

## Лекція 2 ОСНОВНІ СИГНАЛЬНІ СИСТЕМИ

Сигнали від численних гідрофільних біологічних молекул, які називають первинними месенджерами (білково-пептидні гормони, біологічно активні регуляторні молекули), що не здатні проходити крізь плазматичну мембрану (ПМ), передаються в цитоплазму через низку універсальних каскадів, початком яких стає взаємодія зазначених регуляторів із рецепторами, розташованими на ПМ. Унаслідок такої взаємодії включаються внутрішньоклітинні шляхи передачі інформації. На рівні плазматичної мембрани передача сигналу здійснюється через послідовну зміну конфомації мембранних білків (рецепторного і сполучного) і ферменту. Фермент розміщений біля внутрішнього (цитоплазматичного) боку мембрани і каталізує утворення низькомолекулярного вторинного посередника (месенджера). Останній дифундує в цитозолі, що забезпечує швидке поширення сигналу по всій клітині до конкретних ферментів чи інших білків, які реалізують відповідь клітини на первинний сигнал. Безпосередньою мішенню для вторинних месенджерів є ферменти протеїнкінази, які шляхом фосфорилування активують чи інгібують специфічні клітинні білки.

Основними каскадами клітини є аденілатциклазний і гуанілатциклазний (вони простіші, включають по одному вторинному посереднику) та фосфоінозитидний (є складнішим, потребує кількох посередників). Прикладами другорядних каскадів можуть бути енолсинтазний та олігоаденілатний.

*Аденілатциклазний каскад.* У ролі вторинного посередника в аденілатциклазному каскаді виступає циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ).

Уперше цАМФ був виявлений Е. Сазерлендом у 1957 р., коли він показав на гепатоцитах новонароджених щурів, що ефект норадреналіну чи глюкагону опосередковується дією низькомолекулярної стійкої до нагрівання сполуки. Пізніше, у 1971 р., за значний вклад у розвиток моделі аденілатциклазного каскаду цьому досліднику було присуджено Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини.

До аденілатциклазного комплексу входять:

- білок-рецептор;
- G-білок (Gs або Gi);
- каталітична субодиниця аденілатциклази – ферменту, що здійснює реакцію, у якій утворюється цАМФ:  $ATP \rightarrow 3'5'\text{-цАМФ} + \text{ФФн}$ ;
- власне цАМФ;
- протеїнкіназа А (ПкА).

Підсилення сигналу відбувається за рахунок того, що одна молекула гормону спричиняє активацію сотень G білків (I етап підсилення сигналу). Кожен із них, у свою чергу, буде активувати аденілатциклазу, яка може синтезувати сотні молекул цАМФ (II етап підсилення сигналу). цАМФ активує протеїнкіназу А, яка модифікує сотні молекул-мішеней у клітині (III етап підсилення сигналу).

Рецептори ПМ здатні сполучатися із численними сигнальними молекулами – пептидними й білковими гормонами, катехоламінами, інсуліном, факторами росту, цитокінами тощо. За механізмами передачі сигналу всі поверхневі клітинні рецептори поділяються на три основні групи:

- *іонотропні рецептори*, при зв'язуванні ліганду з якими в молекулі рецептора відкривається іонний канал (рецептори до глутамату, гліцину,  $\gamma$ -аміномасляної кислоти);
- *метаботропні рецептори, або серпентинові, або рецептори, сполучені із G-білком* (G-Protein-Coupled Receptors, GPCRs), які при активації передають сигнал на тримерний G-білок (рецептори до адреналіну, ацетилхоліну, серотоніну тощо);
- *рецептори-ферменти* (наприклад, рецепторна тирозинові протеїнкіназа, рецепторна тирозинова протеїнфосфатаза тощо).

Наслідком активації рецепторів двох перших груп є зміни у цитозольній концентрації вторинних посередників, тоді як рецептори третьої групи ініціюють каскад фосфорилування та виступають карскасом для приєднання й наступної активації інших внутрішньоклітинних білків.

*Рецептори, залучені в ініціацію передачі інформації аденілатциклезним каскадом, не мають ферментативної активності і належать до метаботропних рецепторів, які надалі передають сигнал на G-білки. Вони є інтегральними білками – їхній поліпептидний ланцюг 7 разів перетинає ПМ, тому вони належать до 7-TMS (7 transmembrane  $\alpha$ -helices)-рецепторів.*

Залежно від того, з яким G-білком сполучений рецептор (Gs або Gi), в аденілатциклезному каскаді виділяють два типи рецепторних молекул – ті, що передають активуючий сигнал (Rs) та інгібуючі рецептори (Ri). Гормон із рецептором зв'язується за рахунок нековалентних зв'язків: гідрофобних, вандерваальсових, іонних.

Коли гормон діє на рецептор дуже довго, відбувається ефект "насичення" рецептора гормоном, оскільки кількість місць зв'язування з гормоном на рецепторі обмежена; за цією межею рецептор втрачає свою чутливість. Крім того, рецептори можуть занурюватися у ПМ.

**G-білки**, що передають сигнал з гормональних рецепторів на аденілатциклазу, локалізовані на внутрішньому боці ПМ через міристилювання й ізопренілювання поліпептидних ланцюгів субодиниць і не мають трансмембранних ділянок. Загалом виявлено близько двадцяти різних G-білків, серед найважливіших – Gs і Gi, які, відповідно, стимулюють й інгібують аденілатциклазу; Gq, що активує фосфоліпазу C; G-білки сенсорних клітин: фоторецепторних – Gt (трансдуцин), нюхових – Golf і смакових – Gg.

Отже, з аденілатциклазою взаємодіють G-білки двох видів: Gs (*активатор аденілатциклази*) та Gi (*інгібітор аденілатциклази*). Обидва білки є гетеротримерами, тобто мають  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -субодиниці (45–47 кД; 35 кД та 7–9 кД відповідно) і відрізняються будовою  $\alpha$ -субодиниці ( $\alpha_s$  та  $\alpha_i$ ).

$\alpha$ -Субодиниці мають центри зв'язування ГТФ і ГДФ та здатні гідролізувати зв'язаний ГТФ до ГДФ і неорганічного фосфату (Фн), тобто володіють ГТФазною активністю.  $\beta$ -,  $\gamma$ -субодиниці забезпечують локалізацію, ефективно зв'язування й деактивацію  $\alpha$ -субодиниць, регулюють спорідненість рецепторів до їхніх лігандів, знижують здатність ГДФ до дисоціації від  $\alpha$ -

субодиниці, стабілізуючи інактивований стан. Зокрема,  $\gamma$ -субодиниця містить ковалентно приєднаний ліпідний якір, яким G-білок сполучається із внутрішнім моношаром ПМ. Виділити й очистити окремі G-білки та їхні субодиниці складно, так само, як і дослідити їхні функції.

До включення системи G-білок є тримером, містить зв'язаний з  $\alpha$ -субодиницею ГДФ і не взаємодіє з аденілатциклазою. Приєднання гормону викликає конформаційні зміни рецептора і G-білка. При цьому  $\alpha$ -субодиниця останнього швидко зв'язує ГТФ замість ГДФ, дисоціює від  $G\beta\gamma$  і сполучається з певними ділянками аденілатциклази, змінюючи її активність (гальмуючи у випадку  $G_i$  або активуючи у випадку  $G_s$ ).

Одночасно стимулюється ГТФазна активність G-білка, і після переходу ГТФ у ГДФ фермент дезактивується. За дії на клітини-мішені соматостатину, ангіотензину II, нейрогормонів енкефалінів і ендорфінів, а також при зв'язуванні катехоламінів з  $\alpha_2$ -адренорецепторами сигнал від рецептора передається на  $G_i$ -білок, що зумовлює гальмування активності аденілатциклази, зниження рівня цАМФ у клітині та активності відповідних протеїнкіназ. При зв'язуванні з  $\beta$ -адренорецепторами сигнал передається на  $G_s$ -білок і аденілатциклаза активується. Димер  $G\beta\gamma$  при цьому також виступає чинником, здатним активувати або інгібувати ряд інших білків.

Холерний токсин шляхом АДФ-рибозилування  $\alpha$ -субодиниці  $G_s$ -білка пригнічує її ГТФазну активність і переводить G-білок у постійно активний стан, що сприяє постійній активації аденілатциклази та втраті чутливості до гормональних сигналів.

Екзотоксин коклюшу рибозилує  $\alpha$ -субодиницю  $G_i$ -білка, чим блокує взаємодію G-білка з рецептором і передачу гальмівних сигналів від гормональних рецепторів на аденілатциклазу, унаслідок чого при активації рецептора аденілатциклаза не інгібується і залишається постійно активною.

Окрім тримерних G-білків, існує велика *родина малих ГТФ-зв'язувальних білків* (наприклад, Ras). Це одноланцюгові мономери (у випадку Ras – мономер 21 кД), за структурою і функціями подібні до  $G\alpha$ -субодиниці тримерів, що

сполучені з ПМ клітин за допомогою ліпідних ділянок, створених посттрансляційно на С-кінці. Вони не беруть участі в наведених вище каскадах, діючи за іншими механізмами і, зокрема, залучені у передачу сигналу не від 7-TMS-рецепторів, а від рецепторів із тирозинпротеїнкіназною активністю, що належать до *1-TMS-рецепторів* (*1 transmembrane  $\alpha$ -helices*, тобто їхній поліпептидний ланцюг один раз перетинає ПМ) (підпідрозд. 3.1.1). Усі члени родини малих ГТФ-зв'язувальних білків – а їх відомо понад 70 – мають певну гомологічну послідовність і поділяються на підродини – Ras, Rho, Rab, Ran і Arf, у межах кожної із яких спостерігається більш сильна гомологія.

Як і звичайні G-білки, протеїни-члени цієї родини мають здатність зв'язувати гуанінові нуклеотиди (ГТФ і ГДФ) і володіють ГТФазною активністю. Наприклад, нормальний клітинний Ras-білок функціонує подібно до інших G-білків, описаних вище, тобто активує метаболічні процеси, коли він сполучений із ГТФ, і стає неактивним, коли ГТФ гідролізується до ГДФ. Неонкогенні форми G-білка Ras (с-Ras) є в усіх клітинах і локалізовані у внутрішньому моношарі ПМ. Вони регулюють клітинний ріст і диференціювання, залучаються у стимуляцію факторами росту клітинних поділів. Ras активує протеїнкінази Raf і фосфатидилінозитол-3-кінази. Raf, у свою чергу, є першим членом каскаду кіназ, що спричиняє активацію ERK і насамкінець – модуляцію функцій транскрипційних факторів, які, зв'язуючись із ДНК, регулюють експресію низки генів.

ГТФазна активність нормального Ras є дуже низькою ( $K = 5 \times 10^{-4}/\text{с}$ ), що характерно для G-білків, які регулюють тривалі ефекти, скажімо, ріст і диференціювання. Посилення ГТФазної активності малих ГТФ-зв'язувальних білків веде до трансформації клітин: мутантні (онкогенні) Ras-білки мають значно підвищену ГТФазну активність, що спричиняє серйозні зміни в рості клітин і в метаболізмі пухлинних клітин. Більшість малих ГТФ-зв'язувальних білків (а в ряді випадків і тримерні G-білки) для своєї роботи потребують допоміжних білків – GAPs (*GTPase Activating Proteins*, білки-активатори ГТФаз), які стимулюють гідроліз ГТФ, та GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange*

*Factors, фактори обміну гуанінових нуклеотидів*), які індукують ГДФ/ГТФ обмін. Наприклад, взаємодія білка Ras із GAP сприяє багатократному зростанню його ГТФазної активності (на 5 порядків); механізм такого ефекту полягає в утворенні тимчасового стехіометричного комплексу {GAP-Ras}. Активація тримерного Gs-білка передбачає обмін сполученого із  $\alpha$ -субодиницею ГДФ на ГТФ, після чого тример дисоціює. Такий обмін полегшується білком GEF, специфічним до Gs. У свою чергу, ГТФазна активність, притаманна  $\alpha$ -субодиниці, відносно повільно гідролізує зв'язаний ГТФ до ГДФ – у підвищення інтенсивності такого гідролізу може залучатися специфічний до Gs білок GAP.

Аденілатциклаза здійснює реакцію, у якій утворюється цАМФ і є інтегральним білком ПМ, чутливим до змін температури й ліпідного оточення.

Сьогодні відомо десять ізоформ аденілатциклази (АС-1–АС-10), які різняться за механізмами регуляції та тканинною локалізацією. Усі вони є інтегральними білками, що мають 60 % гомології (50–90 % у цитозольній ділянці).

Поліпептидний ланцюг аденілатциклази має 12 гідрофобних трансмембранних доменів із 20–22 амінокислотних залишків; ці домени поєднані у дві групи (по шість у кожній) – M1 і M2. Так утворюється структура, подібна до каналу, але яка не проявляє жодної каналної активності. Інші домени, присутні в молекулі – C1a, C1b, C2a, C2b. C1a і C2b – разом складають каталітичну субодиницю і утворюють місця для зв'язування АТФ і  $\alpha$ -субодиниці G-білка. Зокрема, Lys-923 й Asp-1000 із C2-домену взаємодіють із N1 й N6 аденінового кільця АТФ, а Gln-417 із C1-домену бере участь в орієнтації Lys-923. Для реакції утворення цАМФ необхідні іони  $Mg^{2+}$  і  $Mn^{2+}$ .  $Mg^{2+}$ -зв'язувальна ділянка містить два залишки Asp.

Оскільки аденілатциклаза розташована на цитоплазматичному боці мембрани, цАМФ вивільнюється у цитоплазму (усі попередні етапи каскаду здійснювалися в ПМ).

Нині виявлено кілька систем, які регулюються внутрішньоклітинним вмістом цАМФ. Основною із них є *серин/треонінова протеїнкіназа А* (ПкА), виявлена Кребсом у 1968 р., що регулює фосфорилування, а отже, і активність ряду білків, у тому числі й ферментів.

Молекула ПкА складається із двох каталітичних субодиниць (С) і двох регуляторних (R), тобто комплекс  $\{C_2R_2\}$  є неактивним.

Залежно від особливостей структури регуляторних субодиниць виділяють дві ізоформи ферменту – ПкАІ та ПкАІІ.

Кожна субодиниця R містить псевдосубстратну послідовність, що є подібною до сайту фосфорилування у білкахмішенях, але, на відміну від нього, замість залишків серину або треоніну містить аланін, а отже, не має гідроксильної групи, яка може бути фосфорильована. Цією ділянкою регуляторна субодиниця сполучається з активним центром субодиниці С і виступає її інгібітором.

При зв'язуванні чотирьох молекул цАМФ зі специфічними ділянками двох субодиниць R у останніх відбуваються конформаційні зміни, унаслідок яких комплекс  $\{C_2R_2\}$  розпадається на дві вільні субодиниці С, які мають каталітичну активність, і комплекси  $\{2R-4\text{цАМФ}\}$ .

Активна ПкА може фосфорилувати за залишками серину і треоніну ряд важливих ферментів у різноманітних клітинах мішенях (наприклад, каскад, який відбувається під впливом адреналіну: неактивна кіназа фосфорилази під впливом ПкА перетворюється на активний фермент; активна кіназа фосфорилази каталізує перехід неактивної фосфорилази *b* в активну форму – фосфорилазу *a*, яка залучається у розщеплення глікогену). Фосфорилуванню також підлягають гістони, протаміни, глікогенсинтаза тощо.

У таких каскадних реакціях початковий сигнал зазнає багатократного підсилення.

Іншими ефекторами циклічного АМФ є:

- *білки-обмінники, що активуються цАМФ* (*exchange proteins activated by cyclic AMP, EPACs*), що, як і інші GEFs (див. вище), сприяють обміну ГДФ на

ГТФ і беруть участь у стимуляції малих G-білків Rap1 і Rap2B із підродини Ras-білків. Останні, діючи через протеїнкінази, що активуються мітогенами регулюють транскрипцію низки генів.

- *іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами (cyclic nucleotide-gated channels, CNGCs)*, які є неселективними катіонними каналами, проникними для  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ , містяться у мембранах різних клітин та залучаються в  $Ca^{2+}$ - залежні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи та регуляцію мембранного потенціалу. Ідентифіковано дві структурно подібні родини каналів, які регулюються циклічними нуклеотидами:

- власне іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами (*cyclic nucleotide-gated channels*) – залучаються у передачу зорових сигналів;

- іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами й активуються гіперполяризацією (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) – присутні у провідній системі серця й залучені в контроль серцевої діяльності.

У своїй структурі молекули CNGCs мають шість трансмембранних сегментів (S1–S6); сегмент S4 є сенсором напруги (тому за будовою CNGCs відносять до потенціал залежних іонних каналів), а ділянка між сегментами S5 і S6 залучається в процес утворення пори.

*Повернення системи у вихідний, неактивований стан* відбувається при зниженні вмісту в крові гормону, який викликав індукцію аденілатциклазної системи, наприклад адреналіну. Його рецептори стають незайнятими, аденілатциклаза повертається в неактивний стан і утворення цАМФ припиняється.

*На рівні рецепторів* зупинка каскаду досягається, по-перше, шляхом дисоціації первинного сигналу із комплексу з рецептором; по-друге, завдяки фосфорилуванню рецептора специфічними серин/треоніновими протеїнкіназами, сполученими з метаботропними рецепторами (G-coupled receptor kinases, GRKs), скажімо, кіназою BARK ( $\square\square$  *adrenergic receptor kinase*, кіназа  $\beta$ -адренергічного рецептора). Утворені фосфорильовані залишки надалі



стають докерним сайтом для білка  $\beta$ -арестину, приєднання якого приводить до інактивації рецептора та зниження його чутливості. У деяких випадках зв'язування арестину стає сигналом для клатринзалежного ендоцитозу (інтерналізації) рецептора.

**Інозитолфосфатна система передачі гормонального сигналу (фосфоінозитидний шлях).** Реалізація цього каскаду пов'язана з комбінацією трьох вторинних месенджерів – інозитол-1,4,5-трифосфату (I-1,4,5-P<sub>3</sub>), діацилгліцеролу (ДАГ) та іонів Ca<sup>2+</sup> (рис. 2.11). Цим шляхом реалізується дія катехоламінів (при зв'язуванні їх з  $\alpha$ 1-адренорецепторами), тіреоліберину, гонадоліберину, вазопресину, ангіотензину II, гастрину, холецистокініну, брадикініну та ін.

Для фосфоінозитидного каскаду, на відміну від аденілатциклазного, характерні тільки активуючі, універсальні рецептори без ферментативної активності, які завжди пов'язані зі специфічним G-білком лише одного типу, що передає активуючий сигнал на фосфоліпазу C (Gq).

**Фосфоліпаза C (PLC)** каталізує реакцію гідролізу мінорного структурного мембранного фосфоліпиду фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату (PI-4,5-P<sub>2</sub>). У цій реакції утворюються два із трьох вторинних месенджерів даного каскаду – інозитол-1,4,5-трифосфат і діацилгліцерол.

Відомо 13 ізоферментів фосфоліпази C, які поділяють на шість класів: PLC- $\delta$  (1,3 та 4), - $\beta$  (1–4), - $\gamma$  (1,2), - $\epsilon$ , - $\zeta$ , а нещодавно виявлено клас - $\eta$  (1,2). Найбільш дослідженими із них є PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$  та PLC- $\delta$ . Усі ізоформи фосфоліпази C містять кальційзв'язувальну ділянку і тому є Ca<sup>2+</sup>-залежними. Ізофермент, який раніше позначали як PLC- $\alpha$ , імовірно, є продуктом протеолітичного розщеплення PLC- $\delta$ .

У всіх PLC каталітичний домен розділений на дві частини – X та Y. Домени X та Y є високогомологічними й обидва необхідні для активації PLC. PLC- $\delta$  має найпростішу архітектуру і складається лише з доменів PH, C2 та кальційзв'язувального домену (EF-hand), які присутні і в інших ізоформах цього

ферменту. Довгий С-кінець (близько 500 амінокислот) PLC- $\beta$  зв'язує її з мембраною для регуляції  $\alpha$ -субодиницею G-білк.

У PLC- $\gamma$  X і Y-компоненти розділені великою послідовністю (понад 500 амінокислот), що включає два домени SH2 і SH3-домен. Вони визначають взаємодію PLC- $\gamma$  із фосфорильованими рецепторними тирозиновими протеїнкіназами та іншими сигнальними молекулами.

PLC- $\delta$  є найменшою із PLC, вона присутня у дріжджах, амебі *Dictyostelium discoideum* та квіткових рослинах. Перші два класи фосфоліпази С активуються при стимуляції рецепторів на ПМ (PLC- $\beta$  – за участю G-білка (Gq), що вказує на її причетність до фосфоінозитидного шляху, PLC- $\gamma$  – шляхом фосфорилування рецепторною тирозиною протеїнкіназою): зв'язування, наприклад, рецептора фактора росту з лігандом спричиняє димеризацію рецептора й аутофосфорилування залишків Тур на цитоплазматичному домені рецептора, які створюють "посадочні" місця для PLC- $\gamma$  (її SH2-домени впізнають фосфотирозин), і таким чином закріплюють фосфоліпазу поблизу її субстрату, вбудованого в ПМ. PLC- $\delta$  активується високими рівнями внутрішньоклітинного кальцію, які генеруються, зокрема, під час реалізації сигнальних шляхів фосфоліпаз інших класів.

*Водорозчинний інозитол-1,4,5-фосфат* дифундує в цитозоль, зв'язується з відповідними рецепторами мембрани ЕПР (депо  $\text{Ca}^{2+}$ ) і зумовлює вихід іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (рецептор для I-1,4,5-Р3 є лігандозалежним  $\text{Ca}^{2+}$ -вивільнювальним каналом – I-1,4,5-Р3 сполучається із цитозольним доменом рецептора і спричиняє відкриття каналу). У результаті в цитоплазмі швидко зростає рівень  $\text{Ca}^{2+}$  (спокій –  $10^{-7}$  моль/л).  $\text{Ca}^{2+}$ , зв'язуючись зі специфічним внутрішньоклітинним білком *кальмодуліном*, активує  $\text{Ca}^{2+}$ , *кальмодулінзалежну протеїнкіназу* ( $\text{Ca}^{2+}$ /КМ-залежна Пк).

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  можуть виступати в ролі месенджера й без активації фосфоінозитидної системи – коли їхня концентрація в цитоплазмі зростає внаслідок надходження ззовні через  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ПМ, які відкриваються під

впливом певних регуляторних молекул або при зміні трансмембранного потенціалу.

Цитозольний домен рецептора до I-1,4,5-P<sub>3</sub>, окрім I-1,4,5-P<sub>3</sub>-зв'язувальної ділянки, має кальційзв'язувальний сайт, приєднання до якого іонів Ca<sup>2+</sup> теж може спричинити відкриття каналу. Однак, це справедливо лише, якщо вміст цих іонів відносно низький: висока концентрація Ca<sup>2+</sup> у цитоплазмі, що спостерігається після відкриття каналів, спричиняє закриття каналів. Подібна здатність стимулюватися низькою концентрацією Ca<sup>2+</sup> у ЦП та інгібуватися високою також характерна для структур, близьких за будовою та функціями до I-1,4,5-P<sub>3</sub>-залежних кальцієвих каналів, а саме для *ріанодинових кальцієвих каналів* (або *ріанодинових рецепторів*), що містяться в мембранах саркоплазматичного ретикулума (СР), відповідають за вихід кальцію із цих органел і активуються *циклічною АДФ-рибозою* – цАДФР (*cyclic ADP-ribose, cADPR*) – найпотужнішим із відомих Ca<sup>2+</sup>-вивільнювальних агентів. Таке зворотне інгібування вивільнення Ca<sup>2+</sup> високою концентрацією цитозольного Ca<sup>2+</sup> разом з активністю Ca<sup>2+</sup>-АТФази є контрибутом "вимкнення" сигналу.

Загальною і функціонально найважливішою ділянкою цих рецепторів є Ca<sup>2+</sup>-зв'язувальний сайт, що забезпечує Ca<sup>2+</sup>-індуковану активацію та інгібування рецепторів. Як уже зазначалося, рецептори до I-1,4,5-P<sub>3</sub> активуються низькими концентраціями Ca<sup>2+</sup> і пригнічуються високими, причому зв'язування специфічного активатора збільшує чутливість до Ca<sup>2+</sup>.

Вивільнення Ca<sup>2+</sup> через рецептор до I-1,4,5-P<sub>3</sub> є двохетапним процесом. Сполучення вторинного посередника з лігандзв'язувальними ділянками рецептора веде до вивільнення Ca<sup>2+</sup> із ЕПР. Вивільнений Ca<sup>2+</sup> теж зв'язується з молекулою рецептора до I-1,4,5-P<sub>3</sub>, спричиняючи його конформаційні зміни, що індукують відкриття додаткових Ca<sup>2+</sup>-каналів ПМ, оскільки ПМ і мембрана ЕПР є просторово поєднаними – так зване *Ca<sup>2+</sup>-індуковане вивільнення Ca<sup>2+</sup>*.

Цей вплив конформаційних змін між рецептором на одній мембрані та Ca<sup>2+</sup>-каналом на іншій подібний до функціонування ріанодинових рецепторів у СР.

У 1985 р. було виявлено, що рослинний алкалоїд *ріанодин* із кори *Ryania speciosa* у концентрації  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  ефективно блокує вихід іонів  $Ca^{2+}$  із СР, міцно зв'язуючись з невідомими білками ретикулума, які пізніше – через два роки – виділили й назвали *ріанодиновими рецепторами* (*ryanodine receptors, RYRs*). Тепер встановлено, що RYRs є важливими компонентами кальцієвих сигнальних шляхів [Fill M.].

Ці рецептори також є лігандозалежними  $Ca^{2+}$ -каналами. Їхня структура є високогомологічною рецепторам до I-1,4,5-P<sub>3</sub>, а саме: ріанодинові рецептори є гомотетрамерами (М.м. субодиниці 560 кД), мають форму цвітної капусти (висота 18 нм) і подібну будову в С-кінцевій ділянці. Цитозольна частина молекули має місця для зв'язування цАДФ-рибози,  $Ca^{2+}$ , АТФ, а також висококонсервативні залишки для серин/треонінового фосфорилування.  $Ca^{2+}$ -зв'язувальна ділянка ріанодинового рецептора зумовлює можливість його регуляції внутрішньоклітинними рівнями цього катіона. При цьому I-1,4,5-P<sub>3</sub>-рецептор чутливий до зміни вмісту  $Ca^{2+}$  у ділянці наномолярних концентрацій  $Ca^{2+}$ , а RYRs – у більш широкому діапазоні (активується при мікромольних концентраціях, інгібується – при мілімолярних).

Нині відомо три основні ізоформи ріанодинового рецептора:

- RYR1 є ізоформою скелетних м'язів;
- RYR2 характерна для серцевого м'яза, але також присутня у деяких нервових клітинах;
- RYR3 міститься у мозку, серцевому м'язі й незбудливих тканинах (наприклад, у клітинах підшлункової залози). RYR1 і RYR2 мають 60 % гомології.

Скорочення скелетних і серцевих м'язів активується, коли  $Ca^{2+}$  вивільнюється із СР у цитозоль через ріанодинові рецептори.

При *стимуляції м'язових волокон скелетного м'яза* в ділянках нервово-м'язового синапсу із пресинаптичних нервових закінчень вивільнюється медіатор ацетилхолін, який сполучається із нікотиновими холінорецепторами, розташованими на ПМ постсинаптичної м'язової клітини в ділянці синапсу, які

одночасно є лігандозалежними  $\text{Na}^+$ -каналами, що відкриваються при зв'язуванні ацетилхоліну. При цьому в цитозоль входять іони  $\text{Na}^+$  (за градієнтом концентрації та градієнтом заряду), і потенціал на ПМ змінюється від  $-80$  мВ до  $+40$  мВ, тобто відбувається *деполяризація мембрани*. Деполяризація ПМ спричиняє конформаційні зміни *повільних потенціалчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ПМ*, які при цьому відкриваються і зумовлюють надходження у цитоплазму м'язових клітин невеликої кількості  $\text{Ca}^{2+}$  із позаклітинного середовища.

Фізіологічним активатором RYR2 і RYR3, а також RYR нем'язових тканин, для яких не характерна деполяризація ПМ, зокрема ріанодинчутливого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу яйцеклітин морських їжаків, є *циклічна АДФ-рибоза* – найпотужніший із відомих  $\text{Ca}^{2+}$ -вивільнювальних агентів, виявлений у 1987 р. *Хон Ченг Лі*.

Як і у випадку I-1,4,5- $\text{P}_3/\text{Ca}^{2+}$ - сигнальної системи, у ряді клітинних типів позаклітинний стимул активує цАДФР-формуєвальні ферменти з АДФ-рибозилциклазною активністю (*АДФ-рибозилциклази*), що синтезують цАДФР із НАД<sup>+</sup>. На роль цих ферментів у ссавців претендують, зокрема, *мембранні білки CD38 і CD157*.

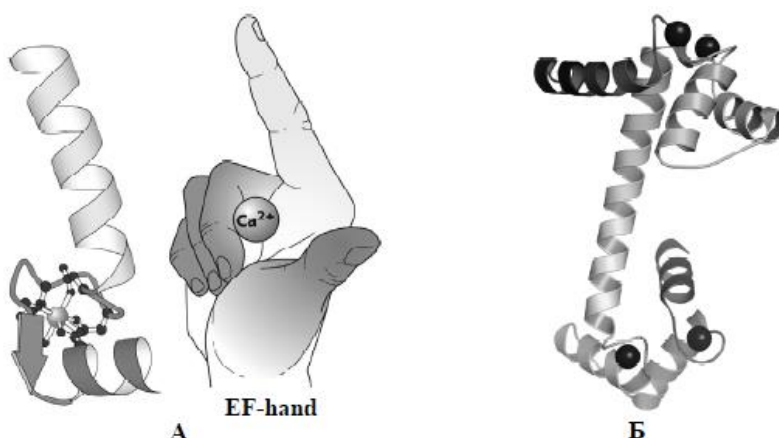
Мембранозв'язані форми АДФ-рибозилциклази – CD38 і CD157 – у випадку, якщо субстратом є не НАД<sup>+</sup>, а НАДФ<sup>+</sup>, за умови наявності нікотинової кислоти утворюють молекулу іншого внутрішньоклітинного посередника – *нікотинададеніндинуклеотидфосфату (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP)*, який також сприяє вивільненню  $\text{Ca}^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо – як через рецептори, відмінні від RYR (в ЕПР, лізосомах, секреторних везикулах), так і, можливо, через RYR.

Вивільнені із ЕПР іони кальцію, як вже зазначалося, свою подальшу дію здійснюють у комплексі із кальмодуліном.

*Кальмодулін* (КМ) належить до родини *EF-hand-білки* (EF hand- послідовність присутня у понад 100 різних білків, зокрема в численних ферментах (мультифункціональна  $\text{Ca}^{2+}$ /КМ-залежна протеїнкіназа (CaMK),

Ca<sup>2+</sup>-АТФаза ПМ, аденілатциклаза, фосфодіестераза, фосфопротеїнфосфатази, фосфоліпаза А<sub>2</sub>, тропонін С тощо.) і є термостабільним білком-перемикачем із М.м. 19 000 Да, що складається із 148 залишків амінокислот, активується іонами кальцію та опосередковує багато сигнальних функцій Ca<sup>2+</sup>, зв'язуючи чотири іони Ca<sup>2+</sup> на одну молекулу кальмодуліну.

У кожному сайті зв'язування Ca<sup>2+</sup> взаємодіє з атомами кисню карбоксильних груп бічного ланцюга головним чином глутамінової та аспарагінової кислот у петльовому домені між двома  $\alpha$ -спіралями, розташованими під прямим кутом, які разом формують мотив *спіраль-петля-спіраль* (*helix-loop-helix motif*, або *EF hand*) (а). У молекулі КМ є чотири мотиви EF hand – по два на кожному кінці молекули, яка через це набуває форми гантелі (б).



Гідрофобний діацилгліцерол переводить в активний стан певні ізоформи мембранозв'язаної протеїнкінази С (ПкС), яка фосфорилує білки, специфічні для кожного типу клітин, за залишками серину та треоніну. Серед її мішеней, зокрема, низка транскрипційних факторів, які регулюють експресію генів, залучених у регуляцію проліферації. Активність ПкС додатково стимулюють іони Ca<sup>2+</sup> (впливають на транслокацію ПкС із цитозолу до мембрани) і фосфатидилсерин мембран (взаємодіє з ДАГ (діацилгліцерол)), тому повна назва цього ферменту – *Ca<sup>2+</sup>, фосфоліпідзалежна ПкС*. У примембранному просторі ДАГ активує ПкС шляхом збільшення її спорідненості до Ca<sup>2+</sup> і фосфоліпідів. У ссавців виявлено 15 різних ізоформ ПкС.

Ці ізоформи залежно від механізмів активації класифікують у три підродини: *класичні* (для активації потребують іонів кальцію, ДАГ та фосфатидилсерину), *нові* (потребують ДАГ, але не залежать від наявності кальцію) та *атипові* (діють у  $\text{Ca}^{2+}$ , ДАГ-незалежний спосіб). Найпоширеніші з них –  $\alpha$ -,  $\beta_1$  й  $\beta_2$  – належать до класичних ПкС.

ПкС- $\alpha$  є 80-кД-поліпептидом із чотирма консервативними доменами та п'ятьма – варіабельними.

Консервативними доменами є АТФ-зв'язувальний, субстрат-зв'язувальний,  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальний і ДАГ-зв'язувальний (або "псевдосубстратний", оскільки він містить амінокислотну послідовність, яка характерна для білкових субстратів ферменту). Деякі джерела дають посилання на те, що псевдосубстратний домен не є ДАГ-зв'язувальним, а це два різні домени, що розташовані поруч.

Роль ПкС у контролі клітинного поділу та проліферації продемонстровано в досліджах із її потужними активаторами – форболовими ефірами. Ці поліциклічні похідні спиртів є промоторами пухлиногенезу. Форболові ефіри імітують дію ДАГ, зв'язуючись із ПкС у псевдосубстратному сайті й активуючи ПкС.

За дуже низьких рівнів  $\text{Ca}^{2+}$  та за відсутності ДАГ ПкС є неактивною і розподілена дифузно в цитозолі. При активації клітин відбувається перерозподіл ПкС- $\alpha$  і  $\epsilon$  до ПМ, ПкС- $\beta_2$  зв'язується із цитоскелетом, ПкС- $\gamma$  спрямовується до апарату Гольджи; ПкС- $\alpha$  також може направлятися до ЕПР, а ПкС- $\epsilon$  – у мембрану ядра.

ПкС фосфорилують, зокрема,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу,  $\alpha_1$ -адренергічні, мускаринові холінергічні та інші рецептори, змінюючи їхню спорідненість до лігандів і впливаючи на взаємодію із G-білками. Активація ПкС відбувається в чотири етапи.

У 1994 році було виявлено ще одну мішень ДАГ – *фосфолінід*, *діацилгліцеролзалежну протеїнкіназу D* (ПкD). Спершу цей фермент був ідентифікований як атипова ПкС (ПкС $\mu$ ) і, подібно до ПкА, ПкС та ПкG,

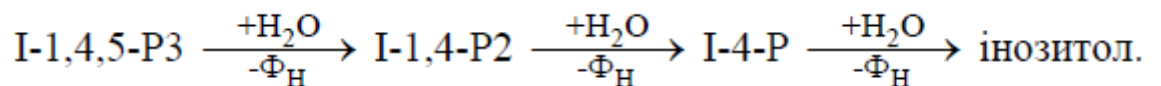
віднесений до групи протеїнкіназ AGC. При подальшому його вивченні було показано, що каталітичний домен цього ферменту є високогомологічним каталітичній ділянці кінази легкого ланцюга міозину і Ca<sup>2+</sup>/KM-залежної кінази, і тому сьогодні її класифікують як нового члена кіназ родини CAMKs. На сьогодні виявлено три ізоформи ферменту – ПкD1, ПкD2, ПкD3, які різняться внутрішньоклітинною локалізацією.

N-кінець молекули ПкD, подібно до ПкC, містить ДАГ і форболзв'язувальну ділянку, багату на цистеїн. Між ним і каталітичним доменом розташований PH домен, необхідний для сполучення ферменту із ПМ.

*Припинення гормональної передачі* здійснюється завдяки інактивації вторинних посередників і дефосфорилуванню вже фосфорильованих білків.

*Інактивація I-1,4,5-P3* може йти двома шляхами:

а) *I-1,4,5-P3-5-фосфатаза каталізує дефосфорилування I-1,4,5-P3 до неактивного метаболіту I-1,4-P2, який надалі дефосфорилується I-1,4-P2-1-фосфатазою до I-4-P і далі – інозитолфосфатмонофосфатазою до вільного інозитулу:*



Із останнього та активованої фосфатидної кислоти надалі генерується фосфатидилінозитол, який шляхом двох послідовних фосфорилувань утворює PI-4,5-P2, що є субстратом для фосфоліпази C і сполукою-попередником вторинних месенджерів.

Іони літію інгібують продукцію інозитулу із I-1,4-P2 та I-4-P, унаслідок чого знижується продукція PI-4,5-P2. Це пояснює порушення обміну фосфоінозитидів і послаблення залежних від них процесів при потраплянні цього металу до організму. Завдяки такому ефекту іони літію застосовують при терапії маніакально-депресивних психозів;

б) *I-1,4,5-P3 може бути фосфорильований ферментом інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кіназою до I-1,3,4,5-P4 (інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфату), який надалі підлягає комплексу серій фосфорилування і дефосфорилування з*



утворенням низки інших інозитолфосфатних сполук – *інозитолполіфосфатів*, більшість із яких також є вторинними месенджерами в різних типах клітин, зокрема в нервовій тканині.

*ДАГ інактивується двома шляхами:*

а) *за участю діацилгліцеролкінази (ДАГ-кінази) перетворюється на фосфатидну кислоту (далі із фосфатидної кислоти та інозитулу синтезується фосфатидилінозитол, а потім, із залученням ЦТФ і АТФ, – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат, компонент плазматичної мембрани і попередник вторинних месенджерів);*

б) *розщеплюється до вихідних компонентів – гліцеролу і жирних кислот, зокрема арахідонової, яка є попередником месенджерів III порядку – простагландинів та лейкотриєнів (фермент – ДАГ-ліпаза). Арахідонова кислота і простагландини активують гуанілатциклазу, під впливом якої синтезується четверта месенджерна молекула даного каскаду – циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ). Останній активує протеїнкіназу G (PкG), яка також фосфорилує низку клітинних білків.*

За дії цГМФ гальмується передача сигналу через фосфоінозитидну систему; у більшості клітини аналогічно діє і активація аденілатциклазної системи. Таким чином запобігається надмірна інтенсивність або тривалість стимуляції гормонами функціональної активності клітин.

### ***Інозитолполіфосфати як сигнальні молекули***

Фосфорилування I-1,4,5-P<sub>3</sub> до інозитолтетракісфосфату I-1,3,4,5-P<sub>4</sub> здійснюється ферментом *інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кіназою (IP3K)*. I-1,3,4,5-P<sub>4</sub> при цьому стає вихідною сполукою для синтезу низки інозитолполіфосфатів, зокрема, вищих інозитололполіфосфатів – IP<sub>5</sub>, IP<sub>6</sub>, IP<sub>7</sub>, IP<sub>8</sub>. Термін *інозитолполіфосфати (IPs)* використовують для назви похідних інозитулу, що утворюються внаслідок фосфорилування різних комбінацій шести ОН-груп інозитолового кільця, унаслідок чого інозитолове кільце сполучається із більш ніж однією фосфатною групою. Для назви похідних інозитолполіфосфатів, що містять високоенергетичні пірофосфатні

(дифосфатні) групи, застосовують термін *інозитолпірофосфати (PPIPs)*. Як інозитолполіфосфати, так і інозитолпірофосфати є месенджерними молекулами, які виконують різні біологічні функції. Першою сигнальною молекулою із числа інозитолполіфосфатів став ідентифікований у 1983 р Г. Стребом із колегами  $\text{Ca}^{2+}$ -мобілізуєчий агент *інозитол-1,4,5-трифосфат*. Інозитолпірофосфати були ідентифіковані пізніше – у середині 90-х років ХХ ст. Загалом ІРs залучені в численні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи і регулюють найрізноманітніші процеси, включаючи гомеостаз кальцію, транскрипцію, експорт мРНК із ядра.

Клітинні рівні ІРs регулюються ланцюгом реакцій фосфорилування й дефосфорилування, причому більшість ферментів, залучених у них, каталізують більш ніж одну реакцію. ІРs-генеруючі шляхи є різними для дріжджів, рослин і тварин.

Родина *інозитолгексакісфосфаткіназ* представлена трьома ізоформами у ссавців – ІР6К1 (ІНРК1), ІР6К2 (ІНРК2), ІР6К3 (ІНРК3); клітини дріжджів *S. Cerevisiae* характеризуються наявністю гомологічного їм ферменту – Kcs1. Основними функціями цих ферментів є:

- перетворення *інозитолгексакісфосфату (IP6)* на *пірофосфоінозитолпентакісфосфат (ізомер 5PP-IP5 (або 5-IP7))*;

- перетворення *інозитолпентакісфосфату I(1,3,4,5,6)P5* на *пірофосфоінозитолтетракісфосфат (ізомер 5PP-IP4)*

*Дифосфоінозитолпентакісфосфаткінази* основною мають 1-кіназну активність. У ссавців відомі дві ізоформи ферменту PP-IP5K – PP-IP5Ka та PP-IP5K b, у дріжджів *S. cerevisiae* – одна PP-IP5K, яка називається Vip1.

Їхніми біологічними функціями є:

- перетворення *інозитолгексакісфосфату (IP6)* на *пірофосфоінозитолпентакісфосфат (ізомер 1PP-IP5 (або 1-IP7))*;

- перетворення *продукту IP6Ks* – *ізомеру пірофосфоінозитолпентакісфосфату 5PP-IP5* – на *дипірофосфоінозитолтетракісфосфат (ізомер 1,5(PP)2-IP4, або 1,5-IP8)*.

Однак PP-IP5Ks, на відміну від IP6Ks, неспроможний фосфорилувати інозитолпентакісфосфат I(1,3,4,5,6)P5.

*Гідроліз інозитолпірофосфатів здійснюється ферментами дифосфоінозитолполіфосфатфосфогідролазам (diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolases, DIPPs).*

У ссавців ідентифіковано чотири ізоформи цього ферменту –DIPP1, DIPP2, DIPP3, DIPP4, у дріжджів *S. cerevisiae* – лише одна форма, Ddp1. Ці фосфатази гідролізують інозитолпірофосфати й нуклеотидні пірофосфати, наприклад, діаденозингексафосфат (Ap6A), а також неорганічні поліфосфати (polyP).

Навіть відносно неактивний метаболіт I-1,4,5-P3, утворений дією *інозитолфосфат-5-фосфатази*, – *інозитол-1,4-дифосфат (I-1,4-P2)* може функціонувати у ядрі, активуючи ДНК-полімеразу, залучається у кальцієву сигналізацію та відіграє роль у розвитку гіпертрофії серцевого м'яза.

Інша похідна I-1,4,5-P3, що утворюється через стадію I-1,3,4,5-P4 і наступного дефосфорилування останнього інозитолфосфат-5-фосфатазою – *інозитол-1,3,4-трифосфат (I-1,3,4-P3)*, – є негативним регулятором ферменту *I-1,3,4,5,6-P5-1-фосфатази* і таким чином контролює рівні іншого сигнального інозитолполіфосфату – *інозитол-3,4,5,6-тетракісфосфату (I-3,4,5,6-P4)*, що утворюється із I-1,3,4,5,6-P5. Інозитол-3,4,5,6-тетракісфосфат виступає інгібітором кальцієчутливих хлорних каналів в епітеліальних клітинах, можливо, унаслідок запобігання їхній активації Ca<sup>2+</sup>/КМ-залежною протеїнкіназою II. Ці канали, зокрема, залучені в регуляцію секреції солей і рідини, а також клітинного об'єму.

*Інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфат (I-1,3,4,5-P4)*, що утворюється із інозитол-1,4,5-трифосфату під впливом ферменту IP3K, може слугувати "короткотривалою пам'яттю" про те, що в клітині генерувався I-1,4,5-P3. I-1,3,4,5-P4 нездатний безпосередньо спричиняти мобілізацію кальцію, але має численні функції вторинного посередника, найбільш виражені в імунній системі та нейронах. Зокрема, високі рівні I-1,3,4,5-P4 захищають I-1,4,5-P3 від

гідролізу, оскільки спорідненість першої сполуки до *інозитолфосфат-5-фосфатази* – ферменту, який гідролізує обидва інозитолполіфосфати – є в 10 разів вищою. Продуктом гідролізу I-1,3,4,5-P4 цим ферментом є I-1,3,4-P3, а продуктом гідролізу I-1,4,5-P3 – I-1,4-P2. Який із процесів – гідроліз I-1,4,5-P3 чи I-1,3,4,5-P4 – буде переважати, залежить від вмісту та тривалості життя I-1,3,4,5-P4, від наявності активної IP3K, а також від співвідношення активностей IP3K та інозитолфосфат-5-фосфатази, які є неоднаковими для різних типів тканин.

*Захищаючи I-1,4,5-P3 від гідролізу, I-1,3,4,5-P4 опосередковано сприяє I-1,4,5-P3-залежній мобілізації Ca<sup>2+</sup> із ЕПР.*

Проте I-1,3,4,5-P4 може діяти як антагоніст I-1,4,5-P3-рецепторів, що є особливо вираженим при співвідношенні цих сполук 10 : 1. Фізіологічне значення цього феномену невідоме, хоча, можливо, це явище залучається в регуляцію вмісту кальцію в клітині: I-1,4,5-P3, спричиняючи вихід Ca<sup>2+</sup> із ЕПР, веде до зростання вмісту цього іона у клітині; підвищені рівні Ca<sup>2+</sup> активують IP3K, яка, у свою чергу, генерує I-1,3,4,5-P4, що в надлишку вимикає I-1,4,5-P3-рецептори і знижує вміст Ca<sup>2+</sup> у клітині.

*I-1,3,4,5-P4 здатний регулювати білок Ras та Ras-подібні малі G-білки, які є потужними ефекторами внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів. Крім того, ймовірно, що I-1,3,4,5-P4 також може безпосередньо впливати на деякі ще не ідентифіковані кальцієві канали.*

Ще один аспект, що дозволяє розглядати I-1,3,4,5-P4 як сигнальну молекулу, пов'язаний з тим, що, як уже зазначалося, *безпосередній продукт гідролізу I-1,3,4,5-P4 ферментом IP-5-фосфатазою – I-1,3,4-P3 – є основним регулятором рівнів іншого інозитолтетракісфосфату – I-3,4,5,6-P4, який є вторинним посередником, що контролює вихід хлору із клітини через кальцієчутливі хлорні канали.*

*Інозитолгексакісфосфат I-1,2,3,4,5,6-P6 (фітинова кислота) є найчисленнішим інозитолполіфосфатом у клітинах ссавців, однією із функцій якого є депонування фосфатних груп. Він має спорідненість до майже всіх ди-*

*і тривалентних неорганічних катіонів, зокрема до магнію, і може утворювати з ними комплексні сполуки.*

**Інозитолпірофосфати** контролюють різноманітні біологічні процеси; можливо, це пояснюється тим фактом, що *інозитолпірофосфати контролюють метаболізм енергії у клітинах, зокрем, гліколіз і окисне фосфорилування в мітохондріях, а отже, і продукцію АТФ.*

*Найбільш дослідженими інозитолпірофосфатами є два ізомери пірофосфоінозитолпентакісфосфату – 5PP-IP5 (або 5-IP7) та 1PP-IP5 (або 1-IP7), а також дупірофосфоінозитолтетракісфосфат 1,5(PP)2-IP4 (або 1,5-IP8) присутні в усіх еукаріотичних клітинах – від амеби до нейронів людини. Ферменти, що відповідають за їхній синтез, як зазначалося раніше, є висококонсервативними протягом еволюції. Концентрації та співвідношення IP6, IP7 та IP8 є стабільними в еукаріотичних клітинах. Ця стабільність є результатом швидкого "вимкнення" інозитолпірофосфатів за участю специфічних дифосфоінозитолполіфосфатфосфогідролаз.*

#### ***Гуанілатциклазна система.***

Циклічному гуанозинмонофосфату (цГМФ) належить і самостійна роль у регуляції функцій клітин. Зокрема, цей вторинний месенджер опосередковує контроль іонного транспорту й обміну води в нирках і кишечнику, а також відповідає за сигнал релаксації в серцевому м'язі.

Біосинтез цГМФ із ГТФ здійснюють ферменти *гуанілатциклази*, цей процес є подібним до синтезу цАМФ. Ферменти з гуанілатциклазною активністю виявлені в багатьох органах (серце, легені, нирки, наднирникові залози, ендотелій кишечнику, сітківка та ін.). На сьогодні ідентифіковано сім мембранозв'язаних форм гуанілатциклази (GCA–GCG), а також цитозольні гуанілатциклази).

*Мембранозв'язані форми (particulate guanylyl cyclases, pGCs) належать до 1-TMS-рецепторів і мають у своєму складі наступні ділянки:*

• *N*-кінцеву позаклітинну (яка в деяких ізоформах (GCA, GCB, GCC) може зв'язувати ліганди – короткі позаклітинні пептиди з 18–20 амінокислотних залишків;

- *один трансмембранний домен*;
- *юкстамембранний домен*, залучений у взаємодію із G-білком;
- *регуляторний кіназоподібний домен*, залучений в активацію ферменту;
- *домен, що залучається у димеризацію рецептора*;
- *C-кінцевий каталітичний компонент*, однаковий у різних форм ферменту.

Ізоформи мембранозв'язаної гуанілатциклази, що експресуються в клітинах слизової оболонки кишечника (GCC) та в сенсорних органах (GCD, GCE, GCF), додатково мають *C-кінцевий "хвіст"*, функція якого невідома (можливо, він сприяє сполученню із цитоскелетом і залучається в інтерналізацію рецепторів).

*Залежно від лігандної специфічності, rGCs класифікують на:*

- *рецептори до натрійуретичного пептиду*;
- *кишкові пептидзв'язувальні рецептори*, лігандом яких є бактеріальний теплостабільний ентеротоксин, і активація яких спричиняє розвиток секреторної діареї;
- *орфанові рецептори* (їхні ліганди ще не ідентифіковані).

Мембранозв'язані гуанілатциклази функціонують у вигляді гомодимеру; після сполучення із лігандом ініціюється серія подій, що включає фосфорилування внутрішньоклітинного кіназоподібного домену, зв'язування ГТФ та активацію синтезу цГМФ.

Один із лігандів rGCs – *натрійуретичний гормон передсердя* (НГП) – синтезується в передсерді у відповідь на збільшення об'єму крові, надходить із кров'ю в нирки, де активує мембранозв'язану гуанілатциклазу в клітинах ниркових каналців. Наслідком цього стає збільшення рівня цГМФ і цГМФ-залежне зростання екскреції Na<sup>+</sup> і води. Гладенькі м'язи судин також містять аналогічну гуанілатциклазну систему, за участю якої зв'язаний з

гуанілатциклазою НГП здійснює судинорозширювальну дію, сприяючи зниженню кров'яного тиску.

*Розчинна гуанілатциклаза (soluble guanylyl cyclase, sGC)* експресується у цитозолі більшості клітин ссавців і опосередковує широке коло важливих фізіологічних функцій – інгібування агрегації тромбоцитів, релаксацію гладеньких м'язів, вазодилатацію, передачу нервових імпульсів, імуномодуляцію. Цей фермент є гетеродимером, що складається із  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць і гемової простетичної групи, причому для його повної каталітичної активності необхідна наявність обох субодиниць. Часом можуть утворюватися і гомодимери, які не здатні до утворення цГМФ – отже, можливість утворювати гомо- і гетеродимери є одним із напрямків регуляції активності даного ферменту. Найпоширенішими субодиницями є  $\alpha 1$  та  $\beta 1$  ( $\alpha 1$ -субодиниця – 82 кД,  $\beta 1$ -субодиниця – 70 кД) – вони виявлені в багатьох тканинах.

*Одним із добре відомих активаторів розчинної форми гуанілатциклази є монооксид азоту (NO)*, який утворюється із амінокислоти аргініну за участю NO-синтази. NO сполучається із гемовою простетичною групою розчинної гуанілатциклази – при цьому утворюється *нітрозогем*. Ферментактивується також деякими *нітрозовазоділятаторами* (нітрогліцерин, нітропрусид тощо) – медичними препаратами, що використовуються при хворобах серця; при метаболізмі цих сполук вивільнюється NO, отже, саме NO в таких випадках

виступає прямим активатором розчинної гуанілатциклази. Ще одним важливим активатором даного ензиму є *монооксид вуглецю (CO)*. Однак, якщо під впливом монооксиду азоту гуанілатциклазна активність зростає у 100–400 разів відносно базального рівня, дія CO демонструє лише чотирикратне зростання цього показника.

Кожна субодиниця sGC має три функціональні домени:

- *N-кінцевий гем-зв'язувальний домен* (наявність гемової простетичної групи необхідна для активації ферменту оксидом азоту або монооксидом вуглецю). Окиснення заліза гемової групи до Fe<sup>3+</sup> веде до втрати

ферментативної активності, тоді як відновлювальні агенти (тіоли, аскорбат) підвищують цей показник;

- *домен, залучений у димеризацію;*

- *C-термінальний каталітичний домен, що має послідовність, гомологічну відповідному домену мембранозв'язаних гуанілатциклаз та аденілатциклаз.*

*цГМФ*, що утворюється в гуанілатциклазній реакції, є вторинним месенджером, що може активувати (інгібувати) численні клітинні процеси, зокрема, регулювати відкриття іонних каналів у клітинах нейроглії та блокувати проникність щільних контактів у ретинальних клітинах. Ця сполука у клітині має три основні мішені:

- *цГМФ-залежна протеїнкіназа (ПкG);*

- *CNGCs – іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами;*

- *фосфодіестерази, що регулюються цГМФ.*

Більшість ефектів цГМФ опосередковані дією цГМФ-залежної протеїнкінази (ПкG). Сьогодні у ссавців ідентифіковано дві ізоформи ПкG – ПкG1 та ПкG2. ПкG1 є цитозольним гомодимером (76 кД), що широко експресується у тканинах ссавців, зокрема в мозочку, тромбоцитах, гладеньких м'язах. ПкG2 представлена 86 кД гомодимером, сполученим із мембраною, якого не виявлено в серцево-судинній системі, проте його багато міститься у мозку й кишечнику, а також наявний у легенях, нирках і кістковій тканині. Амінокислотні послідовності ПкG1 і ПкG2 різняться головним чином у N-кінцевій ділянці, де містяться унікальні сайти, що забезпечують внутрішньоклітинну локалізацію цих ізоформ, а саме, *сайт для міристилювання в молекулі ПкG2* (необхідний для асоціації з мембраною) і *сайт для ацетилювання у ПкG1*. Ще одна відміна між цими ізоформами полягає в тому, що цГМФ-зв'язувальний сайт ПкG2 є низькоафінним до цього циклічного нуклеотиду.

*Усі ПкGs мають:*

- *N-кінцеву регуляторну ділянку,*



- цГМФ-зв'язувальний домен;
- С-кінцевий каталітичний домен.

*N-термінальна частина має п'ять регуляторних сайтів:*

- сайт, залучений у димеризацію, що представлений  $\alpha$ -спіраллю з консервативним лейцин/ізолейциновим повтором;
- аутоінгібіторні сайти, залучені в інгібування каталітичного домену за відсутності цГМФ;
- сайти для аутофосфорилування, які в присутності цГМФ підвищують базальну каталітичну активність;
- сайт, що регулює афінність цГМФ-зв'язувальної ділянки;
- сайт регуляції внутрішньоклітинної локалізації, який визначає взаємодію ферменту зі специфічними внутрішньоклітинними структурами.

цГМФ-зв'язувальний домен має два сайти для асоціації з циклічними нуклеотидами ("А" і "В") і забезпечує повну активацію ферменту після специфічного сполучення із двома молекулами цГМФ.

Каталітичний домен, локалізований на С-кінці молекули, має сайти для зв'язування комплексу  $\{Mg^{2+}$ -АТФ $\}$  та білка-мішені.

ПкG1 діє як водорозчинний модулятор внутрішньоклітинного вмісту  $Ca^{2+}$ , тоді як ПкG2 функціонує на рівні ПМ.

*Біологічними субстратами ПкG1, зокрема, є:*

- рецептор до 1-1,4,5-Р3 та ріанодиновий рецептор, фосфорилування яких знижує вихід кальцію відповідно із ЕПР і СР та сприяє послабленню скелетних м'язів;
- фосфопротеїн, що стимулюється вазодилаторами (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP*), залучений в активацію тромбоцитів;
- рецептор до тромбоксану А2 (його активність у тромбоцитах знижується після ПкG-опосередкованого фосфорилування);
- L-тип  $Ca^{2+}$ -каналів і  $K^{+}$ -канал, що активується кальцієм, які після фосфорилування залучаються в регуляцію тонуусу гладеньких м'язів судин і серцевого скорочення;

- *Ca<sup>2+</sup>-залежна цитозольна фосфоліпаза A<sub>2</sub>*, залучена в релаксацію гладеньких м'язів кишечника;
- *міозинзв'язувальна субодиниця фосфатази легкого ланцюга міозину*, що опосередковує релаксацію скелетних м'язів та гладеньких м'язів судин;
- *білки синаптичних везикул*, які опосередковують нейротрансмісію.

*Єдиним відомим субстратом для PkG<sub>2</sub> є хлорний канал*

*CFTR* (підпідрозд. 1.4.2.2). Він локалізований в апікальній мембрані ентероцитів слизової оболонки тонкого кишечника, а також у низці клітин нирок, печінки тощо, і, поряд з цГМФ-залежною активацією, опосередкованою PkG, може стимулюватися цАМФ-залежною PkA. Фосфорилування CFTR за участю PkG або PkA спричиняє відкриття у його молекулі каналу для іонів хлору (тому CFTR ще називають цАМФ- і цГМФ-залежним хлорним каналом).

Іншою мішенню цГМФ є *іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами (CNGCs)*. цГМФ, подібно до іншого циклічного нуклеотиду – цАМФ – сприяє відкриттю CNGCs, які регулюють транспорт Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> та Ca<sup>2+</sup> через біологічні мембрани.

*Фосфодіестерази* також регулюються внутрішньоклітинними рівнями цГМФ. Як уже відмічено, ФДЕ1, 2, 3, 10 і 11 гідролізують як цАМФ, так і цГМФ; ФДЕ4, 7 та 8 в основному розщеплюють цАМФ, а ФДЕ5, 6, 9 – цГМФ. цГМФ регулює фосфодіестерази у трьох напрямках:

- веде до зростання ферментативної активності внаслідок збільшення кількості субстрату (ФДЕ5, 6, 9);
- змінює швидкість гідролізу цАМФ унаслідок конкуренції за каталітичний сайт (ФДЕ1, 2, 3, 10, 11);

може прямо зв'язуватися зі специфічними алостеричними сайтами в молекулах фосфодіестераз (ФДЕ2, 5, 6, 10).

***Стероїдні гормони*** – жиророзчинні сполуки, похідні холестеролу (*глюкокортикоїди* – кортизол, кортикостерон; *мінералокортикоїди* – альдостерон; вітамін D, *статеві гормони* – прогестерон, тестостерон). Завдяки своїй вираженій гідрофобності (яку молекулі надають стероїдне ядро,

аліфатичні бічні ланцюги і метильні групи), ці сполуки здатні легко перетинати ПМ і тому не потребують наявності на мембрані специфічних рецепторів.

Відомо два основні механізми дії стероїдних сполук на клітину:

- проникаючи через ПМ у клітину й мігруючи до ядра, вони діють як транскрипційні регулятори, модулюючи експресію генів (це триває кілька годин і супроводжується синтезом нових білків);

- стероїди також можуть діяти на рівні клітинних мембран, безпосередньо регулюючи лігандозалежні іонні канали та інші мембранні процеси (такі впливи є дуже швидкими і займають кілька секунд або хвилин).

Після дифузії через ПМ стероїдний гормон дуже міцно зв'язується зі специфічними рецепторними білками. Майже всі рецепторні молекули у стероїдоочутливих клітинах локалізовані в ядрі. Однак через високу гідрофобність стероїдів мало ймовірно, що вони можуть мігрувати через цитоплазму до ядра без допомоги рецепторних білків, а отже, невелика кількість рецепторних білків є і в цитоплазмі, де вони відіграють роль переносника стероїдів від ПМ до ядра.

Усі рецептори до стероїдних гормонів мають подібну будову, що свідчить про те, що всі вони кодуються генами, членами однієї суперродини. Кожен із цих рецепторних білків містить:

- *гідрофобний стероїд-зв'язувальний домен біля С-кінця* (функція – специфічне сполучення із стероїдним гормоном); ця ділянка в різних рецепторах не виявляє значної гомології у амінокислотній послідовності, але певні амінокислотні залишки є консервативними і локалізуються в однакових положеннях;

- *центральний гідрофільний ДНК-зв'язувальний домен*.

Рецептори до стероїдних гормонів, як і інші білки, здатні сполучатися із ДНК, у складі ДНК-зв'язувальної ділянки містять певну кількість структур типу "цинкових пальців". Верхівки цих утворень контактують з великою борозенкою ДНК, причому сусідні "цинкові пальці" сполучаються із протилежними сторонами спіралі нуклеїнової кислоти. На сьогодні виявлено кілька типів "цинкових пальців", серед яких основними є:

- Cys2His2 (класичний "цинковий палець")
- Cys4
- Cys6

Кожен класичний "цинковий палець", наявність яких характерна для більшості транскрипційних факторів, містить дві консервативні пари амінокислотних залишків Cys і His, що взаємодіють з одним іоном цинку, а також консервативні залишки Phe та Leu.

ДНК-зв'язувальний домен рецепторів до стероїдних гормонів містить два "цинкові пальці" іншого типу – Cys4, у якому іонцинку сполучений із чотирма залишками цистеїну, а консервативні залишки His, Phe та Leu відсутні.

Стероїд-рецепторний комплекс має дві функції в ядрі, а саме, може прямо зв'язуватися із ДНК і регулювати транскрипцію або комбінуватися із транскрипційними факторами (Jun-, Fos-білки) і регулювати експресію генів без прямої взаємодії із ДНК. Рецептори для тиреоїдних гормонів (T4, T3) є високого-мологічними до рецепторів стероїдних гормонів і забезпечують зв'язування із ДНК за участю ДНК-зв'язувальних мотивів, що містять Cys–X–X–Cys і консервативні залишки лізину та аргініну.

На рівні ПМ стероїдні гормони, як відомо, головним чином регулюють активність іонних каналів і мембранних переносників. Наприклад, прогестерон модулює Ca<sup>2+</sup>-канали в ПМ нейронів стовбура мозку. Ця дія відбувається так швидко, що активація синтезу білків не встигає включитися.