

В.А. Ткачук, А.В. Воротников,
П.А. Тюрин-Кузьмин

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭНДОКРИНОЛОГИИ

Рецепция и внутриклеточная сигнализация

Учебное пособие

Под редакцией академика РАН В.А. Ткачука

Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ФГАУ «Федеральный институт развития образования»
в качестве учебного пособия для использования в учебном процессе
образовательных учреждений, реализующих программы высшего
образования по направлениям подготовки 31.05.01 «Лечебное дело»,
32.05.01 «Медико-профилактическое дело»,
31.05.03 «Стоматология» (уровень специалитета)

Регистрационный номер рецензии 423 от 27.12.2016 года



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2017

Глава 4

РЕЦЕПТОРЫ РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО СТРУКТУРЕ И СПОСОБУ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

По биохимическому определению, рецептором является молекула белка, либо погруженная в плазматическую мембрану, либо находящаяся в цитозоле и связывающая одну или несколько сигнальных молекул специфической структуры. Рецепторы разнообразны; это разнообразие продиктовано широким спектром молекул различной формы и размеров, которые выступают лигандами. Часто рецепторы для разных лигандов имеют однотипные строение и основной механизм трансмембранной передачи сигнала. Более того, рецепторы различных лигандов часто активируют одни и те же внутриклеточные сигнальные каскады. Тем не менее это не значит, что для рецепторов каждой группы клеточные реакции абсолютно идентичны. Разнообразие последних определяется тем, какие дополнительные пути передачи сигнала задействует каждый рецептор и каким образом они объединяются в единую систему передачи сигнала, именуемую сигнальной сетью. Кроме того, клетки тканей организма содержат разный набор рецепторов и их изоформ, что приводит к еще большему разнообразию вариантов клеточных ответов на одни и те же лиганды.

4.1. СКОРОСТЬ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ СВЯЗАНА СО СПОСОБОМ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Подавляющее большинство биологически активных соединений (гормонов, нейромедиаторов, ядов, токсинов, лекарственных препаратов или других агентов) изменяет функциональную или метаболическую активность клеток одним из трех способов. Во-первых, они могут менять концентрацию ионов, коферментов и субстратов метаболизма в клетке, а также распределение молекул-мишеней между клеточными компартментами или белковыми комплексами. Часто это достигается

путем изменения проницаемости клеточных мембран для ионов или метаболитов. Например, потенциал действия, вызываемый нейромедиаторами, возникает в результате входа Na^+ и выхода K^+ из клетки. Альдостерон и вазопрессин контролируют проницаемость мембран в почках для Na^+ и воды, тем самым регулируя объем крови. Многие гормоны вызывают вход Ca^{2+} в клетку, вызывая широкий спектр реакций, включая мышечное сокращение. Инсулин и соматомедины стимулируют транспорт в клетку глюкозы и аминокислот. Во-вторых, многие гормоны вызывают более медленные метаболические реакции, связанные с поведением клетки в окружающей среде и накоплением/расходом энергетических ресурсов. Наконец, в-третьих, гормоны контролируют длительные морфогенетические изменения, которые позволяют клетке приспосабливаться к внешним условиям или выполнять репродуктивную функцию.

Как быстро действуют гормоны? Во-первых, это зависит от того, насколько быстро гормональный сигнал передается в клетку и достигает своих конечных мишеней. На скорость этого процесса влияет то, какой способ (механизм) проведения сигнала реализует клетка. Во-вторых, быстрота действия гормона зависит от скорости развития реакций, которые следуют за передачей сигнала и запускаются конечными мишенями сигнальных каскадов. На эту скорость влияет то, какая регуляторная стратегия используется конечными мишенями для изменения активности внутриклеточных процессов. Если сопоставить первое со вторым, то можно увидеть соответствие, в общем виде показанное на рис. 1.1. Оно иллюстрирует, что использование клеткой определенных механизмов проведения гормонального сигнала в большинстве случаев согласуется со скоростью развития клеточной реакции.

Как известно, самые быстрые реакции развиваются в процессе передачи нервного импульса. Этот процесс схематически показан на рис. 2.8. Нервный импульс распространяется вдоль мембраны нейронов как потенциал действия, который имеет электрическую природу и возникает за счет быстрого изменения ионной проводимости плазматической мембраны. Однако в участке контакта двух клеток (синапсе) передача сигнала осуществляется по механизму лиганд-рецепторного взаимодействия. Часто нейромедиатором (лигандом) выступает ацетилхолин. Он скапливается около мембраны нервных окончаний в составе секреторных пузырьков. Потенциал действия вызывает его быстрый выброс в межклеточное пространство, где ацетилхолин связывается с холинэргическими рецепторами, расположенными в инвагинациях мембраны

концевой пластинки клетки-реципиента, в данном случае мышечной. Ацетилхолин вызывает быстрый вход ионов Ca^{2+} в эту клетку, опосредованный открытием мембранных каналов. В свою очередь Ca^{2+} запускает взаимодействие актина и миозина, ведущее к развитию мышечного сокращения. На мембране концевой пластинки также расположен фермент холинэстераза (см. рис. 2.8); он быстро расщепляет ацетилхолин, тем самым препятствуя развитию контрактуры — длительного и чрезмерного сократительного ответа.

В случае чисто нервной передачи область клеточного контакта двух нейронов (синапс) очень мала. В окоლოსинаптической области одной клетки концентрируются синаптические пузырьки с нейромедиатором, а в другой клетке рядом с этим местом сконцентрированы соответствующие рецепторы. Это, а также снижение диффузионных ограничений для нейромедиатора (относительная замкнутость межсинаптического пространства) способствует ускорению передачи сигнала. Действуя через мембранные каналы в принимающей клетке, нейромедиатор вызывает быстрое изменение мембранного потенциала, образование потенциала действия и его распространение вдоль мембраны принимающего нейрона.

Все другие механизмы передачи сигнала (от метаболитных и внутриклеточных рецепторов — см. рис. 1.1) значительно более медленные; подробно они разбираются в последующих разделах. Для них характерно, что они вызывают первичные изменения на молекулярном уровне, которые лишь затем ведут к видимым изменениям на уровне целой клетки и организма. Довольно быстрые изменения опосредованы метаболитными рецепторами, контролирующими метаболические реакции. Более длительные изменения опосредованы внутриклеточными рецепторами, вызывающими синтетические реакции клетки. Время наступления клеточных ответов после воздействия стимула варьирует в широких пределах. Реакции на появление лигандов метаболитных рецепторов могут возникать достаточно быстро (в секундной-минутной шкале), например при необходимости срочных поведенческих ответов. Так, клетки быстро меняют направление движения и ускоряются, двигаясь в сторону пищевых источников или, наоборот, уходя от вредных воздействий. Особенно такие реакции проявляются у одиночных клеток, то есть тех, которые живут относительно независимо и должны быстро реагировать на появление пищи или неблагоприятных условий. В природе такими клетками являются одноклеточные бактерии и амебы. Они развивают быстрые двигательные реакции в течение нескольких минут или даже десятков секунд. При этом эти клетки используют гормоноподобные соединения,

активирующие метаболитные рецепторы, чтобы передавать информацию друг другу и организовывать коллективное поведение.

Реакции клеток на воздействие метаболитических гормонов в многоклеточных организмах, в частности у человека, развиваются несколько медленнее (см. рис. 1.1). Как правило, они связаны с посттрансляционными модификациями белков и ферментов. Соответственно, большинство их мишеней локализовано в цитоплазме или неядерных органеллах, например митохондриях, ЭР или внутриклеточных везикулах. Действие этих гормонов направлено на метаболитические перестройки и переключение между распадом и синтезом энергетических запасов и структурных компонентов клетки. Эти процессы занимают определенное время и не могут происходить так быстро, как поведенческие реакции. Они находятся в минутно-часовом диапазоне, сопоставимым с периодами стабильного поступления пищевых ресурсов или их недостатка. Только в такой ситуации организм может адекватно реагировать на смену окружающих условий. Как правило, регулирующие метаболизм гормоны действуют в функциональном антагонизме, стимулируя анаболизм (инсулин) или, наоборот, катаболизм (адреналин и глюкагон).

Внутриклеточные гормоны контролируют медленные синтетические процессы (см. рис. 1.1), ведущие к глобальным морфогенетическим изменениям. Они изменяют доступность генома для прочтения, экспрессию генов и скорость прохождения клеточного цикла. На уровне организма эти реакции проявляются как рост, развитие, дифференцировка и старение. Поэтому ядро клетки является главным местом действия этих гормонов.

Разделение гормонов по скорости действия (развития клеточной реакции) весьма удобно для понимания различий во внутриклеточных мишенях и механизмах проведения сигнала. Такой подход позволяет сделать некоторые обобщения, показывающие, что для «быстрых» гормонов преимущественно характерны одни способы передачи сигнала, тогда как для «медленных» — другие. Вместе с тем по мере развития молекулярной эндокринологии стало ясно, что эта классификация гормонов, как, впрочем и любая другая, довольно условна из-за плеiotропности действия гормонов. Хорошо известно, что цитокины стимулируют как быстрые реакции, связанные с движением клетки, так и транскрипцию генов. Аналогично, факторы роста и вызывают быстрые реакции по изменению формы клетки, и регулируют клеточный цикл. Такой «чисто метаболитический» гормон, как инсулин, регулирует также адипоцитарную дифференцировку клеток-предшественников и старение клеток. Стероидные

гормоны действуют не только на внутриклеточные рецепторы, вызывая медленные синтетические ответы, но и активируют другие типы рецепторов, вызывая быстрые метаболические реакции.

В качестве альтернативной классификации рецепторов гормонов можно использовать молекулярный механизм их действия в клетке. Знание этих механизмов удобно еще и тем, что позволяет понять, возможно ли принудительно корректировать нежелательные реакции клеток и организма на неблагоприятные факторы внешней среды. Особенно важно это для современной эпохи техногенного развития общества. Поэтому следующие главы будут посвящены молекулярным механизмам действия гормонов.

4.2. РАЗНООБРАЗИЕ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ПРИРОДОЙ ЛИГАНДА

Внутриклеточные рецепторы часто называют ядерными по месту выполнения их главной функции. Тем не менее помимо ядра они могут быть локализованы и связывать свои лиганды в цитоплазме. Однако цитоплазматические рецепторы тоже перемещаются в ядро после связывания лиганда. Лигандами внутриклеточных рецепторов выступают жирорастворимые молекулы, такие как стероидные гормоны тестостерон и прогестерон, а также производные витаминов А и D. Они легко проникают через клеточные мембраны и попадают внутрь клетки путем простой диффузии. В сущности, внутриклеточными рецепторами являются лиганд-регулируемые транскрипционные факторы. Активированные внутриклеточные рецепторы контролируют экспрессию генов; они связываются со специальными последовательностями на ДНК, известными как HRE (hormone response element), и запускают или подавляют экспрессию соседних генов путем соответствующих изменений активности транскрипционных комплексов. В дополнение лиганд-связывающие домены этих рецепторов (LBD, ligand binding domain) контролируют ремоделирование хроматина за счет модификаций составляющих его белков, в основном регулируя ацетилирование гистонов. Активация экспрессии генов является более медленной реакцией, чем воздействие на уже существующие сигнальные белки, поэтому большинство реакций, вызываемых внутриклеточными рецепторами, имеют долгосрочный характер.

Мембранные рецепторы изучены сравнительно хорошо. Молекула лиганда не проникает сквозь мембрану, она связывается с внеклеточ-

ной частью таких рецепторов, вызывая изменения их конформации и, особенно, его внутренней части. Если рецептор является ферментом, такое событие ведет к изменению его ферментативной активности. В ином случае оно ведет к открытию участков связывания внутриклеточных молекул на внутренней части рецептора, что запускает передачу сигнала (сигнализацию) внутрь клетки. Такая организация обеспечивает относительно быструю рецепцию внешних сигналов и передачу информации о них внутрь клетки.

Согласно общей классификации рецепторов по структуре и механизму действия, выделяют четыре основные группы мембранных рецепторов, являющихся интегральными мембранными белками (рис. 4.1). *Лиганд-управляемые ионные каналы* (ligand-gated ion channels, LGIC) и *рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками* (G-protein coupled receptors, GPCR), составляют две наиболее известные и характеризованные группы. В группе *рецепторов-ферментов* выделяют несколько подгрупп. Среди них рецепторные тирозиновые киназы (receptor protein tyrosine kinases, RPTK) и небольшая группа рецепторных серин-треониновых киназ, а также рецепторы-ферменты с некиназной активностью, такие как гуанилатциклазные (guanylyl cyclase, GCase). Четвертую группу составляют *цитокиновые рецепторы* (cytokine receptors, CR). По способу действия они очень похожи на RPTK, но не имеют своей ферментативной активности и привлекают в качестве партнеров ферменты из цитозоля. Последними в основном являются протеинкиназы, которые связывают активированные цитокиновые рецепторы и только после этого фосфорилируют специфические субстраты, таким способом передавая сигнал в цитоплазму. Следует отметить, что мембранная локализация всех этих рецепторов не означает их расположения исключительно на поверхности клетки. Они могут находиться также и на внутренних мембранах органелл, например на эндосомах, митохондриях или ЭР. Часто они попадают в эти участки вследствие интернализации внешних рецепторов.

4.3. МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ НАИБОЛЕЕ МНОГОЧИСЛЕННЫ

Мембранные рецепторы являются специализированными интегральными белками, которые осуществляют трансмембранную передачу информации от внешних сигналов (гормонов) внутрь клетки. Внеклеточные сигнальные молекулы (обычно гормоны, нейротрансмиттеры,

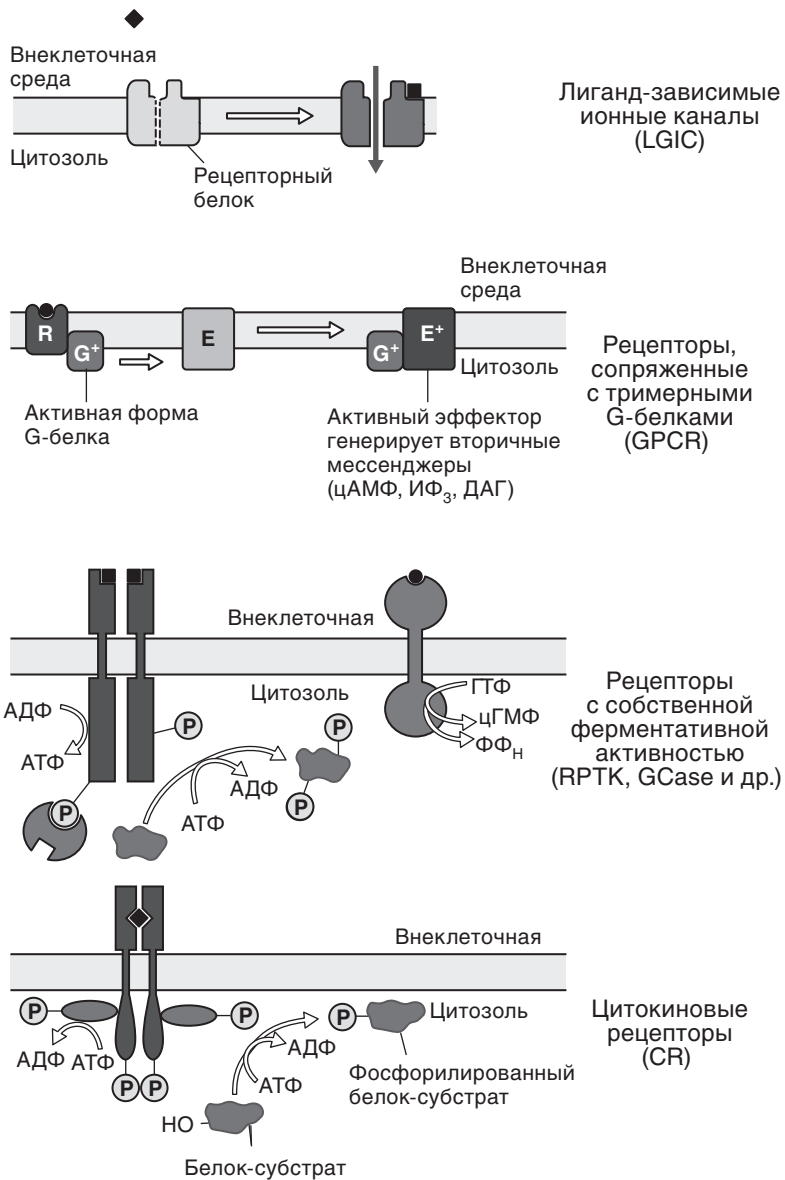


Рис. 4.1. Общая классификация мембранных рецепторов по структуре и механизму действия

цитокины, факторы роста, молекулы матрикса и межклеточного узнавания) выступают лигандами, которые связываются с рецепторами и изменяют поведение клетки. Связывание лигандов с внеклеточными доменами рецепторов вызывает набор взаимосвязанных химических реакций или структурных изменений специальных молекул с цитоплазматической стороны клеточной мембраны. Этот процесс представляет собой механизм переноса информации к конечным мишеням внутри клетки и называется внутриклеточной передачей сигнала или сигнализацией (англ. *signal transduction*).

Рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками (GPCR), называют также серпентиновыми или семидоменными, поскольку они содержат 7 характерных α -спиралей, погруженных в мембрану (рис. 4.2). В первичной последовательности эти спирали разделены гидрофильными последовательностями, которые в третичной структуре находятся вне мембраны. Образованная пространственная структура напоминает мехи или гармошку, содержащую семь трансмембранных звеньев. G-белковые комплексы, состоящие из трех субъединиц (α , β и γ), связываются с активированными рецепторами на внутренней стороне мембраны.

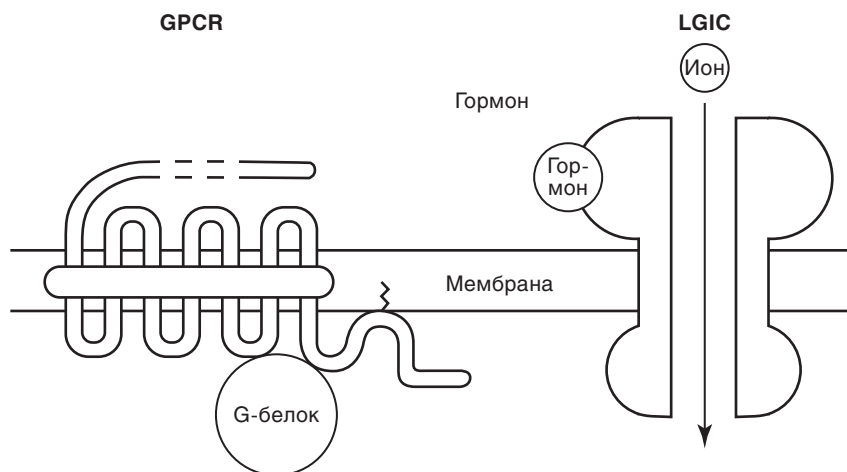


Рис. 4.2. Схематическое представление структуры рецепторов, сопряженных с тримерными G-белками (GPCR), и лиганд-управляемых ионных каналов (LGICs)

Лиганд-управляемые ионные каналы (LGICs) обычно построены из нескольких субъединиц, каждая из которых содержит трансмембран-

ный домен. Ассоциируя, они образуют бубликоподобную структуру (тор), внутри которой расположен канал (см. рис. 4.2). В несвязанном с лигандом состоянии субъединицы взаимодействуют так плотно, что внутренний канал практически отсутствует, то есть закрыт. Связывание гормона вызывает изменение конформации и взаимодействия субъединиц, которое приводит к появлению просвета, то есть открытию канала.

По функциональной нагрузке мембранные рецепторы принято разделять на *ионотропные* и *метаботропные*. По сути, это разделение отражает тип клеточного ответа при активации этих рецепторов. Согласно названию, ионотропные рецепторы регулируют ионные токи, то есть управляют лиганд-зависимыми ионными каналами. Они быстро меняют мембранный потенциал и таким образом опосредуют наиболее быстрые реакции клеток на воздействия внешней среды. Так реагируют зрительные, вкусовые и обонятельные клетки. Напротив, метаботропные рецепторы регулируют внутри клетки метаболические превращения (потоки энергии). Они используют адаптерные белки и ферменты для эстафетной передачи сигнала и изменения активности ферментов-мишеней.

Одни и те же гормоны могут действовать как на ионотропные, так и метаботропные рецепторы, вызывая тем самым клеточные ответы разных типов и разной временной шкалы. Это свойство наиболее характерно для низкомолекулярных соединений, многие из которых являются нейротрансмиттерами (ацетилхолин, глутамат, серотонин, гистамин и др.). Например, ацетилхолин связывается с ионотропными никотиновыми канальными рецепторами (nAChR) и с метаботропными мускариновыми GPCR (mAChR) (рис. 4.3). Эти традиционные названия возникли благодаря растительному алкалоиду табака никотину и ядовитому алкалоиду некоторых грибов мускарину, которые способны селективно связываться и активировать, соответственно, nAChR и mAChR. GABA-рецепторы для γ -аминомаслянной кислоты, пуриnergические рецепторы для АТФ/АДФ и серотониновые рецепторы также имеют ионотропные (LGIC) и метаботропные (GPCR) варианты (рис. 4.3). Гормоны белковой природы действуют, как правило, через один тип рецепторов. Но и в этом случае один гормон может оказывать в клетке эффекты разной временной шкалы в результате расхождения сигнала на пострецепторном уровне. Например, рецепторы факторов роста и цитокинов, которые очень сходны по типу передачи сигнала, вызывают как быстрые метаболические, так и затянутые синтетические реакции. Первые являются результатом активации цитоплазматических

мишеней киназных каскадов, вторые — транскрипционных факторов, действующих в ядре.

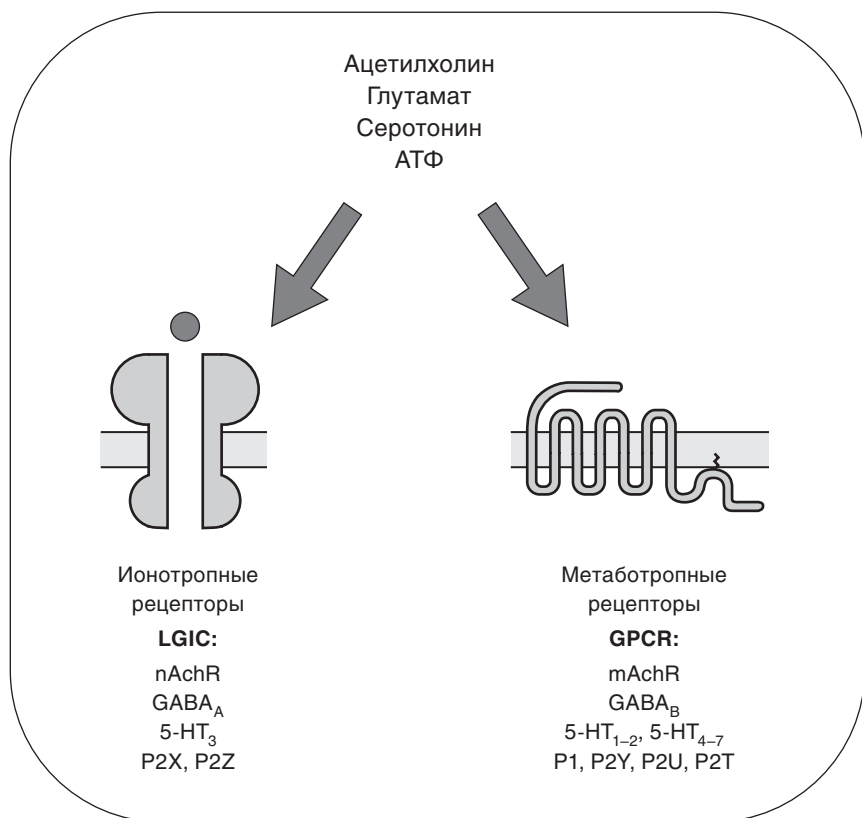


Рис. 4.3. Одни и те же гормоны могут взаимодействовать как с ионотропными, так и с метаботропными рецепторами на поверхности клетки

4.4. ЛИГАНД-УПРАВЛЯЕМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ НАИБОЛЕЕ БЫСТРЫЕ

Лиганд-управляемые ионные каналы (LGICs) открываются или закрываются в ответ на непосредственное связывание нейротрансмиттеров (внеклеточных лигандов этих рецепторов). Это отличает LGICs от каналов, опосредованно регулируемых метаботропными рецепторами через

внутриклеточные лиганды — вторичные посредники. Обычно LGICs располагаются в синапсах и принимают химический сигнал, идущий от пресинаптической мембраны, быстро переводя его в постсинаптический электрический сигнал. Как правило, участок связывания лиганда расположен на другой стороне белкового комплекса LGIC, чем канал, где проходят ионы, и таким образом является аллостерическим (рис. 4.4, см. цв. вклейку). Сходным образом устроены потенциал-управляемые и стретч-активируемые ионные каналы. Они не активируются прямым связыванием лиганда и реагируют, соответственно, на изменение трансмембранного потенциала и механическую деформацию мембраны.

Канальные рецепторы, содержащие Cys-петлю (рис. 4.5, см. цв. вклейку), названы так из-за характерной полипептидной петли, образуемой дисульфидной связью на внешней части рецептора. Классифицируются эти рецепторы по типу проводимого иона (анионные или катионные) и далее по группам, в соответствии с лигандом. Все они являются пентамерами.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются прототипными LGIC. Они имеют пять субъединиц и два участка связывания ацетилхолина (ACh), который при связывании изменяет конформацию рецептора и вызывает открытие канала (рис. 4.5, см. также рис. 1.2). Это позволяет ионам Na^+ входить по градиенту внутрь клетки, деполяризовать плазматическую мембрану и вызывать потенциал действия. α -Токсин из яда кобры действует как антагонист nAChR мышечного типа и вызывает паралич, препятствуя связыванию ацетилхолина с nAChR. Мускариновые mAChR относятся к GPCRs и связаны с G_q - и G_i -белками.

Лигандом *GABA-рецепторов* служит GABA. GABA_A-рецепторы являются основными ингибиторными (тормозящими) в ЦНС. В активированном состоянии они селективно проводят ионы Cl^- , приводя к гиперполяризации нейрона. Это снижает вероятность возникновения последовательных потенциалов действия и тормозит проведение нервного сигнала. Напротив, рецепторы GABA_B являются метаботропными и регулируют калиевые каналы через тримерные G-белки.

Глициновые рецепторы (GlyR) — одни из наиболее распространенных ингибиторных рецепторов в ЦНС, находящихся на постсинаптической мембране многих нейронов. Эти рецепторы выполняют множество физиологических функций, преимущественно ингибируя передачу нервного импульса. Так же как и GABA_A, активный GlyR проводит ионы Cl^- , гиперполяризуя мембрану нейрона. Связыванию глицина с GlyR препятствует вызывающий судороги алкалоид стрихнин.

Серотониновые (5-гидрокситриптаминовые, 5-НТ) рецепторы выявляются в центральной и периферической нервной системе. Только 5-НТ₃ серотониновый рецептор является возбуждающим ионотропным, а все другие — метаботропные, связанные с G_i/G_o, G_s, G_{q/11} тримерными G-белками. Рецепторы 5-НТ₃ могут быть и возбуждающими, и тормозящими. Они вызывают секрецию таких нейротрансмиттеров, как ГАВА, дофамин, адреналин/норадреналин, ацетилхолин, а также многих гормонов, включая окситоцин, пролактин, вазопрессин, кортизол, кортикостерон, кортикотропин, и вещество Р. Таким способом они контролируют множество реакций организма, в том числе агрессивность, беспокойство, аппетит, обучаемость, память, сон и температуру. Серотониновые рецепторы являются мишенями многих фармакологических соединений, к которым относятся антидепрессанты, антипсихотики, галлюциногены и препараты против мигрени.

ZAC (Zn²⁺-активируемый ионный канал) активируется спонтанно. Ген ZAC присутствует у человека и собаки, но у грызунов его гомологи не обнаружены. Функции ZAC остаются пока непонятными.

Глутаматные рецепторы связывают глутамат, действующий в качестве нейротрансмиттера. Глутаматные ионотропные рецепторы представляют собой неселективные катионные каналы. Они являются тетрамерами и классифицируются по агонистам, которые, помимо глутамата, могут активировать данный рецептор (рис. 4.6). Специфическим агонистом *AMPA-рецепторов* является α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изооксазолпропионовая кислота (AMPA). Для *каинатных рецепторов* агонистом служит каиновая кислота. Она была впервые получена из красной альговой водоросли *Digenea simplex*, имеющей японское название «Каинин-соу». Каинат является мощным стимулятором ЦНС. Он селективно активирует постсинаптические рецепторы при возбуждающей нейротрансмиттерной передаче, а также вызывает выброс тормозного нейротрансмиттера ГАВА. Для *NMDA-рецепторов* специфическим агонистом служит N-метил-D-аспартат (NMDA). Уникальным свойством этих рецепторов является их чувствительность к мембранному потенциалу, который вызывает связывание внеклеточного Mg²⁺ и фиксацию канала в открытом положении. Это делает возможным потенциалзависимый вход в клетку ионов Na⁺ и небольших количеств Ca²⁺, а также выход ионов K⁺. Постсинаптический NMDA-рецептор имеет сложную надмолекулярную структуру, в которую входят несколько регуляторных участков. Помимо специфического участка связывания агониста

(L-глутамата), он содержит участок связывания коагониста (которым является глицин) и аллостерические сайты, расположенные как на мембранной стороне (полиаминовый), так и в ионном канале (участки связывания двухвалентных катионов и неконкурентных антагонистов) (рис. 4.6).

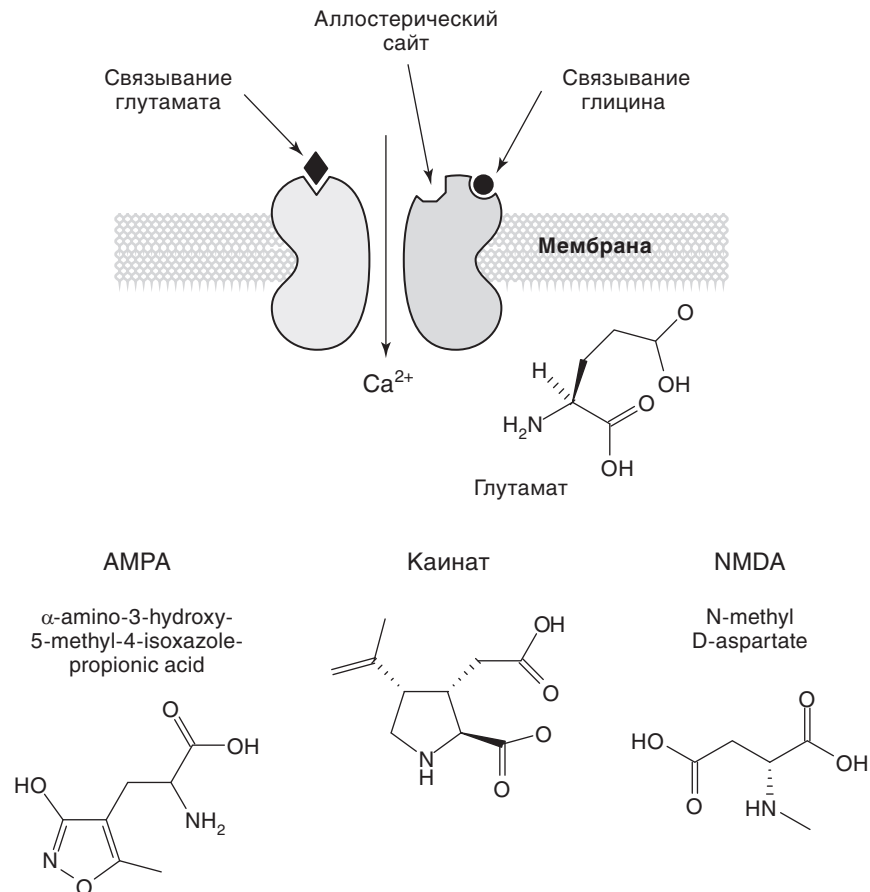


Рис. 4.6. Глутаматные рецепторы связывают глутамат, действующий в качестве нейротрансмиттера. Специфическим агонистом AMPA-рецепторов является α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изооксазолпропионовая кислота (AMPA) (α -amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid). Для кайнатных рецепторов агонистом служит кайновая кислота. Для NMDA рецепторов специфическим агонистом служит N-метил-D-аспартат (NMDA) (N-methyl D-aspartate)

АТФ-управляемые каналы составляют две группы P2-пуриnergических рецепторов, которые открываются в ответ на связывание внеклеточного АТФ. Среди всех пуриnergических рецепторов ионотропными являются только P2X и P2Z. Остальные P2-пуриnergические (P2Y, P2U и P2T), так же как и P1-пуриnergические рецепторы (A1 и A2, лигандом которых служит аденозин), сопряжены с тримерными G-белками и являются metabotropными. Идентифицированы 7 генов, кодирующих субъединицы P2X-рецепторов. Считается, что все P2X₁₋₇ способны образовывать гетеротримеры и только в виде тримеров они функционируют как канал. Ионотропные P2X-рецепторы обнаружены в разных тканях, но основную роль играют в сердечно-сосудистой системе, регулируя сократимость сосудов и сосудистый тонус, а также сократимость миокарда и ритм сердца.

4.5. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ МЕДЛЕННО РЕГУЛИРУЮТ ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ

Суперсемейство внутриклеточных рецепторов объединяет группу рецепторов стероидных, тиреоидных и некоторых других гормонов. Все их лиганды имеют гидрофобную природу и относительно свободно проникают сквозь клеточные мембраны, которые не являются для них барьером. Для одних лигандов рецепторы располагаются в цитоплазме, для других — в ядре, но в конечном счете все лиганд-рецепторные комплексы действуют в ядре (рис. 4.7). Поэтому эти рецепторы также называют ядерными.

Действие внутриклеточных рецепторов связано с регуляцией экспрессии генов (см. рис. 4.7). Они связывают лиганды внутри клетки и по локализации этого события различают рецепторы I или II типа. Рецепторы I типа связывают лиганды в ядре, II типа — в цитозоле, где этот комплекс стабилизируется белками теплового шока (HSP). Как правило, при активации ядерные рецепторы димеризуются. Попадая в ядро, они взаимодействуют со специальными последовательностями ДНК, которые в общем виде называются участками гормонального ответа или гормон-зависимыми элементами (hormone response elements, HREs). После этого они стимулируют или блокируют активность транскрипционных белковых комплексов, тем самым активируя или подавляя экспрессию генов. Внутриклеточные рецепторы влияют также на посттрансляционные модификации гистонов (в основном на их ацетилирование), таким образом участвуя в ремоделировании хроматина. Это связано с функционированием LBD (ligand binding domain) рецепторов.

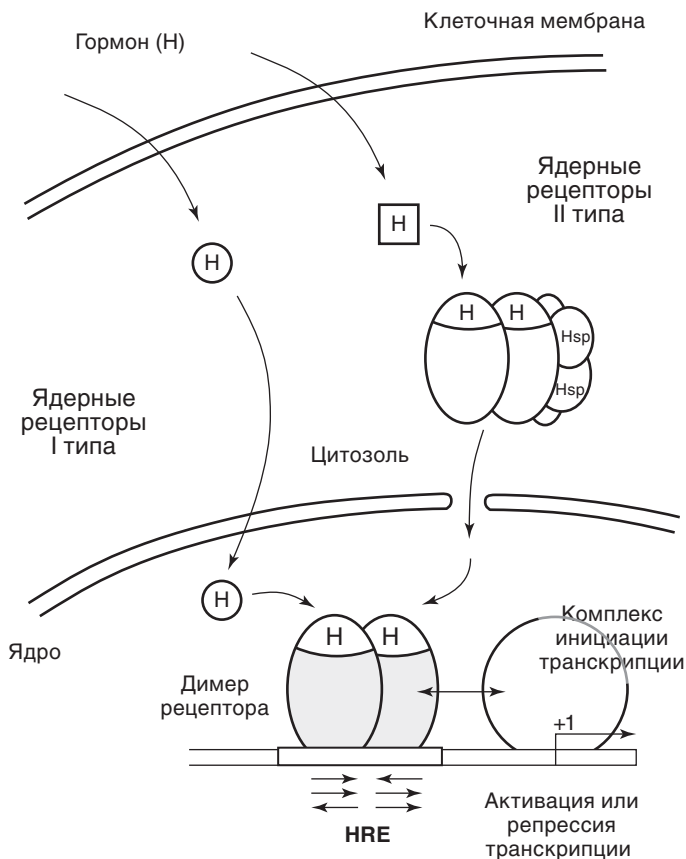
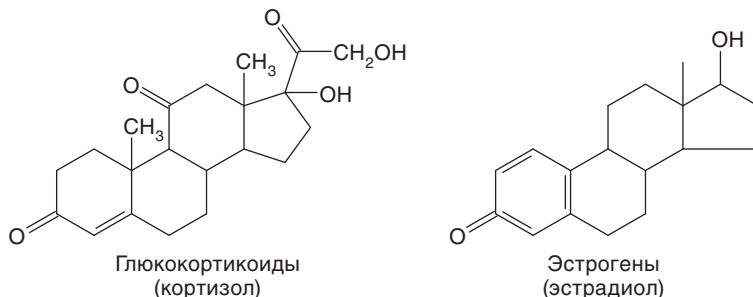


Рис. 4.7. Возможные механизмы действия внутриклеточных рецепторов. Ядерные рецепторы I типа связываются с гормоном (H) в ядре, где и действуют в качестве транскрипционных факторов. Ядерные рецепторы II типа связывают гормон в цитоплазме, и уже гормон-рецепторный комплекс направляется в ядро

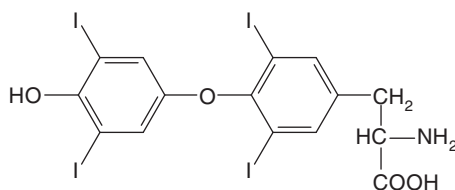
Классификация внутриклеточных рецепторов основана на природе лигандов. Выделяют четыре основные группы стероидных, тиреоидных, ретиновых и орфановых рецепторов (рис. 4.8), которые далее подразделяются на десять подгрупп. Орфановые (сиротские) рецепторы названы так потому, что лиганды для них пока не обнаружены. Для рецепторов остальных групп характерен определенный тип, а также количество последовательностей ДНК, с которыми они связываются. Это отличие обычно подчеркивают заменой первой буквы общей аббреви-

атуры участка связывания в ДНК, например, SRE является участком связывания стероидных (sterol response element), GRE — глюкокортикоидных, а ERE — эстрогеновых рецепторов.

Стероидные гормоны



Тиреоидные гормоны



Ретиновая кислота

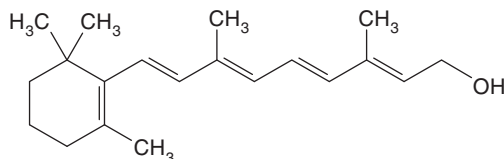


Рис. 4.8. Гормоны-лиганды внутриклеточных рецепторов

Рецепторы стероидных гормонов — наиболее поздние в эволюционном отношении. Они разделяются на глюкокортикоидные и эстрогеновые. Первые имеют четырех представителей, содержащих идентичный элемент, называемый P-box. С его помощью рецепторы узнают свой участок гормонального ответа, а именно GRE. По-видимому, вследствие своего недавнего появления эти рецепторы не показывают большого разнообразия и известны всего лишь несколько их изоформ (или изо-

рецепторов). Изорецепторы структурно и функционально отличны друг от друга, но связывают один и тот же гормон.

Эстрогеновые рецепторы занимают промежуточное положение между глюкокортикоидными и эволюционно более ранними тиреоидными. Хотя они имеют свой уникальный Р-бокс, структурно тот больше напоминает Р-бокс тиреоидных рецепторов, и оба типа рецепторов используют один НРЕ. Таким образом, тиреоидные рецепторы взаимодействуют с ERE. Более того, и эстрогеновые, и тиреоидные рецепторы могут взаимодействовать с ДНК лиганд-независимым образом, то есть без связанного гормона. Однако в отличие от тиреоидных, эстрогеновые рецепторы взаимодействуют с HSP, аналогично глюкокортикоидным, но с меньшим сродством.

Тиреоидные рецепторы — наиболее древние и поэтому наиболее разнообразны. Большинство членов этой группы имеют множество изоформ, которые чаще являются продуктами разных генов, и реже продуктами альтернативного сплайсинга мРНК. Все они имеют короткий участок, называемый А/В, и уникальный Р-бокс. Они проявляют высокое сродство к ДНК и часто связывают НРЕ, даже не будучи в комплексе с лигандом. Эти рецепторы не формируют стабильных комплексов с HSP, но могут кратковременно связываться с ними в процессе синтеза. Несмотря на одинаковый Р-бокс, организация и последовательность участков связывания в ДНК отличается для разных представителей этой группы. На самом деле один и тот же рецептор способен связываться с несколькими разными НРЕ. Так же как и остальные ядерные рецепторы, тиреоидные рецепторы димеризуются при активации, но эти взаимодействия неспецифичны и в результате могут образовываться разнообразные гетеродимеры. Как следствие, эти димеры также неизбирательно взаимодействуют с НРЕ как в прямой, так и обратной ориентации их повторов.

Ретиновые рецепторы служат мишенями 9'-цис-ретиновой кислоты (RXR) и транс-ретиновой кислоты (RAR). Ретиновая кислота является метаболитом витамина А (ретинола) и опосредует его действие в процессе роста и развития организма. Функционируют ретиновые рецепторы в виде гомо- и гетеродимеров, главным образом, регулируя транскрипцию генов так называемого Нох-семейства. В процессе раннего эмбрионального развития организма эти гены отвечают за определение типа сегментов и взаимное расположение частей тела в переднезаднем направлении (anterior/posterior patterning). Кроме того, во взрослом организме ретиновые рецепторы регулируют экспрессию

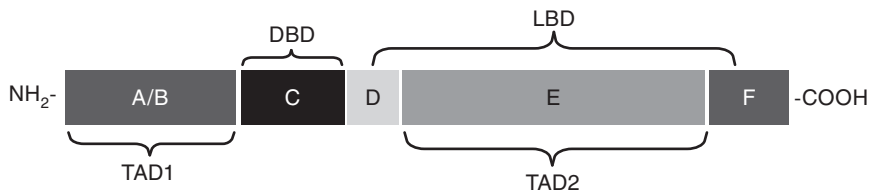
ферментов жирового обмена, таких как апобелок А1, внутриклеточный ретинол-связывающий белок, синтаза и дегидрогеназа ацил-СоА и некоторые ферменты окисления жирных кислот.

Орфановые рецепторы составляют группу белков, гомологичных ядерным рецепторам, для которых не известны лиганды. Связывание лиганда считается эволюционно приобретенной способностью предсуществующих белковых молекул. Поэтому орфановые рецепторы могут рассматриваться как более примитивный тип регуляции, находящийся на стадии становления или происходящий за счет посттрансляционных модификаций. Как альтернатива, эти рецепторы могут быть интракринными и их лигандами могут выступать молекулы внутриклеточных метаболитов.

В отличие от самих рецепторов действие лигандов внутриклеточных рецепторов связано не только с геномом, но и с регуляцией метаболических процессов от поверхностных рецепторов клетки. Это явление еще раз указывает на отмеченную выше возможность относительно независимого происхождения рецепторов и их лигандов в процессе эволюции. Хорошей иллюстрацией могут служить эстрогеновые рецепторы. Эти рецепторы представлены в клетках тремя группами, ER α , ER β и GPR30, разнообразие изоформ которых обеспечивается альтернативным сплайсингом. С одной стороны, ER α и ER β функционируют как классические рецепторы I типа и опосредуют длительные реакции клеток, связанные с изменением экспрессии генов. В комплексе с белком HSP90 они связывают в цитоплазме проникающие в клетку эстрогены, после чего диссоциируют от HSP90 и переходят в ядро. Там они связываются с эстроген-чувствительными локусами ДНК, усиливая (ER α) или подавляя (ER β) транскрипцию генов. Однако, кроме этого, ER α и ER β присутствуют также и на плазматической мембране. При связывании лигандов они димеризуются и активируют сигнальные каскады, типичные для мембранных рецепторов: PI3-киназный и MAP-киназный каскады, тирозиную киназу Src, фосфолипазу C, PKC, инозитол-трифосфат и Ca²⁺. Эти каскады ведут к изменению транскрипционной активности, а также обеспечивают и негеномные эффекты эстрадиола. В дополнение к этому, эстрогеновый рецептор GPR30 прямо сопряжен с G-белками. Он содержит характерные семь трансмембранных доменов, действует специфично и независимо от ER α и ER β , вызывая в клетке быстрые метаболические реакции. Он активирует аденилатциклазу и цАМФ-зависимые реакции, а также матриксную металлопротеиназу (ММП). Последняя отщепляет от поверхности клеток связанный

с гепараном эпидермальный фактор роста (HB-EGF) и переводит его в активную форму (EGF), таким образом активируя его рецептор и связанные с ним тирозинкиназные каскады.

Структура внутриклеточных рецепторов достаточно однотипна (рис. 4.9). Они содержат четыре основных домена, разделенных шарнирным участком. Эти части последовательно обозначаются буквами А-D, начиная с N-конца молекулы. Домены С и Е наиболее консервативны, но различия в домене Е обеспечивают связывание разных лигандов. Домены А/В наиболее вариабельны и изоформы отличаются главным образом по домену А, что обеспечивает их различия в отношении активации транскрипции.



DBD : ДНК-связывающий домен

LBD : лиганд-связывающий домен

TAD1 : домен лиганд-независимой трансактивации

TAD2 : домен лиганд-зависимой трансактивации

Рис. 4.9. Внутриклеточные рецепторы имеют однотипную структуру

N-концевой А/В-домен не имеет отчетливой и стабильной третичной структуры. Он приобретает нужную конформацию при взаимодействии с другими частями рецептора, ДНК и коактиваторами транскрипции. Активация транскрипции является его основной функцией. Домен А/В несет один из двух субдоменов активации транскрипции (TAD1). Второй такой субдомен (TAD2) расположен в домене Е. Две другие функции А/В-домена также имеют прямое отношение к транскрипционной активности. Они обеспечивают рецепторный синергизм и генную избирательность. Суть рецепторного синергизма заключается в том, что активация нескольких HRE оказывает существенно больший эффект на транскрипцию, чем простая арифметическая сумма эффектов индивидуальных HRE. Считается, что этот механизм зависит от коактиваторов: чем больше рецепторов связано рядом с геном, тем больше вероятность того, что необходимые факторы будут привлечены и останутся в непосредственной близости с комплексом. Понятие генной селективности

означает, что группа транскрипционных факторов, связанных с локусом TAD1, может активировать другой набор генов, чем факторы, связывающиеся с последовательностью TAD2.

ДНК-связывающий С-домен (DBD) состоит из двух «цинковых пальцев», стабилизированных α -спиралями, а также дополнительных линейных структур (T-box и A-box) (рис. 4.10, а). Каждый Zn^{2+} -связывающий участок содержит две пары цистеинов, отстоящих друг от друга на 10–15 остатков и координирующих ион Zn^{2+} . Когда была выяснена пространственная структура DBD, оказалось, что в ней доминируют не «пальцы», а две примыкающие α -спирали; каждая начинается на С-конце Zn^{2+} -связывающего кармана и служит продолжением «пальца» (рис. 4.10, б). В третичной структуре эти спирали располагаются перпендикулярно друг другу так, что N-концевая спираль ориентируется поперек ДНК и попадает в канавку между ее витками, а С-концевая лежит сверху вдоль нити ДНК. Такая структура позволяет димеру рецептора стереоспецифично связывать ДНК наподобие скрепки (рис. 4.10, в). При этом N-концевые спирали формируют прочные контакты с определенными нуклеотидными остатками ДНК, а С-концевые определяют регистр и придают всей структуре жесткость. Такая конфигурация очень напоминает спираль-петлю-спираль, характерную для транскрипционных факторов прокариот. Р-box находится в N-конце первой спирали; он непосредственно узнает и связывает HRE.

Некоторые представители тиреоидных рецепторов имеют две дополнительные последовательности к С-концу от второй спирали: T-box нужен для димеризации рецептора, и A-box (или H-box) взаимодействует с А/Т-богатой последовательностью к 5'-концу от HRE. Кроме того, DBD имеет несколько минорных участков димеризации: CI и DR (direct repeat), находящиеся в первом «цинковом пальце», а также D-box и CII, находящиеся во втором. Димеры взаимодействуют с палиндромными HRE в ориентации «голова-к-голове», что позволяет N-концевым частям каждого второго «пальца» располагаться антипараллельно друг другу и формировать множественные водородные и ионные связи (рис. 4.10, в). Однако этих взаимодействий оказывается недостаточно, чтобы стабилизировать структуру димера в растворе, и они вносят существенный вклад на стадии кооперативного связывания димера с HRE.

Шарнирный участок D разделяет DBD и LBD, обеспечивая им относительную подвижность. Однако главной функцией D-участка является ядерная локализация рецептора. Он несет специальную последовательность импорта белка в ядро (nuclear localization signal, NLS), которая

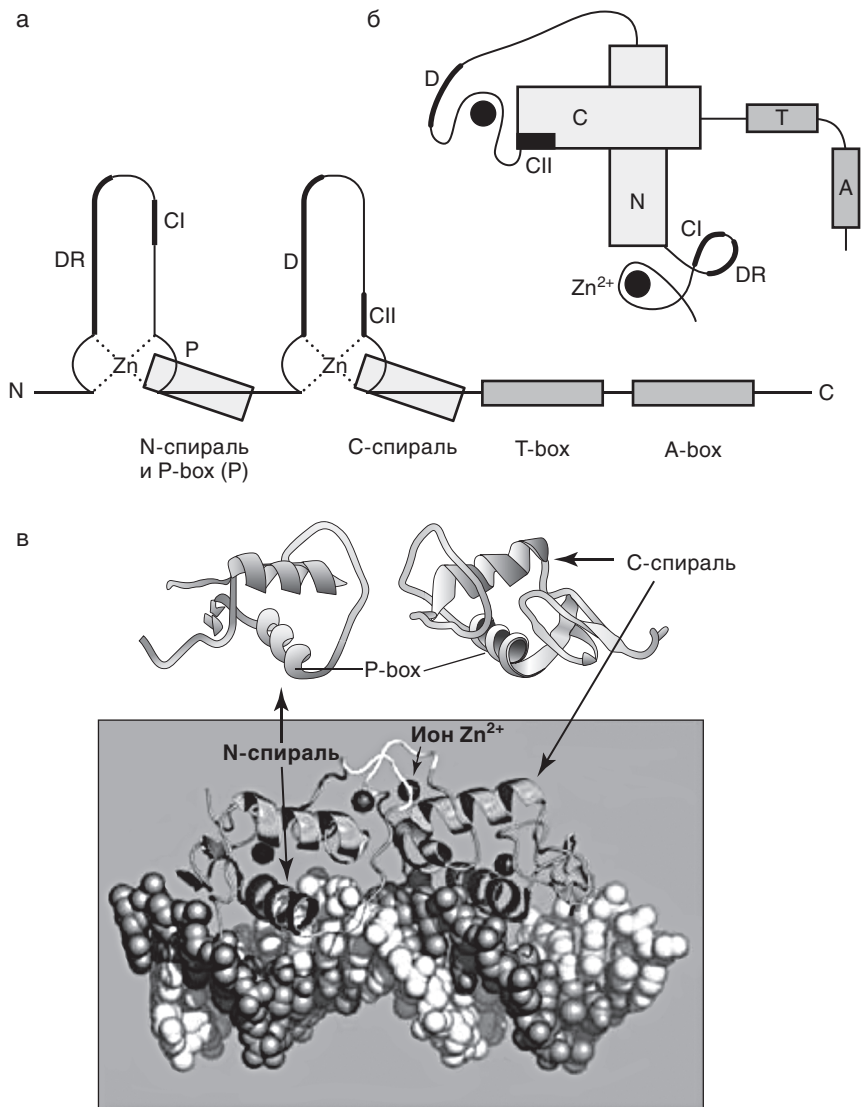


Рис. 4.10. Структура внутриклеточных рецепторов: а — ДНК-связывающий С-домен (DBD) состоит из двух «цинковых пальцев», стабилизированных α -спиралями, а также дополнительных линейных структур (Т-бокс и А-бокс); б — структура DBD домена; в — связывание внутриклеточного рецептора с дезоксирибонуклеиновой кислотой

узнается транспортными системами ядра. Часто этой последовательности предшествует участок фосфорилирования казеинкиназой II типа (СК2), которая ускоряет транспорт в ядро. Шарнирный участок имеет также несколько дополнительных функций. Во-первых, он участвует в димеризации и связывании ДНК, поскольку фактически в нем расположены А-бокс и Т-бокс. Во-вторых, некоторые остатки, участвующие в узнавании лиганда и входящие в протяженные лиганд-связывающие последовательности LBD, также попадают в участок D. Наконец, здесь связываются некоторые коактиваторы и репрессоры транскрипции. Наиболее важными из них являются белки HMGB (high mobility group B), которые повышают сродство стероидных рецепторов к ДНК.

Лиганд-связывающий домен E (LBD) выполняет четыре важные функции. Главная следует из его названия — это связывание лиганда. Другими являются активация транскрипции, димеризация рецептора и связывание HSP. Пространственная структура LBD имеет тип сэндвича, построенного тремя взаимоперпендикулярными уровнями α -спиралей. Ее приблизительная 3-мерная топография показана в виде стереопары на рис. 4.11, а, где в качестве примера изображен LBD рецептора витамина D в комплексе с синтетическим лигандом Gemini. В этой структуре спирали, расположенные слева сверху, почти перпендикулярны плоскости, образованной правыми нижними спиралями, а третья плоскость сформирована β -складками на переднем плане. Структура LBD ядерных рецепторов состоит только из α -спиралей. Она схематично представлена ниже, на рис. 4.11, б. Спирали 4, 8 и 9 лежат параллельно позади спирали 5 и поэтому не видны. Спирали 11/12 имеют разделяющую их точку перегиба и считаются разными. В отсутствие лиганда они лежат вне третьей плоскости и их гидрофобная поверхность экспонирована наружу. Она создает «вход» для гидрофобных лигандов. После связывания лиганда спираль 11/12 складывается, создавая две важные поверхности, и «вход» закрывается. Во-первых, третий уровень спиралей становится плоским и формирует контактный интерфейс для образования димеров. Во-вторых, он полностью оформляет борозду на краю LBD, представляющую собой TAD2. Размер и строение борозды таковы, что она связывает α -спирали, несущие последовательность LxxLL, обозначаемую как домен взаимодействия с ядерными рецепторами (NID), или просто NR-box. Эти домены присутствуют практически во всех коактиваторах и репрессорах транскрипции, которые являются партнерами ядерных рецепторов. В апорецепторе (без лиганда), с TAD2-последовательностями связаны репрессоры, и они держат актив-

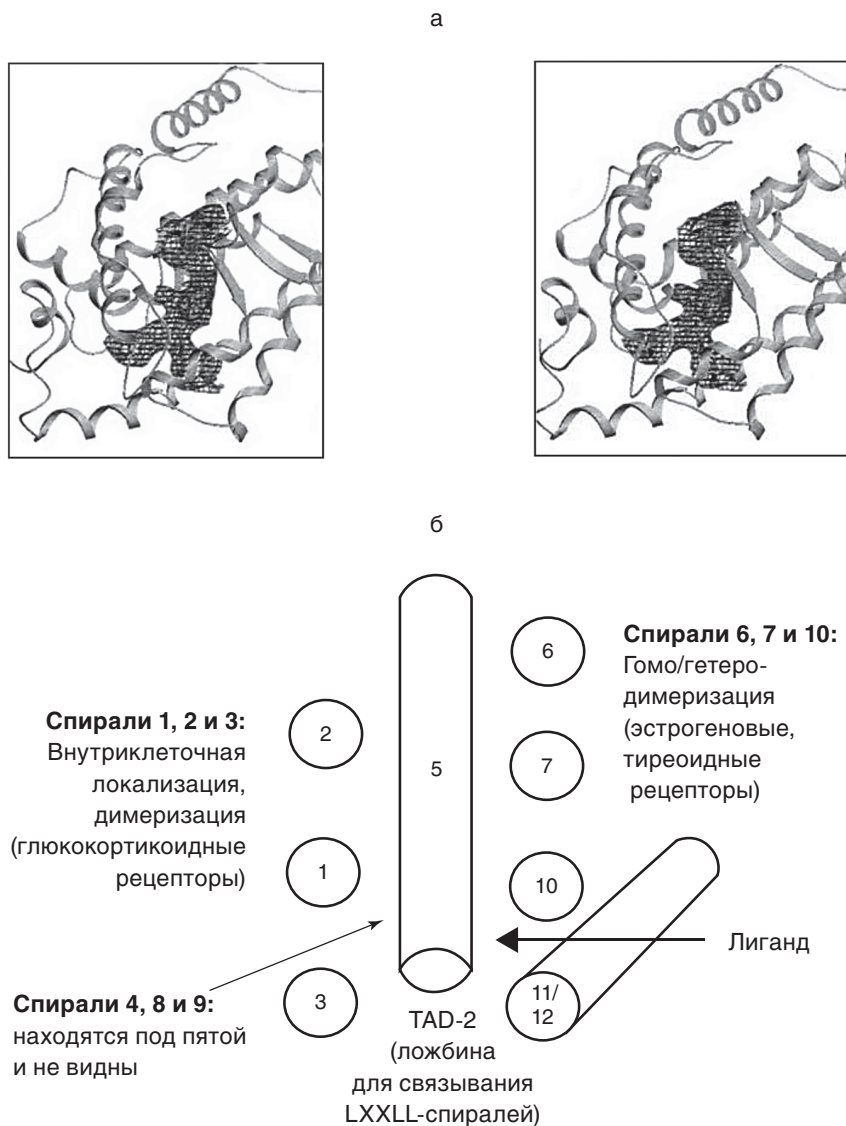


Рис. 4.11. Пространственная структура лиганд-связывающего домена внутриклеточных рецепторов: а — стереопара лиганд-связывающего участка, вид с торца; б — нумерация и схема расположения альфа-спиралей лиганд-связывающего участка, которые могут быть идентифицированы в (а)

ность транскрипционного комплекса на низком уровне. Когда спирали 11/12 структурируют борозду так, что создаются структурные предпосылки для замещения репрессоров коактиваторами и создания активного транскрипционного комплекса. Поверхность первого α -спирального слоя участвует в связывании HSP, компонентов ядерного матрикса и цитоскелета. Помимо этого, у глюкокортикоидных рецепторов здесь находятся второй NLS и структура, репрессирующая транскрипционную активность.

F-домен является просто C-концевым. У многих ядерных рецепторов вся эта последовательность участвует в связывании гормона и формально относится к LBD; эти рецепторы фактически лишены F-домена. В тех же рецепторах, где этот домен присутствует, с ним связан весьма ограниченный набор второстепенных функций. Однако для эстрогеновых рецепторов этот домен важен, так как он участвует в связывании коактиваторов.

Механизм действия внутриклеточных рецепторов включает несколько важных этапов. Изначально они пребывают в динамическом равновесии между неактивной и активной конформациями. Лиганды и коактиваторы стабилизируют активную форму, а HSP, кошапероны и иммунофилины (для цитозольных рецепторов) или корепрессоры (для ядерных рецепторов) стабилизируют неактивную конформацию. Различные ковалентные модификации могут также стабилизировать одну из конформаций, в зависимости от расположения участка фосфорилирования и конкретного рецептора. Финальная конформация, приобретаемая рецептором, зависит от комбинации этих факторов. Этот механизм весьма логичен и с той точки зрения, что связывание лиганда является более поздним приобретением внутриклеточных рецепторов. Возможно, что до этого транскрипционные факторы регулировались другими факторами; связывание лиганда эти факторы не заменило, а было к ним просто добавлено.

Активация рецептора путем связывания лиганда является первым этапом. Это событие вызывает несколько последствий. Во-первых, изменяется конформация рецептора и спираль 11/12 сдвигается так, что «вход» в лиганд-связывающий карман закрывается, рецептор становится более компактным и устойчивым к действию протеолитических ферментов. Во-вторых, от рецептора диссоциируют связанные с ним HSP, их кошапероны и иммунофилины, стабилизовавшие рецептор в неактивной конформации. В-третьих, эти изменения ведут к димеризации рецептора и особенно важным является изменение

положения спирали 11/12 в зоне контакта мономеров. В-четвертых, если рецептор находится в цитоплазме и связывает там лиганд, то диссоциация HSP ведет к открытию NLS и димер рецептора транслоцируется в ядро. До сих пор непонятно, влияет ли связывание лиганда на взаимодействие рецептора с ДНК или только на диссоциацию HSP и перемещение рецептора в ядро. Тот факт, что изолированный DBD-домен конститутивно активен, свидетельствует о том, что лиганд для связывания рецептора с ДНК не нужен. В-пятых, связывание лиганда провоцирует фосфорилирование рецептора, вероятно, открывая доступ киназам. Однако последовательность всех этих событий четко не определена.

Функции фосфорилирования рецепторов остаются во многом противоречивы, хотя определены многие протеинкиназы и картировано большинство модифицируемых остатков. Считается, что фосфорилирование оказывает прямое и не прямое воздействие. Для внутриклеточных рецепторов характерно так называемое иерархическое, или последовательное фосфорилирование. Его суть заключается в том, что каждая предыдущая модификация оказывает перmissive эффект, разрешая последующую. Это достигается тем, что фосфорилированный остаток становится определяющим для узнавания субстрата следующей киназой. Существуют три различные фазы фосфорилирования. Базальное, или конститутивное, происходит в процессе синтеза рецептора или сразу после него. Гормон-зависимое фосфорилирование происходит после связывания лиганда. Третья серия этих модификаций происходит под действием ДНК-зависимой протеинкиназы после связывания рецептора с ДНК. Фосфорилирование может влиять на локализацию рецептора, стабильность активной или неактивной конформации, активность транскрипционного комплекса или сродство к лиганду.

Транскрипционное действие димеров ядерных рецепторов зависит от их связывания с участками HRE в ДНК, а также с корегуляторами — коактиваторами и корепрессорами (рис. 4.12). Первое обеспечивают DBD, а второе — TAD-последовательности рецепторов. TAD2 формируется лиганд-зависимым образом при смещении спирали 11/12. По-видимому, TAD1 эволюционно более ранний, он работает независимо от связывания лиганда. В комплексе с димерами рецепторов корегуляторы изменяют его транскрипционную активность. Однако они не служат коферментами, которые отличаются малыми размерами, небелковой природой и абсолютной необходимостью для ферментативной активности, так как обеспечивают часть катализа.



Рис. 4.12. Транскрипционное действие димеров ядерных рецепторов зависит от их связывания с участками HRE в дезоксирибонуклеиновой кислоте, а также с корегуляторами — коактиваторами и корепрессорами. RA — ретиноевая кислота; RXR/RAR — рецепторы ретиноевой кислоты; RARE — HRE для ретиноевой кислоты; CoR — корепрессор; CoA — коактиватор

Корегуляторы были открыты в первой половине 1990-х гг., хотя негистоновые белки, поддерживающие функцию ядерных рецепторов, были известны еще в 1970-х. Сейчас стало ясно, что они являются важной точкой приложения регуляторных воздействий со стороны разных сигнальных каскадов клетки. Активность, локализация и взаимодействие корегуляторов с рецепторами регулируется целым рядом посттрансляционных модификаций. Помимо фосфорилирования, к ним относятся ацетилирование, метилирование и убиквитинирование.

Механизмы выключения внутриклеточных рецепторов остаются во многом неясными. Очевидно, что одним из них является регулируемая диссоциация лиганда и корегуляторов. Рециклизация ядерных рецепторов и восстановление неактивных комплексов происходят так быстро после удаления лиганда, что не могут объясняться экспрессией рецепторов *de novo*. Считается, что для рециклирования решающее значение имеет дефосфорилирование рецепторов.

Вопросы и задания для самопроверки

1. Молекулярные механизмы действия гормонов на функциональную и метаболическую активность клеток.
2. Классификация рецепторов по механизмам проведения сигнала.
3. Опишите общий план строения LGIC на примере некоторых представителей этой группы рецепторов.
4. Опишите механизм действия внутриклеточных рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов.
5. Основные домены внутриклеточных рецепторов и их функции.