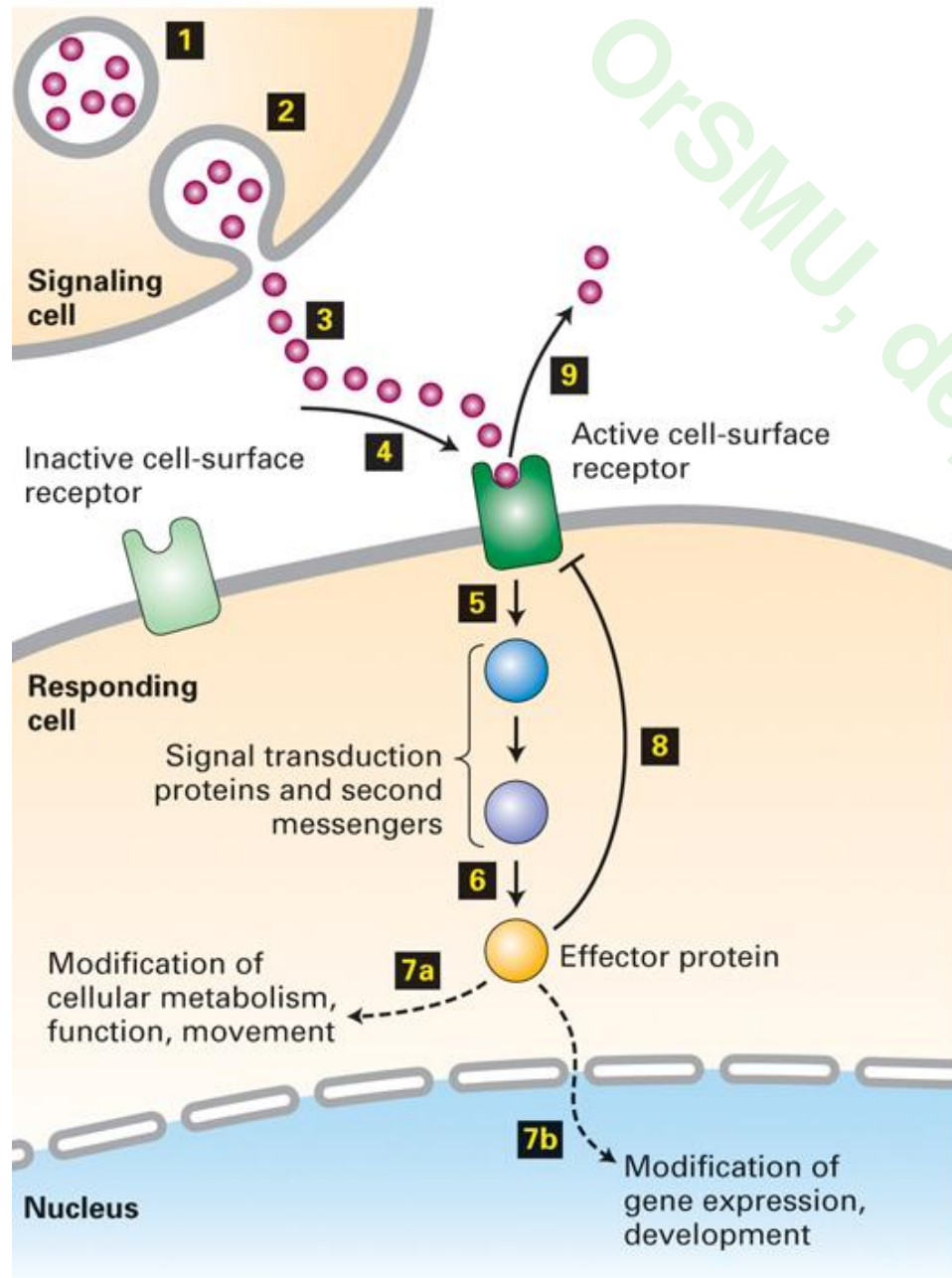


ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
Кафедра химии

Трансдукция сигнала в клетку. G-белки

Д.б.н. Сгибнев А.В.

Общие принципы передачи сигнала в клетку



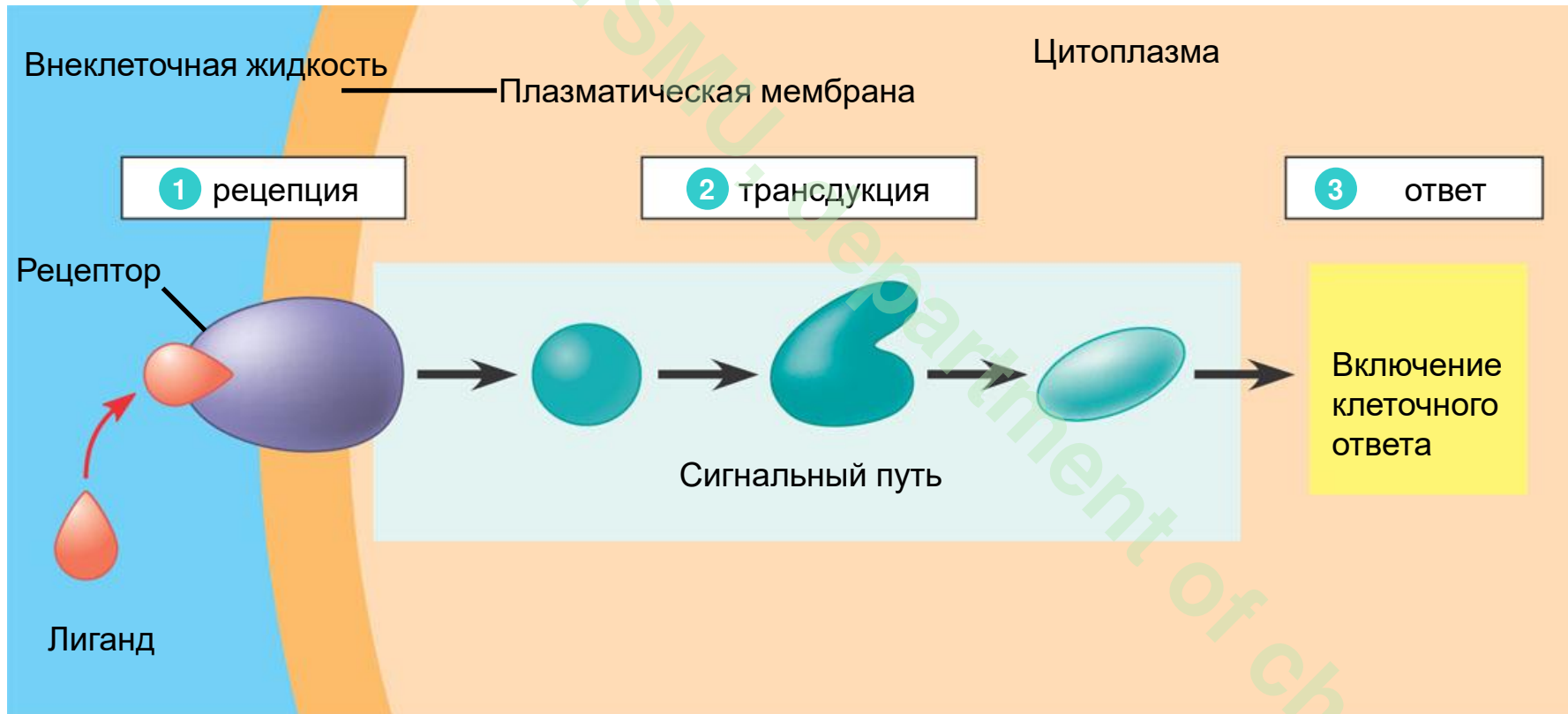
Передача сигнала относится к общему процессу преобразования внеклеточных сигналов во внутриклеточные ответы

Ключевыми участниками передачи сигналов являются сигнальные молекулы, рецепторы, белки передачи сигналов и вторичные мессенджеры, а также эффекторные белки. Клетки реагируют на сигналы, изменяя активность существующих ферментов (быстро) и/или уровни экспрессии ферментов и компонентов клетки (медленнее) за счет регуляции генов (7a и 7b).

Сигналы- гормоны, факторы роста, нейротрансмиттеры, феромоны, кислород, питательные вещества, свет, прикосновение, тепло и т. д.

Существует огромное количество сигнальных молекул и рецепторов к ним, Но относительно немного типов систем передачи внутриклеточного сигнала..

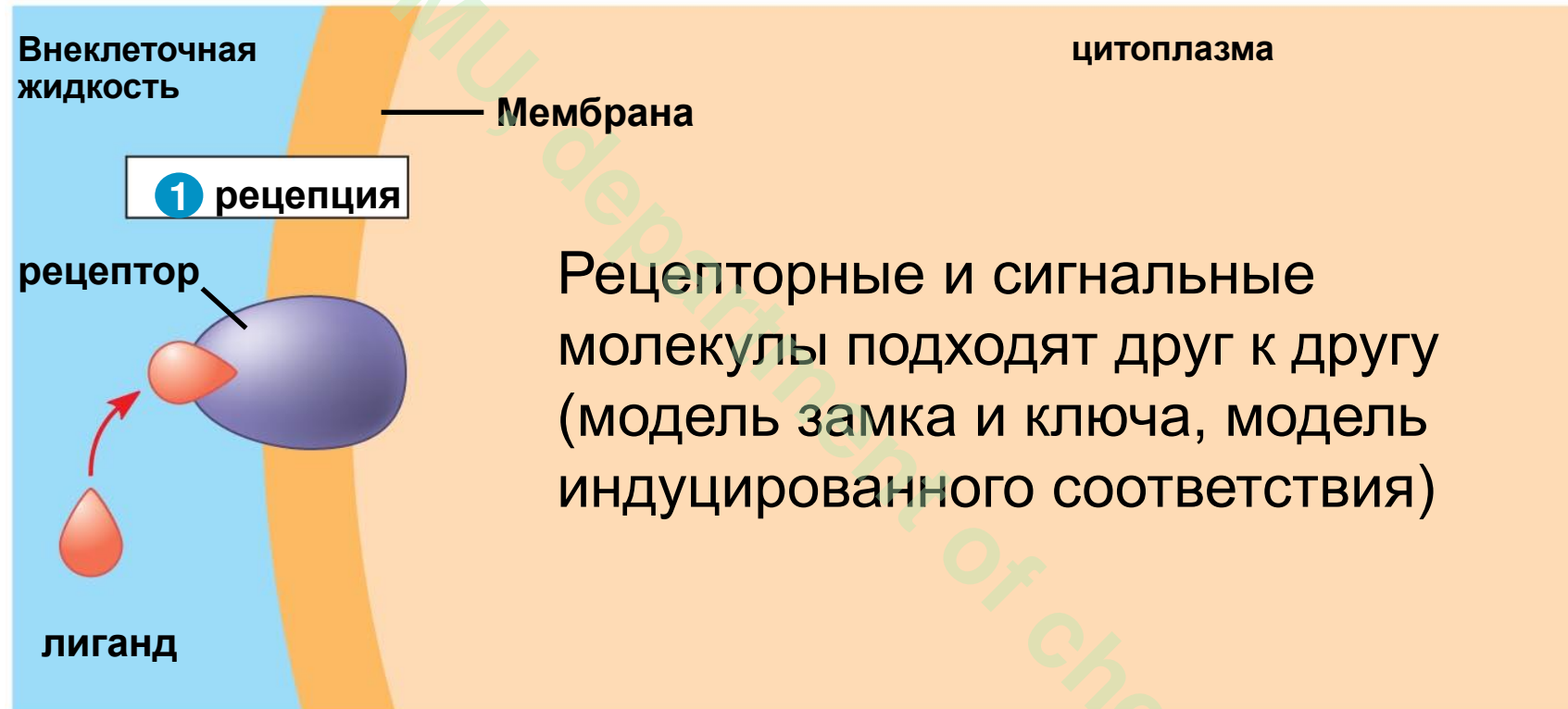
Три этапа передачи сигналов в клетку



Примечание:
Пути передачи сигнала могут отличаться по специфике, но все включают эти три этапа

- Передача сигналов клетки происходит в три этапа:
 - Рецепция - клетка получает сигнал (лиганд) на мембране/в цитозоле (рецептор).
 - Трансдукция - сигнал вызывает каскад изменений внутри клетки (передача сигнала к соответствующей эффекторной молекуле, органелле и т.п..)
 - Ответ - клетка реагирует на сигнал (соответствующее изменение).

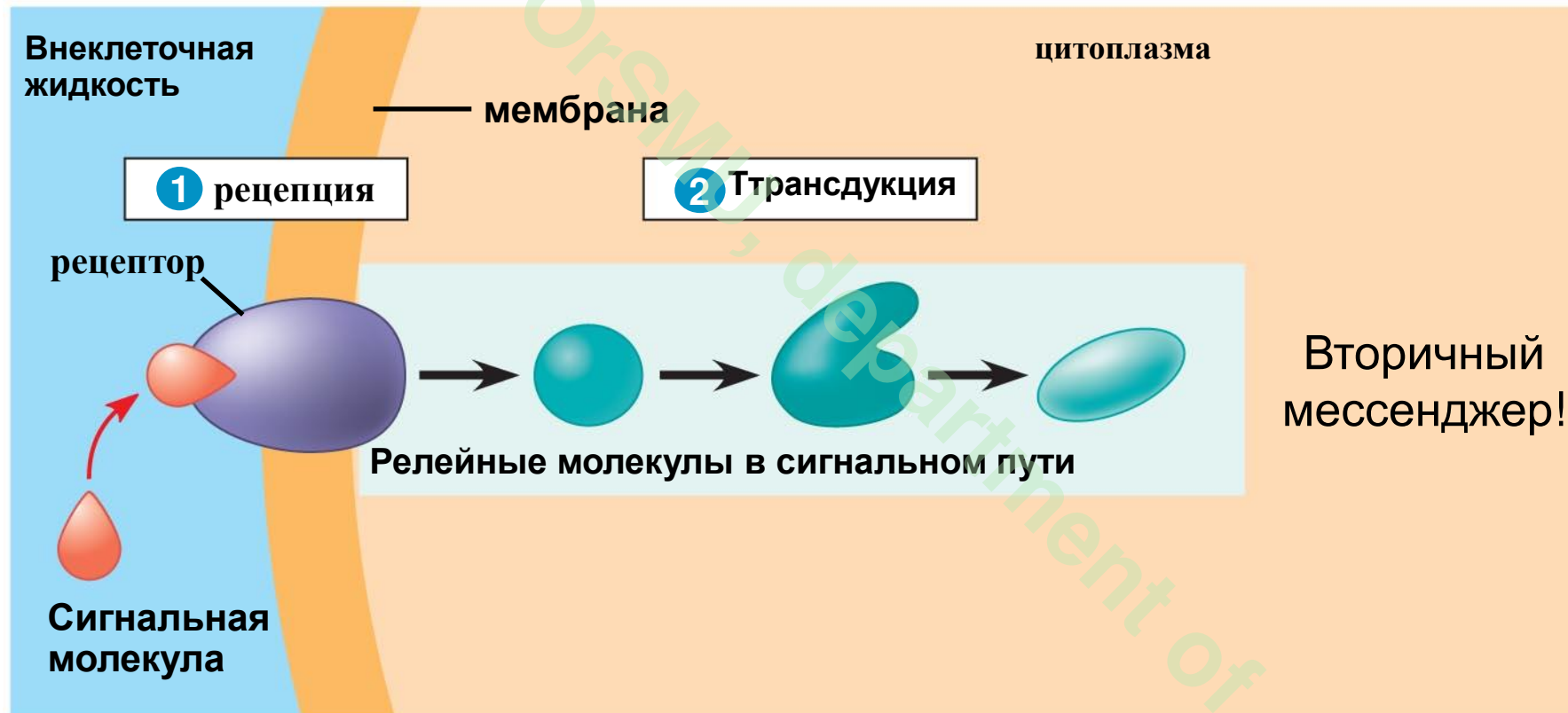
Этап 1: рецепция



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

- Сигнальная молекула (называемая лигандом) связывается со специфическим рецепторным белком;
- Только клетки, содержащие «правильный» рецептор, могут получать сигнал.

Этап 2: трансдукция



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

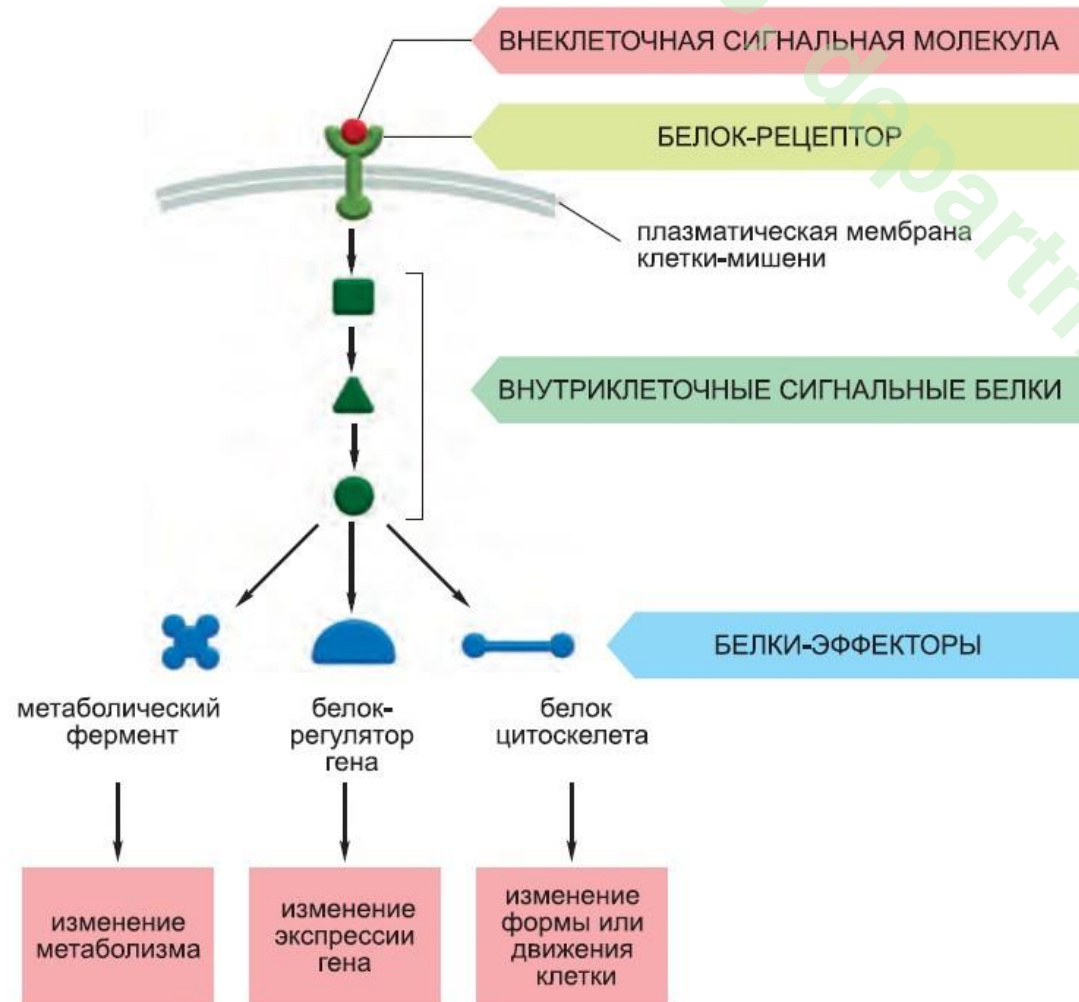
Рецепция запускает «релейную команду» из коммуникационных молекул; белки и/или вторичные мессенджеры (небелковые) несут исходный внешний сигнал внутрь клетки

Каскад фосфорилирования белков - пример трансдукции, в котором киназы фосфорилируют следующий в очереди белок, активируя его и отправляя сигнал дальше.

Набор малых и крупных внутриклеточных сигнальных молекул передает полученные на поверхности сигналы посредством рецепторов, сопряженных с G-белками или ферментами, внутрь клетки.

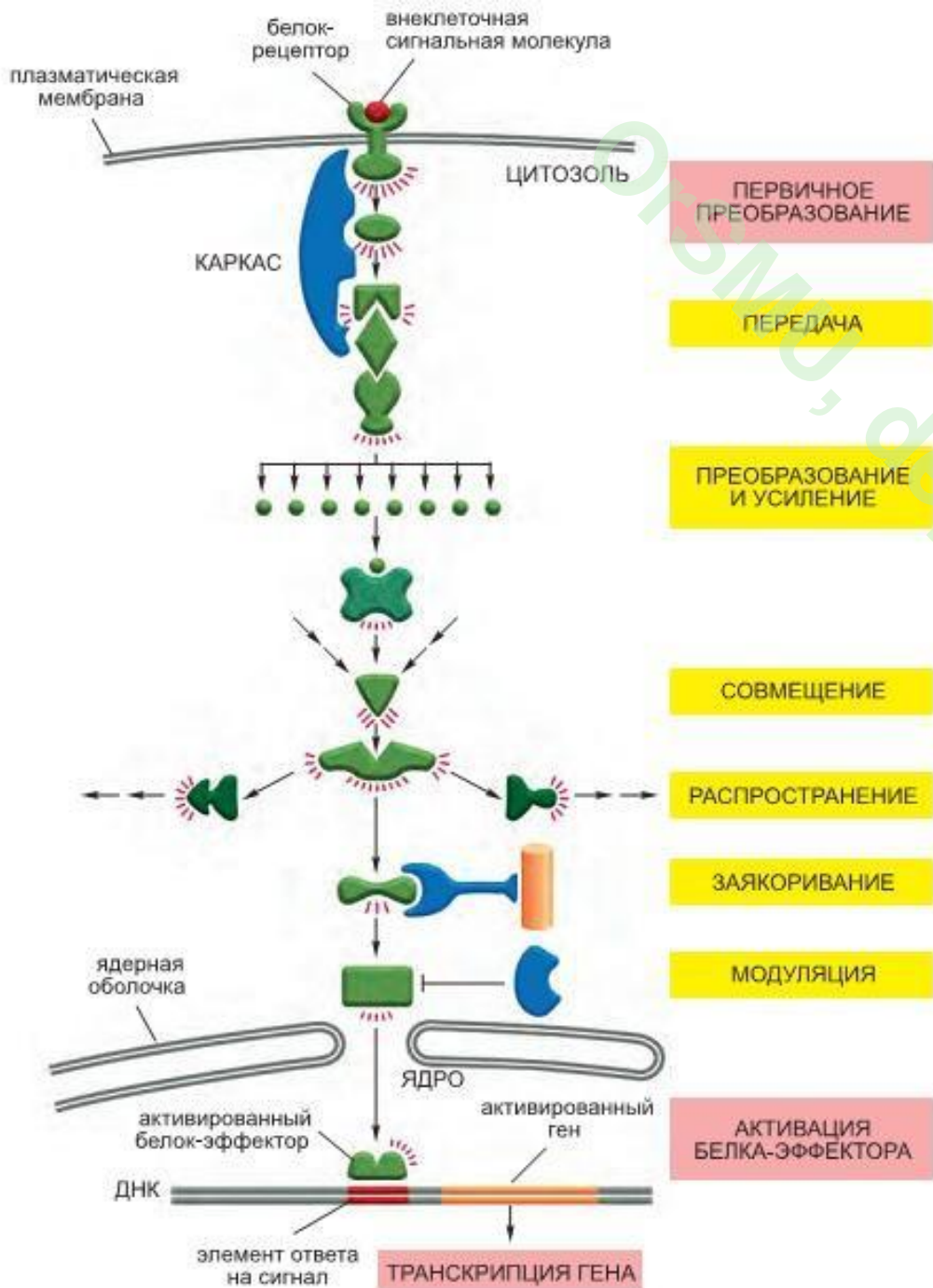
Последовательность внутриклеточных сигнальных событий в конце концов изменяет белки-эффекторы, отвечающие за модификацию функционирования клетки

Внутриклеточный сигнальный путь



Малые молекулы образуются в больших количествах в ответ на активацию рецепторов и часто диффундируют от своего источника, распространяя сигнал в другие части клетки.

Примеры: циклический АМР и Ca^{2+} , диацилглицерин
Они передают сигнал посредством связывания с определенными сигнальными белками или белками-эффекторами и изменения их конформации и активности.



Крупные внутриклеточные сигнальные молекулы — это внутриклеточные сигнальные белки, которые способствуют передаче сигнала в клетку за счет синтеза малых внутриклеточных медиаторов или активации следующего сигнального или эффекторного белка пути. Эти белки образуют функциональную сеть, в которой каждый белок способствует обработке сигнала одним из следующих способов по мере распространения сигнала по клетке

Многие внутриклеточные сигнальные белки играют роль молекулярных переключателей

Два важных класса молекулярных переключателей белков, активируемых или инактивируемых путем фосфорилирования. Переключение этих белков осуществляют **протеинкиназа**, которая ковалентно присоединяет одну или несколько фосфатных групп к сигнальному белку, и **протеинфосфатаза**, которая удаляет фосфатные группы.

Активность любого белка зависит от равновесия между активностями фосфорилирующих его киназ и дефосфорилирующих фосфатаз. Человеческий геном кодирует примерно 520 протеинкиназ и 150 протеинфосфатаз.

Многие сигнальные белки, регулируемые фосфорилированием, сами по себе являются протеинкиназами. Часто они образуют каскады фосфорилирования.

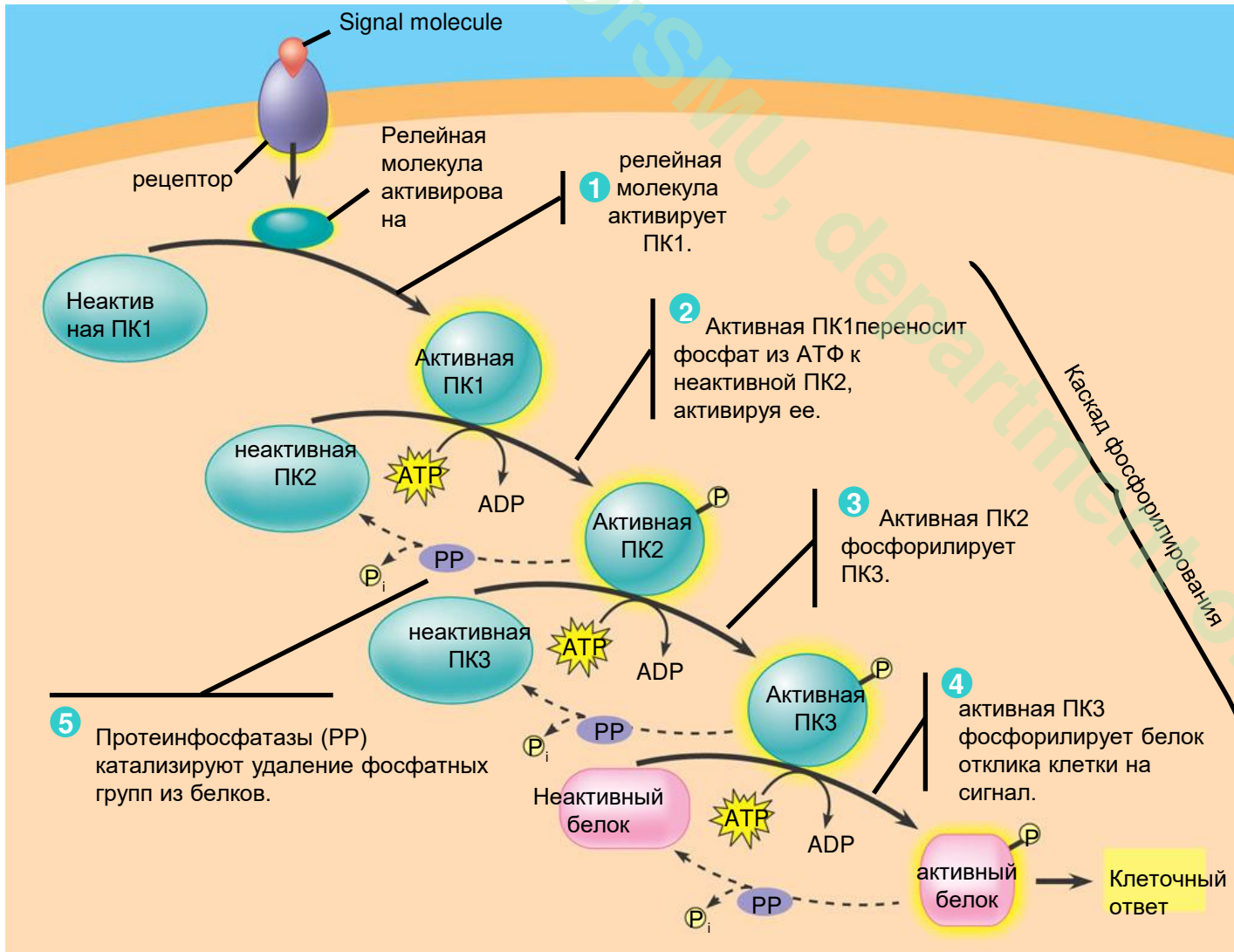
В качестве внутриклеточных сигнальных белков выступают два основных типа протеинкиназ.

1. Это **серин-треониновые киназы**, фосфорилирующие белки по серинам и (значительно реже) треонинам.

2. **Тирозинкиназы**, фосфорилирующие белки по тирозинам.

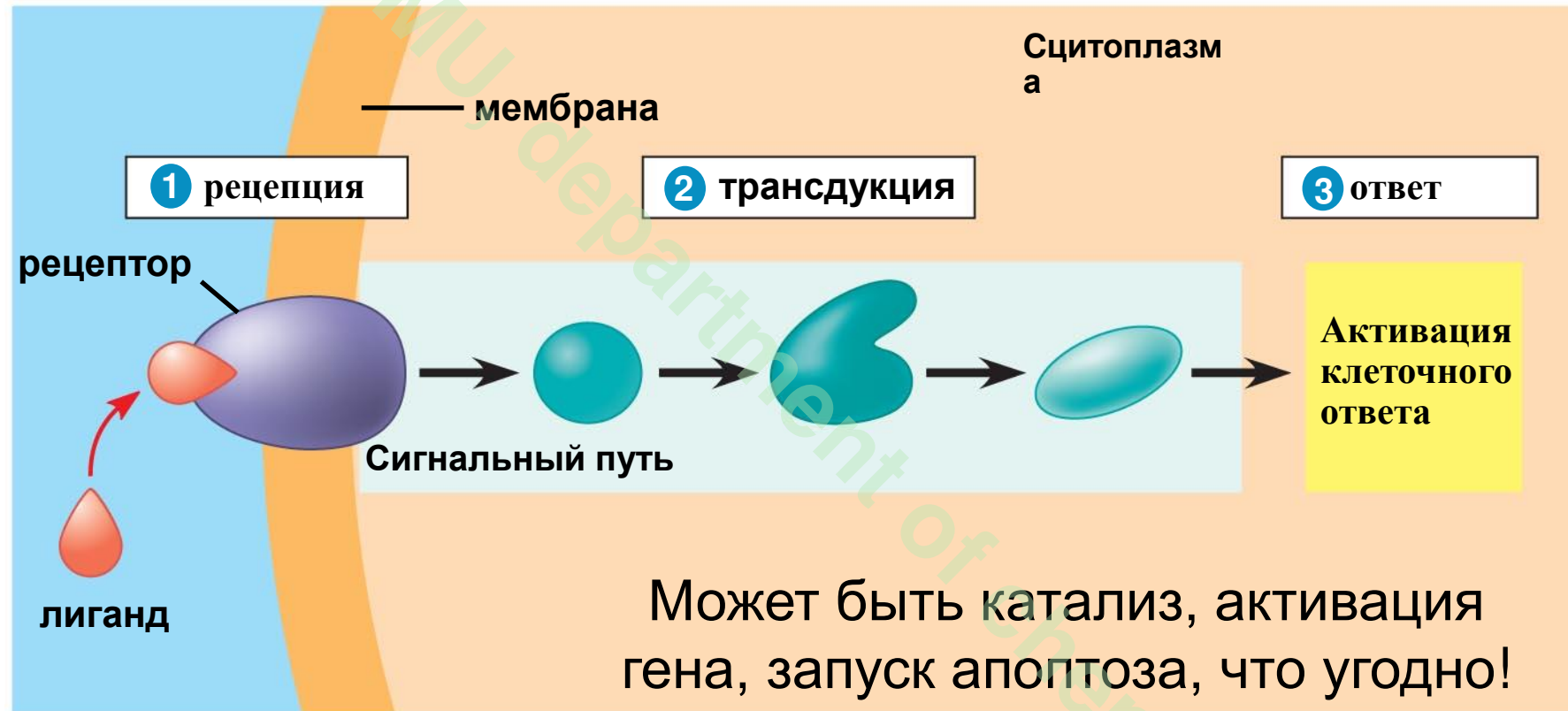
Некоторые киназы способны действовать по обоим механизмам.

Каскад фосфорилирования



Каскад фосфорилирования белков - пример трансдукции, в котором киназы фосфорилируют следующий в очереди белок, активируя его и отправляя сигнал дальше.

Этап 3: ответ



Клетка будет реагировать на сигнал (например, производить белок, производить больше энергии, синтезировать метаболиты, вступать в МИТОЗ и т. д.)

Классификация рецепторов клеточной мембраны

1. **Рецепторы, сопряженные с G белками** (G-protein coupled receptors – GPCR) или семиспиральные рецепторы.
2. **Каталитические рецепторы** – обладают собственной тирозин- и серин/треонин-протеинкиназной активностью, либо гуанилатциклазной активностью.
3. **Рецепторы не каталитические** – после активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами, активируя их.
4. **Регулируемые ионные каналы** (лиганд-активируемые ионные каналы).

**Два функциональных домена рецептора:
лиганд-связывающий и эффекторный.**

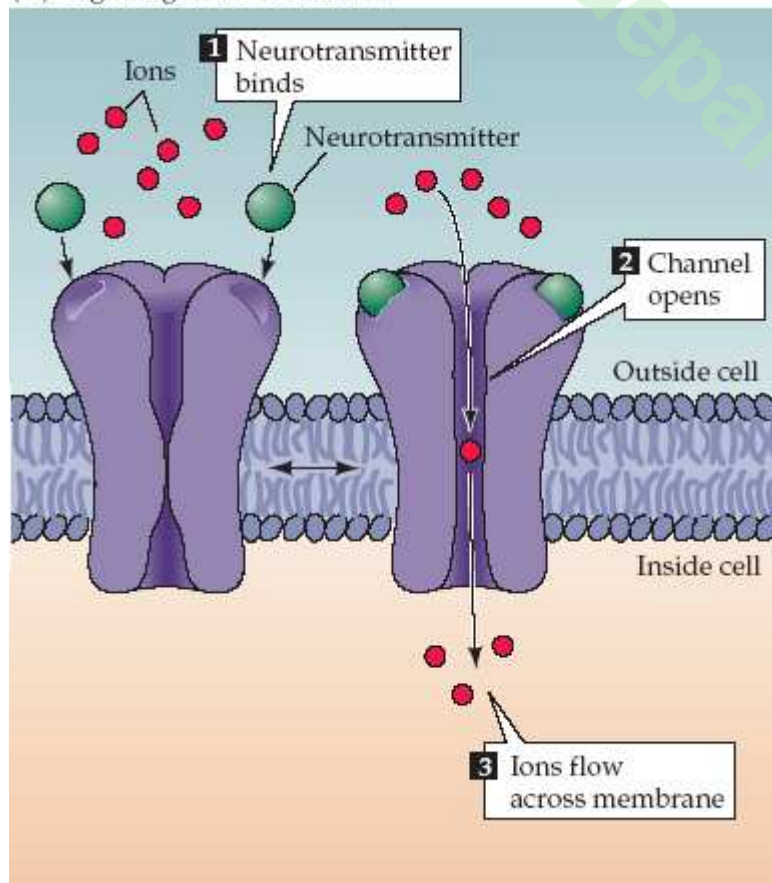
Мембранные рецепторы, активируемые медиаторами

По механизму активации различных процессов (в том числе и изменения ионной проводимости) мембранные рецепторы подразделяют на

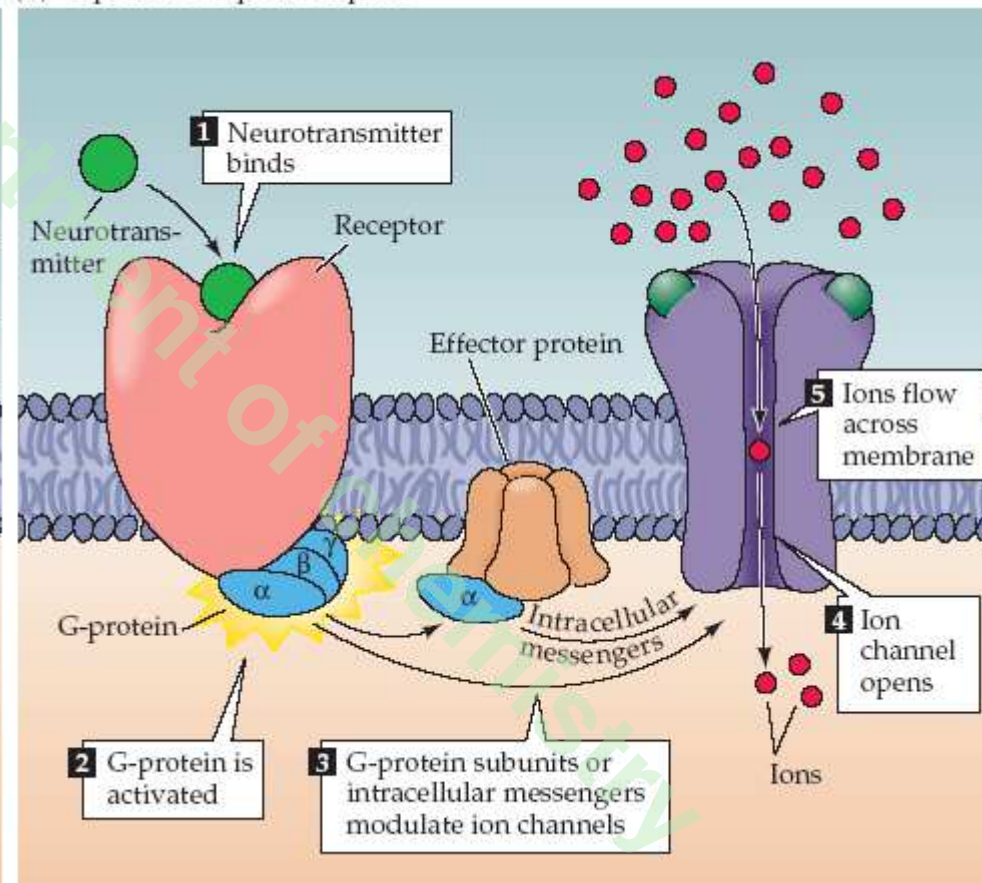
ионотропные

и **метаботропные.**

(A) Ligand-gated ion channels



(B) G-protein-coupled receptors



Метаботропные рецепторы

Метаботропные рецепторы — это подтип трансмембранных рецепторов в эукариотических клетках, воздействие на которые приводит к первичным, непосредственным изменениям метаболизма в клетке.

Эффект всех без исключения метаботропных рецепторов опосредуется через те или иные системы **вторичных посредников**.

Метаботропные рецепторы могут быть расположены как на поверхностной мембране клетки, так и на мембранах внутриклеточных везикул.

Эти рецепторы вызывают эффекты посредством взаимодействия с ГТФ-связывающими белками (G-белками), поэтому их еще называют рецепторами, сопряженными с G-белками (англ., *G-protein coupled receptors*).

Метаботропные рецепторы

Подсемейство рецепторов	Лиганд (медиатор)	Рецептор(ы)
родопсинподобные	ацетилхолин	мускариновые (mAChR ₁₋₅)
	норадреналин (адреналин)	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2, \beta_3$
	дофамин	D ₁ , D _{2Sh, 2Lh} , D ₃ , D ₄ (18 подтипов), D ₅ , D ₆ , D ₇
	аденозин, АТФ	аденозиновые (A ₁ , A _{2a} , A _{2b} , A ₃), АТФ-чувствительные (P2Y)
	серотонин	5-HT ₁ (A, B, D, E, F), 5-HT ₂ (A, B, C), 5-HT ₄ , 5-HT ₅ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇
	гистамин	H ₁₋₄
	десятки пептидов и гормонов (например, энкефалин)	например, энкефалиновые (μ, δ, κ)
секретинподобные	секретин, кальцитонин, паратироидные гормоны, глюкагон, кортикотропин-релизинг фактор, вазоактивные кишечинальные пептиды, гипофизарные белки, активирующие аденилатциклазу	например, глюкагоновые (GR, GIPR, GLP1R, GLP2R)
метаботропные глутаматные	глутамат	mGluR ₁₋₈
	ГАМК	ГАМК _B
	Ca ²⁺	-

В настоящее время в геноме млекопитающих идентифицировано более 1000 генов, кодирующих молекулы метаботропных рецепторов.

По гомологии кодирующих генных последовательностей у млекопитающих выделяют три «главных» подсемейства:

- 1) родопсинподобные
- 2) секретинподобные,
- 3) метаботропные глутаматные рецепторы.

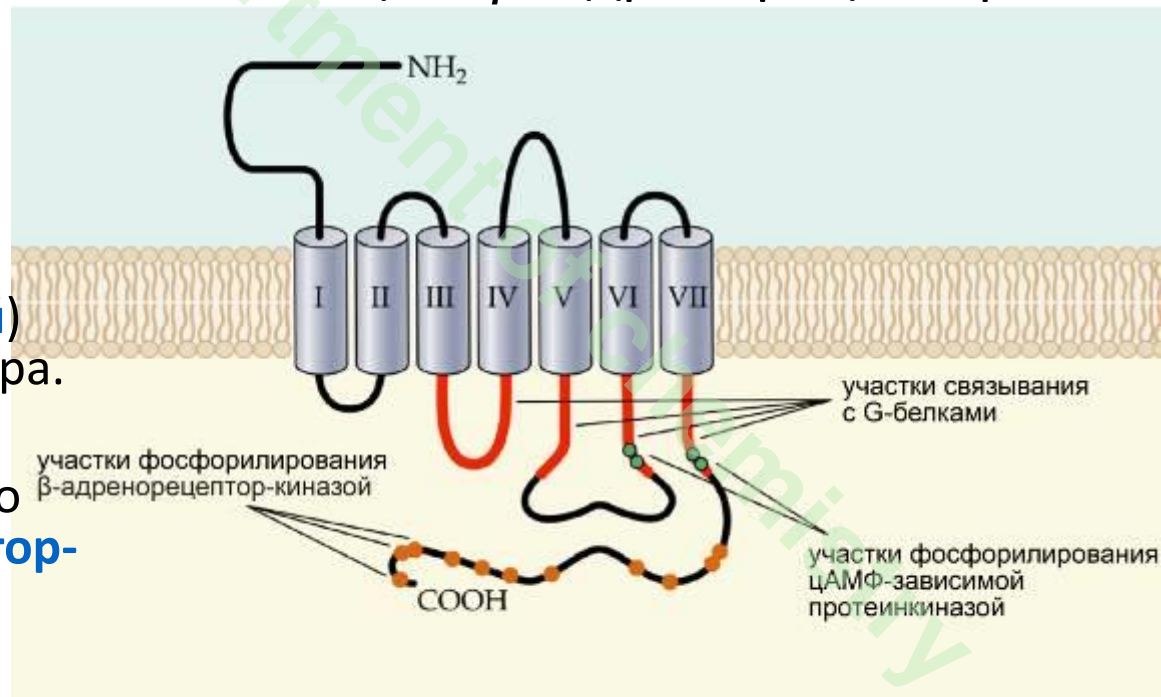
Метаботропные рецепторы

Первым метаботропным рецептором, который был клонирован в начале 1990-х г.г. и всесторонне изучен методами молекулярной биологии и классической фармакологии с широким использованием радиоактивных меченых лигандов, оказался β -адренорецептор.

В 2000 г. методом рентгеновской кристаллографии с высоким разрешением была получена трехмерная конфигурация **родопсина**, прототипа семейства родопсинподобных рецепторов, включающего β -адренорецептор.

Фосфорилирование нескольких оснований на третьей цитоплазматической петле и на карбоксильном конце (например, **цАМФ-зависимой протеинкиназой**) вызывает десенситизацию рецептора.

Фосфорилирование карбоксильного конца (например, **β -адрено-рецептор-киназой**) также приводит к десенситизации рецептора.

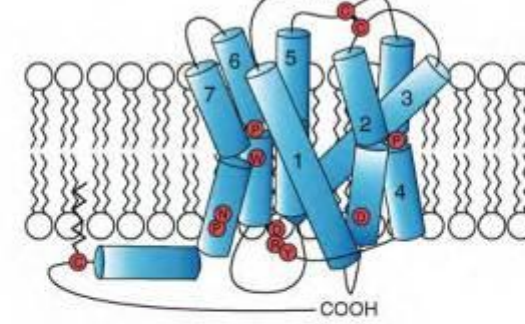


Семейства метаботропных рецепторов

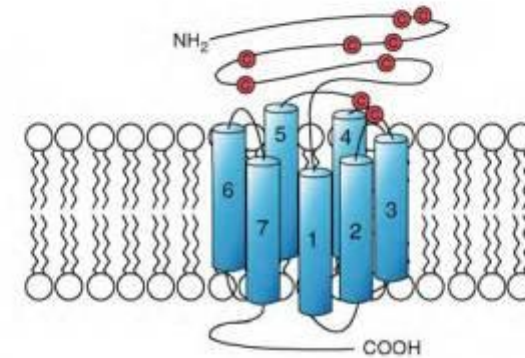
Красными кружками отмечены характерные консервативные остатки аминокислот трансмембранных сегментов, внутри- и внеклеточных петель.

- a) родопсинподобные
- b) секретинподобные,
- c) метаботропные глутаматные рецепторы

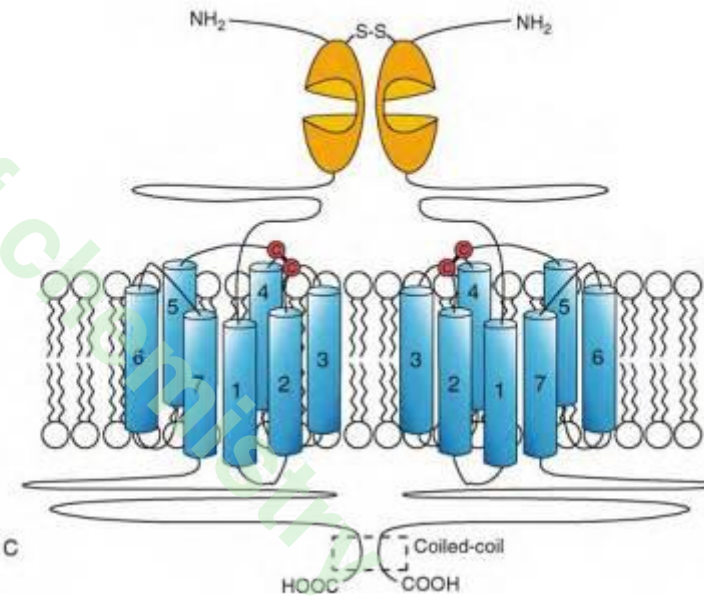
a Family A



b Family B



c Family C



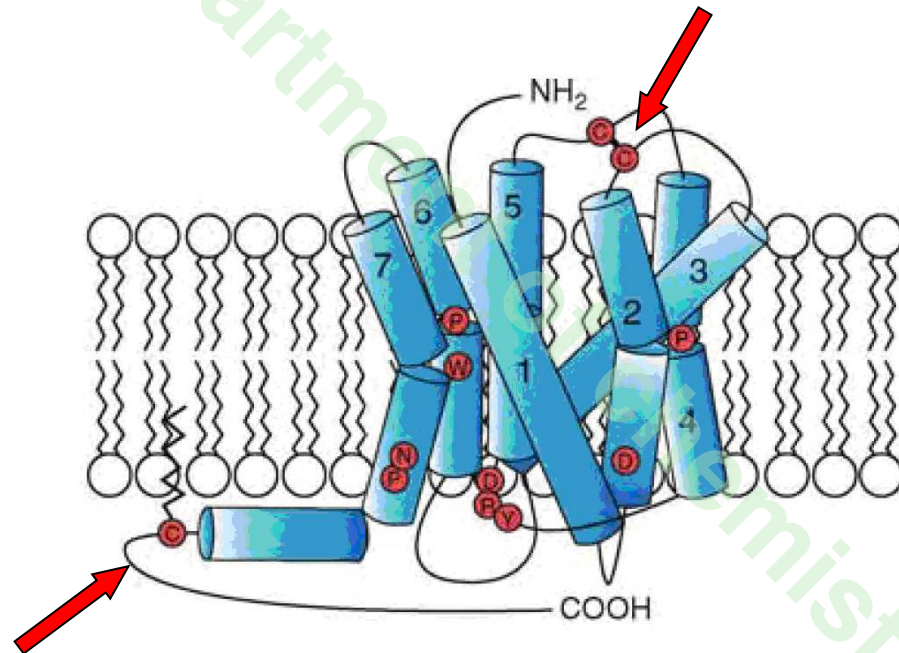
Родопсинподобные метаботропные рецепторы

наиболее изучены и включают родопсин, адренергические рецепторы, мускариновые ацетилхолиновые (МАцХР), пуриновые, серотониновые рецепторы, а также многочисленные рецепторы пептидов и гормонов, подразделяемые на 19 подсемейств.

Относительно мелкие лиганды, такие как катехоламины, связываются в углублении, сформированном семью трансмембранными сегментами, а короткие пептиды взаимодействуют с внеклеточными петлями и N-терминалью, а также с трансмембранными сегментами.

Цистеиновый остаток на участке C-терминали, примыкающем к ТМ7, обеспечивает привязку рецептора к мембране.

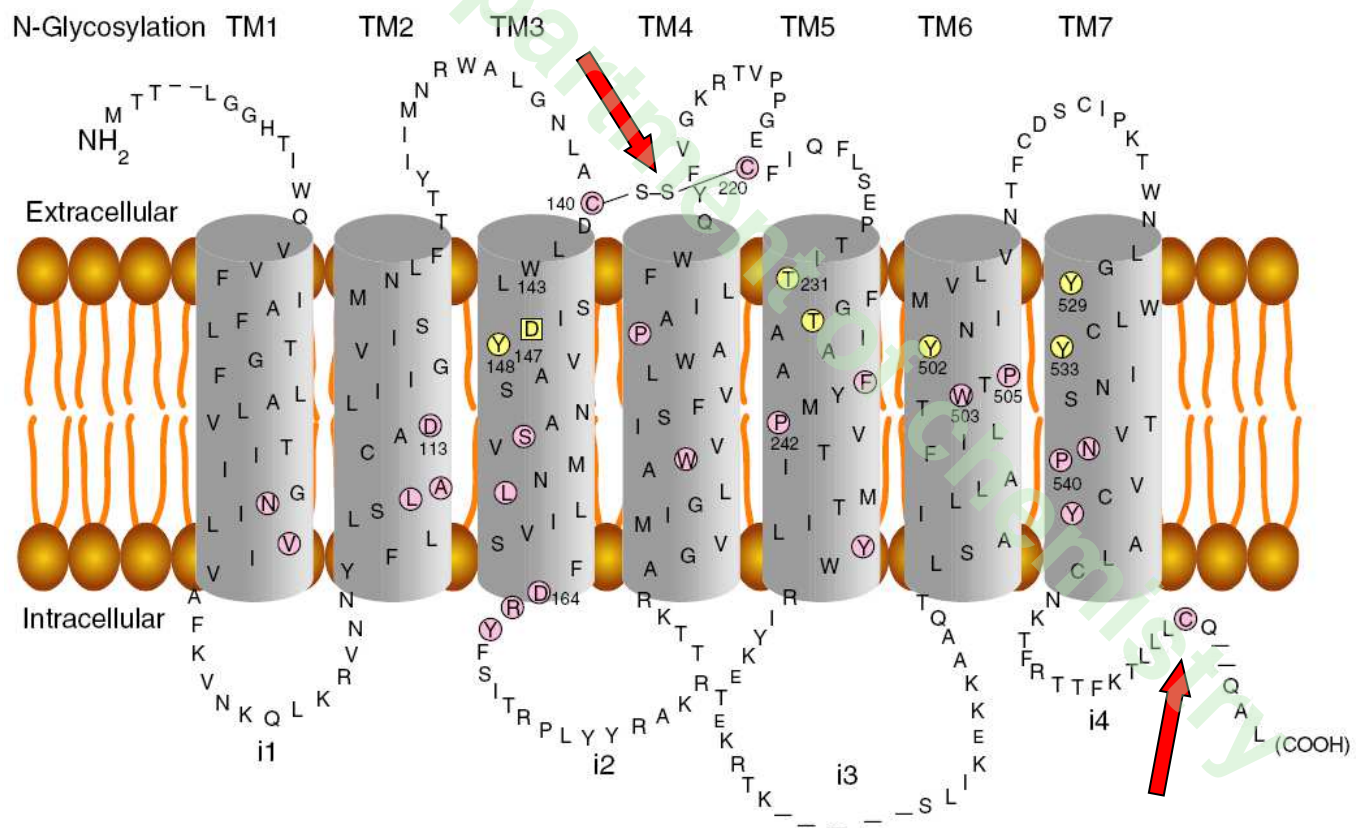
Дисульфидный мостик между цистеиновыми остатками внеклеточных петель между ТМ2-ТМ3 и ТМ4-ТМ5 сегментами является характерным для большинства рецепторов этого семейства.



Родопсинподобные метаботропные рецепторы

Цистеиновый остаток на участке С-терминали, примыкающем к ТМ7, обеспечивает привязку рецептора к мембране.

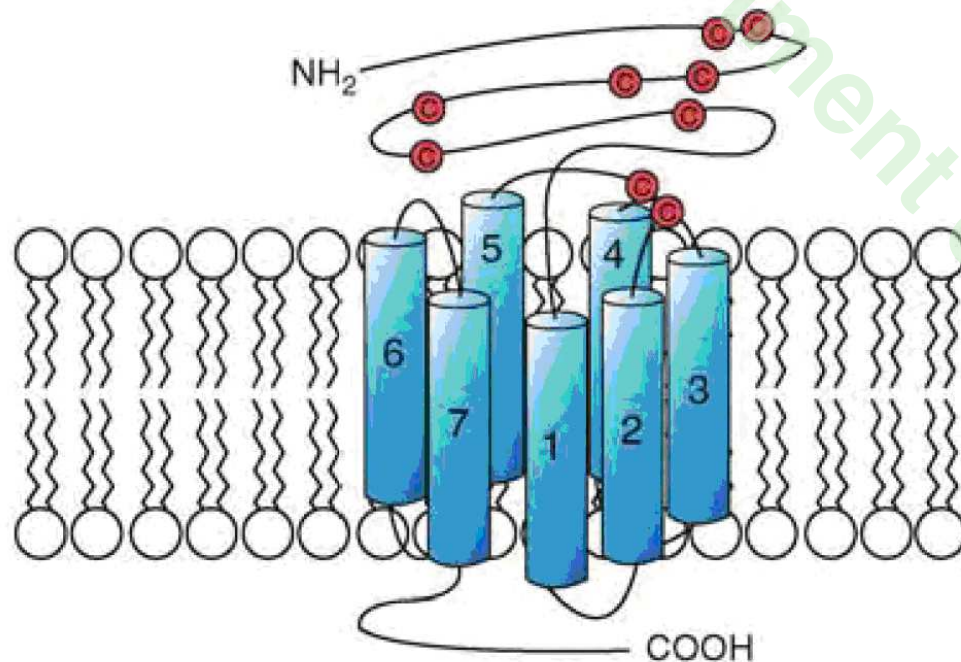
Дисульфидный мостик между цистеиновыми остатками внеклеточных петель между ТМ2-ТМ3 и ТМ4-ТМ5 сегментами является характерным для большинства рецепторов этого семейства.



Секретинподобные metabotropic receptors

связываются с секретин, кальцитонином, паратиреоидными гормонами, глюкагоном, кортикотропин-релизинг фактором, vasoactive intestinal peptides and hypothalamic peptides, activating adenylate cyclase.

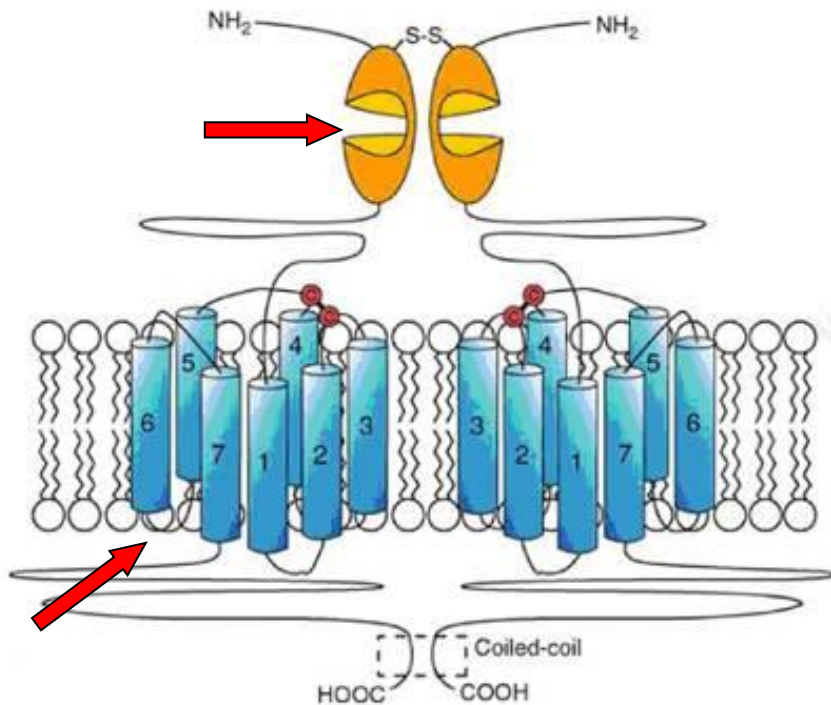
Ligand-binding sites of these receptors are located on the extracellular domain, and their relatively long N-terminus contains several cysteine residues that form a network of disulfide bridges.



Глутаматные метаботропные рецепторы

включают восемь типов метаботропных рецепторов (mGluR), Ca^{2+} -чувствительные рецепторы и GAMK_B рецепторы.

Характеризуются длинными N- и C-терминалями. Лиганд-связывающий участок у mGluR локализован на N-терминалях двух субъединиц рецептора, которые связаны между собой дисульфидным мостиком.



Два цистеиновых остатка на внеклеточных петлях образуют дисульфидный мостик. Уникальной особенностью этого семейства рецепторов является короткая и высоко консервативная внутриклеточная петля TM5-TM6.

Десенситизация метаботропных рецепторов

Десенситизация рецепторов заключается в затухании эффекторной активности и прекращении физиологического ответа, несмотря на то, что лиганд остается связанным с рецептором.

Описано два механизма десенситизации:

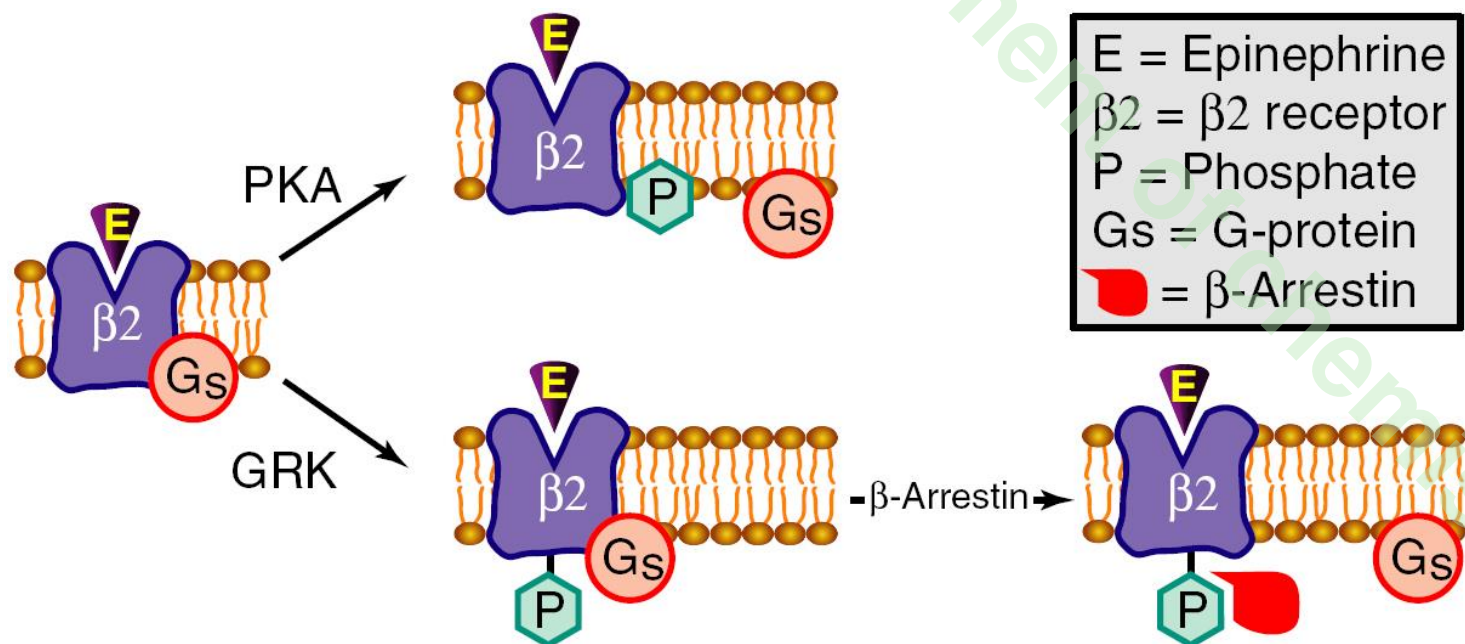
- через **фосфорилирование**
- физическое **удаление** рецептора из мембраны

Десенситизация метаболотропных рецепторов

включает три фазы:

Первая фаза десенситизации (от секунд до минут) заключается в расцеплении рецептора и G-белка, что происходит в результате фосфорилирования рецептора **протеининазами C и A** и **G-белок-рецепторкиназой**. Киназы активируются вторичными посредниками, которые синтезируются в результате функционирования рецепторов при их связывании с агонистами.

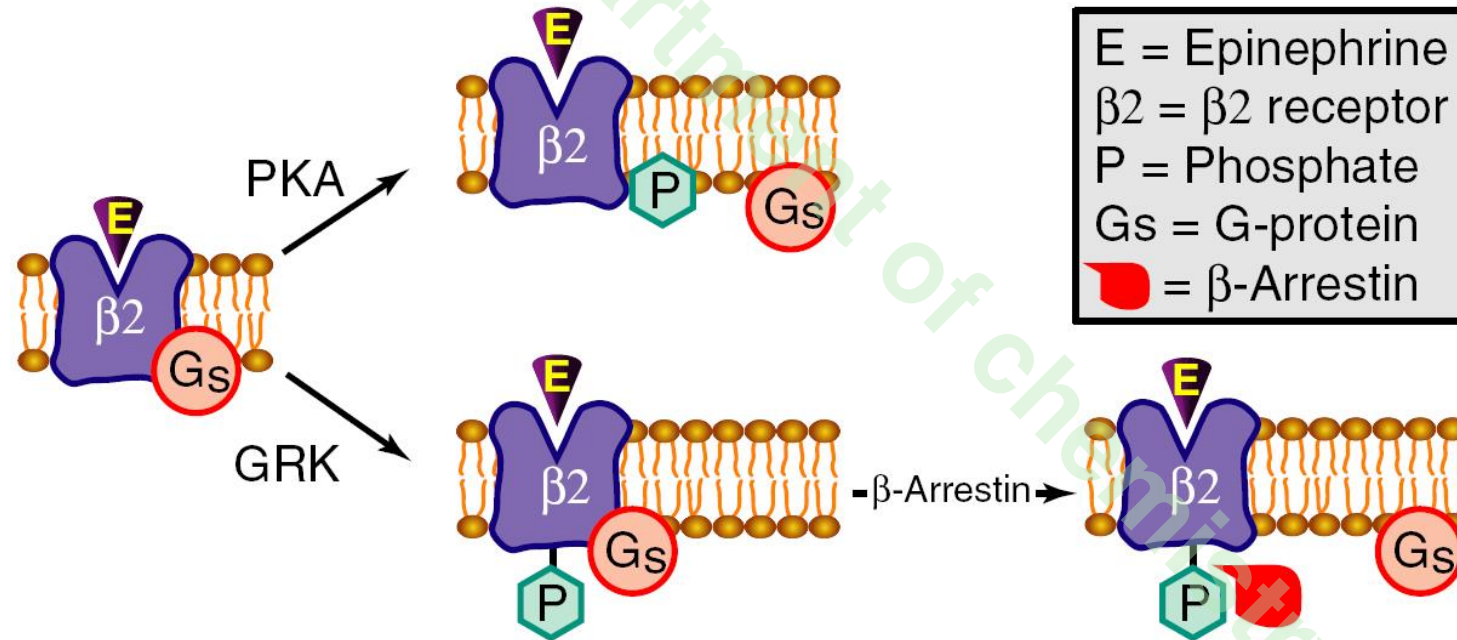
Рецептор может фосфорилироваться **протеинкиназой A** даже если он не связан с агонистом (т.н. гетерогенная десенситизация).



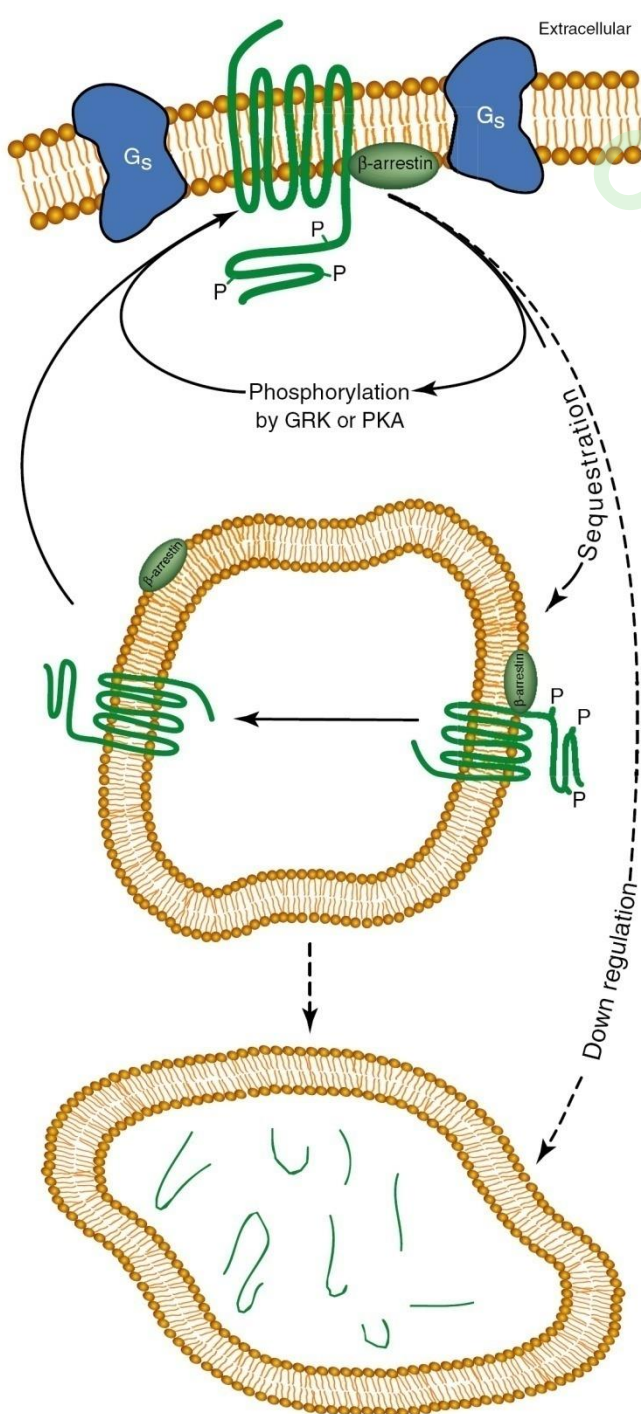
Десенситизация метаботропных рецепторов

При фосфорилировании **протеинкиназой A** происходит расцепление рецептора и G-белка.

При фосфорилировании **G-белок-рецептор-киназой** происходит связывание рецептора с белком **аррестином**, который устраняет связывание рецептора с G-белком.



Десенситизация метаботропных рецепторов



Вторая фаза заключается в изоляции, или так называемой **интернализации** рецептора. При фосфорилировании **G-белок-рецептор-киназой** происходит связывание рецептора с белком **аррестином**.

Затем рецепторы подвергаются **эндоцитозу** и удаляются с поверхности мембраны.

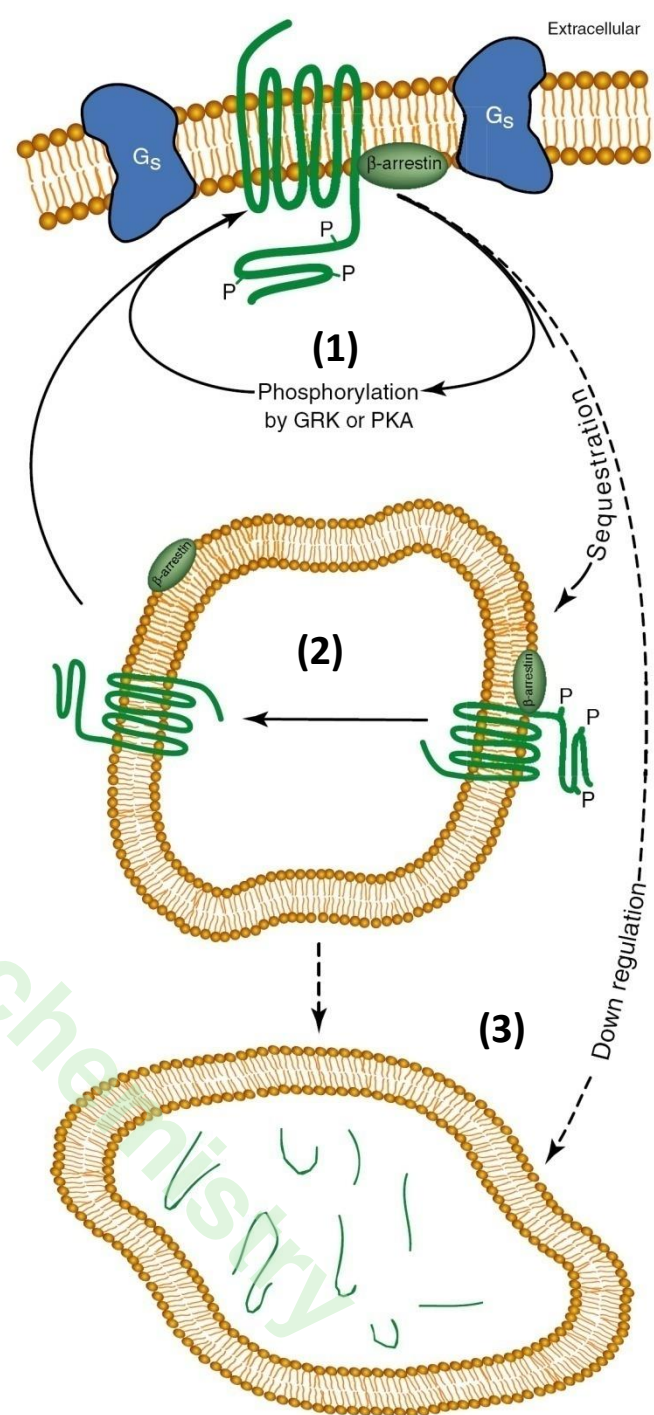
Десенситизация метаботропных рецепторов

В третьей фазе интернализированный рецептор либо:

1) дефосфорилируется и возвращается (рециклируется) на поверхность клеточной мембраны и в дальнейшем продолжает функционировать (рециклирование/ ресенситизация рецептора);

2) секвестрируется (изолируется) в мембране эндосом, при дефосфорилировании освобождается от аррестина и рециклируется;

3) транспортируется в лизосомы, где происходит его деградация. При этом необходимо пополнение пула рецепторов путем их синтеза.



Второй важный класс молекулярных переключателей GTP- связывающие белки

(переключаются из активного состояния со связанным GTP в неактивное со связанным GDP)

В активном состоянии они обладают GTPазной активностью и инактивируют себя, гидролизуя связанный GTP до GDP

Два основных типа GTP-связывающих белков. **Крупные тримерные GTP- связывающие белки (также называемые G-белками)** передают сигнал от активирующих их сопряженных с G-белками рецепторов. Небольшие **мономерные GTPазы** (также называемые мономерными GTP-связывающими белками) передают сигналы от многих классов поверхностных рецепторов.

Специфические регуляторные белки контролируют оба типа GTP-связывающих белков. **GTPаза-активирующие белки** (GTPase-Activating Protein, **GAP**) переводят белки в «выключенное» состояние, усиливая скорость гидролиза связанного GTP; выполняющие эту функцию GAP также называют регуляторами сигнализации G- белков (Regulators of G-protein Signaling, RGS). С другой стороны, рецепторы, сопряженные с G-белками, активируют тримерные G-белки, и **факторы обмена гуаниновых нуклеотидов** (Guanine Exchange Factor, **GEF**) активируют мономерные GTPазы, вызывая высвобождение GDP в обмен на связывание GTP.

Структура G-белков

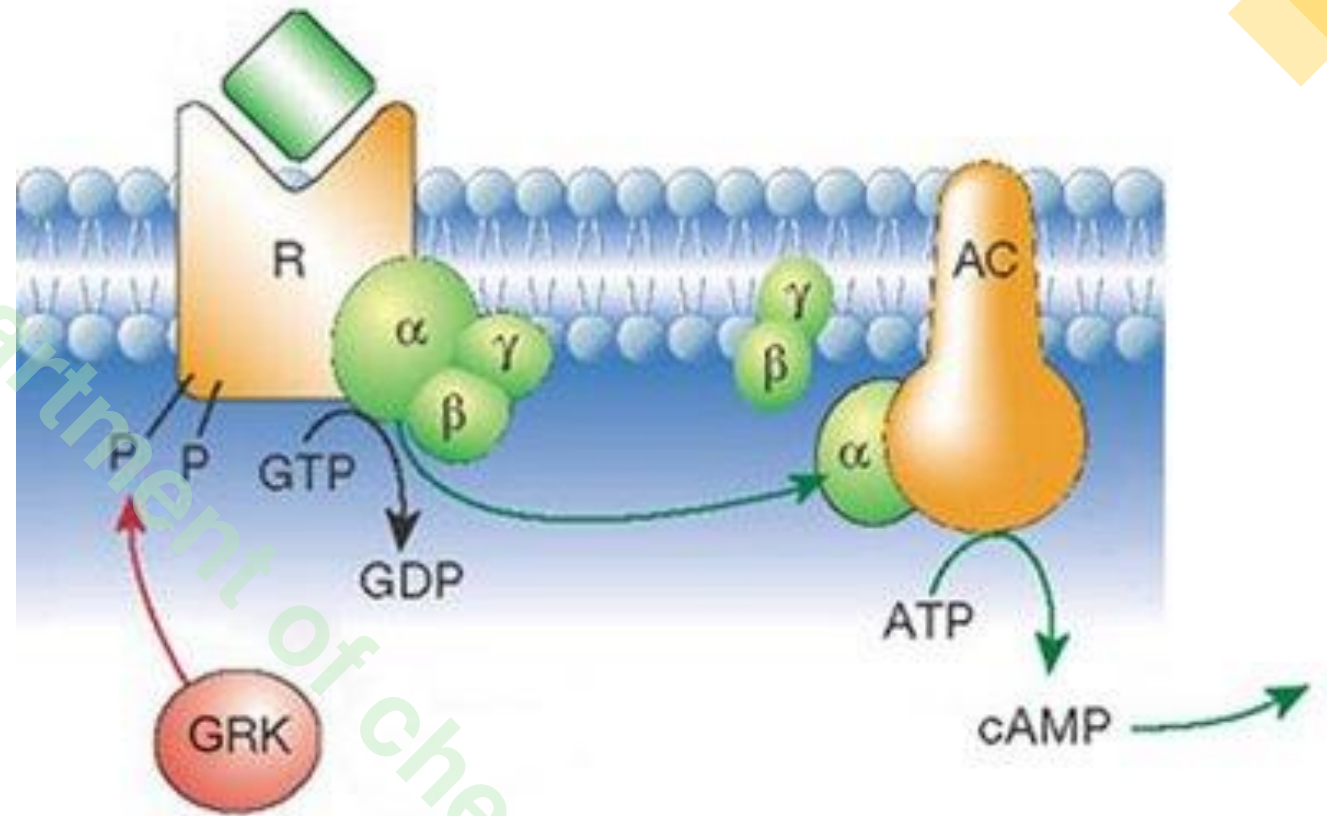
G-белки подразделяют на два типа – **гетеротримеры** и **мономеры**.

G-белки **гетеротримеры** состоят из трех отдельных субъединиц (α , β и γ). Существует большое количество разновидностей каждой из субъединиц (20 α , 6 β и 12 γ), что создает основу для большого количества их комбинаций.

α -субъединица связывается с гуаниновыми нуклеотидами - либо с ГТФ, либо с ГДФ.

При связывании с ГДФ α -субъединица соединяется с β - и γ -субъединицами, формируя неактивный тример ($\alpha\beta\gamma$).

GRK - G protein-coupled receptor kinases



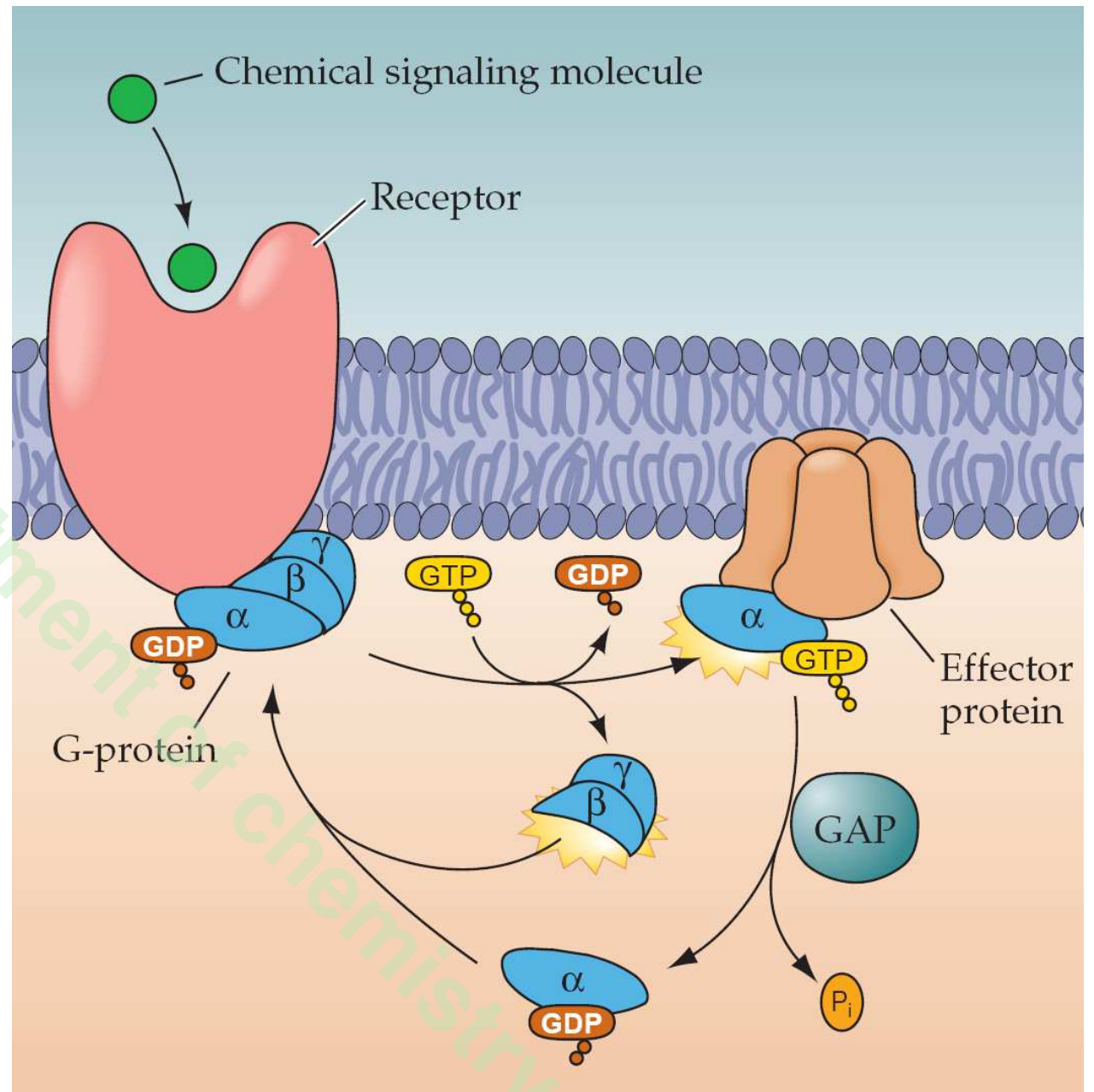
Функции G-белков-тримеров

При связывании метаболитического рецептора с внеклеточным сигналом G-белок связывается с рецептором, и в этом состоянии ГДФ на α -субъединице замещается на ГТФ.

В конфигурации с ГТФ (активированный G-белок) **α -субъединица** отделяется от **димера $\beta\gamma$ -субъединиц**.

Вслед за активацией α -субъединица, связанная с ГТФ, и комплекс из $\beta\gamma$ -субъединиц могут связываться с молекулами-эффекторами следующего порядка, обуславливающими разнообразные ответы клеток-мишеней.

GAP - **GTPase-Activating Proteins** (см. сл. Сл.)



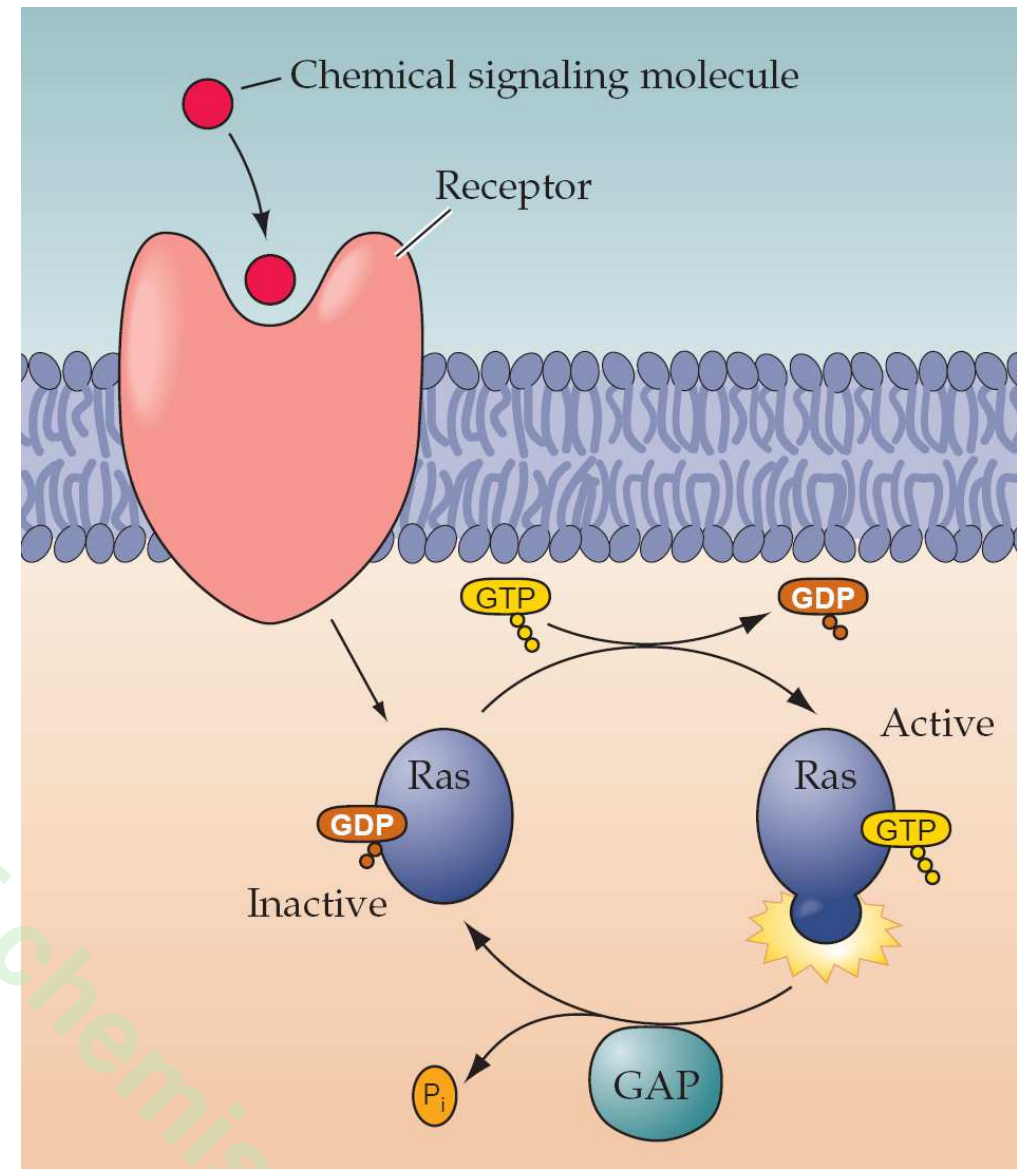
Функции G-белков-мономеров

G-белки мономеры гомологичны α -субъединицам гетеротримерных G-белков и называются также малыми G-белками

Передают сигнал от активируемых внеклеточными агентами метаболотропных рецепторов цитоплазматическим мишеням, таким как элементы цитоскелета и системы везикулярного транспорта. Такие малые G-белки впервые были открыты в вирусах. Ras – от *rat sarcoma*.

При связывании с ГТФ они активируют протеинкиназы, которые передают сигнал в ядро. Это приводит к неконтролируемому росту клеток и развитию опухолей.

После этих открытий было идентифицировано большое число малых G-белков с разнообразными функциями. Например, некоторые из них задействованы в транспорте везикул в пресинаптических терминалях или в других частях нейронов. Другие играют главную роль в транспорте белков и РНК в ядро и из ядра.



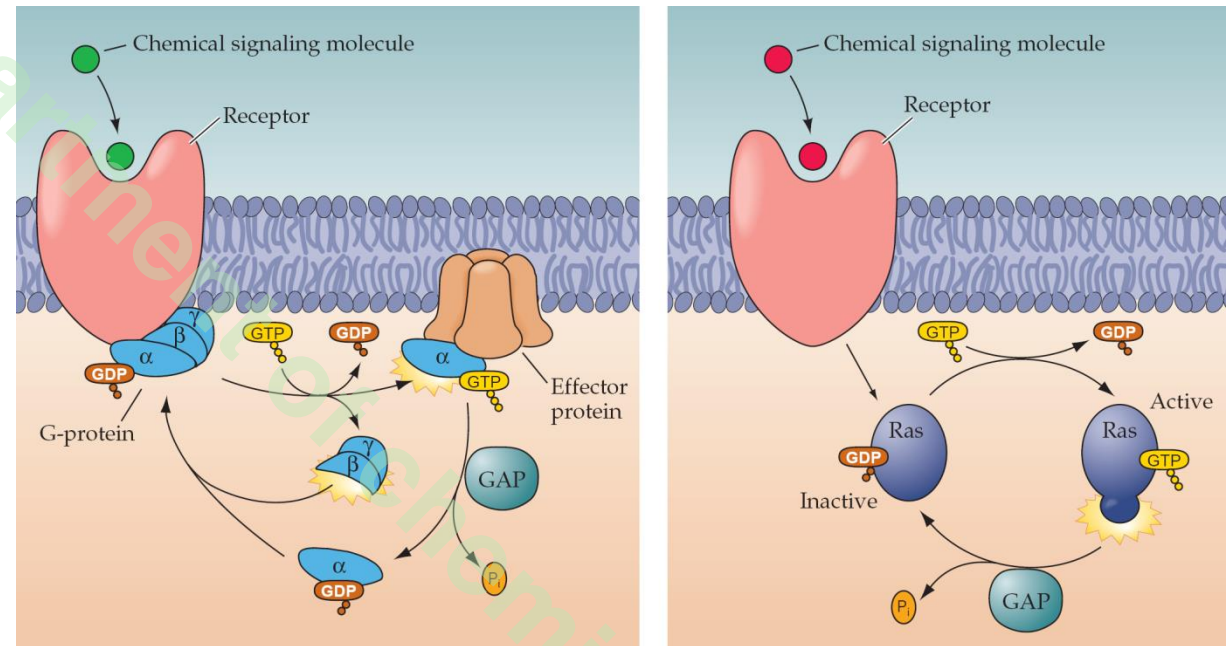
Завершение процесса сигнализации G-белков

определяется гидролизом ГТФ в ГДФ у α -субъединицы.

Скорость гидролиза ГТФ является важным свойством G-белков и регулируется **ГТФаза-активирующими белками** (GAP, от **GTPase-Activating Proteins**). Активная α -субъединица, связанная с ГТФ, функционально является **ГТФазой**.

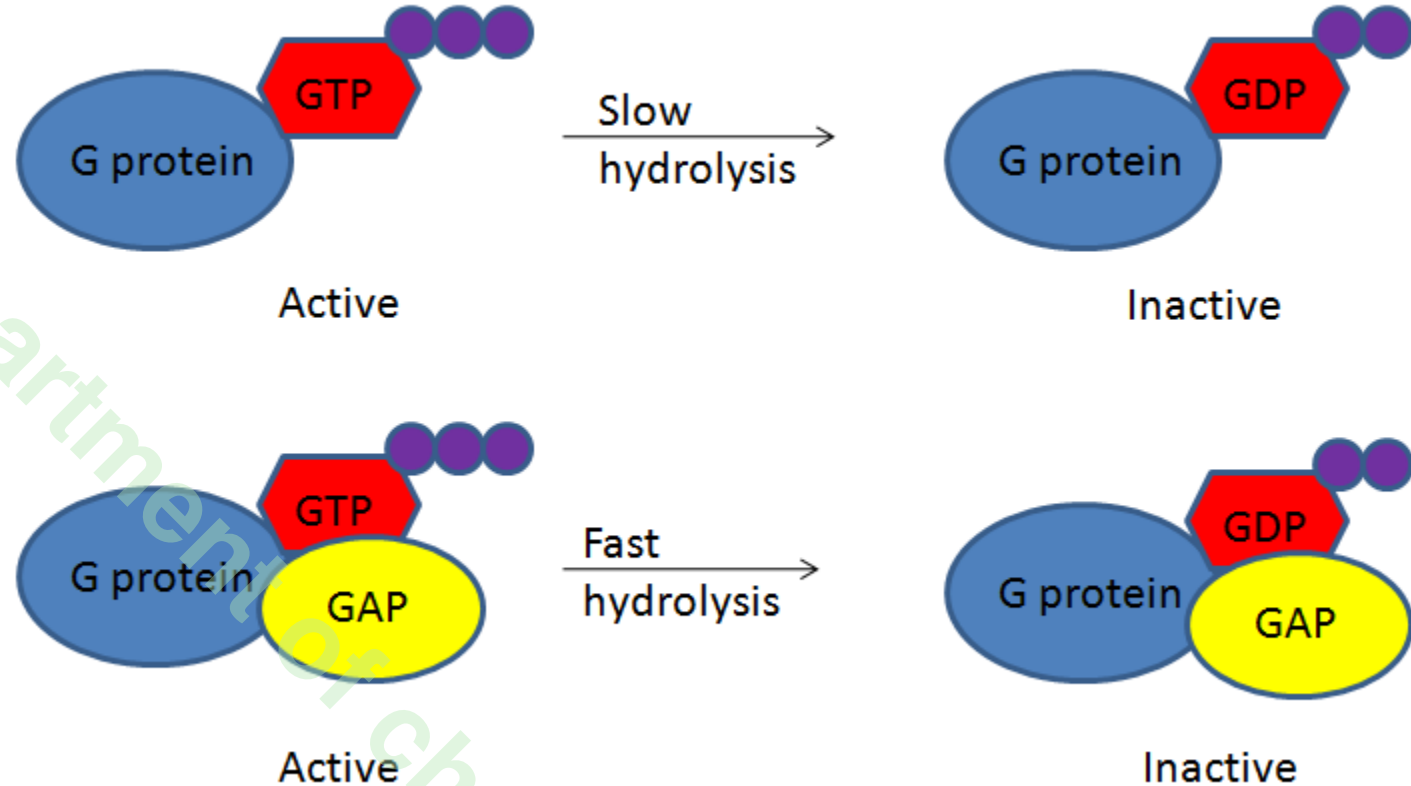
Замещая ГТФ на ГДФ, **ГТФаза-активирующие белки** возвращают α -субъединицу G-белков в неактивное состояние.

Сначала **активирующие ГТФазу белки** были открыты как регуляторы малых G-белков, затем их регулирующая функция была показана и для α -субъединиц G-белков-гетеротримеров.



GAP - GTPase-Activating Proteins

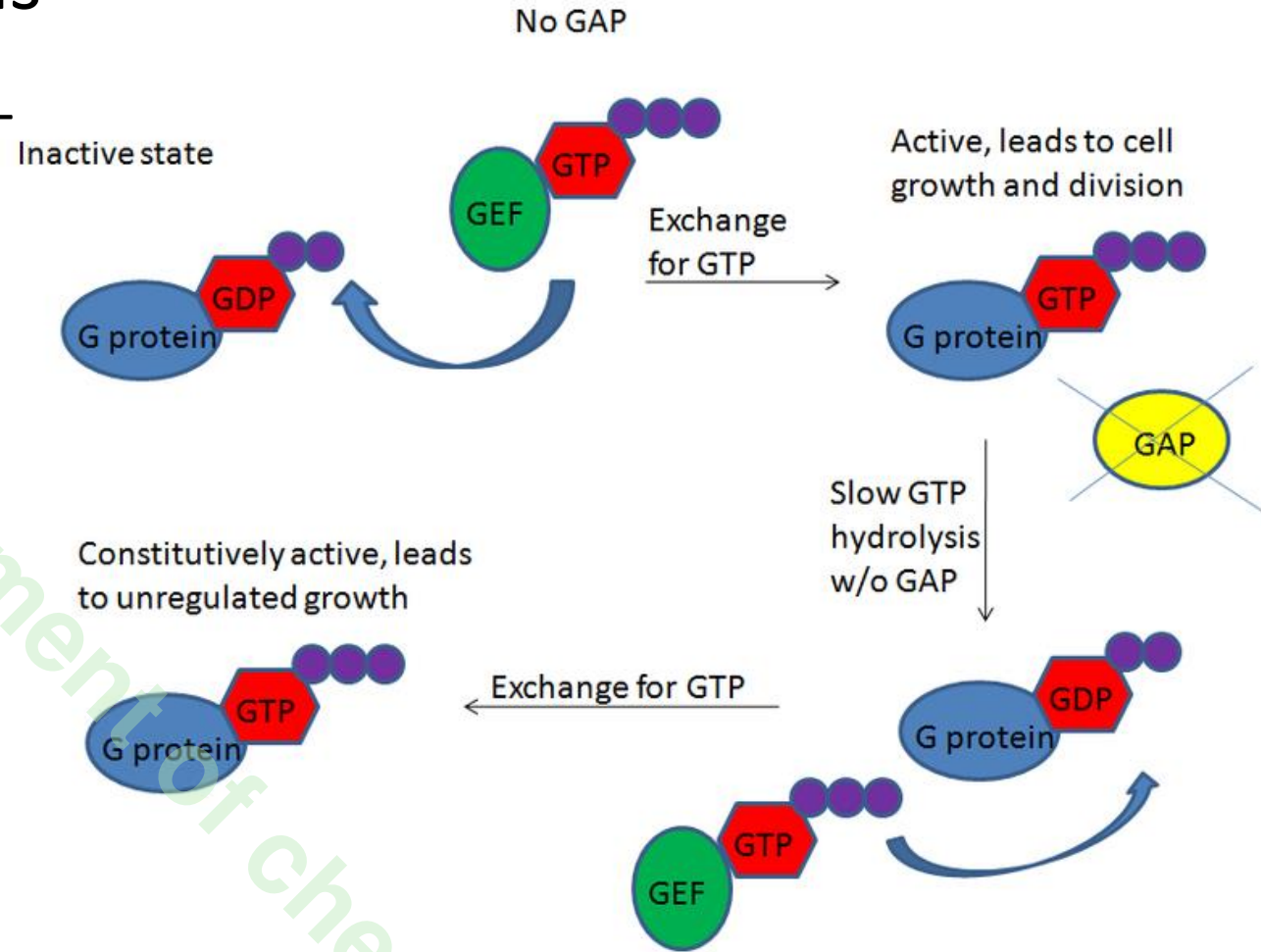
- G-белки обладают медленной гидролитической активностью GTPase.
- В присутствии GAP эта гидролитическая активность является быстрой.



GAP - GTPase-Activating Proteins

- Без GAP, G-белки постоянно включены из-за их медленной гидролитической активности, а GEF постоянно заменяют GDP на GTP. Это приводит к нерегулируемому делению клеток и образованию опухолей.

GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors, факторы обмена гуаниловых нуклеотидов), ускоряют обмен ГДФ на ГТФ и таким образом активируют G-белки. Обычно для G-белка GEF-ом служит активированный лигандом рецептор, однако в некоторых случаях белки AGS (Activator of G-protein Signaling, активаторы передачи сигнала G-белками) могут активировать G-белок независимо от воздействия на него рецептора.



Подразделение G-белков-гетеротримеров

Выделяют четыре группы по **структуре** и **мишеням** α -субъединиц:

- 1) **Gs** стимулирует аденилатциклазу (или гуанилатциклазу);
- 2) **Gi** ингибирует аденилатциклазу (или гуанилатциклазу),
Go ингибирует потенциал-зависимые Ca^{2+} - и K^{+} -каналы;
- 3) **Gq/11** (или **Gq**) активирует фосфолипазу C;
- 4) **G12/13** не участвует в процессах внутриклеточной сигнализации (функции цитоскелета, сокращение гладкой мускулатуры).

Димер, образованный комплексом из **β - и γ -субъединиц ($G_{\beta\gamma}$)**, также проявляет свою самостоятельную функцию, например, регулирует проводимость ионных каналов (например, Ca^{2+} -каналов).

Холерный токсин(и **коклюшный**), содержит фермент АДФ-рибозилазу.

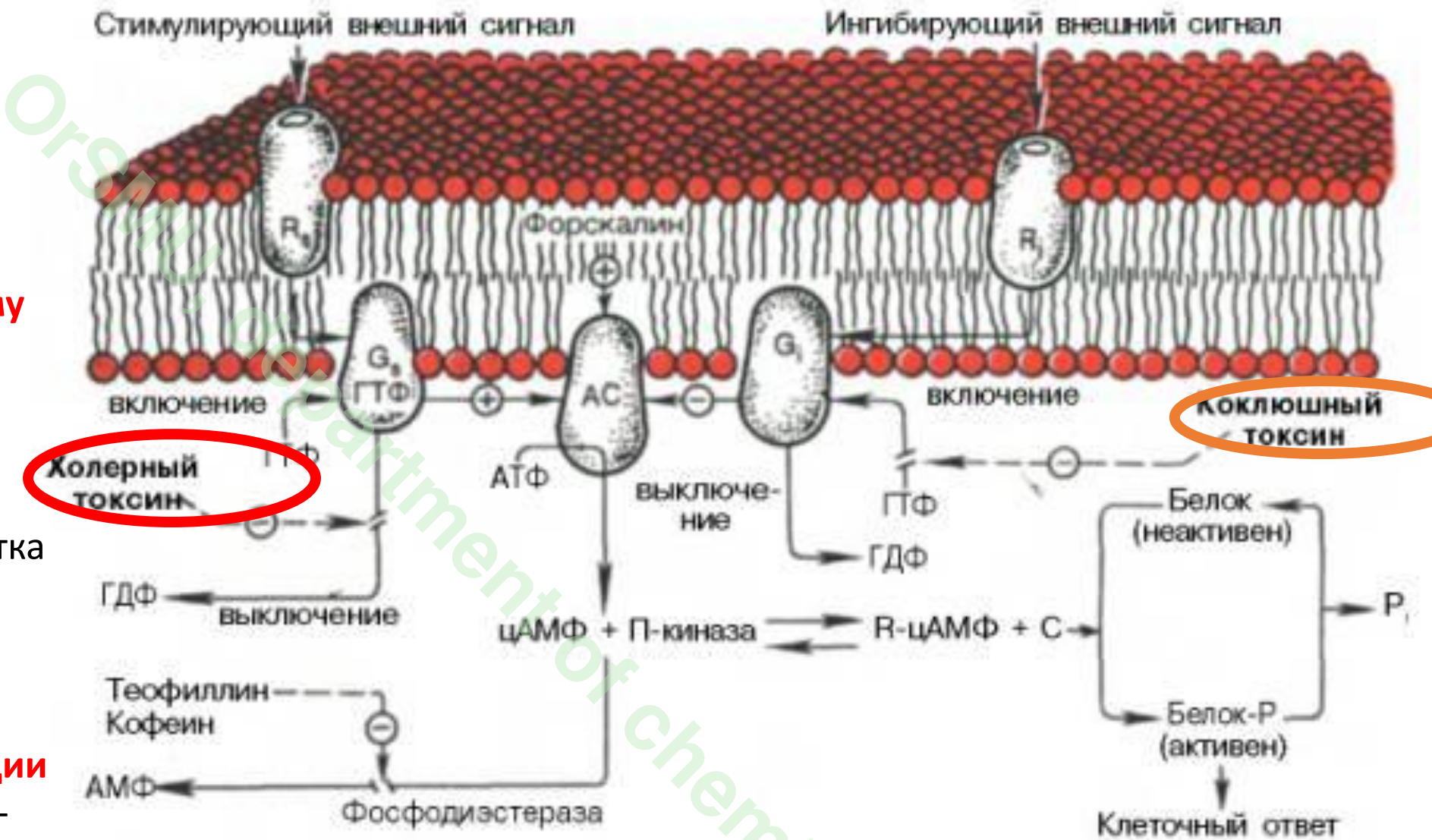
АДФрибозилирование α -субъединицы G_s белка приводит к ее **необратимому активированию**, т.е.

препятствует гидролизу ГТФ.

Итог – активация аденилатциклазы и непрерывающаяся наработка цАМФ.

АДФрибозилирование α -субъединицы G_i белка **препятствует его диссоциации** на субъединицы. Результат –

устранение ингибирующего действия на аденилатциклазу, и она остается активной.

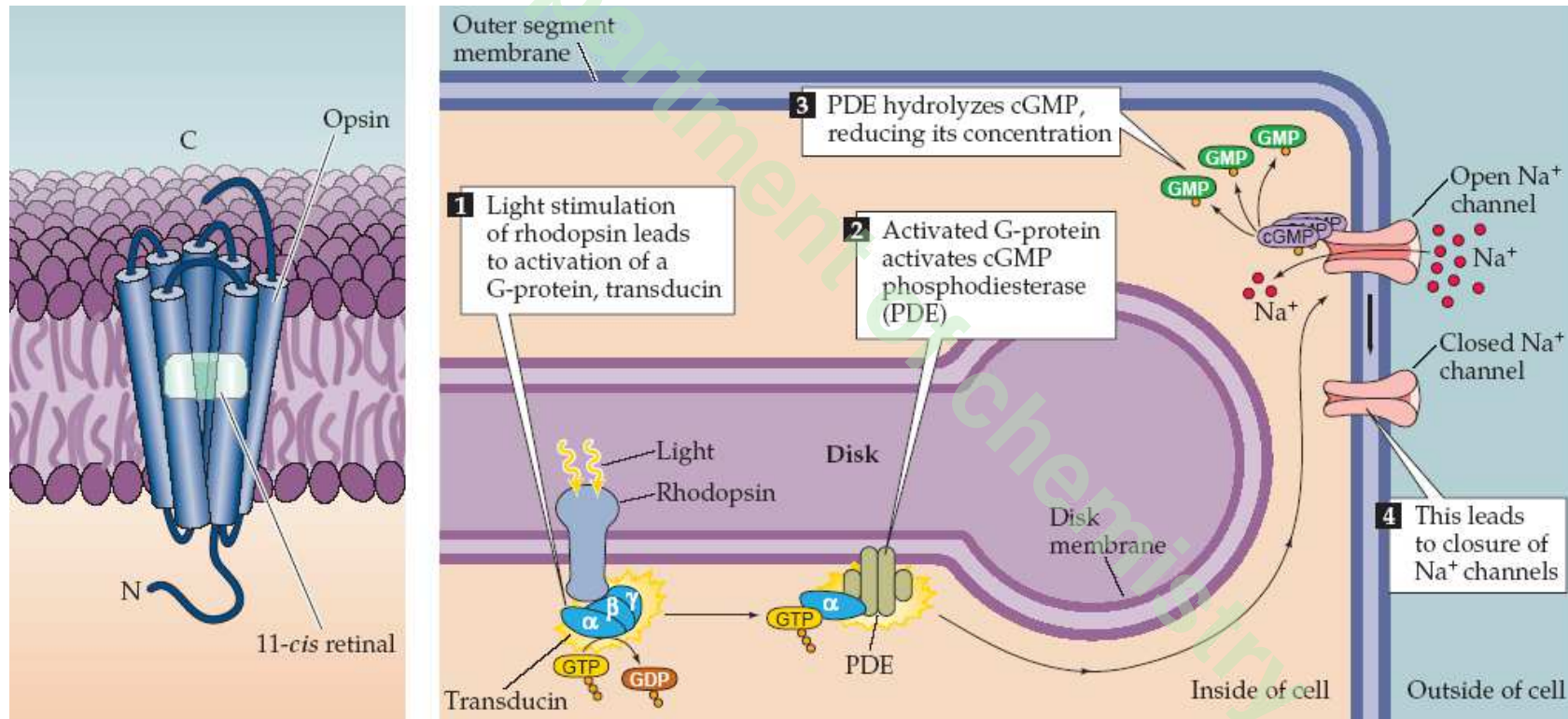


ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ ПОЗВОЛИЛО ОБНАРУЖИТЬ ДВА ВИДА G-БЕЛКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЕ

Подразделение G-белков-гетеротримеров

Семейство **Gi/Go**-белков включает также

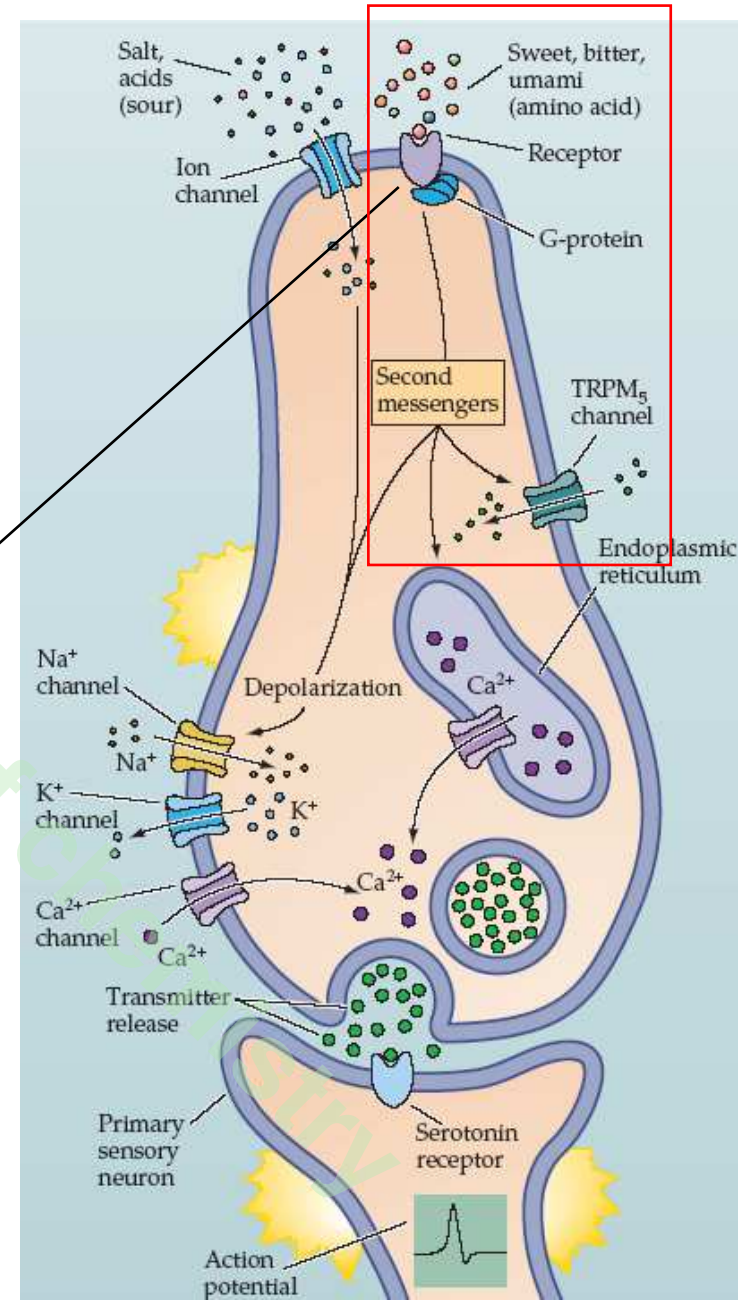
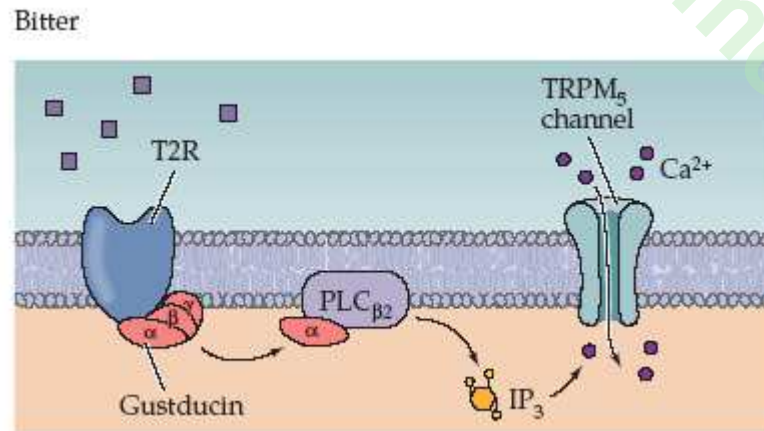
Gt (трансдуцин), который активирует **фосфодиэстеразу**, катализирующую превращение цГМФ в нециклическую форму 5'3'-ГМФ в фоторецепторах сетчатки,



Подразделение G-белков-гетеротримеров

Семейство **Gi/Go**-белков включает также

G-белок густодуцин (передатчик вкуса), который активирует **фосфолипазу C** (на рис. **PLC_{β2}**) в мембранах вкусовых рецепторных клеток.



Активация G-белками внутриклеточных метаболических каскадов

Активированные G-белки влияют на функции многих эффекторов следующего порядка.

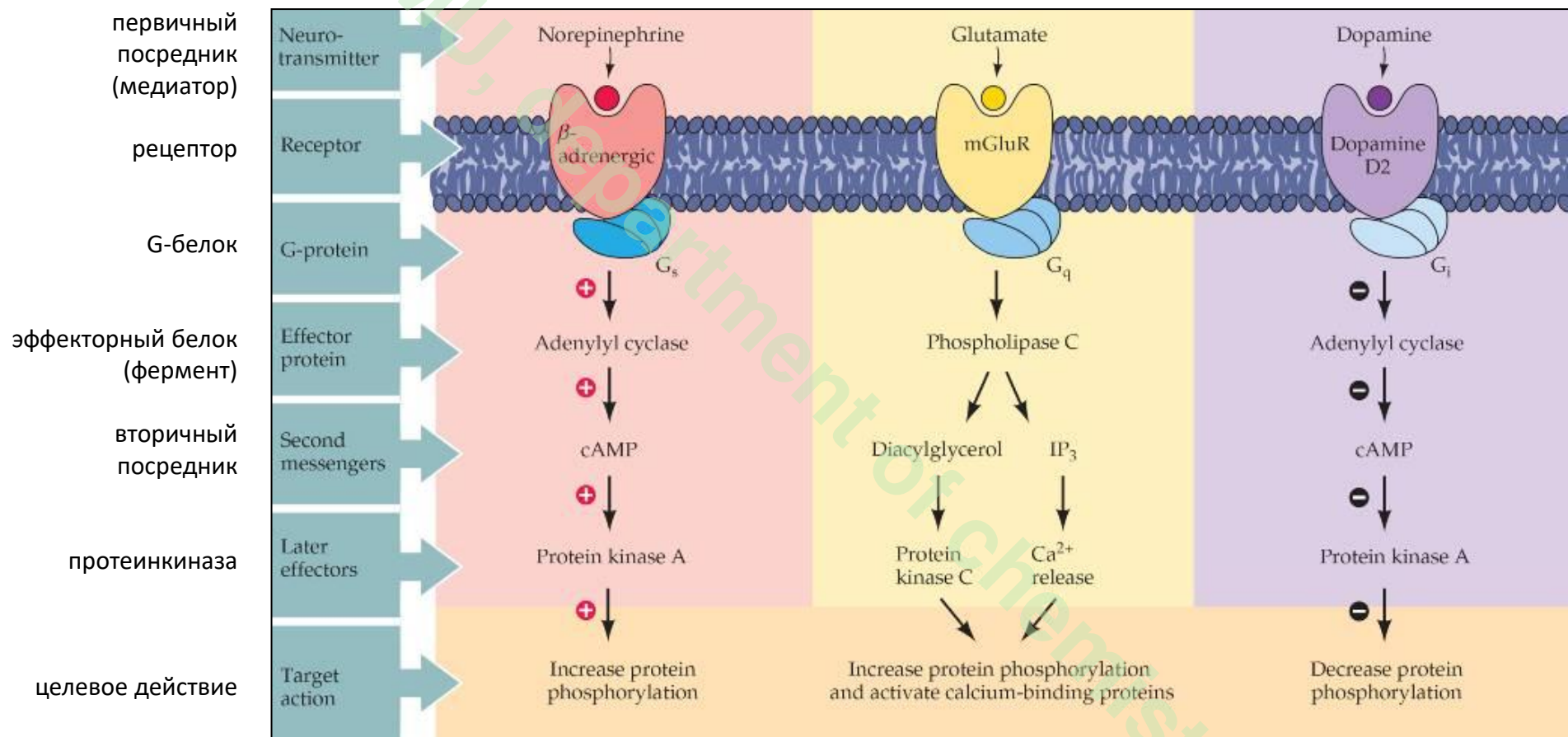
Большинство таких эффекторов являются ферментами, которые при их активации G-белками синтезируют внутриклеточные вторичные посредники, а при ингибировании – прекращают синтез последних.

Эти ферменты включают аденилат- и гунилатциклазы, фосфолипазу C и другие.

Вторичные посредники инициируют каскады следующего порядка.

Поскольку каждый из этих каскадов запускается специфическими субъединицами G-белков, пути внутриклеточной сигнализации, опосредованные отдельными рецепторами, зависят от специфичности ассоциированных с этими рецепторами субъединиц G-белков.

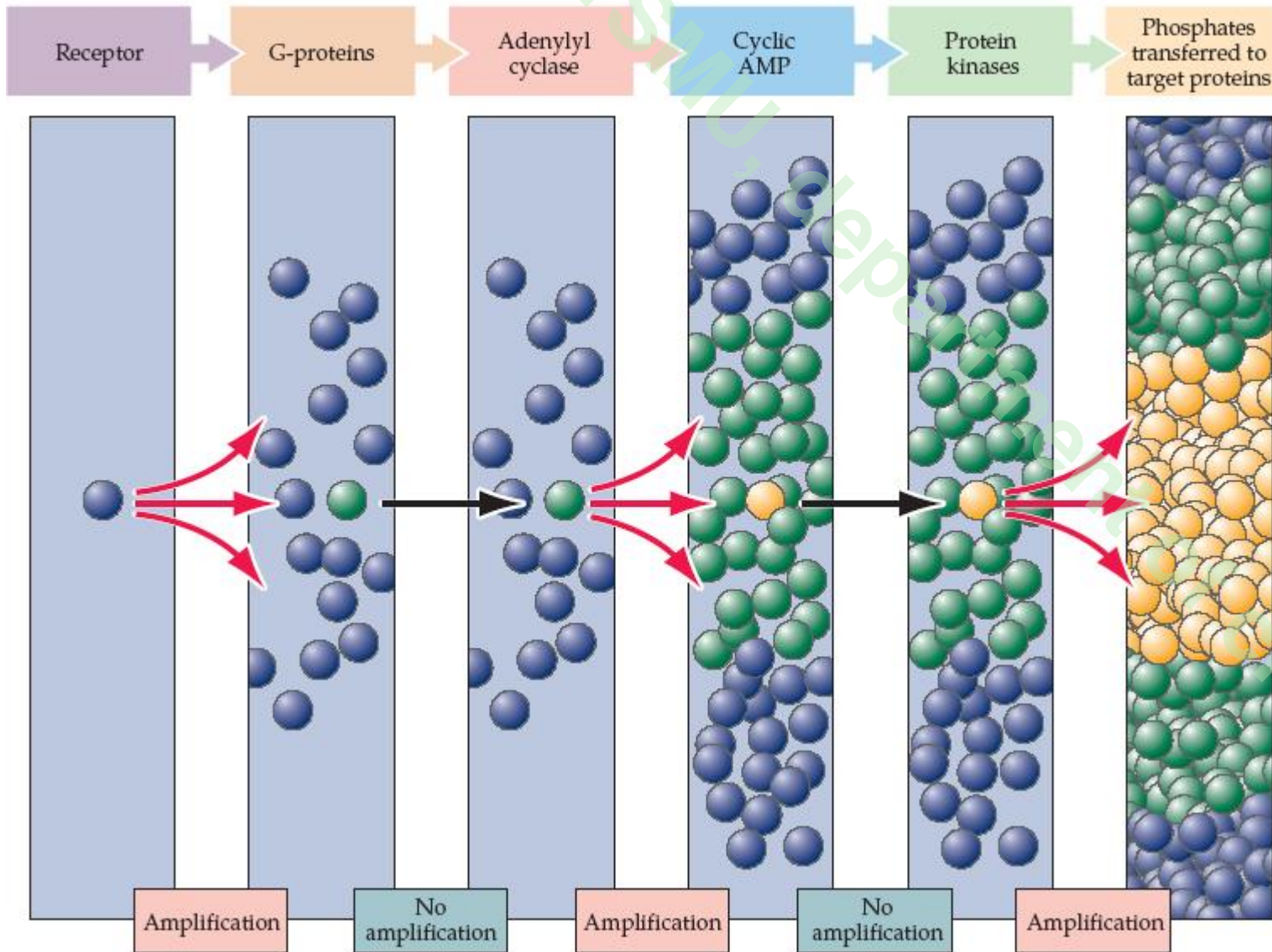
Пути внутриклеточной сигнализации, опосредованные G-белками



Общая схема внутриклеточных метаболических каскадов с участием G-белков состоит из следующих этапов:

- В результате активации рецептора ГДФ на α -субъединице G-белка (передатчик) замещается на ГТФ, что приводит к **диссоциации** α - и $\beta\gamma$ -субъединиц.
- Различные типы активированной α -субъединицы взаимодействуют с рядом первичных эффекторов - ферментов (циклазы, фосфолипазы, фосфодиэстеразы цГМФ, ГТФаза-активируемые белки и некоторые другие). В результате взаимодействия α -субъединица может либо **активировать** ферменты, что приводит к синтезу (циклазы) или деградациии (фосфодиэстеразы) вторичных посредников, либо **ингибировать** ферменты (циклазы), прекращая синтез вторичных посредников. Димер $\beta\gamma$ ингибирует и стимулирует (вместе с α -субъединицей) некоторые аденилатциклазы, а также регулирует активацию фосфолипаз $C\beta$ и A_2 , K^+ - и Ca^{2+} -каналов и других эффекторов.
- Вторичные посредники активируют различные белки-мишени (вторичные эффекторы) – **протеинкиназы, фосфатазы, липоксигеназы, циклооксигеназы** и др., воздействуя на их регуляторные субъединицы.
- Каталические субъединицы различных белков-мишеней вызывают дальнейшие эффекты. Например, протеин киназы **фосфорилируют** каналыые белки, что приводит к открытию ионных каналов, а **фосфатазы** дефосфорилируют каналыые белки, что приводит к закрытию ионных каналов
- Посредники следующего уровня либо активируют различные третичные эффекторы, либо влияют на ионную проводимость в мембранах, в том числе и в мембранах клеточных органелл.

Три уровня усиления в каскадах внутриклеточной сигнализации



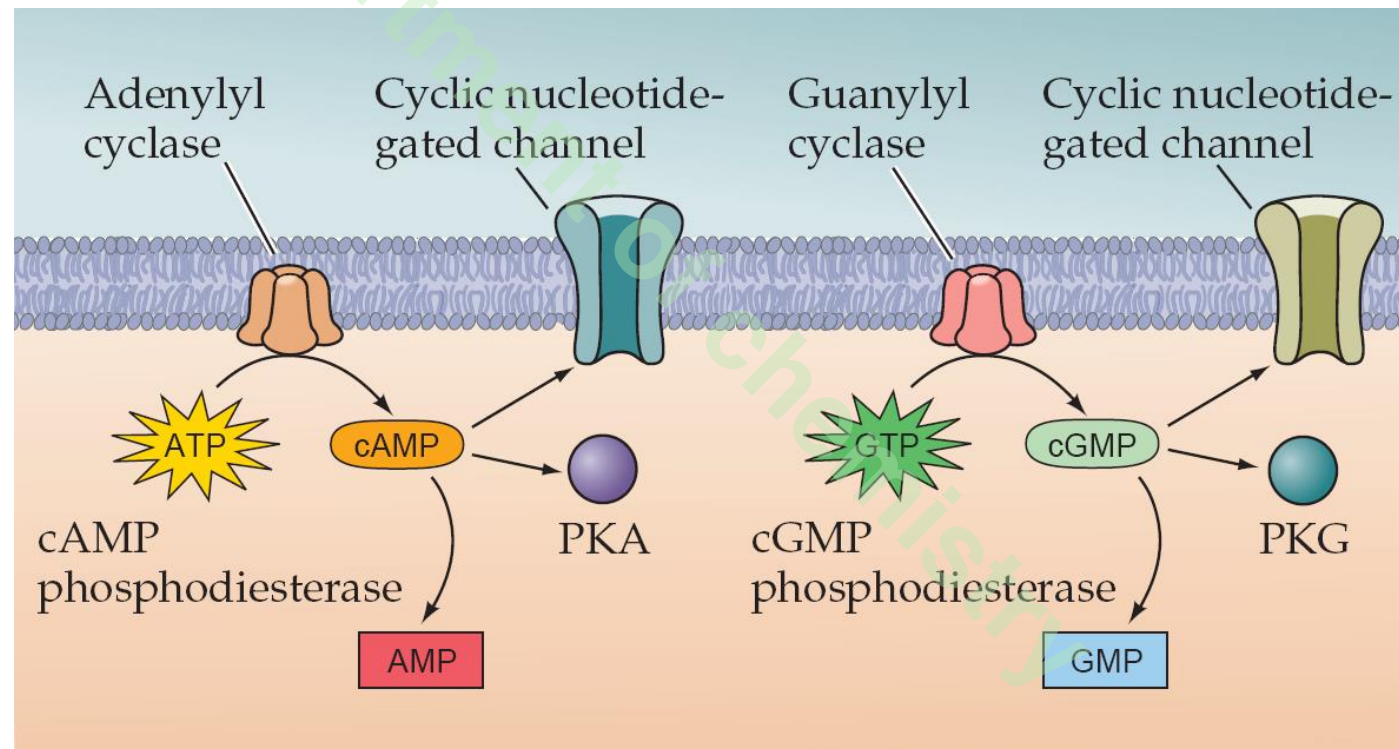
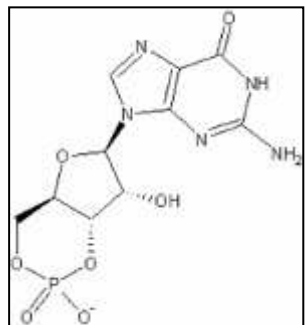
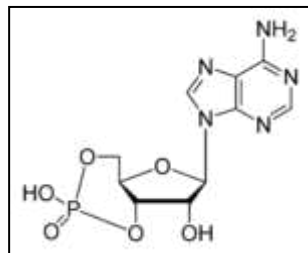
- 1 молекула гормона активирует 1 молекулу РЕЦЕПТОРА, который активирует несколько G-белков. Одна молекула G-белка стимулирует одну молекулу АЦ. Каждая молекула АЦ синтез множество молекул цАМФ. цАМФ активирует одну молекулу ПКА, каждая из которых активирует множество мишеней. Итог каскада – **усиление гормонального сигнала на несколько порядков.**
- Это объясняет, почему для эндокринной регуляции требуется очень низкая концентрация гормона в крови – как правило, 10^{-10} М.

Вторичные посредники: цАМФ и цГМФ

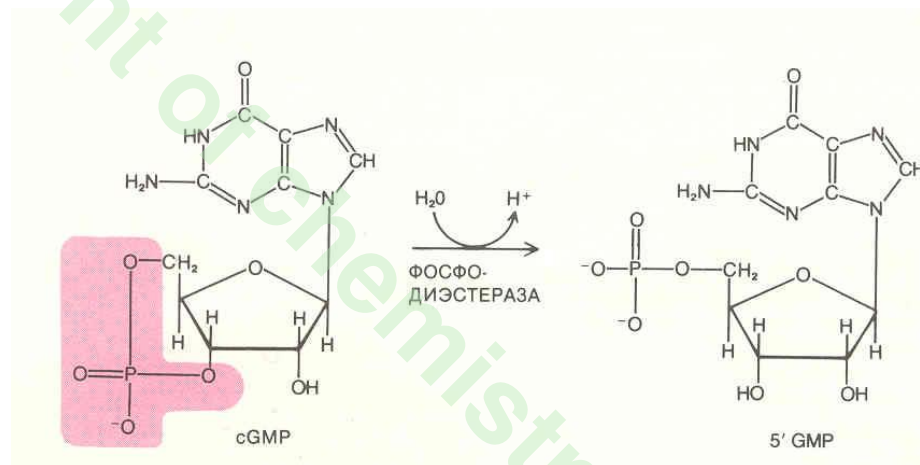
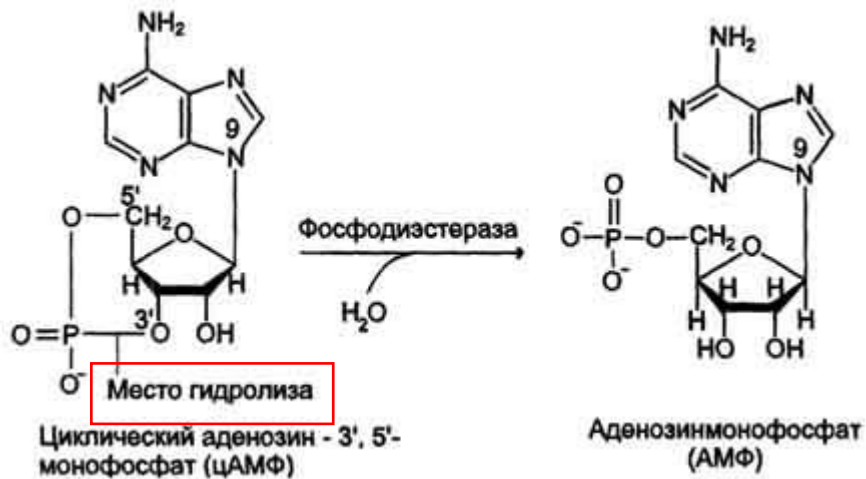
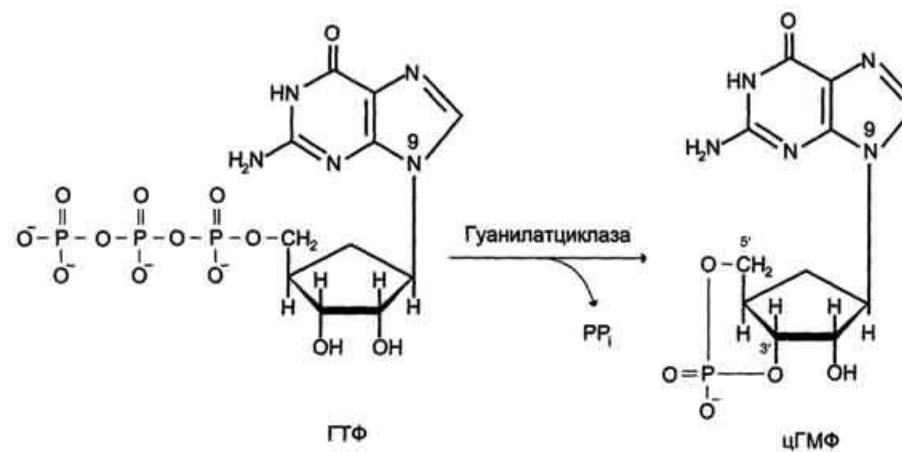
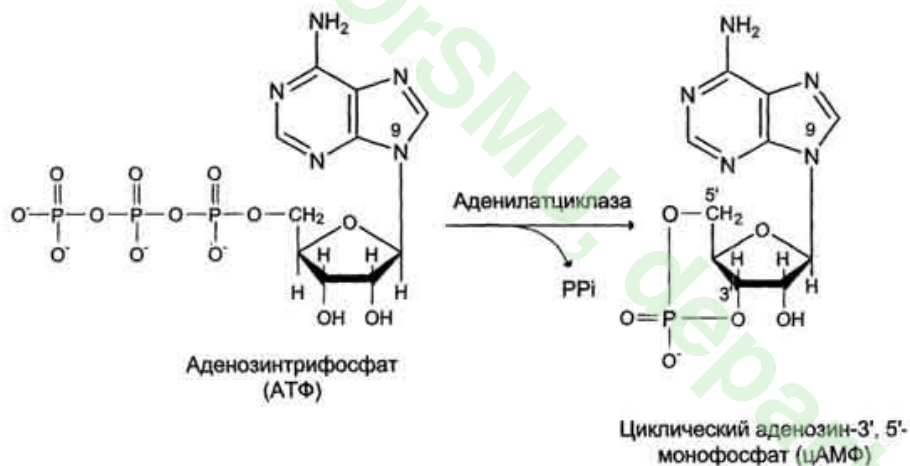
цАМФ синтезируется из АТФ при активации **аденилатциклазы**, локализованной в плазматической мембране. **цГМФ** синтезируется из ГТФ при активации **гуанилатциклазы**.

Циклические нуклеотиды деградируют в результате активации **фосфодиэстераз**, которые разрезают фосфодиэфирную связь в молекулах цАМФ и цГМФ и превращает их в линейную форму 3'5'-АМФ и 3'5'-ГМФ.

Уровень циклических нуклеотидов регулируется балансом их синтеза (**циклазами**) и деградации (**фосфодиэстеразами**). Каждый из этих ферментов может регулироваться независимо.



Синтез и деградация цАМФ и цГМФ



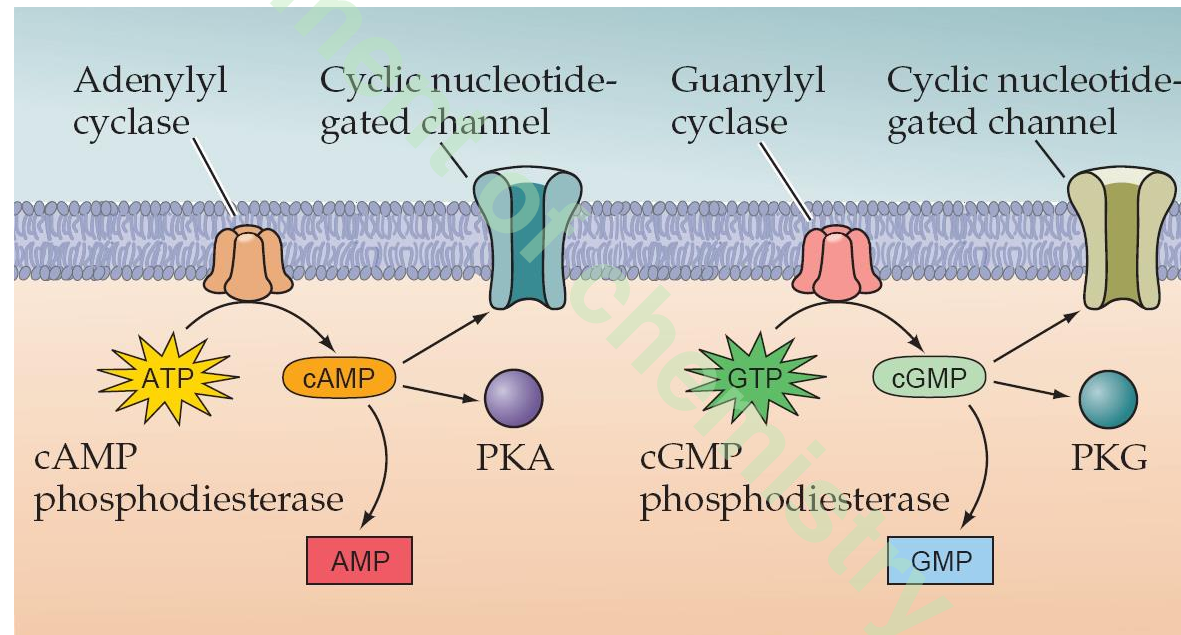
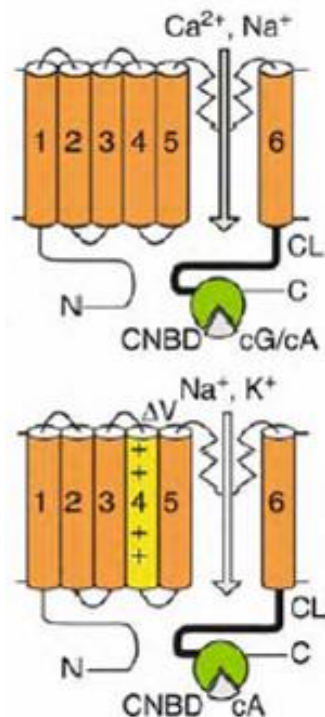
Вторичные посредники: цАМФ и цГМФ

При увеличении концентрации циклические нуклеотиды связываются с двумя различными классами внутриклеточных мишеней.

Типичными их мишенями являются **протеинкиназы** – **цАМФ-зависимая протеинкиназа (ПКА)** и **цГМФ-зависимая протеинкиназа (ПКГ)**.

Протеин киназы обеспечивают множество физиологических ответов, фосфорилируя различные мишени белки-мишени.

Циклические нуклеотиды могут связываться с цитоплазматическими участками С-терминалей определенных лиганд-зависимых ионных каналов, а также с **цАМФ- потенциал-зависимыми** неселективными катионными каналами.



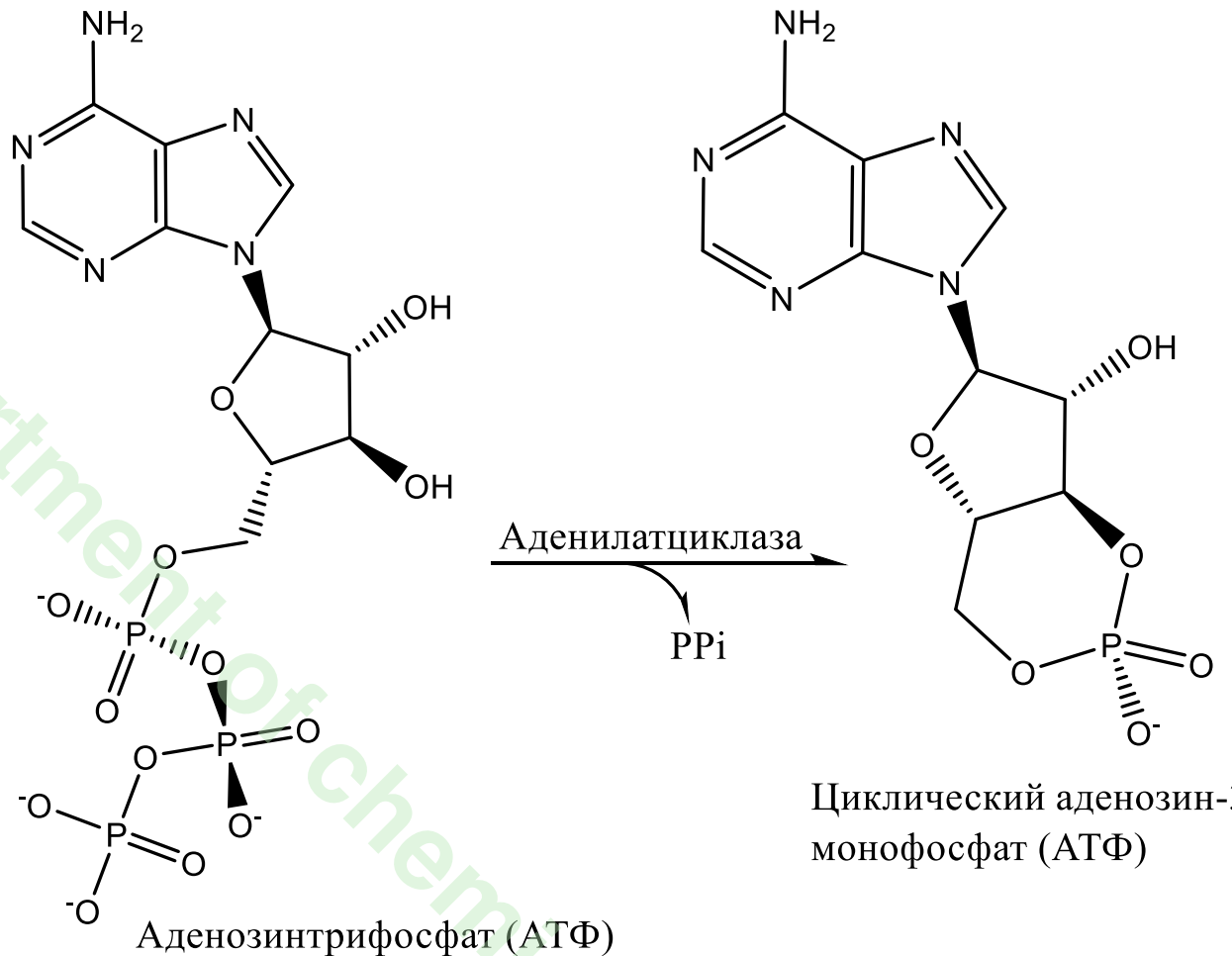
Аденилатциклазная мессенджерная система:

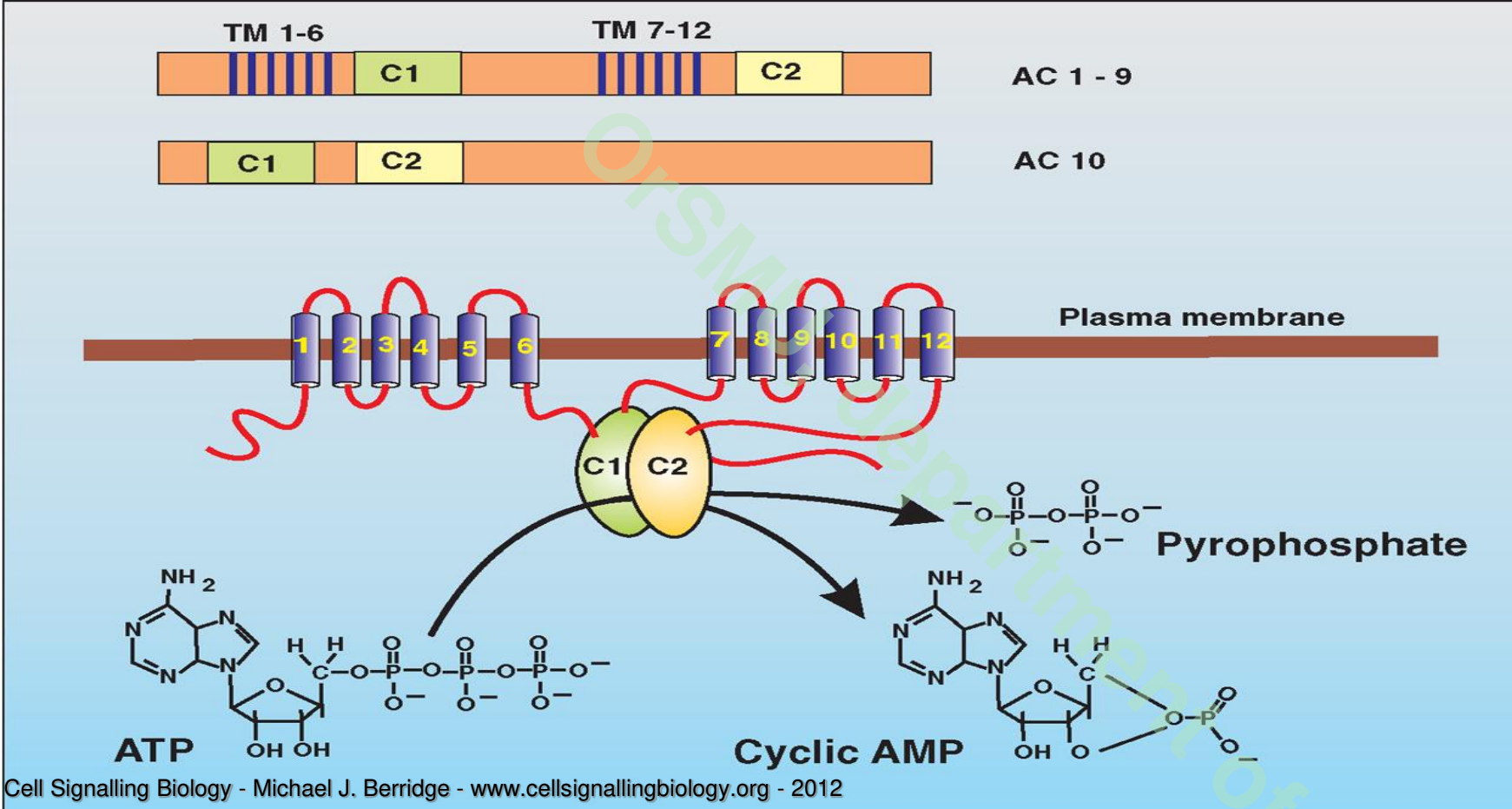
- Рецептор гормона
- **Фермент аденилатциклаза**
- G - белок
- цАМФ-зависимая протеинкиназа
- Фосфодиэстераза

Синтез циклического АМФ

цАМФ открыт при изучении стимуляции гликогенолиза в печени адреналином.

Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – первое соединение, которое Сазерленд назвал вторичным посредником.





Cell Signalling Biology - Michael J. Berridge - www.cellsignallingbiology.org - 2012

Доменная структура аденилатциклазы (АЦ).

9 мембраносвязанных (АС1 – АС9) имеют сходную доменную структуру. Один полипептид имеет тандемный повтор из шести трансмембранных доменов (ТМ) с ТМ1-ТМ6 в одном повторе и ТМ7-ТМ12 в другом. За каждой кассетой ТМ следуют большие цитоплазматические домены (С1 и С2), которые содержат каталитические области, которые превращают АТФ в циклический АМФ.

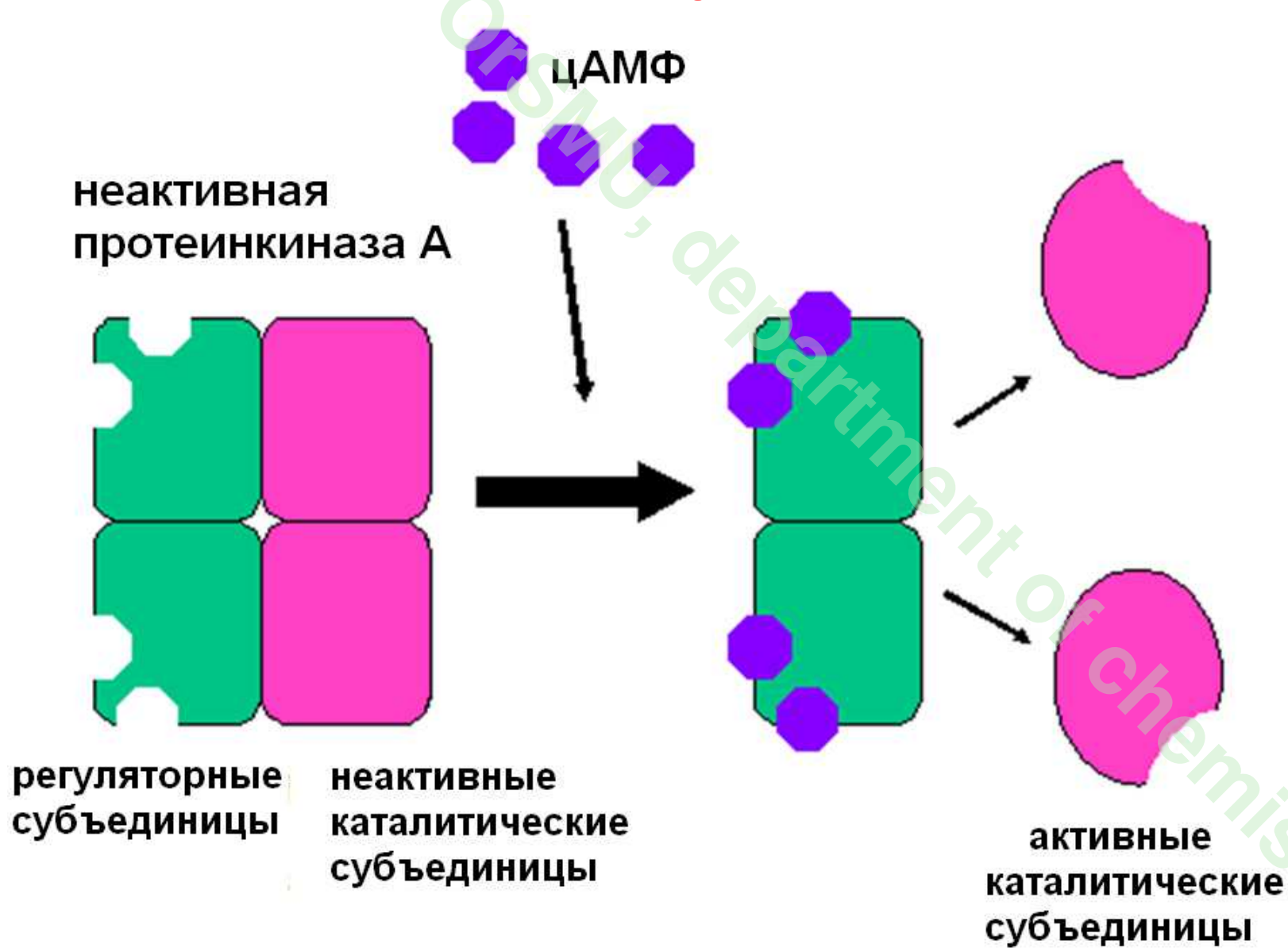
Домены С1 и С2 объединяются, образуя гетеродимер. Сайт связывания АТФ расположен на границе между этими двумя доменами.

Растворимая изоформа АС10 лишена трансмембранных участков, но сохраняет домены С1 и С2, которые ответственны за катализ.

Механизм действия цАМФ

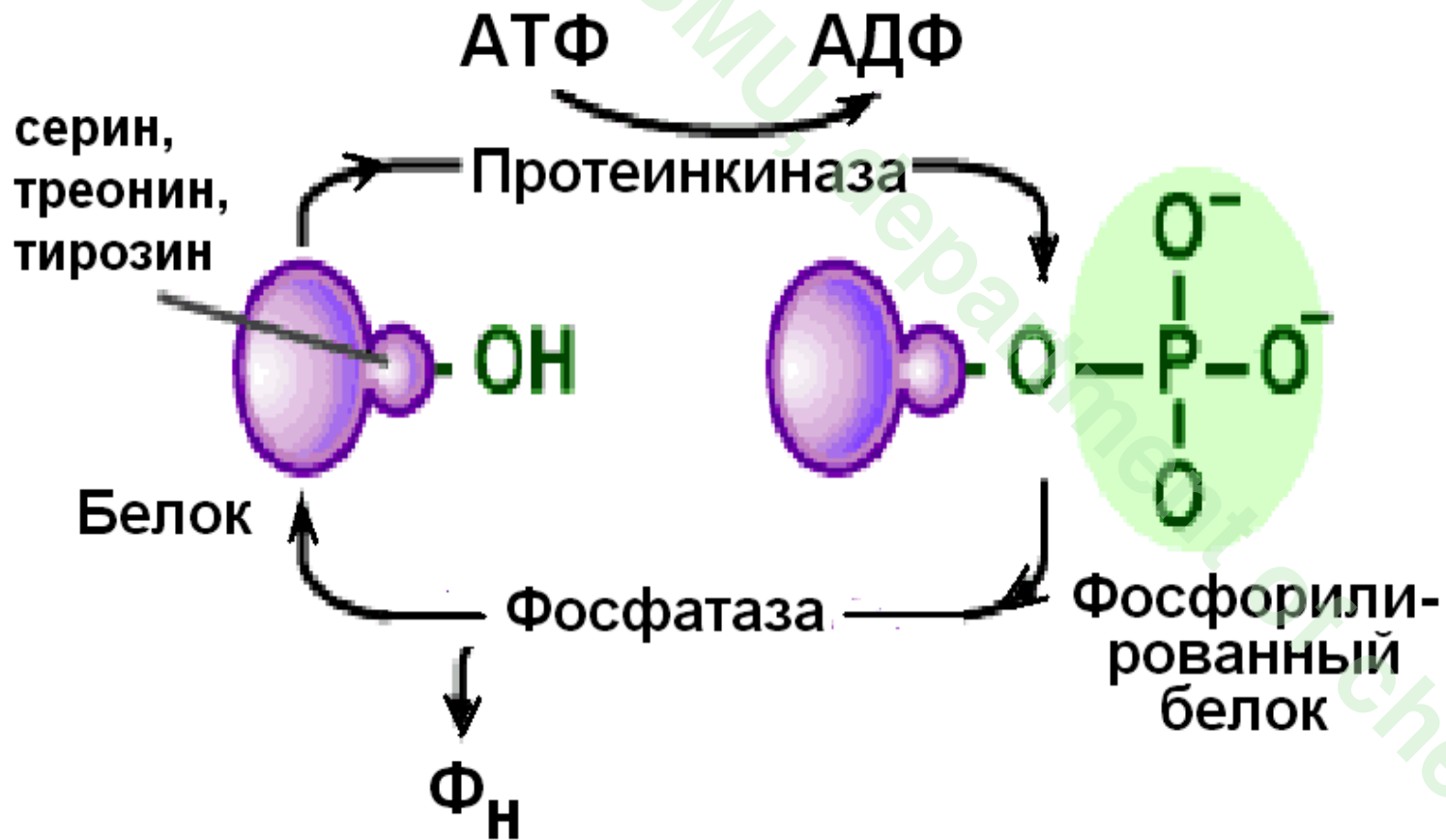
- цАМФ является **аллостерическим эффектором** протеинкиназ А (ПК-А) и ионных каналов.
- В неактивном состоянии ПК-А является тетрамером, две каталитические субъединицы (К-субъединицы) которого ингибированы регуляторными Р-субъединицами (аутоингибирование).
- При связывании цАМФ Р-субъединицы диссоциируют из комплекса и К-единицы активируются.
- Фермент может фосфорилировать остатки серина и треонина, находящиеся в ключевых положениях в цепи, в более чем 100 различных белках, в том числе во многих ферментах и факторах транскрипции.
- В результате фосфорилирования изменяется функциональная активность этих белков.

Активация протеинкиназы А



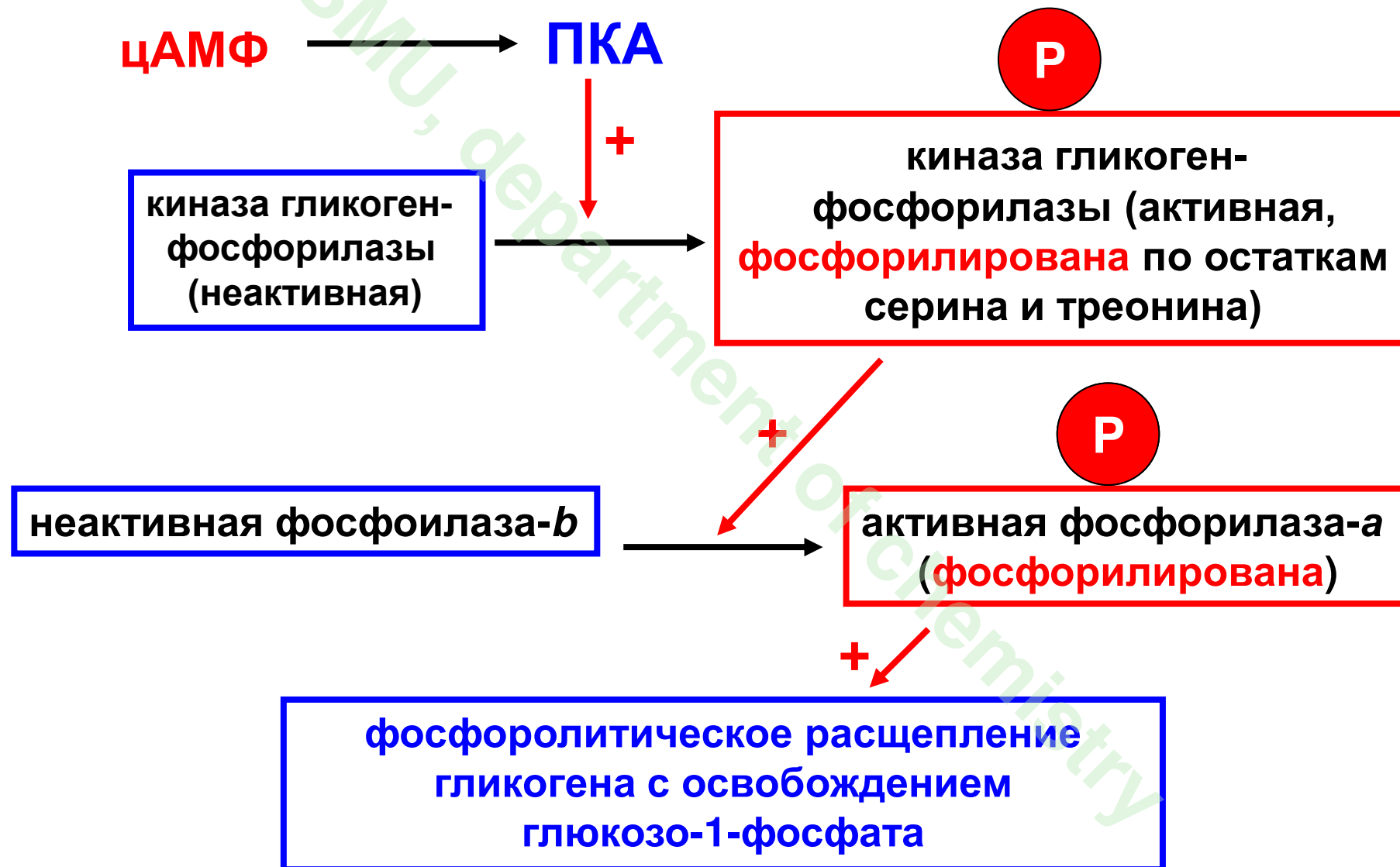
В неактивном состоянии ПК-А является тетрамером, две каталитические субъединицы (К-субъединицы) которого ингибированы регуляторными Р-субъединицами (аутоингибирование). При связывании цАМФ Р-субъединицы диссоциируют из комплекса и К-единицы активируются.

Фосфорилирование белка



Фермент может фосфорилировать остатки серина и треонина, находящиеся в ключевых положениях в цепи, в более чем 100 различных белках, в том числе во многих ферментах и факторах транскрипции. В результате фосфорилирования изменяется функциональная активность этих белков.

цАМФ-зависимая протеинкиназа А (ПКА), серин/треониновая



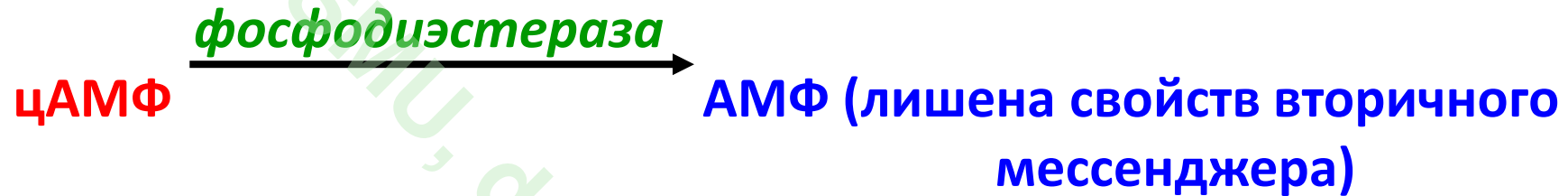
В клетках-мишенях каждого типа экспрессируется **собственный набор протеинкиназ А и киназа-активируемых путей.**

Одна система передачи информации может быть использована для контроля **нескольких специфических биохимических процессов.**

Механизмы прекращения сигнализации посредством рецептора и синтеза цАМФ:

1. Включение собственной ГТФазной активности α -субъединицы, наступает через несколько минут после активации рецептором G_s -белка. Замена ГТФ на ГДФ в составе α -субъединицы приводит к потере её активности и сборке неактивного гетеротримерного G_s -белка;
2. Снижение концентрации адреналина в крови приводит к диссоциации комплекса гормон – рецептор;
3. Рецептор (находящийся в форме комплекса с гормоном) фосфорилируется по цитозольному домену специфической ПКС, что лишает рецептор способности контактировать с G_s -белком и активировать его. Окончательная инактивация рецептора происходит с участием белка **аррестина**: комплекс фосфорилированный рецептор-аррестин поглощается клеткой путем **эндоцитоза**.

4. Сама цАМФ разрушается с участием специфической фосфодиэстеразы:



5. Специфические фосфатазы **дефосфорилируют** ферменты, активированные ПКА.

цАМФ образуется в пределах секундных интервалов времени. Если не происходит постоянного образования всё новых комплексов гормон — рецептор, ответ также быстро прекращается. **Реакции, запускаемые цАМФ, быстрые, но скоротечные.**

Участие цАМФ в регулировании транскрипции белков.

цАМФ способна имитировать действие стероидных и тиреоид-ных гормонов, тем самым, вносить **долговременные изменения** в жизнедеятельность клетки.

Гены, регулируемые цАМФ, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**: это последовательности, которые при стимуляции действуют в качестве энхансеров транскрипции.

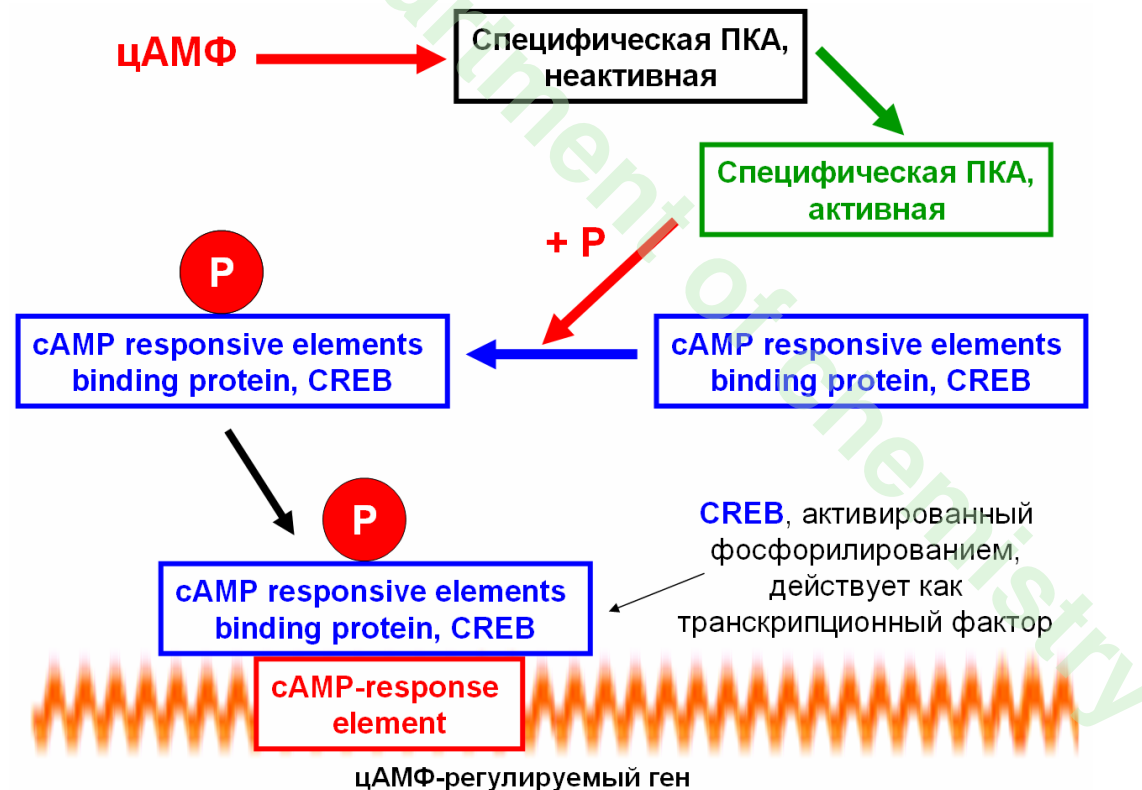
Стимуляция цАМФ-чувствительных элементов идёт с участием специфической цАМФ-зависимой протеинкиназы, которая фосфорилирует белок, связывающий цАМФ-чувствительные элементы (**cAMP responsive elements binding protein, CREB**). Активированный **CREB** действует как транскрипционный фактор и связывается с цАМФ-чувствительными элементами ДНК.

цАМФ-регулируемые гены, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**. **CREB** активируют **элементы**, которые действуют как энхансеры транскрипции. Гены, транскрибируемые при участии **CREB**, различаться в зависимости от типа клеток.

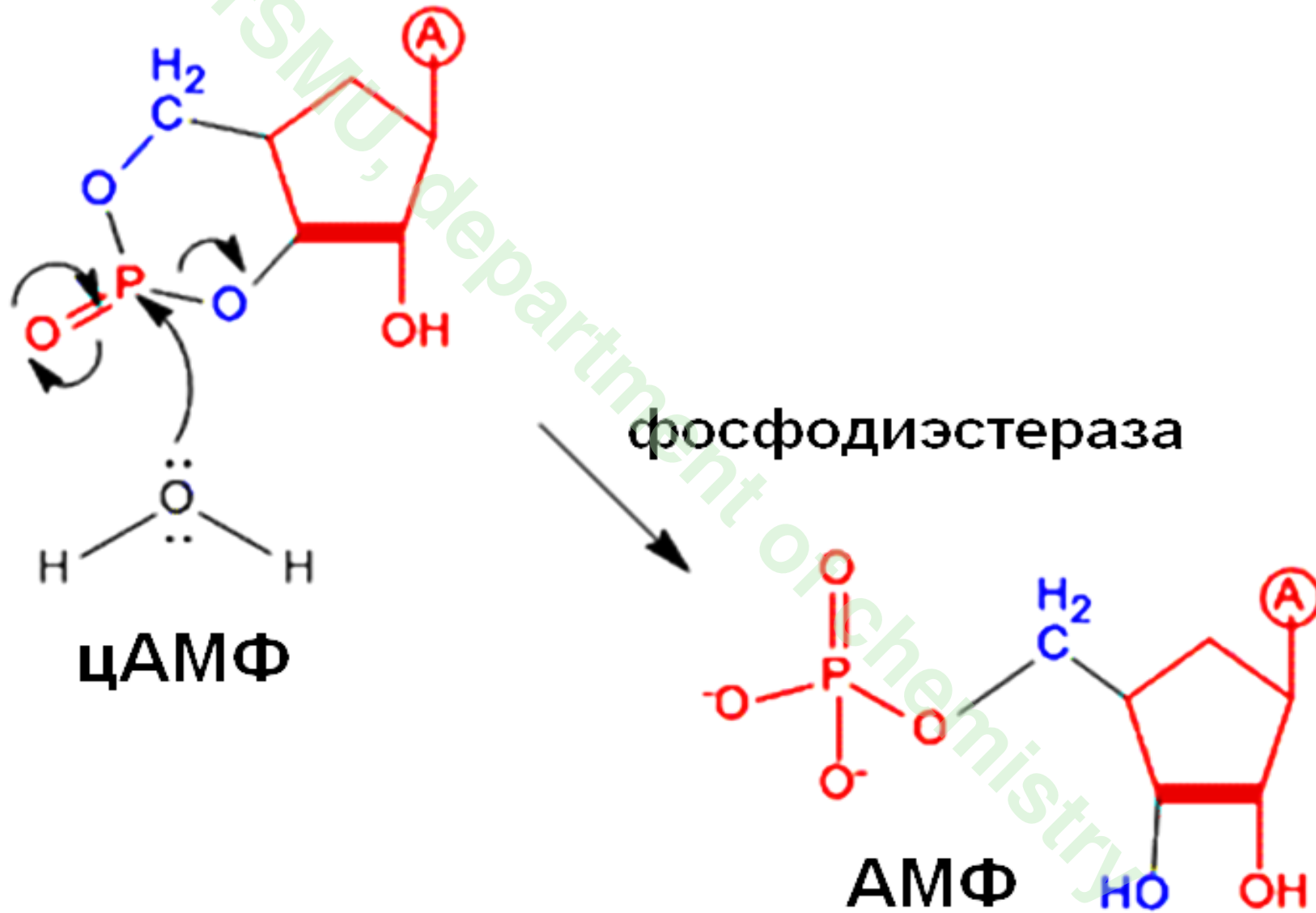
Участие цАМФ в регулировании транскрипции белков

цАМФ способна имитировать действие стероидных и тиреоидных гормонов, тем самым, вносить **долговременные изменения** в жизнедеятельность клетки.

цАМФ-регулируемые гены, содержат **цАМФ-чувствительные элементы (cAMP response elements)**. CREB активируют **элементы**, которые действуют как энхансеры транскрипции. Гены, транскрибируемые при участии CREB, различаются в зависимости от типа клеток.



Прекращение сигнала



Аденилатциклазная система передачи гормонального сигнала

Вторичный посредник (мессенджер) –
циклический АМФ (цАМФ)

Гормоны, использующие аденилатциклазную систему:

- Адреналин (через β -адренорецепторы)
- Глюкагон
- Адrenокортикотропный гормон (АКТГ)
- Паратгормон
- Тиреотропный гормон (ТТГ)
- Лютеинизирующий гормон (ЛГ)
- Меланоцит-стимулирующий гормон (МСГ)
- Дофамин
- Антидиуретический гормон (через V2-рецепторы)



Основные этапы передачи сигнала в клетку (с участием аденилатциклазной системы)

Вторичный посредник - **цАМФ**;

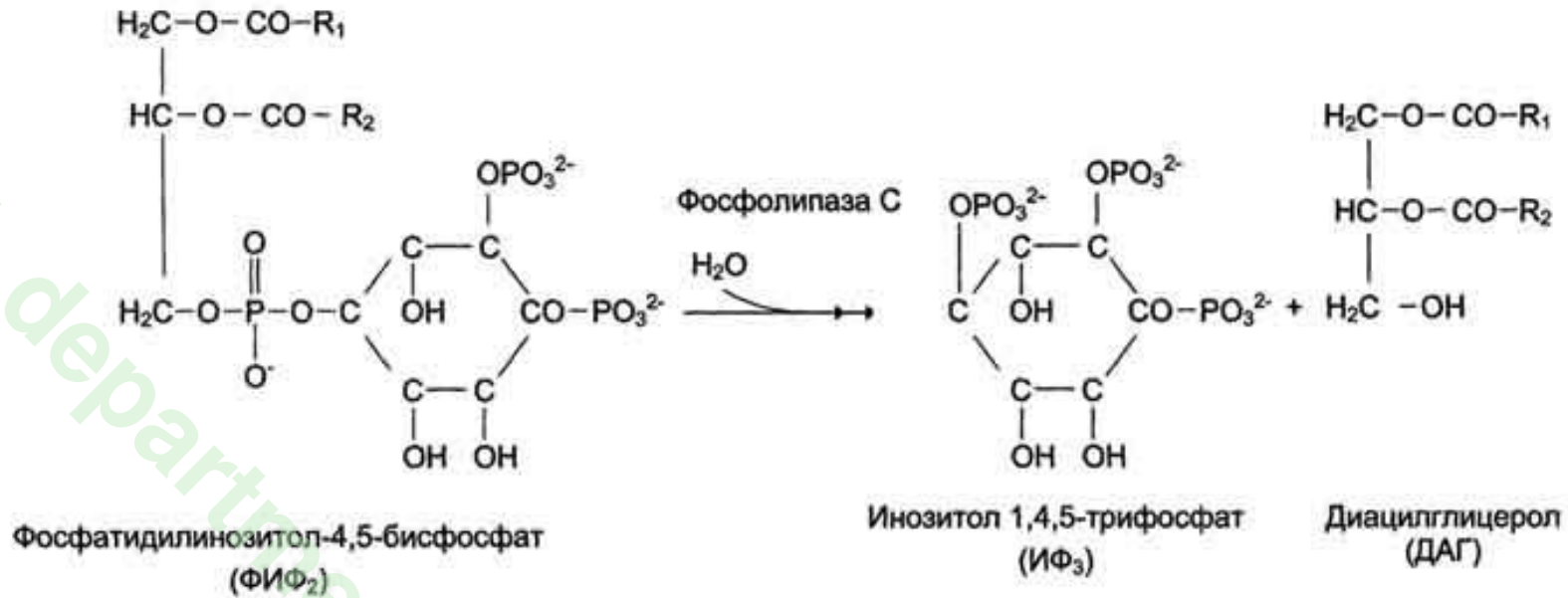
Мембранно-связанный фермент - аденилатциклаза

1. Гормон связывается с мембранным рецептором, образуется комплекс, меняется конформация белка-рецептора, увеличивается сродство к G-белку.
2. Изменение конформации G-белка, сопряженного с рецептором.
3. Активация аденилатциклазы субъединицами G-белка
4. Образование в клетке из АТФ цАМФ (вторичный посредник)
5. цАМФ активирует в цитозоле протеинкиназу А за счет диссоциации протомеров (см. механизмы регуляции активности ферментов)
6. Протеинкиназы фосфорилируют регуляторные ферменты метаболических путей → меняется активность ферментов.
7. Меняется скорость метаболических путей.

В инозитолфосфатной системе передачи сигнала тоже участвует G-белок

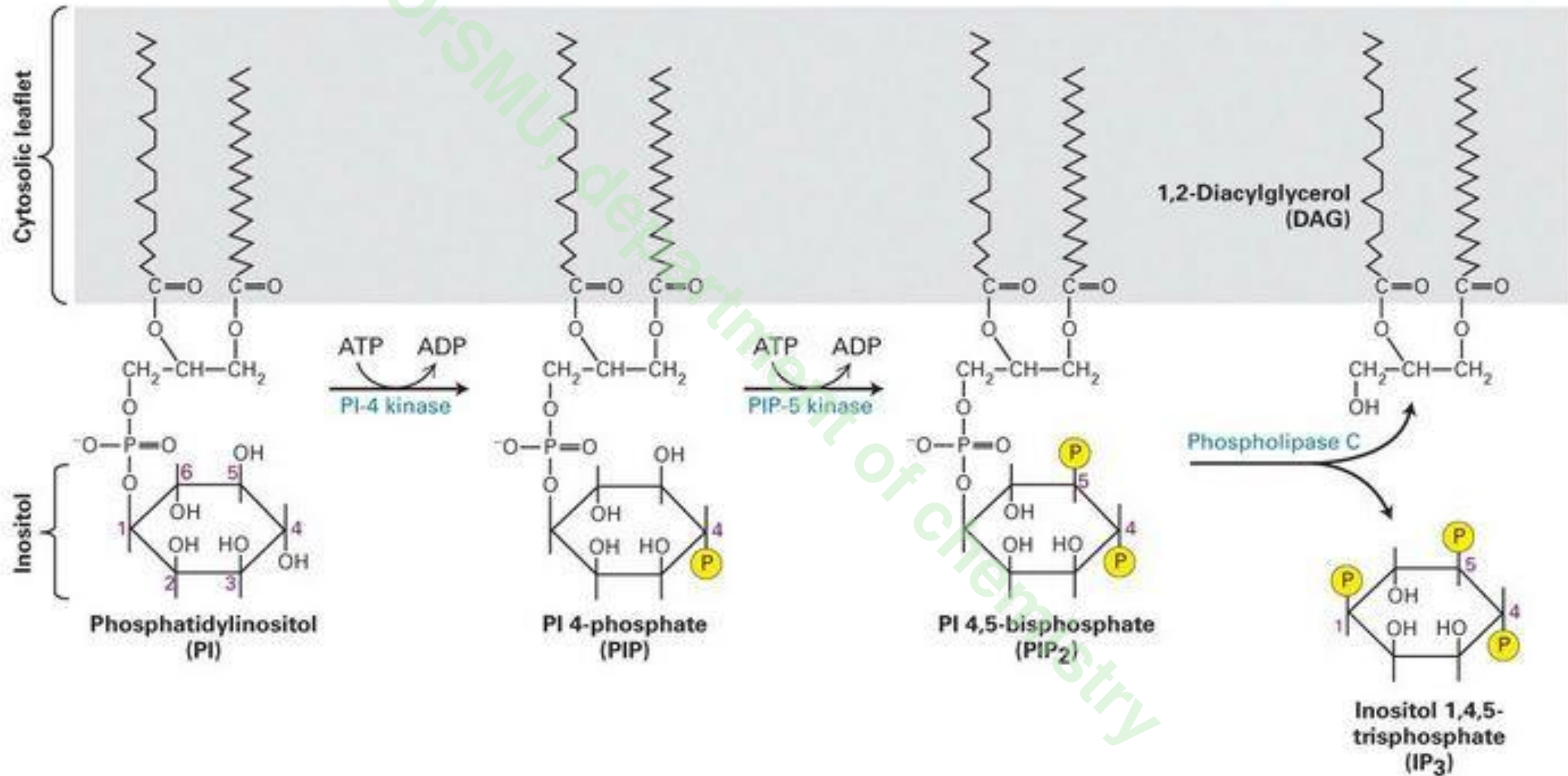
Гормоны, использующие инозитолфосфатную систему:

- Адреналин (через α_1 -адренорецепторы)
- Ангиотензин II
- Вазопрессин (через V_1 -рецепторы)
- Ацетилхолин (через M_1 -рецепторы)
- Гистамин (через H_1 -рецепторы)
- Серотонин
- Тиреолиберин
- Гонадолиберин
- Окситоцин



Вторичный посредник (мессенджер) – инозитолтрифосфат, диацилглицерол, Ca²⁺

Механизм образования ИФ₃ и ДАГ



Основные этапы передачи гормонального сигнала в клетку (с участием инозитолфосфатной системы и ДАГ)

1. Связывание гормона с рецептором — меняется конформация рецептора.
2. Изменение конформации соответствующего G-белка, сопряженного с рецептором.
3. Активация мембранного фермента фосфолипазы C субъединицами G-белка;
4. Образование в цитозоле двух вторичных посредников путем гидролиза ФИФ₂. — ДАГ и ИФ₃ Сигнал раздваивается:

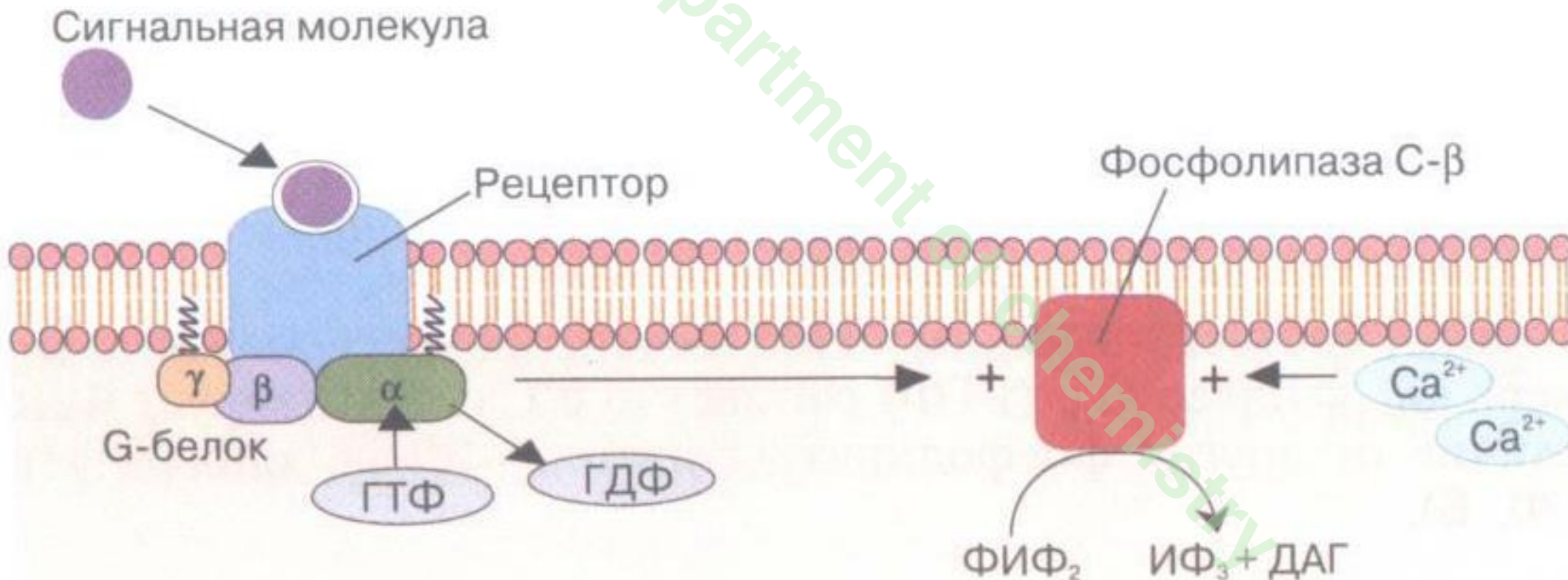
ДАГ активирует в цитозоле **протеинкиназу C**, которая катализирует фосфорилирование регуляторного фермента и меняется активность фермента

ИФ₃ в клетке связывается с Ca^{++} каналами ЭР, каналы открываются, и Ca^{++} поступает в цитозоль, связывается с белком-кальмодулином и этот комплекс активирует Ca^{++} -**кальмодулинзависимую протеинкиназу** которая фосфорилирует ферменты и меняется их активность

ФОСФОЛИПАЗА C: изоформы β и γ

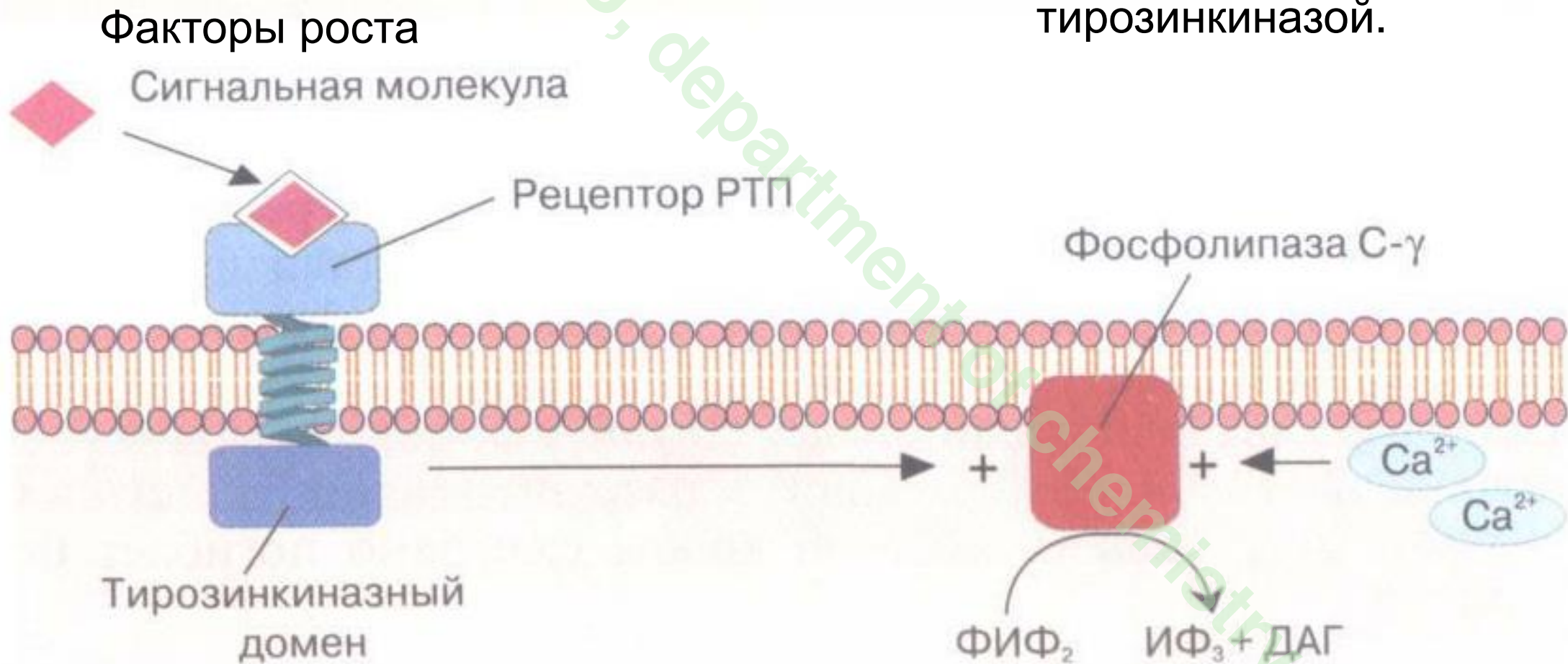
α_1 -адренорецепторы,
мускариновые рецепторы

ФОСФОЛИПАЗА C β активируется через
рецепторы, связанные с G-белками
(G $_q$ белок)



ФОСФОЛИПАЗА С: изоформы β и γ

C_γ активируется благодаря фосфорилированию ее тирозинкиназой.

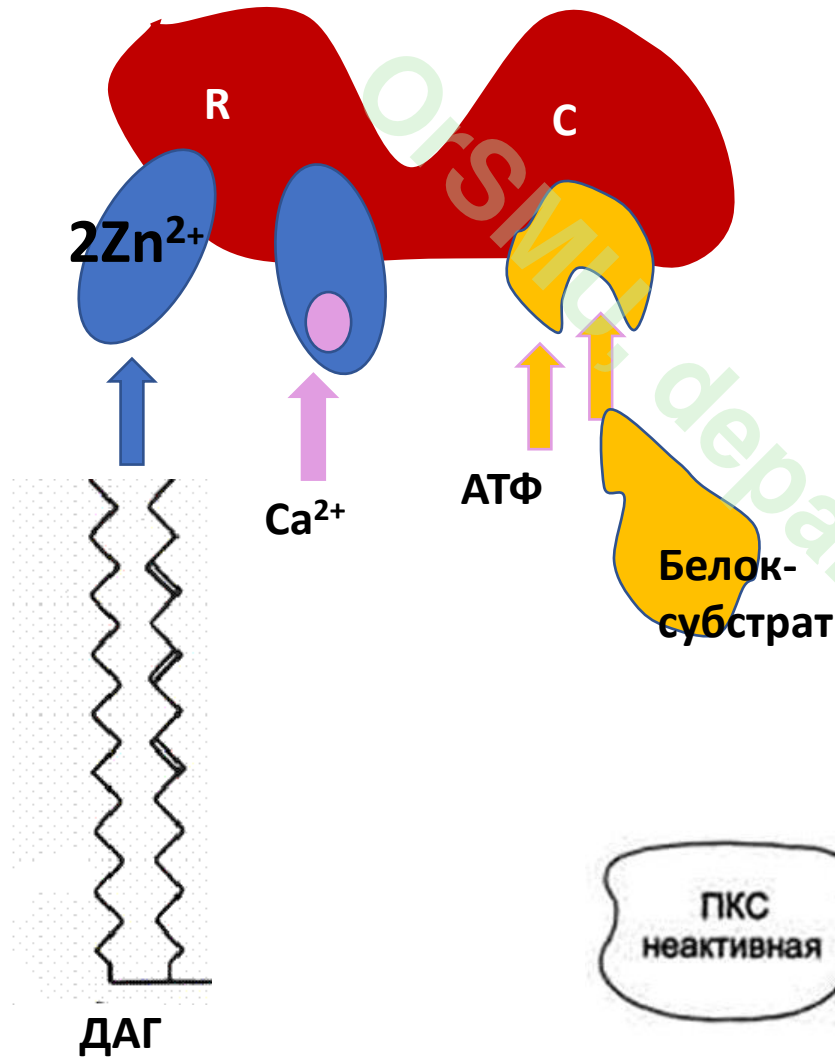


Протеинкиназа С

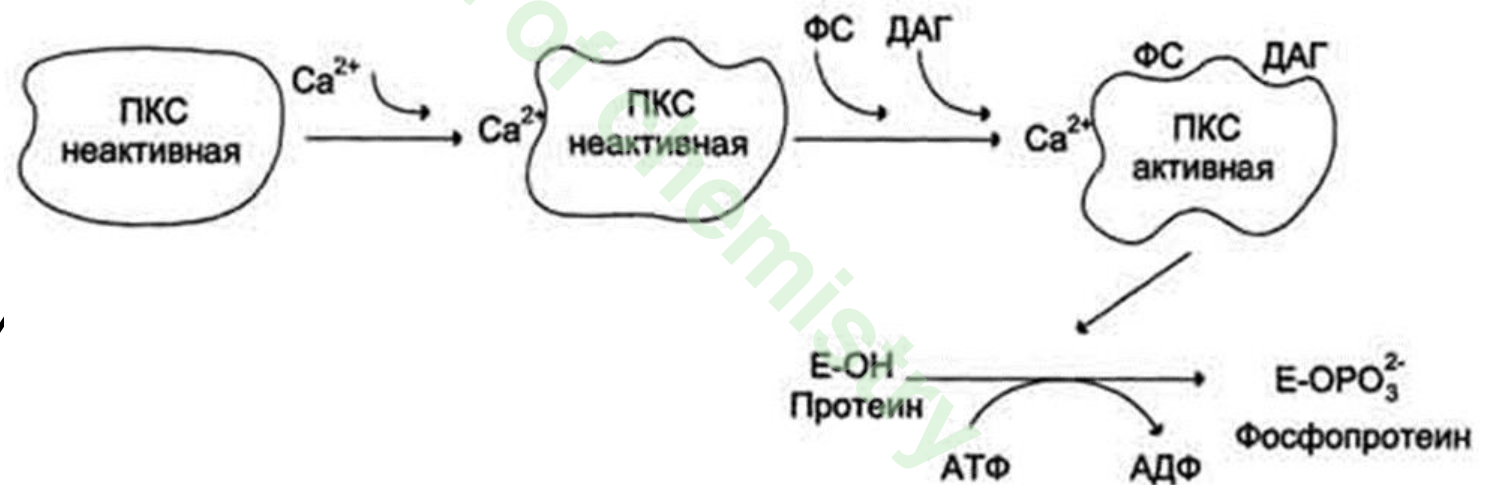
состоит из двух доменов – регуляторного (R) и каталитического (C)

Каталитический домен: центр, связывающий АТФ и белок-субстрат.

Неактивная протеинкиназа С – цитозольная, при активации становится мембраносвязанной



Регуляторный домен: мотив цп пальцы и участок с высоким сродством к Ca^{2+}

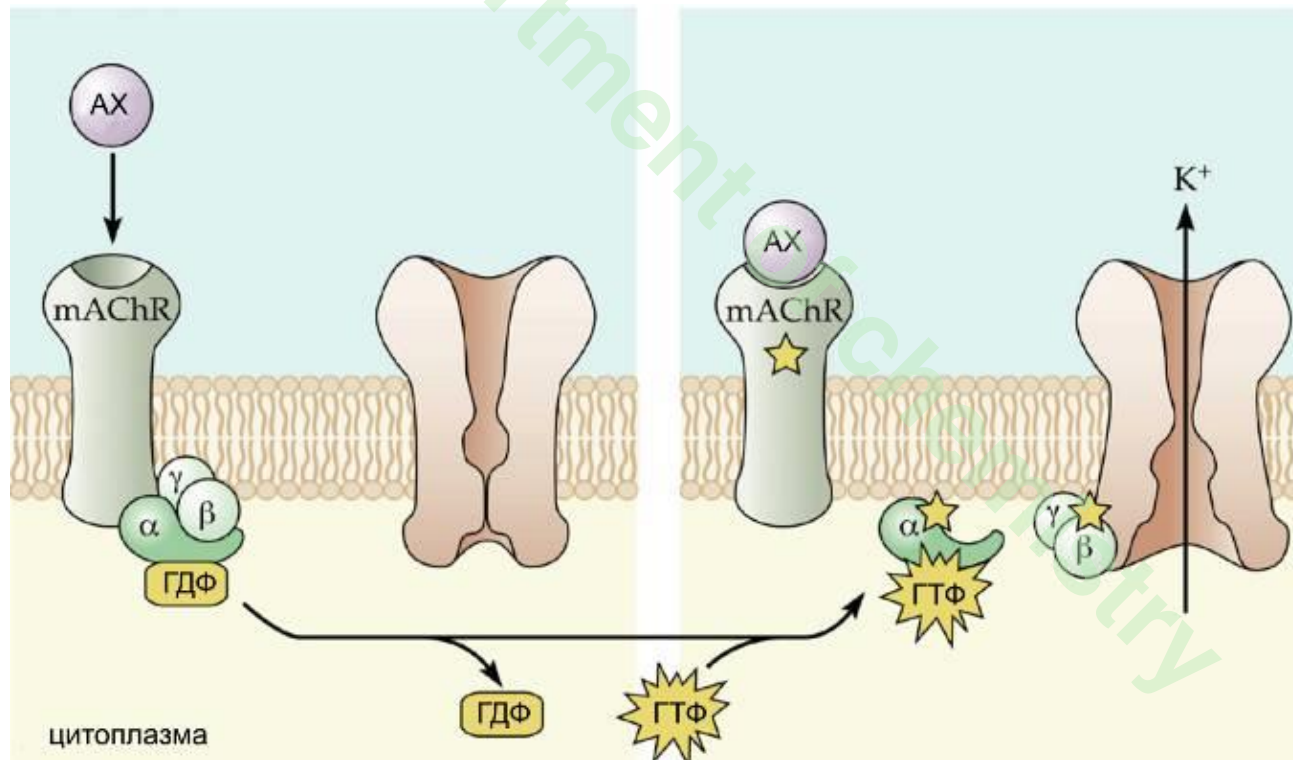


Прямая модуляция активности ионных каналов G-белками

Наряду с активацией ферментных молекул-мишеней G-белки могут также напрямую связываться с ионными каналами.

При активации **мускаринового ацетилхолинового рецептора** в кардиомиоцитах происходит диссоциация G-белка. Димер β/γ напрямую связывается с K^+ -каналом и открывает его, в результате чего выходящий ток катионов вызывает гиперполяризацию клетки.

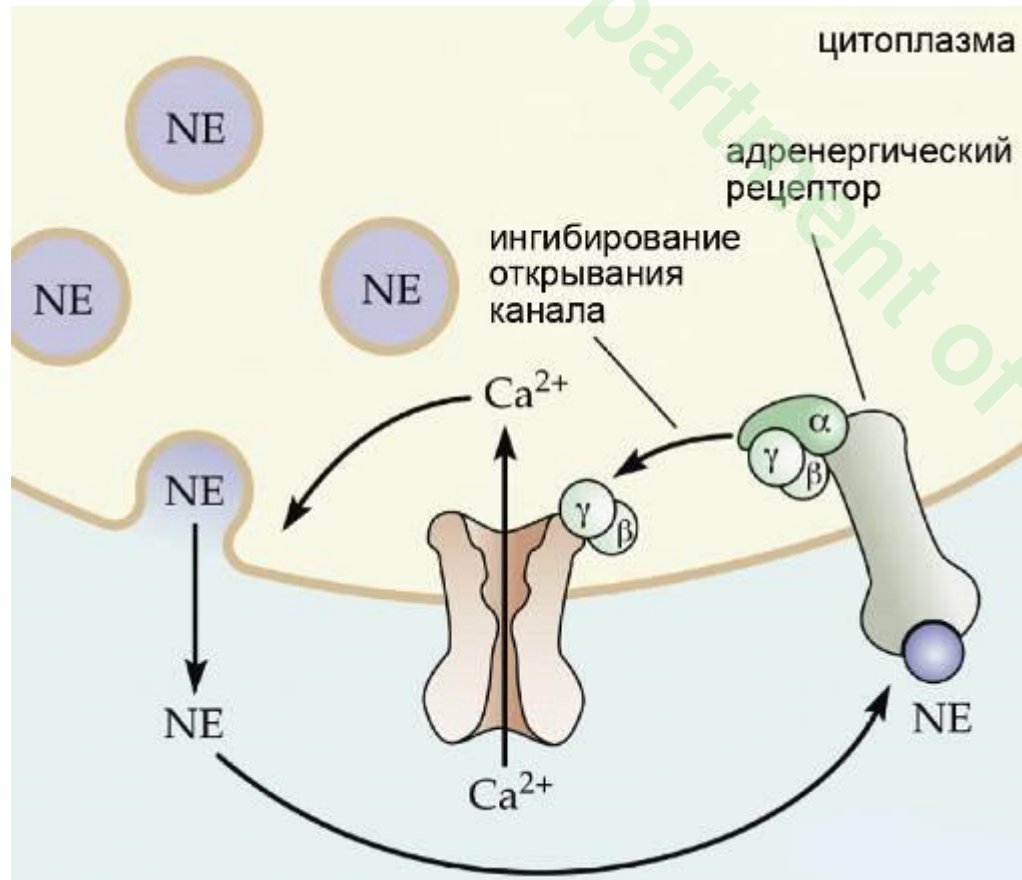
В специальных экспериментах методом *patch clamp* на кардиомиоцитах показано, что при аппликации β/γ с внутренней стороны мембраны происходит открытие K^+ -канала.



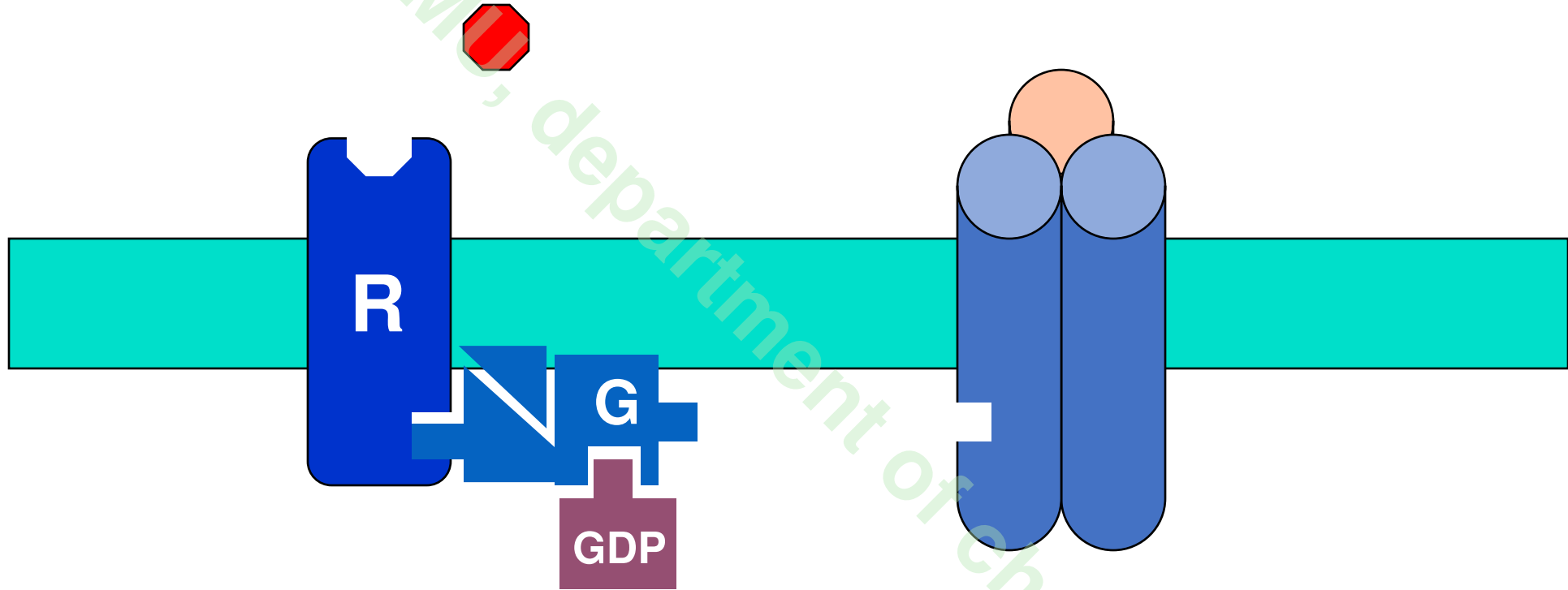
Прямая модуляция активности ионных каналов G-белками

Прямое взаимодействие G-белков и ионных каналов показано в механизме ауторегуляции выделения норадреналина из нейронов симпатического ганглия лягушки. Выделяясь из аксонной терминали, **норадреналин** связывается со специальными пресинаптическими ауторецепторами.

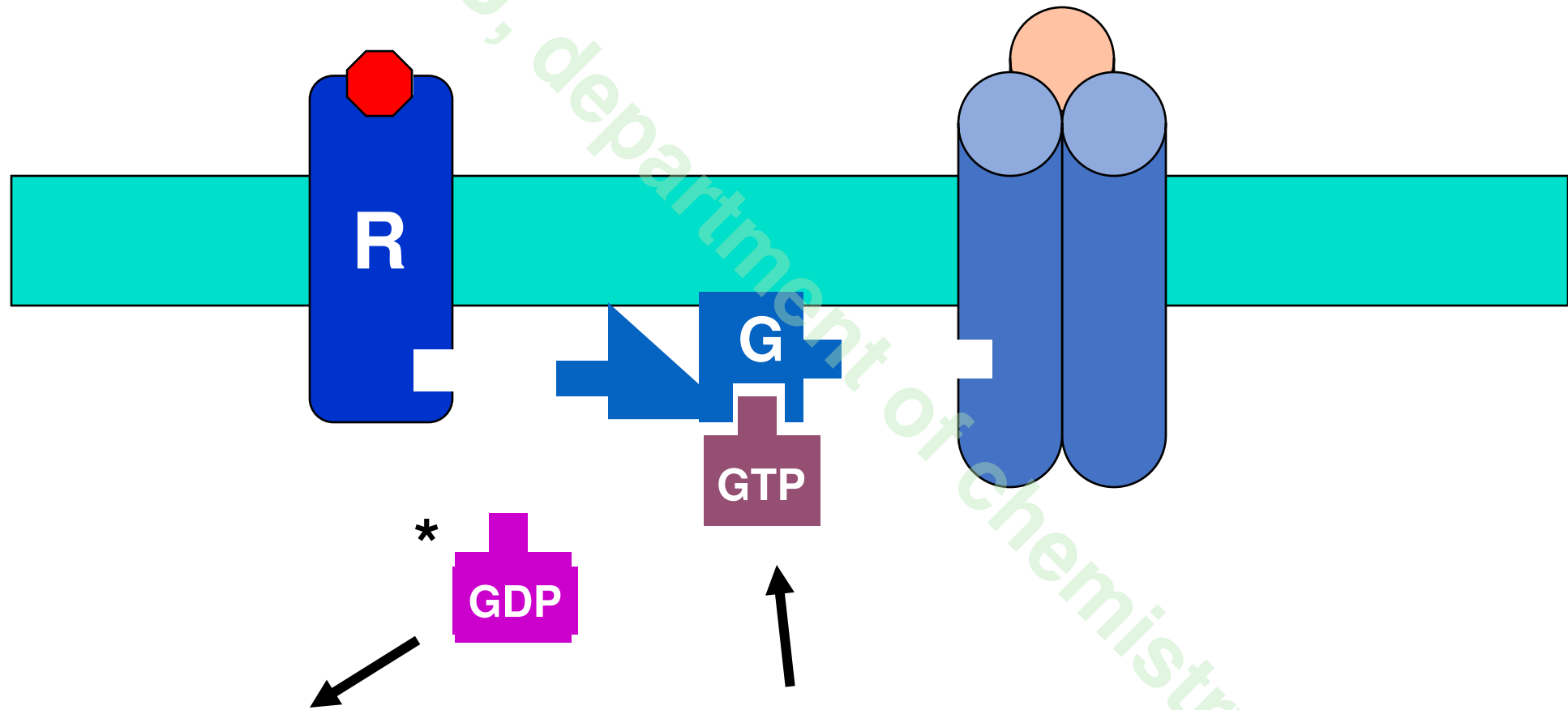
В результате диссоциации G-белка димер β/γ напрямую действует на Ca^{2+} -канал N-типа, снижая вероятность его открытия. Уменьшение Ca^{2+} -тока в пресинаптическую терминаль приводит к уменьшению выделения медиатора.



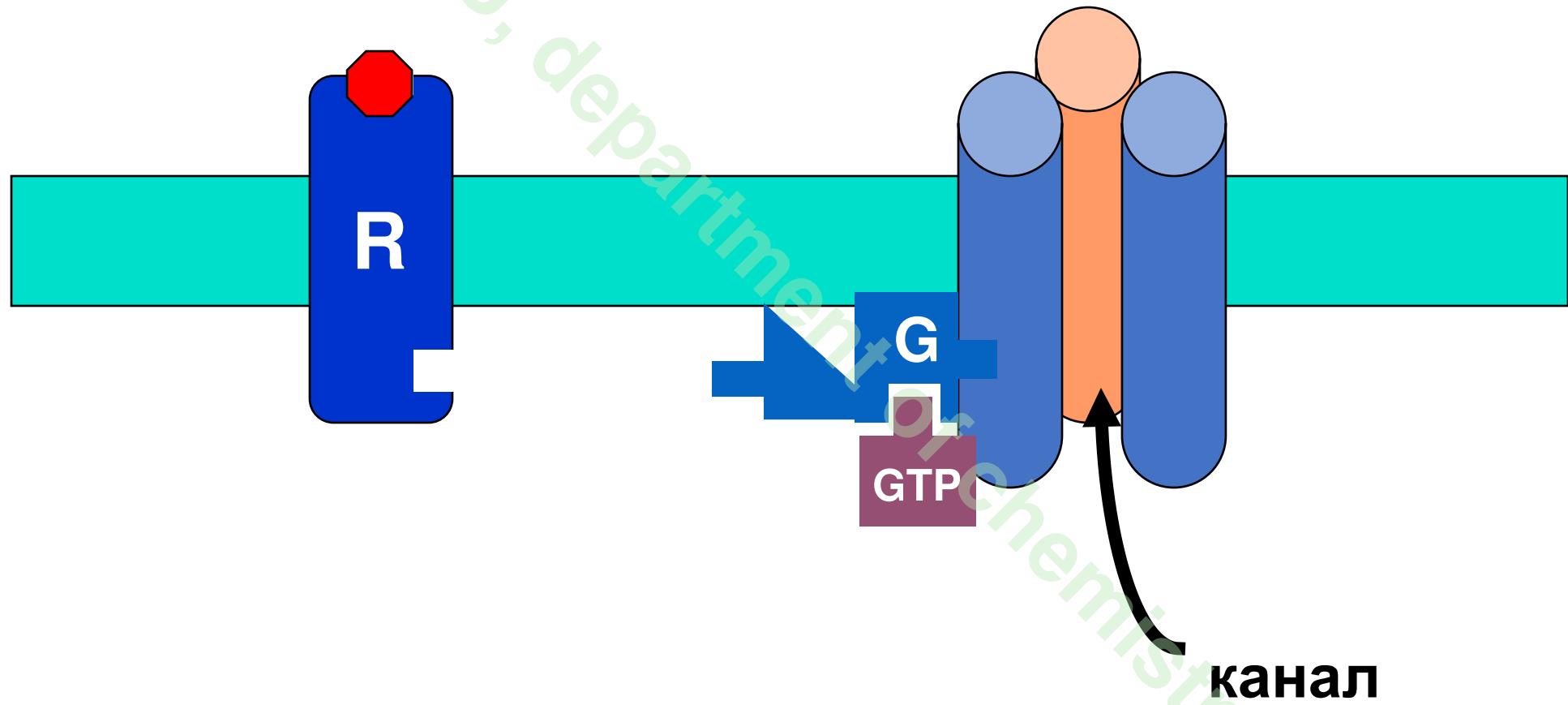
G-белок: может регулировать активность белка непосредственно путем взаимодействия белок-белок...



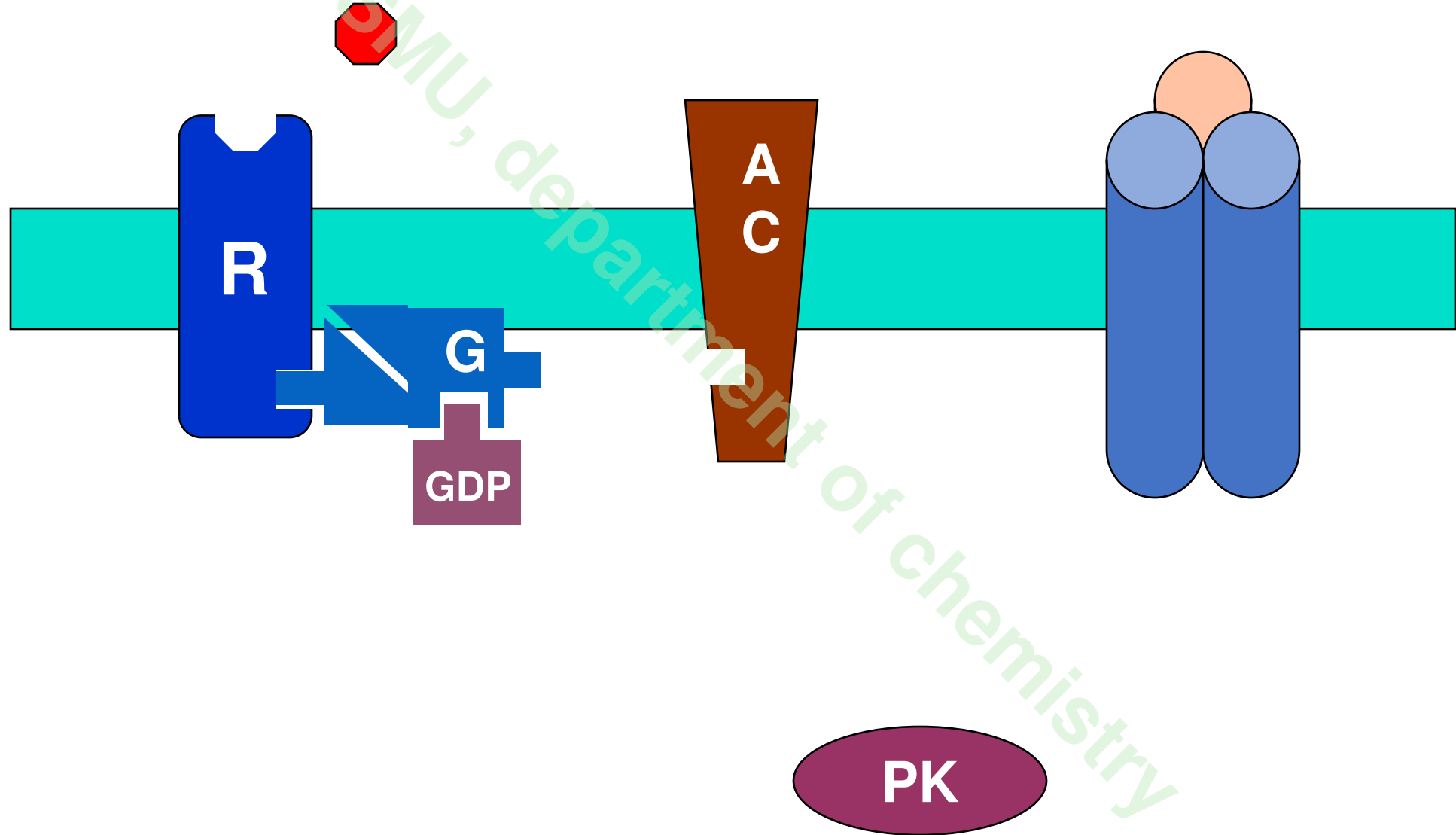
G-белок: может регулировать активность белка непосредственно путем взаимодействия белок-белок...



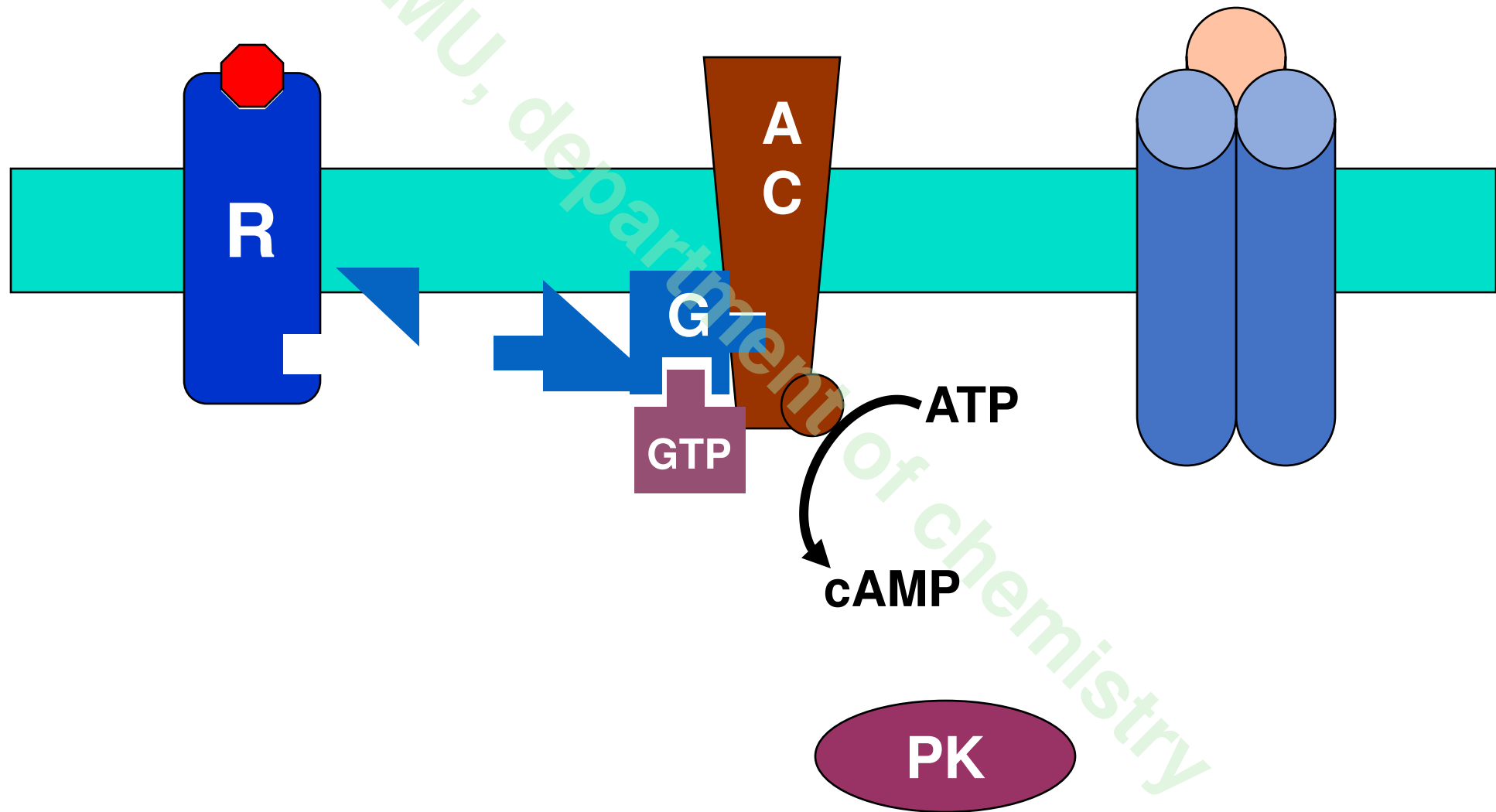
G-белок: может регулировать активность белка непосредственно путем взаимодействия белок-белок...



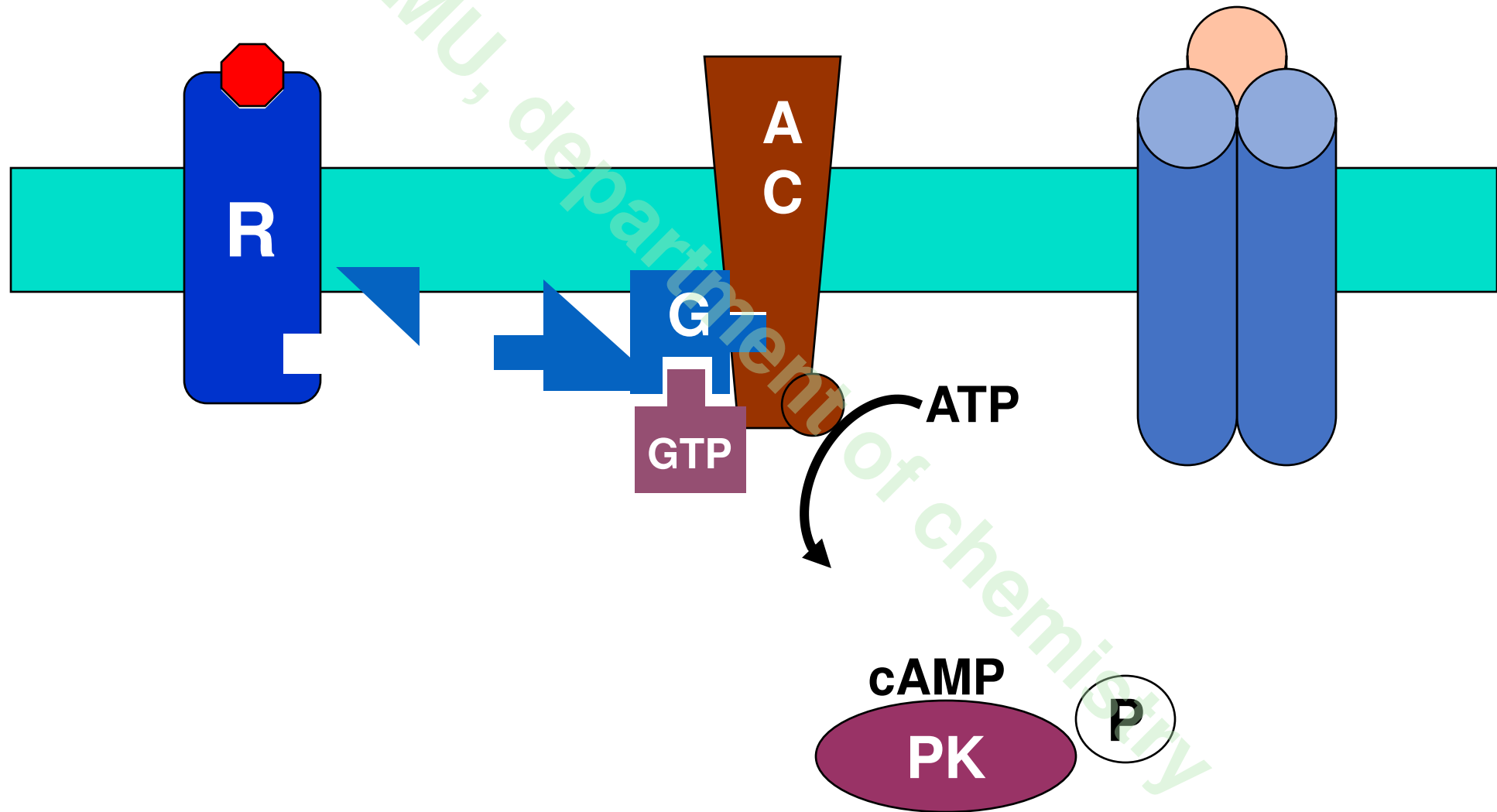
... и путем его фосфорилирования



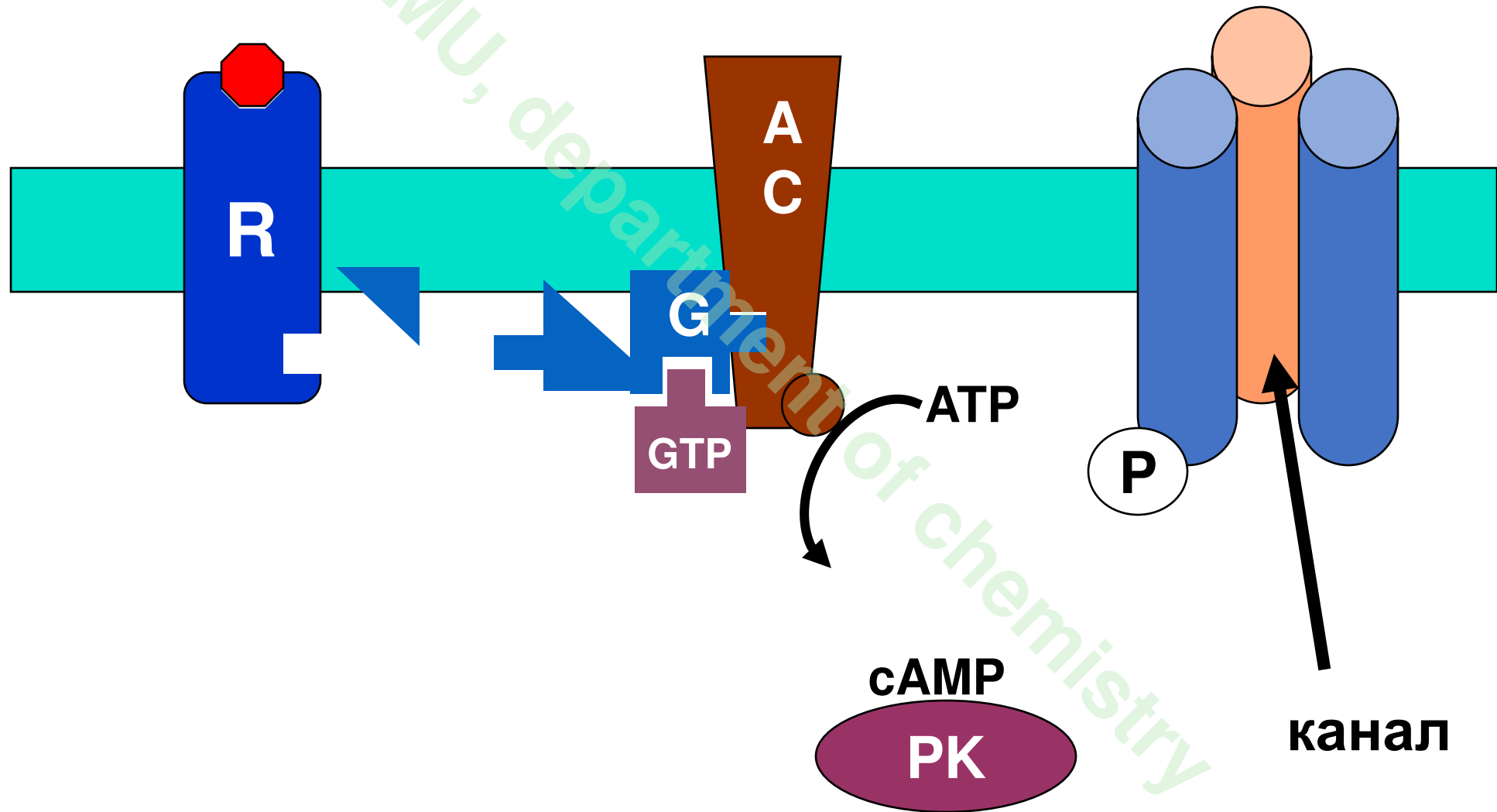
... и путем его фосфорилирования



... и путем его фосфорилирования



... и путем его фосфорилирования



OrSMU, department of chemistry

Спасибо за внимание!