяснены структура, природа лиганда (гормона) и последовательностей ДНК, с которыми эти рецепторы связываются.

Стероидные рецепторы (белки) имеют доменную организацию. В их структуре присутствуют N-концевой домен (A/B), имеющий значительные различия у рецепторов к перечисленным гормонам и состоящий из 25-600 аминокислотных остатков; ДНК-связывающий домен (C), состоящий примерно из 70 аминокислотных остатков; шарнирный домен (D), лигандсвязывающий домен (E/F), включающий около 250 аминокислот, и карбоксилтерминальный домен.



Аминотерминальный домен имеет наибольшие различия, как по форме, так и по аминокислотной последовательности. Он определяет особенности рецепторного ответа и у большинства видов он характеризуется высокой степенью фосфорилирования. Домены C и D, ответственные за связывание с ДНК, характеризуются консервативностью и мало отличаются друг от друга у рецепторов стероидных гормонов разных классов.

ДНК-связывающий домен характеризуется 3 интронами, два из которых имеют так называемые “цинковые пальцы”, или структуры с содержанием ионов цинка. “Цинковые пальцы” участвуют в специфическом связывании гормона с ДНК. Один из них принимает участие в непосредственном связывании с ДНК, а второй – в образовании гомодимеров и гетеродимеров рецепторов.

Гормоносвязывающий домен участвует в связывании гормона, а также в процессах димеризации и регуляции функции других доменов. Он непосредственно примыкает к ДНК-связывающему домену. Карбоксилтерминальный домен также участвует в процессах гетеродимеризации, взаимодействует с различными транскрипционными факторами.

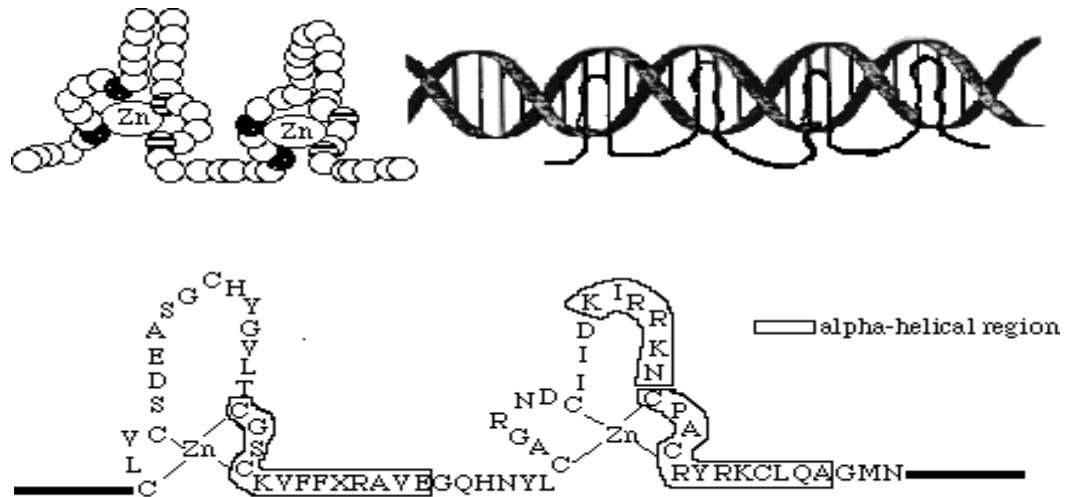


Рисунок 1.3.2 – Аминокислотные остатки в глюкокортикоидном рецепторе, ответственные за специфическое узнавание ДНК

В ДНК-мишени для рецепторов имеются специфические последовательности, которые обозначаются как гормон узнаваемые элементы – HREs (hormone response elements). Эти последовательности связывают два рецептора одновременно. Связанные рецепторы могут быть одним и тем же белком – в этом случае HREs связывают гомодимеры. Если рецепторные димеры состоят из различных рецепторов (например, один T3R, другой – RAR), то HREs связывают гетеродимеры. Соответственно, транскрипцию ДНК, с которой связывается гомодимер, может регулировать один гормон. В то же время как при связывании с ДНК гетеродимера транскрипция может регулироваться двумя разными гормонами.

Класс I (субсемейство глюкокортикоидов) и эстрогенов (тип III) рецепторов ассоциируются с белками теплового шока (hsp's) – hsp90 и hsp70 в отсутствии гормона (рис.1.3.3). Напротив, рецепторы II типа (тиреоидные и ретиноидные) не связаны с белками теплового шока и могут связываться с ДНК в отсутствии лиганда (рис. 1.3.4).

Последовательность событий при действии рецепторов I типа на клетку такова:

- 1) диссоциация стероида от связывающего белка;
- 2) транспорт стероида внутрь клетки;
- 3) связывание стероида с цитоплазматическим рецептором со связанным белком теплового шока;
- 4) потеря hsp и образование «активированного» рецептора;

- 5) активированный цитоплазматический рецептор входит в ядро, связывается с ДНК HREs как гомодимер;
- 6) с ДНК транскрибируется мРНК;
- 7) мРНК покидает ядро, транслируется на рибосомах;
- 8) новый синтезированный белок (белки) вызывают биологический ответ.

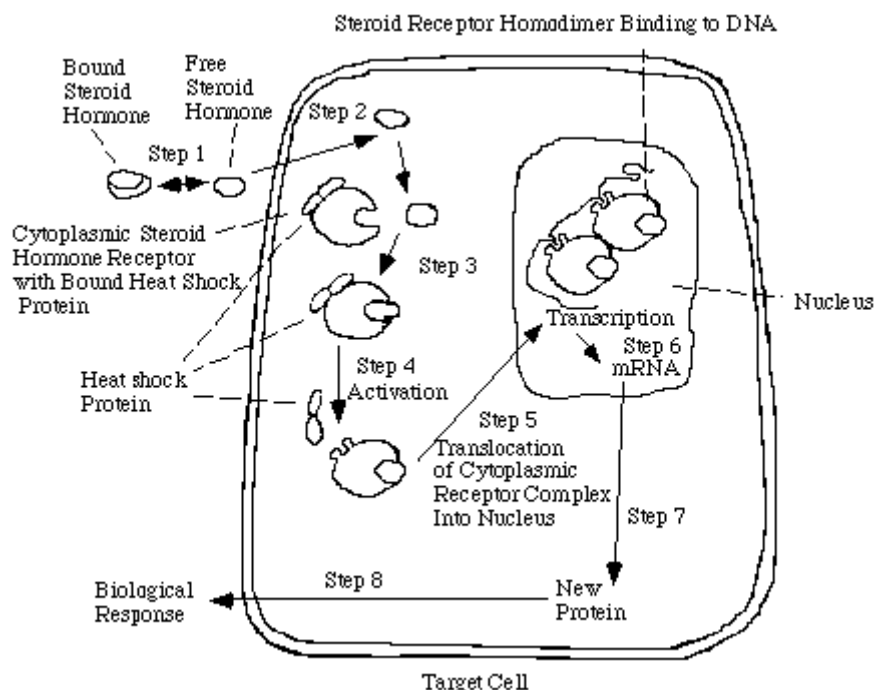


Рис. 1.3.3 – Схема взаимодействия рецепторов I типа (стероиды) и III типа (эстрадиол) с сигнальной молекулой

Связывание гормона с рецептором приводит к изменениям физико-химических свойств последнего, и этот процесс называется активацией или трансформацией рецептора. Присоединив к себе гормон, рецептор приобретает повышенное сродство к определенным последовательностям ДНК, которые начинают действовать как энхансеры, т.е. стимуляторы транскрипции нескольких соседних генов. Продукты некоторых из этих генов могут в свою очередь активировать другие гены и вызывать более поздний вторичный ответ, усиливая т.о. действие гормона.

Последовательность событий при действии рецепторов II типа на клетку такова:

- 1) диссоциация гормона от связывающего белка;
- 2) транспорт гормона в цитоплазму;
- 3) транспорт гормона в ядро;
- 4) связывание гормона с ядерным рецептором и «активация» рецептора;
- 5) активированный ядерный рецептор связывается как гетеродимер с HREs на ДНК;
- 6) с ДНК транскрибируется мРНК;

- 7) мРНК покидает ядро и транслируется;
- 8) вновь синтезированные белки вызывают биологический эффект.

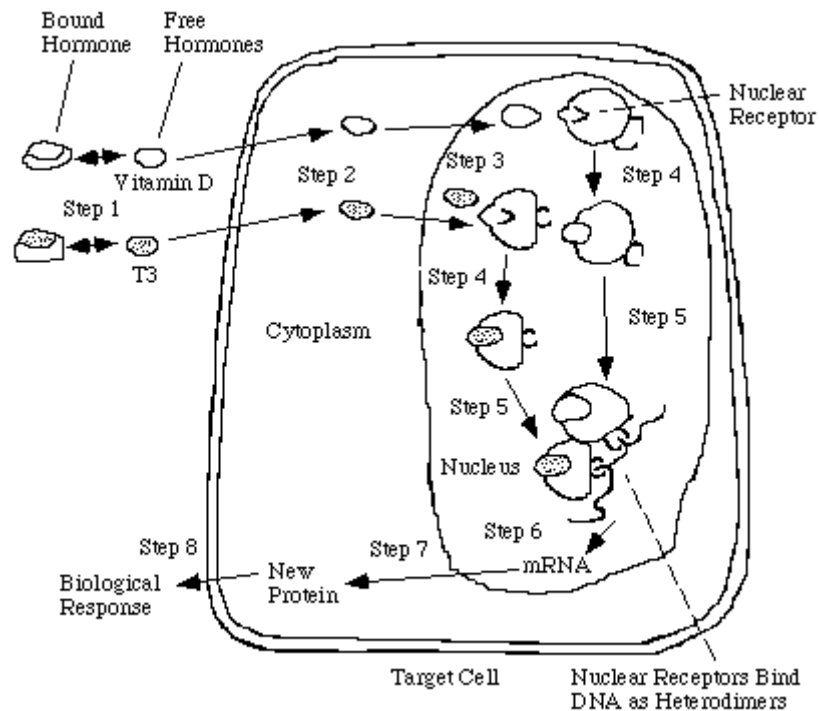


Рисунок 1.3.4 – Схема взаимодействия рецепторов II типа (витамины А и D, тиреоидные гормоны) с сигнальной молекулой

Если стероидцитоплазматический комплекс транслоцируется в ядро клетки, то тиреоидцитоплазматический комплекс сначала диссоциирует и ТЗ непосредственно связывается рецепторами ядра, обладающими к нему высокой аффинностью. Кроме того, высокоаффинные рецепторы к ТЗ обнаруживаются и в митохондриях. Тиреоидные гормоны регулируют синтез белка на уровне транскрипции и это их действие, обнаруживаемое через 12-24 часа, может быть блокировано введением ингибиторов синтеза РНК. Помимо внутриклеточного действия, тиреоидные гормоны стимулируют транспорт глюкозы и аминокислот через клеточную мембрану, непосредственно влияя на активность некоторых локализованных в ней ферментов.

Как связывание гормон-рецепторного комплекса с геном активирует его транскрипцию? Было показано, что узнаваемые гормоном участки ДНК могут стимулировать ТК даже тогда, когда они удалены на большое расстояние (на 1000 оснований) от промотора, где начинается синтез РНК. Эти участки ДНК называются транскрипционными энхансерами.

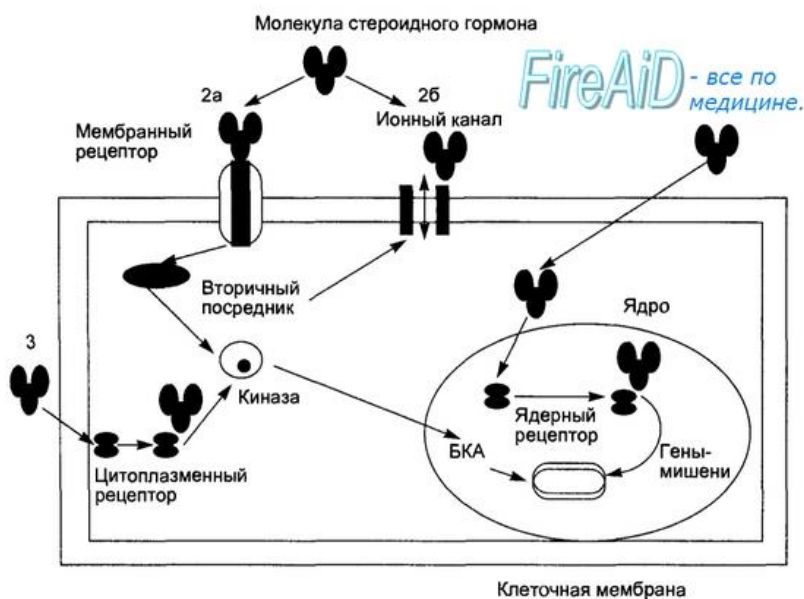
Во многих случаях реакция на стероидный гормон бывает 2-х стадийной. Прямая индукция транскрипции нескольких специфических генов называется первичным ответом. Затем продукты этих генов могут в свою очередь активировать другие гены и вызвать через некоторое время

вторичный ответ. Таким образом, простой гормональный пусковой сигнал способен производить весьма сложные изменения в картине экспрессии генов.

Негеномные эффекты стероидных и тиреоидных гормонов

Эффекты стероидных гормонов проявляются не только спустя несколько часов, что требуется для ядерного влияния, часть из них проявляется очень быстро, в течение нескольких минут. Это такие эффекты, как повышение проницаемости мембран, усиление транспорта глюкозы и аминокислот, освобождение лизосомальных ферментов, сдвиги энергетики митохондрий. К числу быстрых негеномных эффектов стероидных гормонов относятся, например, увеличение в течение 5 мин после введения человеку альдостерона общего периферического сосудистого сопротивления и артериального давления, изменение транспорта натрия через мембрану эритроцитов (вообще лишенных ядра) под влиянием альдостерона в опытах *in vitro*, быстрый вход Ca^{2+} в клетки эндометрия под влиянием эстрогенов и др.

Механизм негеномного действия стероидных гормонов заключается в связывании на плазматической мембране клетки со специфическими рецепторами и активации каскадных реакций систем вторичных посредников, например фосфолипазы С, инозитол-3-фосфата, ионизированного Ca^{2+} , протеинкиназы С. Под влиянием стероидных гормонов в клетке может увеличиваться содержание сАМР и сGMP.



1 — классический геномный путь действия (гормон проникает через клеточную мембрану и цитоплазму в ядро, где после взаимодействия с ядерным рецептором воздействует на гены-мишени, активируя их). 2а и 2б — негеномные пути действия через мембранные рецепторы: 2а — пути, связанные с мембранным ферментом и образованием вторичного посредника, ведущего к активации протеинкиназ. Последние через фосфорилирование в ядре белка-коактиватора (БКА) активируют гены-мишени; 2б — пути, связанные с ионными каналами клеточной мембраны, в результате чего гормон-рецепторный комплекс активирует ионные каналы, меняя возбудимость клетки. 3 — альтернативный негеномный путь действия (молекула гормона, проникая через мембрану в

цитоплазму, взаимодействует с цитозольным рецептором, что приводит к активации цитозольных киназ.

Рисунок 1.3.5 – Схема путей действия стероидных гормонов

Тиреоидные гормоны, как и стероидные гормоны, могут проявлять геномные и негеномные эффекты.