

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Л. І. ОСТАПЧЕНКО
Т. Б. СИНЕЛЬНИК
І. В. КОМПАНЕЦЬ

**БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ
ТА ОСНОВИ
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ
СИГНАЛІЗАЦІЇ**

ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ

Навчальний посібник

УДК 577.352.5(075.8)
ББК 28.071я73
О-76

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф. В. К. Рибальченко,
д-р біол. наук, проф., член-кор. НАН України С. О. Костерін

*Рекомендовано
вченою радою ННЦ "Інститут біології"
(протокол № 10 від 14 квітня 2014 року)*

*Ухвалено науково-методичною радою
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
23 грудня 2014 року*

Остапченко Л. І.

О-76

Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, І. В. Компанець. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2016. – 639 с.

ISBN 978-966-439-878-4

Висвітлено основні уявлення про структуру, властивості й функції біологічних мембран, а також сучасні погляди на механізми внутрішньоклітинної сигналізації. Розглянуто хімічну будову плазматичної мембрани та мембран внутрішньоклітинних органел, принципи їхньої організації, залучення мембранних рецепторів і транспортних систем у функціонування окремих клітин, тканин і органів, а також основні механізми внутрішньоклітинної трансдукції за участю як класичних вторинних посередників, так і інших сигнальних молекул. Увагу приділено ролі порушень функцій біологічних мембран і внутрішньоклітинних регуляторних механізмів у розвитку патологічних станів.

Для студентів-біологів вищих навчальних закладів, магістрів і аспірантів медико-біологічних спеціальностей, науковців.

УДК 577.352.5(075.8)
ББК 28.071я73

ISBN 978-966-439-878-4

© Остапченко Л. І., Синельник Т. Б.,
Компанець І. В., 2016

© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2016

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ УКРАЇНОМОВНИХ ТЕРМІНІВ

АГ	Апарат Гольджі
АКТГ	Адренокортикотропний гормон
АФК	Активні форми кисню
ВІЛ	Вірус імунодефіциту людини
ГАМК	γ -аміномасляна кислота
ГКГ	Головний комплекс гістосумісності
ГОМК-КоА-редуктаза	3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза
ДАГ	Діацилгліцерол
ДАГ-кіназа	Діацилгліцеролкіназа
ДАГ-ліпаза	Діацилгліцеролліпаза
ЕПР	Ендоплазматичний ретикулум
ІФ	Інтерферон
ІФ-Р	ІФ-рецептор
КМ	Кальмодулін
ЛПНЩ	Ліпопротеїни низької щільності
ЛПС	Ліпополісахарид
МАО	Моноаміноксидаза
мтДНК	Мітохондріальна ДНК
НГП	Натрійуретичний гормон передсердя
ОАС	2',5'-олігоаденілатсинтетаза
ОД	Оксигеназний домен синтази оксиду азоту
оЛПНЩ	Окиснені ліпопротеїни низької щільності
ПМ	Плазматична мембрана
ПкА	Протеїнкіназа А
ПкВ	Протеїнкіназа В (синонім – Akt)
ПкС	Протеїнкіназа С
ПкG	Протеїнкіназа G
ПкD	Протеїнкіназа D
ПкR	Протеїнкіназа R, що індукується інтерфероном і активується dsRNA
ПОЛ	Пероксидне окиснення ліпідів
РД	Редуктазний домен синтази оксиду азоту
Ca ²⁺ /КМ-залежна Пк	Ca ²⁺ , кальмодулінзалежна протеїнкіназа
СНІД	Синдром набутого імунодефіциту людини
СОД	Супероксиддисмутаза
СР	Саркоплазматичний ретикулум
Сф-1-Ф	Сфінгозин-1-фосфат
УФ	Ультрафіолетове випромінювання
ФДЕ	Фосфодіестераза
Ф _n	Неорганічний фосфат
цАДФР	Циклічна АДФ-рибоза
цАМФ	Циклічний аденозинмонофосфат
цГМФ	Циклічний гуанозинмонофосфат
ЦНС	Центральна нервова система
ШКТ	Шлунково-кишковий тракт

**УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ АНГЛОМОВНИХ ТЕРМІНІВ
З ПОЯСНЕННЯМИ**

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
1-TMS-рецептори	1 transmembrane α -helices receptors	Рецептори з 1 трансмембранною α -спіраллю	Інтегральні білки, поліпептидний ланцюг яких 1 раз перетинає ПМ, наприклад, рецепторні тирозинові протеїнкінази
3MP	3-mercaptopyruvate	3-меркаптопіруват	Субстрат 3MST, попередник H ₂ S
3MST	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	3-меркаптопіруватсульфотрансфераза	H ₂ S-генеруючий фермент
5-LO	5-lipoxygenase	5-ліпоксигеназа	Фермент обміну арахідонової кислоти
7-TMS-рецептори	7-transmembrane α -helices receptors	Рецептори з 7 трансмембранними α -спіралями	Інтегральні білки, поліпептидний ланцюг яких 7 разів перетинає ПМ, наприклад, метаботропні рецептори
$\Delta\psi_m$	–	–	Зміна електрхімічного потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрії
AA	Arachidonic acid	Арахідонова кислота	–
ABC-transporters	ATP-binding cassette transporters	АТФ-зв'язувальні касетні транспортери	–
ABC-domain	ATP-binding cassette domain	АТФ-зв'язувальний касетний домен	АТФ-зв'язувальна ділянка ABC-транспортера
ABD	Adaptor-binding domain	Адаптерозв'язувальний домен	N-термінальний домен p110 α субодиниці PI3K
AC	Adenyl cyclase	Аденілатциклаза	–
ADAR1	Adenosine deaminase acting on RNA	РНК-специфічна аденозиндезаміназа	Антивірусний білок, що індукується дією ІФ
AH-motif	Від "autoinhibitory helix"	Від "аутоінгібіторна спіраль"	Ділянка аутоінгібування, що міститься у редуктазному домені NOS, так звана АН-послідовність

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
ALD	Adrenoleukodystrophy	Адренолейко- дистрофія	Спадковий розлад, спричинений порушен- нями у структурі низки представників АВС- транспортерів, що супроводжується по- рушенням обміну жирних кислот з дуже довгим ланцюгом (понад С26) і накопи- ченням їх в організмі
Ang II	Angiotensin II	Ангіотензин II	–
ANT	Adenine nucleotide translocator	Переносник адени- нового нуклеотиду	Компонент пори РТР
AP	Activated protein	Білок активації	Транскрипційний фактор, комплекс {cFos + cJun}
ApoE	Apolipoprotein E	Аполіпопротеїн Е	Метаболізм ліпідів
AQPs	Aquaporines	Аквапорини	Водні канали
Arg	Arginine	Аргінін	–
Ask1	Apoptosis signal- regulating kinase 1	Кіназа 1, що регу- люється апоптозним сигналами	Серин/треонінова про- теїнкіназа, член MAPK- каскаду, що функціонує у р38 і JNK шляхах
A-SMase	Acid sphingomyelinase	Кисла сфінгомеліназа	Фермент обміну сфін- голіпідів, гідролізує сфінгомелінін
Asp	Asparagine acid	Аспарагінова кислота	–
ATF6	Activating transcription factor 6	Транскрипційний фактор активації 6	Транскрипційний фак- тор, що залучається в реалізацію ЕПР-стресу
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated protein	Білок, мутований при атаксії-телангіктазії	Активатор білка р53
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	Білок, подібний до ATM і Rad3	Активатор білка р53
Baa helix	Basic amphiphilic alpha helix	Основні амфіпатичні α -спіралі	Ділянка поліпептидного ланцюга, що забезпечує сполучення білка з кальмодуліном
Bax	Bcl-2 associated X- protein	Bcl-2-асоційований Х-білок	Проапоптозний білок родини Bcl-2
Bcl-2	Від "B-cell lymphoma/ leukemia"	Від "В-клітинна лімфома/лейкемія"	Білок, надекспресію якого вперше виявлено за цього стану

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
BDNF	Brain derived neurotrophic factor	Нейротрофічний фактор, що утворюється в мозку	Нейротрофічний фактор мозку
BH4	(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin	(6R)-5,6,7,8-тетрагідро-L-біоптерин	Тетрагідробіоптерин
BiP/GRP78	Binding immunoglobulin protein/ 78 kDa glucose-regulated protein	Білок, що зв'язує імуноглобулін / глюкозорегульований білок з молекулярною масою 78 кД	Шаперон і ключовий регулятор ЕПР-стресу
ВК _{Ca}	–	–	Кальцієзалежні К ⁺ -канали високої провідності
Btk	Bruton's tyrosine kinase	Протеїнкіназа Брутона	Тирозинова протеїнкіназа
C-1-P	Ceramide-1-phosphate	Церамід-1-фосфат	Сигнальна молекула
cADPR	Cyclic ADP-ribose	Циклічна АДФ-рибоза	Вторинний посередник
CAM	Cell adhesion molecules	Молекули клітинної адгезії	–
CaMKs	Ca ²⁺ , calmodulin-dependent serine/threonine protein kinases	Ca ²⁺ /КМ-залежні протеїнкінази	–
CAPK	Ceramide-activated protein kinase	Протеїнкіназа, що активується церамідом	–
CAPPs	Ceramide activated protein phosphatases	Протеїнфосфатази, що активуються церамідом	–
Caspases	Cysteine-dependent aspartate-specific proteases	Цистеїнзалежні аспаргат-специфічні протеази	Каспази
CAT	Cysteine-aminotransferase	Цистеїнаміно-трансфераза	Фермент, що синтезує 3-меркаптопіруват (попередник H ₂ S) із цистеїну та α-кетоглутарату
CBS	Cystathionine-β-synthase	Цистатіонін-β-синтаза	H ₂ S-продукуючий фермент
Cdc25-phosphatases	Cell division cycle phosphatases	Фосфатази, залучені в регуляцію клітинного циклу	Фосфатази циклінозалежних кіназ
Cdk	Cycline depended kinase	Циклінозалежна кіназа	Бере участь у регуляції клітинного циклу

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
CERK	Ceramide kinase	Церамідкіназа	–
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Регулятор трансмембранної проникності при кістозному фіброзі	цАМФ-залежний хлорний канал, мутації якого виявляються за кістозного фіброзу (муковісцидозу)
CH2-domain	Від "cdc25 homology domain"	Домен, гомологічний ділянці білка cdc25	Домен у складі низки фосфатаз подвійної специфічності
Chk	Checkpoint kinase	Чекпойнт-кіназа	Кіназа, дія якої залежить від пошкодження ДНК
CLC	Voltage gated chloride channels	Потенціалзалежні хлорні канали	–
CLCA	Calcium activated chloride channels	Ca ²⁺ -залежні хлорні канали	–
CLNS1A	Nucleotide/volume sensitive chloride channels	Хлорні канали, чутливі до нуклеотидів і об'єму	–
CNGCs	Cyclic nucleotide-gated channels	Іонні канали, що регулюються дією циклічних нуклеотидів	Мішені циклічних нуклеотидів
CO	Carbon monoxide	Монооксид вуглецю	–
CO-RMs	CO-releasing molecules	СО-вивільнювальні молекули	Донори СО
COX	Cyclooxygenase	Циклооксигеназа	Фермент обміну арахідонової кислоти
CR	Cysteine-rich repeats	Ділянки, багаті на цистеїн	Специфічна послідовність у поліпептидному ланцюзі деяких білків
Crm-A	Cytokine response modifier A	Модифікатор цитокинової відповіді-А	Продукт гена вірусу коров'ячої віспи
CSE	Cystathionine-γ-lyase	Цистатіонін-γ-ліаза	Інша назва – цистатіоназа, H ₂ S-продукуючий фермент
CSK	C-terminal Src Kinase,	Кіназа С-кінцевої ділянки Src	Цитозольна тирозинова протеїнкіназа
CTMP	Carboxy-terminal modulator protein	Карбокситермінальний білок-модулятор	Білок, здатний інактивувати ПкВ/Акт
CYP2E1	Cytochrome P450E1	Цитохром P450E1	Ізоформа цитохрому P450, що відповідає за метаболізм етанолу
Cys	Cysteine	Цистеїн	–
Cys-NO	–	–	Нітрозцистеїн
DAG	Diacylglycerol	Діацилгліцерол	–

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
DAMPs	Damage-associated molecular pattern molecules	Молекулярні структури, асоційовані із загибеллю	Ендогенні сполуки, що розпізнаються PRRs
DD	Death domain	Домен загибелі	Ділянка у рецепторів загибелі та адаптерних молекул
DIPPs	Diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolases	Дифосфоінозитол-поліфосфат-фосфогідролази	Ферменти, що здійснюють гідроліз інозитолпірофосфатів
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	ДНК-залежна протеїнкіназа	РІЗК-подібна кіназа, сенсор генотоксичного стресу
dsDNA	Double stranded DNA	Дволанцюгова ДНК	–
DSPKs	Dual-specificity protein kinases	Протеїнкінази подвійної специфічності	Функціонують і як серин/треонінові, і як тирозинові протеїнкінази
dsRNA	Double stranded RNA	Дволанцюгова РНК	–
DUOX1, DUOX2	Dual oxidases-1, -2	Подвійні оксидази-1,-2	Каталітичні субодиниці подвійних оксидаз DUOXs
DUOXAs	Dual oxidases activators	Активатори подвійних оксидаз	Фактори дозрівання подвійних оксидаз
DUOXs	Dual oxidases	Подвійні оксидази	Представники родини НАДФН-оксидаз
DUSPs	Dual-specific phosphatases	Фосфатази подвійної специфічності	Функціонують і як серин/треонінові, і як тирозинові протеїнфосфатази
<i>EDGs</i>	Endothelial differentiation genes	Гени диференціювання ендотелію	Група генів, що кодує рецептори до сфінгозин-1-фосфату (S1P1–S1P5)
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor	Гіперполяризуючий фактор, що виробляється ендотелієм	Узагальнююча назва ряду сполук, що виробляються в організмі і спричиняють гіперполяризацію
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor	Релаксуючий фактор, що виробляється ендотелієм	Назва сполуки, що виробляється в організмі; пізніше була ідентифікована як оксид азоту
EF hand motif	= Helix-loop-helix motif	Спіраль-петля-спіраль-послідовність	Са ²⁺ -зв'язувальна ділянка у складі білків

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
EGF	Epidermal growth factor	Епідермальний фактор росту	–
EGF-R	Epidermal growth factor receptor	Рецептор епідермального фактора росту	–
ENaC	Epithelial sodium channel	Епітеліальний натрієвий канал	Натрієвий канал, локалізований на апікальних ділянках мембран епітеліоцитів, бере участь у підтримці водно-сольового балансу в організмі
eNOS	Endothelial NO-synthase	Ендотеліальна NO-синтаза	Ізоформа NOS
EPACs	Exchange proteins activated by cyclic AMP	Білки-обмінники, що активуються цАМФ	Мішені цАМФ
E-R	Estrogen receptor	Рецептор до естрогену	–
ERK	Extracellular signal regulated kinase	Кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами	Родина MAPK
FADD	Fas-associated death domain protein	DD-вмісний білок, асоційований з рецептором Fas	Адаптерний білок
Fas-R	Fibroblaste- associated antigene receptor	Рецептор антигену, асоційованого з фібробластами	Рецептор, названий за антигеном, який викликав клітинну загибель
Fas-L	Fibroblaste associated antigene	Антиген, асоційований з фібробластами	Ліганд, названий за антигеном, який викликав клітинну загибель
FGF	Fibroblast growth factor	Фактор росту фібробластів	–
FGF-R	Fibroblast growth factor receptor	Рецептор фактора росту фібробластів	–
FLAP	5-lipoxygenase activating protein	Білок, що активує 5-ліпоксигеназу	–
FNIII	Fibronectin III repeats	Повтори, характерні для фібронектину III	Специфічна послідовність у поліпептидному ланцюзі деяких білків
FoxO1	Від "forkhead box O"	–	Транскрипційний фактор, залучений у вуглеводний обмін
GAPDH	Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase	Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа	Гліколітичний фермент

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
GAPs	GTPase Activating Proteins	Білки-активатори ГТФаз	Допоміжні білки при функціонуванні малих ГТФ-зв'язувальних білків
GAS	IFN- γ -activated site	Сайт, що активується γ -інтерфероном	Послідовність у промоторах генів, що індукуються впливом ІФ
GCs	Guanylyl cyclases	Гуанілатциклази	Ферменти, що синтезують цГМФ
GCSF	Granulocyte colonystimulating factor	Колонієстимулювальний фактор гранулоцитів	–
GDI	Guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor	Інгібітор дисоціації ГДФ	Регулятор активності малих ГТФ-зв'язувальних білків
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor	Нейротропний фактор гліальних клітин	–
GEFs	Guanine Nucleotide Exchange Factors	Фактори обміну гуанінових нуклеотидів	Допоміжні білки при функціонуванні малих ГТФ-зв'язувальних білків
Gln	Glutamine	Глутамін	–
Glu	Glutamine acid	Глутамінова кислота	–
GLUT1	Glucose transporter	Транспортер для глюкози	Переносник для глюкози, здійснює полегшену дифузію
GM-CSF	Granulocyte/ Macrophage colonystimulating factor	Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор	–
gp	Glycoprotein	Глікопротеїн	–
GP	Glutathion-peroxidase	Глутатіон-пероксидаза	Антиоксидантний фермент
GPCRs	G-Protein-Coupled Receptors	Рецептори, сполучені з G-білком	Синонім: метабо-тропні рецептори
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol	Глікозил-фосфатидилінозитол	"Якір" для вбудовування білків у мембрану в ділянках ліпідних рафтів
G-P repeats	Glycine-proline-rich repeats	Ділянки, багаті на гліцин і пролін	Специфічні послідовності в поліпептидному ланцюзі деяких білків
G-protein	GTP-binding protein	ГТФ-зв'язувальний білок	–
GR	Glutathione reductase	Глутатіонредуктаза	Фермент, залучений у відновлення GS–SG

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
Grb2	Growth-factor-receptor-binding protein	Білок, що зв'язується з рецепторами факторів росту	Адаптерний білок
GRKs	G-coupled receptor kinases	Протеїнкінази, сполучені з метаботропними рецепторами	Специфічні серин/треонінові протеїнкінази
Grx	Glutaredoxine	Глутаредоксин	Білок, залучений у відновлення дисульфідних зв'язків
GSH	–	–	Відновлений глутатіон
GSK	Glycogensynthase	Глікогенсинтаза	–
GSNOR	S-nitrosoglutathione-reductase	S-нітрозоглутатіон-редуктаза	Під час денітрозилування SNO-білків перетворює S-нітрозоглутатіон (GSNO) до N-гідроксисульфенаміду глутатіону (GSNHOH)
GS-SG	–	–	Окиснений глутатіон (глутатіон-дисульфід)
GT	Glutathion-transferase	Глутатіон-трансфераза	Антиоксидантний фермент
H ₂ S	–	–	Сульфід водню
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid	Гідроксиейкозатетраєнова кислота	Проміжний продукт обміну арахідонової кислоти
HGF	Hepatocyte growth factor	Фактор росту гепатоцитів	–
HGF-R	Hepatocyte growth factor receptor	Рецептор фактора росту гепатоцитів	–
HIF	Hypoxia-inducibile factor	Фактор, що індукується при гіпоксії	Транскрипційний фактор
His	Histidine	Гістидин	–
HIV	Human immunodeficiency virus	ВІЛ (вірус імунодефіциту людини)	–
HO	Heme oxygenase	Гемоксигеназа	СО-формувальний фермент
HO [•]	–	–	Гідроксильний радикал
HPETE	Hydroperoxy eicosatetraenoic acid	Гідропероксиейкозатетраєнова кислота	Проміжний продукт обміну арахідонової кислоти
HVA Ca ²⁺ -channels	High voltage activated	Ті, що активуються за сильної деполяризації	Потенціалзалежні Ca ²⁺ -канали, що активуються за сильної деполяризації
I	Inositol	Інозитол	–

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
I-1-P	Inositol-1-mono-phosphate	Інозитол-1-монофосфат	Продукт гідролізу I-1,3-P2
I-1,2,3,4,5,6-P6	Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate	Інозитол-1,2,3,4,5,6-гексакісфосфат	Продукт фосфорилування I-1,3,4,5,6-P5 (також позначається як IP6)
I-1,3-P2	Inositol-1,3-diphosphate	Інозитол-1,3-дифосфат	Продукт гідролізу I-1,3,4-P3
I-1,3,4-P3	Inositol-1,3,4-triphosphate	Інозитол-1,3,4-трифосфат	Продукт гідролізу I-1,3,4,5-P4 IP-5-фосфатазою
I-1,3,4,5-P4	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate	Інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфат	Продукт фосфорилування I-1,4,5-P3
I-1,3,4,5,6-P5	Inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate	Інозитол-1,3,4,5,6-пентакісфосфат	Продукт фосфорилування I-3,4,5,6-P4 у першому положенні за участю IP56K (також позначається як IP5)
I-1,4-P2	Inositol-1,4-diphosphate	Інозитол-1,4-дифосфат	Продукт гідролізу I-1,4,5-P3
I-1,4,5-P3	Inositol-1,4,5-triphosphate	Інозитол-1,4,5-трифосфат	Вторинний посередник у інозитолфосфатному сигнальному каскаді
I-3-P	Inositol-3-mono-phosphate	Інозитол-3-монофосфат	Продукт гідролізу I-1,3-P2
I-3,4-P2	Inositol-3,4-diphosphate	Інозитол-3,4-дифосфат	Продукт гідролізу I-1,3,4-P3
I-3,4,5,6-P4	Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate	Інозитол-3,4,5,6-тетракісфосфат	Продукт гідролізу I-1,3,4,5,6-P5 за участю IP56K (за наявності магнію і нуклеотидів) або інозитол-1,3,4,5,6-P5-1-фосфатази
I-4-P	Inositol-4-monophosphate	Інозитол-4-монофосфат	Продукт гідролізу I-1,4-P2
IAPs	Inhibitors of apoptotic proteases	Інгібітори апоптозних протеаз	Інгібітори каспаз
IgE	Immunoglobulin E	Імуноглобулін E	–
IgG	Immunoglobulin G	Імуноглобулін G	–
IgL	Immunoglobulin-like motif	Імуноглобуліно-подібні ділянки	Специфічна послідовність у поліпептидному ланцюзі деяких білків
IgM	Immunoglobulin M	Імуноглобулін M	–
IκB	Inhibitor of NF-κB	Інгібітор NF-κB	–

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
IKK	IκB-kinase	IκB-кіназа	Кіназа, що здійснює фосфорилування IκB, що сприяє активації NF-κB
IKKε/IKKi	Inducible I-κB kinase	Індуцибельна кіназа інгібітора NF-κB	Атипова IKK
IL	Interleukin	Інтерлейкін	–
IL-1-R	IL-1-receptor	Рецептор до IL-1	–
iNOS	Inducible NO-synthase	Індуцибельна NO-синтаза	Ізоформа NOS (синонім – макрофагальна NOS)
IP3K	Inositol-1,4,5-triphosphate-3-kinase	Інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кіназа	Фермент, що фосфорилує I-1,4,5-P3 з утворенням I-1,3,4,5-P4
IP-5-phosphatase	Inositolphosphate-5-phosphatase	Інозитолфосфат-5-фосфатаза	Фосфатаза, що гідролізує I-1,3,4,5-P4 з утворенням I-1,3,4-P3
IP56K	Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate-5/6-kinase	Інозитол-3,4,5,6-тетракісфосфат-5/6-кіназа	Генерує інозитолтетракісфосфати – як I-1,3,4,5-P4, так і I-1,3,4,6-P4 – із I-1,3,4-P3
IP6Ks	Inositolhexakisphosphatekinases	Інозитолгексакісфосфаткінази	Інозитолпірофосфатсинтази; також позначаються як IHPKs (<i>inositol hexakisphosphates kinases</i>)
Ipk2	Inositolphosphatekinase-2	Інозитолфосфаткіназа-2	Мультифункціональна кіназа дріжджів, залучена у фосфорилування I-1,4,5-P3
IPMK	Inositolphosphate-multikinase	Мультикіназа інозитолфосфатів	Мультифункціональна кіназа, залучена у фосфорилування I-1,4,5-P3 (має активності IP3K ссавців та Ipk2 дріжджів); основна активність – I-1,3,4,6-P4-5-кіназна
IPS-1	Interferon promoter stimulator-1	Стимулятор промотору інтерферону	Адаптерний білок, залучений у сигнальні шляхи цитозольних PRRs; також відомий як MAVS (<i>mitochondrial antiviral signaling protein, мітохондріальний антивірусний сигнальний протеїн</i>) або VISA (<i>virus-induced signaling adapter, вірус-індукований сигнальний адаптер</i>).

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
IPs	Inositolpoly-phosphates	Інозитолполі-фосфати	Похідні інозиту, що утворюються внаслідок фосфорилування різних комбінацій шести ОН-груп інозитолового кільця
I-R	Insulin receptor	Інсуліновий рецептор	–
IRAKs	Interleukin-1 receptor-associated kinases	IL-1-R-асоційовані кінази	Протеїнкінази, залучені в сигнальні шляхи TLRs
IRE1	Inositol requiring enzyme 1	Фермент 1, що потребує інозиту	Протеїнкіназа, залучена в реалізацію ЕІР-стресу
IRFs	Interferon regulatory factors	ІФ-регуляторний фактор	Родина транскрипційних факторів, що регулюють утворення інтерферону
IRS-1	Insulin-receptor substrate	Субстрат інсулінового рецептора	Адаптерний білок, що сполучається з I-R
ISGs	IFN-stimulated genes	Гени, що стимулюються інтерфероном	–
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3	Фактор 3 ІФ-стимульованих генів	Транскрипційний комплекс {STAT-2 + STAT-1 + IRF-9}
ISRE	Interferon-stimulated response element	Елементи відповіді, стимульовані інтерфероном	Послідовність у промоторах генів, що індукуються впливом ІФ
I _V A Ca ²⁺ -channels	Intermediate voltage activated	Ті, що активуються за середньої деполаризації	Потенціалзалежні Ca ²⁺ -канали, що активуються за середньої деполаризації
Jaks	Janus Kinases	Янус-кінази	Рецептор-асоційовані цитозольні тирозинові протеїнкінази
JNK/SAPK	c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase	Протеїнкіназа, що активується в умовах клітинного стресу	Родина MAPK
K2p	Tandem P domain K channels	K ⁺ -канали з тандемним Р-доменом	–
K _{АТФ} -channels	ATP-sensitive potassium channels	АТФ-чутливі калієві канали	–
K _{Ca} -channels	Calcium-activated potassium channels	Калієві канали, що активуються кальцієм	–
KGF	Keratinocyte growth factor	Фактор росту кератиноцитів	–
KIM	Kinase interaction motif	Мотив взаємодії з MAP-кіназами	Домен у складі фосфатаз MAP-кіназ

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
Knockout mouse	–	"Нокаутовані" миші	Миші, дефіцитні за певним геном
Kv	–	–	Потенціалзалежні K ⁺ -канали
L	Leucine-rich repeats	Ділянки, багаті на лейцин	Специфічна послідовність у поліпептидному ланцюзі деяких білків
L•	–	–	Ліпідний радикал
LO•	–	–	Алкоксильний радикал
LOO•	–	–	Пероксильний радикал
LOOH	–	–	Гідропероксид
LMW PTP	Low-molecular-weight phosphatase	Низькомолекулярна протеїнфосфатаза	Тирозинава протеїнфосфатаза
LPP	Lipid phosphate phosphatase	Фосфатаза ліпідного фосфату	Фосфатаза сфінгозин-1-фосфату
LPS	Lipopolysaccharide	Ліпополісахарид	Інша назва бактеріального ендотоксину
LRRs	Leucine-rich repeats	Повтори, багаті на лейцин	–
LT	Leukotriene	Лейкотриєн	Ейкозаноїд – похідна арахідонової кислоти
LVA Ca ²⁺ -channels	Low voltage activated	Ті, що активуються за слабкої деполіаризації	Потенціалзалежні Ca ²⁺ -канали, що активуються за слабкої деполіаризації
Lys	Lysine	Лізин	–
MAPK	Mitogen activated protein kinases	Протеїнкінази, що активуються мітогенами	Група серин/треонінових протеїнкіназ, що передають сигнал від позаклітинних стимулів-мітогенів усередину клітини
MAPKAPs	MAPK-activated protein kinases	Протеїнкінази, що активуються MAPK	Одні із мішеней MAPK
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase	Кіназа протеїнкінази, що активується мітогенами	–
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase	Кіназа кінази протеїнкінази, що активується мітогенами	–
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	Колонієстимулювальний фактор росту макрофагів	
MDA5	Melanoma differentiation associated protein 5	Блок 5, асоційований з диференціюванням меланоми	Представник цитозольних PRRs

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
Mdm2	Murine double minute 2	–	Блок-інактиватор білка p53
MDRs	Multiple drug resistance proteins	Білки множинної лікарської резистентності	Представники однієї з підродин ABC-транспортерів (ABCВ), надмірна експресія яких спричиняє виникнення множинної лікарської резистентності
MFG-E8	Від "milk fat globule"	Від "жирова глобула молока"	Фактор росту епідермальних клітин із жирових глобул молока
MKPs	MAP Kinase Phosphatases	Фосфатази MAP-кіназ	Фосфатази подвійної специфічності, мішенями яких є MAPK
MPT	Mitochondrial permeability transition	Зміна мітохондріальної проникності	Зміна проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани
MRPs	Multidrug resistance proteins	Білки множинної лікарської резистентності	Представники однієї з підродин ABC-транспортерів (ABCC), надмірна експресія яких спричиняє виникнення множинної лікарської резистентності
mTOR	Mammalian target of rapamycin	Блок-мішень рапаміцину	–
Мх білки	Myxovirus proteins	Білки міксовірусу	Антивірусні білки, що індукуються ІФ
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88	Продукт 88-го гена первинної відповіді диференціювання міелоїду	Адаптерний білок
NAADP	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate	Нікотинададеніндинуклеотидфосфат	Вторинний посередник
NES	Nuclear export signal	Сигнали ядерного експорту	Сигнальна послідовність, що зумовлює експорт білків із ядра
NF-κB	Nuclear factor-κB	Ядерний фактор-κB	Транскрипційний фактор
NGF	Nerve growth factor	Фактор росту нервів	–
NLS	Nuclear localization signal	Сигнал ядерної локалізації	Сигнальна послідовність, що зумовлює ядерну локалізацію білків

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartate receptor	NMDA-рецептор	Іонотропний рецептор до глутамату в ЦНС, кальцієвий канал
nNOS	Neuronal NO-synthase	Нейрональна NO-синтаза	Ізоформа NOS (синонім – мозкова NOS)
NO	Nitrogen monoxide	Монооксид азоту	Синонім – оксид азоту
NO ⁺	–	–	Катіон нітрозонію, одна з редокс-форм оксиду азоту
NO ⁻	–	–	Нітроксил-аніон, одна із редокс-форм оксиду азоту
NO [•]	м	–	Вільний радикал, одна із редокс-форм оксиду азоту
NOS	NO-synthase	NO-синтаза	–
NOX1 – NOX5	–	–	Каталітичні субодиниці Nox1 – Nox5
NOXA1	Nox-activating protein 1	Білок 1, що активує NOX	Білок-гомолог p67 ^{Nox} , регуляторний компонент нефагоцитарних Noxs
NOXO1	Nox-organizing protein 1	Білок, що залучається в організацію NOX	Білок-гомолог p47 ^{Nox} , регуляторний компонент нефагоцитарних Noxs
Noxs	<u>NADPH-oxidases</u>	НАДФН-оксидази	Спеціалізовані ферментативні системи, що генерують ROS
nrPTKs	Non receptor protein tyrosine kinases	Нерецепторні тирозинові протеїнкінази	Інша назва – цитозольні тирозинові протеїнкінази
nrPTPs	Non receptor protein tyrosine phosphatases	Нерецепторні тирозинові протеїнфосфатази	–
N-SMase	Neutral sphingomyelinase	Нейтральна сфінгомеліназа	Фермент обміну сфінголіпідів, гідролізує сфінгомислін
NT-4	Neurotrophin-4	Нейротрофін-4	–
O ₂ ^{•-}	–	–	Супероксидний аніон (супероксид, супероксидний аніон-радикал)
OONO ⁻	–	–	Пероксинітрит
p53	Protein, 53 кД	Білок, 53 кД	Проапоптозний білок, супресор пухлин, транскрипційний фактор

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns	Молекулярні структури, асоційовані зі збудником	Структури, наявні у організмах патогенів, що розпізнаються PRRs
PDGF	Platelet-derived growth factor	Фактор росту тромбоцитів	–
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor	Рецептор фактора росту тромбоцитів	–
PDI	Protein Disulfide-Isomerase	Протеїндисульфідізомераза	Забезпечує вірне утворення дисульфідних зв'язків під час фолдингу білків у ЕПР шляхом залучення в серію реакцій тіол-дисульфідного обміну
PDK-1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1	3'-фосфатидилінозитолзалежна протеїнкіназа-1	–
PERK	Doublestranded RNA-activated protein kinase (P _{ERK}) – like endoplasmic reticulum kinase	Кіназа ЕПР, подібна до P _{ERK}	Фермент, залучений у реалізацію ЕПР-стресу
PFIC	Progressive familial intrahepatic cholestasis	Прогресуючий родинний внутрішньопечінковий холестаза	Група спадкових розладів, спричинених порушеннями у структурі низки представників АВС-транспортерів
PG	Prostaglandin	Простагландин	Ейкозаноїд – продукт обміну арахідонової кислоти
pGCs	Particulate guanylyl cyclases	Мембранозв'язані ізоформи гуанілатциклази	–
PH-domain	Pleckstrin homology domain	Домен гомології плекстрину	Забезпечують сполучення білків із ПМ, зокрема, зв'язуючись із мембранними 3'-фосфорильованими інозитоловими фосфоліпідами – продуктами PI3-кінази
Phox	Phagocyte NADPH-oxidase	Фагоцитарна НАДФН-оксидаза	інша назва – Nox 2
PLA ₂	Phospholipase A ₂	Фосфоліпаза A ₂	–
PLC	Phospholipase C	Фосфоліпаза C	–

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
Pgp	P-glycoprotein	P-глікопротеїн	Один із представників ABC-транспорерів; інші назви – ABCB1, MDR1
PI	Phosphatidylinositol	Фосфатидилінозитол	–
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-kinase	Фосфатидилінозитол-3'-кіназа	–
PI-3-P	Phosphatidylinositol-3-monophosphate	Фосфатидилінозитол-3-монофосфат	–
PI-3,4-P2	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphate	Фосфатидилінозитол-3,4-дифосфат	–
PI-3,4,5-P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate	Фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат	–
PI-4,5-P2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate	Фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат	Мембранний фосфоліпід-попередник вторинних посередників інозитолфосфатного сигнального каскаду
PIKKs	Phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases	PI3K-подібні кінази	–
PkC	Protein kinase C	Протеїнкіназа С	–
PLC	Phospholipase C	Фосфоліпаза С	–
PLIP	Phospholipid inositolpirophosphatase	Фосфатаза фосфоліпідних інозитолів	Інша назва –PTPM1
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate	Форбол-12-міристат-13-ацетат	Форболовий ефір, класичний стимулятор ПкС і промотор росту пухлин
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase	Ca ²⁺ -АТФаза ПМ	–
PP-1	Protein phosphatase 1	Протеїнфосфатаза-1	Серин/треонінова протеїнфосфатаза
PP-2A	Protein phosphatase 2A	Протеїнфосфатаза-2A	Серин/треонінова протеїнфосфатаза
PP-2B	Protein phosphatase 2B	Протеїнфосфатаза-2B	Серин/треонінова протеїнфосфатаза
PP-2C	Protein phosphatase 2C	Протеїнфосфатаза-2C	Серин/треонінова протеїнфосфатаза
PPAR-γ	Peroxisome proliferators-activated receptor	Пероксисомальний ядерний рецептор-γ, що активується проліфераторами	–
PP-IP5	Ryphospho-inositolpentakisphosphate	Пірофосфоінозитолпентакісфосфат	Інозитолпірофосфат, утворюється за участю інозитолпірофосфатсинтази (також позначається як IP7)

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
(PP) ₂ -IP4	Dipyrophospho- inositol tetrakisphosphate	Дипірофосфо- інозитолтетракіс- фосфат	Інозитолпірофосфат, утворюється за участю інозитолпірофосфат- синтаз (також познача- ється як IP8)
PP-IP5Ks	Diphospho-inositol penta- kisphosphate kinases	Дифосфоінозитол- пентакісфосфат- кінази	Інозитолпірофосфат- синтази; також позна- чаються як IP7Ks
PPiPs	Inositol pyrophosphates	Інозитолпірофосфати	Похідні інозитолполі- фосфатів, що містять високоенергетичні пірофосфатні (дифос- фатні) групи
PRRs	Pattern recognition receptors	Рецептори, що розпізнають	Рецептори, залучені в розпізнання вірусної, бактеріальної тощо інфекції
PRS	Proline-rich sequence	Багата на пролін послідовність	Ділянка у складі білків
Prx	Peroxiredoxin	Пероксиредоксин	Антиоксидантні білки, що знижують вміст H ₂ O ₂ у клітинах шля- хом його відновлення
P-S ₂	–	–	Внутрішньомолеку- лярний дисульфід
PS-SG	–	–	Мішаний дисульфід – S-глутатіонований білок
PS-SP'	–	–	Міжмолекулярний дисульфід
PTB- domain	Від "phosphotyrosine binding domain"	PTB-домен (від "фосфотирозин- зв'язувальний домен"	Адаптерний домен у складі білків, що розпі- знає фосфорильований залишок тирозину
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Гомолог фосфатази і тензину	Фермент, що гідролізує фосфорильовані інози- толові ліпиди у 3-му положенні
PTKs	Protein tyrosine kinases	Тирозинові протеїнкінази	–
PTP	Permeability transition pore	Пора зміни проникності	Механізм, за яким здійснюється МРТ
PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B,	Протеїнтирозин- фосфатаза 1B	Цитозольна тирозинова протеїнфосфатаза

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
PTPMT1	PTP localized to the mitochondrion 1	Перша PTP, локалізована в мітохондрії	Фосфатаза подвійної специфічності
PTPs	Protein tyrosine phosphatase	Тирозинові протеїн-фосфатази	–
pTyr	Phosphotyrosine	Фосфорильований тирозин	Скорочено – фосфотирозин
RBD	Ras-binding domain	Ras-зв'язувальний домен	Домен p110a субодиниці PI3K
RIG1	Від "retinoic acid-inducible gene 1"	Від "ген 1, що індукується ретиноевою кислотою"	Білок, що кодується відповідним геном – представник цитозольних PRRs
<i>RING</i>	Really interesting new gene	Дійсно цікавий новий ген	Ген, що кодує відповідну ділянку деяких білків родини IAPs. Він надає цим білкам E3-убіквітинлігазної активності
RIP	Receptor interacting protein	Білок, що взаємодіє з рецептором	Протеїнкіназа, залучена у сигнальні шляхи TLRs
RNase L	–	РНКаза L	2',5'-олігоаденілатзалежна ендорибонуклеаза L
RNS	Reactive nitrogen species	Реактивні частки азоту	Активні форми азоту
ROS	Reactive oxygene species	Реактивні частки кисню	Активні форми кисню (АФК)
rPTKs	Receptor protein tyrosine kinases	Рецепторні тирозинові протеїнкінази	Інша назва – трансмембранні тирозинові протеїнкінази
rPTPs	Receptor protein tyrosine phosphatases	Рецепторні тирозинові протеїнфосфатази	–
R-SNO	–	–	S-нітрозотіоли
P-Tyr-NO ₂	–	–	Нітрований білок
RYRs	Ryanodine receptors	Ріанодинові рецептори	Кальцієві канали CP
SIPs	–	–	Рецептори до сфінгозин-1-фосфату, продукти генів EDGs
S6K	p70 S6 kinase	p70 S6 кіназа	Кіназа, що активується кіназою mTOR і посилює трансляцію мРНК; залучена в PI3K/ТкВ-сигнальний шлях
SAM	S-adenosyl methionine	S-аденозилметіонін	–

Продовження таб.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
SDK-1	Sphingosine-dependent kinase	Сфінгозинзалежна кінза	–
Ser	Serine	Серин	–
SERCA	Sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase	Ca ²⁺ -АТФаза СР	–
sGC	Soluble guanylyl cyclase	Розчинна гуанілатциклаза	–
SGK	Serum and glucocorticoid-inducible kinase	Сироватко- і глюкокортикоїд-індуцибельна кінза	Мішень PI3K
SH1-domain	Від "Src homology region 1"	SH1-домен – від "перша ділянка гомології Src"	Каталітичний протеїнкіназний домен
SH2-domain	Від "Src homology region 2"	SH2-домен – від "друга ділянка гомології Src"	Адаптерний домен у складі білків, що розпізнає фосфорильований залишок тирозину
SH3-domain	Від "Src homology region 3"	SH3-домен – від "третя ділянка гомології Src"	Адаптерний домен у складі білків, що сполучається з послідовностями мішені, багатими на пролін
SHIP	SH2-containing inositol(poly)phosphate-5-phosphatase	SH2-вмісні інозитол(полі)фосфат-5-фосфатази	Фермент, що гідролізує фосфорильовані інозитолові ліпіди у 5-му положенні
SHPs	Src homology region 2 domain-containing phosphatases	SH2-вмісні фосфатази	Цитозольні тирозинові протеїнфосфатази
Sph	Sphingosine	Сфінгозин	Сигнальна молекула
Sph-1-P	Sphingosine-1-phosphate	Сфінгозин-1-фосфат	Сигнальна молекула
Sph-1-P-lyase	Sphingosine-1-phosphate-lyase	Сфінгозин-1-фосфатліаза	Фермент метаболізму сфінголіпідів
SphK	Sphingosine kinase	Сфінгозинкіназа	Фермент обміну сфінголіпідів
SR	Scavenger receptors	Рецептори-"уловлювачі"	–
Src	Від "sarcoma"	Від "саркома"	Онкоген вірусу саркоми птахів і ссавців
ssRNA	Single stranded RNA	Одноланцюгова РНК	–
STATs	Signal transducers and activators of transcription	Сигнальні трансдуктори й активатори транскрипції	Транскрипційні фактори

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
Srxs	Sulfiredoxins	Сульфіредоксини	Білки, що відновлюють залишки цистеїнсульфінової кислоти у складі пероксиредоксинів
SUMO	Small ubiquitin-like modifier	Малий убіквітино-подібний модифікатор	Білок, що приєднується до білків-мішеней у реакції СУМОїлювання
SUR	Sulfonylurea receptor	Рецептор до сульфонілсечовини	Представники однієї з підродин АВС-транспортерів, локалізовані у клітинах підшлункової залози (SUR1; інша назва – АВСС8) і в клітинах серцевого і скелетного м'язів (SUR2, або АВСС9)
SIP	–	Сфінгозин-монофосфат	–
TAB-1,-2	Transforming growth factor- β -activated protein kinase-1,-2	Протеїнкінази-1,-2, що активуються трансформуючим фактором росту- β	Регулятори TAK-1
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1	Кіназа-1, що активується трансформуючим фактором росту- β	МАРККК, що залучається в активацію каскадів JNK та p38 та у інші сигнальні шляхи
TANK	TRAF family member-associated NF- κ B activator	Активатор NF- κ B, асоційований із членами родини TRAF	Регулятор TBK1
TAP	Transporter associated with antigen processing	Транспортер, асоційований з процесингом антигенів	Представники однієї з підродин АВС-транспортерів, інші назви – АВСВ2 (TAP1) та АВСВ3 (TAP2)
TBK1	TANK-binding kinase 1	Кіназа 1, що сполучена з білком TANK	Атипова (неканонічна) ІКК
TCPTP	T-Cell enriched PTP	РТР Т-клітин	Цитозольна тирозінова протеїнфосфатаза
TGF	Tumor growth factor	Фактор росту пухлини	–
Thr	Threonine	Треонін	–
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	TIR-доменвмісний адаптерний білок	Інша назва – Mal (<i>MyD88 adapter-like, подібний до адантера MyD88</i>)
TIR-domain	Toll/interleukin-1 receptor domain	Домен у складі Toll-та IL-рецепторів	TIR-домен

Продовження табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
TLRs	Toll-like receptors	Toll-подібні рецептори	Рецептори родини PRRs
TMD-domain	Transmembrane domain	Трансмембранний домен	Трансмембранна ділянка АВС-транспортера
TNF	Tumor necrosis factor	Фактор некрозу пухлин	–
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor	Рецептор фактора некрозу пухлини	–
TRADD	TNF receptor associated death domain protein	DD-вмісний білок, асоційований з рецептором TNF	Адаптерний білок
TRAFs	TNF receptor associated factors	Фактори, асоційовані з TNF-рецептором	Родина адаптерних білків
TRAM	TRIF-related adaptor molecule	TRIF-залежна адаптерна молекула	Адаптерний білок
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β factor	TIR-домєнвмісний адаптерний фактор, що індукує ІФ- β	Адаптерний білок
Trx	Thioredoxin	Тіоредоксин	Білок, залучений у відновлення дисульфідних зв'язків
TrxR	Thioredoxin reductase	Тіоредоксин-редуктаза	Фермент, залучений у відновлення окисненого тіоредоксину
TX	Thromboxane	Тромбоксан	Ейкозаноїд – продукт обміну арахідонової кислоти
Tyr	Tyrosine	Тирозин	–
Tyr-NO ₂	–	–	Нітротирозин
UPR	Unfolded Protein Response	Відповідь розгорнутих білків	Механізм реалізації ЕПР-стресу
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	Фосфопроєїн, що стимулюється вазодилаторами	Біологічний субстрат ПкG1
VDAC	Voltage-dependent anion channel	Потенціалзалежний аніонний канал	Аніонний канал – складова частина РТР, функціонування якого залежить від різниці потенціалів на мембрані
VDCC	Voltage-dependent calcium channels	Потенціалзалежні Ca ²⁺ -канали	–
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Фактор росту ендотелію судин	–

Закінчення табл.

Термін	Розшифрування	Переклад	Примітки
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor receptor	Рецептор фактора росту ендотелію судин	–
VH1	Vaccinia virus H1 protein	Білок H1 вірусу коров'ячої віспи	Перший ідентифікований фермент з активністю фосфатаз подвійної специфічності (DUSPs)
WW-domain	–	WW-домен	Домен із двома консервативними залишками триптофану (W)
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	X-сполучений інгібітор апоптозу	Білок із родини інгібіторів апоптозу IAPs

ВСТУП

Наявність клітинної мембрани була встановлена ще в XIX ст. Це доводили досліди, у яких клітини розміщували в розчинах із різним осмотичним тиском і спостерігали або розбухання (у гіпотонічному розчині), або, навпаки, зморщування клітин (якщо розчин був гіпертонічний), що свідчило про присутність на поверхні клітини певного обмежувального її утворення.

Перші відомості про хімічний склад і молекулярну організацію мембран були отримані Ч. Овертоном у 1895 р. Він звернув увагу на вибіркочну проникність клітинної мембрани, точніше, на те, що через неї у клітини легко потрапляють ліпофільні молекули, і висловив гіпотезу, згідно з якою до складу мембран входять ліпіди.

У 1925 р. було отримано експериментальні докази того, що в основі біомембран лежить ліпідний бішар. Відповідні досліди проводили на "тінях" еритроцитів – структурах, що утворюються при розміщенні цих клітин у прісній воді: унаслідок надходження води за градієнтом концентрації еритроцити спочатку розбухають, а надалі їхні мембрани розриваються із втратою внутрішньоклітинного вмісту. Із таких "тіней" – прозорих плазматичних мембран – у 1923 р. І. Гортер та А. Грендель за допомогою ацетону екстрагували ліпіди, які потім помістили на поверхню води й отримали на ній ліпідний шар товщиною в одну молекулу. Вимірювання площі цього шару показало, що вона є вдвічі більшою за площу всіх "тіней" еритроцитів, із яких були виділені ліпіди. Це дало змогу висловити гіпотезу, згідно з якою ліпіди в мембранах розташовуються у два шари. У цей же період було встановлено, що поверхневий натяг клітинної мембрани є значно меншим, ніж чистої ліпідної плівки, і додавання до останньої білка сприяє зниженню даного показника. У подальшому хімічний аналіз підтвердив наявність білкових молекул у біологічних мембранах. Наступні дослідження показали, що не лише плазматична мембрана, але й ендомембрани мають подібний хімічний склад.

Перша класична модель будови мембрани, згідно з якою вона представлена тришаровою структурою (білок-ліпід-білок), була запропонована на початку 30-х рр. Д. Даніеллі й Н. Доусоном.

Дана модель "сендвіча" набула особливого визнання в 50-ті рр., оскільки підтверджувалася даними електронної мікроскопії, що справді виявляли в межах біологічної мембрани три чіткі шари: два темні по краях і ширший світлий – між ними. Проте результати подальших досліджень, зокрема виявлення можливості транспорту через біологічні мембрани гідрофільних сполук, нездатних перетинати безперервний ліпідний бішар, указували на суттєві недоліки моделі Даніелі – Доусона та передбачали наявність у мембрані білкових молекул, спроможних сприяти транспорту нерозчинних у ліпідах сполук.

У 1972 р. С. Сінгером і Г. Ніколсоном було запропоновано рідинно-мозаїчну модель, основу якої теж становить ліпідний бішар, але при цьому мембранні білки не суцільно покривають зовнішню та внутрішню поверхні мембрани, а занурені в її товщу, часом пронизуючи її наскрізь. Підтвердження цієї гіпотези були отримані при вивченні структури біологічних мембран із застосуванням методу заморожування-сколювання.

Набагато пізніше, а саме в 1997 р., К. Зимонс виявив, що і ліпідний бішар не є однорідним утворенням. Ним було відкрито існування ліпідних рафтів – специфічних ділянок плазматичної мембрани, залучених у внутрішньоклітинну сигналізацію й ендоцитоз. Надалі виявилося (Р. Андерсон, 1998), що такі самі функції виконують і інші мембранні утворення, споріднені до ліпідних рафтів – кавеоли, які вперше були ідентифіковані Дж. Паладе (1953) та Е. Ямада (1955) як 50–100 нм вгнутості плазматичної мембрани. Для молекулярної медицини ці утворення стали ланкою, якої не вистачало для розуміння механізмів розвитку багатьох захворювань – адже низка вірусів (зокрема, віруси СНІДу, кору, грипу) проникають у клітину саме через ліпідні "плоти".

Поряд із досягненнями у вивченні особливостей структури плазматичної та внутрішньоклітинних мембран, удосконалювалися й методи їхнього дослідження, унаслідок чого було відкрито механізми, залучені в реалізацію функцій цих компонентів клітини. Тепер відомо, що біологічні мембрани причетні до широкого кола різноманітних фізіологічних і біохімічних процесів: транспорту речовин, здійснення міжклітинних взаємодій, зякорювання цитоскелета, перетворення енергії, сприйняття й передачі позаклітинних сигналів тощо.

У світовій біологічній літературі термін "передача сигналу" ("*signal transduction*") уперше був вжитий наприкінці 70-х рр. У низці ранніх публікацій поряд із ним використовували й інші вирази – "сигнальна трансмісія" ("*signal transmission*") і "сенсорна трансдукція" ("*sensory transduction*"). Виникнення достатньо молоді науки про шляхи внутрішньоклітинної сигналізації зумовили потужні дослідження механізмів передачі сигналів від рецепторів, відкриття G-білків і сигнальних властивостей циклічних нуклеотидів та похідних мембранних фосфоліпідів.

Так, у 1957 р. Е. Сазерленд показав, що ініційоване адреналіном розщеплення глікогену до глюкози в гепатоцитах передбачає утворення вторинного посередника – циклічного аденозинмонофосфату, який став першим описаним вторинним месенджером. За ці дослідження в 1971 р. вченому було присуджено Нобелівську премію в галузі фізіології й медицини. Надалі був ідентифікований ще один внутрішньоклітинний посередник – циклічний ГМФ (Дж. Хардман, 1962 р.). Деталі цАМФ- і цГМФ-залежних сигнальних шляхів пізніше прояснили М. Родбелл та А. Гілман.

У 1970 р. М. Родбелл, вивчаючи ефект глюкагону на мембранні рецептори гепатоцитів, відмітив, що ГТФ сприяє стимуляції певних мембранних білків, що потужно впливає на метаболізм клітини, і висловив гіпотезу, згідно з якою ці молекули, котрі отримали назву G-білків, є трансдукторами, що сприймають сигнали від активованих глюкагоном рецепторів і передають їх у клітину. За відкриття G-білків та їхньої ролі у внутрішньоклітинній сигналізації М. Родбеллу й А. Гілману в 1994 р. було присуджено Нобелівську премію.

Наступним досягненням у цій галузі стала ідентифікація вторинних месенджерів фосфоінозитидного шляху, похідних фосфатидилінозитол-4,-5-дифосфату – діацилгліцеролу та інозитол-1,4,5-трифосфату (Г. Стреб, 1983 р.; М. Беррідж, 1984 р.). Одночасно було встановлено, що всі ці сигнальні сполуки виконують свої регуляторні функції, стимулюючи Ca^{2+} -залежні процеси, спричиняючи фосфорилування білків або ініціюючи інші події, наслідком чого стає певна відповідь клітини.

Останніми десятиріччями вченими зроблено багато відкриттів, що поглиблюють наші уявлення про реалізацію основних сигнальних каскадів; зокрема, виявлено нові мішені класичних вторинних посередників – цАМФ, цГМФ, іонів кальцію, інози-

тол-1,4,5-трифосфату, діацилгліцеролу, та доведено конвергенцію цих сигнальних шляхів. Поряд із цим ідентифіковано ряд ендогенних біологічно активних сполук, які за своєю здатністю синтезуватися у клітині у відповідь на певний стимул і надалі залучатися в регуляцію функцій клітинних білків та модулювати перебіг сигнальних каскадів клітини теж можуть бути віднесені до вторинних месенджерів.

Зокрема, при вивчення шляхів катаболізму інозитол-1,4,5-трифосфату було виявлено, що продукти його фосфорилування – інші інозитолполіфосфати – теж мають сигнальні властивості, а в середині 90-х років ХХ ст. були ідентифіковані найскладніші за структурою представники фосфорильованих інозитолів – інозитолпірофосфати. Подальші дослідження показали, що ці сполуки залучені в численні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи й регулюють найрізноманітніші процеси, включаючи гомеостаз кальцію, транскрипцію, експорт мРНК із ядра.

У 1999 р. С. Спігель з колегами виявили сигнальні властивості інших ліпідних сполук – похідних сфінголіпідів – кераміду, керамід-1-фосфату, сфінгозину та сфінгозин-1-фосфату, а також установили існування так званого "сфінголіпідного реостата" – певного співвідношення їх у клітині, яке визначає її долю (проліферація або зупинка клітинного циклу та апоптоз).

Досліджуючи ефекти нуклеотидів на вивільнення кальцію в гомогенаті яйцеклітин морського їжака, у 1987 р. Х. Лі з групою вчених відкрили одразу два Ca^{2+} -мобілізуючі вторинні посередники – циклічну АДФ-рибозу й NAADP. На сьогодні відомо, що ці обидві сполуки є потужними кальцієвивільнювальними агентами, мішенями яких є ріанодинові рецептори саркоплазматичного ретикулула (для цАДФР) і гомологічні їм структури в лізосомах та інших внутрішньоклітинних везикулах (для NAADP).

Того ж року Р. Фачготт, Л. Ігнерро, Ф. Мурад і С. Монкада ідентифікували давно відомий релаксуючий фактор, що виробляється ендотелієм (*endothelium-derived relaxing factor, EDRF*) як оксид азоту, що генерується в організмі людини за фізіологічних умов. На цей час встановлено, що NO як вторинний месенджер включається в численні фізіопатологічні функції: у релаксацію гладенької мускулатури, нейротрансмісію, процеси запам'ятовування, в імунну регуляцію, диференціювання клітин, тканинний морфогенез,

цитотоксичність, клітинну загибель тощо. Ця сполука відіграє головну роль у таких патологічних феноменах, як септичний шок, неспецифічний захист клітин організму-хазяїна від пухлин і внутрішньоклітинних патогенів, гострі та хронічні нейродегенеративні захворювання, деструкція β -клітин підшлункової залози при діабеті, відторгнення трансплантата. Директор інституту нейробиології Медичної Школи Дж. Хопкінса С. Снайдер відмітив: "За свої 25 років роботи в нейробиології я не знав іншої молекули, яка б так активно впливала на фізіологічні та патологічні функції організму". У 1992 р. NO був названий журналом "Science" "молекулою року", а в 1998 р. Р. Фачотту, Л. Ігнерро та Ф. Мураду за роботу, що привела до відкриття NO як біологічного медіатора, який продукується у клітинах ссавців, було присуджено Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини.

Вивчаючи ферментативну активність гемоксигенази – ферменту, залученого у катаболізм гему – М. Барінага (1993 р.) виявив, що одним із продуктів даної реакції є монооксид вуглецю. У цьому ж році С. Снайдер та А. Верма передбачили існування можливої фізіологічної ролі цієї сполуки, і вже на 2005 р. дослідниками Р. Ванг і Л. Ву було зібрано багато даних, які свідчили про наявність у монооксиду вуглецю антизапальних, антиапоптозних й антипроліферативних властивостей, а також отримано низку даних про механізми їхніх сигнальних функцій.

У 90-х рр. ХХ ст. було ідентифіковано шляхи ферментативного генерування (незалежні дослідження М. Стіпанюка, П. Еріксона, М. Свароопа) і виявлено сигнальні властивості (К. Абе, Г. Кімура) ще однієї ендогенної молекули – сульфїду водню. Перші дані про біологічну роль фізіологічних концентрацій сульфїду водню в організмі стосувалися його впливу на нервову і судинну системи через модуляцію NMDA-рецепторів і K_{ATP} -каналів. Пізніше було виявлено цито- і кардіопротекторні властивості H_2S у цих системах, а також відмічено ефекти сульфїду водню на майже всі системи органів, його здатність регулювати вивільнення інсуліну, процеси поширення запалення, ангіогенез.

Для узагальненої назви класу ендогенних газоподібних сполук, що генеруються в організмі у відповідь на низку стимулів і мають сигнальні властивості, – оксиду азоту, монооксиду вуглецю та сульфїду водню – у 2002 р. Р. Ванг із колегами вперше використав термін "газотрансмітери".

З початку 1990-х рр. було отримано багато підтверджень того, що сигнальні властивості притаманні й таким молекулам, як активні форми кисню. На сьогодні відомо, що вони залучаються в активацію низки про- та антиапоптозних транскрипційних факторів, впливають на MAP-кіназні каскади, протеїнкінази, регулюють активність мембранних рецепторів і транспортних систем, пригнічують протеїнофосфатазну активність тощо. Доказом залучення цих сполук до процесів внутрішньоклітинної трансдукції стало виявлення шляхів ендогенного утворення активних форм кисню, зокрема, відкриття у 1999 р. ферменту, здатного генерувати супероксидний аніон-радикал – фагоцитарної НАДФН-оксидази. Таким чином, не лише токсичні у великих дозах газотрансмітери, але й активні форми кисню, що в надлишку пошкоджують компоненти клітин і призводять до їхньої загибелі, можуть виступати в ролі сигнальних молекул (В. Дреге, 2001 р.; С. Ри, 2003 р. – "ROS і H₂O₂ – не тільки "молекули загибелі", а й "молекули життя").

Наприкінці ХХ ст. також було відкрито сигнальні механізми, залучені в реалізацію відповіді клітини на вплив численних патогенів – вірусів, бактерій тощо. Цьому посприяло виявлення сполук із антивірусними, антибактеріальними, цитотоксичними, цитотоксичними й імуномодулюючими властивостями – інтерферонів, а також рецепторів, здатних розпізнавати компоненти патогенних збудників – PRRs.

Передумовою для відкриття інтерферону стали експерименти японських дослідників Я. Нагано та Я. Койїма, які при пошуку вакцини від стафілококу виявили, що у клітинах шкіри кроля, попередньо інокульованих інактивованим ультрафіолетом вірусом, після реінфекції живим вірусом розмноження останнього пригнічується. Вони висловили гіпотезу, що причиною цього є певний інгібуючий фактор, спробували його ідентифікувати та в 1954 р. опублікували свої відкриття у французькому журналі "Journal de la Société de Biologie". Через три роки британський вірусолог А. Ісаакс і шведський дослідник Дж. Лінденманн показали ефект інтерференції, спричинений вірусом грипу, інактивованим температурою, на ріст живого вірусу грипу у клітинах курячого зародка. Для цього клітини інкубували з інактивованим вірусом грипу, нездатним до реплікації; супернатант, отриманий після диференційного центрифугування лізату цих клітин, увели в інші – нативні

клітини зародка, після чого інфікували останні життєздатним вірусом грипу. Виявилось, що вірус втратив здатність до росту в цих клітинах, отже, сполука, що вивільнилася із клітин, оброблених неактивним вірусом, захищала клітини від наступної інфекції. У 1957 р. вони опублікували свої результати в науковому журналі "Nature", використовуючи термін "інтерферон" (від "інтерференція" – несприйнятливість клітин до повторного зараження вірусом), і нині цей специфічний інтерферуючий агент відомий як інтерферон I типу.

Потім, досліджуючи механізми генерування інтерферону в клітинах, було ідентифіковано структури, здатні розпізнавати компоненти патогенів – PRRs, зокрема Toll-подібні рецептори. Назва цих білків пояснюється їхньою структурною гомологією з білком, що кодується Toll-геном, ідентифікованим у 1985 р. К. Нюсслейн-Фольхард у *Drosophila*. Тепер відомо, що представники указаної родини еволюційно консервативних PRRs відіграють ключову роль у сприйнятті мікроорганізмів і відповідають за ініціювання відповіді вродженого імунітету як при інфекційних, так і неінфекційних захворюваннях. Пізніше було детально охарактеризовано сигнальні шляхи, якими активація цих рецепторів приводить до генерування ураженими клітинами молекул інтерферону, а також каскади, якими інтерферони реалізують свої ефекти.

Спадкові й набуті порушення функціонування мембранних транспортних систем, розлади в регуляції внутрішньоклітинних сигнальних каскадів та пов'язані з ними надмірна активація або пригнічення білків-ферментів і транскрипційних факторів залучаються у патогенез широкого кола захворювань, зокрема цукрового й нецукрового нефрогенного діабету, муковісцидозу, серцево-судинних, онкологічних, нейродегенеративних розладів тощо. Тому, крім суто наукової, теоретичної зацікавленості дослідників, на новітні відкриття у галузі досліджень функцій біологічних мембран та механізмів внутрішньоклітинної сигналізації чекають лікарі-онкологи, невропатологи, кардіологи, інфекціоністи та інші фахівці медичного профілю. Адже це дозволить їм поповнити свої знання щодо причин виникнення і розробити нові, більш досконалі методи ранньої діагностики й терапії цих захворювань.

Розділ 1

БУДОВА І ФУНКЦІЇ

БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

1.1. Хімічна будова біологічних мембран

Біологічні мембрани є одними із найважливіших структурних утворень клітини. Плазматична мембрана (ПМ) і комплекс внутрішньоклітинних мембран ендоплазматичного ретикулула, апарату Гольджі, мембран ядер, мітохондрій, лізосом, перокси-сом, піно- і фагосом окрім суто механічної, бар'єрної функції, залучені в безліч фізіологічних і біохімічних процесів, притаманних відповідним органелам і клітині загалом.

Перші спроби побудувати молекулярну модель біологічних мембран були зроблені ще до того, як у середині 1950-х років цю структуру вперше дослідили під електронним мікроскопом. Так, у 1915 р. було виділено плазматичну мембрану еритроцита й доведено, що до її складу входять ліпідні й білкові компоненти. Десятьма роками пізніше два датські вчені висунули гіпотезу, згідно з якою мембрани є фосфоліпідними бішарами. У 1935 р. Девсон та Даніелі запропонували "**модель сандвіча**", відповідно до якої фосфоліпідний бішар біологічної мембрани з обох боків укривають гідрофільні білки. Коли дослідники вперше використали електронний мікроскоп для вивчення структури клітини (1950), ця модель на перший погляд була підтверджена. Але пізніше – наприкінці 1960-х – численні групи вчених виявили в ній низку недосконалостей. Так, було показано, що біологічні мембрани з різних клітин з різними функціями відрізнялися за своєю структурою та хімічним складом. Ще серйозніші недоліки моделі сандвіча виявили після детального аналізу мембранних білків: на відміну від протеїнів, розчинених у цитозолі,

мембранні білки було охарактеризовано як амфіпатичні, і при розміщенні на поверхні фосфоліпідного бішару їхні гідрофобні ділянки мали б контактувати з водним середовищем. Узявши до уваги зазначені факти, Сенгер та Ніколсон у 1972 р. запропонували іншу – **рідинно-мозаїчну модель** – згідно з якою гідрофільні ділянки мембранних білків і фосфоліпідів максимально контактують із цитозолем та позаклітинною рідиною, тоді як їхні гідрофобні частини – з неполярним середовищем, а сама мембрана є "мозаїкою" із білкових молекул, вбудованих у фосфоліпідний бішар.

Отже, згідно із сучасними поглядами, основними компонентами біологічних мембран є ліпіди (фосфо-, гліколіпіди, холестерол), білки і вуглеводи (останні у вільному вигляді не зустрічаються, а входять до складу гліколіпідів і глікопротеїнів, наприклад, рецептори є глікозильованими білками).

В основі структури біологічних мембран лежить фосфоліпідний бішар товщиною близько 5 нм, непроникний для молекул води, побудований таким чином, що гідрофобні жирнокислотні хвости фосфоліпідних молекул розташовані всередині, а гідрофільні "голівки" – ззовні (рис. 1.1).

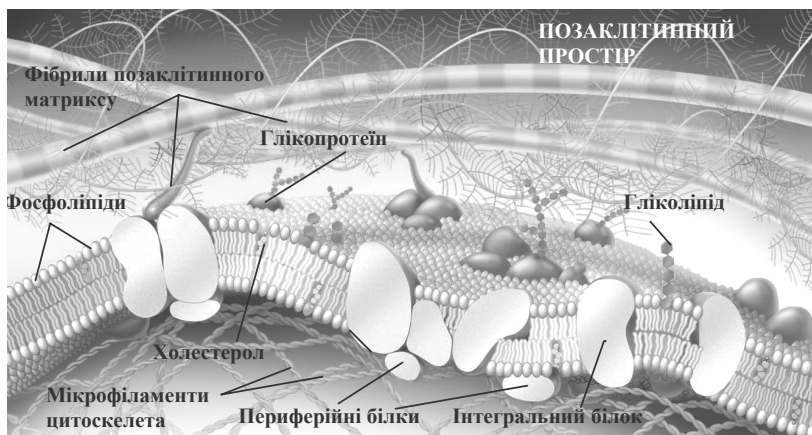


Рис. 1.1. Рідинно-мозаїчна структура плазматичної мембрани

Холестерол міститься в обох моношарах біологічних мембран – чим більший його вміст, тим жорсткішою буде мембрана.

При цьому бішар є динамічним утворенням – *плинність мембран* дозволяє фосфоліпідам і білкам підлягати латеральній дифузії в межах одного шару ПМ. До того ж, молекули фосфоліпідів здатні до обертальних рухів навколо власної осі, а їхні жирнокислотні хвости – до коливальних (сегментарних) рухів (найрухливішими при цьому є дистальні ділянки хвостів).

Теоретично можливими є і "фліп-флоп" переходи ліпідів – їхнє переміщення з одного шару в інший; хоча насправді це відбувається нечасто й дуже повільно внаслідок того, що гідрофільна голівка фосфоліпіду має перетнути велику гідрофобну ділянку бішару, утворену "хвостами". Тому повний перехід однієї молекули фосфоліпіду з одного моношару в інший становить кілька діб. Проте існує АТФ-залежний фермент фліпаза, який полегшує і прискорює фліп-флоп переходи (за його дії час переміщення фосфоліпіду зменшується до кількох секунд). Активні фліпази відповідають за створення і підтримку ліпідної асиметрії мембран. Активація фліпаз можлива також за низки специфічних процесів, які відбуваються у клітинах – наприклад, таке явище спостерігається, коли клітина стає на шлях апоптозної загибелі. У цьому випадку фліпазозалежна поява на зовнішньому боці мембрани залишків фосфатидилсерину є маркерним сигналом для сусідніх клітин і макрофагів, який спричиняє поглинання апоптозної клітини. Крім того, на візуалізації фосфатидилсерину в зовнішньому моношарі мембрани за допомогою флуоресцентних барвників засновано один із методів детекції клітин, що стали на шлях апоптозної загибелі.

1.1.1. Ліпідний склад біологічних мембран

Згідно із сучасною класифікацією, усі **фосфоліпіди** за наявністю в їхній структурі спирту гліцеролу або сфінгозину поділяються на дві підгрупи – гліцерофосфоліпіди й сфінгофосфоліпіди.

Гліцерофосфоліпіди – це похідні **фосфатидної кислоти**, до складу яких входять вищі жирні кислоти із парною кількістю атомів вуглецю – насичені й ненасичені (рис. 1.2.; табл. 1.1).

Вони, у свою чергу, діляться на 6 підгруп – фосфатидилхоліни, фосфатидилетаноламіни, фосфатидилсерини, фосфатидилінозитолі, кардіоліпіни, плазмалогени. Найпоширенішими із них є перші чотири (рис. 1.3.)

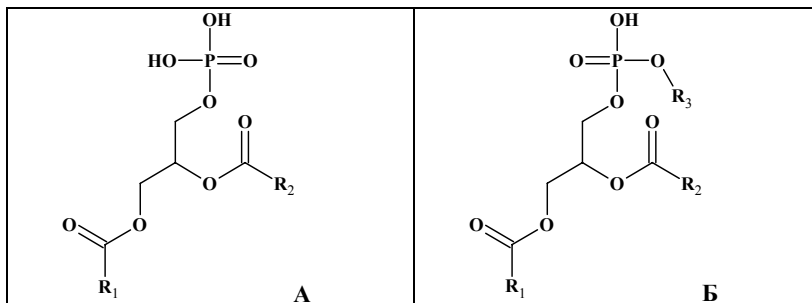


Рис. 1.2. Структура фосфатидної кислоти (А) і загальна формула гліцерофосфоліпідів (Б)

Таблиця 1.1. Жирні кислоти – складові гліцерофосфоліпідів

Назва жирної кислоти	Формула
Лауринова	C _{12:0}
Міристинова	C _{14:0}
Пальмітинова	C _{16:0}
Маргарінова	C _{17:0}
Стеаринова	C _{18:0}
Арахідова	C _{20:0}
Бегенова	C _{22:0}
Лігноцеринова	C _{24:0}
Пальмітоолеїнова	C _{16:1(9)}
Олеїнова	C _{18:1(9цис)}
Елаїдинова	C _{18:1(9транс)}
Вакценова	C _{18:1(7)}
Невронова	C _{24:1(9)}
Лінолева	C _{18:2(9,12)}
Ліноленова	C _{18:3(9,12,15)}
Арахідонова	C _{20:4(5,8,11,14)}
Клупанодонова	C _{22:5(7,10,13,16,19)}
Докозагексаєнова	C _{22:6(4,7,10,13,16,19)}

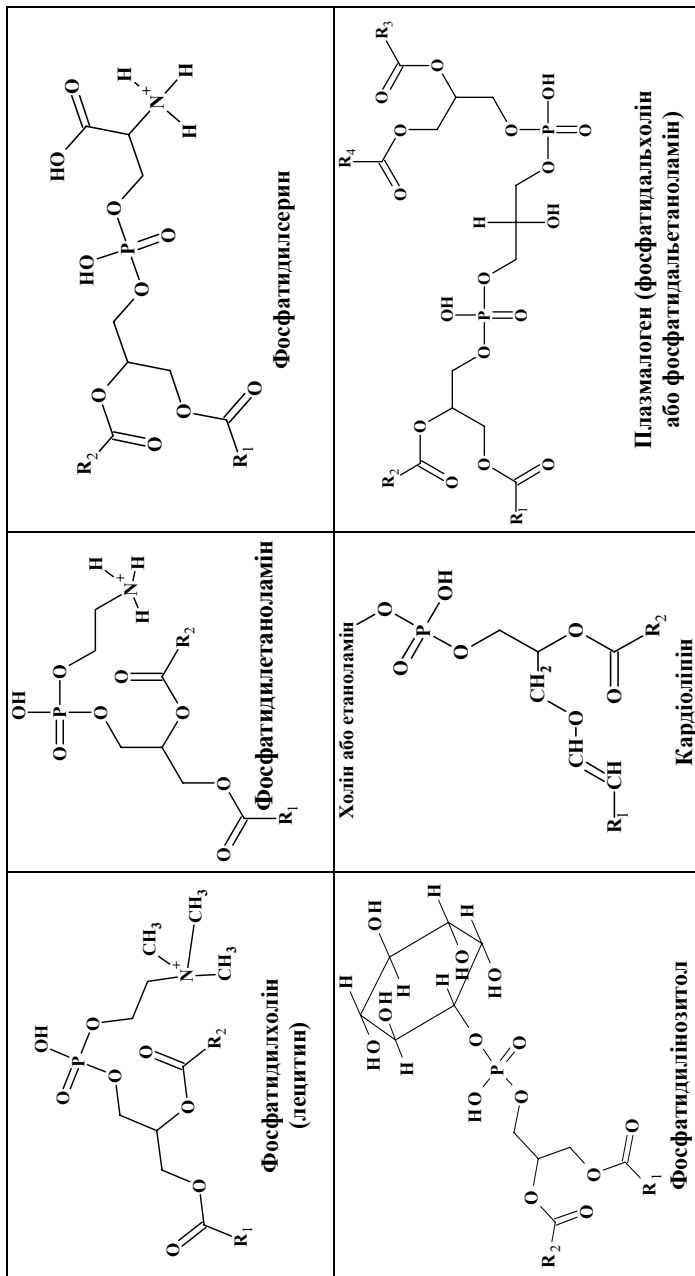


Рис. 1.3. Класи гліцерофосфоліпідів

В основі молекули **сфінгофосфоліпідів** лежить не залишок гліцеролу, а інший спирт – сфінгозин. Основним представником сфінгофосфоліпідів є сфінгомієлін (рис. 1.4).

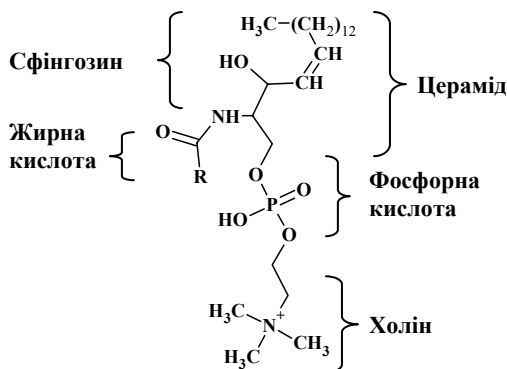


Рис. 1.4. Структура сфінгомієліну

Усі фосфоліпіди – як гліцеро- так і сфінго- – є амфідільними сполуками (рис. 1.5).



Рис. 1.5. Амфідільні властивості фосфоліпідів

Серед фосфоліпідів, із яких побудований бішар, виділяють чотири головні й один мінорний. Так, у зовнішньому шарі плазматичної мембрани клітин ссавців містяться фосфатидилхолін і сфінгомієлін, у внутрішньому – фосфатидилетаноламін і фосфатидилсерин, а також мінорний компонент – фосфатидилінозитол. Фосфатидилсерин і фосфатидилінозитол несуть негативний заряд, що надає відповідного заряду і всьому внутрішньому шару плазматичної мембрани.

Гліколіпіди становлять близько 2 % ліпідів плазматичної мембрани і містяться виключно в її зовнішньому шарі. Ця група ліпідів, подібно до фосфоліпідів, за наявності у своїй будові залишку гліцеролу або сфінгозину теж поділяється на дві підгрупи: гліцерогліколіпіди й сфінгогліколіпіди [Богач П. Г. и др.].

Гліцерогліколіпіди, на відміну від гліцерофосфоліпідів, у 3-му положенні гліцеролу містять не залишок фосфорної кислоти, а залишок вуглеводу, наприклад галактози або глюкози. Вони поширені у синьозелених водоростей і ціанобактерій, а також зустрічаються у хлоропластах (зокрема, діацилгалактозилгліцерол).

Сфінгогліколіпіди містять керамід (керамідом називається сполука, утворена спиртом сфінгозином і жирною кислотою) та один чи кілька залишків моносахаридів. Найпростіші з них – **цереброзиди**, скажімо, галактозилцерамід (галактоцереброзид) і глюкозилцерамід (глюкоцереброзид). Найскладнішу будову мають **гангліозиди** – їх можна розглядати як похідні цереброзидів, що мають один чи кілька залишків сірчаної кислоти (у людини – N-ацетилнейрамінової), а замість одного залишку моносахариду – олігосахарид. Також є **сульфоцереброзиди** (або сульфатиди – складні ефіри цереброзиду й сірчаної кислоти; зв'язок – через третій атом вуглецю гексози), **глобозиди** (або керамідполігексозиди), які в молекулі мають не один залишок моносахариду, а два і більше. Структуру основних класів сфінгогліколіпідів наведено на рис. 1.6.

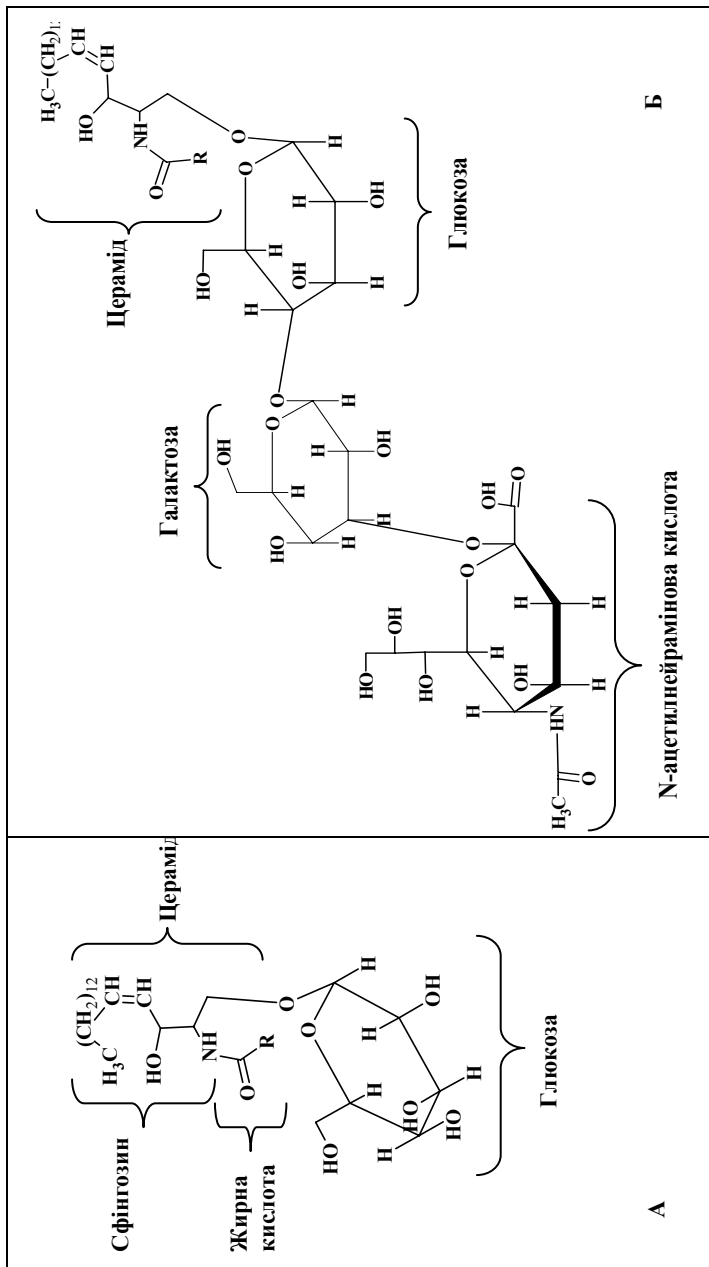


Рис. 1.6. Структура сфінголіпідів (А – глюкоцереброзид, Б – гангліозид)

На ще один ліпідний компонент мембран – **холестерол** – у середньому припадає до 30 % усіх ліпідів плазматичної мембрани ссавців, ним обидва моношари мембрани збагачені приблизно рівною мірою. Високий вміст холестеролу робить мембрану більш жорсткою, а низький його вміст збільшує плинність (рис. 1.7).

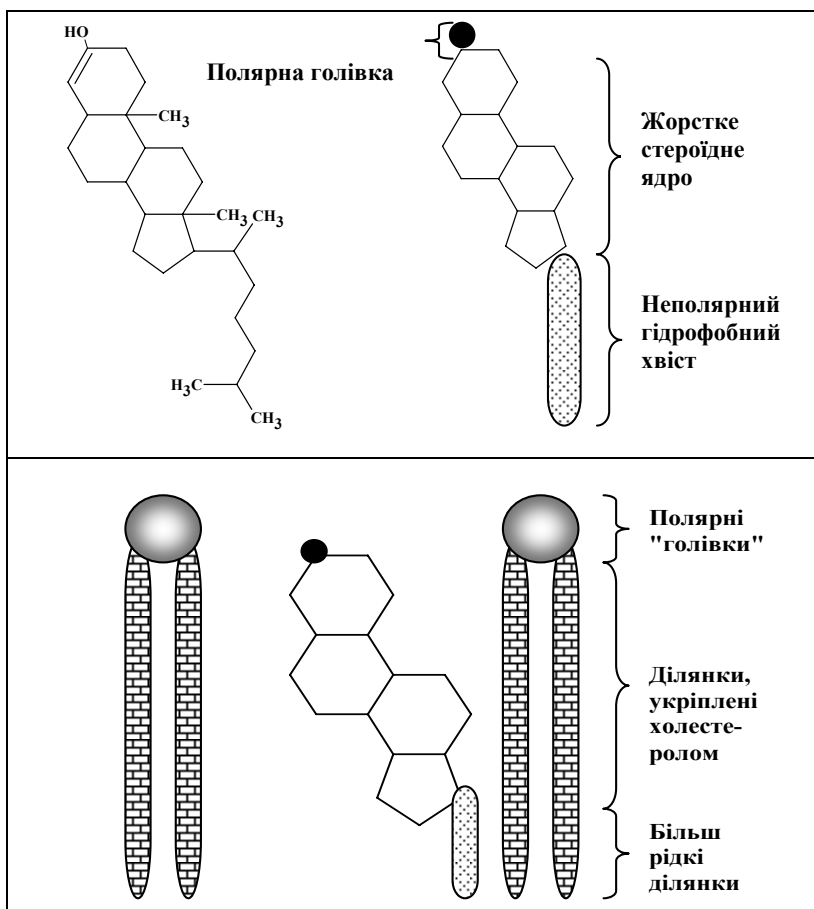
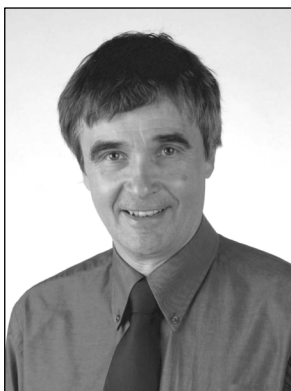


Рис. 1.7. Структура холестеролу та схема його залучення у побудову біологічних мембран

Мембрани організмів різних таксономічних груп можуть доволі сильно відрізнятися за ліпідним складом. Наприклад, мембрана *E. coli* містить головним чином фосфатидилетаноламін. Холестерол, навпаки, зовсім відсутній у мембранах бактерій, а в мітохондріях міститься в дуже низьких концентраціях. Крім того, певною мірою відрізняються за фосфоліпідним складом мембрани різних органел клітини (зокрема, у мембранах мітохондрій відсутній сфінгомієлін), а також мембрани різних типів клітин одного і того ж організму. Так, найбільше гліколіпідів (особливо цереброзидсульфатів) міститься в мієліновій оболонці та плазматичній мембрані мікрроворсинок кишечника. Менш функціонально активні мембрани містять більше ліпідів (наприклад, мієлін – до 80 % ліпідів і лише один білок ліпофілін), тоді як функціонально активніші мембрани – більше білків. Це пояснюється тим, що функціональна активність мембрани прямо пропорційна вмісту в ній ферментів, які представлені простими або складними протеїнами.

Міноними ліпідними компонентами мембран є токоферолі, убіхінони та інші хінони, 7-кетохолестерол, ретинол, діацилгліцерол, моноацилгліцерол, вільні жирні кислоти, зокрема арахідонова – попередник ейкозаноїдів.

У 1997 р. німецький учений Кай Зимонс висунув "**теорію ліпідних рафтів**".



Кай Зимонс

Головна ідея Зимонса полягає в тому, що певні ділянки мембрани самоорганізовані в багаті на холестерол рафти – "плоти", що є щільнішими, ніж інші ділянки, і здатні вільно рухатися в оточуючих їх ліпідах. Залежно від подій, які відбуваються із клітиною, ці "плотики" можуть збиратися у великі платформи, і тоді молекули білків, які до цього містилися на різних "плотах", набувають здатності зустрічатися та взаємодіяти.

За своєю структурою ліпідний рафт (англ. *lipid raft* – ліпідний плот) є мікродоменом ліпідного бішару ПМ, що багатий на холестерол,

сфінголіпіди і насичені фосфоліпіди (звідси й асоціація із ділянкою щільноупакованого ліпиду, що "плаває" на поверхні "рідко-го" фосфоліпиду) (рис. 1.8).

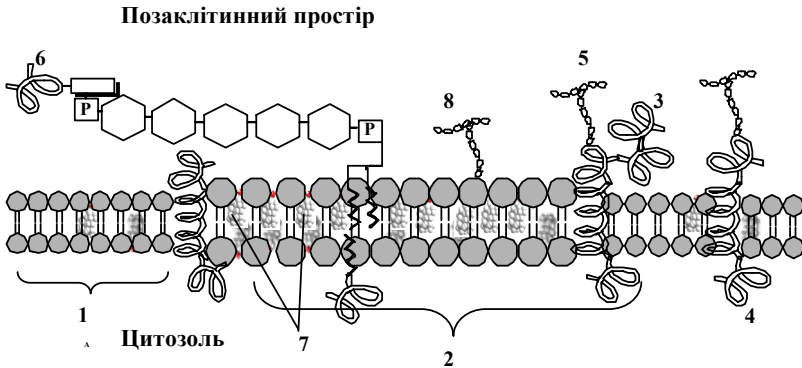


Рис. 1.8. Структура ліпідного рафту: 1 – ліпід у рідкій неупорядкованій фазі, що оточує щільно упакований ліпідний рафт (2); 3 – трансмембранний білок, сполучений із ліпідним рафтом; 4 – інтегральний білок-глікопротеїн клітинної мембрани поза рафтом; 5 – олігосахаридні залишки на білку рафту (глікопротеїн); 6 – GPI-заякорений білок; 7 – холестерол; 8 – олігосахаридні залишки на ліпідах (гліколіпід)

В утворенні таких мікродоменів вирішальну роль відіграють міцні контакти між стероїдним кільцем холестеролу й залишком кераміду у складі сфінголіпідів [Fantini J. et al.].

Ліпідний рафт, відносно нерозчинний в оточуючих його ліпідах, є достатньо гетерогенною і нестабільною структурою із розмірами 50–200 нм. Вбудовування специфічних мембранних білків у ліпідний рафт спричиняє його стабілізацію, а наступне зв'язування лігандів із рецепторами або гліко-сфінголіпідами, розташованими у таких рафтах, запускає передачу внутрішньоклітинного сигналу.

Ліпідні рафти й кавеоли багаті на білки, що відіграють провідну роль у сигнальній трансдукції. Серед численних білків, виявлених у ділянках ліпідних рафтів, є **GPI-заякорені білки** (*GPI* – від *glycosylphosphatidylinositol*, глікозилфосфатидиліно-

зитол), сполучені із зовнішнім моношаром ПМ; **трансмембранні білки** (різноманітні мембранні рецептори, іонні канали, обмінники й транспортери); **подвійно ацильовані білки** (білки, молекули яких підлягли двом посттрансляційним модифікаціям – пальмітилюванню й ацетилюванню), сполучені із внутрішнім моношаром ПМ (наприклад, тирозинові протеїнкінази родини Src); **холестерол-сполучені протеїни** та низка інших білків (табл. 1.2).

Таблиця 1.2. Білки, асоційовані з ліпідними рафтами, та їхні функції

Білки	Функції
GPI-заякорені білки	Численні сигнальні механізми
Флотиліни	Поглинання холерного токсину й ендоцитоз GPI-заякорених білків
Тирозинові протеїнкінази родини Src	Фосфорилування білків за залишками тирозину
Рецептори до епідермального фактора росту (<i>epidermal growth factor receptors, EGFR</i>)	Зв'язує такі ліганди, як епідермальний фактор росту (<i>epidermal growth factor, EGF</i>) та трансформуючий фактор росту (<i>transforming growth factor α, TGFα</i>)
Рецептори до тромбоцитарного фактора росту (<i>platelet derived growth factor receptors, PDGFR</i>)	Регулюють клітинну проліферацію, диференціювання, ріст і розвиток клітин
Рецептори до ендотеліну	Гомеостаз кальцію
Тирозинова протеїнфосфатаза Surp	Сигнальна трансдукція, зв'язується з активованим PDGFR
Білок-2, зв'язаний із рецепторами фактора росту	Сигнальна трансдукція, проліферація численних типів клітин
MAP-кінази	Експресія генів, мітоз, диференціювання, проліферація, виживання або апоптоз клітин
Протеїнкіназа С	Фосфорилування ОН-груп залишків серину і треоніну у складі білків та контроль функцій останніх

Ліпідні рафти стійкі до обробки неіонним детергентом Тритоном X-100 (підпідрозд. 1.1.2) за низької температури (+4°C) – тому їх ще називають "детергент-нерозчинні мембрани" (*detergent-*

insoluble membranes, DIMs) або "детергент-резистентні мембрани" (*detergent-resistant membranes, DRMs*). При цьому ліпідна мембрана, представлена рідкою неупорядкованою фазою, розчиняється, а мембрана в рідкій упорядкованій фазі (тобто в ділянці рафта) зберігає свою цілісність. Разом із тим, обробка мембрани сполуками, які специфічно зв'язують холестерол і видаляють його із ліпідної мембрани (наприклад, циклодекстран), спричиняє розчинення рафта в навколишніх фосфоліпідах і підкреслює важливість холестеролу для утворення рафта. Цілісність ліпідних рафтів також можна порушити впливом речовин-інгібіторів біосинтезу сфінголіпідів (L-цикloserин, фумонізин B1).

Як уже зазначалося, деякі білки специфічно локалізуються у ліпідних рафтах (тирозинкінази родини Src, трансмембранні білки тощо). Інші білки приєднуються до рафта лише після активації (рецептори T-клітин, рецептори B-клітин, CD39 та ін.). Проте деякі білки взагалі не можуть бути присутніми у рафтах, і, щоб забезпечити їхню взаємодію з білками-компонентами рафтів, клітина руйнує частину останніх і вивільнює необхідні білки.

Різновидом ліпідних рафтів є *кавеоли* – спеціалізовані ліпідні угруповання, що мають вигляд 50–100 нм "впінань" ПМ (рис. 1.9) [Deurs V. et al.]. Ці структури виявляються в численних типах клітин – гладком'язових, ендотеліальних, фібробластах, макрофагах і адипоцитах; у клітинах нервової системи ці структури є, але морфологічних ознак класичної кавеоли не мають.

Кавеоли, подібно до класичних ліпідних рафтів, є ділянками ПМ, багатими на холестерол, сфінголіпіди, глікосфінголіпіди, якорні глікопротеїни. Також вони містять *рецептори-"уловлювачі"* (*scavenger receptors*) класу В, зокрема **SR-B1** (уловлювач ЛПВЩ, ЛПНЩ, аніонних фосфоліпідів, апоптозних клітин, тригліцеридів, токоферолів) і **CD36** (уловлювач окиснених ЛПНЩ (окЛПНЩ), жирних кислот, аніонів фосфоліпідів, апоптозних клітин). На відміну від ліпідних рафтів, кавеоли містять білки *кавеоліни*, які виступають маркером цих структур (1992, Rothberg). Миші, нокаутовані за геном кавеоліну, не виявляють жодної морфологічної ознаки кавеол, тобто *роль кавеоліну – стабілізація кавеол як мембранного утворення*; допоміжну роль при цьому відіграє актиновий кортекс, що утримує кавеоли у ПМ.

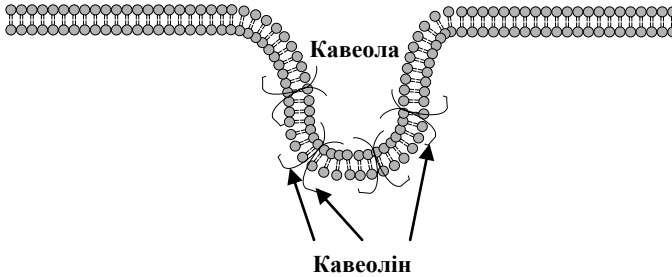


Рис. 1.9. Структура кавеоли

Ідентифіковано три ізоформи кавеолінів з М.м. 22–24 кД [Feng H. et al.]. Кавеолін-1 і -2 характерні для більшості клітин, тоді як кавеолін-3 – лише для м'язових клітин. Кавеолін-1 (178 амінокислотних залишків, 22 кД) є трансмембранним білком і здатний взаємодіяти із сигнальними молекулами. Зокрема, він є субстратом для деяких нерцепторних тирозинових протеїнкіназ, що фосфорилують його за залишком тирозину в 14 положенні. Численні білки ліпідних рафтів приєднуються до N-кінцевого домену кавеолінів своїми кавеолінзв'язувальними ділянками. У таких взаємодіях кавеолін, з одного боку, відіграє роль "каркасу", що забезпечує вірну локалізацію сигнальних білків, а з іншого – виступає інгібітором низки приєднаних до нього білків, зокрема, eNOS, аденілатциклази, низки кіназ і серин/треонінових фосфатаз. Отже, кавеолін може слугувати негативним регулятором численних внутрішньоклітинних шляхів. Кавеолін-1 також залучається у внутрішньоклітинний транспорт і обмін холестеролу, переносючи його від місця синтезу (ендоплазматичний ретикулум, ЕПР) до ПМ, а також сприяючи його кавеолярному поглинанию.

Ліпідні рафти та кавеоли мають безпосереднє значення для здійснення внутрішньоклітинної сигналізації, залучаються в процеси секреції, у мембранний транспорт, транцитоз через епітеліальні моношари, у генерацію полярності клітин, а також до рецептор-опосередкованого ендоцитозу харчових компонентів, гормонів, хемокінів, деяких вірусів, бактерій, паразитів і бактеріальних токсинів. Останнє є особливо характерним

для кавеол. Кавеосоми, що утворюються під час ендоцитозу в ділянках кавеол, є більш стабільними, ніж ендосоми, і переносять "вантаж" до ЕПР і апарату Гольджі. Отже, поглинання в ділянках кавеол дозволяє патогенам уникнути перетравлення в лізосомах і деградації.

Рецептор-опосередкований ендоцитоз у ділянках ліпідних рафтів і кавеол здійснюється за участю як GPI-заякорених білків, так і ліпідів у складі рафтів (глікосфінголіпідів, сфінгомієліну, холестеролу), які виступають при цьому своєрідними рецепторами. Так, *холерний токсин* сполучається із *рецептором-гангліозидом GM1* у ділянці ліпідного рафта, *Mycobacterium bovis BCG* зв'язує *холестерол*, а *E. coli* власним бактеріальним білком FimH сполучається із *рецептором клітини-хазяїна* (тучні клітини, макрофаги) *CD48*, який належить до GPI-сполучених білків [Goldston A. et al.].

Токсини правцю й ботулізму, взаємодіючи з нервовими клітинами, зв'язують кілька *ди-* і *трисіалогангліозидів (GD1a, GD1b, GT1b)* на поверхні пресинаптичної мембрани. І хоча ці сполуки мають дуже високі рівні токсичності (на рівні субмікромолярних концентрацій токсину), афінність токсинів до цих гангліозидів є надзвичайно низькою. Для пояснення цього парадоксу була розроблена *теорія "подвійного рецептора"*: токсин приєднується до поверхні пресинаптичної мембрани через *низькоафінні взаємодії з гангліозидами*. Такі взаємодії індують *конформаційні перебудови у складі молекули токсину*. Надалі молекула токсину підлягає *латеральній дифузії та високоафінно сполучається з іншим гіпотетичним рецептором*. З часом у синапсах мозку було ідентифіковано білок із *М.м. 58 кД*, який зв'язує токсини ботулізму і правцю лише у присутності *GD1a, GD1b або GT1b*.

Взаємодія *холерного токсину* із клітинами-мішенями ілюструє інший аспект взаємодій рафтів і токсинів. Молекула холерного токсину складається із п'яти ідентичних В-поліпептидів, які зв'язують гангліозид *GM1*, і одну А-субодиницю, що містить активний *A1-пептид*, який входить у клітину і активує аденілатциклазу. Пентамер В-субодиниць специфічно сполучається із

п'ятьма молекулами GM1 із високою афінністю. **У цьому випадку головною функцією ліпідного рафта є концентрування рецепторів до токсину** – молекул GM1, що забезпечує максималну зв'язувальну здатність токсину відносно поверхні клітини. Така олігомеризація В-субодиниць є необхідною передумовою для наступного етапу в дії холерного токсину – формування каналу. Подібним чином діють більшість пороутворювальних токсинів.

Деякі патогени та їхні токсини здатні **використовувати нормальні клітинні функції ліпідних рафтів** (наприклад, внутрішньоклітинний транспорт) для полегшення входу в клітину-хазяїна – зокрема, так діє **токсин *Shigella dysenteriae***, що сполучається із гліколіпідним рецептором Gb3, який виступає не лише сайтом зв'язування токсину, але й опосередковує його внутрішньоклітинний транспорт до ЕПР.

Нарешті, **деякі бактеріальні токсини змінюють локалізацію білків цільних контактів у межах рафтів**. Ці міжклітинні контакти в нормі утримують епітеліальні клітини разом, що запобігає транспорту розчинених молекул між клітинами. Тому зміни в їхній структурі результують у дефекті бар'єрної функції епітелію. Такий механізм характерний, зокрема, для **екзотоксину *Clostridium difficile***.

Потрапляння патогену в ділянку ліпідного рафта також може ініціювати запальну відповідь в організмі хазяїна. Наприклад, розпізнання бактеріального білка FimH його рецептором CD48 на поверхні тучних клітин запускає секрецію прозапального цитокіну TNF α , який є необхідним для залучення інших імунних клітин у боротьбу із бактеріальною інфекцією.

Цікавим є той факт, що **в патогенезі численних збудників, зокрема *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.*, відіграють роль не лише ліпідні рафти, локалізовані в ПМ клітини-хазяїна, але й власні рафти у клітинних мембранах цих збудників** [Rosenberger C. et al.]. Вони, зокрема, регулюють адгезію ("заякорювання") клітин збудника до клітини-хазяїна, інвазію, везикулярний транспорт, рухливість та клітинну сигналізацію.

Для молекулярної медицини рафти стали ланкою, якої не вистачало для розуміння механізмів розвитку багатьох захворювань. Наприклад, виявилось, що **віруси** (у т. ч. й **віруси СНІДу, кору, грипу, вірус мавп SV40**) також вибирають своєю мішенню у клітинній мембрані саме ліпідні "плоти" і звідти розпочинають своє проникнення у клітину. У випадку **пріонових і нейродегенеративних захворювань** у ділянках рафтів відбувається генерація патологічних білків, асоційованих з указаними розладами [Fantini J. et al.]. Усе наведене вище останнім часом дає змогу вважати ліпідні рафти однією із потенційних мішеней антипаразитарних терапевтичних засобів. Так, ряд сполук, здатних видаляти холестерол із ПМ, можуть запобігати сполученню збудника з клітинами-мішенями та унеможливити його проникнення в останні.

Сигнальні функції ліпідних рафтів і кавеол пояснюються **їхньою латеральною дифузією в ПМ** – при цьому **рафти виступають як переносники активованих рецепторів і молекул-трансдукторів**. У ділянках ліпідних рафтів і кавеол виявлено велику кількість рецепторів – Т- і В-клітинні рецептори, рецепторні тирозинові протеїнкінази, G-білок-сполучені рецептори, рецептори загибелі (TNF-R, Fas-R, DR4, DR5) тощо. Також у ділянках ліпідних рафтів міститься велика кількість **нерецепторних сигнальних молекул** – ГТФаз, eNOS, цитозольних тирозинових протеїнкіназ, компонентів MAPK-шляху, аденілатциклази, сигнальних похідних сфінголіпідів. Ключовою гіпотезою, яку розглядають як механізм сигнальних шляхів у ділянках ліпідних рафтів, є **модель об'єднання ("coalescence model") субмікроскопічних рафтів у великі мембранні макродомени, які можуть слугувати як платформи для концентрування та олігомеризації білків, передачі сигналів через ПМ, церамідопосередкованої активації численних сигнальних каскадів за участю протеїнкіназ і протеїнфосфатаз, що беруть участь у регуляції виживання клітин або їхньої загибелі**. Отже, рафти виступають як машини для сортування молекул, здатні координувати просторово-часову організацію сигнальних шляхів у межах вибраної ділянки ПМ.

1.1.2. Мембранні білки

Усі білки клітини умовно можна поділити на дві групи – мембранні та цитоплазматичні.

Класифікація мембранних білків за функціями дозволяє умовно розділити їх на:

- транспортні білки (АТФази, іонні канали, білки-переносники);
- *білки-ферменти* (інтегральні – АТФази; периферійні – ацетилхолінестераза, лужна і кисла фосфатази, РНКаза);
- *сигнальні білки* (білки-рецептори (як інтегральні, так і периферійні), G-білки);
- *білки, залучені у розпізнавання іншими клітинами* (низка глікопротеїнів слугують мішенями, які специфічно розпізнаються мембранними білками інших клітин);
- *білки міжклітинних контактів* (наприклад, білки, які беруть участь у створенні щільних та щілинних контактів)
- *структурні білки* (зокрема, мембранні білки, розташовані з цитозольного боку мембрани, можуть взаємодіяти із білками цитоскелета, тоді як білки, локалізовані на позаклітинному боці мембрани, можуть сполучатися з фібрилами позаклітинного матриксу).

За локалізацією у фосфоліпідному бішарі мембранних білків виділяють наступні підгрупи білкових молекул:

- *інтегральні* (помпи, канали);
- *частково занурені* ("заякорені");
- *периферійні* (розташовані із зовнішнього або цитоплазматичного боку мембрани);

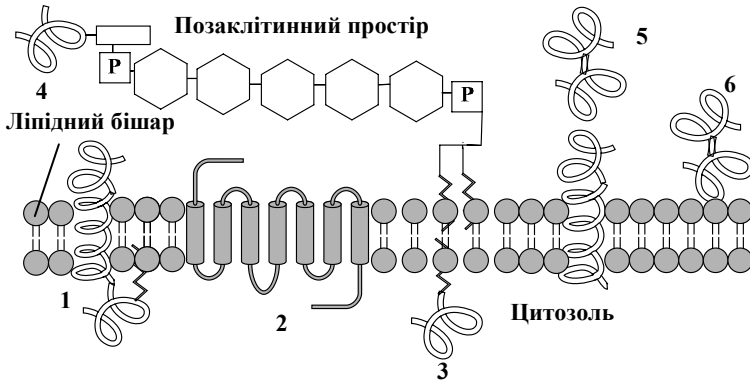
Крім мембранних і цитоплазматичних білків, є група так званих *амфітропних білків*, здатних існувати і у вільному, і в мембранозв'язаному стані. У латентному стані такі білки здебільшого сполучені з цитоскелетом; сигналом для їхнього вбудовування у мембрани стають різні типи посттрансляційної модифікації – найчастіше ацилювання (нековалентне приєднання жирних кислот або діацилгліцеролів) та ізопренілювання.

Взаємодія мембранних білків із ліпідним бішаром відбувається у кілька стадій:

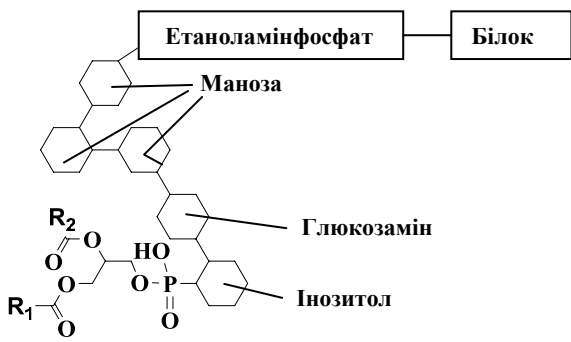
- 1) адсорбція білка на поверхні бішару;
- 2) зміна конформації білкової молекули з наступним виникненням гідрофобного контакту між білком і ацильними ланцюгами фосфоліпідів;
- 3) вбудовування білка у бішар. Глибина такого вбудовування залежить від сили гідрофобних взаємодій і від співвідношення гідрофобних і гідрофільних ділянок на поверхні білкової глобули, побудованих із відповідно гідрофобних і гідрофільних амінокислот.

У молекулах **периферійних білків** (наприклад, спектрин еритроцитів) залишки гідрофільних амінокислот розташовані на поверхні білкової глобули. Периферійні білки мембран відрізняються від інтегральних меншою глибиною проникнення у бішар і більш слабкими білок-ліпідними взаємодіями. Вони утримуються на поверхні мембрани іонними й водневими зв'язками між ними та інтегральними білками і тому не міцно зв'язані з мембранами. Завдяки цьому периферійні білки легко відокремлюються від мембрани за дії сольових розчинів (екстракція карбонатами), зміни рН тощо, а також за дії детергентів середньої сили.

Інтегральні білки (глікофорин, Band 3, бактеріородопсин) мають великі гідрофобні ділянки (структури типу α -спіралі), розташовані всередині мембрани, і фіксуються у бішарі за допомогою електростатичних сил (на рівні полярних голівок фосфоліпідів) і гідрофобних взаємодій (у товщині бішару). Трансмембранні ділянки таких білків, представлені α -спіралями з неполярних амінокислот, перетинають мембрану один (глікофорин) або кілька разів (лактозопермеаза, бактеріородопсин) (рис. 1.10, А). Вони тісно пов'язані з мембранним бішаром, і зміна стану цих білків передається на оточуючі їх ліпідні молекули (так звані *анулярні ліпіди*). Деякі інтегральні білки є компонентами олігомерних комплексів (H^+ -АТФаза/АТФ-синтаза внутрішньої мембрани мітохондрій, Na^+ , K^+ -АТФаза плазматичної мембрани, H^+ , K^+ -АТФаза слизової оболонки кишечника), причому ступінь олігомеризації є важливою для варіювання активності цих ферментів за різних функціональних станів клітини. Такі білки можна виділити з мембрани тільки шляхом її руйнування за допомогою екстракції детергентами або органічними розчинниками.



А



Б

Рис. 1.10. А – способи прикріплення білкових молекул до ліпідного бішару: 1 – інтегральний монотопний (1-TMS) білок; 2 – інтегральний політопний (7-TMS) білок; деякі із цих монота політопних білків можуть додатково заякорюватися в один із моношарів мембрани за допомогою ковалентно приєднаної жирної кислоти (1); 3 – "заякорений" білок, приєднаний до мембрани через жирну кислоту або ізопреноїдний залишок; 4 – "заякорений" білок, ковалентно приєднаний до розташованого в зовнішньому моношарі мембрани глікозилізованого фосфатидилінозиту (GPI); 5, 6 – периферійні білки, які не мають гідрофобних ділянок, а містять заряджені частини, що взаємодіють з іншими білками (5) або з фосфатними групами фосфоліпідів. Б – структура GPI-якора

"Заякорені" білки утримуються в мембрані завдяки наявності ковалентно приєднаного гідрофобного "якоря" (рис. 1.10, А). У ролі останнього можуть виступати *жирні кислоти* (пальмітинова, міристинова), *залишок ізопрену* або *послідовність неполярних амінокислот* (наприклад, у цитохрому b5); також заякорювати білки в мембрані може *ковалентно приєднаний до них глікозилфосфатидилінозитол (GPI)* – гліколіпід, що приєднується до С-кінця білків під час посттрансляційної модифікації. При цьому фосфатидилінозитолова група GPI через залишок інозитолу сполучається з вуглеводним лінкером, що містить глюкозамін та манозу; маноза через залишок етаноламінфосфату приєднується до С-кінцевої амінокислоти білка (рис. 1.10, Б). Прикладом таких GPI-заякорених білків є фосфоліпаза С, ацетилхолінестераза та низка білків ліпідних рафтів. Для виділення "заякорених" білків застосовують детергенти або ферменти, що здійснюють лізис ліпідного "якоря".

Внутрішньомолекулярна динаміка мембранних білків вивчена менше, ніж ліпідів. Численні мембранні білки здатні легко *дифундувати* вздовж мембрани (часто разом з ліпідами, що їх оточують) і мають досить високу *обертальну рухливість у межах одного моношару*. Але коефіцієнти дифузії навіть у найрухливіших білків приблизно на порядок нижче, ніж у ліпідних молекул. Мобільними є 20–50 % мембранних білків, інші мають обмежену рухливість або зовсім нерухомі. Причиною іммобілізації інтегральних білків у мембрані може бути їхня асоціація з утворенням великих агрегатів, взаємодія із периферійними білками, зв'язування з елементами цитоскелета тощо. Виявлені також *обертальні рухи молекул білків з переміщенням з одного моношару в інший* із паралельною зміною своєї конфігурації (зокрема, так переміщуються рухливі переносники різних сполук, наприклад валіноміцин, сприяючи процесам полегшеної дифузії іонів калію), *інтерналізація рецепторів* (за певних умов вони занурюються в ліпідний шар, втрачають свою активність, мембрана змінює свої властивості), вбудовування цілих мембранних фрагментів мембран одного типу в інші мембрани.

Для вивчення функцій і властивостей окремих мембранних білків їх необхідно виділити із біологічних мембран. Першим етапом цього процесу є **вибір біологічного джерела і виділення мембранної фракції, збагаченої на даний білок**. Мембранні білки є нерозчинними у воді й погано розчиняються в органічних розчинниках. Отже, наступне виділення мембранних білків пов'язане з їхньою солюбілізацією – переходом у розчинену форму. **Периферійні білки** солюбілізуються легко, без порушення цілісності мембрани. Виділення **інтегральних білків** потребує руйнування мембрани. Для цього застосовують **детергенти** – амфіпатичні молекули, що містять полярні групи ("голівка") і довгий вуглеводневий гідрофобний ланцюг ("хвіст"), і завдяки такій будові у водному середовищі утворюють міцели. У складі міцел детергенти здатні солюбілізувати у воді гідрофобні структури, зокрема інтегральні білкові молекули. У процесі солюбілізації детергент повинен замістити гідрофобні ліпідні ділянки мембрани навколо трансмембранної частини білка з утворенням *білково-детергентної міцели*, при цьому не порушуючи вторинну і третинну структури протеїну. Білки вбудовуються у такі міцели за допомогою гідрофобних взаємодій, а сам детергент копіює ліпідне бішарове оточення білка. Далі білково-детергентну міцелу треба розділити, оскільки детергент буде впливати на властивості білка (заряд, електрофоретичну рухливість). Для цього зазвичай застосовують **діаліз**, при цьому певна частина молекул детергенту відокремлюється. Якщо використання методу ускладнено, також існують специфічні смоли, які дозволяють відокремити білок від детергенту [Остапченко Л. І. та ін., 2006].

За природою групи *гідрофільної голівки* виділяють **іонні** (катионні та аніонні, "голівка" яких містить заряджені групи), **неіонні** (у голівці мають незаряджені гідрофільні групи) і **цвітер-іонні детергенти**. До іонних належать *солі жовчних кислот* – холат, дезоксихолат (*аніонний детергент*, що містить карбоксильну і гідроксильні групи); *додецилсульфат натрію* (SDS, ДСН – *аніонний детергент* із сульфатною групою); *алкіл-*

триметиламонієві солі (катіонний детергент – містить триметиламонієву групу); ЦТАБ (цетилтриметил-1-амоній бромід – катіонний детергент із триметиламонієвою групою). Крім "голівки", ці сполуки містять вуглеводневий ланцюг (SDS, ЦТАБ) або жорстке стероїдне ядро (дезоксихолат натрію). Серед неіонних найважливішими є октил- β -D-глюкопіранозид (*октилглюкозид*), що в голівці має глікозидні групи, і поліоксietiленові похідні типу *тритону X-100, лубролу PX, TWINs* (у голівці – поліоксietiленові компоненти). Іонні детергенти належать до денатуруючих, тобто таких, що здатні порушувати структуру білка. Детергенти другої групи краще придатні для руйнування ліпід-ліпідних і ліпід-білкових взаємодій, ніж білок-білкових. Тому вони вважаються неденатуруючими й широко використовуються для виділення мембранних білків у біологічно активній формі. Цвітер-іонні детергенти (*CHAPS – 3[(3-холамідопропіл)-диметиламоній]-1-пропансульфонат; цвітергент серії 3-X*) мають властивості як іонних, так і неіонних детергентів: як і неіонні, вони не несуть електричного заряду, їм не властиві електропровідність і електрофоретична рухливість, вони не зв'язуються з іонообмінними смолами; як і іонні, є ефективними для руйнування білок-білкових взаємодій і тому належать до денатуруючих.

Після виділення мембранних білків зазвичай проводять їхнє *фракціонування* за допомогою звичайних хроматографічних і електрофоретичних методів, імуноафінного методу із застосуванням моноклональних антитіл. Для білка окремої фракції надалі можна застосувати всі відомі *аналітичні методи вивчення його структури* – установити амінокислотний склад, визначити N- та C-кінцеві залишки, вміст вуглеводів, первинну структуру тощо.

1.1.3. Вуглеводні компоненти мембран

Вуглеводні компоненти присутні виключно в зовнішньому моношарі біологічних мембран як складові глікопротеїнів, протеогліканів і гліколіпідів. Так, у мембранах глікозильованими є близько 10 % усіх білків і 5–26 % ліпідів. У вільному стані вуглеводи в біомембранах відсутні.

Серед основних функцій вуглеводних компонентів можна виділити контроль за міжклітинними взаємодіями, підтримання імунного статусу клітини та забезпечення стабільності білкових молекул у мембрані.

Вуглеводні залишки, прикріплені до зовнішньоклітинного домену численних інтегральних білків мембран, разом із вуглеводами, прикріпленими до молекул фосфоліпідів, формують *глікокалікс*, функціями якого є клітинна адгезія та розпізнавання.

1.2. Властивості мембран

Біологічним мембранам притаманні наступні властивості:

- **Замкненість.** Теоретично фосфоліпідний бішар може мати вигляд плоскої структури. Проте така його конформація є енергетично не вигідною – адже на кінцях бішару його гідрофобні ділянки, утворені жирнокислотними хвостами фосфоліпідів, будуть безпосередньо контактувати з водним середовищем. Тому біологічні мембрани в клітині завжди представлені замкненими везикулами.

- **Плиність** біологічної мембрани залежить від:

- кількості ліпідів на одиницю площини;
- співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот (зі збільшенням вмісту вищих ненасичених ЖК плиність зростає);
- довжини жирних кислот;
- температури;
- концентрації холестеролу.

Зміни у плиності мембран можуть впливати на стан її проникності для різних сполук, на активність мембранних білків-ферментів та на інші мембранні процеси.

- **Асиметричність** біологічних мембран є важливою для мембранного транспорту, дії гормонів, імунологічних реакцій і пов'язана із різним молекулярним складом зовнішнього і внутрішнього моношару. Це стосується як ліпідних, так і білкових та вуглеводних компонентів (рис. 1.11).

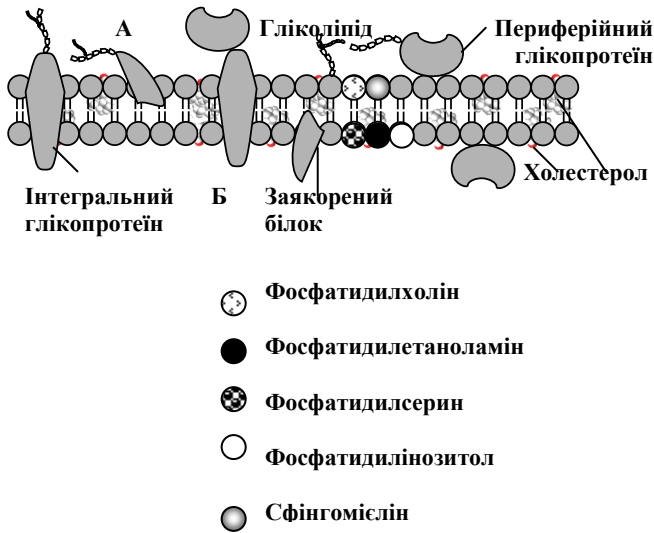


Рис. 1.11. Асиметричність плазматичної мембрани:
 А – позаклітинне середовище; Б – цитозоль

З усіх представників ліпідів лише холестерол однаково розподілений між обома моношарами мембрани. Серед інших ліпідних складових, як уже зазначалося, зовнішній шар містить в основному фосфатидилхолін і сфінгомієлін, а внутрішній – фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин і фосфатидилінозитол. Такий фосfolіпідний розподіл надає внутрішньому моношару мембрани негативного заряду. Різниця зарядів по обидва боки мембрани створює мембранний потенціал, величина якого впливає на функціональний стан іонних каналів.

Моношари фосfolіпідного бішару також різняться за білковим складом. Зокрема, периферійні і заякорені білки-ферменти локалізуються в одному із двох моношарів залежно від походження їхніх субстратів (внутрішньо- чи позаклітинне). Білки-рецептори, якщо вони не є трансмембранними молекулами, містяться виключно в зовнішньому моношарі. Розміщення інтегральних білків також робить певний внесок у асиметрію мембрани. Так, N-кінець інтегрального мембранного білка еритроцитів глікофорину є позаклітинним, тоді як С-кінець – внутрішньоклітинним.

Що стосується вуглеводних компонентів, то, як було сказано раніше, вони у складі глікозильованих похідних ліпідів і білків виявляються виключно в зовнішньому моношарі біологічних мембран, що є важливим для міжклітинної сигналізації та інших процесів, які передбачають взаємодію між клітинами та між клітиною й позаклітинним середовищем.

• **Вибіркова проникність.** Біологічні мембрани є неоднаково проникними для різних речовин. І якщо одні молекули проходять крізь неї легко або відносно легко (газоподібні сполуки – кисень, CO_2 , вода), то інші або майже не перетинають фосфоліпідний бішар шляхом простої дифузії (глюкоза, амінокислоти), або зовсім не переносяться через нього (усі іони). Детальніше про шляхи проникнення таких речовин через біологічні мембрани див. у підрозд. 1.4.

• **Динамічні властивості біологічних мембран** зумовлені динамікою їх ліпідних і білкових компонентів.

У випадку *ліпідів* великий внесок у рухливість роблять **внутрішньомолекулярні рухи вуглеводневих ланцюгів** шляхом *гош-* і *транс-поворотів* суміжних ланок вуглеводневого ланцюга навколо зв'язку C–C (рис. 1.12).

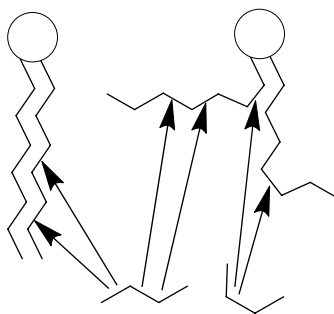


Рис. 1.12. Схема внутрішньомолекулярних рухів вуглеводневих ланцюгів шляхом *гош-* і *транс-поворотів* суміжних ланок вуглеводневого ланцюга навколо зв'язку C–C

При цьому в ланцюзі постійно виникають згини, що спричиняє порушення регулярного розташування ліпідних молекул у бішарі й появу дефектів упаковки бішару – "кінків" і "джогів" (*див далі*).

Різні ділянки ліпідної молекули у складі бішару мають різну рухливість. Найменша – у гліцеролового остова молекули (він служить жорстким "якорем", що обмежує рух прилеглих ділянок вуглеводневих ланцюгів). Із наближенням до середини бішару рухливість ланцюгів зростає і стає максимальною в ділянці кінцевих метильних груп. Доволі високою рухливістю також володіє полярна голівка ліпідної молекули. Окрім руху окремих частин молекули, у бішарі, як уже зазначалося, також спостерігаються рухи молекули як єдиного цілого: обертання навколо осі; маятниковоподібні та поплавевоподібні коливання молекули відносно її рівноважного положення у бішарі; латеральна дифузія в межах моношару; фліп-флоп-переходи [Meer G. et al.]. Усі ці рухи мають різну швидкість. Обертання навколо осі здійснюється дуже швидко (частота порядку 10^7 – 10^8 об/с); латеральна дифузія – набагато повільніше (порядку 10^{-12} м²/с); дуже повільними є фліп-флоп-переходи. Однак у деяких мембранах останній показник є значно вищим (напівперіод 1–2 хв), що пов'язано із залученням АТФ-залежних ферментів фліпаз у перенесення ліпідних молекул через мембрану. Активні фліпази відповідають за створення і підтримку ліпідної асиметрії мембран.

Активація фліпаз можлива також за низки специфічних процесів, які відбуваються у клітинах – наприклад, таке явище спостерігається коли клітина стає на шлях апоптозної загибелі. У цьому випадку фліпазозалежна поява на зовнішньому боці мембрани залишків фосфатидилсерину є маркерним сигналом для сусідніх клітин і макрофагів для поглинання апоптозної клітини. Крім того, на візуалізації фосфатидилсерину в зовнішньому моношарі мембрани за допомогою флуоресцентних барвників засновано один із методів детекції клітин, що стали на шлях апоптозної загибелі. Винятком із усіх ліпідів є холестерол, що може легко переходити з одного шару мембрани на інший.

Імобілізація (зупинка руху) ліпідів може відбуватися під час їхньої взаємодії з білками: інтегральні білки оточені пограничним шаром ліпідних молекул (так звані *анулярні ліпіди*), рухливість яких обмежена або хоча б порушена в результаті контакту з нерівною поверхнею білкової глобули.

Можливість змін конфігурації ланцюгів жирних кислот має велике значення для розчинення у ліпідному шарі й перенесення через нього різних молекул та іонів. Іон потрапляє у порожнину, всередині ліпідного бішару, яка утворюється за рахунок відповідних вигинів оточуючих іон ланцюгів жирних кислот. Така порожнина має назву "кінк" (англ. *kink* – петля, вигин). Кінки утворюються в результаті теплового руху молекул, і іон може переміщуватися в ліпідному шарі мембрани, перескакуючи із одного кінку в сусідній (рис. 1.13).

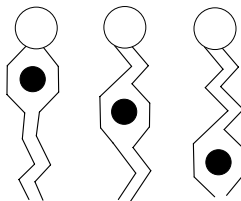


Рис. 1.13. Роль кінків у трансмембранному русі іонів

Щодо рухів білкових компонентів біологічних мембран, то, як зазначалося раніше, вони є також досить різноманітними, але набагато повільнішими за пересування ліпідних молекул.

1.3. Плазматична мембрана та ендомембрани

Серед біологічних мембран, присутніх у клітині, виділяють плазматичну мембрану (ПМ) і ендомембрани, серед яких розрізняють мембрани ендоплазматичного ретикулума, апарату Гольджі, ядер, мітохондрій, лізосом, пероксисом, піно- і фагосом тощо.

Плазматична мембрана виконує у клітині *бар'єрну* (ПМ, як і ендомембрани, є напівпроникною), *транспортну* (яка зумовлена наявністю транспортних білків) *функції*, залучається в *передачу сигналів від гормонів, нейромедіаторів, факторів росту та інших біологічно активних сполук*, бере участь у *міжклітинній адгезії* (між клітинами одного типу в органі або між клітинами різного типу, наприклад у печінці, де є гепатоцити, холангіоцити (клітини протоків), клітини кровоносних судин). **Ендомембрани** поділяють клітину на компартменти, у яких здійснюються специфічні функції: синтез біомолекул (ендоплазматичний ретикулум), відтворення генетичної інформації (ядро), генерація енергії (мітохондрії), вивільнення продуктів життєдіяльності (апарат Гольджі).

Принципи будови плазматичної та ендомембран є спільними для всіх типів, однак різні біологічні мембрани мають низку специфічних відмін, які забезпечують здійснення ними відповідних біологічних функцій.

Плазматичну мембрану будь-якої клітини за особливостями її морфології та функцій можна віднести до одного із двох типів: гомогенна або гетерогенна. **Гомогенна плазматична мембрана** має подібну морфологію по всій її довжині – прикладом може слугувати ПМ еритроцита (рис. 1.14).

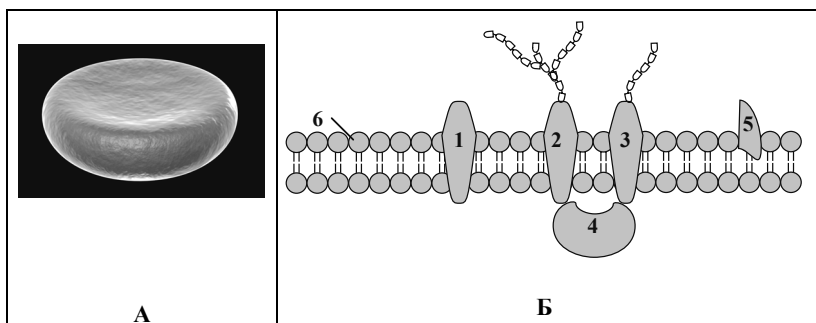


Рис. 1.14. Еритроцит (А) та структура гомогенної мембрани еритроцита (Б). 1 – Na^+ , K^+ -АТФаза; 2 – білок глікофорин; 3 – мембранний глікопротеїн; 4 – білок спектрин; 5 – ацетилхолінестераза; 6 – фосфоліпідний бішар

У *гетерогенній плазматичній мембрані* можна виділити різні ділянки, що відрізняються за будовою і функціями. Такими є мембрани клітин, які одночасно контактують з міжклітинною речовиною, сусідніми клітинами і певними порожнинами – це, наприклад, мембрани гепатоцитів, холангіоцитів, ентероцитів та епітеліальних клітин. Такий тип мембран складається зі специфічних ділянок, які мають специфічне оточення (рис. 1.15):

- апікальна;
- базальна (синусоїдальна);
- латеральна.

Дві останні часто розглядають як одну базолатеральну мембрану. Різні ділянки гетерогенної плазматичної мембрани можна виділити і вивчати їх окремо.

Класичним об'єктом, що дозволяє розглянути особливості будови гетерогенної мембрани, є плазматична мембрана гепатоцита [Синельник Т. Б. та ін.].

Апікальна мембрана гепатоцита не контактує з іншими клітинами, а спрямована у просвіт жовчного каналця і безпосередньо створює його стінки, тому в паренхіматозних клітинах печінки апікальну мембрану також називають *каналікулярною*. В ентероциті ця ділянка мембрани спрямована у просвіт шлунково-кишкового тракту. За будовою апікальні мембрани найчастіше мають на своїй поверхні специфічні структури, зокрема мікрворсинки, що утворюють "щетинкову облямівку" й підвищують ефективність мембранного транспорту, збільшуючи поверхню мембрани, та низку транспортних систем для іонів і органічних сполук.

Латеральна мембрана забезпечує контакт з іншими клітинами, маючи спеціальні структури для адгезії (взаємодії), і практично не містить білків-транспортерів.

Базальна (синусоїдальна) мембрана контактує із кровоносною судиною і забезпечує обмін речовин між кров'ю та гепатоцитом. Для неї, як і для апікальної мембрани, також характерна наявність мікрворсинок і структур для активного і пасивного перенесення ряду сполук (але у більшості своїй відмінних від таких на апікальній мембрані).

ЕНТЕРОЦИТ, ХОЛАНГІОЦИТ, ЕПТЕЛОЦИТ

ГЕПАТОЦИТ

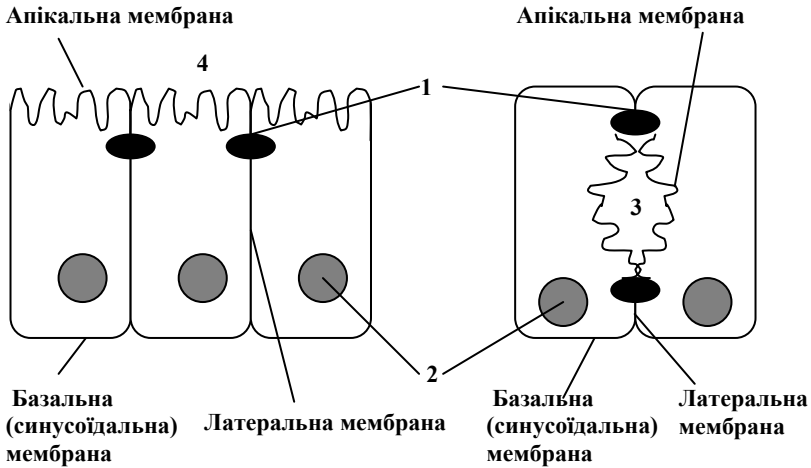


Рис. 1.15. Будова гетерогенної плазматичної мембрани різних клітин.
1 – щільні контакти; 2 – ядро; 3 – жовчний каналець; 4 – просвіт (наприклад, кишечника, ниркового каналця або жовчної протоки)

Кожний тип ендомембран, а також ПМ характеризується тим чи іншим спектром специфічних мембранних ферментів, представлених інтегральними білками й залучених у біохімічні процеси, властиві даному типу мембран. Ці ферменти отримали назву маркерних. До *маркерних*, або *векторних*, ферментів належать порівняно стабільні ферменти, активність яких є достатньо високою і може бути легко виміряна. Зокрема, маркерними ферментами ПМ є аденілатциклаза і Na^+ , K^+ -АТФаза (для базолатеральної ділянки) і 5'-нуклеотидаза, лейцинамінопептидаза та глутамілтранспептидаза (для апікальної). Маркерні ферменти застосовують для ідентифікації й оцінки чистоти виділених мембранних фракцій.

Ендоплазматичний ретикулум – це система мембранних структур, що утворюють сітку трубочок, пухирців, каналців. Площа мембран ЕПР становить понад половину загальної поверхні всіх мембран клітини. Мембрана ЕПР морфологічно ідентична оболонці клітинного ядра і є з нею одним цілим, а порож-

нини ЕПР відкриваються в міжмембранну порожнину ядерної оболонки. Мембрани ЕПР забезпечують активний транспорт низки елементів проти градієнта концентрації.

Основною функцією *гранулярного (шорсткого)* ЕПР є біосинтез білків на рибосомах. У гранулярному ЕПР, зокрема, утворюються розчинні секреторні білки, лізосомальні гідролази, а також нерозчинні мембранні білки. Тут же здійснюється первинна модифікація цих молекул, сполучення їх із олігосахаридами (реакції глікозилювання) із утворенням глікопротеїнів. Гранулярний ЕПР також відповідає за синтез мембранних ліпідів та їхнє вбудовування в мембрану – "збирання мембран".

Розчинний білок, що синтезується, проходить крізь мембрану ЕПР безпосередньо під час свого синтезу, тобто *котрансляційно*, одночасно з його трансляцією. Після завершення синтезу вся білкова молекула міститься у порожнині ЕПР – при цьому рибосома відокремлюється. Під час трансмембранного перенесення білкового ланцюга, який ще росте, до нього внаслідок реакцій глікозилювання приєднуються олігосахариди. У порожнині цистерн ЕПР білки також підлягають низці додаткових змін: утворюються дисульфідні зв'язки, відбувається їхнє вірне згортання, збирання третинної та четвертинної структури білків. Лише білки з вірною конформацією в подальшому будуть переноситися в цис-ділянку апарату Гольджі (АГ).

Початкові стадії синтезу *мембранних білків* схожі на такі при синтезі розчинних білків. Однак у ланцюзі мембранного білка, що синтезується, є одна чи кілька амінокислотних стоп-последовностей, які запобігають переміщенню білкового ланцюга крізь мембрану ЕПР, і білок у ділянці стоп-сигналу лишається сполученим із мембраною, але при цьому синтез білка на рибосомі не зупиняється. Це веде до того, що в ділянці стоп-сигналу локалізується гідрофобна α -спіральна ділянка, а весь білок лишається вбудованим у мембрану. У різних білків число таких α -спіральних трансмембранних ділянок може бути від одного до кількох. Мембранні білки, подібно до розчинних, можуть підлягати різним модифікаціям. Найбільш характерними для них є реакції глікозилювання, у результаті яких білок стає глікопротеїном. Сполучення білкового ланцюга, що синтезується, з олігосахаридами теж здійснюється котрансляційно.

Подальша модифікація синтезованих білків надалі здійснюється в апараті Гольджі, після чого вони набувають функціональної активності. Деякі новосинтезовані білки (зокрема, білки-транспортери, іонні канали, мембранні ферменти, рецептори) після модифікації (*процесингу*) в апараті Гольджі можуть прямувати до ПМ і вбудовуватися в неї.

Дистальні ділянки гранулярного ЕПР, що розташовані в зоні, наближеній до апарату Гольджі, втрачають рибосоми й утворюють мембранні виступи, від яких відпупковуються дрібні вакуолі, які містять синтезовані в ЕПР білки. Ця зона має назву *ЕПР-АГ-проміжного компартменту*. Вакуолі, що відокремилися від ЕПР, надалі зливаються одна з одною і транспортуються за допомогою мікротрубочок до цис-ділянки апарату Гольджі, де і зливаються з його мембранами. Однак деякі вакуолі можуть прямувати не до апарату Гольджі, а до інших органел: адресність і точність зливання будь-яких вакуоль з іншими мембранами визначається спеціальними білками SNARE (це інтегральні білки-рецептори, лігандами яких є інші білки, що відповідають за прикріплення і злиття мембран).

В ЕПР також здійснюється синтез і збирання ліпідів самих мембран, включаючи фосфоліпіди й холестерол (рис. 1.16). Ферменти, що беруть участь у синтезі ліпідів, вбудовані в мембрану ЕПР з боку цитозолу, і синтез ліпідів відбувається на мембрані там само. Тому синтезовані ліпіди спочатку вбудовуються в ліпідний бішар ЕПР з боку цитоплазми, а потім переносяться на внутрішній бік за допомогою переносників фосфоліпідів. Ліпідний бішар мембрани зростає, збільшуючи поверхню вакуолі або цистерни ЕПР. Цей процес відбувається одночасно із синтезом інтегральних мембранних білків, отже, *мембрана будується і росте за рахунок двох процесів: синтезу й вбудовування ліпідів та синтезу й інтеграції мембранних білків*. Інтегральні білки мембран ЕПР, мембран апарату Гольджі, секреторних вакуоль і ПМ мають одне походження: вони синтезуються і вбудовуються в мембрану в гранулярному ЕПР. Від того, які інтегральні й периферійні білки будуть синтезуватися на рибосомах ЕПР і від того, які фосфоліпіди будуть тут синтезуватися та включатися в мембрану, буде залежати тип нової ділянки мембрани, що утворюється – чи буде вона компонентом гладенького ЕПР, мембран апарату Гольджі, лізосоми або ПМ.

Агранулярний (гладенький) ЕПР здійснює біосинтез стероїдів (зокрема, статевих гормонів і стероїдних гормонів надниркових залоз), десатурацію жирних кислот, відіграє важливу роль у вуглеводному обміні (завдяки наявності ферменту глюкозо-6-фосфатфосфатази), відповідає за процеси детоксикації із залученням електронотранспортного ланцюга за участю цитохромів р450 і b5.

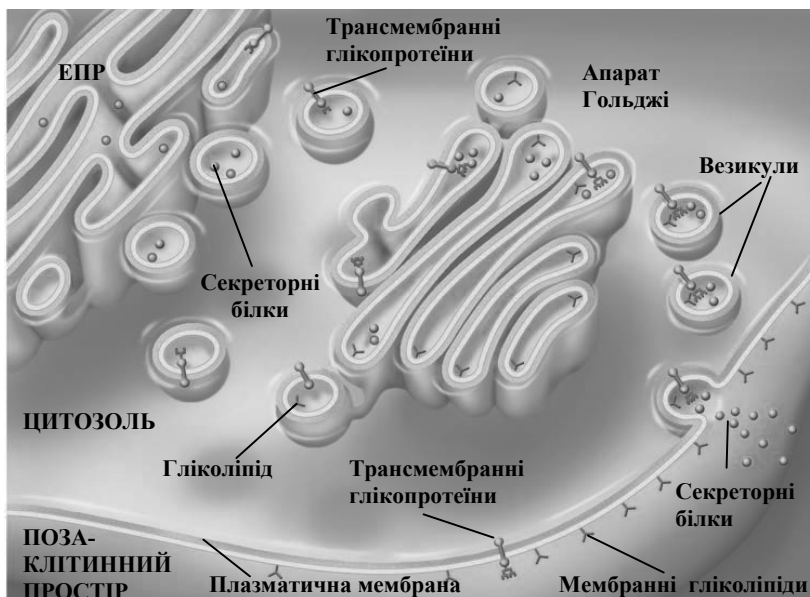


Рис. 1.16. Схема участі ЕПР та АГ у біосинтезі біологічних мембран. Мембранні ліпіди й білки синтезуються в ЕПР; там же із мембранних білків утворюються глікопротеїни. В АГ здійснюється додаткова модифікація вуглеводної частини глікопротеїнів, а також утворюються гліколіпіди. Надалі глікопротеїни, гліколіпіди разом із секреторними білками у складі везикул спрямовуються до ПМ. Унаслідок наступного злиття везикулярної та плазматичної мембрани внутрішня поверхня мембрани везикули стає частиною зовнішнього моношару ПМ, зовнішня її поверхня – частиною внутрішнього моношару, а секреторні білки вивільнюються в позаклітинний простір

Крім того, гладенький ЕПР є депо Ca^{2+} – концентрація цих іонів у ЕПР може досягати 10^{-3} моль, тоді як у цитозолі цей показник становить близько 10^{-7} моль (у стані спокою) – таке співвідношення підтримується діяльністю Ca^{2+} -АТФази та Ca^{2+} -каналів ЕПР. Клітини нирок і печінки, що характеризуються надзвичайно високими рівнями метаболізму вуглеводів і ліпідів, як і клітини ячок і ячеників, що відповідають за синтез статевих гормонів, мають добре розвинутий ЕПР.

Маркерними ферментами мембран ЕПР є глюкозо-6-фосфатфосфатаза, цитохроми b5, P450, Ca^{2+} -АТФаза, НАДФН-дегідрогеназа.

Апарат Гольджі – сукупність окремих мембран, що здійснює модифікацію і збереження білків, синтезованих на ЕПР, їхню упаковку та секрецію. У цистернах АГ також відбувається синтез полісахаридів, їх сполучення з білками з утворенням глікозаміногліканів. Крім того, АГ є джерелом лізосом клітини.

Ця структура має певну полярність: у ній виділяють цис-відділ (ближче до ядра), медіальну ділянку і транс-відділ (найвіддаленіший від ядра). Цис-відділ є початком апарату Гольджі, а транс-відділ – його закінченням. По ходу апарату Гольджі змінюється будова мембран, а також здатність до синтезу і модифікації різних сполук. *Цис-ділянка* апарату Гольджі здійснює модифікацію глікопротеїнів, синтез глікозаміногліканів. *Проміжна ділянка* апарату Гольджі відповідає за додаткові модифікації глікопротеїнів. У *транс-ділянці* АГ здійснюється сортування секреторних і лізосомних білків та відділення вакуоль.

Апарат Гольджі багатий на ферменти глікозилування, зокрема глікозидази і глікозилтрансферази, причому його різні ділянки різняться між собою набором ферментів. У цис-відділі містяться N-ацетилглюкозамінфосфотрансфераза, яка переносить залишок N-ацетилглюкозамінфосфату від УДФ-N-ацетилглюкозаміну на залишок манози в олігосахариді, а також фосфоглікозидаза, що надалі видаляє кінцевий N-ацетилглюкозамін, залишаючи фосфат, унаслідок чого утворюється манозо-6-фосфат. У медіальному відділі містяться два ферменти: манозидаза (відщеплює манозу) та N-ацетилглюкозамінтрансфераза (приєднує N-ацетилглюкозамін). Для транс-відділу характерними є пептидази і трансферази.

Маркерними ферментами мембрани апарату Гольджі є УДФ-галактозилтрансфераза, сіалілтрансфераза, тіамінпірофосфатаза.

Лізосома відповідає за деградацію макромолекул. Вона містить гідролітичні ферменти – протеази, ліпази, нуклеази, а також сполуки, які поглинає клітина шляхом ендоцитозу (фаго- і піноцитозу). Останні потрапляють до лізосом у складі ендосом і фагосом, а в лізосомах відбувається розщеплення компонентів цих структур. До маркерних ферментів мембран лізосом відносять кислу фосфатазу, β -глюкуронідазу, арилсульфатазу, кислу РНКазу, кислу ДНКазу.

Пероксисома – органела, обмежена мембраною, її розмір становить 0,2–1,5 мкм, вона містить велику кількість ферментів, що каталізують окисно-відновні реакції (оксидози D-амінокислот, уратоксидаза й каталаза). Набір функцій пероксисом різниться залежно від типу клітин – це окиснення жирних кислот, руйнування токсичних сполук, синтез жовчних кислот, холестеролу, побудова мієлінової оболонки нервових волокон тощо. Поряд із мітохондріями, пероксисоми є головними споживачами O_2 у клітині. Тривалість життя цих органел незначна – усього 5–6 діб. Нові пероксисоми найчастіше утворюються в результаті поділу попередніх, подібно до утворення мітохондрій і хлоропластів, однак вони можуть формуватися і *de novo* із ЕПР.

Усі ферменти, що містяться в пероксисомі, синтезуються на рибосомах поза нею. Для їхнього перенесення із цитозолу всередину органели мембрани пероксисом мають систему вибіркового транспорту.

Маркерними ферментами пероксисом є каталаза, карнітинпальмітоїлтрансфераза, уратоксидаза.

Мітохондрії здійснюють основні процеси, що сприяють накопиченню енергії в організмі. Це двомембранні структури, внутрішня мембрана яких утворює кристи, на яких зосереджені субстрати і ферменти ланцюга перенесення електронів. Як і ЕПР, мітохондрія виконує роль депо іонів кальцію.

Зовнішня мітохондріальна мембрана має товщину близько 7 нм, на неї припадає приблизно 7 % від площі поверхні всіх мембран клітинних органел. Основною її функцією є обмеження мітохондрії від цитоплазми. Ця мембрана містить особливий каналоутворювальний білок порин – він формує в зовнішній

мембрані отвори діаметром 2–3 нм, крізь які можуть проникати невеликі молекули й іони вагою до 5 кД. Великі молекули можуть перетинати зовнішню мембрану лише шляхом активного транспорту крізь транспортні білки мітохондріальних мембран. Для зовнішньої мембрани характерна наявність моноаміноксидази, що є маркерним ферментом цієї мембрани. Зовнішня мембрана мітохондрії може взаємодіяти з мембраною ЕПР, що відіграє важливу роль у транспортуванні ліпідів та іонів кальцію.

Внутрішня мітохондріальна мембрана утворює численні гребенеподібні складки – кристи, які суттєво збільшують площу її поверхні, і, наприклад, у клітинах печінки становлять близько третини всіх клітинних мембран. Внутрішня мембрана мітохондрії, на відміну від зовнішньої, не має спеціальних отворів для транспорту малих молекул та іонів. Характерною рисою складу внутрішньої мембрани мітохондрій є присутність у ній кардіоліпіну (близько 20 % від загального вмісту ліпідів). Цей особливий гліцерофосфоліпід, що містить одразу чотири жирнокислотні залишки, робить мембрану повністю непроникною для протонів і таким чином залучається в регуляцію функціонування дихального ланцюга та процесів окисного фосфорилування. Ще одною особливістю внутрішньої мембрани мітохондрій є дуже високий вміст білків (до 70 % за вагою), що представлені транспортними білками, ферментами дихального ланцюга, які займають всю товщу мембрани, а також великими АТФ-синтетазними комплексами, крізь які проходять протони, наслідком чого стає синтез АТФ. У деяких місцях зовнішня і внутрішня мембрани стикаються – там локалізований спеціальний білок-рецептор, який сприяє транспорту мітохондріальних білків, закодованих у ядрі, у матрикс мітохондрії. Для внутрішньої мітохондріальної мембрани маркерними ферментами є H^+ -АТФаза, ротеноннечутлива НАДФН-цитохром с-редуктаза, сукцинатдегідрогеназа та цитохромоксидаза.

Товщина міжмембранного простору мітохондрій становить 10–20 нм. Оскільки зовнішня мембрана мітохондрії є проникною для невеликих молекул та іонів, їхній вміст у міжмембранному просторі мало чим відрізняється від такого в цитоплазмі. Проте великим білкам для транспорту із цитоплазми в периплазматичний простір необхідно мати специфічні сигнальні

пептиди – тому периплазматичний простір і цитоплазма відрізняються за білковими компонентами. Одним із білків, що міститься у периплазматичному просторі, є цитохром с – один із компонентів дихального ланцюга мітохондрій. Маркерними ферментами міжмембранного простору мітохондрій є аденілаткіназа та малатдегідрогеназа.

У матриксі мітохондрій – обмеженому внутрішньою мембраною просторі – містяться ферментні системи окиснення пірувату, жирних кислот, а також ферменти циклу Кребса. Крім того, тут розташовані мітохондріальна ДНК, РНК та власний білоксинтезуючий апарат мітохондрії.

Ядро клітини оточене двомембранною ядерною оболонкою; у деяких випадках ці дві мембрани з'єднуються з утворенням ядерних пор. *Внутрішня ядерна мембрана* має 6 % вуглеводів (зовнішня – 16 %), більше окисних ферментів і домішки ДНК – адже до неї прикріплюється периферійний хроматин. Функціональна активність внутрішньої ядерної мембрани є дуже високою; існує гіпотеза, що вона залучена до регуляції ініціації реплікації та транскрипції. *Зовнішня ядерна мембрана* утворює "випинання", які формують везикули, що за певних умов здатні відпупковуватися від неї – "*blabbing*". Ці везикули рухаються у напрямку *ядерна мембрана* → *ЕПР* → *апарат Гольджі* → *ПМ*.

Під внутрішньою ядерною мембраною розташована *ядерна ламіна* – фіброзний шар товщиною 20–80 нм, немембранний компонент ядерної оболонки, що контактує із внутрішньою ядерною мембраною, не містить ДНК і ліпідів. У місцях утворення пор цей шар переривається. Він сформований послідовністю однаково орієнтованих білків проміжних філаментів, які називаються ламінами. У клітинах хребетних ядерна ламіна формується в основному із ламіну А, ламіну В і ламіну С, які створюють 10 нм структури, що приєднуються до специфічних білків ядерної мембрани через С-ламін. В-ламін, імовірно, сполучений із певними ділянками хромосом, а ламін А зв'язує С і В ламіни. Ядерна ламіна механічно скріплює ядерну оболонку і сприяє її відновленню при пошкодженні, а також закрючує хроматин на ядерній мембрані.

Ядерні пори – це транспортні канали, що пронизують двошарову ядерну мембрану. Вони є не просто порами, а складно побудованими, багатофункціональними структурами, утвореними білками – **нуклеопоринами**, яких нараховуються близько 50. Білкова складова ядерної пори має октагональну симетрію і позначається терміном "**ядерний поровий комплекс**". Проникний для молекул канал розташований у центрі структури, а іншу частину пори утворюють нуклеопорини, згруповані у структури, що формують 6 горизонтальних кілець, зв'язаних численними вертикальними спицями. Комплекс ядерної пори закорнений на ядерній мембрані своєю трансмембранною частиною, від якої в напрямку просвіту каналу також відходять спиці. Ця корова частина пори, побудована із восьми доменів, із цитозольного та ядерного боків обмежена **цитозольним і ядерним кільцями** відповідно (рис. 1.17).

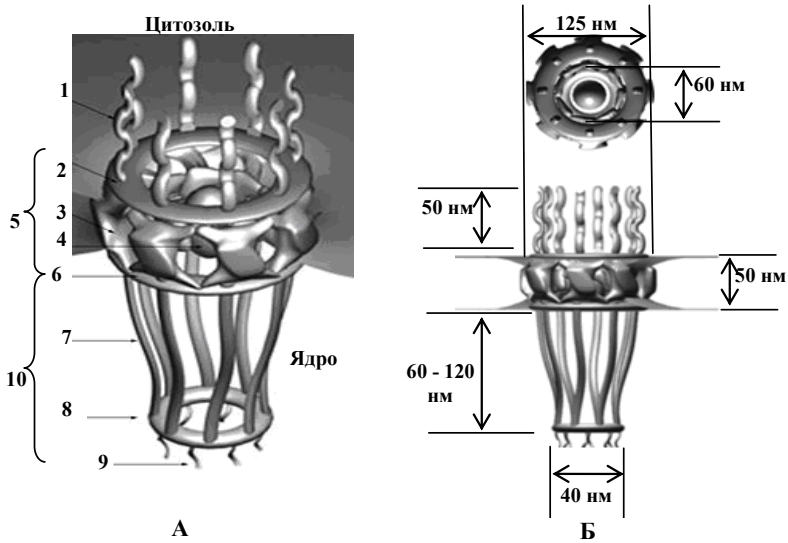
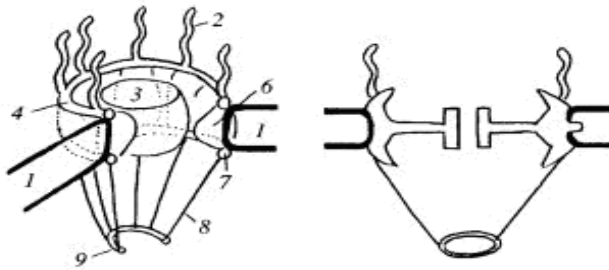
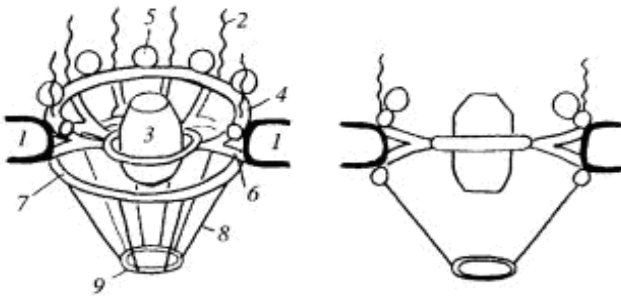


Рис. 1.17. Найбільш розповсюджені моделі структури ядерної пори. А: 1 – цитоплазматичні філаменти; 2 – цитоплазматичне кільце; 3 – домен корової частини; 4 – центральна гранула ("транспортер"); 5 – ядерна оболонка; 6 – ядерне кільце; 7 – ядерні філаменти; 8 – термінальне кільце ядерного кошика; 9 – філаменти термінального кільця; 10 – ядерна корзина. Б: розміри ядерної пори

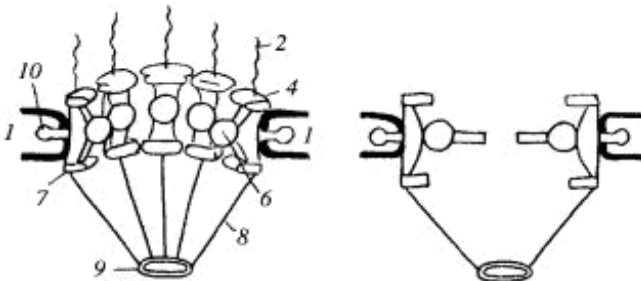
Закінчення рис. 1.17.



В



Г



Д

Рис. 1.17. Найбільш розповсюджені моделі структури ядерної пори.

В, Г, Д: 1 – ядерна оболонка; 2 – цитоплазматичні філаменти;
 3 – центральна гранула ("транспорт"); 4 – цитозольне кільце;
 5 – цитоплазматична субодиниця; 6 – спиця; 7 – ядерне кільце;
 8 – фібрили кошика; 9 – термінальне кільце; 10 – анулярні ліпіди

До ядерного кільця приєднані білкові, спрямовані всередину ядра, тяжі (**ядерні філаменти**), до кінців яких кріпиться **термінальне кільце**. Уся ця структура називається **ядерним кошиком**. До цитозольного кільця також прикріплені спрямовані у цитоплазму тяжі – **цитоплазматичні філаменти**. Трансмембранна корова частина ядерної пори включає три сполучені один з одним кільця: **внутрішнє**, що контактує з центральним транспортером; **середнє**, що пронизує бокову ділянку ядерної мембрани, яка формує пору, і **радіальне**, розташоване в просвіті між зовнішньою і внутрішньою ядерними мембранами. Середнє та радіальне кільця міцно закріплюють пору в ядерній оболонці, а внутрішнє відіграє роль основного каркасу, навколо й усередині якого зібрані інші компоненти пори. Центральний канал пори має варіабельний внутрішній діаметр (змінюється від 10 до 26 нм) і міститься всередині **транспортера** (який ще називають *штулкою*, або *центральною гранулою*), що займає центральну частину внутрішнього кільця пори. Транспортер складається із чотирьох сполучених між собою частин: двох симетричних циліндрів та двох однакових периферійних гранул, які прив'язані вісьмома фібрилами до периферійних кілець пори й закривають обидва входи в центральний канал.

З боку цитозолу пора має вісім гранул, котрі містяться на цитозольному кільці, як буси на мотузці, і мають короткі фібрили. Вона безпосередньо сполучена з ядерною ламіною, однак у місці отвору пори ламіна відсутня.

Провідність ядерних пор для молекул різних розмірів неоднакова. Молекули невеликих розмірів (іони, метаболіти, мононуклеотиди тощо) здатні пасивно дифундувати в ядро. Білки масою меншою за 15 кД швидко проникають в ядро, тоді як для білка масою понад 30 кД для цього потрібний певний час. Шляхом активного транспорту крізь ядерні пори можуть проходити великі молекули (понад 60–70 кД) і навіть надмолекулярні комплекси. Зокрема, за цим механізмом надходять у цитоплазму синтезовані в ядрі молекули РНК, а в ядро потрапляють білки, залучені в ядерний метаболізм – конститутивно (наприклад, гістони) або у відповідь на певні стимули (наприклад, транскрипційні фактори). У ядерних білків виявлені специфічні послідовності, що відповідають за їхню локалізацію. Найбільш розповсюдженим із них є так званий "класичний" *сигнал ядерної локалізації* (*nuclear localization signal, NLS*) – одна чи дві ділянки

з позитивно заряджених амінокислот (аргініну й лізину). У свою чергу, білки, що підлягають експорту із ядра, містять *сигнали ядерного експорту* (*nuclear export signal, NES*) – ділянки, для яких характерний високий вміст гідрофобних амінокислот.

Субстрати ядерного транспорту переносяться у ядро або із нього в комплексі зі спеціальними білками – *транспортинами*, або каріоферинами (*transportins, karyopherins*). Транспортини, що залучаються у транспорт до ядра, називаються *імпортинами*, а із ядра – *експортинами*. Кожний транспортин для здійснення своєї функції повинен мати три активності: розпізнавати та зв'язувати субстрат, що транспортується; "заякорюватися" на ядерній порі; зв'язувати невеликий білок – ГТФаза Ran (малий G білок із родини Ras-подібних ГТФаз, який служить для спряження транспорту з гідролізом ГТФ, що надає процесу енергії).

Маркерними ферментами ядерної оболонки є глюкозо-6-фосфатфосфатаза, пірофосфатаза, манозо-6-фосфатфосфатаза, 5'-нуклеотидаза, лізофосфоліпідтрансфераза, Mg^{2+} -залежна АТФаза, фосфоліпази А і С, протеїнкінази. Наявність у ядерній мембрані таких ферментів, як *серинові/треонінові протеїнкінази* (зокрема, здійснюють фосфорилування білків-регуляторів реплікації, наприклад гістонів), *фосфатази* (відщеплюють залишки фосфорної кислоти з утворенням АТФ), *фосфоліпази А і С* (залучені в синтез ейкозаноїдів, фосфатидилінозитол-1,4,5-фосфату і діацилгліцеролу), Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежна АТФаза (забезпечує транспорт Ca^{2+} і виконує регуляторну роль у біосинтетичних процесах у ядрі) свідчить про те, що ядерна мембрана безпосередньо залучена до внутрішньоклітинної трансдукції.

1.4. Механізми мембранного транспорту

Біологічні мембрани виконують багато різноманітних функцій. Як уже було відзначено, плазматична мембрана є механічним бар'єром, що відокремлює клітину від позаклітинного середовища, залучається у трансмембранні рухи речовин, здійснює рецепторну функцію, забезпечуючи надходження у клітину сигналів від гормонів, факторів росту та інших біологічно активних сполук, бере участь у регуляції синтезу та ефектів циклічних нуклеотидів, здійснює міжклітинні взаємодії й є місцем заякорювання цитоскелета; плазматич-

чні мембрани збудливих тканин сприяють поширенню процесів збудження. Спряжені мембрани, зокрема, мітохондріальні, є місцем генерування енергії; мембрани мікросомальної фракції залучаються у процеси детоксикації численних ендо- та екзогенних токсинів.

У даному підрозділі не будуть розглядатися деякі з наведених функцій, оскільки більш повну їхню характеристику буде подано в наступних розділах посібника.

Плазматична мембрана, як і інші біологічні мембрани, є напівпроникною, тобто має неоднакову проникність для різних сполук (рис. 1.18). Гідрофобні сполуки, а також O_2 , CO_2 , N_2 можуть вільно проходити крізь мембрану, тоді як заряджені іони взагалі не здатні її перетинати без використання спеціальних молекул-помічників. Малі й великі незаряджені полярні молекули (вода, сечовина, гліцерол та глюкоза, сахароза відповідно), мають певні ускладнення під час транспорту крізь мембрану, які більш виражені для великих молекул, і тому для більш ефективного перенесення також потребують транспортних молекул.

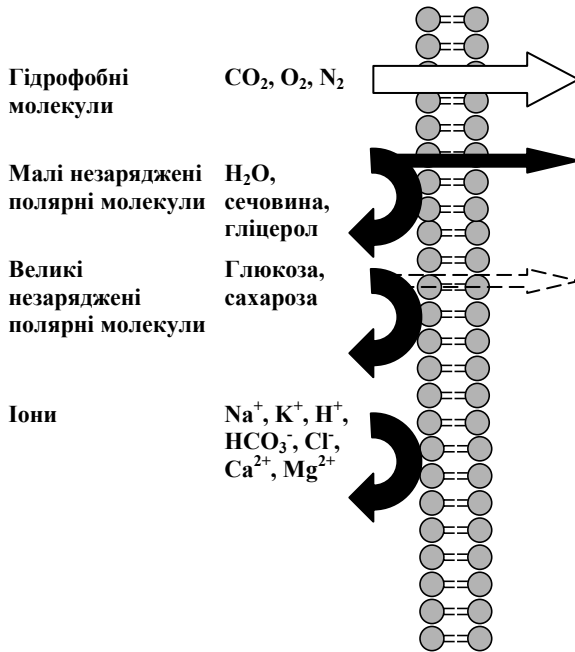


Рис. 1.18. Схема проникності плазматичної мембрани для різних сполук

Завдяки існуванню специфічних транспортних систем плазматична мембрана є основною структурою, що забезпечує створення і підтримку концентраційного (табл. 1.3) та електрохімічного градієнтів і залучає клітину до обміну речовин.

Таблиця 1.3. Концентрації деяких іонів у клітині та поза нею

Іони	Внутрішньоклітинна концентрація	Позаклітинна концентрація
Na^+	5–15 мМ	145 мМ
K^+	140 мМ	5 мМ
Mg^{2+}	0.5 мМ	1–2 мМ
Ca^{2+}	10^{-7} М	10^{-3} М
H^+	8×10^{-5} мМ, рН = 7.1	4×10^{-5} мМ, рН = 7.4
Cl^-	5–15 мМ	110 мМ

Мембранні транспортні процеси, що відбуваються у клітині, можна віднести до одного із двох основних типів – пасивного або активного транспорту (рис. 1.19). Під час **пасивного транспорту** речовина переноситься за градієнтом концентрації без залучення енергії гідролізу АТФ. Пасивний транспорт, у свою чергу, може здійснюватися шляхом *простої* або *полегшеної дифузії* (в останньому випадку – за допомогою специфічного переносника, каналу або іонофору). Під час **активного транспорту** рух речовини здійснюється *проти* концентраційного градієнта за рахунок енергії, що вивільнюється при гідролізі АТФ. Активний транспорт поділяють на *первинно-активний* (його опосередковують ферменти-АТФази, наприклад, Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза та інші помпи (насоси), що переносять неорганічні іони, а також представники АВС-транспортерів, що здійснюють транслокацію органічних субстратів) і *вторинно-активний транспорт*, зокрема Na^+ -залежний котранспорт глюкози (або амінокислот). Це так званий *спряжений транспорт*, або *котранспорт*, який здійснюється за рахунок енергії, зумовленої градієнтом інших іонів, у даному випадку – Na^+). До активного

транспорту також належать *ендо-* та *екзоцитоз*, які теж є енергозалежними, переносять сполуки проти концентраційного градієнта, але, на відміну від наведених прикладів, супроводжуються порушенням структурної цілісності мембран.

Коли молекули речовин, що транспортуються (або іони) переносяться через мембрану незалежно від наявності та перенесення інших сполук, ідеться про *уніпорт*. *Котранспортом* називають перенесення молекул (іонів) речовини, пов'язане (і зумовлене) транспортом інших молекул або іонів.

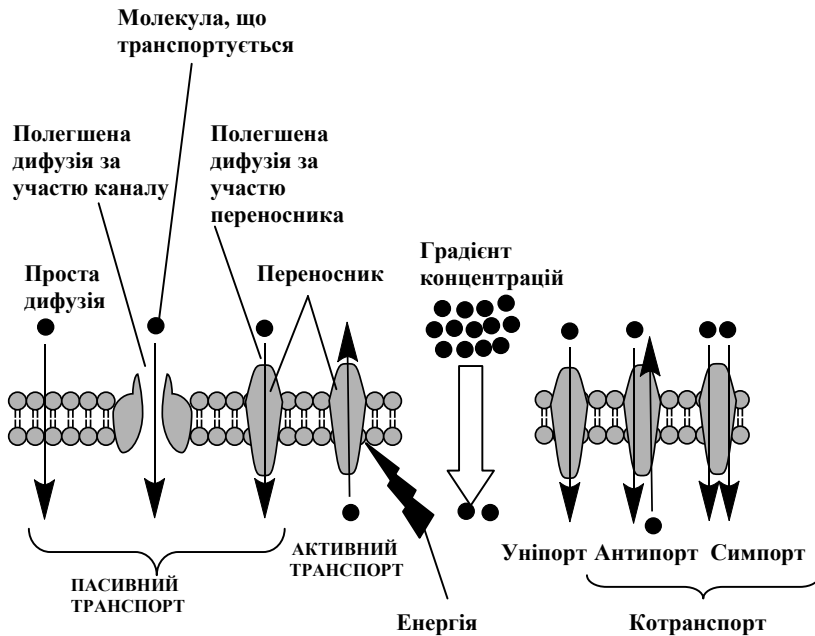


Рис. 1.19. Типи мембранного транспорту

До котранспорту належить як *симпорт* – тип руху, за якого молекули речовини (або іони), що транспортуються, переносяться через мембрану одночасно та односпрямовано з іншими сполуками, так і *антипорт* – транспорт молекул (іонів) сполуки, зумовлений одночасним і протилежно спрямованим транспортом іншої речовини.

1.4.1. Пасивний транспорт. Проста дифузія

Дифузійними процесами називають самовільне переміщення речовини за градієнтом концентрації внаслідок теплового руху молекул, яке приводить систему до стану рівноваги (рис. 1.20).

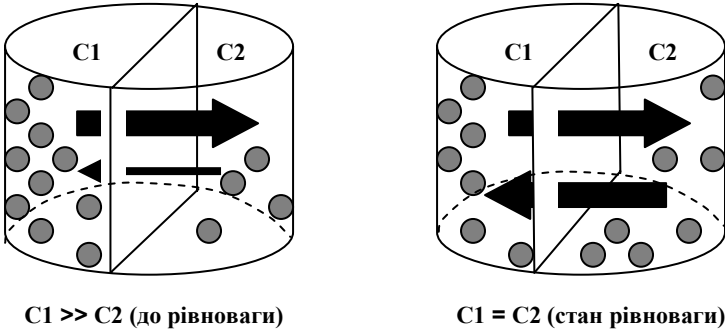


Рис. 1.20. Схема дифузійних процесів

Проста дифузія (наприклад, транспорт CO_2 , H_2O , O_2) є процесом неспецифічним і дуже повільним, описується він рівнянням Фіка:

$$dm/dt = -DS dC/dx,$$

де dm/dt – кількість речовини m , що проходить через поверхню S за час t ; D – коефіцієнт дифузії ($\text{см}^2/\text{с}$); C – концентрація речовини; x – відстань.

Швидкість простої дифузії залежить від розміру молекул, що переносяться, і від їхньої концентрації.

1.4.2. Пасивний транспорт. Полегшена дифузія

Полегшена дифузія, порівняно із простою, є процесом більш специфічним і більш швидким; вона можлива за участю *каналу* (наприклад, канали для іонів K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), *переносника* (так звані *пермеази* (від *permeate* – проникність) – родина білків-переносників, які збільшують проникність мембрани для певних речовин; до неї належать, зокрема, транспортери для глюкози), *іонофорів* (антибіотиків, здатних формувати канал (приклад – *граміцидин*, який пронизує білкову мембрану наскрізь і формує канал,

по якому можуть рухатися іони натрію), або виступати у ролі мобільних переносників, які при зв'язуванні зі сполукою, що транслюється, змінюють свою конформацію, із гідрофільних стають гідрофобними і, обертаючись навколо своєї осі, перетинають мембрану (приклад – валіноміцин, що, зв'язуючи іони K^+ , перетворюється на гідрофобну сполуку й перетинає мембрану).

При полегшеній дифузії переміщення речовини, як і у випадку простої, переводить систему у стан рівноваги. Разом із тим, застосування каналу, переносника або іонофору збільшує швидкість дифузії (рис. 1.21).

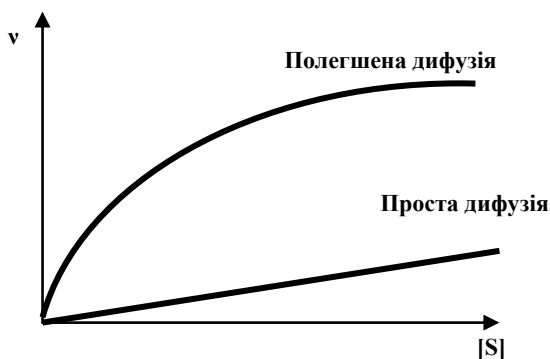


Рис. 1.21. Залежності швидкості дифузії (v) від концентрації субстрату ($[S]$) для пасивної і полегшеної дифузії

Такий транспорт підлягає *кінетиці насичення* внаслідок того, що ПМ клітин характеризується певною кількістю молекул, що полегшують дифузійні процеси, і при додаванні субстрату S (молекули, що переносяться) рано чи пізно настає такий момент, коли всі транспортні структури будуть зайняті (*ефект насичення*), і при подальшому збільшенні кількості субстрату швидкість дифузії практично не буде змінюватися.

При полегшеній дифузії в тих випадках, коли одним переносником, наприклад каналом, переносяться різні сполуки, спостерігається *конкуренція речовин, які переносяться*; при цьому одні речовини переносяться краще, ніж інші, і додавання цих сполук ускладнює транспорт інших. Також є сполуки, що блокують полегшену дифузію, утворюючи міцний комплекс із молекулами переносника, що запобігає подальшому перенесенню.

1.4.2.1. Рухливі переносники

Полегшена дифузія, опосередкована переносником GLUT1 (транспортер для глюкози).

Переносники родини GLUT здійснюють транспорт глюкози, зокрема її поглинання еритроцитами, перенесення через базальну мембрану еритроцитів тощо (рис. 1.22).

Це структурно близькі мембранні білки з різними функціями. GLUT-1 та GLUT-3 мають високу спорідненість до глюкози (K_d близько 1 мМ). Вони виявлені майже в усіх клітинах, де забезпечують постійне надходження глюкози (табл. 1.4).

Таблиця 1.4. Характеристики переносників родини GLUT

Транспортер	Тканинна експресія	Ген	Роль
GLUT-1	Всюди	<i>SLC2A1</i>	Базальне поглинання глюкози
GLUT-2	Печінка, підшлункова залоза, кишечник	<i>SLC2A2</i>	Видалення надлишку глюкози із крові (печінка), регуляція вивільнення інсуліну (підшлункова залоза)
GLUT-3	Мозок	<i>SLC2A3</i>	Базальне поглинання глюкози
GLUT-4	М'язи, жирова тканина, серце	<i>SLC2A4</i>	Транспорт глюкози; активність зростає під впливом інсуліну
GLUT-5	Кишечник, сім'яники, нирки	<i>SLC2A5</i>	Транспорт глюкози
GLUT-6	Селезінка, лейкоцити, мозок	<i>SLC2A6</i>	?
GLUT-7	ЕПР печінки	<i>SLC2A7</i>	?
GLUT-8	Сім'яники, мозок	<i>SLC2A8</i>	?
GLUT-9	Печінка, нирки	<i>SLC2A9</i>	?
GLUT-10	Печінка, підшлункова залоза	<i>SLC2A10</i>	?
GLUT-11	Серце, скелетні м'язи	<i>SLC2A11</i>	?
GLUT-12	Скелетні м'язи, адипоцити, тонкий кишечник	<i>SLC2A12</i>	

GLUT-2 виявлений у клітинах печінки та підшлункової залози. Цей переносник має набагато меншу спорідненість до глюкози (K_d 15–20 мМ). GLUT-4 з K_d близько 5 мМ виявлений у ПМ м'язових і жирових клітин. Гормон інсулін спричиняє збільшення кількості молекул GLUT-4 на поверхні клітини і таким чином стимулює надходження глюкози в ці тканини (підрозд. 4.2). GLUT-5 синтезується клітинами кишкового епітелію.

GLUT1 має 12 трансмембранних доменів і М. м. ~ 45 кД. Кілька цих доменів формують лінійний канал із гідрофільними залишками амінокислот; це дозволяє утворювати із молекулою глюкози водневі зв'язки під час її транспортування через мембрану.

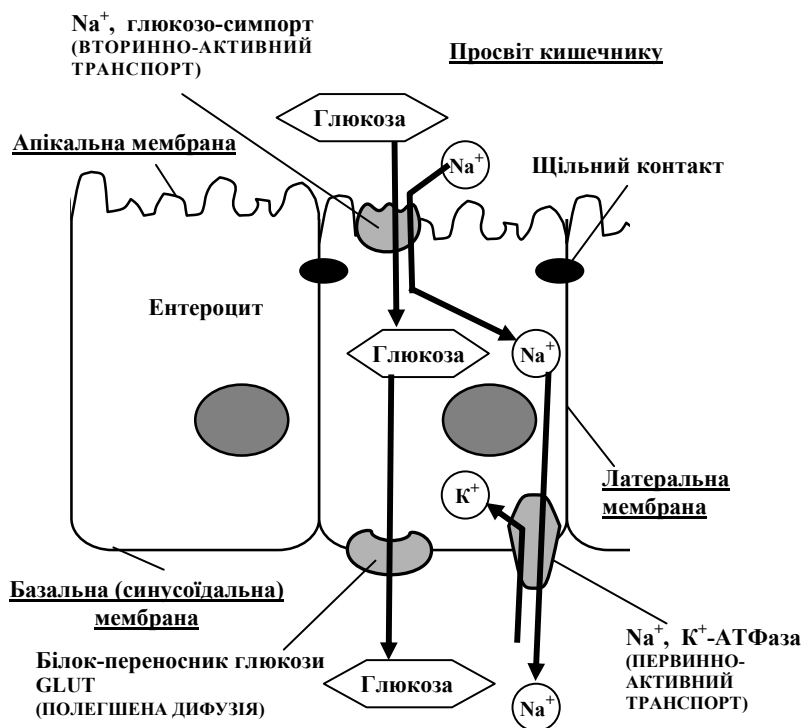


Рис. 1.22. Схема транспорту глюкози ентероцитом: переносник для глюкози локалізований у базальній мембрані ентероциту

Схема перенесення глюкози цією транспортною системою наведена на рис. 3.3. GLUT має ділянку зв'язування глюкози на зовнішньому боці ПМ. Після приєднання глюкози конформація білка змінюється з T1 на T2, через що глюкоза виявляється зв'язаною з білком у ділянці, зверненій усередину клітини. Надалі глюкоза відокремлюється від переносника, переходячи всередину клітини, а останній знову змінює конформацію – з T2 на T1.

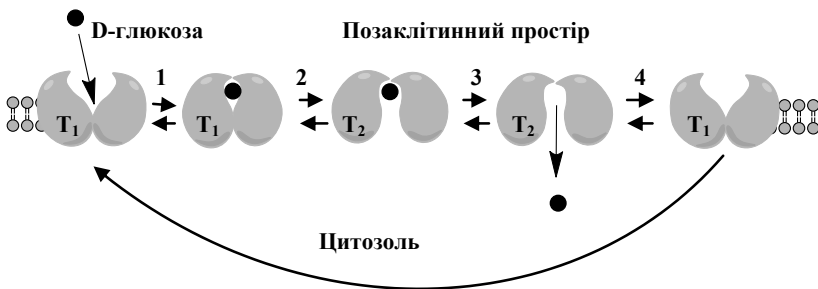


Рис. 1.23. Схема функціонування транспортеру для глюкози

1.4.2.2. Іонні канали

Іонна проникність клітинних мембран забезпечується іонними каналами. Більшість із них вбудовані в ліпідний бішар (тобто є інтегральними білками), мають специфічність (вибірковість) щодо іона або групи іонів. Швидкість руху через канали, як і в інших випадках полегшеної дифузії, підлягає феномену насичення при зростанні концентрації субстратів (іонів). Канали можуть конкурентно пригнічуватися аналогами субстрату (іонами-блокаторами). Наприклад, кальцієвим каналам притаманна відносно низька специфічність, тому через них легко проходять двовалентні катіони стронцій і барій, тоді як інші – нікель, кобальт, кадмій, марганець – є блокаторами Ca^{2+} -каналів, конкурентно зв'язуючись із певними ділянками в їхній структурі.

Крім того, специфічні речовини можуть бути активаторами чи інгібіторами іонних каналів; можлива також регуляція через фосфорилування по залишках треоніну, серину, тирози-

ну. Через різні канали за секунду проходить 10^6 – 10^9 іонів, причому канали працюють за принципом "усе або нічого", тобто можуть бути або закритими, або відкритими. Із закритого стану у відкритий їх переводять конформаційні зміни.

За механізмом відкриття виділяють кілька типів мембранних каналів:

- *лігандозалежні* – відкриваються після зв'язування із лігандом (ліганд може бути позаклітинним або внутрішньоклітинним, але не є іоном, який транспортується по каналу);
- *потенціалзалежні* – регулюються при деполяризації ПМ у клітинах, здатних до збудження (нейрони, м'язові клітини);
- *механочутливі* – наприклад, відкриття механічними впливами звукових хвиль іонних каналів клітин внутрішнього вуха, що спричиняє виникнення нервового імпульсу, який надає в мозку інтерпретується як звук;
- *світлочутливі* (містяться на ПМ клітин сітківки ока);
- *температурочутливі* (відкриваються за підвищення або зниження температури тіла).

Деякі іонні канали конститутивно перебувають у відкритому (активному) стані. Прикладом таких структур може слугувати високоспецифічний *епітеліальний натрієвий канал* (*epithelial sodium channel, ENaC*). Ці іонні канали локалізовані на апікальних ділянках мембран клітин епітелію і відіграють важливу роль у підтримці водно-сольового балансу в організмі. Зокрема, ENaC апікальних мембран епітеліальних клітин дистальних звивистих канальців та збирних трубок нирок, діючи спряжено із Na^+ , K^+ -АТФазою синусоїдальної мембрани, забезпечує реабсорбцію іонів натрію в нирках, сприяючи тим самим осмотичному руху води та регуляції всмоктування іонів K^+ . Лікарські препарати *триамтерен* і *амілорид*, блокуючи цей канал, утримують натрій (а отже, і молекули води) у ниркових канальцях, чим зумовлюють діуретичний ефект. Альдостерон, підвищуючи рівень експресії мРНК Na^+ , K^+ -АТФази та ENaC, має протилежні впливи на сечоутворення. Окрім нирок, ці натрієві канали характерні для апікальних мембран епітелію прямої кишки, легень, потових залоз, де вони також беруть участь у регуляції реабсорбції натрію.

Лігандозалежні іонні канали

Прикладом *позаклітинних лігандів*, які здатні спричинити відкриття іонних каналів, є ацетилхолін, серотонін, глутамат, γ -аміноасляна кислота (ГАМК), гліцин тощо. Ацетилхолін-залежний катіонний канал, структуру якого наведено на рис. 1.24, є класичним прикладом лігандозалежних іонних каналів і складається із п'яти субодиниць (a, a, b, d, g), кожна із яких має по чотири трансмембранні домени.

Ацетилхолінзалежний катіонний канал складається із 5 с/о; кожна із них має 4 трансмембранні домени

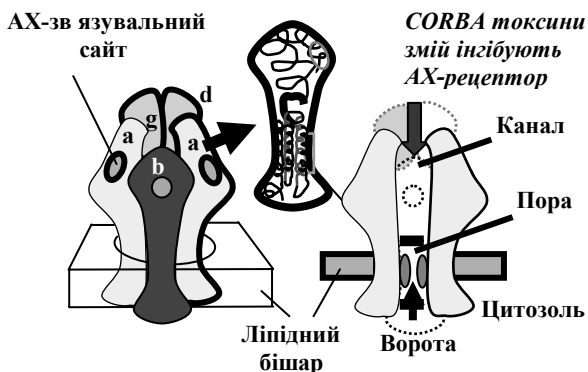


Рис. 1.24. Структура ацетилхолінзалежного катіонного каналу (АХ – ацетилхолін; пояснення в тексті)

Внутрішньоклітинними лігандами найчастіше є **фосфатні залишки**, що приєднуються до ОН-груп серину, треоніну чи тирозину у складі поліпептидного ланцюга молекули каналу під впливом ферментів-протеїнкіназ у процесі фосфорилування. Серин/треонінові протеїнкінази активуються через збільшення у цитозолі вторинних посередників (месенджерів – розд. 2), зокрема цАМФ, цГМФ, іонів кальцію, тоді як тиро-

зинові протеїнкінази стимулюються дією позаклітинних агентів (наприклад, рецептор до інсуліну) або внаслідок активації інших сигнальних шляхів клітини (наприклад, цитозольна тирозинова протеїнкіназа Src). Фосфорилування регуляторних компонентів каналу також контролює тривалість його існування у відкритому стані.

Вторинні месенджери можуть слугувати внутрішньоклітинними лігандами і без залучення протеїнкіназ. Так, безпосередніми активаторами іонних каналів є **циклічні нуклеотиди цАМФ і цГМФ** – відповідні канали називаються *іонними каналами, що відкриваються дією циклічних нуклеотидів* (*cyclic nucleotide-gated channels, CNGCs*) (підрозд. 2.1), **іони кальцію** (наприклад, *калієві канали, що активуються кальцієм* – *K_{Ca} канали, calcium-activated potassium channels*), **інозитол-1,4,5-трифосфат** (рецептор до I-1,4,5-P₃), **циклічна АДФ-рибоза** (ріанодиновий рецептор), а також **АТФ і АДФ** (зокрема, *АТФ-чутливі калієві канали* – *K_{АТФ}-канали, ATP-sensitive potassium channels*).

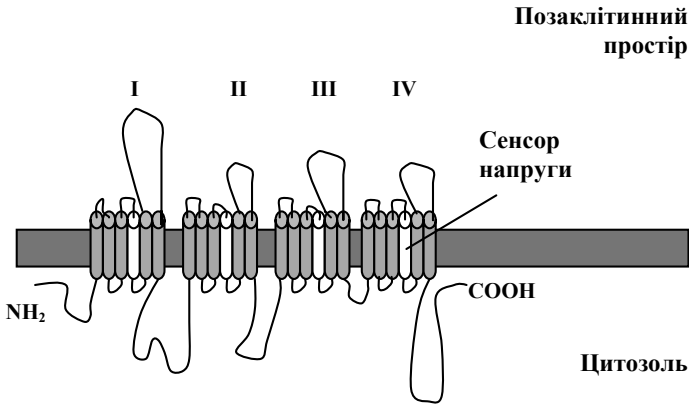
Потенціалзалежні іонні канали

Молекула **потенціалзалежного Na⁺-каналу** є комплексом двох типів білкових субодиниць – α і β . α -субодиниця формує пору каналу, тоді як β -субодиниця є регуляторною, а також відповідає за зв'язок із внутрішньоклітинним цитоскелетом і позаклітинним матриксом.

α -субодиниця має 4 домени, що повторюються (I–IV) (рис. 1.25); кожен такий домен, у свою чергу, має 6 трансмембранних спіралей (S1–S6). Висококонсервативна S4 спіраль діє як сенсор напруги каналу через те, що в кожній 3-й позиції цієї спіралі розташовані позитивно заряджені залишки амінокислот. Коли трансмембранний потенціал змінюється, ця ділянка рухається до позаклітинного боку ПМ і відкриває канал для іонів.

Сама пора може бути поділена на дві частини. Ближче до позаклітинного середовища містяться *P-петлі* ("*P-loops*"), утворені ділянками між S5 і S6 кожного із 4-х доменів. Ця

частина відповідає за селективність каналу. Внутрішня ділянка пори – та, що розташована ближче до цитоплазми – утворена безпосередньо спіралями S5 і S6 усіх чотирьох доменів.



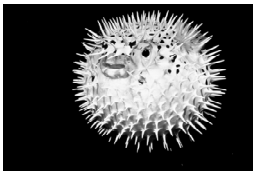
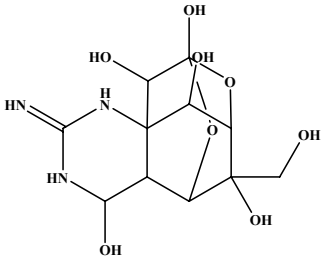
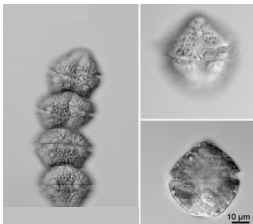
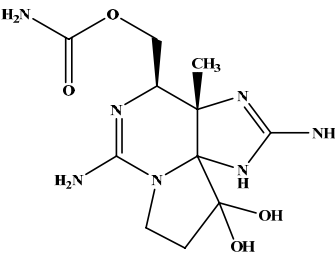
Na⁺-канал має 4 трансмембранні домени (I–IV); кожний із них має 6 трансмембранних α-спіралей (S1–S6); четверта з них (S4) є сенсором напруги

Рис. 1.25. Схематична структура α-субодиниці Na⁺-каналу

Різні біологічні мембрани містять від 1 до 50 каналів на 1 мкм² площі поверхні; діаметр молекули каналу становить близько 8 нм, а його просвіту – 0,5 нм.

Існує ряд сполук, здатних специфічно блокувати Na⁺-канали. Найвідомішими із таких речовин є тетродотоксин і сакситоксин (табл. 1.5). *Тетродотоксин* міститься в яєчниках, печінці, у шкірі риб родини *Tetraodontidae* ("puffer fish"), в організмі деяких видів тритонів (*Taricha torosa*), а *сакситоксин* – у клітинах деяких синьозелених водоростей, зокрема у джгутикових *Gonyaulax catanella*, унаслідок чого їхня надлишкова концентрація, що є небезпечною для людини, може створюватися в їстівних молюсках, а також при "цвітінні" водоростей.


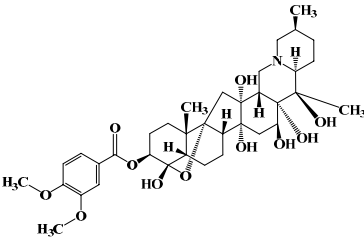
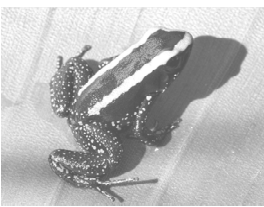
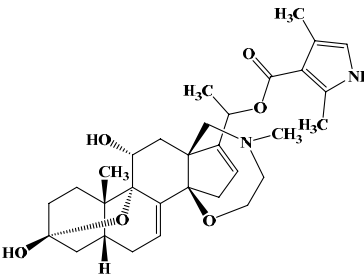
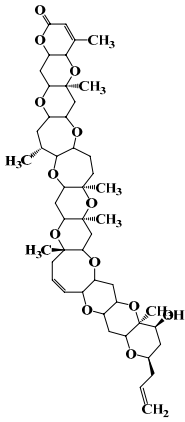
Таблиця 1.5. Блокатори потенціалзалежних Na⁺-каналів

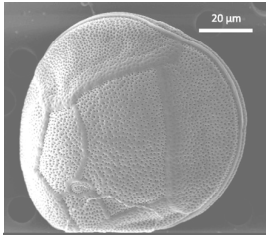
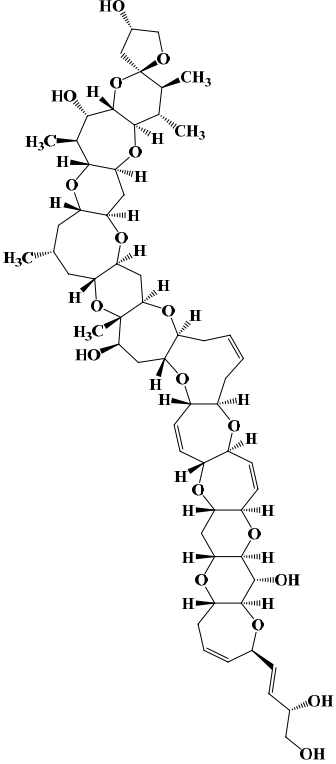
Токсин	Організм	Формула
Тетродотоксин	Риби родини скелезубових (голкочервні, <i>Tetraodontidae</i>) 	
Сакситоксин	Джгутикові <i>Gonyaulax catanella</i> 	

Ці блокатори Na⁺-каналів можуть спричинити асфіксію внаслідок блокування контролю дихання нервовою системою; за низьких їх доз виникає параліч. Рецептори до цих сполук розташовані біля зовнішнього вустя каналу.

Токсини іншої групи – вератридин, граянотоксин, батрахотоксин, ціагутероподібні токсини (напр., бревітоксин) – діють як активатори Na⁺-каналів (так звані *розчинні в ліпідах активатори натрієвих каналів*) (табл. 1.6). Сполуки цієї групи зв'язуються з рецептором на межі між ліпідами мембрани і пептидними ланцюгами молекули натрієвого каналу. Симптомами отруєння є діарея, нейрологічні дефекти із втратою чутливості, парестезіями, паралічами, перепадами "тепло-холод", галюцинаціями.

Таблиця 1.6. Активатори потенціалзалежних Na⁺-каналів

Токсин	Організм	Формула
<p><i>Вератридин</i> – алкалоїд стероїдної природи</p>	<p>Рослини родини лілейних (<i>Veratrum album</i> – чемериця біла)</p> 	
<p><i>Батрахотоксин</i></p>	<p>Отрута секрету жаби <i>Phyllobates aurotaenia</i></p> 	
<p><i>Бревітоксин</i></p>	<p>Продукент – динофлагелят <i>Gymnodinium brevis</i>. Ця сполука також здатна накопичуватися в тілі коралових риб</p>	

Токсин	Організм	Формула
<p><i>Токсини цигуатера</i></p>	<p>Продукуються джгутиковими <i>Gamberdiscus</i>, акумулюються в тілі коралових риб, із м'ясом яких потрапляють до шлунково-кишкового тракту людини</p> 	

Потенціалзалежний K^+ -канал хребетних є октамером (4 α -субодиниці утворюють стінки трансмембранної пори), β -субодиниця асоціюється із α -субодиницею у стехіометричному співвідношенні $\alpha 4\beta 4$ і має регуляторну роль (рис. 1.26).

Кожна α -субодиниця має 6 трансмембранних гідрофобних α -спіралей S1-S6 (тобто структура всієї α -субодиниці подібна до I, II, III і IV-доменів натрієвого потенціалзалежного каналу – рис. 1.27). S5 і S6 сегменти субодиниці зв'язує Р-ділянка. Структура K^+ -каналу аналогічна Na^+ (селективний фільтр, ворота, сенсор).

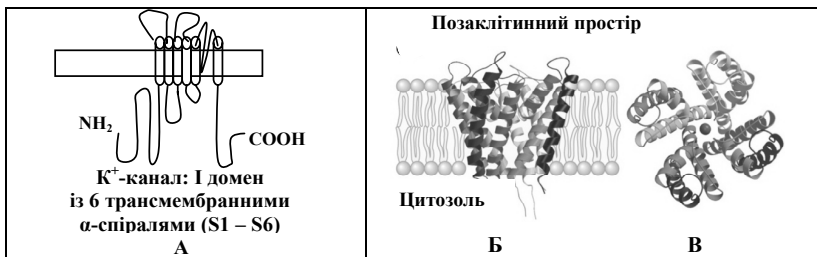
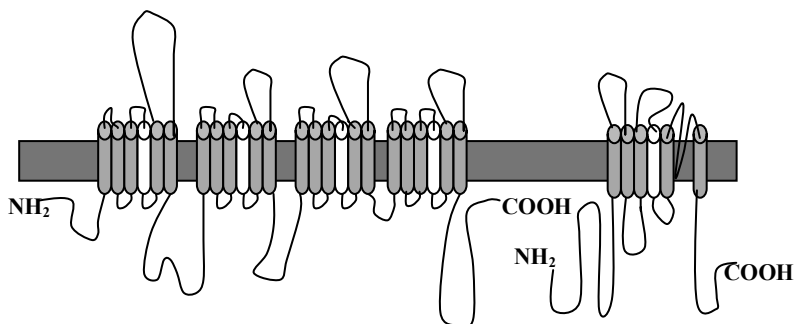


Рис. 1.26. Схематична структура потенціалзалежного K^+ -каналу: схематична структура α -субодиниці K^+ -каналу (А), K^+ -канал – вид збоку (Б), вид зверху (В)



Na^+ -канал має 4 трансмембранні домени (I–IV); кожний із них має 6 трансмембранних α -спіралей; четверта з них є сенсором напруги


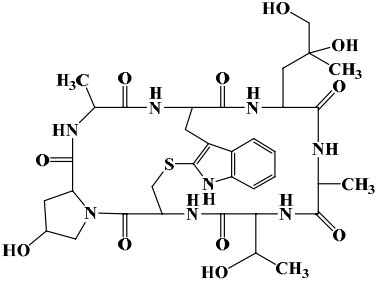

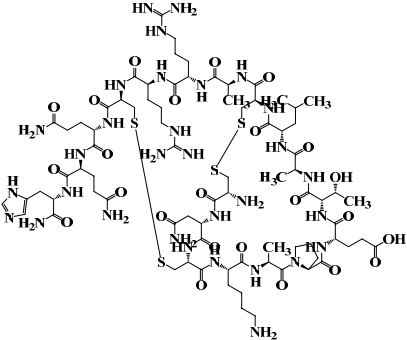

K^+ -канал: I домен із 6 трансмембранними α -спіралями

Рис. 1.27. Порівняльна схема структури α -субодиниць потенціалзалежних Na^+ - і K^+ -каналів


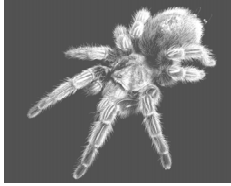
Є кілька підвидів K^+ -каналів, що відрізняються за залежністю від потенціалу, здатністю до інактивації, кінетикою активації та інактивації, фармакологічними характеристиками. Деякі з K^+ -каналів регулюються як мембранним потенціалом, так і нейромедіаторами й гормонами.

Вибірковим блокуючим агентом K^+ -каналу є *тетраетиламоній*, що блокує його внутрішнє вустя; іншими блокаторами є такі органічні сполуки небіологічного походження, як *4-амінопіридин*, *фенциклідин*, *9-аміноакридин*, а також іони лужних металів (цезій тощо). Поліпептидні речовини – похідні живих організмів із подібними властивостями наведені в табл. 1.7.

Таблиця 1.7. Блокатори потенціалзалежних K⁺-каналів

Токсин	Організм	Формула
Фаллоїдин	<p><i>Amanita phalloides</i></p> 	
Апамітін	<p><i>Apis mellifera</i></p> 	
Агітоксин-2	<p>Отрута жовтого скорпіона <i>Leiurus quinquestratus herbraeus</i></p> 	<p>Gly-Val-Pro-Ile-Asn-Val-Ser-Cys-Thr-Gly-Ser-Pro-Gln-Cys-Ile-Lys-Pro-Cys-Lys-Asp-Ala-Gly-Met-Arg-Phe-Gly-Lys-Cys-Met-Asn-Arg-Lys-Cys-His-Cys-Thr-Pro-Lys</p>

Закінчення табл. 1.7.

Токсин	Організм	Формула
Тітуїс-токсин К-α	Скорпіон <i>Tityus serrulatus</i>	Val-Phe-Ile-Asn-Ala-Lys-Cys-Arg-Gly-Ser-Pro-Glu-Cys-Leu-Pro-Lys-Cys-Lys-Glu-Ala-Ile-Gly-Lys-Ala-Ala-Gly-Lys-Cys-Met-Asn-Gly-Lys-Cys-Lys-Cys-Tyr-Pro
Імператор-токсин А	Скорпіон <i>Pandinus imperator</i>	Gly-Asp-Cys - Leu-Pro-His-Leu-Lys-Arg-Cys-Lys-Ala-Asp-Asn-Asp-Cys-Cys-Gly-Lys-Lys-Cys-Lys-Arg-Arg-Gly-Thr-Asn-Ala-Glu-Lys-Arg-Cys-Arg
Дендротоксин	<i>Dendroaspis angusticeps</i> 	Gln-Pro-Arg-Arg-Lys-Leu-Cys-Ile-Leu-His-Arg-Asn-Pro-Gly-Arg-Cys-Tyr-Asp-Lys-Ile-Pro-Ala-Phe-Tyr-Tyr-Asn-Gln-Lys-Lys-Lys-Gln-Cys-Glu-Arg-Phe-Asp-Trp-Ser-Gly-Cys-Gly-Gly-Asn-Ser-Asn-Arg-Phe-Lys-Thr-Ile-Glu-Glu-Cys-Arg-Arg-Thr-Cys-Ile-Gly
Ханатоксини I і 2	Токсини тарантула <i>Grammostola spatulata</i> 	Glu-Cys-Arg-Tyr-Leu-Phe-Gly-Gly-Cys-Lys-Thr-Thr-***-Asp-Cys-Cys-Lys-His-Leu-Gly-Cys-Lys-Phe-Arg-Asp-Lys-Tyr-Cys-Ala-Trp-Asp-Phe-Thr-Phe-Ser (*** Ser у молекулі NaTx_1 або Ala в молекулі NaTx_2)

Потенціалзалежні Ca^{2+} -канали залежно від субодиничного складу, провідності, швидкості активації та інактивації, специфічних блокаторів, локалізації поділяються на кілька типів. Так, є два великі класи цих структур – HVA (*high voltage activated* – ті, що активуються в умовах сильної деполяризації) та LVA (*low voltage activated* – ті, що активуються в умовах слабкої деполяризації) Ca^{2+} -канали (табл. 1.8).

Таблиця 1.8. Класифікація потенціалзалежних кальцієвих каналів

Тип	Залежність від потенціалу	Субодинамічний склад	Тканинна специфічність	Інгібітори
Ca²⁺-канали L-типу ("Long-Lasting")	HVA	$\alpha_1, \alpha_2\delta, \beta, \gamma$	Скелетний і гладенький м'язи, кісткова тканина (остеобласти), міоцити шлуночків серця, дендрити кортикальних нейронів	Дигідропіридин; фенілалкіламіни (верапаміл); бензодіазепіни (ділтіазем)
Ca²⁺-канали R-типу ("Purkinje") та Q-типу	HVA	$\alpha_1, \alpha_2\delta, \beta, \gamma$	Клітини Пуркінєс	Речовини з отрути воронкових водяних павуків funnel web spider (атратоксини, агатоксин IVA). ω -Конотоксин MVIIIC (Q-тип каналів є більш чутливим до цієї сполуки)
Ca²⁺-канали N-типу ("Neural"/"Non-L")	HVA	$\alpha_1, \alpha_2\delta/\beta_1, \beta_3, \beta_4, \gamma$	Нейрони мозку та периферійної нервової системи	ω -Конотоксини GVIA і MVIIA
Ca²⁺-канали R-типу ("Residual")	IVA	$\alpha_1, \alpha_2\delta, \beta, \gamma$	Нейрони мозку	Пептид SNX-482 тарангула <i>Hysteroocrates gigas</i>
Ca²⁺-канали T-типу ("Transient")	LVA	$\alpha_1, ?$	Нейрони мозку, кісткова тканина (остеоцити)	Іони нікелю. Пептид із отрути скорпіона <i>Parabuthus transvaalicus</i>

Молекули потенціалзалежних кальцієвих каналів є комплексом кількох різних субодинаміць: $\alpha_1, \alpha_2\delta, \beta_{1-4}$ та γ . α_1 -субодинаміця формує пору для проходження іонів, тоді як асоційовані з нею субодинаміці

є регуляторними. α_1 -Субодиниця (~190 кД) є гомологічною до α -субодиниці потенціалзалежного натрієвого каналу (див. вище) – має чотири домени (I–IV), кожен із яких містить по 6 трансмембранних α -спіралей (S1–S6), причому спіраль S4 слугує сенсором напруги. α_2 і δ -субодиниці є продуктом одного й того самого гена і через дисульфідний зв'язок утворюють між собою комплекс $\{\alpha_2\delta\}$ із М.м. 170 кД.

HVA Ca^{2+} -канали поділяються на канали L, N, P/Q і R-типів, тоді як до LVA Ca^{2+} -каналів належать лише канали T-типу. Представників R-типу кальцієвих каналів часом класифікують як канали IVA класу (*intermediate-voltage-activated* – ті, що активуються за середньої деполяризації).

Ca^{2+} -канали L-типу ("Long lasting") мають найвищу провідність, активуються при сильній деполяризації та мають дуже слабку здатність до інактивації. Ці структури чутливі до впливу *дигідропіридину*, фенілалкіламінів (верапаміл), бензодіазепінів (ділтіазем) і кальцісептинів.

Представники N-типу ("Neural"/"Non-L") Ca^{2+} -каналів є проміжними за провідністю, активуються за умов сильної деполяризації та повільно інактивуються. Специфічними блокаторами є ω -коноксисини GVIA (потужне, необоротне інгібування) і MVIIA; канали цієї групи нечутливі до дигідропіридину.

Ca^{2+} -канали T-типу ("Transient") мають низьку провідність, активуються за умов навіть дуже слабкої деполяризації (у межах потенціалу спокою), характеризуються швидкою інактивацією та швидким відновленням каналу. Представлені кількома підформами залежно від локалізації, які, до того ж, різняться і за іншими параметрами. Блокаторами цього типу кальцієвих каналів є іони нікелю і пептид із отрути скорпіона Південної Африки *Parabuthus transvaalicus*; дигідропіридин не є їхнім інгібітором.

Ca^{2+} -канали P-типу ("Purkinje") активуються за умов сильної деполяризації і володіють повільною інактивацією. Блокада каналів здійснюється речовинами з отрути воронкових водяних павуків *funnel web spider* (атратоксини; агатоксин IVA) і ω -коноксисином MVIIIC; канал нечутливий до дії дигідропіридину і ω -коноксисину GVIA.

Q-тип Ca^{2+} -каналів за властивостями подібний до P-типу: активується за сильної деполяризації, повільно інактивується. Більш чутливий до ω -коноксисину MVIIIC, ніж P-тип;

R-min ("Residual") Ca^{2+} -каналів характеризується високим порогом активації в умовах сильної деполяризації, потенціалзалежною швидкою інактивацією. Блокуються такі канали SNX-482 пептидом африканського тарантула *Hysteroocrates gigas*.

Отже, Ca^{2+} -канали N-,P- та Q-типів здатні блокуватися різними сполуками, які належать до групи конотоксинів – пептидів, що містять 10–30 амінокислотних залишків, мають один або більше дисульфідних зв'язків і продукуються отруйними морськими конусоподібними равликами (*cone snails*), яких нараховується понад 500 видів. Окрім розглянутих конотоксинів ω , які зв'язують Ca^{2+} -канали, серед споріднених до них речовин є блокатори рецептора до ацетилхоліну (конотоксини α) та інгібітори Na^+ -каналів (δ та μ) (табл. 1.9), причому кожний із цих типів конотоксинів (α , δ , μ , κ , ω) представлений дуже гетерогенною групою споріднених сполук.

Таблиця 1.9. Конотоксини як блокатори іонних каналів

<p><i>α-конотоксин</i> інгібує нікотиновий ацетилхоліновий рецептор у нервовій і м'язовій системі</p> <p><i>δ-конотоксин</i> інгібує інактивацію потенціалзалежних натрієвих каналів</p> <p><i>κ-конотоксин</i> інгібує калієві канали</p> <p><i>μ-конотоксин</i> інгібує потенціалзалежні натрієві канали у м'язах</p> <p><i>ω-конотоксин</i> інгібує N-тип потенціалзалежних кальцієвих каналів</p>	<div data-bbox="517 708 927 1018" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="532 1038 910 1066">Конусоподібний равлик (<i>cone snails</i>)</p> <p data-bbox="449 1090 956 1235"><u>ω-Conotoxin GVIA:</u> Cys-Lys-Ser-Hyp-Gly-Ser-Ser-Cys-Ser-Hyp-Thr-Ser-Tyr-Asn-Cys-Cys-Arg-Ser-Cys-Asn-Hyp-Tyr-Thr-Lys-Arg-Cys-Tyr (дисульфідні зв'язки: Cys¹-Cys¹⁶, Cys⁸-Cys¹⁹, Cys¹⁵-Cys²⁶)</p> <p data-bbox="449 1259 956 1399"><u>ω-Conotoxin MVIIIC:</u> Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Pro-Cys-Arg-Lys-Thr-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-Ser-Gly-Ser-Cys-Gly-Arg-Arg-Gly-Lys-Cys (дисульфідні зв'язки: Cys¹-Cys¹⁶, Cys⁸-Cys²⁰, Cys¹⁵-Cys²⁶)</p>
---	--

За типом іонів, що транспортуються, іонні канали поділяють на:

- хлорні; ● натрієві; ● інші.
- калієві; ● кальцієві;

Зокрема, біологічні мембрани різних типів клітин містять кілька видів **каналів до іонів хлору**, що різняться за локалізацією (ПМ, везикули), провідністю поодинокого каналу, механізмом відкриття, молекулярною структурою. На відміну від раніше розглянутих систем, ці структури можуть переносити інші аніони (напр., Γ або NO_3^-), часом навіть краще, ніж власне Cl^- , але називаються Cl^- -каналами, оскільки Cl^- – найчисельніший аніон в організмі. Cl^- -канали у тканині скелетного м'яза залучаються до стабілізації потенціалу спокою, а у гладеньких м'язах відкриття Cl^- -каналів спричиняє деполяризацію ПМ. Найвідомішим блокатором хлорних каналів є хлоротоксин отрути скорпіону. Крім того, активність каналів може регулювати внутрішньоклітинна концентрація Cl^- .

Деякі з Cl^- -каналів є *лігандозалежними* (зокрема, ГАМК- та гліцинзалежні Cl^- -канали постсинаптичної мембрани); в ролі ліганду можуть виступати й іони (аніони, H^+ (pH), Ca^{2+} , фосфати (за умов фосфорилування внутрішньоклітинних амінокислотних залишків різними протеїнкіназами). Прикладом регульованих фосфатом хлорних каналів може бути CFTR-канал (від *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – регулятор трансмембранної проникності при кістозному фіброзі (муковісцидозі)), відкриття якого регулюється внутрішньоклітинним АТФ і цАМФ-залежним фосфорилуванням ПкА чи ПкG. Цей канал належить до родини ABC (*ATP-binding cassette, АТФ-зв'язувальних касетних*)-транспортерів (підпідрозд. 1.4.3.4), але, на відміну від інших членів цієї родини, які здійснюють активний транспорт органічних сполук через мембрану, полегшує дифузію іонів хлору за градієнтом концентрації й використовує АТФ не як джерело енергії, а як джерело фосфатних груп для реакції фосфорилування власної молекули. Зустрічаються також *потенціалзалежні хлорні канали* (*voltage gated chloride channels, CLC*), хлорні канали, чутливі до нуклеотидів та об'єму (*nucleotide/volume sensitive chloride channels, CLNS1A*), *внутрішньоклітинні хлорні канали* (*chloride intracellular channels*) і *Ca^{2+} -залежні хлорні канали* (*calcium activated (CLCA) chloride channels*) тощо.

Загалом хлорні канали залучаються в регуляцію рН, клітинного об'єму, транспорту органічних розчинів, процесів міграції, проліферації та диференціювання клітин.

Розлади, пов'язані з генетичними дефектами у структурі і функціях молекул іонних каналів, назвали **хворобами іонних каналів**. Найхарактерніші хвороби хлорних, натрієвих, калієвих, кальцієвих каналів наведено в табл. 1.10.

Таблиця 1.10. Хвороби іонних каналів

Іонний канал	Локалізація	Ген	Хвороба
Na ⁺ , потенціал-залежний	Скелетний м'яз	<i>SCN4A</i>	Гіперкаліємічний періодичний параліч, спадкова параміотонія і міотонія
Na ⁺ , потенціал-залежний	Нейрони	<i>SCN1A</i>	Генералізована епілепсія з нападами лихоманки
Na ⁺ , потенціал-залежний	Серцевий м'яз	<i>SCN5A</i>	Тривалий QT-синдром (серцеві аритмії)
Na ⁺ (епітеліальний)	Дистальний звивистий каналець нефрону, збирні трубки	<i>SCNN1B</i>	Синдром Ліддла. Неадекватний транспорт натрію із нирок унаслідок мутації каналу веде до зростання осмотичного тиску крові й насамкінець спричиняє гіпертензію
Ca ²⁺ , потенціал-залежний	Нейрони	<i>CACNA1A</i>	Родинна однобічна мігрень
Ca ²⁺ , потенціал-залежний	Ретина	<i>CACNA1F</i>	Спадкова стаціонарна куряча сліпота
Ca ²⁺ , цАДФ-рибозозалежний	Саркоплазматичний ретикулум (СР) скелетних м'язів	<i>RYR1</i>	Гіпертермія, асоційована з небезпечними для життя контракціями скелетних м'язів

Закінчення табл. 1.10.

Іонний канал	Локалізація	Ген	Хвороба
Ca ²⁺ , цАДФ-рибозозалежний	СР скелетних м'язів	<i>RYR2</i>	Катехоламін-індуковане патологічне збільшення частоти серцевих скорочень, кардіоміопатія
K ⁺ , потенціал-залежний	Нейрони	<i>KCNQ2</i> <i>KCNQ3</i>	Родинні неонатальні судоми
K ⁺ , потенціал-залежний	Нейрони	<i>KCNQ4</i>	Нейросенсорна тугоухість
СГ, ГАМК-залежний	Нейрони	<i>GABRA1</i> <i>GABRG2</i>	Різні форми епілепсії
СГ, потенціал-та об'ємозалежні	Нейрони	<i>CICN2</i>	Генералізована епілепсія
СГ, потенціал-залежний	Апікальні ендосоми клітин проксимальних відділів каналців	<i>CICN5</i>	Хвороба Дента – хронічне захворювання нирок із підвищеною тенденцією до утворення ниркових каменів
цАМФ-залежний СГ-канал	Епітеліальні клітини (холянгіоцити тощо)	<i>CFTR</i>	Муковісцидоз
Ацетилхоліновий рецептор	Скелетні м'язи	<i>CHRNA1</i>	Спадковий міастенічний синдром

1.4.2.3. Транспорт води й аквапорини

Дифузія води через біологічні мембрани (у тому числі й через ПМ) із менш концентрованого розчину у більш концентрований називається **осмосом**. Баланс між вмістом води всередині клітини та у позаклітинному середовищі, що контролюється осмосом, є критичним щодо виживаності та збереження функцій клітин.

Для пояснення поведінки клітини в розчині було введено термін **тонічність** – здатність розчину, що оточує клітину, спричиняти затримання або втрату нею води. Тонічність розчину залежить від концентрації в ньому сполук, які не можуть проходити крізь напівпроникну мембрану.

Ізотонічний розчин (від *iso* – такий самий) не відрізняється за вмістом зазначених речовин від внутрішньоклітинного середовища – тому при розміщені в ньому клітини молекули води дифундують через її плазматичну мембрану з однаковою швидкістю в обох напрямках, і об'єм клітини залишається стабільним.

Якщо клітину помістити в **гіпертонічний розчин** (від *hyper* – більше), який має надлишок розчинених речовин, не здатних проходити крізь напівпроникну мембрану, клітина втратить воду й об'єм, зморщиться і загине.

При потраплянні клітини в **гіпоосмотичне середовище** (від *hypo* – менше), вода в надлишку увійде в клітину, наслідком чого стане її розбухання й розрив.

Особливо небезпечними два останні випадки є для клітин ссавців, деяких безхребетних та одноклітинних, що не мають клітинної стінки. Разом із тим, ці організми при потраплянні в гіпер- або гіпоосмотичне середовище можуть включати механізми адаптивної осморегуляції.

Клітини рослин, прокаріотів, грибів та деяких найпростіших оточені клітинною стінкою. Коли така клітина потрапляє у *гіпоосмотичне середовище*, клітинна стінка допомагає підтримати клітинний водний баланс. Спочатку, подібно до клітини ссавців, рослинна клітина розбухає внаслідок осмотичного входження в неї води. Однак відносно нееластична клітинна стінка з часом починає створювати тиск на клітину (**тургорний тиск**), який зупиняє осмос. У такому випадку клітина є **тургесцентною** (дуже міцною), що є нормальним станом для клітин більшості рослин.

Якщо рослинна клітина оточена *ізотонічним розчином*, рух води в її цитозоль та із нього є збалансованим – клітина перебуває у "**в'ялому**" стані.

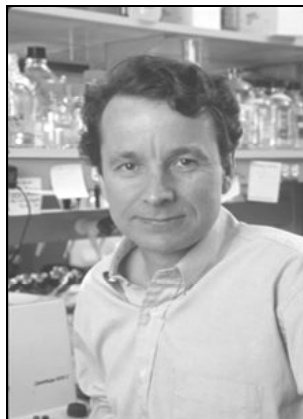
Однак клітинна стінка не рятує клітину від її розміщення у *гіперосмотичному середовищі*. У цьому випадку рослинна клітина, як і клітина ссавців, втрачатиме воду та зморщувати-

меться, її ПМ буде відокремлюватися від клітинної стінки (цей феномен названо **плазмолізом**), унаслідок чого клітина гине. Клітини бактерій і грибів у гіперосмотичному середовищі поведуть себе подібно.

Останнім часом було встановлено, що молекули води переносяться через мембрани клітин головним чином не за рахунок простої дифузії, а за допомогою специфічних переносників. Хоча вода є полярною молекулою, вона здатна проходити через ліпідний бішар біологічних мембран. Цей процес здатні посилювати трансмембранні білки, що формують гідрофільні канали – **аквапорини** (*aquaporines*, *AQPs*) [Agre P. et al.]. За відкриття аквапоринів у 2003р *Петер Агрі* та *Род Макіннон* отримали Нобелівську премію.



Петер Агрі



Род Макіннон

У середині 1980-х Петер Агрі досліджував різні білки, виявлені в мембрані еритроцитів, і серед них виявив білок, який зустрічається і в нирках – це пептид СНР28 із М.м. 28кДа. Згодом дослідник визначив його амінокислотну послідовність і відповідну йому послідовність нуклеотидів у ДНК. Експресія СНР28 в ооцитах *Xenopus* показала, що при розміщенні таких гібридних ооцитів у гіпоосмотичному середовищі клітини швидко розбухали (рис. 1.28).

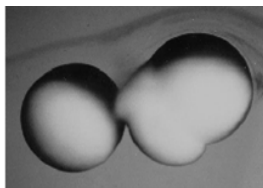


Рис. 1.28. Розбухання в гіпоосмотичному середовищі ооциту *Xenopus*, що експресує білок CHIP28

Ще одним доказом причетності CHIP28 до транспорту води став простий експеримент щодо порівняння поведінки двох клітин за тих самих умов – одна з цим білком, а інша – без (рис. 1.29). Подібні результати також були отримані на ліпосомах.

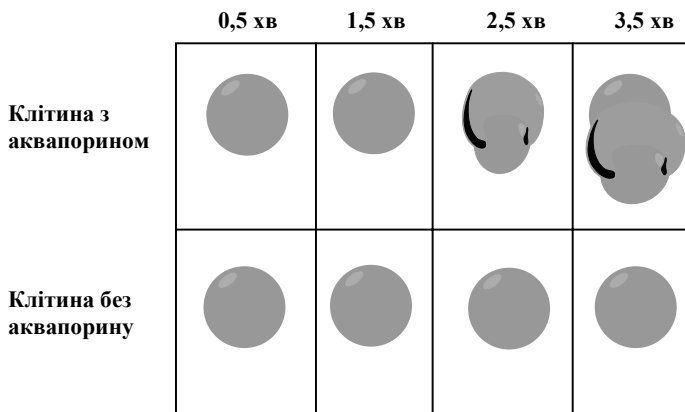


Рис. 1.29. Схема дослідів з вивчення функцій CHIP28

Використовуючи відомий блокатор руху води у клітинах – іони Hg^{2+} – Агрі показав, що клітини з білком CHIP28 стають неактивними за дії цих іонів. Усі проведені дослідження дозволили Агрі назвати ці каналні білки аквапоринами – "водяними порами".

У 2000 р. лабораторія, у якій працював Агрі, показала першу тривимірну структуру аквапорину AQP-1 еритроцитів людини. На сьогодні відомо, що AQP-1 є ансамблем із 4-х субодиниць, кожна із яких формує канал, через який рухаються молекули води (рис. 1.30).

Окрема субодиниця має три основні структурні ділянки:

- вхід ("вестибюль") ззовні клітини;
- подібний "вестибюль" (вихід) усередині клітини;
- довга пора, що їх поєднує.

Таким чином, кожен мономер формує канал, через який рухаються молекули води.

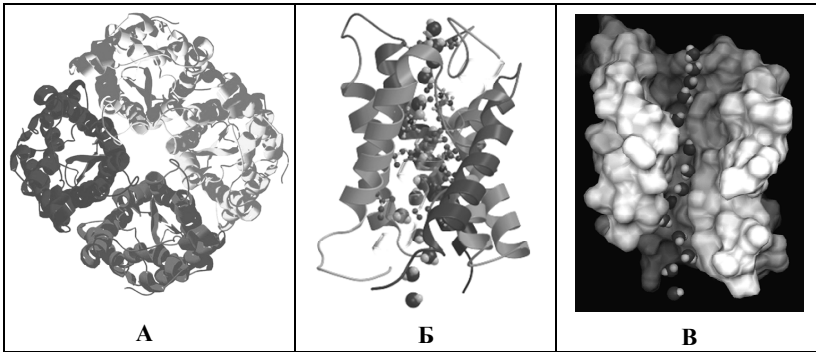


Рис. 1.30. Структура тетрамеру аквапорину (А), його мономера, що формує водяну пору (Б) і модель пори аквапорину (В)

Кожна субодиниця аквапорину має шість трансмембранних α -спіралей, С- і N-кінці поліпептидного ланцюга, що розташовані на цитозольній поверхні мембрани, і п'ять петельних ділянок (А–Е), які формують позаклітинний і цитоплазматичний вестибюлі (рис. 1.31). Петлі В і Е є гідрофобними і містять висококонсервативний аспарагін-пролін-аланін (Asn-Pro-Ala, =NPA)-мотив, що бере участь в утворенні пори. Різні аквапорини мають відміни в їхніх амінокислотних послідовностях, що впливає на розміри пори.

Аквапорини виявлені майже в усіх клітинах – від бактерій до клітин різних тканин людини (наприклад, у людини є 10 різних генів, що кодують різні ізоформи аквапоринів, а у *Arabidopsis thaliana* – 38) (табл. 1.11). Різні аквапорини мають відміни в їхній амінокислотній послідовності, що впливає на розміри пори.

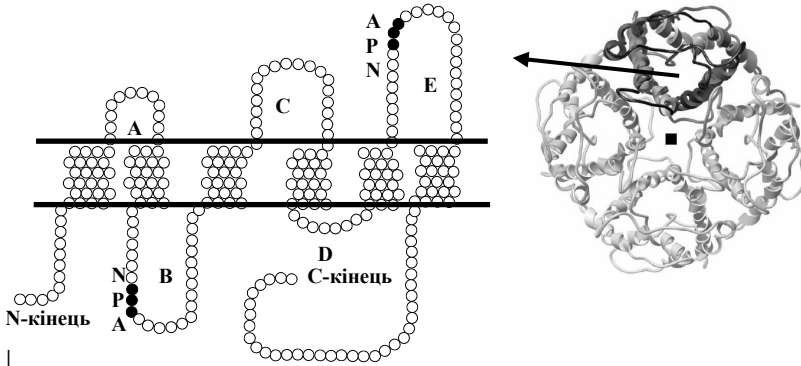


Рис. 1.31. Структура субодиноці молекули аквапорину (пояснення в тексті)

Таблиця 1.11. Найважливіші представники родини аквапоринів

Аквапорин	Роль	Локалізація
AQP-1	Реабсорбція рідини в проксимальних ниркових канальцях; секреція водянистої вологи ока і цереброспінальної рідини у ЦНС; водний гомеостаз у легенях	Нирки, очне яблуко, ЦНС, легені
AQP-2	Проникність води у збирних трубках нирок (мутації спричиняють розвиток нецукрового нефрогенного діабету)	Нирки
AQP-3	Затримка води у збирних трубках нирок	Нирки
AQP-4	Реабсорбція цереброспінальної рідини в ЦНС; ушкодження цієї системи супроводжується водяною мозку	
AQP-5	Секреція рідини у слинних, слізних залозах і альвеолярному епітелії легень	ЦНС
AQP-6	?	Нирки

Закінчення табл. 1.11.

AQP-7	?	Проксимальні каналі- ці нирок, кишечник
AQP-8	?	Печінка, підшлункова залоза, пряма кишка, плацента
AQP-9	?	Печінка, лейкоцити
PIP	?	Регуляція тургорного тиску у хлоропластах рослин
PIP	?	ПМ рослин
AQY	?	ПМ дріжджів

Від функціонування аквапоринів залежать такі процеси, як підтримка температури тіла, внутрішньоочний тиск, реабсорбція води у нирках та багато-багато інших. Зокрема, відомо, що за добу нирки продукують приблизно 170 л первинної сечі, тоді як добовий діурез (об'єм екскреції вторинної сечі за добу) складає близько 1 л. Ця різниця зумовлена потужною реабсорбцією води у різних відділах ниркового каналця, причому 70 % води реабсорбується в кров через AQP1, а 10 % – через AQP2 (рис. 1.32).

У латентному стані молекули аквапорину є асоційованими з внутрішніми цитоплазматичними везикулами. Дія певних індукторів здатна спричинити їхній рух до мембран клітин, де вони, вбудовуючись у фосфоліпідний бішар, стають інтегральними білками з функціями активних водних каналів. Такими індукторами можуть бути різні чинники. Наприклад, у кінцевих відділах дистальних звивистих каналців нефрону й у збирних трубках цю роль відіграє *антидіуретичний гормон (вазопресин)*, і дефіцит останнього може спричинити виникнення нецукрового діабету, при якому екскреція сечі зростає до 10–15 л за день. Іноді під впливом речовин-індукторів вміст молекул аквапоринів у ПМ може досягати дуже великого значення (наприклад, до 2×10^5 на 1 еритроцит).

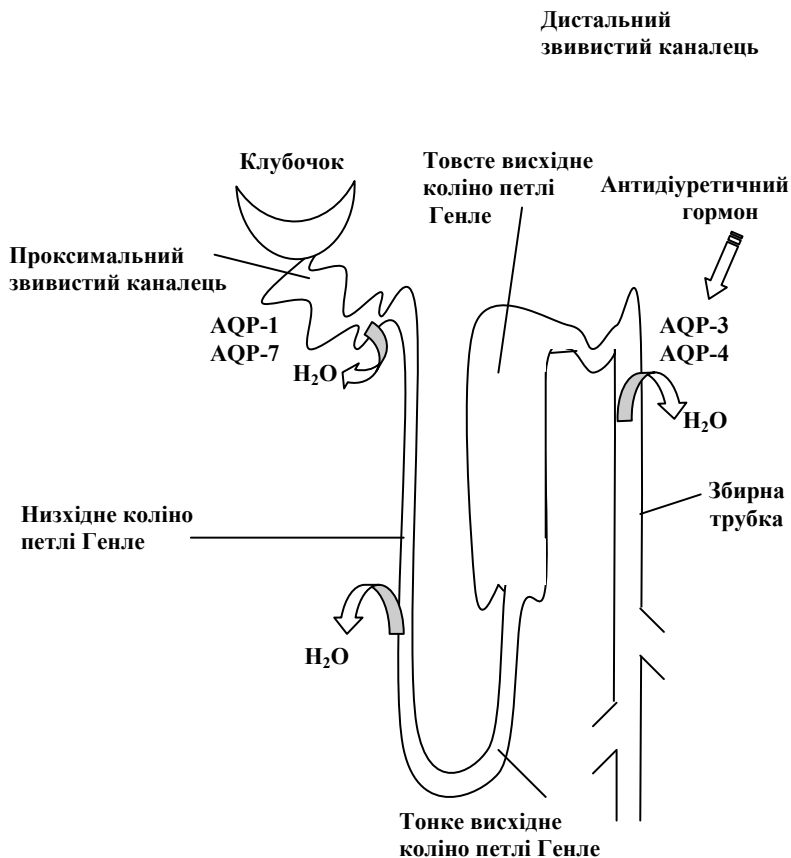


Рис. 1.32. Аквапорини у процесі сечоутворення

Мутації аквапоринів, як і генетичні порушення іонних каналів, спричиняють розвиток певних патологічних станів. Так, спадкові дефекти у структурі AQP-2 зумовлюють виникнення *спадкового нецукрового нефрогенного діабету людини*. Відомим є і *набутий нецукровий нефрогенний діабет*, причиною якого є зниження регуляції AQP-2, зокрема внаслідок впливу солей літію (ці сполуки використовують для лікування маніакально-

депресивного синдрому), при гіпокаліємії, гіперкальціємії, хронічному надмірному вживанні води за нормальної в ній потреби. Зрідка зустрічається *тотальний дефіцит AQP-1* – такі люди зовні здорові, але мають дефект нирок щодо здатності концентрувати сечу і зберігати воду в умовах недостатності питної води. Виявлено й можливість розвитку аутоімунної реакції проти AQP-4 – такий стан називається *хворобою Девіка (Devic's disease)*.

Слід зауважити, що вода ніколи не транспортується активним шляхом, тобто ніколи не рухається проти власного градієнта концентрації. Однак концентрація води може бути змінена під впливом активного транспорту інших іонів і молекул – саме таким чином зазвичай здійснюється контроль руху води із та в клітину. Як приклад можна навести залежність реабсорбції H_2O від реабсорбції іонів Na^+ у ниркових каналцях. При цьому натрій шляхом вторинно-активного транспорту (підрозд. 1.4.4) переходить із просвіту каналця нефрону у клітини стінок каналця, а вода – пасивно в тому самому напрямку – за осмотичним градієнтом, створеним іонами натрію.

1.4.2.4. Іонофори

Іонофори – антибіотики бактеріального походження, що вбивають клітини бактерій унаслідок порушення процесів транспорту й іонного градієнта, результатом чого стає іонний дисбаланс у клітинах. Іонофори часто використовують в експериментальних цілях, зокрема для дослідження механізмів транспорту іонів через них.

За особливостями функціонування виділяють два типи іонофорів (рис. 1.33): перші з них формують у ПМ клітини-мішені пептидні іонні канали (приклад – грамїцидин, що, вбудовуючись у ПМ бактеріальної клітини, створює канал для іонів натрію), а другі слугують мобільними переносниками (валіноміцин, який, зв'язуючи іони калію, змінює свою конформацію і разом з іоном перетинає ПМ).

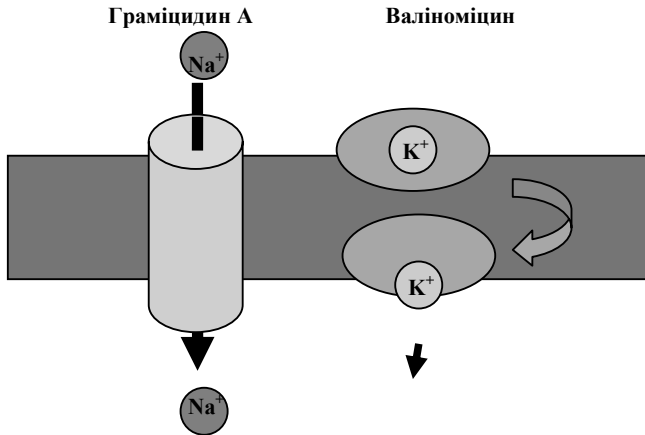


Рис. 1.33. Типи іонофорів: іонофор-канал та іонофор-мобільний переносник

Валіноміцин – це циклічний пептид, що зв'язує іони K^+ (рис. 1.34). Можливість такого зв'язування зумовлена будовою валіноміцину, а саме, наявністю послідовності L-валін–D-гідроксивалеріанова кислота–D-валін–L-лактат, що тричі повторюється (3–6; 7–10; 11–2).

У ліпідній фазі молекула валіноміцину має форму манжетки, усередині якої містяться полярні групи, а зовні – неполярні гідрофобні залишки молекули. Такі особливості хімічної будови валіноміцину дозволяють утворювати його молекулі комплекс з іонами K^+ , що потрапляють усередину молекули-«манжетки», і при цьому валіноміцин є розчинним у ліпідній фазі мембрани, оскільки зовні його молекула гідрофобна. Іони K^+ утримуються всередині молекули за рахунок іон-дипольної взаємодії (рис. 1.35). Молекули валіноміцину, що локалізовані біля поверхні мембрани, захоплюють із оточуючого її розчину іони K^+ і, дифундуючи в мембрані, переносять K^+ через мембрану і віддають іони в розчин по інший бік мембрани. Так і відбувається човникове перенесення іонів K^+ через мембрану.

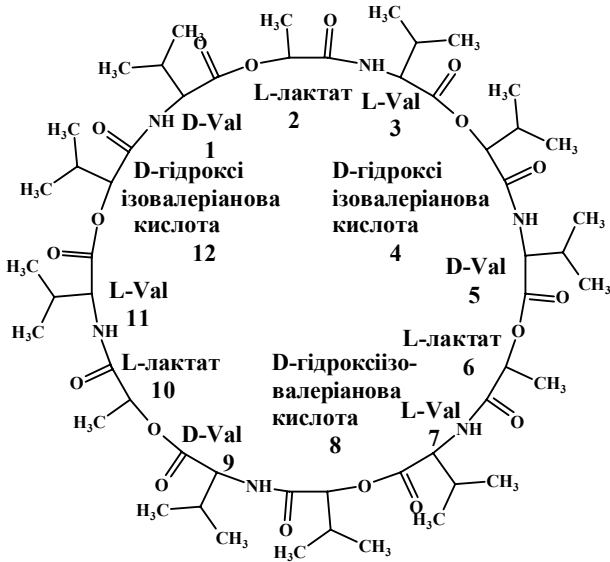


Рис. 1.34. Структура молекули валіноміцину

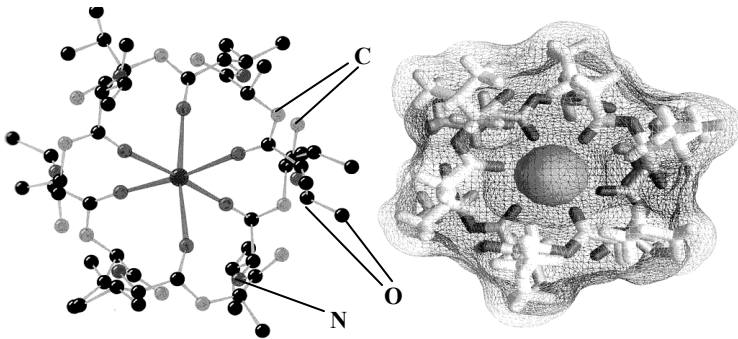
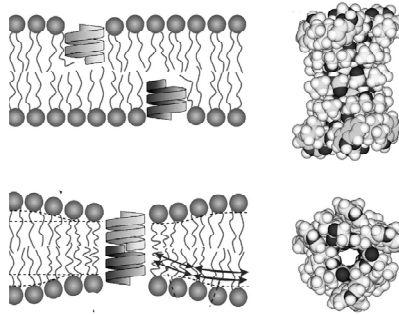


Рис. 1.35. Схема утримання іона калію молекулою валіноміцину

Граміцидин А вбудовується у ПМ у вигляді трансмембранного каналу, що складається із двох 15-амінокислотних спіральних структур, і робить мембрану проникною для іонів Na^+ (рис. 1.36).



Структура граміцидину А: HCO-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NH-CH₂-CH₂-OH

Рис. 1.36. Структура молекули граміцидину

Утворена канална структура може блокуватися іонами Ca²⁺.

1.4.2.5. Порини

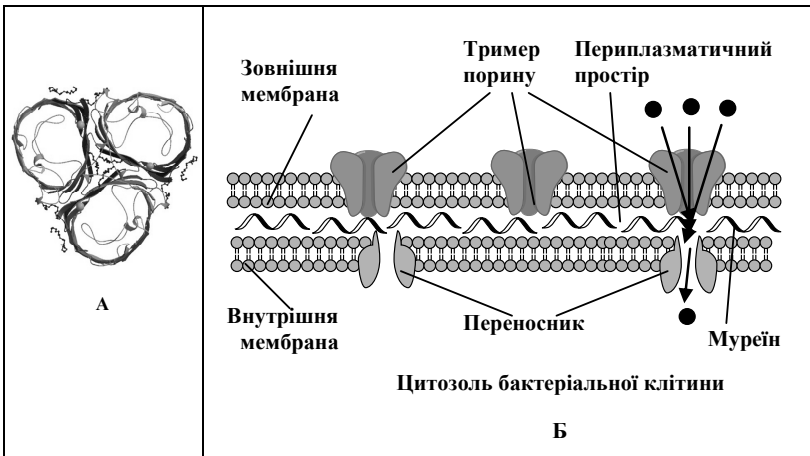


Рис. 1.37. А – структура порину зовнішньої мембрани бактерії *Rhodospseudomonas blastica*; Б – схема залучення порину у транспорт речовин через біологічну мембрану

У бактерій, що мають одну, але достатньо складно побудовану клітинну стінку, існують специфічні структури, що опосередковують переміщення крізь неї метаболітів, які бактеріальній клітині необхідно абсорбувати або вивільнити – трансмембранні каналотворювальні білки **порини**. ПМ грам-негативних бактерій захищена від зовнішнього середовища сіткою пептидогліканів (муреїн) і додатковою *зовнішньою мембраною*. Порини забезпечують перенесення сполук крізь зовнішню мембрану і представлені тримерами, що утворюють пори, заповнені водою і проникні для молекул з М. м. до 600 Да (рис. 1.37). У вищих організмів пориноподібні білки виявлені у мембранах мітохондрій і хлоропластів.

1.4.3. Активний транспорт.

Первинно-активний транспорт

Джерелом енергії для первинно-активного транспорту є АТФ; усі іонні насоси одночасно є ферментами, що гідролізують АТФ – АТФазами. При цьому перенесення речовин здійснюється проти їхнього концентраційного градієнта.

Усі АТФази за особливостями їх будови та механізмів функціонування поділяють на три основні типи (P, V, F) (рис. 1.38, табл. 1.12). В окрему групу виділяють АВС-транспортери (*ATP-binding cassette transporters, АТФ-зв'язувальні касетні транспортери*), що також здійснюють активний транспорт сполук із використанням енергії гідролізу АТФ, але ці сполуки найчастіше є не іонами, а органічними речовинами – пептидами, стероїдами, ліпідами тощо.

Для АТФаз *P-типу* характерним є те, що під час функціонування термінальний фосфат АТФ переноситься на карбоксильну групу залишку аспарагінової кислоти у складі активного центру молекули ферменту з утворенням нестійкого фосфоферменту EP; ванадат-іон є специфічним і високоефективним зв'язувачем цієї ділянки АТФази, тобто її інгібітором; до P-типу належать, зокрема, Na^+ , K^+ -АТФаза, K^+ , H^+ -АТФаза шлунка і Ca^{2+} -АТФаза. Na^+ , K^+ -АТФаза також інгібується серцевим глікозидом убаїном і строфантином, K^+ , H^+ -АТФаза – дициклогексилкарбодімідом, Ca^{2+} -АТФази – тіоловими отрутами.

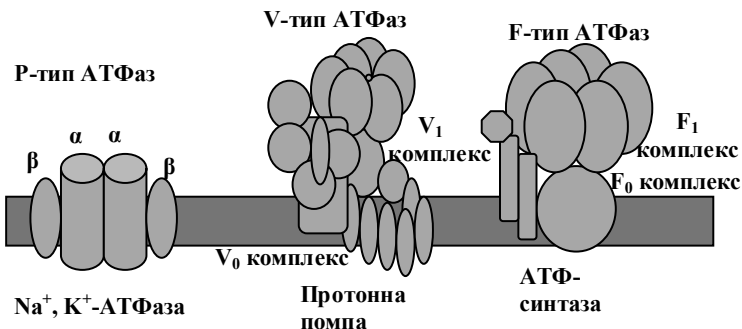


Рис. 1.38. Субодиночна організація АТФаз різних типів

Таблиця 1.12. Приклади АТФаз Р, V, F типу та АВС-транспортерів

Розчини, що транспортуються	Тип мембрани	Організми	Функції АТФаз
Р-тип АТФаз ("Р" – від <i>phosphorylation</i>, фосфорилування)			
Na ⁺ , K ⁺	ПМ	Ссавці	<ul style="list-style-type: none"> – Підтримує у клітині низьку концентрацію натрію та високу – калію. – Створює трансмембранний потенціал. – Є рушійною силою для вторинно-активного транспорту
H ⁺	ПМ	Рослини, гриби	<ul style="list-style-type: none"> – Переносить H⁺ із цитозолу в позаклітинний простір; – Створює трансмембранний потенціал
Ca ²⁺	ПМ	Еукаріоти	Переносить Ca ²⁺ із цитозолу у позаклітинний простір
Ca ²⁺	Мембрана СР	Ссавці	Переносить Ca ²⁺ із цитозолу у СР

Закінчення табл. 1.12

Розчини, що транспортуються	Тип мембрани	Організми	Функції АТФаз
V-тип АТФаз ("V" – від <i>vesicular, везикулярні</i>)			
H ⁺	Мембрана лізосом та секреторних везикул	Ссавці	Утримує рН усередині лізосоми низьким, що активує гідролітичні ферменти
H ⁺	Вакуолярна мембрана	Рослини, гриби	Утримує рН усередині вакуолі низьким, що активує гідролітичні ферменти
F-тип АТФаз ("F" – від <i>factor</i>); інша назва – АТФ-синтази			
H ⁺	Внутрішня мембрана мітохондрій	Еукаріоти	Під час функціонування переносить протони як проти градієнта концентрації, так і за ним; в останньому випадку виділена енергія акумулюється у вигляді АТФ
H ⁺	Мембрана тилакоїдів	Рослини	Синтез АТФ
H ⁺	ПМ	Прокаріоти	Синтез АТФ
ABC-транспортери (<i>ATP-binding cassette transporters</i>)			
Органічні сполуки (в основному гідрофобні), у т. ч. протипухлинні лікарські препарати	ПМ і мембрани органел	Еукаріоти	Експортні транспортні системи, що видаляють гідрофобні сполуки із клітин у позаклітинне середовище
Органічні сполуки та іони	ПМ і мембрани органел	Прокаріоти	– Експортні транспортні системи; – Імпорттери, залучені в поглинання сполук клітиною із позаклітинного простору

До *V-типу* АТФаз належать погано вивчені й складно побудовані переносники протонів, для яких не характерне утворення комплексу EP, і які містяться у вакуолях дріжджів, лі-

зосомах, ендосомах, секреторних гранулах тощо. Вони інгібуються низкою специфічних сполук, але не чутливі до ванадату й олігоміцину.

Представники *F*-типу АТФаз мають складну олігомерну будову. Зокрема, H^+ -АТФаза (*АТФ-синтетаза*) складається із 10 субодиниць, що формують F_1 -частину ("шапінка гриба", здійснює фосфорилування АДФ до АТФ) і F_0 -частину (F_0 – від "олігоміцин" – гідрофобний білок, що виконує функцію каналу, через який H^+ надходять до F_1 – ця частина фіксується в мембрані і пронизує її наскрізь).

У 1997 П. Бойєру та Дж. Уолкеру було присуджено Нобелівську премію з фізіології та медицини за дослідження механізмів функціонування АТФ-синтази (F-тип), а Дж. Скоу отримав цю ж нагороду за вивчення Na^+ , K^+ -АТФази, яка використовує 1/3 всієї кількості АТФ, яка виробляється АТФ-синтазою.



Паул Бойєр



Джон Уолкер



Дженс Кристіан Скоу

1.4.3.1. АТФази Р-типу

Na^+ , K^+ -АТФаза плазматичної мембрани витрачає енергію гідролізу однієї молекули АТФ на транспорт у клітину двох іонів K^+ із одночасним перенесенням трьох іонів Na^+ у позаклітинне середовище. Отже, цей фермент причетний до створення **градієнта концентрації** цих іонів із високим внутрішньоклітинним вмістом калію й низьким – натрію. Крім того, функціонування Na^+ , K^+ -АТФази робить свій внесок у створення **трансмембранного потенціалу**, або **електричного градієнта** – різниці

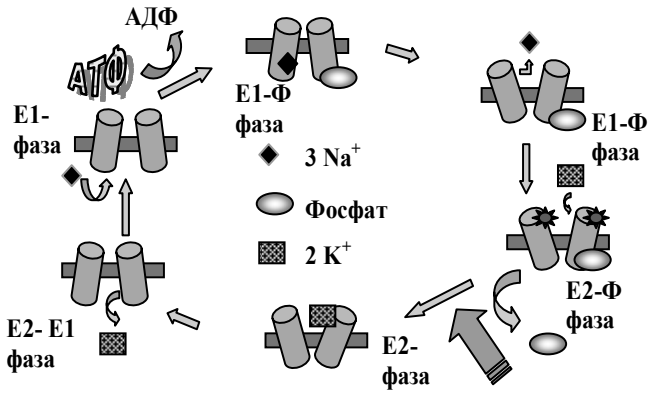
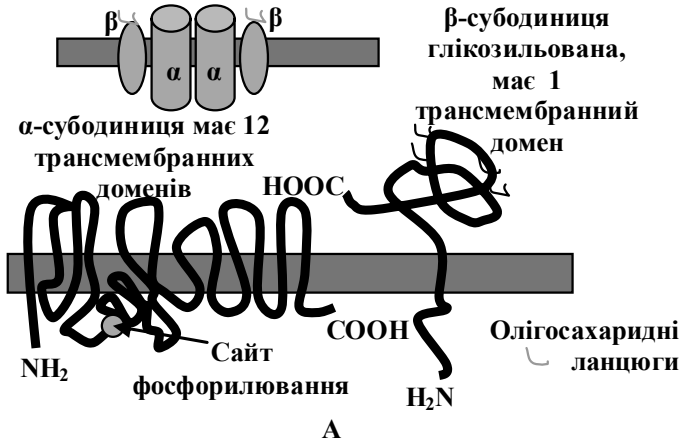
заряду між внутрішньоклітинною (зарядженою негативно) і позаклітинною (позитивно зарядженою) сторонами плазматичної мембрани. Іонний концентраційний та електричний градієнти часто об'єднують в один термін – **електрохімічний градієнт**.

Отже, Na^+ , K^+ -АТФаза є прикладом **електрогенних pomp** – транспортних білків, які генерують електрохімічний градієнт; крім того, цей фермент є основною електрогенною помпою у клітинах ссавців. Аналогічну функцію у клітинах рослин, грибів і бактерій виконує **протонна помпа (H^+ -АТФаза)**, що за рахунок енергії гідролізу АТФ переносить із цитозолу в позаклітинний простір іони водню, чим створює позитивний заряд назовні клітини. Електрохімічний градієнт, створений Na^+ , K^+ -АТФазою, є необхідним для перебігу багатьох процесів. Зокрема, він залучається у вторинно-активний транспорт через мембрану низки сполук (підрозд. 1.4.4), у передачу нервового імпульсу тощо.

Na^+ , K^+ -АТФаза є тетрамером $\alpha_2\beta_2$ (М. м. α -субодиниці – 120 кД, β -субодиниці – 35 кД); α -субодиниця відповідає за гідроліз АТФ, а також містить ділянку зв'язування кардіотонічних інгібіторів стероїдної природи; β -субодиниця має вуглеводні залишки (рис. 1.39, А). Основною функцією ферменту є створення низької внутрішньоклітинної концентрації Na^+ (10 мМ) і високої – K^+ (100 мМ). Концентрації цих іонів у позаклітинному просторі становлять відповідно 100–140 мМ і 5–10 мМ.

Під час ферментативного циклу Na^+ , K^+ -АТФази фосфорилування змінює конформацію α -субодиниці (Р-тип – від "фосфорилування") – при цьому із клітини вивільнюються три іони Na^+ (Е1 – Е1Ф – Е2Ф фази, рис. 1.39, Б); дефосфорилування знову змінює структуру α -субодиниці, що сприяє перенесенню двох іонів K^+ у клітину (Е2Ф – Е2 – Е1 фази).

Кардіотонічні стероїди, інша назва яких "*серцеві глікозиди*" (наприклад, дигіталіс із наперстянки та убаїн (табл. 1.13)) інгібують Na^+ , K^+ -АТФазу та іонний транспорт, зв'язуючись виключно з позаклітинною поверхнею Na^+ , K^+ -АТФази, коли фермент перебуває у Е2-Ф-фазі, та інгібують його дефосфорилування, знижуючи Na^+ -градієнт через ПМ кардіоміоцитів.

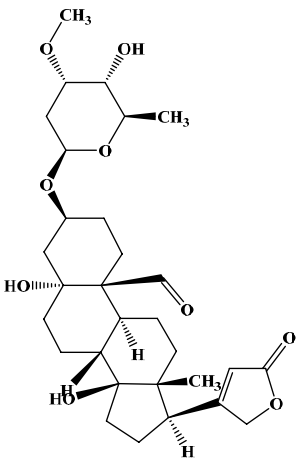

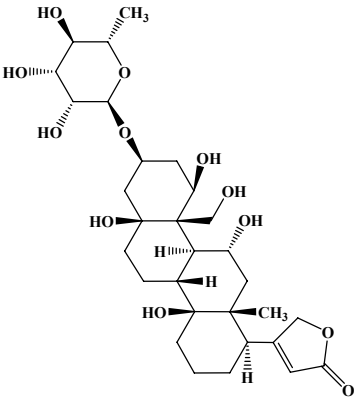


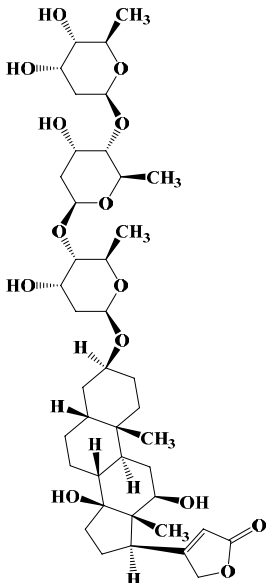

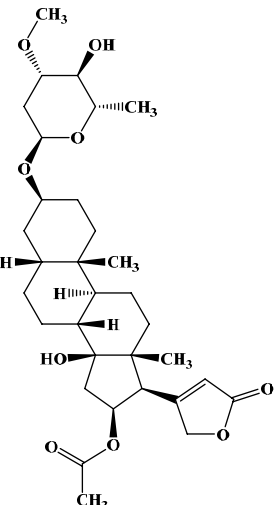

Кардіотонічні стероїди (* – наприклад, дигіталіс із наперстянки та убаїн) інгібують E2-Ф фаза (дефосфорилювання) Na⁺/K⁺-АТФази і знижують Na⁺-градієнт у клітинах серцевого м'яза

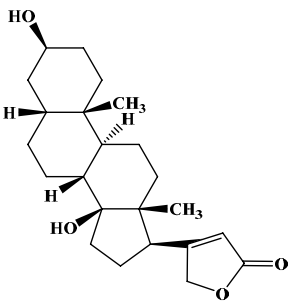

Б

Рис. 1.39. А – схематична структура Na⁺,K⁺-АТФази та її α -субодинаці; Б – схема функціонування Р-типу АТФази (Е – фермент, пояснення в тексті)

Таблиця 1.13. Кардіотонічні стероїди

Речовина	Формула	Джерело
<p><i>Строфантин</i></p>	 <p>The chemical structure of Strophanthin is a complex steroid molecule. It features a pentacyclic steroid nucleus with a methyl group at C-13 and a butyrolactone ring at C-14. A glucose moiety is attached to the C-3 position via an ether linkage. The glucose ring has a methyl group at C-2 and a hydroxyl group at C-4. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<p><i>Строфант, Strophanthus gratus</i></p>  <p>A black and white photograph of the Strophanthus gratus plant, showing its characteristic large, trumpet-shaped flowers and dense foliage.</p>
<p><i>Убаїн</i></p>	 <p>The chemical structure of Ubaïn is a complex steroid molecule. It features a pentacyclic steroid nucleus with a methyl group at C-13 and a butyrolactone ring at C-14. A glucose moiety is attached to the C-3 position via an ether linkage. The glucose ring has hydroxyl groups at C-2, C-4, and C-6. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	

Речовина	Формула	Джерело
<i>Дигоксин</i>	 <p>The chemical structure of Digoxin is a complex steroid molecule. It features a pentacyclic steroid nucleus with a methyl group at C-13 and a lactone ring at C-14. Attached to the C-3 position is a diglycoside chain consisting of three pyranose rings. The top two rings are 2,6-dimethyl-β-D-glucopyranose units, and the bottom ring is a β-D-glucopyranose unit. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<p><i>Наперстянка шерстиста, Digitalis lanata</i></p> 
<i>Олеандрин</i>	 <p>The chemical structure of Oleandrin is a steroid molecule with a pentacyclic nucleus. It has a methyl group at C-13 and a lactone ring at C-14. At C-3, there is a complex glycoside chain. The top part is a 2,6-dimethyl-β-D-glucopyranose unit. This is linked to a pyranose ring that is further substituted with a methyl group and a hydroxyl group. The bottom part of the chain is a β-D-glucopyranose unit. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<p><i>Олеандр, Nerium oleander</i></p> 

Речовина	Формула	Джерело
Дигітоксигенін		<p>Наперстянка пурпурна, <i>Digitalis purpurea</i></p> 

Різні форми Ca^{2+} -АТФази, локалізовані у ПМ та ЕПР (або СР), причетні до підтримання цитозольної концентрації Ca^{2+} на низькому рівні (вміст калію у клітині у стані спокою становить 10^{-7} моль/л, тоді як поза клітиною – 10^{-3} моль/л; при вмісті цих іонів $\sim 10^{-5}$ моль/л м'язові клітини починають скорочуватися) шляхом активного транспорту іонів Ca^{2+} або у позаклітинне середовище (Ca^{2+} -АТФаза ПМ, англ. *Plasma membrane Ca^{2+} ATPase*, РМСА), або у внутрішньоклітинне депо (Ca^{2+} -АТФаза СР, англ. *Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*, SERCA) і Ca^{2+} -АТФаза ЕПР).

Ca^{2+} -АТФаза ПМ присутня у всіх клітинах еукаріотів і використовує енергію гідролізу однієї молекули АТФ на транспорт одного іона Ca^{2+} із клітини. Саме завдяки роботі Ca^{2+} -АТФази ПМ зупиняється сигнал, опосередкований дією Ca^{2+} як вторинного месенджера.

Рівні Ca^{2+} у цитоплазмі м'язових клітин у стані спокою підтримуються на низькому рівні завдяки діяльності Ca^{2+} -АТФази СР. Нервовий імпульс спричиняє вивільнення Ca^{2+} із СР у цитоплазму шляхом полегшеної дифузії через Ca^{2+} -вивільнювальні канали (ріанодинові рецептори). Вміст Ca^{2+} у цитозолі при цьому зростає до 10^{-5} М, що і спричиняє скорочення м'язів. Після ско-

рочення іони Ca^{2+} "заганяються" у СР білком із М. м. 110 кД, який дуже подібний до α -субодиниці Na^+, K^+ -АТФази – іншою Ca^{2+} -АТФазою, яка енергію гідролізу однієї молекули АТФ використовує на транспорт двох іонів Ca^{2+} .

Механізм функціонування обох ізоформ цього ферменту передбачає фосфорилування залишку аспарагінової кислоти у 351 положенні з утворенням Е-Р-інтермедіату. Отже, функціонування Ca^{2+} -помпи також підлягає під Е1-Е2 модель (рис. 1.40).

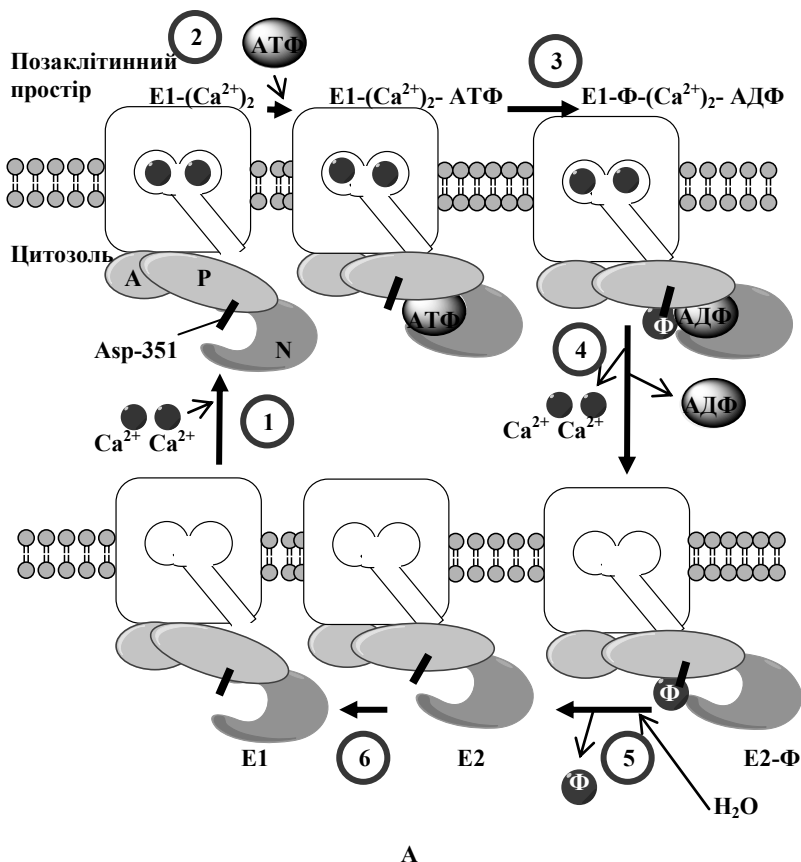
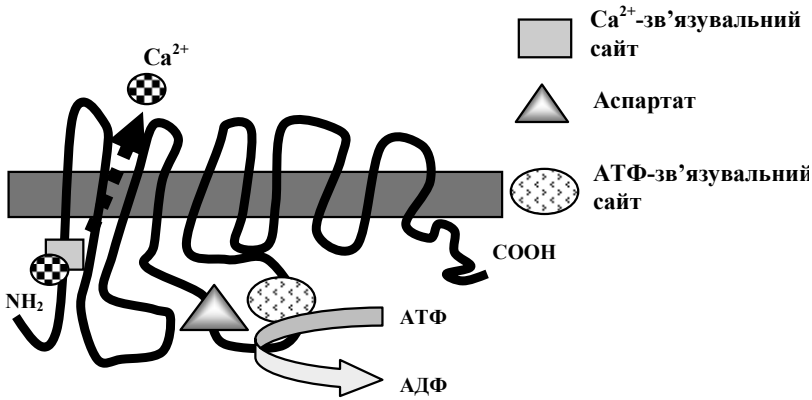


Рис. 1.40. Ca^{2+} -АТФаза.

Схема функціонування Ca^{2+} -АТФази (А)

Закінчення рис. 1.40.



Інші транспортери бівалентних катіонів мають структуру, подібну до цієї Ca^{2+} -АТФази та α -субодиниці Na^+ - K^+ -АТФази

Б

Рис. 1.40. Ca^{2+} -АТФаза.
Каталітично важливі ділянки (Б)

Інші транспортери бівалентних катіонів мають структуру, подібну до цієї Ca^{2+} -АТФази й α -субодиниці Na^+ , K^+ -АТФази.

H^+ , K^+ -АТФаза шлунка здійснює електронейтральний антипорт з властивостями, подібними до Na^+ , K^+ -АТФази, і залучений у підтримання рН шлунка в межах 0.8–1, тоді як парієтальні клітини слизової оболонки цього органа мають цитозольне рН 7.4. H^+ , K^+ -АТФаза "виштовхує" протони із цих клітин у просвіт шлунка, створюючи на їхній ПМ градієнт рН, величина якого становить 6,6, що є найбільшим трансмембранним градієнтом рН у клітинах еукаріотів. Cl^- -канал у тому самому напрямку переносить іони Cl^- . Загальним продуктом цього транспорту стає HCl у просвіті шлунка; сюди ж повертаються іони K^+ через K^+ -канал (рис. 1.41).

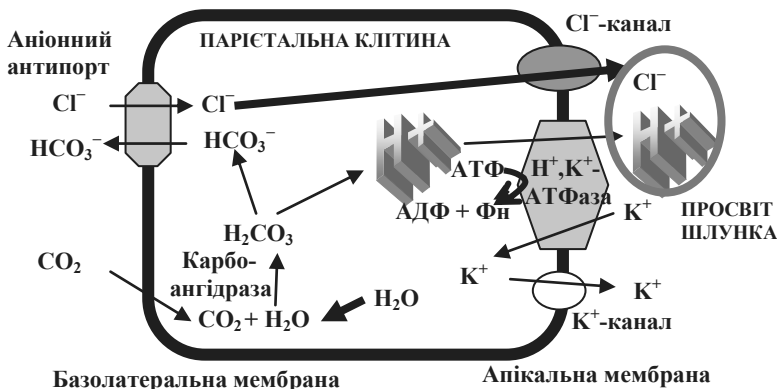


Рис. 1.41. Схема залучення шлункової H^+ , K^+ -АТФази в секрецію соляної кислоти

Омепразол і циметидин зупиняють шлункову секрецію HCl (рис. 1.42).

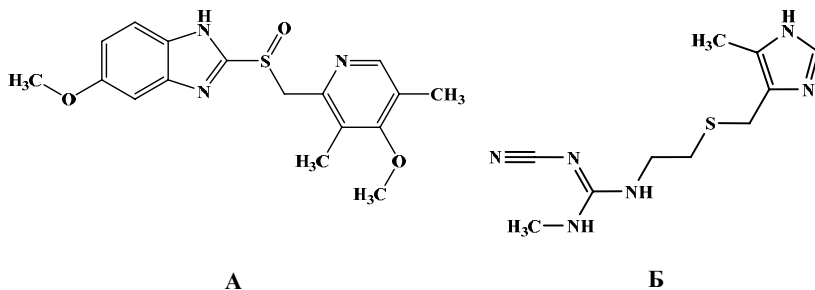


Рис. 1.42. Структурні формули омепразолу (А) і циметидину (Б)

При цьому омепразол прямо інгібує протонну помпу, тоді як циметидин діє опосередковано через вплив на гістамінові рецептори. H^+ , K^+ -АТФаза слизової оболонки шлунка активується гістаміном, який після зв'язування зі своїми рецепторами стимулює синтез цАМФ і надалі – продукцію HCl . Циметидин (циметидину гідрохлорид) унаслідок своєї подібності до гістаміну

блокує зв'язування останнього з його рецепторами, запобігаючи таким чином активації H^+K^+ -АТФази гістаміновим рецептором, тобто здійснює непряме інгібування H^+ , K^+ -АТФази.

1.4.3.2. АТФази F-типу

До цього типу АТФаз (F – від "фактор") належать протонні помпи (H^+ -АТФази), які забезпечують рух протонів проти концентраційного градієнта з використанням для транспорту енергії, що вивільнюється при гідролізі АТФ. Ці ферменти є складними олігомерними комплексами із великою кількістю субодиниць; прийнято виділяти дві умовні частини H^+ -АТФази: F_o ("о" – *oligomycin sensitivity*) і F_1 (рис. 1.43, А).

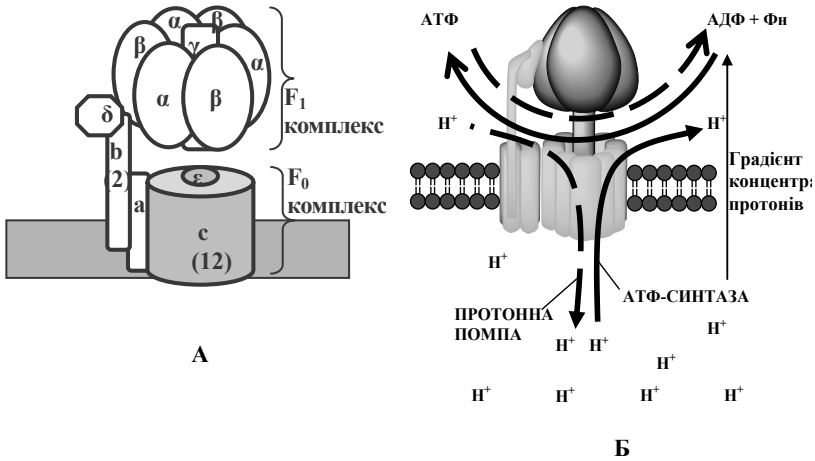


Рис. 1.43. Схема структури (А) і функціонування (Б) H^+ -АТФази/АТФ-синтази

Особливістю протонних помп даного типу є те, що, працюючи в зворотному напрямку, тобто переносючи протони за градієнтом концентрації, вони здатні синтезувати АТФ, що зумовлює їхню назву – *F₀F₁ АТФаза/АТФ синтаза* (рис. 1.43, Б). З указаною властивістю H^+ -АТФази пов'язані такі процеси, як мітохондріальне окисне фосфорилування (рис. 1.44) й фотофосфорилування у хлоропластах рослин, у результаті яких за рахунок транспорту протонів за градієнтом концентрації H^+ -АТФаза/АТФ-синтаза синтезує АТФ.

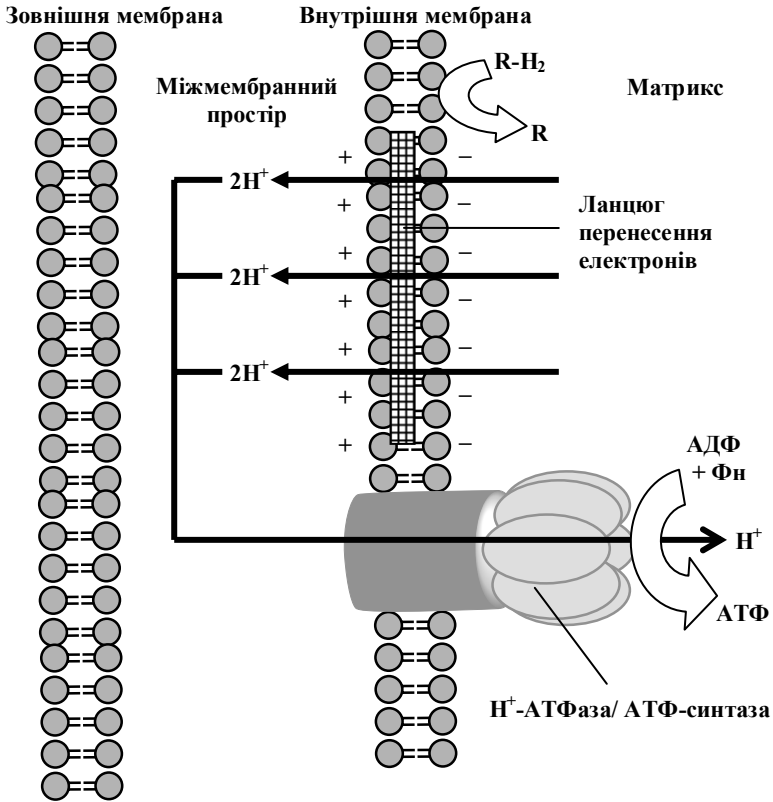


Рис. 1.44. Механізм утворення АТФ за участю H^+ -АТФази/АТФ-синтази

Протонний градієнт для синтезу АТФ при цьому створюється іншими процесами (поглинання світла, катаболізм вуглеводів і жирів тощо).

Ще однією унікальною властивістю АТФаз цього типу є здатність F_1 -субодиниці до обертальних рухів, завдяки чому останнім часом нанобіотехнологами розглядаються можливості її використання при виробництві нанодвигунів для мініатюрних наномеханізмів.

1.4.3.3. АТФази V-типу

Ці системи (V – від "вакуолярна") є структурно подібними до F-типу АТФаз і, використовуючи енергію гідролізу АТФ на транспорт протонів, залучені у підтримку значення рН у численних внутрішньоклітинних органелах (ендосомах, лізосомах, секреторних і синаптичних везикулах) у межах 3–6 (цитозоль ~ 7.5).

АТФази V-типу також виявлені у плазматичних мембранах широкого кола клітин (вставні клітини в нирках, остеобласти, макрофаги, нейтрофіли, деякі пухлинні клітини), де залучаються у підтримку кислотно-лужного балансу, вторинно-активний транспорт і прогресію ракових метастазів.

Прикладом АТФаз даного типу є **протонна помпа остеокластів**. Кісткова тканина в процесі всього життя організму підлягає постійному ремоделюванню, під час якого остеокласти здійснюють "вимивання" кісткової тканини, а остеобласти її добудовують. При цьому остеокласти функціонують, секретуючи кислоту, здатну розчиняти Ca^{2+} -фосфатний матрикс кістки, у простір між мембранами остеокластів та поверхнею кістки. Саме у процес секретії кислоти і залучена АТФ-залежна протонна помпа мембрани остеокластів. Вона локалізована в ділянці щетинкової облямівки остеокластів і функціонує, переносячи протони у простір між своїми ПМ та поверхнею кістки (рис. 1.45).

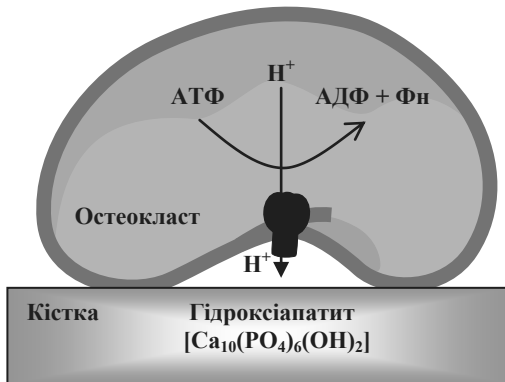


Рис. 1.45. Схема функціонування протонної помпи остеокластів

Висока концентрація H^+ у цьому просторі сприяє розчиненню мінерального матриксу кістки. Уроджені порушення структури протонної помпи остеокластів спричиняють розвиток *остеопетрозу*, або *мармурової хвороби*, що проявляється дифузним ущільненням кісток скелета, їхньою ламкістю та недостатністю кістково-мозкового кровотворення внаслідок порушення кісткової резорбції.

1.4.3.4. АВС-транспортери

АТФ-зв'язувальні касетні транспортери є членами однієї з найбільших суперродин транспортних білків, яка представлена в різноманітних організмах – від прокариотів до людини. Ці трансмембранні білки функціонують, використовуючи енергію гідролізу АТФ на перенесення через плазматичні й внутрішньоклітинні мембрани широкого кола субстратів, включаючи продукти метаболізму (неорганічні іони, амінокислоти, пептиди, цукри), ліпіди і стероїди, лікарські речовини, у тому числі цитотоксичні антипухлинні агенти. Вони можуть функціонувати як імпортери, що переносять речовини у клітину (такі АВС-імпортери виявлені лише у прокариотів), а також і як експортери, що видаляють із клітини гідрофобні сполуки (АВС-експортери є характерними як для про-, так і для еукаріотів). Транспортерів, що функціонують в обох напрямках, на сьогодні не виявлено. І імпортери, і експортери мають високу подібність у структурі та механізмах функціонування, але їхній субстратзв'язувальний сайт локалізований відповідно або на позаклітинному, або на внутрішньоклітинному боці мембрани.

Білки відносять до АВС-транспортерів за наявністю специфічної амінокислотної послідовності й особливої організації їхнього АТФ-зв'язувального касетного домену. За вказаними ознаками до цієї родини також належить ряд протеїнів, що не функціонують як транспортери, а залучені в процеси трансляції та репарації ДНК.

Бактеріальні АВС-транспортери залучені у метаболізм клітин цих організмів; крім того, ці структури опосередковують вірулентність бактерій та їхню здатність спричиняти розвиток захворювання.

Субстрати **АВС-імпортерів** дуже різняться за розмірами й хімічною природою – серед них, зокрема, є органічні та неорганічні іони (наприклад, іони металів), комплекс {залізо-сидерофор}, гем, амінокислоти, олігопептиди, моно- і олігосахариди, вітамін В12. Важливими ефекторами вірулентності є АВС-імпортери, що відповідають за поглинання заліза. За нормальних умов більшість заліза в організмі людини перебуває у зв'язаному стані з білками трансферином, лактоферином, феритином або як компонент гем-вмісних білків. Патогени здатні захоплювати залізо із цих молекул за допомогою секреції високоафінних залізохелатуючих білків, які отримали назву *сидерофорів*. У вигляді комплексу {залізо-сидерофор} АВС-імпортери здатні переносити даний іон через плазматичну мембрану бактеріальних клітин [Davidson A. et al.]. Інший мікроорганізм – *Agrobacterium tumefaciens* – містить імпортери глюкози й галактози, що також асоційовані з вірулентністю.

Бактеріальні АВС-експортери переносять протеїни, що залучаються в бактеріальний патогенез (гемолізину, протеолітичні ферменти, лужну протеазу), пептиди (у тому числі пептидні антибіотики), небілкові сполуки (капсулярні полісахариди, ліпополісахариди, тейхоеву кислоту, гем, токсини, небілкові лікарські препарати) [Fath M. et al.].

Більшість еукаріотичних АВС-транспортерів є помпами; у той же час, деякі з них – наприклад, *регулятор трансмембранної проникності при кістозному фіброзі (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CRTR)* та *рецептор до сульфонілсечовини (sulfonylurea receptor, SUR)* – використовують гідроліз АТФ для регуляції відкриття й закриття іонних каналів у молекулі самого АВС-транспортера чи в інших білках. АВС-транспортери локалізовані як у ПМ, так і в ендомембранах пероксисом, лізосом, вакуоль, ендосом, у мембранах апарату Гольджі, ЕПР і мітохондрій [Rees D. et al.].

У людини виявлено 48 АВС транспортерів, що залучаються в перенесення через мембрани холестеролу та інших ліпідів, жовчних і жирних кислот, розвиток множинної лікарської резистентності (див. дод., п. 1), у презентацію антигенів, у гомеостаз мітохондріального заліза та в АТФ-залежну регуляцію іонних каналів. Ці білки, залежно від особливостей структури, відносять до однієї із семи підродин АВС-транспортерів (*ABCA – ABCG*) (табл. 1.14).

Таблиця 1.14. Класифікація ABC-транспортерів

Родина	Функції	Приклади	Причетність до множинної лікарської резистентності та спадкові дефекти
ABCA	Транспорт холестеролу й ліпідів (ABCA1), щодо більшості представників функції невідомі	ABCA1–ABCA10, ABCA12, ABCA13	– Танжерська хвороба (ABCA1); – Вікозалежна дегенерація сітківки (ABCA4)
ABCB	Транспорт кон'югатів гідрофобних сполук, пептидів, фосфоліпідів, жовчних кислот	ABCB1–ABCB11 ABCB1 (MDR1, або <i>p</i> -глікопротеїн (pgP)); ABCB2 (TAP1); ABCB3 (TAP2); ABCB4 (MDR2/3, або фліпаза); ABCB11 (BSEP)	– Множинна лікарська резистентність (ABCB1, ABCB4); – Прогресуючий рідинний внутрішньопечінковий холестаза II типу (ABCB11) та III типу (ABCB4);
ABCC	Транспорт іонів, кон'югатів гідрофобних сполук (стероїдних гормонів, жовчних солей, лікарських препаратів) із глутатіоном, глюкоуроною та сірчаною кислотами	ABCC1–ABCC12 ABCC1 (MRP1); ABCC2 (MRP2); ABCC4 (MRP4); ABCC7 (CFTR); ABCC8 (SUR1); ABCC9 (SUR9)	– Множинна лікарська резистентність (більшість представників); – Синдром Дабіна – Джонсона (ABCC2); – Еластична псевдоксантома (ABCC6); – Муковісцидоз (ABCC7); – Персистентна гіперінсулінемічна гіпоглікемія новонароджених (ABCC8);

Закінчення табл. 1.14.

Родина	Функції	Приклади	Причетність до множинної лікарської резистентності та спадкові дефекти
ABCD	Транспорт сполук (зокрема, жирних кислот з дуже довгим (понад С26) ланцюгом) через мембрани пероксисом	ABCD1 – ABCD4	– Аденолейкодистрофія (ABCD1 та ABCD2); – Деякі форми хвороби Цельвегера (ABCD3 і ABCD2)
ABCE/ ABCF	Не виконують транспортних функцій, залучені в регуляцію білкового синтезу й експресії генів	ABCE1; ABCF1 – ABCF3	?
ABCG	Транспорт ліпідів, лікарських препаратів різної хімічної природи, жовчних кислот, холестеролу, інших стероїдів, зокрема рослинних стеролів	ABCG1, ABCG2, ABCG3, ABCG4, ABCG5, ABCG8	– Множинна лікарська резистентність (ABCG2); – Ситостеролемія (ABCG5 та ABCG8)

Мутації щонайменш 13 із цих білків асоціюються з широким колом розладів:

- **танжерською хворобою** з недостатністю або відсутністю в плазмі крові ліпопротеїнів високої щільності й накопиченням у тканинах ефірів холестеролу (ABCA1);
- **вікозалежною дегенерацією сітківки** (ABCA4);

- **прогресуючим родинним внутрішньопечінковим холестазом II типу** (*progressive familial intrahepatic cholestasis, PFICII*) із порушенням екскреції через апікальну мембрану гепатоцита жовчних кислот, зокрема гідрофобної хенодезоксихолевої кислоти (ABCB11);

- **прогресуючим родинним внутрішньопечінковим холестазом III типу (PFICIII)** із порушенням екскреції через апікальну мембрану гепатоцита фосфоліпідів (ABCB4);

- **синдромом Дабіна – Джонсона** з порушенням екскреції кон'югованого білірубіну із гепатоцитів у жовчні капіляри (ABCC2);

- **еластичною псевдоксантомою** з порушенням структури сполучної тканини деяких органів, що супроводжується фрагментацією і мінералізацією еластинових та колагенових фібрин (ABCC6);

- **муковісцидозом** (ABCC7);

- **персистентною гіперінсулінемічною гіпоглікемією новонароджених** (ABCC8);

- **адренолейкодистрофією** (*adrenoleukodystrophy, ALD*) із порушенням обміну жирних кислот із дуже довгим ланцюгом (понад C26), які при цьому накопичуються в організмі (ABCD1 та ABCD2);

- деякими формами **хвороби Цельвегера** – пероксисомального розладу з ознаками, подібними до адренолейкодистрофії (ABCD3 і ABCD2);

- **ситостеролемією** – рідкісним порушенням ліпідного обміну новонароджених, за якого у крові й тканинах накопичуються рослинні стероли (ABCG5 та ABCG8).

Функціонуючі транспортери більшості підродин еукаріотичних ABC-транспортерів складаються із чотирьох доменів – **двох АТР-зв'язувальних касетних доменів** (*ATP-binding cassette* (ABC)), які також відомі під назвами *нуклеотидзв'язувальних доменів* (*nucleotide-binding domains* (NBDs)) або *nucleotide-binding folds* (NBFs)) та **двох трансмембранних доменів** (*transmembrane domains, TMDs*) (рис. 1.46).

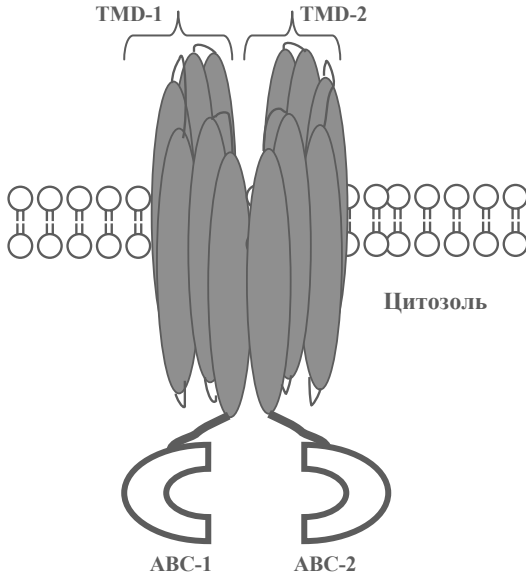


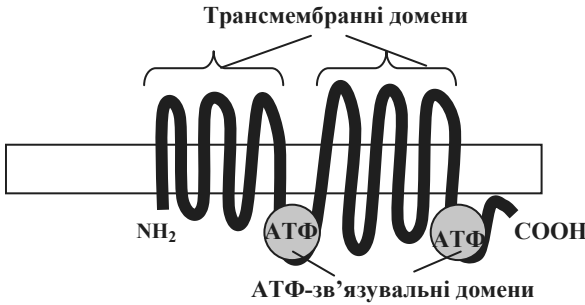
Рис. 1.46. Доменна будова, характерна для більшості функціонуючих еукаріотичних АВС-транспортерів

Два АВС-домени, локалізовані в цитозолі, разом зв'язують і гідролізують АТФ, тоді як два ТМД-домени залучаються в розпізнання субстратів і транслокацію їх через мембрану. ТМД-домени найчастіше складаються із шести трансмембранних ділянок, представлених α -спіралями.

За особливостями структури виділяють три групи АВС-транспортерів (рис. 1.47).

До першої групи відносять АВС-транспортери, їх називають **повними транспортерами** (рис. 1.47, А). Їхні молекули в межах одного поліпептидного ланцюга мають 12 трансмембранних ділянок (тобто два ТМД-домени) та два АТФ-зв'язувальні сайти (тобто два АВС-домени). Прикладами АВС-транспортерів цієї групи є білки АВСВ1 (інша назва – MDR1 – *multiple drug resistance protein 1*, білок множинної лікарської резистентності 1) та АВСС4 (MRP4).

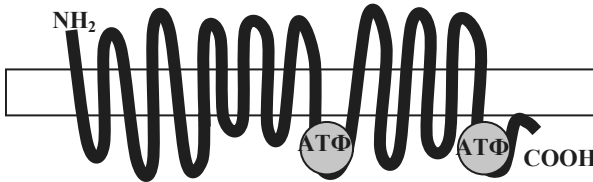
А ПОВНІ ТРАНСПОРТЕРИ



ПРИКЛАДИ

MDR1 (ABCB1)
MRP4 (ABCC4)
MRP5 (ABCC5)
MRP7 (ABCC7)
BSEP (ABCB11)

Б ПОВНІ ПОДОВЖЕНІ ТРАНСПОРТЕРИ



MRP1 (ABCC1)
MRP2 (ABCC2)
MRP3 (ABCC3)
MRP6 (ABCC6)

В НАПІВТРАНСПОРТЕРИ

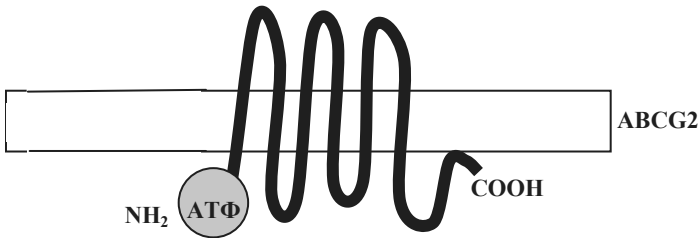


Рис. 1.47. Особливості структури різних представників ABC-транспортів: повні транспортери й напівтранспортери

До другої групи належать АВС-транспортери, що також у межах одного поліпептидного ланцюга мають два ТМД- і два АВС-домени, тобто є *повними транспортерами*, але, на відміну від представників попередньої групи, **на N-кінці молекули мають додатковий регуляторний домен, що складається із п'яти трансмембранних сегментів** (рис. 1.47, Б). Загалом же в межах одного поліпептидного ланцюга ці білки мають 17 трансмембранних ділянок і два АТФ-зв'язувальні сайти. Прикладами є білки АВСС1 (MRP1), АВСС2 (MRP2), АВСС3 (MRP3) та АВСС6 (MRP6).

Третя група АВС-транспортерів представлена так званими **напівтранспортерами** (рис. 1.47, В), оскільки в межах одного поліпептидного ланцюга її представники мають лише **шість трансмембранних доменів та один АТФ-зв'язувальний сайт, локалізований або на С-кінці** (наприклад, у білка АВСВ2 (*TAP1 – transporter associated with antigen processing*), **або на N-кінці** (прикладом є білок АВСГ2 та інші реверсні транспортери). У результаті **одна молекула таких АВС-транспортерів містить один ТМД- і один АВС-домен, тоді як функціонують напівтранспортери у вигляді гомо- або гетеродимерів** [Gottesman M. et al.].

АВС-домен містить три консервативні послідовності (рис. 1.48):

- *Walker A послідовність*;
- *Walker B послідовність*;
- *сигнатурну С-послідовність (signature (C) motif)*, також відому під назвою *LSGGQ-послідовності* (літерами позначено амінокислоти даної ділянки поліпептидного ланцюга – лейцин, серин, гліцин, гліцин, глутамін).

Дві перші послідовності – Walker A та Walker B – разом складають *каталітичний коровий субдомен* і виявлені в усіх АТФ-зв'язувальних білках. LSGGQ-ділянка локалізована ліворуч від Walker B послідовності в *α-спіральному субдомени*, є специфічною виключно для АВС-транспортерів – цим вони різняться від інших АТФ-зв'язувальних білків.

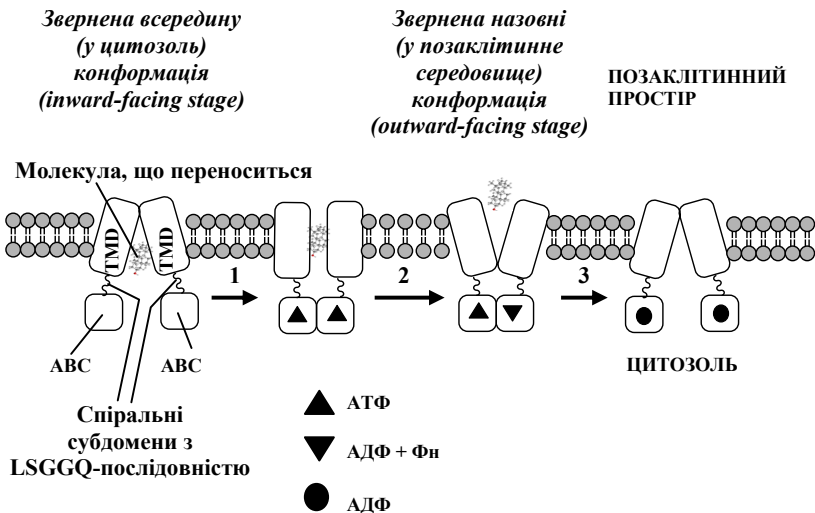
Окрім цього, в АВС-домені містяться *Q* петля, залучена у взаємодію між АВС та ТМД, зокрема у спряження гідролізу АТФ і конформаційних змін у ТМД під час транслокації субстрату, та *H* петля, необхідна для взаємодії АВС-доменів з АТФ.

Домен ТМД має кілька гідрофобних α -спіралей (як зазначалося раніше, найчастіше таких спіралей 6), які формують трансмембранний канал, у якому розташована субстратзв'язувальна ділянка. Він розпізнає широке коло субстратів, і під час зв'язування та гідролізу АТФ підлягає конформаційним перебудовам, які зумовлюють транспорт субстратів через мембрану. Амінокислотна послідовність та архітектура ТМД-доменів не є консервативною, що пояснюється відмінністю субстратів, які переносяться різними АВС-транспортерами.



Рис. 1.48. Структура АВС-домєну

АВС-експортери мають високу подібність у механізмах функціонування (рис. 1.49).



- 1 – зв'язування АТФ;
- 2 – початок гідролізу АТФ;
- 3 – повний гідроліз АТФ та вивільнення Фн

Рис. 1.49. Схема функціонування ABC-транспортера

У вихідному стані експортер перебуває у *зверненій усередину (у цитозоль) конформації (inward-facing stage)*, ABC-домени відносно віддалені один від одного, що дає змогу приєднувати амфіфільні або гідрофобні субстрати. *Транспортний цикл ініціюється зв'язуванням субстрату.*

У вихідному стані молекула експортера має низьку здатність зв'язувати АТФ. Зв'язування субстрату із TMD-доменами індукує конформаційні зміни в ABC-доменах, наслідком чого стає зростання їх спорідненості до АТФ. Під час каталітичного процесу зв'язування двох молекул АТФ індукує *димеризацію ABC-доменив*, закриття щілини між ними і формування "АТФ-сандвіча". При цьому обидві молекули АТФ розташовуються таким чином, що кожна з них контактує з Walker A-послідовністю одного ABC-домену й з LSGGQ-послідовністю іншого. *Це приводить у рух спіральні домени, у яких розташована LSGGQ, і переводить TMD-домени у звернену назовні*

(в позаклітинне середовище) конформацію (*outward-facing stage*). Гідроліз АТФ веде до вивільнення субстрату й до переходу молекули у вихідний стан.

Механізми роботи прокаріотичних АВС-імпортерів є подібними, але молекули у вихідному стані перебувають у зверненій назовні конформації й вивільнюють субстрат після АТФ-залежного переходу в конформацію, звернену всередину [Locher K.].

Як уже зазначалося (табл. 1.14), окремі представники АВС-транспортерів еукаріотів можуть належати до однієї із семи субродин даної родини.

АВСА субродина містить 12 повних транспортерів (АВСА1 – АВСА10, АВСА12, АВСА13), функції більшості з них ще не досліджено. Найвідоміший представник цієї субродини – білок **АВСА1** – бере участь у транспорті холестеролу й біосинтезі ліпопротеїнів високої щільності. Мутації відповідного гена є причиною розвитку *танжерської хвороби* – спадкового розладу, що характеризується відсутністю або наднизькими рівнями ліпопротеїнів високої щільності у плазмі крові з одночасним накопиченням ефірів холестеролу в тканинах і виникненням атеросклерозу та інших серцево-судинних патологій. Інший білок АВСА субродини – **АВСА4** – транспортує похідні вітаміну А й залучається у перебіг процесів зору.

АВСВ (MDR/TAP) субродина складається із чотирьох повних транспортерів та семи напівтранспортерів, і є єдиною субродиною АВС-білків, що містить транспортери обох груп. Деякі члени цієї родини білків відповідають за розвиток множинної лікарської резистентності (*multiple drug resistance, MDR*) до широкого кола структурно різних препаратів.

АВСВ1 (інші назви – **MDR1**, **Pgp** (*P-glycoprotein*)) – добре вивчений білок, асоційований із множинною лікарською резистентністю. MDR1 є повним транспортером, що переносить головним чином ліпофільні катіони (у тому числі протипухлинні препарати, блокатори Ca^{2+} -каналів, циклоспорин А, стероїдні гормони, гідрофобні пептиди, гліколіпіди). Він експресується на апікальних мембранах клітин печінки, гемато-енцефалічного бар'єру, нирок, кишечника, плаценти і захищає ці клітини від дії токсичних агентів. Надекспресія MDR1 виявлена за різних пух-

лин, клітини яких унаслідок цього стають резистентними до дії таких лікарських препаратів, як колхіцин, доксорубіцин, адриаміцин, вінбластин, дигоксин тощо, які при цьому видаляються із клітин-мішеней.

ABCB4 (інші назви – **MDR2/3**, **фліпаза**) та **ABCB11** (інша назва – **BSEP** (*Bile Salt Export Pump*)) локалізовані в апікальних мембранах гепатоцитів – перший бере участь у транспорті фосфатидилхоліну в жовч, другий – у транспорті у тому ж напрямку жовчних солей. Їхні мутації відповідають за різні форми прогресуючого родинного внутрішньопечінкового холестазу (*progressive familial intrahepatic cholestasis*, PFIC) – PFICIII (дефекти в MDR2/3) та PFICII (дефекти у BSEP). За цих захворювань токсичні жовчні кислоти, зокрема хенодезоксихолева, ушкоджують гепатоцити (PFICII) або клітини жовчних проток (PFICIII), що супроводжується раннім розвитком холестазу та стає головною причиною трансплантацій печінки в дітей.

ABCB2 (TAP1) та **ABCB3 (TAP2)** локалізовані в мембранах ЕПР більшості клітин і необхідні для розпізнавання антигенів (ендогенних або чужорідних білків) із залученням молекул I класу головного комплексу гістосумісності (ГКГ) (підрозд. 11.4). Процеси розпізнавання антигенів передбачають розщеплення указаних протейнів до коротких пептидів з наступним транспортом останніх через ЕПР, де вони формують комплекс із молекулами I класу ГКГ і надалі презентуються на поверхні клітини. Білки TAP1 і TAP2 є половинними транспортерами, які формують гетеродимер для транспорту утворених пептидів у ЕПР. Дефекти в генах цих білків проявляються *імуносупресією*, оскільки організм втрачає важливу ланку розпізнавання антигенів.

Інші представники ABCB субродини є половинними транспортерами й експресуються у лізосомах (**ABCB9**) або в мітохондріях (**ABCB6**, **ABCB7**, **ABCB8** та **ABCB10**), де залучаються у метаболізм заліза та транспорт попередників Fe/S білків.

ABCC (CFTR/MRP) субродина складається із 12 повних транспортерів, функцією яких є іонний транспорт, секреція токсинів, передача сигналів.

ABCC7 (CFTR) експресується у апікальних мембранах клітин легень, кишечнику, жовчних проток. Білок CFTR є унікальним аналогом ABC транспортерів, оскільки він є **цАМФ-регульованим хлорним каналом**, який відкривається при цАМФ-залежному фосфорилуванні його молекули за участю протеїнкінази A і здійснює не первинно-активний транспорт, а полегшену дифузю іонів хлору. [Luckie D. et al.]. При спадковій втраті функцій цього транспортеру внаслідок мутації відповідного гена (делеція трьох пар основ) розвивається *муковіцидоз (cystic fibrosis, кістозний фіброз, фіброзно-кістозна дегенерація)* – вроджений розлад, що характеризується аномаліями у функціонуванні екзокринних залоз. Розвиток муковіцидозу супроводжується продукцією організмом надмірно в'язкого й густого слизу на поверхнях епітелію. Це перш за все знижує здатність в'язкого епітелію очищуватися від мокрот і веде до хронічної ендобронхіальної бактеріальної колонізації. Наслідками таких станів є надпродукція мокрот, важке дихання, задишка, обмеженість перенесення фізичних навантажень і врешті-решт загибель. У 85 % пацієнтів виявляють панкреатичну недостатність, яка спричиняє погану абсорбцію жирів і розлади у травленні. Як супроводжувальні стани можуть виникати цукровий діабет, кишкова непрохідність, артрити, безпліддя.

При муковіцидозі загибель клітин епітелію легень відбувається внаслідок втрати іонного балансу, що спричиняє зниження функцій клітин із слизовою обструкцією, порушення обміну газів і зумовлює летальність у молодому віці.

Цей генетичний дефект виявляють приблизно у 30 000 дітей і дорослих у США; серед мешканців Кавказу муковіцидоз є одним із найбільш летальних спадкових захворювань (1/1000 новонароджених порівняно з 1/2500 в інших місцевостях). На 1997 р. середня тривалість життя чоловіків із цією патологією становила 32,7 років, жінок – 28,9 років. 1 із 31 американця та 1 із 28 мешканців Кавказу (а загалом понад 10 млн людей у світі) є безсимптомними гетерозиготними носіями дефектного гена.

Механізми функціонування CFTR детально вивчені на прикладі трансмембранного перенесення іонів хлору через апікальну мембрану холангіоцитів – клітин, що вистилають жовчні протоки. Рухомою силою для відкриття CFTR-каналу стає взаємодія молекул

секретину (його можна вважати агоністом CFTR) зі своїми рецепторами на базолатеральній мембрані холангіоцитів (рис. 1.50). Ці рецептори є метаботропними, тобто функціонально зв'язаними із G-білками (підрозд. 2.1), через які вони і передають сигнал на фермент аденілатциклазу, що каталізує реакцію синтезу цАМФ (підрозд. 2.1). цАМФ із залученням протеїнкінази А фосфорилює і активує CFTR, Cl^- -канал якого повертає іони хлору із холангіоцитів, куди вони надійшли внаслідок функціонування $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінника, у простір жовчної протоки.

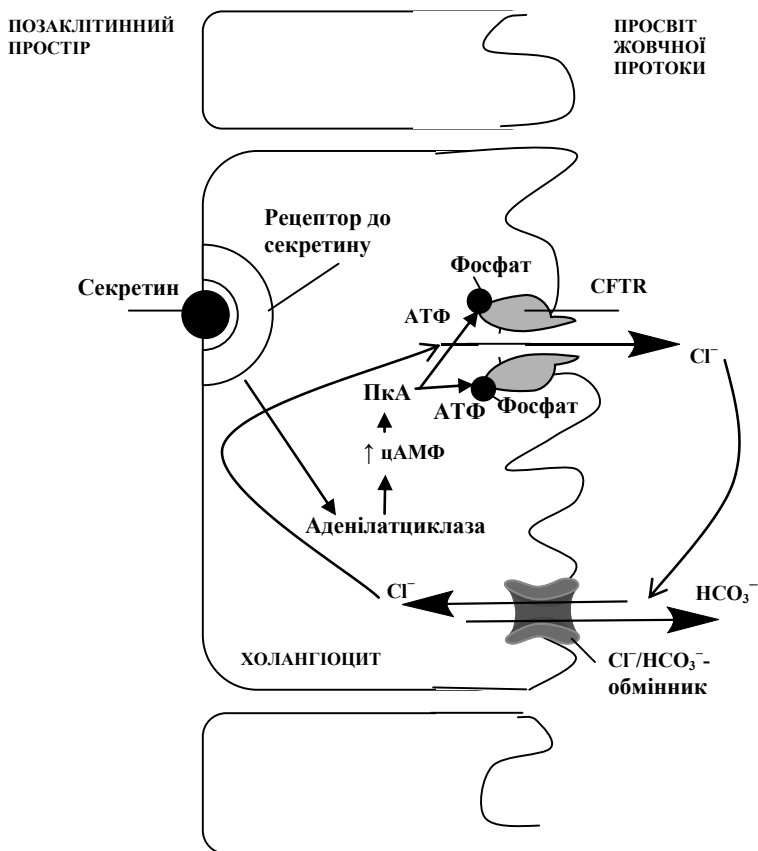


Рис. 1.50. Схема функціонування цАМФ-залежного хлорного каналу CFTR у холангіоциті

ABCC8 (SUR1), від *sulfonylurea receptor*, *рецептор до сульфонілсечовини*) локалізований у клітинах підшлункової залози і функціонує як *модулятор АТФ-залежних калієвих каналів (K_{АТФ} каналів)* і вивільнення інсуліну. Він є високоафінним рецептором до лікарських препаратів на основі сульфонілсечовини, які використовуються для лікування цукрового діабету II типу і діють, посилюючи вивільнення інсуліну із β-клітин підшлункової залози. Мутація цього білка веде до розвитку *персистентної гіперінсулінемічної гіпоглікемії новонароджених*, розладу, що характеризується нерегульованою секрецією інсуліну.

Спорідненим до нього є білок **ABCC9 (SUR2)**, що експресується у клітинах серцевого та скелетного м'язів і має низькі рівні експресії в інших клітинах.

K_{АТФ}-канали утворюють з білками-рецепторами до сульфонілсечовини октамерні комплекси у стехіометричному співвідношенні 4K_{АТФ}-канали : 4SUR1 та 4K_{АТФ}-канали : 4SUR2. При цьому похідні сульфонілсечовини, зв'язуючи SUR1 або SUR2, блокують K_{АТФ}-канали.

Механізм дії похідних сульфонілсечовини як антидіабетичних препаратів через білок SUR1 полягає в наступному (рис. 1.51). Вивільнення інсуліну із β-клітин підшлункової залози відбувається лише за деполяризації їх ПМ. Але вхід іонів калію в ці клітини спричиняє гіперполяризацію мембрани. Глюкоза діє як інсуліноген, підвищуючи внутрішньоклітинні рівні АТФ, унаслідок чого закриваються K_{АТФ}-канали і мембрана деполяризується. Це спричиняє відкриття потенціалзалежних Ca²⁺-каналів ПМ з наступним зростанням рівнів внутрішньоклітинного кальцію, що ініціює секрецію інсуліну. Сульфонілсечовина блокує калієві канали (подібно до глюкози, але не через зростання внутрішньоклітинних рівнів АТФ, а безпосередньо), що приводить до деполяризації ПМ та вивільнення інсуліну.

Іншими членами субродини ABCC є *дев'ять MRP-подібних білків*. **ABCC1 (MRP1, multidrug resistance protein)** експресується у латеральних мембранах клітин легень та інших тканин і відповідає за множинну лікарську резистентність. Він функціонує як мультиплетний транспортер органічних аніонів і транс-

портує глутатіонові, глюкуронові й сульфатні кон'югати стероїдних гормонів і жовчних солей, лікарських препаратів та інших гідрофобних сполук, у тому числі й токсинів.

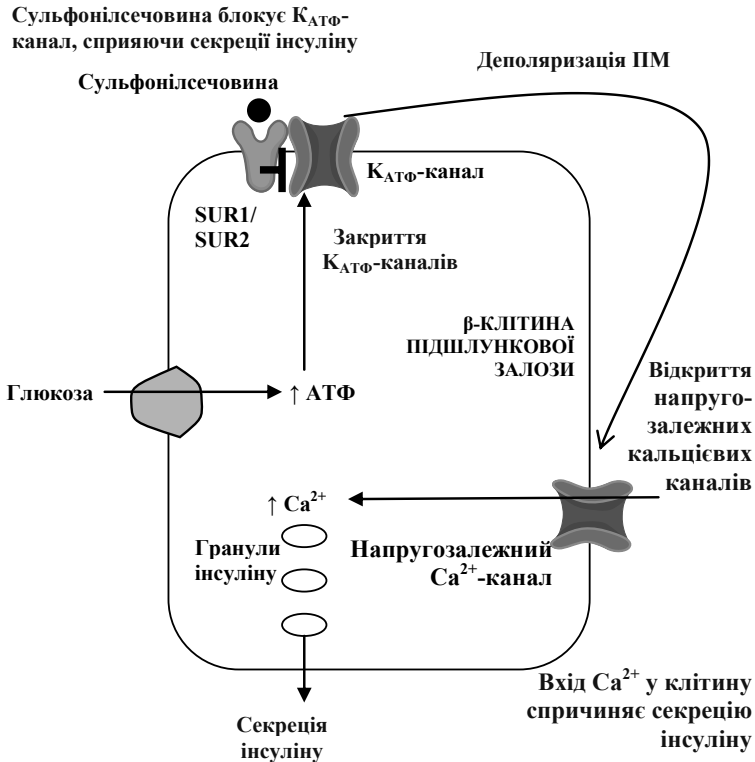


Рис. 1.51. Схема участі білка SUR1 у антидіабетичних впливах похідних сульфонілсечовини

ABCC2 (MRP2) та **ABCC3 (MRP3)** експресуються на апікальних мембранах клітин печінки, нирок, кишечнику і функціонують подібно до **MRP1/ABCC1** – переносять численні амфипатичні аніонні субстрати, зокрема лейкотриєн С4, кон'югати з глутатіоном, сірчаною чи глюкуроною кислотами, а також виводять із клітин ряд хімотерапевтичних препаратів, сприяю-

чи таким чином розвитку резистентності до хіміотерапії. При цьому надекспресія MRP3 у клітинах печінки може зростати в умовах холестазу (компенсаторне явище для видалення із гепатоцитів гідрофобних жовчних кислот). Мутація гена MRP2 є характерною для *синдрому Дабіна – Джонсона*.

Білки **ABCC4** та **ABCC5** визначають резистентність клітин до препаратів на основі нуклеозидів. Білки **ABCC4**, **ABCC5**, **ABCC11** та **ABCC12** за розмірами є меншими відносно інших представників цієї субродина за рахунок відсутності N-термінального домену, не залученого до здійснення транспортної функції.

ABCD (ALD) субродина складається із чотирьох білків, які є половинними транспортерами і локалізовані в пероксисомах (так звані *пероксисомальні ABC-транспортери*), де вони функціонують як гомо- і гетеродимери, залучаючись у регуляцію транспорту жирних кислот з дуже довгими ланцюгами (з довжиною ланцюга понад 26 атомів вуглецю). Мутації цих білків пов'язують з розвитком так званих *пероксисомальних розладів*, до яких відносять *аденолейкодистрофію* (мутовані гени білків ABCD1 та ABCD2) і деякі форми *хвороби Цельвегера* (дефекти в генах білків ABCD3 і ABCD2). Ці стани пов'язані з порушенням обміну довголанцюгових жирних кислот і супроводжуються накопиченням їх в організмі.

ABCE та ABCF субродини складаються, відповідно, із одного та чотирьох білків. Ці білки не мають трансмембранних доменів (TMDs), характерних для більшості ABC-транспортерів, і тому не виконують жодної ролі в мембранному транспорті.

ABCE1 – білок, що зв'язує олігоаденілат, здатний розпізнавати 2',5'-олігоаденілати, які продукуються у відповідь на вірусну інфекцію (їх продукція опосередкована синтезом в інфікованих клітинах інтерферону та дією індукованого ним ферменту олігоаденілатсинтази – підрозд. 11.3). ABCE1 виступає інгібітором РНКазі L – ферменту, що активується за дії інтерферону (така активація також передбачає зв'язування цим ферментом 2',5'-олігоаденілатів – підрозд. 11.3). Ефекти активованої олігоаденілатами РНКазі L є однією із причин блокування білкового синтезу за дії інтерферону.

Блок **ABCF1** асоційований із рибосомами й опосередковує активацію кінази фактора елонгації транскрипції eIF-2 α , таким чином посилюючи біосинтез білка. Він активується за дії TNF α і, отже, залучається у реалізацію запальної відповіді.

ABCG субродина складається із шести "реверсних" половинних транспортерів, у яких ABC-домен розташований на N-, а TMD-домен – на C-кінці молекули. **ABCG1** білок залучений у регуляцію транспорту холестеролу. **ABCG2** визначає резистентність до лікарських препаратів. Білки **ABCG5** та **ABCG8**, що експресуються в ентероцитах і гепатоцитах, під час функціонування утворюють гетеродимер, що називається *стеролін*, і опосередковує секрецію харчових стеролів (холестеролу і рослинних нехолестеролових стеролів – сітостеролу, кампестеролу, брасікастеролу) із ентероцитів у просвіт кишечника та із гепатоцитів у жовч, видаляючи їх таким чином із організму. Функції білків **ABCG3**, виявленого виключно у гризунів, та **ABCG4**, характерного для печінки, не з'ясовані.

Мутації гена білка ABCG1 спричиняють *порушення обміну холестеролу* з розвитком атеросклерозу; дефекти генів білків ABCG5 та ABCG8 ведуть до виникнення *ситостеролемії* – хвороби, яка характеризується гіперабсорбцією і зниженням секреції з жовчю харчових стеролів, у тому числі рослинного походження, що спричиняє гіперхолестеролемію, ксантоматоз, ранній розвиток атеросклерозу, аномальні функціональні тести крові та печінки [Dean M. et al.], [Vasiliou V. et al.].

Отже, представники щонайменше трьох субродин ABC-транспортерів відіграють критичну роль у розвитку *множинної лікарської резистентності* – стану, за якого у пацієнтів розвивається резистентність не лише на призначений препарат, але й на інші лікарські засоби [Gottesman M. et al.]. Резистентність до лікарських препаратів є загальною клінічною проблемою у пацієнтів, хворих як на інфекційні хвороби, так і на рак. Прокаріотичні, еукаріотичні, а також неопластичні клітини часто є резистентними до дії терапевтичних агентів. Це зумовлюється низкою факторів, одним із яких є посилене видалення цих сполук із клітин за участю ABC-транспортерів.

Блок **MDR1** – представник субродини ABCB – видаляє із клітин цитостатичні й пухлиносупресуючі лікарські препарати, а також ряд інших терапевтичних засобів (табл. 1.15).

Таблиця 1.15. Лікарські препарати-мішені білка ABCB1 (MDR1)

Група препаратів	Приклади
Хіміотерапевтичні (протипухлинні) засоби	Вінбластин, вінкристин, доксорубіцин, даунорубіцин, етопозид, мітоксантрон
Інгібітори протеаз вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ)	Ритонавір, саквінавір, нелфінавір
Анальгетики	Морфін
Антигістамінні засоби	Терфенадин
Антагоністи H ₂ -гістамінових рецепторів	Циметидин
Імуносупресивні засоби	Циклоспорин А
Анти аритмічні засоби	Квінідин, пропафенон
Антиепілептичні засоби	Фелбамат, топірамат
Інгібітори ГОМК-КоА-редуктази – ключового ферменту біосинтезу холестеролу	Статини
Інгібітори тирозинових протеїнкіназ	Гефтиніб
Серцеві глікозиди	Дигоксин
Антигельмінтні засоби	Івермектин
Блокатори кальцієвих каналів	Верапаміл
Антагоністи кальмодуліну	Трифлуоперазин, хлорпромазин
Препарати, що знижують тиск	Резерпін, пропранолол
Антибіотики	Еритроміцин, граміцидин А
Стероїди	Кортикостерон, дексаметазон, альдостерон, кортизол
Препарати для лікування алкоголізму	Дисульфірам

Приклади гідрофобних цитотоксичних ліків, що транспортуються MDRs, наведено на рис. 1.52.

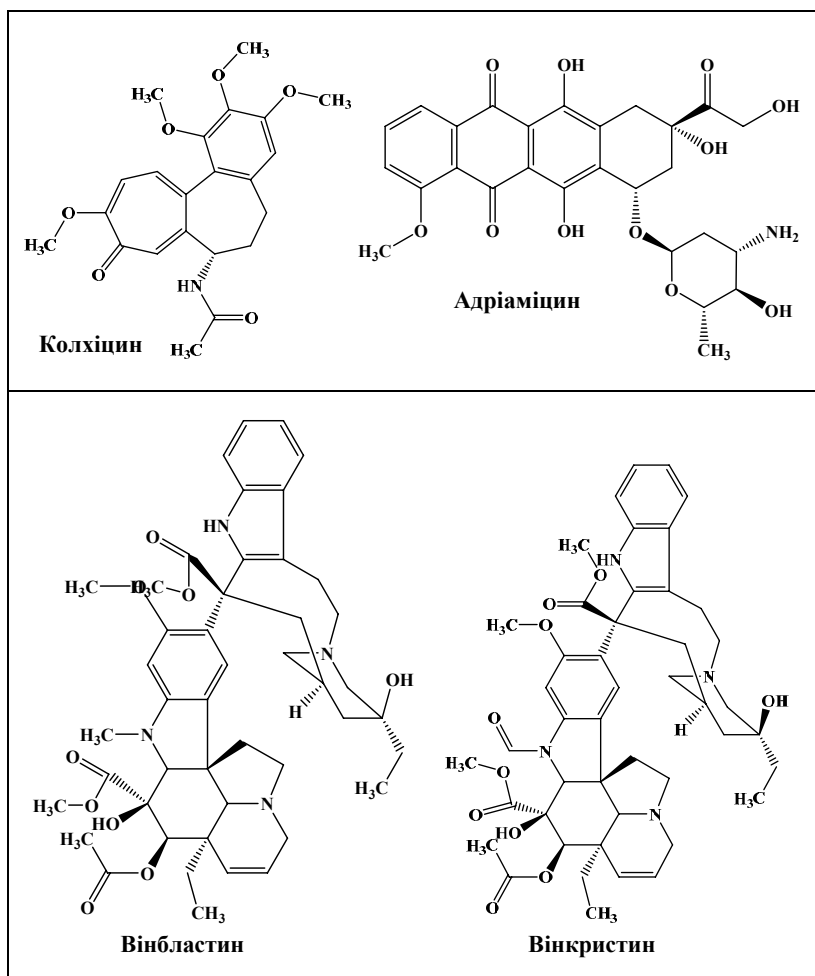


Рис. 1.52. Приклади гідрофобних цитотоксичних ліків, що транспортуються MDRs

Ряд представників субродини АВСС – MRPs – діють подібно (табл. 1.16).

Таблиця 1.16. Лікарські препарати-мішені білка ABCC1 (MRP1)

Група препаратів	Приклади
Хіміотерапевтичні (протиухлинні) засоби	Вінбластин, вінкристин, доксорубіцин, даунорубіцин, етопозид, іринотекан
Металоїди	Арсенат натрію, арсеніт натрію,
Пептиди	Окиснена і відновлена форми глутатіону
Глутатіоновані кон'югати	Кон'югати лейкотриєнів, простагландинів, циклофосфаміду, доксорубіцину
Сульфатні кон'югати	Кон'югати стероїдних гормонів, жовчних кислот
Глюкуронові кон'югати	Кон'югати білірубіну, стероїдних гормонів
Інгібітори протеаз вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ)	Ритонавір, саквінавір
Інгібітори тирозинових протеїназ	Гефітініб
Антибіотики	Дифлоксацин
Фолати	Фолієва кислота

Найбільш вивченим представником субродини ABCG є **ABCG2** (відомий також як білок резистентності раку молочної залози, *breast cancer resistance protein*, BCRP), який визначає резистентність до інгібіторів топоізомерази I і II – топотекану, іринотекану, а також до доксорубіцину та інших препаратів (табл. 1.17).

**Таблиця 1.17. Лікарські препарати-мішені
білка ABCG2**

Група препаратів	Приклади
Хіміотерапевтичні (протиухлинні) засоби	Доксорубіцин, даунорубіцин, етопозид, іринотекан, флавопіридол, мітоксантрон, бізантрен
Антифолати	Метотрексат
Порфірини	Протопорфірин XI, гематопорфірин
Інгібітори тирозинових протеїнкіназ	Гефітиніб
Флавоноїди	Кверцетин
Глутатіоновані кон'югати	Динітрофеніл-S-глутатіон
Сульфатні кон'югати	Кон'югати стероїдних гормонів,
Глюкуронові кон'югати	Кон'югати стероїдних гормонів
Інгібітори ГОМК-КоА-редуктази	Статини
Препарати, що знижують тиск	Резерпін
Антибіотики	Ципрофлоксацин, норфлоксацин
Антивірусні препарати	Ламівудин

Множинна лікарська резистентність часто асоціюється з надекспресією ABC транспортерів, яку виявляють, зокрема, при більшості онкологічних захворювань. Тому інгібування причетних до розвитку резистентності ABC транспортерів низькомолекулярними сполуками розглядається як один із напрямків антиракової терапії.

1.4.4. Активний транспорт.

Вторинно-активний транспорт (котранспорт)

Процеси вторинно-активного транспорту безпосередньо не пов'язані з гідролізом АТФ, а спряжені з потоком іонів за електрохімічним градієнтом (рис. 1.53).

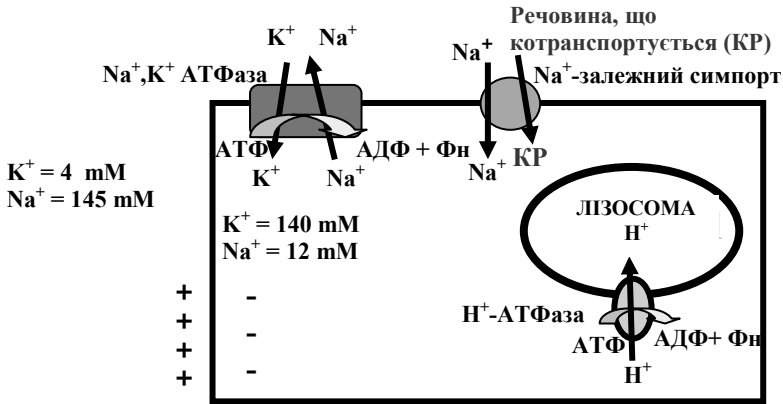


Рис. 1.53. Координація первинно- та вторинно-активного транспорту у клітинах

Зокрема, електрохімічний градієнт іонів Na^+ , що створюється роботою Na^+ , K^+ -АТФази, забезпечує енергією транспорт амінокислот і цукрів у клітинах тварин. При цьому поглинання, наприклад, глюкози цими клітинами супроводжується входом у клітини іонів натрію: іони натрію і глюкози зв'язуються зі специфічним білком-переносником і проникають у клітину одночасно. Таким способом здійснюється реабсорбція амінокислот і глюкози у проксимальних звивистих каналцях нефрону, транспорт цукрів у мікрроворсинках щетинкової облямівки ентероцитів кишечника, працює Na^+ , таурохолат-котранспортна система базолатеральної мембрани гепатоцитів (рис. 1.54) тощо.

КЛІТИНА ЩІТИНКОВОЇ ОБЛЯМІВКИ

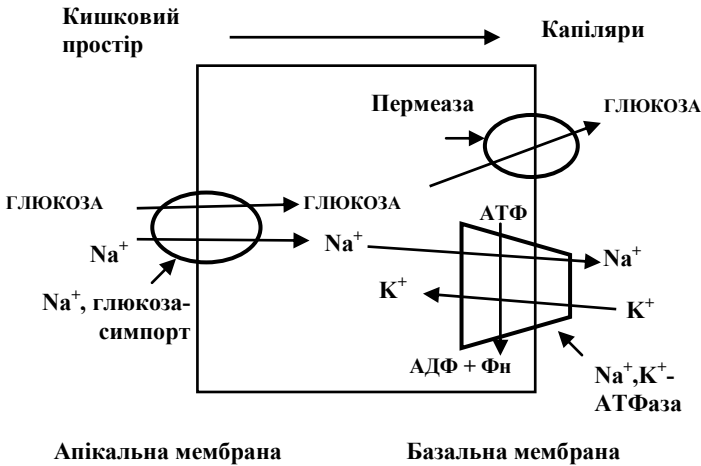


Рис. 1.54. Приклад вторинно-активного транспорту – поглинання глюкози із просвіту кишечника апікальними мембранами ентероцитів (транспортер для глюкози на базальній мембрані (пермеаза) – полегшена дифузія; Na⁺, глюкоза-симпорт апікальної мембрани – вторинноактивний транспорт; Na⁺,K⁺-АТФаза – первинно-активний транспорт)

Натрій, що входить у клітину разом зі сполукою, яка транспортується, виводиться із клітини за участю Na⁺, K⁺-АТФази.

У рослинних клітинах головною рушійною силою для вторинно-активного транспорту є градієнт концентрації іонів водню, генерований H⁺-АТФазою плазматичної мембрани: поглинання цими клітинами амінокислот, цукрів, інших сполук спряжене з входом у клітини протонів, які надалі видаляються із клітини завдяки роботі H⁺-АТФази.

1.4.5. Цитоз як активний транспорт

Цей особливий вид транспорту речовин, до якого відносять ендоцитоз і екзоцитоз, теж належить до активного, але відбувається він з порушенням цілісності ПМ за рахунок послідовного утворення оточених мембранами кульок (везикул). У ці процеси залучені периферійні мембранні білки і рецептори, що здійснюють координацію і специфічну регуляцію.

1.4.5.1. Ендоцитоз

До ендоцитозу прийнято відносити піно- і фагоцитоз. *Піноцитоз* ("пиття клітин") – це транспорт позаклітинної рідини з іонами й невеликими молекулами, тоді як *фагоцитозом* ("травлення клітин") називають перенесення твердих субстанцій – бактерій, фрагментів клітин тощо; до фагоцитозу здатні найпростіші, а в організмі вищих тварин – макрофаги.

Ряд сполук, наприклад холестерол, необхідний для побудови біологічних мембран і біосинтезу інших стероїдів, потрапляє у клітину шляхом *високоспецифічного ендоцитозу, що опосередковується мембранними рецепторами*. Для цього типу ендоцитозу необхідна низка клітинних білків, зокрема клатрин і динамін.

Холестерол, як і інші ліпідні сполуки, у крові перебуває у вигляді складних білків – ліпопротеїнів. Найбільше холестеролу міститься у ліпопротеїнах низької щільності (ЛПНЩ). Рецептор-опосередкований ендоцитоз ЛПНЩ індукується зв'язуванням відповідного рецептора ПМ із В-100 апопротеїном ЛПНЩ, унаслідок чого формується ендосома з комплексом {рецептор-ЛПНЩ} усередині, оточена молекулами *клатрину* зовні (рис. 1.55); ЛПНЩ за умов кислого рН ендосоми відокремлюється від власного рецептора, останній разом із клатрином повертається до мембрани, а ЛПНЩ деградує до холестеролу, жирних кислот і амінокислот у вторинних лізосомах.

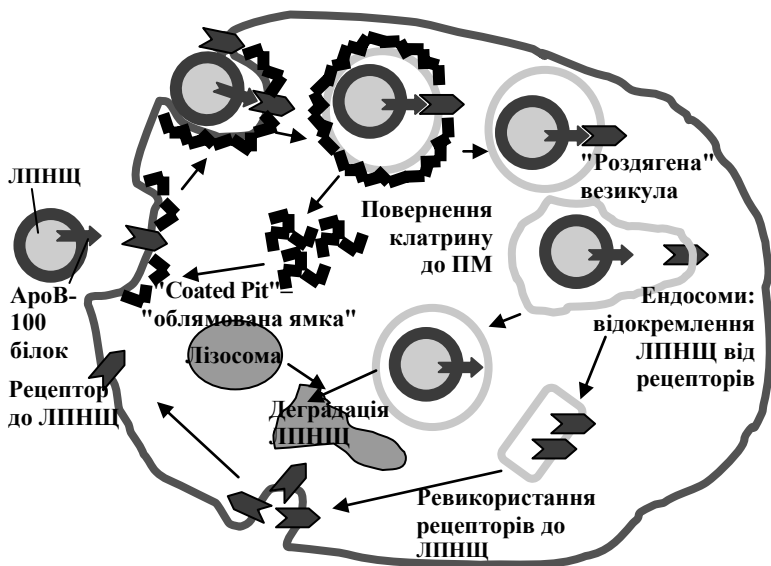


Рис. 1.55. Схема рецептор-опосередкованого ендоцитозу. Клатрин-облямовані ямки (англ. *coated pits*) – спеціалізовані ділянки ПМ, у яких виявлені специфічні рецептори клітинної поверхні

Мутації гена рецептора до ЛПНЦ спричиняють розвиток *родинної гіперхолестеролемії*, яка характеризується порушенням поглинання ЛПНЦ і супроводжується високими рівнями холестеролу в крові. За аналогічним механізмом здійснюється надходження до клітин іонів заліза (трансферин захоплюється рецептором, іони заліза лишаються у лізосомах, а трансферин із рецептором повертаються на поверхню клітини), гормонів, регуляторних білків, вірусів. Сьогодні відомі деякі деталі реалізації такого *клатрин-опосередкованого ендоцитозу* (рис. 1.56).

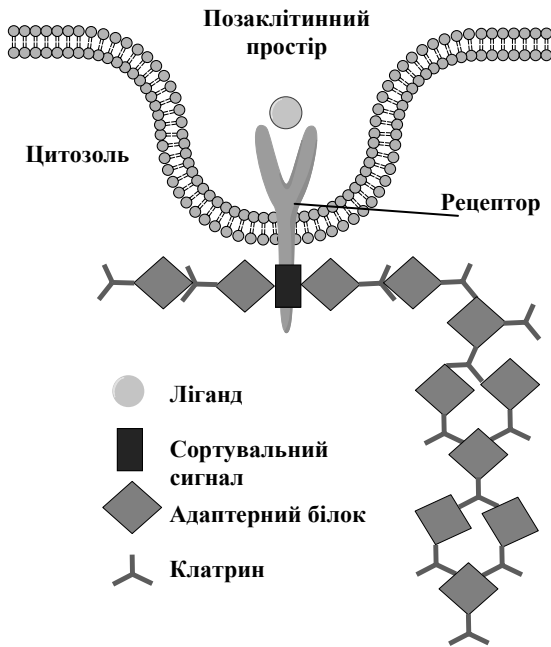


Рис. 1.56. Будова "комплексних часток": взаємодія рецептора з адаптером опосередковує зв'язування клатрину і його олігомеризацію

Зокрема, встановлено, що вибір рецептора або комплексу {ліганд-рецептор} для транспорту здійснюється через наявність "сортувального сигналу" у хвості рецептора, який, взаємодіючи з цитозольним адаптером, формує "комплексні частки", що надалі взаємодіють із клатрином. На цитоплазматичному домені мембранних білків-рецепторів виявлено чотири типи "сортувальних сигналів", котрі забезпечують подальшу взаємодію рецепторних молекул із цитозольним адаптером і клатрином:

- тирозинові сигнали (*tyrosine based signals*), що як адаптера потребують AP2;
- дилейцин(LL)-вмісні сигнали з адаптером AP2;

- *домен, багатий на фосфорильовані залишки серину на С-кінці;*
- *мотив, утворений шляхом моноубіквітинування з адаптерами Eps15/15R, епсинами та Hrs.*

Везикули формуються за рахунок полімеризації клатрину з використанням регуляторних білків, зокрема динаміну (рис. 1.57).

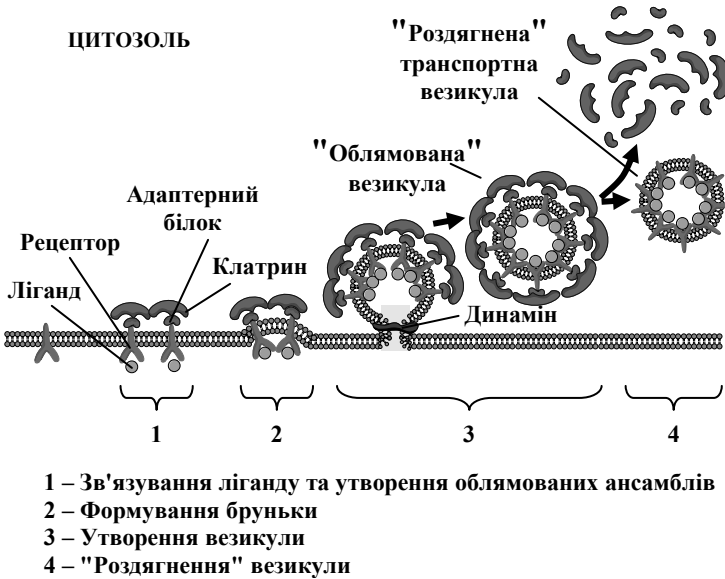


Рис. 1.57. Схема, що показує функціонування клатрину і динаміну. Динамін – мембранозв'язана ГТФаза, залучена у "відпупкування" облямованих ямок ПМ

Ендоцитоз у ділянках кавеол – *кавеолярне поглинання* – іде за іншим механізмом. Кавеоли не містять рецепторів, які беруть участь у клатринзалежному поглинанні. Тому недостатність холестеролу, що порушує рафти й кавеолярне поглинання, не впливає на клатрин-опосередкований ендоцитоз. Кавеосоми, що утворюються під час кавеолярного поглинання, є більш стабільними, ніж звичайні ендосоми, і переносять

"вантаж" одразу до ЕПР або апарату Гольджі, не взаємодіючи з лізосомами. Кавеоли є сайтами поглинання харчових компонентів, гормонів, хемокінів, деяких вірусів (наприклад, SV-40), бактерій, паразитів і бактеріальних токсинів. Поглинання в ділянках кавеол дозволяє патогенам уникнути перетравлення в лізосомах і деградації.

Ще одним механізмом ендоцитозу є **убіквітин-опосередкований ендоцитоз**. Білок убіквітин (76 амінокислотних залишків) залучений у кон'югацію із протеїнами-субстратами (убіквітинування). *Поліубіквітинування* є маркером, що зумовлює деградацію модифікованих білків-мішеней у протеасомі (підпдрозд. 5.2.3.1), тоді як *моноубіквітинування* стає сигналом для ендоцитозу кон'югованих білків на поверхні клітини. Адаптерні білки, наприклад епсини, мають убіквітин-взаємодіючі домени, що "впізнають" модифіковані білки й надалі взаємодіють із клатрином. Таким чином убіквітиновані білки інтерналізуються в ендосоми, мультивезикулярні тільця (пізні ендосоми), лізосоми. Сортування убіквітинованих субстратів у ранні й пізні ендосоми і лізосоми у ссавців потребує адаптерних білків Tsg101 (кодується геном пухлинної чутливості – *tumor susceptibility gene 101*) і Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*, білок-субстрат тирозинової протеїнкінази, що регулюється фактором росту гепатоцитів). Дуже часто моноубіквітинуванню підлягають залучені до ендоцитозу рецептори ПМ після зв'язування їх із лігандом. У цьому випадку у пізніх ендосомах ферменти деубіквітинування видаляють убіквітин із молекул рецепторів для їхнього подальшого використання, після чого неубіквітиновані рецептори рециклізуються в ПМ через рециклічні ендосоми. Цей тип ендоцитозу також використовується вірусами, зокрема ВІЛ-1 і Ebola, для полегшення відпупкування вірусів у клітину.

Рецептор-опосередкований ендоцитоз є широко розповсюдженим механізмом потрапляння вірусних часток у клітини хазяїна [Sieczkarski S. et al.]. Наприклад, вірус ВІЛ входить у Т-клітини, розпізнаючи CD4-білок на їх поверхні за допомогою власних білків-глікопротеїнів gp120 і gp41 (рис. 1.58); gp120 при цьому полегшує ендоцитоз вірусних часток.

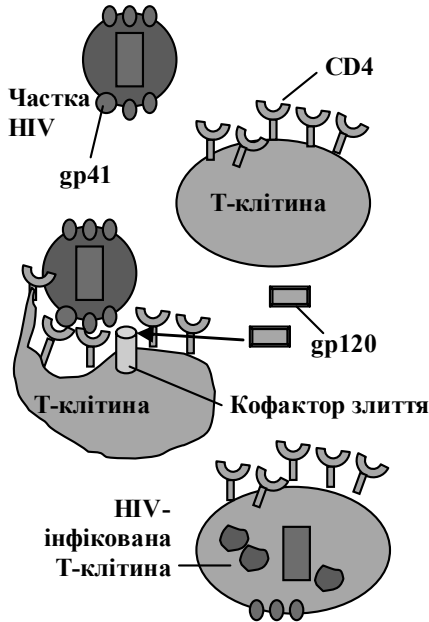


Рис. 1.58. Схема ендцитозувірусної частки ВІЛ Т-клітиною. HIV-вірус входить у Т-CD4⁺-клітини, розпізнаючи маркер CD4 за допомогою вірусних білків gp41 і gp120. При цьому gp120 полегшує ендцитоз вірусних часток

Аналогічні шляхи вбудовування характерні й для інших РНК-вмісних вірусів. Так, вірус грипу (*Influenza virus*) використовує власний білок гемаглютинації для розпізнавання глікофору А або сіалової кислоти на поверхні еритроцитів, активуючи ендцитоз, шляхом якого віруси входять у клітини.

На рис 1.59 наведено різні механізми потрапляння патогенів у клітину ссавців. Слід ще раз нагадати, що з усіх численних типів ендцитозу тільки кавеолярне поглинання не приводить до взаємодії субстанції, що входить у клітину, із вмістом лізосом, і, відповідно, до її руйнування гідролазами.

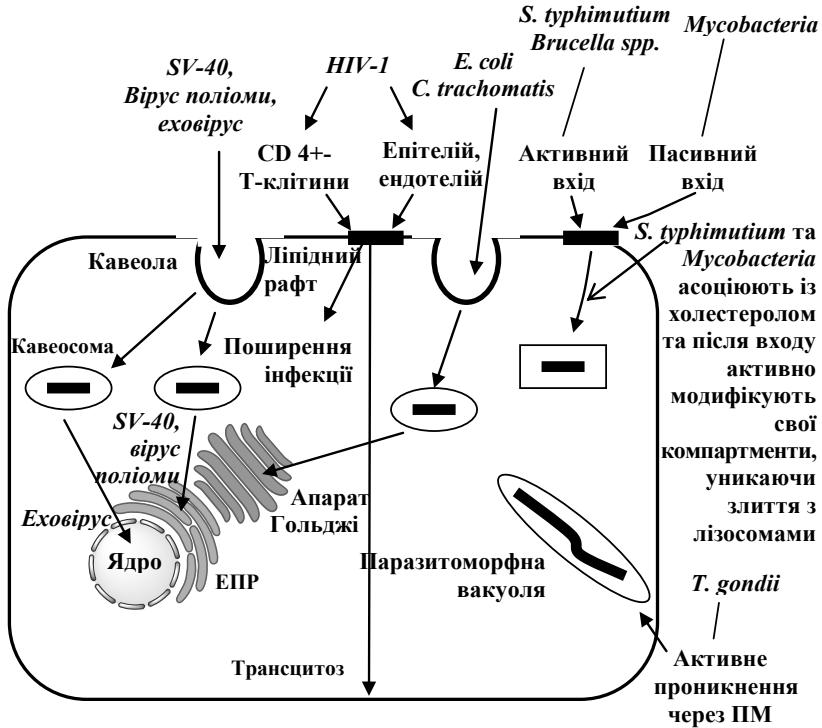


Рис. 1.59. Механізми потрапляння патогенів у клітину ссавців

1.4.5.2. Екзоцитоз

Екзоцитоз є кінцевою стадією процесу секреції низки сполук. Він задіяний, зокрема, у побудову біологічних мембран, виділення нервовими закінченнями нейромедіаторів, клітинами травних залоз – травних ферментів, ендокринними клітинами – відповідних гормонів. Рослинні клітини використовують екзоцитоз для доставки від АГ до поверхні клітини білків і вуглеводів, необхідних для побудови їхньої клітинної стінки.

Загалом екзоцитозу притаманні три основні функції:

- доставляти до ПМ ліпіди, синтезовані в ЕПР, або ж ліпідні компоненти ПМ, які потрапили всередину клітини під час ендоцитозу;
- спрямовувати до ПМ функціональні мембранні білки – рецептори або білки-транспортери, канали тощо;
- вивільнювати із клітини різноманітні сполуки, наприклад, токсичні продукти метаболізму або синтезовані у клітині сигнальні молекули (гормони, нейромедіатори).

За механізмом прийнято виділяти два основні шляхи екзоцитозу – **конститутивний**, або **неспецифічний** (кальцієнезалежний, із залученням апарату Гольджі), який зустрічається практично в усіх еукаріотичних клітинах і є необхідним для побудови позаклітинного матриксу й доставки білків до ПМ, та **регульований**, або **високоспецифічний**, кальцієзалежний неконститутивний екзоцитоз, прикладом якого може бути секреція гормонів та нейромедіаторів.

У випадку конститутивного ендоцитозу секреторні везикули за відсутності певних зовнішніх стимулів відокремлюються від АГ, транслокуються вздовж мікротрубочок цитоскелета і доставляються до поверхні клітини. Коли везикулярна мембрана вступає у контакт із ПМ, специфічні везикулярні білки вбудовуються між ліпідними молекулами відповідного мембранного моношару, а сама мембрана везикули стає частиною ПМ.

За регульованого екзоцитозу секреторні міхурці накопичуються у клітині, а процес їхнього вивільнення запускається певним сигналом (дією гормону, зміною мембранного потенціалу), який опосередковується швидким зростанням вмісту іонів Ca^{2+} у цитозолі клітини.

1.5. Біологічні мембрани у формуванні міжклітинних взаємодій

Клітини багатоклітинних організмів організовані у **тканини**. В останніх, окрім клітин, також наявний **позаклітинний матрикс** – комплексна "сітка" макромолекул (білків, глікозаміногліканів, протеогліканів), що секретуються клітинами. У тканинах клітини сполучені між собою та з елементами по-

заклітинного матриксу спеціалізованими контактними ділянками – міжклітинними контактами. Таким чином, тканина формується внаслідок двох основних типів взаємодій:

- клітина-клітина
- клітина-матрикс (рис. 1.60).

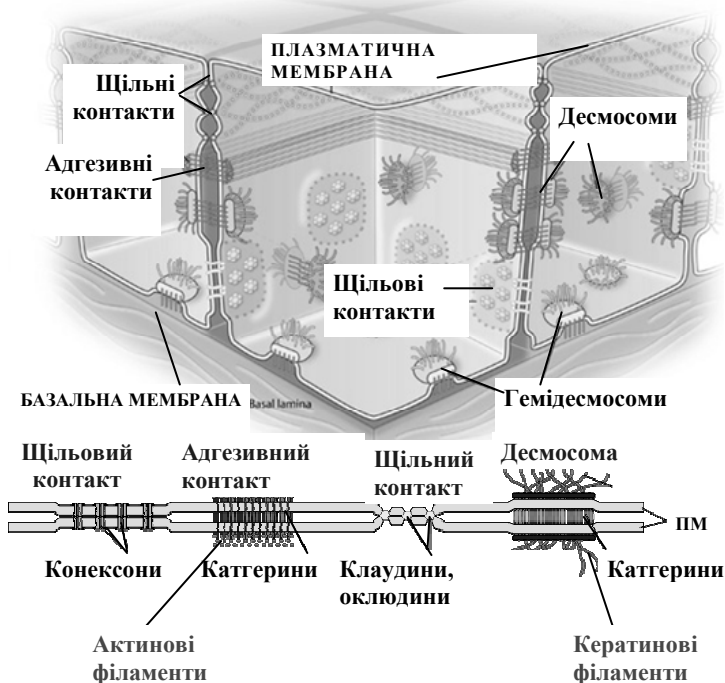


Рис. 1.60. Загальні принципи формування різних типів міжклітинних контактів

Усі типи міжклітинних взаємодій прийнято класифікувати у три основні класи:

- **замикальні контакти** (*occluding junctions*) – контакти, що "зшивають" клітини між собою, мембрани клітин при цьому максимально зближуються, унаслідок чого формуються непроникні або вибірково проникні щільні шари;

- **якірні контакти** (*anchoring junctions*) – залучаються у з'єднання клітин з іншими клітинами або з позаклітинним матриксом; вони асоційовані з елементами цитоскелета і мають три основні елементи: *трансмембранні молекули клітинної адгезії (Cell adhesion molecules, CAMs), внутрішньоклітинні якірні (адантерні) білки*, що сполучають CAMs із елементами цитоскелета, та власне *елементи цитоскелета (пучки філаментів)*.

- **комунікативні контакти** (*communicating junctions*) – контакти, що формують канали і сполучають цитоплазми сусідніх клітин, інтегруючи їхній метаболізм.

1.5.1. Замикальні контакти

Транспорт речовин через епітеліальний шар може відбуватися двома шляхами:

- *за участю транспортних білків плазматичної мембрани* (наприклад, із залученням відповідних Na^+ -залежних переносників у клітини епітеліального шару кишечника – ентероцити – через апікальну мембрану потрапляють амінокислоти і моносахариди, підпідрозд. 1.4.4);

- *парацелюлярно* (між клітинами за градієнтом концентрації – так здійснюється абсорбція амінокислот і моносахаридів із просвіту кишечника, де їхній вміст зростає у процесі травлення, що зумовлює стимуляцію пасивного транспорту).

Зв'язуючи сусідні клітини, замикальні контакти (представлені **щільними контактами** (*tight junctions*) у хребетних та відповідними їм **септованими контактами** (*septate junction*) у безхребетних) утримують сусідні клітини разом, *сприяючи виконанню епітелієм бар'єрної функції* так, що навіть низькомолекулярні субстанції не можуть переходити через шар епітеліальних клітин. Проте цей бар'єр не є абсолютним: усі щільні контакти є непроникними для макромолекул, а прони-

кність щільних контактів для низькомолекулярних сполук неоднакова в різних типах епітелію (наприклад, щільні контакти в епітеліальному шарі тонкого кишечника в 10 000 разів проникніші для неорганічних іонів, ніж щільні контакти в епітелії сечового міхура). Ці відміни пояснюються різницею в білках, що формують ці контакти. Крім того, проникність щільних контактів у епітеліальному шарі може змінюватися, наслідком чого стає зростання транспорту через епітелій низькомолекулярних сполук і води. Отже, замикальні контакти здійснюють регуляцію стану парацелюлярної проникності та інтенсивності парацелюлярного транспорту (рис. 1.61).

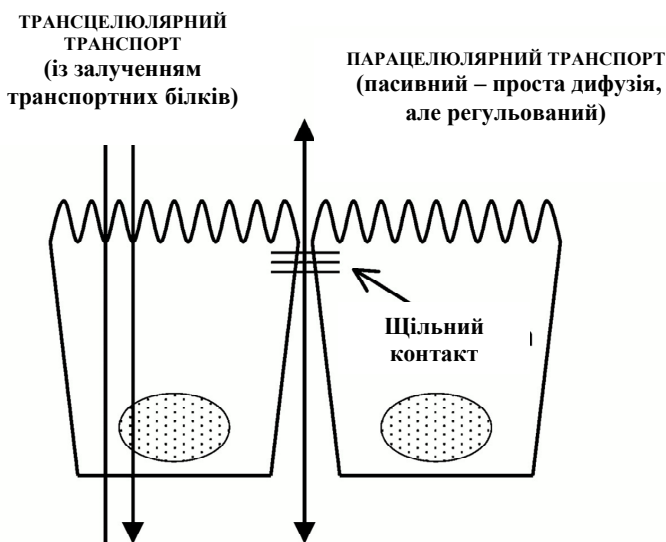


Рис. 1.61. Щільні контакти в регуляції парацелюлярного транспорту

Окрім епітеліальних шарів, замикальні контакти також виявлені між гепатоцитами – у місцях формування жовчних каналців (рис. 1.15).

Щільні контакти також запобігають латеральній дифузії деяких мембранних білків і ліпідів між апікальною і базолатеральною ділянками ПМ. Тому при руйнуванні їх відбувається змішування білків і ліпідів, у нормі характерних для цих ділянок. Зокрема, це спостерігається при видаленні із позаклітинного середовища іонів кальцію, необхідних для підтримки цілісності цього типу міжклітинних взаємодій.

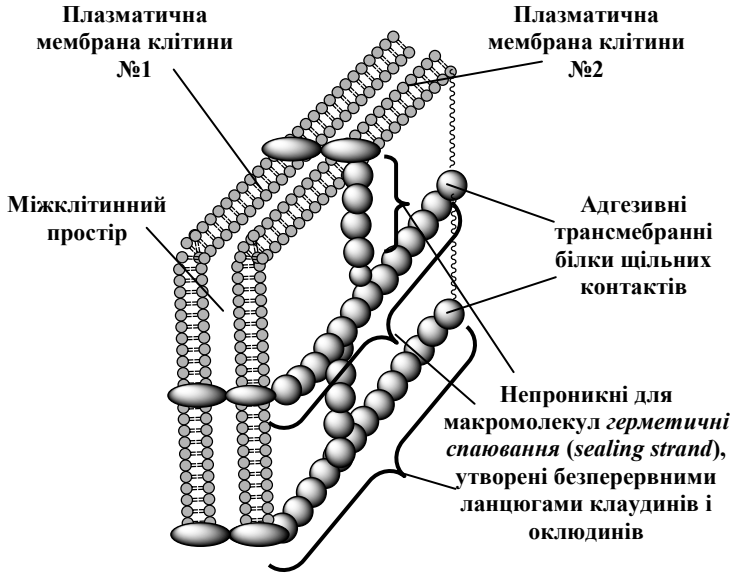
До складу щільних контактів входить близько 40 різних білків, серед яких є як трансмембранні, так і цитоплазматичні протеїни.

Трансмембранні білки щільних контактів можна поділити на дві групи:

- які перетинають мембрану чотири рази (4TMS);
- які перетинають її тільки один раз (1TMS).

4TMS-білки представлені **головними адгезивними трансмембранними білками щільних контактів** – **клаудинами** і **оклюдинами**. При формуванні щільного контакту безперервні ланцюги цих білків скріплюють плазматичні мембрани сусідніх клітин, утворюючи **герметичні спаювання** (*sealing strand*), які герметизують ділянки взаємодії клітин і є непроникними для макромолекул (рис. 1.62). Залежно від кількості таких спаювань мембрани мають різну проникність для малих молекул та іонів – адже кожне спаювання функціонує як незалежний бар'єр. Окреме герметичне спаювання щільного контакту складається із довгого ряду занурених у плазматичні мембрани клітин, що взаємодіють, клаудинів і оклюдинів, позаклітинні домени яких сполучаються між собою і замикають міжклітинний простір.

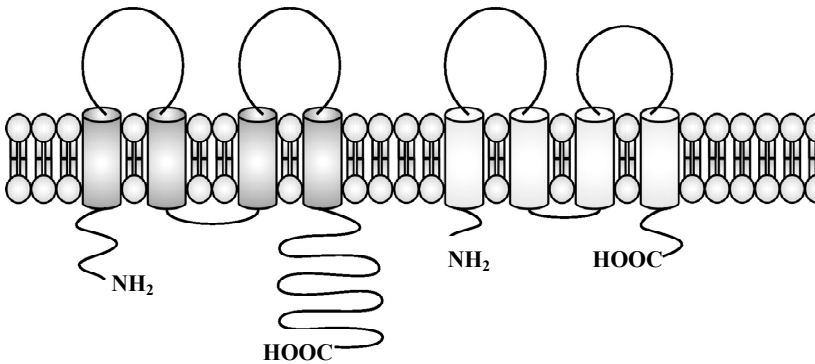
Клаудини необхідні для формування та функціонування щільних контактів різних типів. Наприклад, специфічний клаудин епітеліальних клітин нирок відповідає за резорбцію іонів Mg^{2+} із сечі у кров. Мутації гена, що кодує цей клаудин, спричиняють потужну втрату магнію із сечею. Оклюдини регулюють транспорт невеликих гідрофільних молекул.



А

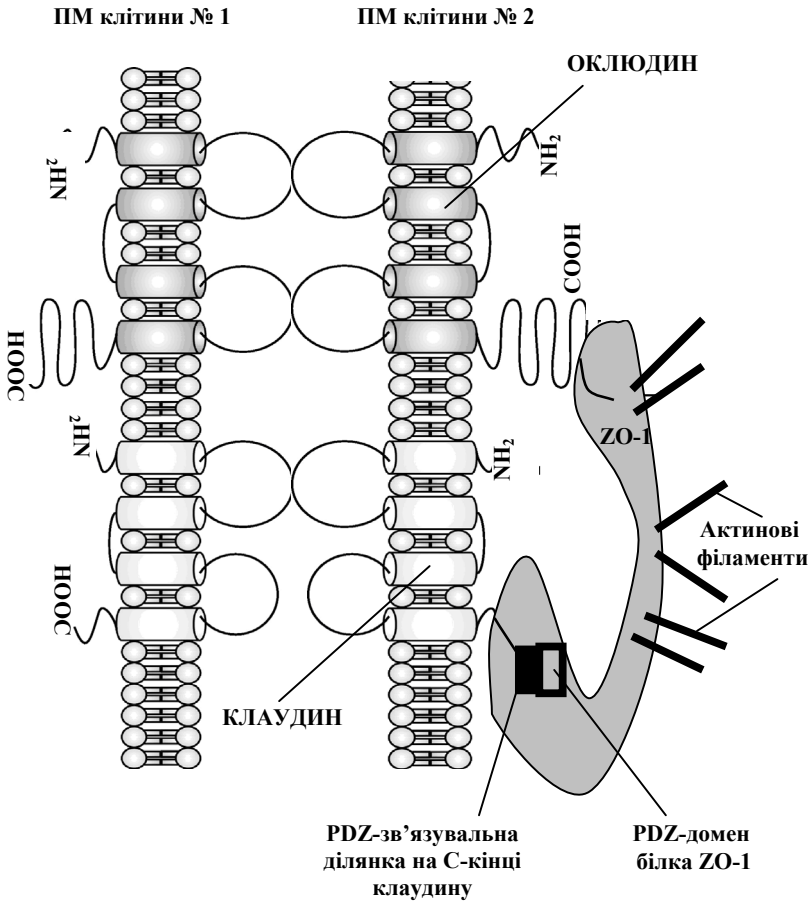
Оклюдин

Клаудин



Б

Рис. 1.62. Структура й особливості функціонування білків щільних контактів. Довгий ряд інтегральних білків однієї клітини сполучається з подібним довгим рядом інтегральних білків іншої клітини, формуючи "спаювання" (А); головні трансмембранні адгезивні білки щільних контактів – клаудини й оклюдини (Б)



В

Рис. 1.62. . Структура й особливості функціонування білків щільних контактів. Принципи взаємодії головних трансмембранних адгезивних білків із цитозольними якірними білками та елементами цитоскелета при формуванні щільного контакту (В)

Функції **1TMS-білків** з'ясовані недостатньо. Вони, зокрема, представлені:

- білками *JAM-A, -B, -C* і *-D* (*junctional adhesion molecules*, молекули контактної адгезії) та спорідненими з ними *CAR* (*coxsackie virus and adenovirus receptor*, рецептор вірусу Коксаки та аденовірусу), *CLMP* (*CAR-like membrane protein*, *CAR*-подібний мембранний білок) та *ESAM* (*endothelial-cell selective adhesion molecule*, молекула ендотеліально-клітинної селективної адгезії), що мають по два імуноглобуліноподібні домени, а в цитозольній ділянці – канонічну послідовність для сполучення із PDZ-доменвісними білками;

- білками *CRB3* (*Crumbs homologue 3*) та *Bves*.

Цитоплазматичні білки щільних контактів, що формують **цитоплазматичну контактну пластинку**, необхідні для прикріплення актинових філаментів, регуляції зчеплення клітин і стану парацелюлярної проникності, а також для передачі сигналів від позаклітинного матриксу всередину клітини. Серед них виділяють **якірні (адаптерні), каркасні та цитоскелетні білки**, а також **елементи сигнальних шляхів** (протеїнкінази, протеїнфосфатази). Найважливішими із **цитозольних якірних білків** є **ZO-білки** (від іншої назви щільних контактів – *zonula occludens*, зона злипання), які своїми специфічними доменами сполучаються з **клаудинами, оклюдинами та актиновим цитоскелетом** (рис. 1.62, В).

Наприклад, ZO-1 має кілька доменів, залучених у білок-білкові взаємодії, кожен із яких забезпечує контакт з іншими компонентами:

- **три PDZ-домени** (від *PSD95-DlgA-ZO-1* – назви білків, що містять ці домени), які зв'язують клаудини та інші ZO-білки (ZO-2 та ZO-3);

- **GUK-домен** (від *guanylate kinase homolog*, гомолог гуанілаткінази), що асоціює з оклюдинами,

- **SH3 домен**, котрий сполучається із сигнальними білками.

Крім клаудинів, оклюдинів та ZO-білків, зі щільними контактами асоціюють і інші білки. Деякі з них регулюють полярність епітеліальних клітин, інші допомагають доставляти компоненти до відповідних ділянок плазматичної мембрани

Білки **клаудини** були вперше відкриті в 1998 р. (М. Фурусе, Ш. Цукіта) і отримали свою назву від лат. *claudere* ("to close", *закривати*), що вказує на їхню участь у створенні парацелюлярного бар'єра, який контролює потік молекул та іонів між клітинами. Це родина трансмембранних білків (4-TMS) із М. м. 20–27 кД, N- та С-кінець яких розташований у цитозолі. У їхніх молекулах наявні дві позаклітинні петлі із 53 та 24 амінокислот відповідно, консервативні у клаудинів різних типів. N-кінець цих білків є дуже коротким (4–10 амінокислот), а С-кінець варіює (21–63 амінокислоти) і є необхідним для локалізації цих білків у щільних контактах. Усі клаудини (за винятком клаудину-12) у своєму складі містять домени, що дозволяють їм сполучатися із PDZ-доменами якірних ZO-білків (рис. 1.62, В).

Інтегральні білки **оклюдини** (65 кД, 522 амінокислоти) були вперше описані в 1993 (Ш. Цукіта). Подібно до клаудинів, вони належать до 4-TMS білків із цитозольними N- та С-кінцями і містять дві позаклітинні петлі, що залучаються у регуляцію парацелюлярної проникності й адгезію клітин. Ряд цитозольних білків у ділянці контактної пластинки (наприклад, ZO-1) можуть взаємодіяти з СООН кінцем оклюдину.

Порушення у структурі й функціях щільних контактів лежать в основі розвитку низки захворювань. Так, зниження експресії ZO-1 та ZO-2 характерне для багатьох типів раку. Деякі віруси використовують мембранні білки щільних контактів для проникнення у клітину, зокрема, клаудин-1 є рецептором для вірусу гепатиту С. Інші віруси приєднуються до білків щільних контактів, щоб зруйнувати бар'єр, що відділяє їх від справжніх рецепторів на базолатеральній поверхні епітеліальних клітин або на неепітеліальних клітинах. Щільні контакти можуть бути мішенню і для бактеріальних патогенів: зокрема, *Clostridium perfringens* – збудник газової гангренни – виділяє ентеротоксин, що діє на позаклітинні домени мембранних клаудинів та оклюдинів, і спричиняє "протікання" епітелію, а *Helicobacter pylori* (збудник гастриту) ви-

діляє у клітини білок CagA, що взаємодіє із комплексом {ZO-1-JAM-A} – це допомагає бактерії подолати захисний бар'єр шлункового епітелію.

1.5.2. Якірні контакти

Якірні контакти приєднують цитоскелет клітини або до цитоскелета іншої клітини (*адгезивні контакти, десмосоми*), або до компонентів позаклітинного матриксу (*фокальні адгезії, гемідесмосоми*). Усі вони мають спільний принцип формування, а саме: характеризуються наявністю **трансмембранних адгезивних білків**, які, залучаючи **цитозольні якірні білки**, сполучають **елементи цитоскелета (філаменти)** із компонентами сусідніх клітин або елементами позаклітинного матриксу (рис. 1.63). При цьому адгезивні контакти і фокальні адгезії є сайтами для закорювання актинових, а десмосоми і гемідесмосоми – проміжних філаментів.

Якірні контакти, подібно до замикальних, побудовані із залученням двох основних класів білків:

- **трансмембранні адгезивні білки**, цитозольний хвіст яких сполучається з одним або кількома внутрішньоклітинними якірними білками, а позаклітинний домен взаємодіє або з компонентами позаклітинного матриксу, або з позаклітинними доменами трансмембранних адгезивних білків іншої клітини. Головними адгезивними білками адгезивних контактів й десмосом є представники родини *кадгеринів*, фокальні адгезії й гемідесмосоми формуються протеїнами родини *інтегринів*.

- **внутрішньоклітинні якірні білки**, що формують **контактні пластинки** біля цитозольної поверхні ПМ і приєднують контактний комплекс або до актинових філаментів (*адгезивні контакти, фокальні адгезії*), або до проміжних філаментів (*десмосоми, гемідесмосоми*).

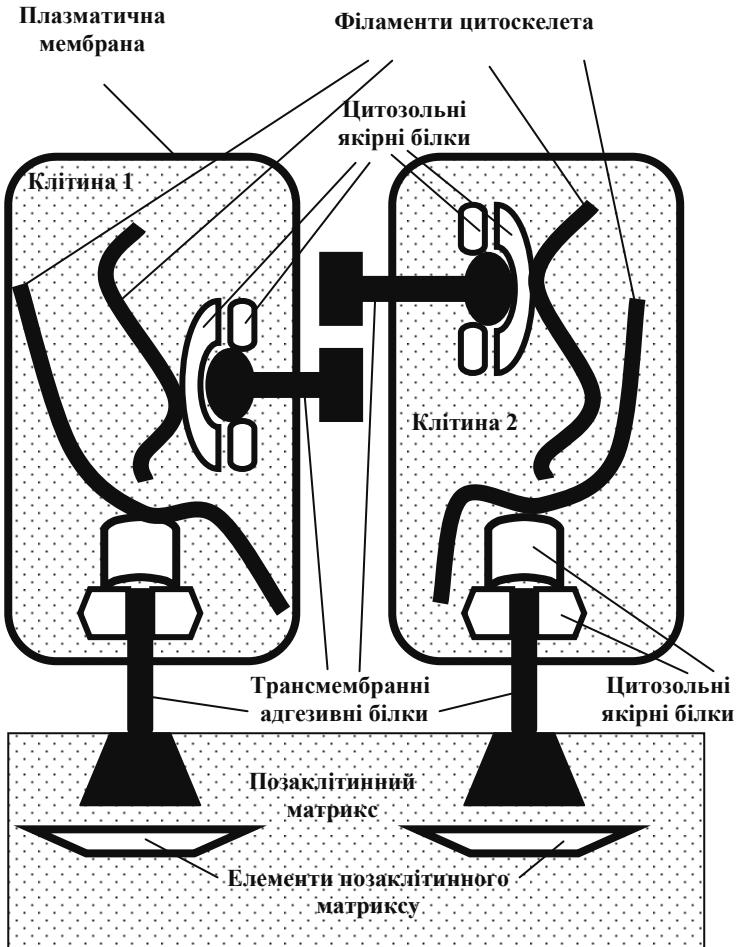


Рис. 1.63. Загальний принцип формування якірних контактів

Окрім адгезивних і якірних білків, якірні контакти містять внутрішньоклітинні сигнальні білки. Порівняльну характеристику різних типів якірних контактів наведено в табл. 1.18

Таблиця 1.18. Порівняльна характеристика якірних контактів

Тип контакту	Транс-мембранний адгезивний білок	Позаклітинний ліганд	Компонент цитоскелета клітини	Внутрішньо-клітинні якірні білки
Клітина-клітина				
Адгезивні контакти	Кадгерин	Кадгерин сусідньої клітини	Актинові філаменти	α - і β -катеніни, плакоглобін (γ -катенін), вінкулін, α -актинін,
Десмосоми	Кадгерин (десмоглеїн, десмоколін)	Десмоглеїни й десмоколіни сусідньої клітини	Проміжні філаменти	Плакоглобін (γ -катенін), десмоплакін, десмофілін
Клітина-матрикс				
Фокальні адгезії	Інтегрин	Білки позаклітинного матриксу (фібронектин)	Актинові філаменти	Талін, вінкулін, α -актинін, філамін
Гемідесмосоми	Інтегрин $\alpha\beta\gamma$, VP180 (тип 17 колаген)	Білки позаклітинного матриксу	Проміжні філаменти	Плектин, VP230 (дистонін)

1.5.2.1. Адгезивні контакти

Адгезивні контакти (*adherens junctions*, *зона адгезії*, *zonula adherens*) утримують разом латеральні ділянки ПМ клітин, що взаємодіють, за допомогою *трансмембранних адгезивних білків кадгеринів* (рис. 1.64).

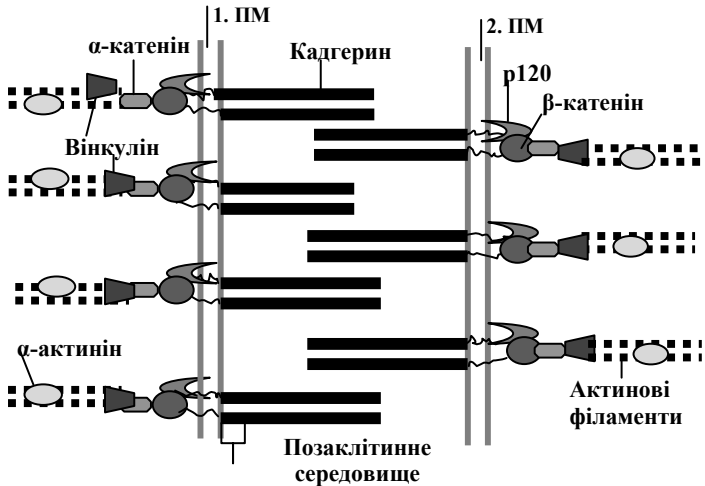


Рис. 1.64. Принцип будови адгезивного контакту.

Контакт клітина-клітина (як адгезивні контакти, так і десмосоми) опосередковується білками кадгеринами; кадгерини однієї клітини взаємодіють із кадгеринами іншої. У випадку адгезивних контактів актинові філаменти через якорні білки сполучаються із трансмембранними кадгеринами

Вони підтримують фізичну цілісність епітелію, формуючи між його клітинами тривалу "зону адгезії" (*zonula adherens*), що розташована нижче щільних контактів і має вигляд адгезивного поясу між епітеліальними клітинами. Більше того, утворення щільних контактів обов'язково потребує попереднього формування адгезивних контактів: антикадгеринові антитіла, що блокують утворення адгезивних контактів, також блокують і формування щільних контактів.

У ПМ кожної із клітин, що взаємодіють, кадгерини формують гомодимери. Позаклітинний домен одного димеру кадгерину сполучається із позаклітинним доменом ідентичного кадгеринового домену на сусідній клітині. Внутрішньоклітинні хвости кадгеринів сполучаються із **цитозольними якорними білками**, які прикріплюють їх до актинових філаментів. Цими якорними білками можуть бути: **α-катенін**, **β-катенін**, **γ-катенін** (інша назва – **плакоглобін**), **α-актинін**, **вінкулін**. Отже, кадгерини залучаються у з'єднання актинових філаментів однієї клітини із актиновими філаментами іншої (рис. 1.65).

Кадгерини (від "*calcium-dependent adhesion*", кальціезалежна адгезія) – це трансмембранні білки (720–750 амінокислотних залишків), залучені у клітинну адгезію. У людини виявлено понад 80 типів кадгеринів (табл. 1.19).

Таблиця 1.19. Деякі представники суперродини кадгеринів

Назва	Локалізація	Асоціація із міжклітинними контактами	Наслідки нокауту відповідного гена в миші
<i>Класичні кадгерини</i>			
Е-кадгерин	Епітелій багатьох типів	Адгезивні контакти	Загибель на стадії бластоцисти
Н-кадгерин	Нейрони, серцевий і скелетний м'язи, кришталік ока, фібробласти	Адгезивні контакти, хімічні синапси	Ембріони гинуть від дефектів у серцевому м'язі
Р-кадгерин	Плацента, епідерміс, епітелій молочної залози	Адгезивні контакти	Аномалії розвитку молочних залоз
VE-кадгерин	Ендотеліальні клітини	Адгезивні контакти	Аномалії в розвитку судин (апоптоз ендотеліальних клітин)
<i>Некласичні кадгерини</i>			
Десмоколін	Шкіра	Десмосоми	Пухирчатка шкіри внаслідок порушення контактів між кератиноцитами
Десмоглеїн	Шкіра	Десмосоми	Пухирчатка шкіри внаслідок порушення контактів між кератиноцитами
Т-кадгерин	Нейрони, серцевий і скелетний м'язи	Не залучений у формування міжклітинних контактів	?
Кадгерин-23	Внутрішнє вухо	Чутливий елемент вестибулярного апарату	Глухота
α-, β-, γ-протокадгерини	Нейрони	Хімічні синапси й несинаптичні мембрани	Дегенерація нейронів

Так, суперродина кадгеринів включає:

- класичні кадгерини,
- протокадгерини,
- десмоглеїни,
- десмоколіни,
- інші

Їхні молекули характеризуються наявністю невеликого цитозольного хвоста, трансмембранної та позаклітинної ділянки. У складі останньої містяться кадгеринові повтори, представлені кальційзв'язувальними доменами. Отже, кадгерини опосередковують Ca^{2+} -залежну взаємодію клітин.

1.5.2.2. Десмосоми (пластинки прикріплення)

Міжклітинних взаємодій цього типу найбільше у тканинах шкіри, серцевого та скелетного м'язів. Цей контакт характеризується **щільною цитозольною пластинкою**, сформованою комплексом **внутрішньоклітинних якірних білків** (плакофіліну, плакоглобіну й десмоплакіну), що відповідають за приєднання елементів цитоскелета, а саме *кератинових проміжних філаментів цитоскелета*, до трансмембранних адгезивних білків. **Трансмембранні адгезивні білки** (десмоглеїн і десмоколін), як і трансмембранні якірні білки адгезивних контактів, *належать до родини кадгеринів*; взаємодіючи своїми позаклітинними доменами, вони у кальцієзалежний спосіб утримують сусідні ПМ разом (рис. 1.65).

Існує захворювання шкіри – **пемфігус** – за якого у хворих виробляються антитіла проти одного з десмосомальних кадгеринів (антитіла до десмоглеїну-1 – *Pemphigus foliaceus*; до десмоглеїну-3 – *Pemphigus vulgaris*); це веде до руйнування десмосом, які сполучають епітеліальні клітини шкіри (кератиноцити) і появи пухирців унаслідок виходу тканинних рідин у розпушений епітелій. Це стосується тільки шкіри – отже, десмосоми різних тканин мають біохімічні відміни.

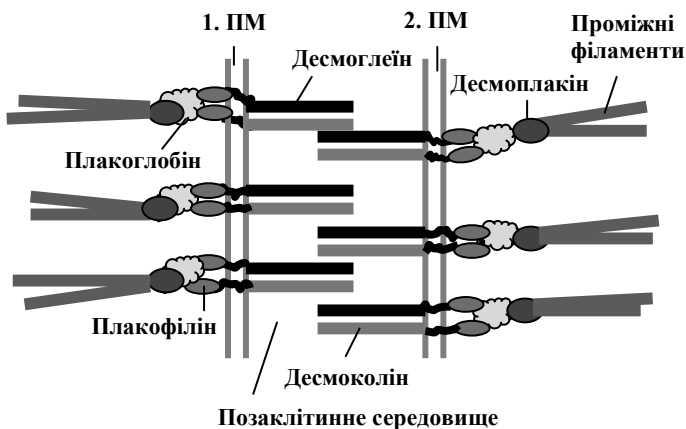


Рис. 1.65. Десмоглеїн та десмоколін – представники адгезивних білків родини кадгеринів.

Їхні цитозольні хвости приєднуються до внутрішньоклітинного якірного білка плакофіліну, який, взаємодіє із плакоглобіном (γ -катеніном), який, у свою чергу, асоціює з десмоплакіном. Десмоплакін сполучається з ділянками проміжних філаментів, приєднуючи десмосому до цих філаментів

1.5.2.3. Фокальні адгезії

Фокальні адгезії та гемідесмосоми – види якірних контактів, утворених **трансмембранними адгезивними білками інтегринами** – великою родиною білків, що відрізняються від кадгеринів і *сполучають філаменти цитоскелета всередині клітини із компонентами позаклітинного матриксу*. Також інтегрини є рецепторами, що залучаються у внутрішньоклітинну трансдукцію, передаючи сигнали від позаклітинного матриксу всередину клітини.

Інтегрини функціонують у вигляді гетеродимерів (містять α - і β -субодиниці з М.м. 90–160 кД); у ссавців виявлено 18 типів α - і 8 типів β -субодиниць. Залежно від суб-

одиночного складу існує багато типів цих білків, причому на поверхні клітини можуть розташовуватися інтегрини різних типів.

α -, β -Субодиниці можуть зв'язувати кілька бівалентних катіонів. Якщо їхня роль у функціях α -субодиниці невідома, то взаємодія катіонів із β -субодиницею необхідна для вірної координації як мінімум деяких лігандів, котрі сполучаються із інтегринами.

Субодиниці інтегринів є трансмембранними, із короткими цитозольними доменами (40–70 амінокислот). Винятком є субодиниця β -4 (1088 амінокислот – один із найдовших цитозольних доменів у складі трансмембранних білків). Позаклітинні домени α - і β -субодиниць є паралельними; на N-кінці кожного з них міститься лігандзв'язувальна ділянка для приєднання лігандів – молекул позаклітинного матриксу. *Лігандами інтегринів є білки позаклітинного матриксу – фібронектин, вітронектин, колаген, ламінін.* Тип ліганду в позаклітинному матриксі, який буде зв'язувати інтегрин, залежить від типу α - і β -субодиниць, із яких побудований інтегрин.

Фокальні адгезії відповідають за сполучення клітин з елементами позаклітинного матриксу через інтегрини, що взаємодіють *із внутрішньоклітинними актиновими філамен-тами*. При цьому позаклітинні домени інтегринів (зокрема, інтегрину α 5 β 1) сполучаються з білковими компонентами позаклітинного матриксу (наприклад, фібронектином, вітронектином, колагеном, ламініном), а внутрішньоклітинний хвіст цих трансмембранних адгезивних білків контактує з актиновими філамен-тами через *внутрішньоклітинні якірні білки*, що утворюють *щільну пластинку* (талін, тензин, вінкулін, α -актинін тощо) (рис. 1.66).

Установлено, що цей тип міжклітинних взаємодій зустрічається у різних типах клітин, причому для його формування в позаклітинному матриксі обов'язково має бути присутній білок фібронектин.

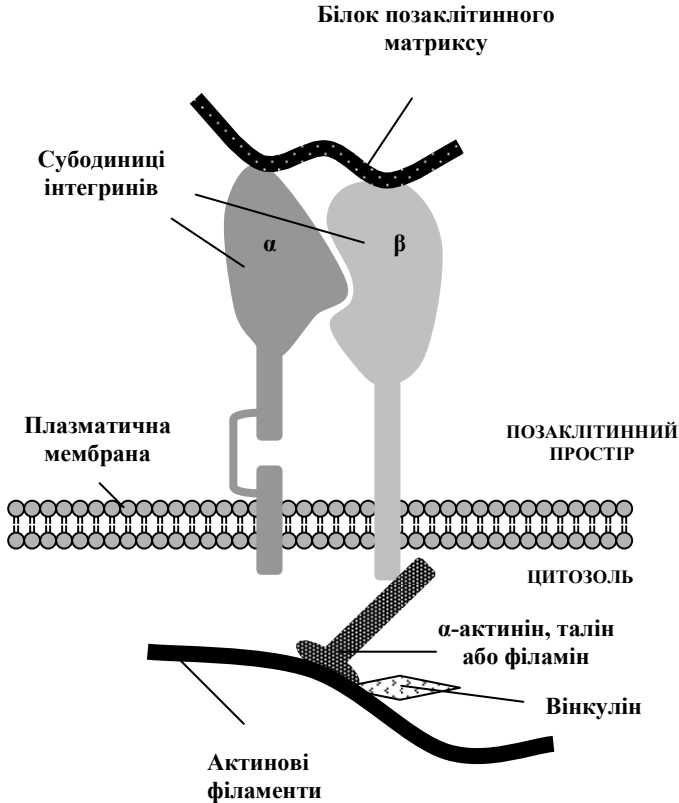


Рис. 1.66. Деякі з білків, що утворюють фокальні адгезії: трансмембранні адгезивні білки представлені гетеродимерами інтегринів, що складаються з α - і β -субодиниць; їхні позаклітинні домени сполучаються з білками позаклітинного матриксу, а цитозольний хвіст β -субодиниці приєднується до актинових філаментів через внутрішньоклітинні якорні білки

1.5.2.4. Гемідесмосоми

Гемідесмосоми, або "половинні" десмосоми – структури, що нагадують десмосоми морфологічно, а також тим, що здійснюють **заякорювання проміжних філаментів**. Проте, на відміну від десмосом, ці контакти не сполучають сусідні клітини, а **приєднують епітеліальні клітини до базальної мембрани** – специфічного виду позаклітинного матриксу.

Трансмембранними адгезивними білками гемідесмосом є інтегрин $\alpha\beta 4$ та колаген XVII типу. Позаклітинні домени субодиниць **інтегрину $\alpha\beta 4$** сполучаються із білками базальної мембрани, а їхні внутрішньоклітинні домени через **цитозольний якірний білок (плектин)** приєднуються до **кератинових проміжних філаментів**. **Колаген XVII** (інша назва – **білок BP180**) є трансмембранним гомотримером із трьох α -субодиниць. Кожна субодиниця (180 кД) має:

- глобулярний внутрішньоклітинний домен (М. м. 70 кД), що взаємодіє з $\beta 4$ -субодиницею інтегрину та з цитозольними якірними білками – **плектином** і **BP230**. Цей домен необхідний для приєднання гемідесмосом до кератинових проміжних філаментів;
- довгий позаклітинний С-кінець (М. м. 120 кД), який відповідає за сполучення з $\alpha 6$ -субодиницею інтегрину (амінокислоти 506–519) та інтегрування колагену XVII у гемідесмосоми. С-кінець колагену XVII також сполучає **білок базальної мембрани – ламінін 5**.

Подібно до аутоімунного захворювання пемфігус, що супроводжується порушенням структури десмосом, виявлено стан, за якого ушкоджується цілісність гемідесмосом – цей розлад, який отримав назву **пемфігоїд бульозний (Bullous pemphigoid)**, спричинений появою аутоантитіл до колагену XVII типу.

1.5.3. Комунікаційні контакти

Цей тип міжклітинних взаємодій, що візуально виглядає як щілина розміром 2–4 нм між мембранами сусідніх клітин, представлений **щілинними контактами (gap junction)** у тва-

рин та **плазмодесмами** у рослинних організмах. У випадку щільних контактів молекулярними складовими такої щілини є каналоформувальні білки **конексини**, що утворюють канали – **конексони** – із максимальним розміром функціональної пори 1,5 нм. Наявність такого каналу дозволяє малим молекулам безпосередньо переходити із цитозолу однієї клітини в цитозоль іншої. Зокрема, через конексони вільно транспортуються неорганічні іони, водорозчинні молекули розмірами до 1000–1500 Да (цукри, амінокислоти, нуклеотиди, вітаміни, внутрішньоклітинні медіатори – цАМФ, інозитол-1,4,5-трифосфат), тоді як макромолекули (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди) не переносяться.

Конексини – це родина структуроподібних трансмембранних білків, що утворюють щільні контакти хребетних (у безхребетних гомологічні білки мають назву **інексини**). Конексини – це 4TMS-білки з цитозольними C- і N-кінцями, із цитозольною петлею (*cytoplasmic loop, CL*) та двома позаклітинними петлями (*extracellular loops, EL-1 і EL-2*). У геномі людини є гени (їх виявлено 21), що кодують різні типи конексинів з М. м. 26–60 кД (близько 380 амінокислот), які різняться тканинною специфічністю (при цьому більшість клітин експресує понад один тип конексинів).

Шість молекул конексинів формують **конексон (хеміканал)** (рис. 1.67). У випадку використання конексинів одного типу утворюється **гомомерний конексон**; якщо ж хеміканал побудований із конексинів різних типів, кажуть про **гетеромерний конексон**. Гомомерні й гетеромерні конексони мають різні властивості.

Два конексони сусідніх клітин надалі формують **канал щільного контакту**, що сполучає цитоплазми обох клітин – **гомотиповий** (містить гомомерні конексони) або **гетеротиповий** (складається із гетеромерних конексонів). Гомотипові та гетеротипові канали щільних контактів теж мають різні властивості (проникність пори, селективність у розмірах, селективність зарядів, залежність від потенціалу, залежність від лігандів). Кількість таких каналів у щільному контакті різна, залежно від типу клітин – від кількох одиниць до сотень.

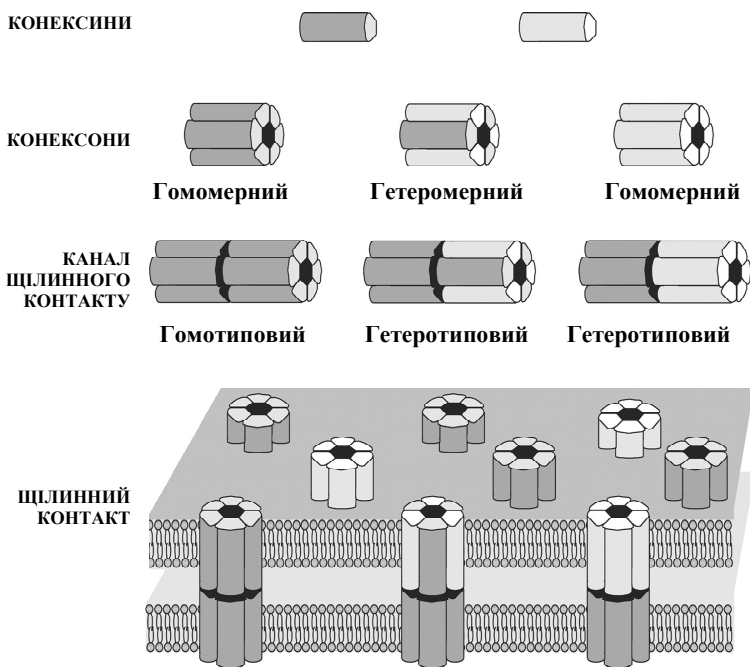


Рис. 1.67. Принцип формування щілинного контакту

Формування із конексонів каналів щілинних контактів регулюється наявними в мембрані адгезивними контактами. Так, після вбудовування у ПМ конексони вільно дифундують у межах фосфоліпідного бішару. Лише після зустрічі зі специфічними білками, головним чином кадгеринами – компонентами адгезивних контактів, конексони іммобілізуються і приєднуються до конексонів сусідньої клітини із формуванням щілинного контакту.

За фізіологічних умов канали щілинних контактів можуть бути як закритими, так і відкритими (в останньому випадку вони мають низьку провідність). За дії певних факторів канали можуть підлягати оборотним конформаційним змінам, які закривають (відкривають) пору у відповідь на зміни у клітині. Факторами, що можуть спричинити відкриття щілинних контактів та (або) збільшити їхню проникність, є:

- *вміст кальцію* (комплекс $\{Ca^{2+}/KM\}$);
- *pH* (регуляторні ділянки, що відповідають на зміну pH, виявлені у внутрішньоклітинній петлі та на С-кінці конексинів);
- *зміна мембранного потенціалу* (спричиняє конформаційні перебудови);
- *білок-білкові взаємодії*;
- *посттрансляційні модифікації*: фосфорилування (впливає на транслокацію, деградацію конексинів, змінює їхню проникність), глікозилювання, гідроксилювання, убіквітинування, S-нітрозилювання, окиснення.

Щілинні контакти також регулюються позаклітинними сигналами, які спричиняють зміну експресії генів конексинів, впливають на внутрішньоклітинні рівні кальцію, фосфорилування/дефосфорилування їхніх молекул тощо.

За патологічних умов проникність каналів щілинних контактів може зростати й (або) може збільшуватися їхня кількість на ПМ (за рахунок активації певних транскрипційних факторів); у інших випадках канали, навпаки, повністю закриваються. Так, проникність щілинних контактів швидко (у межах секунд) і оборотно знижується при зниженні цитозольного pH або зростанні внутрішньоклітинного вмісту кальцію до високих рівнів. Наприклад, при порушенні цілісності клітини вміст Ca^{2+} усередині клітини зростає (до 10^{-4} моль/л і більше), що викликає миттєве закриття пори та ізоляцію клітини. Це запобігає поширенню пошкодження по тканині – адже якщо зруйнована клітина залишиться сполученою із сусідніми клітинами, це буде негативно впливати на останні.

Окрім *сприяння обміну малими метаболітами та іонами між сусідніми клітинами* (механізм координування активностей індивідуальних клітин у незбудливих клітинах та запобігання випадковим коливанням концентрацій малих молекул у клітині), щілинні контакти мають і інші функції. Зокрема, вони залучаються у *регуляцію ембріогенезу, є основою для формування електричних синапсів між нейронами та їхнім клітинами-мішенями в нервовій системі, а в серцевому м'язі – координують деполяризацію кардіоміоцитів.*

Мутації конексинів спричиняють аномалії в розвитку та функціонуванні нервової та м'язової систем. Наприклад, мутації в гені конексину-26 (назви конексинів зумовлені величиною їхньої молекулярної маси у кілодальтонах (кД)) є найчастішою причиною **вродженої глухоти людини**, а мутації в гені конексину-32 лежать в основі спадкового захворювання – **хвороби Шарко – Марі – Тута** (*Charco – Marie – Tooth disease*, інша назва – *спадкова невральна аміотрофія*), що супроводжується прогресуючою дегенерацією периферійних нервів і проявляється наростаючою слабкістю м'язів, особливо рук та ніг.

У епітелії хребетних на латеральній ділянці ПМ міжклітинні контакти різних типів розташовані у певній послідовності:

- щільні контакти – найбільш апікально;
- під ними – адгезивні контакти;
- під ними – десмосоми.

Разом вони формують *контактний комплекс* (рис. 1.68). Щілинні контакти, фокальні адгезії та гемідесмосоми є менш організованими.

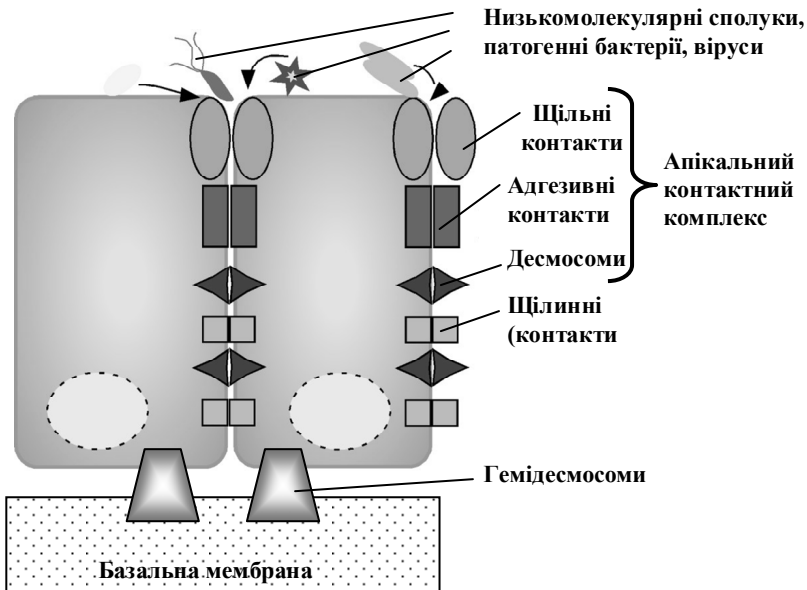


Рис. 1.68. Структура "контактного комплексу" між латеральними мембранами сусідніх епітеліальних клітин

Розділ 2

МЕХАНІЗМИ СПРИЙНЯТТЯ СИГНАЛУ ТА ЙОГО ПЕРЕДАЧІ ВСЕРЕДИНУ КЛІТИНИ: ОСНОВНІ СИГНАЛЬНІ КАСКАДИ

Сигнали від численних гідрофільних біологічних молекул (білково-пептидні гормони, біологічно активні регуляторні молекули тощо, які називають *первинними месенджерами*), що не здатні проходити крізь 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 конформації 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 (останній передає сигнали від інтерферону, підрозд. 11.3).

2.1. Аденілатциклезний каскад

У ролі вторинного посередника в аденілатциклезному каскаді виступає *циклічний аденозинмонофосфат* (цАМФ, рис. 2.1):

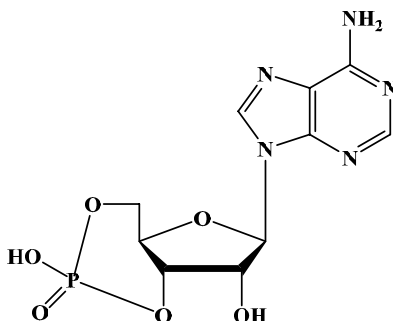


Рис. 2.1. Структурна формула циклічного аденозинмонофосфату

До аденілатциклезного комплексу входять:

- білок-рецептор;
- G-білок (G_s або G_i);
- каталітична субодиниця аденілатциклази – ферменту, що здійснює реакцію, у якій утворюється цАМФ:



- 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:

- **іонотронні рецептори**, при зв'язуванні ліганду з якими в молекулі рецептора відкривається іонний канал (рецептори до глутамату, гліцину, γ -аміномасляної кислоти);

- **метаботронні 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 тирозинава протеїнкіназа, рецепторна тирозинава 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 (розд. 3).

Рецептори, залучені в ініціацію передачі інформації аденілатциклазним каскадом, не мають ферментативної активності і належать до *метаботронних 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 α -helices*)-рецепторів.

Залежно від того, з яким G-білком сполучений рецептор (G_s або G_i), в аденілатциклазному каскаді виділяють два типи рецепторних молекул – ті, що передають активуючий сигнал (R_s) та інгібуючі рецептори (R_i). Гормон із рецептором зв'язується за рахунок нековалентних зв'язків: гідрофобних, вандервальсових, іонних (табл. 2.1).

Таблиця 2.1. Способи зв'язування лігандів з рецепторами

Тип ліганду	Спосіб активації рецептора
Низькомолекулярні ліганди – аміни, нуклеотиди, ейкозаноїди тощо (наприклад, адреналін, ацетилхолін)	Сполучення з ділянкою всередині гідрофобного ядра рецептора
Пептидні гормони	Приєднання до зовнішньоклітинної поверхні рецептора
Глікопротеїнові гормони	
Іони кальцію, глутамат, ГАМК	Сполучення із довгими ділянками на N-кінці молекули рецептора, унаслідок чого рецептор набуває нової конформації
Рецептори, що активуються протеїназами	Активація за участю "відрізаючої" протеїнази – новий N-кінець при цьому діє як автоліганд; пептид, що відрізається, при цьому також може взаємодіяти з іншими рецепторами

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 – G_s і G_i , які, відповідно, стимулюють й інгібують аденілатциклазу; G_q , що активує фосфоліпазу C; G-білки сенсорних клітин: фоторецепторних – G_t (трансдуцин), нюхових – G_{olf} і смакових – G_g (табл. 2.2).

Таблиця 2.2. Найважливіші G-білки та їхні ефектори

G-білок	Локалізація	Стимул	Ефектор	Ефект
G _s	Печінка	Адреналін, глюкагон	Аденілатциклаза	Розпад глікогену
G _s	Жирова тканина	" _ "	" _ "	Розпад жиру
G _s	Нирки	АДГ	" _ "	Збереження води нирками
G _s	Фолікули яєчника	Лютеїнізуючий гормон	" _ "	Зростання синтезу естрогену та прогестерону
G _i	Серцевий м'яз	Ацетилхолін	K ⁺ -канали	Зниження частоти й сили серцевих скорочень
G _q	Гладенькі м'язи кровоносних судин	Ангіотензин	Фосфоліпаза С	Скорочення м'язів, зростання тиску крові
G _t (трансдуцин)	Палички і колбочки сітківки	Світло	цГМФ-специфічна фосфодіестераза	Детекція світла

Отже, з аденілатциклазою взаємодіють G-білки двох видів: G_s (активатор аденілатциклази) та G_i (інгібітор аденілатциклази). Обидва білки є гетеротримерами, тобто мають α -, β -, γ -субодиниці (45–47 кД; 35 кД та 7–9 кД відповідно, рис. 2.2) і відрізняються будовою α -субодиниці (α_s та α_i).

α -Субодиниці мають центри зв'язування ГТФ і ГДФ та здатні гідролізувати зв'язаний ГТФ до ГДФ і неорганічного фосфату (P_n), тобто володіють ГТФазною активністю. β -, γ -суб-

одиниці забезпечують локалізацію, ефективне зв'язування й деактивацію α -субодиниць, регулюють спорідненість рецепторів до їхніх лігандів, знижують здатність ГДФ до дисоціації від α -субодиниці, стабілізуючи інактивованій стан. Зокрема, γ -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 α -субодиницею ГДФ і не взаємодіє з аденілатциклазою. Приєднання гормону викликає конформаційні зміни рецептора і G-білка. При цьому α -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 $_s$).

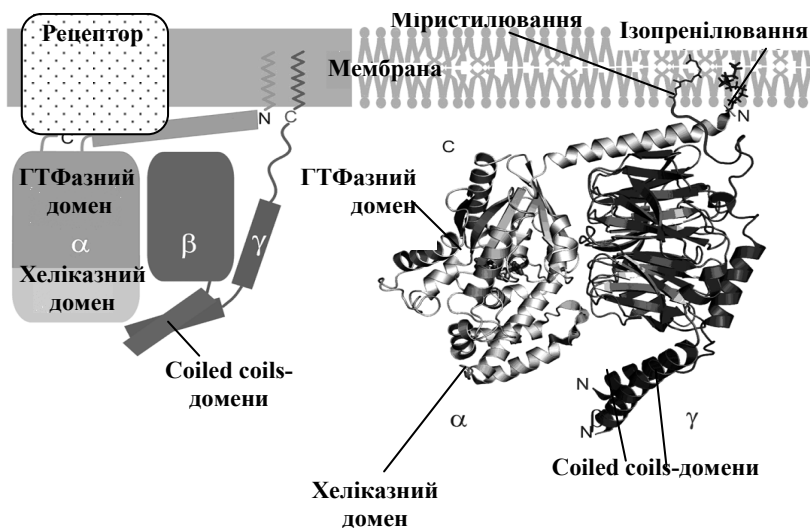


Рис. 2.2. Тривимірна структура тримеру G-білка

Одночасно стимулюється ГТФазна активність G-білка, і після переходу ГТФ у ГДФ фермент деактивується. За дії на клітини-мішені соматостатину, ангіотензину II, нейрогормонів енкефалінів і ендорфінів, а також при зв'язуванні катехоламінів з

α_2 -адренорецепторами сигнал від рецептора передається на G_i -білок, що зумовлює гальмування активності аденілатциклази, зниження рівня цАМФ у клітині та активності відповідних протеїназ. При зв'язуванні з β -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 α -субодиниці G_s -білка (рис. 2.3) пригнічує її ГТФазну активність і переводить G -білок у постійно активний стан, що сприяє постійній активації аденілатциклази та втраті чутливості до гормональних сигналів.

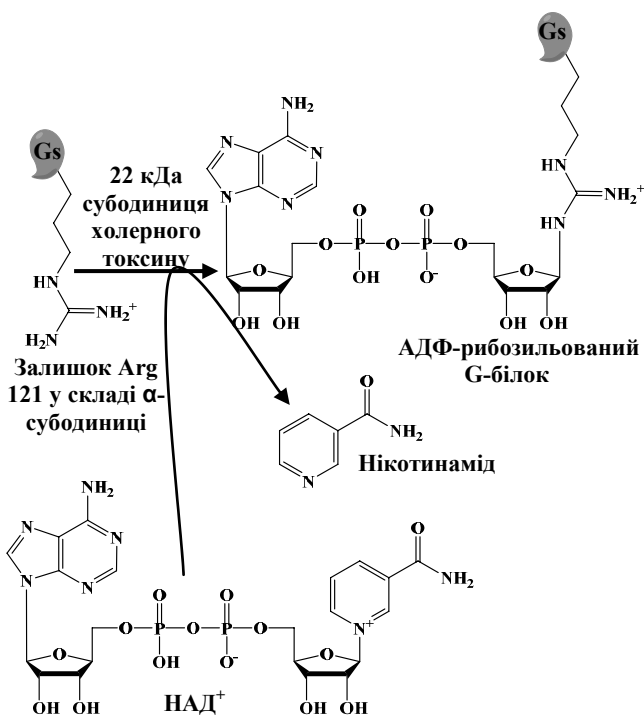


Рис. 2.3. Реакція АДФ-рибозилування α -субодиниці G_s -білка за дії холерного токсину

Екзотоксин коклюшу рибозилує α -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 α -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 *I-TMS-рецепторів* (*1 transmembrane α -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. Функції білків даних підродин наведено в табл. 2.3.

Таблиця 2.3. Функції найважливіших малих G- білків

Малі G- білки (приклади)	Функції
Ras	Залучення у сигнальні каскади від ростових факторів
Rab	Регуляція везикулярного транспорту та злиття везикул із мембранами
Arf	Регуляція формування везикул
Ran	Регуляція транспорту білків у та із клітин
Rho	Регуляція функцій актинового цитоскелета

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 (c-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 (підпідрозд. 3.1.3.2).

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 α -субодиницею ГДФ на ГТФ, після чого тример дисоціює. Такий обмін полегшується білком GEF, специфічним до Gs. У свою чергу, ГТФазна активність, притаманна α -субодиниці, відносно повільно гідролізує зв'язаний ГТФ до ГДФ – у підвищення інтенсивності такого гідролізу може залучатися специфічний до Gs білок GAP.

Порівняльні характеристики тримерних та малих ГТФ-зв'язувальних білків наведено в табл. 2.4.

Таблиця. 2.4. Порівняльні характеристики тримерних і малих ГТФ-зв'язувальних білків

	Тримерні G-білки	Малі G-білки
М.м.	30–35 кД	20–25 кД
Структура	Гетеротример (α -, β -, γ -субодиниці)	Мономер (подібний до α -субодиниці)
Рецептори, залучені в активацію	Метаботропні	Рецепторні тирозинові протеїнкінази
Рівень ГТФазної активності	Середня	Низька (підвищується внаслідок взаємодії з білками GAPs)

Аденілатциклаза здійснює реакцію, у якій утворюється цАМФ (рис. 2.4) і є інтегральним білком ПМ, чутливим до змін температури й ліпідного оточення.

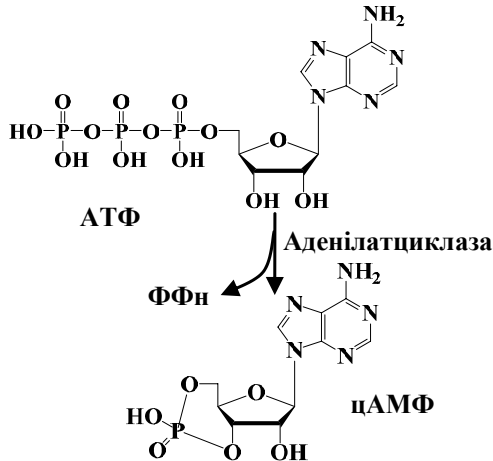


Рис. 2.4. Схема аденілатциклазної реакції



Ерл Сазерленд

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 нагріванню сполуки. Пізніше, у 1971 р., за значний вклад у розвиток моделі аденілатциклязного каскаду цьому досліднику було присуджено Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини.

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) – М1 і М2 (рис. 2.5, А). Так утворюється структура, подібна до каналу, але яка не проявляє жодної каналної активності. Інші домени, присутні в молекулі – С1а, С1б, С2а, С2б. С1а і С2б – разом складають каталітичну субодиницю і утворюють місця для зв'язування АТФ і α -субодиниці G-білка (рис 2.5, Б). Зокрема, Lys-923 й Asp-1000 із С2-домену взаємодіють із N1 й N6 аденінового кільця АТФ, а Gln-417 із С1-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).

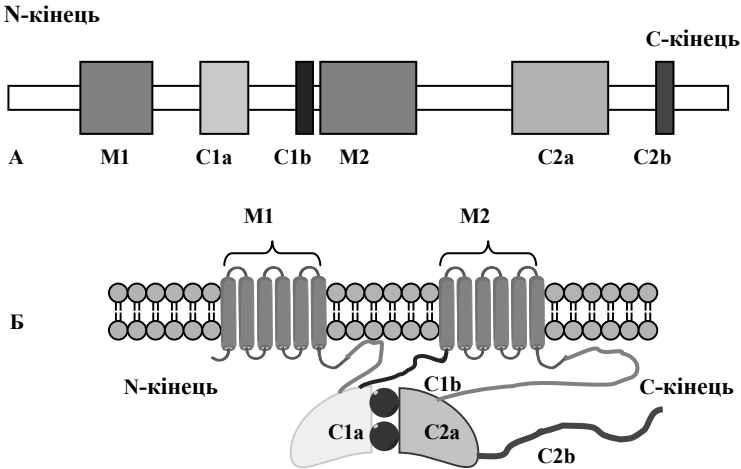


Рис. 2.5. Доменна будова аденілатциклази (А) і схема розташування її молекули у ПМ (Б)

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 $\{C2R2\}$ є неактивним (рис. 2.6).

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 білках-мішенях, 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.

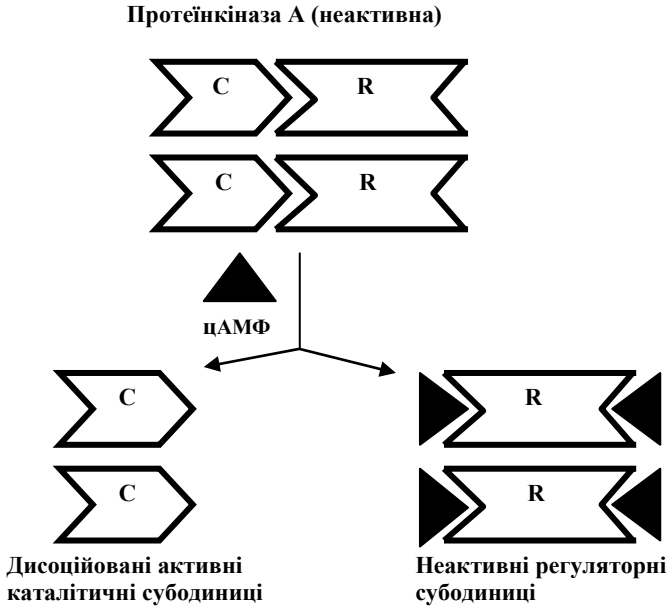


Рис. 2.6. Схема активації протеїнкінази А

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 фосфори-

лази каталізує перехід неактивної фосфорилази *b* в активну форму – фосфорилазу *a*, яка залучається у розщеплення глікогену). Фосфорилуванню також підлягають гістони, протаміни, глікогенсинтаза тощо (табл. 2.5).

Таблиця 2.5. Приклади ферментів, що регулюються ПкА

Фермент	Роль у метаболічних шляхах
Глікогенсинтаза	Синтез глікогену
Кіназа фосфорилази	Розпад глікогену
Піруваткіназа	Гліколіз
Піруватдегідрогеназа	Перетворення пірувату до ацетил-КоА
Гормоночутлива ліпаза	Розпад триацилгліцеролів
Тирозингідроксилаза	Синтез ДОФА, дофаміну, адреналіну
Гістон H1	Утворення нуклеосом
Гістон H2B	Утворення нуклеосом
Інгібітор протеїнфосфатази 1	Регуляція дефосфорилування білків

У таких каскадних реакціях початковий сигнал зазнає багатократного підсилення. Загальну схему аденілатциклазного каскаду наведено на рис. 2.7.

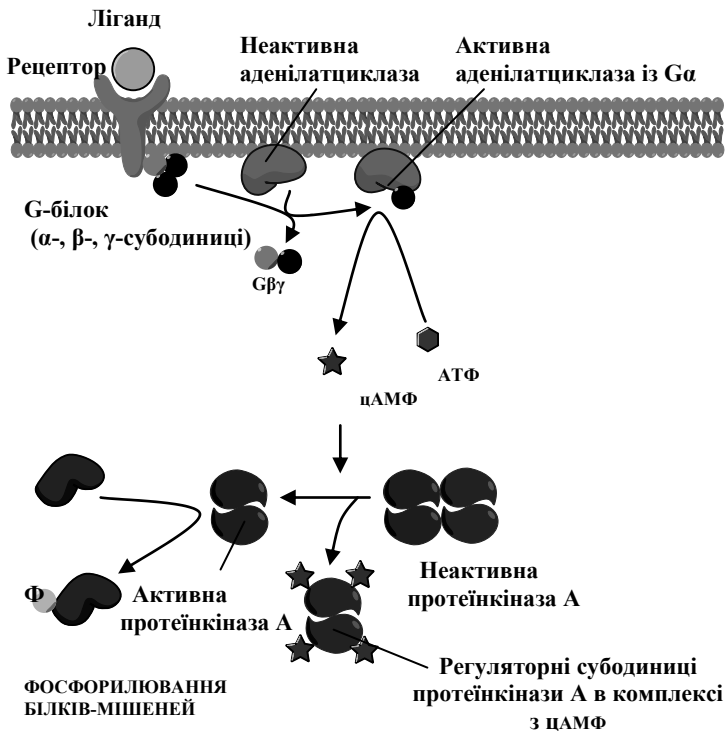


Рис. 2.7. Загальна схема аденілатциклазного каскаду

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 підроддини Ras-білків. Останні, діючи через протеїнкінази, що активуються мітогенами (підпідрозд. 3.1.3.2), 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 (рис. 2.8):

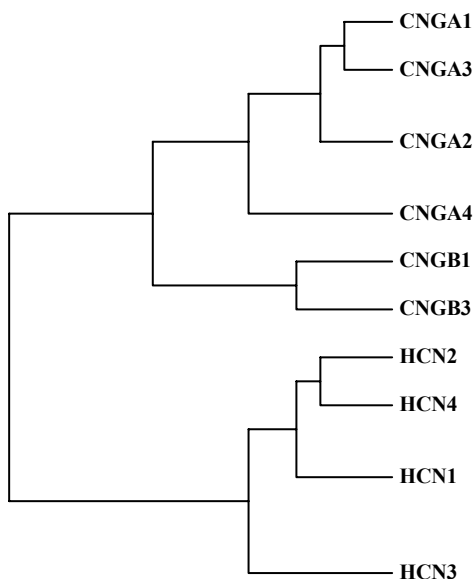


Рис. 2.8. Класифікація іонних каналів, які регулюються циклічними нуклеотидами

- 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 потенціалзалежних іонних каналів), а ділянка між сегментами S5 і S6 залучається в процес утворення пори (рис. 2.9).

На цитозольному боці мембрани (з N- та C-кінця молекули) міститься два регуляторні домени. Крім того, на C-кінці молекула має домен зв'язування циклічних нуклеотидів, гомологічний такому у структурі протеїнкіназ, що регулюються циклічними нуклеотидами (ПкА і ПкG).

Незважаючи на наявність сенсора напруги, пора цих каналів відкривається лише у присутності циклічних нуклеотидів, причому за достатньої кількості останніх відкриття цих каналів уже не залежить від мембранного потенціалу (механізм цього явища незрозумілий). CNGC, окрім цАМФ, можуть бути активовані іншим вторинним посередником — циклічним гуанозинмонофосфатом (підрозд. 2.4), причому різні типи цих каналів є чутливими або до цАМФ, або до цГМФ, або до обох сполук одночасно. Крім того, окремі типи CNGC різняться за селективністю та залежністю від потенціалу, можуть активуватися одним нуклеотидом (цАМФ або цГМФ) або сумісною комбінацією обох циклічних нуклеотидів [Biel M.].

Повернення системи у вихідний, неактивованій 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 (*β adrenergic receptor kinase*, кіназа *β -адренергічного рецептора*). Утворені фосфорильовані залишки надалі стають докерним сайтом для білка β -арестину, приєднання якого приводить до інактивації рецептора та зниження його чутливості. У деяких випадках зв'язування арестину стає сигналом для клатринзалежного ендоцитозу (інтерналізації) рецептора (підрозд. 1.4.5.1).

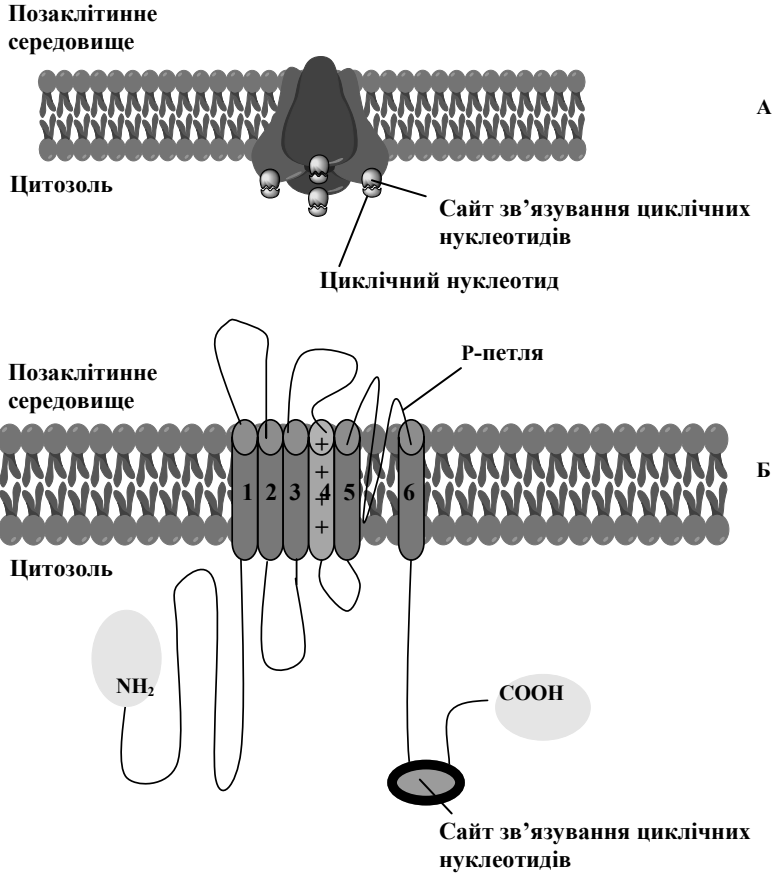


Рис. 2.9. Тривимірна структура іонного каналу, що регулюється циклічними нуклеотидами: 4 субодиниці формують загальну пору; кожна субодиниця має сайт для зв'язування циклічних нуклеотидів (А); доменна структура α -субодиниці: 6 трансмембранних спіралей, S4 сегмент є сенсором напруги, ділянка між S5 та S6 (P-домен) бере участь у формуванні пори каналу. Сайт для зв'язування циклічних нуклеотидів міститься у С-кінцевій ділянці (Б)

G-білки мають здатність гідролізувати зв'язаний з ними ГТФ до ГДФ, що забезпечує їхнє "самовимкнення", тобто перехід *G*-ГТФ у *G*-ГДФ. Наслідком цього стає інактивація *аденілатциклази*.

Уже утворений *ц*АМФ, який залишився у клітині, руйнується під впливом *фосфодіестерази* (ФДЕ) – ферменту, що каталізує реакцію гідролізу *ц*АМФ до 5'-АМФ (рис. 2.10).

Цей фермент має 11 ізоформ, що відрізняються за здатністю діяти на *ц*АМФ: **фосфодіестерази-1, -2, -3, -10 та -11** гідролізують як *ц*АМФ, так і *ц*ГМФ; **-4, -7 та -8** головним чином розщеплюють *ц*АМФ, а **-5, -6, -9** – *ц*ГМФ. Зазначені ізоформи даного ферменту можуть мати сплайсинг-варіанти і, окрім субстратної специфічності, різняться своєю тривимірною структурою, кінетичними властивостями, механізмами регуляції, внутрішньоклітинною локалізацією, клітинною експресією та чутливістю до інгібіторів (табл. 2.6).

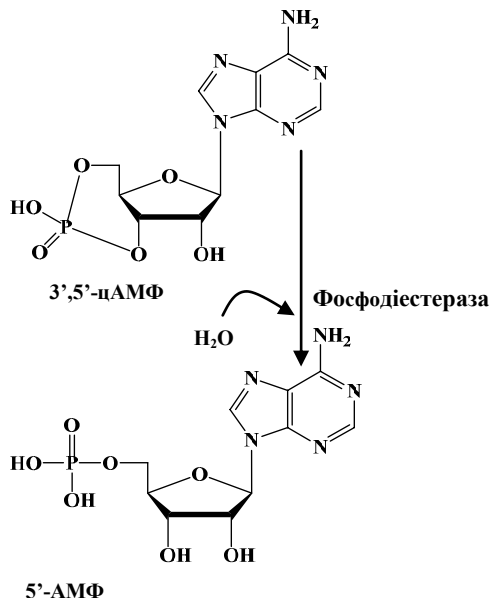


Рис. 2.10. Схема реакції гідролізу *ц*АМФ за дії фосфодіестерази

Таблиця 2.6. Характеристика ізоформ фосфодіестерази

Ізоформа ФДЕ	Гени, сплайсінг-варіанти	Внутрішньоклітинна локалізація	Експресія у тканинах	Функції
ФДЕ1 (А-С)	3 гени, кожен має кілька сплайсінг-варіантів	Цитозольні	Серце, мозок, легені, гладенькі м'язи	ФДЕ1А залучена в регуляцію скорочень гладенької мускулатури судин; ФДЕ1В бере участь у сигнальних шляхах дофаміну, причетна до активації імунних клітин та їхнього виживання; ФДЕ1С залучена в проліферацію клітин гладеньких м'язів судин і нейрональну сигналізацію
ФДЕ2 (А)	1 ген, кілька сплайсінг-варіантів	Цитозольні або сполучені із мембраною (залежно від сплайсінг-варіанта та типу клітин);	Надниркові залози, серце, легені, печінка, тромбоцити	На рівні ФДЕ2 відбувається перетин сигнальних шляхів від цГМФ та цАМФ; ФДЕ2 регулює секрецію наднирковими залозами альдостерону, цАМФ- та ПкА-залежне фосфорилування Ca^{2+} -каналів у серці, вплив цГМФ у нейронах

Ізоформа ФДЕ	Гени, сплайсінг-варіанти	Внутрішньоклітинна локалізація	Експресія у тканинах	Функції
ФДЕ3 (А,В)	2 гени, Кожен має кілька сплайсінг-варіантів	А – цитозольна або асоційована з мембраною (залежно від сплайсінг-варіанта та типу клітин); В – сполучена з мембраною (часто в ЕПР)	Серце, легені, печінка, тромбоцити, жирова тканина, імунні клітини	ФДЕ3А регулює скорочення серцевого м'яза та гладенької мускулатури судин, агрегацію тромбоцитів, дозрівання ооцитів і вивільнення реніну; ФДЕ3В опосередковує інсулінову сигналізацію, особливо антиліполітичні ефекти цього гормону; ФДЕ3В також є регулятором клітинного циклу і проліферації.
ФДЕ4 (А-Д)	4 гени, кожен має кілька сплайсінг-варіантів	А, В – сполучені з мембраною в ділянках ліпідних рафтів; С – цитозольна; Д – цитозольна або асоційована із мембраною (залежно від сплайсінг-варіанта та типу клітин);	Клітини Сертолі, нирки, мозок, печінка, легені, імунні клітини	Ізоформи ФДЕ4 залучені в широке коло процесів, зокрема у функції мозку, активацію моноцитів і макрофагів, проліферацію гладком'язових клітин судин, вазодилатацію, скорочення серцевого м'яза

Продовження табл. 2.6.

Ізоформа ФДЕ	Гени, сплайсінг-варіанти	Внутрішньоклітинна локалізація	Експресія у тканинах	Функції
ФДЕ5 (А)	1 ген, кілька сплайсінг-варіантів	Цитозольна	Легені, тромбоцити, гладком'язові клітини судин	ФДЕ5 є регулятором скорочення гладком'язових клітин судин; залучена в цГМФ-опосередковані сигнальні шляхи NO в тромбоцитах, що зумовлюють контроль агрегації цих клітин, також може брати участь у регуляції цГМФ-залежних процесів у мозку
ФДЕ6 (А, В, С)	3 гени	А, В – сполучені з мембраною; С – цитозольна	Фото-рецептори	Ізоензими ФДЕ6 залучені в передачу зорових сигналів; також можуть регулювати секрецію мелатоніну шишкоподібною залозою
ФДЕ7 (А, В)	2 гени, кожен має кілька сплайсінг-варіантів	Цитозольні	Скелетний м'яз, серце, нирки, мозок, підшлункова залоза, Т-лімфоцити	Ізоферменти ФДЕ7 залучені в активацію низки імунних клітин, зокрема Т-клітин
ФДЕ8 (А, В)	2 гени, кожен має кілька сплайсінг-варіантів	Цитозольні або асоційовані з мембраною (залежно від сплайсінг-варіанта та типу клітин);	Сім'яники, око, печінка, скелетний м'яз, яєчники, серце, нирки, мозок, Т-лімфоцити	Ізоформи ФДЕ8 можуть брати участь у активації Т-клітин, а також у функціонуванні сім'яників та яєчників

Закінчення табл. 2.6.

Ізоформа ФДЕ	Гени, сплайсинг-варіанти	Внутрішньоклітинна локалізація	Експресія у тканинах	Функції
ФДЕ9 (А)	1 ген, кілька сплайсинг-варіантів	Цитозольні або ядерні (залежно від сплайсинг-варіанта й типу клітин);	Нирки, печінка, легені, мозок	Функції ізоензимів ФДЕ9 повністю не досліджено; гіпотетично вони можуть залучатися в регуляцію цГМФ-залежних сигнальних шляхів NO в мозку
ФДЕ10 (А)	1 ген, кілька сплайсинг-варіантів	Цитозольні або асоційовані з мембраною (залежно від сплайсинг-варіанта та типу клітин);	Сім'яники, мозок	ФДЕ10А є регулятором вмісту цГМФ у мозку, залучається у процеси навчання і пам'яті
ФДЕ11 (А)	1 ген, кілька сплайсинг-варіантів	Цитозольна	Скелетний м'яз, простата, нирки, печінка, гіпофіз та слинні залози, сім'яники	Імовірна роль ФДЕ11 полягає в утворенні сперми

Зокрема, ФДЕ1 є Ca^{2+} , кальмодулінзалежним (комплекс іонів Ca^{2+} із білком кальмодуліном (КМ) також бере участь і в інозитолфосфатному каскаді – підрозд. 2.2), тоді як інші форми цього ферменту не регулюються внутрішньоклітинним вмістом цього катіона. Зв'язування комплексу $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$ здійснюється N-кінцевою ділянкою молекули ферменту. Регуляторами фосфодіестераз також є деякі ліки, зокрема *метилксантини*. Так, неспецифічними інгібіторами всіх ізоформ ФДЕ є *кофеїн* і *теофілін* – алкалоїди, що містяться в невеликих кількостях у каві та чаю, відповідно. Тому ці сполуки, а отже, і великі кількості зазначених напоїв пролонгують або підсилюють дію адреналіну шляхом зниження швидкості розпаду цАМФ.

Зі зниженням вмісту цАМФ у цитозолі вивільнюються молекули цього посередника, зв'язані з регуляторними субодинамицями *PKA*. У результаті ці субодинамиці поєднуються з каталітичними

ми і протеїнкіназа повертається в неактивну форму. Одночасно дефосфорилуються фосфорильовані білки (ферменти – серин/треонінові фосфатази) і система повертається у вихідний стан.

Активні серин/треонінові фосфатази найчастіше складаються із каталітичної й регуляторної субодиниці. *Протеїнфосфатаза 1* (*protein phosphatase 1*, PP1) є мембранозв'язаною із цитоплазматичного боку; різні регуляторні субодиниці зумовлюють її печінкову чи м'язову локалізацію. Відомо, що вона бере участь, зокрема в дефосфорилуванні кінази фосфорилази. *Протеїнфосфатаза 2A* (PP2A) є цитозольним тримером з каталітичною, регуляторною та каркасною субодиницями, що для функціонування не потребує двовалентних катіонів. *Протеїнфосфатаза 2B* (PP2B), або *кальциневрин*, або Ca^{2+} , *КМ-залежна протеїнфосфатаза* складається із каталітичної субодиниці (*кальциневрин А*) і регуляторної Ca^{2+} -зв'язувальної субодиниці (*кальциневрин В*) та регулює активності ПкА і ПкС. *Протеїнфосфатаза 2С* (PP2C) є цитозольною і потребує іонів магнію. PP1, 2A та 2B мають великий відсоток гомології, унаслідок чого належать до однієї родини, тоді як PP2C належать до іншої.

2.2. 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-P₃), *діацилгліцеролу* (ДАГ) та іонів Ca^{2+} (рис. 2.11). Цим шляхом реалізується дія катехоламінів (при зв'язуванні їх з $\alpha 1$ -адренорецепторами), тиреолиберину, гонадоліберину, вазопресину, ангіотензину II, гастрину, холецистокініну, брадикініну та ін.

Для фосфоінозитидного каскаду, на відміну від аденілатциклязного, 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 (G_q).

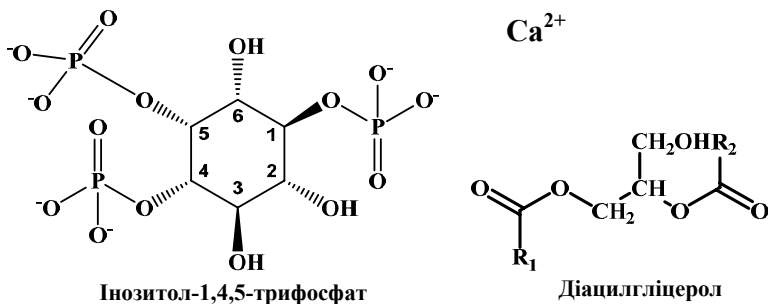


Рис. 2.11. Структурні формули вторинних посередників інозитолфосфатного сигнального каскаду

Фосфоліпаза C (PLC) каталізує реакцію гідролізу міnorного структурного мембранного фосфоліпіду фосфатиділінозитол-4,5-дифосфату (PI-4,5-P2) (рис. 2.12). У цій реакції утворюються два із трьох вторинних месенджерів даного каскаду – інозитол-1,4,5-трифосфат і діацилгліцерол.

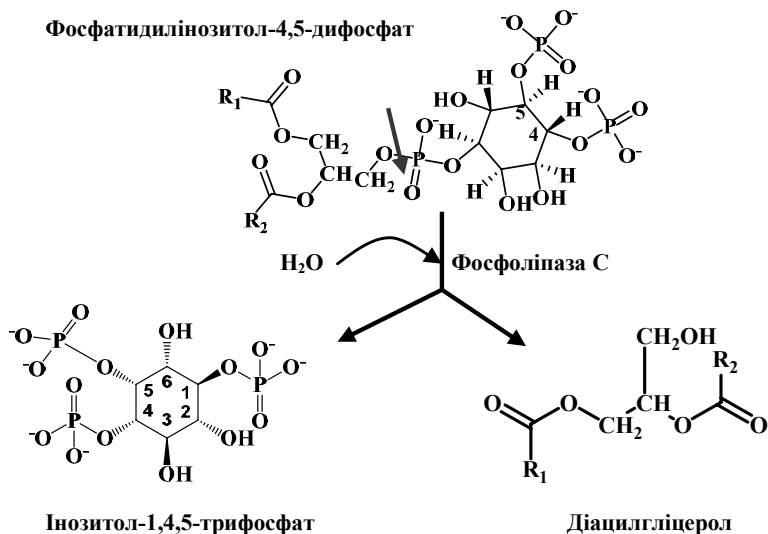


Рис. 2.12. Схема реакції гідролізу PI-4,5-P2 за участю фосфоліпази C

Відомо 13 ізоферментів фосфоліпази C, які поділяють на шість класів: PLC- δ (1,3 та 4), - β (1-4), - γ (1,2), - ϵ , - ζ , а нещодавно виявлено клас - η (1,2) (рис. 2.13). Найбільш дослідженими із них є PLC- β , PLC- γ та PLC- δ . Усі ізоформи фосфоліпази C містять кальційзв'язувальну ділянку і тому є Ca^{2+} -залежними. Ізофермент, який раніше позначали як PLC- α , імовірно, є продуктом протеолітичного розщеплення PLC- δ .

У всіх PLC каталітичний домен розділений на дві частини – X та Y. Домени X та Y є високоомологічними й обидва необхідні для активації PLC. PLC- δ 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 C-кінець (близько 500 амінокислот) PLC- β зв'язує її з мембраною для регуляції α -субодиницею G-білка (рис. 2.14).

У PLC- γ X і Y-компоненти розділені великою послідовністю (понад 500 амінокислот), що включає два домени SH2 і SH3-домени. Вони визначають взаємодію PLC- γ із фосфорильованими рецепторними тирозиновими протеїнкіназами та іншими сигнальними молекулами (детальніше про роль наведених білкових доменів див. розд. 3).

PLC- δ є найменшою із PLC, вона присутня у дріжджах, амебі *Dictyostelium discoideum* та квіткових рослинах. Перші два класи фосфоліпази C активуються при стимуляції рецепторів на ПМ (PLC- β – за участю G-білка (Gq), що вказує на її причетність до фосфоінозитидного шляху, PLC- γ – шляхом фосфорилування рецепторною тирозиною протеїнкіназою (рис. 2.14): зв'язування, наприклад, рецептора фактора росту з лігандом спричиняє димеризацію рецептора й аутофосфорилування залишків Туг на цитоплазматичному домені рецептора, які створюють "посадочні" місця для PLC- γ (її SH2-домени впізнають фосфотирозин), і таким чином закріплюють фосфоліпазу поблизу її субстрату, вбудованого в ПМ). PLC- δ 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 Ca^{2+}) і **зумовлює вихід іонів Ca^{2+}** через Ca^{2+} -канали (рецептор для I-1,4,5-P3 є лігандозалежним Ca^{2+} -вивільнювальним каналом – I-1,4,5-P3 сполучається із цитозольним доменом рецептора і спри-

чиняє відкриття каналу). У результаті в цитоплазмі швидко зростає рівень Ca^{2+} (спокій – 10^{-7} моль/л). Ca^{2+} , зв'язуючись зі специфічним внутрішньоклітинним білком *кальмодуліном*, активує Ca^{2+} , кальмодулінзалежну протеїнкіназу (Ca^{2+} /КМ-залежна Пк).

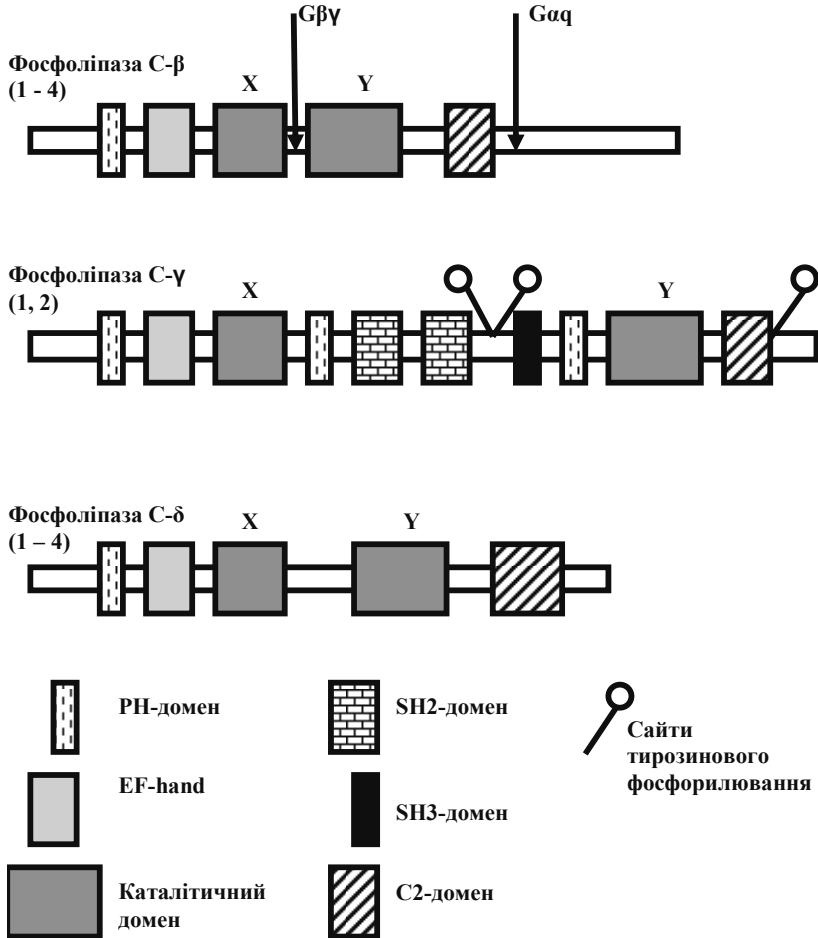


Рис. 2.13. Доменна структура PLC-β і PLC-γ

Іони Ca^{2+} можуть виступати в ролі месенджера й без активації фосфоінозитидної системи – коли їхня концентрація в цитоплазмі зростає внаслідок надходження ззовні через

Ca²⁺-канали ПМ, які відкриваються під впливом певних регуляторних молекул або при зміні трансмембранного потенціалу.

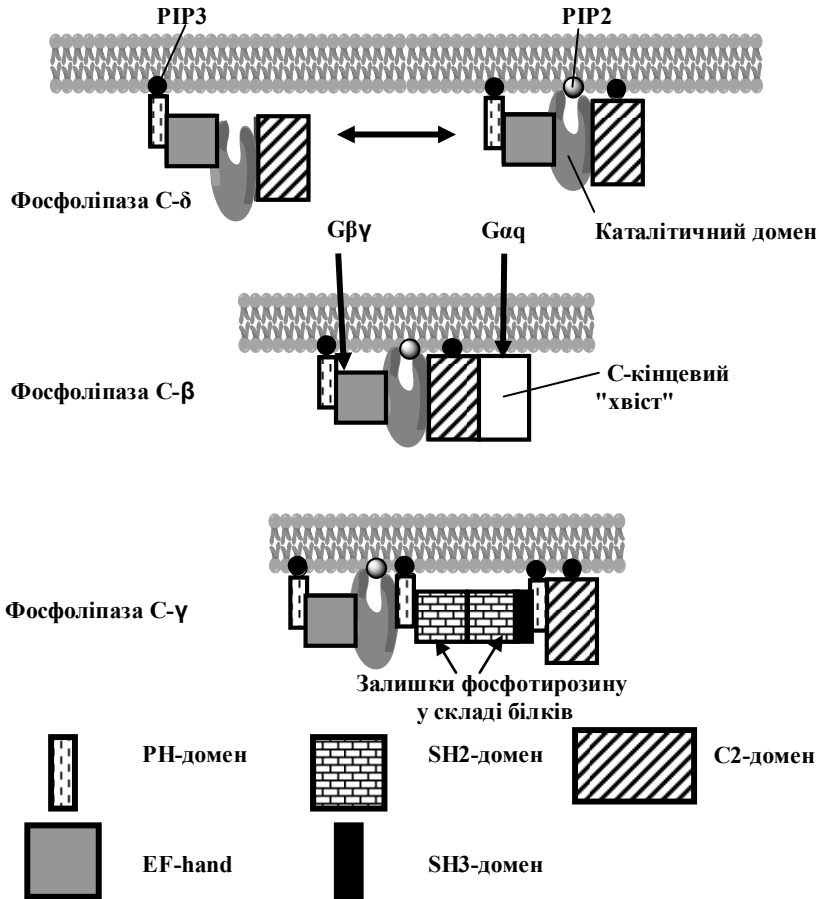


Рис. 2.14. Схема зв'язування з мембраною та активації PLC: початкове прикріплення PLC-δ до мембрани здійснюється через її PH-домен; домен C2, взаємодіючи з мембраною, приводить каталітичну ділянку в контакт із субстратом; активація PLC-β потребує додатково взаємодії із субодиницею G-білка; PLC-γ взаємодіє з фосфорильованими залишками тирозину рецептора через SH2-домени

Цитозольний домен рецептора до I-1,4,5-P₃, окрім I-1,4,5-P₃-зв'язувальної ділянки, має кальційзв'язувальний сайт, приєднання до якого іонів Ca²⁺ теж може спричинити відкриття каналу. Однак, це справедливо лише, якщо вміст цих іонів відносно низький: висока концентрація Ca²⁺ у цитоплазмі, що спостерігається після відкриття каналів, спричиняє закриття каналів. Подібна здатність стимулюватися низькою концентрацією Ca²⁺ у ЦП та інгібуватися високою також характерна для структур, близьких за будовою та функціями до I-1,4,5-P₃-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 Ca²⁺-вивільнювальних агентів. Таке зворотнє інгібування вивільнення Ca²⁺ високою концентрацією цитозольного Ca²⁺ разом з активністю Ca²⁺-АТФази є контрибутом "вимкнення" сигналу.

Рецептор до I-1,4,5-P₃ є тетрамером, що складається із чотирьох ідентичних великих субодиниць з молекулярною масою 310 кД. Домен, локалізований на С-кінці, кілька разів пронизує мембрану й бере участь в утворенні каналу для катіонів. Канал має геометричну форму "кольорової капусти" (вид у профіль) чи розетки (вид спереду) (рис. 2.15), ширина якої становить приблизно 20 нм, а висота 10 нм. Уся інша частина молекули розташована на цитоплазматичному боці, де є місця для зв'язування I-1,4,5-P₃, Ca²⁺, АТФ, а також два залишки Ser, що фосфорилуються ПкА і ПкG.

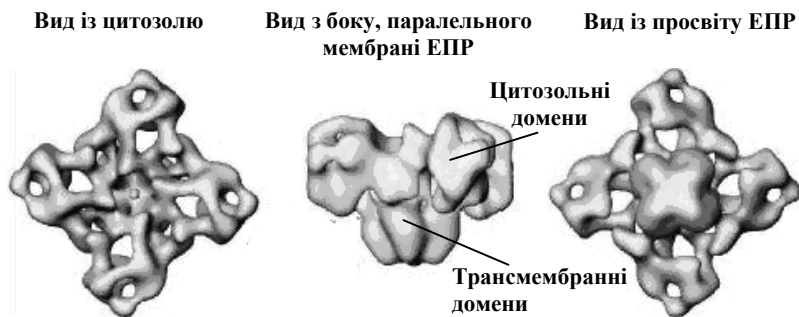


Рис. 2.15. Структура рецептора до I-1,4,5-P₃

Загальною і функціонально найважливішою ділянкою цих рецепторів є Ca^{2+} -зв'язувальний сайт, що забезпечує Ca^{2+} -індуковану активацію та інгібування рецепторів. Як уже зазначалося, рецептори до I-1,4,5-P3 активуються низькими концентраціями Ca^{2+} і пригнічуються високими, причому зв'язування специфічного активатора збільшує чутливість до Ca^{2+} .

Вивільнення Ca^{2+} через рецептор до I-1,4,5-P3 є двохетапним процесом (рис. 2.16). Сполучення вторинного посередника з лігандзв'язувальними ділянками рецептора веде до вивільнення Ca^{2+} із ЕПР. Вивільнений Ca^{2+} теж зв'язується з молекулою рецептора до I-1,4,5-P3, спричиняючи його конформаційні зміни, що індукують відкриття додаткових Ca^{2+} -каналів ПМ, оскільки ПМ і мембрана ЕПР є просторово поєднаними – так зване Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} .

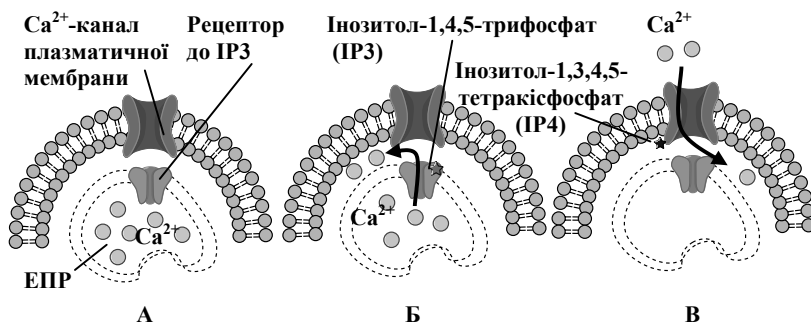


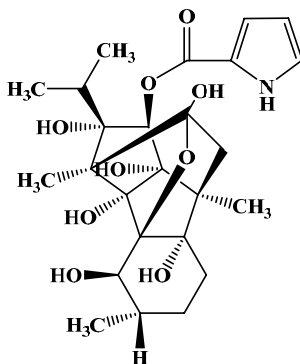
Рис. 2.16. Схема Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} із ЕПР: А – стан спокою; Б – IP3 мобілізує Ca^{2+} з ЕПР; В – спустошення пулу ЕПР індукує конформаційні зміни рецептора до IP3, що спричиняє відкриття Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани (можливо, із залученням IP4)

Цей вплив конформаційних змін між рецептором на одній мембрані та Ca^{2+} -каналом на іншій подібний до функціонування ріанодिनних 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

ріанодиноними 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-P3, 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-P3-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).



Ріанодин

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 закін-

чень вивільнюється медіатор ацетилхолін, який сполучається із нікотиновими холінорецепторами, розташованими на ПМ постсинаптичної м'язової клітини в ділянці синапсу, які одночасно є лігандозалежними Na^+ -каналами, що відкриваються при зв'язуванні ацетилхоліну. При цьому в цитозоль входять іони 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 Ca^{2+} -каналів ПМ* (Ca^{2+} -канали *L-типу*, або *дигідропіридиночутливі Ca^{2+} -канали* – підпідрозд. 1.4.2.2), які при цьому відкриваються і зумовлюють надходження у цитоплазму м'язових клітин невеликої кількості Ca^{2+} із позаклітинного середовища.

У скелетних м'язах Ca^{2+} -канали ПМ і ріанодинові рецептори безпосередньо контактують один із одним: приблизно із половиною молекул RYR зв'язано по 4 молекули Ca^{2+} -каналів ПМ. Використовуючи мутантні форми Ca^{2+} -каналів ПМ, які були нездатні пропускати Ca^{2+} через ПМ, але могли змінювати свою конформацію під впливом деполяризації, виявили, що *для активації RYR достатньо лише потенціалзалежної зміни конформації Ca^{2+} -каналів ПМ* (рис. 2.17). Проте зауважимо, що Ca^{2+} необхідний для активації тих RYR, які не мають безпосереднього зв'язку з тетрадами Ca^{2+} -каналів.

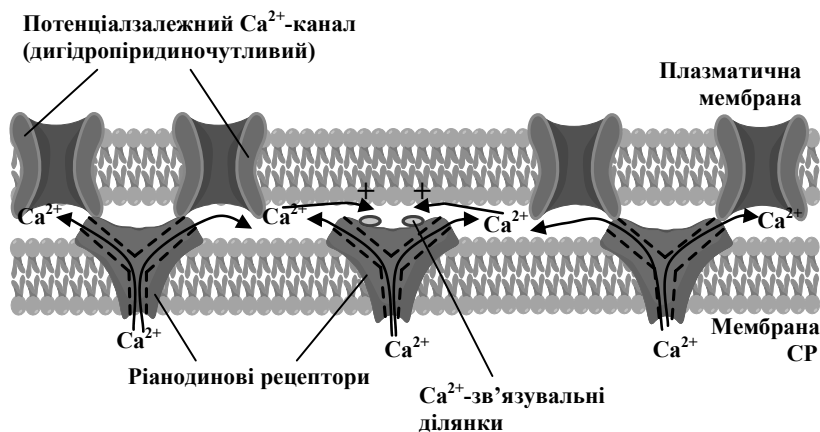


Рис. 2.17. Схема функціонування ріанодинових рецепторів у клітинах скелетного м'яза

У серцевому м'язі лише невелика частина RYR зв'язана із Ca^{2+} -каналами ПМ (на 1 молекулу RYR припадає 2 Ca^{2+} -канали) і взагалі не виявлено міцних контактів RYR із ПМ. Тому в серцевому м'язі діє інший механізм активації RYR – Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} . При деполяризації ПМ кардіоміоцитів активуються потенціалчутливі Ca^{2+} -канали ПМ, і в цитоплазму надходить невелика кількість Ca^{2+} із позаклітинного середовища (тригерний Ca^{2+}). Його недостатньо для забезпечення м'язового скорочення, однак він активує RYR, через які із ретикулума вивільнюється основна кількість Ca^{2+} , потрібного для скорочення серцевого м'яза, що є іншим варіантом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (рис. 2.18).

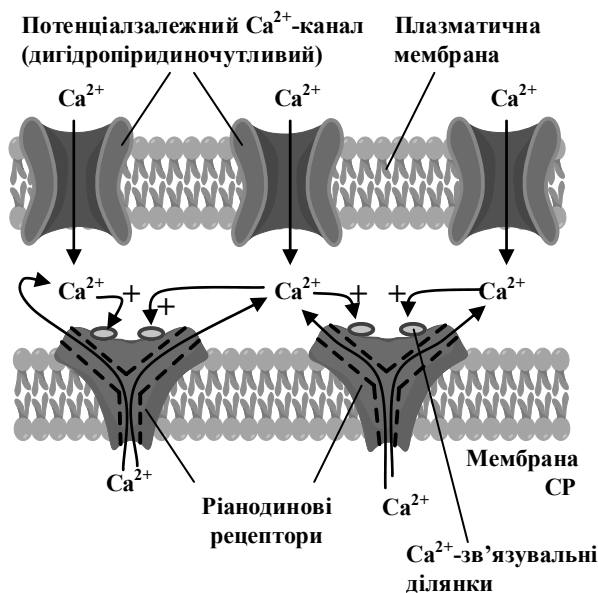


Рис. 2.18. Схема функціонування ріанодинових рецепторів у клітинах серцевого м'яза

Отже, у скелетному м'язі в передачі сигналу від ПМ до СР відіграє основну роль зміна конформації Ca^{2+} -каналів ПМ, а в серцевому м'язі посередником є сам Ca^{2+} .

У гладеньких м'язях, як і в серцевому, спостерігається Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} , але у вивільненні Ca^{2+} із СР беруть участь не лише RYR, але й рецептори до I-1,4,5-РЗ. При деполяризації ПМ клітин гладеньких м'язів активуються потенціалчутливі Ca^{2+} -канали, і Ca^{2+} , що входить через них, активує RYR. Проте скорочення гладеньких м'язів може відбуватися і без деполяризації ПМ, а саме, через вплив гормонів і фосфоінозитидний шлях.

При цьому I-1,4,5-РЗ зумовлює вихід Ca^{2+} із СР, і вже цей Ca^{2+} може активувати RYR, спричиняючи вивільнення додаткових кількостей Ca^{2+} (рис. 2.19).

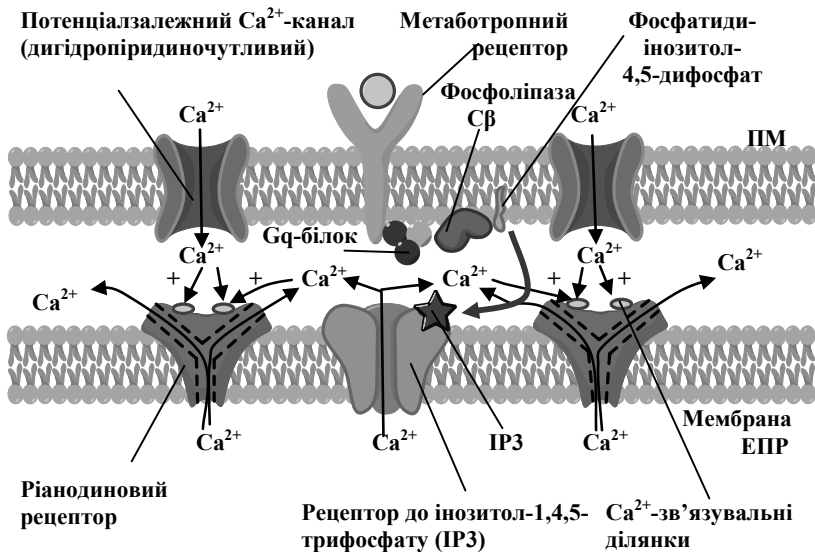


Рис. 2.19. Схема функціонування ріанодинових рецепторів у клітинах гладенького м'яза

Фізіологічним активатором RYR2 і RYR3, а також RYR нем'язових тканин, для яких не характерна деполяризація ПМ, зокрема ріанодинчутливого Ca^{2+} -каналу яйцеклітин морських їжаків, є **циклічна АДФ-рибоза** – найпотужніший із відомих Ca^{2+} -вивільнювальних агентів, виявлений у 1987 р. *Хон Ченг Лі* (рис. 2.20) [Guse A.], [White T. et al.].

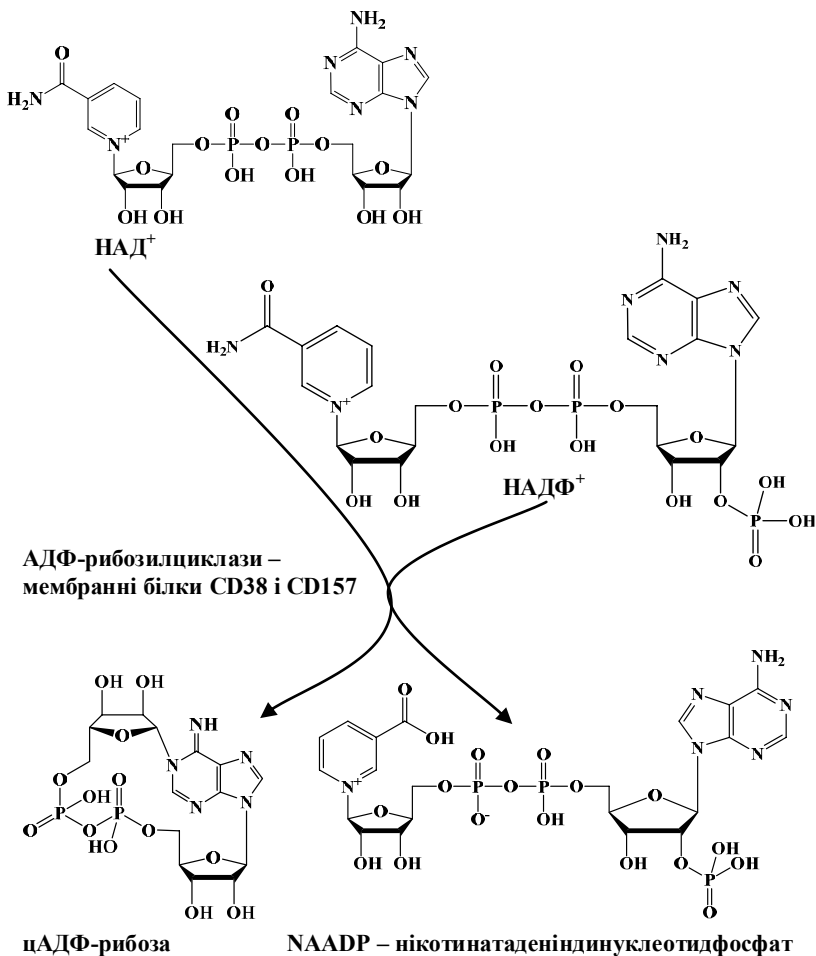


Рис. 2.20. Структурні формули двох вторинних посередників – цАДФР та NAADP

цАДФР/ Ca^{2+} -сигнальна система є активною в різних клітинних системах: це гладенькі, скелетні й серцеві м'язи (але там вона відіграє другорядну роль), нейрони, гемопоетичні та ацинарні клітини, ооцити. Вона виявляється й в протозоа, і в рослин, тобто є філогенетично давньою й консервативною системою.



Хон Ченг Лі

Як і у випадку I-1,4,5-P3/Ca²⁺-сигнальної системи, у ряді клітинних типів позаклітинний стимул активує цАДФР-формувальні ферменти з АДФ-рибозилциклазною активністю (*АДФ-рибозилциклази*), що синтезують цАДФР із НАД⁺.

На роль цих ферментів у ссавців претендують, зокрема, *мембранні білки CD38 і CD157*.

Своєрідним "топологічним парадоксом" є те, що каталітичний сайт цих ферментів локалізований поза клітиною;

при такому розташуванні ферменту немає прямого контакту із субстратом НАД⁺; немає і прямого контакту цАДФР, що утворюється поза клітиною, із RYR.

Як клітина обходить цей парадокс?! Гіпотетично НАД⁺ може виходити із клітини через специфічні канали і поза клітиною перетворюватися на цАДФР. Остання повертається у клітину – виявлено, що як сам CD38, так і транспортери нуклеотидів можуть діяти як цАДФР-транспортувальні білки. Крім того, цАДФР може діяти і паракринно. Крім того, є дані про експресію цитозольних і (або) мембранозв'язаних ферментів, не гомологічних CD38 і CD157, але жодний із них ще не ідентифікований.

Сама цАДФР швидко гідролізується у клітинах, при цьому продукт її гідролізу – АДФ-рибоза – інгібує ріанодинчутливі Ca²⁺-канали.

Мембранозв'язані форми АДФ-рибозилциклази – CD38 і CD157 – у випадку, якщо субстратом є не НАД⁺, а НАДФ⁺, за умови наявності нікотинової кислоти утворюють молекулу іншого внутрішньоклітинного посередника – **нікотинаденіндинуклеотидфосфату** (*nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP*) (рис. 2.20), який також сприяє вивільненню Ca²⁺ із внутрішньоклітинних депо – як через рецептори, відмінні від RYR (в ЕПР, лізомах, секреторних везикулах), так і, можливо, через RYR.

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

лін (КМ) належить до родини *EF-hand-білків** 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^{2+} , зв'язуючи чотири іони Ca^{2+} на одну молекулу кальмодуліну.

У кожному сайті зв'язування Ca^{2+} взаємодіє з атомами кисню карбоксильних груп бічного ланцюга головним чином глутамінової та аспарагінової кислот у петльовому домені між двома α -спіралями, розташованими під прямим кутом, які разом формують мотив *спіраль-петля-спіраль* (*helix-loop-helix motif*, або *EF hand*) (рис. 2.21, а). У молекулі КМ є чотири мотиви EF hand – по два на кожному кінці молекули, яка через це набуває форми гантелі (рис. 2.21, б).

Зв'язування Ca^{2+} із чотирма EF hand-мотивами спричиняє конформаційні зміни, унаслідок яких гідрофобні залишки КМ виставляються назовні. Ці залишки включаються у білок-білкові взаємодії. Крім того, ці гідрофобні ділянки оточені ділянками з високим негативним зарядом. При цьому $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$ знову змінює конформацію й "огортає" домени-мішені білка, який регулюється комплексом $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$.

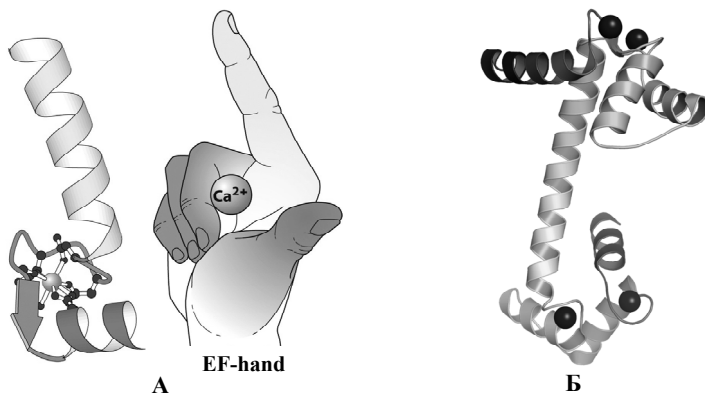


Рис. 2.21. Структура домену EF hand (а) і модель молекули кальмодуліну в комплексі з чотирма іонами кальцію (б)

* EF hand-послідовність присутня у понад 100 різних білків, зокрема в численних ферментах (мультифункціональна $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -залежна протеїнкіназа (СаМК), Ca^{2+} -АТФаза ПМ, аденілатциклаза, фосфодіестераза, фосфопротеїнфосфатази, фосфоліпаза А2, тропонін С тощо).

Типовими КМ-зв'язувальними доменами-мішенями білків є позитивно заряджені амфіпатичні α -спіралі з полярною і неполярною поверхнями – так звані *основні амфіпатичні α -спіралі* (*basic amphiphilic alpha helix*, або *Vaa helix*), із якими $\{Ca^{2+}/KM\}$ зв'язується з високою афінністю. Термінальні CH_3 -групи бічних ланцюгів залишків метіоніну КМ беруть участь у зв'язуванні з гідрофобними залишками доменів-мішеней деяких ферментів, які регулюються кальмодуліном. Коли білок-мішень уже зв'язаний, два глобулярні домени, утримуючись разом, формують єдиний зв'язувальний сайт.

Взаємодія $\{Ca^{2+}/KM\}$ з деякими іншими мішенями відрізняється від описаного вище механізму.

Прикладами білків, які регулюються $\{Ca^{2+}/KM\}$, є Ca^{2+}/KM -залежні протеїнкінази (Ca^{2+} , *calmodulin-dependent serine/threonine protein kinases*, *CaMKs*), Ca^{2+} -АТФази, фосфодіестерази, НАД⁺-кінази. Зокрема, до CaMKs належать кіназа легкого ланцюга міозину (*myosin light-chain kinase*), що залучається в активацію скорочення гладенької мускулатури, кіназа фосфорилази, яка причетна до стимуляції розщеплення глікогену, CaM кіназа II (CaM kinase II), виявлена в усіх клітинах, але в найбільшій кількості – у нервовій системі, де відповідає за фосфорилування гідроксилази тирозину, швидкість-лімітуючого ферменту в синтезі катехоламінів, який може відігравати роль у механізмах пам'яті й навчання.

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^{2+} (впливають на транслокацію ПкС із цитозолу до мембрани) і фосфатидилсерин мембран (взаємодіє з ДАГ), тому повна назва цього ферменту – Ca^{2+} , *фосфоліпідзалежна ПкС*. У примембранному просторі ДАГ активує ПкС шляхом збільшення її спорідненості до Ca^{2+} і фосфоліпідів. У ссавців виявлено 15 різних ізоформ ПкС (рис. 2.22).

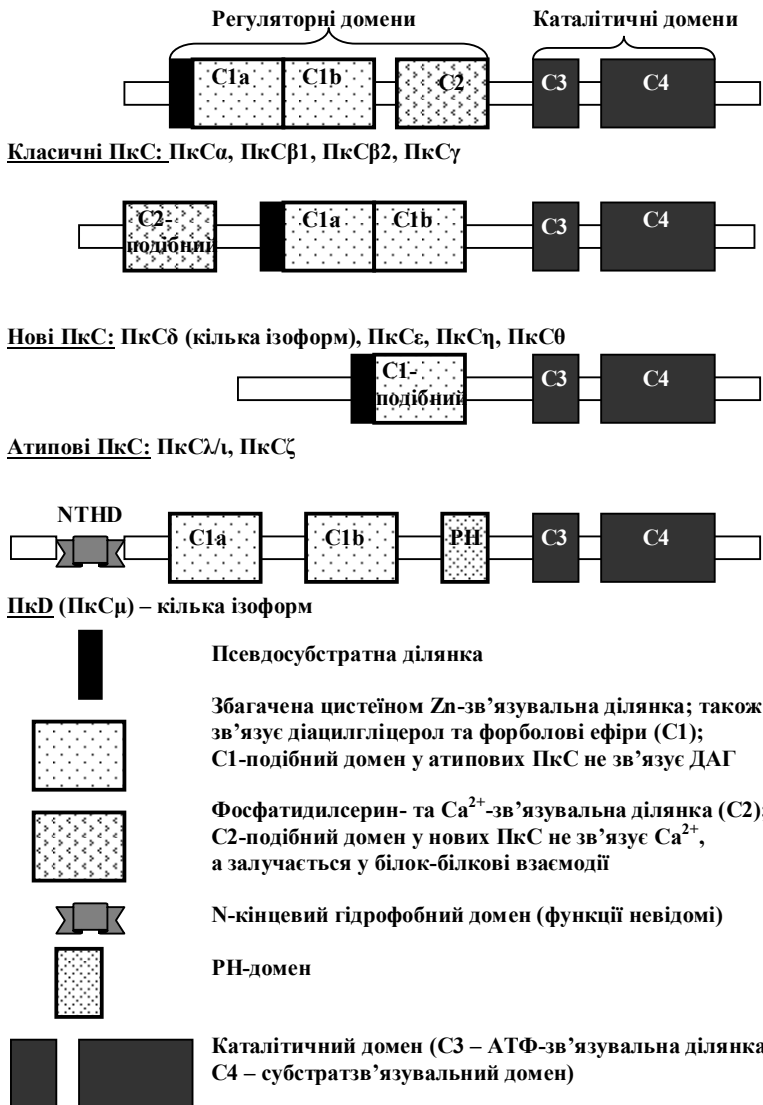


Рис. 2.22. Доменна будова різних ізоформ протеїнкінази С

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 Ca^{2+} , ДАГ-незалежний спосіб). Найпоширеніші з них – α , $\beta 1$ й $\beta 2$ – належать до класичних ПкС.

ПкС- α є 80-кД-поліпептидом із чотирма консервативними доменами та п'ятьма – варіабельними (рис. 2.23).

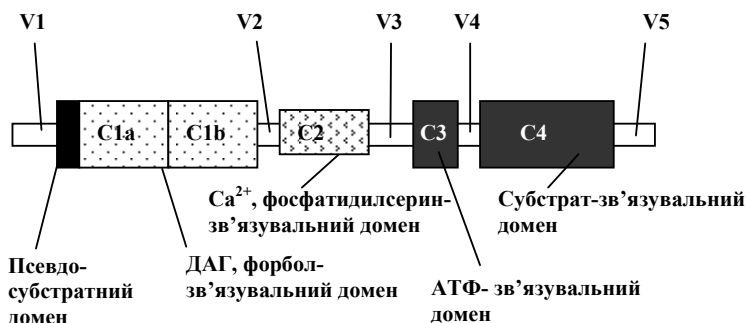


Рис. 2.23. Первинна структура ПкС- α : V – варіабельні ділянки, C – консервативні. Форболзв'язувальний домен є ідентичним ДАГ-зв'язувальному домену

Консервативними доменами є АТФ-зв'язувальний, субстрат-зв'язувальний, 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 дослідях 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 Ca^{2+} та за відсутності ДАГ ПкС є неактивною і розподілена дифузно в цитозолі. При активації клітин відбувається перерозподіл ПкС- α і - ϵ до ПМ, ПкС- β 2 зв'язується із цитоскелетом, ПкС- γ спрямовується до апарату Гольджи; ПкС- α також може направлятися до ЕПР, а ПкС- ϵ – у мембрану ядра.

ПкС фосфорилують, зокрема, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу, α 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 (рис. 2.24).

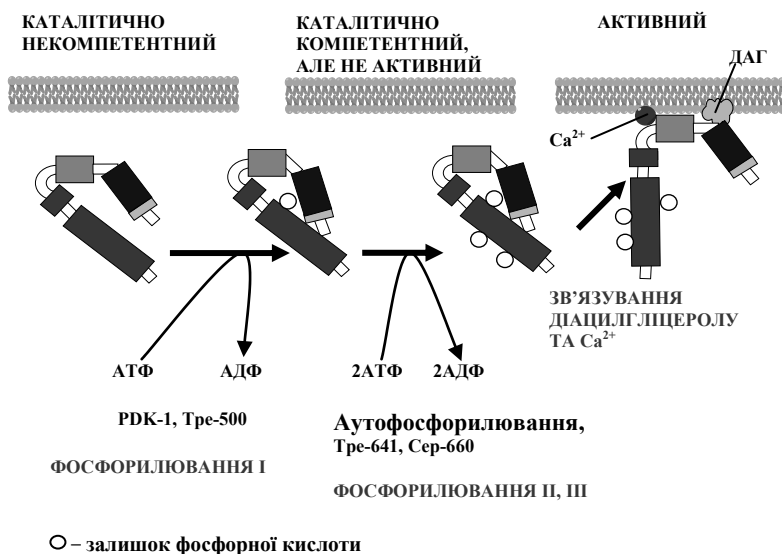


Рис. 2.24. Модель Ca^{2+} - і ДАГ-залежної активації ПкС

ПкС синтезується як попередник 74 кД. На початку її каталітичний сайт доступний для субстрату, але не активний. Надалі відбуваються три різні фосфорилування, які переводять фермент у каталітично компетентний, але ще не активний стан

(можливо, за участю PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, 3'-фосфоінозитидзалежна протеїнкіназа-1*). При цьому доступ субстрату запобігається приєднанням псевдосубстратної ділянки до каталітичного сайту.

При зв'язуванні ДАГ і зростанні вмісту Ca^{2+} фермент міцно сполучається з мембраною і підлягає конформаційним змінам, унаслідок чого псевдосубстрат від'єднується від каталітичного сайту й останній стає доступним для субстрату й готовим до фосфорилування. Також зростає афінність ферменту до Ca^{2+} та ліпідів.

Контроль ферментативної активності зв'язуванням псевдосубстратного домену з активним центром розглядають як *інтрастеричний контроль*, на відміну від *алостеричного*, за якого регулятор ферменту зв'язується з алостеричним центром, відмінним від активного. Численні протеїнкінази і протеїнфосфатази регулюються шляхом інтрастеричного контролю.

Загальну схему фосфоінозитидного каскаду (за участю метаботропного рецептора та із залученням рецепторної тирозинової протеїнкінази) наведено на рис. 2.25.

Останнім часом (1994) було виявлено ще одну мішень ДАГ – **фосфоліпід, діацилгліцеролзалежну протеїнкіназу D** (PкD) [Ding G. et al.]. Спершу цей фермент був ідентифікований як атипова PкC (PкC μ) і, подібно до PкA, PкC та PкG, 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^{2+} /KM-залежної кінази, і тому сьогодні її класифікують як нового члена кіназ родини SAMKs. На сьогодні виявлено три ізоформи ферменту – PкD1, PкD2, PкD3, які різняться внутрішньоклітинною локалізацією.

N-кінець молекули PкD, подібно до PкC, містить ДАГ і фоболзв'язувальну ділянку, багату на цистеїн. Між ним і каталітичним доменом розташований РН домен, необхідний для сполучення ферменту із ПМ.

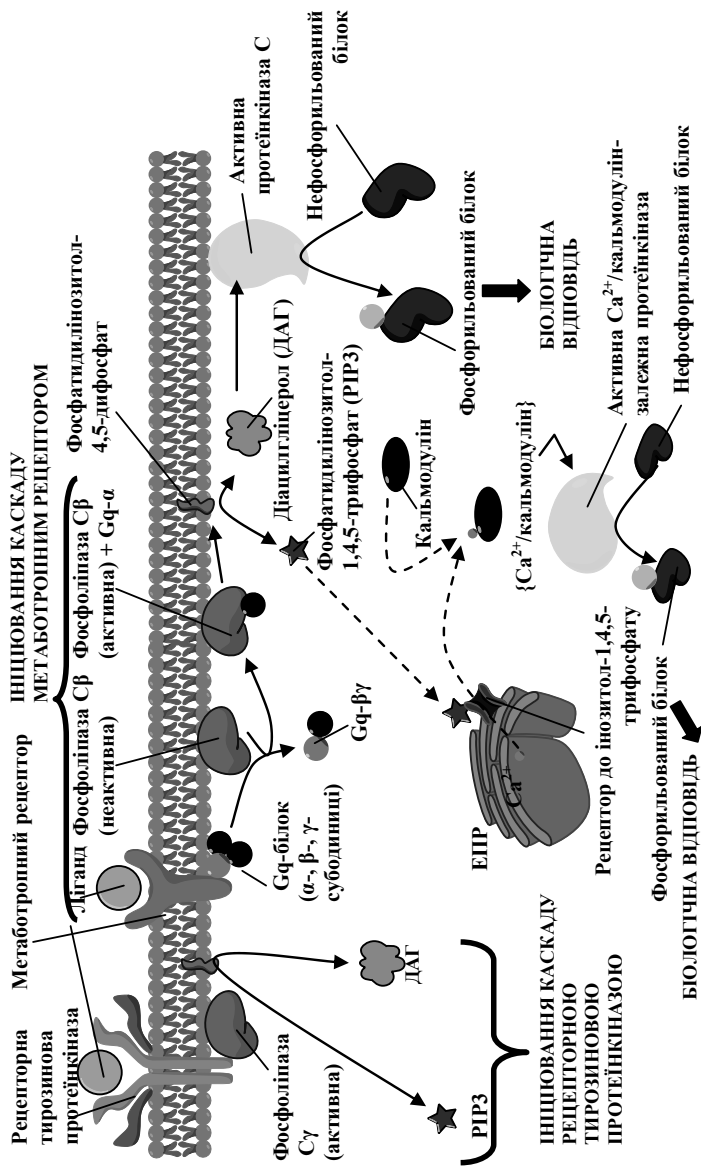


Рис. 2.25. Загальна схема фосфоінозитидного каскаду: PLC – фосфоліпаза С; білок-Р – фосфорильований білок; IP3 – інозитол-1,4,5-трифосфат; DAG – діацилгліцерол

Завдяки наявності збагаченої цистеїном ділянки, ПкD, як і ПкC, здатна активуватися діацилгліцеролом і форболовими ефірами. Разом із тим, ще одним безпосереднім активатором цього ферменту виявилася ПкC.

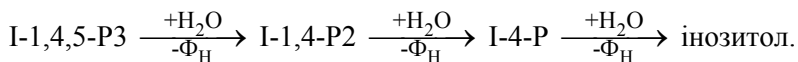
Найчастіше неактивна ПкD є цитозольним ферментом, хоча в невеликих кількостях її виявляють у АГ й мітохондріях, міститься у більшості нормальних, а також у пухлинних клітинах. Після стимуляції клітинних рецепторів такими лігандами, як бомбезин, брадикінін, ендотелін, вазопресин, ростові фактори (зокрема, фактор росту тромбоцитів) й активації інозитол-1,4,5-трифосфатного каскаду в клітині утворюється ДАГ. У відповідь на таку продукцію неактивна ПкD транслокується із цитозолу до ПМ, де взаємодіє або з ДАГ, або з ПкC, вже активованою ДАГ. ПкC фосфорилує регуляторну ділянку ПкD за залишками серину-744 й -748, що веде до активації її ферментативної активності, дисоціації від ПМ та транслокації спочатку в цитозоль, а надалі – у ядро.

Цей фермент причетний до регуляції мембранних, цитозольних, ядерних подій, а саме, залучений у сигнальну трансдукцію, мембранний транспорт, виживання клітин, їхню міграцію, диференціювання, проліферацію.

Припинення гормональної передачі здійснюється завдяки інактивації вторинних посередників (рис. 2.26) 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 фосфатиділінозитол, 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 літїю 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 (підрозд. 2.3).

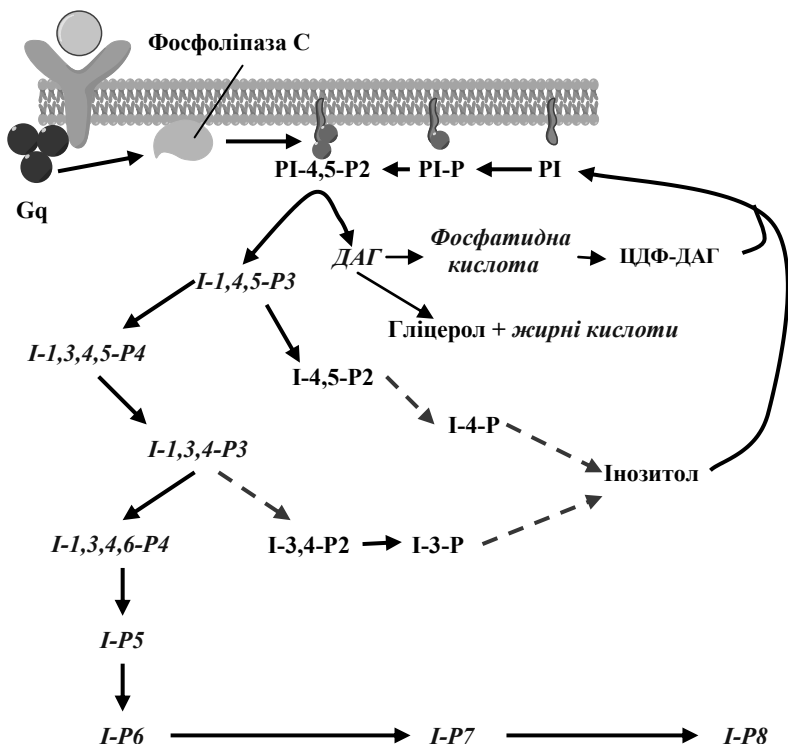


Рис. 2.26. Шляхи інактивації вторинних посередників інозитолфосфатного сигнального каскаду.

Пунктирними стрілками позначено етапи, які блокуються іонами літїю; курсивом виділено молекули, залучені у внутрішньоклітинну сигналізацію

ДАГ інактивується теж 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* (ПкG), яка також фосфорилує низку клітинних білків (про гуанілатциклазну систему як самостійний регулятор функцій клітин див. підрозд. 2.4).

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.

2.3. Інозитолполіфосфати як сигнальні молекули

2.3.1. Шляхи генерування інозитолполіфосфатів

Як уже зазначалося, **фосфорилування I-1,4,5-P₃ до інозитолтетракісфосфату I-1,3,4,5-P₄** здійснюється ферментом *інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кіназою* (IP3K). I-1,3,4,5-P₄ при цьому стає вихідною сполукою для синтезу низки інозитол-

поліфосфатів, зокрема, вищих інозитолполіфосфатів – IP5, IP6, IP7, IP8. Термін **інозитолполіфосфати (IPs)** використовують для назви похідних інозиту, 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 Ca²⁺-мобілізуючий агент **інозитол-1,4,5-трифосфат**. Інозитолпірофосфати були ідентифіковані пізніше – у середині 90-х років ХХ ст. Загалом IPs залучені в численні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи і регулюють найрізноманітніші процеси, включаючи гомеостаз кальцію, транскрипцію, експорт мРНК із ядра.

Клітинні рівні IPs регулюються ланцюгом реакцій фосфорилування й дефосфорилування, причому більшість ферментів, залучених у них, каталізують більш ніж одну реакцію (рис. 2.27). IPs-генеруючі шляхи є різними для дріжджів, рослин і тварин.

У дріжджів I-1,4,5-P₃ є першим субстратом для ланцюга інозитолфосфаткіназних реакцій. *Мультифункціональна кіназа Ipk2*, аналогами якої є ІРМК у щурів та інозитол-1,3,4,6-P₄-5-кіназа в людини, фосфорилує I-1,4,5-P₃ у шостому, а надалі – і в третьому положенні з утворенням **I-1,3,4,5,6-P₅**.

У людини та інших ссавців, як уже зазначалося, I-1,4,5-P₃ спочатку фосфорилується *кіназою IP3K* з утворенням **інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфату (I-1,3,4,5-P₄)**. Останній надалі може або метаболізуватися до вільного інозиту, або дефосфорилуватися *IP-5-фосфатазою* з утворенням **іншого інозитолтрифосфату – I-1,3,4-P₃**.

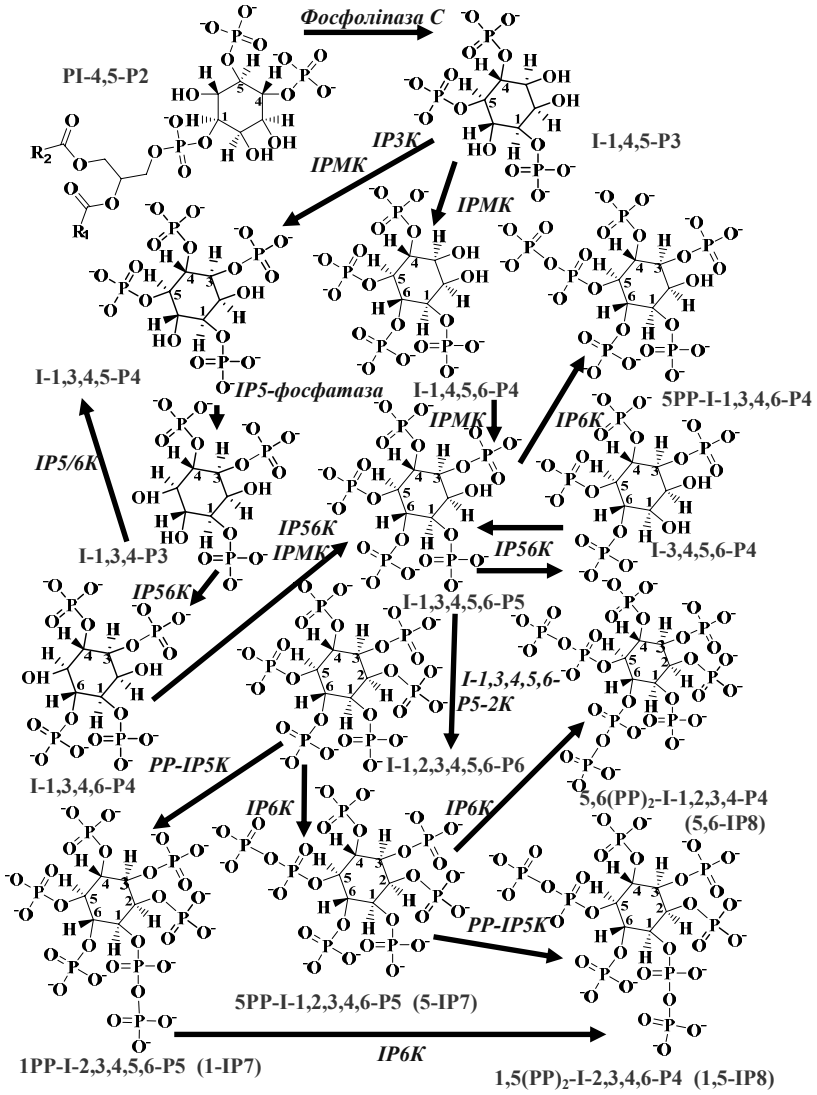
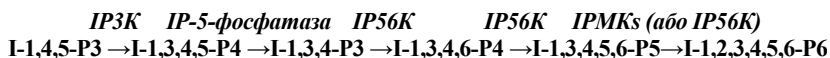


Рис. 2.27. Шляхи генерування інозитолполіфосфатів

Інша кіназа дріжджів – *Ipk1* – надалі фосфорилує I-1,3,4,5,6-P5 у другому положенні з утворенням I-1,2,3,4,5,6-P6.

I-1,3,4-P3 у подальшому може дефосфорилуватися до I-1,3-P2, I-1-P та I (вільного інозитулу) або до I-3,4-P2, I-3-P та I (іони літію інгібують продукцію I із I-1-P та I-3-P, унаслідок чого продукція P1-4,5-P2 – субстрату для фосфоліпази C – також знижується). I-1,3,4-P3 також є основним субстратом для *інозитол-3,4,5,6-тетракісфосфат-5/6-кінази* (*Inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate-5/6-kinase, IP56K*) [Miller G. et al.]. Цей фермент каталізує швидкість-лімітуючий етап синтезу вищих інозитолполіфосфатів у тварин і генерує **інозитолтетракісфосфати – як I-1,3,4,5-P4, так і I-1,3,4,6-P4**, які стають ключовими проміжними продуктами в синтезі всіх інших інозитолтетракісфосфатів та вищих інозитолполіфосфатів у ссавців. Таким чином, цей фермент регулює баланс між ізомерами інозитолтетракісфосфату – I-1,3,4,5-P4 та I-1,3,4,6-P4. Крім того, IP56K має мутазну активність щодо цих ізомерів, каталізуючи реакцію внутрішньомолекулярного перенесення фосфатної групи. Для перебігу цієї реакції необхідні іони магнію та АДФ.

Окрім цього, IP56K фосфорилує I-3,4,5,6-P4 у першому положенні з утворенням **інозитолпентакісфосфату – I-1,3,4,5,6-P5**, який також може дефосфорилуватися до інозитулу або ж надалі фосфорилуватися до **інозитолгексакісфосфату – I-1,2,3,4,5,6-P6**:



Реакція утворення I-1,3,4,5,6-P5 є важливим регуляторним механізмом, оскільки I-3,4,5,6-P4 є інгібітором Ca²⁺-залежних Cl⁻-каналів ПМ, а I-1,3,4,5,6-P5 – не має такої дії.

IP56K за наявності магнію і нуклеотидів може діяти як інозитолфосфатфосфатаза – так, цей фермент може дефосфорилувати інозитолтетракісфосфати I-1,3,4,5-P4 і I-1,3,4,6-P4 до інозитолтрифосфату I-1,3,4-P3, а також інозитолпентакісфосфат I-1,3,4,5,6-P5 до інозитолтетракісфосфату I-3,4,5,6-P4. Останню реакцію, крім того, може здійснювати фермент *інозитол-1,3,4,5,6-P5-1-фосфатаза*. IP56K також має протеїнкіназну активність, яка на сьогодні погано вивчена.

Інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кіназа, що перетворює **інозитол-1,4,5-трифосфат** на **інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфат**, належить до Ca²⁺/КМ-регульованих ферментів (в активації IP3K бере участь CaM-кіназа II) та в людини має три різні ізоформи,

що кодуються різними генами – IP3KA, IP3KB, IP3KC [Lloyd-Burton S. et al.]. Крім того, є ще один фермент – *мультикіназа інозитолфосфатів (IPMK)*, також відома як Ipk2 та Arg82 у дріжджів), що має широкий спектр кіназних активностей щодо інозитолфосфатів, включаючи й I-1,4,5-P3-3-кіназну активність. Функції IP3K – видалення I-1,4,5-P3 та генерація I-1,3,4,5-P4. Особливо високі активності цього ферменту в мозку.

Молекули IP3Ks у своєму складі мають як мінімум два основні функціональні домени. С-термінальний домен є висококонсервативним серед різних ізоформ і видів і має каталітичну активність. Регуляторний N-термінальний домен має Ca^{2+} /КМ-зв'язувальну ділянку, також відповідає за регуляцію внутрішньоклітинною локалізацією і визначає взаємодію із субстратом. У нейронах, наприклад, IP3KA є сполученою із F-актиновими філаментами цитоскелета та регулюється іонами Ca^{2+} , IP3KB асоційована як із F-актиновими філаментами цитоскелета, так і з ЕПР, де регулюється протеазами, IP3KC є цитозольною, рідше – ядерною формою. Видалення з N-кінця ізоформи IP3KA 66-ти амінокислот робить цю форму ферменту цитозольною.

Ізоформи IP3KA і IP3KB потужно активуються комплексом $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$ (IP3KB – більш виражено). Ефект цього комплексу на ізоформу С є більш комплексним і може бути видоспецифічним.

Ca^{2+} /КМ-зв'язувальна ділянка в регуляторному домені містить висококонсервативний для всіх форм IP3Ks залишок триптофану. Фермент *C. elegans*, гомологічний за функціями IP3K, не має цього залишку і не здатний зв'язувати $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$. Ензим-гомолог IP3Ks у *Drosophila* має дві форми – Ca^{2+} /КМ-незалежну (подібно до *C. elegans*, вона не має консервативного залишку триптофану) і Ca^{2+} /КМ-залежну (як у ссавців). Це вказує на те, що, по-перше, залежність цього ферменту від комплексу $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$ еволюціонувала, а, по-друге, що вона не залучена в базальну ферментативну активність IP3K, оскільки у більшості примітивних організмів фермент є активним, проте Ca^{2+} /КМ-нечутливим.

IP3Ks функціонують як негативні регулятори I-1,4,5-P3-індукованих кальцієвих сигналів через їхню здатність перетворювати I-1,4,5-P3 на I-1,3,4,5-P4 і таким чином видаляти I-1,4,5-P3. Продукт цієї реакції – I-1,3,4,5-P4 – залежно від типу

клітин та його концентрації здатний надалі по-різному регулювати гомеостаз кальцію. Серед трьох ізоформ ІРЗКс ссавців найбільш ефективною у зупинці Ca^{2+} -сигналів є С-ізоформа, яка найменше залежить від комплексу $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$ і не має сайта для фосфорилування $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -кіназою.

Мультикінази інозитолфосфатів мають структурну подібність до ІРЗКс. У **дріжджів та щурів** цей фермент має переважно *I-1,4,5-P3-3/6-кіназу активність* і залучений у перетворення **I-1,4,5-P3** на **I-1,3,4,5,6-P5**. ІРМК людини в основному функціонує як *I-1,3,4,6-P4-5-кіназа* (основна активність), проте цей фермент може мати й *I-1,4,5-P3-3-кіназу активність*, діючи як ІРЗК. У той же час *основною функцією цього ферменту в клітинах дріжджів, дрозофіли та ссавців є все ж таки продукція вищих інозитолполіфосфатів, а не видалення I-1,4,5-P3 й регуляція Ca^{2+} -сигналів.*

Отже, у ссавців є чотири основні ферменти – ІРЗКс, ІР-5-фосфатаза, ІРМКс та ІР56К, комплексна і послідовна дія яких веде до утворення таких вищих інозитолполіфосфатів як **I-1,3,4,5,6-P5 (ІР5)** та **I-1,2,3,4,5,6-P6 (ІР6)**. У свою чергу, ці сполуки є субстратами для інших ферментів, залучених у синтез інозитолпірофосфатів. До таких інозитолпірофосфатсинтаз належать *інозитолгексакісфосфаткінази (ІР6Кс, які часом позначаються як ІНРКс – від inositol hexakisphosphates kinases)* та *дифосфоінозитолпентакісфосфаткінази (РР-ІР5К, або ІР7Кс)*. Ці кінази, зокрема, здатні продукувати такі інозитолпірофосфати, як **пірофосфоінозитолпентакісфосфат (РР-ІР5, або ІР7)** та **дипірофосфоінозитолтетракісфосфат ((РР)₂-ІР4, або ІР8)**. Окрім цих основних інозитолпірофосфатів також ідентифіковані й інші, які продукуються із менш фосфорильованих ІРс під впливом однієї з родин інозитолпірофосфатсинтаз (наприклад, похідними інозитолтетракісфосфатів (ІР4) є РРІР3 та (РР)₂ІР2).

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 (ІР6) на пірофосфоінозитолпентакісфосфат (ізомер 5РР-ІР5 (або 5-ІР7));**

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

У цих реакціях IP6Ks утилізують АТФ як донор фосфату. Втрата зазначеної ферментативної активності у дріжджів приводить до дефектів відповіді на осмотичний стрес, регуляції довжини теломер, вакуолярного біогенезу, ендоцитозу та порушення інших клітинних процесів. 5PP-IP5 також виступає донором фосфатів і здатний безпосередньо фосфорилувати білки у ферментативній реакції.

Активність IP6Ks також є необхідною, хоча й не обов'язковою, для синтезу дипірофосфоінозитолтетракісфосфату (1,5(PP)₂-IP4, або IP8) – ще більш фосфорильованого виду інозитолпірофосфатів, що містить дві пірофосфатні групи. Показано, що рівні 1,5(PP)₂-IP4 залучені у відповіді на осмотичний і тепловий шок як у клітинах дріжджів, так і в клітинах ссавців. Також 1,5(PP)₂-IP4 разом із 5PP-IP5, ймовірно, відіграє роль у цАМФ-опосередкованих сигнальних шляхах при регуляції хемотаксису *Dictyostelium discoideum*, оскільки рівні цих метаболітів значно змінюються протягом цАМФ-залежної сигналізації.

In vitro показано, що IP6Ks також може генерувати більш комплексні молекули, що містять два або навіть три пірофосфатні групи.

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 **дифосфоінозитолполіфосфатфосфогідролазами** (*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 (Ар6А), а також неорганічні поліфосфати (polyP) (див. дод., п. 2).

2.3.2. Функції інозитолполіфосфатів

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-I-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 Ca²⁺/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 [Irvine R.]. 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 (рис. 2.28). 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 пере-

важати, 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.

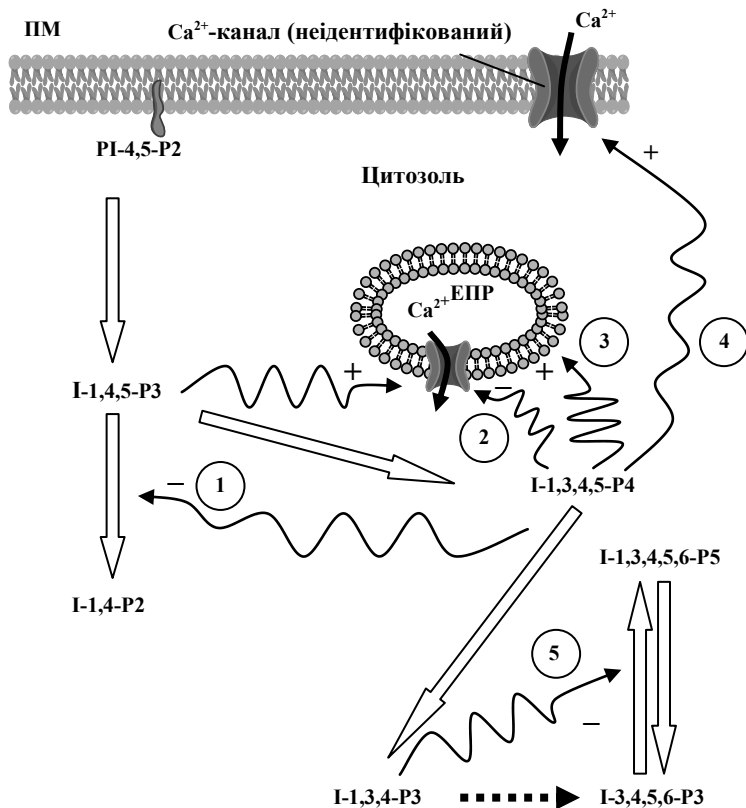


Рис. 2.28. Внутрішньоклітинні ефекти I-1,3,4,5-P₄:
 1 – інгібування I-1,3,4,5-P₄ гідролізу I-1,4,5-P₃; 2 – інгібування I-1,4,5-P₃-стимульованої мобілізації кальцію високими концентраціями I-1,3,4,5-P₄; 3 – позитивний вплив I-1,3,4,5-P₄ на мобілізацію Ca²⁺ через регуляцію структури ЕПР; 4 – прямий вплив I-1,3,4,5-P₄ на деякі ще неідентифіковані Ca²⁺-канали; 5 – інгібування I-1,3,4-P₃ ферменту I-3,4,5,6-P₄-1-кінази (за [Irvine R.]])

Захищаючи I-1,4,5-P3 від гідролізу, I-1,3,4,5-P4 опосередковано сприяє I-1,4,5-P3-залежній мобілізації Ca²⁺ 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 Ca²⁺ із ЕПР, веде до зростання вмісту цього іона у клітині; підвищені рівні Ca²⁺ активують IP3К, яка, у свою чергу, генерує I-1,3,4,5-P4, що в надлишку вимикає I-1,4,5-P3-рецептори і знижує вміст Ca²⁺ у клітині.

I-1,3,4,5-P4 може певним чином регулювати структуру ЕПР. Ця дія I-1,3,4,5-P4 залучає два протеїни – асоційований із ПМ білок GAP1^{SH4BP}, що належить до родини білків-активаторів ГТФаз (підрозд. 2.1) і виступає основним кандидатом на роль рецептора до I-1,3,4,5-P4, та ще один високогомологічний до нього білок ендоплазматичного ретикулума – GAP1m, що є рецептором до інозитолового ліпиду фосфатидилінозитол-3,4,5-трисфосфату (PI-3,4,5-P3). Гідрофільна голівка PI-3,4,5-P3 за будовою дуже схожа на I-1,3,4,5-P4, тому будь-який PI-3,4,5-P3-рецептор може специфічно розпізнавати I-1,3,4,5-P4. Приєднання I-1,3,4,5-P4 до мембрано-заякореного домену GAP1^{IP4BP} чи GAP1m спричиняє відокремлення цих білків від відповідних мембран. У цілому, регуляторні ефекти як I-1,3,4,5-P4, так і PI-3,4,5-P3 на структуру ЕПР мають відношення до організації та динаміки систем ендомембран, особливо в ділянці біля ПМ (оскільки це головний сайт синтезу PI-3,4,5-P3 і локалізації GAP1^{SH4BP}).

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 іншо-

го 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 комплекси сполуки. Взаємодіючи з іонами Fe^{3+} , I-1,2,3,4,5,6-P6 запобігає Fe^{3+} -опосередкованому утворенню в клітинах активних форм кисню (розд. 6) і виконує таким чином антиоксидантну роль. Крім того, здатність інозитолгексакісфосфату зв'язувати залізо дає змогу розглядати його як потенційний низькомолекулярний переносник заліза в клітині.

I-1,2,3,4,5,6-P6 також має ряд ефектів на рівні ядра. Зокрема, він залучений у репарацію ДНК, експорт мРНК із цієї органели, у регуляцію транскрипції, розвиток лімфоцитів, регуляцію структури хроматину.

I-1,2,3,4,5,6-P6 залучається в регуляцію везикулярного транспорту й ендоцитозу, а також модулює внутрішньоклітинну кальцієву сигналізацію. Наприклад, він присутній у багатьох ділянках мозку, де його вміст зростає під час нейрональної активності. У нейронах ця сполука, стимулюючи активність аденілатциклази і продукцію цАМФ, а також інгібуючи протеїнофосфатази, спричиняє активацію L-типу Ca^{2+} каналів. У гладком'язових клітинах I-1,2,3,4,5,6-P6, імовірно, діє на ці самі кальцієві канали із залученням ПкС.

I-1,2,3,4,5,6-P6 виступає попередником інозитолпірофосфатів – повністю фосфорильоване інозитолове кільце інозитолгексакісфосфату підлягає низці наступних фосфорильовань специфічними кіназами, у результаті чого утворюються молекули, що мають один або два макроергічні пірофосфатні зв'язки.

Інозитолпірофосфати контролюють різноманітні біологічні процеси; можливо, це пояснюється тим фактом, що інозитолпірофосфати контролюють метаболізм енергії у клітинах, зокрем, гліколіз і окисне фосфорильовання 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.

Ці сполуки, на відміну від I-1,2,3,4,5,6-P6, не утворюють солі з магнієм, оскільки їхня пірофосфатна група на місті фосфатної може руйнувати структуру новоствореного комплексу.

Два основні механізми клітинних функцій інозитолпірофосфатів передбачають зв'язування певних ділянок білків і пірофосфорилування.

Більшість інозитолпірофосфатів фізіологічно сполучаються з рядом білків, зокрема з їхніми РН-доменами. Біологічною функцією РН-доменів є зв'язування мембранних фосфоліпідів – 3'-фосфорильованих фосфатидилінозитолів, які утворюються під впливом ферменту РІЗК (наприклад, РІ-3,4,5-Р3), що забезпечує мембранну локалізацію цих білків. Зокрема, протеїнкіназа Акт є РН-вмісним білком, що набуває здатності взаємодіяти з ПМ при утворенні в ній РІ-3,4,5-Р3 під впливом РІЗК, активованої гормонами, зокрема інсуліном, або ростовими факторами (підрозд. 4.2). 5-IP7, зв'язуючи РН-домен кінази Акт, запобігає її РІ-3,4,5-Р3-опосередкованій активації та навіть може бути причиною виникнення інсулінової резистентності

Пірофосфатвмісні інозитолполіфосфати IP7 та IP8, як уже було відмічено, можуть виступати високоенергетичними неферментативними донорами фосфатів при неферментативному фосфорилуванні білків, зокрема, ядерних протеїнів (А. Сайарді, 2004). Крім того, вони можуть віддавати високоенергетичний фосфат АДФ з утворенням АТФ.

Ще один пірофосфатвмісний інозитолполіфосфат – **пірофосфоінозитолтетракісфосфат 5PP-IP4**, що утворюється із інозитолпентакісфосфату I-1,3,4,5,6-P5 під впливом ферментів IP6Ks, регулює довжину теломер [Saiardi A.].

Функції інших уже ідентифікованих інозитолпірофосфатів – $(PP)_2IP3$ (похідна інозитолпентакісфосфату), а також $PPIP3$ та $(PP)_2IP2$ (похідні інозитолтетракісфосфату) – дотепер ще не вивчені [Bennett M. et al.].

2.4. Гуанілатциклазна система як самостійний регулятор функцій клітин

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 кишечника, 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).

Характеристики мембранозв'язаних гуанілатциклаз наведено в табл. 2.7.

Таблиця 2.7. Типи мембранозв'язаних гуанілатциклаз

Мембранозв'язана гуанілатциклаза	Ліганд	Тканинна специфічність
GCA	Натрійуретичний пептид	Жирова тканина, мозочок кишечника, нирки, плацента, мозкова частина надниркових залоз, серцевий м'яз, гіпофіз тощо
GCB	Натрійуретичний пептид	Плацента, мозкова частина надниркових залоз, мозочок, аорта, передсердя, легені, кишечник, гіпофіз, шлуночок тощо
GCC	Бактеріальний теплостабільний ентеротоксин	Слизова оболонка кишечника
GCD	?	Епітелій органів нюху
GCE	?	Сітківка, шишкоподібна залоза
GCF	?	Сітківка
GCG	?	Кишечник, нирки, легені, скелетний м'яз

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

Один із лігандів рGCs – *натрійуретичний гормон передсердя* (НП) – 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^+ і води. Гладенькі м'язи судин також містять аналогічну гуанілатциклазну систему, за участю якої зв'язаний з гуанілатциклазою НП здійснює судинорозширювальну дію, сприяючи зниженню кров'яного тиску.

В епітеліальних клітинах кишечника активатором системи мембранозв'язаної гуанілатциклази слугує інший ліганд – *термостабільний ендотоксин грамнегативних бактерій*, що спричиняє уповільнення всмоктування води в кишечнику й розвиток діареї.

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 α - і β -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 (табл. 2.8).

Таблиця 2.8. Субодиниці – складові розчинних гуанілатциклаз

Субодиниця	Тканинна специфічність
$\alpha 1$	Легені, мозок, серце, нирки, печінка, скелетні м'язи
$\alpha 2$	Мозок, сітківка, нирки, плацента
$\beta 1$	Легені, мозок, серце, нирки, печінка, скелетні м'язи, плацента
$\beta 2$	Нирки, печінка

Одним із добре відомих активаторів розчинної форми гуанілатциклази є монооксид азоту (NO) (розд. 5), який утворюється із амінокислоти аргініну за участю NO-синтази (рис. 2.29). NO сполучається із гемовою простетичною групою розчинної гуанілатциклази – при цьому утворюється *нітрозогем*. Фермент активується також деякими *нітрозовазоділяторами* (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 (рис. 2.29). Ще одним важливим активатором даного ензиму є монооксид вуглецю (CO) (підпідрозд. 9.2). Однак, якщо під впливом монооксиду азоту гуанілатциклазна активність зростає у 100–400 разів відносно базального рівня, дія CO демонструє лише чотирикратне зростання цього показника.

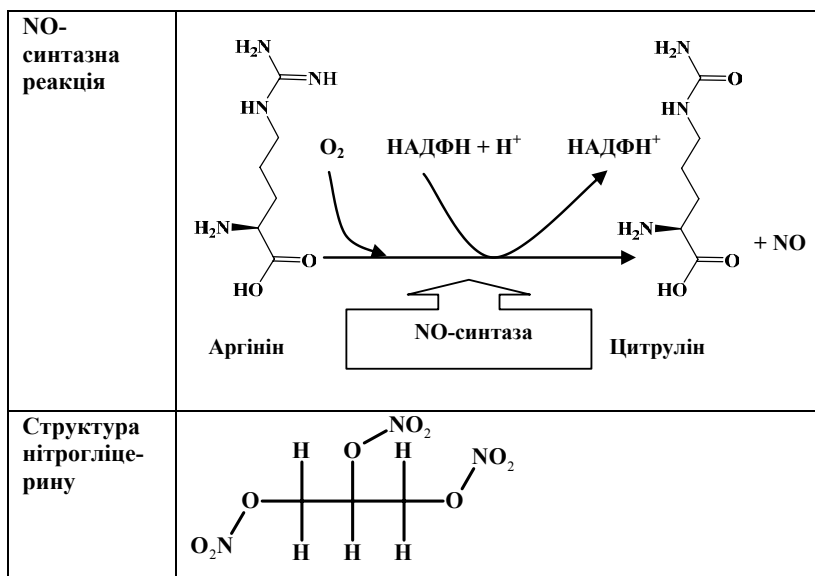


Рис. 2.9. Ферментативний синтез NO та стимуляція монооксидом азоту та його донорами утворення цГМФ. Схема синтезу активатора розчинної гуанілатциклази – оксиду азоту – за участю NO-синтази; формула донора NO – нітрогліцерину

Закінчення рис. 2.9.

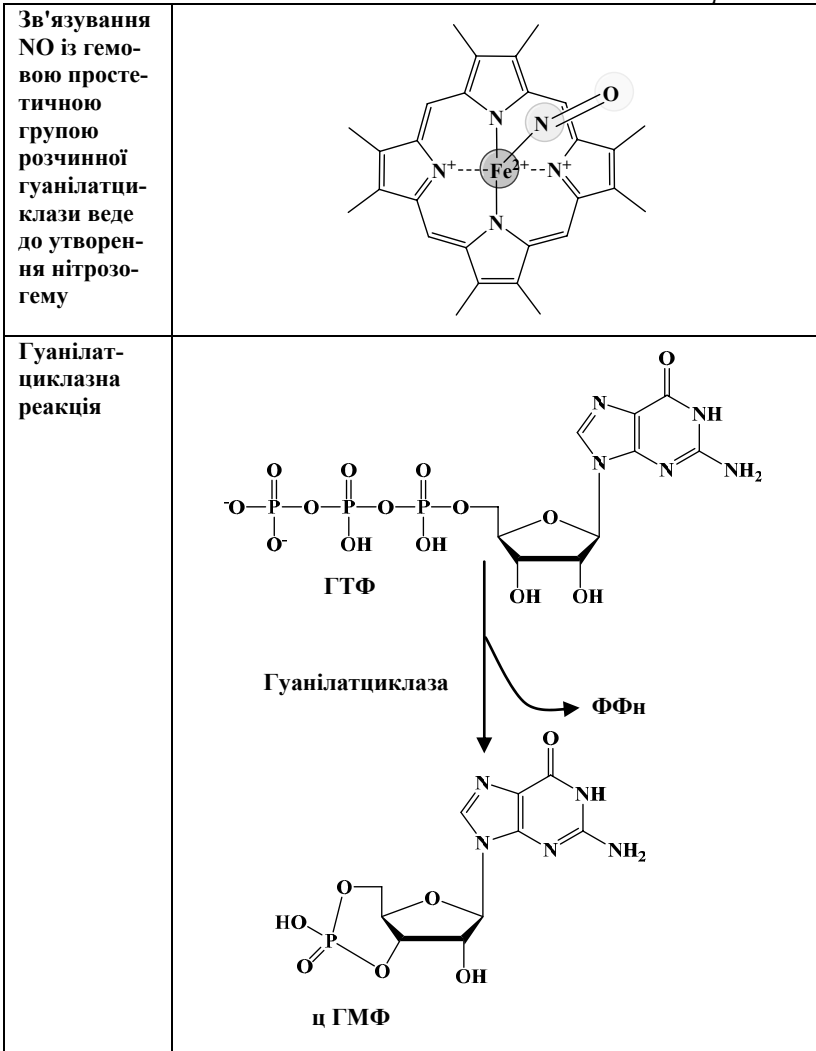


Рис. 2.29. Ферментативний синтез NO та стимуляція монооксидом азоту та його донорами утворення цГМФ. Механізм активації оксидом азоту гуанілатциклази й гуанілатциклазна реакція

Кожна субодиниця sGC має три функціональні домени:

- *N-кінцевий гем-зв'язувальний домен* (наявність гемової протетичної групи необхідна для активації ферменту оксидом азоту або монооксидом вуглецю). Окиснення заліза гемової групи до Fe^{3+} веде до втрати ферментативної активності, тоді як відновлювальні агенти (тіоли, аскорбат) підвищують цей показник;

- *домен, залучений у димеризацію;*

- *S-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 PкGs 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 α -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 I-1,4,5-P3 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 A_2* (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^{2+} -залежна цитозольна фосфоліпаза A_2 , 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 ПкG2 є хлорний канал CFTR (підпрозд. 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 ПкG, може стимулюватися цАМФ-залежною ПкA. Фосфорилування CFTR за участю ПкG або ПкA 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^+ , K^+ та Ca^{2+} через біологічні мембрани (детально про CNGCs див. підрозд. 2.1).

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 – цАМФ (підрозд. 2.1). 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) [Francis S. et al.], [Lucas K. et al.].

2.5. Механізми дії стероїдних гормонів

Стероїдні гормони – жиророзчинні сполуки, похідні холестеролу (*глюкокортикоїди* – кортизол, кортикостерон; *мінералокортикоїди* – альдостерон; вітамін D, *статеві гормони* – прогестерон, тестостерон). Завдяки своїй вираженій гідрофобності (яку молекули надають стероїдне ядро, аліфатичні бічні ланцюги і метильні групи), ці сполуки здатні легко перетинати ПМ і тому не потребують наявності на мембрані специфічних рецепторів (рис. 2.30).

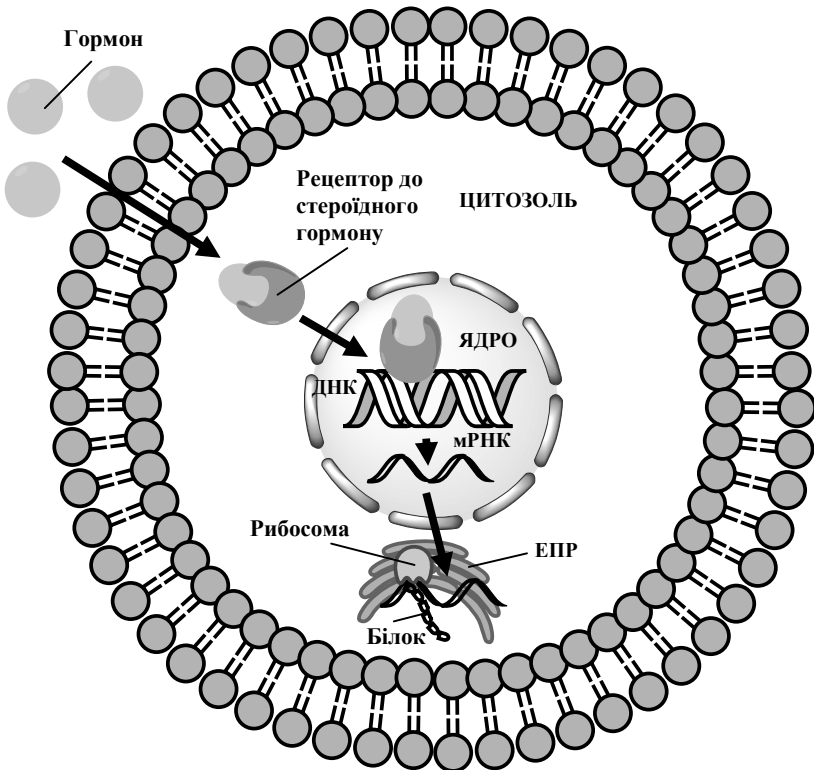


Рис. 2.30. Схема дії стероїдних гормонів на клітину

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 стероїдочутливих клітинах локалізовані в ядрі. Однак через високу гідрофобність стероїдів малоймовірно, 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 (рис. 2.31):

- **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.**

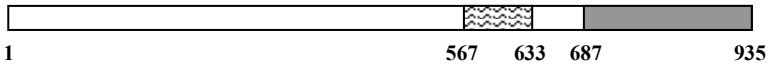
Рецептори до стероїдних гормонів, як і інші білки, здатні сполучатися із ДНК, у складі ДНК-зв'язувальної ділянки містять певну кількість структур типу "цинкових пальців". Верхівки цих утворень контактують з великою борозенкою ДНК, причому сусідні "цинкові пальці" сполучаються із протилежними сторонами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

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

**Естрогеновий
рецептор людини**



**Прогестероновий
рецептор людини**



**Тиреоїдний
рецептор людини**

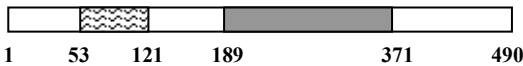


Рис. 2.31. Доменна будова рецепторів до стероїдних і тиреоїдних гормонів

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 (рис. 2.32).

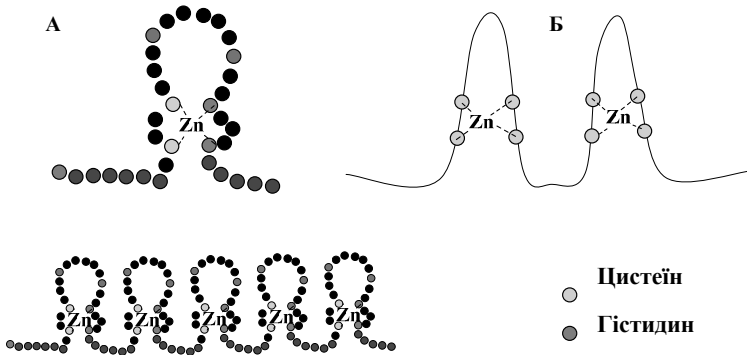


Рис. 2.32. Порівняльна структура класичних "цинкових пальців" (А) та "цинкових пальців" стероїдних рецепторів (Б)

ДНК-зв'язувальний домен рецепторів до стероїдних гормонів містить два "цинкові пальці" іншого типу – Cys₄, у якому іон цинку 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 (Т₄, Т₃) є високогомологічними до рецепторів стероїдних гормонів (рис. 2.31) 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 Ca²⁺-канали в ПМ нейронів стовбура мозку. Ця дія відбувається так швидко, що активація синтезу білків не встигає включитися. Тестостерон стимулює транспорт глюкози, іонів Ca²⁺, амінокислот у клітинах нирок щурів (Ca²⁺ – ще й серця).

Розділ 3

ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТИРОЗИНУ ЯК МЕХАНІЗМ РЕГУЛЯЦІЇ ВНУТРІШНЬО- КЛІТИННИХ ПРОЦЕСІВ

Сьогодні в організмі людини виявлено близько 500 ферментів, які каталізують реакції фосфорилування білкових молекул. Приблизно 400 з них є **цитозольними серин/треоніновими протеїнкіназами** (ПкА, ПкС, ПкG, ПкB/Akt, протеїнкінази, що активуються мітогенами (MAPKs), Ca^{2+} , кальмодулінзалежна протеїнкіназа (CaMK), фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI3K), фосфатидилінозитолзалежна кіназа-1 (PDK1)), тоді як інші належать до **тирозинових протеїнкіназ** – **трансмембранних** (інсуліновий рецептор, рецептор до епідермального ростового фактора (EGF-R) тощо) або **цитозольних** (Src, Janus-кінази та ін.). Крім того, нещодавно виявлено існування **протеїнкіназ подвійної специфічності** (*dual-specificity protein kinases, DSPKs*, К.Ф. 2.7.12.1), здатних функціонувати і як серин/треонінові, і як тирозинові протеїнкінази. Прикладами таких ферментів є, зокрема, компоненти RAS–RAF–MEK–ERK сигнального каскаду MAP кіназ (підпідрозд. 3.1.3.2) – MAP2K1/MEK1 та MAP2K2/MEK2 – що здатні фосфорилувати залишки треоніну і тирозину в послідовності Thr–Glu–Tyr у межах протеїнкінази ERK [Roskoski R.]. Відкривачами тирозинового фосфорилування – процесу, який полягає у приєднанні залишку фосфорної кислоти до ОН-групи амінокислоти тирозину – стали 1950-х рр. Едвін Кребс і Едмонд Фішер. Тепер доведено, що фосфорилування залишків тирозину є одним із механізмів внутрішньоклітинної регуляції активності численних білкових молекул, зокрема, ферментів, рецепторів, іонних каналів і транспортних систем. Схему фосфорилування тирозину і тирозинвмісного білка наведено на рис. 3.1.

Роль протеїнкіназ у регуляції метаболізму пов'язана з модуляцією певних етапів внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що опосередковують метаболізм, транскрипцію генів, регуляцію клітинного циклу, диференціювання клітин, функціонування цитоскелета, міграцію клітин, апоптоз, міжклітинні взаємодії, імунологічну й нейрональну активності тощо.

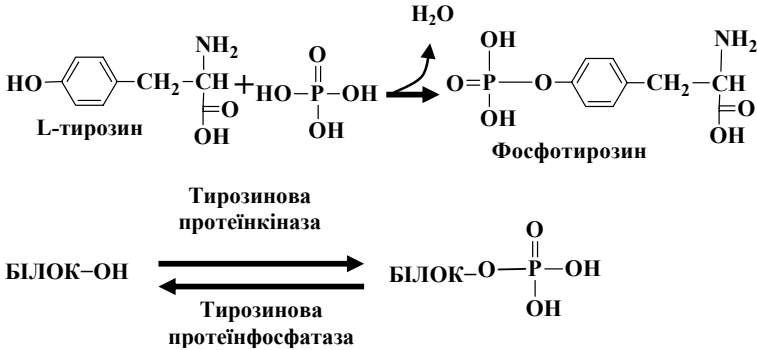


Рис. 3.1. Схема фосфорилування тирозину і тирозинвмісного білка

Фосфорилування білків є одним із найбільш загальних механізмів регуляції їхніх функцій (рис. 3.2) – адже модифікований таким чином білок може змінювати свою активність і (або) внутрішньоклітинну локалізацію, підлягати убиквітинуванню та деградації у протеасомі (підпідрозд. 3.1.3.2).

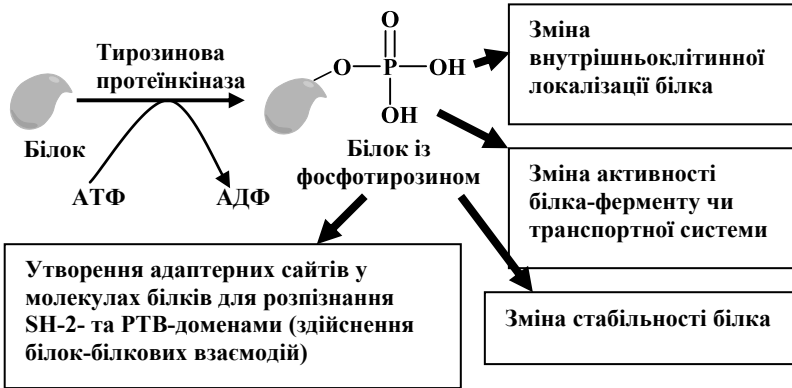


Рис. 3.2. Схема залучення тирозинового фосфорилування у регуляцію функцій білків-мішеней

Фосфорилування білків також зумовлює можливість їх взаємодії з іншими білками, у структурі яких є відповідні *адаптерні домени* (або *білкові модулі*) для розпізнання фосфорильованих залишків амінокислот. Результатом таких білок-білкових взаємодій є активація або інгібування різних сигнальних систем.

Найважливіші сигнальні адаптерні домени (рис. 3.3) можна поділити на дві групи – *ті, що розпізнають олігопептидні мотиви у структурі білків* (SH2, PTB, SH3, WW та ін.) і *ті, що сполучаються з певними групами у складі білків і ліпідів* (PH тощо), сприяючи формуванню не лише білок-білкових, але й білок-фосфоліпідних взаємодій.

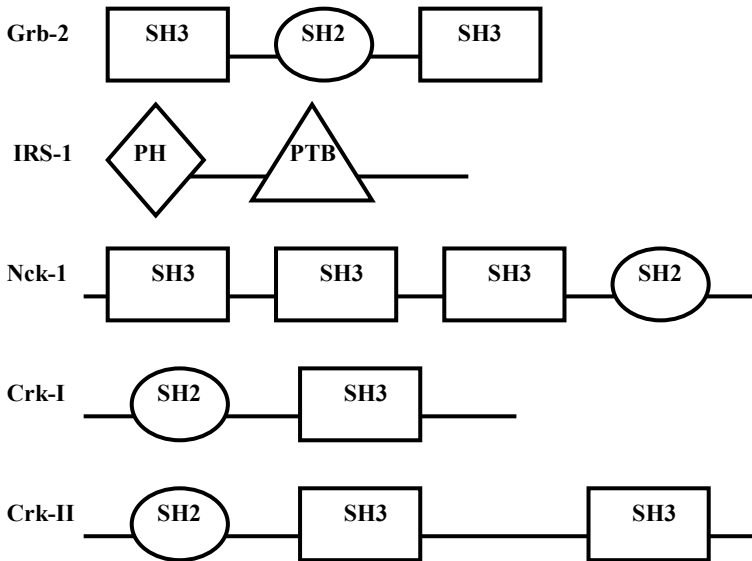


Рис. 3.3. Адаптерні домени у складі білкових молекул (як приклад наведено адаптерні білки, єдиною функцією яких є здійснення білок-білкових та білок-ліпідних взаємодій)

При цьому білки із двома (чи більше) адаптерними доменами асоціюють із двома (або більше) партнерами по зв'язуванню, що веде до утворення "функціональних комплексів" – або з активованим мембранним рецептором, або в примембранній ділянці, або вільно в цитоплазмі.

SH2-домени (*Src homology region 2*, друга ділянка гомології *Src*) складаються приблизно зі 100 амінокислотних залишків і високоафінно зв'язуються з пептидними послідовностями, що містять фосфорильований залишок тирозину. Вони присутні в молекулах усіх нерецепторних (цитозольних) тирозинових протеїнкіназ і в основному локалізовані на їхньому N-кінці; також у великій кількості їх виявляють і в інших білках.

PTB-модулі (*phosphotyrosine binding domain*, фосфотирозин-зв'язувальний домен; інша назва – *phosphotyrosine interaction domain (PID)*, домен взаємодії з фосфотирозином) також розпізнають і зв'язують фосфотирозинвмісні послідовності, але за іншим механізмом.

SH3-домени (*Src homology region 3*, третя ділянка гомології *Src*) та **WW-модулі** (домен із двома консервативними залишками триптофану (*W*)) містять відповідно 60 та 40 амінокислот і сполучаються з багатими на пролін послідовностями мішені (8–10 залишків проліну).

PH-домени (*pleckstrin homology domain*, домен гомології *плекстрину*) складаються із близько 100 амінокислот і забезпечують сполучення білків із ПМ з утворенням сигнального комплексу. Деякі з цих доменів можуть безпосередньо зв'язуватися з мембранними 3'-фосфорильованими інозитоловими фосфоліпідами, що швидко генеруються у ПМ через дію P3K (розд. 4). Інші PH-домени мають меншу спорідненість до мембранних ліпідів, але сполучаються з білками. Ці послідовності наявні, зокрема, у структурі більшості регуляторних малих ГТФ-зв'язувальних білків (наприклад, Ras, Rac, Rho), у молекулах низки серин/треонінових протеїнкіназ (ПкВ/Акт), тирозинової протеїнкінази Брутона (Bruton's tyrosine kinase, Btk).

У системі тирозинового фосфорилування/дефосфорилування для розпізнання залишків фосфорильованого тирозину (фосфотирозину, *pTyr*) у складі білків найважливішими є SH2-домени. В останнє десятиріччя з'явилися численні моделі, що пояснюють структуру та функціонування цього утворення (рис. 3.4, А).

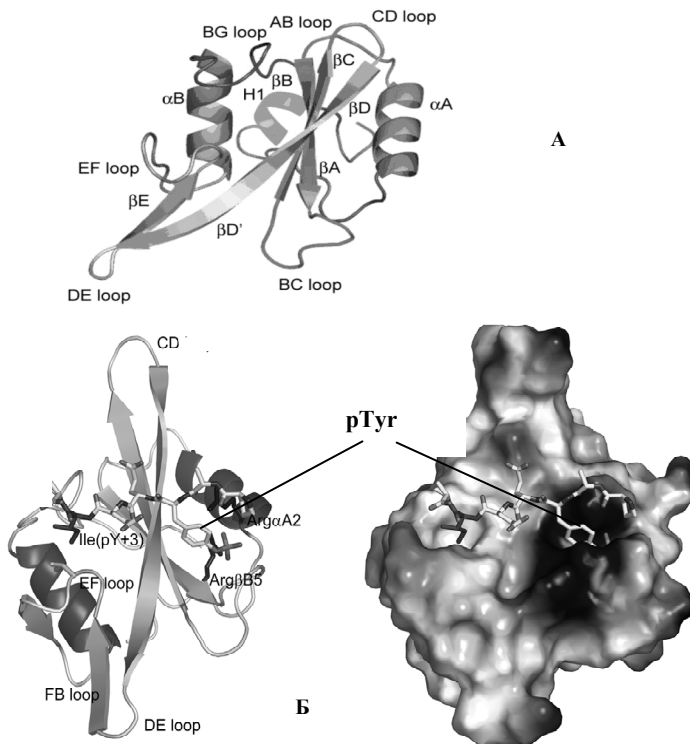


Рис. 3.4. Просторова структура SH2-домену (А) і схема його взаємодії із залишком фосфотирозину у складі білка-мішені (Б). А: βA , βB , βC ... – β -складчасті шари; αA , αB – α -спіралі; АВ-, ВС-, CD-, ... loops – сполучні петлі. Б: pTyr – зв'язаний залишок фосфотирозину у складі фосфорильованого пептиду; Ile (pY + 3) – позиція залишку ізолейцину, розташованого у третьому положенні від залишку фосфотирозину (pTyr) у напрямку С-кінця. Також показано два залишки аргініну (Arg), що здійснюють ключові контакти з pTyr: один із спіралі А, а інший – із шару В

Центральна вісь SH2-домену складається із чотирьох ділянок складчастого шару (βA , βB , βC і βD). Сполучений із SH2-доменом фосфорильований пептид роз'єднує ці шари так, що pTyr лежить з одного боку, а пептидні залишки від pTyr + 1 до pTyr + 5 – з іншого (рис. 3.4, Б). Ключові позитивно заряджені залишки Arg, що відповідають за координацію pTyr, присутні в усіх SH2-доменах. Вони

взаємодіють із двома атомами кисню фосфатів негативно зарядженого фосфотирозину через водневий зв'язок і не здатні розпізнавати нефосфорильований залишок тирозину.

Залишки в BG- і EF-петлях визначають специфічність різних SH2-доменів відносно залишків амінокислот, розташованих на C-кінці молекули після рТуг.

За механізмом розпізнання SH2-доменом фосфотирозинвмісних мішеней усі SH2-домени поділяють на дві групи:

- **Src-подібні SH2-домени** – є специфічними до негативно заряджених залишків у позиціях рТуг + 1 і рТуг + 2, використовують гідрофобний "карман" для вибору аліфатичних залишків у положенні рТуг + 3 і містяться, зокрема, у молекулах цитозольних тирозинових протейніназ Src, Fyn, Hck і Nck (рис. 3.5).

- **Фосфоліпаза C-подібні SH2 домени** – використовують довгий гідрофобний "ключ" для вибору аліфатичних залишків у положеннях від рТуг + 1 до рТуг + 5.

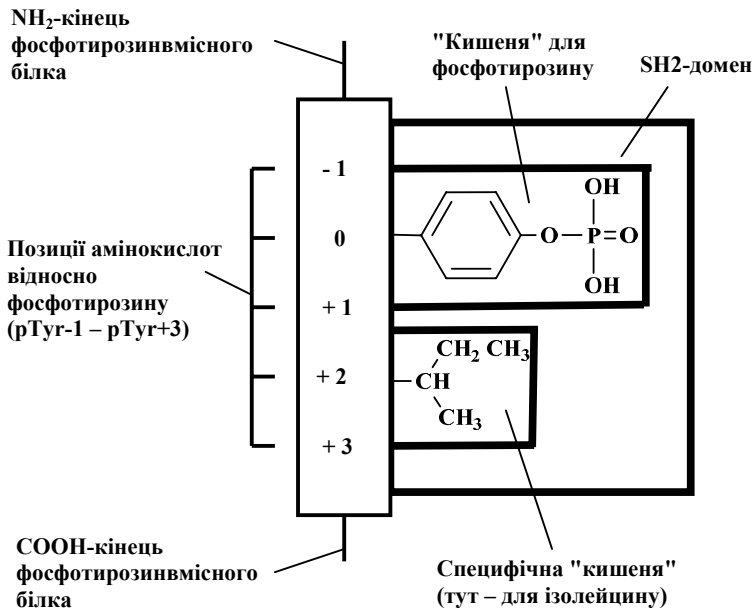


Рис. 3.5. Схема розпізнання фосфотирозину і специфічних амінокислот Src-подібним SH2-доменом

Білки, що містять SH2- і SH3- домени, за біологічною дією поділяють на дві групи:

I – **білки, що мають ферментативну активність або відомі функції**, наприклад:

- цитоплазматичні тирозинові протеїнкінази родин Src, Abl, Csk (SH2-домен і SH3-домен);
- фосфоліпаза Cγ (два SH2-домени та SH3-домен);
- GAP-120 (SH2-домен і SH3-домен);
- тирозинові протеїнфосфатази PTP1C (два SH2-домени) і PTP1D (SH-PTP2/SYP) (два SH2-домени);
- регуляторна субодиниця p-85 фосфатидилінозитол-3-кінази (два SH2-домени й SH3-домен).

II – **адаптерні білки, що складаються виключно з SH2- і SH3-доменів**:

- білок Shc (SH2-домен);
- білок Nck (SH2-домен, три SH3-домени);
- білок Crk-I (SH2-домен, SH3-домен);
- білок Crk-II (SH2-домен, два SH3-домени);
- білок Grb2 (*growth-factor-receptor-binding protein*, білок, що зв'язується із рецепторами факторів росту) (SH2-домен, два SH3-домени).

3.1. Класифікація і функції тирозинових протеїнкіназ

За систематичною класифікацією тирозинові протеїнкінази (*protein tyrosine kinases*, *PTKs*) – ферменти, що здійснюють перенесення залишку фосфорної кислоти на ОН-групу залишку тирозину в молекулах білків – є *АТФ:протеїн-тирозин-О-фосфо-трансферазами* (КФ 2.7.10.1 – трансмембранні, КФ 2.7.10.2 – цитозольні) [Гусев Н. Б.]. Сьогодні виділяють 17 підкласів трансмембранних РТКs (різняються за структурою позаклітинних доменів) і 10 підкласів цитозольних РТКs (містяться в цитозолі, ЕПР, ядрі та ін.).

3.1.1. Рецепторні (трансмембранні) тирозинові протеїнкінази

Рецепторні, або трансмембранні, PTKs (*receptor protein tyrosine kinases, rPTKs*) пронизують ПМ один раз (рис. 3.6).

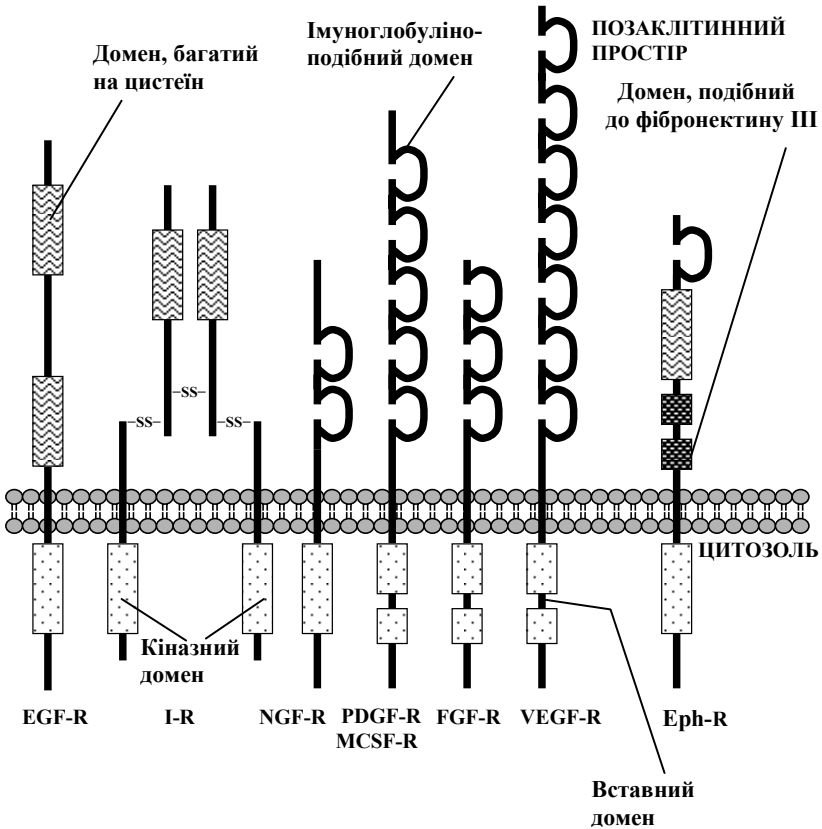


Рис. 3.6. Структура найважливіших представників rPTKs

Молекули rPTKs мають:

- **глікозилований зовнішній (позаклітинний) лігандзв'язувальний домен**, у складі якого різні rPTKs можуть мати:

- багаті на цистеїн ділянки (CR);
- імуноглобуліноподібні ділянки (IgL);
- повтори, характерні для фібрoneктину III (FNIII);
- крингл-домени (або "подвійні петлі" – консервативні елементи вторинної структури білків, у яких поліпептидний ланцюг укладений у вигляді подвійної петлі ("петля в петлі") за допомогою трьох дисульфідних зв'язків; назва зумовлена особливою формою утвореної структури: у перекладі з данського *kringle* – різновид кренделя, популярний у скандинавських країнах);

- багаті на лейцин ділянки (L).

Позаклітинний домен обов'язково містить *сайт зв'язування для лігандів rPTKs*, роль яких можуть виконувати як водорозчинні фактори і білки позаклітинного матриксу, так і поверхневі білки, що експресуються на інших клітинах. Позаклітинний домен також залучений у димеризацію rPTKs – процес, критичний для активації внутрішньої тирозинкіназної активності;

- **трансмембранний домен**, що один раз пронизує ПМ і представлений гідрофобним сегментом із 22–26 амінокислот. Він обмежений ділянкою, багатою на пролін, на N-кінці та кластером лужних амінокислот на C-кінці. Між різними rPTKs у цій ділянці дуже низький ступінь гомології – навіть між близькими rPTKs;

- **внутрішньоклітинний домен**, який складається із *каталітичного домену й низки сайтів для аутофосфорилування*, що регулюють каталітичну функцію і служать "докерними сайтами" для SH2-доменвісних білків. Каталітичний домен (SH1-домен) rPTKs є висококонсервативним і за структурою подібним до каталітичних SH1-доменів нерцепторних (цитозольних) rPTKs (рис. 3.7).

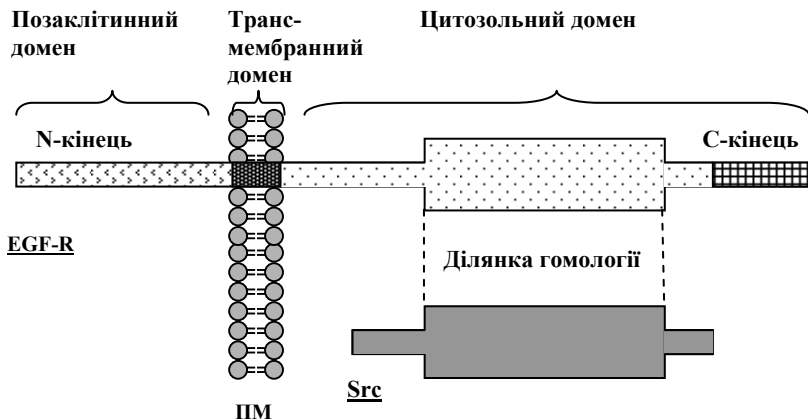


Рис. 3.7. Гомологія у структурі рецепторних і цитозольних РТКs (на прикладі рецептора для EGF та кінази Src відповідно)

За особливостями будови представників усіх 17 підкласів rPTKs поділяються на три групи (рис. 3.8):

I – **мономерні rPTKs** (приклад – рецептор до EGF (*epidermal growth factor, епідермальний фактор росту*)), що мають багаті на цистеїн ділянки (EGF-R – дві такі ділянки);

II – **димерні rPTKs** (приклад – рецептор для інсуліну (*insulin receptor, I-R*), який складається із двох типів субодиниць і в неактивному стані є $\alpha\beta$ -димером. β -субодиниця є інтегральним трансмембранним білком, N-кінець якого міститься поза клітиною, а С-кінець – у цитозолі; α -субодиниця представлена позаклітинним білком, сполученим із β -субодиницею дисульфідним зв'язком. Інсулінзв'язувальний домен розташований у багатій на цистеїн ділянці α -субодиниці; приєднання інсуліну веде до виникнення додаткового дисульфідного зв'язку між α -субодиницями з утворенням активного $\alpha_2\beta_2$ -тетрамеру інсулінового рецептора).

III – **rPTKs, що мають мультиплетні IgL-домени** (приклади – рецептори для FGF (*fibroblast growth factor, фактор росту фібробластів*) – три домени, для PDGF (*platelet-derived growth factor, фактор росту тромбоцитів*) – п'ять доменив). Загальноприйняту класифікацію rPTKs наведено в табл. 3.1.

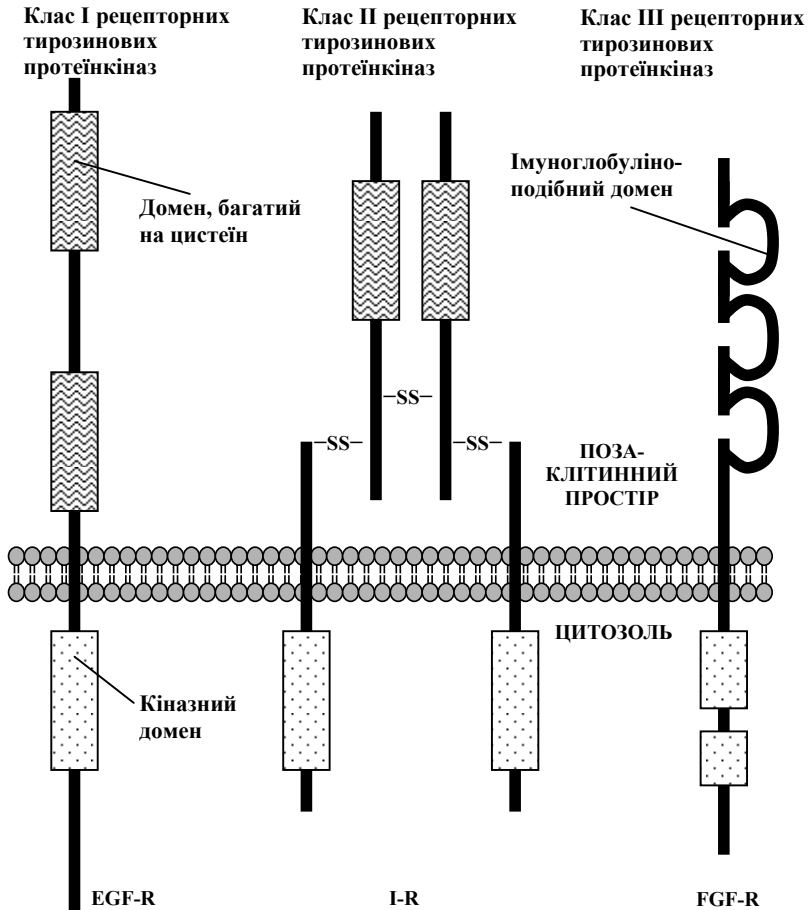


Рис. 3.8. Мономерні, димерні rPTKs та rPTKs з мультиплетними IgL-доменами

Сигнальна трансдукція за участю rPTKs бере початок від індукованої лігандом асоціації рецепторів. Така асоціація запускається конформаційними змінами у позаклітинному домені рецептора, які спричиняються зв'язуванням ліганду (гормону, фактора росту тощо). Так, сполучення інсуліну з інсуліновим рецептором викликає взаємодію двох неактивних димерів ($\alpha\beta$) з утворенням повного тетрамеру: $(\alpha\beta) + (\alpha\beta) = 2\alpha_2\beta_2$. У випадку рецептора до EGF два неактивні мономерні утворюють активний димер.

Таблиця 3.1. Класифікація рецепторних тирозинових протейніназ

Клас	Назва	Кількість білків	Ліганд	Будова позаклітинного домену	Основна функція
I	EGF-R	4	EGF	L; CR	Регуляція клітинної проліферації, диференціювання клітин, клітинного росту, розвитку
II	I-R	2	Інсулін	L, CR, FNIII	Регуляція гомеостазу глюкози
III	PDGF-R	2	PDGF	IgI	Регуляція клітинної проліферації, диференціювання клітин, клітинного росту, розвитку
IV	FGF-R	23	FGF	IgI	Регуляція ангіогенезу, ембріонального розвитку, проліферації та диференціювання клітин
V	VEGF-R	3	VEGF (<i>vascular endothelial growth factor, фактор росту ендотелію судин</i>)	IgI	Регуляція ангіогенезу під час ембріонального розвитку, після ушкодження або тромбозу судин
VI	HGF-R	1	HGF (<i>hepatocyte growth factor, фактор росту гепатоцитів</i>)	CR, IgL, ділянки, багаті на гліцин і пролін (<i>G-P повтори</i>)	Регуляція ембріонального розвитку
VII	Ttk	3	Нейротрофіни: BDNF (<i>brain-derived neurotrophic factor, нейротрофінний фактор мозку</i>), NGF (<i>nerve growth factor, фактор росту нервів</i>), NT-4 (<i>neurotrophin 4</i>)	IgI	Регуляція функцій синапсів, пластичності нервової системи, виживання і диференціювання нейронів

Продовження табл. 3.1.

Щкаєас рРТК	Назва	Кльквксть блктв	Лганд	Будова позакльпннго домечу	Основна функця
VIII	Eph	16	Мембранозв'язаний бллок ефрн	Висококонсер- вативний ефрн- зв'язувальний домен, CR, FNIII	Опосередкування мжкльпннх взаємодй пд час регуляцї ембріонального розвитку; залу- чення в регуляцню ангогенезу, диферен- цювання стовбурових кльпн
IX	AXL	1	Ростовї фактори, подбнї до вїтамїн К-за- лежного бллка, що регулює зупинку кльпннго циклу	IgL, FNIII	Стимуляця пролїферацї кльпн
X	LTK	2	?	Подбний до їнсулїнового рецептора	Контроль кльпннго росту й диференцювання
XI	TIE	2	Ангопестини – бллки, що регулюють ангогенез	IgL, FNIII	Регуляця ангогенезу
XII	ROR	2	Wnt-бллки (модифікованї лїпїдами сїгнальнї глїкопротеїни)	IgL	Регуляця розвитку кїсткової та нервової тка- нини, мїграцї кльпн
XIII	DDR	2	Коллаген рїзного типу	Дїянка, гомоло- гїчна домечу дїскоїдину – бллку амєби Dictyostelium discoideum	Регуляця кльпннго росту, диференцювання й метаболїзму

Закінчення табл. 3.1.

Підклас rPTK	Назва	Кількість білків	Ліганд	Будова позаклітинного домену	Основна функція
XIV	RET	1	GDNF (<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> , <i>нейротрофний фактор гліальних клітин</i>)	CR	Розвиток нирок і нервової системи
XV	KLG	4	?	IgL	Атипова rPTK, що не має тирозинкіназної активності, але виконує певну роль у сигнальних шляхах клітин, зокрема, може слугувати молекулою клітинної адгезії
XVI	RYK	2	?	?	Атипова rPTKs, що не має тирозинкіназної активності; функції невідомі
XVII	MuSK	1	Агрин – протеоглікан, що виробляється нервовими клітинами	?	Відповідає за утворення нейром'язового контакту: під час розвитку закінчення аксонів мотонейронів секретують білок агрин, який, сполучаючись із рецепторами цього класу на поверхні м'язових клітин, сприяє формуванню нейром'язового синапсу

Подібна асоціація дозволяє взаємодіяти цитоплазматичним доменам, що веде до стимулювання цитоплазматичної тирозинкіназної активності та аутофосфорилування цих доменів. Аутофосфорилування залишків тирозину робить гРТКs мішенню для SH2-вмісних білків-субстратів і, крім того, дозволяє гРТКs залишатися активними навіть після того, як ліганд, що подіяв, дисоціює від рецептора.

Спрощену схему функціонування гРТКs (рис. 3.9) можна зобразити таким чином: зв'язування гРТКs ліганду → асоціація молекул рецепторів (димеризація гРТКs або утворення тетраметрів, як у випадку інсулінового рецептора) → активація тирозинкіназної активності гРТКs → аутофосфорилування С-кінцевих залишків тирозину цитоплазматичного домену гРТКs з утворенням фосфотирозину → залишки фосфотирозину у складі гРТКs стають "посадочними місцями" для зв'язування білків-субстратів, що містять SH2-домени, які розпізнають фосфотирозин, наприклад Src-кінази. Отже, SH2-домен робить білок мішенню для фосфорилування гРТКs.

Тирозинкіназна активність рецептора може бути заінгібована фосфорилуванням за участю серин/треонінових протеїнкіназ (ПкС, ПкА тощо) залишків відповідних амінокислот у складі внутрішньоклітинного домену, що вказує на прямий зв'язок між гРТКs і кількома вторинними месенджерами (цАМФ, I-1,4,5-P₃, ДАГ, Ca²⁺).

Цитоплазматичний SH2-вмісний білок, який начебто "прилип" до рецептора, після фосфорилування за залишками тирозину сам стає центром зв'язування SH2-вмісних цитозольних білків. Через таку послідовність реакцій на цитоплазматичному боці рецептора може зібратися ціла "гірлянда" білків.

Фосфорилування білків-мішеней веде до зміни поведінки всієї клітини, оскільки модулює мембранний транспорт іонів та амінокислот, транскрипцію генів і синтез білків унаслідок активації/інактивації кіназної, фосфатазної або ДНК-зв'язувальної активності білків-мішеней через присутність у них доменів з відповідними активностями.

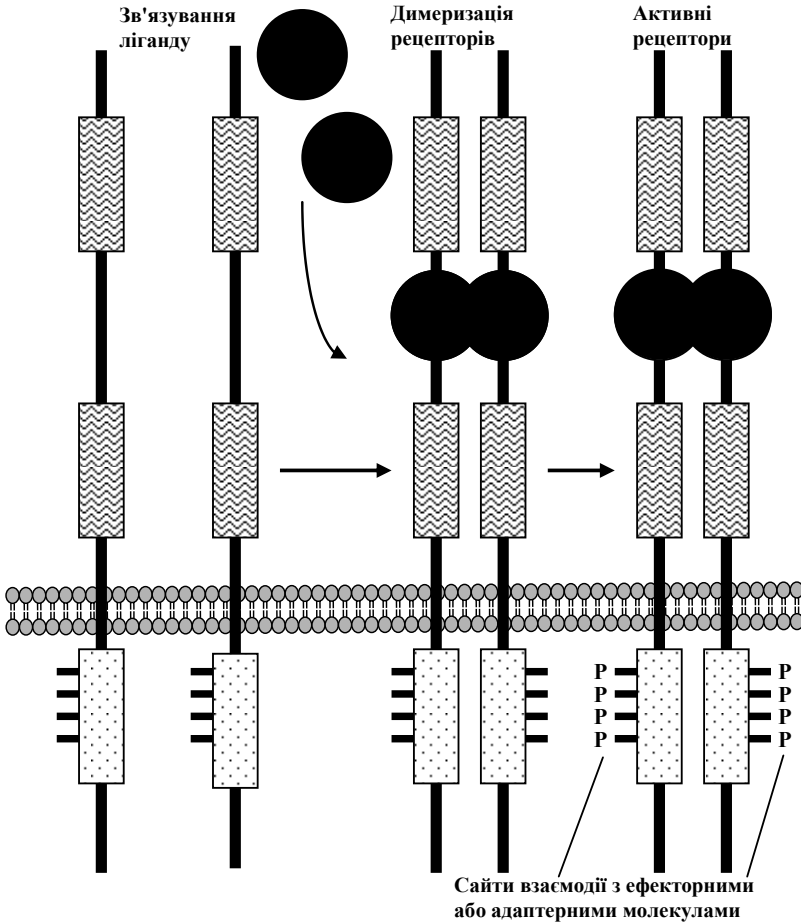


Рис. 3.9. Схема функціонування rPTKs
(на прикладі рецептора до EGF)

3.1.2. Нерецепторні (цитозольні) тирозинові протеїнкінази

Структура **нерецепторних (цитозольних) тирозинових протеїнкіназ (nrPTKs)** характеризується наявністю низки адаптерних доменів (зокрема, SH2 та SH3), завдяки яким ці ферменти залучаються у внутрішньоклітинні сигнальні шляхи й виконують свої функції (рис. 3.10).

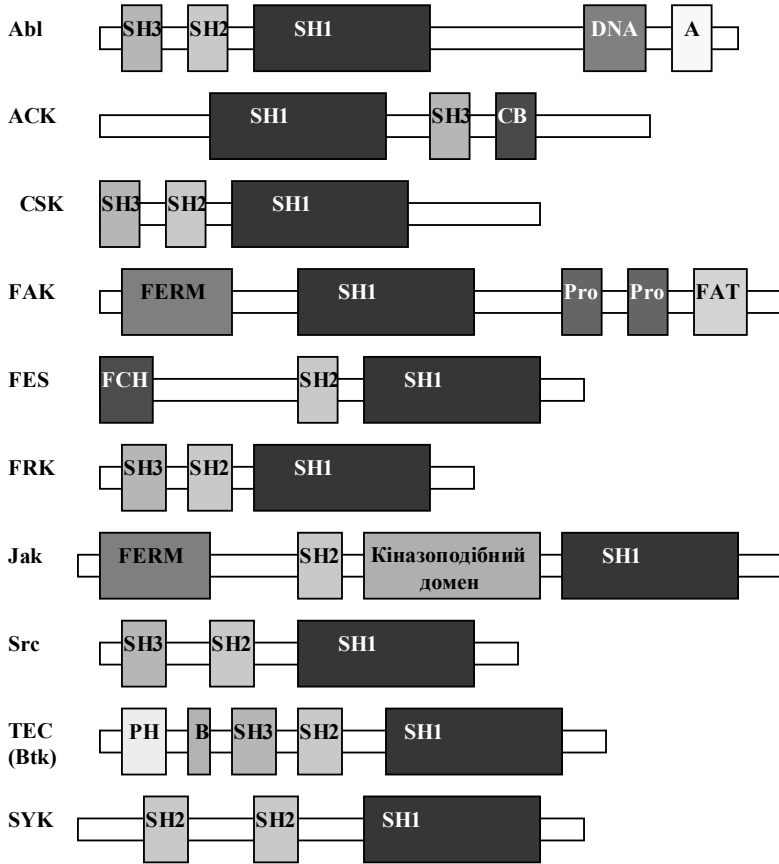


Рис. 3.10. Доменна будова найважливіших цитозольних РТКs: А – *actin binding domain*, актинзв'язувальний домен; В – структура "цинкових пальців"; СВ – *Cdc42 binding domain*, домен зв'язування із *Cdc42*; DNA – *DNA binding domain*, ДНК-зв'язувальний домен; FAT – *focal adhesion domain*, домен-мішень для білків фокальної адгезії; FCH – *Fes/CIP4 homology domain*, домен гомології *Fes* і *CIP4*; FERM – *4,1-protein, ezrin, radixin, moesin*; PH – PH-домен; pro – *proline rich region*, багата на пролін ділянка; SH1 – домен з активністю тирозинової протеїнкінази; SH2 – SH2-домен; SH2-A – атипичний SH2-домен; SH3 – SH3-домен

Сучасну класифікацію цитозольних тирозинових протеїнкіназ наведено в табл. 3.2.

Таблиця 3.2. Класифікація цитозольних тирозинових протеїніназ

Підклас пгPTKs	Назва	Приклади	Функції
I	ABL	ABL1, ARG	Регуляція поділу й диференціювання клітин, клітинної адгезії та стресової відповіді
II	ACK	ACK1, TNK1	Сполучаючись із гPTKs (зокрема, EGF-R, AXL, I-R), залучаються в регуляцію виживання і проліферації клітин
III	CSK	CSK, MATK	Виступають супресором активності пгPTKs родини Src, здійснюючи фосфорилування останніх за консервативним С-термінальним залишком в їхніх молекулах. Залучені в активацію Т-клітин
IV	FAK	FAK, PYK2	Залучаються в регуляцію фокальної адгезії, ранніх етапів міграції клітин та клітинного виживання, сигнальні шляхи інтегринів
V	FES	FES, FER	Залучені в гематопоез
VI	FRK	FRK, BRK, SRMS	Регулюють поділ і диференціювання клітин
VII	Jak	Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2	Є компонентами Jak/STAT-сигнального шляху (підпідрозд. 3.1.3.4, підрозд. 11.3), який використовується при активації цитокінових рецепторів, рецептора до ростових гормонів, пролактину та інших сигнальних молекул
VIII	SRC	Src, FGR, FYN, YES1, BLK, HCK, LCK, LYN	Ініціюють виживання і проліферацію клітин, ангиогенез
IX	TEC	Tec, BMX, Btk, ITK, TXK	Залучені у внутрішньоклітинні сигнальні механізми цитокінових рецепторів, поверхневих антигенів лімфоцитів, метаботропних рецепторів, інтегринів. Є ключовими регуляторами функцій імунної системи. Беруть участь в активації В-клітин
X	SYK	SYK, ZAP70	Передають сигнали від численних рецепторів, виступають регуляторами розвитку імунної системи

Класичним прикладом гРТКs є **Src** – білок 52–62 кД, який складається із шести різних функціональних доменів (у порядку із N-кінця): SH4, унікальний домен, SH3, SH2, SH1 і С-кінцева регуляторна ділянка (рис. 3.11). Кіназний домен (SH1) є консервативним.

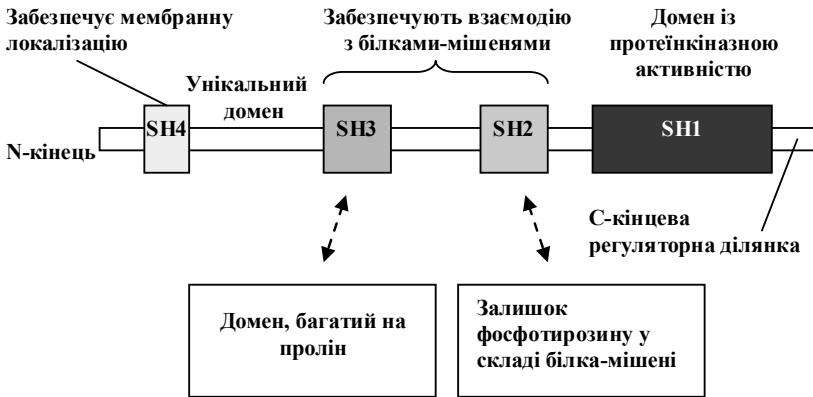


Рис. 3.11. Структура цитозольної РТКs Src

SH4-домен, який обмежує молекулу з N-кінця, містить міристиляційні сигнали, утворені під час посттрансляційної модифікації білкової молекули шляхом сполучення із залишком міристинової кислоти (*міристилювання*). Вони спрямовують молекулу Src до ПМ, де вона може бути активована гРТКs.

Унікальний домен Src відповідає за його специфічну взаємодію з певними рецепторами та білковими мішенями (тому в межах підкласу Src він дуже варіабельний), крім того, він зв'язується з атиповою ПкС.

SH3-домен забезпечує сполучення Src із білками-мішенями, що містять ділянки, багаті на пролін.

SH2-домен розпізнає залишки фосфотирозину, зокрема забезпечує зв'язування Src з активованою гРТКs.

Кіназний домен SH1, виявлений в усіх білках родини Src, відповідає за тирозинкіназну активність і відіграє головну роль у зв'язуванні субстратів; він є гомологічним кіназному домену рецепторних тирозинових протеїнкіназ.

C-термінальна частина (регуляторний домен) Src містить сайт (сайти) для фосфорилювання за залишком тирозину. v-Src (вірусна) має один такий сайт – Tyr-416, тоді як c-Src (клітинна) – два сайти: Tyr-416 та Tyr-527 (рис. 3.12).

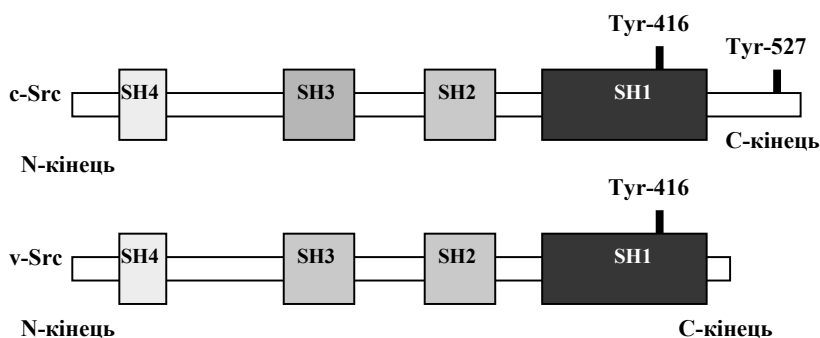


Рис. 3.12. Порівняльна структура вірусної та клітинної Src

Наслідком такої різниці стають відміни в регуляції кіназної активності v-Src та c-Src (рис. 3.13). У неактивній конформації SH2-домен c-Src взаємодіє з фосфорильованим залишком тирозину (Tyr-527) C-кінцевої регуляторної ділянки (Tyr-527 у неактивній c-Src перебуває у вигляді фосфотирозину), а Tyr-416 є нефосфорильованим. При цьому неконтрольована активація c-Src є ключовим фактором, залученим у міграцію клітин карциноми та поширення метастазів. v-Src, не маючи Tyr-527, завжди присутня у відкритій конформації і є конститутивно активним ферментом.

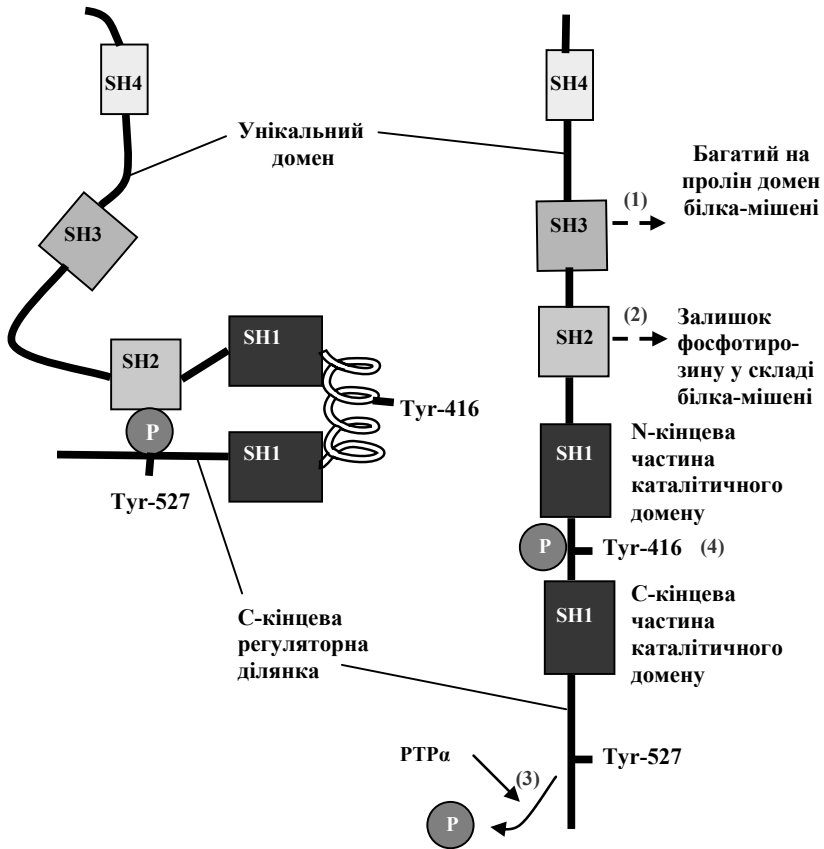


Рис. 3.13. Схема активації c-Src (пояснення в тексті)

Активація c-Src відбувається при: зв'язуванні SH3-домену (1); зв'язуванні SH2-домену (2); при дефосфорилюванні Tyr-527 тирозиною протеїнфосфатазою, наприклад, PTP α (3). Повної активності c-Src набуває після фосфорилювання Tyr-416 (наприклад, за участю рецепторної тирозинової протеїнкінази або шляхом аутофосфорилювання) (4). Так, якщо c-Src локалізується поруч із білками, що у своєму складі містять поліпролі-

нові спіралі (мішені SH3-домену) або фосфорильований залишок тирозину (мішень SH2-домену), фермент "розкривається", адаптерні домени зв'язують субстрат, а каталітичний центр ферменту розблоковується і фосфорилує субстрати. Це, зокрема, спостерігається при сполученні c-Src із rPTKs. При цьому для повної каталітичної активності кінази необхідне її фосфорилування за залишком тирозину-416.

Фосфорилування і дефосфорилування критичного сайту Tyr-527 можуть здійснювати численні ферменти, зокрема цитозольна тирозинова протеїнкіназа CSK (*C-terminal Src kinase, кіназа С-кінцевої ділянки Src*) або цитозольна тирозинова протеїнфосфатаза SHP1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1, SH2-вмісна фосфатаза-1*).

Регуляція активності цитозольних PTKs, зокрема представників родини Src, зазвичай залучає рецепторні PTKs (рис. 3.14). У випадку Src протеїнкіназа транслокується до ПМ (через наявність у SH4 домені ковалентно приєднаних залишків міристинової кислоти), де своїм SH2-доменом зв'язується з аутофосфорильованими залишками тирозину в цитозольній ділянці активованої rPTKs. Це "відкриває" молекулу Src, вивільнюючи каталітичний домен; рецепторна PTKs надалі фосфорилує Src за залишком тирозину-416, що веде до активації її кіназної активності. Активовані Src залишають рецептор і фосфорилують інші білки.

Найвідоміші субстрати Src містяться у трансформованих клітинах; більшість із них є ключовими компонентами інтегрин-опосередкованої сигнальної трансдукції: вінкулін, кортактин, талін, паксилін, FAK, тензин тощо. Інші субстрати – це білки міжклітинних контактів (β - і γ -катенін, ZO-1, оклюдин, p120ctn, конексин-43, нектин). Міжклітинні взаємодії через щільні контакти не утворюються, якщо два залишки тирозину в молекулі конексину-43 фосфорилуються v-Src.

Інші відомі мішені Src – це ферменти, що залучаються в метаболізм фосфоліпідів (PLC- γ , p85 субодиниця PI3-кінази, білки-активатори ГТФазної активності (GAPs) тощо.

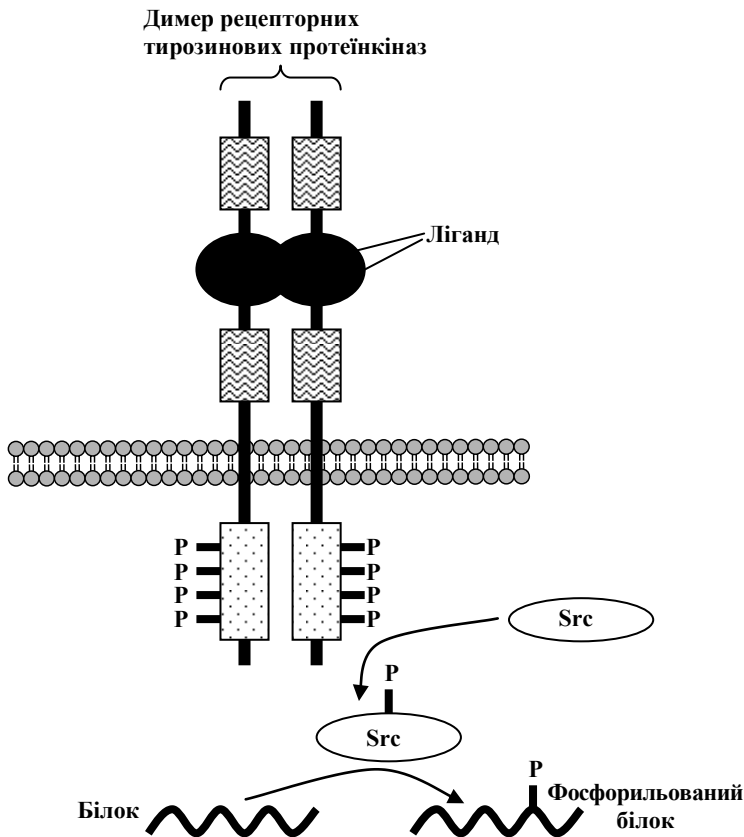


Рис. 3.14. Схема активації Src рецепторними РТКs

Src залучена в контроль численних функцій клітин, зокрема, клітинної адгезії, росту, міграції та диференціювання. Експресія Src виявлена в різних типах клітин, причому фермент може мати різну клітинну локалізацію (бути асоційованим із клітинними мембранами (ПМ, ядерна мембрана, мембрани ендосом) або розташовуватися у цитозолі). Зміна внутрішньоклітинної локалізації цього ферменту залучається у регуляцію його функцій. Так, Src, що міститься біля ПМ, опосередковує передачу інформації від широкого кола рецеп-

торів (наприклад, передає пропроліферативні та проростові сигнали від рецепторів факторів росту). У ядрі Src, взаємодіючи з іншими білками, допомагає регулювати клітинний цикл і поділ клітин. Src також виявлена в цитозолі та в ділянках міжклітинних контактів.

Оскільки цей фермент причетний до численних сигнальних шляхів, залучених у проліферацію та онкогенез (зокрема, ініційованих ростовими факторами EGF і VEGF), надекспресія або надмірна активація Src часто виявляється в пухлинних тканинах. Src регулює ангиогенез, може спричинити посилену проліферацію клітин через Ras/ERK/MAPK шлях і контролювати експресію генів через транскрипційні фактори, зокрема STATs. Через взаємодії з інтегринами, актином, білками GAP, іншими кіназами Src може включатися в регуляцію клітинної адгезії та міграції клітин.

Нині розроблено низку низькомолекулярних інгібіторів Src, які проявляють інгібуючі ефекти на ріст пухлин і метастазування, а отже, можуть бути корисними в комплексній терапії онкологічних розладів. Деякі з цих сполук уже проходять початкові етапи клінічного тестування.

3.1.3. Сигнальні каскади *за участю тирозинових протеїнкіназ*

rPTKs можуть індукувати чотири найважливіші сигнальні каскади, а саме: PI3K-, Ras-, PLC γ - та Jak/STAT-залежні шляхи. Класичними прикладами rPTKs-ініційованих каскадів є сигнальні шляхи від інсулінового рецептора (I-R) та рецепторів до цитокінів.

3.1.3.1. PI3K-залежний сигнальний шлях

Особливості **PI3K-залежного сигнального шляху**, що активується інсуліном, детально розглянуто в розд. 4. Адаптерний білок-субстрат інсулінового рецептора IRS1 (*insulin-receptor substrate*) своїм SH2-доменом сполучається з аутофо-

сфорильованим I-R; останній при цьому здійснює фосфорилування тирозинових залишків у складі адаптера. Надалі до фосфорильованого IRS приєднується SH2-доменвмісна серин/треонінова протеїнкіназа PI3K, яка каталізує утворення 3'-фосфорильованих фосфоінозитидів із фосфоліпідів клітинної мембрани. Утворені фосфоінозитиди активують ще одну серин/треонінову протеїнкіназу – 3'-фосфатидилінозитолзалежну кіназу-1 (*3-Phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1*). Механізм активації PDK1 передбачає зв'язування її РН-домену з 3'-фосфорильованими інозитоловими ліпідами, котрі швидко генеруються у мембрані через дію PI3K. PDK1, у свою чергу, фосфорилує та активує інші кінази, включаючи ПкВ/Akt, серед мішеней якої є білки, що залучаються у транспорт і окиснення глюкози (наприклад, транспортер для глюкози GLUT4).

3.1.3.2. MAP-кіназні каскади

Інший напрямок внутрішньоклітинної сигналізації інсуліну передбачає залучення розташованого у внутрішньому моношарі ПМ мономерного G-білка Ras та ERK-каскаду MAP-кіназ (*MAPKs, mitogen activated protein kinases, протеїнкінази, що активуються мітогенами*).

MAPKs – це група серин/треонінових протеїнкіназ, що активуються у відповідь на різноманітні позаклітинні стимули, які є *мітогенами* [Потехина Е. С. и др.]. До таких стимулів належать, зокрема, фактори росту, гормони, цитокіни, стресові чинники. Мітогени здатні ініціювати проліферацію (мітоз) клітин. При цьому окремі процеси, що проходять під час мітозу (міграція специфічних білків, причетних до клітинного поділу, у потрібні ділянки клітини; синтез ДНК; чергування стадій клітинного циклу; ріст клітини) регулюються специфічними генами, і контроль їхньої експресії здійснюється за участю MAPK-каскадів, що передають сигнал від позаклітинного мітогену всередину клітини. Працюючи за каскадним принципом, MAP-кінази фосфорилують і активують одна

одну в певній послідовності. Хоча дуже активна проліферація клітин є необхідною для росту та розвитку молодих організмів, з віком цей процес частіше асоційований із запаленням; крім того, у старих організмів проліферація легше спричиняє розвиток онкологічних захворювань.

MAPKs – збірна група білків, яка містить три родини протеїнкіназ: **p38**, **JNK/SAPK** (*c-Jun-N-terminal kinase/Stress activated protein kinase, протеїнкіназа, що активується за умов стресу*) та **ERK** (*Extracellular signal regulated kinase, кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами*). У більшості випадків активація протеїнкіназ родини ERK сприяє клітинному виживанню та проліферації, тоді як активація ферментів інших двох родин викликає індукцію апоптозу.

Основними мішенями MAPK є *фактори транскрипції*. У комбінації з низкою інших сигнальних шляхів MAP-кінази здійснюють фосфорилування цих факторів, змінюючи їхню активність. При фосфорилуванні транскрипційних факторів MAPK функціонують усередині ядра та фосфорилують білки, уже зв'язані із ДНК. І хоча транскрипційні фактори, локалізовані в ядрі, є важливими субстратами MAPK, лише частина активованих у цитоплазмі MAPK транслокується у ядро. Інша частина MAP-кіназ залишається в цитоплазмі, де ці ферменти можуть фосфорилувати латентні транскрипційні фактори, сприяючи їхній транслокації в ядро, або ж регулювати експресію генів на посттранскрипційному рівні, використовуючи як субстрати цитоплазматичні білки, що беруть участь у стабілізації мРНК. Крім того, MAP-кінази здатні фосфорилувати *ефекторні протеїнкінази*, наприклад *протеїнкінази, які активуються MAPK* (*MAPK-activated protein kinases, MAPKAPs*).

Загальний MAP-кіназний каскад зазвичай включає трикіназний модуль (рис. 3.15). Усередині цього модуля *MAP-кіназа (MAPK)* фосфорилується та активується *кіназою MAPK (MAPK Kinase, MAPKK; інші назви – МКК, МЕК)*.

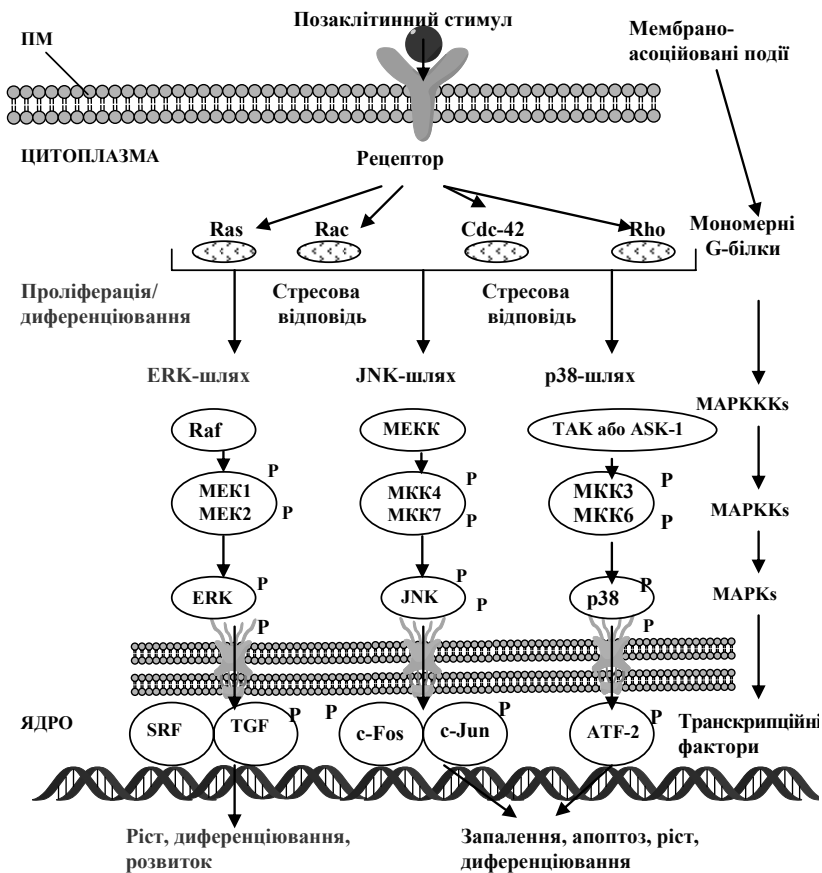


Рис. 3.15. Залучення ERK-, p38- та JNK/SAPK-кіназних каскадів до регуляції апоптозу, клітинної проліферації та диференціювання

МАРКК є унікальним ферментом, що фосфорилує МАРК за залишками тирозину і треоніну в консервативній послідовності Thr-Glu-Tyr. МАРКК, у свою чергу, фосфорилується та активується серин/треоніновою *кіназою кінази* **МАРК** (*МАРК Kinase Kinase, МАРККК*; інші назви – МККК, МЕКК). Подіб-

ні трикомпонентні каскади ПК є еволюційно консервативними в усіх еукаріотів – від дріжджів до людини. **МАРККК активується одним із мономерних G-білків** (Ras, Rho тощо), тоді як **МАРК активує транскрипційні фактори** (NF-κB, c-Jun, c-Fos тощо).

Контрольована регуляція МАР-кіназного каскаду включається у клітинну проліферацію та диференціювання, тоді як нерегульована активація може спричиняти онкогенез. **ЕРК-каскади** активуються різними мітогенами шляхами, опосередкованими рецепторними тирозиновими протеїнкіназами, метаботропними або цитокіновими рецепторами. Прикладом транскрипційних факторів, що є мішенями ЕРК-кіназного каскаду, є NF-κB. Як уже йшлося вище, ці ферменти в основному відіграють роль у клітинній проліферації та диференціюванні. Останнім часом також показано залучення їх у регуляцію процесів запам'ятовування та навчання. Дисрегуляція ERKs може спричиняти розвиток нейродегенеративних та онкологічних розладів.

Навпаки, **p38- та JNK/SAPK-каскади** часто активуються у відповідь на різноманітні види стресів, дію запальних цитокінів та інші стимули апоптозу. Рецептори для подібних стимулів найчастіше невідомі. Прикладом стресорних тригерів, здатних активувати ці шляхи, можуть бути вінбластин, метилметансульфонат, кадмій, арсеніт натрію, саліцилат натрію, церамід, анізоміцин, тепловий шок, ультрафіолет, гіпероксія, гіперосмолярність, низький рН, пероксид водню, ішемія-реперфузія, деякі фактори росту, наприклад TNFα. Однією із основних мішеней кінази JNK є транскрипційний фактор c-Jun (що разом з іншою молекулою – c-Fos – створює активний димер, відомий під назвою транскрипційного фактора AP-1); кіназа p38 контролює експресію прозапальних цитокінів. Крім того, обидва ці ферменти здатні фосфорилувати й таким чином модулювати функції низки про- та антиапоптозних білків, наслідком чого стає реалізація програмованої загибелі клітин.

Слід зауважити, що включення цих трьох сигнальних систем (ERK, p38, JNK/SAPK-кіназних каскадів) в апоптоз, клітинну проліферацію та диференціювання є комплексним. Імовірно, що кінцеве рішення щодо виживання чи загибелі клітини після тригерного сигналу визначається тонким балансом між активацією апоптозних шляхів і шляхів проліферації через індукцію/гальмування цих трьох (та інших) напрямків передачі сигналу [Остапченко Л. І. та ін.].

Як приклад функціонування MAP-кіназних каскадів можна навести ERK-каскад. Із викладеного раніше знаємо, що цей сигнальний шлях може активуватися rPTKs (наприклад, інсуліновим рецептором), метаботропними або цитокіновими рецепторами. Активація кінцевої кінази цього каскаду – ERK – передбачає участь мономерного G-білка Ras та серин/треонінової кінази Raf (яка виступає як MAPKKK).

Ras-білки кодуються генами *ras* (від *Rat sarcoma*) і представлені одноланцюговими поліпептидами довжиною 189 амінокислотних залишків, сполученими з плазматичними мембранами клітин ізопреноїдним якорем. Усі вони зв'язують гуанінові нуклеотиди (ГТФ і ГДФ) і всі є ГТФазами, що гідролізують ГТФ до ГДФ. У ссавців є три майже ідентичні *ras*-гени, які кодують білки з молекулярною масою 21 кД (тому ці білки також відомі під загальною назвою "*p21 білки*").

Ген *ras* є протоонкогеном. Пухлинні клітини містять мутантні форми генів *ras*, котрі активують численні внутрішньоклітинні Ras-залежні сигнальні системи. Характерний механізм переродження гена *ras* – точкові мутації (наприклад, за ділянками ДНК, які кодують амінокислотні залишки 12, 61). Утворений при цьому білковий продукт мутованого гена *ras* надсилає безперервні сигнали з мембрани в ядро.

Активація Ras опосередковується білками родини GEFs – факторами обміну гуанінових нуклеотидів (рис. 3.16).

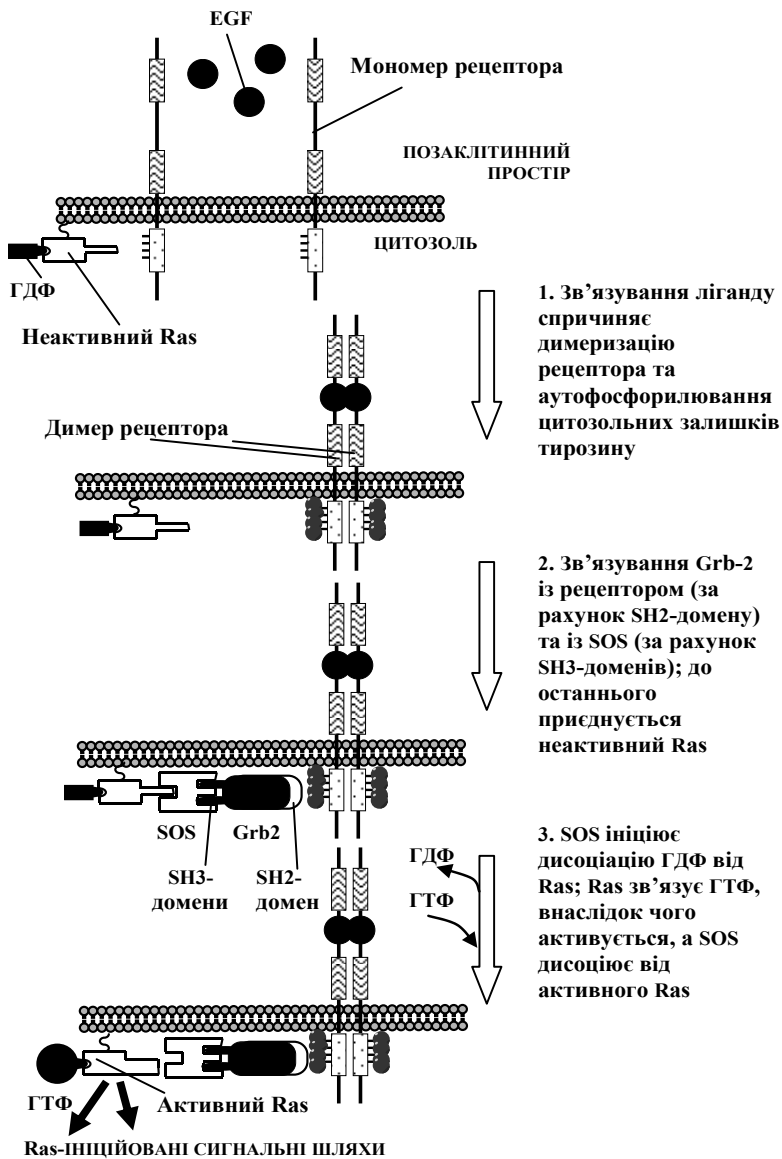


Рис. 3.16. Схема активації білка Ras рецепторними тирозиновими протеїнкіназами

Одним із добре охарактеризованих таких білків є Sos, який у неактивній формі сполучений з білком Grb2. Grb2 (*growth-factor-receptor-binding protein*, білок, що зв'язується з рецепторами факторів росту) – адаптерний протеїн, він не має жодної внутрішньої активності й містить SH2-домен, яким може сполучатися з фосфотирозинвмісними білками, зокрема з IRS, що приєднаний до інсулінового рецептора. Білок Sos локалізований у цитозолі, а комплекс {Sos-Grb2} – біля мембрани, де може взаємодіяти з Ras. Sos стимулює активацію Ras-GTP (цей процес також потребує білків, що стимулюють ГТФазну активність GAPs (підрозд. 2.1)).

Активований Ras сполучається з N-кінцевим доменом серин/треонінової кінази Raf (яка виступає в ролі MAPKKK у цьому каскаді й, подібно до білка Ras, також є протоонкогеном). Raf фосфорилує кіназу MEK (MAPKK у цьому каскаді). MEK, як уже знаємо, має подвійну специфічність – може фосфорилувати залишки як треоніну, так і тирозину в консервативній послідовності Thr-Glu-Tyr останньої кінази цього каскаду (ERK, яка є власне MAPK). Фосфорильована ERK надалі залучається в активацію ряду транскрипційних факторів, зокрема NF-kB.

Дисрегуляція ERK-шляху причетна до патогенезу понад 30 % онкологічних захворювань.

3.1.3.3. PLC- γ -залежні сигнальні шляхи

Інсулін-ініційовані сигнальні шляхи також можуть залучати PLC- γ . Ця ізоформа фосфоліпази C є SH2-доменвмісним білком, здатним безпосередньо сполучатися з аутофосфорильованим I-R. При цьому PLC- γ просторово наближується до свого субстрату – PI-4,5-P₂, і здійснює його гідроліз з утворенням I-1,4,5-P₃ та ДАГ – двох вторинних посередників, характерних для класичної фосфатидилінозитолової сигнальної системи (підрозд. 2.2), у якій функціонує інша ізоформа PLC – PLC- β . Окрім інсулінового рецептора, фосфоліпаза C γ активується й іншими rPTKs (наприклад, PDGF-R та EGF-R).

3.1.3.4. *Jak/STAT-система*

Активация rPTKs, що представлені цитокиновими рецепторами, ініціює передачу сигналів через Jak/STAT-систему, яку детально розглянуто в підрозд. 11.3. Ця система також пов'язана з регуляцією активності транскрипційних факторів, а отже, і експресії низки генів у ядрі, чим є подібною до каскадів MAPKs.

Jaks (*Janus Kinases, янус-кінази*) є рецептор-асоційованими цитозольними тирозиновими протеїнкіназами. Вони сполучаються з аутофосфорильованими активованими rPTKs через наявний у їхньому складі SH2-домен і, у свою чергу, самі підлягають активації шляхом фосфорилування тирозинкіназною активністю рецепторів. Білки **STATs** (*signal transducers and activators of transcription, сигнальні трансдуктори й активатори транскрипції*) є транскрипційними факторами, що також володіють SH2-доменами, які опосередковують їхні сполучення з фосфотирозинвмісними послідовностями. У нестимульованих клітинах білки STATs є неактивними і містяться в цитозолі. Стимуляція й аутофосфорилування цитокинових рецепторів зумовлює приєднання до них білків STATs, де вони фосфорилуються кіназами Jaks, після чого підлягають димеризації та транслокуються до ядра, де стимулюють транскрипцію генів-мішеней.

Дисфункція сигнальних шляхів PTKs може бути причиною або супроводжувати низку небезпечних для організму людини патологічних станів. Так, через наведені вище особливості внутрішньоклітинної сигналізації, які результуються у пригніченні апоптозу та посиленні проліферації, PTKs можна віднести до протоонкогенів: їхня постійна активність властива для пухлин. Гіперекспресія ERK, до того ж, може спричинити ріст гіпертрофії міокарда, а надмірну активність JNK/SARK-каскаду виявляють при хронічних запальних процесах, інсульті, цукровому діабеті. Зниження активності цитозольних PTKs є характерним для імунодефіциту та α - γ -глобулінемії, а зростання їхньої активності – для імунних, запальних захворювань (ревматоїдний артрит, гломерулонефрит, алергії тощо).

Як і будь-які інші ферменти, тирозинові протеїнкінази можуть підлягати інгібуванню. Класичним інгібітором РТКs є тирфостин; ряд інших сполук може блокувати АТФ-зв'язувальний або субстратзв'язувальний сайт ензиму, також для РТКs виявлено можливість алостеричної регуляції.

3.2. Класифікація і функції тирозинових протеїнфосфатаз

Ферменти, які здійснюють зворотну реакцію відщеплення залишку фосфорної кислоти від фосфотирозинвмісного субстрату, називають **тирозиновими протеїнфосфатазами (PTPs)** (за систематичною назвою – *протеїн-тирозинфосфат-фосфогідролаз*, КФ 3.1.3.48). Ці ензими є ключовими регуляторами тирозинового фосфорилування, а отже, і внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, залучених у контроль клітинного росту, проліферації, диференціювання, трансформації [Tonks N.].

За особливостями перебігу фосфатазної реакції тирозинові протеїнфосфатази поділяють на **цистеїнзалежні** та **аспартатзалежні**. Ферменти першої групи характеризуються наявністю *канонічного сигнатурного мотиву (I/V)HCXXGXXR(S/T)G* (або **C-X5-R**, де С і R – консервативні залишки цистеїну та аргініну, відповідно; X – будь-які амінокислоти), есенціальний нуклеофільний залишок цистеїну якого під час реакції залучається у формування цистеїніл-фосфатного ферментного проміжного комплексу. Аспартатзалежні тирозинові протеїнфосфатази не мають цієї послідовності й використовують для гідролізу фосфоефірних зв'язків нуклеофільний залишок аспарагінової кислоти.

Аспартатзалежні тирозинові протеїнфосфатази мають подвійну субстратну специфічність щодо залишків фосфосерину й фосфотирозину. Нині ідентифіковано лише чотири

представники цих ферментів, які належать до родини дегалогеназ галоїдних кислот (*Haloacid Dehalogenases, HAD*, див. дод., п. 3). Перші досліджені білки цієї групи – **EYAs** (*Eyes absent (Drosophila) homologs, гомологи білків, що відповідають за розвиток ока у Drosophila*) – залучені в регуляцію розвитку органів зору та слуху, м'язів, нирок. Крім протеїнфосфатазної активності, вони проявляють властивості транскрипційних факторів, що контролюють експресію ряду генів, та здатні регулювати фосфорилування інших транскрипційних факторів. Мутації EYAs асоціюються з низкою вроджених патологій, у тому числі з бронхіооторенальним синдромом та спадковою катарактою. Ще одним представником аспартатзалежних протеїнфосфатаз є **фосфатаза С-термінального домену РНК-полімерази II** (*RNA polymerase II C-terminal domain phosphatases*).

Суперродина **цистеїнзалежних тирозинових протеїнфосфатаз** включає понад 100 різних ферментів, які за особливостями структури та функціонування відносять до одного із чотирьох класів (табл. 3.3):

- **класичні PTPs** (*рецепторні (rPTPs) та нерцепторні PTP (nrPTPs)*), що дефосфорилують лише залишки фосфотирозину;

- **фосфатази подвійної специфічності** (*dual-specific phosphatases, DUSPs*), які, крім фосфотирозину, розпізнають фосфосерин і фосфотреонін;

- **Cdc25-фосфатази**, специфічні до фосфотирозину і фосфотреоніну;

- **низькомолекулярна PTP** (*LMW PTP, low-molecular-weight phosphatase*).

Рецепторні PTPs в основному виявлені у ПМ, тоді як цитозольні PTPs – біля ПМ, у цитозолі та в різних внутрішньоклітинних компартментах, наприклад у ЕПР. Каталітичні мішені більшості PTPs і позаклітинні ліганди rPTPs ще не виявлені.

Таблиця 3.3. Класифікація цистеїнзалежних тирозинових протеїнфосфатаз

Клас РТРС	Приклади	Кількість білків	Функція	
Класичні РТРС (38)	CD45, LAR, РТР- α , РТР- δ , РТР- μ , РТР- κ , РТР- λ / μ / ν , РТР- ϕ , DER1, РТР- α , РТР- ϵ , РТР- ζ / β , РТР- γ	21	Передача сигналів від антигенів, інтерлейкінів, інтерферонів, мітогенів; дефосфорилування представників Src-, Jak-родин РТРС, MAPK; регуляція адгезивних і міграційних властивостей клітин, дефосфорилування білків цитоскелета; супресія пухлин	
	ptRTPs	17	Трансдукція сигналів від антигенів, інтерферонів, інтерлейкінів, дофаміну, G-білків; залучення у дефосфорилування ядерних білків (а отже, і контроль проліферації, чергування фаз клітинного циклу тощо); регуляція апоптозу лімфоцитів	
VH-I-подібні фосфатази подвійної специфічності (61)	I клас	11	Дефосфорилування MAPKs (ERK, p38, JNK)	
	II клас	MPKs	3	Регуляція перебудови цитоскелета
		SSHs	3	Регенерація печінки
	III клас	PRLs	4	Регуляція клітинного циклу
	CDCl4s	19	Низькомолекулярні фосфатази подвійної специфічності (DUSPs); деякі з них залучені в регуляцію MAPK-каскадів, для інших функції невідомі	
III клас	Атипові DUSPs	5	Супресор пухлин; дефосфорилування 3'-фосфорильованих фосфатидилілі-нозитолів ПМ	
	РТЕНs	16	Подібно до РТЕНs діють на низку фосфорильованих фосфатидилілінозитолів; залучаються в обмін кардіоліпінів	
Низькомолекулярна РТР	RTPM1	1	Дефосфорилує за залишками фосфотирозину низку рецепторів факторів росту; регуляція клітинного росту і ремоделювання цитоскелета.	
Src25-фосфатази	LMW РТР	3	Активує циклінозалежну протеїнкіназу шляхом її дефосфорилування; регуляція клітинного циклу	
	CDC25A, B, C			

Активний сайт усіх цистеїнзалежних РТРs характеризується наявністю висококонсервативної послідовності – *РТР-сигнатурного мотиву (C-X5-R)* з консервативними неваріабельними залишками цистеїну та аргініну, необхідними для розпізнання фосфотирозину і каталізу. Унаслідок цього всі цистеїнзалежні тирозинові протеїнфосфатази мають загальний каталітичний механізм, вони також чутливі до дії окисників, безпосередніми мішенями яких є SH-група цистеїну. Через це SH-спрямовані агенти та активні форми кисню можуть інгібувати ці ферменти. Функціональні відміни між різними представниками цистеїнзалежних РТРs визначаються регуляторними доменами.

Більшість даних про структуру й функції цистеїнзалежних РТРs отримано із вивчення цитозольної **протеїнтирозинфосфатази 1В** (*protein tyrosine phosphatase 1B, РТР1В*). Цей фермент сполучається із **тандемним фосфотирозиновим мотивом (E/D)-pY-pY-(R/K)** у складі білків-мішеней: так, РТР1В зв'язує і дефосфорилує, зокрема, цитозольну РТК Jak2 у положеннях pY1007/pY1008, а I-R – у положеннях pY1162/pY1163. Крім того, РТР1В може дефосфорилувати IRS 1.

У молекулі РТР1В каталітично необхідними залишками цистеїну та аргініну в межах сигнатурного мотиву є **Cys-215** і **Arg-221**. Каталітичний сайт із сигнатурною послідовністю оточують три петлі, які важливі в каталізі й розпізнанні субстрату (рис. 3.17):

- **Петля розпізнання фосфотирозину** (*pTyr-петля, pTyr-loop*) що містить неваріабельний залишок тирозину (Tyr-46) і відповідає за розпізнання різних фосфотирозинових субстратів;
- **WPD-петля** (*WPD-loop*), у якій локалізований каталітично необхідний залишок аспарагінової кислоти (**Asp-181**).
- **Q-петля** (*Q-loop*), що складається із двох неваріабельних залишків глутаміну (Gln-262 і Gln-266).



Рис. 3.17. Просторова структура активного центру РТРs (на прикладі РТР1В): М1-М10 – функціональні домени; мотив 9 – сигнатурний мотив з послідовністю С-Х5-Р; мотив 8 – WPD-петля; мотив 10 – Q-петля; мотив 1 – рТуг-петля

Консервативний залишок Cys-215 у молекулі РТР1В розміщений на дні щілини, наявної на поверхні білка; її стінки формують WPD- та Q-петля, а глибина визначається залишком тирозину (Туг-46) у рТуг-петлі. Це пояснює абсолютну специфічність РТР1В відносно рТуг-вмісних субстратів, тоді як менші за розмірами залишки фосфосерину і фосфотреоніну не досягають нуклеофільного залишку цистеїну на дні щілини.

Після зв'язування із субстратом цистеїнзалежні РТРs каталізують гідроліз фосфоефірного зв'язку через формування цистеїніл-фосфатного ферментного проміжного комплексу. При цьому вільний цистеїновий нуклеофіл формує зв'язок з атомом Р фосфатної групи (рис. 3.18).

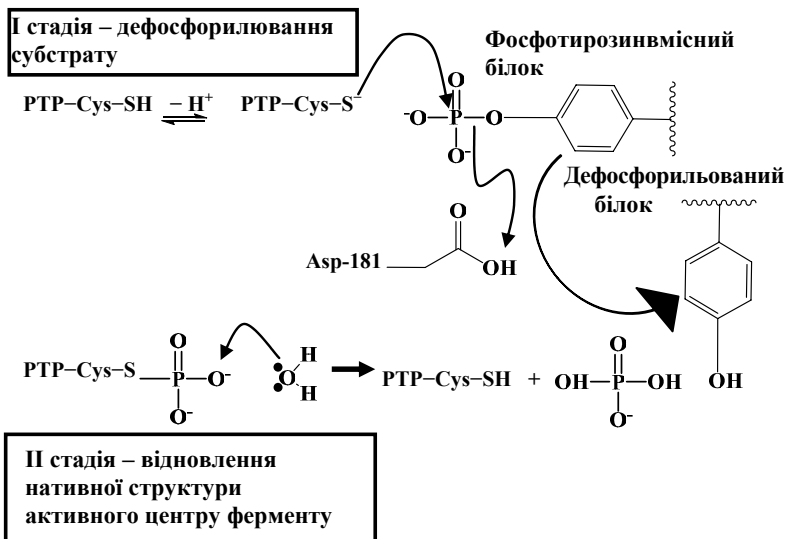


Рис. 3.18. Механізм реакції дефосфорилювання за участю цистеїнзалежних PTPs

Сполучення ферменту із субстратом супроводжується значними конформаційними змінами в активному сайті: WPD-петля, що містить каталітично необхідний залишок аспарагінової кислоти, закривається навколо рТуг-залишку субстрату. Це є класичним прикладом концепції "індукованої відповідності", згідно з якою конформаційні зміни, індуковані сполученням субстрату, переводять фермент у каталітично компетентну форму. Закриття WPD-петлі викликає розрив Р–О зв'язку, що сполучає фосфатну групу з тирозином, і депротонування розташованого поруч залишку Asp (Asp-181 у TP1B); відокремлений протон надалі передається на залишок тирозину субстрату.

Утворений цистеїніл-фосфатний інтермедіат у наступній стадії гідролізується за участю молекули води та каталітично важливого залишку глутамінової кислоти (Gln-262 у PTP1B)

Q-петлі, який скоординує молекулу води – таким чином вивільнюється фосфат і регенерується активний центр для наступної каталітичної реакції.

Ці події каталітичного механізму є консервативними для всіх представників цистеїнзалежних PTPs.

3.2.1. Класичні (фосфотирозин-специфічні) цистеїнзалежні цитозольні протеїнфосфатази

Цитозольні PTPs залучаються у позитивну та негативну трансдукцію сигналів від антигенів, інтерферонів, інтерлейкінів, дофаміну, G-білків, беруть участь у дефосфорилуванні ядерних білків (а отже, здійснюють контроль проліферації, чергування фаз клітинного циклу тощо), причетні до регуляції апоптозу лімфоцитів. Усі вони мають один консервативний протеїнфосфатазний домен і один регуляторний, який надає ферменту вірної внутрішньоклітинної локалізації та специфічності щодо субстрату, а також містить сайти для посттрансляційної модифікації (рис. 3.19).

Класичним прикладом цитозольних PTPs є **PTP1B**, у молекулі якої регуляторний сегмент (~115 залишків) локалізований на С-кінці, причому останні 35 амінокислотних залишків цієї ділянки є гідрофобними і функціонують, спрямовуючи фермент до цитозольного боку мембран ЕПР. Цей фермент, зокрема, причетний до дефосфорилування інсулінового рецептора та цитозольної тирозинової протеїнкінази Jak2.

Подібна будова характерна і для іншої цитозольної PTP – **ТСРТР** (*T-Cell enriched PTP, PTP T-клітин*) із М.м. 48 кД; для цього ферменту характерна наявність двох сплайсинг-варіантів, що мають подібну структуру каталітичного домену на N-кінці молекули, але різняться С-кінцевими послідовностями: тоді як 48кД форма (ТС48) спрямовується до ЕПР, 45кД форма (ТС45), що не має гідрофобного сегмента, транслокується до ядра.

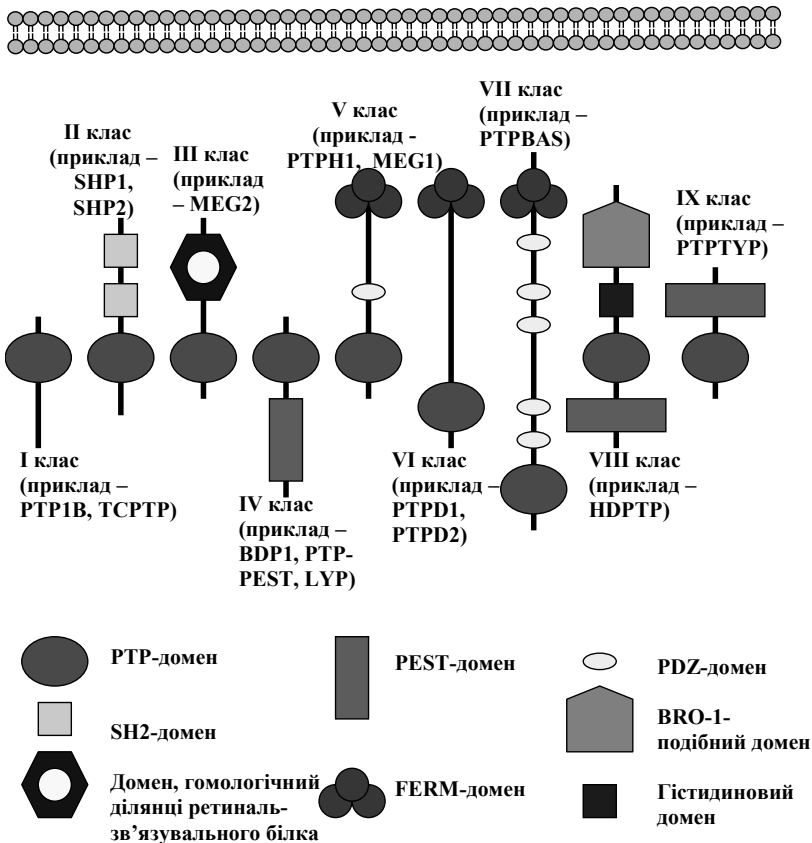


Рис. 3.19. Доменна структура класичних цитозольних цистеїн залежних тирозинових протеїнфосфатаз

Незважаючи на високий відсоток структурної гомології із RTR1B, TCRTP дещо відрізняється від неї за субстратною специфічністю. Так, подібно до RTR1B, TCRTP також пригнічує інсулінову сигналізацію через дефосфорилювання I-R, але не впливає на Jak2: її мішенями є Jak1 і Jak3.

С-кінцевий сегмент РТР1В також має сайти для фосфорилювання серин/треоніновими протеїнкіназами і сайт для протеолітичного розщеплення кальпаїном. Кальпаїнозалежний протеоліз РТР1В генерує "вкорочену", розчинну форму ферменту з підвищеною активністю. Це підтверджує роль цього сегмента не лише у спрямуванні ферменту, але й у прямій регуляції активності РТР1В. Подібне залучення С-кінцевого сегмента в супресію ферментативної активності також виявлене для ТСРТР.

Субклітинна локалізація є важливим компонентом регуляції функцій цитозольних РТРs. Наприклад, присутність двох SH2-доменів на N-кінці цитозольної протеїнфосфатази SHP (*Src homology 2 (SH2) domain containing PTP, PTP, що містить SH2-домен*) (рис. 3.19), зумовлює взаємодію цього ферменту з фосфорильованими залишками тирозину у складі рецепторів і адаптерних білків; присутність FERM-домену (див. дод., п. 4) сприяє сполученню РТРs із ПМ і елементами цитоскелета; SEC14-домен (див. дод., п. 5) необхідний для зв'язування із ліпідами і мембранного спрямування; BRO1-домен (див. дод., п. 6) зумовлює ендосомальну локалізацію відповідних ферментів.

Некаталітичні послідовності деяких РТРs (наприклад, SH2-доменвісної SHP2) також можуть зумовлювати існування різних конформацій ферментів, відмінних за рівнем активності. Так, амінокислотні залишки активного сайту нестимульованої SHP2 взаємодіють з N-кінцевим SH2-доменом, що унеможливорює сполучення із субстратом і визначає дуже низьку каталітичну активність ферменту (подібне аутоінгібування також є характерним для цитозольної тирозинової протеїнкінази c-Src – підпідрозд. 3.1.2). Сполучення SH2-доменів із рТуг-вмісними рецепторами або адаптерними білками індукують конформаційні зміни, що сприяють утворенню такої форми фосфатази, у якій активний сайт є відкритим і може дефосфорилювати субстрати. Таким чином, SHP2 може набувати активності лише за умови її залучення до сигнального комплексу. Відомі мутантні форми SHP2, які виявляють консти-

тутивну активність. Зокрема, мутації в амінокислотних залишках у межах N-кінцевих SH2-доменів або поруч із ними полегшують взаємодію ферменту із субстратами внаслідок порушення контакту між цими ділянками і активним сайтом ферменту, через що активна конформація ферменту утворюється без наявності зовнішнього стимулу (рТуг-вмісного рецептора або адаптерного білка). Оскільки SHP2 бере участь у численних сигнальних шляхах, ініційованих ростовими факторами і цитокінами, подібні мутації цього ферменту часто асоціюються із підвищеним ризиком виникнення деяких пухлин (ювенільна мієломоноцитарна лейкемія, гостра мієлоїдна лейкемія). Слід відмітити, що SHP2 був ідентифікований як перший онкоген серед PTPs.

Унаслідок того, що активний центр цитозольних PTPs містить залишок цистеїну, регуляція активності цих ферментів може здійснюватися шляхом його оберненого окиснення. Це є одним із механізмів, за якими активні форми кисню пролонгують тривалість сигналізації за участю тирозинових протейніназ (підрозд. 6.2). При цьому активація рецепторів факторів росту (що є рецепторними PTKs) сама може зумовлювати продукцію пероксиду, здатного окиснювати PTPs.

Високореактивний каталітично необхідний залишок цистеїну сигнатурного мотиву PTPs за дії H_2O_2 й інших активних форм кисню та клітинних окисдантів може бути окиснений до різних кінцевих продуктів (підпідрозд. 6.2.1). При утворенні **цистеїнсульфенової кислоти** (Cys-SOH) остання надалі у внутрішньомолекулярній реакції може реагувати з атомом азоту сусідньої аміногрупи – при цьому утворюється **сульфеніламідна структура**. Зокрема, при окисненні PTP1B сульфеніламідний зв'язок утворюється між окисненим до цистеїнсульфенової кислоти цистеїном у 215 положенні (Cys-215) активного центру та азотом серину (216). Це спричиняє потужні конформаційні зміни в каталітичному центрі PTP (рис. 3.20), які є оборотними. Утворення **цистеїнсульфінової** (Cys-SO₂) та **цистеїнсульфонової** (Cys-SO₃) **кислот** є необоротними процесами.

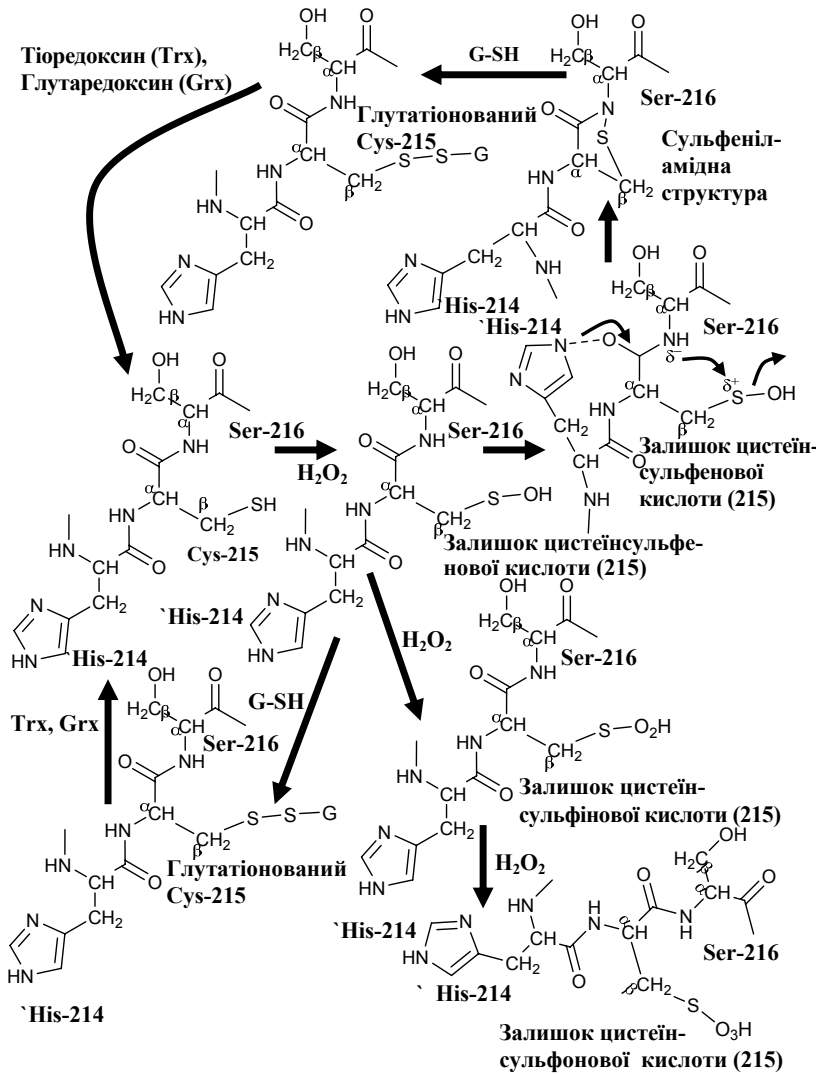


Рис. 3.20. Принципи окисного інгібування активності PTPs (на прикладі PTP1B)

Таким чином, сульфеніламід захищає консервативний залишок цистеїну в активному центрі РТРС від необоротного окиснення з утворенням цистеїнсульфінової та цистеїнсульфонової кислот, тобто стає "протективним інтермедіатом" в оксидативному інгібуванні.

Іншими формами оборотного окиснення консервативного залишку цистеїну сигнатурного мотиву РТРС є його глутатіонування (підпідрозд. 6.2.1) і нітрозилування (підрозд. 5.3.2). Утворені окиснені форми надалі можуть відновлюватися, наприклад, за участю глутатіону (GSH) та глутатіонзалежних ферментів.

3.2.2. Класичні (фосфотирозин-специфічні) цистеїнзалежні рецепторні протеїнфосфатази

Із 38 генів класичних цистеїнзалежних РТРС у людини 21 ген кодує трансмембранні (рецепторні) ферменти (rRTPs), що залучаються у передачу сигналу від антигенів, інтерлейкінів, інтерферонів, мітогенів, здійснюють дефосфорилування представників Src-, Jak-родин РТКС, MAPKs, беруть участь у регуляції адгезивних і міграційних властивостей клітин, дефосфорилуванні білків цитоскелета. Деякі з них виступають супресорами пухлин, унаслідок чого їхня втрата або мутація можуть привести до неконтрольованої клітинної проліферації та трансформації.

РТРС цієї групи, подібно до рецепторних РТКС, мають внутрішньоклітинну, позаклітинну і трансмембранну частини (рис 3.21).

Варіабельна **позаклітинна частина** має структуру, подібну до молекул клітинної адгезії (*cell adhesion molecules, CAM*), з *IG-подібними доменами (IgL)* і *фібронектинними повторами (домени, характерні для фібронектину III (FNIII))*; деякі rRTPs на позаклітинному боці містять *МAM-домени* (див. дод., п. 7) і *домени, подібні ділянкам карбоангідрази* (див. дод., п. 8).

Відмінності у структурі позаклітинних доменів гРTPs відповідають особливостям будови лігандів, з якими вони сполучаються.

У межах **С-термінальної внутрішньоклітинної частини** гРTPs виділяють *мембрано-проксимальний (D1)* і *мембрано-дистальний (D2) домени*. Домен D1 є власне каталітичним, тоді як D2 є неактивним, але за структурою подібним до активного (рис. 3.21).

Високий відсоток гомології між D1- і D2-доменами виявлений у консервативних послідовностях амінокислот, а також у вторинній і третинній структурах; при цьому лише дві точкові мутації здатні надати D2-домену каталітичної активності. Проте ці домени мають і структурні відмінності, що визначають різницю в їхньому функціонуванні. Зокрема, D2 домени опосередковують димеризацію гРTPs, залучаючись таким чином у регуляцію передачі сигналу, а також мають вищу чутливість до дії окисників порівняно з D1, унаслідок чого можуть слугувати редокс-сенсором. Більш того, конформаційні зміни у D2, індуковані окисненням, можуть передаватися на позаклітинний домен гРTPs.

Регуляція активності гРTPs здійснюється кількома основними шляхами, одним із найважливіших із яких є їхня *регуляторна димеризація*. Будь-яка гРTPs у вигляді димеру є неактивною, оскільки в димеризованому стані відбувається реципрокне інгібування каталітичних D1-доменів (рис. 3.21): на N-кінці кожного D1-домену наявна *послідовність спіраль-петля-спіраль ("клин")*, яка при димеризації взаємодіє з активним сайтом розташованого поруч сусіднього D1.

У деяких випадках зв'язування ліганду інгібує активність гРTPs шляхом індукції димеризації (рис. 3.20, а); для інших гРTPs, зокрема для РТР- α , показано відмінний від наведеного механізм регуляторної димеризації: вона у вихідному стані є неактивним гомодимером унаслідок взаємодій між усіма сегментами мономерів.

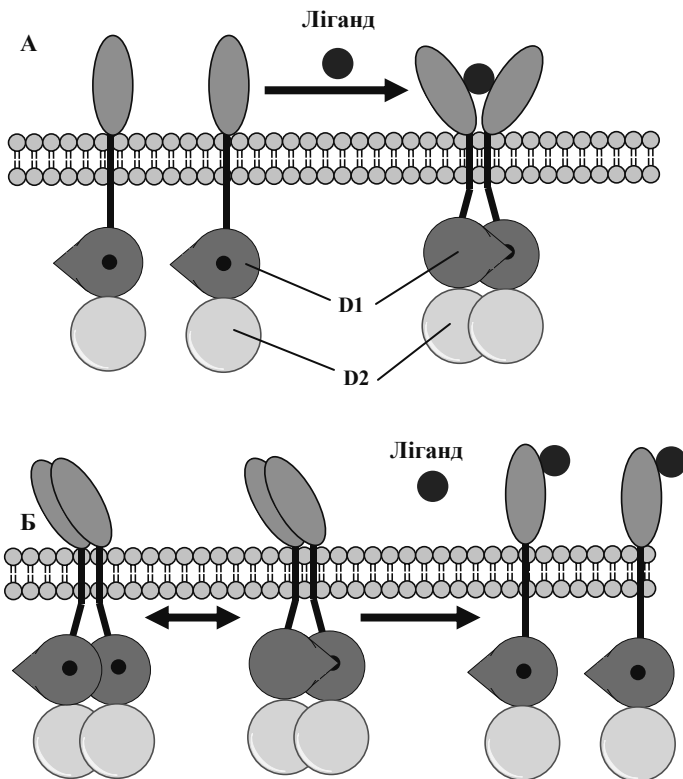


Рис. 3.21. Димеризація гРTPs як регулятор їхньої активності

Зв'язування ліганду спричиняє руйнування димерів і активацію ферменту (рис. 3.20, б). Таким самим чином відбувається регуляція активності CD45-рецептора – головної трансмембранної РTP лімфоїдних клітин.

гРTPs можуть бути *фосфорильованими за залишками тирозину*; це створює в їхніх молекулах сайти для розпізнання SH2-вмісними білками і сприяє залученню їх у надмолекулярні сигнальні комплекси. Однією із гРTPs, що можуть взаємодіяти із SH2-доменами, є РTP- α – залишок Тир-789 в її D2-домені є конститутивно фосфорильованим і асоційованим із SH2-доменом адаптерного білка Grb2.

Обмежений протеоліз і зміна субклітинної локалізації також є способами регуляції активності rPTPs. Так, розщеплення численних rPTPs субтилізиноподібними протеазами спричиняє втрату ними позаклітинного домену і може бути одним із механізмів, залучених у термінацію rPTPs-залежних сигнальних шляхів. Деякі rPTPs можуть підлягати і внутрішньоклітинному розщепленню; наприклад, кальпаїнозалежний гідроліз PTP- α сприяє вивільненню її каталітичного домену в цитозоль.

Оскільки rPTPs, подібно до цитозольних PTPs, в активному центрі мають консервативний залишок цистеїну, вони теж можуть підлягати регуляції окисненням шляхом утворення цистеїнсульфенової кислоти та сульфаніламідної структури, глутатіонування й нітрозилування (оборотні модифікації), а також необоротно інгібуватися при утворенні в активному центрі цистеїнсульфінової та цистеїнсульфонової кислот.

Особливим механізмом регуляції функцій rPTPs є стабілізація неактивних димерів (приклад – PTP- α) за дії окисників (рис. 3.22).

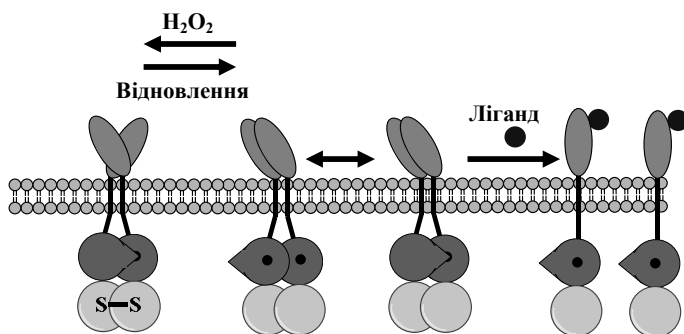


Рис. 3.22. Схема утворення неактивних димерів за дії окисників (на прикладі PTP α)

Залишок цистеїну в домені D2 (Cys-723) є більш чутливим до дії ROS, ніж цистеїн у домені D1, отже, D2 може функціонувати як редокс-сенсор. Окиснення Cys-723 індукує конфо-

рмаційні зміни у D2, що запускають утворення S–S зв'язку між залишками цистеїну D2-доменів, таким чином стабілізуючи неактивний димер.

Окисні зміни також повертають молекули РТР- α , що веде до змін орієнтації позаклітинних доменів димеру, і можуть запускати формування гетеродимерів між різними rPTPs.

Усе це є прикладами оборотних модифікацій, і при відновленні дисульфідного зв'язку, що поєднує D2-домени в димер, відновлюється вихідна конформація rPTPs.

Подібно до РТКs, дисфункції класичних цистеїнзалежних РТРs – як цитозольних, так і рецепторних – можуть стати причиною розвитку численних патологічних станів. Так, послаблення процесів дефосфорилування залишків тирозину у складі протеїнкіназ може привести до їхньої гіперактивації та, як наслідок, до пухлиногенезу. Мутації в молекулі РТРs є фактором ризику низки аутоімунних захворювань (діабет I типу, ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак). Зокрема, в останньому випадку в крові хворих з'являються антитіла до CD45.

Для дослідження процесів фосфорилування і дефосфорилування тирозину в наш час використовують численні методи, зокрема, визначають сайти фосфорилування (за допомогою мітки – наприклад, пероксидази хрому), вміст фосфотирозину (із застосуванням кон'югованих антитіл, що містять і сайт зв'язування, і мітку, або некон'югованих первинних і вторинних антитіл, останні з яких містять мітку). Використовують і радіомічену АТФ, яка під час процесів фосфорилування включається у субстрати, після чого визначається рівень радіоактивності зразку.

3.2.3. Фосфатази подвійної специфічності

Перший фермент з активністю фосфатаз подвійної специфічності (*dual specificity phosphatases, DUSPs*) – **VH1** (*Vaccinia virus H1 protein, білок H1 вірусу коров'ячої віспи*) – був ідентифікований К. Гуаном і Дж. Діксоном. Пізніше було

показано, що інгібітори цього ферменту мають виражений антивірусний ефект і що ця фосфатаза відіграє важливу роль у контролі вірулентності та експресії вірусних генів.

Першою ідентифікованою фосфатазою подвійної специфічності у ссавців є **МКР1** (*MAP Kinase Phosphatase 1*, *фосфатаза MAP-кіназ-1*). Субстратом цього ферменту є фосфорильована кіназа ERK відповідного MAPK-каскаду. МКР1 дефосфорилує залишки тирозину і треоніну в консервативній послідовності Thr-Glu-Tyr ERK, що веде до її інактивації. Тепер відомо, що **VH1-подібні DUSPs** відіграють важливу роль у численних клітинних функціях, включаючи реорганізацію цитоскелета, контроль клітинного циклу, регуляцію апоптозу й метаболізму РНК. 43 ферменти, які належать до VH1-подібних DUSPs, мають виражену гомологію відносно VH1 і, у свою чергу, поділяються на три класи (I–III), у межах яких ферменти мають більший відсоток гомології. Частина із цих ферментів має *два CH2-домени* (від *cdc25 homology*) – CH2A і CH2B, що за структурою подібні до бактеріального та мітохондріального ферментів роданези (див. дод., п. 9) і до послідовностей, фланкуючих активний сайт фосфатази Cdc25, а також розташований між ними *мотив взаємодії з MAP-кіназами* (*kinase interaction motif, KIM*), представлений послідовністю із лужних і гідрофобних амінокислот. У молекулах інших VH1-подібних DUSPs присутні *PEST-домен* (див. дод., п. 10) або додаткові N- і C-кінцеві домени. *Усі вони в активному центрі мають консервативні залишки аспарагінової кислоти, цистеїну та аргініну*. Атипові DUSPs не мають CH2-доменив і мотиву взаємодії з кіназами.

Представники **I класу VH1-подібних DUSPs – фосфатази MAP-кіназ** (*MAP Kinase Phosphatases, MKPs*) – залучаються у регуляцію сигнальних шляхів, опосередкованих MAPK-каскадами. Так, активність MAPKs – кінцевих кіназ трикіназного модуля (ERK, p38, JNK) – регулюється балансом між активностями протеїнкіназ подвійної специфічності MAPKK (що фосфорилують MAPKs за залишками тирозину та треоніну в Thr-Glu-Tyr-послідовності) і протеїнофосфатаз (які дефосфорилують фосфорильовані залишки тирозину та (або)

треоніну). Дефосфорилування залишків фосфотирозину можуть здійснювати кілька класичних РТРs – наприклад, РТР-SL, СТЕР та He-РТР, у некаталітичному сегменті яких наявна послідовність взаємодії з кіназами. МКРs також функціонують як фосфатази MAP-кіназ, розпізнаючи фосфорильовані залишки як треоніну, так і тирозину в послідовності Thr–Glu–Tyr активаційної петлі. У структурі МКРs присутній *C-кінцевий каталітичний сигнатурний мотив C-X5-R* і некаталітична *N-кінцева ділянка із CH2A та CH2B-доменами й мотивом взаємодії з MAP-кіназами* (рис. 3.23) [Wu J. et al.].

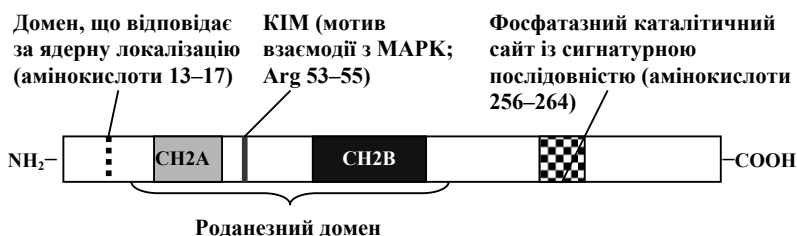


Рис. 3.23. Структура МКР1: висококонсервативна С-кінцева ділянка із сигнатурною послідовністю; N-кінцевий домен відповідає за ядерну локалізацію (містить збагачену лейцином послідовність ядерної локалізації) і сайт зв'язування із MAPK (КІМ, збагачений аргініном). Каталітично неактивний роданезний домен локалізований між залишками 20–137

Ці МКРs різняться типом експресії (конститутивна або індукційна), тканинною і субклітинною локалізацією (ядерна або цитозольна), а також специфічністю стосовно окремих членів родини MAP-кіназ, яка визначається взаємодією між КІМ мотивом у некаталітичних сегментах DUSPs і MAPK. Наприклад, N-кінцевий сегмент МКР3 специфічно сполучається з ERK2-кіназою, яка виступає фізіологічним субстратом МКР3.

Низка інших представників I класу залучається у регуляцію реорганізації мікрофіламентів, полімеризації актину та ін.

До II класу V^{H1}-подібних DUSPs належать 10 DUSPs людини, зокрема фосфатази PTEN, PRLs та CDC14s, а також фермент, залучений у формування кепу під час процесингу мРНК (див. дод., п. 11).

Найвідомішим членом цієї групи DUSPs є **PTEN** (*phosphatase and tensin homolog, гомолог фосфатази й тензину*). Цей фермент виступає супресором пухлин: втрата або мутація відповідного гена виявляється у численних типах раку людини (детально див. підрозд. 4.3) [Ostman A. et al.]. PTEN має 403 амінокислотні залишки; на N-кінці розташований РТР-домен, поруч із ним – С2-домен, що слугує для сполучення із фосфоліпідами і може полегшувати локалізацію ферменту біля ПМ. С-кінцевий регуляторний сегмент білка містить мультиплетні сайти для фосфорилування, а також послідовність –Thr–Lys–Val–COOH (*PDZ-зв'язувальний домен*, див. Додаток, п.12). Фосфорилування С-кінцевої ділянки може залучатися в контроль стабільності білка, а також його активності. Зокрема, фосфорильовані амінокислотні залишки можуть вступати у внутрішньомолекулярні асоціації із N-кінцевим РТР- та С2-доменами, унаслідок чого утворюється "закрита" конформація ферменту, яка унеможливує його зв'язування із мембранами. Дефосфорилування С-кінцевого хвоста "відкриває" конформацію, що сприяє сполученню ферменту з мембраною та його активації. PDZ-зв'язувальний домен, що також наявний на С-кінці молекули, відповідає за здатність ферменту взаємодіяти із PDZ-доменвмісними білками й таким чином залучається у регуляцію його локалізації, стабільності та активності.

Субстратна специфічність PTEN є відмінною від більшості інших РТР (у тому числі й класичних рецепторних і цитозольних): цей фермент регулює сигнальну трансдукцію шляхом дефосфорилування небілкових субстратів. Хоча цей фермент є членом родини РТРs і має тирозинфосфатазну активність, вона проявляється лише відносно дуже кислих субстратів, а його основною мішенню є мембранні 3'-фосфорильова-

ні фосфоліпіди, зокрема ліпідний вторинний посередник PI-3,4,5-P3, який генерується із PI-4,5-P2 під впливом PI3K (розд. 4). Таким чином, PTEN є компонентом PI3K-залежної сигнальної системи, що залучається в зупинку цього шляху, безпосередньо дефосфорилуючи PI-3,4,5-P3 до PI-4,5-P2. Унаслідок цього PTEN виступає негативним регулятором інсулінової сигналізації [Tsou R. et al.].

Представники **третього класу VН1-подібних DUSPs** за структурою схожі на класичні цистеїнзалежні PTPs. Прикладом ферментів цієї групи є **PTPMT1** (*PTP localized to the mitochondrion 1, перша PTP, локалізована в мітохондрії*). За здатністю дефосфорилувати ліпідні субстрати ця протеїнфосфатаза подібна до PTEN, і тому спочатку її було названо PLIP (*Phospho-Lipid Inositol Phosphatase, фосфатаза фосфоліпідних інозитолів*). Нова назва цього ферменту – PTPMT1 – зумовлена тим, що, на відміну від інших PTPs, він сполучений N-кінцевою сигнальною послідовністю із матриксною поверхнею внутрішньої мітохондріальної мембрани, де міститься разом із білковим комплексом, що відповідає за транспорт електронів і продукцію АТФ. Втрата PTPMT1 у клітинах інгібує активності комплексів I і II дихального ланцюга, що порушує мітохондріальні процеси. Основним субстратом PTPMT1 є фосфатидилгліцеролфосфат – проміжний продукт біосинтезу кардіоліпінів, котрі є найважливішими компонентами внутрішньої мембрани мітохондрій. За відсутності PTPMT1 акумулюється фосфатидилгліцеролфосфат і порушується формування фосфатидилгліцеролу, безпосереднього попередника кардіоліпінів [Stoker A.], [Tonks N.].

3.2.4. Низькомолекулярна тирозинова протеїнфосфатаза та cdc25-фосфатази

Низькомолекулярна PTP (*low molecular weight PTP, LMW PTP*) та Cdc25-фосфатази (від *cell division cycle phosphatases, фосфатаза, залучена в регуляцію клітинного*

циклу) унаслідок структурних особливостей їхніх молекул не можуть бути віднесені до класичних цистеїнзалежних РТPs або VН1-подібних DUSPs. Як і останні, вони мають консервативну послідовність, залучену в каталітичний процес – сигнатурний мотив, проте різняться від них розташуванням або наявністю консервативного залишку аспарагінової кислоти. Тоді як у молекулах класичних цистеїнзалежних РТPs або VН1-подібних DUSPs цей залишок міститься з N-кінця від каталітично важливого залишку цистеїну, локалізованого в сигнатурному мотиві, то в молекулі низькомолекулярної РТР він наявний на С-кінці від сигнатурного мотиву, а в Cdc25-фосфатази він узагалі відсутній.

Cdc25 фосфатази поряд із VН1-подібними DUSPs мають подвійну специфічність; однак єдиним їхнім субстратом є циклінозалежні кінази (*cyclin-dependent kinases, Cdk*s). У людини виявлено три представники цих ферментів (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C), які кодуються різними генами, активують Cdkс шляхом видалення двох фосфатних груп із залишків фосфотреоніну-14 і фосфотирозину-15 в АТФ-зв'язувальному домені їхніх молекул, виступаючи таким чином позитивними регуляторами прогресії клітинного циклу, забезпечуючи перехід клітинного циклу із G1 у S й із G2 у M фазу.

Фосфатази цієї групи представлені білками (470–530 амінокислотних залишків), варіабельна N-кінцева ділянка яких виконує регуляторні функції (зокрема, містить сайти для фосфорилювання й убіквітінування), а висококонсервативна С-кінцева частина є каталітичною і характеризується наявністю СН2А, С–Х5–R і СН2В послідовностей. Гомологія Cdc25-фосфатаз із іншими цистеїнзалежними РТPs проявляється лише в ділянці сигнатурного мотиву (С–Х5–R) (рис. 3.24). Він розташований між двома доменами – СН2А і СН2В, виявленими також у складі ферменту роданези, наявного у бактерій і в мітохондріях (як уже йшлося вище, подібна структура характерна і для N-термінального некаталітичного домену МКPs – представників VН1-подібних фосфатаз подвійної специфічності).

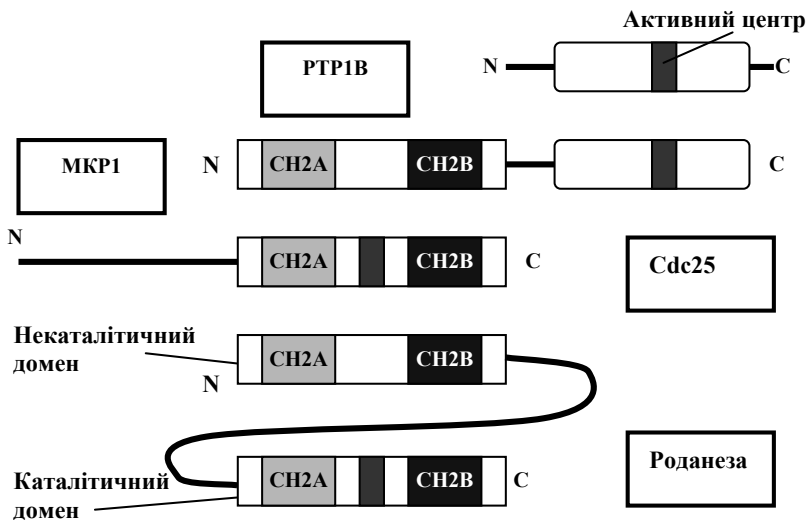


Рис. 3.24. Доменна структура Cdc25-фосфатаз порівняно з іншими цистеїнзалежними PTPs: CH2A і CH2B послідовності характерні для каталітичного домену Cdc25-фосфатаз і некаталітичної ділянки MKP1

Загалом будова фосфатази Cdc25A ідентична каталітичному домену роданези, що містить активний центр із нуклеофільним залишком цистеїну (цей ензим має два високогомологічні домени, і лише одному із них притаманна ферментативна активність) (рис. 3.25).

Каталітичний механізм Cdc25 подібний до функціонування класичних PTPs та VH1-подібних DUSPs і передбачає наявність двох стадій із формуванням цистеїніл-фосфатного інтермедіату; при цьому мутації цистеїну або аргініну в межах сигнатурного мотиву інактивують даний фермент. Для Cdc25 консервативними залишками в межах сигнатурного мотиву є Cys-430 і Arg-436. Функцію відсутнього в молекулі Cdc25, але каталітично необхідного залишку аспарагінової кислоти відіграє при цьому залишок Glu-431, розташований поруч із нуклеофільним цистеїном.

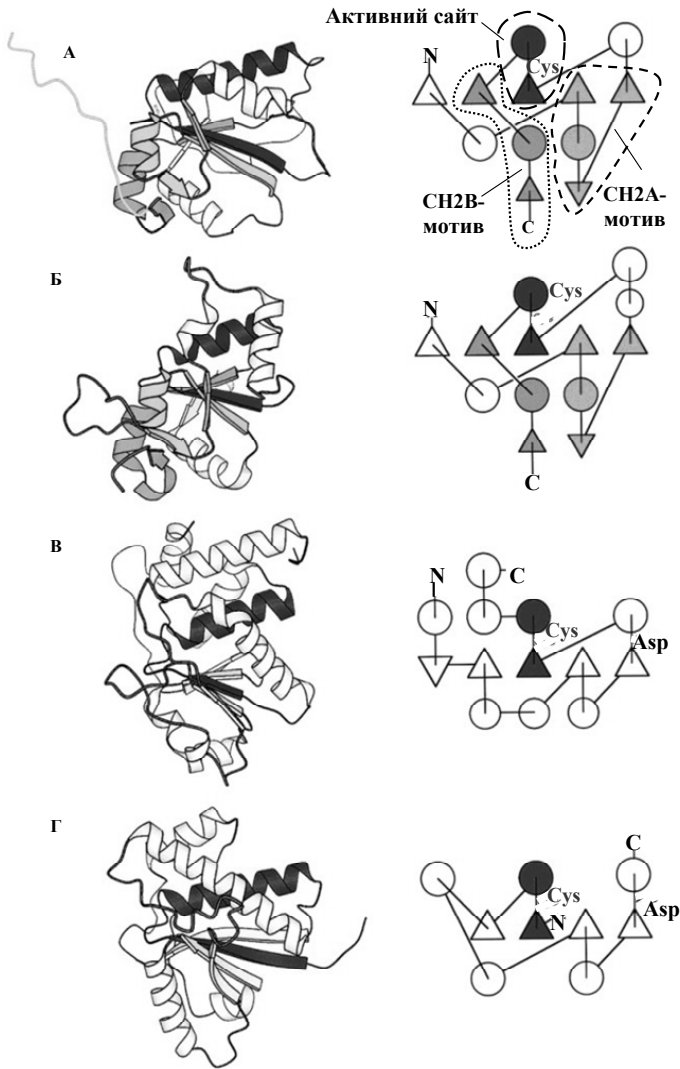


Рис. 3.25. А – Cdc25A-фосфатаза, Б – каталітичний домен роданези, В – Vh1-подібні DUSP, Г – LMW-PTP. Cdc25-фосфатаза за структурою є ідентичною каталітичному домену роданези. "Cys" – локалізація нуклеофільного залишку цистеїну; "Asp" – каталітично необхідний залишок аспарагінової кислоти в молекулах Vh1-подібних DUSP і LMW-PTP

Каталітичний залишок Cys-430 може формувати внутрішньомолекулярний дисульфідний зв'язок із наявним у структурі цих фосфатаз іншим залишком цистеїну – Cys-384. Це пояснює чутливість даних ферментів до впливів окисного стресу і втрату їхньої активності за відсутності відновлювальних агентів [Fauman E. et al.].

Підвищену експресію Cdc25 виявляють у багатьох випадках онкологічних розладів, отже, інгібітори Cdc25 можуть бути використані як потенційні антиракові препарати.

Низькомолекулярна РТР – LMW РТР – кодується геном *ACPI* людини і є висококонсервативним білком із М. м. 18 кД, виявленим у організмів різних рівнів організації – від бактерій до ссавців. Подібно до класичних РТРs та VH1-подібних DUSPs, цей фермент в активному сайті містить сигнатурний мотив із каталітично необхідними залишками Cys-12 і Arg-18, але, на відміну від них, має іншу локалізацію консервативного залишку Asp (Asp-129) (рис. 3.25).

LMW РТР за будовою подібна до бактеріальної арсенатредуктази (див. дод., п. 13), причому найбільша схожість цих ферментів виявляється в ділянці активного сайту. Функціонування арсенатредуктази передбачає утворення ковалентного арсеностеїнового комплексу, що є подібним до формування цистеїнілфосфатного інтермедіату при РТР-опосередкованому каталізі; до того ж, арсенатредуктаза виявляє протеїнтирозинфосфатазну активність *in vitro*. LMW РТР дефосфорилує за залишками фосфотирозину численні рецептори факторів росту, зокрема PDGF-R та інсуліновий рецептор, і таким чином негативно регулює функції цих білків. Також цей фермент залучається у контроль клітинного росту й ремоделювання цитоскелета.

Активність LMW РТР може регулюватися фосфорилуванням за двома специфічними залишками тирозину; також вона залежить від локалізації ферменту. Більш того, залишки цистеїну в активному центрі LMW РТР під час сигналізації від ростових факторів можуть підлягати оборотному окисненню, яке інгібує ферментативну активність ензиму. Відновлення фосфатазної активності при цьому залежить від доступності відновленого глутатіону [Raugei G. et al.].

Розділ 4

РІЗК-ЗАЛЕЖНІ СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ

4.1. Родина фосфатидилінозитол-3-кіназ

Контрольований метаболізм інозитолових фосфоліпідів є фундаментальним для сигнальної трансдукції в еукаріотичних клітинах. І шлях обміну цих сполук опосередкований фосфоліпазами С, які гідролізують PI-4,5-P2 до I-1,4,5-P3 та ДАГ, тоді як ІІ шлях залучає РІЗК-кінази, які фосфорилують 3'-ОН-групу інозитолового кільця інозитолових фосфоліпідів (PI – *phosphatidylinositol*, *фосфатидилінозитол*), продукуючи PI-3-P (*phosphatidylinositol-3-monophosphate*, *фосфатидилінозитол-3-монофосфат*), PI-3,4-P2 (*phosphatidylinositol-3,4-diphosphate*, *фосфатидилінозитол-3,4-дифосфат*), PI-3,4,5-P3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*, *фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат*).

РІЗК залучаються у сигнальну трансдукцію, ініційовану широким колом гормонів. Більшість пептидних гормонів здатні активувати РІЗК, проте особливості біохімічних механізмів та залучення специфічних ізоформ РІЗК відомі лише для ангіотензину ІІ, лептину та інсуліну. Також добре вивченими є РІЗК-залежні відповіді клітини на вплив стероїдних гормонів, наприклад естрогену.

На сьогодні ферменти із РІЗ-кіназою активністю класифікують у три класи, представники яких різняться за первинною структурою, механізмами регуляції та типом ліпідних субстратів.

Ензими класу І РІЗК є найкраще вивченими і каталізують фосфорилування фосфатидилінозитолів у третьому положенні інозитолового кільця. Їхнім **основним субстратом** *in vivo* є фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат PI-4,5-P2, який у процесі реакції перетворюється на PI-3,4,5-P3. Крім того, *in vitro* РІЗК І класу відповідають за продукцію фосфатидилінозитол-3-монофосфату (PI-3-P) і фосфатидилінозитол-3,4-дифосфату (PI-3,4-P2) – у цих реакціях відповідними субстратами виступають фосфатидилінозитол (PI) і фосфатидилінозитол-4-монофосфат (PI-4-P).

Представники цього класу є гетеродимернимим білками, що складаються із каталітичної (p110) та регуляторної адаптерної субодиниці (у різних випадках – p85, p50, p55, p87, p101) (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Характеристика субодиниць PI3K різних класів

Група	Ген	Білок	Алель	Код ферменту
PI3K II класу	<i>PIK3C2A</i>	PI3K, клас 2, α-поліпептид	PI3K-C2α	2.7.1.154
	<i>PIK3C2B</i>	PI3K, клас 2, β-поліпептид	PI3K-C2β	
	<i>PIK3C2G</i>	PI3K, клас 2, γ-поліпептид	PI3K-C2γ	
PI3K III класу	<i>PIK3C3</i>	PI3K, клас 3	Vps34	2.7.1.137
PI3K I класу, каталітична субодиниця	<i>PIK3CA</i>	PI3K, каталітична, α-поліпептид	p110-α	2.7.1.153
	<i>PIK3CB</i>	PI3K, каталітична, β-поліпептид	p110-β	
	<i>PIK3CG</i>	PI3K, каталітична, γ-поліпептид	p110-γ	
	<i>PIK3CD</i>	PI3K, каталітична, δ-поліпептид	p110-δ	
PI3K I класу, регуляторна субодиниця	<i>PIK3R1</i>	PI3K, регуляторна субодиниця 1 (α)	p85-α	N/A
	<i>PIK3R2</i>	PI3K, регуляторна субодиниця 2 (β)	p85-β	
	<i>PIK3R3</i>	PI3K, регуляторна субодиниця 3 (γ)	p55-γ	
	<i>PIK3R4</i>	PI3K, регуляторна субодиниця 4	p150	
	<i>PIK3R5</i>	PI3K, регуляторна субодиниця 5	p101	
	<i>PIK3R6</i>	PI3K, регуляторна субодиниця 6	p87	

Усі ферменти цього класу активуються різними позаклітинними стимулами, причому така активація опосередковується рецепторними РТКs, G білок-сполученими рецепторами (а точніше – комплексом $\beta\gamma$ -субодиниць тримерних G-білків, який після стимуляції рецепторів відокремлюється від α -субодиниці) або малим G-білком Ras через пряму взаємодію між **Ras-GTP і каталітичною субодиницею p110**.

Після активації різні ізоформи РІЗК I класу залучаються у регуляцію широкого кола внутрішньоклітинних процесів, зокрема модулюють прогресію клітинного циклу, ріст і міграцію клітин, їхню адгезію та виживання, причому надмірна активація цих ферментів може стати причиною злякисного переродження клітин. **Ефекторами цих ензимів виступають РН-доменвімісні білки, такі як серин/треонінова протеїнкіназа ПкВ/Akt, цитозольні тирозинові протеїнкінази Vtk, ТЕС, ІТК, та малі ГТФази Cdc42, Rac тощо.**

Ферменти II класу є великими білками (170–210 кД) із каталітичним доменом, який на 45–50 % гомологічний p110, і С-термінальною ділянкою, гомологічною С2-домену класичної ПкС, що опосередковує зв'язування іонів кальцію і фосфоліпідів. Їхні молекули представлені трьома каталітичними ізоформами (С2 α , С2 β і С2 γ), регуляторних субодиниць ферменти цього класу не мають (табл. 4.1). Ізоформи С2 α і С2 β експресуються у різних тканинах, С2 γ – лише в гепатоцитах. РІЗК II класу залучені у продукцію як РІ-3-Р, так і РІ-3,4-Р2 – субстратами при цьому виступають відповідно РІ і РІ-4-Р. Також у присутності фосфатидилсерину ці ферменти фосфорилують РІ-4,5-Р2.

За структурою підклас II РІЗКs різняться С-кінцевим С2 доменом. Він втрачає критичний залишок Asp, який необхідний для зв'язування іонів Ca²⁺, тому кінази класу II РІЗКs зв'язують ліпіди Ca²⁺-незалежно.

Найвідоміший представник **ферментів III класу** – білок дріжджів, що кодується геном *VPS34*, фосфорилує виключно РІ з утворенням РІ-3-Р та залучається у регуляцію везикулярного транспорту. Нещодавно ідентифіковано низку подібних ферментів і в клітинах інших організмів. За структурою білок *VPS34*

більш подібний до кіназ I класу і є гетеродимером, який складається із каталітичної (Vps34) і регуляторної (Vps15/p150) субодиниць (табл. 4.1). PI3K III класу, імовірно, залучені у транспорт білків і везикул.

Каталітичні субодиниці PI3K *in vitro* мають також серин/треонін кіназну активність, (щодо *in vivo* – невідомо); ліпідна субстратна специфічність усіх ізоформ є подібною, тоді як здатність фосфорилувати білки проявляється різною мірою.

Окрім PI3K класів I–III, є група менш подібних ферментів, які інколи позначають як PI3K IV класу. До них відносять, зокрема, білки ATM (*ataxia-telangiectasia mutated protein, білок, мутований при атаксії-мелангієктазії*), ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein, білок, подібний до ATM і Rad3*), а також mTOR (*mammalian target of rapamycin, білок-мішень рапаміцину*), які по суті є серин/треоніновими протеїнкіназами (також див. підрозд. 6.3).

У ссавців є чотири гени, що кодують p110 PI3K класу I – PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG та PIK3CD (табл. 4.1) – їхні білкові продукти позначають як p110 α , β , γ і δ , а **PI3K, що містять відповідні каталітичні субодиниці – як PI3K- α , - β , - γ , - σ** . Два перші білки експресуються в усіх тканинах; γ і δ – у лейкоцитах. Гомологія білків виявлена у N-термінальній ділянці, у домені зв'язування білка Ras, ліпід-зв'язувальній C2 ділянці та в кіназному каталітичному домені.

За подібністю у амінокислотній послідовності виділяють дві підгрупи I типу PI3K – субкласи IA і IB (рис. 4.1).

До IA субгрупи належать **PI3K- α , - β , - σ** , які потребують регулятора p85 (p85 α , p85 β або p85 γ , що кодуються різними генами – PIK3R1, PIK3R2 та PIK3R3 відповідно). Крім того, виявлені сплайсинг-варіанти адаптерної субодиниці – p50 α і p55 α , присутні в жировій тканині, м'язах, печінці, мозку, а також мозкова форма p55 γ . Для PI3K IA субгрупи характерні три варіанти каталітичної субодиниці p110–p110 α , β , і δ (дві перші ізоформи експресуються в усіх клітинах, а p110 δ – у лейкоцитах, де залучаються у функціонування адаптивної імунної системи).

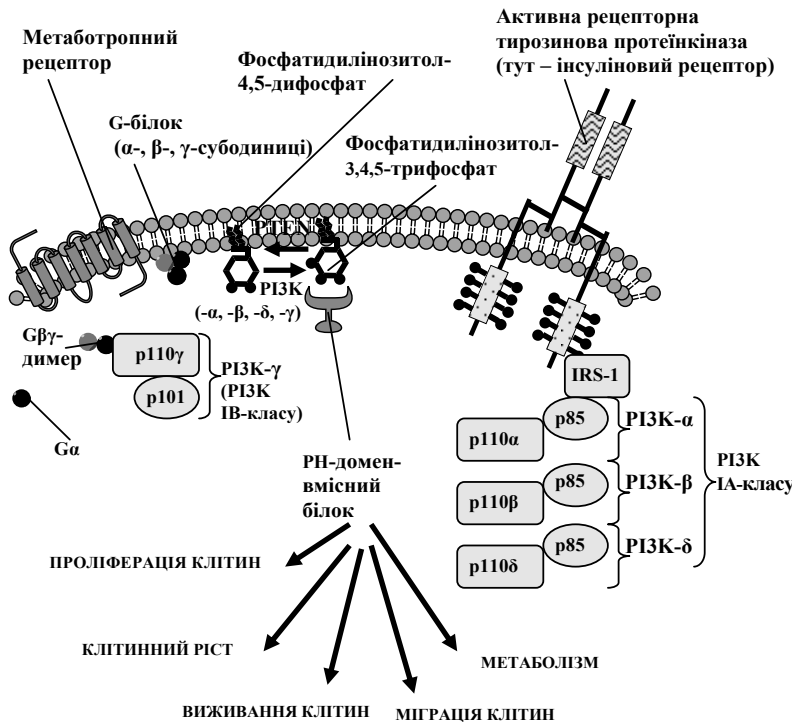


Рис. 4.1. PI3K класу I. Представники класу IA PI3K (PI3K-α, -β, -δ) в основному активуються гРТКs, тоді як PI3K класу IB (PI3K-γ) активується лише GPCR, зв'язаними з Gi-білком. PI3K класу IA зв'язують регуляторну (адаптерну) субодиницю p85, яка, у свою чергу, своїм SH2-доменом приєднується до аутофосфорильованої гРТКs або адаптерного білка, наприклад IRS. PI3K-γ (клас IB) зв'язує регуляторні (адаптерні) субодиниці p101 або p84/87 і вільний димер Gβγ, утворений при активації GPCRs

p110α субодиниця має кілька доменів, у тому числі N-термінальний адаптерозв'язувальний домен (*adaptor-binding domain, ABD*), Ras-зв'язувальний домен (*Ras-binding domain, RBD*), C2-домен, що сполучається із ПМ, спіральний домен (*helical domain, HD*) з невідомими функціями і власне

каталітичний кіназний домен. Функціонування цих доменів координується спеціальним доменом регуляторної субодиноці p85 (NSH2).

Усі члени p85 родини на С-кінці містять p110-зв'язувальну ділянку (*inter-SH2 (iSH2) домен*), яка оточена двома іншими SH2 доменами (N-термінальний (NSH2) і С-термінальний (CSH2)), що зв'язують фосфотирозин, тому активація РІЗК ІА підгрупи в основному пов'язана з рецепторними РТКs або фосфотирозинвмісними адаптерними білками. Основна роль iSH2 – міцне сполучення адаптерозв'язувального домену (ABD) **каталітичної субодиноці p110**, ефективне утримання гетеродимеру. Зв'язування фосфотирозину фланкуючими SH2 доменами спричиняє конформаційні зміни, які поширюються на каталітичну субодиноцю, наслідком чого стає активація ферменту – адже у стані спокою p85 має інгібуючий вплив на активність p110.

На N-кінці молекули p85 розташований ВН-домен (*breakpoint cluster region homology*), оточений двома багатими на пролін ділянками, який проявляє GАР-активність (властивості активатора ГТФази) відносно малих G-білків родини Rho, Cdc42, Rac1, причому консервативні залишки Arg-151, Lys-187 і Pro-270 відіграють у цьому важливу роль. Фланкуючі багаті на пролін ділянки, у свою чергу, є ідеальними лігандами для SH3-вмісних цитозольних тирозинових протеїнкіназ (Src, Lyn і Fyn).

SH3 домен у складі p85 (на N-кінці) відповідає за білок-білкові взаємодії шляхом розпізнавання і зв'язування багатих на пролін послідовностей у білках-мішенях з утворенням мультимерних сигнальних комплексів. Зокрема, SH3 домен взаємодіє із Src, Cdc42GAP і білковим продуктом протоонкогена Cbl. SH3 домен сполучається з багатими на пролін мішенями через низку гідрофобних взаємодій і водневих зв'язків, зокрема через консервативні залишки Trp-55, Pro-70, Tyr-73.

Отже, у стані спокою p110-субодиноця конститутивно зв'язана з p85 через iSH2 домен останньої і є неактивною в цитозолі. Після активації рецепторною РТК регуляторна субодиноця РІЗК своїми SH2-доменами зв'язує залишок фосфорильованого тирозину в цитозольній ділянці рецептора. Це, з одного боку, знижує інгібуючий ефект p85 на p110-кіназну активність через конфор-

маційні зміни {p85-p110} комплексу (що може залучати SH3- і VH-домени, які мають пригнічувальну дію відносно каталітичної активності p110-субодиниці), а з іншого – сприяє локалізації каталітичної субодиниці ферменту у ПМ, біля його субстрату. Активована rPTK, як уже зазначалося, може й непрямо активувати p110, діючи через білок Ras.

Два сплайсинг-варіанти, p85 α -p55 α і p50 α , містять консервативні SH2-домени, але втрачають SH3- та VH-домени, а отже, є більш потужними активаторами p110.

PI3K- α (p110 α /p85) залучена до прогресії росту пухлин, оскільки здійснює контроль проліферації, виживання клітин і регуляцію функцій потенціального онкогена ПкВ/Akt. За великої кількості онкологічних розладів виявлено мутовані форми цього ферменту, причому найчастіше подібні мутації конститутивно активують *PI3K- α* і можуть запустити онкогенну трансформацію та хронічну активацію ефекторних сигнальних шляхів, зокрема молекул, причетних до процесів метастазування, розвитку множинної лікарської резистентності, ангиогенезу та клітинного росту. Тому *PI3K- α* можна розглядати як одну із потенційних мішеней при пошуку шляхів терапії онкологічних розладів.

PI3K- β (p110 β /p85) активується інсуліном через інсуліновий рецептор і ініціює каскад подій, які контролюють ріст клітин і метаболізм. Активація *PI3K- β* опосередкована взаємодією регуляторної субодиниці p85 із білками-субстратами інсуліну, наприклад, IRS-1 або IRS-2, фосфорильованими за залишком тирозину. Існує і незалежний від фосфотирозину шлях активації *PI3K- β* , який залучає G β у димер і G-білок-сполучені рецептори.

PI3K- δ (p110 δ /p85) експресується здебільшого у клітинах крові, зокрема у клітинах, які спричиняють або опосередковують гематологічні злоякісні новоутворення, запалення, аутоімунні хвороби, алергію.

Єдиний член ІВ підгрупи *PI3K* – *PI3K- γ* – складається із каталітичної p110 γ субодиниці, яка не має N-термінальної p85-зв'язувальної ділянки і взаємодіє з p101 та p84/87 регуляторами (табл. 4.1). *PI3K- γ* активується GPCRs, а точніше – вивільненим після активації гетеротримерного G-білка (зазвичай Gi-субтипу) димером G β у; присутність некаталітичного ре-

гулятора (p101 та p84/87) при цьому полегшує активацію, наближуючи PI3K- γ до ПМ. Тоді як PI3K- γ активується виключно GPCRs, PI3K- β класу IA може активуватися як rPTKs, так і GPCRs. З іншого боку, подібно до PI3K IA класу, PI3K- γ має здатність зв'язувати GTP-Ras, і це може також стимулювати його активність. PI3K- γ має обмежене розповсюдження у тканинах і експресується головним чином у нейтрофілах, макрофагах і дендритних клітинах, залучаючись до регуляції специфічного імунітету.

4.2. Сигнальні шляхи PI3K; принцип ПкВ/Акт-залежного шляху

Мишенями PI3K-сигналізації, як уже зазначалося, виступають малі G-білки, тирозинові й серин/треонінові протеїнкінази. Зокрема, активація ГТФаз Rac і Rho, які координують динамічну організацію актинового цитоскелета та збирання асоційованих інтегринових структур, стимулюється гуанін-нуклеотид-обмінними факторами GEFs, які як обов'язковий компонент містять каталітичний домен Dbp-гомології, розташований поруч із PH-доменом, що є критичним для функцій GEFs. Одним із добре вивчених GEFs є *Vav-1*, каталітична активність якого залежить від тирозинового фосфорилування Src-кіназою. PI-3,4,5-P3 зв'язують PH-домен *Vav-1*, що сприяє тирозинкіназоопосередкованій активації цього ферменту. Здебільшого ГТФази Rac і Rho мають плейотропні функції у клітині, зокрема внаслідок того, що вони залучаються в регуляцію MAPK p38 і JNK та активацію транскрипційних факторів. Однак PI3K індукує лише Rac і Rho-опосередковані відповіді в регуляції актинового цитоскелета й не спричиняє впливу цих білків на MAPK і транскрипційні фактори. Механізми цього явища поки не з'ясовані.

Члени Тес-родини цитозольних РТКs (ІТК, Тес, Btk) потребують фосфорилування в межах їхньої активаційної петлі кіназами родини Src для активації. ІТК, Тес, Btk містять N-кінцевий PH-домен, який зв'язує PI-3,4,5-P3 та контролює їхню асоціацію із ПМ та Src-кіназами. Мутації в їхньому PH-доміні зумовлюють розвиток агамаглобулінемії людини і, відповідно, імунодефіцит у щурів.

Класичними мішенями PI3K є серин/треонінові протеїнкінази PDK1 і Akt.

Кінази Akt є серин/треоніновими протеїнкіназами, що містять N-кінцевий PH-домен, центральний каталітичний домен і короткий C-кінцевий регуляторний домен та виступають клітинними гомологами білкового продукту ретровірусного онкогена *v-Akt*. У ссавців виявлені три різні форми ПкВ/Akt, що кодуються різними генами (ПкВ- α , - β , - γ або, відповідно, Akt1, 2, 3). Їхніми основними ефектами є виживання, проліферація (збільшення кількості клітин) і ріст (збільшення розміру клітин), а також впливи на вуглеводний і білковий обміни. Ці ферменти регулюють виживання клітин і метаболізм, зв'язуючи й модулюючи функції низки ефекторів, серед яких NF- κ B, про- та антиапоптозні білки родини Bcl-2 і білок-регулятор активності супресора пухлин p53 Mdm2. Так, кіназа Akt залучена в регуляцію клітинного циклу, є необхідною для інсулін-індукованої транслокації GLUT4 до ПМ, а Akt-опосередковане фосфорилування кінази глікогенсинтази 3 (*glycogensynthase 3*, *GSK3*) спричиняє інгібування цього ферменту і, як наслідок, – зростання синтезу глікогену.

Дослідження на нокаутуваних мишах показали асоціацію кожної ізоформи ПкВ/Akt зі специфічною функцією. Так, *ПкВ α /Akt1* пригнічує процеси апоптозу й тому залучена в ріст і виживання клітин. Крім того, Akt1 також індукує шляхи біосинтезу білків, і тому є ключовим сигнальним білком у клітинних шляхах, які спричиняють гіпертрофію скелетних м'язів, загальний ріст тканин. Akt1, як основний фактор, залучений у низку ракових розладів, була ідентифікована як онкоген. *ПкВ β /Akt2* є основним *in vivo* регулятором гомеостазу глюкози. Відсутність ПкВ β /Akt2 зумовлює розвиток діабету II типу як у мишей, так і в людини. Миші, дефіцитні при Akt1, але з нормальною активністю Akt2, не мають відхилень у гомеостазі глюкози, проте тварини є меншими, що відповідає ролі Akt1 у рості. І навпаки, миші з дефіцитом Akt2, але нормальною Akt1, мають незначні відхилення у рості, але характеризуються діабетичним фенотипом (інсулінова резис-

тентність). Роль *Akt3* є менш вираженою. Вона експресується головним чином у мозку, де причетна до розвитку нейронів. Миші з дефіцитом *Akt3* мають зменшений мозок.

Фосфорильовані мембранні фосфатидилінозитולי PI-3,4,5-P3 та PI-3,4-P2 зв'язують PH-домен Akt і приєднують останню до ПМ. Біля ПМ Akt фосфорилується за залишком треоніну-308 у петлі кіназної активації та за залишком серину-473 в гідрофобній ділянці на С-кінці. Перше фосфорилування здійснює інша серин/треонінова протеїнкіназа – PH-вмісна *3-фосфоінозитид-залежна протеїнкіназа-1 (PDK1)* (67 кД). Цей фермент також є важливим для регуляції інших протеїнкіназ, оскільки він, зокрема, фосфорилує ключові залишки в петлі активації ПкС та рибосомального регулятора білкового синтезу та клітинного росту – кінази p70-S6K. PDK1 має N-кінцевий каталітичний домен і С-кінцевий PH-домен, що зв'язує PI-3,4,5-P3 і PI-3,4-P2. Роль PI-3,4,5-P3 у контролі активності PDK-1 та її субклітинної локалізації є гіпотетичною. Вважають, що активність PDK1 регулюється конформацією субстрату, і PI-3,4,5-P3 впливають скоріше на доступність субстрату, ніж безпосередньо на активність PDK1. Наприклад, зв'язування PI-3,4,5-P3 та PI-3,4-P2 PH-доменом Akt знімає аутоінгібування активного сайту, дозволяючи PDK1 фосфорилувати залишок треоніну-308. За іншою гіпотезою, PI-3,4,5-P3 та PI-3,4-P2 ініціюють PH-залежну релокалізацію PDK1 від цитозолу до ПМ. Існує ще одна думка, за якою PH-домен PDK1 є аутоінгібітором, і взаємодія PI-3,4,5-P3 та PI-3,4-P2 з ним знімає це інгібування.

Отже, колокалізація активованої PDK1 і Akt дозволяє Akt фосфорилуватися за залишком треоніну-308, спричиняючи часткову активацію Akt. Повна активація Akt відбувається після другого фосфорилування молекули ПкВ/Akt (за залишком серину-473), яке здійснюється іншим ферментом, не гомологічним PDK1. Цей фермент спочатку було названо PDK2, але сьогодні показано, що ферментативну активність PDK2 мають кілька ензимів, зокрема комплекс TORC2 протеїнкінази mTOR (найчастіше саме цей фермент виступає в ролі активатора Akt), кіназа, сполучена з інтегрином (*integrin-linked kinase, ILK*), і про-

теїнкіназа 2, що активується MAPK – MAPKAPK2. Активна ПкВ/Акт надалі фосфорилує ряд білків, виступаючи таким чином ключовим ферментом РІЗК-залежних сигнальних шляхів.

У нормі Akt є також фосфорильованою за залишком тирозину-450. Таке фосфорилування здійснюється під час трансляції, і якщо цей процес порушується, Akt не функціонує і підлягає убіквітинуванню та деградації у протеасомі.

Акт є антиапоптозним фактором, який здійснює пряме фосфорилування низки компонентів апоптозного каскаду. Так, цей фермент фосфорилує та інгібує проапоптозний білок, що є членом родини Bcl-2 – Bad, який у нормі спричиняє апоптоз, зв'язуючи антиапоптозний Bcl-X_L. Фосфорилування Bad за залишком серину-136, яке здійснює Akt, запобігає цій взаємодії та вивільнює Bcl-X_L, чим унеможливує розвиток апоптозу. Akt також фосфорилує білок Mdm2 (*murine double minute 2*) – негативний регулятор активності білка p53, E3-убіквітинлігазна активність якого робить p53 мішенню для деградації в протеасомі (підпрозд. 5.2.3.1, підпрозд. 6.3). Фосфорилування спричиняє більш активну транслокацію Mdm2 у ядро, де він зв'язує p53 і посилює його деградацію. Akt-залежне фосфорилування білка FKHR – члена родини транскрипційних факторів Forkhead – запобігає його ядерній транслокації та активації генів-мішеней, що кодують такі проапоптозні білки, як BIM та Fas-ліганд. Інші антиапоптозні властивості Akt зумовлені, зокрема, інактивуванням фосфорилуванням каспази-9 та непрямим впливом на транскрипційний фактор NF-κB (Akt фосфорилує кіназу інгібітора NF-κB (*IκB-kinase, IKK*), яка при цьому набуває активності й, у свою чергу, фосфорилує інгібітор NF-κB (*Inhibitor of NF-κB, IKB*), останній деградує з одночасною активацією фактора, який ініціює транскрипцію пропроліферативних генів (підпрозд. 5.2.3.1)).

Інший напрямок впливу ПкВ/Акт – проліферація клітин. Клітинний цикл регулюється координованою дією цикліну D, циклінозалежних кіназ Cdks та інгібіторів останніх. Рівні цикліну D, які є важливими для переходу клітинного циклу із фази G1 у фазу S, регулюються на транскрипційному, посттранскрипційному і посттрансляційному рівнях різними механізмами. Akt запобігає деградації цикліну D через регуляцію активності такої

Cdk, як кінза глікогенсинтази 3β (*glycogen synthase kinase 3β , GSK 3β*). Після фосфорилування кінзаю GSK 3β циклін D стає мішенню для деградації у протеасомі, а Akt може безпосередньо фосфорилувати GSK 3β і блокувати її кінзну активність, що спричиняє акумуляцію цикліну D.

Ефекти ПкВ/Akt на ріст клітин опосередковані її активуючим впливом на один із ключових регуляторів клітинного росту і білкового синтезу – білок *mTOR*. Ця серин/треонінова протеїнкіназа, у свою чергу, фосфорилує та активує *p70-S6 кінзу (S6K)*, яка посилює трансляцію мРНК, а також інші елементи, необхідні для ініціації трансляції мРНК, наприклад, еукаріотичний фактор ініціації 4В (*eukaryotic initiation factor 4B, eIF4B*), білок програмованої клітинної смерті 4 (*programmed cell death protein 4, PDCD4*) та кінзу еукаріотичного фактора елонгації-2 (*eukaryotic elongation factor-2 kinase, eEF2K*).

Ще однією мішенню PI3K та PIP3 є кінза, що індукується сироваткою та глюкокортикоїдами (*serum and glucocorticoid-inducible kinase, SGK*), яка за структурою є високогомологічною Akt і має подібні ефекти на сигнальні шляхи виживання. Проте механізм активації SGK відрізняється від активації Akt, оскільки SGK не має РН-домени.

Як відбувається інгібування активної PI3K – невідомо. Одна з існуючих гіпотез указує на те, що тирозинове фосфорилування p85, яке відбувається після приєднання неактивного {p85-p110} комплексу до rPTKs, служить як негативний регуляторний сигнал, що веде до інактивації p110.

Отже, наслідком активації PI3K стає генерація PI-3,4,5-P3, який функціонує як вторинний посередник в активації ефекторних шляхів. Він зв'язує РН-домени білків-мішеней і може або алостерично модифікувати їхню активність, або індукувати їхню транслокацію до різних ділянок ПМ, де здійснюється їхня активація.

Оскільки результатом активності всіх ізоформ PI3K (PI3K- α , - β , - γ , - δ) є генерація PI-3,4,5-P3, а сигнальні шляхи, у які залучаються ці ферменти, та їхні наслідки для клітини є різними, виникає питання, як саме клітина розпізнає від якої ізоформи утворилися фосфорильовані фосфатидилінозитолі. Кожна ізо-

форма РІЗК має різні механізми активації: РІЗК γ – від рецепторів, спряжених із тримерними G-білками, тоді як $-\alpha$, $-\beta$, $-\delta$ – від рецепторних РТКs. І оскільки кінетика активності G-білків та РТКs є різною, то й відповідні ізоформи активуються у різні терміни життя клітини. Крім того, різною є і субклітинна локалізація G-білків та РТКs і, як наслідок, різними є й ділянки клітини, у яких активується РІЗК. До того ж різні мембранні субдомени містять різні набори РН-вмісних білків – прямих мішеней ліпідних продуктів РІЗК [Cantrell D.].

4.3. РІР3-фосфатази як регулятори РІЗК-залежних сигнальних шляхів

Рівні основного продукту РІЗК – РІ-3,4,5-Р3 – регулюються, крім активності РІЗК, низкою РІР3-фосфатаз, які специфічно видаляють фосфатні групи з інозитолового кільця РІ-3,4,5-Р3.

Гідроліз фосфату в третьому положенні здійснюється фосфоінозитид-ліпідною 3-фосфатазою РТЕН (*phosphatase and tensin homolog, гомолог фосфатази і тензину*), яка знижує рівні РІ-3,4,5-Р3 шляхом його перетворення на РІ-4,5-Р2. *Утворений продукт не є мішенню для РН-доменвмісних білків і нездатний активувати останні, зокрема кіназу Akt – агент, що спричиняє проліферацію. Тому фосфатаза РТЕН вважається пухлинним супресором, а її знижена активність супроводжує ряд онкологічних розладів.* Клітини, бідні на РТЕН, мають підвищені рівні РІ-3,4,5-Р3 та РІ-3,4-Р2 і виявляють конститутивну активацію РІЗК-сигнальних шляхів, опосередковану РТКs родини Tec та Akt. Окрім впливу на фосфоінозитиди, ця фосфатаза може дефосфорилувати й білкові субстрати.

SH2-доменвмісні інозитол(полі)фосфат-5-фосфатази SHIP (*SH2-containing inositol-5-phosphatase*) також діють на РІР3, але видаляють фосфат не із третього, а із п'ятого положення, унаслідок чого продуктом реакції є РІ-3,4-Р2 (ще одним джерелом цієї сполуки є РІЗК II класу). РІ-3,4-Р2 є вторинним месенджером, функція якого через наявність залишку фосфор-

ної кислоти у третьому положенні інозитолового кільця подібна до дії PIP3. Ці сполуки однаково здатні зв'язувати PH-домени білків-мішеней, зокрема Akt. Тому ця фосфатаза не виступає пухлинним супресором. Водночас, SHIP опосередковує важливий механізм негативної регуляції в лімфоцитах, і його втрата супроводжується дисбалансом в імунній відповіді, руйнуванням імунного гомеостазу та розвитком аутоімунних розладів.

4.4. Біологічна роль

PI3K-залежних сигнальних шляхів

Одним із важливих напрямків PI3K-сигналізації, як вже зазначалося, є вплив на вуглеводний обмін. Так, в адипоцитах і м'язових клітинах PI3K-залежна активація ПкВ/Akt контролює інсулін-опосередковане поглинання глюкози шляхом стимуляції везикулярної транслокації транспортера глюкози GLUT4 із внутрішньоклітинних компартментів до ПМ (підпідрозд. 1.4.2.1). Інсулін-опосередковане інгібування печінкового глюконеогенезу також зумовлюється впливом ПкВ/Akt, а саме, ПкВ/Akt-опосередкованим фосфорилуванням транскрипційного фактора *FoxO1* (від "*forkhead box O*"). Після фосфорилування FoxO1 не здатний транслокуватися в ядро та активувати транскрипцію численних генів, необхідних для глюконеогенезу, зокрема генів фосфоенолпіруваткарбоксікінази та глюкозо-6-фосфатфосфатази. Ще одним напрямком впливу ПкВ/Akt на вуглеводний обмін є інгібування активності GSK3, що сприяє синтезу глікогену.

Спрощену схему PI3K- та ПкВ/Akt-залежних сигнальних шляхів інсулінового рецептора в регуляції внутрішньоклітинного і плазматичного рівня глюкози наведено на рис. 4.2. Зв'язування I-R інсуліну веде до аутофосфорилування β -субодиниці рецептора та активації тирозинкіназної активності цитоплазматичного домену. Утворені залишки фосфотирозину у складі I-R стають мішенями для зв'язування РТВ-доменвісного білка-субстрату інсулінового рецептора IRS1.

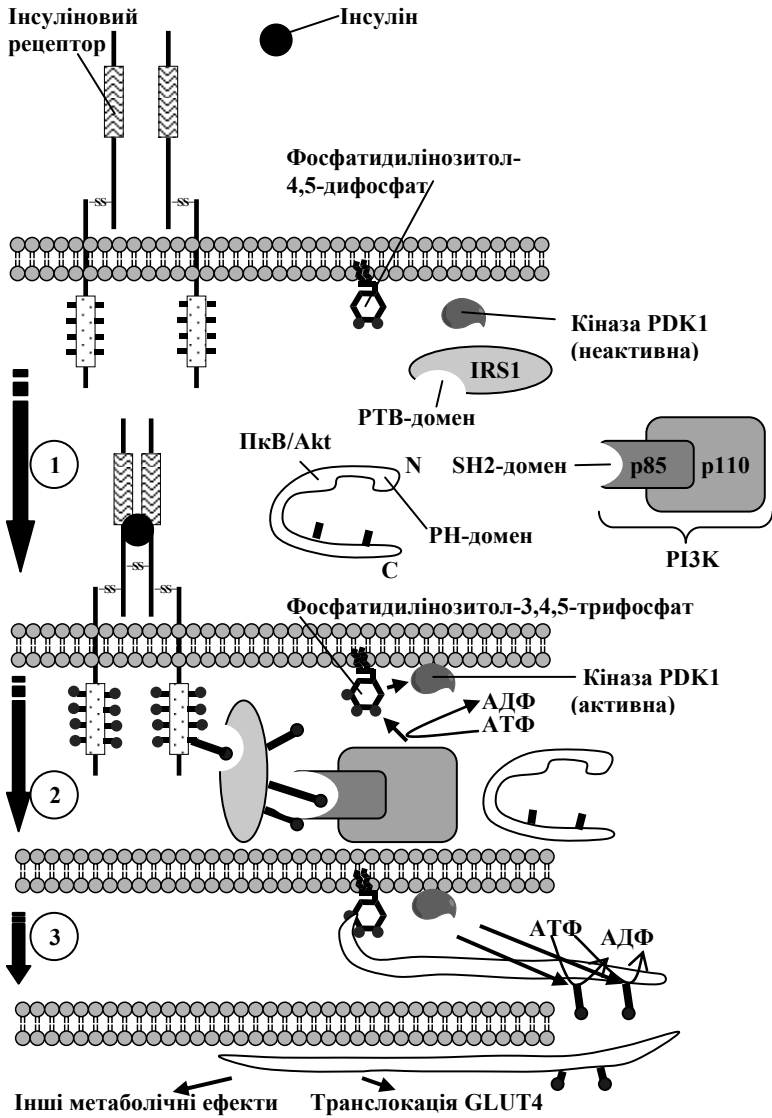


Рис. 4.2. PI3K- та ПкВ/Акт-залежні сигнальні шляхи інсулінового рецептора в регуляції внутрішньоклітинного і плазматичного рівня глюкози

Залишки тирозину білка IRS1 після цього фосфорилуються активним I-R і набувають здатності приєднувати SH2-домен-вмісну PI3K, унаслідок чого остання наближається до свого субстрату – мембранного фосфоліпиду PI-4,5-P3 і фосфорилує його у третьому положенні. Утворений 3'-фосфорильований фосфоліпід PI-3,4,5-P3, у свою чергу, активує 3'-фосфатидилінозитолфосфатзалежну кіназу PDK1, що надалі спричиняє активацію Akt/ПкВ (рис. 4.2, 2). Наслідком останнього стає, зокрема, транслокація транспортерів для глюкози (GLUT4) із цитоплазматичних везикул у клітинну мембрану (рис. 4.2, 3).

Адаптерні білки родини IRS характеризуються подібністю доменів, зокрема наявністю PH-домену і фосфотирозин-з'язувального домену, а також присутністю численних залишків тирозину, які можуть бути фосфорильованими I-R. У клітинах ссавців експресуються чотири різні IRS білки з молекулярною масою у межах 60–180 кД, які мають різну тканинну й субклітинну локалізацію.

IRS1 та IRS2 є широко розповсюдженими, IRS3 обмежено представлений у мозку, печінці, адипоцитах і фібробластах, а IRS4 характерний для ембріональних тканин і м'язових клітин дорослої людини.

Моделі нокаутованих мишей показали, що ізоформи IRS можуть відігравати різну роль: IRS1-, IRS2- і IRS4-дефіцитні миші мають дефекти в гомеостазі глюкози зі зниженою толерантністю до цього моносахариду, підвищені рівні триацилгліцеролів у сироватці крові та інсулінову резистентність печінки. Дефіцит IRS3, навпаки, не має значних впливів на метаболізм. У клітинах людини також ідентифіковано два додаткові IRS білки (IRS5/DOK4 і IRS6/DOK5), які залучені в інсулінову сигналізацію, але не є причетними до активації PI3K.

Після фосфорилування активним I-R, IRS стає мішенню для численних молекул, у складі яких є SH2-домени, що зумовлює розгалуження сигнальних шляхів від активованого інсулінового рецептора. Зокрема, фосфорильовані залишки тирозину в молекулі IRS1 служать докерними сайтами для SH2-доменів p85-регуляторної/адаптерної субодиниці PI3K IA класу, що

надалі приєднує p110 субодиницю до активованого рецептора і до субстрату ферменту – мембранного фосфоліпиду PI-4,5-P2. Продукція з останнього PI-3,4,5-P3, у свою чергу, активує розташовані нижче ефектори, які контролюють різні метаболічні процеси, зокрема, поглинання глюкози, інгібування ліполізу, синтез триацилгліцеролів, синтез глікогену. Дефекти у структурі молекули PI3K супроводжуються змінами у метаболізмі глюкози. Так, зниження експресії генів PI3K IA класу та її адаптерної субодиниці спричиняє розвиток діабету II типу, тоді як їхня надекспресія веде до зростання рівнів 3'-фосфорильованих фосфатидилінозитолів у адипоцитах, що полегшує транслокацію GLUT4 до ПМ. Цікавою виявилася роль регуляторної p85-субодиниці в інсуліновій сигналізації, оскільки, з одного боку, вона є необхідною для стабілізації p110, але з іншого, вільні p85-субодиниці мають інгібуючий вплив на PI3K-сигналізацію. Тому оптимальну відповідь PI3K-шляху на вплив інсуліну визначає критичний молекулярний баланс між регуляторною і каталітичною субодиницями. За фізіологічних умов субодиниця p85 наявна у більшій кількості, ніж p110, і є певне співвідношення між p85 мономерами та p85–p110 димерами. Мономери p85 інгібують продукцію PI-3,4,5-P3 або зв'язуючись із фосфорильованим IRS, або змінюючи субклітинну локалізацію димерів p110/p85.

Фосфатаза PTEN є потенційним негативним регулятором поглинання глюкози, і втрата PTEN у адипоцитах спричиняє підвищення чутливості до інсуліну і залучення GLUT4.

На сьогодні не виявлено специфічних фосфатаз, здатних інактивувати Akt, хоча обробка клітин інгібіторами фосфатаз підвищує активність останньої. ПкВ/Akt може інактивуватися білком *CTMP* (*carboxy-terminal modulator protein*, *карбокситермінальний білок-модулятор*), який, зв'язуючи цю кіназу, запобігає її активації та блокує подальші сигнальні шляхи. Взаємодія з шапероном HSP90, навпаки, протектує ПкВ/Akt від дефосфорильовання і запобігає її інактивації.

Порушення регуляції експресії генів білків, залучених у PI3K/Akt-сигнальні шляхи, здатне спричинити онкологічні розлади. Так, ампліфікація (дублювання) гена p110 виявля-

ється у хворих на рак яєчників, гена Akt2 – на рак яєчників та злоякісні пухлини підшлункової залози. Для регуляторної p85 субодиниці найхарактернішою мутацією є делеція у внутрішньому SH2-домені, унаслідок чого утворюється вкорочений варіант p85 (p65), який спричиняє постійну активацію PI3K – це характерне для раку яєчників і онкологічних ушкоджень кишечника. Крім того, до порушення цього сигнального каскаду ведуть активуючі мутації рецепторних РТКs та втрата фосфатази PTEN [Vivanco I. et al.].

Крім залучення в інсулінову сигналізацію, PI3K причетна й до передачі сигналів від інших біологічно активних сполук [Hirsch E. et al.].

Так, **сигналізація за участю ядерного естрогенового рецептора (*estrogen receptor, E-R*)** передбачає активацію PI3K. У цілому дія естрогену опосередкована сукупністю як прямо контрольованої експресії генів (так звана **геномна, або класична, дія**) так і регуляцією сигнальних каскадів фосфорилування клітини (**негеномна, або позаядерна, дія**).

Позаядерна сигналізація E-R залучає PI3K і може відігравати центральну роль у контролі клітинної проліферації та виживанні. Негеномні ефекти естрогену на PI3K шлях можуть бути спричинені безпосередньою взаємодією E-R із PI3K у процесі, який включає зв'язування p85-регуляторної субодиниці з E-R і наступну E-R-залежну активацію ПкВ/Акт. Альтернативний E-R-опосередкований механізм активації PI3K залежить від ER-індукованої стимуляції рецепторної тирозинової протеїнкінази ErbB2, що надалі запускає залучення/активацію PI3K. Через PI3K E-R також здійснює свої анти-апоптозні ефекти. Виявлення того, що E-R може активувати PI3K у нормальних і трансформованих клітинах, указує на те, що цей шлях може бути причетним до злоякісного переродження клітин (зокрема, при раку легенів людини).

Хоча E-R контролює активність PI3K, також добре описаний і протилежний процес: **у ряді епітеліальних клітин, регуляція E-R-залежної транскрипційної активності може бути мішенню PI3K-сигналізації, навіть за відсутності естрогену, через механізм, який передбачає ПкВ/Акт2-опосередковане фосфорилування E-R.**

PI3K залучається і в сигнальні шляхи ангіотензину (Ang II). Хоча Ang II регулює ріст клітин через незалежні від активації PI3K шляхи, імовірно, що залучення PI3K є необхідним для Ang II-індукованої проліферації гладком'язових клітин судин і контролю скорочення гладеньких м'язів. У Ang II-сигналізацію *in vivo* залучається лише одна з ізоформ PI3K – PI3K- γ . Миші з утраченою PI3K- γ нечутливі до гіпертензії, індукованої впливом Ang II. PI3K- γ контролює скорочення гладеньких м'язів через два різні шляхи: з одного боку, запускає ПкВ/Акт активацію і наступний вхід позаклітинного Ca^{2+} через L-тип Ca^{2+} -каналів, а з іншого боку, пул PI-3,4,5-P3, що продукується PI3K- γ , є необхідним для активації малої ГТФази Rac, можливо, через залучення РН-доменвісних факторів обміну гуанінових нуклеотидів GEFs. Активація Rac, у свою чергу, є критичним етапом, що веде до активації НАДФН-оксидази (підпідрозд. 6.1.1), яка продукує активні форми кисню. Інгібування активності PI3K знижує активацію ПкВ/Акт, білка mTOR, p70-S6 кінази, що є характерним для стимуляції рецептора до Ang II, і пригнічує відповідні ефекти ангіотензину – проліферацію гладком'язових клітин судин (VSMC) та експресію генів. Отже, PI3K- γ є ключовою сигнальною молекулою в Ang II-шляху, і блокування функції PI3K- γ може бути використано в терапії розвитку гіпертензії.

Більшість гормональних сигналів через PI3K обумовлює виживання клітин і проліферацію. І лише один інсулін відповідає за індукцію поглинання глюкози. Причина такої особливості PI3K-залежної дії інсуліну не зовсім зрозуміла. Сучасні гіпотези вказують на те, що в основі цих відмін можуть лежати залучення різних ізоформ PI3K, а також термін і місце генерації PI-3,4,5-P3 у клітині.

Розділ 5

СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ МОНООКСИДУ АЗОТУ

5.1. МОНООКСИД АЗОТУ: ВЛАСТИВОСТІ ТА ШЛЯХИ УТВОРЕННЯ В ОРГАНІЗМІ

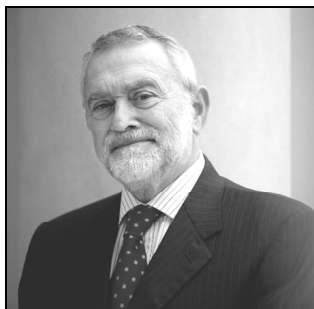
Початок вивчення монооксиду азоту (оксид азоту, *nitric oxide*, *NO*) припадає на 1772 р., коли ця сполука була ідентифікована Джозефом Прістлі як безкольоровий токсичний газ. Понад сторіччя тому було доведено утворення *NO* клітинами прокариотів. Але можливість синтезу *NO* еукаріотичними клітинами була виявлена лише кілька десятиліть тому, а факт генерування цієї сполуки в організмі людини за фізіологічних умов – тільки в 1987 р.

Тепер відомо, що *NO* – це молекула вторинного посередника з унікальними можливостями: вона є газом і тому здатна вільно переміщуватися з однієї клітини до іншої (С. Монкада, 1991). *NO* як вторинний месенджер включається в численні фізіопатологічні функції: релаксацію гладенької мускулатури, нейротрансмісію, процеси запам'ятовування, в імунну регуляцію, диференціювання клітин, тканинний морфогенез, цитотоксичність, клітинну загибель тощо. Ця сполука відіграє головну роль у таких патологічних феноменах, як септичний шок, неспецифічний захист клітин організму-хазяїна від пухлин і внутрішньоклітинних патогенів, гострі та хронічні нейродегенеративні захворювання, деструкція β -клітин підшлункової залози при діабеті, відторгнення трансплантата. С. Снайдер, директор інституту нейробіології Медичної Школи Дж. Хопкінса, відмітив: "За свої 25 років роботи в нейробіології я не знав іншої молекули, яка б

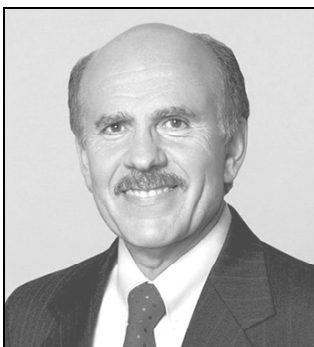
так активно впливала на фізіологічні та патологічні функції організму". У 1992 р. NO була названа журналом "Science" "Молекулою Року", а в 1998 р. Р. Фарчготту, Л. Ігнерро та Ф. Мураду було присуджено Нобелівську премію в галузі медицини та фізіології за роботу, котра привела до відкриття NO як біологічного медіатора, що продукується у клітинах ссавців.



Роберт Фарчготт



Сальвадор Монкада



Луїс Ігнарро

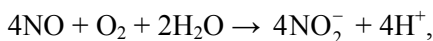


Ферід Мурад

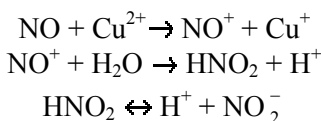
NO є реактивним газом. Реактивність монооксиду азоту залежить від його фізичних властивостей – малий розмір, висока швидкість дифузії, ліпофільність. Наявність одного неспареного

електрона зумовлює його здатність вступати в численні реакції з біологічними молекулами і ця здатність є важливою в сигнальних шляхах NO. Утворюючись у клітинах, монооксид азоту діє як ауто-, так і паракринно; при цьому його сигнальні шляхи обмежуються швидким окисненням NO до нітритів і нітратів, які здатні видалятися із сечею, а також його взаємодією з іншими активними радикалами.

Неферментативна реакція NO з молекулярним киснем (аутоокиснення) відбувається доволі повільно:



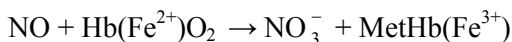
тоді як його окиснення за участю мідєвмісної оксидази церулоплазміну в плазмі крові є швидким:



Подальше окиснення нітриту до нітрату може відбуватися за участю оксигемоглобіну:



У судинному руслі NO, швидко сполучаючись із оксигемоглобіном, може й одразу генерувати нітрат і метгемоглобін:



Унаслідок цього *нітрит-* і *нітрат-*аніони можна розглядати як стабільні кінцеві метаболіти NO і використовувати як маркери при оцінюванні вмісту оксиду азоту й активності ферментів, що здійснюють його утворення – NO-синтаз.

NO вступає в реакцію із супероксидним радикалом, іонами металів перехідної валентності (наприклад, з Fe^{2+} гемової структури). Серед найважливіших хімічних реакцій NO і його реактивних похідних особливе значення мають реакції нітрозилування і нітрування білків. S-нітрозильовані білки, подібно до фосфо-

рильованих, змінюють свою активність і при цьому служать донорами NO, тоді як нітровані за залишком тирозину протеїни необоротно втрачають свою активність. Зазначені модифікації за наявності потужної генерації монооксиду азоту визначають його токсичні ефекти. За низьких рівнів NO має цитопротективні властивості, але якщо рівні високі – він є цитотоксичним, може залучатися в ангиогенез і прогресію пухлин.

В організмі NO може утворюватися двома шляхами: ферментативним і неферментативним. Прикладом **неферментативних шляхів** може бути відновлення нітритів за участю дезоксигемоглобіну, міоглобіну, цитохромоксидази (рис. 5.1, А). Зокрема, нітрогліцерин (гліцерину тринітрат, рис. 5.1, Б) у процесі свого метаболізму утворює NO – на цьому базується його дія на судини.

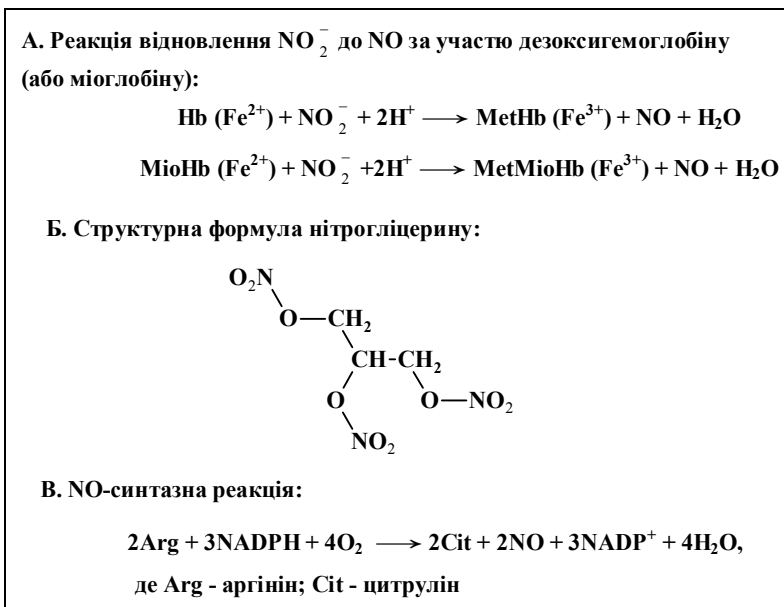


Рис. 5.1. А – схема неферментативного утворення монооксиду азоту;
 Б – структурна формула нітрогліцерину – донора NO;
 С – схема NO-синтазної реакції

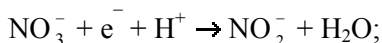
Ферментативним шляхом NO генерується при окисненні L-аргініну до L-цитруліну родинною конститутивних або цитокін-індукованих НАДФ-залежних ферментів – **NO-синтаз** (*NO-synthase, NOS*) (рис. 5.1, В).

Ферментативний і неферментативний шляхи пов'язані між собою **циклом NO**, який реалізується наступними етапами (рис. 5.2):

1) утворення NO в присутності O₂ (за участю NO-синтази, *ферментативний шлях*);

2) утворений NO окиснюється до нітриту (за дії церулоплазміну) і (або) до нітрату (зокрема, у присутності оксигемоглобіну);

3) нітрат відновлюється до нітриту (за участю ферментів бактерій ротової порожнини і шлунково-кишкового тракту, ксантинооксидази та деяких інших ферментів у тканинах):



4) відновлення нітриту до NO є прикладом *неферментативного утворення оксиду азоту* й останнім етапом NO-циклу. Це відновлення відбувається у крові та тканинах і може здійснюватися за різними механізмами, більшість із яких посилюються при гіпоксії:

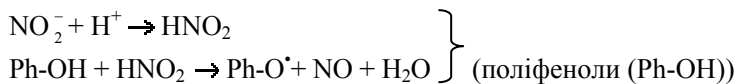
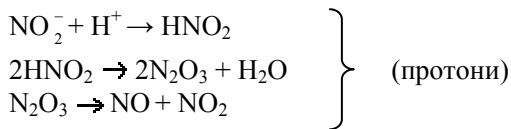
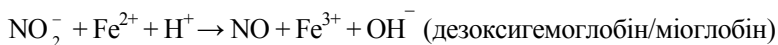




Рис. 5.2. Схема циклу оксиду азоту в організмі ссавців

Відновлення нітритів у кислому середовищі (за участю протонів) є джерелом генерації NO, але при цьому утворюються й інші сполуки, здатні спричиняти реакції нітрозилування (N_2O_3) і нітрування (NO_2). У присутності аскорбату або поліфенолів цей шлях відновлення нітритів прискорюється з одночасним зниженням генерування N_2O_3 і NO_2 .

Цикл оксиду азоту в організмі ссавців *регулюється надходженням із продуктами харчування неорганічних нітратів*, які після абсорбції в кишечнику циркулюють у кровеносному

руслі й активно секретуються зі слиною; *бактерії ротової порожнини відновлюють нітрати до нітритів*. У шлунку відновлення нітритів слини спричиняє неферментативне утворення великих кількостей NO, причому ця продукція залежить від шлункового рН.

Відновлення нітритів і NOS-незалежне утворення NO можуть відбуватися і поза ШКТ, наприклад, у серцевому м'язі при гіпоксії. Взагалі, нітрат-нітрит-NO-шлях бере участь у низці важливих біологічних процесів, зокрема в регуляції кровотоку, внутрішньоклітинній сигналізації тощо. На відміну від класичного NOS-залежного шляху, який передбачає наявність кисню як субстрату, залучення цього механізму зростає при гіпоксії та ацидозі й може слугувати резервним забезпеченням генерації NO у випадку ішемії-гіпоксії, коли NOSs майже не функціонують. Той факт, що цей шлях залежить від вмісту нітратів і нітритів у продуктах харчування, дозволяє говорити про можливу користь дієти, збагаченої овочами (які особливо багаті на нітрати) при терапії серцево-судинних розладів [Lundberg J. et al.], [Weitzberg E. et al.].

5.2. NO-синтаза: структура, ізоформи, принципи функціонування і регуляції ферментативної активності

5.2.1. Структура NO-синтази

NO-синтаза (*L-аргінін, НАДФН:O₂-оксидоредуктаза, NO-формувальна, К. Ф. 1.14.13.39.*) була вперше охарактеризована в 1989 р. і належить до родини цитохром P450-подібних гемових білків (рис. 5.3).

За відсутності субстрату – L-аргініну – NOS може відновлювати O₂ у присутності НАДФН із формуванням супероксидного аніона та H₂O₂.

Фермент є гомодимером, структуру субодиниць встановлено в 1998–1999 рр. Так, кожна субодиниця має С-кінцевий *редуктазний домен* (РД) і N-кінцевий *оксигеназний домен* (ОД). На межі РД і ОД розташований *кальмодулінзв'язувальний домен*.

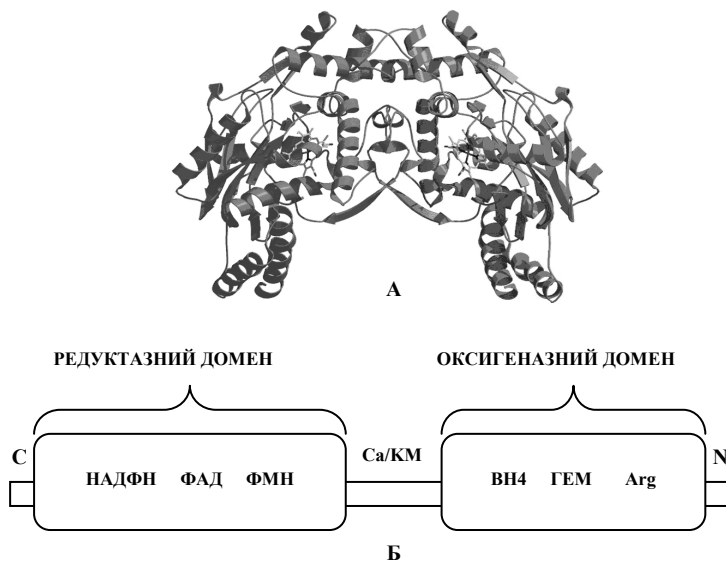
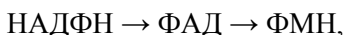


Рис. 5.3. Кристалічна структура димеру (А) і схематична структура мономера NOS (Б)

Редуктазний домен має центри сполучення із ФАД і ФМН. Його здатність передавати електрони до ОД є визначальною щодо швидкості синтезу NO та індукується конформаційними змінами, що відбуваються при зв'язуванні NOS із кальмодуліном.

Потік електронів через редуктазний домен в у напрямку



причому потік між ФАД і ФМН контролюється комплексом $\{\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}\}$ (рис. 5.4).

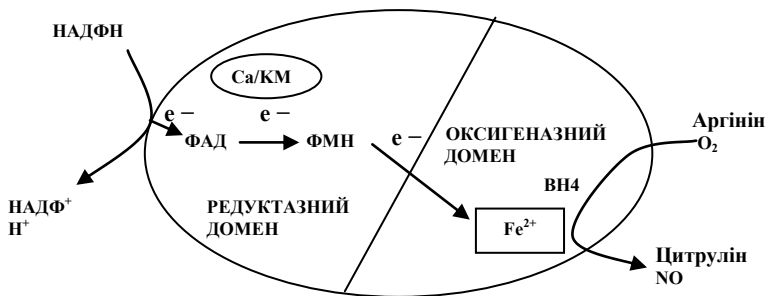
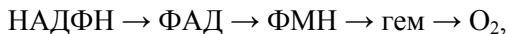


Рис. 5.4. Схема функціонування NOS: електрони, передані від НАДФН до редуцтазного домену, проходять через окисно-відновні переносники ФАД і ФМН до оксигеназного домену. Там вони, взаємодіючи з розташованими в межах активного центру Fe^{2+} гему та ВН4, каталізують реакцію взаємодії кисню з аргініном, у результаті якої утворюються цитрулін та NO. Електронний потік через редуцтазний домен (між ФАД і ФМН) вимагає наявності комплексу $\{Ca^{2+}/KM\}$

Оксигеназний домен має центри зв'язування з гемом і тетрагідробіоптерином, а також L-аргініном. Використовуючи електрони, надіслані НАДФН, він забезпечує безпосереднє перетворення L-аргініну та O_2 на NO і цитрулін. Крім того, в ОД NOS розташований *Zn-S4-центр* (*Zn-тетрапіолат-центр*), необхідний для стабілізації гомодимеру: атом Zn координаційними зв'язками сполучений із двома залишками цистеїну кожної субодиноці (рис. 5.5). Отже, при утворенні гомодимеру дві субодиноці сполучаються між собою їхніми оксигеназними доменами.

Потік електронів через активний гомодимер NO-синтази здійснюється за схемою:



причому один флавіновий кофермент редуцтазного домену (ФМН) однієї субодиноці передає свої електрони на гем оксигеназного домену іншої субодиноці. Це пояснює факт, що мономер NOS є неактивним [Michel T. et al.].

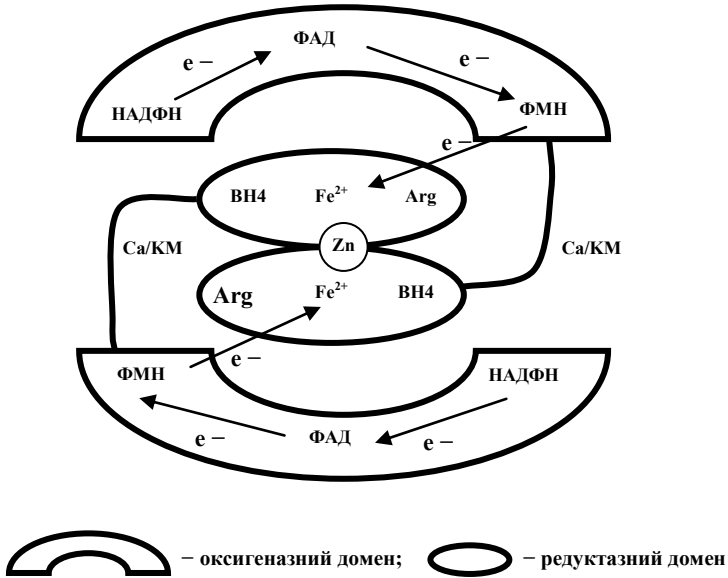


Рис. 5.5. Схема будови активного гомодимеру NOS та "перехресність" шляху електронів між двома субодинамиціями гомодимеру

Отже, *кофакторами і простетичними групами NOS є:*

- **ФАД** – первинний акцептор електронів від НАДФН;
- **ФМН** – переносить електрони від ФАД на гем в оксигеназному домені;
- **тіолатзв'язаний гем** – бере безпосередню участь в утворенні NO;
- **Ca²⁺ і кальмодулін** – цей комплекс надає NOS вірної конформації та регулює перенесення електронів від НАДФН на гем;
- **тетрагідробіоптерин (BH4, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin)** – відіграє ключову роль у димеризації мономерів, стабілізації активності ферменту, бере безпосередню участь в утворенні NO, захищає ензим від інактивації та аутоінакти-

вації. Прикладами інших ферментів, котрі як кофактор використовують цю сполуку, є фенілаланінмонооксигеназа (перетворює фенілаланін на тирозин), тирозин-3-монооксигеназа (перетворює тирозин на ДОФА), триптофан-5-монооксигеназа (здійснює конверсію триптофану до 5-гідрокситриптофану), проте в цих випадках ВН4 функціонує як кофактор гідроксилювання [Habib S. et al.].

5.2.2. Ізоформи NO-синтази

NOS має три основні ізоформи, виявлені в 1991–1994 рр., що синтезуються трьома різними генами:

- **nNOS** (*NOS1*, *brain NOS*) – *нейрональна*, або *мозкова*; "нокаут" відповідного гена спричиняє гастромегалію через відсутність NO-вивільнювальних (NO-ергічних) нейронів, агресивність, погані здібності до навчання та тривалої пам'яті;

- **iNOS** (*mNOS*, *NOS2*) – *макрофагальна*; у "нокаutowаних" тварин після імунної стимуляції або ін'єкції ліпополісахариду (LPS; інша назва – бактеріальний ендотоксин) не зростає рівень NO, їхні макрофаги не синтезують NOS і NO, а самі тварини мають підвищену чутливість до інфекцій;

- **eNOS** – *ендотеліальна* (виробляється ендотеліоцитами судин, *NOS3*) – "нокаут" відповідного гена спричиняє гіпертензію.

Гомологія між субодинамиціями зазначених ізоформ NOS у людини становить 51–57 % (у ділянках, безпосередньо причетних до каталізу).

Іноді виділяють ще одну ізоформу ферменту – мітохондріальну NO-синтазу, яка насправді є підізоформою nNOS, що міститься на внутрішній мембрані мітохондрій, підлягає міристилюванню і фосфорилуванню і регулює споживання O₂ шляхом оборотного інгібування цитохромоксидази.

Деякі важливі характеристики ізоформ NOS наведено в табл. 5.1, а особливості їхньої структури – на рис. 5.6.

Таблиця 5.1. Характеристики різних ізоформ NOS

	nNOS	eNOS	iNOS
Тканнна експресія	Постсинаптичні терміналі нейронів центральної та периферійної нервової системи; активується за дії глутамату або при деполяризації ПМ унаслідок відкриття потенціалзалежних Ca ²⁺ -каналів	Ендотеліальні клітини судин	Макрофаги (основний індуктор – LPS клітинної стінки грамнегативних бактерій, який діє через Toll-подібні рецептори (підпідрозд. 11.2.1.1) і активацію транскрипційних факторів IRF-1 і NF-κB. Інші клітини – нейтрофіли, гладком'язові клітини, хондроцити, гепатоцити, гліальні клітини нервової системи
М.м. субодиниці	160 кД	130 кД	130 кД
Структура	PDZ-домен на N-кінці молекули (рис. 5.6) сприяє зв'язуванню nNOS із рецепторами ПМ і білками цитоскелета	На N-кінці має 3 сайти для приєднання міристинової та пальмітинової кислот (рис. 5.6), необхідних для сполучення ферменту з ПМ	–
Тип	Конститутивна	Конститутивна	Індуцибельна; індуктори – ендотоксини бактеріального походження, зокрема LPS
Локалізація	Цитозольна (розчинна), може приєднуватися до цитоскелета через PDZ-домен	Зв'язана з кавеолами ПМ через залишки жирних кислот	Цитозольна (розчинна)

Закінчення табл. 5.1.

	nNOS	eNOS	iNOS
Залежність від Ca²⁺	Ca ²⁺ -залежна	Ca ²⁺ -залежна	Ca ²⁺ -незалежна, оскільки сама є зв'язаною з кальмодуліном, і зміни внутрішньоклітинного вмісту Ca ²⁺ на неї не впливають, а активність визначається головним чином швидкістю синтезу молекул ферменту; за відсутності КМ iNOS є нестабільною
Рівні продукції NO	Невелика кількість (близько 5 Mm)	Невелика кількість (близько 1 Mm)	Збільшує кількість утворення NO більш ніж у 1000 разів
Основні функції	Є нейромедіатором, що залучається у процеси запам'ятовування, синаптичну пластичність, утворення синапсів, розвиток ексайтотоксичності (підпродд. 5.2.3.3, підпродд. 5.4), спричиненої надмірною активацією глутаматом NMDA-рецептора	Дифундуючи у клітини гладеньких м'язів кровоносних судин, спричиняє цГМФ-залежну релаксацію гладенької мускулатури, тим самим знижуючи кров'яний тиск і прискорюючи кровотік; причетна до розвитку атеросклеротичних ушкоджень	Реалізує бактерицидну та антипухлинну дії макрофагів, макрофаг-опосередковану цитотоксичність, зокрема за рахунок взаємодії iNOS-генерованого NO із супероксидним аніоном з утворенням пероксинітриту. Надмірна активація iNOS і генерація великих кількостей NO асоціюються із цитокін-індукованим септичним шоком: бактерії продукують ендотоксини (наприклад, LPS), який активує iNOS у макрофагах. Антипухлинна дія iNOS-генерованого NO пов'язана, зокрема, з індукцією апоптозу
Локалізація гена	12 хромосома	7 хромосома	17 хромосома

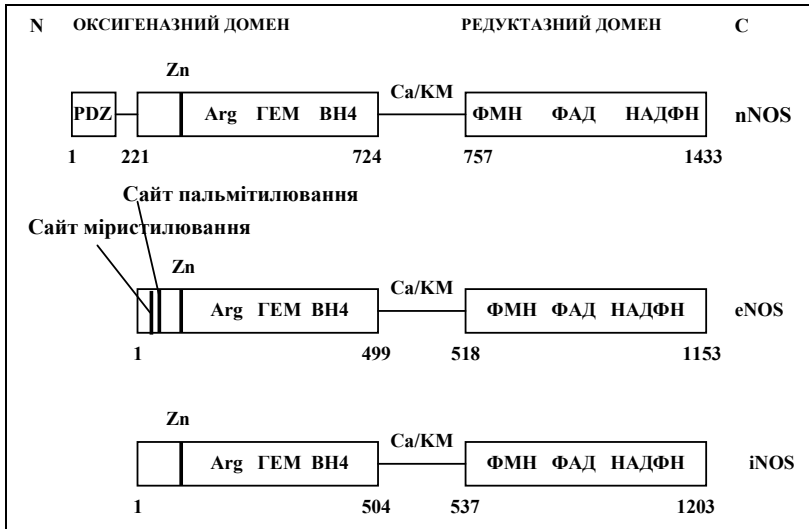


Рис. 5.6. Особливості структури різних ізоформ NOS

5.2.3. Принципи регуляції

ферментативної активності конститутивних та індукцибельної ізоформ NO-синтази

Регуляція ферментативного утворення оксиду азоту може здійснюватися різними шляхами, серед яких основними є:

- **регуляція на рівні транскрипції**;
- **посттранскрипційна регуляція** (альтернативний сплайсинг, стабільність мРНК);
- **посттрансляційна регуляція**:
 - наявність кофакторів;
 - наявність Ca^{2+} (для eNOS і nNOS);
 - ковалентні модифікації (фосфорилування за залишками треоніну, серину, ацилювання – міристилювання і пальмітилювання). Зокрема, фосфорилування протеїнкіназами ПкВ/Акт за залишками серину активує NOS, а ферментами ПкС і MAPK –

інгібує. Міристилювання і пальмітилювання відіграє ключову роль у функціонуванні eNOS, що буде розглянуто нижче;

- білок-білкові взаємодії (з кальмодуліном, кавеоліном (білок кавеол), білками цитоскелета, hsp90 (*heat-shock protein 90*, білок теплового шоку 90), ін);

- інгібування молекулою NO (кінцевим продуктом): молекула зв'язується з атомом заліза у структурі гему активного центру як конститутивних, так і індукцибельних ізоформ ферменту з утворенням нітрозогему, а також здійснює S-нітрозилування NOS за певними залишками цистеїну;

- наявність субстрату або його аналогів;

- зміна субклітинної локалізації NOS;

- порушення димеризації ферменту.

При цьому регуляція iNOS здійснюється в основному на транскрипційному і посттранскрипційному рівнях, тоді як інші рівні – трансляція, посттрансляційна модифікація (утворення димерів, наявність субстрату, кофакторів, інгібування кінцевим продуктом, фосфорилування, субклітинна локалізація) – для неї є другорядними. У регуляції ж конститутивних форм основна роль належить зв'язуванню КМ, вмісту Ca^{2+} та іншим посттрансляційним механізмам, наведеним вище.

5.2.3.1. Регуляція на рівні транскрипції

Регуляція активності синтаз оксиду азоту на рівні транскрипції здійснюється через впливи численних транскрипційних факторів та тих сигнальних каскадів, компонентами яких є ці фактори. Одним із таких факторів є NF-κB.

Транскрипційний фактор NF-κB був ідентифікований як білок, що зв'язує специфічну послідовність ДНК усередині інтрона легкого ланцюга імуноглобуліну капа (кара) у зрілих В-клітинах, але не в їхніх попередниках (Р. Сен та Д. Белтімор, 1986).

Пізніше було показано, що ДНК-зв'язувальна активність цього фактора індукується численними екзогенними стимулами, і що ця активація не залежить від *de novo*-синтезу білків. NF-κB знайдений у більшості типів клітин, а специфічні для його зв'я-

зування ділянки ДНК ідентифіковані у промоторах та енхансерах великої кількості індукбельних генів. Ядерний фактор NF- κ B контролює експресію генів, які беруть участь в імунній відповіді, апоптозі, регуляції клітинного циклу. Порушення такого контролю може спричинити запальні та аутоімунні розлади, вірусні інфекції, рак.

Транскрипційний фактор NF- κ B – це гомо- чи гетеродимер. Його субодиниці є членами родини структурно подібних білків (*Rel/NF- κ B proteins*). У ссавців ідентифіковано п'ять членів цієї родини:

- NF- κ B1 (інша назва – p50)
- NF- κ B2 (p52)
- RelA (p65)
- RelB
- c-Rel

Усі вони містять висококонсервативний Rel-гомологічний домен, який відповідає за їхню димеризацію та зв'язування з ДНК і специфічним інгібітором І κ B (*inhibitor of NF- κ B*). Активний NF- κ B є гетеродимером; найчастіше його складовими є p50 або p52 субодиниці та p65-субодиниця (рис. 5.7).

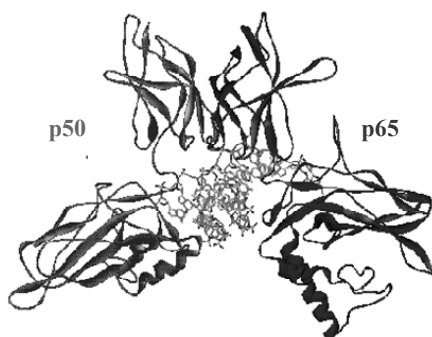


Рис. 5.7. Кристалічна структура комплексу {NF- κ B/ДНК}. Транскрипційний фактор складається із двох субодиниць: p50 і p65 (за Х. Верліндом)

NF- κ B активується численними стимулами, наприклад, цитокінами (TNF α і IL-1), T- та B-клітинними мітогенами, вірусними білками, стресовими індукторами (активні форми кисню, ультрафіолетове випромінювання). У цитоплазмі NF- κ B зазвичай міститься в неактивній формі внаслідок його асоціації з інгібіторами I κ B, до яких належать I κ B α , I κ B β та I κ B ϵ . Вищі активуючі сигнали (наприклад, зв'язування TNF α з його рецептором) можуть спричинити фосфорилування I κ B відповідною кіназою (*кіназа I κ B*, *I κ B-kinase*, IKK). Це запускає деградацію I κ B через систему убіквітину, у якій молекула-мішень маркується ланцюгом убіквітину для деградації у 26S-протеасомі (рис. 5.8).

На цьому етапі необхідно детальніше зупинитися на термінах *убіквітинування* та *протеасома*.

Протеасома (від *протео-* і *сома* – *частинка із протеолітичною функцією*, за К. Танакою та А. Голдбергом) – це високомолекулярний білковий комплекс, що функціонує у клітинах за певних умов як кілька протеолітичних ферментів, причому свою руйнівну дію він виявляє лише при нефізіологічних станах – під впливом речовин, здатних змінювати його структуру. Цей комплекс виявлено у клітинах як найбільш примітивних, так і вищих еукаріотів, як у ядрі, так і в цитоплазмі, що свідчить про його важливу роль у нормальній життєдіяльності клітин. Протеасомою названі дві частинки з різною складністю будови, з різними молекулярними масами та коефіцієнтами седиментації (S): уперше виділений комплекс з молекулярною масою близько 700 кД та коефіцієнтом седиментації 20 S (так звана *20S-протеасома*) як протеолітичне ядро входить до складу ще більш складної частинки – *26S-протеасоми*.

У ссавців до 90 % клітинних білків – як з коротким, так і з тривалим терміном життя – підлягають гідролізу в порожнині протеасоми. Зрозуміло, що для початку такого процесу протеасома має розпізнати об'єкт гідролізу за певною ознакою.

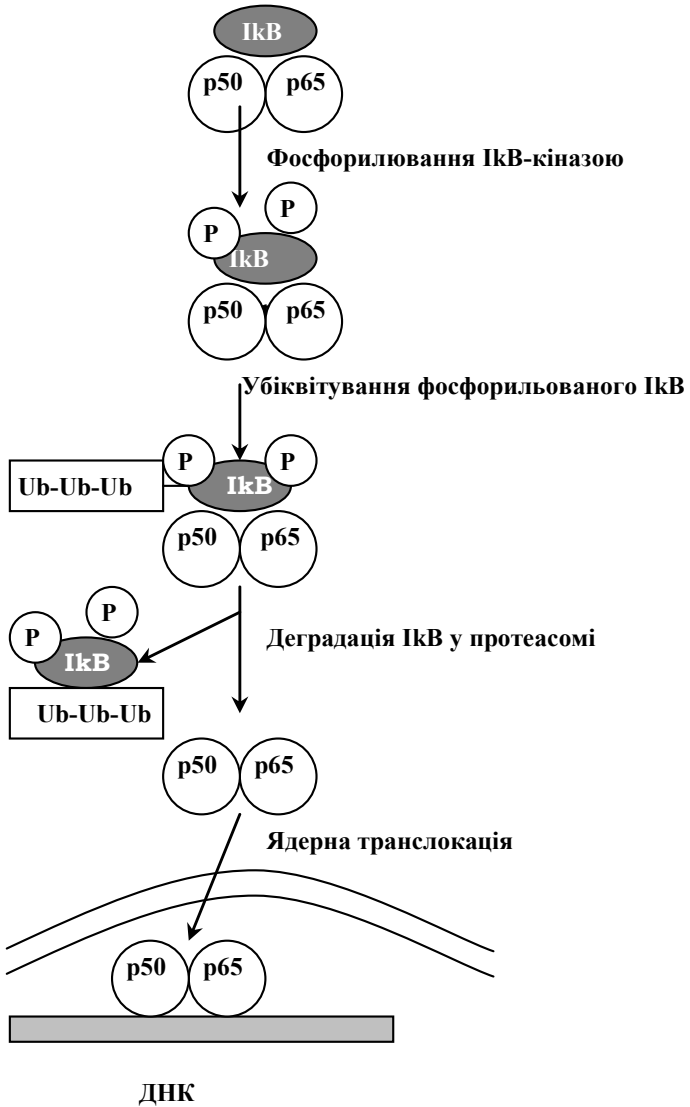


Рис. 5.8. Механізм активації NF-κB

Таке "маркування" здійснює спеціальна система ферментів – **система убіквітинування**, а "яриком" слугує ланцюг не менш ніж із чотирьох молекул білка **убіквітину**, кожна із яких складається із 76 амінокислотних залишків (рис. 5.9).

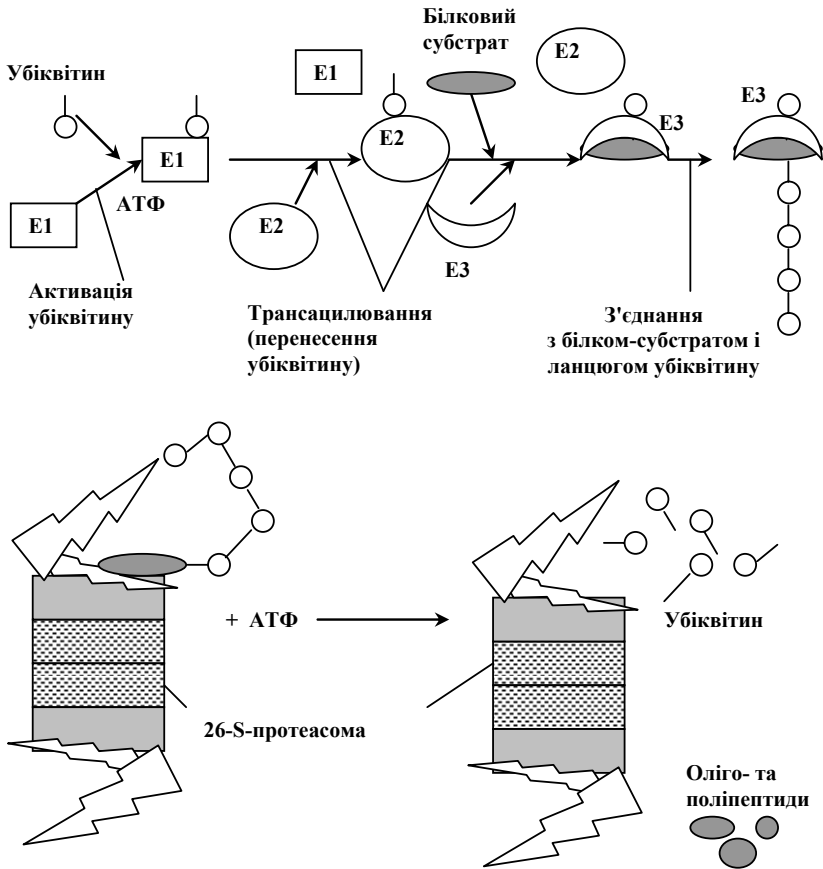


Рис. 5.9. Принцип функціонування системи протеасоми та убіквітинування як шляху гідролітичного розщеплення білків

Як утворення ланцюга через залишок лізину в 48-му положенні кожної молекули, так і приєднання його до білка-субстрату здійснюється зазначеною ферментативною систе-

мою. Вона включає *три типи ферментів* – E1, E2 і E3, є високоспецифічною та вибірковою за рахунок того, що побудована за принципом ієрархічного ускладнення. **Фермент E1** (у клітині він лише один) активує молекулу убіквітину та передає її одному із **ферментів родини E2** (це так звані "*кон'югуючі*" ферменти). Надалі залучається **третій ензим – представник родини E3 – лігаза**, або "*зшивний*" фермент. Він приймає убіквітин від E2, з'єднується з білком-субстратом і ковалентно пришиває до нього ланцюг убіквітину [Абрамова Е. Б. и др.].

Активований унаслідок убіквітинування та протеасомальної деградації інгібітора NF- κ B надалі може транслокуватися до ядра та активувати транскрипцію, у тому числі й гена iNOS (рис. 5.10).

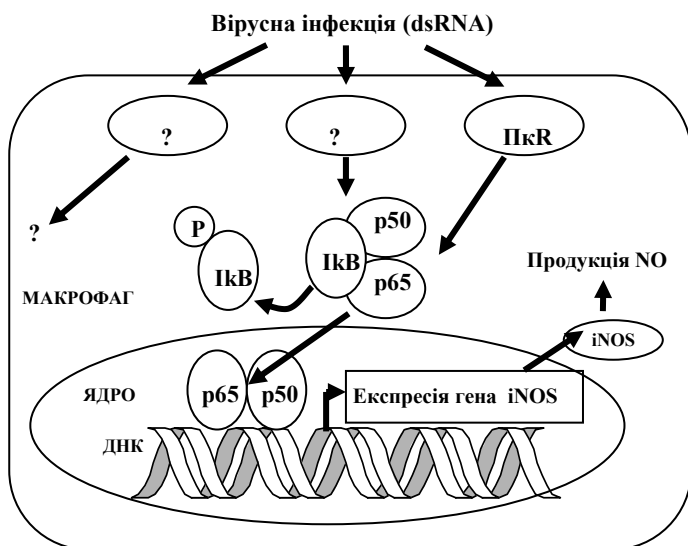


Рис. 5.10. Схема NF- κ B-залежної активації транскрипції гена iNOS

Саме стимулюванням NF- κ B-залежних механізмів пояснюється явище dsRNA- (дволанцюгова РНК) або вірус-індукованої експресії iNOS і продукції NO макрофагами, що є одним із пояснень антивірусної відповіді цих клітин. У цьому випадку фосфорилування I κ B здійснює головним чином не ІКК, а інший фермент – протеїнкіназа R (P κ R, протеїнкіназа, що індукується інтерфероном і активується dsRNA, підрозд. 11.4), хоча й додаткові P κ R-незалежні шляхи, що стимулюються у клітині в умовах інфікування, також можуть брати участь у транскрипційній регуляції iNOS [Mitchell D. et al.]. Прямим доказом важливості iNOS-експресії і NO-продукції у антивірусній відповіді є спостереження, що індуковане інтерфероном- γ інгібування реплікації вірусів віспи мишей і людини, а також вірусу герпесу опосередковане продукцією макрофагами NO. Крім того, видалення активності iNOS – або шляхом впливу інгібіторів, або нокаутом – збільшує вірусні титри і підвищує смертність інфікованих вірусом мишей.

Інший варіант транскрипційної регуляції iNOS – це залучення згаданого раніше **Jak/STAT-шляху** (детальніше див. підрозд. 11.3) і **транскрипційного фактора IRF-1**. Зв'язування ліганду веде до димеризації рецепторної тирозинової протеїнкінази, що збільшує локальне концентрування приєднаних до рецептора цитозольних тирозинових протеїнкіназ Jaks, які при цьому активуються й ініціюють сигнал трансдукції, фосфорилуючи залишки тирозину в складі рецептор-асоційованих білків, у тому числі й латентних транскрипційних факторів STATs. Фосфорильовані молекули STATs дисоціюють від рецептора, утворюють STAT:STAT- гомо- або гетеродимери, набувають ДНК-зв'язувальних властивостей і, транслокуючись у ядро, сполучаються із промоторами відповідних генів та активують їхню транскрипцію. В індукцію експресії iNOS залучений фактор STAT-1, гомодимери якого зв'язуються із промотором іншого транскрипційного фактора – IRF-1 (підрозд. 11.3), який, у свою чергу, асоціюючи з промотором гена iNOS, індукує транскрипцію цієї ізоформи ферменту (рис. 5.11).

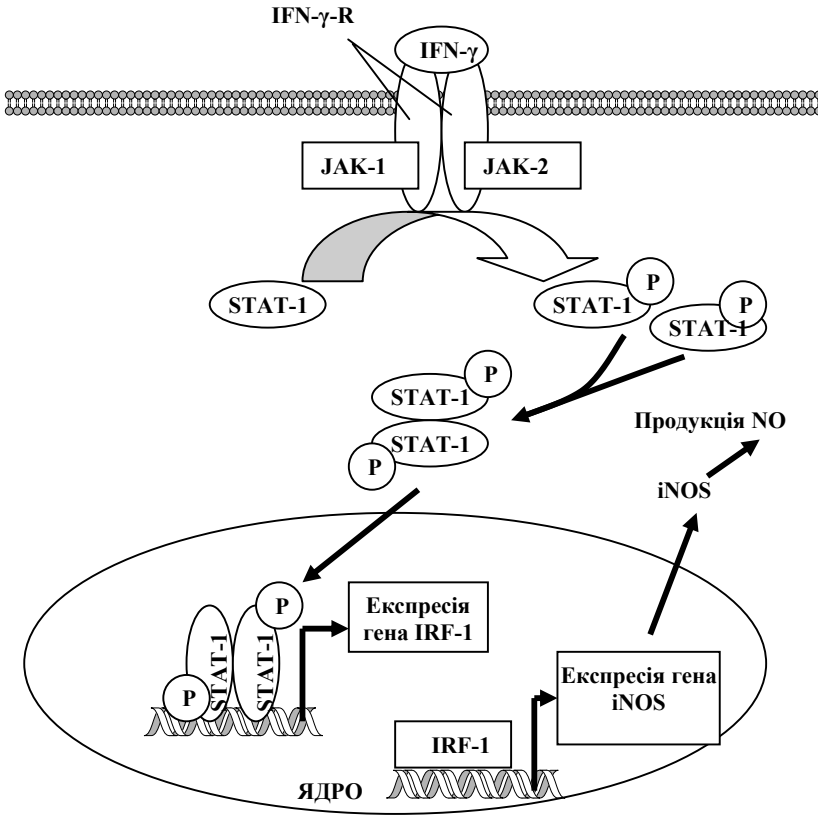


Рис. 5.11. Схема Jak/STAT-залежної індукції синтезу iNOS

Іншим прикладом транскрипційних регуляторів активності NOS (а саме, eNOS) є **статини**.

Статини – це *інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктази (ГОМК-КоА-редуктази)*, ферменту, залученого в біосинтез холестеролу (каталізує перетворення ГОМК-КоА на мевалонову кислоту), і в цьому біосинтезі є ланкою, що лімітує швидкість усього процесу (рис. 5.12).

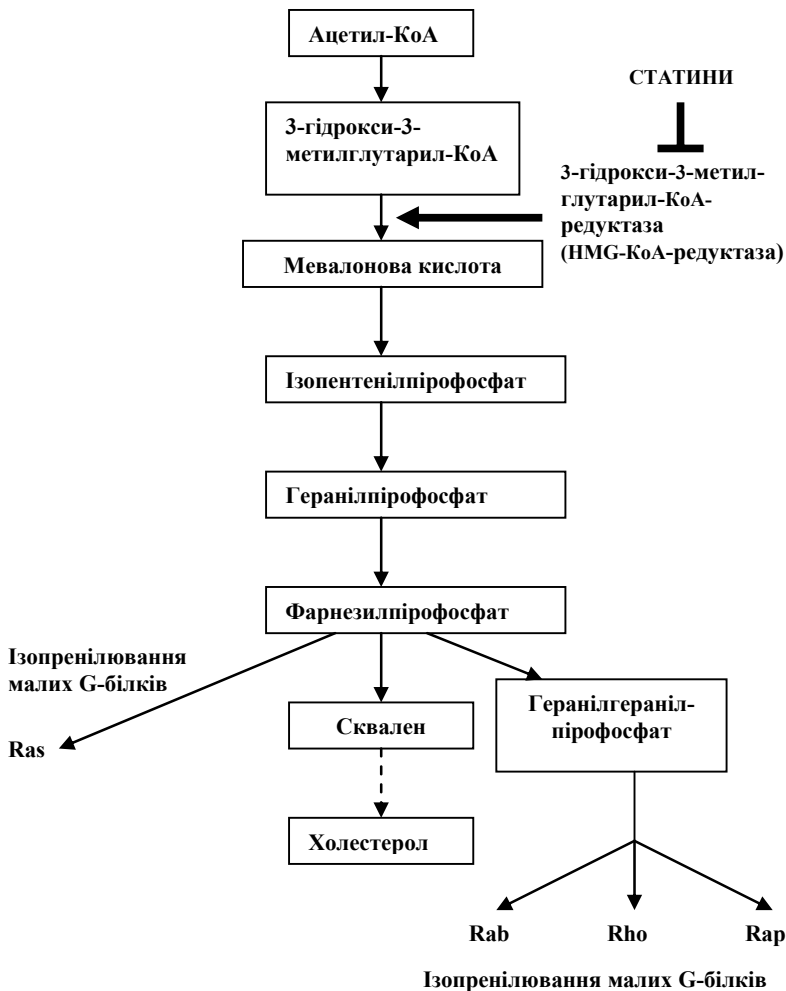


Рис. 5.12. Схема статинозалежного інгібування біосинтезу холестеролу

Здатність статинів знижувати вміст ліпідів у сироватці крові (за рахунок фракції холестеролу) дає можливість використовувати їх у терапії серцево-судинних захворювань.

Крім впливу на рівень холестеролу, *статины* блокують синтез проміжних продуктів біосинтезу холестеролу – фарнезилпірофосфату (FPP) та гераніл-геранілпірофосфату (GGPP), які є важливими ліпідними чинниками для посттрансляційної модифікації (ізопренілювання), необхідної для вірної локалізації та функціонування численних білків, у тому числі G-білків і малих ГТФ-зв'язувальних білків родин Ras (FPP), Rho, Rap, Rab ГТФаз (GPP). Статини, запобігаючи ізопренілюванню малих ГТФаз, інгібують ці сигнальні молекули [Rikitake Y. et al.].

Важливим ефекторним медіатором Rho-білка є Rock-кіназа (рис. 5.13).

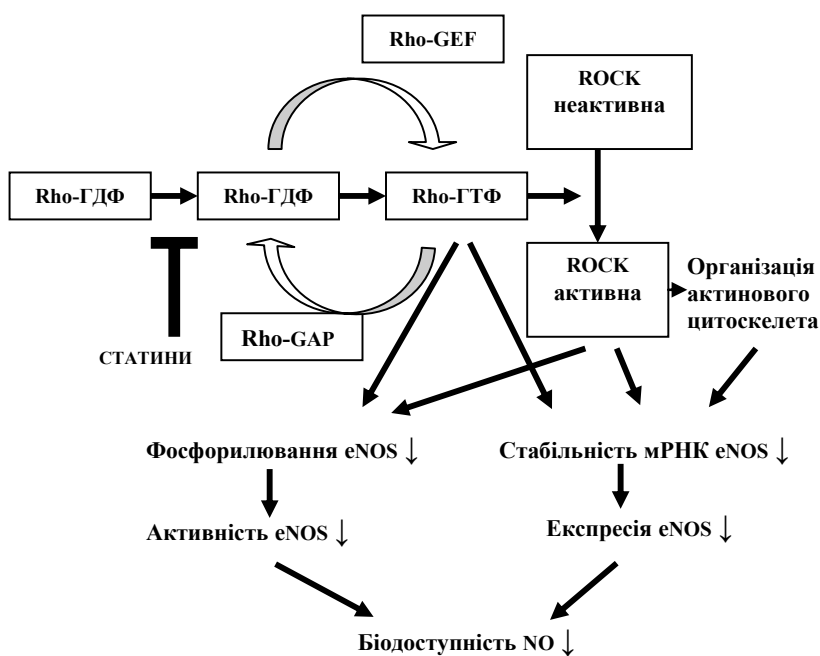


Рис. 5.13. Схема регуляції експресії та активності eNOS статинами, білками Rho і Rock

Виявлено, що остання знижує стабільність мРНК eNOS. Крім того, стимуляція Rho/Rock-шляху веде до гальмування активності eNOS, а інгібування цього шляху – до активації. Тому *інгібітори Rho/Rock-шляху, до яких належать і статини, впливають на eNOS на двох рівнях:*

- 1) збільшують експресію eNOS та її стабільність;
- 2) індукують фосфорилування і активацію eNOS через PI3K/Акт-шлях, оскільки інгібування Rho і Rock веде до швидкого фосфорилування і активації Акт через PI3K.

5.2.3.2. Посттранскрипційна регуляція активності NOS: сплайсинг-варіанти

nNOS кодується одним із найбільш структурно варіабельних генів людини, зокрема в ділянці промотора. Виявлено п'ять основних варіантів nNOS залежно від локалізації сплайсингу:

- nNOS- α (повноланцюговий);
- nNOS- β ;
- nNOS- γ ;
- nNOS- μ ;
- nNOS2.

nNOS- β та nNOS- γ не мають PDZ-домену (що забезпечує зв'язування nNOS із клітинними рецепторами), який кодується екзоном 2, і не зв'язують PSD-95 (білок постсинаптичної мембрани). Перший має 80 % активності nNOS- α , другий – 3 %. Кінетичні параметри nNOS- μ подібні до nNOS- α . nNOS2 несе делецію амінокислот у висококонсервативному регіоні, що унеможливує зв'язування L-аргініну.

Сплайсинг-варіанти iNOS недостатньо вивчені. iNOS_{8,9} мають делеції в оксигеназному домені; такий сплайсинг-варіант не утворює димерів і не виявляє активності NOS. Також виявлені варіанти з делеціями у ФМН-зв'язувальній ділянці редуцтазного домену.

5.2.3.3. Посттрансляційна регуляція активності NOS

Із викладеного вище відомо, що регуляція активності NOS на посттрансляційному рівні здійснюється шляхом утворення димерів, наявністю субстрату, кофакторів, інгібу-

ванням кінцевим продуктом, фосфорилуванням, зміною субклітинної локалізації, присутністю комплексу $\{Ca^{2+}/KM\}$.

Ca²⁺ як активатор NOS. Низка метаботропних рецепторів (тобто тих, які функціонують, залучаючи G-білки) після зв'язування з гормоном спричиняють активацію G_q-білка, що надалі веде до активації фосфоліпази C і вивільнення через фосфоїнозитидний шлях із ЕПР іонів Ca²⁺ (детальніше див. підрозд. 2.2). Іонотропні рецептори (канали), зокрема NMDA-рецептор, а також потенціалзалежні Ca²⁺-канали збудливих клітин також можуть привести до входу Ca²⁺ у клітину.

Унаслідок зростання вмісту Ca²⁺ усередині клітини утворюється комплекс $\{Ca^{2+}/KM\}$, здатний зв'язуватися з NOS (Ca²⁺-залежні ізоформи eNOS та nNOS). Ізоформа iNOS, як уже йшлося раніше, не є Ca²⁺-залежною, оскільки одразу міцно зв'язана із кальмодуліном.

Ключову роль Ca²⁺ як активатор синтезу NO відіграє у ЦНС, (про це йтиметься нижче).

Особливості регуляції eNOS: ацилювання. Потреба в ацилюванні відрізняє eNOS від nNOS та iNOS, які є цитозольними білками. *Міристилювання* молекули eNOS здійснюється за *N-термінальним залишком гліцину* під час трансляції та є необоротною і необхідною для локалізації eNOS у кавеолах модифікацією [Dudzinski D. et al.].

Інша модифікація – *пальмітилювання* – є оборотною, здійснюється посттрансляційно, за залишками *цистеїну* (Cys-15 і Cys-26) і слугує для стабілізації асоціації eNOS із мембраною. Депальмітилювання веде до дисоціації ферменту від кавеол, де розташовані субстрати й кофактори, що спричиняє його інактивацію.

Білок-білкові взаємодії як регулятори активності eNOS. Як відомо із викладеного раніше, eNOS є *єдиною ізоформою синтази оксиду азоту, що міститься в ділянках кавеол* – багатих на холестерол, сфінголіпіди, глікосфінголіпіди 50–100 нм "вигнаний" ПМ. Окрім eNOS, у кавеолах є ряд специфічних білків, зокрема рецептори-"уловлювачі" (*scavenger receptors*) класу В, що залучаються у поглинання ЛПВЩ і ЛПНЩ (SR-B1), окЛПНЩ (CD36) та інших субстанцій, а також маркерний білок кавеолін

(підпідрозд. 1.1.1). Кавеоли виконують сигнальні функції, а також беруть участь у процесах ендоцитозу. Зокрема, доведено роль кавеол у SR-B1-опосередкованому поглинанні холестеролу, яке відбувається перед необоротною інтерналізацією холестеролу у внутрішньоклітинні компартменти. Аналогічна роль, але щодо окЛПНЩ, характерна для CD36.

Усі три ізоформи NOS мають кавеолінзв'язувальні ділянки. Вони є консервативними: ФххххФххФ, або ФхФххххФ, де Ф – ароматична амінокислота (триптофан, фенілаланін або тирозин), а х – будь-яка амінокислота. Така консервативна ділянка сполучається зі специфічним доменом у молекулі кавеоліну.

Асоціація NOS із кавеоліном інгібує фермент тому, що кавеолінзв'язувальна ділянка міститься у сайті, що відповідає за зв'язування аргініну – субстрату NOS, і сполучення із кавеоліном просторово перешкоджає цьому зв'язуванню.

Міристилювання N-термінального залишку гліцину в молекулі eNOS і пальмітилювання залишків цистеїну в позиціях 15 і 26 сприяє розташуванню eNOS у кавеолах, де eNOS зв'язується із своїм негативним регулятором – кавеоліном. При від'єднанні від кавеоліну eNOS активується, тобто кавеолін виступає інгібітором eNOS. При зростанні концентрації Ca^{2+} у клітині eNOS взаємодіє з Ca^{2+}/KM , після чого дисоціює від кавеоліну й активується (рис. 5.14).

Для функціонування eNOS важливими також є й інші мембранні білки, що присутні в кавеолах, у тому числі *транспортер катіонних амінокислот (cationic amino acid transporter, CAT1)*, який залучений у поглинання L-аргініну, Ca^{2+} -АТФаза і рецептор до брадикініну.

Гіперхолестеролемія збільшує вміст кавеоліну в кавеолах; це сприяє зростанню утворення неактивного комплексу {кавеолін + eNOS}. ОкЛПНЩ індукує транслокацію кавеоліну та eNOS із кавеол у внутрішні відділи мембран, де фермент не може бути стимульований агоністами. Ефекти окЛПНЩ на кавеоли та утворення NO опосередковує присутність CD36, тоді як відсутність цього рецептора захищає кавеоли від втрачати холестеролу і транспорту eNOS із кавеол.

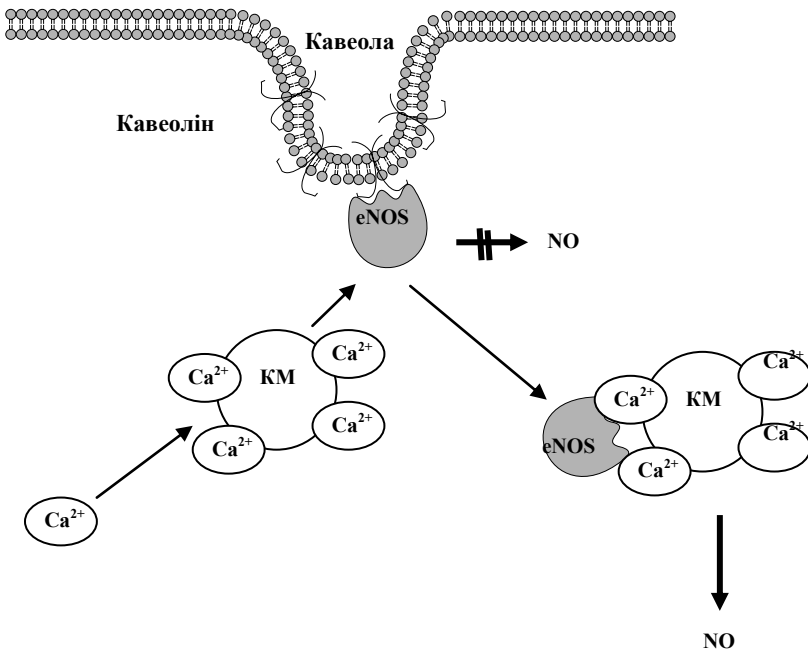


Рис. 5.14. Схема регуляції активності eNOS кавеоліном та іонами кальцію

ЛПВЩ зв'язуються з рецептором SR-B1, що має активуючий вплив на eNOS: таке зв'язування активує Akt-кіназу, яка фосфорилує eNOS за залишком серину-1179 і стимулює фермент до синтезу NO. Інший шлях ЛПВЩ-індукованої активації eNOS залучає церамід, субстратом для його утворення є сфінгомелін, на який багаті кавеоли. Точний механізм останнього шляху ще не розкритий.

Отже, ЛПВЩ та SR-B1 здійснюють позитивну модуляцію функцій eNOS, протидіючи окЛПНЩ-ініційованій, CD36-опосередкованій втраті кавеолярного холестеролу, оскільки

сприяють перенесенню холестеролу в кавеоли. Таке інгібування eNOS є одним із чинників початку розвитку атеросклерозу [Catalgol B. et al.].

Сфінгозин-1-фосфат-, VEGF- та інсулін-індуковане фосфорилування eNOS. Сфінгозин-1-фосфат (Sph-1-P) – це похідна сфінголіпідів тромбоцитарного походження (підрозд. 10.4), яка утворюється із сфінгозину тромбоцитів під впливом сфінгозинкінази, вивільнюється тромбоцитами при їхній активації, зокрема внаслідок дії тромбіну, і відіграє значну роль у регуляції eNOS через активацію G-білок-сполучених рецепторів до Sph-1-P (EDGs) в ендотелії судин. Як сигнальна молекула в судинній тканині, Sph-1-P є регулятором ангиогенезу, міграції, проліферації та виживання ендотеліальних клітин.

У судинному ендотелії eNOS залучена у як мінімум кілька біологічних відповідей на Sph-1-P-індуковану активацію EDG-рецепторів. Ефекти Sph-1-P передбачають EDG-рецептор-опосередковану активацію кіназ PI3K- β і Akt (активована PI3K каталізує утворення 3'-фосфорильованих фосфоінозитидів із інозитолових фосфоліпідів ПМ. Утворені фосфоінозитиди надалі активують PDK1, яка, у свою чергу, активує кіназу Akt). Остання активує eNOS шляхом фосфорилування. Крім того, сполучення Sph-1-P із рецептором сприяє мобілізації внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що в комплексі з КМ теж приводить до активації цієї ізоформи синтази оксиду азоту (рис. 5.15).

Інсулін і фактор росту судинного ендотелію при сполученні зі своїми рецепторами, що є рецепторними тирозиновими протеїнкіназами, через стадію активації цитозольних тирозинових протеїнкіназ здатні спричиняти Akt-залежну активацію eNOS як через PI3K- β , так і через іншу ізоформу цього ферменту – PI3K- α , а VEGF – також і шляхом одночасного впливу на внутрішньоклітинний вміст кальцію.

Інший позаклітинний ліганд – *брадикінін* – діє через брадикінінові рецептори лише на ланку вмісту в клітині Ca^{2+} .

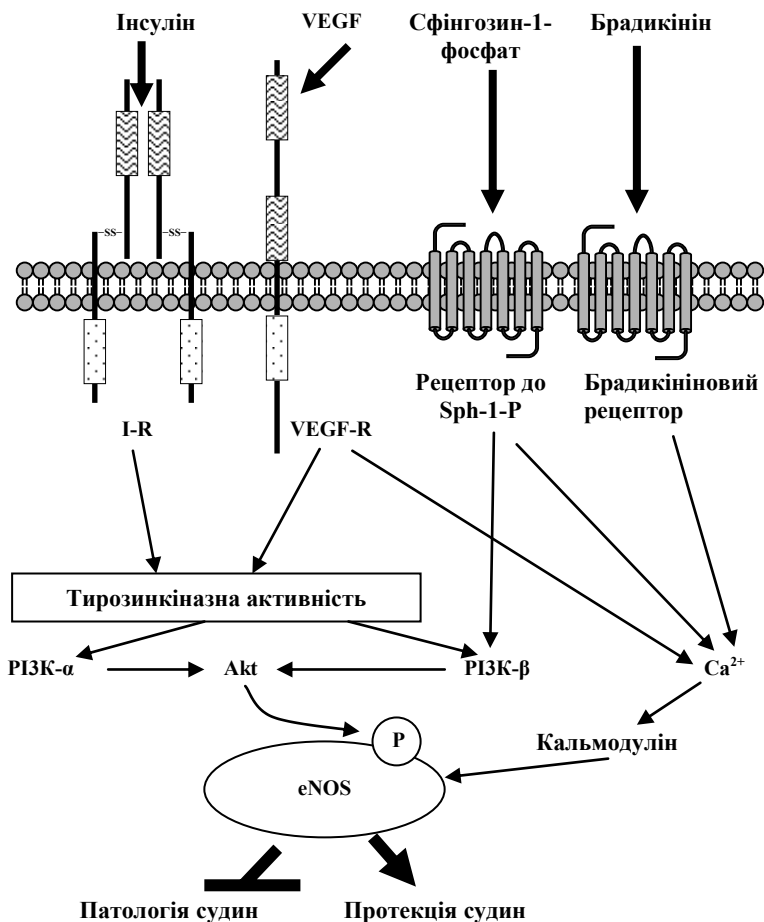


Рис. 5.15. Схема сфінгозин-1-фосфат-, VEGF-, інсулін- та брадикінін-індукованої посттрансляційної активації eNOS

Особливості регуляції nNOS у ЦНС: NMDA-рецептори і Ca^{2+} . Найважливішим регулятором активності nNOS є вільний цитозольний Ca^{2+} , що стимулює nNOS через утворення $\{\text{Ca}^{2+}/\text{KM}\}$ -комплексу. Надходження потенціалу дії активує потенціалзалежні Ca^{2+} -канали нейролеми і стимулює вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних джерел. Зв'язування KM із nNOS

і наступна активація цього ферменту потребують зростання цитозольного вмісту Ca^{2+} до рівнів понад 400 нмоль. Коли концентрація Ca^{2+} знижується, він дисоціює від КМ, який, у свою чергу, дисоціює від pNOS – таким чином Ca^{2+} виступає перемикачем активності ферменту. Фосфорилування є додатковим механізмом регуляції активності pNOS: вона знижується внаслідок фосфорилування ПкА, ПкС і Ca^{2+} /КМ-залежною протеїнкіназою.

Однак у випадку ЦНС синтез NO здебільшого регулюється входом Ca^{2+} через лігандозалежні канали, зокрема внаслідок постсинаптичної стимуляції *N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)*-рецептора збуджувальним нейротрансмітером глутаматом.

Як уже знаємо, термінальна частина pNOS містить PDZ-домен (близько 100 амінокислот); цей домен наявний також в інших білках і "заякорює" їх у елементи цитоскелета. У випадку pNOS, його PDZ-домен взаємодіє з постсинаптичним білком PSD95, тоді як NMDA-рецептор (NMDA-R) містить Ser/Thr-X-Val мотив, що також зв'язується із PSD95. Полегшуючи зближення NMDA-R та ензиму, PSD95 прямо "підставляє" pNOS під потік Ca^{2+} , що входить через іонний канал активованого рецептора.

NMDA-рецептор є високоспецифічним лігандозалежним Ca^{2+} -каналом нейронів, що належить до родини іонотропних глутаматних рецепторів. Надмірна стимуляція NMDA-R спричиняє потужний вхід Ca^{2+} у клітину, який активує низку кальцієзалежних ферментів (фосфоліпаз, ендонуклеаз, протеаз), що руйнують компоненти цитоскелета, мембрани, ДНК. Крім того, надвисокі рівні кальцію стимулюють генерацію вільних радикалів (зокрема, pNOS-залежне утворення NO) із розвитком оксидативного і нітрозативного стресу, руйнування потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани, втрату АТФ, наслідком чого стає апоптоз або некроз нейронів (залежно від розмірів ушкодження і швидкості поповнення пулу АТФ). Цей процес назвали *ексайтотоксичністю* – "збуджувальною токсичністю", він є інтегральним компонентом фінального загального шляху ушкодження нейронів при нейродегенеративних розладах.

Залежне від віку зростання мембраноасоційованого оксидативного стресу і мітохондріальна дисфункція пришвидшують

надмірний вхід Ca^{2+} через NMDA-R у дендритах дофамінергічних нейронів. Ca^{2+} зв'язується з КМ, що активує nNOS і насамкінець приводить до продукції NO (рис. 5.16).

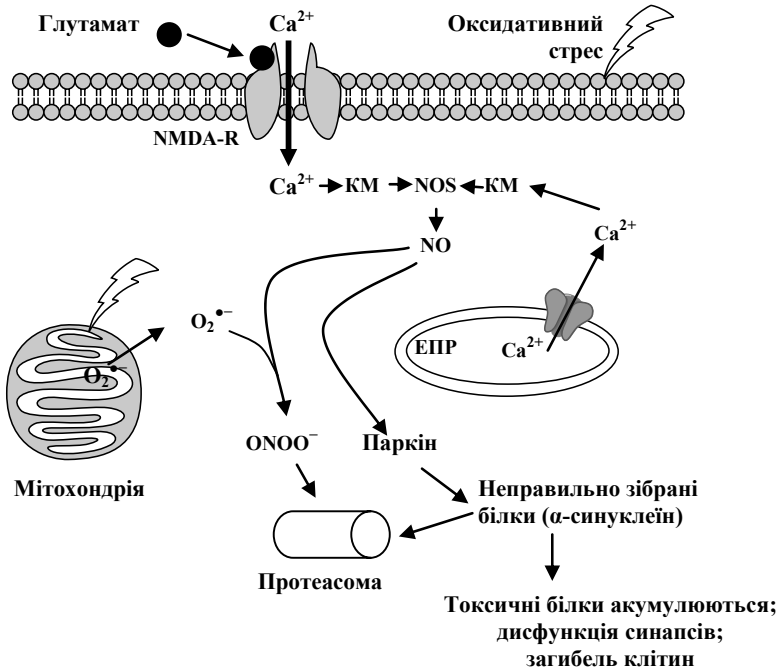


Рис. 5.16. Схема активзації nNOS у нейронах ЦНС та участі цього ферменту в розвитку ексайтотоксичності

Серед можливих впливів NO у нейронах – пошкодження функцій протеасом унаслідок їхнього S-нітрозилування; при цьому в нейронах накопичуються ті білки, що в нормі руйнуються цими структурами (наприклад, невірно зібраний паркін, що в нормі відповідає за убіквітинування та наступну деградацію аномальних і відпрацьованих протеїнів). NO також може руйнувати білки внаслідок їхнього необоротного нітрування пероксинітридом (ONOO^-) – продуктом взаємодії оксиду азоту із супероксидним аніоном.

Подібно до описаного вище здійснюється регуляція nNOS і в нейронах брижейки (рис. 5.17).

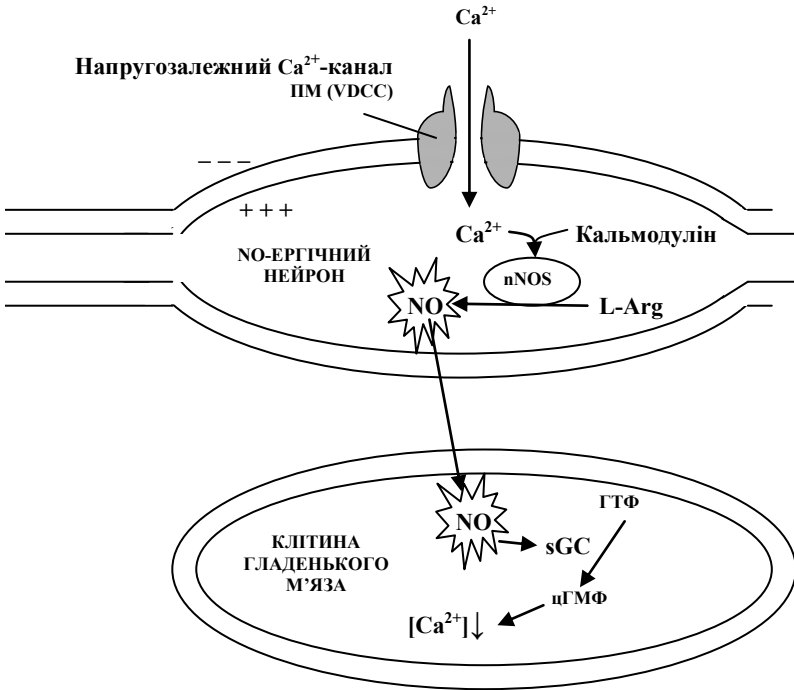


Рис. 5.17. Схема активації nNOS у нейронах брижейки

Брижейка – це складка очеревини, що прикріплює шлунок, тонку кишку, частину ободової кишки та ряд інших розташованих у черевній порожнині органів до задньої частини живота. У цьому випадку активатором nNOS виступають іони Ca^{2+} , що входять через структури, відмінні від NMDA-R, а саме через потенціалзалежні Ca^{2+} -канали (*voltage-dependent calcium channels, VDCC*) Утворений унаслідок цього NO послаблює гладенькі м'язи внутрішніх органів шляхом наступної активації розчинної гуанілатциклази.

Механізм активуючої дії кальмодуліну. Редуктазний домен NOS містить ділянку аутоінгібування, що складається із 45 амінокислот. Вона розташована між ФМН- і НАДФН-зв'язувальними сайтами. Ця ділянка має консервативну амінокислотну послідовність, що є копією КМ-зв'язувального домену (*АН-послідовність*, від *autoinhibitory helix*). АН-послідовність може комплементарно сполучатися з комплексом $\{Ca^{2+}/КМ\}$, що за низьких концентрацій $\{Ca^{2+}/КМ\}$ запобігає контакту активованого КМ із КМ-зв'язувальним доменом. Взаємодія АН із ФМН- та НАДФН-зв'язувальними сайтами приводить до такого конформаційного стану цих ділянок, який унеможливає передачу електронів через редуктазний домен (на ділянці ФАД-ФМН) (підпдрозд. 5.2.1, рис. 5.4, 5.5). За високих концентрацій комплексу $\{Ca^{2+}/КМ\}$ асоціація $\{Ca^{2+}/КМ\}$ із КМ-зв'язувальною ділянкою сприяє зміні цієї конформації та передачі електронів до ОД.

5.3. Механізми дії NO

Усі шляхи дії оксиду азоту як регуляторної молекули на клітину можна розділити на цГМФ-залежні та цГМФ-незалежні.

5.3.1. ЦГМФ-залежні сигнальні шляхи NO

цГМФ-залежні сигнальні шляхи NO опосередковані цГМФ, який утворюється при зв'язуванні цього оксиду гемовою групою *розчинної гуанілатциклази*, що спричиняє активацію ферменту (також див. підрозд. 2.4).

Розчинна гуанілатциклаза є гетеродимером, який складається із $\alpha 1$ і $\beta 1$ субодиниць, обидві вони є необхідними для каталітичної активності ферменту. N-термінальна ділянка кожної із субодиниць зв'язує гем, тоді як каталітичну функцію здійснює C-термінальна ділянка. Така її будова відрізняється від будови трансмембранної гуанілатциклази, яка не асоціює з гемом. Зв'язування NO з гемовою простетичною групою розчинної гуанілатциклази з формуванням нітрозогему (рис. 5.18) зумовлює як мінімум 100-кратне зростання швидкості синтезу цГМФ:

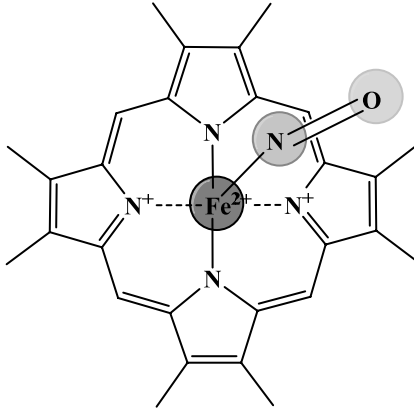


Рис. 5.18. Структура нітрозогему

До цГМФ-залежних ефектів NO відносять:

- **збільшення активності Ca^{2+} -АТФази**, що знижує внутрішньоклітинні рівні Ca^{2+} , у тому числі й у клітинах гладеньких м'язів, що спричиняє *ефект вазодилатації, зниження тону м'язів, бронходилатації* (дилатація – розширення);
- **гальмування фосфоліпази C**, що запобігає активації протеїнкінази C і сприяє *пригніченню агрегації та адгезії тромбоцитів*;
- **запобігання активації фосфоліпази A2**, унаслідок чого не утворюються *ейкозаноїди* через пригнічення метаболізму *арахідонової кислоти*;
- **активація ПкG** (підрозд. 2.2, 2.4), яка, у свою чергу, активує *фосфатазу легкого ланцюга міозину*. цГМФ-опосередковане дефосфорилування міозину гладеньких м'язів спричиняє *вазодилатацію й релаксацію*;
- **вплив на іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами** (підрозд. 2.1, 2.4);
- **вплив на тирозинові протеїнкінази та протеїнфосфатази, фосфодіестерази.**

5.3.2. цГМФ-незалежні сигнальні шляхи NO

цГМФ-незалежні NO-індуковані відповіді пояснюють анти-мікробні, цитостатичні та цитотоксичні властивості NO. Вони, зокрема, включають:

- сполучення NO із залізом гему;
- зв'язування Fe-S-центрів;
- ушкодження ДНК;
- білкову модифікацію шляхом оберненого S-нітрозилювання (нітрозування) тіолових груп цистеїну (уведення NO-групи);
- необоротне нітрування (азотування) тирозину (уведення NO₂-групи);
- активацію полі-АДФ-рибозилування зі зниженням енергозабезпечення клітини;
- окиснення метіоніну.

S-нітрозилювання цистеїну, наприклад, є білковою модифікацією, яку здійснює NO в присутності кисню, і яка зазвичай асоціюється із втратою функцій цього білка. Така модифікація може регулювати шляхи внутрішньоклітинної сигналізації, впливаючи на білки-ферменти, рецептори, транскрипційні фактори. Зокрема, наявність нітрозилюваних залишків цистеїну в межах ДНК-зв'язувальної ділянки ядерного фактора NF-kB зумовлює інгібування здатності даної молекули сполучатися із ДНК і, як наслідок, веде до змін у транскрипції клітинних генів.

Коли оксид азоту продукується у кількостях, що перевищують фізіологічні рівні, він, модулюючи структуру й функції білків, ліпідів і ДНК, приводить до розвитку *нітрозативного стресу* (подібно до виникнення *оксидативного стресу* за потужної генерації активних форм кисню, розд. 6). За цих умов, зокрема, відбувається потужне нітрування, нітрозилювання та окиснення біологічних макромолекул, що приводить до порушення функцій клітин і до їхньої загибелі.

Плейотропний ефект NO пояснюється наявністю у цього радикала трьох проміжних редокс-форм (*катіон нітрозонію* (NO^+), *нітроксил-аніон* (NO^-) і *вільний радикал* NO^\bullet), у яких він присутній в організмі (Дж. Стамлер, 1992) (рис. 5.19). Ці форми існують у динамічній рівновазі, різняться хімічною реактивністю відносно різних груп-мішеней, у тому числі й щодо розчинної гуанілатциклази, і виконують різні фізіологічні функції. Крім цього, висока реактивність притаманна й іншим молекулам-похідним оксиду азоту – *пероксинітрити* ($ONOO^-$) та *діоксиду нітрогену* (NO_2), які разом зі згаданими редокс-формами NO належать до *реактивних форм азоту* (*reactive nitrogen species, RNS*).

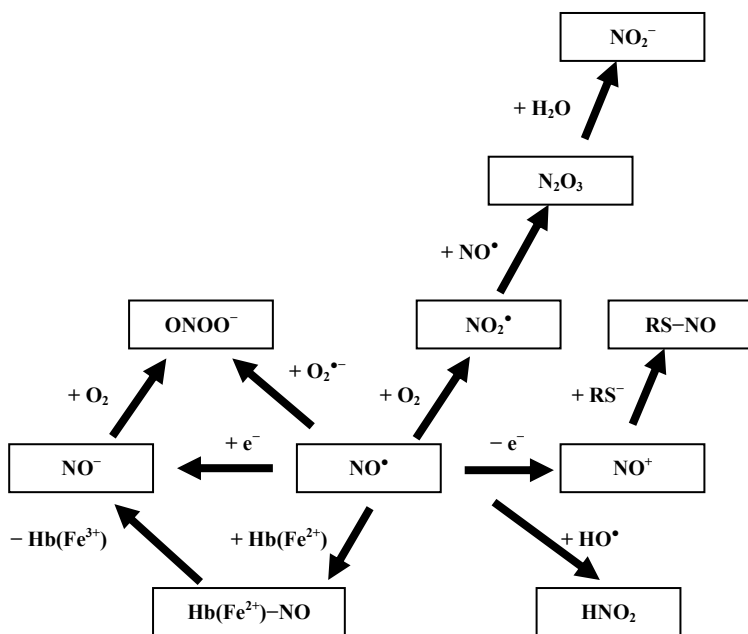


Рис. 5.19. Взаємоперетворення реактивних форм азоту

Нітроксил-аніон і катіон нітрозонію є подхідними оксиду азоту, що утворюються відповідно при відновленні та окисненні NO^\bullet -радикала: NO^\bullet має один електрон, його видалення гене-

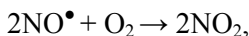
рує NO^+ , тоді як додавання ще одного електрона формує NO^- . Оскільки взаємоперетворення NO^- , NO^\bullet і NO^+ відбувається у клітині за фізіологічних умов, і кожна із цих форм володіє специфічними функціями та властивостями, тому, розглядаючи біологічну активність оксиду азоту, необхідно враховувати особливості впливів на біологічні молекули всіх трьох форм.

5.3.2.1. Регуляторні впливи радикала оксиду азоту

Радикальна форма оксиду азоту NO^\bullet реагує з молекулярним киснем, супероксидним аніоном ($\text{O}_2^{\bullet-}$) і катіонами металів, що зумовлює утворення реактивних проміжних азотистих продуктів.

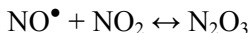
У реакції NO^\bullet з молекулярним киснем кінцевим продуктом є нітрит, а проміжними інтермедіатами – NO_2 і N_2O_3 , високореактивні сполуки з коротким періодом напіврозпаду. Це є одним із шляхів деградації NO в аеробних умовах.

Діоксид азоту (NO_2), що утворюється в реакції,

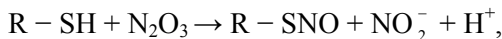


може швидко реагувати із численними біологічними мішенями, зокрема з тіолами, аскорбатом, уратами, і більш повільно окиснювати ненасичені жирні кислоти, триптофан і тирозин. Він, утворюючи комплекси із залишками тирозину або ненасиченими жирними кислотами, може викликати їхнє нітрування (детальніше про реакцію нітрування буде сказано при розгляді властивостей іншої похідної оксиду азоту – пероксинітриту), або сприяти *цис-транс*-ізомеризації. Нітрування залишків тирозину у складі білків асоціюється з численними патологіями, однак останнім часом виявляють біологічні ефекти нітроліпідів. Зокрема, нітролінолеат залучається у цГМФ-залежні та цГМФ-незалежні сигнальні шляхи оксиду азоту і спричиняє послаблення гладеньких м'язів, цАМФ-опосередковане інгібування стимульованої тромбіном агрегації тромбоцитів, значне послаблення мобілізації кальцію тощо. Зумовлене нітролінолеатом підвищення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ викликане інгібуванням цими сполуками фосфодіестерази і можливою активацією аденілатциклази [Kalyanaraman B.].

Одразу після утворення діоксид азоту NO_2 швидко реагує з наступною молекулою NO^\bullet (оборотна реакція) з утворенням азотистого ангідриду N_2O_3 – важливого медіатора дезамінування азотистих основ у складі ДНК, а також нітрозилювання амінів і тіолів:



Нітрозилюючим агентом може виступати як власне N_2O_3 :

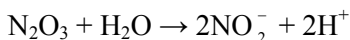


так і катіон нітрозонію (NO^+), що утворюється із N_2O_3 в реакції:



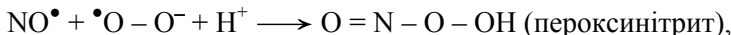
Дезамінування азотистих основ ДНК є однією з причин мутагенезу і розвитку раку, а нітрозилювання тіолів – важливий механізм оборотної посттрансляційної модифікації білків, що може регулювати ряд клітинних процесів як у нормі, так і за патологічних станів (детальніше про механізми й біологічну роль реакцій нітрозилювання йтиметься при розгляді функцій катіона нітрозонію).

N_2O_3 також може підлягати гідратації з утворенням азотистої кислоти, що дисоціює до нітриту:

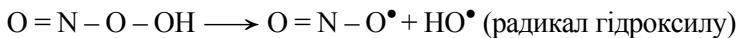


Нітрит, утворений в обох реакціях, у присутності кисню окиснюється до нітрату.

Унаслідок взаємодії NO^\bullet та супероксидного аніона утворюється пероксинітрит – ONOOH (в аніонній формі – ONOO^-):



який надалі може розкладатися з утворенням радикала гідроксилу (HO^\bullet):



Пероксинітрит забезпечує *необоротне нітрування білків за залишками тирозину (реакції нітрування)* з утворенням *нітротирози* (Tyr-NO_2) і відповідних *нітрованих білків* (R-Tyr-NO_2) (рис. 5.20).

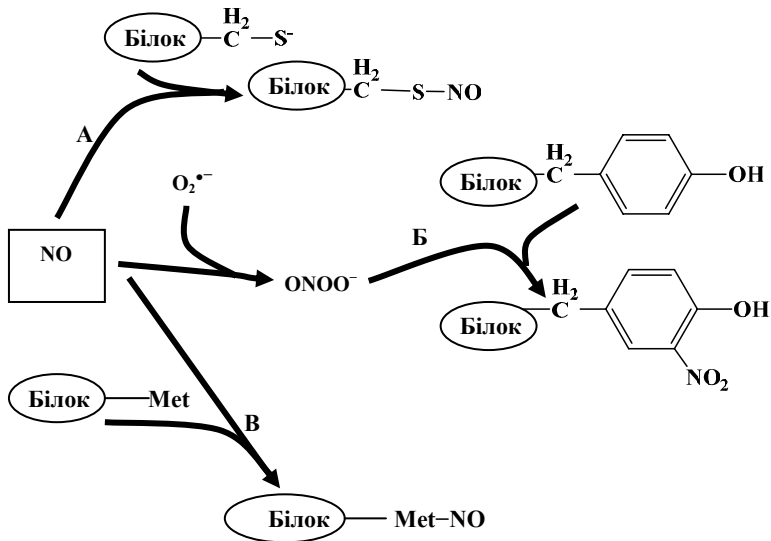


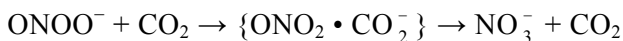
Рис. 5.20. Схема перебігу реакцій нітрозилювання і нітрування білків:
 А – S-нітрозилювання залишків цистеїну;
 Б – нітрування залишку тирозину;
 В – нітрозилювання іона металу

Такі реакції запобігають фосфорилуванню або аденілуванню залишків тирозину у складі регуляторних білків. Наприклад, тирозин присутній в активному центрі рибонуклеотидредуктази, і його нітрування інгібує цей фермент. NO-індуковане інгібування в цьому випадку може бути ще одним механізмом NOS-опосередкованої бактерицидної активності. Утворені нітровані білки надалі підлягають деградації у протеасомі.

Білки, модифіковані шляхом нітрування, у великій кількості виявляють у більш ніж 50 різних захворюваннях людини, у тому числі при атеросклерозі, інфаркті міокарда, міокардитах, цукровому діабеті, нейродегенеративних розладах і запальних процесах.

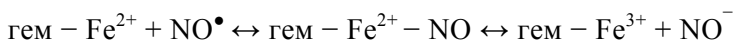
Пероксинітрит також здатний взаємодіяти з іншими вільними радикалами, ініціюючи реакції пероксидного окиснення ліпідів і хімічного розщеплення ДНК, і є важливим індуктором клітинної загибелі шляхом апоптозу або некрозу.

Високотоксичним є і *нітрозопероксикарбонат* – нестійка сполука, що утворюється в реакції пероксинітриту з CO_2 і надалі розкладається до NO_3^- і CO_2 :



NO у формі NO^\bullet є високореактивним щодо катіонів перехідних металів і тому здатний *нітрозилувати іони заліза у складі гемопroteinів* (дезоксигемоглобін, міоглобін, гуанілатциклаза, каталаза, цитохроми) та *Fe-вмісних негемових білків, у тому числі й Fe-S-центрів*, при цьому змінюючи валентність цього катіона ($\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$).

У випадку сполучення NO^\bullet з гемовою структурою реакція йде за схемою:



і супроводжується утворенням *нітрозогему* (рис. 5.21, А).

При сполученні із заліzosірчаними кластерами у складі *Fe-S-білків* NO^\bullet теж формує нітрозильовані комплекси із залізом (рис. 5.21, Б).

Реакція нітрозилування металів у складі білків причетна як до регуляторних, так і до цитотоксичних впливів оксиду азоту. Зокрема, утворення нітрозогему в складі цитохром с оксидази може спричинити інгібування дихального ланцюга, а сполучення NO^\bullet з гемом цитохрому P450 – зміни у процесах мікросомальної детоксикації сполук. Взаємодія NO^\bullet з Fe гему

NOS лежить в основі здатності цього ферменту до інгібування кінцевим продуктом. Деякі із дослідників вважають, що лише у формі NO^\bullet монооксид азоту здатний стимулювати розчинну гуанілатциклазу.

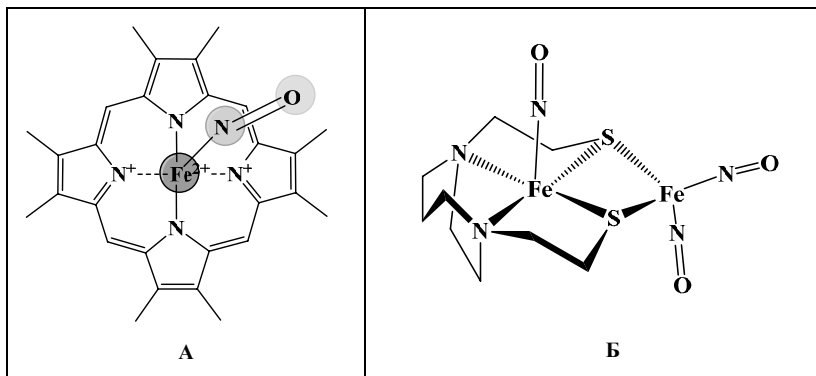
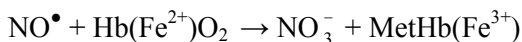


Рис. 5.21. А – Нітрозильований гем (нітрозогем);
Б – нітрозильований залізосірчаний кластер

Утворення нітрозильованого заліза у складі НАДН:убіхінон-оксидоредуктази (комплекс I) і сукцинат:убіхінон-оксидоредуктази (комплекс II) дихального ланцюга мітохондрій, а також у структурі аконітази циклу Кребса – білків із Fe-S-центрами – веде до змін перебігу процесів, у які залучені ці ферменти і, як наслідок, до недостатності в клітинах енергетичних запасів.

Аналогічні впливи NO^\bullet має на мідь- та цинковмісні білки. Зокрема, ДНК-з'язувальні білки (транскрипційні фактори, рецептори до стероїдних гормонів) містять у своїй структурі ділянки цинкових пальців і є мішенями NO^\bullet .

Реакція NO^\bullet з оксигемоглобіном іде за іншим механізмом, без формування нітрозогему, проте із утворенням метгемоглобіну (MetHb) і нітрату, і, як уже зазначалося, є одним із шляхів первинної детоксикації NO^\bullet :



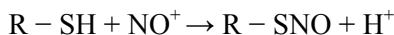
5.3.2.2. Регуляторні впливи катіона нітрозонію

Катіон нітрозонію (або нітрозильний катіон) NO^+ здійснює *нітрозилування* (інша назва – *нітразування*) нуклеофільних груп тіолів, амінів, карбоксильних, гідроксильних груп, ароматичних кілець. Найчастіше катіон нітрозонію утворюється із N_2O_3 в реакції:

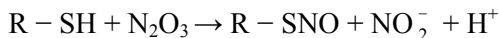


Найпоширенішою із реакцій нітрозилування є *S-нітрозилування SH-груп цистеїну* з утворенням *нітрозоцистеїну (Cys-NO)*. Відповідно, білки, модифіковані таким чином, отримали назву *S-нітрозотіоли (R-SNO)* (наприклад, S-нітрозоальбумін (Alb-SNO), S-нітрозогемоглобін (Hb-SNO)).

Механізм формування цих сполук можна зобразити наступною схемою:



(генерація S-нітрозотіолів за участю NO^+);



(генерація S-нітрозотіолів за участю N_2O_3);

За фізіологічних умов S-нітрозилування, модулюючи функції різноманітних білків-субстратів, залучається у регуляцію численних біологічних процесів (табл. 5.2).

Таблиця 5.2. Модуляція функцій білків шляхом S-нітрозилування їхніх молекул

Білок-мішень S-нітрозилування	Ефект S-нітрозилування
NMDA-R	Зменшення чутливості до глутамату
Ріанодиновий рецептор	Збільшення тривалості відкриття каналу
β -арестин	Посилення інтерналізації рецепторів
JNK1	Інгібування кіназної активності
HSP90	Інгібування шаперонової активності
Протеасома	Інгібування протеасомальної активності 26S
Каспази	Інгібування протеазної активності
MMPs	Активация металопротеїназної активності
Akt	Інгібування кіназної активності
PTEN	Інгібування фосфатазної активності

Закінчення табл 5.2.

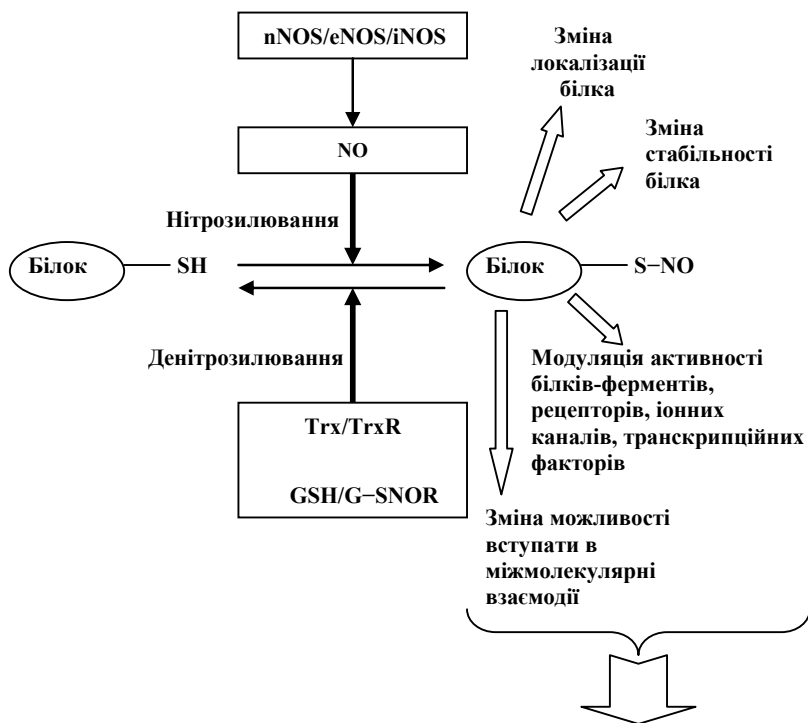
Білок-мішень S-нітрозилювання	Ефект S-нітрозилювання
SHP2	Інгібування фосфатазної активності
Ptx2	Інгібування антиоксидантних властивостей
COX2	Активація синтезу простагландинів
ApoE	Зниження здатності зв'язуватися з LDL-рецепторами
Комплекс I	Інгібування мітохондріального дихання
Комплекс IV	Інгібування мітохондріального дихання
F1 субодиниця H ⁺ -АТФази	Інгібування АТФазної активності
Аконітаза	Пригнічення циклу Кребса
ALDH2	Пригнічення метаболізму алкоголю
NOS	Інгібування активності NOS продуктом реакції

Подібно до інших посттрансляційних модифікацій, S-нітрозилювання може запускати конформаційні зміни і таким чином активувати чи інгібувати активність ферментів. Часом зміни конформації білкової молекули можуть полегшувати наступне окиснення залишків менш реактивними активними формами кисню, що спричиняє утворення сульфенової (–SOH), сульфінаної (–SO₂H), або сульфонової (–SO₃H) похідної тіолової групи залишку цистеїну.

Крім того, S-нітрозилювання впливає на можливість перебігу інших посттрансляційних модифікацій залишків цистеїну. Наприклад, S-нітрозилювання одного з двох поруч розташованих залишків цистеїну може полегшити утворення між ними дисульфідного зв'язку, тоді як модифікація обох залишків унеможливує формування дисульфідів. Більше того, S-нітрозилювання цистеїну може передувати й таким чином перешкоджати пальмітилюванню, яке здійснюється за цими ж залишками. Оскільки пальмітилювання підвищує асоціацію білків із ПМ, S-нітрозилювання знижує спрямування білків до мембрани.

Посттрансляційна модифікація шляхом S-нітрозилювання також може модулювати білок-білкові взаємодії, спричиняти

агрегацію білків, змінювати їхню локалізацію, що впливає на перебіг внутрішньоклітинної сигналізації та на функціональний стан клітин (рис. 5.22).



Порушення перебігу внутрішньоклітинних сигнальних каскадів і процесів нейротрансмісії, дисфункція дихального ланцюга, зміни в гомеостазі заліза, розвиток адаптаційної та стресової відповіді

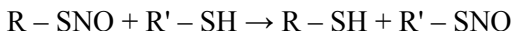
Рис. 5.22. Біологічна роль S-нітрозилювання білків

За патологічних умов посилене S-нітрозилювання білків стимулює в клітині деструктивні процеси. Ексайтотоксичність, асоційована з нітративним стресом і посиленим нітрозилюванням і нітруванням білків, причетна до цілого ряду нейрологічних патологій, від гострої гіпоксії-ішемії до хронічних нейродегенеративних розладів. Так, при хворобах Альц-

геймера та Паркінсона S-нітрозилювання низки специфічних, важливих для виживання нейронів протеїнів, а в деяких випадках і наступне їхнє окиснення, може порушити білковий фолдинг, метаболізм ліпідів, привести до дегенерації синапсів, спричинити розвиток ЕПР-стресу і мітохондріальної дисфункції, а також зумовити дисрегуляцію клітинного редокс-статусу і балансу між процесами апоптозу й виживання клітин, що, власне, і залучається у механізм патогенезу (табл. 5.3). Це дозволяє розглядати окремі етапи розвитку нітрозативного стресу як нові мішені при терапії нейродегенеративних розладів [Akhtar M. et al.], [Nakamura T. et al.].

Не всі залишки цистеїну в складі білків можуть підлягати S-нітрозилюванню. Їхня здатність до цієї модифікації залежить від локалізації, а також від наявності *сигнатурного мотиву амінокислот* в ділянках, суміжних із залишком цистеїну. Кислі і/або лужні амінокислоти, розташовані поруч із тіоловою (–SH) групою-мішенню, спричиняють депротонування сульфгідрилу з утворенням тіолят-аніона (–S[–]), що полегшує S-нітрозилювання – адже насправді введення NO-групи відбувається не в тіолову групу залишку цистеїну, а саме в тіолят-аніон.

Крім прямої взаємодії з монооксидом азоту, білки можуть перетворюватися на S-нітрозотіоли в **реакції транснітрозилювання**:



Транснітрозилювання є важливим ферментативним механізмом, що генерує S-нітрозильовані білки в біологічних системах. Під час цієї реакції NO-група від білка-донора переноситься на реактивний залишок цистеїну в білку-акцепторі, при цьому утворюються денітрозильований білок і новий SNO-білок.

Виявлено *S-транснітрозилювальні ферменти (S-транснітрозилази)*, які, вступаючи у білок-білкові взаємодії, забезпечують перебіг цього процесу. До них, зокрема, належать такі нітрозильовані білки-донори NO, як SNO-гемоглобін, SNO-тіо-редоксин, SNO-гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа, SNO-каспаза-3 і SNO-циклінозалежна кіназа 5.

Таблиця 5.3. Роль S-нітрозилювання білків у патогенезі нейродегенеративних розладів

Білок	Біологічне значення	Вплив S-нітрозилювання на функції білка	Розлади
Протеїн-дисульфідізомераза (<i>Protein Disulfide Isomerase, PDI</i>)	Один із ферментів, що забезпечує вірне утворення дисульфідних зв'язків під час фолдингу білків у ЕПР шляхом залучення в серію реакцій тіоло-дисульфідного обміну.	S-нітрозилювання полегшує наступне окиснення залишків цистеїну, що унеможливує належне формування дисульфідних містків, білки невірно згортаються і агрегують в ЕПР, що веде до розвитку ЕПР-стресу і загибелі клітини.	Хвороби Альцгеймера, (хв. А.) Паркінсона (хв. П.)
Динамічнозалежний білок 1 (<i>Dynamin Related Protein 1, Drp1</i>)	Необхідний для поділу мітохондрій.	SNO-Drp1 має підвищену активність і спричиняє потужний поділ мітохондрій, що веде до втрати синапсів і загибелі нейронів.	Хвороба Альцгеймера
Циклінозалежна кіназа 5 (<i>cyclin-dependent kinase 5, Cdk5</i>)	У нейронах не здійснює регуляцію клітинного циклу, проте контролює виживання цих клітин, їхню міграцію, розгалуження дендритів, синаптичну пластичність.	Після S-нітрозилювання SNO-Cdk5 набуває нітрозилазної активності й, діючи як ендогенна нітрозилаза, спричиняє транснайтрозилювання інших нейрональних білків, зокрема, Drp1, що веде до ушкодження синапсів.	Хвороба Альцгеймера

Блок	Біологічне значення	Вплив S-нітрозилювання на функції білка	Розлади
<p>Аполіпропротеїн E (<i>Apolipoprotein E, ApoE</i>)</p>	<p>Залучений у метаболізм ліпідів.</p>	<p>Ліпопротеїни низької щільності, до складу яких входить модифікований ApoE, втрачають здатність сполучатися із власними рецепторами, що порушує метаболізм ліпідів, відповідає за прогресію хв. А. і є одним із основних факторів, що сприяють більш ранньому розвитку цього розладу.</p>	<p>Хвороба Альцгеймера</p>
<p>Паркін</p>	<p>Це E3-убіквітинлігаза, її мішенню є, зокрема, анормальні білки, які після убіквітинуювання підлягають деградації в протеасомах. Через це паркін володіє нейропротективними властивостями, захищаючи нейрони від апоптозу, який є одним із механізмів загибелі нейронів при хв. П.</p>	<p>Подібно до мутованого паркіну, SNO-паркін втрачає нейропротективні функції і стає причиною акумуляції потенційно нейротоксичних білкових агрегатів субстратів паркіну з наступною дисфункцією убіквітин/протеасомальної системи і формуванням тілець Леви – структур, які виявляються у клітинах при хв. П.</p>	<p>Хвороба Паркінсона</p>

Білок	Біологічне значення	Вплив S-нітрозилювання на функції білка	Розлади
Пероксидредоксин 2 (<i>peroxiredoxin 2, Prx 2</i>)	Серед пероксидредоксинів – антиоксидантних білків, що знижують вміст H_2O_2 у клітинах шляхом його відновлення (підрозд. 6.4), пероксидредоксин 2 є найчисленнішим у нейронах ссавців і виконує свої функції за рахунок наявності каталітично необхідних залишків цистеїну.	При деяких нейродегенеративних розладах, що супроводжуються розвитком оксидативного/нітративного стресу, рівні Prx2 зростають, що може мати протективне значення. Водночас, S-нітрозилювання редокс-активних залишків цистеїну запобігає взаємодії цих білків із H_2O_2 , що унеможливає нейрозахисну дію Prx2, посилює оксидативний стрес і стає причиною загибелі нейронів.	Хвороба Паркінсона
X-сполучений інгібітор апоптозу (<i>X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP</i>)	Білок із родини інгібіторів апоптозу (<i>inhibitors of apoptosis, IAPs</i>), які регулюють виживання клітин, безпосередньо сполучаючись специфічним доменом із головними протеазами, залученими в апоптоз – каспазами – і тим самим притічуючи їхню каталітичну активність; одночасно, за рахунок присутності іншого домену, XIAP, подібно до паркіну, має E3-убіквітинлігазну активність і залучається в роботу убіквітин/протеасомальної системи (зокрема, в деградацію каспаз).	S-нітрозилювання XIAP за залишком цистеїну в E3-убіквітинлігазному домені унеможливає його участь в убіквітин/протеасомальній системі; дуже високі концентрації NO можуть модифікувати і каспаза-зв'язувальний домен. Більш того, багаті на цистеїн молекули субстратів XIAP – каспаз, у свою чергу, теж можуть підлягати S-нітрозилюванню і надавати у процесі транскрипції передавати NO-групу на XIAP. Наслідком цього стає пригнічення E3-убіквітинлігазної активності XIAP на каспази та стимулювання проапоптотичних сигналів.	Хвороби Альцгеймера, Паркінсона

Блок	Біологічне значення	Вплив S-нітрозилювання на функції білка	Розлади
Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH</i>)	Каталізує шосту реакцію гліколітичного шляху – перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на гліцерат-1,3-дифосфат, але при цьому може залучатися і в низьку метаболічних процесів, зокрема в активацію транскрипції, ініціацію апоптозу, у переміщення везикул від ЕПР до апональний транспорт.	SNO-GAPDH набуває здатності сполучатися з іншим білком – Siah1 (який володіє E3-убіквітинлігазною активністю); це сприяє стабілізації останнього, ядерній транслокації цього комплексу (завдяки наявності сигналу ядерної локалізації в молекулі Siah1). У ядрі SNO-GAPDH здійснює транснайтрозилювання низки ядерних білків, унаслідок чого порушуються процеси транскрипції генів, реплікації та репарації ДНК, ядерного експорту РНК, а стабілізований Siah1 здійснює деградацію ядерних білків-мішеней, що веде до ініціації процесів апоптозу.	Хвороби Альцгеймера, Паркінсона

При цьому білок, що приймає NO-групу в реакції транснаїтрозування, може вважатися агентом, який здійснює денїтрозування та деградацію S-нітрозотїолїв.

Денїтрозування S-нітрозотїолїв, що йде не за механїзмом транснаїтрозування (*власне денїтрозування*), супроводжується вивільненням NO (рис. 5.23).

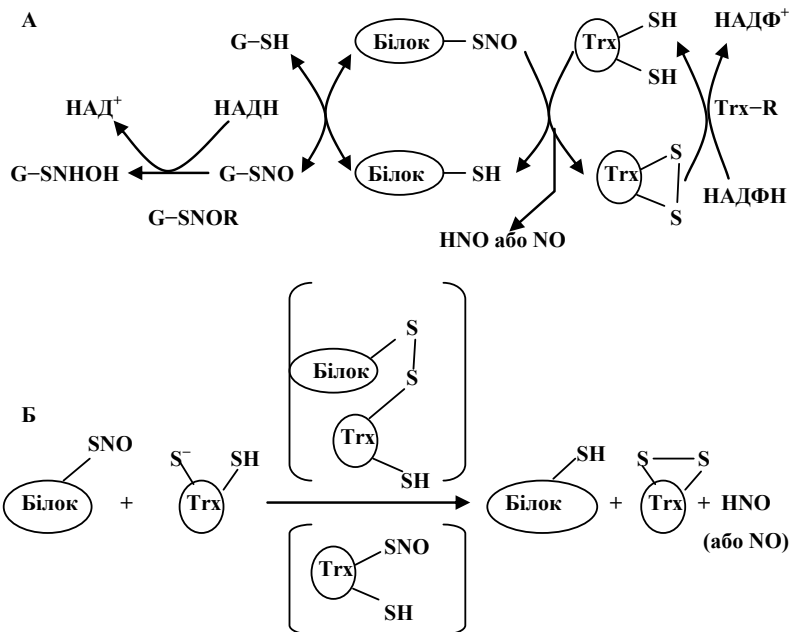


Рис. 5.23. А – схема денїтрозування за участю тїоредоксину та S-нітрозоглутатїонредуктази; Б – альтернативний механїзм Trx-опосередкованого денїтрозування: Trx – тїоредоксин; G-SNOR – S-нітрозоглутатїонредуктаза; TrxR – тїоредоксинредуктаза; SNO-білок – S-нітрозильований білок; GSH – глутатїон; G-SNO – S-нітрозоглутатїон; G-SNHOH – N-гїдроксисульфенамїд глутатїону; GS-SG – окиснений глутатїон, глутатїондисульфїд; GR – глутатїонредуктаза

Індукторами цього процесу можуть бути тепловий шок, ультрафіолетове випромїнення, деякі йони металїв, супероксидний анїон, аскорбїнова кислота тощо. Утїм, найчастїше денїтрозування вїдбувається за участю тїоредоксину або S-нітрозоглутатїонредуктазної системи.

Так, при денітрозилюванні модифікованих білків за участю тіоредоксину (*thioredoxin, Trx*), у структурі якого наявні дві SH-групи (детально про структуру і функції цього білка див. підпідрозд. 6.2.1), генерується відновлений тіол (–SH) у складі білкової молекули і окиснений Тгх. Останній надалі відновлюється селенофлавопротеїном *тіоредоксинредуктазою* (*thioredoxin reductase, TrxR*) із використанням НАДФН як джерела протонів. Крім білкових похідних, Тгх також може денітрозилювати і низькомолекулярні S-нітрозотіоли. За альтернативним механізмом Тгх-опосередкованого денітрозилювання у процесі реакції може утворюватися міжмолекулярний дисульфідний інтермедіат (у якому Тгх ковалентно сполучений із білком дисульфідним містком) або відбуватися реакція трансітрозилювання (у якій Тгх є транс-S-нітрозильованим).

Інший шлях денітрозилювання SNO-білків передбачає залучення *глутатіону* (GSH). На першому етапі при цьому утворюється білковий тіол і S-нітрозоглутатіон (G–SNO); надалі G–SNO швидко метаболізується *S-нітрозоглутатіонредуктазою* (*S-nitrosoglutathione reductase, G–SNOR*) до N-гідроксисульфенаміду глутатіону (G–SNHOH), що вступає в реакцію ще з однією молекулою глутатіону з формуванням глутатіондисульфіду (GS–SG) – окисненої форми глутатіону. Останній, у свою чергу, відновлюється до GSH за участю *глутатіонредуктази* (*glutathione reductase, GR*). За певних умов може відбуватися реакція SNO-білків з GSH (або білкових тіолів з G–SNO) з формуванням S-глутатіонованих білків, які надалі підлягають деглутатіонуванню за участю глутаредоксину або тіоредоксину (про біологічну роль модифікації шляхом S-глутатіонування див. підпідрозд. 6.2.1), або реакція S-трансітрозилювання між SNO-білками або G–SNO та іншим тіолвмісним білком з утворенням нового S-нітрозотіолу [Benhar M. et al.], [Corpas F. et al.], [Lima B. et al.].

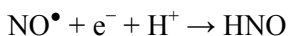
Отже, S-нітрозотіоли, які за певних умов здатні вивільнювати оксид азоту, слугують його фізіологічним пулом. Як донори NO SNO-білки проявляють ефекти, подібні до вільного моноок-

сиду азоту (є потенційними вазорелаксантами, мають антиагрегаційні та антиадгезивні, а також антимікробні властивості, залучаються в регуляцію активності ферментів), але мають значно довший порівняно з ним період напіврозпаду. Проте потужне нітрозилування білків при нітрозативному стресі є небажаним явищем і може залучатися у патогенез ряду захворювань, зокрема нейродегенеративних розладів.

Окрім нітрозилування тіолових груп, N_2O_3 та NO^+ , взаємодіючи з аміногрупами біологічних молекул, можуть спричинити **утворення нітрозоамінів** (R_2N-NO). Ці сполуки здатні атакувати ДНК і модифікувати її й тому проявляють канцерогенні властивості.

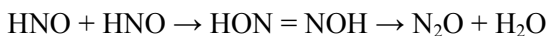
5.3.2.3. Регуляторні впливи нітрокислого аніона

Нітрокислий аніон (NO^-) за фізіологічних умов існує у вигляді HNO (при pH 7.0 співвідношення між вмістом HNO і NO^- становить приблизно 25 000 : 1) і здатний перетинати ПМ. Безпосереднє утворення HNO шляхом одноелектронного відновлення NO^\bullet в організмі відбувається зрідка й лише за наявності високого вмісту біологічних відновників:

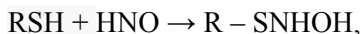


За різних умов ендogenous джерелами NO^- можуть бути такі біологічні процеси, як діяльність NOS, окиснення азидів пероксидазою, розкладання пероксинітриту, відновлення радикала оксиду азоту мітохондріальним ферроцитохромом c або цитохромоксидазою. Зокрема, синтаза оксиду азоту здатна генерувати нітрокислий аніон за відсутності кофактора тетрагідробіоптерину, а також при використанні як субстрату N-гідрокси-L-аргініну в умовах оксидативного стресу. Однак двома найважливішими механізмами, що спричиняють продукцію HNO, є його утворення із азотовмісних молекул, а саме, **денітрозилування S-нітрозотіолів** ($R-SNO$) у присутності тіолів і розкладання гідроксиламінів ($R-NHOH$) [DuMond J. et al.]. Це відносно стабільна форма оксиду азоту, проте у водному середовищі вона швидко вступає **в реакцію димеризації** з утворенням **азотноватистої кислоти**, що надалі підлягає

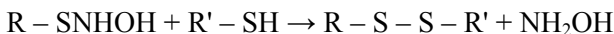
дегідратації з утворенням *оксиду азоту (I)* N_2O – сполуки, здатної окиснювати сульфгідрильні групи і реагувати з металами, зокрема з Fe^{3+} -гемом.



HNO є дуже реакційною щодо тіолів – у результаті таких реакцій утворюються гідроксиламіни:

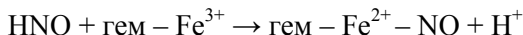


із яких у подальшому генеруються дисульфіди:

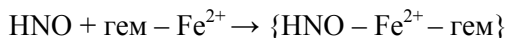


За фізіологічних умов останні швидко перетворюються на тіоли.

Іншою біологічною мішенню HNO є металопротеїни, зокрема гем-вмісні сполуки. ***Реакція HNO з гемопротейнами в (Fe^{3+}) стані*** генерує похідні з нітрозильованим залізом:

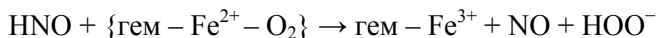


HNO також може реагувати з ***гемопротейнами у стані (Fe^{2+})*** з утворенням $\{HNO - Fe^{2+}\}$ -комплексу:



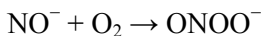
Цей комплекс є стабільним, хоча раніше вважалося, що в присутності кисню він нестійкий.

HNO також може вступати в реакцію з ***комплексом $\{O_2\}$ -гемопротейн (Fe^{2+})*** , зокрема з ***оксигемоглобіном***, наслідком чого є окиснення заліза гемопротейну до (Fe^{3+}) та утворення пероксиду водню і NO :



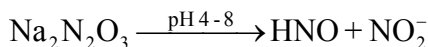
Двоелектронне відновлення HNO веде до утворення *гідроксіаміну* (NH_2OH). Ця реакція є оборотною – двоелектронне окиснення NH_2OH веде до утворення HNO , отже, NH_2OH , подібно до гідроксиламінів $R - NHOH$, теж може вважатися джерелом нітросильного аніона [Paolucci N. et al.].

NO^- у ***реакції із молекулярним киснем*** також може спричинити утворення пероксинітриту:



Отже, *різні редокс-форми оксиду азоту – радикальна та аніонна – реагуючи відповідно із супероксид-аніоном або молекулярним киснем, можуть залучатися у формування перокси-нітриту*, а отже, і в необоротне нітрування залишків тирозину. Також HNO, подібно до NO•, пригнічує фосфодіестеразну активність, таким чином опосередковуючи цАМФ-залежну вазодилатацію. Однак низка властивостей HNO і NO• є різними. Зокрема, HNO не є реакційноздатним щодо активних форм кисню, легко взаємодіє з тіоловими групами, що не характерно для радикальної форми; також HNO здатний вступати в реакцію з гемопротейнами у (Fe³⁺) стані, тоді як NO-радикал – лише з (Fe²⁺)-вмісними білками.

Біологічні функції HNO можуть бути досліджені при використанні екзогенних сполук-донорів HNO, зокрема солі Анжелі (*Angeli's salt*, Na₂N₂O₃), яка вивільнює нітроксильний аніон у протонізованому вигляді за схемою:



Отже, **найважливішими внутрішньоклітинними мішенями монооксиду азоту** залежно від його редокс-форми можуть бути:

- *активні форми кисню;*
- *гем-вмісні ферменти*, у тому числі ферменти антиоксидантного захисту (каталаза);
- *білки з Fe-S-центрами*, у тому числі й ферменти дихального ланцюга та циклу Кребса;
- *Си, Zn²⁺-вмісні ферменти;*
- *залишки цистейну;*
- *залишки тирозину;*
- *залишки метіоніну.*

Основними напрямками цитотоксичної дії NO є:

- *дезактивація низки транскрипційних факторів* (зокрема, NF-κB, AP-1), що порушує білковий склад клітини;
- *за певної концентрації – проапоптозна дія;*

• через зв'язування із залізом Fe-S-вмісних та гемових білків порушення їхнього функціонування, зокрема в дихальному ланцюзі, унаслідок чого *клітина страждає від недостатності синтезу АТФ у мітохондріях*;

• *утворення нітрозосполук* (нітрозотіолів, нітрузоамінів);

• *інактивація гем-вмісного ферменту каталази, що спричиняє надчутливість клітин до окисного стресу і розвиток ПОЛ*;

• *модифікація ДНК* продуктами окиснення NO;

• *інгібування системи репарації ушкоджень ДНК*.

Цитотоксичну дію також мають похідні NO:

• пероксинітрит ONOO^- ;

• нітрузопероксикарбонат $\{\text{ONO}_2 \cdot \text{CO}_2^-\}$;

• нітрілхлорид ClNO_2 .

5.4. Фізіологічні функції NO

Оксид азоту впливає на всі процеси, що проходять в організмі:

• *має судинорелаксуючу дію*;

• *є одним із месенджерів ексайтотоксичності*;

• *має протипухлинні властивості, але за певних умов може сприяти росту злякислених новоутворень*, оскільки бере участь в ангіогенезі – рості судин;

• *залучений у патогенез низки захворювань* (напр., атеросклерозу та нейродегенеративних розладів);

• *здійснює антимікробну дію*;

• *є причиною апоптозу або може проявляти антиапоптозні властивості*, що залежить від типу клітин, концентрації радикала та тривалості його дії;

• *обмежує вплив негативних наслідків на організм унаслідок стресу*;

• *можливо, зниження активності NOS є одним із фізіологічних механізмів старіння*.

Основні біологічні функції й токсичні впливи оксиду азоту на різні системи органів людини й ссавців наведено в табл. 5.4.

**Таблиця 5.4. Роль монооксиду азоту
в діяльності функціональних систем організму**

Система	Медіаторні функції	Патології
Серцево-судинна	Релаксуючий фактор, що утворюється ендотелієм; антитромботична й антиатеросклеротична дія, протекція ішемії	Атеросклероз, септичний шок, запалення, реперфузійні ушкодження
Дихальна	Регуляція вентиляції-перфузії, секреції слизу, рухливості війчастого епітелію бронхів, імунний захист	Астма, альвеоліт, індукований імунним комплексом
Сечоутворювальна й сечовидільна	Тубулогломерулярний зв'язок, перфузія, секреція реніну	Гострі ушкодження нирок, гломерулонефрити
ЦНС	Синаптогенез, синаптична пластичність, формування пам'яті, регуляція току крові в головному мозку, нейроендокринна секреція, передача зорового імпульсу, реалізація відповіді на ішемію	Проконвульсивний нейротоксин; залучення в патогенез нейродегенеративних розладів і ексайтотоксичності
ШКТ	Кровотік, регуляція перистальтики, екзокринної секреції, протекція слизових оболонок, антимікробна дія, регуляція секреції інсуліну підшлунковою залозою	Мутагенез, ушкодження слизових оболонок, деструкція клітин підшлункової залози
Імунна	Антимікробна та антипухлинна дії	Розвиток запалення, септичного шоку, ушкодження тканин

NO в серцево-судинній системі. У 1980 р Фарчгофф і Завадський уперше показали, що ендотеліальні клітини судин вивільнюють *релаксуючий фактор, що виробляється ендотелієм (endothelium-derived relaxing factor, EDRF)*, який у 1987 р. був ідентифікований як NO, що продукується при окисненні

L-аргініну. Вивільнення монооксиду азоту в судинній системі ініціюється високим кров'яним тиском або впливом сигнальних молекул (наприклад, ацетилхоліну або брадикініну). Джерелами NO в серцево-судинній системі є eNOS, nNOS NO-ергічних нейронів, які оточують кровоносні судини, а також iNOS макрофагів.

NO послаблює гладенькі м'язи стінок артеріол. Синтезуючись в ендотеліальних клітинах кровоносних судин, NO дифундує у прилеглий шар гладком'язових клітин, спричиняючи їхню релаксацію, або вазодилатацію (за схемою: барорецептори → активація eNOS → синтез NO → активація Ca^{2+} -АТФази мембрани ЕПР → транспорт Ca^{2+} у ЕПР → зниження вмісту Ca^{2+} у клітині → послаблення гладком'язових клітин кровоносних судин). На цьому базується дія нітрогліцерину: він є донором NO, який релаксує стінки коронарних артерій та артеріол. Завдяки таким ефектам нітрогліцерин застосовують і при ризику передчасних пологів. Інші вазодилатори, наприклад ацетилхолін, спричиняють зростання концентрації Ca^{2+} усередині ендотеліальних клітин судин, активуючи таким чином eNOS. Фармакологічні інгібітори NOS, зокрема L-нітроаргінін, виявляють протилежні вазоконстрикторні ефекти й підвищують рівні кров'яного тиску.

Показано, що, дифундуючи у кров, *NO гальмує процеси агрегації та адгезії тромбоцитів*, запобігаючи таким чином утворенню тромбів; уже було відмічено роль оксиду азоту в запобіганні атеросклерозу. Дуже важливою є функція NO у відновленні кровопостачання після ішемії та гіпоксії: за цих умов NO генерується для протекції тканин і полегшення кровотоку. Проте надмірна продукція NO має пошкоджувальний вплив на судини.

NO у нервовій системі. Основним джерелом оксиду азоту в нервовій системі є nNOS. За фізіологічних рівнів генерування NO виступає як нейромедіатор: утворюючись у NO-ергічних нейронах, він здатний запускати каскад передачі сигналу і видалятися із синаптичної щілини (рис. 5.24).

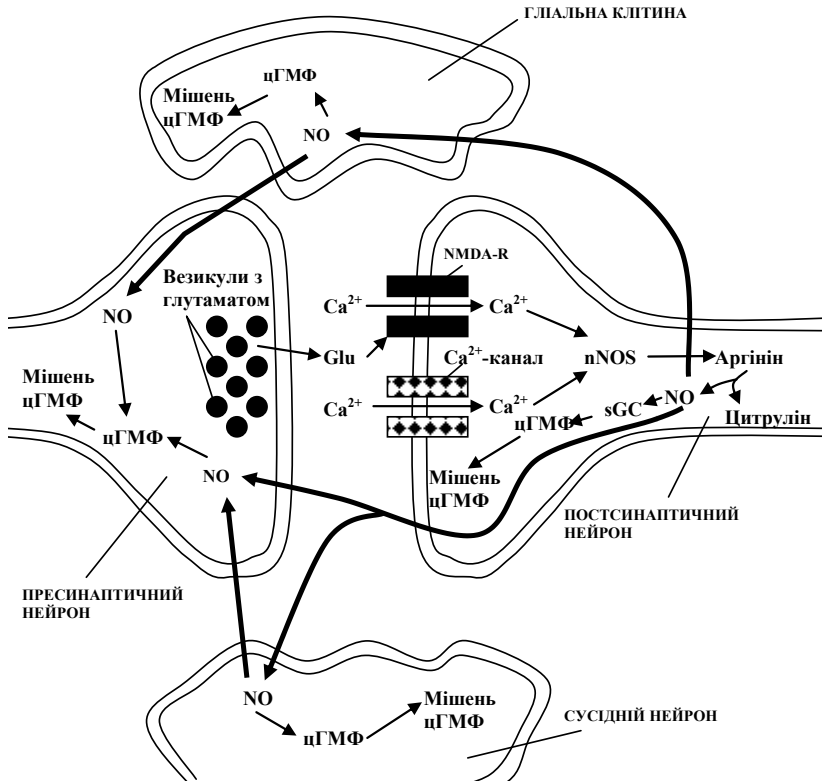


Рис. 5.24. Схема функціонування NO як нейромедіатора

При цьому, на відміну від класичних нейромедіаторів, транспорт NO у синаптичну щілину не передбачає його накопичення у везикулах і процесу екзоцитозу, а відбувається шляхом простої дифузії. Крім того, NO не сполучається з рецепторами на поверхні постсинаптичної мембрани, а дифундує в цитозоль клітини-мішені, де активує розчинну гуанілатциклазу. Також монооксид азоту може потрапляти із постсинаптичного нейрона зворотно в пресинаптичний і спричиняти там продукцію цГМФ.

Пул NO, що генерується eNOS, залучений у вазодилатацію судин, локалізованих у межах нервової системи.

Надмірна активація глутаматом NMDA-R, як відомо, веде до гіперактивації nNOS і потужного генерування оксиду азоту, який у цьому випадку відіграє в ЦНС роль медіатора збуджувальної нейротоксичності (феномен "*ексайтотоксичності*", або "*смерті від надзбудження*", що характеризується локальною загибеллю нервових клітин від токсичної дії збуджувального нейромедіатора глутамату) (підпідрозд. 5.2.3.3, рис. 5.16). Нітрозативний стрес унаслідок гіперпродукції NO змінює процеси внутрішньоклітинної сигналізації через S-нітрозилювання білків, у тому числі аномальних, і нітрування залишків тирозину в їхньому складі, що стає причиною ушкодження синапсів і загибелі нервових клітин. При цьому порушуються численні клітинні процеси – функціонування мітохондріального дихального ланцюга, фолдинг білків, метаболізм ліпідів, деградація білків у протеасомі тощо, що веде до розвитку нейродегенерації. Метаболіти NO здатні дифундувати на дуже невеликі відстані (у середньому кілька мікрометрів), що й визначає ареал токсичної дії глутамату. Механізм ексайтотоксичності є складовою патогенезу травматичних ушкоджень спинного і головного мозку, інсульту, втрати слуху, нейродегенеративних розладів ЦНС (хвороба Альцгеймера, аміотрофічний латеральний склероз, хвороба Паркінсона та ін.), епілепсії тощо.

За фізіологічних умов низькі рівні NO, генерованого nNOS та eNOS через активацію розчинної гуанілатциклази і PkG, а також шляхом S-нітрозилювання низки білків, необхідного для їхнього нормального функціонування (NMDA-R, Gospel тощо) виявляють нейропротективні ефекти (рис. 5.25). Однак, як нейропротекція, так і розвиток нейродегенеративних процесів можуть відбуватися і за іншими, NO-незалежними механізмами.

За фізіологічних умов у клітинах мозку активність iNOS є відсутньою, проте численні стимули, зокрема ішемічне, травматичне, нейротоксичне або запальне ушкодження, можуть спричинити експресію у клітинах астро- та мікроглії ЦНС iNOS.

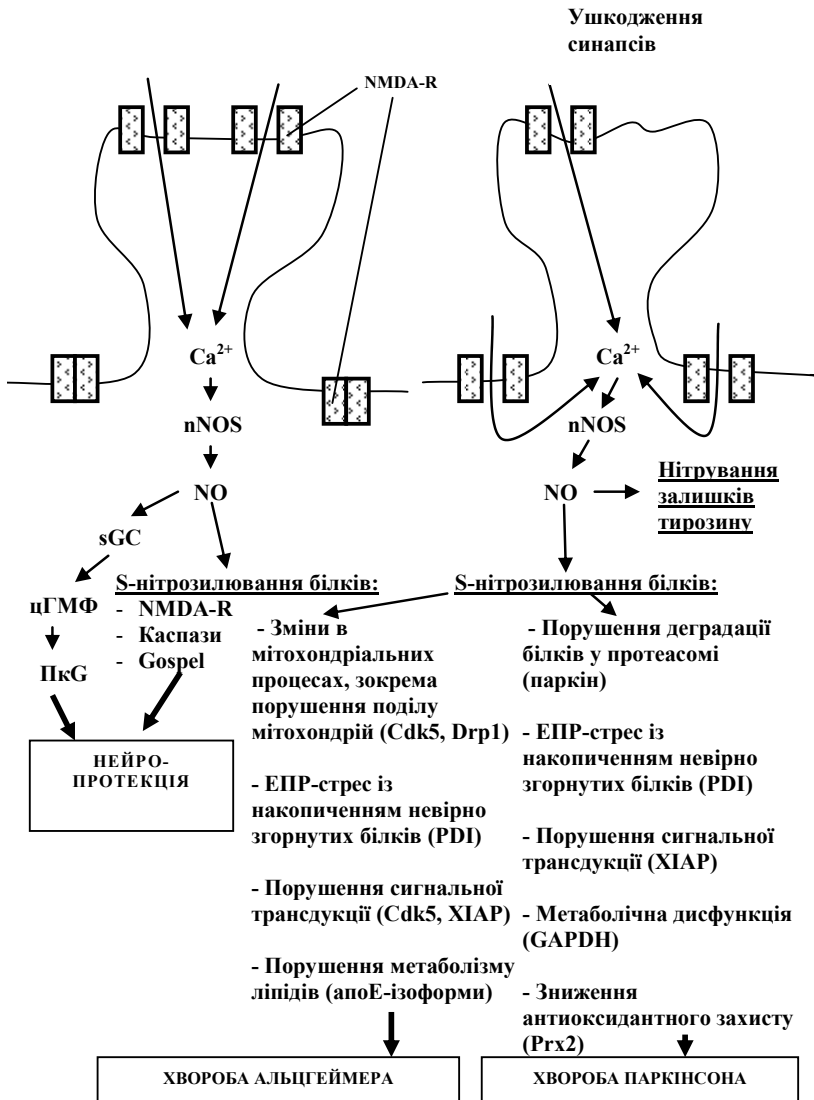


Рис. 5.25. Сигнальні шляхи NO у нейропротекції та в патогенезі нейродегенеративних розладів

Надмірні рівні NO, що утворюються дією цього ферменту, приводять до дегенерації олігодендроцитів при демієлінізуючих розладах (множинний склероз, експериментальна алергічна енцефалопатія, X-адренолейкодистрофія) і загибелі нейронів при ішемії, травмах і нейродегенеративних розладах. Результати останніх наукових досліджень також указують на залучення оксиду азоту в розвиток нейронів і у процеси формування пам'яті.

NO у шлунково-кишковому тракті. NO є найважливішим неадренергічним, нехолінергічним (*non-adrenergic non-cholinergic, NANC*) інгібуючим нейротрансмітером у кишечнику, що послаблює гладенькі м'язи цього органу шляхом активації розчинної гуанілатциклази і наступного залучення цГМФ та ПкG; остання, взаємодіючи із кіназою легкого ланцюга міозину, модулює тонус гладенького м'яза. Крім того, NO залучається в модуляцію секреції бікарбонатів, соляної кислоти, слизу, бере участь у регуляції моторики шлунка й кишечника, має гастропротективні властивості й причетний до патогенезу інсулінозалежного цукрового діабету.

NO в імунній системі. NO генерується численними клітинами, залученими в імунітет і запалення. До цього синтезу причетна головним чином iNOS, яка індукується дією цитокінів чи LPS і продукує високі рівні оксиду азоту, який у таких концентраціях є токсичною сполукою для патогенів. При цьому NO швидко перетворюється на інші реактивні форми оксиду азоту, які опосередковують більшість імунологічних ефектів iNOS-генерованого NO і зумовлюють цитостатичний і цитотоксичний ефекти на мікроорганізми, що потрапили в організм, або на пухлинні клітини. Механізми антимікробної дії NO передбачають S-нітрозилування та окиснення різноманітних бактеріальних структур, у тому числі протеїнкіназ, транскрипційних факторів і ключових ферментів дихального ланцюга мітохондрій, що спричиняє модуляцію синтезу ДНК, активацію апоптозу (за певної концентрації оксиду), зниження клітинної проліферації, втрату АТФ і недостатність енергетичних запасів у клітині. Комбінацією цих впливів пояснюються мультиплетні впливи NO на регуляцію функціональ-

ної активності, росту і загибелі макрофагів, Т-лімфоцитів, антиген-презентуючих клітин, тучних клітин, нейтрофілів, натуральних кілерів. Також NO є важливим агентом, здатним інгібувати реплікацію вірусів у клітинах.

При гострій інфекції внаслідок надмірної активації iNOS і вивільнення надвеликої кількості NO може виникати *септичний шок* – стан, що супроводжується різким падінням кров'яного тиску.

NO в діяльності нирок. Унаслідок послаблювальної дії на стінки судин клубочків нирок NO, модулюючи швидкість фільтрації й утворення сечі, регулює сечоутворення. Також установлені релаксуючі впливи оксиду азоту на стінки сечового міхура.

NO в ендокринній системі. NO підсилює секреторну активність деяких ендокринних залоз, наприклад, полегшує вивільнення гонадотропін-вивільнювального гормону (гіпоталамус), адреналіну (мозкова частина надниркових залоз), секрецію панкреатичної амілази.

NO у функціонуванні скелетних м'язів. У скелетних м'язах експресуються всі ізоформи NOS, включаючи специфічний для м'язової тканини сплайсинг-варіант pNOS. Основні впливи NO, генерованого цими ферментами, опосередковуються цГМФ, а також S-нітрозилюванням білків, зокрема ріанодинового рецептора CP, залученого у вивільнення кальцію із цієї органели. Ефекти NO у скелетних м'язах спрямовані на регуляцію процесів скорочення, тонуусу кровоносних судин, диференціювання міоцитів, гомеостазу глюкози. Особливу роль оксид азоту відіграє у регенерації м'язів.

NO в дихальній системі. Основними джерелами оксиду азоту в дихальній системі є pNOS і eNOS, а також інші NO-вивільнювальні молекули (нітрозотіоли). NO, генерований цими шляхами, модулює тонус бронхів і кровотік через легені. Зміни у вмісті NO причетні до розвитку хронічних запалень дихальної системи, астми, легеневої гіпертензії тощо. Комбіноване застосування у терапевтичних цілях NO і кисню дає кумулятивний ефект на гемодинаміку та обмін газів у легенях [Mathur V. et al.].

Оксид азоту є регуляторною молекулою не лише в організмах ссавців. Так, головна роль у формуванні NO у рослин належить специфічній формі NOS. При цьому сам оксид азоту здійснює свої функції за механізмами, подібними описаним вище. NO у рослин може виявляти антиінвазивні ефекти відносно низки патогенних збудників, а також здатний пригнічувати цвітіння.

Залежно від концентрації та тривалості дії NO може виступати перемикачем між двома основними типами загибелі клітин – апоптозом і некрозом, а також визначати, чи буде клітина жити, чи загине. В основі такого перемикання лежать NO-залежна активація певних транскрипційних факторів і вплив NO на енергетичний обмін у клітині – адже відомо, що апоптоз, на відміну від некрозу, є енергетично залежним процесом, і його реалізація унеможливується в умовах недостатнього утворення макроергічних сполук у клітині.

Як інгібітор клітинної загибелі NO може діяти за різними напрямками:

- для виживання клітин може бути важливим *S*-нітрозилювання багатьох критичних факторів. Зокрема, потенційними білками-мішенями є каспази (ферменти, які відіграють одну із ключових ролей у програмі апоптозу) і транскрипційний фактор NF- κ B;

- NO є уловлювачем активних форм кисню, який, реагуючи з алкоксильними та пероксильними радикалами, гальмує пероксидне окиснення ліпідів;

- NO може індукувати протективні білки, зокрема білок теплового шоку Hsp70, що захищає низку клітин від апоптозу, хоч механізм цього явища досі невідомий, а також посилювати експресію антиапоптозного білка Bcl-2;

- NO може спричиняти інгібування білка ANT (підрозд. 6.3) – одного із компонентів пори, що утворюється у мітохондріальних мембранах і служить для виходу із мітохондрій низки білків (зокрема, цитохрому c), необхідних для реалізації програми апоптозу;

Показано, що NO, залежно від його вмісту, редокс-форми та стану клітини, може включатися як у процеси апоптозу, так і в

некротичну загибель клітин. Зокрема, високі рівні NO в нейронах запускають некроз, тоді як триваліший вплив за низьких концентрацій – апоптоз.

NO-індукований апоптоз виникає в багатьох типах клітин; його сигнальні шляхи досі не вивчено, проте відомо, що він може супроводжуватися акумуляцією гена транскрипційного фактора і супресора пухлин p53, змінами в експресії про- та антиапоптозних членів родини Bcl-2, активацією каспаз, транслокацією цитохрому c. До того ж, монооксид азоту здатний до хімічної взаємодії з білком Mdm2 – інгібітором p53 (підрозд. 6.3). Це зумовлює активацію останнього та ініціацію апоптозних шляхів (p53 за наявності у ядрі мутованої ДНК веде до зупинки клітинного циклу, різкого зростання експресії проапоптозних генів і загибелі клітини шляхом апоптозу).

NO-опосередкований некроз є характерним для численних клітинних систем і пов'язаний із його мультиплетними взаємодіями з мішенями (тіловими групами, гемом, Fe-S-центрами, залишками тирозину білків, ДНК). Частина цих ефектів є прямими; ряд інших залежить від реагування NO із супероксидним аніоном, а за високих концентрацій цього оксиду – і з киснем з утворенням пероксинітриту ONOO⁻ і нітрозативних агентів відповідно. Високий вміст NO або його швидка дія, як уже зазначалося, гальмують природні клітинні процеси – синтез ДНК, мітохондріальне дихання, метаболічні реакції. Зокрема, NO може порушувати функціонування дихального ланцюга мітохондрій, обернено інактивуючи цитохром с-оксидазу, таким чином стимулюючи продукцію супероксидного аніона в дихальному ланцюзі. У результаті супероксидний аніон через утворення пероксинітриту необоротно гальмує комплекси I та III мітохондріального електронотранспортного ланцюга. Крім того, інактивуються критичні метаболічні ферменти, наприклад аконітаза. NO формує Fe-нітрозил-комплекси із залізосірчаними центрами аконітази. І хоч таке інгібування зазначеного ферменту циклу Кребса не обов'язково індукує зниження синтезу АТФ (це залежить від типу клітин), воно гальмує метаболізм глюкози та амінокислот, унаслідок чого поступово втрачається енергія. Ще один напрямок NO-індукованого некрозу включає ініцію-

вання пероксинітридом пероксидного окиснення ліпідів, хімічного розщеплення ДНК, нітрування вільного та сполученого із білком тирозину, яке змінює процеси фосфорилування білків та їхню третинну структуру.

Отже, ***NO-перемикач між подіями апоптозу та некрозу працює за двома основними напрямками:***

- викликаючи NO-опосередковану втрату АТФ;
- через безпосереднє запобігання активації каспаз.

При цьому на ймовірність перемикання впливають редокс-потенціал клітини, концентрація і тривалість впливу оксиду азоту, виникнення його комбінації з O_2 , супероксидом, іншими молекулами [Остапченко Л. І. та ін].

У клініці, зокрема в кардіології, і в наукових дослідженнях (для вивчення впливу оксиду азоту) широко застосовуються донори NO. Ними є сполуки, які при потраплянні в організм унаслідок свого метаболізму (за участю міо- і гемоглобіну) тривало вивільнюють NO, наприклад нітрогліцерин і нітропрусид натрію, останній застосовують для контролю тиску крові. Теоретично можливим є й інфузування нітритів. Вдихання чистого NO має виражений ефект лише на клітини легень; високі дози NO при вдиханні можуть мати системні ефекти, але це, імовірніше, дія його метаболітів, зокрема нітритів. Нітрати овочів за допомогою бактерій ротової порожнини відновлюються до нітритів, джерел NO. Нітроти у шлунку при низькому рН легко відновлюються до NO, що створює значний антимікробний ефект. Лактобацили також здатні до продукції NO і нітритів із нітратів.

Розділ 6

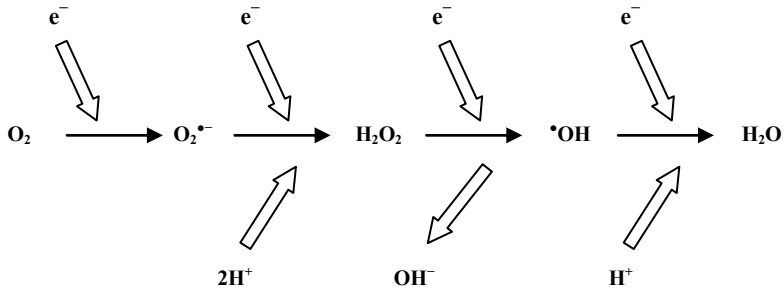
УЧАСТЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У ПРОЦЕСАХ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ ТРАНСДУКЦІЇ СИГНАЛУ

6.1. Особливості генерації ROS у клітинах

ROS (*reactive oxygen species*, активні форми кисню, АФК) – це збірний термін, що включає не лише радикали, але й нерадикальні молекули з високою реакційною здатністю. До найважливіших вільних радикалів належать гідроксил (HO^\bullet), супероксид-аніон ($\text{O}_2^{\bullet-}$), азотовмісні радикали NO_2^\bullet (діоксид азоту) і NO^\bullet (монооксид азоту) (які через наявність атома азоту відносять і до групи його активних форм (*reactive nitrogen species*, RNS)), пероксид (ROO^\bullet). Інші сполуки – пероксинітрит (ONOO^-), гіпохлорна кислота (HOCl), пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), озон (O_3), нітритна кислота (HNO_2), триоксид динітрогену (N_2O_3) не є вільними радикалами, але легко спричиняють вільнорадикальні реакції в живому організмі.

Дисбаланс між генерацією ROS та активністю антиоксидантної системи називається *окисним стресом*.

Первинним окисником у реакціях метаболізму є O_2 . Формування всіх основних видів ROS із O_2 проходить за схемою:



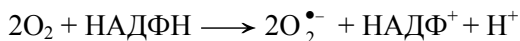
Отже, першим радикалом, що утворюється в організмі, є **супероксидний аніон** (*супероксид-аніон, супероксид*) $O_2^{\bullet -}$.

Генерація супероксидного аніона здійснюється ферментативними і неферментативними шляхами за участю спеціалізованої та неспеціалізованих систем (рис. 6.1).



Рис. 6.1. Шляхи генерування активних форм кисню та локалізація їх у клітині

Єдиною в організмі спеціалізованою ферментативною системою є **НАДФН-оксидаза**, основною функцією якої є продукція ROS, а саме $O_2^{\bullet-}$:



Усі інші системи – ферментативні й неферментативні – неспеціалізовані, ROS є їхнім побічним продуктом.

Внутрішньоклітинні ферментативні шляхи генерування активних форм кисню включають:

- ферменти обміну арахідонової кислоти – 5'-ліпоксигеназу й циклооксигеназу (за участю циклооксигенази утворюються простагландини і тромбоксани, за участю 5'-ліпоксигенази – лейкотриєни);

- ксантинооксидазу (Мо- і $[Fe_2S_2]$ -вмісний флавопротеїн, що каталізує реакцію перетворення гіпоксантину на ксантин, а ксантину – на сечову кислоту);

- альдегіддегідрогеназу;

- флавопротеїндегідрогеназу;

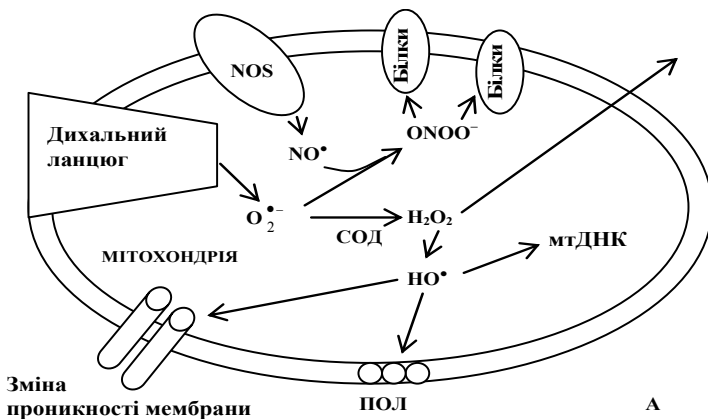
- NO-синтазу;

- мієлопероксидазу;

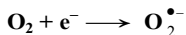
- електронотранспортні ланцюги мембран (мітохондріальний дихальний ланцюг, цитохром P450- та цитохром b5-вмісні ланцюги ЕПР, ядерні електронотранспортні ланцюги, механізми і функції яких ще на з'ясовано).

Прикладами **неферментативних джерел ROS** є процеси аутоокиснення глюкози, глікозилювання (взаємодії глюкози з протеїнами, ліпідами та нуклеїновими кислотами) і поліоловий, або сорбітолальдозоредуктазний, шлях, за яким глюкоза із залученням двох ферментів – альдозоредуктази й сорбітолдегідрогенази – через стадію утворення сорбітолу перетворюється на фруктозу, і який причетний до розвитку таких ускладнень цукрового діабету, як мікроангіопатії та супутні їм ушкодження сітківки, нирок і нервової тканини.

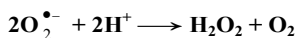
Більшість $O_2^{\bullet-}$ швидко перетворюється на H_2O_2 (спонтанно чи за участю супероксиддисмутази (СОД)) або сполучається з іншими реактивними молекулами, наприклад з NO, з утворенням пероксинітриду (рис. 6.2, А, Б).



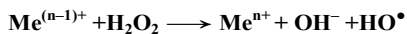
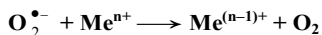
Відновлення молекулярного кисню до супероксидного радикала:



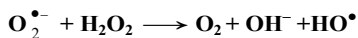
Дисмутація супероксидного радикала:



Реакція Фентона (у присутності перехідних металів):



Реакція Хабера – Вейса:



Me – перехідний метал, напр., $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$

$\text{O}_2^{\bullet -}$ – супероксидний радикал (=супероксид-аніон)

HO^\bullet – гідроксильний радикал

OH^- – гідроксильний аніон

H_2O_2 – пероксид водню

Б

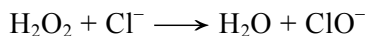
Рис. 6.2. Схеми генерування найважливіших ROS

Таблиця 6.1. Найважливіші характеристики основних активних форм кисню

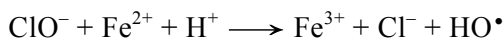
Сполука	Хімічний символ	Період напіврозпаду при 37 °С, с	Властивості
Молекулярний кисень	O ₂	> 100	Слабкий окисник
Синглетний кисень	¹ O ₂	10 ⁻⁶	Сильний окисник
Супероксидний аніон	O ₂ ^{•-}	10 ⁻⁶	Швидко відновлюється; слабкий окисник
Гідроксильний радикал	HO•	10 ⁻⁹	Дуже активний у донорно-акцепторних реакціях, реакціях перенесення електронів; коротка відстань дифузії; є ініціатором ПОЛ у мембрані, також окиснює білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи
Гідропероксильний радикал	HOО•	10 ⁻⁸	Сильніший окисник і більш гідрофобна сполука, ніж O ₂ ^{•-} ; може ініціювати ПОЛ у мембрані
Пероксильний радикал	ROO•	10 ⁻²	Нижча окисативна здатність у порівнянні з HO•, але вища швидкість дифузії
Алкоксильний радикал	RO•	10 ⁻⁶	Залучений у реакції ПОЛ
Пероксид водню	H ₂ O ₂	10–100	Окисдант із низькою швидкістю взаємодії з органічними субстратами; має вищу здатність до проникнення крізь мембрану

Сам по собі супероксидний аніон не володіє високою реакційною здатністю (табл. 6.1). Шкідливість **супероксидного аніона** в першу чергу зумовлена його перетворенням на високореактивний **гідроксильний радикал HO•** у *реакції Фентона* (у присутності катіонів перехідних металів (Fe³⁺, Cu²⁺)) (рис. 6.2, Б) і в *реакції Хабера – Вейса* (взаємодія з пероксидом водню).

HO• також формується у фагоцитах із гіпохлорит-аніона (ClO⁻), який, у свою чергу, утворюється в цих клітинах із H₂O₂ за участю лізосомального ферменту мієлопероксидази й залучається до знищення бактерій, руйнуючи компоненти їхньої клітинної стінки:



При взаємодії з іонами Fe(II) ClO⁻ спричиняє формування HO•, причому навіть із більшим виходом, ніж у реакції Фентона:



HO• із періодом напіврозпаду порядку 10⁻⁹ с є дуже реактивним і руйнує практично будь-яку молекулу, що зустрічається у нього на шляху (*радикал-руйнівник, радикал-убивця*). У **молекулах білків** він впливає на SH-групи, гістидинові та інші амінокислотні залишки, спричиняючи денатурацію білків; ініційоване гідроксильним радикалом утворення між- і внутрішньомолекулярних зшивок може викликати агрегацію білків і (або) зміну їхньої третинної структури. Усе це призводить до інактивації ферментів, порушення регуляторної, синтетичної, транспортної, структурної та інших функцій білків. У **молекулах нуклеїнових кислот** HO• руйнує водневі місточки між нуклеотидами і таким чином розриває ланцюги ДНК і РНК, що сприяє виникненню мутацій і загибелі клітин або їхньому злякисному переродженню; спричиняє окиснення і модифікацію азотистих основ. Мутації ДНК статевих клі-

тин, викликані впливом ROS, можуть стати причиною спадкових захворювань. Компенсаторним явищем є активація активними формами кисню шляхів апоптозу – унаслідок цього ціною загибелі низки клітин запобігається загибель усього організму. У *молекулах ліпідів* HO^\bullet здійснює запуск реакцій ПОЛ з накопиченням ліпідних радикалів (L^\bullet), пероксилів (LOO^\bullet), гідропероксидів (LOOH), алкоксилів (LO^\bullet), що зумовлюють ушкодження мембран, порушення їхніх функцій та загибель клітин (підрозд. 7.1).

На відміну від супероксидного аніона, який може бути знешкоджений дією супероксиддисмутази, HO^\bullet не елімінується жодною ферментативною системою, і його уловлювання, необхідне для захисту клітинних структур, здійснюється ендогенними неферментативними антиоксидантами, зокрема мелатоніном, глутатіоном, вітаміном E.

6.1.1. НАДФН-оксидаза: структура і принципи функціонування

Родина НАДФН-оксидаз (*NADPH-oxidases*, *Noxs*) людини нараховує кілька ізоформ цього ферменту (рис. 6.3) [Ray R. et al.].

Гени, що кодують субодиниці *Noxs*, виявлені тільки в еукаріотів (зокрема, в організмах тварин, рослин, міксоміцетів, грибів) і є еволюційно давніми, що вказує на їхню фундаментальну роль у підтриманні нормального функціонування клітин.

Активаторами цих ферментів залежно від типу клітин можуть виступати численні хімічні, фізичні й біологічні фактори: іони важких металів, арсеніт, етиловий і бутиловий спирти, ендогенні цитотоксичні молекули (окиснені ліпопротеїни, лізофосфатидилхолін), активні форми кисню (H_2O_2), іонізуюче та ультрафіолетове випромінювання, тепловий шок, дія низьких температур, зміни осмотичного тиску, іонної сили й рН,

гіпоксія та гіпероксія, прозапальні чинники (ліпополісахарид, ростові фактори, інтерферон, інтерлейкін-1, фактор некрозу пухлин), ангіотензин II, ейкозаноїди (простагландини, тромбосани, лейкотриєни) тощо.

Каталітичні субодиниці перших п'яти ізоформ Noxs, що позначаються NOX1, NOX2 (gp91), NOX3, NOX4, NOX5, є подібними за структурою, мають 6 трансмембранних доменів на *N*-кінці, 4 консервативні залишки гістидину, локалізовані в 3-й і 5-й трансмембранних спіралях, необхідні для скоординовування розташування двох гемових структур, флавопротеїнів зв'язувальний і НАДФН-зв'язувальний домени на *C*-кінцевій цитозольній ділянці. NOX5, крім цього, на *N*-кінці молекули має Ca^{2+} -зв'язувальні домени, представлені структурами EF-hands (підрозд. 2.2). Каталітичні субодиниці двох останніх ізоформ – DUOX1 і DUOX2, крім EF-hands, характеризуються наявністю *N*-кінцевої закореної в мембрану ділянки з пероксидазо-подібним доменом. Субклітинна локалізація ізоформ Noxs у фагоцитуючих клітинах не обмежується ПМ.

Усі НАДФН-оксидази продукують ROS унаслідок перенесення електронів від НАДФН через ФАД і дві гемові групи до молекулярного кисню, причому за відновлення останнього відповідає другий гем.

Найбільш дослідженим і першим ідентифікованим (1999) ферментом цієї родини є фагоцитарна НАДФН-оксидаза (*Nox2*, *phagocyte oxidase*, *Phox*), присутня у фагоцитуючих клітинах – нейтрофілах, моноцитах, макрофагах, еозинофілах. Основною її функцією є неспецифічний захист клітин організма-хазяїна від мікроорганізмів: саме дією Phox пояснюється розвиток "духального вибуху" (або "окисного вибуху", "*respiratory burst*") – швидкого вивільнення ROS ($\text{O}_2^{\bullet-}$ та H_2O_2) із імунних клітин після контакту з патогенами з одночасним поглинанням O_2 . Ці ROS беруть участь в інактивації патогенів, а також залучаються у внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що опосередковують прозапальні та імунопротективні відповіді.

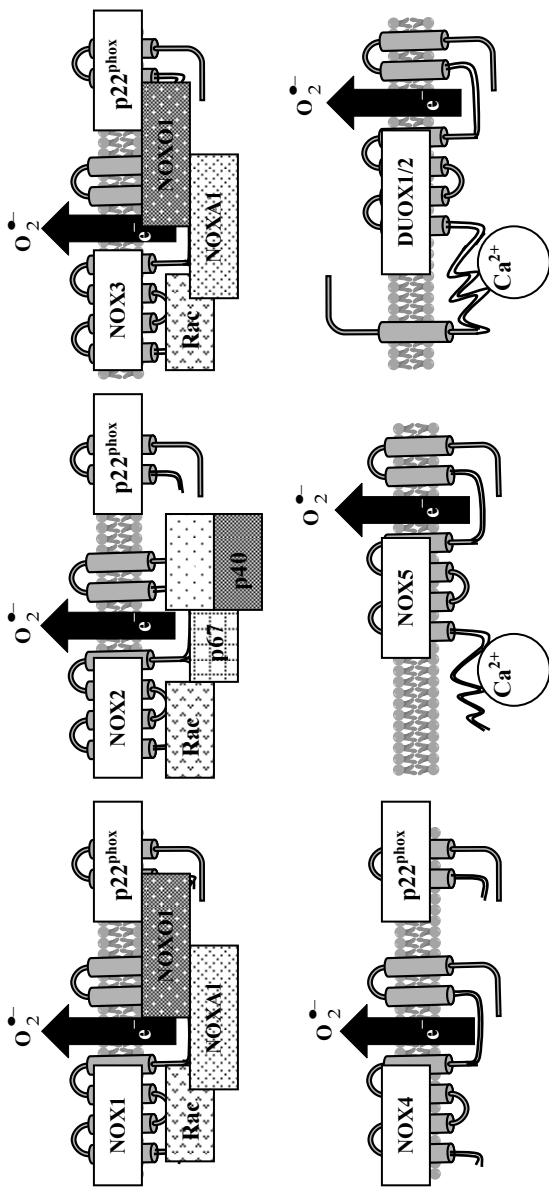


Рис. 6.3. Субодиничний склад різних ізоформ НАДФН-оксидаз

Однак Phox експресується не лише фагоцити, але й ендотеліальні клітини судин, фіброblastи, кардіоміоцити, клітини скелетних м'язів, гепатоцити, гематопоетичні стовбурові клітини. При цьому Phox, локалізована у фагоцитах, відповідає за утворення найбільших кількостей супероксиду та, опосередковано, інших ROS, що використовуються клітиною для захисту від патогенів; цей же фермент, що міститься у нефагоцитуючих клітинах, а також його аналоги з інших тканин (Nox1 – гладенькі м'язи судин кишечника, простата; Nox3 – внутрішнє вухо; Nox4 – нирки; Nox5 – селезінка) генерують невеликі кількості $O_2^{\bullet -}$, які залучаються у внутрішньоклітинну сигналізацію та регуляцію клітинних функцій. Надмірна стимуляція Noxs цитокінами та іншими агентами причетна до розвитку численних захворювань, у тому числі серцево-судинних і нейродегенеративних розладів.

Phox є гетеромерним комплексом, що має мембранний і цитозольний компоненти (рис. 6.4).

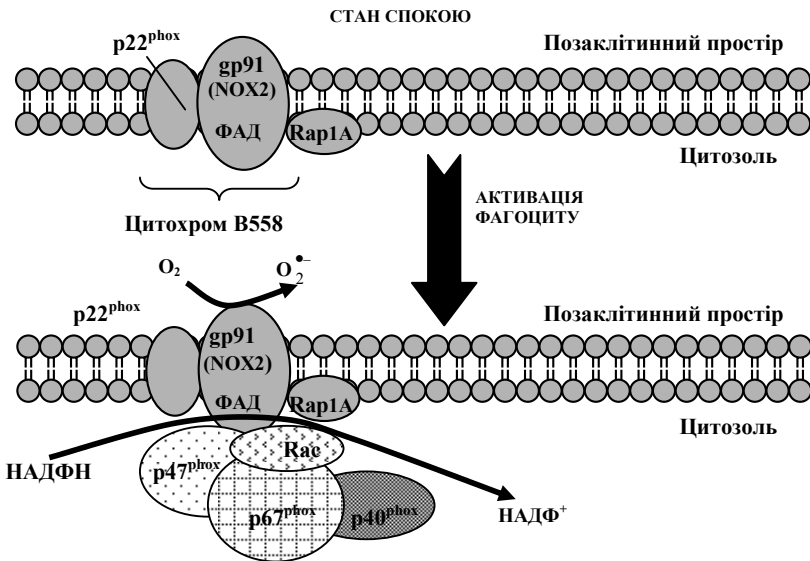


Рис. 6.4. Структура фагоцитарної НАДФН-оксидази

Мембранний компонент – *флавоцитохром B558* – складається із конститутивно асоційованих субодиниць NOX2 (gp91^{phox}) і p22^{phox}, представлених інтегральними поліпептидами; перша з них є каталітичною і містить НАДФН- і ФАД-зв'язувальні ділянки і два геми, локалізовані біля зовнішнього і внутрішнього боків ПМ, що разом створюють окисно-відновний шлях, здатний передавати електрони від цитоплазматичного НАДФН через ПМ до молекулярного кисню (gp91^{phox} при цьому функціонує як протонна помпа). Таким чином, генерування $O_2^{\bullet-}$ є наслідком одноелектронного відновлення O_2 з використанням відновленого НАДФН як донора електронів. Компоненти p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} є цитозольними. Активація фагоцитів спричиняє фосфорилування цитоплазматичних компонентів (за участю Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної ПкС), після чого вони вбудовуються у мембрану в ділянці gp91^{phox}.

Виявлено ще два білки, причетні до утворення повного комплексу фагоцитарної НАДФН-оксидази, які виконують регуляторну роль – Rap1A (належить до GTP-зв'язувальних Ras-подібних білків) і Rac1 (інша назва – p21, член суперродини Pho GTP-зв'язувальних білків, що взаємодіє з gp91).

Активаторами Phox є агоністи рецепторів, сполучених із G-білком (наприклад, рецепторів до ангіотензину II), фактори росту (тромбін, VEGF), цитокіни (TNF- α), метаболічні фактори (зростання вмісту глюкози, вплив інсуліну, нестерифікованих жирних кислот), окиснені ліпіди, ішемія/реперфузія, голодування.

Механізми регуляції Phox передбачають гострий і хронічний вплив на її активність. **Гостра активація** ферменту здійснюється через зростання формування повного комплексу оксидази внаслідок посттрансляційної модифікації регуляторних цитозольних субодиниць p47^{phox} і Rac (рис. 6.5).

Одним із шляхів такої модифікації є ПкС-залежне фосфорилування регуляторної цитозольної субодиниці p47^{phox} із подальшою її транслокацією до мембранного гетеродимеру (точніше – до p22^{phox}) із формуванням більш повного комплексу, тоді як нефосфорильована субодиниця має інгібуючий ефект на активність оксидази. p22^{phox} містить послідовності, багаті на

пролін (*proline-rich sequences*, *PRS*, залучені у зв'язування SH3 доменів у молекулі $p47^{\text{phox}}$, які у стані спокою сполучаються з аутоінгібіторною ділянкою (AIR) на C-кінці молекули, що унеможливило сполучення із $p22^{\text{phox}}$. У присутності стимулу, наприклад форболових ефірів, залишки серину в молекулі $p47^{\text{phox}}$ фосфорилуються ПкС, після чого $p47^{\text{phox}}$ стає доступною для зв'язування із $p22^{\text{phox}}$.

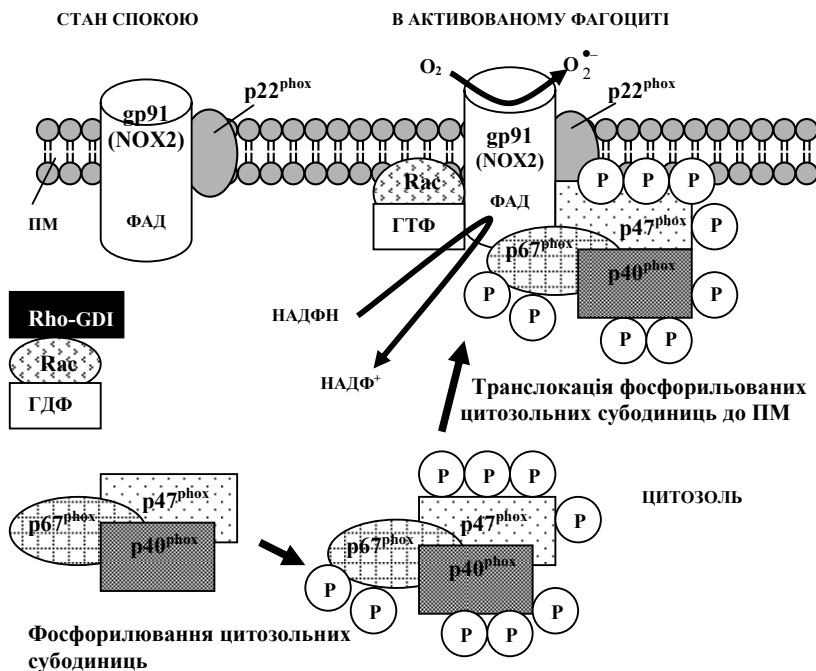


Рис. 6.5. Схема гострої регуляції активності фагоцитарної НАДФН-оксидази

Цитозольний компонент $p67^{\text{phox}}$ сполучається своїм C-термінальним SH3 доменом із $p47^{\text{phox}}$ через C-кінцевий *PRS* у складі останньої. Він також містить чотири багаті на тетратрікопептид (*tetratricopeptide-rich*) повтори (див. дод., п. 14), які відповідають за зв'язування білка Rac1. Крім цього, у C-термінальній ді-

лянци p67^{phox} наявний РВ1-домен (*the Phox and Bem1p domain*), функцією якого є створювання гетеродимерів між білками, які мають РВ1-домени, зокрема сполучення p67^{phox} із Р40^{phox}.

Р67^{phox} підлягає ПкС-залежному фосфорилуванню за залишками серину-315 і треоніну-154, але це не є необхідним для активації оксидазного комплексу.

Крім власне ПкС-залежного фосфорилування, в умовах клітинного стресу до активації Phox може привести і зростання за дії цитотоксичних хімікатів, осмотичного шоку, фізичних впливів, гіпоксії, прозапальних чинників внутрішньоклітинного вмісту іонів Ca²⁺, причому це може як передувати активації ПкС, так і бути її наслідком.

Інший регуляторний білок – Rac – у клітинах у стані спокою включений у розчинний цитозольний комплекс із білком GDI (*guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor, інгібітор дисоціації ГДФ*). Після активації фагоцитів Rac активується шляхом ізопренілювання і транслокується до ПМ, де в ГТФ-зв'язаній формі залучається в активацію комплексу оксидази, модулюючи функції ряду компонентів системи (p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox}). Статини, що пригнічують біосинтез холестеролу й, відповідно, ізопренілювання Rac, інгібують активність фагоцитарної НАДФН-оксидази (рис. 5.12, підпідрозд. 5.2.3.1).

Хронічне зростання активності Phox передбачає зростання експресії компонентів субодиноць цього ферменту. Зокрема, в промоторі генів, що кодують gp91^{phox}, а також p22^{phox}, p47^{phox} і p67^{phox}, локалізовані сайти зв'язування ряду транскрипційних факторів, що активуються прозапальними цитокінами, наприклад інтерферонами, що передають сигнали за Jak/STAT системою (підрозд. 11.3). Сигнальні шляхи, що супроводжуються активацією транскрипційного фактора AP-1, підвищують експресію субодиноць p22^{phox} і p67^{phox}.

Інші ферменти-гомологи мають іншу молекулярну будову і тільки часткову гомологію, різняться за механізмами активації й регуляції, можуть бути конститутивними чи індукцибельними. Проте усі вони, подібно до Phox, виконують єдину функцію, а саме регулюють утворення активних форм кисню.

Зокрема, активні форми кисню, що генеруються *Nox1* – першим ідентифікованим гомологом Phox, виділеним із епітеліальних клітин кишечника – залучаються у формування імунного захисту й регуляцію клітинної проліферації. Низькі рівні експресії даного ферменту характерні також для гладком'язових та ендотеліальних клітин судинної стінки, клітин уретри, плаценти, простати, остеобластів, періцитів сітківки, макрофагів. Індукторами експресії *Nox1* є численні вазоактивні фактори, зокрема ангіотензин II і PDGF, а також інтерферон, що за Jak/STAT-каскадом активує транскрипцію *Nox1*. Порушення регуляції цієї ізоформи НАДФН-оксидази відповідає за розвиток запалення кишечника і канцерогенез.

Крім каталітичної субодиниці (NOX1) активний комплекс цієї ізоформи містить мембранну (p22^{phox}) і дві цитозольні субодиниці – NOXA1 (*Nox-activating protein 1, гомолог p67^{phox}*) і NOXO1 (*Nox-organizing protein 1, гомолог p47^{phox}*), а також Rac1.

Nox3 експресується у клітинах внутрішнього вуха (де бере участь у функціонуванні вестибулярного апарату), а також у селезінці, нирках, печінці, легенях і черепі новонароджених, відіграючи важливу роль у розвитку цих тканин (у дорослих тканинах відповідний ген є "вимкненим"). Активність каталітичної субодиниці цього ферменту (NOX3) залежить від p22^{phox}, NOXO1, NOXA1 і Rac1.

Ідентифікований уперше у клітинах нирок, *Nox4* також наявний у гладком'язових і ендотеліальних клітинах судин, фіброблестах, кератиноцитах, остеоблестах, нейронах і гепатоцитах, де залучається в реалізацію стресової відповіді, у TGFβ-індуковане диференціювання клітин, сигнальні шляхи інсуліну тощо. Для повної активності ця ізоформа потребує лише p22^{phox}; однак, на відміну від NOX1–NOX3, PRR-домен у складі p22^{phox} у процес активації не залучається. При цьому активність *Nox4* підвищує білок, який взаємодіє із полімеразою-δ (*polymerase delta-interacting protein, Poldip2*), що контактує з p22^{phox}.

На N-кінці молекули Ca²⁺-залежного гомолога Phox – *Nox5*, що ідентифікована в лімфоїдній тканині, селезінці, в ендотеліальних клітинах і контролює, зокрема, такі процеси, як диферен-

ціювання й міграцію ендотеліальних клітин, а також ангиогенез, присутні чотири Ca^{2+} -зв'язувальні домени – EF-hands. На відміну від інших НАДФН-оксидаз, цей фермент є мономером (має лише каталітичну субодиницю NOX5) і для активації не потребує жодних інших регуляторних білків – його основним регулятором є внутрішньоклітинні рівні Ca^{2+} ; крім того, він може активуватися при ПкС-залежному фосфорилуванні залишків серину в межах каталітичної субодиниці. Зв'язування кальцію веде до конформаційних змін N-кінця молекули Nox5, що дозволяє пряму взаємодію регуляторного N- та каталітичного C-кінця, що і спричиняє Ca^{2+} -індуковану активацію Nox5. Рослинні клітини експресують Nox5-подібну ізоформу, активація якої в умовах клітинного стресу теж супроводжується входом Ca^{2+} у клітину.

Nox5 причетний до розвитку таких патологій, як волосисто-клітинна лейкемія (*hairy cell leukemia* – рідкісна форма В-клітинних хронічних лімфопроліферативних хвороб, що характеризується наявністю типових волосистих лімфоїдних клітин у кістковому мозку та периферійній крові), меланома, рак простати.

Два останні представники родини НАДФН-оксидаз – *подвійні оксидази DUOX1 і DUOX2* – були вперше описані як гомологи Nox2 у щитоподібній залозі й представлені тиреоїдними НАДФН-оксидазами, залученими в біосинтез тиреоїдних гормонів. H_2O_2 , генерований цими ферментами, необхідний для тиреопероксидазоопосередкованого йодування залишків тирозину білка тиреоглобуліну в щитоподібній залозі.

Тепер показано, що ці ферменти також експресуються в епітеліальних клітинах легень, DUOX1 – у клітинах плаценти, простати, підшлункової залози й серця, а DUOX2 – в епітеліальних клітинах екскреторних проток потових і ректальних залоз, де залучаються у реалізацію захисних функцій клітин і запальні процеси. Зокрема, у шлунково-кишковому тракті DUOX2 у комбінації з лактопероксидазою відіграє певну роль у знищенні бактерій.

Каталітичні субодиниці DUOXs, подібно до Nox5, не потребують для функціонування наявності інших компонентів НАДФН-оксидазного комплексу і є Ca^{2+} -залежними. Молекули DUOXs харак-

теризуються наявністю NOX-подібного НАДФН-оксидазного домену на С-кінці, двох Ca^{2+} -зв'язувальних доменів (EF-hands), а також N-кінцевої закореної в мембрану ділянки з позаклітинним пероксидазоподібним доменом, гомологічним тиреопероксидазі (цей домен неактивний, тому ферменти здійснюють лише генерування пероксиду). Саме через одночасну присутність у цих молекулах оксидазного й пероксидаза-подібного доменів ці ферменти отримали назву "подвійних оксидаз". Для функціонування вони потребують двох факторів дозрівання – DUOXAs (DUOXA1 і DUOXA2 для DUOX1 і DUOX2 відповідно). DUOXAs – це виявлені в ЕПР трансмембранні глікопротеїни, необхідні для транспорту новосинтезованих молекул DUOXs із ЕПР до апарату Гольджі, наступного їхнього дозрівання та спрямування до ПМ.

Регуляція активності DUOXs здійснюється як на рівні транскрипції (зокрема, в епітеліальних клітинах легень індукторами експресії гена DUOX 1 є цитокіни Th2-клітин (див. дод., п. 15) – IL-4 і IL-13, а гена DUOX 2 – цитокіни Th1-клітин (див. дод., п. 16), наприклад ІФ- γ), так і на посттрансляційному рівні. (DUOX 1 – цАМФ- і ПкА-залежне фосфорилування, DUOX2 – фосфоліпаза С- і ПкС-залежне фосфорилування). Мутації гена DUOX 2 у щитоподібній залозі відповідають за розвиток конгенітального гіпотироїдизму.

Основним продуктом більшості ізоформ НАДФН-оксидаз є $\text{O}_2^{\bullet-}$; при цьому Nox4 і DUOXs можуть безпосередньо продукувати H_2O_2 . У структурі Nox4, що виробляє невеликі кількості пероксиду, для цього наявна зовнішня Е-петля, і зміни в цій ділянці перемикають Nox4 на продукцію $\text{O}_2^{\bullet-}$. Молекули DUOX1 та DUOX2, які головним чином продукують H_2O_2 , не виявляють жодної гомології з Е-петлею Nox4, проте мають довгий N-кінцевий позаклітинний домен, що може брати участь у продукції H_2O_2 . Наявність факторів дозрівання DUOXAs також асоціюється з типом генерованих активних форм кисню і виступає перемикачем ферменту щодо генерування H_2O_2 або $\text{O}_2^{\bullet-}$: комплекс

{DUOX1,DUOXA1} (або {DUOX2,DUOXA2}) мігрує до ПМ і продукує великі кількості саме H_2O_2 , але не супероксиду [Paletta-Silva R. et al.].

6.1.2. Ферменти обміну арахідонової кислоти 5-ліпоксигеназа та циклооксигеназа як джерела ROS

Арахідонова кислота (5,8,11,14-ейкозатетраєнова кислота, 5,8,11,14-icosatetraenoic acid) утворюється із мембранних фосфоліпідів за участю *фосфоліпази A2*, яка гідролізує ефірний зв'язок між жирною кислотою (у тому числі й арахідоною) і гідроксилем при С2 залишку гліцеролу зі вивільненням жирної кислоти (у тому числі й арахідонової) і лізофосфоліпиду (рис. 6.6).



Рис. 6.6. Схема вивільнення арахідонової кислоти

Далі арахідонова кислота підлягає метаболічним перетворенням або за участю *циклооксигенази* – при цьому утворюються простагландини і тромбосани, або за участю *5-ліпоксигенази* (утворюються лейкотриєни) (рис. 6.7).

Ліпоксигенази – родина залізовмісних ферментів, які каталізують оксигенацію численних поліненасичених жирних кислот за різними сайтами за схемою:



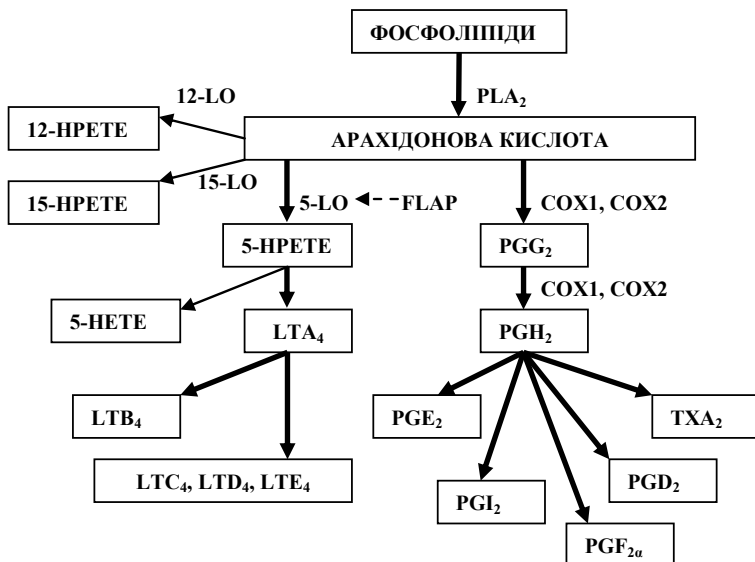


Рис. 6.7. Схема метаболічних шляхів арахідонової кислоти:
 HPETE – гідропероксείйкозатетраєнова кислота (*hydroperoxyeicosatetraenoic acid*), HETE – гідроксείйкозатетраєнова кислота (*hydroxyeicosatetraenoic acid*), AA – арахідонова кислота (*arachidonic acid*), PLA₂ – фосфоліпаза A₂ (*phospholipase A₂*), 5-LO – 5-ліпоксигеназа (*5-lipoxygenase*), COX – циклооксигеназа (*cyclooxygenase*), LT – лейкотриєн (*leukotriene*), PG – простагландин (*prostaglandin*), TX – тромбоксан (*thromboxane*), FLAP – білок, що активує 5-ліпоксигеназу (*5-lipoxygenase activating protein*)

Арахідонат-5-ліпоксигеназа (5-ліпоксигеназа, 5-LO, арахідонат:оксиген-5-оксидоредуктаза, КФ 1.13.11.34) виявлена в лейкоцитах і каталізує перетворення арахідонату на 5-гідропероксείйкозатетраєнову кислоту (5-HPETE, *5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid*). 5-HPETE надалі метаболізується до лейкотриєну A₄, який, у свою чергу, дає початок різним іншим лейкотриєнам. Унаслідок важливої ролі 5-LO в обміні ейкозаноїдів цей фермент розглядається як потенційна терапевтична мішень при багатьох захворюваннях, що супроводжуються запальними процесами.

Реакція починається із видалення атома водню із арахідо-нату з перенесенням одного електрона на негемове залізо ферменту – при цьому Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+} . Утворений радикал жирної кислоти, реагуючи з O_2 , надалі формує гідропероксижирну кислоту і, як побічні продукти, супероксид і синглетний кисень.

Фермент має цитоплазматичну та ядерну розчинні ізоформи. Для функціонування 5-LO, зокрема для забезпечення взаємодії ферменту із субстратом, необхідний білок FLAP – 5-LO-активуєчий білок (*5-Lipoxygenase-activating protein*). Після стимуляції клітини агоністом 5-LO підлягає швидкій Ca^{2+} -залежній транслокації із цитозолу або ядерного простору до ядерної мембрани, де вона взаємодіє із FLAP. Саме ядерна оболонка є найімовірнішим місцем внутрішньоклітинного синтезу лейкотриєнів. Тригером для транслокації 5-LO є її фосфорилування, що здійснюється за участю MAPK.

Як тільки 5-LO перетворює арахідонову кислоту на лейкотриєни, вона інактивується за суїцидальним механізмом через необоротне зв'язування високореактивного продукту LTA₄.

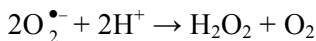
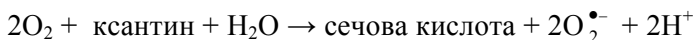
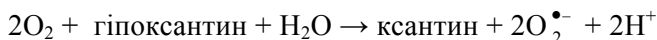
Циклооксигеназа (*cyclooxygenase*, COX, К.Ф. 1.14.99.1) перетворює арахідонову кислоту на простагландин H₂, що є попередником інших простагландинів. Інгібітори COX є лікарськими препаратами, що належать до нестероїдних протизапальних агентів (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs). Фермент має два активні центри: безпосередньо циклооксигеназний сайт, у якому арахідонова кислота перетворюється на *простагландин G₂*, і гем із пероксидазною активністю, що відповідає за відновлення простагландину G₂ до *простагландину H₂* (рис. 6.7). Весь цей комплекс має також іншу назву – *простагландин-H₂-синтаза*.

Як діоксигеназа, COX здійснює "вбудовування" молекули O_2 у субстрат і міститься у мембранах ЕПР. Виявлено три ізоформи цього ферменту: COX1, COX2 і COX3 (інші назви останньої – *COX1b* або *COX1v* (*COX1 variant*)); це сплайсинг-варіант COX1, що зберігає один інтрон і має мутацію зсуву

рамки зчитування). COX1 є конститутивним ферментом, виявленим у більшості клітин ссавців (тромбоцити, ендотеліальні клітини, слизова шлунка, нирки), що забезпечує фізіологічні відповіді, у тому числі цитопротекцію, при цьому відмічається низький рівень утворення простагландинів. Показано, що COX1 може бути надактивною при карциномах і відіграє центральну роль у пухлиногенезі. Активність COX2 не виявляється у більшості нормальних клітин. Ця ізоформа є індукцибельною і функціонує в активованих макрофагах та інших клітинах у ділянці запалення. Стимулом для індукції експресії гена COX2 є ліпополісахариди, прозапальні цитокіни (IL-1 β , TNF- α).

6.1.3. Ксантиноксидаза як джерело активних форм кисню

Ксантиноксидаза – це Mo- і [Fe₂S₂]-вмісний флавопротеїн, що каталізує дві кінцеві стадії катаболізму пуринів – перетворення гіпоксантину на ксантин і ксантину – на сечову кислоту:



При цьому O₂ відновлюється до супероксидного аніона, який, у свою чергу, швидко – спонтанно чи ферментативно – перетворюється на H₂O₂. Цей фермент також може продукувати NO і тому має подвійну роль у клітинній сигналізації. Він є критичним джерелом активних форм кисню при запальних розладах, пов'язаних із дисфункціями судин і дегенерацією серцевого м'яза.

Фермент експресується на апікальній поверхні ендотелію численних органів, зазвичай у вигляді *ксантиндегідрогенази*,

яка не генерує $O_2^{\bullet-}$. Остання може перетворюватися на ксантиноксидазу або при окисненні, або через протеолітичне розщеплення сегмента ксантиндегідрогенази.

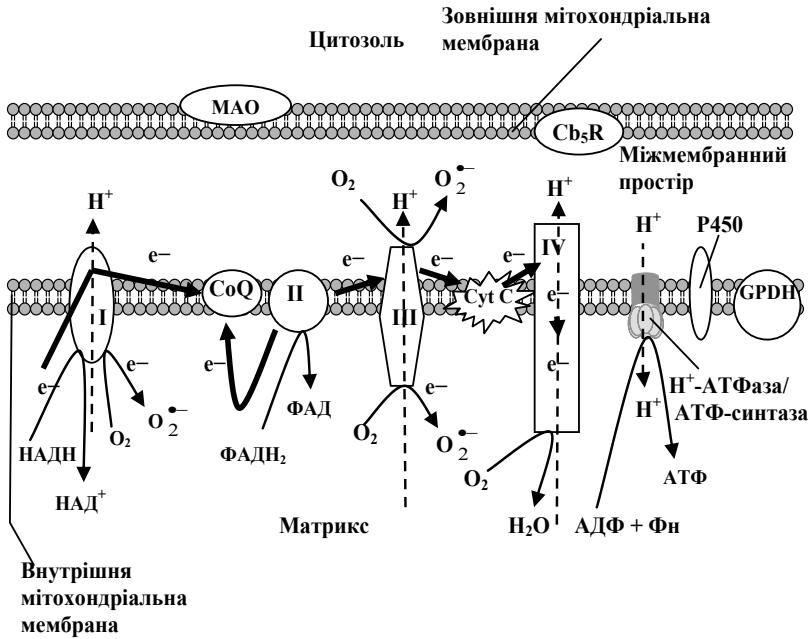
6.1.4. Генерація ROS

в електротранспортних ланцюгах клітини

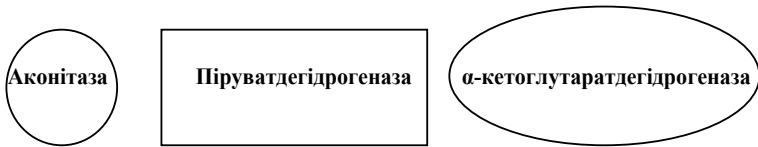
Мітохондрія є основним джерелом супероксиду у клітині: невідповідність продукції НАДН і використання АТФ за деяких фізіологічних і патологічних станів може "завантажити" мітохондріальний електротранспортний ланцюг (комплекс I–IV) і модулювати продукцію ROS (рис. 6.8). При цьому $O_2^{\bullet-}$ формується при одноелектронному відновленні молекулярного кисню в реакції, що є побічною для дихального ланцюга.

У цілому, будь-який білок, причетний до передачі електронів, або ферментативна система, можуть бути залучені до продукції ROS як "співпродукту" електротранспортних реакцій. На таку "нецільову" генерацію ROS у мітохондріях припадає близько 1–2 % від загального використання O_2 . При цьому основними місцями генерування $O_2^{\bullet-}$ є комплекс I (НАДН:КоQ-оксидоредуктаза – НАДН-дегідрогеназа, яка містить ФМН і кілька Fe-S білків, каталізує перенесення електронів від НАДН на убіхінон) і III (КоQ:цитохром c-оксидоредуктаза, що має цитохроми b, c1 і один FeS-білок, каталізує транспорт електронів із відновленого убіхінону на цитохром c); тоді як комплекс III вивільнює $O_2^{\bullet-}$ і в матрикс, і в міжмембранний простір, при залученні комплексу I він спрямовується лише в матрикс.

Другорядними джерелами ROS у мітохондріях є комплекс II – сукцинат:КоQ-оксидоредуктаза, що містить сукцинатдегідрогеназу з ФАД, 2–3 Fe-S білки і каталізує транспорт електронів від сукцинату на убіхінон (він здатний генерувати активні форми кисню при ушкодженні або гіпоксії), а також структури, розташовані в інших ділянках мітохондрій.



МАТРИКСНІ ФЕРМЕНТИ-ДЖЕРЕЛА АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ:



ЗНЕШКОДЖЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У МАТРИКСІ:

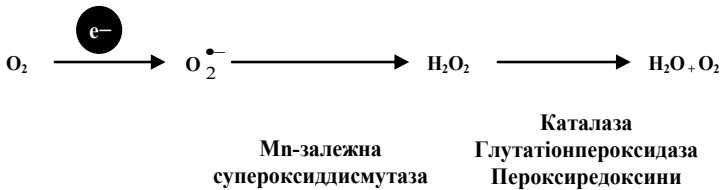


Рис. 6.8. Генерація ROS у мітохондріях

Так, ROS можуть формуватися ферментативними активностями моноаміноксидази (MAO) і цитохром *b5*-редуктази (Cb5R), локалізованих у зовнішній мітохондріальній мембрані, а також гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (*glycerol-3-phosphate Dehydrogenase, GPDH*), а в деяких типах клітин – різними ізоформами цитохрому P450, локалізованими у внутрішній мітохондріальній мембрані. Також є низка матриксних ферментів і комплексів – аконітаза, піруватдегідрогеназа, α -кетоглутаратдегідрогеназа, які можуть генерувати $O_2^{\bullet-}$. Так, флавопротеїн-моноаміноксидаза при катаболізмі моноамінів – серотоніну і катехоламінів – генерує H_2O_2 , альдегіди й амоній. Акумуляція ROS, утворених при функціонуванні MAO, є характерною, зокрема, для окисного стресу й загибелі міоцитів серцевого та скелетного м'язів.

Інгібітори MAO значно знижують ступінь ушкодження серця при ішемії-реперфузії; більш того, надмірна активність MAO разом із підвищеними рівнями норадреналіну в серцевій тканині є ознакою виникнення і прогресії ушкодження серця.

До потенційних джерел мітохондріальних вільних радикалів також належить p66Shc – проапоптозний адаптерний білок, локалізований головним чином у внутрішній мембрані цієї органели, який передає електрони від відновленого цитохрому c на O_2 . У випадку неповного відновлення O_2 формується H_2O_2 , який, у свою чергу, стає чинником, що змінює проникність мітохондріальних мембран та ініціює загибель клітин. Активація p66Shc відіграє важливу роль у кардіоваскулярній патофізіології.

Після утворення $O_2^{\bullet-}$ спонтанно або під впливом мітохондріальної Mn-SOD може перетворюватися на H_2O_2 , що вивільнюється у цитозоль і надалі нейтралізується дією каталази, глутатіонпероксидази і пероксиредоксинами. Унаслідок високої концентрації мітохондріальної SOD концентрації $O_2^{\bullet-}$ усередині цієї органели характеризуються дуже низкими рівнями. На відміну від H_2O_2 , генерований у мітохондрії $O_2^{\bullet-}$ практично не виходить у цитоплазму. Надмірні кількості ROS, генерованих у мітохондріях, залучаються в регуляцію апоптозу: зокрема, цей

пул ROS бере участь у механізмах TNF α - і IL-1-індукованого апоптозу. Крім того, мітохондрія може функціонувати як "O₂-сенсор" при опосередкуванні транскрипції генів, експресія яких індукується при гіпоксії.

Окрім домінуючих у мітохондріях процесів одноелектронного відновлення, часом у цих органелах можуть відбуватися і реакції двохелектронного відновлення, за яких молекулярний кисень відновлюється одразу до пероксиду водню.

Електронотранспортний ланцюг ЕПР також є місцем потужного утворення активних форм кисню. Гладенький ЕПР містить ферменти – члени великої родини цитохрому P450, що шляхом окиснення здійснюють детоксифікацію ендогенних і екзогенних сполук, у тому числі лікарських засобів та інших ксенобіотиків. Зокрема, при функціонуванні однієї з ізоформ цитохрому P450–CYP2E1, що використовує O₂ для метаболізму алкоголю, ROS можуть генеруватися за такою схемою (рис. 6.9).

Спочатку етанол зв'язується з ферментом (**етап 1**). Оскільки перший електрон передається на гем CYP2E1 і одночасно відбувається зв'язування кисню (**етап 2**), електрон може рухатися на кисень, у результаті чого генерується супероксид, зв'язаний із гемом (**етап 3**). Час від часу вільний супероксид вивільнюється з утворенням вихідної форми ферменту (**етап 4**). Якщо до ферменту додається другий електрон, утворюється інша форма відновленого кисню – гем-зв'язана форма пероксиду (**етап 5**). Пероксид також час від часу вивільнюється. Продукція цих ROS CYP2E1 належить до так званих *роз'єднувальних реакцій*, оскільки кисень не доходить до субстрату. Якщо H₂O₂ лишається зв'язаним, надалі фермент буде переносити один атом кисню до субстрату, інший атом перетворюватиметься на воду з одночасною продукцією нестабільного інтермедіату (наприклад, гем-діолу), що розпадається з утворенням ацетальдегіду (**етап 6**).

Генерація цих ROS CYP2E1 є контрибутом оксидативного стресу, що спостерігається після алкогольного ушкодження. Окрім продукції ацетальдегіду, ROS, що продукуються

CYP2E1, можуть також спричиняти утворення реактивного 1-гідроксиетильного радикала, що теж є контрибутом алкоголь-індукованого оксидативного стресу.

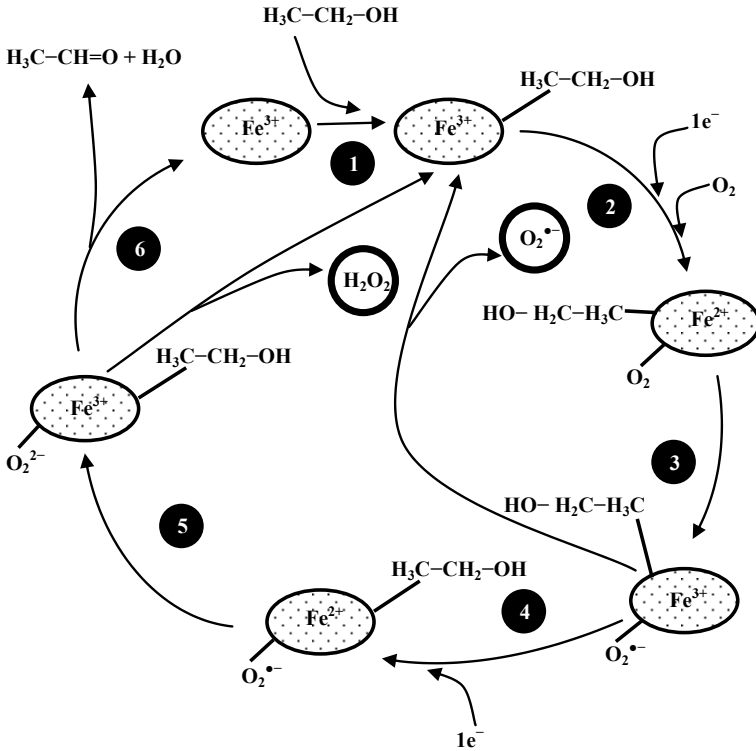


Рис. 6.9. Схема генерування активних форм кисню за участю CYP2E1

CYP2E1 – одна із 57 різних ізоформ цитохрому P450, виявлених у організмі людини, здатних акцептувати електрони і генерувати ці ROS навіть за відсутності субстратів. Більшість інших ізоформ P450 (а всього цей фермент має їх близько 300) не може приймати електрони доти, доки не відбудеться приєднання субстрату до ферменту. Після зв'язування субстрату ці ізоформи також будуть генерувати певні типи ROS [Campos J. et al.].

Ядерні мембрани також містять цитохромоксидази й електронотранспортні системи, що є схожими на структури, наявні в ЕПР, але функції яких невідомі. Вважається, що втрата електронів у цих ферментативних системах може спричиняти утворення ROS, які можуть привести до загибелі клітинної ДНК *in vivo*.

6.1.5. Генерування ROS у пероксисомах

Пероксисоми – це органели, причетні як до продукції, так і до знешкодження пероксиду водню. Так, вони містять низку H₂O₂-генеруючих ферментів, більшість з яких є ФАД-залежними оксидазами, що утворюють пероксид як побічний продукт (наприклад, оксидаза D-амінокислот, уратоксидаза, оксидаза L- α -гідроксикислот, оксидаза ацил-CoA, гліколатоксидаза), і водночас – каталазу і пероксиредоксини. Тому за нормальних умов лише невелика фракція H₂O₂, синтезованого в пероксисомах, може виходити із цих органел. Пероксисоми причетні до розвитку ряду розладів, котрі супроводжуються акумуляцією ROS – раку, нейродегенеративних і серцево-судинних патологій, і відіграють у їхньому патогенезі ключову роль.

6.2. Біохімічні механізми дії ROS як біорегуляторів

Останніми роками дослідники все більше уваги приділяють активним формам кисню як регуляторним молекулам [Bartosz G. et al.].

Будь-які внутрішньоклітинні сигнальні шляхи (як класичні регуляторні каскади (аденилатциклазний, фосфоінозитидний), так і процеси фосфорилювання залишків тирозину, впливи оксиду азоту, про які йшлося в попередніх розділах) реалізуються через нековалентні білок-білкові взаємодії або ковале-

нтні модифікації білків (фосфорилування, нітрозилування, окиснення тощо), тобто *посттрансляційна модифікація білків є ключовою подією у внутрішньоклітинній сигналізації*.

Як уже відомо із викладеного раніше, сигнальні шляхи у клітині передбачають синтез біологічно активної молекули, її вивільнення із клітини, транспорт до клітини-мішені, розпізнання специфічними рецепторами останньої, після чого генерується специфічна відповідь, яка потребує численних мембранних і внутрішньоклітинних білків. Шляхом поступових взаємодій між цими білками інформація передається на вторинний месенджер, який у більшості випадків ініціює каскад фосфорилування цитоплазматичних білків, серед яких – ферменти й транскрипційні фактори, що регулюють експресію генів.

Не викликає сумнівів той факт, що більшість регуляторних сигналів не прямо спричинені найбільш реактивними формами ROS ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet}), а, швидше, їхніми похідними, із яких найважливішою сполукою є H_2O_2 (В. Дреге, 2001; С. Ри, 2003 – "ROS і H_2O_2 – не тільки "молекули загибелі", а й "молекули життя").

ROS можна віднести до сигнальних молекул-вторинних посередників, оскільки:

1. Ідентифіковані регульовані ферментативні й неферментативні джерела ROS (НАДФН-оксидаза, 5-ліпоксигеназа, циклооксигеназа тощо), які синтезують супероксидний аніон у відповідь на позаклітинний стимул (зокрема, при зв'язуванні зі своїми рецепторами інсуліну, PDGF, EGF, IL-1, TNF- α);

2. ROS можуть перетинати ПМ і:

- безпосередньо модулювати активність каталітичного домену трансмембранних рецепторів (імітуючи дію наведених позаклітинних стимулів),

- впливати на внутрішньоклітинний вміст кальцію і на перебіг Ca^{2+} -залежних процесів у клітині,

- змінювати активність цитоплазматичних ферментів, які залучені в передачу сигналу – протеїнкіназ (PкC, MAPKs, PкRaf, rTPKs, nrPTKs), протеїнфосфатаз, АТФаз, фосфоліпаз, аденілатциклази, що, зокрема, може привести до аномальної активації транскрипційних факторів.

- прямо модулювати активність ROS-чутливих транскрипційних факторів (NF-кВ, AP-1, HIF-1, р53 тощо),

- змінювати іонну проникність біологічних мембран шляхом впливу на функції іонних каналів.

- При цьому, залежно від сили й інтенсивності дії ROS, можливі такі події:

- активація синтезу білків, залучених у адаптацію та виживання клітини;

- активація синтезу білків, залучених у клітинні ушкодження і загибель.

3. Після закінчення дії сигналу активні форми кисню видаляються шляхом деструкції сигнальної молекули за участю супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази й пероксиредоксинів [Forman H. et al.].

Сучасна концепція сигнальних шляхів ROS включає **два основні механізми дії активних форм кисню**, що передбачають:

- окисні модифікації білків,

- зміни внутрішньоклітинного редокс-статусу [Nindl G.].

6.2.1. Окисні модифікації білків у регуляторних впливах ROS

Найважливіші типи *окисних модифікацій білків* у клітині наведено на рис. 6.10, А.

До функціонування H_2O_2 як регуляторної молекули залучаються тільки такі окисні модифікації білків, які є оборотними і не призводять до втрати білкових функцій [Rhee S.]. Найважливішу роль при цьому відведено *окисним модифікаціям залишків цистеїну*, які містяться в активних центрах і регуляторних ділянках великої кількості клітинних білків, зокрема ферментів і транскрипційних факторів (рис. 6.11).

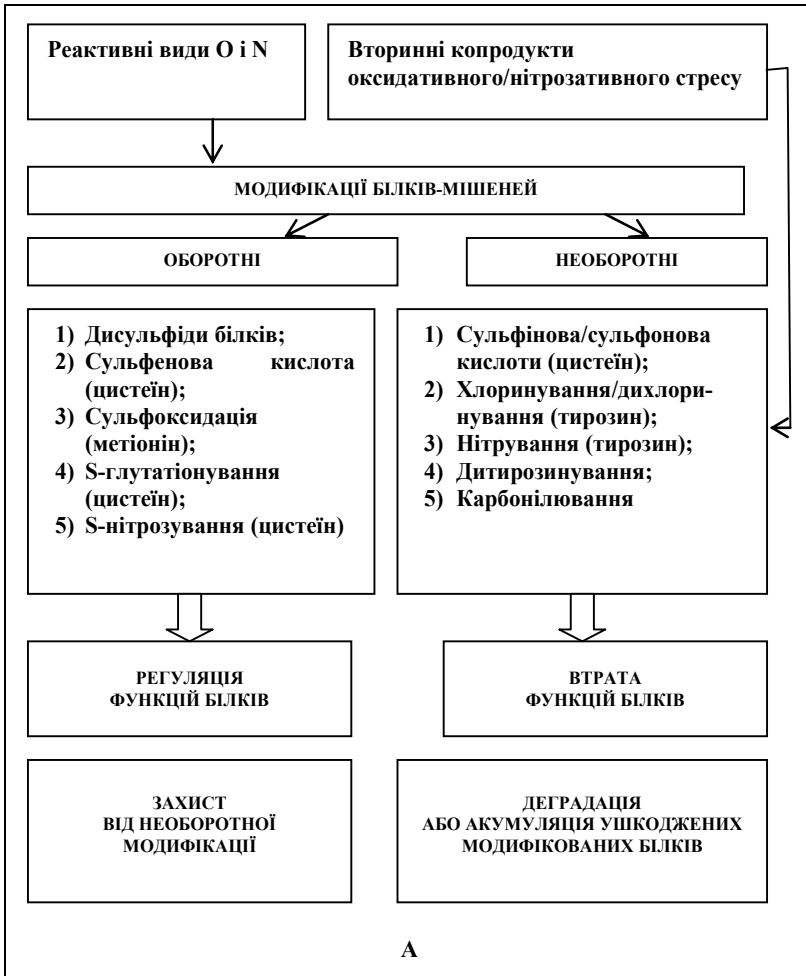


Рис. 6.10. Окисні модифікації білків.
Оборотні й необоротні модифікації реактивними формами кисню білків-мішеней (A)

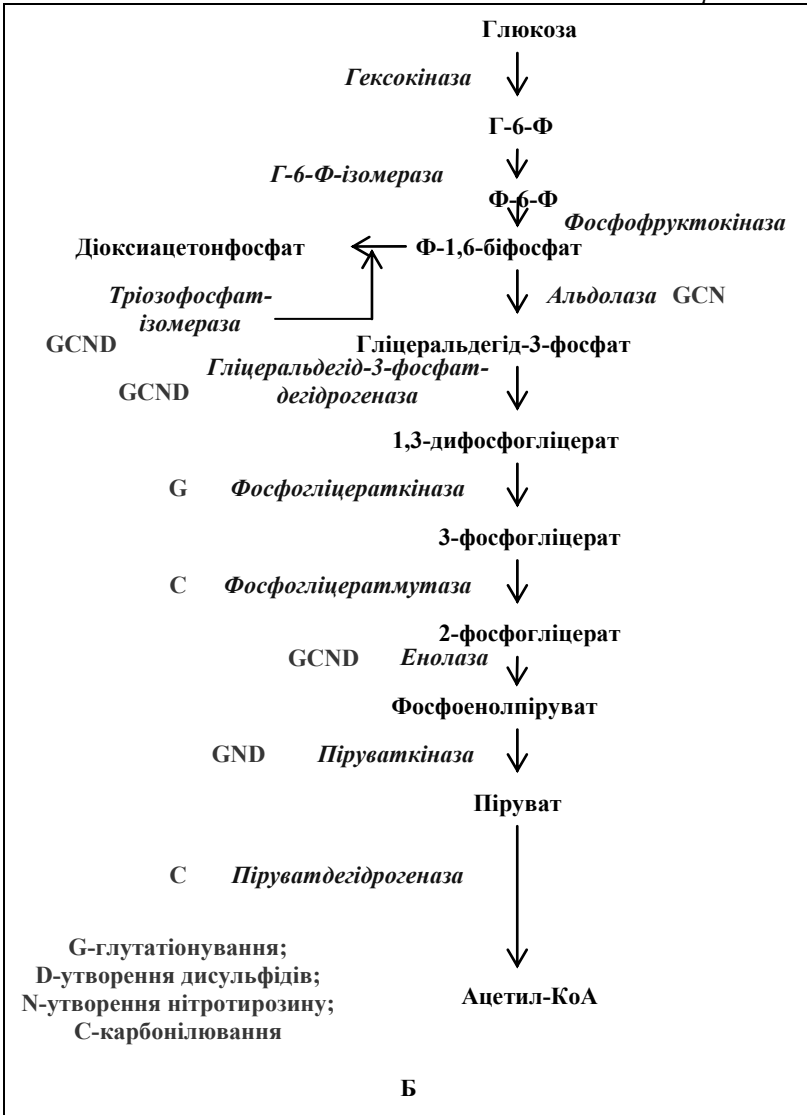


Рис. 6.10. Окисні модифікації білків.
Роль окисних модифікацій білків
у регуляції ферментів гліколізу (Б)

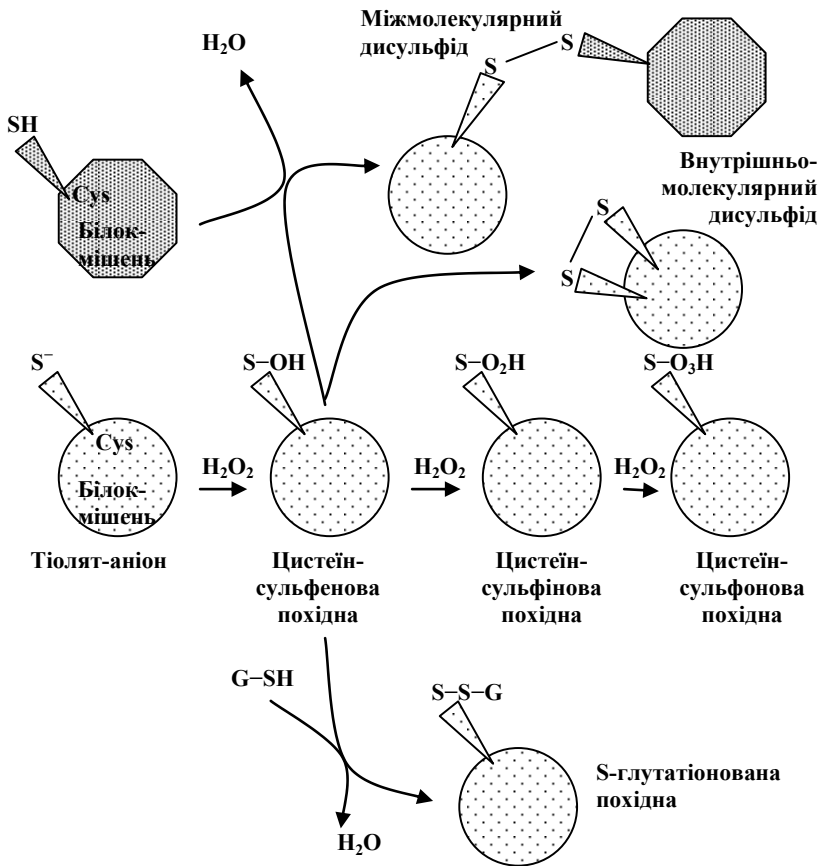


Рис. 6.11. Типи окисних модифікацій залишків цистеїну

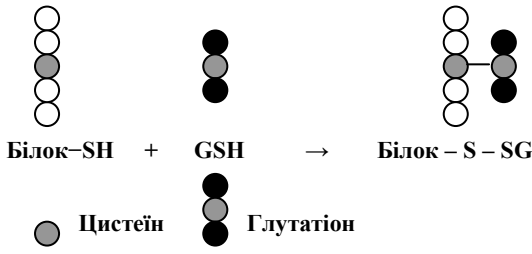
Сульфгідрильна, або тіолова, група (-SH) поодинокого залишку цистеїну може бути окиснена до сульфенової (-SOH), *сульфінової* (-SO₂H) або *сульфонової* (-SO₃H) кислот, *сульфенаміду* (-SNR₁R₂). Крім того, наявність залишків цистеїну в складі білків зумовлює виникнення під впливом окисників **внутрішньо-, міжмолекулярних і мішаних дисульфідів**, а також **S-глутатіонованих (-S-SG) похідних**.

При цьому реакції окиснення тіолової групи до сульфінової і сульфоновної кислот у клітинах є необоротними (лише в поодиноких випадках можливе АТФ-залежне відновлення залишків цистеїнсульфінової кислоти за участю білків сульфiredоксинів (*sulfiredoxins, Srxs*)). Окиснення тіолових груп залишків цистеїну в молекулах білків-мішеней пероксидом водню можливе лише в тому разі, коли константа дисоціації цих груп $pK_a < 7,0$. За фізіологічних рН вони є депротонованими, тобто містяться у вигляді тіолят-аніонів ($-S^-$).

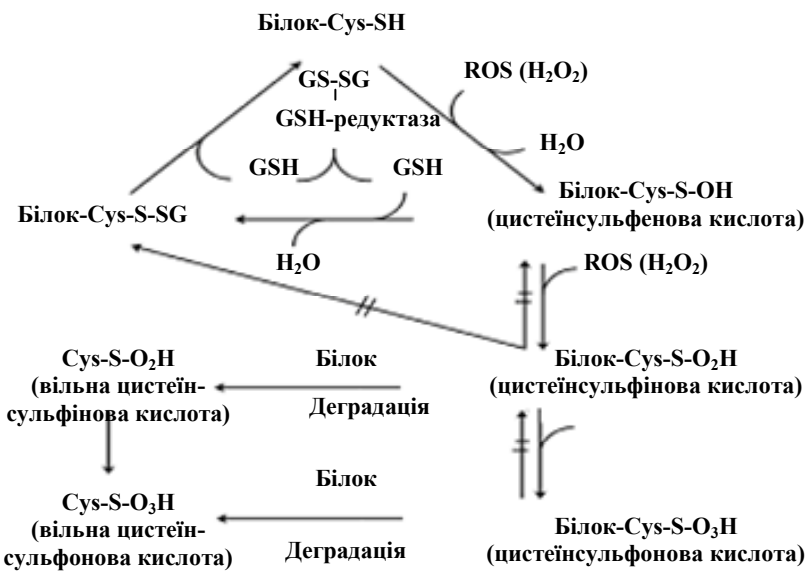
Чим легше депротонуються тіолові групи білка, тим легше цей білок буде окиснений за залишками цистеїну. Мішенями, які в активному центрі мають $-SH$ групи з низькою pK_a , є тіоредоксин, протеїндисульфідізомераза, тирозинові протеїнфосфатази, пероксиредоксини. Для більшості білків ця цифра становить $> 8,0$ – ці білки не модифікуються окисненням цистеїну. Кілька серин/треонінових протеїніназ – ПкА, ПкG, ПкВ/Akt, ПкС – мають $Cys-SH$ групи, не залучені до їхньої активності, але вони є консервативними, і окиснення цих залишків цистеїну (їхня pK_a невідома) може модулювати активність цих кіназ.

Окисні модифікації залишків цистеїну можуть змінювати активність ферментів (якщо критичний залишок цистеїну локалізований у межах каталітичного домену), знижувати здатність транскрипційних факторів сполучатися з ДНК (якщо він локалізований у межах ДНК-зв'язувальної ділянки). Одні білки при цьому інактивуються (наприклад, протеїнфосфатаза РТР1В), тоді як інші, навпаки, набувають активності (ріанодинові рецептори); деякі протеїни при окисненні змінюють свою конформацію і підлягають димеризації (шаперони) або вивільнюються із надмолекулярного комплексу (Ask1 від окисненого тіоредоксину).

В умовах окисного стресу окиснення залишків цистеїну може спричинити утворення мішаних дисульфідів між SH -групою білка ($P-SH$) і SH -групою низькомолекулярного тіолу (реакція *S-тіоляції*). У випадку тіолу *глутатіону* (це трипептид γ -*глутамініл-цистеїніл-гліцин*, підрозд. 8.2) утворюється *S-глутатіонована* похідна – мішаний білок-глутатіоновий дисульфід (реакція *S-глутатіонування*) (рис. 6.12, А).



А



Б

Рис. 6.12. А – реакція S-глутатіонування білків;

Б – продукти оборотного і необоротного окиснення SH-груп білків

Схеми можливого перебігу реакцій S-глутатіонування наведено в табл. 6.2. Раніше вважалося, що глутатіонування йде за механізмом тілового обміну між окисненою дисульфідною формою глутатіону (GS-SG) і білком із вільною тіловою групою (табл. 6.2, 1). Тепер відомо, що ця реакція відбувається головним чином шляхом взаємодії залишку сульфенової кислоти (-SOH) у складі білка і відновленим глутатіоном (GSH) (табл. 6.2, 2).

Таблиця 6.2. Схеми реакцій S-глутатіонування білків

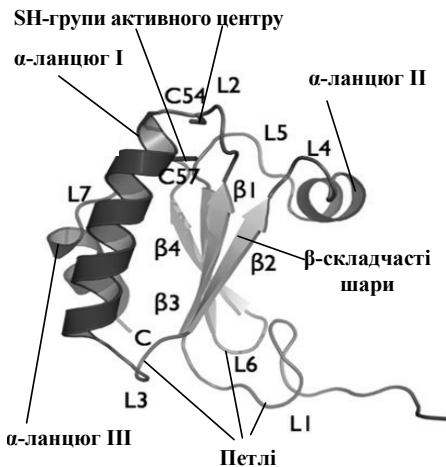
№	Механізм реакції	Примітки
1	$P-SH + GS-SG \rightarrow PS-SG + GSH$	Тіол-дисульфідний обмін
2	$P-SOH + GSH \rightarrow PS-SG + H_2O$	Відновлення цистеїнсульфенової кислоти у складі білків
3	$P-SH + GSH \rightarrow PS-SG$	Пряме окиснення
4	$P-SNO + GSH \rightarrow PS-SG + HNO$	Відновлення нітрозотіолів
5	$P-SH + G-SNO \rightarrow PS-SG + HNO$	Відновлення нітрозоглутатіону

S-глутатіонування є загальною оборотною модифікацією білків (S-глутатіоновані похідні залишків цистеїну, подібно до внутрішньо- і міжмолекулярних дисульфідів, легко відновлюються до активних сульфгідрильних груп), яку можна порівняти з фосфорилюванням. Вона виконує у клітинах дуже важливі функції, зокрема, протектує білки від необоротного окиснення до сульфїнової та сульфїнової кислот (рис. 6.12, Б), здійснює модуляції функцій протеїнів (рецепторів, транспортерів, протеїнкіназ, фосфатаз, протеаз, білків цитоскелета) при редокс-регуляції. Якщо залишки цистеїну є функціонально критичними, їхня модифікація при зміні редокс-стану клітини може інактивувати білок; коли ж редокс-статус клітини нормалізується, через оборотність S-глутатіонування відновлюються і функції білків [Giustarini D. et al.].

Серед білків і ферментів, активність яких модулюється реакцією S-глутатіонування – пероксиредоксини, аконітатгідратаза, α -кетоглутаратдегідрогеназа, креатинкіназа, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, мітохондріальний комплекс I (НАДН: убіхінон-оксидоредуктаза), нуклеотиддифосфаткіназа B, ПкC- α , PP2A, РТР1В, тіоредоксин, тіоредоксинпероксидаза II, тріозофосфатізомераза, тирозингідроксилаза тощо.

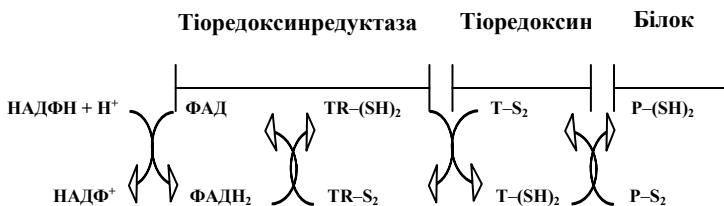
До зворотної реакції – **відновлення внутрішньомолекулярних (P-S₂), міжмолекулярних (PS-SP') і мішаних дисульфідів** (наприклад, PS-SG) – залучаються системи тіоредоксину і глутаредоксину.

Тіоредоксин (*thioredoxine, Trx*) – білок, виявлений в організмах бактерій, рослин і ссавців. В активному центрі його молекула містить два залишки цистеїну, тому білок може існувати у двох редокс-формах – окисненій ($-S-S-$) і відновленій ($2SH-$) (рис. 6.13, А).



А

**МЕХАНІЗМ ВІДНОВЛЕННЯ $-S-S-$ ЗВ'ЯЗКІВ У БІЛКАХ
ЗА УЧАСТЮ СИСТЕМИ ТІОРЕДОКСИНУ**



Б

Рис. 6.13. Модель молекули тіоредоксину та схема механізму відновлення дисульфідних зв'язків за участю системи тіоредоксину

2SH-форма тіоредоксину взаємодіє з дисульфідами, відновлюючи їх до вільних тіолових груп; при цьому сам тіоредоксин переходить у –S–S-форму і надалі відновлюється тіоредоксинредуктазою (рис. 6.13, Б).

Глутаредоксин (*glutaredoxine*, *Grx*; інша назва – **тіолтрансфераза**), подібно до тіоредоксину, в активному центрі має два залишки цистеїну й може набувати двох редоксформ (рис. 6.14).

У відновленій формі (2SH–) він відновлює субстрат, а сам перетворюється на окиснену форму, для редукції якої потрібний ендогенний глутатіон, а для відновлення глутатіону, у свою чергу, – глутатіонредуктаза. Для відновлення PS–SP необхідні обидві SH-групи глутаредоксину (А), тоді як для відновлення PS–SG – лише одна (Б).

Слід зауважити, що молекули глутатіону й тіоредоксину є надчутливими до зміни редокс-статусу клітини, що приводить до порушення функцій антиоксидантних систем за цих умов.

Окисні модифікації залишків цистеїну по-різному впливають на активність різних ферментів. Зокрема, H_2O_2 шляхом окиснення залишків цистеїну каталітичного сайту, імовірно, до сульфенової кислоти оборотно інактивує **родину тирозинових протеїнфосфатаз** – цим пояснюється факт, що продукція H_2O_2 необхідна для рецептор-індукованого фосфорилування залишків тирозину. Зворотна реакція відновлення фосфатаз відбувається за рахунок тіоредоксину або глутаредоксину за їхніх фізіологічних концентрацій. **Цистеїнові залишки факторів транскрипції** є мішенями H_2O_2 -модифікацій, і ці модифікації разом із фосфорилуванням можуть відповідати за їхні комплексні сигнальні механізми. Окиснення –SH-груп залишків цистеїну **Ca²⁺-транспортувальних систем ЕПР**, мітохондрій, ПМ може спричиняти зростання вмісту Ca^{2+} у цитозолі. Окиснення цих груп у складі деяких внутрішньоклітинних білків впливає на їхню здатність упізнаватися іншими білками, сприяє їхньому руйнуванню в протеасомах.

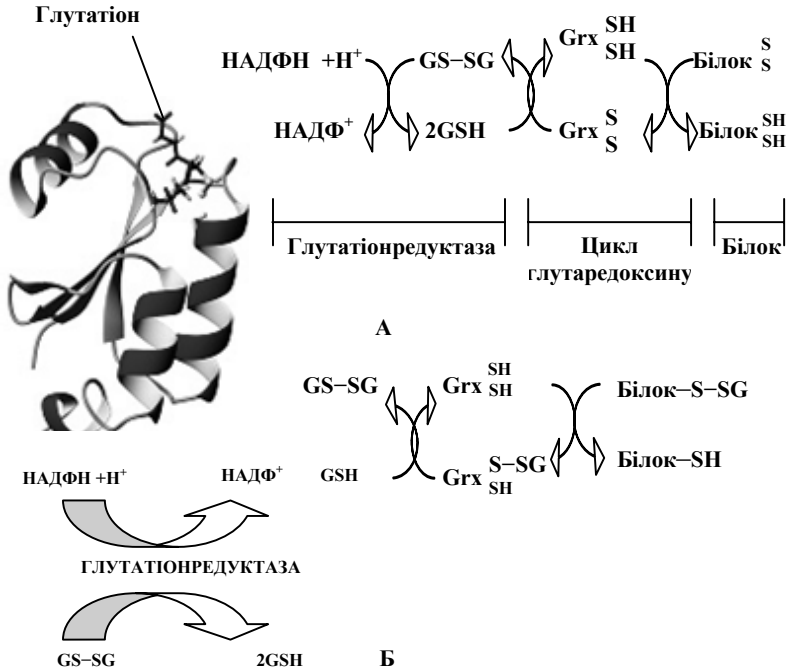


Рис. 6.14. Модель молекули глутаредоксину і схема механізму відновлення дисульфідних зв'язків за участю системи глутаредоксину

Що стосується окисних модифікацій інших амінокислот, то відносно часто зустрічаються, наприклад, окисні модифікації залишків метіоніну з формуванням метіонінсульфоксиду; зворотну реакцію каталізує фермент метіонінсульфоксидредуктаза. Цей механізм залучений, зокрема, у регуляцію функції кальмодуліну й низки мембранних транспортерів, хоча і є недостатньо дослідженим.

Окисні модифікації залишків тирозину можуть брати участь у регуляції білків-мішеней тирозинових протеїнкіназ і самих РТКs.

ROS також здатні взаємодіяти з Fe-S центрами або іншими металовмісними структурами у складі білків, модулюючи при цьому їхню активність. Так, залізо-сірчані білки, зокрема (4Fe-4S)-вмісна

аконітаза ссавців (фермент циклу Кребса), містить негемовий комплекс заліза {Fe-S-Cys}. ROS руйнують Fe-S кластери та інгібують аконітазну активність, впливаючи на залишки цистеїну в негемових залізовмісних білках.

6.2.2. Роль ROS у рецептор-опосередкованих шляхах передачі сигналу

За певних умов зв'язування деяких лігандів (зокрема, інсуліну, ангіотензину II, паратгормону, активної форми вітаміну D3 1,25-діоксихолекальциферолу, цитокінів – інтерлейкінів, інтерферону, ростових факторів, низки нейромедіаторів) зі своїми рецепторами може ініціювати синтез у клітині ROS, активуючі різноманітні шляхи їхнього утворення.

ROS, які генеруються після ліганд-рецепторної взаємодії, самі можуть спричиняти певні впливи на рецептор. Як приклад, розглянемо систему інсулінового рецептора. Як уже йшлося в підпідрозд. 3.1.1, I-R є гетеродимером ($2\alpha 2\beta$), субодиноці в якому сполучені дисульфідними зв'язками. α -Субодиноця при цьому є позаклітинною і відповідає за взаємодію з інсуліном, тоді як β -субодиноця є трансмембранною і володіє активністю тирозинової протеїнкінази. У результаті зв'язування ліганду інсуліновий рецептор активується шляхом аутофосфорилування за залишками Tyr-1158, -1162, -1163, локалізованими в цитозольній ділянці β -субодиноці. Стимульований I-R активує НАДФН-оксидазу (субодиноця рецептора з РТКs-активністю здійснює фосфорилування регуляторних субодиноць комплексу НАДФН-оксидази). НАДФН-оксидаза синтезує $O_2^{\bullet -}$, який перетворюється на H_2O_2 . Останній як окисник надалі може спричиняти конформаційні перебудови інсулінового рецептора, зокрема його активного центру (це пояснюється наявністю в цій ділянці значної кількості залишків цистеїну, що виникло еволюційно), і, як наслідок – аутофосфорилування рецепторної молекули. Тому за відсутності інсуліну високі концентрації H_2O_2 здатні створювати інсуліноподібні сигнали шляхом незалежного

від ліганду аутофосфорилування інсулінового рецептора. До того ж, такі впливи H_2O_2 частково зумовлені пригніченням високими концентраціями пероксиду водню активності тирозинових фосфатаз, що, хоча й не спричиняє аутофосфорилування, проте знижує інтенсивність дефосфорилування вже активованих рецепторів.

Отже, активні форми кисню посилюють сигнали інсуліну за зворотним позитивним зв'язком (а за певних умов – навіть імітують їх), а також забезпечують кооперативність між I-R та іншими трансмембранними рецепторами, оскільки H_2O_2 , генерований у клітині внаслідок активації одного рецептора, може впливати на активність іншого.

В інших випадках, крім НАДФН-оксидази, у ROS-залежну передачу сигналів від одного й того ж ліганду, але в різних типах клітин можуть залучатися й інші ферменти, наприклад, 5-LO або ще не виявлені НАДФН-оксидазо-, 5-LO-незалежні шляхи. Один і той самий ліганд може зумовити синтез різних форм ROS, які, залежно від типу клітин, можуть привести до різного кінцевого результату.

За подібною схемою здійснюється і H_2O_2 -залежна регуляція рецептора до епідермального фактора росту (EGF-R). Так, взаємодія ліганду з рецептором веде до індукції тирозинкіназної активності рецептора, наслідком чого стає фосфорилування G-білка Ras і наступна активація НАДФН-оксидази з утворенням $O_2^{\bullet -}$ і H_2O_2 . H_2O_2 при цьому зумовлює:

- аутофосфорилування рецептора (як у випадку інсулінового рецептора), причому H_2O_2 за відсутності EGF також може активувати рецептор;
- внутрішньоклітинну передачу сигналу.

Показано, що продукція пероксиду водню є необхідною для нормального перебігу сигнальних шляхів від ростових факторів: інгібування продукції ROS, ініційованої зв'язуванням лігандів або повне видалення H_2O_2 запобігає аутофосфорилуванню і подальшій передачі сигналу від активованої rPTKs. Отже, продукція H_2O_2 і H_2O_2 -залежне аутофосфорилування рецептора необхідні для нормальної передачі сигналу. При цьому для

аутофосфорилування рецептора (наприклад, EGF-R) не має значення, чи буде H_2O_2 , що спричиняє цю реакцію, утворюватися при його власній активації чи при функціонуванні інших рецепторів, наприклад до ангіотензину II, що свідчить про кооперативність між різними типами мембранних рецепторів.

6.2.3. Вплив ROS на внутрішньоклітинні сигнальні каскади

Загальну схему активації молекулами ROS, зокрема H_2O_2 , внутрішньоклітинних сигнальних шляхів зображено на рис. 6.15, А. Із наведеного видно, що умовно дію ROS як сигнальних молекул можна розглядати на двох рівнях – на рівні внутрішньоклітинних білків і каскадів та на генному рівні (рис. 6.15, Б).

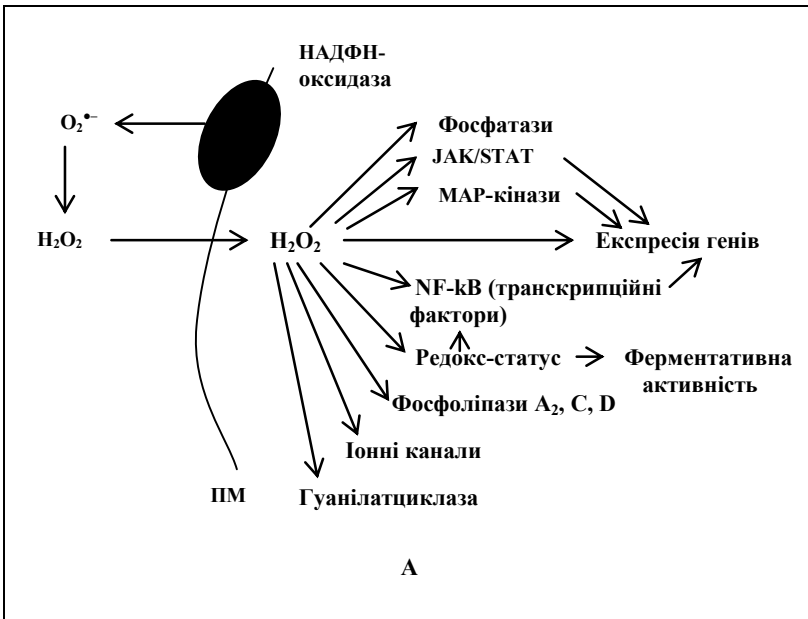


Рис. 6.15. Активація молекулами ROS внутрішньоклітинних сигнальних шляхів.
А: Загальна схема

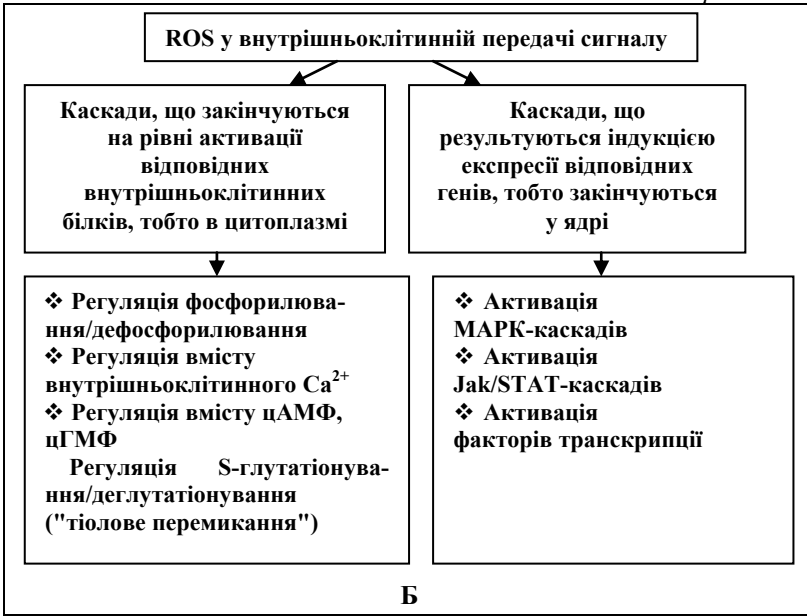


Рис. 6.15. Активація молекулами ROS внутрішньоклітинних сигнальних шляхів.
Б: Вплив на основні сигнальні каскади клітини

ROS *посилюють фосфорилювання залишків тирозину*. Стан Туг-фосфорилювання білків-мішеней залежить від активності двох класів ферментів – *тирозинових протеїнкіназ* (рецепторних і цитозольних) і *тирозинових протеїнофосфатаз*. Отже, ефекти окисного стресу на активність цих ферментів є ключовим сайтом модуляції сигнальної трансдукції окисним стресом. Основним механізмом зростання Туг-фосфорилювальної активності за дії ROS є інгібування активності тирозинових протеїнофосфатаз шляхом окиснення залишків цистеїну активного центру РТPs, як правило, до цистеїнсульфенової кислоти, котра при подальшому окисненні (в умовах потужного окисного стресу) може перетворюватися на цистеїнсульфінову або цистеїнсульфонову кислоти. Іншими варіантами окисних модифікацій цистеїну в молекулах РТPs є їхнє

нітрозилювання, глутатіонування і формування внутрішньо- і міжмолекулярних дисульфідів. У клітинах, оброблених оксидантами, лігандонезалежної базальної активності тирозинових протеїнкіназ може бути достатньо для зростання Туг-фосфорилювання білків унаслідок інактивації РТРs.

Усі РТРs містять консервативний залишок цистеїну, що під час каталізу відповідає за взаємодію з фосфатом фосфотирозину. Цей залишок швидко окиснюється пероксидом водню – при цьому фермент оборотно інактивується. Оскільки ракові клітини характеризуються підвищеним окисним метаболізмом, у більшості випадків при онкологічних розладах РТРs є неактивними, що веде до стимуляції rРТКs-залежних сигнальних шляхів і провокує прогресію канцерогенезу. ROS, зокрема, інгібують активність тирозинових протеїнфосфатаз РТР1В, РТЕН, SHP1/2 і LMW РТР. Так, РТЕН, що здійснює регуляцію численних фізіологічних функцій (перебігу клітинного циклу, процесів апоптозу, репарації ДНК, сигнальної трансдукції та адгезії клітин), підлягає інактивації пероксидом водню шляхом окиснення Cys-124 у каталітичному сайті внаслідок формування дисульфідного зв'язку із Cys-71. Оскільки РТЕН дефосфорилує PI-3,4,5-P3 до PI-4,5-P2, акумуляція PI-3,4,5-P3 підвищує активність антиапоптозного PI3K/Akt сигнального шляху. Крім того, шлях PI3K/Akt є ефектором rРТКs, і тому його активація за дії окисників може бути зумовлена і стимуляцією сигнальних процесів, ініційованих ROS-залежною активацією rРТКs.

Загальним ефектом на всі *серин/треонінові протеїнкінази* є їхня активація, проте у випадках деяких протеїнкіназ окисники можуть проявляти й інгібуючі впливи. Оксиданти регулюють активність ПкА на рівнях утворення/деградації цАМФ (зокрема, активність аденілатциклази зростає за короткочасних впливів ROS і знижується у разі їхньої тривалої дії) і фосфорилування/дефосфорилування субстратів. Сайтоспецифічне окиснення каталітичних субодиниць ПкА через окисну модифікацію Cys-199 з утворенням PS-SG оборотно знижує

активність ПкА. Разом із тим, ROS може активувати ПкА через зниження активності серин/треонінових фосфатаз (PP1, PP2C, PP2A, кальциневрин). Що буде результатом таких подвійних ефектів на ПкА, залежить від різної чутливості ПкА і фосфатаз до окисної інактивації. А це, у свою чергу, залежить від інтенсивності та тривалості дії ROS: їхні низькі й середні концентрації активують ПкА-залежне фосфорилування шляхом інгібування фосфатаз, тоді як тривала дія або (та) їхні вищі рівні інгібують ПкА.

У структурі ПкС, що в нормі активується ДАГ через N-кінцеву ділянку, при цьому потребуючи наявності фосфоліпідів і Ca^{2+} , є й інша ділянка, через яку фермент активується окисниками (H_2O_2) – багата на цистеїн Zn^{2+} -вмісна ділянка (так званий "цинковий палець", рис. 6.16). SH-групи цієї ділянки є високочутливими до окиснення, яке сприяє зміні конформації поліпептидного ланцюга й активації ферменту. Крім того, "цинкові пальці" є сайтом зв'язування ретиноїдів, які виступають як кофактори в активації ПкС ROS (можливо, вони посилюють іонізацію SH-груп залишків цистеїну), тоді як класичний шлях активації ПкС не залежить від наявності ретиноїдів.

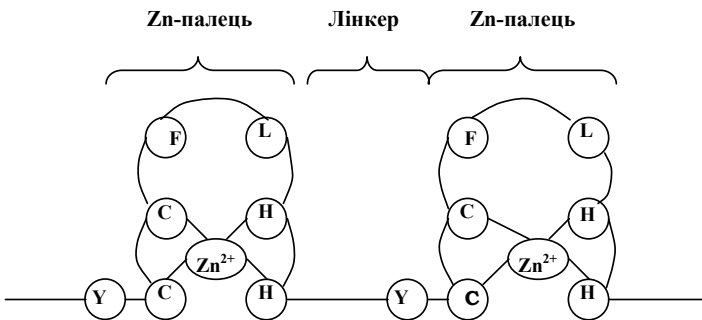


Рис. 6.16. Структура "цинкових пальців"

Ще один механізм активації ПкС опосередкований активацією ROS фосфоліпази С, залученої в утворення ДАГ. Вітамін Е, прискорюючи перетворення ДАГ на фосфатидну кислоту, знижує рівні ДАГ і активність ПкС. Узагалі, кілька серин/треонінових протеїнкіназ, у тому числі ПкА, ПкС, ПкG, ПкВ/Akt, S6-кіназа, – усі вони мають консервативні залишки цистеїну в межах їхнього активного центру, які не є обов'язковими для активності ферменту. Оборотно окиснення цих залишків може змінювати активність цих кіназ і модулювати взаємодії між регуляторною і каталітичною субодиницею або між ферментом і субстратом.

Протеїнкіназа Raf у нормі активується фосфатидилсеринном або G-білком Ras. Механізм активації за участю ROS є аналогічним ретинол- і ROS-залежній активації ПкС та передбачає модифікацію залишків цистеїну в "цинкових пальцях" активного центру. Ще один шлях активації протеїнкінази Raf за дії ROS опосередкований активацією за дії вільних радикалів G-білка Ras. Цей механізм залучений до активації транскрипційного фактора NF- κ B впливом ROS. Підвищена чутливість Ras до ROS і редокс-статусу клітини є додатковим механізмом, за яким ROS можуть спричиняти онкогенез, оскільки надактивовані форми Ras часто виявляють у хворих на рак. Механізм ROS-активації Ras – S-глутатіонування Cys-118, що індукує конформаційні зміни Ras-білка і відповідає за його взаємодію з різними сигнальними білками-ефекторами (серед них PI3K, Raf, ПкС, ДАГ-кіназа, MAPKKK, які при цьому активуються).

H_2O_2 індукує швидке *зростання рівнів внутрішньоклітинного Ca^{2+}* як за рахунок його вивільнення із I-1,4,5-P3-чутливих Ca^{2+} -депо в ЕПР, так і (повільніше) унаслідок входу Ca^{2+} із позаклітинного простору. Крім того, ROS інгібують активність Ca^{2+} -АТФази ЕПР. Основні напрямки дії ROS у регуляції рівнів внутрішньоклітинного Ca^{2+} наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3. Основні напрямки дії ROS у регуляції рівнів внутрішньоклітинного Ca^{2+}

Основні напрямки ROS у регуляції вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+}	
Унаслідок зростання надходження із поза-клітинного простору	За рахунок Ca^{2+} ЕПР і СР, рідше – за рахунок Ca^{2+} мітохондрій
Активация різних типів Ca^{2+} -каналів ПМ	Ca^{2+} -АТФаза чутлива до ушкодження вільними радикалами – при цьому відбувається окиснення SH-груп активного центру ферменту. Ушкоджена АТФаза не лише втрачає здатність закачувати Ca^{2+} , а й перетворюється на канал для Ca^{2+}
Активация K^+ , Na^+ , Cl^- -каналів ПМ	Активация ріанодинових рецепторів (великі Ca^{2+} -вивільнювальні канали в мембранах СР, чутливі до інгібування рослинним алкалоїдом ріанодином)
Активация іонних насосів (K^+ , Na^+ -АТФаза)	Активация внаслідок дії ROS фосфоліпази С; при цьому у клітині зростає продукція двох вторинних посередників – ДАГ та I-1,4,5-Р3. Останній, зв'язуючись із рецепторами до I-1,4,5-Р3 в мембрані ЕПР, активує їх і зумовлює вихід Ca^{2+}
Активация іонних обмінників ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$)	Вплив ROS на вихід Ca^{2+} із мітохондрій, виникнення РТР під час апоптозу, спричиненого дією ROS
Активация котранспортерів (K^+/Cl^- , $1\text{Na}^+/1\text{K}^+/2\text{Cl}^-$)	

Щодо участі ROS у *регуляції рівня циклічних нуклеотидів*, то на рівні *цАМФ* (через мембранозв'язаний фермент аденілатциклазу) ROS діють тільки опосередковано, причому активність аденілатциклази зростає при короткочасних впливах ROS і знижується за їхньої тривалої дії (шляхом регуляції рівня Ca^{2+} або через ROS-залежне блокування проходження сигналу до цього ферменту від рецептора).

**Таблиця 6.4. Основні напрямки дії ROS
в окисній активації MAPK-каскадів**

Окисна активація MAPK-каскадів		
Безпосередня активація кіназ (p38, JNK, ERK)	Опосередкована активація кіназ – через ROS-активацію регуляторних систем	Інгібування фосфатаз
Через активацію фосфорилювання залишків Ser і Thr в активних центрах цих ферментів	1) Через ROS-активацію тирозинових протеїнкіназ родини Src активуються p38 і JNK (рис. 6.17, А)	Тирозинові протеїнофосфатази (PTP1B, PTEN, SHP1/2, LMW PTP)
	2) Регулятор протеїнкіназ, що активуються в умовах стресу (SARKs = p38 + JNK) – Ask1 (див. дод., п. 17), інгібується у нестресових умовах через його асоціацію з тіоредоксином. Зростання рівнів ROS спричиняє дисоціацію цього комплексу, активацію Ask1 і SARKs (рис. 6.17, Б)	Фосфатази подвійної специфічності (MKPs – фосфатази MAPKs)
	3) Шляхом активації Ras і Raf (ERK-каскад) (рис. 6.17, В)	Серин/треонінові протеїнофосфатази
	4) На рівні ліганд-рецепторної взаємодії	

На відміну від цАМФ, *рівні цГМФ* під впливом активних форм кисню виключно зростають унаслідок прямої регуляції (безпосередня активація цитозольної форми гуанілатциклази такими ROS, як NO, H₂O₂) або опосередкованих ефектів (через регуляцію внутрішньоклітинного вмісту Ca²⁺ – ROS збільшують вміст Ca²⁺ у клітині).

Відомості про напрямки регуляторних впливів ROS *на стан MAPK-каскадів* наведено в табл. 6.4 та рис. 6.17.



А

Рис. 6.17. Основні напрямки дії ROS в окисній активації MAPK-каскадів.
А: схема Src-залежної активації p38 MAPK-каскаду

Продовження рис. 6.17.

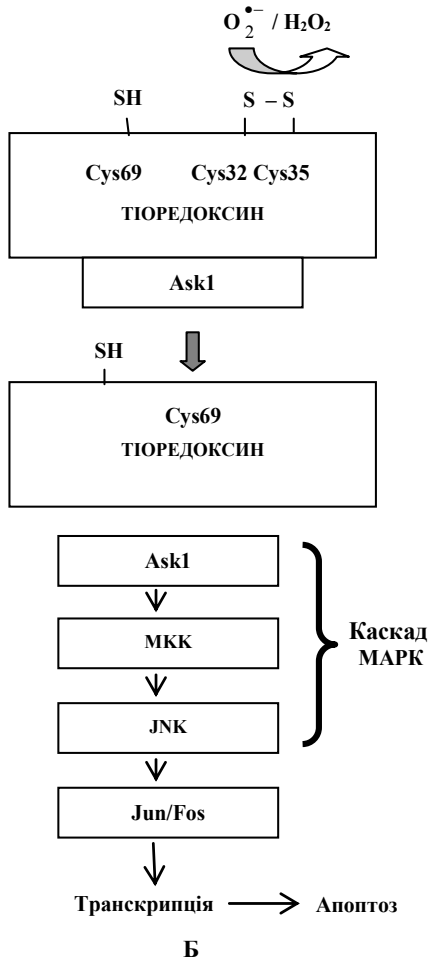


Рис. 6.17. Основні напрямки дії ROS в окисній активації МАРК-каскадів.
Б: регуляція JNK МАРК-каскаду тиоредоксином

Закінчення рис. 6.17.



В

Рис. 6.17. Основні напрямки дії ROS в окисній активації МАРК-каскадів
В: схема **Ras**-залежної активації ERK МАРК-каскаду

6.2.4. Вплив ROS на функціональний стан транскрипційних факторів та експресію генів

Кінцевим результатом активації МАРК-кіназ (див. підпідрозд. 3.1.3.2), є активація транскрипційних факторів, зокрема NF-κB, AP-1, що здійснюють регуляцію експресії низки відповідних генів. Тому ROS можуть активувати такі транскрипційні фактори через індукцію МАРК-каскадів. Стосовно NF-κB (підпідрозд. 5.2.3.1), то інші механізми її регуляції активними формами кисню включають окиснення ключових сайтів кіназ, які фосфорилюють і активують кіназу інгібітора NF-κB ІКК (наприклад, кінази ПкВ/Акт), безпосередню редокс-модуляцію активності ІКК, а також етапи транслокації активного NF-κB із цитопла-

зми у ядро. При цьому антиоксиданти та тіолові сполуки інгібують NF-κB. Проте для функціонування NF-κB його ДНК-зв'язувальна ділянка має бути у відновленому стані, тому здатність NF-κB сполучатися із ДНК знижується за дії окисників і зростає за дії відновників. Тому кінцевий результат такої подвійної регуляції залежить від тривалості й сили окисника, а також від локалізації джерела активних форм кисню: у ядрі безпосереднє окиснення залишків цистеїну в межах ДНК-зв'язувальної ділянки буде інгібувати NF-κB-ДНК-зв'язувальну активність, тоді як у цитозолі активація ІКК, фосфорилування інгібітора NF-κB (IκB) або власне NF-κB буде спричиняти активацію цього транскрипційного фактора (в останньому випадку фосфорилування NF-κB певними кіназами може відокремлювати NF-κB від IκB і спричиняти його ядерну транслокацію).

Інший транскрипційний фактор – AP (*activated protein, білок активації*) – залучається у регуляцію процесів диференціювання, регенерації й апоптозу. AP-1 представлений низкою споріднених димерних комплексів, мономерами яких виступають білки з родин Jun (c-Jun, JunB, JunD) і Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), кожний із яких представлений ядерним фосфопротеїном, що містить три функціональні ділянки – С-кінцевий ZIP-домен (див. дод., п. 18), що слугує для сполучення мономерів у функціонально активний димер, ДНК-зв'язувальну ділянку та N-кінцевий трансактиваційний домен.

Ці білки формують гомо- або гетеродимери, або ж можуть сполучатися з іншими білками, що містять ZIP-домени, зокрема з протеїнами родин Maf (від "*avian musculoaponeurotic fibrosarcoma virus*" – c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) і ATF (від "*activating transcription factor-2*" – ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2). Сформовані комплекси різняться своєю стабільністю. Найстабільнішим із них є гетеродимер, що складається із білків c-Fos і c-Jun; він активує експресію генів, які, зокрема, кодують колагеназу, TGF-1b, цитокіни тощо. Димерний комплекс {c-Fos + c-Jun} взаємодіє з регуляторним елементом у складі ДНК – AP-1-зв'язувальним сайтом AP-1 індукцибельних генів.

Активацію AP-1 індукують мітогени, форболові ефіри, фактори росту, TNF-α, H₂O₂, ультрафіолетове й іонізуюче випромі-

нення. Механізми ROS-індукованої активації AP-1 включають фосфорилування специфічних залишків AP-1. Наприклад, ROS-залежна активація MAPK-каскаду (JNK) приводить до фосфорилування Ser-63 та -73 в субодиниці c-Jun AP-1, що активує цю субодиницю. c-Fos білок в AP-1 також активується шляхом фосфорилування Thr-232 внаслідок Fos-регуляторної кіназної активності білка Ras. Проте, подібно до NF- κ B, один залишок цистеїну у висококонсервативному ДНК-зв'язувальному домені AP-1 є редокс-чутливим, і його відновлений стан необхідний для сполучення AP-1 з ДНК. На рівні ядра модифікація цього залишку окисниками знижує активність AP-1, а обробка відновниками посилює асоціацію із ДНК.

Ряд факторів транскрипції, зокрема Myb, Sp-1, Egr-1, регулюються подібно до AP-1 і NF- κ B.

Транскрипційний фактор HIF (*hypoxia-inducible factor*, фактор, що індукується в умовах гіпоксії), який регулює експресію багатьох чутливих до гіпоксії генів (у тому числі генів еритропоєтину, гемоксигенази-1, індукцибельної NOS, фактора росту ендотелію судин, трансферину, кількох гліколітичних ферментів), за дії ROS підлягає інгібуванню. Це гетеродимерний білок, що складається із двох субодиниць (HIF-1 α й HIF-1 β). Механізм ROS-індукованого інгібування HIF-1 полягає в гальмуванні утворення гетеродимерного комплексу внаслідок зниження експресії HIF-1 α та активації її протеолізу у протеасомі.

ROS також інгібує транскрипційний фактор і супресор пухлин p53, активність якого при ушкодженні ДНК є визначальною щодо подальшої долі клітини (репарація чи загибель шляхом апоптозу) (детальніше про білок p53 йтиметься у підрозд. 6.3) [Liu B. et al.]. До мішеней p53, залучених до зупинки клітинного циклу й до регуляції загибелі клітин, належать білки p21, GADD45, 14-3-3-сигма, Вах, Puma, Noxa, Araf-1, Fas-R, DR5, які він активує, та Bcl-2 й Bcl-X_L, на які p53 має інгібіторний вплив. Крім того, p53 відіграє важливу роль у підтримці редокс-гомеостазу шляхом регуляції енергетичного метаболізму, мітохондріального біогенезу й експресії антиоксидантних ферментів. Утрата функцій p53 асоційована з розвитком багатьох типів раку. Хоча p53 функціонує як транскрипційний фактор, що кон-

тролює експресію кількох молекул, залучених у регуляцію редокс-статусу клітини, сам p53 є редокс-чутливим, оскільки має багато залишків цистеїну (зокрема, у ДНК-зв'язувальній ділянці), що можуть підлягати окисній модифікації.

6.2.5. Зміна внутрішньоклітинного редокс-статусу як регулятор функцій клітинних білків

Завдяки існуванню певного рівня генерації ROS і певної активності антиоксидантних систем у клітині створюється певний **редокс-баланс**, тобто клітина набуває певного редокс-статусу [Kohen R. et al.]. Редокс-статус клітини визначається за співвідношенням вмісту активних та інактивованих радикалів, їхніх похідних і окиснених та відновлених форм інших молекул, чутливих до дії активних форм кисню, зокрема НАД⁺/НАДН, НАДФ⁺/НАДФН, GS-SG/GSH, і є неоднаковим у клітинах із різним функціональним станом – у тих, наприклад, що активно ростуть, підлягають диференціюванню або стають на шлях апоптозу. Так, *уміст окисненого глутатіону в нормі становить лише 10% від його загального вмісту. Це співвідношення (GS-SG / GSH) у певній тканині є величиною сталою, а його зростання – чутливим індикатором окисного стресу: зниження вмісту GSH спостерігається після стимуляції ROS. Редокс-баланс клітини підтримується наявністю численних антиоксидантних систем.*

Зміна редокс-статусу клітини супроводжується модуляцією активностей численних ферментів, зокрема кіназ і фосфатаз, а також факторів транскрипції, наприклад AP-1 і NF-kB, а отже, може діяти як сигнальний механізм. Серед найважливіших молекул, чутливих до змін редокс-статусу клітини, є й ті, що беруть участь у антиоксидантному захисті клітин і залучені в регуляторні механізми, насамперед – у процеси відновлення оборотних окисних модифікацій залишків цистеїну білків: глутатіон, тіоредоксин і глутаредоксин. При нормалізації редокс-статусу окиснені форми цих білків підлягають відновленню за участю глутатіонредуктази, тіоредоксинредуктази та НАДФН як донора протонів.

У табл. 6.5. підсумовано літературні дані про впливи ROS на різні типи сигнальних молекул.

Таблиця 6.5. Ефекти оксидантів на сигнальні молекули клітини

Сигнальна молекула	Ефект оксидантів
Тирозинові протеїнкінази (рецептори до EGF, PDGF, інсуліну; Src, Lck, Fyn, Zap70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk, Ltk)	Активація
Тирозинові протеїнофосфатази	Інактивація
Ліпідна сигналізація (PLC, PLD, PLA ₂ , PI3K)	Активація
Ca²⁺-сигналізація: рецептор до I-1,4,5-P ₃ , Ca ²⁺ -АТФаза	– " –
Малі G-білки (Ras)	– " –
Серин/треонінові протеїнкінази (MAPKs – JNK, p38, ERK; BMK1, ПкВ/Акт, S6-кіназа, ПкС)	Активація/ інактивація
Серин/треонінові протеїнофосфатази (PP1, PP2A, кальциневрин)	Інактивація
Транскрипційні фактори (AP-1 {c-fos + c-jun}, NF-kB, Myb, p53, ATF, ін.	Активація/ інактивація

На можливі напрямки дії активних форм кисню (у випадку активація/інактивація) впливають:

- тип ROS (різні форми мають різні ефекти на внутрішньоклітинні мішені, у тому числі й MAPKs);
- сайт генерації ROS (таким чином визначаються первинні мішені ROS);
 - просторове розповсюдження;
 - діапазон концентрацій;
 - тривалість дії;
 - редокс-статус клітин.

6.3. Роль ROS у розвитку клітинного стресу:

ЕПР-стрес, генотоксичність і мітохондріальна дисфункція

Відомо, що ЕПР бере участь у регуляції вмісту внутрішньоклітинного Ca²⁺ (оскільки ЕПР та мітохондрії є основними депо для цих іонів), у біосинтезі білків, їхньому експорті. Різні чин-

ники, зокрема експресія мутованих білків, вірусні інфекції, недостатність енергії чи поживних речовин, екстремальні умови навколишнього середовища, зміни редокс-статусу, зміни в Ca^{2+} -гомеостазі, порушують основні функції ЕПР і зумовлюють так званий ЕПР-стрес. Він веде до активації у клітинах самопротективних механізмів; однак надмірний і тривалий стрес спричиняє загибель клітин шляхом апоптозу (М. Шредер, Р. Кауфман, 2005) [Schröder M. et al.].

ЕПР-стрес має свої власні сигнальні шляхи. UPR (від *Unfolded Protein Response – відповідь розгорнутих білків*) є наслідком утворення агрегатів розгорнутих білків і використовує еволюційно консервативний сигнальний шлях, протягом якого "сигнал розгорнутих білків" активує низку трансмембранних ЕПР-локалізованих сенсорів, що реагують або на ЕПР-стрес загалом, або на присутність розгорнутих білків. **Найважливішими серед таких білків-сенсорів** є шапероновий білок BiP/GRP78 (*binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose-regulated protein; білок, що зв'язує імуноглобулін/78 кД глюкозорегульований білок*), протеїнкінази IRE1 (*inositol requiring enzyme 1, фермент1, що потребує інозитулу*) і PERK (*doublestranded RNA-activated protein kinase (ПкR) – like endoplasmic reticulum kinase; кіназа ЕПР, подібна до ПкR*), а також транскрипційний фактор ATF6 (*activating transcription factor 6, транскрипційний фактор активації 6*). Крім того, до контролю акумуляції UPR залучає існуючі протеази і ферменти з убіквітинлігазною активністю.

BiP/GRP78 (шаперон HSP70) локалізований у просвіті ЕПР і за фізіологічних умов сполучений з іншими ЕПР-локалізованими білками – PEKR, IRE1 і ATF6. Його функцією є приєднання до новосинтезованих білків під час їхньої транслокації у просвіт ЕПР, і підтримання їх у стані, що дозволяє наступний фолдинг і олігомеризацію. Також BiP/GRP78 є необхідним компонентом системи транслокації через мембрани, він, зокрема, відіграє певну роль у ретроградному транспорті через мембрану ЕПР аберантних білків для їхньої наступної деградації у протеасомі. Синтез цих молекул значно зростає

за акумуляції незгорнутих білків у ЕПР. Крім того, BiP/Grp78 є центральним регулятором ЕПР-стресу, що залучається у контроль активації інших сенсорів ЕПР (IRE1, PERK, ATF6) шляхом зв'язування-вивільнення цих молекул.

Білки IRE1 і PERK мають цитоплазматичні домени із серин/треоніною протеїнкіназою активністю, активуються ЕПР-стресом і при цьому підлягають гомодимеризації та фосфорилуванню. У стані спокою ці кінази асоційовані з BiP/Grp78 і є неактивними. При ЕПР-стресі надлишок розгорнутих білків у просвіті ЕПР спричиняє дисоціацію BiP/Grp78 з наступною олігомеризацією IRE1 і PERK, що активує трансдукцію сигналу. ATF6 також регулюється BiP, але в інший спосіб.

Опосередкована ЕПР-стресом активація *IRE1* стимулює сплайсинг мРНК ХВР-1 (*X-box binding protein 1*). ХВР-1 є транскрипційним фактором, що надалі транслокується в ядро й індукує експресію широкого кола ЕПР-локалізованих шаперонів, у тому числі BiP/Grp78 і Grp94 (від *glucose regulated protein*).

PERK-кіназа (або eIF-2-кіназа), яка фосфорилує субодиницю фактора ініціації трансляції еукаріотів eIF-2 (від *eukaryotic initiation factor 2*), спричиняє зниження загального білкового синтезу і також залучена в активацію ряду транскрипційних факторів.

У нормі **ATF6** у неактивному стані асоційований із мембранами ЕПР. Активація ATF6 також пов'язана з білком BiP/Grp78, який за відсутності стресу зв'язується із двома послідовностями у поліпептидному ланцюзі цього транскрипційного фактора, які мають назву GLS (від *Golgi localization signal* – сигнал локалізації в апараті Гольджі). Під час ЕПР-стресу BiP/Grp78 дисоціює, унаслідок чого ATF6 транспортується до апарату Гольджі, де активується шляхом розщеплення протеазами (*Site-1* і *Site-2 протеази* – S1P і S2P) із вивільненням N-кінцевої послідовності, що є транскрипційним фактором bZIP (*basic leucine zipper*). Останній, сполучаючись із ATF/CRE-елементами і елементами стресової від-

повіді I і II (*ER stress response elements I і II*), регулює експресію генів-мішеней ЕПР-стресу, серед яких BiP/Grp78, ХВР-J і СНОР. Зокрема, транскрипційний фактор СНОР (від *CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein*, також відомий як GADD153 (від *growth arrest and DNA damage-inducible gene 153*) залучається в ЕПР-стрес-індукований апоптоз шляхом зниження експресії Bcl-2. Це підтверджується даними, згідно з якими СНОР-дефіцит спричиняє резистентність до ЕПР-стрес-індукованої загибелі клітин як *in vitro*, так і *in vivo*.

Відомо, що новосинтезовані білки після виходу із рибосом для вірного функціонування повинні згорнутися у стабільні тривимірні структури й лишатися такими протягом всього функціонального життя. Шаперони є спеціальними білками, що каталізують укладку поліпептидів і забезпечують підтримку контролю якості структури білка. Збирання поліпептидів і укладання мультибілкових комплексів також здійснюється шаперонами. Шаперони зв'язуються з гідрофобними ділянками невірнo згорнутих білків і допомагають їм згорнутися й досягти стабільної нативної структури, чим запобігають включенню їх у нерозчинні й нефункціональні агрегати. Крім того, протягом свого функціонального життя білок може підлягати численним стресам і денатурації. Такі частково денатуровані білки можуть стати мішенню протеаз, агрегувати або складатися в нативну структуру за допомогою шаперонів.

Отже, наслідками UPR стає транскрипційна активація шаперонів, які контролюють акумуляцію білкових агрегатів, стимуляція синтезу антиоксидантів, кофакторів і регуляторів, залучених у деградацію білків, асоційованих із ЕПР-стресом, та інгібування синтезу нових білків, що запобігає можливій наступній акумуляції розгорнутих білків. Така скоординованість зупиняє утворення нових білків і надає час для видалення розгорнутих протеїнів, що відновлює клітинний гомеостаз. Однак, якщо ЕПР-стрес не врегульовується, клітина гине шляхом апоптозу (рис. 6.18).

АДАПТАЦІЯ І АПОПТОЗ В УМОВАХ Е П Р - СТРЕСУ

ПРИЧИНИ Е П Р - СТРЕСУ

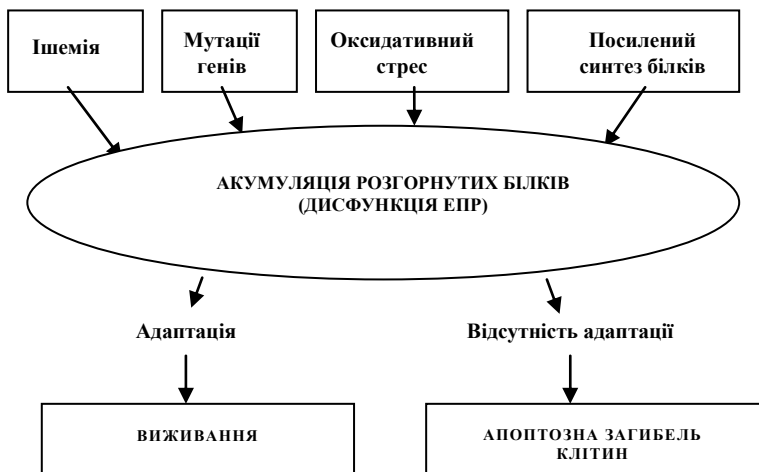


Рис. 6.18. Причини і можливі результати ЕПР-стресу

При цьому в ініціацію проапоптозних відповідей також залучається активація шляхів UPR. Механізми, за якими клітина за ЕПР-стресу "вибирає" шлях апоптозу чи виживання, залишаються нез'ясованими [Остапченко Л.І. та ін., 2010].

ВіР/Grp78 за ЕПР-стресу є ключовим сенсором акумуляції невірно зібраних білків у ЕПР, що опосередковано, через вивільнення IRE1, PERK й ATF6, залучається у стресову відповідь, сприяє глобальному уповільненню біосинтезу білків та індукції експресії залежних від ЕПР-стресу шаперонових протеїнів, здатних проводити рефолдинг і видаляти ушкоджені білки. Більш того, активація ATF6 індукує активацію шаперонового білка СНОР, залученого в апоптоз, асоційований з ЕПР-стресом.

ЕПР-стрес супроводжується підвищенням продукції ROS, зокрема за рахунок активації Noxs, і генеровані активні форми кисню відіграють значну роль у модуляції як проадаптив-

них, так і проапоптозних ефектів ЕПР-стресу [Jiang F. et al.]. У механізми ЕПР-стресу залучені як мінімум дві ізоформи цих ферментів: Nox 2 і Nox 4. Наприклад, ендогенна цитотоксична ліпідна сполука – 7-кетохолестерол – у гладком'язових клітинах аорти людини підвищує експресію Nox 4 та індукує розвиток ЕПР-стресу, про що свідчить зростання експресії Вір/GRP78 і наступна активація IRE1. При цьому дефіцит гена Nox4 значно знижує 7-кетохолестерол-індуковану продукцію ROS і зменшує апоптозну відповідь. Після обробки ендотеліальних клітин індукторами ЕПР-стресу (тунікаміцином і вірусним білком Tat) також виявлено гіперпродукцію H₂O₂, тоді як нокаут гена Nox 4 блокує ЕПР-специфічну продукцію ROS і стресову відповідь ЕПР (експресію Вір/GRP78 і СНОР). На моделі цукрового діабету встановлено залучення Noxs у реалізацію відповіді ЕПР-стресу *in vivo*: виявлено, що дефіцит компоненту Noxs – Rac1, або системний вплив апоциніну – інгібітора НАДФН-оксидази – пригнічує експресію маркерів ЕПР-стресу в міокарді.

Генотоксичні агенти (іонізуюче випромінення, хіміотерапевтичні чинники, окисний стрес), викликаючи зміни в геномній ДНК, спричиняють розвиток геномного (генотоксичного) стресу. **На роль внутрішньоклітинних сенсорів** цього стану претендують ферменти, що належать до родини РІЗК-подібних кіназ (*phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, PIKKs*), а саме: **ДНК-залежна протеїнкіназа** (*DNA-dependent protein kinase, DNA-PK*), **АТМ** (*ataxia-telangiectasia mutated protein, білок, мутований при атаксії-телангієктазії*) і **АТР** (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, білок, подібний АТМ і Rad3*). Активація цих кіназ ініціює сигнальні шляхи, що передбачають фосфорилування "checkpoint"-кіназ (*checkpoint kinases*) Chk 1 і Chk2, а також білка-супресора пухлин р53 та ведуть до зупинки клітинного циклу, що дозволяє ушкодженій ДНК репаруватися, або спрямовує клітину до апоптозу і тим самим запобігає поширенню геномних дефектів і сприяє підтриманню стабільності геному. Фосфорилу-

вання та активація транскрипційного фактора p53 відіграє при цьому головну роль, визначаючи відповідь клітини за геномного стресу [Jiang F. et al.].

Білок p53, що є продуктом відповідного гена, постійно синтезується клітинами, хоча й дуже швидко деградує. Коли у клітині відбувається пошкодження ДНК (унаслідок дії хіміо-терапевтичного агента, γ -випромінення або надмірної генерації ROS), деградація білка p53 закінчується і він починає функціонувати [Чумаков П. М.]. У відповідь на пошкодження ДНК білок p53 індукує зупинку клітинного циклу. Продукт гена p53 має М.м. 53кД і складається із 392 амінокислотних залишків. Він утворює тетрамерний комплекс, що здатний регулювати транскрипцію ряду генів, які мають у своєму складі специфічні послідовності ДНК, так звані p53-респонсивні елементи. У молекулі p53 виділяють кілька функціональних доменів, що відіграють важливу роль у здійсненні чи регуляції його активності (рис. 6.19).

N-кінцева ділянка (амінокислоти 1–42) відповідає за транскрипційну активацію генів-мішеней. Крім того, цей домен бере участь у білок-білкових взаємодіях, що регулюють стабільність молекули p53. Нарешті, у ньому локалізовано кілька залишків серину і треоніну, фосфорилування яких регулює активність p53. Центральний домен p53 (амінокислоти 120–290) безпосередньо розпізнає і зв'язує специфічні послідовності ДНК генів, які регулюються – p53-респонсивні елементи, що складаються із розташованих одна за одною послідовностей із загальною структурою типу PuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPu (Pu – пурин, Py – піримідин). Далі містяться ділянки, що відповідають за ядерну локалізацію (амінокислоти 305–323) та димеризацію/тетрамеризацію молекул p53 (амінокислоти 323–356). С-кінцева ділянка p53 (амінокислоти 363–392) є так званим інгібіторним доменом. У немодифікованому стані він запобігає посадці ДНК-зв'язувального домену на специфічну послідовність гена, який регулюється.

РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ РЯДУ ГЕНІВ,
ЯКІ МАЮТЬ У СВОЄМУ СКЛАДІ
СПЕЦИФІЧНІ ПОСЛІДОВНОСТІ ДНК
(p53-РЕСПОНСИВНІ ЕЛЕМЕНТИ)

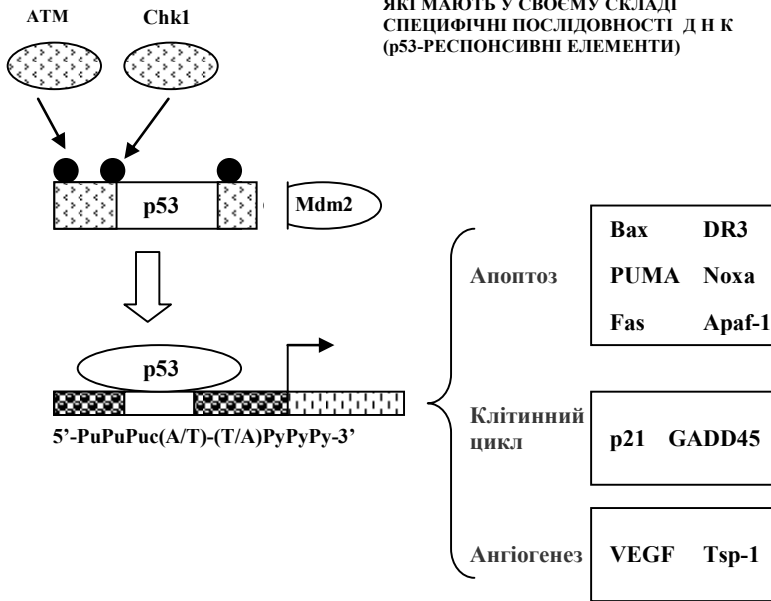


Рис. 6.19. Будова та регуляція експресії гена p53

У звичайних – нестресових – умовах практично весь p53 інактивується білком, що кодується протоонкогеном *mdm2* (від *turine double minute 2*) (рис. 6.20).

Білок Mdm2 є p53-специфічною убіквітинлігазою (підпід-розд. 5.2.3.1); крім того, при зв'язуванні з p53 він екранує його N-кінцевий транскрипційний домен. У результаті, незважаючи на постійну транскрипцію і трансляцію гена *p53*, утворений білок швидко підлягає убіквітинзалежній деградації. Не проявляє активності й та частина загального p53, яка не встигла розщепитися [Чумаков П. М.].

Після виникнення пошкоджень ДНК (наприклад, у відповідь на радіоактивне випромінювання, хіміотерапевтичні агенти та дію окисників) білки родини РІЗК-подібних кіназ фосфорилують p53 за залишком серину¹⁵ (Ser-15) (рис. 6.20).

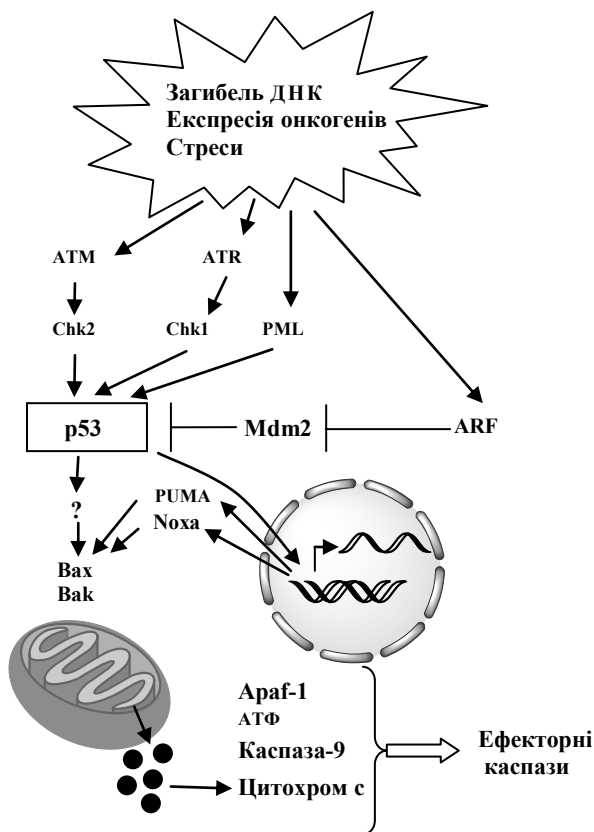


Рис. 6.20. Механізми функціонування білка p53

За іншими залишками цієї амінокислоти (Ser-20, Ser-33, Ser-37), а також у п'ятнадцятому положенні фосфорилювання можуть здійснювати Chk1 та Chk2, які, у свою чергу, самі активуються білками даної родини. Унаслідок таких модифікацій конформація N-кінцевої ділянки p53 змінюється так, що він втрачає здатність зв'язувати Mdm2. При цьому p53 стабілізується в ядрі та набуває здатності зв'язувати низку транскрипційних факторів. Після цих змін N-кінцевої ділянки транскрипційна активність p53 залишається невисокою. Для посилення транс-

крипційної активності модифікується С-кінець p53, що відповідає за зв'язування з ДНК. Ці зміни ініціює дефосфорилювання Ser-376, яке теж є наслідком пошкоджень ДНК.

Після описаних перетворень у структурі С-ділянки білка p53 з нею зв'язуються білки родини 14-3-3, унаслідок чого p53 набуває конформації, у якій його С-кінцеві залишки лізину можуть ацетилюватися. Ацетилювання цих груп значно підвищує спорідненість p53 до ДНК, його транскрипційна активність зростає і запускається експресія генів-мішеней [Чумаков П. М.].

До мішеней p53, залучених до зупинки клітинного циклу, належать білки p21, GADD45, 14-3-3-сигма, Вах, Puma, Noxa, Araf-1, Fas, DR5, які він активує, та Bcl-2 і Bcl-x_L, на які p53 має інгібіторний вплив.

Геномний стрес супроводжується посиленням утворенням ROS, і вже доведено участь Noxs і ROS у запуску ушкоджень ДНК [Jiang F. et al.]. Однак роль Noxs/ROS у передачі геномного сигналу вивчена недостатньо. Крім прямого впливу ROS на структуру ДНК, активні форми кисню можуть спричиняти активацію ферментів, які є членами родини PI3K-подібних кіназ. Також Noxs-генеровані ROS можуть фосфорилювати p53 і через активацію ERK-, p38- і JNK-каскадів MAPKs.

Подібно до ЕПР, *функціональний стан мітохондрій*, які є найпотужнішим джерелом ROS у клітині, в умовах клітинного стресу також змінюється. При цьому цитозольні ROS/RNS можуть стимулювати генерування ROS мітохондріями. Зокрема, утворений у цитозолі супероксид сприяє відкриттю мітохондріальних редокс-чутливих АТФ-залежних K⁺-каналів (*K_{ATP} channels*) у мітохондріальній мембрані. Це спричиняє вхід катіонів калію в матрикс і наступну деполяризацію мітохондріальної мембрани з одночасним розбуханням і залуженням матриксу. Наслідком цього, у свою чергу, є дисфункція дихального ланцюга і збільшення рівнів генерування ROS мітохондріями.

Пероксид водню, що генерується в мітохондрії із супероксиду під впливом мітохондріальної СОД, надалі здатний виходити в цитозоль і залучатися у регуляцію внутрішньоклітинних каскадів і функцій клітинних білків, у тому числі й тих, що беруть участь у активації НАДФН-оксидази.

ROS, генеровані мітохондріями, також залучаються у регуляцію мітохондріальних подій апоптозу і слугують захисним механізмом проти інфекції або інших клітинних ушкоджень за клітинного стресу. Так, вплив активних форм кисню може привести до раптового Ca^{2+} -залежного зростання проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани для розчинів з молекулярною масою менше 1,5 кД – явища, відомого під назвою МРТ (від *mitochondrial permeability transition*, зміна мітохондріальної проникності), яке є першопричиною загибелі клітини як апоптозної, так і некрозної [Kim J. et al.].

Одночасно з виникненням МРТ унаслідок миттєвого прориву зовнішньої мітохондріальної мембрани всередину матриксу надходить вода і спостерігається осмотичне розбухання органели. У результаті з мітохондріального міжмембранного простору в цитоплазму вивільнюються проапоптозні білки та іони кальцію, зупиняється синтез АТФ, редокс-чутливі молекули (НАДН, НАДФН) і глутатіон окиснюються, генеруються ROS, які спричиняють окиснення ліпідів, білків та нуклеїнових кислот.

Для МРТ існує кілька можливих механізмів, але ймовірнішим є відкриття так званої **пори зміни проникності** (РТР, *permeability transition pore*) діаметром 2,6–2,9 нм, основними компонентами якої є АНТ (від *adenin nucleotide translocator* – *транслокатор аденінового нуклеотиду*) і VDAC (від *voltage-dependent anion channel* – *потенціалзалежний аніонний канал* (рис. 6.21) [Остапченко Л.І. та ін., 2010].

Білок АНТ локалізований у внутрішній мітохондріальній мембрані. Це трансмембранний канал, він відповідає за експорт АТФ в обмін на АДФ (антипорт). Надекспресія АНТ у ракових клітинах людини індукує апоптоз.

VDAC, або порин, – білок, вбудований у зовнішню мітохондріальну мембрану й формує через неї неселективну пору. Завдяки в основному білок-білковим взаємодіям, комплекс {VDAC-АНТ} утворює пору РТР, сполучаючи внутрішню та зовнішню мітохондріальні мембрани в так звані "контактні ділянки".

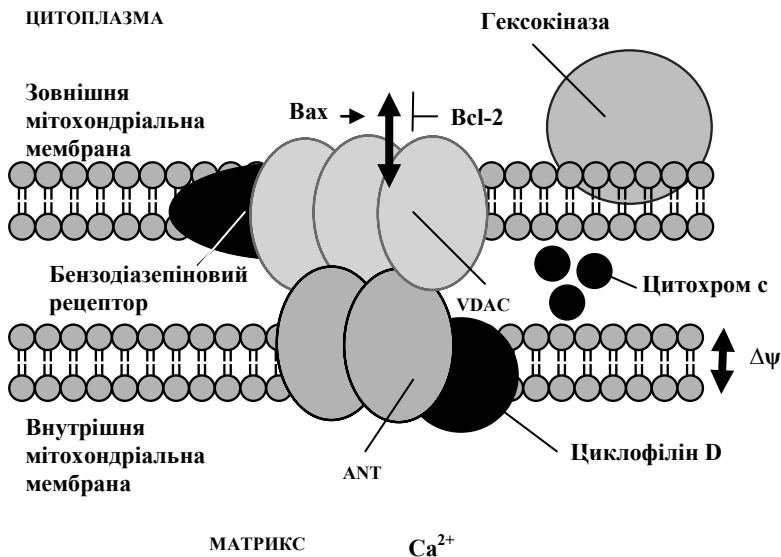


Рис. 6.21. Структура пори зміни проникності (РТП)

В утворенні РТП також задіяні:

- *циклофілін D* – пептидилпроліл-цис-транс-ізомераза матриксу, яка при асоціації з комплексом РТП (а саме – з ANT) надає їй чутливості до циклоспорину А;
- *гексокіназа* (взаємодіє із VDAC), креатинкіназа;
- периферійний *бензодіазепіновий рецептор* (також сполучається із VDAC);
- *Вах-подібні проапоптозні білки-члени родини Bcl-2*.

Оскільки зміна мітохондріальної проникності відбувається як при апоптозі, так і при некрозі, то існує фактор, що визначає шлях загибелі клітини, і одним із цих факторів є рівень АТФ у клітині. Відомо, що апоптоз потребує АТФ, тому, якщо при зміні мітохондріальної проникності вичерпується АТФ, наслідком стає некротична загибель клітини, тоді як за достатньої кількості АТФ розвивається апоптоз. Можливо, якщо з прогресією апоптозу АТФ буде вичерпуватися, одночасно з проявами останнього будуть з'являтися й ознаки вторинного некрозу.

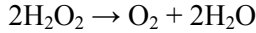
При окисному стресі активні форми кисню та азоту спричиняють нітрування (підпідрозд. 5.3.2.1) залишків тирозину в молекулі VDAC, формування дисульфідного зв'язку у структурі ANT і транслокацію регуляторної субодиниці циклофіліну D із матриксу до внутрішньої мембрани мітохондрії, що сприяє відкриттю РТР та вивільненню проапоптозних факторів у цитозоль [Daiber A.]. Іони кальцію, які також переходять у цитозоль, залучаються в активацію мультиплетних сигнальних шляхів, у тому числі Pkc- і MAPKs-залежних, що, у свою чергу, стимулюють численні біологічні молекули, зокрема Noxs.

ROS, генеровані у мітохондріях, також можуть сприяти інтенсифікації процесів ПОЛ у мембранах мітохондрій і виникненню мутацій у мітохондріальній ДНК (*mtДНК*). Показано, що в умовах окисного стресу ушкодження *mtДНК* є більш вираженими і тривалими, ніж аналогічні зміни в ядерній ДНК. Цей факт має кілька пояснень. По-перше, *mtДНК* не містить гістонів, які виступають протекторами проти ROS-викликаних ушкоджень. По-друге, *mtДНК* не має потужної системи репарації. Крім того, у структурі *mtДНК* виявлено дуже небагато некодуючих послідовностей, що підвищує ймовірність виникнення змін у тих ділянках ДНК, які кодують гени. Нарешті, *mtДНК* локалізована поруч із внутрішньою мітохондріальною мембраною, основним сайтом генерування вільних радикалів кисню [Kirkinezos I. et al.].

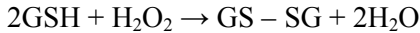
6.4. Основні механізми видалення H₂O₂: каталаза, глутатіонпероксидаза, пероксиредоксини

У нейтралізацію активних форм кисню залучаються ферментативні й неферментативні антиоксиданти (підрозд. 8.1). При цьому основна роль у відновленні пероксиду водню належить саме ферментативним антиоксидантам (каталазі, глутатіонпероксидазі, пероксиредоксинам тощо), тоді як α -токоферол, вітамін С, ліпоева й сечова кислоти та інші найважливіші антиоксидантні системи клітин мають низьку здатність знижувати його рівні.

Каталаза – це тетрамерний гемопротеїн (М. м. 240 кД), локалізований головним чином у пероксисомах, але він є і в цитозолі (нейтрофіли), і в мітохондріях (кардіоміоцити) деяких типів клітин і здатний більш ефективно нейтралізувати H_2O_2 за високих концентрацій субстрату:



Глутатіонпероксидаза – це тетрамерний селенопротеїн (М.м. 85 кД), що використовує відновлений глутатіон як косубстрат. Локалізована вона в цитоплазмі, у мітохондріях, у ядрі деяких типів клітин (гепатоцити, фібробласти, ентероцити):



Нещодавно ідентифіковані ферменти **пероксиредоксини** (*peroxyredoxines*, *Prxs*, К. Ф. 1.11.1.15.) поділяються на три класи: *типові 2-Cys-Prxs* (Prx1, 2 (цитоплазматичні), 3 (мітохондріальні), 4 (містяться в ЕПР та поза клітиною), *атипові 2-Cys-Prxs* (Prx5) та *1-Cys-Prxs* (Prx6) (рис. 6.22).

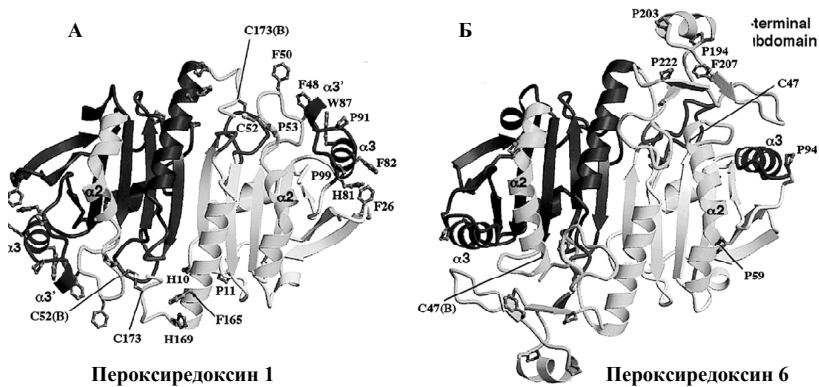
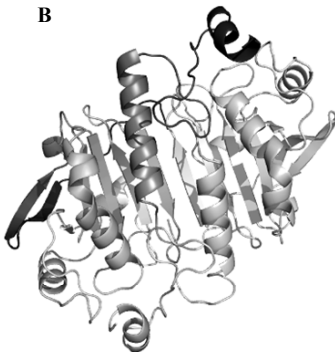


Рис. 6.22. Пероксиредоксини. А – схематична структура димеру Prx1 (представник 2-Cys-Prxs) із двома консервативними залишками цистеїну (N-кінцевого "пероксидазного" Cys-52 і С-кінцевого "дозвільного" Cys-173) у кожному мономері; Б – схематична структура представника 1-Cys-Prxs – Prx6, у молекулі якого відсутній С-термінальний "дозвільний" залишок цистеїну за наявності N-кінцевого Cys-47

Закінчення рис. 6.22.



Пероксиредоксин 4 (димер)



Пероксиредоксин 4 (декамер)

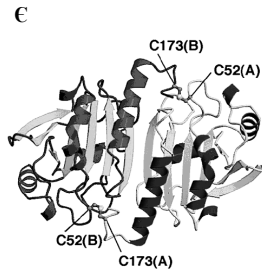
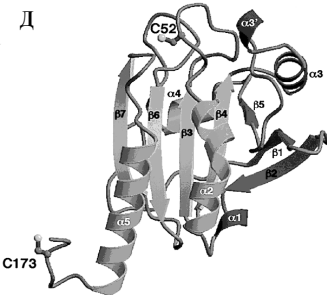


Рис. 6.22. Пероксиредоксины. В, Г – відповідно димерна і декамерна (складається із п'яти димерів) форми іншого представника 2-Cys-Prxs – Prx4 (утворення згаданих форм регулюється, зокрема, редокс-статусом клітини). У молекулі Prx4 "пероксидазним" залишком цистеїну є Cys-124, а "дозвільним" – Cys-245Д – схематична структура мономери Prx1 (показано консервативні залишки цистеїну). Є – схема формування міжмолекулярних дисульфідних зв'язків між консервативними залишками цистеїну при окисненні димеру Prx1

Ферменти всіх трьох класів містять консервативний N-кінцевий залишок Cys – "пероксидазний" цистеїн, який, взаємодіючи з пероксидом водню, окиснюється до цистеїнсульфенової кислоти. Prx1–5 мають додатковий залишок цистеїну на C-кінці – "дозвільний" цистеїн, а Prx6 – не мають.

Механізми реакцій за участю пероксиредоксинів різних класів є відмінними (рис. 6.23). Типові 2-Cys-Prxs проявляють свою пероксидазну активність у вигляді димерів (рис. 6.23, А, Г). У каталітичному циклі типових 2-Cys-Prxs консервативна SH-група цистеїну N-кінця одного мономеру ("пероксидазний" цистеїн) під дією H₂O₂ вибірково окиснюється до Cys–SOH (1), який надалі реагує з Cys–SH на C-кінці іншого мономеру ("дозвільний" цистеїн) з утворенням міжмолекулярного дисульфїду – на весь димер їх утворюється два (2). Сформовані дисульфїди надалі специфічно відновлюються за участю тіоредоксину або глутаредоксину (3). В умовах окисного стресу цистеїнсульфенова сполука (Cys–SOH) швидше окиснюється до цистеїнсульфінової (Cys–SO₂H) (4) та навіть цистеїнсульфенової (Cys–SO₃H) кислот.

Ці гіперокиснені форми цистеїну інактивують фермент; але є механізм, що дозволяє відновлювати сульфїнову похідну цистеїну зворотно до сульфенової похідної: цистеїнсульфінова кислота пероксиредоксину – єдина виявлена на сьогодні сульфїнова похідна в організмі, що може оборотно відновлюватися за участю ферменту *сульфіредоксину* (Srx) (К. Ф. 1.8.98.2). Така редукція потребує консервативного залишку цистеїну в молекулі Srx, гідролізу АТФ, Mg²⁺ і тіолів як донорів електронів (5).

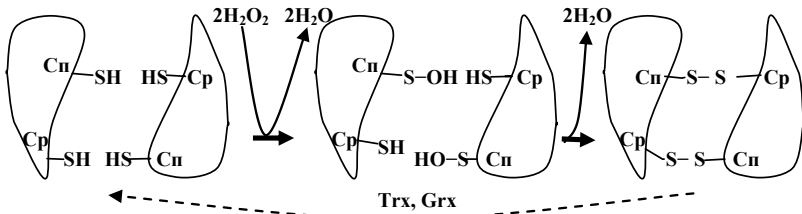
Атипові 2-Cys-Prx мають подібний механізм, проте і "пероксидазний", і "дозвільний" залишки Cys, що залучаються у формування дисульфїдного зв'язку, належать одній субодиноці, унаслідок чого формується не міжмолекулярний, а внутрішньомолекулярний дисульфїдний зв'язок, відновлення якого також можуть здійснювати тіоредоксин або глутаредоксин (рис. 6.23, Б).

1-Cys-Prx, що містять лише один консервативний залишок цистеїну, при окисненні формують цистеїнсульфенову кислоту, яка для відновлення потребує систем тіоредоксину або аскорбату (рис. 6.23, В).

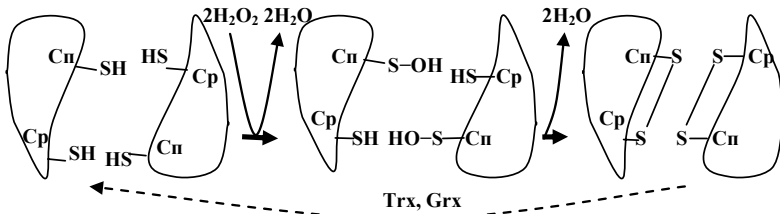
Нещодавно була виявлена нова функція більшості 2-Cys-Prx, не пов'язана з їхніми пероксидазними ефектами, – це їхня активність як молекулярного шаперона, наявність якої корелює зі ступенем олігомеризації ферменту.

Відповідно до сучасних уявлень, типові 2-Cys-Prx (наприклад, Prx1 та Prx4) можуть перебувати в різних конформаційних станах, перехід між якими виступає "перемикачем" функцій відповідного білка (рис. 6.24).

А ТИПОВІ 2-CYS-ПЕРОКСИРЕДОКСИНИ



Б АТИПОВІ 2-CYS-ПЕРОКСИРЕДОКСИНИ



В 1-CYS-ПЕРОКСИРЕДОКСИНИ

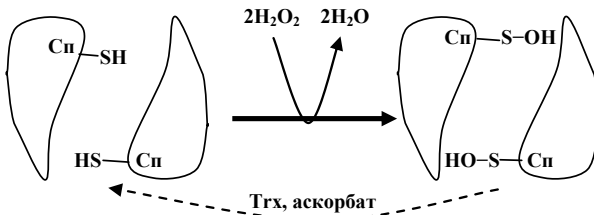


Рис. 6.23. Схема залучення пероксиредоксинів у відновлення H_2O_2 . А, Б, В – механізми функціонування типових, атипових 2-Cys-Prx та 1-Cys-Prx відповідно. Cp – "пероксидазний" цистеїн, Cr – "дозвільний" цистеїн, Trx – тіоредоксин, Grx – глутаредоксин, Srx – сульфїредоксин

Г ЦИКЛ ГІПЕРОКИСНЕННЯ ТИПОВИХ 2-CYS- ПЕРОКСИРЕДОКСИНІВ

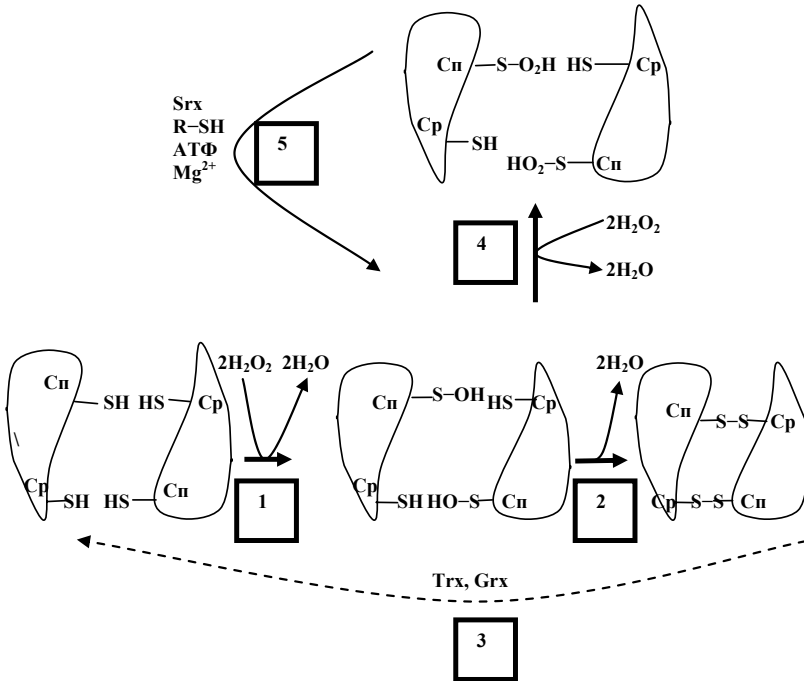


Рис. 6.23. Схема залучення пероксиредоксинів у відновлення H₂O₂:
 Г – цикл гіперокиснення типових 2-Cys-Prx. Cp – "пероксидазний" цистеїн, Cr – "дозвільний" цистеїн, Trx – тиоредоксин, Grx – глутаредоксин, Srx – сульфїредоксин

Мінімальна функціональна одиниця 2-Cys-Prx – це гомодимер, у межах якого може формуватися міжмолекулярний дисульфїдний зв'язок між пероксидазним та дозвільним цистеїнами різних субодиноць. Димери 2-Cys-Prx мають високу тенденцію до формування олігомерів (див. рис. 6.22, В, Г – відповідно димер і декамер Prx₄). Олігомерний стан цих білків залежить від редокс-статусу клітини, рН, іонної сили, а також від концентрації самих пероксиредоксинів.

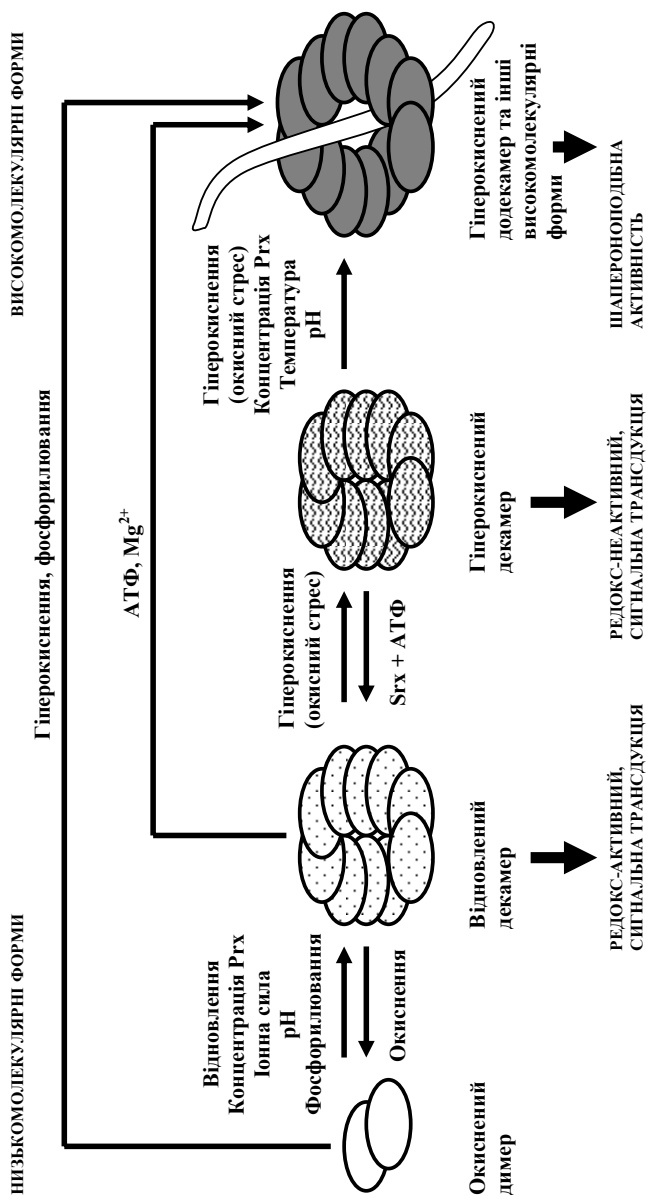


Рис. 6.24. Принципи формування олігомерних форм 2-Cys-Ptx та особливості їхніх функцій

Представники 2-Cys-Prx можуть існувати у вигляді:

- *відновленого гомодимеру* (із вільними тіоловими групами – таких димерів небагато, оскільки вони швидко асоціюють між собою);
- *окисненого гомодимеру* (із дисульфідними зв'язками);
- *гіперокисненого гомодимеру* (із залишками цистеїнсульфінової кислоти – кількість таких димерів, подібно до відновлених, є теж незначною);
- *відновленого гомодекамеру* (структури, що складається із п'яти димерів (сполучених між собою в основному за рахунок гідрофобних взаємодій, які додатково можуть стабілізуватися вандерваальсовими та (або) дисульфідними зв'язками (останнє – за наявності в молекулах індивідуальних пероксиредоксинів додаткових залишків цистеїну – напр., для Prx4 – Cys-51);
- *гіперокисненого гомодекамеру* (із залишками цистеїнсульфінової кислоти);
- *високомолекулярних похідних* (додекамеру тощо).

Критичним фактором, що визначає напрямок переходу (димер – декамер) є редокс-статус каталітичного залишку цистеїну: молекули пероксиредоксинів за наявності відновників формують декамер, який за фізіологічних низьких концентрацій H_2O_2 окиснюється і дисоціює на димери (рис. 6.24). Prxs у такому вигляді мають дві активності: крім власне пероксидазної, також можуть захищати білки від денатурації. Відновлений декамер проявляє більш виражену пероксидазну активність порівняно з окисненим димером.

Однак, в умовах оксидативного стресу, 2-Cys-Prxs швидко підлягають структурним змінам: при гіперокисненні декамеру у складі його мономерів формуються залишки цистеїнсульфінової кислоти, що сприяє стабілізації таких форм, а при подальшому окисненні – веде до перетворення на ще більш високомолекулярні комплекси (додекамери тощо), які втрачають пероксидазну активність (унаслідок формування цистеїнсульфенової кислоти) та функціонують як шаперони (рис. 6.24).

У присутності сульфїредоксину, що відновлює цистеїнсульфінову кислоту, високомолекулярні комплекси дисоціюють до димерів – це вмикає пероксидазну функцію Prx і знижує їхню шаперонову активність. Отже, відновлені та гіперокиснені димери легше формують декамери або додекамери, тоді як окиснені форми головним чином присутні у вигляді димерів.

Крім відновлювальних умов, формуванню декамеру сприяють високий вміст фосфатів, висока іонна сила, низький рН (перехід димер – декамер відбувається при зниженні рН від 8.0 до 7.5).

Утворення додекамеру – структури із шести димерів – та інших високомолекулярних форм (ще більш складних похідних декамерів), які проявляють функцію шаперонів, теж потребує дії певних чинників. Так, їхні формування можуть спричинити подальша гіпероксидація або більш виражене зниження рН, підвищення температури, дуже висока концентрації молекул пероксиредоксинів.

Атипові 2-Cys-Prxs також можуть підлягати олігомеризації, унаслідок якої змінюються їхні функції. При цьому формуються менші за М.м. утворення (димери, тетраметри, гексамери)) порівняно з типовими 2-Cys-Prxs (декамери й високомолекулярні форми). Що стосується 1-Cys-Prxs, то на сьогоднішні можливості цих білків утворювати агрегати є практично не дослідженими.

Прикладом того, яким чином активні форми кисню залучаються у внутрішньоклітинну сигналізацію, може бути їхня визначальна роль як перемикача між виживанням і загибеллю клітини. ROS, залежно від місця генерації, розповсюдження, типу вільних радикалів, тривалості й сили їхньої дії, а також від редокс-статусу клітини, можуть мати різні ефекти на сигнальні каскади клітини, транскрипційні фактори, окремі білки-ферменти, наслідком чого є спрямовування клітини на шлях виживання, проліферації або апоптозу. Так, низькі рівні ROS регулюють клітинну сигналізацію і відіграють важливу функцію у нормальній клітинній проліферації. Зниження

внутрішньоклітинного рівня GSH або посилення його окиснення до GS-SG, як і зростання генерації ROS, часто можуть виступати як проапоптозні фактори. При цьому активні форми кисню залучаються у різні фази й різні шляхи реалізації програмованої клітинної загибелі. За відсутності потужного окисного стресу клітини протекують від дії ROS шляхом зростання експресії гена природного антиоксиданту мітохондріального матриксу Mn²⁺-СОД. Клітинні антиоксиданти, зокрема GSH і Trx, не лише регулюють рівні ROS, але й діють як оборотні редокс-модифікатори активності низки білків/ферментів, причетних до механізмів апоптозу.

Разом із тим, ROS все ж таки не є класичним вторинним месенджером. По-перше, білки-мішені класичних вторинних месенджерів повинні мати специфічні зв'язувальні центри, при взаємодії з якими месенджери здійснюють свою регуляторну дію за рахунок зміни конформації білків-мішеней. Крім того, швидкість як продукції, так і розпаду вторинних месенджерів є набагато нижчою за швидкість продукції та розпаду ROS, що забезпечує надійну взаємодію ліганду (месенджеру) з активним центром мішені.

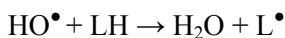
Розділ 7

УЧАСТЬ ПРОДУКТІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У СИГНАЛЬНИХ КАСКАДАХ

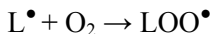
7.1. Стадії пероксидного окиснення ліпідів

В основі процесу пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) лежить викликане дією вільних радикалів окиснення поліненасичених жирних кислот у складі ліпідів, зокрема фосфоліпідів біологічних мембран [Niki E. et al.]. Сам процес характеризується генерацією цілої групи різних вільнорадикальних ліпідних форм, частина із яких сама спроможна поширювати ушкодження на сусідні ліпідні молекули, і може бути розбитий на чотири основні стадії: ініціацію, продовження, розгалуження і обрив ланцюга.

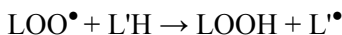
Ініціатором ПОЛ виступає HO^\bullet , який, будучи незарядженою малою часткою, вільно проникає у товщу гідрофобного ліпідного шару і вступає в хімічну взаємодію з поліненасиченими жирними кислотами у складі ліпідів (LH). Безпосередніми мішенями гідроксильного радикала при цьому є метиленові містки ($-\text{CH}_2-$), що містять особливо реактивні атоми водню і розділяють у молекулах поліненасичених жирних кислот окремі подвійні зв'язки. При цьому в ліпідному бішарі утворюються *ліпідні радикали* (L^\bullet):



L^\bullet вступає в реакцію з розчиненим у водному середовищі молекулярним киснем – при цьому утворюється новий вільний радикал – *радикал лінопероксиду* (LOO^\bullet):

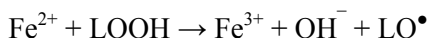


Продовження ланцюгової реакції полягає в тому, що радикал LOO^\bullet атакує одну із сусідніх молекул фосфоліпіду ($L'H$) з утворенням *гідропероксиду ліпиду* ($LOOH$) та нового радикала L'^\bullet :

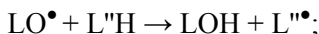


Чергування двох останніх реакцій і є ланцюговою реакцією ПОЛ.

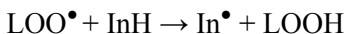
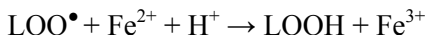
Розгалуження ланцюга потребує наявності невеликої кількості Fe^{2+} – тоді відбувається дихотомія ланцюгів через взаємодію Fe^{2+} із гідропероксидами ліпідів (*реакція Фентона*):



Утворені *алкоксильні радикали* LO^\bullet ініціюють нові ланцюги окиснення ліпідів:

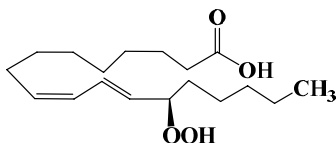


У біологічних мембранах ланцюги можуть мати понад 10 ланок. Але врешті-решт **ланцюг обривається** через взаємодію вільних радикалів з антиоксидантами (InH), іонами металів змінної валентності (наприклад, тими ж Fe^{2+}) або один з одним:

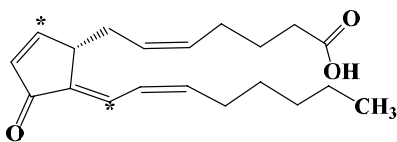


Остання реакція цікава тим, що вона супроводжується світінням (хемілюмінесценцією).

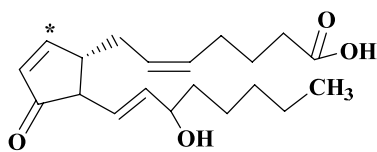
7.2. Продукти ПОЛ та їхній вплив на біологічні мембрани



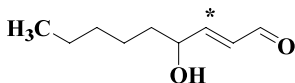
1 – 13-гідропероксіоктадекадієнова кислота
(продукт-похідна ферментативної дії
15-ліпоксигенази на лінолеву кислоту)



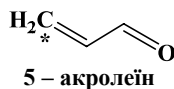
2 – 15-дезоксид- $\Delta^{12,14}$ -простагландин J2



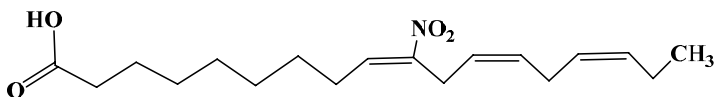
3 – ізопростан J2



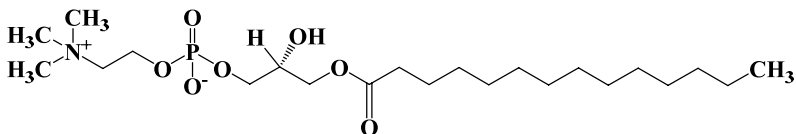
4 – 4-гідроксиноненаль (поряд із
гідропероксидами та малоновим
діальдегідом слугує маркером ПО).



5 – акролеїн



6 – нітроліноленова кислота



7 – лізофосфатидилхолін

Рис. 7.1. Основні продукти
пероксидного окиснення ліпідів

Основні реактивні продукти, утворені в процесі ПОЛ, можна віднести до одного із трьох класів: **пероксиди ліпідів** (наприклад, 13-гідроксіоктадекадієнова кислота – продукт-похідна ферментативної дії 15-ЛО на лінолеву кислоту), **реактивні ліпіди з електрофільними властивостями** (наприклад, 4-гідроксиноненаль, що поряд із малоновим діальдегідом є маркером ПОЛ) та рецепторні агоністи (зокрема, нітроліноленова кислота і лізофосфатидилхолін) (рис. 7.1).

Продукти ПОЛ можуть формувати похідні з неліпідними сполуками – білками і ДНК, мають пряму токсичність (наприклад, 4-гідроксиноненаль), спричиняють порушення мембраноасоційованих сигнальних шляхів, ушкодження ДНК та мутагенез. Загалом реакції ПОЛ можуть викликати функціональні зміни у мембранах, які впливають на плинність і роботу іонних каналів і транспортерів, функції сигнальних білків, сполучених із мембраною, і підвищують іонну проникність.

Узагальнені відомості щодо ефектів, які спричиняють продукти ПОЛ на мембранні компоненти – білки і ліпідний бішар – наведено в табл. 7.1.

Впливаючи на компоненти біологічних мембран, продукти ПОЛ залучаються в модуляцію сигнальних шляхів у клітині. Така модуляція може здійснюватися шляхом:

- *нековалентних модифікацій* (змін структурно-функціонального стану мембрани (плинності), які впливають на зв'язування лігандів із рецепторами та на активацію транспортних систем);
- *ковалентних модифікацій* (безпосередньої модифікації внутрішньомембранних білків-ферментів і транспортерів через їхні амінокислотні залишки);
- *активуючих сигнальних каскадів*, що зумовлюють вхід Ca^{2+} у клітину та (або) зростання внутрішньоклітинного синтезу ROS/RNS.

Таблиця 7.1. Особливості впливу процесів ПОЛ на компоненти біологічних мембран

Дія ПОЛ на мембранні білки	Дія ПОЛ на ліпідний бішар
Окиснення SH-груп	Збільшення проникності для іонів H^+ , що стає причиною "енергетичного голоду" клітини
Ушкодження транспортних систем, у тому числі мембранних АТФаз	Збільшення мікрров'язкості мембран
	Збільшення проникності для іонів Ca^{2+} , що впливають на внутрішньоклітинні сигнальні каскади
	Зміна проникності для іонів натрію, що спричиняє зміну поверхневого заряду мембран
	Зменшення гідрофобного об'єму
	Збільшення полярності ліпідної фази

Біологічними регуляторами, що впливають на сигнальні шляхи клітини, також виступають нітропохідні мембранних ліпідів, які утворюються через вплив активних форм азоту (наприклад, пероксинітриту), зокрема відносно стабільний нітролінолеат холестеролу, який виявляють у плазмі крові людини і в ліпопротеїнах. Більшість активних форм азоту, що індукують нітрування білків, здатні нітрувати ліпіди, тому нітровані мембрани і ліпопротеїни можуть передавати NO^{\bullet} -сиг-

нальні реакції та опосередковувати регуляторні шляхи сигналізації запалення. Нітрований лінолеат активує як цГМФ-залежні, так і незалежні сигнальні шляхи. Наприклад, він індукує NO[•]-залежну, цГМФ-опосередковану релаксацію гладком'язових клітин, інгібує тромбін-опосередковану агрегацію тромбоцитів людини через цАМФ-залежні механізми, значно знижує мобілізацію Ca²⁺ і посилює фосфорилування стимульованих вазодилаторами фосфопротеїнів через активацію цАМФ-залежної ПкА. Опосередковане нітролінолеатом зростання цАМФ відбувається головним чином унаслідок інгібування фосфодіестерази – ферменту, що відповідає за гідроліз цАМФ, і через активацію аденілатциклази [Finkel T.].

Розділ 8

АНТИОКСИДАНТНІ СИСТЕМИ ЯК МОДУЛЯТОРИ РЕДОКС-СИГНАЛІЗАЦІЇ

8.1. Неферментативні й ферментативні антиоксиданти

Загальну класифікацію компонентів антиоксидантного захисту організму наведено на рис 8.1.

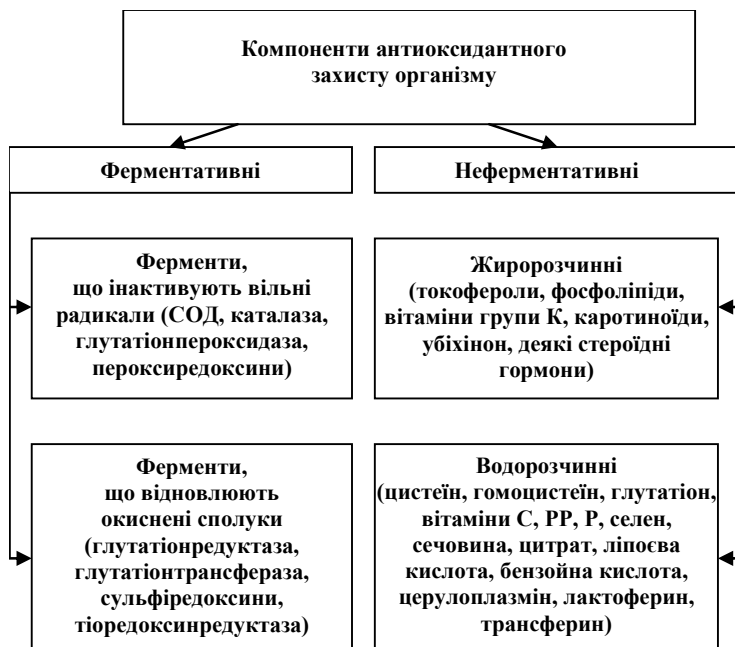


Рис. 8.1. Класифікація компонентів антиоксидантного захисту

Деякі речовини, що належать до групи **неферментативних антиоксидантів**, мають рухливий атом водню і тому реагують з вільними радикалами і каталізаторами вільнорадикального окиснення (наприклад, іонами перехідних металів). Рухливість атома Н зумовлена нестійким зв'язком між атомами С–Н і S–Н. У результаті виникають малоактивні радикали самого антиоксиданту, які нездатні до продовження ланцюгової реакції, є малоактивними й виводяться із організму:



Однак накопичення радикалів антиоксидантів у клітині є небажаним. У ряді випадків антиоксиданти не обривають, а уповільнюють ланцюгову реакцію. Такий антиоксидантний захист спрямований проти всіх видів радикалів, що утворюються у клітині.

Інші неферментативні антиоксиданти, наприклад, *аскорбінова* та *ліпоева кислоти*, можуть існувати в різних редокс-формах – при взаємодії з окисником вони переходять із відновленого стану в окиснений. Для регенерації вихідної форми цих сполук необхідна активність відповідних ферментів (рис. 8.2).

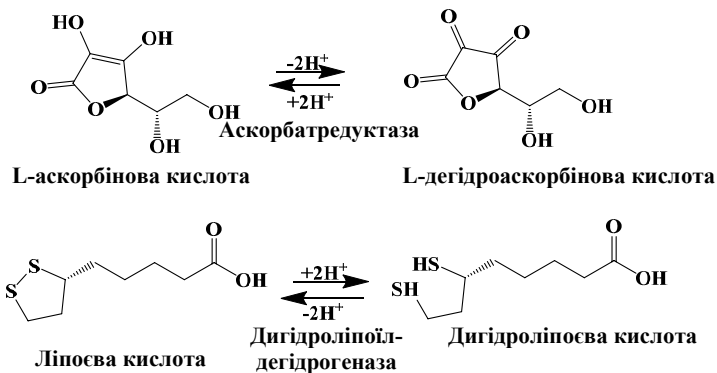


Рис. 8.2. Схема редокс-властивостей аскорбінової та ліпоевої кислот

Найважливішою ланкою неферментативної антиоксидантної системи організму є й хелатні сполуки – феритин, гемосидерин, трансферин, сечова кислота та інші, що здатні зв'язувати іони металів перехідної валентності й таким чином нейтралізувати основні каталізатори вільнорадикального окиснення в організмі.

Жиророзчинні неферментативні антиоксиданти (наприклад, вітаміни Е, А та каротиноїди, убіхінон, естрогени) діють на рівні біологічних мембран, а водорозчинні (вітамін С, глутатіон, ліпоева кислота, біофлавоноїди, трансферин, лактоферин, феритин, сечовина) – у цитоплазмі клітин, міжклітинній рідині, плазмі крові та в лімфі [Казимирко В. К. и др.].

Ферментативні антиоксиданти класифікують у чотири рівні захисту клітини від дії активних форм кисню (рис. 8.3).

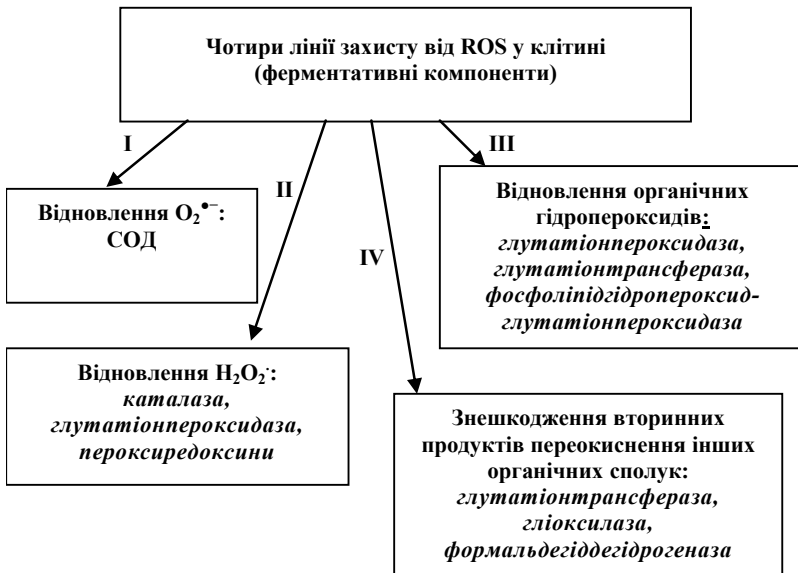
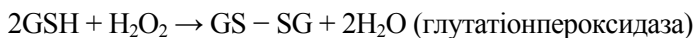
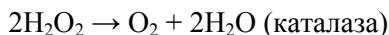


Рис. 8.3. Ферментативні антиоксиданти:
чотири лінії захисту

Першу лінію захисту клітин від дії ROS – на рівні відновлення $O_2^{\bullet-}$ – здійснює металофермент *супероксиддисмутаза*, що каталізує дисмутацію $O_2^{\bullet-}$ до H_2O_2 і O_2 . Виявлено три типи СОД:

- Cu, Zn²⁺-СОД (цитоплазматична)
- Mn-СОД (мітохондріальна)
- ЕС-СОД (Cu, Zn²⁺-СОД позаклітинного матриксу, від *extracellular matrix*)

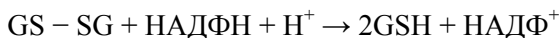
Друга лінія захисту передбачає відновлення H_2O_2 і потребує кількох ферментів – *каталази*, *глутатіонпероксидази* і *перокси-редоксинів* (підрозд. 6.4).



На третій лінії ферментативного антиоксидантного захисту здійснюється відновлення органічних гідропероксидів:



Цю реакцію можуть каталізувати два ферменти – *глутатіонпероксидаза* (*glutathionperoxidase, GP*) і *глутатіонтрансфераза* (*glutathiontransferase, GT*). Остання, на відміну від глутатіонпероксидази, нездатна впливати на пероксид водню, і відновлює лише ROOH – один із її ізоферментів міститься безпосередньо у хроматині й відновлює ROOH ДНК у ядрі. Ще один фермент – *фосфоліпідгідропероксидглутатіонпероксидаза* – відновлює ROOH жирних кислот у складі фосфоліпідів (для цього не потрібний попередній гідроліз останніх). Допоміжним ферментом цієї лінії є **глутатіонредуктаза** (GR), що регенерує GSH із GS-SG шляхом НАДФН-залежного відновлення:



Отже, три перші лінії захисту зменшують або навіть запобігають прогресуванню ПОЛ і окисній модифікації нуклеїнових кислот і білків, тоді як **четверта лінія захисту** необхідна для знешкодження вторинних метаболітів окисної модифікації:

- *глутатіонтрансфераза* кон'югує з відновленим глутатіоном низку окиснених сполук, у тому числі основні продукти ПОЛ – 4-гідроксіалкени та шкідливі епоксиди;

- *формальдегіддегідрогеназа* і *гліоксалаза*, які використовують GSH як кофермент, окиснюють свої субстрати до органічних кислот;
- *альдегіддегідрогеназа* окиснює малоновий діальдегід;
- *хінонредуктаза (ДТ-діафораза)* забезпечує двоелектронне відновлення хінонів у дигідрохінони, що запобігає утворенню шкідливих продуктів одноелектронного відновлення – семіхінонів;
- *епоксидгідралаза* гідратує епоксиди з утворенням діолів.

8.2. Глутатіон як головний компонент системи антиоксидантного захисту

В антиоксидантній системі особливо важливою є роль *глутатіону*, який є головним відновником клітини, концентрація якого (1–10 мМ) є вищою, ніж вміст більшості органічних сполук. Як і інші низькомолекулярні антиоксиданти, він здатний безпосередньо відновлювати ROS, але одночасно функціонує і на трьох лініях ферментативного захисту (відновлення H₂O₂, ROOH та знешкодження вторинних метаболітів окисної модифікації) із чотирьох (рис. 8.3). Глутатіонзалежні ферменти працюють в усіх частинах клітини, у тому числі у ядрі, мітохондріях та ЕПР [Kidd P.].

Глутатіон є трипептидом (*L-γ-глутаміл-L-цистеїніл-L-гліцин*), який у клітині існує у двох формах (рис. 8.4):

- *відновлена* – GSH
- *окиснена* – GS–SG (глутатіондисульфід)

Глутатіон присутній у всіх тканинах організму, основна його кількість міститься в цитоплазмі. Синтезується ця сполука у печінці, з неї із жовчю надходить у кишечник, звідти у плазму крові, а з крові – у клітини. Останній етап лімітується ферментом γ -глутамілцистеїнілсинтетазою.

Вміст окисненого глутатіону в нормі становить лише 10 % від загального вмісту цього трипептиду. Відношення GS–SG / GSH для певної тканини є величиною сталою, зростання якої є чутливим індикатором окисного стресу.

Крім залучення в роботу антиоксидантних систем клітин, глутатіон має цілу низку інших функцій в організмі. Так, він здійснює відновлення та ізомеризацію зв'язків $-S-S-$, через що впливає на активність ферментів (адже низка ферментів, наприклад, аденілатциклаза, глюкозо-6-фосфатфосфатаза, піруваткіназа, Ca^{2+} -АТФаза, регулюються окисно-відновним балансом або прямо – через окиснення їхніх SH-груп, або опосередковано, зокрема через зміну внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+}).

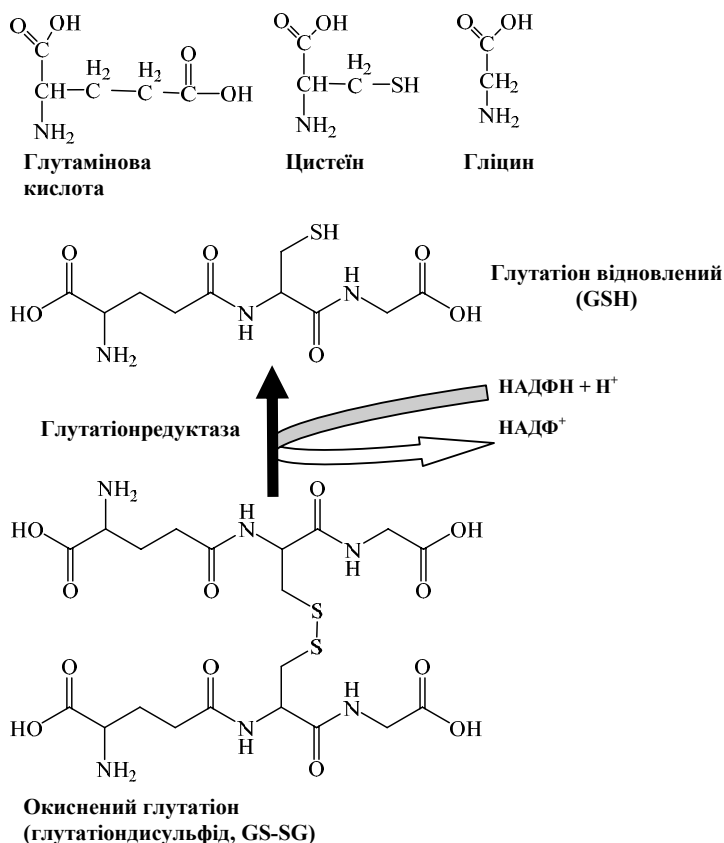


Рис. 8.4. Структура глутатіону та його редокс-форми

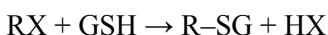
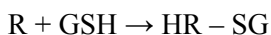
Глутатіон також виконує коферментні функції, бере участь у знешкодженні ксенобіотиків у печінці шляхом кон'югації, залучається в обмін ейкозаноїдів, впливає на біосинтез нуклеїнових кислот і білка, є резервом цистеїну, підтримує тіоловий редокс-потенціал клітин, посилює резистентність клітин до шкідливих впливів, має значення для проліферації, клітинного дозрівання та росту.

Синтез глутатіону є АТФ-залежним процесом, який має дві стадії та, відповідно, потребує участі двох ферментів – *γ-глутамілцистеїнсинтетази* та *глутатіонсинтетази*.

За фізіологічних умов уміст цистеїну лімітує синтез глутатіону. Перший фермент є регуляторним – його активність інгібується вмістом відновленого глутатіону, а зниження рівня GSH у тканинах посилює інтенсивність даного процесу.

Етапи біосинтезу й деградації ендogenousного глутатіону до відповідних амінокислот тісно пов'язані з одним із механізмів транспорту амінокислот із просвіту тонкого кишечника у клітини, а саме з **γ-глутамільним циклом (циклом Мейстера)** (рис. 8.5). Це активний процес, що потребує енергії; у ньому беруть участь 6 ферментів і глутатіон. Ключовим ферментом є мембранозв'язана *γ-глутамілтрансфераза*, яка каталізує перенесення *γ-глутамільної* групи від глутатіону на амінокислоту, що транспортується; надалі комплекс {*γ-глутаміл-амінокислота*} надходить у клітину. Потім за участю ще п'ятох внутрішньоклітинних ферментів відбувається вивільнення із дипептиду вільної амінокислоти та ресинтез використаної на транспорт молекули глутатіону.

Деградація глутатіону потребує *γ-глутамілтрансферази*, яка відщеплює глутамін, і *дипептидаз*, що вивільнюють із утвореного дипептиду гліцин. Інший шлях деградації GSH передбачає початкове утворення в реакціях детоксикації глутатіонових кон'югатів:



Після цього утворені кон'югати перетворюються на меркаптурові кислоти або меркаптани, що виводяться через нирки із сечею.

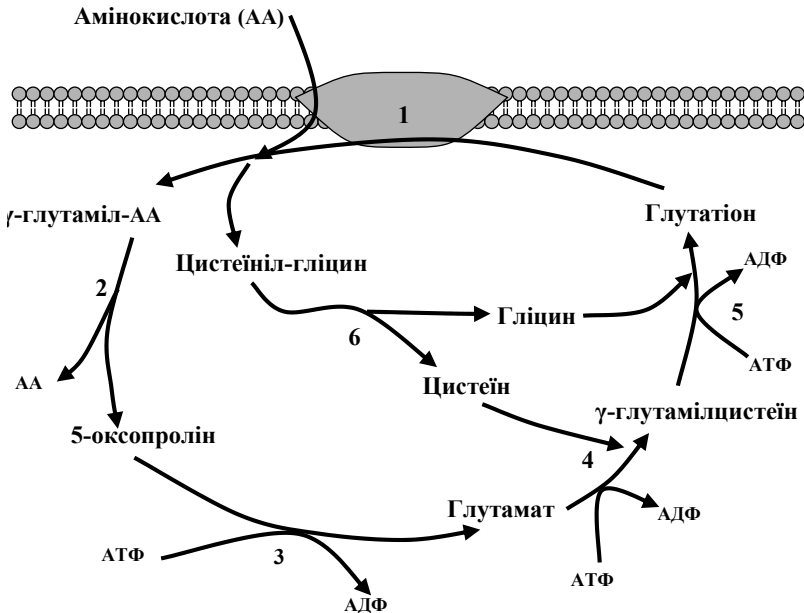


Рис. 8.5. Схема циклу Мейстера:
 1 – γ -глутамілтрансфераза; 2 – γ -глутамілциклотрансфераза;
 3 – 5-оксопроліназа; 4 – глутамілцистеїнсинтаза;
 5 – глутатіонсинтаза; 6 – дипептидаза

8.3. Компоненти глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи

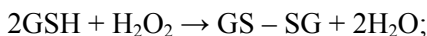
Основними компонентами глутатіон-антиоксидантної системи організму є:

- глутатіон;
- глутатіонпероксидаза;
- глутатіонредуктаза;

- НАДФН;
- глутатіонтрансфераза.

Пентозофосфатний шлях відіграє важливу роль у рециркуванні глутатіону, оскільки він постачає для роботи глутатіонредуктази НАДФН.

Глутатіонпероксидаза є селеноцистеїнвмісним білком (селеноцистеїн розташований у 41 положенні), що має 4 гомологічні субодиниці й каталізує реакції знешкодження пероксиду водню і органічних гідропероксидів:



Селеноцистеїн (рис. 8.6) відіграє ключову роль у каталізі й необхідний для синтезу глутатіонпероксидази: при аліментарній недостатності селену активність ферменту знижена. Фізіологічна роль GR полягає в її залученні до захисних реакцій організму, зокрема до процесів детоксикації активних форм кисню.

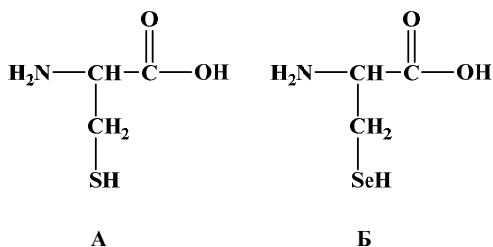


Рис. 8.6. Порівняльна структура цистеїну (А) і селеноцистеїну (Б)

Інший компонент глутатіон-антиоксидантної системи – **глутатіонредуктаза** – локалізована в мітохондріях і ЕПР та підтримує достатній рівень відновленого глутатіону (і низький – окисненого) шляхом відновлення його дисульфідної (окисненої) форми за участю НАДФН. Для клітини є вигідним саме такий шлях поповнення пулу GSH, адже на його синтез *de novo* необхідно витратити АТФ. GR є гомодимерним флавопротеїном,

високоспецифічним до НАДФН і окисненого глутатіону: накопичення останнього завжди спричиняє його відновлення цим ферментом.



Обидва розглянуті ферменти-компоненти глутатіонової антиоксидантної системи – GP і GR – працюють спряжено, адже під час перебігу глутатіонпероксидазної реакції утворюється глутатіондисульфід, і для збереження редокс-статусу клітини стає необхідним його відновлення за участю другого ферменту (рис. 8.7).

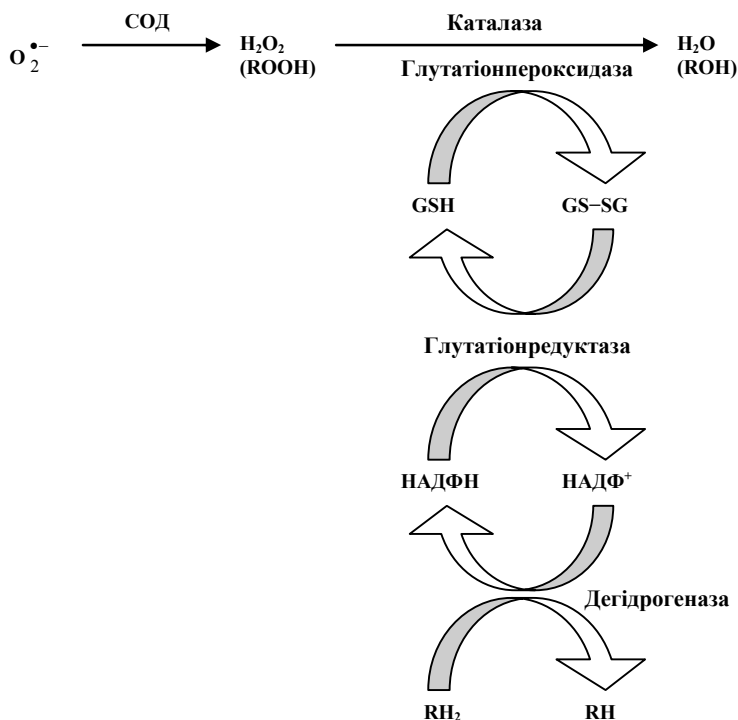


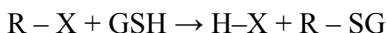
Рис. 8.7. Спряженість функціонування глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази

Ще один фермент глутатіон-антиоксидантної системи – *глутатіонтрансфераза* – каталізує реакції знешкодження органічних гідропероксидів, тобто діє аналогічно глутатіонпероксидазі, а також залучається у детоксикацію мітогенних і мутагенних сполук і продуктів окисного стресу, відновлення окиснених ацилів фосфоліпідів, бере участь у метаболізмі ксенобіотиків у печінці.

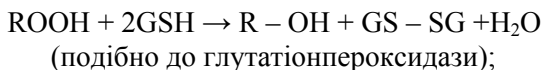
ГТ каталізує наступні типи реакцій:

1) Приєднання до субстратів цілої молекули GSH (за цією схемою ідуть процеси детоксикації різних органічних субстратів у печінці шляхом кон'югації з глутатіоном);

2) Нуклеофільне заміщення:



3) Відновлення органічних пероксидів (гідропероксидів та ендпероксидів) до спиртів:

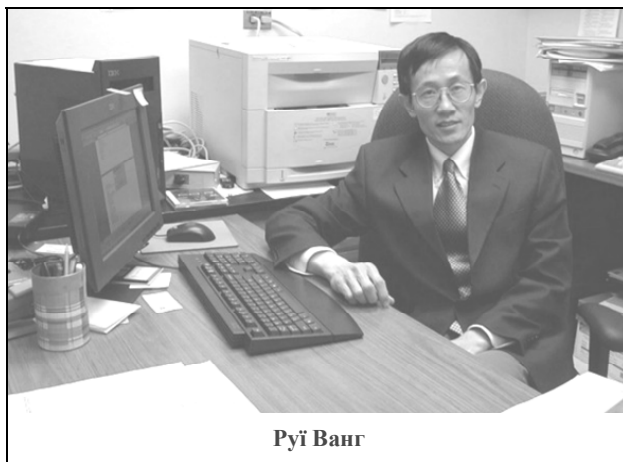


4) Ізомеризація (проміжне приєднання GSH).

Розділ 9

СУЛЬФІД ВОДНЮ І МОНООКСИД ВУГЛЕЦЮ ЯК ГАЗОТРАНСМІТЕРИ

Термін "газотрансмітери" вперше був використаний у 2002 р. (Р. Ванг та співавт.) для узагальненої назви класу ендогенних газоподібних сполук, що генеруються в організмі у відповідь на низку стимулів. Тепер до цієї групи сигнальних молекул відносять оксид азоту (NO), монооксид вуглецю (CO) і сульфід водню (H₂S), які в малих дозах спричиняють біологічну відповідь, а у великих є токсинами [Wang R.].



Руй Ванг

На відміну від нейротрансмітерів, газотрансмітери не упаковуються у везикули, оскільки синтезуються дуже швидко у відповідь на дію стимулу, а при вивільненні не підлягають екзоцитозу.

Тоді як класичні сигнальні молекули взаємодіють із рецепторами і таким чином включають внутрішньоклітинні сигнальні каскади, газотрансмітери потрапляють у клітину шляхом дифузії, не потребуючи рецепторів для ініціації внутрішньоклітинних сигналів, і хімічно модифікують клітинні мішені. Наприклад, NO спричиняє нітрозилування, а H_2S – сульфідрування білків-мішеней. Через посттрансляційні модифікації газотрансмітери здатні спричиняти миттєві ефекти у клітині-мішені

Виявлення CO, NO і H_2S як малих сигнальних газотрансмітерів навело на думку, що ендогенно утворені гази можуть виконувати ключові біологічні функції й залучатися у патогенез ряду захворювань людини.

Сьогодні на предмет визначення можливих сигнальних властивостей у клітині досліджується кілька інших газів, зокрема ацетальдегід (CH_3CHO), діоксид сірки (SO_2), оксид динітрогену (N_2O) та амоній.

Для того, щоб сполука була віднесена до газотрансмітерів, вона повинна відповідати наступним критеріям:

- бути малою молекулою газоподібної речовини;
- проникати вільно через мембрану, не потребуючи рецепторів і везикуловивільнювальних процесів;
- мати ензиматичні шляхи ендогенного синтезу, причому її утворення має регулюватися фізіологічними стимулами;
- біологічні ефекти даної речовини повинні імітуватися введенням сполук-донорів даних молекул;
- мають бути наявні специфічні клітинні мішені (зокрема, для NO і CO – це розчинна гуанілатциклаза, а для сульфїду водню – АТФ-залежні K^+ канали (K_{ATP} -канали)).

9.1. Сульфід водню як сигнальна молекула

За останні 15 років було виявлено багато свідчень того, що H_2S є важливою сигнальною біомолекулою. Перші дані про біологічну роль фізіологічних концентрацій сульфиду водню в організмі стосувалися його впливу на нервову й судинну системи через модуляцію NMDA-рецепторів і K_{ATP} -каналів. Пізніше було виявлено цито- і кардіопротекторні властивості H_2S у цих системах, а також відмічено ефекти сульфиду водню на майже всі системи органів, його здатність регулювати вивільнення інсуліну, процеси поширення запалення, ангіогенез.

H_2S – газ, за своєю структурою дуже подібний до молекули води. Однак атом сірки в молекулі сульфиду водню є менш електронегативним, ніж кисень, а отже, і вся молекула є менш полярною, ніж молекула води.

Сульфід водню у водному середовищі дисоціює на катіон водню (H^+) та аніон гідросульфиду (HS^-). Останній у подальшому може розпадатися до H^+ і S^{2-} . За фізіологічних умов ($\text{pH} = 7,4$) третина сульфиду водню присутня у біологічних рідинах у недисоційованому вигляді, а S^{2-} узагалі не виявляється, оскільки HS^- дисоціює лише за високих значень pH . У крові ссавців H_2S присутній у мікромольних концентраціях (10–50 мкмоль).

9.1.1. Генерування й катаболізм сульфиду водню в організмі

Головним джерелом ендogenous сульфиду водню є два **піридоксаль-5-фосфатзалежні ферменти**, що утворюють сульфід водню із сірковмісної амінокислоти **L-цистеїну** – *цистатіонін- γ -ліаза* (*cystathionine- γ -lyase* (CSE), або *цистатіоназа*) та *цистатіонін- β -синтаза* (*cystathionine- β -synthase*, CBS). Ще одним H_2S -продукуючим ферментом є *3-меркаптопіруватсульфотрансфераза* (*3-mercaptopyruvate sulfurtransferase*, *3MST*), яка генерує H_2S із **3-меркаптопірувату** (3MP) (рис. 9.1) [Caliendo G. et al.].

Останній утворюється за дії *цистеїнамінотрансферази* (*cysteine aminotransferase*, CAT)) на цистеїн і α -кетоглутарат. Тіоредоксин і дигідроліпоєва кислота є ендogenousними відновлювальними кофакторами, які полегшують вивільнення сульфїду водню за дії 3MST. Цей 3MST/CAT шлях також регулюється вмістом Ca^{2+} , тоді як активність CBS підвищується за наявності S-аденозилметіонїну (*S-adenosyl methionine*, SAM).

CBS й CSE виявлено в різних клітинах людини та ссавців, однак CBS є головним джерелом сірководню у центральній нервовій системі (у гіпокампі, мозочку, корі головного мозку та мозковому стовбурі активність CBS у 30 разів вища за активність CSE), а CSE – основним H_2S -продукуючим ферментом у серцево-судинній системі (аорта, артерії мезентерію, портална вена). У деяких тканинах, зокрема в печінці й нирках, у синтезі цього газотрансмітеру беруть участь обидва ферменти.

Класичною функцією ферменту **цистатіонін- γ -ліази** (К. Ф. 4.4.1.1) є перетворення цистатіонїну на цистеїн у реакції β -дисульфїдного елімінування з утворенням амонїю та α -кетобутирату як співпродуктів. Крім того, він причетний до перетворення цистину до тіоцистеїну, пірувату і NH_3 та цистеїну до пірувату, NH_3 та H_2S (рис. 9.1). Тіоцистеїн надалі реагує із цистеїном або іншими тіолами, продукуючи H_2S і цистин або інший відповідний дисульфїд.

Цей білок складається із 405 амінокислотних залишків, є тетрамером, сформованим двома гомодимерами, обидва з яких необхідні для формування активного центру й повної активності ферменту. Подібно до конститутивних ізоформ синтази оксиду азоту (eNOS, nNOS) і гемоксигенази (HO2) цистатіонінліаза є Ca^{2+} /KM-залежним ферментом.

Цистатіонін- β -синтаза (К. Ф. 4.2.1.22) є цистатіонін-формульним ферментом, що каталізує реакцію конденсації серину і гомоцистеїну шляхом β -транслокації OH-групи серину та тіолової групи гомоцистеїну з утворення кінцевих продуктів – H_2S та цистатіонїну.

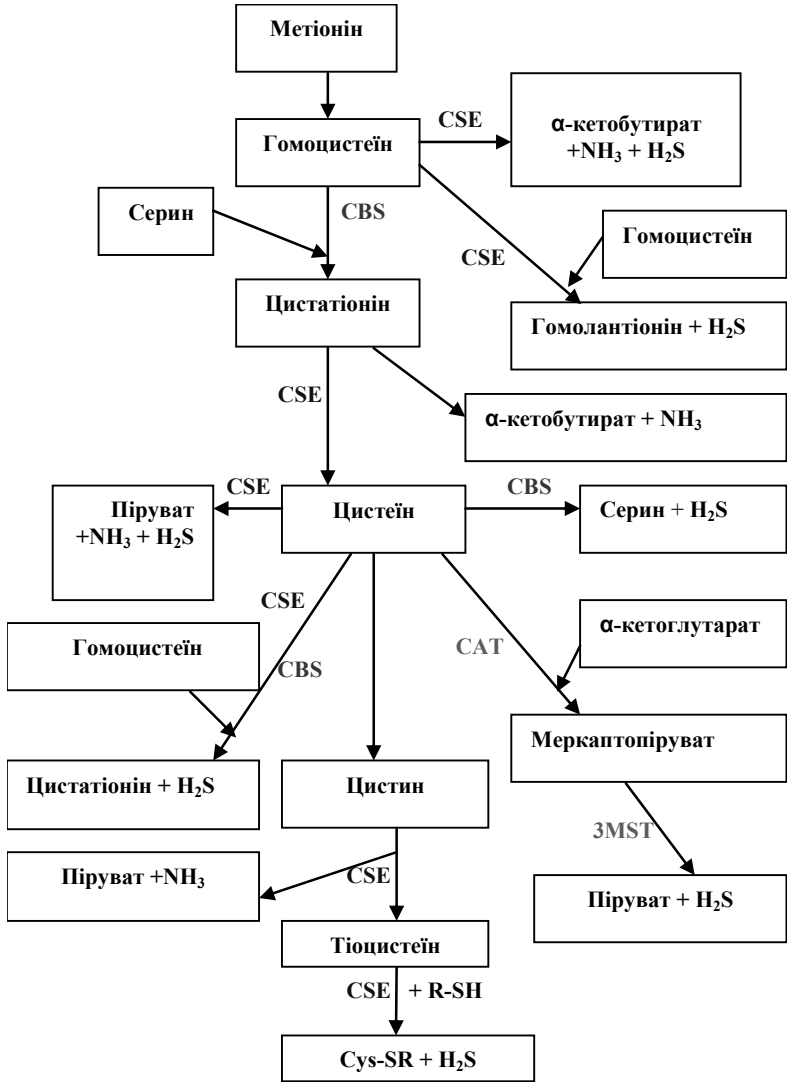


Рис. 9.1. Шляхи ендогенного утворення сульфїду водню

Молекула ферменту є гомотетрамером (М. м. кожної субодиниці 63 кД, 551 амінокислот); кожна субодиниця зв'язує два кофактори – піридоксаль-5-фосфат і гем – і обидва субстрати

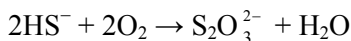
(гомоцистеїн і серин) та алостерично активується S-аденозил-L-метіоніном. Роль гему, локалізованого на N-кінці молекули, поки що нез'ясована – можливо, він виступає як редокс-сенсор. Крім того, гемове залізо може зв'язувати CO і NO, які в цьому випадку є інгібіторами ферменту, і це лише один із прикладів конвергенції сигнальних шляхів газотрансмітерів (CO, NO, H₂S). На C-кінці молекули фермент має два CBS-домени, які, імовірно, виступають інгібіторами ферментативної активності, оскільки втрата їх активує фермент. Ці ділянки молекули вважаються енергетичними сенсорами. Крім того, у CBS-домені молекула ферменту може підлягати СУМОїлюванню за залишком лізину-211. СУМОїлювання (підпідрозд. 9.2.2) визначає ядерну транслокацію ферменту та інгібує його каталітичну активність.

Фармакологічними інгібіторами обох ферментів є DL-пропаргілгліцин (*propargylglycine*, *PAG*) і β-ціаноаланін (*β-cyanoalanine*, *BCA*).

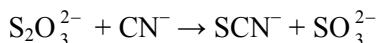
Координована дія двох інших ферментів – **3-меркаптопіруватсульфотрансферази** (К.Ф. 2.8.1.2) та **цистеїнамінотрансферази** (К.Ф. 2.6.1.3) – причетна до генерації H₂S із зв'язаної сірки, яка присутня у білках за наявності таких клітинних відновників, як глутатіон, цистеїн і дигідроліпоева кислота). Однак фізіологічне значення 3MST/CAT шляху та генерованого ним пулу сульфідів водню досі не встановлено.

Катаболізм сульфідів водню може йти за кількома основними шляхами (рис. 9.2).

Так, **H₂S швидко окиснюється (неферментативно), головним чином у мітохондріях, формуючи тіосульфат, який надалі перетворюється на сульфід і сульфат** (Т. Хілдебрендт, М. Грішабер, 2008) [Kimura H.]. Перша реакція функціонально пов'язана із транспортом електронів під час мітохондріального дихання:



друга потребує ферменту **роданези**, або **тіосульфат:ціанідсульфотрансферази** (*thiosulfate cyanide sulfurtransferase*, К. Ф. 2.8.1.1), що переносить сірку з тіосульфату на ціанід або інші акцептори:



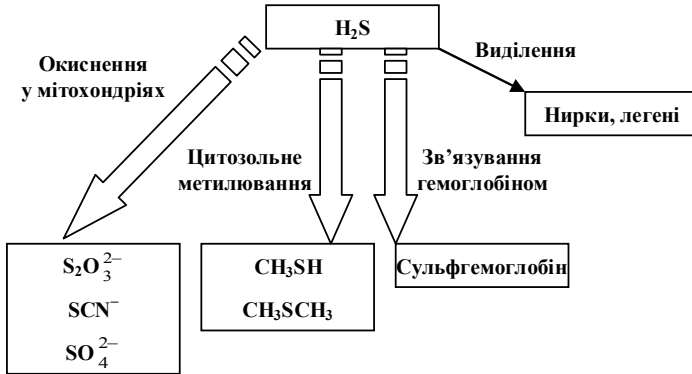


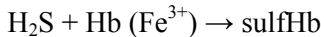
Рис. 9.2. Основні шляхи генерування та катаболізму сульфїду водню

Остання реакція здійснюється дуже швидко і каталізується **сульфїтоксидазою**. Таким чином, головним кінцевим продуктом метаболізму H_2S за фізіологічних умов є сульфат. Водночас, неспецифічним маркером продукції сульфїду водню є тиосульфат сечовини.

Іншим шляхом катаболізму H_2S є його метилювання **тіол-S-метилтрансферазою** до метилмеркаптану і надалі до диметилсульфїду (DMS). Ця реакція перебігає в цитозолі й особливо поширена у шлунково-кишковому тракті:



Також H_2S може зв'язуватися із метгемоглобіном, утворюючи сульфгемоглобін:



9.1.2. Біологічна роль сульфїду водню

Біологічну активність сульфїду водню досліджують, застосовуючи інгібітори H_2S -продукуючих ферментів, аналізуючи стан нокаутованих за відповідними генами тварин або використовуючи екзогенні донори цієї сполуки, зокрема $NaHS$. На цих моделях показано, що сульфід водню є важливим чинником, який регулює діяльність серцево-судинної, нервової, ендокринної систем, шлунково-кишкового тракту, має вплив на поширення запальних процесів, модулює експресію цитохром с-оксидази, VEGF, IGF, рецептора до TGF- β тощо (рис. 9.3) [Gadalla M. et al.].

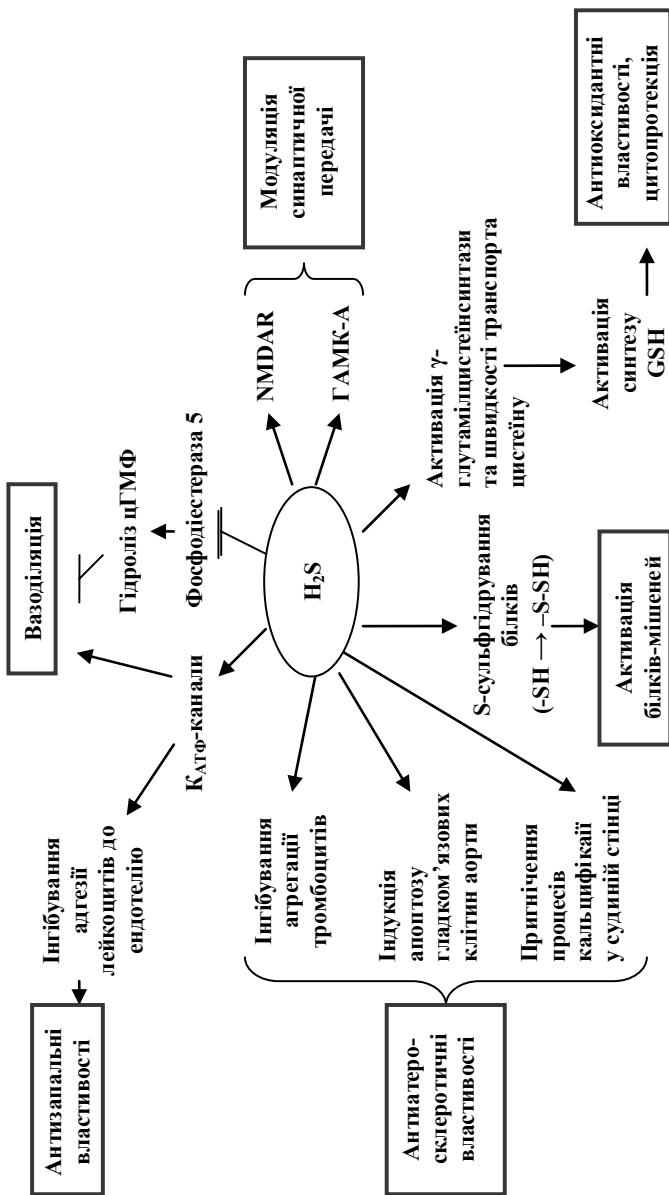


Рис. 9.3. Біологічні функції сульфїду водню

Сульфід водню в регуляції серцево-судинної системи. Після виявлення релаксуючого фактора, що виробляється ендотелієм (EDRF) спочатку його ідентифікували як NO. Надалі було показано, що всі три газотрансмітери – монооксид азоту, монооксид вуглецю та сульфід водню – є вазодилаторами, і механізми такої їхньої дії мають багато спільних рис [Вараксин А. А. и др.]. Підтвердженням цього став той факт, що судинорелаксуюча дія оксиду азоту лише частково знижувалася за дії інгібіторів eNOS або в нокаутованих за відповідним геном мишей, а найсильніше його дія щодо послаблення судин проявлялася у стінках великих судин (аорта).

Ферментом, який конститутивно продукує CO, є гемоксигеназа (HO2, підпідрозд. 9.2.1), котра, як і ендотеліальна синтаза оксиду азоту (eNOS, підпідрозд. 5.2.2), що продукує оксид азоту, розташована в ендотеліальному шарі судинної стінки. Пул H₂S, причетний до релаксації судин, також селективно міститься в ендотеліальному шарі кровоносних судин.

Основним H₂S-продукуючим ферментом у серцево-судинній системі є CSE, яка експресується у гладком'язових клітинах судин і не виявлена в ендотеліальних клітинах. Сульфід водню синтезується теж у гладком'язових клітинах судин і має вазорелаксуючі властивості у всіх хребетних – риб, амфібій, рептилій, птахів і ссавців та, імовірно, є філогенетично давнішим ендогенним вазорелаксантом, ніж оксид азоту, судинорозширювальні ефекти якого виникли у процесі еволюції вперше в амфібій.

Вазодилаторні ефекти оксиду азоту і CO опосередковані активацією розчинної гуанілатциклази (sGC). CO також здатний послаблювати стінки судин незалежно від цГМФ – через кальцієзалежні K⁺-канали високої провідності (BK_{Ca}, підпідрозд. 9.2.2). Інгібітори цих каналів блокують вазодилатацію, спричинену ендогенним CO, а інгібітори гемоксигенази знижують активність цих каналів. Інгібування sGC не впливає на CO-індуковану активацію BK_{Ca}-каналів. Дія CO на ці канали може включати зв'язування з гемом (за аналогією з тим, як оксид азоту сполучається з гемом sGC), оскільки α -субодинаця BK_{Ca} містить гем-

з'язувальну ділянку і приєднання гему інгібує його активність. Таким чином, CO може приєднуватися до канал-асоційованого гему і підвищувати активність каналу.

Одним із основних компонентів дії EDRF є гіперполяризація – феномен, який не притаманний sGC-опосередкованим ефектам. Ця компонента називається *гіперполяризуючий фактор, що виробляється ендотелієм* (EDHF). До сполук, які можуть спричиняти таку дію, належать простацикліни, котрі генеруються із арахідонової кислоти під впливом циклооксигенази, епоксиейкозатетраєнова кислота, що утворюється із арахідонату за дії цитохром P450-епоксигенази, пероксид водню, іони калію, C-тип натрійуретичного пептиду, оксид азоту. При цьому CSE-нокаутовані миші втрачають EDHF-активність на 80 %, що свідчить про вагомий внесок у гіперполяризацію H₂S.

Вазорелаксуючий ефект сульфїду водню нівелюється застосуванням інгібіторів *АТФ-чутливих K⁺-каналів*. Отже, вазорелаксацію спричиняє гіперполяризація, опосередкована відкриттям K_{АТФ}-каналів гладком'язових клітин. Їхнім фізіологічним активатором є мембранний фосфоліпід фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат. Здатність цього ліпїду зв'язуватися з K_{АТФ}-каналом знижена у тварин, нокаутованих за CSE або з дефектом цього ферменту, а донори H₂S здатні стимулювати їх сполучення.

Сульфїд водню здатний викликати *реакцію S-сульфїдрування (S-sulphydrating) залишків цистеїну в білках-мішенях* (аналогічно реакції S-нітрозилування за дії оксиду азоту, підпдрозд. 5.3.2.2). І якщо модифікація шляхом нітрозилування зазвичай інгібує ферменти, то сульфїдрування їх активує. Базальний рівень нітрозилування білків-мішеней становить лише 1–2 %, а для реакцій сульфїдрування – приблизно 10–25 %. Зокрема, молекула K_{АТФ}-каналу має дев'ять залишків цистеїну, які підлягають сульфїдруванню за дії H₂S.

Дефіцит H₂S приводить до розвитку артеріальної гіпертензії. Крім впливу на K_{АТФ}-канали, H₂S інгібує агрегацію тромбоцитів, пригнічує проліферацію та індукує апоптоз гладком'язо-

вих клітин аорти людини, знижуючи таким чином атеросклеротичні зрушення. Інший антиатерогенний ефект цього газотрансмітеру пов'язаний із його впливом на судинну запальну реакцію, яка відіграє значну роль у порушенні стійкості атеросклеротичних бляшок. Так, у пацієнтів з гіпертензією та (або) атеросклерозом часто спостерігається кальцифікація судин. Її розвиток знижує еластичність артерій, стимулює тромбоз і руйнування атеросклеротичних бляшок. Кальцифікація пов'язана з трансформацією гладком'язових клітин у остеобластоподібні елементи, що супроводжується експресією кислотої фосфатази і білків кісткової тканини – остеопонтину, остеокальцину й остеонектину. Донори H_2S запобігають кальцифікації, про що свідчить зниження вмісту кальцію в судинах, активності кислотої фосфатази та експресії остеопонтину.

Септичний шок характеризується генералізованою вазодилатацією і гіпотензією. Підвищена продукція NO та CO за участю відповідно iNOS та HO1 сприяє вазодилатації. При цьому також спостерігається надмірне утворення сульфиду водню.

Концентрація H_2S у плазмі крові негативно корелює з тиском крові та скорочуваністю міокарда, що вказує на його причетність до виникнення гемодинамічного колапсу, причому індукована ліпополісахаридом гіпотензія, імовірно, пов'язана з активацією K_{ATP} -каналів.

Сульфід водню не лише сприяє гіпотензії, але й посилює запальну відповідь і ушкодження в органах, пов'язані із сепсисом. Підвищення продукції сульфиду водню та експресії H_2S -генеруючих ферментів часом відмічають і при локалізованих формах запалення. Серед можливих механізмів подібних ефектів цього газотрансмітеру – підвищення рівнів субстанції P, індукція утворення прозапальних цитокінів і хемокінів через активацію ядерного транскрипційного фактора NF- κ B.

Разом із тим, існує багато свідчень того, що H_2S за інших умов може мати й антизапальну дію. Так, одним із ранніх проявів запалення є адгезія лейкоцитів до судинного ендотелію та наступна міграція їх у прилеглі тканини. Сульфід водню інгібує зв'язування лейкоцитів із ендотелієм та інфільтрацію цих

клітин. Антизапальні ефекти H_2S дозволяють використовувати донори цієї сполуки (наприклад, похідні діклофенаку) як терапевтичні агенти.

Сульфід водню в регуляції нервової системи. Селективна нейрональна локалізація nNOS і HO2 дає змогу охарактеризувати NO і CO як нейротрансмітери [Mancardia D. et al.]. Основним джерелом генерування сульфиду водню у ЦНС, зокрема в гіпокампі й мозочку, є Ca^{2+} /КМ-залежний фермент CBS, активність якого регулюється внутрішньоклітинною концентрацією кальцію, а також S-аденозилметіоніном, що є алостеричним активатором ферменту. За утворення цього газотрансмітеру у периферійній нервовій системі відповідає CSE.

Функції, які виконує H_2S у мозку, пов'язані з модуляцією синаптичної передачі, регуляцією гомеостазу кальцію, супресією окисного стресу, індукцією довготривалого потенціювання у гіпокампі, розвитком ексайтотоксичності, регуляцією кров'яного тиску в судинах мозку, підтримкою рівноваги між процесами збудження і гальмування у мозку, нейромодуляторною діяльністю у гліальних клітинах (астроцитах), регуляцією постнатального нейрогенезу тощо.

Сульфід водню виступає *модулятором функцій постсинаптичного NMDA-рецептора до глутамату*. Зокрема, цей газотрансмітер посилює продукцію цАМФ і спричиняє відповідну активацію PkA. Остання фосфорилує NMDA-R за специфічними сайтами. Таке фосфорилування підвищує чутливість рецептора до глутамату. Ще один механізм активуючого впливу H_2S на NMDA-R передбачає модуляцію редокс-потенціалу тіолових груп на позаклітинних доменах рецептора. Така стимуляція рецепторів спричиняє індукцію довготривалого потенціювання в гіпокампі; з іншого боку, вона сприяє розвитку явища ексайтотоксичності, яке причетне до патогенезу низки нейродегенеративних розладів. Тому інгібування синтезу H_2S у даному випадку може бути одним із терапевтичних напрямків, спрямованих на зниження токсичності глутамату і лікування таких захворювань, як хорея Гентінгтона, хвороби Альцгеймера і Паркінсона.

Сульфід водню *модулює активність рецепторів до γ -аміномасляної кислоти (ГАМК-В)*, розташованих на пре- та постси-

наптичних мембранах. Стимуляція постсинаптичних рецепторів генерує довготривале пригнічення постсинаптичних потенціалів. Це веде до зростання рівнів іонів калію і є необхідним для тонкого налаштування гальмівної нейропередачі. Збільшуючи ж приток іонів калію через K_{ATP} -канали, H_2S спричиняє гіперполяризацію.

Сульфід водню також *відіграє роль захисника нейронів від окисного стресу*. У мозку він проявляє нейропротективні властивості, подібні до ефектів відновленого глутатіону, який захищає цей орган шляхом уловлювання вільних радикалів та інших реактивних груп, видаляючи пероксид водню та органічні гідропероксиди (підрозд. 8.2), запобігаючи таким чином окисненню інших біомолекул.

Причиною подібності ефектів H_2S і глутатіону є здатність сульфїду водню збільшувати вміст GSH у клітинах за рахунок підвищення активності γ -глутамілцистеїнсинтази та швидкості транспорту цистеїну.

Сульфід водню у регуляції ендокринної системи. Сульфід водню *пригнічує секрецію інсуліну*. У регуляції секреції цього гормону головну роль відіграють K_{ATP} -канали панкреатичних β -клітин: H_2S -залежне відкриття цих каналів блокує секрецію інсуліну. Також відомо, що вміст цистеїну у плазмі крові та експресія CBS і CSE у різних тканинах хворих на цукровий діабет є підвищеними.

Сульфід водню у регуляції шлунково-кишкового тракту. CBS та CSE експресуються у слизовій оболонці шлунка, де ендогенний сульфід водню *виконує роль протективного фактора при ушкодженнях*. Ацетилсаліцилова кислота й нестероїдні антизапальні препарати знижують експресію гена CSE і продукцію H_2S у слизовій оболонці шлунка. Присутність сульфїду водню у слизовій оболонці стимулює розташовані поруч нервові закінчення, що спричиняє посилення секреції соляної кислоти.

CSE експресується у гепатоцитах та зірчастих клітинах печінки. Сульфід водню, генерований у цих клітинах, зумовлює *релаксацію стінки мікросудин печінки*.

Слизова оболонка товстого кишечника постійно підлягає впливу H_2S , який утворюється із сульфатів їжі бактеріями. Існує

думка, що газ бактеріального походження може спричиняти виникнення різних захворювань товстого кишечника, зокрема виразковий коліт і рак.

9.2. Монооксид вуглецю як сигнальна молекула

Майже століття монооксид вуглецю вважався "тихим убивцею" внаслідок його потужної афінності до гемоглобіну, яка у 240 разів вища за спорідненість до кисню. Присутність CO у крові вважали вкрай небажаним явищем, оскільки він легко витісняє кисень із оксигемоглобіну, наслідком чого стає гіпоксія тканин і загибель усього організму. Лише в 1968 р. з'явилася гіпотеза, що CO може утворюватися ендогенно при катаболізмі гему (Р. Тенхунен із колегами), але вона знайшла підтвердження набагато пізніше – тільки в 1993 р., коли М. Барінага встановив, що ендогенно синтезований CO є продуктом гемоксигенази. Того ж року С. Снайдер і А. Верма передбачили існування можливої фізіологічної ролі монооксиду вуглецю, і вже на 2005 р. дослідниками Р. Вангом і Л. Ву було зібрано багато даних, які свідчили про те, що CO має антизапальні, антиапоптозні й антипроліферативні властивості.

9.2.1. Шляхи ендогенного утворення і катаболізму монооксиду вуглецю

Основна кількість CO в організмі *утворюється при деградації гем-вмісних сполук – гемоглобіну й міоглобіну* (80% усього ендогенного CO), *а також цитохромів і низки металовмісних ферментів, що у своїй структурі містять тетрапірольне кільце (каталаза, пероксидаза, триптофанпіролаза, гуанілатциклаза, NO-синтаза тощо)* (20%) [Коржов В. И. и др.]. Конверсія гему в клітинах селезінки, печінки та кісткового мозку супроводжується утворенням CO, заліза й білівердину з наступним перетворенням останнього на білірубін (рис. 9.4). Вивільнене із гему залізо надалі реутилізується, а білірубін перетворюється на жовчні пігменти, які виводяться із організму.

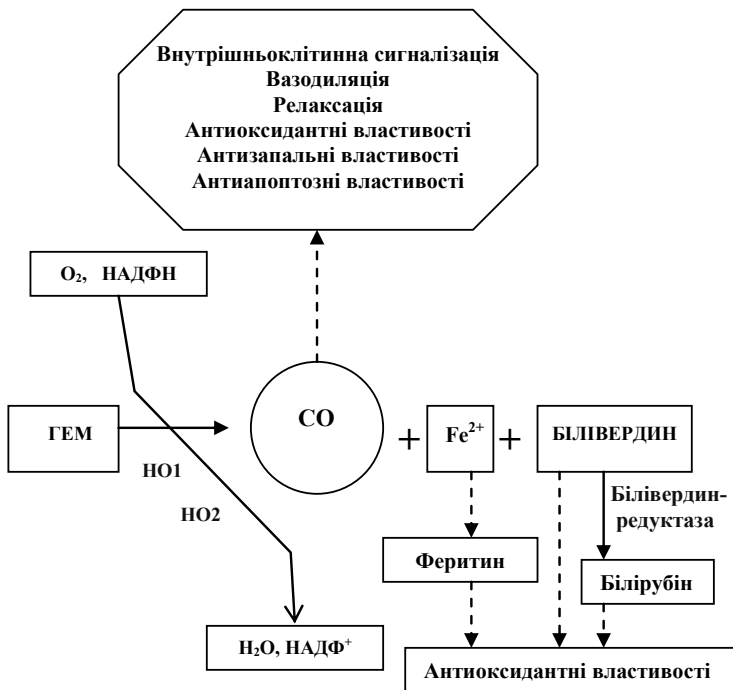


Рис. 9.4. Механізм генерування СО в організмі

СО формується дією ферменту *гемоксигенази* (*heme oxygenase*, *HO*, К. Ф. 1.14.99.3), який має три ізоформи, що кодуються трьома різними генами. Субстратом *НО* є *протопорфірин IX*. *НО* каталізує реакцію перетворення гему на білівердин – при цьому після розщеплення гемового кільця один фрагмент вуглецю вивільнюється як СО.

Ферментативний механізм катаболізму гему з утворенням СО до кінця не з'ясовано. Можливо, цей процес здійснюється у наступному порядку. Першим етапом є гідроксилування гему в мікросомальному електронотранспортному ланцюзі за участю *НО* і цитохрому Р-450. При цьому утворюється *α-гідроксигем*. На другому етапі відбувається спонтанний розрив порфіринового кільця з утворенням комплексу {білівердин – СО}. Комплекс надалі розпадається з вивільненням СО, а білівердин

відновлюється ферментом *білівердинредуктазою* до білірубіну. У процесі гідроксилування гем у бере участь пероксид водню, що генерується в мікросомальному електронотранспортному ланцюзі на рівні його початкової ділянки, де відбувається окиснення НАДФН флавопротеїном (підпідрозд. 6.1.4). Швидкість продукції СО в організмі людини – 20 мкмоль/год. Збільшення цього показника може виявлятися при астмі, бронхоектазії, кістозному фіброзі, інфекціях дихальних шляхів, ринітах, діабеті, метаболічному синдромі тощо.

НО каталізує швидкістьлімітуючий етап деградації гему до СО і білівердину. Для функціонування цього ферменту необхідні НАДФН, O_2 і флавопротеїнредуктаза (цитохром Р-450-редуктаза).

Індукція НО1 є адаптивним захисним механізмом клітин і тканин проти ушкоджень за різних розладів, що супроводжуються запаленням і оксидативним стресом, за яких зростає вміст вільного гему у крові. Безпосередніми індукторами для синтезу цього ензиму є різноманітні стресові стимули різної природи – гем і гем-похідні, важкі метали, ліпополісахарид, окиснені ліпіди, пероксид водню, деякі цитокіни (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , інтерферон- γ), гіпоксія, гіпероксія, гіпертермія, електромагнітне та іонізуюче випромінювання тощо.

Значна активність НО1 виявлена в нирках, печінці й селезінці – органах, причетних до руйнування гему. НО1 вважається мікросомальним білком, локалізованим в ендоплазматичному ретикулумі, проте його також виявляють у цитоплазмі, ядерному матриксі, пероксисомах і мітохондріях клітин зазначених органів.

Серед інших функцій НО1 варто відмітити наступні. НО1 відповідає за катаболізм гему "старих" еритроцитів. Він важливий у регуляції клітинної проліферації, диференціювання і апоптозу. НО1 є білком теплового шоку (за класифікацією цієї групи білків НО1 має назву HSP32) і виступає цитопротектором за дії окисників. Узагалі, фермент має антизапальні та антиоксидантні властивості й може використовуватися як терапевтична мішень, зокрема при лікуванні серцево-судинних захворювань.

Конститутивна ізоформа НО₂ присутня в багатьох органах і визначає швидкість деградації гемму в нормі. При цьому швидкістюлімітуючим фактором продукції СО за дії НО₂ є вміст вільного гемму. НО₂ виявлено в нейронах мозку, у нервових клітинах, які іннервують гладеньку мускулатуру, у клітинах ендотеліального шару кровоносних судин, у гепатоцитах і купферівських клітинах печінки. Цей фермент активується комплексом {Ca²⁺/КМ} і казеїнкіназою II; підвищують експресію гена, що кодує цю ізоформу НО, глюкокортикоїди та опіати.

Функція **НО₃** – *це однієї конститутивної ізоформи НО*, яка виявлена лише у тканинах щурів (мозок, печінка, нирки, селезінка) – лишається нез'ясованою. Структурно вона є подібною до НО₂, але майже не має каталітичної гемоксигеназної активності.

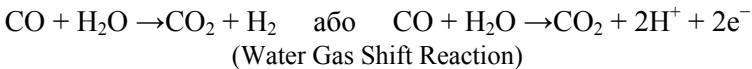
Однак гем не єдине джерело ендогенного СО в організмі. **Близько 14 % ендогенного монооксиду вуглецю походить із жирних кислот (реакції неферментативної аскорбатозалежної системи ПОЛ), а також утворюється у процесах фотоокиснення органічних сполук, метаболізму ксенобіотиків, під час діяльності певних видів бактерій.**

НО має високу чутливість до інгібуючої дії СО. Для інгібування активності НО на 50 % достатньо, щоб співвідношення О₂/СО становило 0,34. Висока чутливість до СО ферментативних систем, залучених у катаболізм гемму (НО й цитохрому Р450), дозволяє зрозуміти біологічну роль ендогенної продукції СО: *ендогенний СО є метаболітом, що регулює швидкість розпаду гемінових структур*. А саме, прискорення розпаду гемінових структур супроводжується інтенсифікацією ендогенного утворення СО. Надмірне ендогенне утворення СО приводить до пригнічення активності НО й цитохрому Р450 та зниження швидкості деградації гемму. Гальмування окисного руйнування тетрапіролових кілець, у свою чергу, зменшує продукцію ендогенного СО та сприяє послабленню його інгібуючої дії на НО й цитохром Р450. Отже, процес розпаду гемму, який супроводжується ендогенним утворенням СО, саморегулюється за принципом зворотного зв'язку, що забезпечує відносну постійність в організмі швидкості розпаду порфіринових структур.

Різноманітні фактори зовнішнього середовища й патологічні стани можуть впливати на швидкість утворення ендogenous CO в організмі. Так, синтез CO зростає у відповідь на підвищення цитозольної концентрації іонів кальцію, активацію протеїнкінази C й тирозинових протеїнкіназ.

Ендogenous утворений CO *виводиться із організму переважно через дихальні шляхи з повітрям, яке видихається, а також шляхом дифузії через шкіру або внаслідок транспорту в розчиненому стані із сечею і калом*. Існує також спеціальний механізм оборотного зв'язування CO гем-вмісними білковими структурами (гемоглобін, міоглобін, цитохром a3 тощо).

В аеробних бактерій є індукцибельний Мо-вмісний фермент **CO-оксидаза**, здатний окиснювати монооксид карбону до CO₂. **Цитохром с-оксидаза** в кардіоміоцитах також може здійснювати цю реакцію.

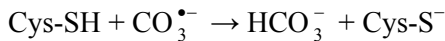


Окиснення CO до CO₂ за участю цитохром с-оксидази в організмі відбувається набагато повільніше, ніж його ендogenous утворення. Однак швидкість його окиснення зростає пропорційно тканинному резерву CO.

У клітинах завжди присутній пероксинітрит, що формується при взаємодії NO-радикала із супероксидним аніоном (підпідрозд. 5.3.2.1), який надалі спонтанно окиснюється до NO₃^{•-}. При реагуванні пероксинітриту із CO₂ здійснюється така реакція:



Утворений *радикал-аніон карбонату* (CO₃^{•-}) має довгий період напіврозпаду й може дифундувати та окиснювати клітинні мішені – залишки тирозину, триптофану, цистеїну у складі білків; меншу спорідненість ця сполука має до аланіну і гліцину.



Окрім впливу на амінокислотні залишки, радикал-аніон карбонату окиснює гуанінові основи у ДНК і, можливо, може мати вплив на перехідні метали у складі металопротеїнів та глікозаміноглікани.

9.2.2. Біологічна роль монооксиду вуглецю

Для вивчення ефектів монооксиду карбону застосовують донори цієї сполуки – CO-вивільнювальні молекули (*CO-releasing molecules, CO-RMs*) (рис. 9.5). Таким хімічним агентом, зокрема, є CORM II (*tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer*), що проявляє вазодилаторний, антиішемічний і антизапальний ефекти.

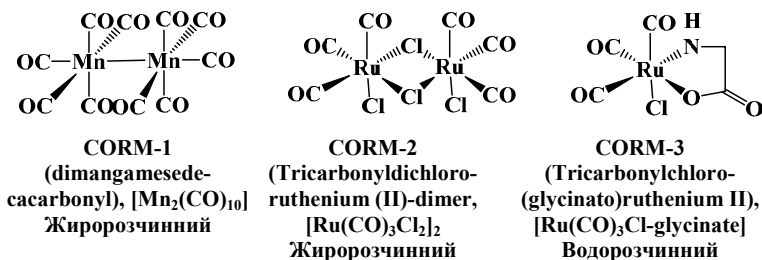


Рис. 9.5. Приклади *CO-RMs* – донорів CO

Біологічними мішенями CO у клітинах є структури, які містять або зв'язують гем [Rochette L. et al.]. Наприклад, зв'язування CO активує sGC, що веде до генерації цГМФ у цитозолі; інгібує відновлену форму НАДФН-оксидази у макрофагах; інгібує цитохром с-оксидазу. Крім того, CO може впливати через гем-зв'язувальні транскрипційні фактори, зокрема VACH1 і NPAS2. Інші мішені, що не містять гему або перехідних металів, наприклад MAPKs, модулюються CO через непрямі механізми.

Основною мішенню дії CO у клітині є sGC. CO, подібно до оксиду азоту, також активує цей фермент, але менш виражено. Зв'язування CO із залізом гему sGC змінює конформацію ферменту, що спричиняє його активацію і збільшення утворення із ГТФ цГМФ. Більшість ефектів цГМФ опосередковано цГМФ-залежною протеїнкіназою G. ПкG, зокрема, модулює

відкриття Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів високої провідності – BK_{Ca} – у гладком'язових клітинах, потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу, активує Ca^{2+} -АТФазу сарколеми, фосфатазу легкого ланцюга міозину – усе це веде до релаксації гладком'язових клітин судин. Цей ефект CO є подібним до дії оксиду азоту. До інших sGC-опосередкованих ефектів CO належать антизапальна дія, інгібування антитромбоцитарної активності, регуляція метаболізму глюкози.

Монооксид карбону *впливає на ROS-залежні сигнальні шляхи клітини*. CO може модулювати генерування супероксиду і пероксиду водню мітохондріальними й цитозольними джерелами. Така модуляція є одним із механізмів, за якими CO змінює перебіг головних сигнальних каскадів у клітині (зокрема, впливає на рівні Wax і Bid , стан фосфорилування Акт, активує $\text{NF-}\kappa\text{B}$, p38 MAPK , $\text{PPAR-}\gamma$, $\text{HIF-1}\alpha$ і $\text{TGF-}\beta$, посилює секрецію $\text{TNF-}\alpha$, інгібує ERK MAPK , стимулює експресію цикліну D, сприяє вивільненню цитохрому c із мітохондрій та пригнічує TLR -залежну сигналізацію).

На рівні мітохондрій *CO впливає не ланцюг транспорту електронів, зв'язуючись із термінальним ферментом ланцюга цитохром c-оксидазою* (комплекс 4) і модулюючи таким чином його активність. Як наслідок, CO спричиняє втрату електронів із електронотранспортного ланцюга, що, у свою чергу, веде до продукції ROS. Одночасно виявлено інгібуючі впливи монооксиду вуглецю на активність Mn-SOD . Аналогічні ефекти CO має на електронотранспортний ланцюг ЕПР на ділянці цитохрому P450. За недостатності аргініну CO сприяє синтезу супероксидного аніона ендотеліальною NOS. Загальним наслідком усіх наведених вище ефектів CO стає активація утворення ROS і ROS-залежної сигналізації у клітинах.

З іншого боку, у цитозолі *CO інгібує НАДФН-оксидазу* – єдину спеціалізовану ферментативну систему генерування ROS (підпідрозд. 6.1.1). Однак афінність CO до НАДФН-оксидази є низькою, тому така реакція перебігає повільно, і хоча ROS-продукція НАДФН є зниженою, це компенсується зростанням генерації ROS у електронотранспортному ланцюзі мітохондрій.

СО модулює сигнальні шляхи MAPK-каскадів. Зокрема, монооксид вуглецю опосередковано – через генерацію ROS та активацію розчинної гуанілатциклази – веде до активації р38-каскаду MAPK, що частково зумовлює антизапальні, анти-апоптозні, антипроліферативні впливи СО. На ERK-кіназний каскад монооксид вуглецю має інгібуючу дію.

СО як регуляторна молекула відіграє важливу роль у регуляції діяльності нервової, сенсорної, бронхо-легеневої, серцево-судинної, репродуктивної, імунної систем і метаболізму в різних органах. Дія ендогенного СО при цьому проявляється у вигляді вазорелаксуючого, антизапального, антипроліферативного, антиапоптозного, протизгортального та інших ефектів.

СО в регуляції функцій іонних каналів. СО регулює кілька класів іонних каналів (рис. 9.6), зокрема:

- кальціезалежні K^+ -канали високої провідності (BK_{Ca});
- потенціалзалежні K^+ -канали (K_v);
- потенціалзалежні Ca^{2+} -канали L-типу;
- лігандозалежні P2X-рецептори (P2X2 і P2X4);
- K^+ -канали із тандемним P-доменом (*tandem P domain K channels*, *K2p*);
- епітеліальні натрієві канали (ENaC).

Хоча існує гіпотеза, що цГМФ-залежна сигналізація може бути загальним механізмом регуляції монооксидом вуглецю багатьох іонних каналів, імовірно є й існування інших, цГМФ-незалежних механізмів такої регуляції, зокрема за рахунок прямого зв'язування СО з поліпептидом, непрямого зв'язування через гем або внаслідок модуляції клітинного редокс-статусу [Wilkinson W. et al.]. При цьому різні механізми впливу СО на іонні канали можуть приводити до протилежних ефектів (активація/інгібування).

BK_{Ca} -канали є потенціал- і Ca^{2+} -залежними K^+ -каналами високої провідності. Показано, що за дії СО їхня активність може зростати внаслідок як цГМФ і PкG-опосередкованого впливу, так і через пряме зв'язування СО із позаклітинними залишками гістидину у складі молекули каналу або із внутрішньоклітинним аспартатом/гістидином у ділянці RCK-1-домену, а також в результаті непрямого зв'язування СО із канал-асоційованим гемом.

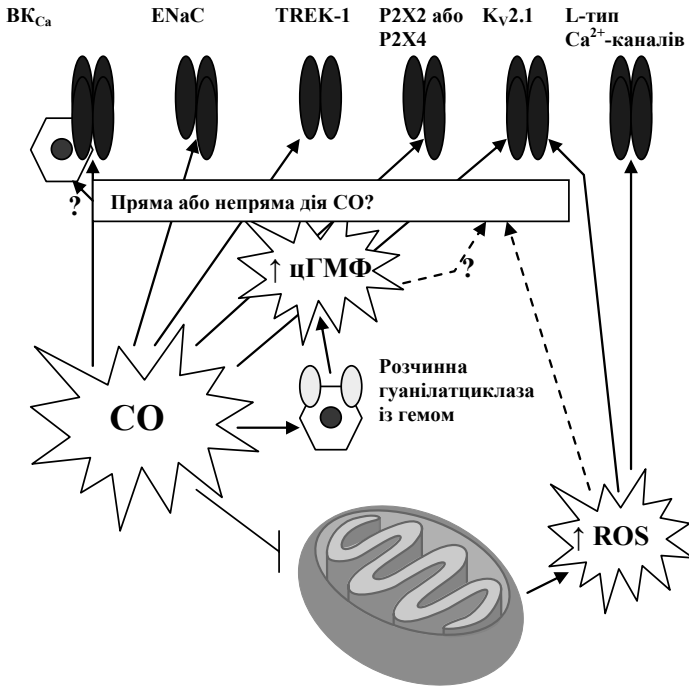


Рис. 9.6. Роль CO в регуляції іонних каналів

Відкриття цих каналів веде до гіперполяризації, яка, в свою чергу, викликає закриття потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів і знижує внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+} , наслідком чого стає послаблення гладком'язових клітин.

BK_{Ca} канали складаються із двох нековалентно зв'язаних субодиниць – пороутворювальної α -субодиниці й регуляторної β -субодиниці, яка визначає електрофізіологічні та фармакологічні властивості організації BK_{Ca} -каналу. Взаємодія CO або з α -, або з β -субодиницями BK_{Ca} каналу може бути визначальною щодо селективної модуляції його активності.

Провідність і відкриття BK_{Ca} визначається специфічними амінокислотними залишками у складі молекули цього каналу. CO підвищує здатність до відкриття каналів, але не їхню провідність. За CO-індуковану активацію каналу відповідає вза-

ємодія між CO та імідазольними групами залишків гістидину (His-365, -394) у складі α -субодиниці. Крім того, мутагенез Cys-911 у позаклітинному C-кінцевому домені значною мірою, але не повністю, знижує здатність CO активувати ці канали.

Оксид азоту теж активує VK_{Ca} , взаємодіючи з β -субодиницею каналу. За одночасної дії цих двох сполук виявлено зниження CO-індукованої вазорелаксації на 40 % унаслідок того, що модифікація β -субодиниці оксидом азоту спричиняє негативний алостеричний ефект на α -субодиницю).

L-тип Ca^{2+} -каналів. Виявлено CO-залежну активацію цих каналів у гладеньких м'язах кишечника та інгібування їх у кардіоміоцитах. Монооксид вуглецю спричиняє інгібування Ca^{2+} -каналів L типу в серцевому м'язі через CO-залежну продукцію в мітохондріях ROS, які модифікують специфічні залишки цистеїну (Cys-1789, -1790, -1810) у внутрішньоклітинних доменах каналу на C-кінці молекули. У гладком'язових клітинах кишечника цей тип каналу активується через NO-залежний шлях.

K^{+} -канали із тандемним P-доменом. $K2p$ -канали є активними у нейронах ЦНС за потенціалу спокою. Один із таких каналів – TREK-1 – активується донорами CO та оксиду азоту. Механізм дії обох газотрансмітерів залежить від активації sGC і наступного синтезу цГМФ. Такий вплив CO на даний тип каналів може зумовлювати нейрональну протекцію і бути потенційною терапевтичною мішенню при склеротичних ушкодженнях мозку.

Потенціалзалежні калієві канали за дії CO інгібуються, причому механізм інгібування Kv -каналів монооксидом вуглецю не залежить від CO-індукованої продукції ROS і, можливо, опосередковується активацією sCG і PkG .

Натрієві канали епітелію відіграють важливу роль у реабсорбції іонів натрію у нирках, кишечнику та легенях. Виявлено CO-залежну активацію ENaC у нирках та інгібування їх в альвеолярних клітинах. Можливо, вирішальним щодо результату впливу CO є локальне оточення каналу (наприклад, вміст циклічних нуклеотидів) і редокс-статус клітин, або ж відміни в амінокислотному складі однієї із субодиниць каналу (α , β або γ).

P2X-рецептори представлені групою лігандозалежних іонних каналів, які активуються при зв'язуванні позаклітинного

АТФ та ініціюють скорочення кардіоміоцитів і гладком'язових клітин. Ідентифіковано 7 білків-членів P2X-родини ссавців, що мають тканинну специфічність щодо експресії (P2X1–P2X7).

СО активує P2X2-рецептори (цГМФ-незалежно, через генерацію ROS у мітохондріях), тоді як P2X4 інгібуються донорами СО, але не власне СО (причина такої різниці полягає в тому, що донори зв'язують молекулу каналу і змінюють її конформацію, тоді як сам СО такого ефекту не має).

Серцево-судинна система й вазорелаксуючі ефекти СО. Монооксид вуглецю стимулює вазорелаксацію як мінімум трьома різними шляхами: *активуючи sGC, стимулюючи кальцієзалежні K^+ -канали високої провідності, індукуючи синтез оксиду азоту* [Untereiner A. et al.]. СО також може непрямо впливати на тонус судин – шляхом блокування синтезу потенційних вазоконстрикторів, скажімо, ендотеліну-1. Але за умов окисного стресу СО може діяти як вазоконстриктор, а блокування прооксидантних ферментів (НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза, дихальний ланцюг) перемикає впливи СО з вазоконстрикторних на вазодилаторні, тобто *редокс-статус клітини може бути вирішальним щодо напрямку дії СО*.

Антизапальні ефекти СО. Є кілька напрямків, за якими монооксид вуглецю здатний спричиняти антизапальні ефекти. Так, СО запобігає утворенню LPS-індукованої продукції прозапальних цитокінів (TNF- α , IL- β) і підвищує продукцію антизапальних цитокінів (IL-10), пригнічує активацію прозапальних ферментів (COX2), знижує адгезію лейкоцитів та міграцію нейтрофілів у ділянки запалення.

СО через генерацію ROS у мітохондріях індукує *пероксисомальний ядерний рецептор- γ , що активується проліфераторами (peroxysome proliferators-activated receptor, PPAR- γ)*, наслідком чого також є пригнічення запального процесу. На рівні транскрипції СО приводить до зростання експресії гена цього рецептора у ядрі макрофагів, а на посттрансляційному рівні – ROS-залежне СУМОїлювання PPAR- γ . **Реакція СУМОїлювання** є регуляторним механізмом, який передбачає ковалентне приєднання білка SUMO (*small ubiquitin-like modifier, малий убіквітино-*

подібний модифікатор) до певних амінокислотних залишків специфічних білків-мішеней, унаслідок чого останні змінюють свої функції. Регуляція білкових функцій шляхом СУМОїлювання є контрибутом патогенезу розвитку запалення і кардіоваскулярних розладів, а модифікований таким чином PPAR- γ відіграє роль у адипогенезі й гомеостазі глюкози, а також виступає негативним регулятором запальної відповіді.

СО і апоптоз. Залежно від низки факторів, СО може мати як про-, так і антиапоптозні впливи. *Антиапоптозні ефекти СО* можуть передбачати активацію кінази ПкВ/Акт та р38-каскаду MAPKs, NF- κ B-залежний шлях, модуляцію активності транскрипційних факторів STAT-1 і STAT-3 (через генерацію ROS). Прикладами *проапоптозних ефектів СО* може слугувати спричинена монооксидом вуглецю зупинка клітини в G₀/G₁-фазі клітинного циклу через цГМФ-залежні механізми, які передбачають зміни в експресії білків-регуляторів клітинного циклу (зниження рівнів циклінів A і D). Також показано індукцію мітохондріальних подій апоптозу за високого вмісту СО (250–500 мкмоль) і блокування цього типу загибелі клітин – за низького (10–100 мкмоль).

9.3. Конвергенція сигнальних шляхів газотрансмітерів

H₂S разом із NO і СО залучаються у мультиплетні фізіологічні функції. При цьому газотрансмітери можуть запобігати або сприяти виникненню відповідних клітинних ефектів цих сполук на рівнях продукції, молекулярних мішеней, або безпосередньо взаємодіючи один з одним (рис. 9.7).

NO підвищує експресію HO1, унаслідок чого зростає генерація монооксиду вуглецю. У свою чергу, *СО модулює активність iNOS*, зв'язуючись із гемом, або змінює експресію цього ферменту через р38 MAPK (збільшує або зменшує – залежно від типу клітин і стимулів).

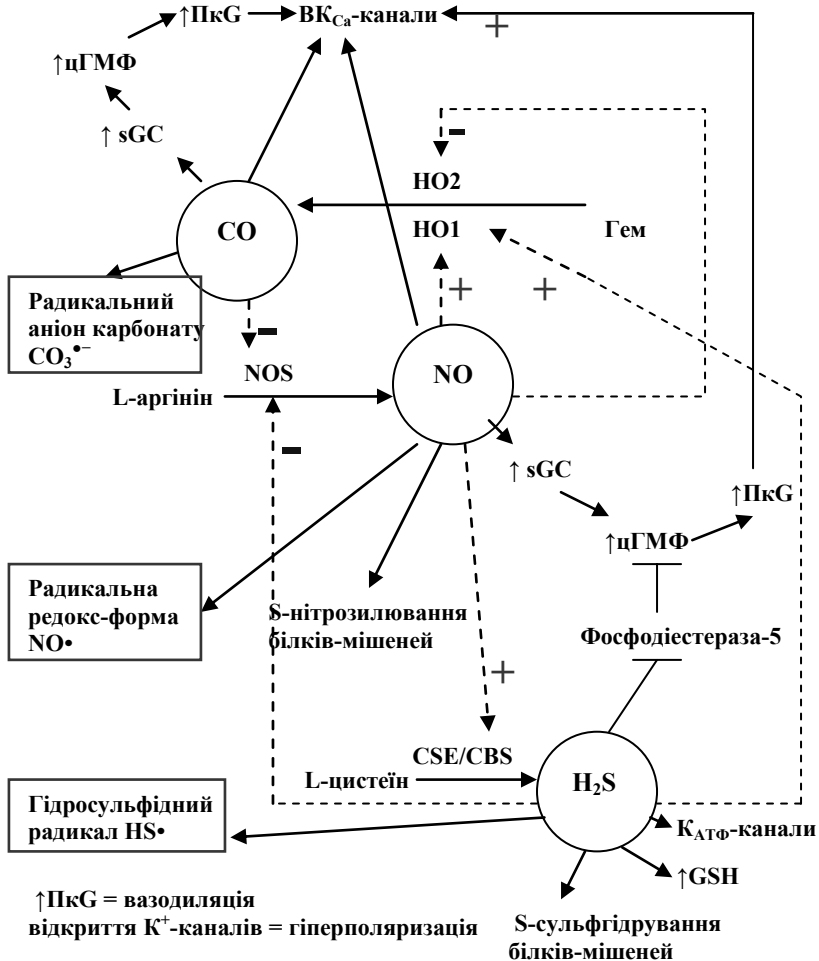


Рис. 9.7. Напрямки взаємодії газотрансмітерів у клітинах

H₂S активує HO1-CO-систему через ERK-кіназний каскад MAPK і блокує всі три ізоформи NOS.

Усі три сполуки мають спорідненість до гемму. Зокрема, загальною мішенню для них є гемоглобін – унаслідок таких взаємодій утворюються відповідно карбоксигемоглобін, нітрозогемоглобін, сульфгемоглобін.

На рівні ПкГ конвергують усі три газотрансмітери. Так, *NO* і *CO* активують розчинну гуанілатциклазу, наслідком чого стає утворення цГМФ і наступна активація ПкГ. Афінність розчинної гуанілатциклази до *NO* є в 100–300 разів більшою, ніж до *CO*. Сульфід водню впливає на ПкГ не через гуанілатциклазу, а опосередковано – шляхом інгібування фосфодіестерази-5, що вповільнює руйнування цГМФ, наслідком чого стає зростання активності ПкГ. Одним із результатів ініціації ПкГ-залежного сигнального шляху стає зниження внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} і, як наслідок, – вазодилатація, ефект, характерний для всіх трьох газотрансмітерів, які можуть сумісно діяти на гомеостаз судин.

H_2S має ще один напрямок судинопослаблювального впливу, оскільки здатний стимулювати K_{ATP} -канали у гладком'язових клітинах судин, через що, на додаток до назви релаксуючий фактор, що виробляється ендотелієм, він відомий як гіперполяризуючий фактор, що виробляється ендотелієм. Показано, що *NO* більше значення має для послаблення тонуусу великих судин (аорта), тоді як H_2S – периферійних (коронарні, мезентеричні).

Загальною мішенню впливу всіх трьох газотрансмітерів є також Ca^{2+} -чутливі K^+ -канали. Так, *NO* взаємодіє з β -субодиницею Ca^{2+} -чутливого K^+ -каналу високої провідності, тоді як *CO* – з α -субодиницею цього каналу, що спричиняє комплексні впливи на здатність VK_{Ca} до відкриття. H_2S , у свою чергу, активує різні типи K_{Ca} -каналів. У цілому, відкриваючи різні типи K^+ -каналів, ці три трансмітери приводять до гіперполяризації плазматичної мембрани, зниження вмісту іонів Ca^{2+} у клітині та вазодилатації (розслаблення судин).

Крім впливу на гем-вмісні сполуки та іонні канали, ***NO* і H_2S викликають специфічні модифікації білків-мішеней.** Так, *NO* спричиняє необоротне нітрування залишків тирозину у складі протеїнів, а також оборотне нітрозилювання білків за *SH*-групами цистеїну (підпідрозд. 5.3.2). Остання модифікація, що залучається у сигнальні функції оксиду азоту, є широко розповсюдженою в білках, причому деякі протеїни під впливом ендогенно генерованого оксиду азоту зазнають фізіологічного нітрозилювання за нормальних умов (глікогенфосфорилаза, глі-

церальдегід-3-фосфатдегідрогеназа, креатинкіназа, Na^+ , K^+ -АТФаза, NMDA-рецептор, β -тубулін і актин). Деякі з цих білків (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, β -тубулін, актин), окрім нітрозилювання, можуть також підлягати реакції S-сульфгідрування – додавання зайвого атома сірки у сульфгідрильну групу з утворенням гідроперсульфіду ($-\text{S}-\text{SH}$). Цій посттрансляційній модифікації підлягає 10–25 % указаних білків, тоді як їхнє фізіологічне нітрозилювання становить 1–2 %.

Нітрозилювання білків звичайно інгібує їхню активність унаслідок того, що сульфгідрильні групи більшості протеїнів є важливими для їхньої активності, і нітрозилювання маскує ключові реактивні тіолові групи. Навпаки, сульфгідрування, перетворюючи групу $-\text{SH}$ на $-\text{S}-\text{SH}$, надає останній підвищеної реактивності, а білку, відповідно, більшої активності. Наприклад, нітрозилювання гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази знижує її каталітичну активність, тоді як H_2S спричиняє семикратне зростання цього показника. **Нітрозилювання і сульфгідрування білків є прикладом антагоністичної конвергенції впливів NO і H_2S , оскільки в обох випадках модифікуються залишки цистеїну.**

CO і H_2S можуть виступати джерелом активних форм кисню. Так, $\text{Cu}, \text{Zn}^{2+}$ -супероксиддисмутаза може окиснювати іонізовану форму H_2S до гідросульфідного радикала HS^\bullet , а при окисненні CO до CO_2 може утворюватися радикальний аніон карбонату $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Оксид азоту сам по собі може перебувати в радикальній редокс-формі NO^\bullet .

Ще один імовірний напрямок конвергенції сигнальних шляхів NO , CO і H_2S полягає в **потенційній можливості існування взаємодії між цими трьома газотрансмітерами на молекулярному рівні, яка може зумовити утворення ще неідентифікованих сполук із біологічною активністю.**

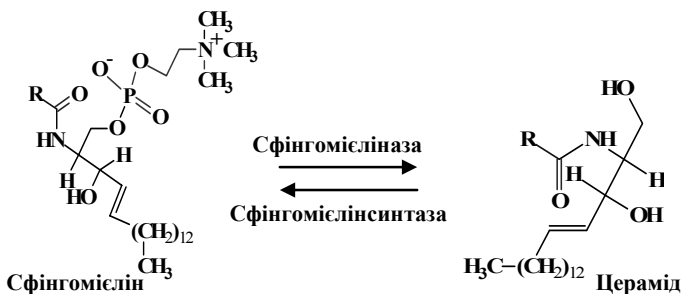
Розділ 10

СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ

ПОХІДНИХ СФІНГОМІЄЛІНУ

Сфінгомієлін – це представник сфінгофосфоліпідів, який є обов'язковим структурним компонентом плазматичної мембрани еукаріотів, де міститься головним чином у зовнішньому моношарі. Похідні сфінгомієліну – керамід, сфінгозин, керамід-1-фосфат і сфінгозин-1-фосфат – є біосинтетично спорідненими біологічно активними ліпідними медіаторами, залученими в регуляцію проліферації, диференціювання, міграції, ембріогенезу, ангиогенезу, зупинки росту, апоптозу, гомеостазу Ca^{2+} . Вони відповідають усім критеріям вторинних месенджерів: їхній вміст зростає у відповідь на дію позаклітинних агентів; відповідні екзогенні препарати цих сполук викликають біологічний ефект, аналогічний дії позаклітинного агенту; для них виявлені біохімічні мішені. Зокрема, ці сполуки діють як вторинні месенджери в механізмах апоптозу: *керамід і сфінгозин індують апоптоз, тоді як сфінгозин-1-фосфат та керамід-1-фосфат є антиапоптозними чинниками*. Баланс – так званий "сфінголіпідний реостат" – між цими про- і антиапоптозними сфінголіпідами визначає долю численних типів клітин [Mathias S. et al.].

Ключовою сполукою в метаболізмі сфінгомієліну та його похідних є керамід. Так, біосинтез сфінгомієліну (N-ацил-сфінгозин-1-фосфохоліну) здійснюється шляхом перенесення фосфорилхолінової групи фосфатидилхоліну на керамід (фермент – *сфінгомієлінсинтаза*). Катаболізм сфінгомієліну включає активацію сфінгомієлінспецифічної фосфоліпази C – *сфінгомієлінази*, яка гідролізує фосфодієфірний зв'язок сфінгомієліну з утворенням кераміду й фосфорилхоліну:



10.1. Церамід

Церамід – ліпофільна месенжерна молекула з мембранною локалізацією, яка регулює різноманітні сигнальні шляхи, зокрема апоптоз, стресову відповідь, старіння клітин, зупинку клітинного циклу, диференціювання, міграцію та адгезію клітин. Здебільшого церамід виявляє антипроліферативні та проапоптозні ефекти.

10.1.1. Шляхи утворення цераміду

Тепер виділяють **три основні шляхи генерації цераміду**:

- *сфінгомієліназний шлях* (використовує ферменти, що руйнують сфінгомієлін з вивільненням цераміду);
- *de novo шлях синтезу цераміду*;
- *шлях реакціювання сфінгозину, утвореного при гідролізі сфінголіпідів (залишковий шлях, Salvage pathway)*.

Індукторами утворення цераміду в організмі є анандамід, тетрагідроканабінол та інші канабіоїди, TNF- α , Fas-ліганд, ендотоксин, хіміотерапевтичні агенти, 1,25-дигідро-холекальциферол (активна форма вітаміну D3), інтерферон γ , тепловий шок, іонізуюче випромінення тощо. Деякі із цих індукторів можуть активувати кілька шляхів генерації цераміду, тоді як інші – лише один конкретний. У свою чергу, із цераміду під впливом *церамідаз* може утворюватися сфінгозин, а із останнього – сфінгозин-1-фосфат (ферменти *сфінгозинкінази*).

Гідроліз мембранних сфінгомієлінів здійснюється під впливом ферментів сфінгомієліназ.

Сфінгомієлінази (сфінгомієлінфосфодієстерази) функціонують подібно до фосфоліпази С. Активація цих ферментів спостерігається у відповідь на численні стресові стимули – радіація, вплив ДНК-ушкоджувальних агентів, дія проапоптозних лігандів (TNF α), чим частково пояснюються антиракові ефекти радіаційного випромінення і хіміотерапії. На генерацію значної кількості кераміду за участю сфінгомієліназ витрачається кілька секунд/хвилин.

У людини є декілька ізоформ сфінгомієліназ, котрі відрізняються за рН-оптимумом, потребою у катіонах і продукуються різними генами: кисла, нейтральна (Mg²⁺-залежна та Mg²⁺-незалежна), лужна.

Кисла сфінгомієліназа (сфінгомієлінфосфодієстераза-1, acid sphingomyelinase, A-SMase) є ферментом із рН-оптимумом у межах 4,5–5, який міститься у мембранах лізосом, але також характерний для багатих на сфінгомієлін кавеол. Він має ауто- і паракринну дію і гідролізує сфінгомієлін з утворенням кераміду. Через швидку активацію кислої сфінгомієлінази діють більшість цитокінів та стресів, які спричиняють апоптоз, включаючи CD95 (Fas), TNF- α , іонізуюче та ультрафіолетове випромінення, тепловий шок, оксидативний стрес. Спадковий дефект цього ферменту зумовлює розвиток захворювання Німана – Піка. Фермент синтезується у вигляді попередника (75 кД), під час процесингу утворюються форми 72 кД, 70 кД і зріла форма – 57 кД.

Нейтральні сфінгомієлінази (сфінгомієлінфосфодієстерази-2, neutral sphingomyelinases, N-SMases) (рН-оптимум 7,4) мають дві ізоформи – мембранозв'язану Mg²⁺-залежну та цитозольну, катіоннезалежну. Активаторами цих ферментів є, зокрема, TNF- α , окиснений ЛПНЩ, IL-1, CD28, Fas-L, низка ростових факторів. Так, рецептор до TNF- α містить різні ділянки для взаємодії з різними сфінгомієліназами; залежно від подій, що відбуваються у клітині, мембрано-проксимальний

відділ рецептора зв'язує та активує нейтральну сфінгомеліназу, а ділянка, що містить домен загибелі (*death domain*, DD), – кислу. *Сигнальні шляхи, ініційовані активацією нейтральної та кислої ізоформ ферменту, є відмінними й можуть приводити до різних, часом протилежних, наслідків для клітини.*

Лужна сфінгомеліназа (сфінгомелініфосфодіестераза-3), виявлена в інтерстиційному слизу і в жовчі, є погано дослідженою. Вона відповідає за генерування цераміду в кишковому тракті, для каталітичної активності потребує наявності жовчних солей і є стійкою до дії трипсину. Фермент має антипроліферативні та антипухлинні властивості й захищає слизову оболонку кишечника від запальних процесів. Зниження його активності спостерігається при колітах, а мутації у відповідному гені виявляються при деяких онкологічних розладах кишечника.

De novo синтез цераміду починається реакцією конденсації пальмітоїл-КоА і серину з формуванням 3-оксодигідросфінгозину (3-оксосфінганіну) (рис. 10.1). Синтез de novo відбувається в ЕПР і стимулюється дією низки ліків, іонізуючої радіації; при цьому для генерації значної кількості цераміду потрібно кілька годин.

Першу реакцію каталізує фермент *серинпальмітоїлтрансфераза*; вона є швидкість-лімітуючим етапом цього метаболічного шляху. У свою чергу, 3-оксодигідросфінгозин відновлюється до дигідросфінгозину (фермент *3-оксосфінганінредуктаза*), який надалі ацилюється ферментом *церамідсинтазою* з утворенням *дигідроцераміду*. Остання реакція в утворенні цераміду каталізується *дигідроцераміддесатуразою*.

Після *de novo* синтезу в ЕПР церамід спрямовується до апарату Гольджі (або шляхом везикулярного транспорту, або із залученням церамід-транспортувального білка *CERT (ceramide transfer protein)*), де надалі може перетворюватися на *фосфосфінголіпіди* або *глікосфінголіпіди*.

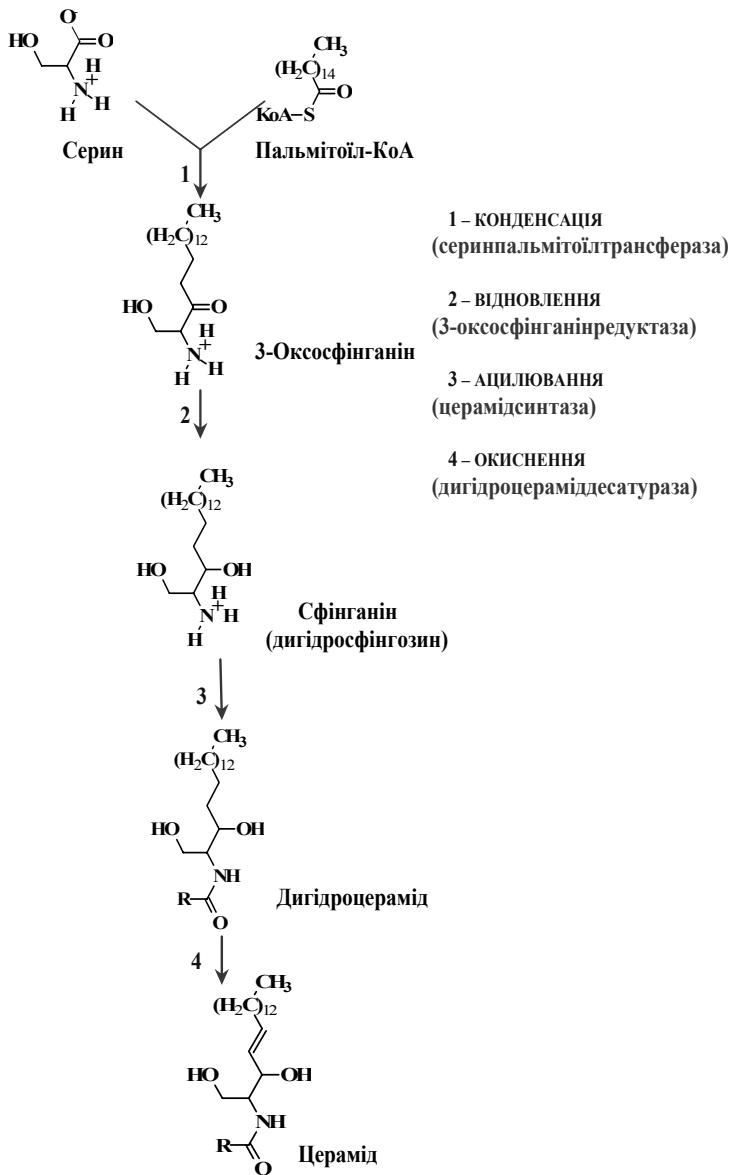


Рис. 10.1. *de novo* – метаболічний шлях цераміду в утворенні вторинних месенджерів

Останні після утворення везикулярним транспортом спрямовуються до ПМ клітини.

Залишковий шлях (salvage pathway) утворення цераміду – це конститутивна *деградація фосфо- і глікофінголілідів, яка відбувається в кислих субклітинних компартментах – лізосомах і пізніх ендосомах. У випадку глікофінголілідів екзогідролази, активні за кислого рН, спричиняють поступове відщеплення моносахаридних одиниць з кінця олігосахаридного ланцюга, що насамкінець веде до вивільнення цераміду. Фосфосфінголілід сфінгомієлін перетворюється на церамід під впливом лізосомальної кислій сфінгомієлінази. Надалі утворений церамід може гідролізуватися кислій церамідазою з формуванням сфінгозину і вільної жирної кислоти – компонентів, які, на відміну від цераміду, здатні вивільнюватися із лізосом. Довголанцюгові сфінгоїдні основи надалі можуть використовуватися на синтез цераміду (така їхня реутилізація відбувається на поверхні ЕПР і потребує ферменту церамідсинтази) і (або) сфінгозин-1-фосфату (із залученням сфінгозинкінази).*

Отже, церамід генерується під впливом численних фізіологічних сигналів (цитокіни, фактори росту, іонізуюче та УФ-випромінення, хемотерапевтичні ліки, 1,25-діоксихолекальциферол, FAS-ліганд, окисний стрес) (рис. 10.2).

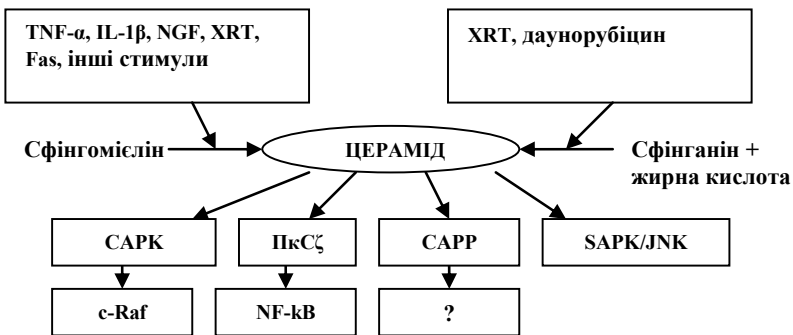


Рис. 10.2. Індукція синтезу цераміду та його основні мішені

Ці церамідгенеруючі фактори в різних типах клітин впливають або на активність сфінгомієлінази (TNF- α , УФ, іонізуюче випромінення, ін), або на активність церамідсинтази (цитотоксичні препарати типу етопозиду, даунорубіцину, форболового ефіру тощо), або модулюють активність обох ферментів (рис. 10.2;10.3).

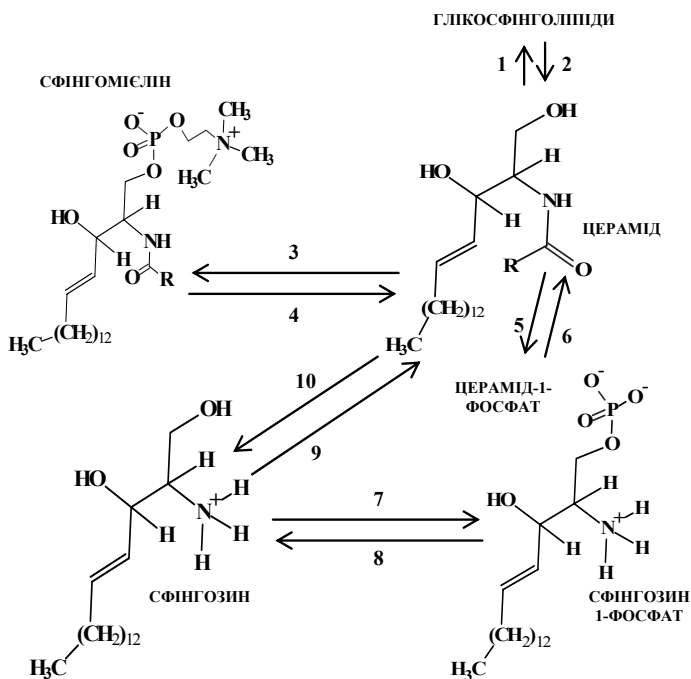


Рис. 10.3. Метаболічний шлях сфінгомієліну та утворення вторинних месенджерів:

- 1 – ферменти глікозилювання; 2 – глікозидази;
- 3 – сфінгомієлілсинтаза; 4 – сфінгомієліназа;
- 5 – церамідкіназа; 6 – церамід-1-фосфатфосфатаза;
- 7 – сфінгозинкіназа; 8 – сфінгозин-1-фосфатфосфатаза;
- 9 – церамідсинтаза; 10 – церамідаза

Одразу після генерування керамід може акумулюватися або перетворюватися на інші метаболіти, які залучаються у регуляцію апоптозу, клітинного циклу, диференціювання, процесів старіння клітин, або які є попередниками в утворенні сфінголіпідів (рис. 10.3):

- **церамід-1-фосфат** (фермент *церамідкіназа*);
- **сфінгозин** (ферменти *церамідази*, які мають дві ізоформи – кисла (лізосомальна) або нейтральна (сполучена із ПМ)) і **сфінгозин-1-фосфат** (*сфінгозинкіназа*);
- **сфінгомієлін** (*сфінгомієлінсинтаза*, що міститься в апараті Гольджі);
- **глікосфінголіпіди** (ферменти глікозилювання, локалізовані в апараті Гольджі)

10.1.2. Церамід як сигнальна молекула

Є кілька причин плейотропності ефектів кераміду. Так, ця молекула в різних типах клітин може розпізнаватися і зв'язуватися з різними мішенями; на активацію керамідом певних сигнальних шляхів також впливають клітинне мікрооточення та супутнє утворення інших вторинних месенджерів, сайт і джерело його генерування, фаза клітинного циклу. До того ж, як уже йшлося, у клітинах є ферменти, що перетворюють керамід на інші метаболіти, і для різних клітин їхній спектр та активність неоднакові, але найпоширенішою відповіддю на дію кераміду є апоптоз.

Найважливішими безпосередніми мішенями, які стимулюються генерованим керамідом, є:

- *протеїнкіназа, що активується керамідом (ceramide-activated protein kinase, CAPK)*, яка активує c-Raf1 і далі – ERK-кіназний каскад;
- *протеїнфосфатази, що активуються керамідом (ceramide activated protein phosphatases, CAPPs)* – фосфатази PP2A та PP1;

- ПкС ζ , що діє через NF- κ B;
- Катепсин D;
- SAPK/JNK- та ERK-каскади MAPKs (залежно від стимулів і шляхів генерації цераміду, а також типу клітин; найчастіше стимулюється проапоптотний SAPK/JNK-каскад);
- мітохондріальна сигнальна система.

Крім впливу на зазначені сигнальні шляхи, генерація цераміду може змінювати активність мембранних білків-ферментів та трансмембранних рецепторів. Усі ці ефекти зумовлюють такі наслідки дії цераміду, як проліферація, диференціація, зупинка росту, клітинна загибель (рис. 10.4).

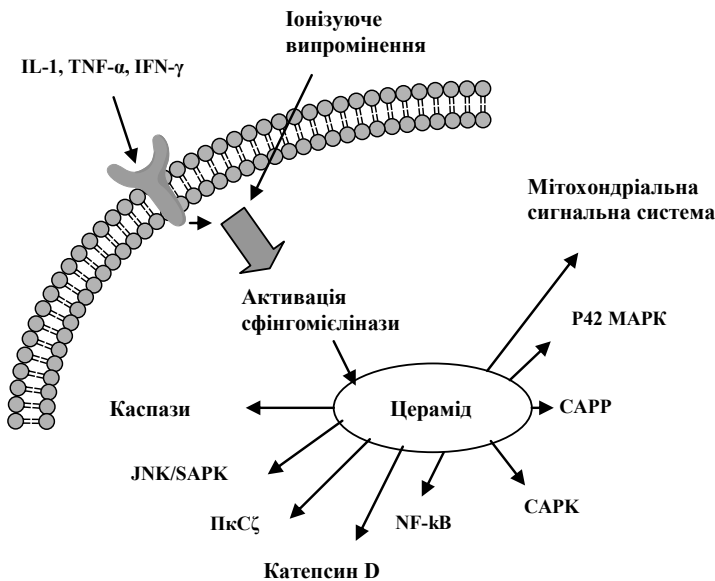


Рис. 10.4. Біологічні мішені цераміду

Розгалуження сигнальних шляхів цераміду було досліджено на моделі із застосуванням TNF- α -рецептора (рис. 10.5).

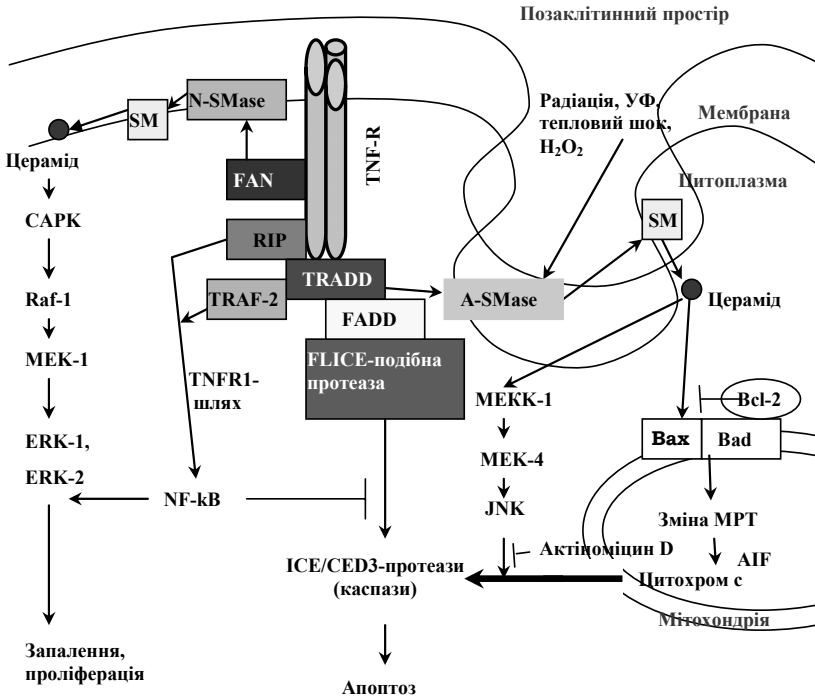


Рис. 10.5. Церамід-опосередковані шляхи апоптозу і виживання клітин.
 SM – сфінгомієлін;
 N-SMase – нейтральна сфінгомієліназа;
 A-SMase – кисла сфінгомієліназа

Із викладеного вище знаємо, що різні ділянки рецептора можуть зв'язувати різні сфінгомієлінази: мембрано-проксимальний відділ – нейтральну, а ділянка, що містить домен загибелі (DD) – кислу сфінгомієліназу. **Активация N-SMase** опосередкована адаптерним білком FAN (*factor associated with neutral SMase activation*, фактор, асоційований з активацією нейтральної сфінгомієлінази), який зв'язується з мембрано-проксимальною ділянкою цитоплазматичного домену TNF- α -рецептора. Цю ділянку називають NSD

(*neutral sphingomyelinase domain*, домен нейтральної сфінгомелінази) (рис. 10.5). N-SMase включає ERK-кіназний каскад і прозапальну відповідь.

Активация A-SMase передбачає участь адаптерних білків TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*, DD-вмісний білок, асоційований з рецептором TNF) і FADD (*Fas-associated death domain protein*, DD-вмісний білок, асоційований з рецептором Fas), що зв'язуються із доменом загибелі TNF-R, і врешті-решт веде до реалізації проапоптозних ефектів цераміду через подальшу активацію *аспартилпротеази катепсину D* (а саме, церамід сприяє аутокаталітичному протеолізу попередників цього ферменту) або ініціацію проапоптозного SAPK/JNK-каскаду.

Оскільки проліферативний і прозапальний ефекти цераміду залучають N-SMase і включають активацію ERK-кіназного каскаду, а проапоптозні його ефекти – SAPK/JNK-шлях, було висунуто гіпотезу, що в апоптозній загибелі клітини чи її виживанні значну роль може відігравати баланс між активностями SAPK/JNK- та ERK-кіназних систем.

SAPK – протеїнкіназа, що активується церамідом (М. м. 97 кД) є мембраноасоційованою пролінспецифічною протеїнкіназою, що розпізнає в молекулі субстрата ділянку X–Thr–Leu–Pro–X. Церамід спричиняє аутофосфорилування SAPK, яка при цьому активується і через фосфорилування c-Raf-1 за Thr-269 *стимулює ERK-шлях*, який зазвичай є прозапальним і антиапоптозним.

SAPPs – протеїнофосфатази, які активуються церамідом – є представниками родини серин/треонінових фосфатаз підродин PP2A і PP1. **PP2A** функціонує як гетеротример, у якому субодиниці А і В є регуляторними, а субодиниця С – каталітична. За активацію церамідом відповідає субодиниця В. PP2A залучена в реалізацію антипроліферативних відповідей цераміду й зупинку клітинного циклу у фазі G1. Активація **PP1** церамідом є однією із причин церамідіндукованого апоптозу. Ця фосфатаза дефосфорилує SR-білки, які

модулюють сплайсинг мРНК. Унаслідок цього знижується рівень утворення низки антиапоптозних білків і зростає вміст проапоптозних. Крім того, PP1 і PP2A здатні інактивувати сигнальні молекули, що залучені у виживання клітин – наприклад, класичні та нові ізоформи ПкС і ПкВ/Акт.

Атипова ізоформа ПкС – ПкС ζ – є інертною до дії ДАГ і форболових ефірів, але чутливою до впливів кераміду й бере участь у *активації NF- κ B*. У відповідь на зростання рівнів кераміду ПкС ζ транслокується у ядро, що свідчить про її можливе залучення до регуляції транскрипції.

Модуляція керамідом сигнального JNK-каскаду, який запускає апоптоз, здійснюється через малий G-білок Rac1:

Церамід → Rac1 → JNK-каскад

Взаємодія кераміду із сигнальним каскадом ERK, який зазвичай опосередковує ростові та прозапальні сигнали, іде за схемою:

Церамід → c-Raf1 → ERK-каскад

Церамід також прямо *протидіє PI3K/Akt сигнальному механізму виживання клітини шляхом активації фосфатази та індукції протеолітичної дегградації Akt*. Втрата PI3K/Akt-активності внаслідок подібних ефектів кераміду може спричинити зниження фосфорилювання та активацію низки ключових регуляторів апоптозу, а надекспресія Akt знижує продукцію кераміду і блокує керамід-індукований апоптоз.

На рівні мітохондрій керамід може індукувати втрату мембранного потенціалу з наступною зміною мітохондріальної проникності й вивільнення із цих органел апоптогенних факторів (підрозд. 6.3) або ж спричинити посилення генерації ROS у III комплексі дихального ланцюга (підпідрозд. 6.1.4).

Церамід, що утворюється у зовнішньому моношарі клітинної мембрани, викликає полярний перерозподіл та олігомеризацію ("утворення шапки") рецептора загибелі Fas, залученого в ініціювання рецептор-опосередкованого апоптозу.

Біологічні ефекти кераміду, який виступає вторинним месенджером за дії ряду цитокінів, мають відповідний вплив на цілі системи органів, зокрема на імунну, ендокринну, серцево-судинну та нервову. Наприклад, **в імунній системі** керамід залучається у TNF- α -, IL-1- і ІФ γ -сигналізацію, опосередковує імунну й запальну активності шляхом стимулювання проліферації, диференціації, апоптозу або реплікації вірусів, залежно від типу клітин та умов. Так, керамід здатний інгібувати "дихальний вибух" (підпідрозд. 6.1.1), фагоцитоз, залежний від антитіла, та TNF- α -залежне вивільнення супероксидного аніона із нейтрофілів. **В ендокринній системі** керамід як вторинний месенджер за дії низки цитокінів регулює численні ендокринні функції й залучений у патогенез діабету, розладів секреції прогестерону тощо. **У функціонуванні серцево-судинної системи** показана причетність цієї молекули до патогенезу радіаційної пневмонії, септичного шоку, атерогенезу, ішемічної хвороби серця, тромбозів. **У нервовій системі** керамід може модулювати сигнальні шляхи нейтрофінів (NGF, BDNF тощо), залучаючись у патогенез алергійних енцефаломієлітів, мультиплетного склерозу, синдрому демієлінування і в розвиток захворювань Альцгеймера і Паркінсона, ішемії та інсульту.

Проапоптозні ефекти генерованого кераміду можуть бути одним із пояснень застосування іонізуючого опромінення та низки лікарських препаратів при терапії онкологічних розладів. Так, іонізуюче опромінення спричиняє швидкий гідроліз сфінгомієліну за участю кислій сфінгомієлінази в ендотеліальних, гемопоетичних і стовбурових клітинах, а також у лімфоцитах. Однак у клітинах тимусу за впливів цього агенту керамід не опосередковує загибель клітин – там вона йде за іншим механізмом. Отже, один і той же стресор (наприклад, іонізуюче випромінювання) у різних типах клітин може діяти за різними механізмами, але приводити до одного й того ж наслідку – апоптозу. Через генерацію кераміду діють такі хіміотерапевтичні агенти, як даунорубіцин (активує керамідсинтазу) і вінкрістин.

10.2. Церамід-1-фосфат

10.2.1. Біосинтез церамід-1-фосфату

Церамід-1-фосфат (*Ceramide-1-phosphate, C-1-P*) утворюється із цераміду шляхом фосфорилування. Уперше ця регуляторна молекула була ідентифікована в 1990 р (Р. Колеснік, М. Хемер) у HL-60 клітинах лейкемії людини. Ці самі дослідження показали її генерацію з утвореного із сфінгомієліну цераміду шляхом фосфорилування за участю специфічної кінрази – **церамідкінази** (*ceramide kinase, CERK*), яка є відмінною від сфінгозинкінази (SphK, підпідрозд. 10.4.1), але досить спорідненою до неї. **Активаторами церамідкінази є**, зокрема, IL-1- β , колонієстимулювальний фактор макрофагів (*macrophage colony stimulating factor, M-CSF*) та іони кальцію. Потенціальні біологічні функції церамід-1-фосфату були виявлені лише у 2003 р (Г. Ліанг, Б. Петтус). Тепер відомо, що C-1-P має анти-апоптозні властивості та виступає важливим медіатором відповіді запалення.

10.2.2. Церамід-1-фосфат як сигнальна молекула

Раніше вважали, що C-1-P діє лише аутокринно – усередині клітини, оскільки на плазматичній мембрані не було виявлено рецепторів для його зв'язування. Проте останні дослідження показали, що низка ефектів цієї сполуки, зокрема її здатність стимулювати міграцію клітин, потребує участі специфічних рецепторів ПМ, сполучених із G_i білком. Отже, C-1-P може функціонувати і як внутрішньоклітинний вторинний посередник (антиапоптозні впливи C-1-P), і як ліганд, що, сполучаючись із відповідним рецептором, ініціює ефекторні сигнальні шляхи (регуляція хемотаксису).



Річард Колеснік

Основним біологічним ефектом церамід-1-фосфату є його залучення у синтез ейкозаноїдів – він функціонує як **медіатор вивільнення арахідонової**

кислоти із фосфоліпідів, активуючи фермент, що каталізує швидкість-лімітуючий етап біосинтезу ейкозаноїдів – **цитозольну фосфоліпазу A2** (*cytosolic phospholipase A2*, cPLA2) (рис. 10.6).

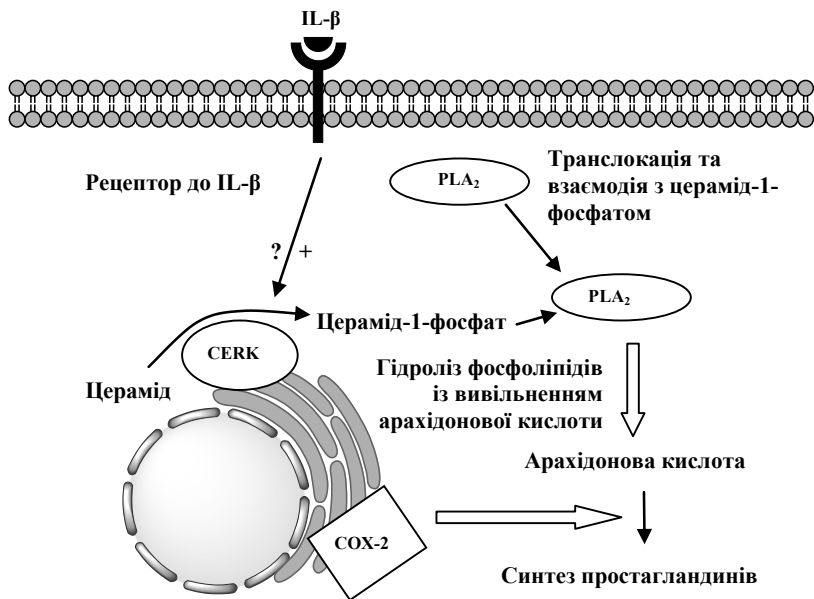


Рис. 10.6. Церамід-1-фосфат як регулятор синтезу ейкозаноїдів:
COX2 – циклооксигеназа; PLA₂ – фосфоліпаза A₂;
CERK – церамідкіназа

Це підтверджується застосуванням інгібіторів церамідкінази. Арахідонова кислота, у свою чергу, є попередником ейкозаноїдів – простагландинів і лейкотриєнів – які опосередковують запальну відповідь організму й залучені в патогенез раку, атеросклерозу, астми, остеоартриту, хвороби Альцгеймера тощо.

C-1-P може регулювати цей фермент прямими та опосередкованими впливами. cPLA2 має Ca²⁺-залежний ліпідзв'язувальний домен, подібний до C2-домену ПкС. C-1-P, аніонний ліпід, може взаємодіяти безпосередньо з цим доменом (подібно до

взаємодії фосфатидилсерину із С2-доменом ПкС, підрозд. 2.2). С-1-Р також може активувати сPLA2 опосередковано – шляхом індукції мобілізації Ca^{2+} .

Крім участі в синтезі ейкозаноїдів, керамід-1-фосфат також є чинником, що сприяє виживанню клітин.

Механізми, які лежать в основі мітогенних ефектів С-1-Р, включають:

- стимуляцію ERK-каскаду MAPKs;
- активацію PI3K/Akt шляху;
- стимуляцію ДНК-зв'язувальної активності транскрипційного фактора NF- κ B;
- підвищення експресії кінази глікогенсинтази 3β (glycogen synthase kinase 3β , GSK3 β – підрозд. 4.2), що активує білки циклін D1 та с-Мус, котрі є важливими маркерами проліферації клітин.

С-1-Р також виступає безпосереднім інгібітором апоптозу. Так, ця сполука є інгібітором як PPI, так і PP2A – двох фосфатаз, що активуються керамідом (CAPPs), які в більшості клітин мають проапоптозні ефекти, а також кислої сфінгомієлінази – ферменту, залученого в генерацію пулу кераміду, який активує JNK/SARK-каскад MAPKs. Крім того, С-1-Р індукує експресію низки антиапоптозних білків, що також сприяє виживанню клітин, але високі концентрації С-1-Р можуть проявляти протилежні ефекти і вбивати клітини.

Як позаклітинний, ліганд С-1-Р залучається до контролю міграції клітин, зокрема макрофагів. Нещодавно було ідентифіковано специфічний рецептор, через який С-1-Р стимулює хемотаксис [Aragana L. et al.]. Він локалізований на ПМ макрофагів і передає сигнал через G_i білок. Зв'язування цього рецептора із С-1-Р спричиняє активацію ERK-каскаду і транскрипційного фактора NF- κ B, а також стимуляцію ПкВ. Таким чином, рецептор до С-1-Р може бути важливою мішенню в терапії низки розладів (наприклад, атеросклерозу або метастазування пухлин), у патології яких велике значення має міграція клітин (рис. 10.7).

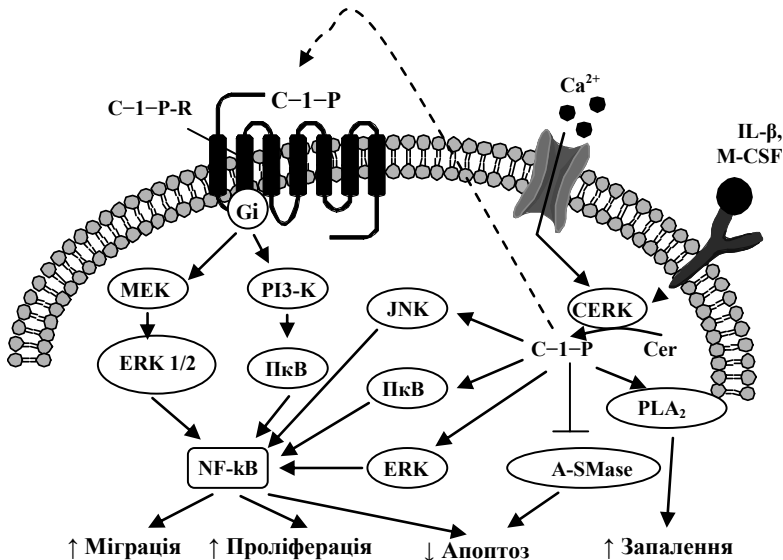


Рис. 10.7. Сигнальні шляхи церамід-1-фосфату

10.3. Сфінгозин

10.3.1. Шляхи генерації сфінгозину

Сфінгозин (Sph) утворюється *шляхом деацильовання цераміду за участю церамідаз* (кисла, лужна церамідази залежно від рН-оптимуму) *або через дефосфорилювання сфінгозин-1-фосфату сфінгозин-1-фосфатфосфатазою* (рис. 10.3).

10.3.2. Сфінгозин як сигнальна молекула

Сфінгозин функціонує як модулятор функцій численних сигнальних молекул:

- *ПкС*;
- *про- та антиапоптозні білки*;

- *сфінгозинзалежна кінза 1 (sphingosine dependent kinase-1, SDK1*, яка за походженням є С-кінцевим доменом ПкС і причетна до активації проапоптозних білків та інактивації антиапоптозних; синонім – ПкСδKD);

- *Akt/ПкВ;*
- *MAPKs.*

Зокрема, Sph діє як *потенційний інгібітор ПкС, є прямим активатором низки проапоптозних факторів, стимулює ферментативне розщеплення ПкС із вивільненням ПкСδKD (SDK1)*. Також його впливи *знижують експресію ПкВ/Akt – протеїнкінази, що бере участь в інтегрин-опосередкованому сигналі виживання.*

Сфінгозин *інгібує ERK-каскад MAPKs і, подібно до кераміду, активує JNK- та р38-каскади, що також стає причиною зниження виживання клатин і реалізації програми апоптозу.*

Наявність лізосомотропних властивостей сфінгозину вказує на *можливе залучення у механізми сфінгозин-індукованого апоптозу сфінгозинзалежної транслокації лізосомальних гідролаз (наприклад, катепсинів D, В та (або) L) у цитозоль.*

10.4. Сфінгозин-1-фосфат

10.4.1. Біосинтез сфінгозин-1-фосфату

Інші ефекти сфінгозину пов'язані з його перетворенням на *сфінгозин-1-фосфат (Sph-1-P) шляхом фосфорилування за участю однієї із 2-х кінз: сфінгозинкінази 1 (SphK1) або сфінгозинкінази 2 (SphK2) (рис. 10.8)*. Sph-1-P є полярною еволюційно консервативною молекулою, що присутня у дріжджів, рослин і ссавців.

Сфінгозин-1-фосфат є мультифункціональним ліпідним медіатором, що регулює клітинний ріст, диференціювання та програмовану клітинну загибель. *Метаболічна конверсія кераміду на Sph-1-P є молекулярним перемикачем, який знижує чутливість клітини до летальних факторів.*

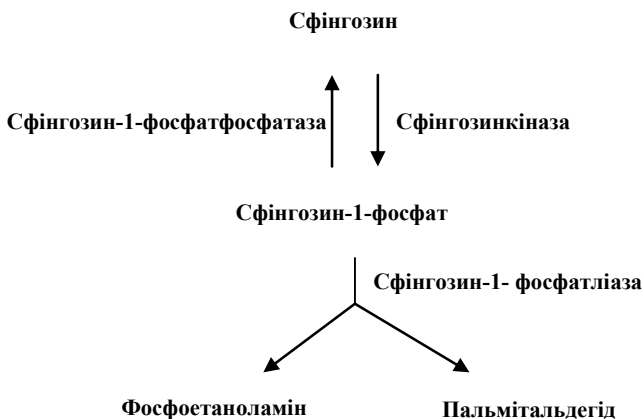


Рис. 10.8. Схема метаболізму сфінгозин-1-фосфату

SphK – ключовий фермент, що регулює відносні рівні *Sph-1-P*, *Sph* і *цераміду* [Tahal T. et al.]. *SphK1* (43 кД) і *SphK2* (65 кД) активуються численними вторинними посередниками (Ca^{2+} , ДАГ, цАМФ), які утворюються у сигнальних шляхах, ініційованих факторами росту й низкою гормонів, зокрема цитокінами (*NGF*, *EGF*, *PDGF*, *VEGF*), лігандами рецепторів, сполучених із *G*-білками, форболовими ефірами, естрогенами, вітаміном *D3*, антигенами. Сигнальні шляхи, залучені в активацію *SphK*, також можуть залучати *ERK*-каскад *MAPKs*.

Фактори, що спричиняють синтез *Sph-1-P*, одночасно знижують пули *цераміду* та *сфінгозину* й підвищують виживання клітин. Отже, *SphK* можна віднести до протоонкогенів – порушення в її регуляції, а саме посилена активація, може стати причиною переважання процесів проліферації над апоптозом і онкологічного переродження клітин. Надекспресія *SphK* сама по собі – без сторонніх стимулів – здатна посилити ріст клітин, що спостерігається, зокрема за різних типів онкологічних розладів, а також сприяти розвитку резистентності пухлин до дії таких хіміотерапевтичних агентів, вплив яких реалізується через проапоптозні властивості сфінгозину

і кераміду. Інгібування SphK має антипухлинну та проапоптозну дію, що показано на різних лініях пухлин, а також збільшує чутливість ракових клітин до хемотерапії.

SphK1 міститься у мозку, серці, тимусі, селезінці, нирках, легенях; її ген локалізований у хромосомі 17; сам фермент має чотири трансмембранні домени, у латентному стані міститься в цитозолі, після активації транслокується до ПМ. **SphK2** характерна для клітин нирок і печінки; ген присутній у 19 хромосомі; білок не має трансмембранних доменів і локалізується в основному в ядрі, хоча часом може виявлятися в ЕПР та мітохондріях. Кожна із цих кіназ має альтернативні сплайсинг-варіанти, що відрізняються тільки за кількома амінокислотними залишками на N-кінці й утворюються із однієї й тієї самої мРНК-транскрипту: SphK1 – три форми (384, 398, 470 амінокислот), SphK2 – дві форми (618 і 654 амінокислоти).

Обидва ферменти мають п'ять висококонсервативних ділянок (C1–C5).

Домени C1 і C5 мають гомологію 35 % і 58 % із відповідними ділянками ДАГ-кінази (ферменту, що здійснює АТФ-залежне фосфорилування діацилгліцеролу з утворенням фосфатидної кислоти); також вони є високогомологічними відповідним доменам керамідкінази. У C1-домені міститься АТФ-зв'язувальний сайт (послідовність Glu–Glu–Lys–Glu–Cys); ділянки C1–C3 – це каталітичні домени; C4 містить сфінгозинзв'язувальний сайт, має залишок Asp.

Особливостями будови SphK1 є:

- наявність Ca^{2+} /кальмодулінзв'язувальної послідовності;
- присутність кількох сайтів, що регулюються протеїнкіназами:

- 1) один – для ПкА;
- 2) один – для казеїнкінази II;
- 3) вісім – для ПкС (інгібування керамід-індукованого апоптозу при активації ПкС асоціюється зі стимуляцією SphK1 через зазначені сайти й утворенням Sph-1-P);

4) багатий на пролін домен на С-кінці (17 кінцевих амінокислот);

5) дві *послідовності ядерного експорту*, що забезпечують транспорт ферменту із ядра у цитозоль;

6) залишок Ser-225, пряме фосфорилування якого кіназами ERK-каскаду спричиняє транслокацію SphK1 до плазматичної мембрани.

7) сайти для N-міристилювання і N-глікозилювання.

SphK2 містить:

- Ca^{2+} /кальмодулінзв'язувальну послідовність;
- сайти для фосфорилування казеїнкіназою II, ПкА, ПкG;
- сайти фосфорилування ПкС;
- сайти для тирозинового фосфорилування;
- довший домен, багатий на пролін;
- сигнали ядерної локалізації та ядерного експорту;
- сайти амідування.
- сайти для N-міристилювання і глікозилювання;

Хоча SphK1 і SphK2 дуже різняться за розмірами (384 і 618 амінокислот відповідно), їхня гомологія становить 80 %, а амінокислотні послідовності ідентичні на 45 %. Причиною цього є те, що практично весь поліпептидний ланцюг SphK1 входить до складу SphK2. SphK2 має додаткову ділянку на N-кінці (у ній розташований *сигнал ядерної локалізації* NLS), а також додаткову центральну збагачену проліном ділянку, не виявлену в структурі SphK1, у якій міститься унікальний *сигнал ядерного експорту* NES, залучений у регуляцію транспорту SphK2 із цитозолу в ядро. Така регуляція здійснюється шляхом фосфорилування розташованого в унікальному NES залишку серину *фосфоліпід-, діацилгліцерол- і ПкС-залежною протеїнкіназою D* (підрозд. 2.2), що стає сигналом для транслокації SphK2 у ядро – органелу, із якою пов'язані функції цього ферменту [Ding G. et al.].

Обидві *сфінгозинкінази* у своєму складі не мають *SH2-та PH-доменів*, тому вони не взаємодіють із фосфотирозин-вмісними адаптерними білками і фосфоліпідами, зокрема фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфатом [Neubauer H. et al.].

Загальним для більшості активаторів *SphK* є те, що вони діють на посттрансляційному рівні (гостра активація, хвилини), впливаючи на стан фосфорилування *SphK*, її локалізацію, взаємодію з іншими білками, що пояснюється наявністю у структурі сфінгозинкіназ Ca^{2+} /КМ-зв'язувальних доменів і сайтів для фосфорилування. Наприклад, потужні активатори сфінгозинкіназ – РМА (*phorbol-12-myristate-13-acetate*, *форбол-12-міристан-13-ацетат* – форболовий ефір, що є класичним стимулятором ПкС і промотором росту пухлин) і ПкС – діють через активацію кіназ ERK-каскаду, які надалі прямо фосфорилують залишок Ser-225 у складі молекули і змінюють локалізацію *SphK*, спрямовуючи рух її молекул до ПМ.

Деякі із активаторів *SphK*, наприклад *естроген*, *вітамін D3*, *ростові фактори*, можуть впливати на рівень транскрипції/трансляції (хронічна активація, години/дні) або навіть на всі рівні. Особливо важливою є хронічна активація зростання транскрипції гена *SphK*: збільшення вмісту відповідної мРНК у пухлинних клітинах відносно нормальних клітин свідчить про те, що регуляція *SphK* на рівні транскрипції може бути важливим механізмом у запуску клітинної проліферації.

Зростання активності *SphK* часто асоційоване з її *транслокацією до ПМ*, зокрема за дії таких стимулів, як РМА, TNF- α , ішемія, ліпополісахарид, NGF. Локалізація *SphK* у ядрі зупиняє синтез ДНК, тому рух *SphK* до ядра може бути сигналом для зупинки росту клітин (це, наприклад, характерно для *SphK2*).

Є кілька білків, здатних взаємодіяти із *SphK* і модулювати функції цього ферменту в клітинах. Наприклад, активація *SphK1* біля плазматичної мембрани за дії TNF- α потребує її взаємодії з убіквітинлігазою TRAF2 (детальніше про білки

родини TRAFs див. у підпідрозд. 11.2.1.2) через С-кінцеві амінокислотні залишки ферменту. А два інші білки – протеїн, що взаємодіє із SphK (*sphingosin kinase interacted protein, SKIP*) та аміноацилаза 1 – знижують активність SphK1.

SphK є ефектором іонів Ca^{2+} (що надійшли як із внутрішньоклітинних депо, так і ззовні), які мають на фермент активуючу дію – адже у SphK є Ca^{2+} /КМ-зв'язувальні центри; зв'язування Ca^{2+} хелаторами блокує утворення Sph-1-P. Аналогічно діє і фосфоліпаза С, яка спричиняє зростання вмісту Ca^{2+} у клітині.

Протеоліз знижує активність SphK. Це, зокрема, відбувається при стимуляції клітин агентами, які посилюють апоптоз (наприклад, сполуками, що руйнують ДНК).

Порушення регуляції SphK причетне до розвитку ряду патологій. Так, активація SphK має місце в патогенезі атеросклерозу, розвитку ранніх стадій діабетичних нефропатій, онкологічних захворювань, ангіо- і васкулогенезу.

10.4.2. Сфінгозин-1-фосфат як сигнальна молекула

Sph-1-P може діяти як *екстрацелюлярний медіатор* (через G-білок-сполучені рецептори ПМ) або як *внутрішньоклітинний месенджер* (механізми повністю не досліджено) (рис. 10.9).

Позаклітинний пул Sph-1-P генерується шляхом транслокації внутрішньоклітинного Sph-1-P через ПМ за допомогою *транспортера ABCC1*, який належить до родини ABC-транспортерів (підпідрозд. 11.4.3.4).

За екстрацелюлярних впливів Sph-1-P є лігандом для низки рецепторів родини EDG (від *endothelial differentiation gene, ген диференціювання ендотелію*), які експресуються на плазматичній мембрані більшості клітин: S1P1 (edg1), S1P2 (edg5), S1P3 (edg3), S1P4 і S1P5.

Sph-1-P може взаємодіяти як з рецепторами, розташованими на поверхні клітини, із якої він вивільнився, так і з рецепторами сусідніх клітин, а також може транспортуватися у кровоносному руслі до більш віддалених тканин.

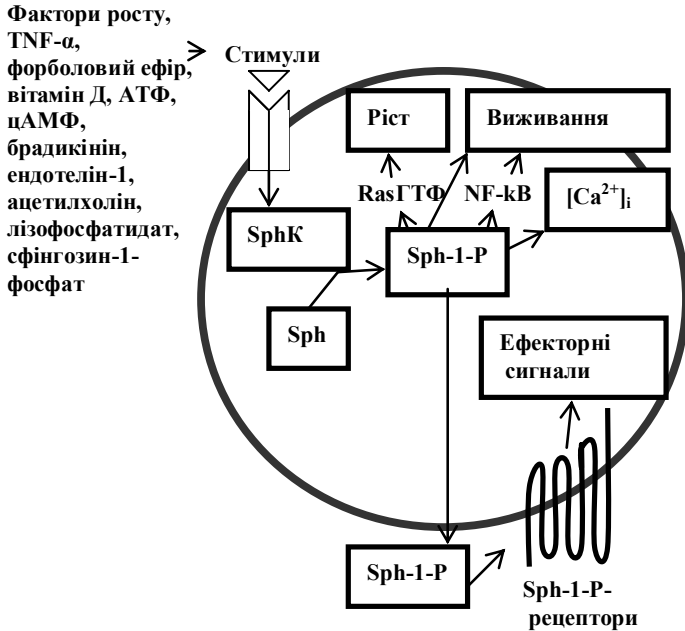


Рис. 10.9. Екстрацелюлярні та внутрішньоклітинні ефекти Sph-1-P

S1Ps-рецептори є глікозилізованими трансмембранними білками із 7-ма трансмембранними доменами; різні їхні типи мають між собою до 50 % ідентичності у структурі. Роль окремих рецепторів до Sph-1-P та їхні ефекторні мішені вивчають, використовуючи моделі "нокаутованих" мишей, у яких специфічні гени S1Ps видалені.

Зв'язування Sph-1-P із певним типом S1Ps-рецепторів активує певний G-білок (рис. 10.10). Вибірковість цих рецепторів у сполученні зі специфічними G-білками і активації окремих шляхів трансдукції сигналів не зовсім зрозуміла [Spiegel S. et al.].

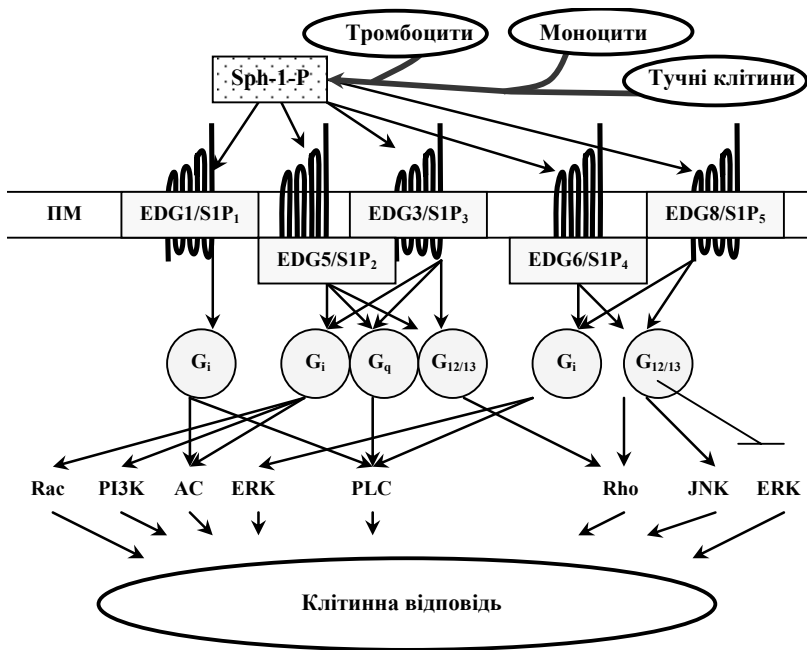


Рис. 10.10. Дія Sph-1-P як ліганду S1Ps-рецепторів

Sph-1-P через різні G-білки впливає на ряд мішеней, серед яких:

- аденілатциклаза (у різних клітинах може активуватися або інгібуватися);
- фосфоліпаза C (активація, індукція утворення I-1,4,5-P₃, мобілізація Ca²⁺);
- ERK-каскад MAPKs (стимуляція);
- PI3K/Акт-шлях (активація);
- білок Rho (активація і наступна стимуляція фосфоліпази D);
- малий G-білок Rac (індукція з наступною активацією JNK/p38).

Як уже відомо з викладеного вище, внутрішньоклітинні рівні Sph-1-P модулюються в широкому колі клітин у відповідь на різні позаклітинні стимули – фактори росту, цитокіни, агоністи

GPCR тощо. **Sph-1-P як внутрішньоклітинний вторинний месенджер** виявляє протективну дію щодо апоптозу у багатьох клітинних лініях. **Такі ефекти цієї молекули передбачають:**

- активацію *Raf/MKK/ERK*-кіназного каскаду (тому Sph-1-P вважається мітогеном);
- зниження рівнів *SAPK/JNK*-опосередкованого апоптозу;
- безпосередню активацію транскрипційних факторів *NF-kB* і *AP-1*, залучених в антиапоптозні сигнальні шляхи;
- зниження експресії низки проапоптозних білків;
- інгібування активності низки проапоптозних ферментів;
- запобігання стрес-індукованим процесам у мітохондріях, у тому числі й вивільненню із цих органел проапоптозних факторів;
- залучення *Sph-1-P* в інозитол-1,4,5-трифосфатнезалежну мобілізацію Ca^{2+} .

Усі ці сигнальні шляхи Sph-1-P ведуть до клітинної проліферації і супресії церамід-індукованого апоптозу.

Припинення сигналу через Sph-1-P здійснюється за участю одного із наступних ферментів: *Sph-1-P-фосфатази* (синонім – *фосфатаза ліпідного фосфату*, *lipid phosphate phosphatases*, *LPP*) або *Sph-1-P-ліази*.

Sph-1-P-фосфатаза локалізована в мембранах ЕПР, має дві ізоформи – LPP1 та LPP2 і каталізує дефосфорилування *Sph-1-P* до вільного сфінгозину. Баланс між активностями LPP1 та LPP2, з одного боку, та активностями сфінгозинкіназ, із іншого, є чітко врегульованим.

Sph-1-P-ліаза має подібну локалізацію, активується сфінгозин-1-фосфатом, дигідросфінгозин-1-фосфатом та іншими фосфоровмісними сфінгоїдними сполуками й каталізує розщеплення сфінгозин-1-фосфату до пальмітальдегіду та фосфоетаноламіну, потребує коферменту піридоксальфосфату, експресується в більшості тканин, проте відсутній у тромбоцитах і еритроцитах).

Доведено участь Sph-1-P у патогенезі ряду розладів, що дає змогу розробляти нові методи їхньої діагностики та терапевтичні прийоми. Так, один із рецепторів до Sph-1-P – EDG4 –

є маркером клітин раку яєчників (інші EDG – інші типи раку). Sph-1-P відіграє роль у ангиогенезі (формуванні нових судин) як фактор, що спричиняє диференціювання ендотеліальних судин. При атеросклерозі Sph-1-P посилює мітогенез гладком'язових клітин судин під впливом окЛПНЩ. Показана його участь як регулятора міграції лейкоцитів та еозинофілів у запальній відповіді. *Причинами цих впливів Sph-1-P є зміни рівнів експресії рецепторів до Sph-1-P, сфінгозинкінази, Sph-1-P-ліази, фосфатази ліпідного фосфату.*

Дефіцит ферментів продукції Sph-1-P асоціюється зі зниженням виживання клітин, їхнього диференціювання та інтенсифікацією процесів апоптозу. Зокрема, недостатність Sph-1-P може бути одним із факторів прогресії нейродегенеративних процесів.

Залежно від відхилення рівнів Sph-1-P (наприклад, при онкології спостерігається зростання, при нейродегенеративних захворюваннях – зниження), терапевтичні заходи можуть передбачати застосування антагоністів (агоністів) рецепторів до Sph-1-P, вибіркоче інгібування чи активацію ферментів метаболізму Sph-1-P, а також генну терапію. Так, при лікуванні онкологічних захворювань застосовують сафінгол – інгібітор сфінгозинкінази, який, блокуючи синтез Sph-1-P, посилює керамід-опосередкований сигнал загибелі клітин. Одночасно можливо застосування інгібітора керамідази B13, що збільшує рівні клітинного кераміду та індукує апоптоз пухлинних клітин без впливу на нормальні клітини [Pune S. et al.].

10.5. Модель керамід / Sph-1-P-реостату

Sph-1-P є важливою месенджерною молекулою, ефекти якої здебільшого є протилежними впливам кераміду і сфінгозину: дві останні молекули сприяють припиненню росту й апоптозу, тоді як Sph-1-P – проліферації та виживанню клітин. Головними причинами наявності таких протилежних

впливів є різні ефекти цих сполук на членів ERK- та JNK-каскадів: Sph-1-P пригнічує процеси апоптозу шляхом активації *ERK- та інгібування JNK-каскаду*, тоді як *церамід і сфінгозин індукують апоптоз: керамід – активуючи JNK-каскад, а сфінгозин – блокуючи ERK-шлях* (рис. 10.11).

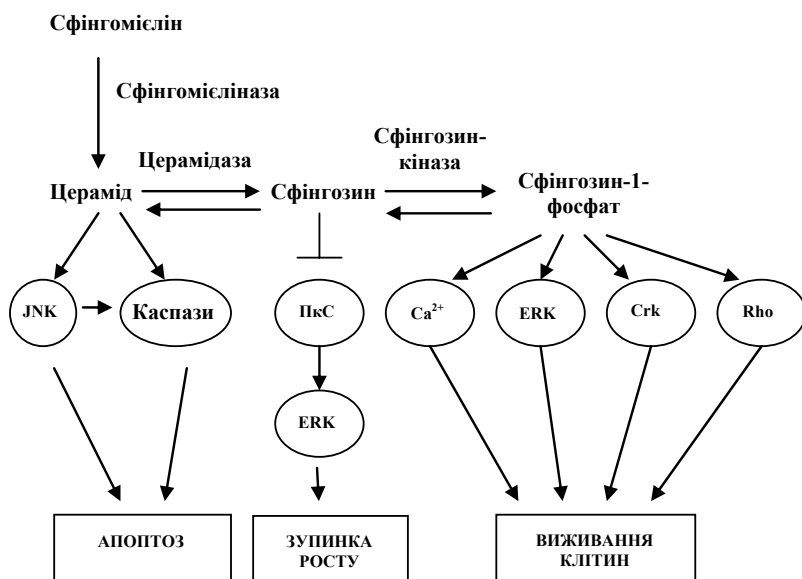


Рис. 10.11. Схема моделі керамід / Sph-1-P-реостату

Через відміни в дії Sph-1-P, кераміду та сфінгозину – молекул, здатних взаємоперетворюватися у клітині – долю останньої буде визначати динамічний баланс між цими сполуками. У підтримання цього балансу, який називається *сфінголіпідним реостатом* (С. Спігель, 1996), свій внесок роблять також ростові фактори і цитокіни, які по-різному регулюють сфінгом'єліназу, керамідазу, сфінгозинкіназу, сприяючи цим установленню певних рівнів кераміду і Sph-1-P.



Сара Спігель

Отже, *агенти, що регулюють внутрішньоклітинні реакції перетворення керамід ↔ сфінгозин ↔ сфінгозин-1-фосфат, залежно від рівнів кераміду/сфінгозину та Sph-1-P можуть спрямовувати клітину на шлях або апоптозу, або виживання.* Якщо цей баланс зсувається у бік кераміду/сфінгозину, у клітині включається програма загибелі, тоді як при зростанні вмісту Sph-1-P активуються процеси, асоційовані з виживанням і проліферацією клітин, тобто *метаболічне перетворення кераміду на Sph-1-P може служити "перемикачем" між апоптозом і проліферацією.*

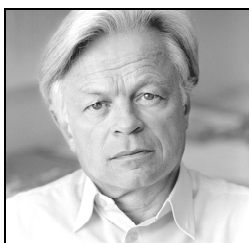
Зниження рівнів Sph-1-P (шляхом інгібування сфінгозинкінази і/або активації Sph-1-P-фосфатази та (або) Sph-1-P-ліази), що супроводжується зсувом цього реостату в бік кераміду/сфінгозину, може бути потенційною мішенню в терапії онкологічних розладів [Young S. et al.]. Наприклад, специфічні інгібітори сфінгозинкіназ, антагоністи рецепторів до S1P, індуктори й активатори Sph-1-P-ліази та Sph-1-P-фосфатази запобігають росту пухлин, васкуляризації, ангиогенезу і метастазуванню, а також здатні індукувати апоптоз пухлинних клітин.

Ще одна сполука – похідна сфінгомієліну, а саме керамід-1-фосфат, яка, подібно до сфінгозин-1-фосфату, має виражені антиапоптозні та пропроліферативні властивості, теж може вважатися компонентом системи "реостату" [Chalfant C. et al.].

Розділ 11

СИГНАЛЬНА СИСТЕМА ІНТЕРФЕРОНУ

Передумовою для відкриття інтерферону (ІФ) стали дослідження японських дослідників Й. Нагано та Й. Коджима інституту інфекційних хвороб (університет Токіо), які при пошуку вакцини від стафілококу виявили, що клітини шкіри кроля, попередньо інокульовані вірусом, інактивованим ультрафіолетом, після реінфекції живим вірусом характеризуються пригніченим вірусного росту. Вони висловили гіпотезу, що причиною цього став *певний інгібуючий фактор*, спробували ідентифікувати його та в 1954 р. опублікували свої відкриття у французькому журналі "Journal de la Société de Biologie".



Джен Лінденманн



Йасухіко Коджима



Йасуїчі Нагано



Алік Ісаакс

Через три роки британський вірусолог А. Ісаакс і шведський дослідник Дж. Лінденманн у Національному інституті Медичних досліджень (Лондон) показали *ефект інтерференції*, викликаний вірусом грипу, інактивованим температурою, на ріст живого вірусу грипу в клітинах курячого зародка. Ці клітини інкубували з інактивованим вірусом грипу, нездатним до реплікації; супернатант, отриманий після диференційного центрифугування лізату цих клітин, ввели в інші, нативні клітини зародка, після чого їх інфікували життєздатним вірусом грипу. Виявилося, що вірус втратив здатність до росту в цих клітинах, отже, сполука, що вивільнилася із клітин, оброблених неактивним вірусом, захищала клітини від наступної інфекції. У 1957 р. вони опублікували свої результати в науковому журналі "Nature", використовуючи термін "*інтерферон*" (від *інтерференція* – несприйнятливість клітин до повторного зараження вірусом), і *сьогодні цей специфічний інтерферуючий агент відомий як ІФ І тину* [Borden E. et al.].

11.1. Типи інтерферонів

Інтерферони – це мультигенна родина індукованих цитокінів (біологічно активних білків, що синтезуються у клітині в процесі виникнення захисної реакції після дії антигену), які мають видову специфічність і здатні продукуватися майже всіма ядерними клітинами, володіють противірусною, антибактеріальною та імуномодулюючою властивостями й при цьому практично не виявляють негативної дії на метаболізм власних клітин організму. Інтерферон має як пара-, так і аутокринний вплив, і діє, як і гормони, у концентраціях 3×10^{-14} моль/л.

Є понад 20 ізоформ інтерферонів, котрі різняться за структурою і біологічними функціями. Усі інтерферони за стимулом і за типом клітинам, які їх продукують, поділяються на три типи. Основні характеристики ІФ різних типів наведено в табл. 11.1.

Таблиця 1.11. Характеристики основних типів інтерферонів

ІФ	Хімічна природа	Ген, хромосома	Індуктори	Клітини-продуценти	Особливості дії
α	Протеїн, 166 а/к	13–24 генів, без інтронів, хр. № 9	Віруси, бактерії, полісахариди, dsRNA	Ядерні клітини, гранулоцити, лімфоцити, макрофаги, макроцити (лімфоцитарний ІФ)	Основна дія – антивірусна
β	Глікопротеїн, 166 а/к	1 ген, без інтронів, хр. № 9	Віруси, dsDNA	Моноцити, епітелоцити, фіробласти (фіробластний ІФ)	Основна дія – антивірусна
ω	Глікопротеїн, 172 а/к	5 генів, без інтронів, хр. № 9	Відомо мало	Відомо мало (трофобласти)	Відомо мало
γ	Глікопротеїн, 146 а/к	1 ген, 3 інтрони, хр. № 12	Мітогени Т-лімфоцитів, клітини пухлин, антигени до сенсibilізованих лімфоцитів	Т-лімфоцити, макрофаги, НК, дендритні клітини, інші імунні клітини (імуний ІФ)	Основна дія – імуномодулююча
λ	Глікопротеїн, 181 а/к	3 гени (ІФ-λ1 4 інтрони; ІФ-λ2 та ІФ-λ3–5 інтронів), хр. № 19	Віруси, ssRNA	Численні ядерні клітини, у тому числі дендритні клітини, моноцити, макрофаги, пухлинні клітини	За дією схожий на ІФ І типу (основна дія – антивірусна)

Примітка: dsRNA – дволанцюгова РНК (double stranded RNA); dsDNA – дволанцюгова ДНК (double stranded DNA); ssRNA – одноланцюгова РНК (single stranded RNA).

До **I типу (вірусний інтерферон)** належать **IФ-α** (ця група, у свою чергу, має 13 різних підтипів: IФ-α1, -α2, -α4, -α5, -α6, -α7, -α8, -α10, -α13, -α14, -α16, -α17 та -α21, подібних за амінокислотними послідовностями, але вони можуть різнитися ступенем глікозилування і загальним числом амінокислот), **IФ-β** (представлений однією сполукою) та **IФ-ω** (-ω1, -ω2, -ω3) (новий), а також менш поширені IФ-δ, IФ-ε, IФ-κ, IФ-τ, IФ-ν, та IФ-ζ.

IФ-α, IФ-β, IФ-ε, IФ-κ та IФ-ω характерні для людини, тоді як IФ-δ і IФ-τ описані тільки у свиней та великої рогатої худоби відповідно, вони не виробляються в організмі людини та не мають відповідних гомологів; IФ-ζ виявлений лише в організмі мишей, а IФ-ν виробляється тканинами домашніх котів.

II тип (імунний інтерферон) представлений лише IФ-γ.

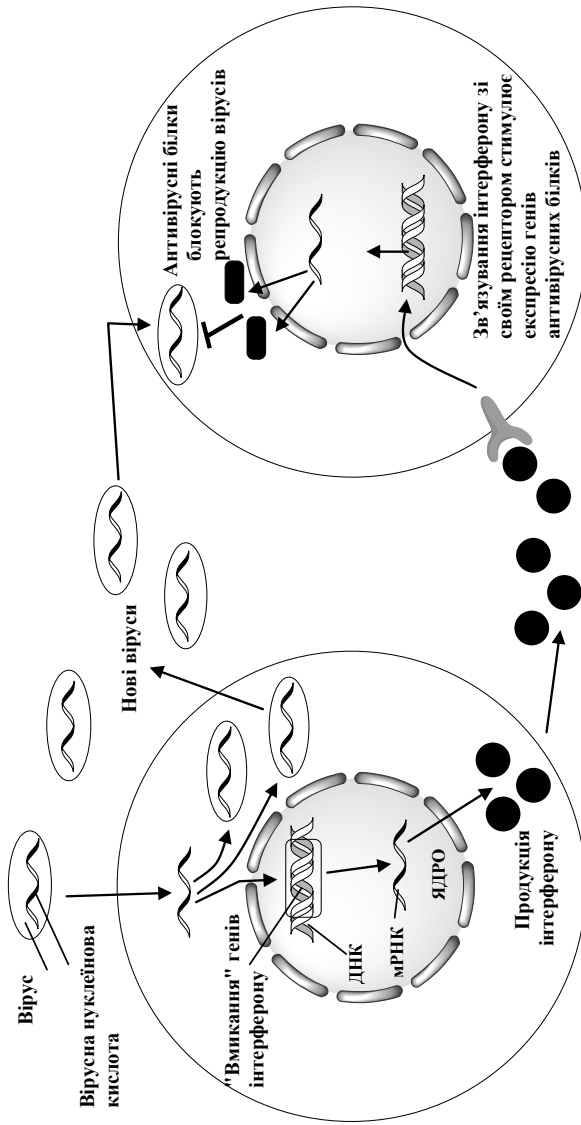
Нещодавно виявлено новий клас інтерферонів – **IФ-λ** (IФ-λ1, -λ2 і -λ3, які також відомі як *інтерлейкін-29* (IL-29), *IL-28A* і *IL-28B* відповідно). За своєю структурою молекули цих інтерферонів є близькими до IФ I типу, подібно до останнього, вони експресуються більшістю ядерних клітин організму, напрямки їхньої дії схожі. Однак вони не передають сигнал через класичні шляхи передачі сигналу від інтерферонів I і II типів, що дає змогу класифікувати їх як **інтерферон III типу** [Tagawa M. et al.].

11.2. Шляхи синтезу інтерферонів інфікованою клітиною

Узагальнена схема утворення і дії інтерферону наведена на рис. 11.1.

У відповідь на інфікування клітини вірусом або іншим патогеном **IФ I типу** генерується переважною більшістю типів клітин, у тому числі лейкоцитами й фібробластами.

Продукція **IФ II типу** зумовлена стимуляцією лімфоцитів прозапальними стимулами (зокрема, мітогенами) та активацією імунної системи у відповідь на антиген (зокрема, вірусного походження). Ця продукція контролюється впливом інтерлейкінів IL-12 та IL-18.



КЛІТИНА ОРГАНІЗМУ-ХАЗЯЙКА № 1:

- інфікується вірусом;
- продукує інтерферон;
- гине під впливом вірусів

КЛІТИНА ОРГАНІЗМУ-ХАЗЯЙКА № 2:

- отримує сигнал від інтерферону, синтезованого клітиною № 1;
- інтерферон викликає захисну відповідь, що унеможливіває загибель клітини

Рис. 11.1. Узагальнена схема утворення та дії інтерферону

Раніше вважалося, що до генерації ІФ II типу здатні лише Т-хелпери (Th-1-лімфоцити), цитотоксичні Т-лімфоцити та натуральні кілери (NK) (див. дод., п. 19), але тепер відомо, що В-клітини та антиген-презентуючі клітини також секретують ІФ- γ .

Новоутворені молекули ІФ вивільнюються клітинами, інфікованими вірусами та іншими патогенами або клітинами – мішенями дії прозапальних цитокінів, дифундують до сусідніх клітин, сполучаються із власними рецепторами на їхній поверхні та запускають сигнальний каскад, наслідком якого стає активація експресії ІФ-залежних генів (яких тепер відомо понад 1000) і продукція білків, здатних запобігати синтезу вірусних протеїнів.

11.2.1. Утворення ІФ I типу

Утворення ІФ I типу регулюється на рівні транскрипції та індукується розпізнаванням компонентів вірусів, бактерій, грибів, низки ендогенних сполук **рецепторами, що розпізнають** (*pattern recognition receptors, PRRs*). Ці рецептори є ключовими компонентами **вродженої імунної системи**, яка є першою лінією захисту від численних патогенів, тоді як друга ланка **імунної системи** – **адаптивна імунна система** – є відповіддю на специфічні чужорідні антигени й генерує імунологічну пам'ять [Pedraza S. et al.].

PRRs здатні розпізнавати **молекулярні структури, асоційовані як зі збудником** (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*), так і з **загибеллю** (*damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs*). PAMPs і DAMPs таким чином виступають основними "сигналами небезпеки", що запускають вроджену імунну відповідь.

PAMPs – це екзогенні молекули-похідні патогенних і непатогенних мікроорганізмів, які можуть бути представлені дволанцюговою РНК (*double-stranded RNA, dsRNA*), одноланцюговою РНК (*single-stranded RNA, ssRNA*) або дволанцюговою

ДНК (*double-stranded DNA, dsDNA*), вірусними глікопротеїнами, CpG-послідовностями (див. дод., п. 20), LPS бактеріальної стінки, флагеліном джгутикових, зимозаном грибів та іншими компонентами екзогенних патогенів.

DAMPs мають ендогенне походження, тобто є молекулами, що вивільнюються із клітин організма-хазяїна, які підлягають загибелі під час клітинного стресу або ушкодження тканин. Вони можуть бути як внутрішньоклітинними білками (білки теплового шоку), так і білками поза клітинного матриксу, що утворилися після ушкодження тканин, а також небілковими DAMPs (АТФ, сечова кислота, гепарансульфат, ДНК).

ІФ є частиною "першої хвилі" імунної відповіді, що діє протягом годин після інфікування, тоді як для продукції антитіл необхідно кілька днів.

Залежно від тканинної специфічності й функцій виділяють три основні класи PRRs [Lee M. et al.]:

• ***PRRs, які залучаються у розпізнавання вірусної інфекції.*** До цієї групи належать трансмембранні структури – представники родини *Toll-подібних рецепторів (Toll-like receptors, TLRs)* та цитозольні PRRs – білки *RIG1* (кодується *retinoic acid-inducible gene 1, ген 1, що індукується ретиноевою кислотою*), *MDA5* (*melanoma differentiation associated protein 5, білок 5, асоційований з диференціюванням меланоми*) і *ПкR* (*протеїнкіназа R, що індукується інтерфероном і активується dsRNA*). ***Ці рецептори залучаються в реалізацію прозапальних сигнальних шляхів та у продукцію ІФ I типу;***

• ***фагоцитарні (ендоцитарні) PRRs***, що експресуються на поверхні фагоцитуючих клітин і *опосередковують поглинання ними мікроорганізмів;*

• ***секретовані PRRs***, що секретуються макрофагами, епітеліальними клітинами, гепатоцитами й *активують молекули комплементу, опсоніни та виступають допоміжними білками при розпізнаванні PAMPs.*

11.2.1.1. Toll-подібні рецептори та їхні сигнальні шляхи

Toll-подібні рецептори – родина еволюційно консервативних PRRs, які відіграють ключову роль у сприйнятті мікроорганізмів і належать до суперродини рецепторів до IL-1. Різні члени цієї родини відповідають за розпізнавання різноманітних PAMPs і деяких ендогенних DAMPs та ініціювання відповіді вродженого імунітету як при інфекційних, так і неінфекційних захворюваннях. TLRs виявлені у хребетних і безхребетних; молекулярні структури, подібні до TLRs, також ідентифіковані у бактерій і рослин.

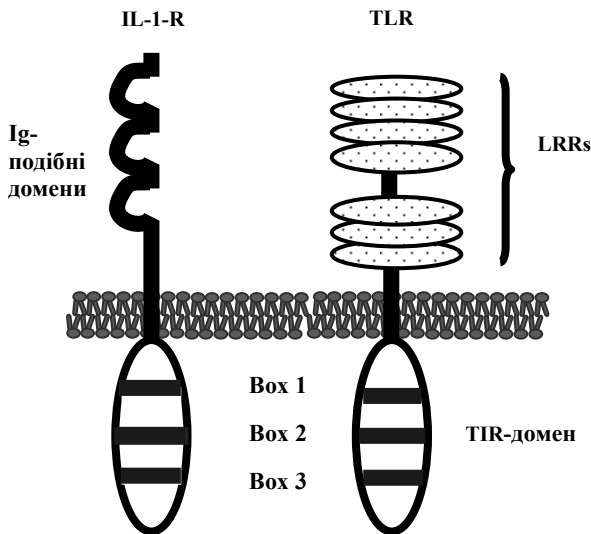
Назва цих білків пояснюється їхньою структурною гомологією з білком, що кодується *Toll*-геном, ідентифікованим у 1985 р. Крістіан Нюсслейн-Волхард у *Drosophila*.

Усі TLRs є трансмембранними глікопротеїнами, що мають цитоплазматичний, трансмембранний і позаклітинний домен [Heiden L. et al.].

Цитоплазматичний домен за будовою схожий на цитозольну ділянку рецептора до IL-1 (IL-1-R), оскільки містить **TIR-домен** (*Toll/interleukin-1 receptor domain, домен Toll- та IL-рецепторів*) (рис. 11.2). Цей домен безпосередньо залучається в передачу сигналів активованим рецептором, забезпечуючи взаємодію TLRs із TIR-вмісними адаптерними білками, необхідними для подальшої передачі сигналу.

Позаклітинний домен наявністю численних багатих на лейцин повторів (*leucine-rich repeats, LRRs*), відрізняється від відповідної ділянки IL-1-R (останній замість них має три *імуноглобуліно-подібні домен*). Ця ділянка забезпечує пряму взаємодію з PAMPs.

Першим TLR, ідентифікованим у ссавців, став TLR4; сьогодні родина TLRs людини включає 11 білків. Крім висококонсервативних патогенних компонентів бактерій, вірусів, грибів і паразитів (ліпополісахариди клітинних стінок грамнегативних та пептидоглікани грамнегативних та грампозитивних бактерій, флагелін джгутикових бактерій, бактеріальна й вірусна ДНК, збагачена на неметильовану послідовність CpG, вірусна dsRNA, зимозан дріжджів тощо), TLRs також можуть активуватися ендогенними лігандами, зокрема комплексом {хроматин-IgG} (табл. 11.2).



- Рецептор до інтерлейкіну-1 (IL-1-R) містить позаклітинну ділянку з імуноглобулін-подібними доменами (Ig-подібні домени)
- Toll-рецептор (TLR) містить позаклітинний домен з багатьма лейциновими повторами (leucine rich repeats motifs, LRRs)
- TLR, подібно до IL-1-R, мають цитозольний "хвіст", у складі якого наявний TIR-домен (Toll interleukin-1 (IL-1) receptor domain)

Рис. 11.2. Структура TLR та IL-1-R

У відповідь на численні стимули TLRs експресуються як на імунних клітинах (макрофагах, дендритних клітинах, нейтрофілах, моноцитах, В- і Т-лімфоцитах), так і на епітеліальних клітинах слизової оболонки кишечника, керацитах шкіри та клітинах мікроглії тощо, при цьому різним типам клітин притаманний різний спектр TLRs. В імунній системі вони є причетними до виникнення різних станів активації клітин, імунного захисту, підтримки гомеостазу і розвитку різноманітних патологій. *Експресія TLRs може модулюватися у відповідь на стимул (патоген), тобто вони є індукційними.*

TLRs функціонують як димери. Хоча більшість TLRs здатні утворювати гомодимери, TLR2 формує гетеродимери з TLR1 чи TLR6, і кожен димер при цьому має свою специфічність відносно лігандів (рис. 11.3).

За локалізацією у клітині TLRs можна поділити на дві групи:

1) TLRs, що найчастіше присутні на ПМ клітин:

- **TLR1/TLR2** (активний димер) – розпізнають бактеріальні ліпопротеїни та якірні глікопротеїни;

- **TLR2/TLR6** – упізнають ліпоейхоеву кислоту грампозитивних клітинних стінок, а також зимозан грибів;

- **TLR4/TLR4** – зв'язують LPS грамнегативних клітинних стінок і вірусних гліколіпідів, F-білок респіраторного сінцитіального вірусу людини, enV-білки ретровірусів. **Цей рецептор є основним щодо причетності до продукції ІФ І типу у відповідь на грам-негативну бактеріальну інфекцію.**

- **TLR5** – упізнає бактеріальний флагелін.

2) TLRs, локалізовані на мембранах ендосом:

- **TLR3** – розпізнає dsRNA-мотиви (у клітинах деяких типів цей рецептор також виявляють і на ПМ), **причетний до продукції ІФ І типу;**

- **TLR7 і TLR8** – зв'язують ssRNA РНК-вмісних вірусів (наприклад, вірусу везикулярного стоматиту або вірусу грипу); при цьому TLR7 є специфічним до аналогів гуанідину та імідазоквінолінових повторів і є надекспресованим у плазмочитоїдних дендритних клітинах, а TLR8 – до ssRNA, збагаченої на GU-послідовності (РНК ВІЛ, вірусу грипу, ssRNA невірусного походження). **Ці рецептори причетні до продукції ІФ І типу;**

- **TLR9** – упізнає неметильовану CpG-послідовність ДНК-вмісних вірусів, зокрема цитомегаловірусу, вірусу простого герпесу, аналогічні послідовності в бактеріальній ДНК, і є **причетним до продукції ІФ І типу.**

Таблиця 11.2. Основні характеристики TLRs

TLR	Локалізація	РАМРС	DAMPs	Адаптерна молекула	Продукція
TLR1 + TLR2	Плазматична мембрана	Бактеріальні пептидоглікани, ліпопептеїни, ліпополісахариди, якірні глікопептеїни	(DAMPs, характерні для TLR2)	TLR1P, MyD88	Прозапальні цитокіни
TLR2 + TLR6	– " –	Ліпоейхосва кислота клітинних стінок грампозитивних бактерій, бактеріальні ліпопептеїни, зимозан грибів	Білки теплового шоку (HSP-60, -70), протеоглікани, фрагменти гіалуронової кислоти	TLR2P, MyD88	– " –
TLR3	Мембрана ендосом	dsRNA	мРНК тРНК	TRIF	Прозапальні цитокіни, ІФ I типу
TLR4	Плазматична мембрана	Ліпополісахарид (LPS) клітинних стінок грамнегативних бактерій, глікопептеїни вірусних оболонкок	Білки теплового шоку, протеоглікани, гепарансульфат, фрагменти гіалуронової кислоти, фібронектин, тенаascin	TRAM, TRIF, TIRAP, MyD88	– " –
TLR5	Плазматична мембрана	Флагелін джугікових бактерій	–	MyD88	Прозапальні цитокіни
TLR7	Мембрана ендосом	ssRNA, специфічний до аналогів гуандину та імідазопіридинових повторів	ssRNA	MyD88	Прозапальні цитокіни, ІФ I типу
TLR8	– " –	ssRNA, збагачена GU-последовностями	ssRNA	MyD88	– " –
TLR9	– " –	Неметильований CpG-мотив ДНК-вірусів та бактерій	Комплекс {хроматин-IgG}	MyD88	– " –

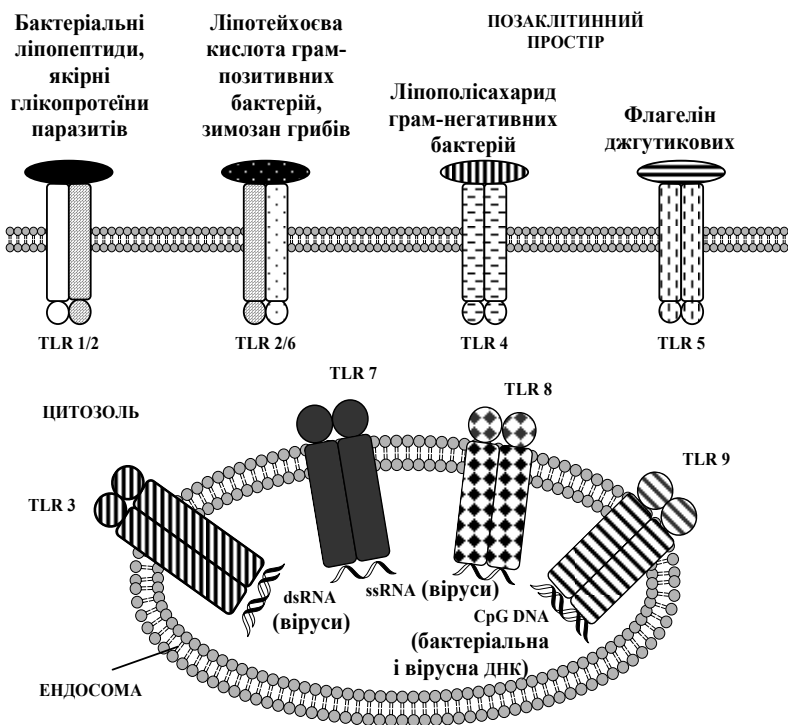


Рис. 11.3. TLRs та їхні ліганди

Останні члени родини TLRs – **TLR10** і **TLR11** – виявлені нещодавно і вони ще погано досліджені.

Отже, компоненти вірусів та інших патогенів, що входять ендоцитозом, розпізнаються TLRs мембран ендосом. PAMPs мікроорганізмів, які взаємодіють з клітиною на її поверхні, зв'язуються із TLRs ПМ, тоді як інфекційні частки, що накопичуються у компартментах цитоплазми, розпізнаються цитозольними PRRs – RIG1, MDA5 і ПкR.

До індукції синтезу **ІФ I** типу в інфікованій клітині причетні **TLR3, 7, 8** та **9** мембран ендосом, а також **TLR4**, локалізований у плазматичній мембрані. **TLR8** та **9** теж здатні

до індукції синтезу ІФ III типу. Останній утворюється при потраплянні в організм вірусної інфекції, яка не обов'язково спричинятиме й синтез ІФ I типу.

11.2.1.2. Сигнальні шляхи Toll-подібних рецепторів

Активация TLRs ініціюється при зв'язуванні ліганду з позаклітинним доменом рецепторів (у цьому залучені багаті на лейцин повтори). Сполучення ліганду індукує конформаційні зміни в позаклітинному домені, наслідком чого стає **ліганд-індукована димеризація рецепторів (формування гомо- або гетеродимерів)**. Це, у свою чергу, приводить до конформаційних змін у трансмембранній ділянці кожного мономеру, які є критичними для передачі сигналу із клітинної поверхні в цитозоль, оскільки сприяють переходу TIR-доменів у цитозольній ділянці рецептора у стан, що дозволяє приєднання до них білків-адаптерів (рис. 11.4).

Численні цитозольні TIR-доменвмісні адаптерні білки – **MyD88** (*Myeloid differentiation primary response gene 88, продукт 88 гена первинної відповіді диференціювання мієлоїду*); **TIRAP** (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein, TIR-доменвмісний адаптерний білок, інша його назва – Mal (MyD88 adapter-like, подібний до адаптера MyD88)*); **TRIF** (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β factor, TIR-доменвмісний адаптерний фактор, що індукує ІФ- β*); **TRAM** (*TRIF-related adaptor molecule, TRIF-залежна адаптерна молекула*) – подібно до TLR, також мають TIR-домен. Отже, взаємодія між рецептором і адаптером (**утворення сигнальних комплексів {TLR/адаптерний білок}**) опосередкована гомотиповими асоціаціями між TIR-доменами рецептора й адаптера. Адаптерні білки є важливою ланкою в сигнальній трансдукції від TLRs та інших PRRs. Тип адаптера, що використовується для подальшої передачі сигналу, ініційованого лігандом, залежить від типу TLRs.

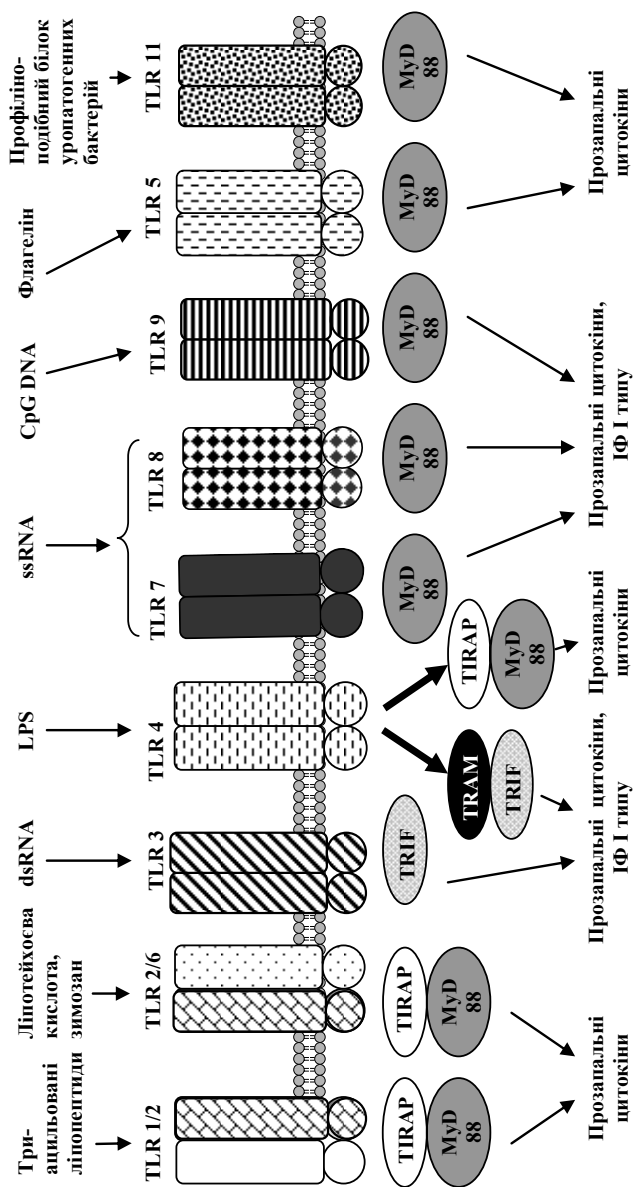


Рис. 11.4. Схема залучення адаптерних білків у TLRs-сигналізацію. TLR1/2 і TLR2/6 одночасно використовують MyD88 та TIRAP, TLR3 – лише TRIF, TLR4 може залучати всі чотири адаптерні молекули, а TLR7/8, TLR9, TLR5 та TLR11 потребують тільки MyD88

TLR1, TLR2, TLR4 та TLR6 залучають **TIRAP**, який слугує адаптером між TIR-доменом TLRs та іншим TIR-вмісним адаптерним білком – **MyD88**; деякі інші члени цієї родини – *TLR5, TLR7, TLR9, TLR11* – можуть безпосередньо зв'язувати **MyD88**.

Білок MyD88 на N-кінці має *домен загибелі DD*, необхідний для його взаємодії з ефекторними молекулами, представленими іншими DD-вмісними білками – *кіназами родини IRAKs (interleukin-1 receptor-associated kinases, IL-1-R-асоційовані кінази)*, а на C-кінці – *TIR-домен*, що дозволяє йому приєднуватися до TLRs. **TLR3** – єдиний із представників TLRs, який не використовує адаптерний білок MyD88. Сигналізація за участю *TLR3* (а також *TLR4*) може опосередковуватися адаптерною молекулою **TRIF**. Однак, залучення TRIF у TLR4-сигнальні шляхи потребує участі **TRAM**.

Приєднання зазначених адаптерних білків запускає сигнальні каскади, результатом яких стає активація ряду транскрипційних факторів, зокрема **NF- κ B**, **AP-1** та **IRFs**. Ці фактори індують експресію генів, залучених у захисні механізми організму. Так, їхніми продуктами є прозапальні цитокіни (IF, IL-1, TNF- α , IL-12), хемокіни, молекули головного комплексу гістосумісності, коstimуляторні молекули, iNOS, антимікробні білки, що безпосередньо руйнують патогени. Зокрема, NF- κ B є ключовим регулятором імунної відповіді, що залучається у проліферацію і виживання клітин та індуює експресію генів IL-2, IL-6, IL-12, MCP-1, TNF- α .

Різна здатність різних TLR приєднувати специфічні адаптерні білки лежить в основі розгалуження сигнальних шляхів від TLR (рис. 11.5).

MyD88-залежний (класичний) сигнальний шлях. *TLRs мають "загальний" сигнальний шлях, який використовують усі TLRs, крім TLR3, і який потребує адаптерного білка MyD88, TRAF6 та протеїнкіназ родини IRAKs. Крім того, різні TLR-рецептори можуть використовувати і "специфічні" сигнальні каскади.*

MyD88-залежний шлях ініціюється зв'язуванням TLR-рецепторами ліганду та їхньою димеризацією. Конформаційні зміни, що при цьому відбуваються у молекулах рецептора, сприяють рекрутуванню в сигнальний комплекс адаптера MyD88 (через наявність у складі останнього С-кінцевого TIR-домену) і протеїнкіназ родини **IRAKs** – IRAK4 та IRAK1 (які сполучаються з MyD88 через N-кінцевий DD-домен).

Після приєднання до адаптерного білка IRAK4 фосфорилює IRAK1, чим створює докерний сайт для зв'язування фактора **TRAF6** (*TNF receptor associated factor, фактор, асоційований з рецептором до TNF*) і сприяє активації останнього. **На цьому етапі сигнальний комплекс, асоційований з TLRs, має вигляд {TLRs/MyD88/IRAK4/IRAK1/TRAF6}.**

Далі {IRAK1/TRAF6} дисоціює від нього і бере участь в активації **протеїнкінази TAK1** (*transforming growth factor beta-activated kinase 1, кіназа-1, що активується трансформуючим фактором росту-β*), яка входить до складу олігомерного комплексу із регуляторними білками TAB1 і TAB2 – {TAK1/TAB1/TAB2} (TAB1, 2 – *transforming growth factor-β-activated protein kinase-1, -2*). **Кінцевим наслідком цих сигнальних процесів є активація транскрипційних факторів NFκB та AP-1.**

Кінази родини IRAKs відіграють ключову роль в опосередкуванні майже всіх TLR-залежних процесів. IRAK1 був першим членом цієї родини, ідентифікованим як найважливіший компонент IL-1R-сигнального шляху. Сьогодні ця родина ферментів представлена чотирма членами: IRAK1, IRAK2, IRAKM та IRAK4. Усі ферменти указаної родини у своєму складі містять DD-домен, необхідний для сполучення з адаптерними білками, та серин/треонінкіназний каталітичний домен.

TRAF6 – це убіквітинлігаза (фермент E3 у системі полі-убіквітинування, підпрозд. 5.2.3.1), що є представником **білків родини TRAFs** (у ссавців TRAF1 – TRAF7). У своїй структурі TRAF6 має висококонсервативний RING-домен (від "*really interesting new gene*", "*дійсно цікавий новий ген*"), характерний для ферментів із убіквітинлігазною активністю, та специфічний С-кінцевий домен, який зумовлює їхню здатність взаємодіяти з іншими сигнальними компонентами, зокрема кіназами родини IRAKs, і, як наслідок, залучатися в регуляцію розвитку запалення, антивірусної відповіді та апоптозу.

У реалізації сигнальних шляхів, ініційованих активацією TLRs, цей білок виступає трансдуктором, що здійснює полі-убіквітинування **кінази TAK1**.

TAK1 є кіназою кінази MAPK (*MAP kinase kinase kinase*, MAPKKK, підпрозд. 3.1.3.2), яка залучається в активацію MAPK-каскадів JNK та p38. Крім того, вона здатна брати участь і в інших сигнальних шляхах. Тому на етапі активації TAK1 відбувається розгалуження цього сигнального шляху:

- **активація MAP-кіназних каскадів** (JNK та p38), наслідком чого є, зокрема, активація транскрипційного фактора **AP-1** (димер c-Fos/c-Jun) та експресія AP-1-залежних генів (наприклад, генів IФ-β та IФ-γ);

- **фосфорилування кінази інгібітора транскрипційного фактора NF-κB** (*inhibitor NF-κB kinase*, ІКК, що є комплексом із трьох субодиниць – ІКК-α, ІКК-β та ІКК-γ), а саме її субодиниці ІКК-β, приводить до її активації та реалізації **NF-κB-шляху** (активована ІКК надалі фосфорилує інгібітор NF-κB (ІκB), унаслідок чого фосфорильований інгібітор руйнується у протеасомі, а NF-κB вивільнюється, транслюкується у ядро й активує експресію NF-κB-залежних генів (наприклад, генів, що кодують прозапальні цитокіни або IФ-β) – підпрозділи 3.1.3.2, 6.2.4) [Chau T. et al.].

MyD88-незалежний (TRIF-залежний) сигнальний шлях. **TLR3**, що не використовує *MyD88* для сигнальної трансдукції, реалізує свою дію через адаптерний білок **TRIF**. **TLR4**-індуковані сигнальні шляхи теж можуть опосередковуватися залученням **TRIF**, але між рецептором і адаптером у цьому випадку виникає посередник – ще один адаптерний білок **TRAM**).

Зв'язування лігандів із **TLR3** сприяє рекрутуванню молекули **TRIF** і насамкінець приводить до експресії прозапальних цитокінів та ІФ I типу через **три незалежні шляхи**. Це зумовлено тим, що молекула *TRIF* у своєму складі має три різні ділянки, здатні сполучатися з різними ефекторними білками. Зокрема, **N-кінцевий домен TRIF** взаємодіє із **TRAF6** з утворенням сигнального комплексу {**TLR3/TRIF/TRAF6**}. Потім через низку каскадних подій, наведених вище, за участю **TRAF6** активуються протеїнкіназа **TAK1** і **TAK1**-сигнальні шляхи, наслідком чого стає функціональна активність транскрипційних факторів **NF-κB** і **AP-1** та індукція експресії генів прозапальних цитокінів.

C-кінцевий домен TRIF може сполучатися із протеїнкіназою **RIP1** (*receptor-interacting protein 1, протеїн 1, що взаємодіє із рецептором*) з утворенням сигнального комплексу {**TLR3/TRIF/TRAF6/RIP1**}. У цьому випадку **RIP1** підлягає **TRAF6**-залежному убіквітинуванию і після цього безпосередньо активує **TAK1**.

Залучаючи адаптерний білок **TRIF**, **TLR3** також може індукувати експресію ІФ I типу через активацію транскрипційних факторів **IRF-3** (*interferon regulatory factor 3, ІФ-регуляторний фактор*), який у латентному стані локалізований у цитозолі, та **IRF-7** (головним чином **IRF-3**) [Ikushima H. et al.]. Цей шлях потребує рекрутування іншої убіквітинлігази родини **TRAFs** – **TRAF3** з утворенням сигнального комплексу {**TLR3/TRIF/TRAF3**} [Paz S. et al.]. Наслідком цього стає наступна активація двох **нетипових, або неканонічних, ІККs** – **TBK1** (*TANK-binding kinase 1,*

кіназа 1, що сполучена із TANK; TANK – TRAF family member-associated NF- κ B activator, активатор NF- κ B, асоційований із членами родини TRAF) та ІКК- ϵ /ІКК- i (inducible I- κ B kinase, індукцибельна кіназа інгібітора NF- κ B). Ці кінази є конститутивно сполученими з адаптерним білком TANK, який виступає сполучною ланкою між ними, та білками, що передують активації ТВК1 і ІКК- ϵ /ІКК- i у сигнальних шляхах (TRIF, TRAF3 або адаптерний білок, залучений у передачу сигналів від цитозольних PRRs).

Неканонічні ІККs, на відміну від канонічних ІККs – ІКК- α та ІКК- β , що регулюють активність транскрипційних факторів родини NF- κ B, беруть участь у активації транскрипційних факторів родини IRF [Clément J. et al.].

ТВК1 та ІКК- ϵ /ІКК- i мають 64 % гомології. ІКК- ϵ /ІКК- i , на відміну від канонічних ІККs та ТВК1, які конститутивно експресуються в усіх клітинах, характерна в основному для клітин підшлункової залози, тимусу, селезінки, лейкоцитів периферійної крові, де продукується на дуже низьких рівнях. Експресія гена ІКК- ϵ /ІКК- i може бути індукована впливом LPS, вірусної інфекції, численними цитокінами.

Активация ТВК1 та ІКК- ϵ /ІКК- i відбувається шляхом аутофосфорилування, але для переходу ферментів у функціонально-активний стан додатково необхідною є убіквітинлігазна активність TRAF3. У процесі активації ТВК1 та ІКК- ϵ /ІКК- i і найчастіше утворюють гетеродимерний комплекс {ТВК1/ІКК- ϵ /ІКК- i }, проте в деяких випадках вони можуть функціонувати і як гомодимери. Так, ТВК1-гомодимери {ТВК1/ТВК1} існують, зокрема, у тих типах клітин, де експресія ІКК- ϵ /ІКК- i не виявлена. Більш того, на відміну від ТВК1-дефектних клітин, які характеризуються потужним зниженням продукції ІФ, ІКК- ϵ /ІКК- i -дефектні клітини генерують ІФ нормально. Існування ІКК- ϵ /ІКК- i -гомодимерів {ІКК- ϵ /ІКК- i /ІКК- ϵ /ІКК- i } також підтверджується тим фактом, що саме ці неканонічні ІККs, але не ТВК1, залучені в мітохондріальні події, які активуються після інфікування.

Обидві кінази можуть фосфорилювати IRF-3 та IRF-7 за ключовими С-термінальними залишками. Проте **активуючий вплив неканонічних IKKs є більш вираженим щодо IRF-3, активація якого веде до індукції експресії генів ІФ-β.** Це пов'язано з тим, що IRF-3 постійно міститься у цитозолі в латентному стані, тоді як утворення IRF-7 може бути індукованим на транскрипційному рівні (лише деякі клітини, зокрема макрофаги, здатні конститутивно експресувати IRF-7 і, відповідно, швидко генерувати ІФ-α). **Індукцію експресії генів IRF-7 може спричиняти низка факторів, зокрема дія вже синтезованого ІФ, тому вважають, що IRF-7, на відміну від IRF-3, причетний до генерування другої хвилі ІФ.**

Після TBK1/IKKε/IKKі-залежного фосфорилування С-кінцевої ділянки IRF-3 гомодимеризується (рідше – гетеродимеризується із IRF-7). Це сприяє його ядерній локації та сполученню з послідовністю ДНК, яка отримала назву **ISRE** (*interferon-stimulated response element, елементи відповіді, стимульовані інтерфероном*). Цю послідовність виявлено в промоторах низки генів, зокрема генів ІФ I типу, генів, що індукуються впливом ІФ та численних інших генів, залучених у імунні процеси й онкогенез. Молекули IRFs, яких на сьогодні виявлено дев'ять, містять консервативну ділянку на N-кінці (близько 120 амінокислот), яка укладається у структуру, здатну специфічно сполучатися із ISRE. Інша частина амінокислотної послідовності цих білків варіює залежно від їхніх функцій.

Ще один член родини IRFs – **IRF-5** – також може бути фосфорильованим TBK1 або IKK-ε/IKK-і; крім того, він може активуватися і під час MyD88-залежного сигнального каскаду за участю ще не ідентифікованих протеїнкіназ. Однак детальні механізми його залучення в транскрипційну регуляцію ІФ I типу ще не з'ясовані.

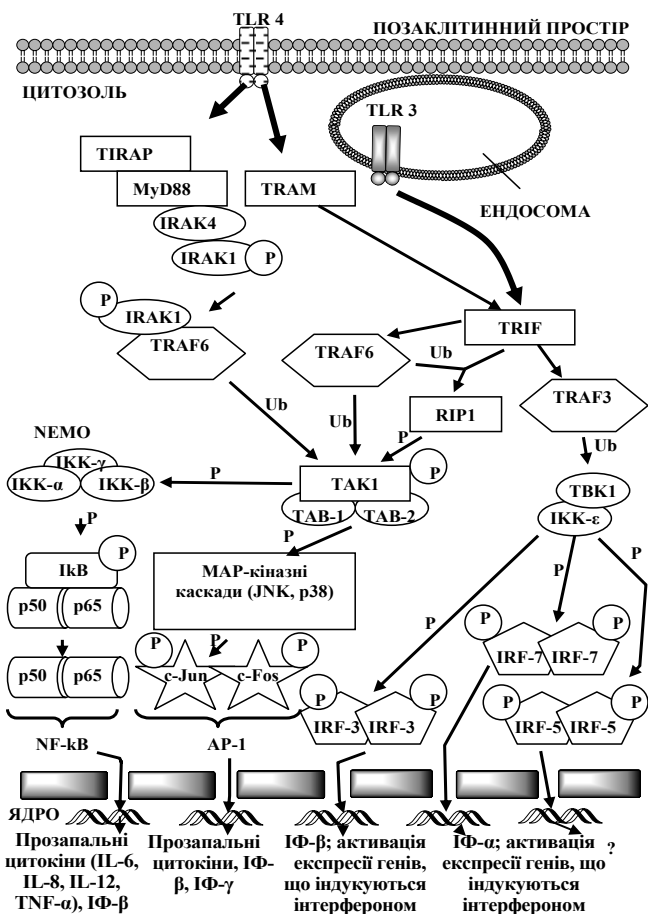


Рис. 11.6. Схема TLR3- і TLR4-ініційованих сигнальних шляхів:

TLR4, що міститься у ПМ, активує MyD88-залежний і TRIF-залежний шляхи, для реалізації яких необхідні додаткові адаптерні білки – TIRAP і TRAM відповідно. MyD88-шлях завершується активацією транскрипційних факторів NF-κB та AP-1. TLR4 також залучає TRAM та TRIF – цей сигнальний шлях веде до активації IRF-3. Крім того, TRIF взаємодіє з TRAF6 та RIP1, наслідком чого стає активація NF-κB. Активація IRF-3, NF-κB і AP-1 необхідна для індукції генів ІФ I типу, в основному ІФ-β. NF-κB і AP-1 також регулюють експресію генів прозапальних цитокінів.

TLR3, локалізований у мембранах ендосом, використовує для передачі сигналів лише адаптерний білок TRIF і відповідні TRIF-залежні сигнальні шляхи

Особливості сигнальної системи TLR4. TLR4 є рецептором до LPS – основного компонента клітинної стінки грам-негативних бактерій та єдиним представником TLRs, що у своїх сигнальних шляхах використовує всі чотири адаптерні білки (рис. 11.6). Так, залучаючи одночасно TIRAP і MyD88, TLR4 утворює сигнальний комплекс {TLR4/TIRAP/MyD88} та активує класичний MyD88-залежний шлях, що приводить до активації транскрипційних факторів NF-κB та AP-1.

З іншим адаптерним білком – TRIF – TLR4 також не може прямо сполучатися і використовує для цього посередник – адаптер TRAM. Наслідком такого {TLR4/TRAM/TRIF}-залежного шляху, який є аналогічним MyD88-незалежному (TRIF-залежному) сигнальному каскаду, що ініціюється стимуляцією TLR3, є активація транскрипційних факторів IRF-3 та IRF-7 (переважно IRF-3) і продукція ІФ I типу (ІФ-β).

Особливості сигнальної системи TLR7/8 та TLR9. Зв'язування лігандів із TLR7/8 і TLR9 індукує активацію транскрипційних факторів NF-κB та AP-1 через класичний MyD88-залежний шлях, наслідком чого стає секреція прозапальних цитокінів.

У клітинах, у яких виявлена конститутивна експресія транскрипційного фактора IRF-7, ці рецептори можуть індукувати утворення ІФ I типу (ІФ-α). Такий шлях передбачає утворення сигнального комплексу {TLRs/MyD88/IRAK4/IRAK1/TRAF6/IRF-7}, у якому IRF-7 активується шляхом IRAK1-залежного фосфорилювання і TRAF6-залежного убіквітинування (рис. 11.7). Після активації IRF-7 димеризується і транслокується в ядро, де виступає індуктором транскрипції ІФ-α [Zhu J. et al.].

11.2.1.3. Цитозольні PRRs у регуляції експресії генів ІФ I типу

TLR3, TLR7/8 та TLR9 локалізовані специфічно в мембрані ендосом і тому здатні індукувати експресію генів ІФ I типу у відповідь на розпізнання компонентів вірусів і бактерій, вивільнених у порожнину цих компартментів клітини. Однак деякі віруси потрапляють безпосередньо в цитозоль, тому TLRs до них нечутливі. Для цих випадків клітини організму-хазяїна експресують **цитозольні сенсори**, які можуть розпізнавати віруси, що активно реплікуються в цитоплазмі.

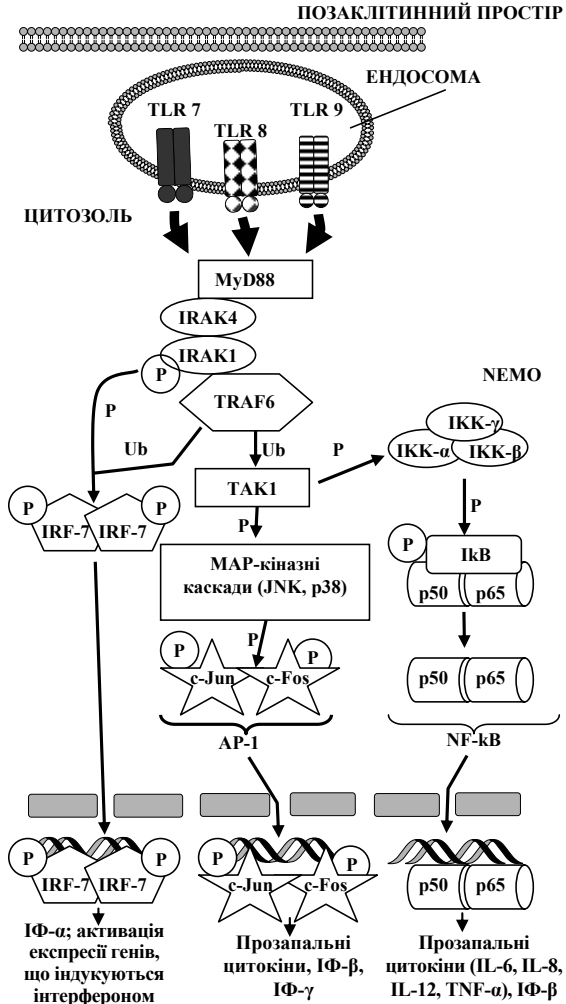


Рис. 11.7. Схема TLR7/8- та TLR9-ініційованих сигнальних каскадів. TLR7/8 і TLR9 експресуються на мембранах ендосом і після активації запускають MyD88-залежний шлях, що завершується активацією транскрипційних факторів NF-κB та AP-1. Крім того, у клітинах, у яких конститутивно експресується IRF-7, може формуватися сигнальний комплекс {TLRs/MyD88/IRAK4/IRAK1/TRAF6/IRF-7} з наступною активацією транскрипційного фактора IRF-7, який регулює експресію генів ІФ-α

До dsRNA-зв'язувальних цитоплазматичних білків належать, зокрема, **представники RIG1-подібних рецепторів** – білки **RIG1** і **MDA5** з dsRNA-хеліказною активністю. Вони містять **два N-термінальні CARD-подібні домени** (CARD – *caspase-recruiting domain*, *домен, що залучає каспазу*) і функціонують подібно до TLR-рецепторів, виконуючи роль сенсорів вірусної інфекції та передаючи сигнали, що спричиняють індукцію синтезу ІФ і прозапальних цитокінів.

Під час сигнального каскаду їхній С-термінальний хеліказний домен (консервативна послідовність амінокислот Asp–Glu–Ala–Asp (DEAD)) взаємодіє із dsRNA, тоді як CARD-подібні домени необхідні для активації ефektorних шляхів, що результиуються в активації IRF-3, NF-κB та AP-1. При цьому RIG1 розпізнає короткі ланцюги (< 4000 п. о) dsRNA, тоді як MDA5 – dsRNA з розмірами понад 2000 п. о. dsRNA-індукована активація RIG1 та MDA5 приводить до розкручування вірусної РНК і викликає конформаційні зміни в молекулах RIG1 та MDA5, що надають їм здатності взаємодіяти із CARD-доменивмісними адаптерними білками.

Такою адаптерною молекулою є, зокрема, **IPS1** (*interferon promoter stimulator 1*, *стимулятор промотора інтерферону*), також відомий як **MAVS** (*mitochondrial antiviral signaling protein*, *мітохондріальний антивірусний сигнальний протеїн*) або **VISA** (*virus-induced signaling adapter*, *вірус-індукований сигнальний адаптер*). Цей білок має:

- **N-термінальний CARD-домен**, необхідний для сполучення із RIG1-подібними рецепторами шляхом CARD-CARD-взаємодій (рис. 11.8);

- **С-кінцеву трансмембранну ділянку**, необхідну для його сполучення із зовнішньою мітохондріальною мембраною;

- **кілька TRAF-зв'язувальних мотивів (TIM)** для сполучення із білками TRAF6 і TRAF3;

- **ділянку для сполучення з білком TRADD** (*tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain protein*, *білок, що містить домен загибелі та асоційований із TNF-R1*), що запускає передачу сигналу через білки, які зазвичай утворюють сигнальні комплекси із TNF-R – **FADD** та **RIP1**.

Сполучення *IPS-1* з мітохондріальною мембраною є необхідним для активації IRF-3, IRF-7 та NF- κ B – зміни локалізації цього адаптера інгібують утворення ІФ I типу та реалізацію прозапальної відповіді. Необхідною умовою для передачі сигналів від RIG1-подібних рецепторів також є *димеризація IPS1*, яка відбувається після зв'язування з рецепторами і залуцає як CARD-домени, так і трансмембранні ділянки молекул.

Активований IPS1 може взаємодіяти з кількома сигнальними молекулами (TRAF3, TRAF6, TRADD, RIP1, FADD тощо). Залежно від цього RIG1 сигналізація може йти шляхом:

- **TRAF6-опосередкованої активації кінрази TAK1**, канонічних IKKs і MAPKs, що спричиняє активацію відповідно NF- κ B та AP-1 (аналогічно до класичного Myd88-залежного шляху);

- **залучення TRAF3 із наступною активацією TANK-сполучених неканонічних IKKs** – TBK1 та (або) IKK-i, які за наведеним вище механізмом фосфорилують фактори транскрипції IRF-3 та IRF-7 (аналогічно до MyD88-незалежного (TRIF-залежного) шляху);

- **приєднання TRADD**, який надалі формує комплекс із FADD та (або) із RIP1. Приєднання FADD вмикає реалізацію програми апоптозу, тоді як сполучення з RIP після приєднання TRAF2 і TRAF2-залежного її поліубіквітинування запускає сигнальні шляхи, що ведуть до активації транскрипційних факторів AP-1 і NF- κ B, під контролем яких експресуються прозапальні та імуномодуючі гени [Paz S. et al.].

Ще одним типом цитозольних PRRs є **ПкR** – цитоплазматична серин/треонінова протеїнкіназа, яка має два **dsRNA-зв'язувальні домени** на N-кінці й активується при сполученні з вірусною dsRNA. Після активації ПкR може блокувати синтез вірусних і клітинних білків (через фосфорилування фактора елонгації трансляції eIF-2 α , підрозд. 11.4) та активувати NF- κ B, MAPKs і IRF-сигнальні шляхи, що викликає апоптоз інфікованих клітин та (або) продукцію ІФ- α/β .

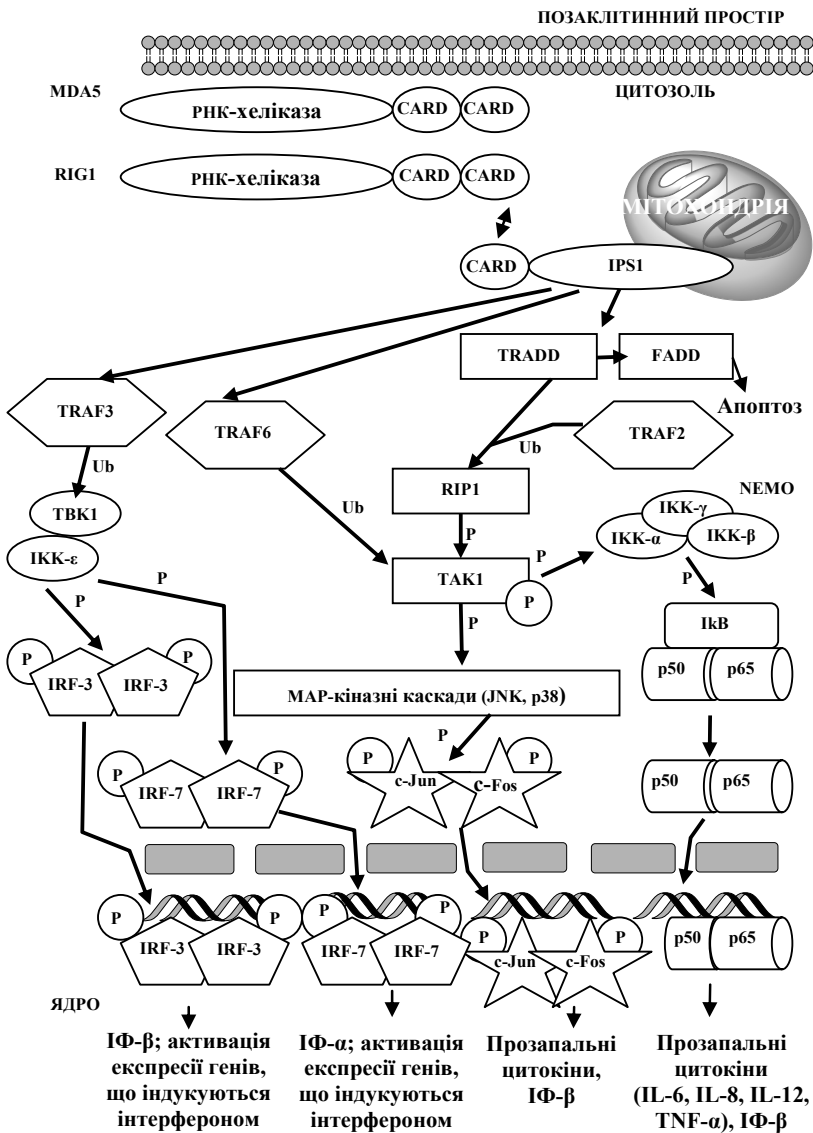


Рис. 11.8. Сигнальні шляхи цитозольних PRRs

Останнім часом з'явилася гіпотеза, згідно з якою транскрипційні фактори, активовані внаслідок зв'язування TLRs та цитозольних PRRs – IRFs, AP-1 та NF- κ B – можуть комплексно залучатися в індукцію експресії генів ІФ I типу шляхом сполучення з відповідними (IRFs-, AP-1- та NF- κ B-зв'язувальними) ділянками у структурі промотера гена ІФ. За цією гіпотезою, для наступної стимуляції транскрипції генів ІФ також необхідна наявність додаткових регуляторних білків [Randall R. et al.].

Деякі віруси виробляють білки, котрі запобігають реалізації сигнальних шляхів, ініційованих TLRs та цитозольними PRRs. Так, білок коров'ячої віспи A52R містить специфічний домен, який зумовлює його асоціацію з IRAK2 та TRAF6 – двома цитозольними білками, що залучаються у TLRs-залежну сигнальну трансдукцію і, як наслідок, виключення цих компонентів із антивірусної відповіді. Білок зовнішнього капсиду реовірусу σ -354, VP35-білок вірусу Ебола та NS1-білок вірусу грипу діють як dsRNA-зв'язувальні білки, що блокують розпізнання вірусного геному цитозольними PRRs (RIG1, MDA5 та ПкR) і запобігають виникненню ІФ-відповіді або зменшують її на ранніх етапах. Вірус грипу може також безпосередньо інактивувати ПкR. V-білок параміксовірусів сполучається із MDA5 і запобігає його активації й продукції ІФ I типу.

11.2.2. Утворення ІФ II типу

ІФ II типу (ІФ- γ) продукується CD4⁺- і CD8⁺-Т-клітинами внаслідок транскрипційної активації під впливом антиген-презентуючих клітин. Промотер ІФ- γ CD4⁺-клітин перебуває під контролем двох різних регуляторних елементів – проксимального і дистального, тоді як у CD8⁺-клітинах він має тільки дистальний елемент. Проксимальний елемент активується комплексом транскрипційного фактора AP-1; дистальний елемент – факторами GATA-3 та ATF-1.

Механізми сигнальної трансдукції, залученої в активацію транскрипції гена ІФ- γ , досліджені погано, але відомо, що вони реалізуються шляхами р38- і JNK-каскадів MAPKs.

Продукція ІФ- γ у відповідь на антигенну стимуляцію значно зростає внаслідок утворення антиген-презентуючими клітинами цитокінів ІL-12 або ІL-18. Однак ні ІL-12, ні ІL-18 самі по собі не можуть стимулювати продукцію ІФ- γ в нестимульованих антигенами Т-клітинах. Отже, ці цитокіни стимулюють продукцію ІФ- γ залежно від антигену. Молекулярні основи цього процесу невідомі, але можуть включати активацію транскрипційного фактора STAT-4 цитокіном ІL-12 та NF- κ B цитокіном ІL-18, а також можуть передбачати активацію рецепторів до ІL-18 цитокіном ІL-12.

ІФ- γ також продукується активованими НК за механізмом, незалежним від антигену, але ця продукція також залежить від утворення антиген-презентуючими клітинами ІL-12 і стимулюється ІL-18 [Zhu J. et al.].

11.3. Механізми дії інтерферонів

Механізми дії інтерферонів різних типів на клітину-мішень подібні (рис. 11.9). Так, молекули ІФ- α і - β зв'язуються із загальним ІФ-рецептором для ІФ І типу (цей шлях було відкрито в 1990-х рр.).

ІФ-рецептор (ІФ-Р) належить до цитокінових янус-рецепторів. Із його внутрішньоклітинним доменом асоційовані цитозольні тирозинові протеїнкінази родини янус-активованих кіназ (*Janus activated kinases*, Jaks). Зв'язування ліганду вмикає кіназну активність у молекулах Jaks, і вони за залишками тирозину фосфорилують одна одну (аутофосфорилування), а також сам рецептор, унаслідок чого в цитозольному домені останнього формуються докерні сайти для приєднання низки сигнальних SH2-вмісних білків, у тому числі транскрипційних факторів STATs (*Signal-Transducing Activators of Transcription*,

активатори транскрипції, що передають сигнал). STATs фосфорилуються янус-активованими протеїнкіназами, димеризуються і транслокуються до ядра, де активують транскрипцію генів, які кодують численні вірус-інгібуючі білки.

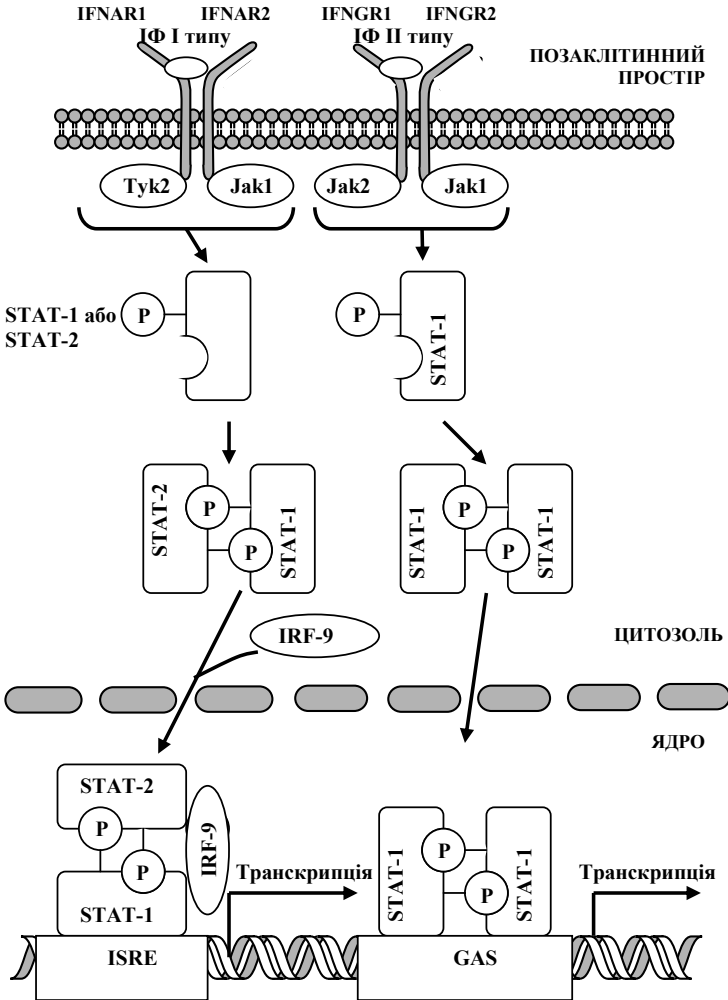


Рис. 11.9. Загальна схема сигнальних шляхів ІФ I і II типів

ІФ II типу зв'язується з рецептором для ІФ II типу, далі сигнал передається за аналогічною схемою.

Загальні риси сигнальних шляхів, ініційованих ІФ III типу, також є подібними до наведених вище. Хоча молекули ІФ III типу структурно подібні до ІФ I типу, вони зв'язуються зовсім з іншими рецепторами клітинної поверхні і, маючи антивірусну дію, одночасно можуть виявляти й інші ефекти, не характерні для ІФ I типу.

Рецептори для ІФ I типу (I тип ІФ-Р), ІФ II типу (II тип ІФ-Р) та ІФ III типу (III тип ІФ-Р) працюють через Jak/STAT систему і складаються із двох субодиниць:

- для ІФ- α/β – IFNAR-1 та IFNAR-2 (I тип ІФ-Р)
- для ІФ- γ – IFNGR-1 та IFNGR-2 (II тип ІФ-Р)
- для ІФ- λ – IFNLR1 (або IL-28 рецептор- α , IL-28R α) та IL-10R β (III тип ІФ-Р)

Кожна із цих субодиниць рецепторів взаємодіє із членом янус-активованих кіназ.

У випадку I типу ІФ-Р IFNAR1-субодиниця взаємодіє з тирозинкіназою 2 (*tyrosine kinase 2*, Tyc2), тоді як IFNAR2 асоціює із Jak1. У випадку II типу ІФ-Р IFNGR1-субодиниця асоціює із Jak1, а IFNGR2 – із Jak2. ІФ-Р III типу, подібно до ІФ-Р I типу, взаємодіє із Tyc2 (субодиниця IL-10R β) і Jak1 (субодиниця IL-28R α) Tagawa M. et al.].

Деякі поксовіруси кодуєть розчинний гомолог ІФ-рецептора, що діє як конкурентний інгібітор біологічної активності ІФ. Наприклад, так діє B18R – білок, що продукується вірусом коров'ячої віспи.

I тип ІФ-Р експресується на всіх соматичних клітинах. II тип ІФ-Р у великих кількостях міститься на поверхнях численних клітин (Т-клітини, В-клітини, макрофаги, НК, фібробласти); експресія IL-28R α субодиниці ІФ-Р III типу є тканинспецифічною (зокрема, відсутня в фібробластах і ендотеліальних клітинах), тоді як IL-10R β субодиниця виявлена всюди.

Протеїнкінази родини Jaks є цитозольними тирозиновими протеїнкіназами, асоційованими з цитозольними домена-

ми цитокінових рецепторів. У сигнальних шляхах інтерферону беруть участь кінази Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2). Кожна Jak має N-кінцевий домен з кіназною каталітичною активністю і регуляторний домен на C-кінці білка. Домен, що відповідає за зв'язування Jak із рецепторами, локалізований на N-кінці.

Зв'язування ліганду веде до димеризації субодиниць рецептора, унаслідок чого збільшується локальне концентрування Jaks, вони активуються шляхом аутофосфорилування і фосфорилують рецептор. До новоутворених фосфотирозинвмісних ділянок цитоплазматичних доменів рецептора приєднуються транскрипційні фактори STATs – таким чином утворюється рецепторний сигнальний комплекс. Одночасно ініціюється сигнал трансдукції, що передбачає фосфорилування залишків тирозину у складі STATs та інших рецептор-асоційованих білків.

STATs є латентними цитоплазматичними транскрипційними факторами. Після утворення рецепторного сигнального комплексу STATs фосфорилуються за унікальним консервативним залишком тирозину, після чого дисоціюють від рецептора й утворюють димери. Усі STATs можуть формувати гомодимери, описані й гетеродимери. При цьому STATs набувають ДНК-зв'язувальних властивостей і, транслокуючись у ядро, сполучаються із промотерами гена й активують транскрипцію, впливаючи таким чином на регуляцію клітинної диференціації, виживання, апоптозу та пухлиногенезу.

У ссавців відомо сім типів STATs: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b і STAT-6 [Ivashkiv L. et al.].

STAT-1 опосередковує антивірусні й імунзапальні ефекти інтерферонів через індукцію імунних ефекторів і прозапальних генів *головного комплексу гістосумісності* (ГКГ, див. далі), коstimуляторних молекул, хемокінів, компоненту, IRF-1, iNOS. Проте STAT-1 може опосередковувати антипроліферативні та проапоптозні ефекти інтерферонів – отже, за певних умов STAT-1 може стримувати запалення.

STAT-2 активується тільки ІФ- α/β і ІФ- λ і є необхідним для ІФ- α/β -відповіді. STAT-2 разом із STAT-1 та ще одним транскрипційним фактором – IRF-9 – формують гетеромерний транскрипційний комплекс ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*), що відіграє ключову роль у ІФ- α/β відповідях у широкому колі типів клітин. STAT-2 можуть також формувати комплекси зі STAT-6 і IRF-9 у В-клітинах, проте значення таких STAT-2:STAT-6 взаємодій ще не з'ясовано.

STAT-3 є плейотропним і може активуватися численними цитокінами (наприклад, ІЛ-6, ІЛ-10 і ІФ- α/β). Конститутивна активація STAT-3 виявляється в ракових клітинах людини, що вказує на важливість STAT-3 у малігнізації. Загалом роль STAT-3 є комплексною, тому активація цього транскрипційного фактора може мати протилежні ефекти в різних клітинах залежно від типу клітин та їхнього статусу.

STAT-4 активується ІЛ-12 і ІЛ-23 у клітинах миші й додатково стимулюється ІФ- α у клітинах людини й може залучатися в сигналізацію ІФ I типу шляхом взаємодії зі STAT-2.

STAT-5 – це дуже споріднені білки STAT-5a та STAT-5b, що кодуються різними, але пов'язаними між собою у хромосомі генами; вони мають деяку відмінність у функціях: STAT-5a не може повністю компенсувати дефіцит STAT-5b. STAT-5 активуються широким колом цитокінів (гормон росту, пролактин, епідермальний фактор росту, фактор росту тромбоцитів, гемопоетичні цитокіни, ІЛ-3, колоніестимулювальний фактор гранулоцитів/макрофагів, ІЛ-5, еритропоетин, цитокіни, що діють на лімфоцити – ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-7, ІЛ-9 та ІЛ-15).

STAT-6 активується ІЛ-4 і ІЛ-13, а в В-клітинах – ІФ- α . Гени-мішені STAT-6 включають такі, що кодують важкий ланцюг ϵ -імуноглобуліну, CD23, ГКГ класу II та ін.

Отже, наслідком активації Jaks, асоційованих із типом I IP, є фосфорилування за залишками тирозину STAT-2 і STAT-1. Це веде до утворення **STAT-1–STAT-2–IRF-9-комплексів**, які отримали назву **ISGF3-комплексів** (*ISGF3 – IFN-stimulated gene (ISG) factor 3, фактор 3 генів, що стимулюються ІФ*).

Ці комплекси транслокуються до ядра і зв'язуються з **ISREs** (*IFN-stimulated response elements, елементи відповіді, стимульовані ІФ*) у ДНК для ініціації транскрипції генів, зокрема генів ГКГ.

Обидва типи ІФ – як І, так і ІІ – також індуюють утворення **STAT-1–STAT-1 гомодимерів**, які транслокуються до ядра і зв'язуються з **GAS-елементами** (*IFN- γ -activated site, сайт, що активується γ -інтерфероном*), присутніми у промоторі кожного **ISG** (*IFN-stimulated gene, ІФ-стимульований ген*), таким чином ініціюючи транскрипцію цих генів [Platanias L. et al.].

Сигнальні шляхи ІФ ІІІ типу подібні до дії ІФ І типу; проте показано, що для ІФ ІІІ типу характерною є більш пролонгована активація STAT-1 і STAT-2, яка супроводжується синтезом цих транскрипційних факторів *de novo* та уповільненням їхньої деградації.

ІФ І та ІІІ типів також можуть індювати утворення інших STAT-комплексів, зокрема гомодимерів STAT-3–STAT-3, STAT-4–STAT-4, STAT-5–STAT-5 і STAT-6–STAT-6 та гетеродимерів STAT-1–STAT-3, STAT-1–STAT-4, STAT-1–STAT-5, STAT-2–STAT-3 і STAT-5–STAT-6. Подібні ІФ-індуковані комплекси, як і у випадку ІФ ІІ типу, зв'язуються у ДНК не з ISREs, а із GAS-елементами у складі промоторів генів, стимульованих інтерфероном. Із сотень відомих ISGs деякі містять лише ISREs або лише GAS-елементи у своїх промоторах, тоді як інші мають обидва елементи. Отже, комбінація різних STAT-вмісних комплексів може бути необхідною для оптимальної активації транскрипції низки генів.

Інтерферони індуюють експресію сотень генів, яка опосередковує численні біологічні відповіді. Ці гени, що стимулюються інтерфероном (ISGs), – "робочі коні" інтерферонової відповіді, які зумовлюють антивірусний, антипроліферативний та імунорегуляторний захист клітин організму-хазяїну (рис. 11.10).

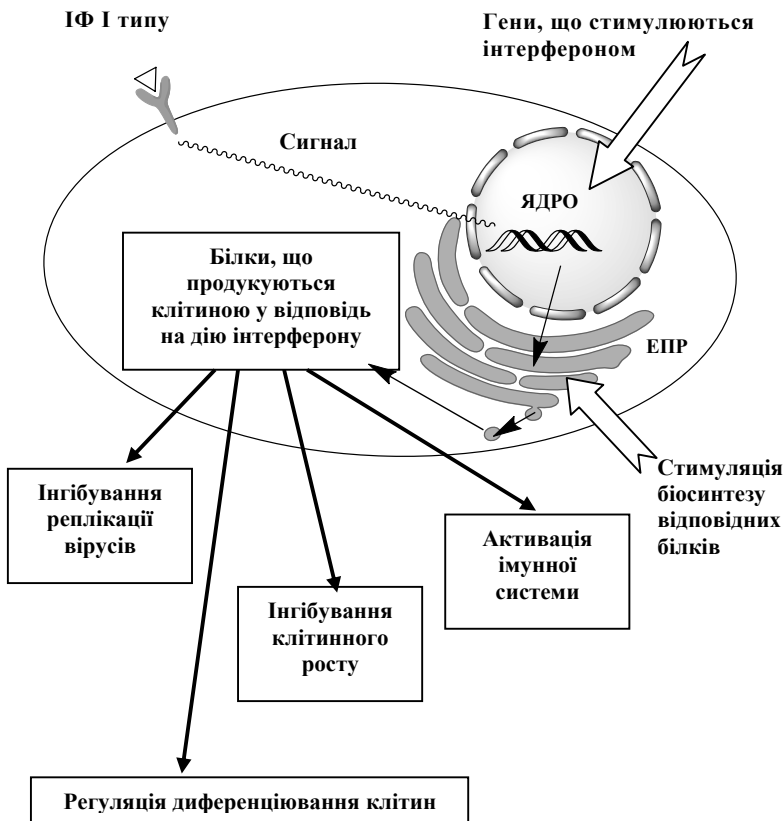


Рис. 11.10. Напрямки дії ІФ-стимульованих білків

Серед них є гени, що кодують ферменти, нуклеотидзв'язувальні білки, транскрипційні фактори, молекули ГКГ I та II типу (див. дод., п. 21), регуляторні білки, деякі цитокіни та їхні рецептори тощо. Декотрі із цих генів регулюються ІФ I і II, тоді як інші – одним типом ІФ. Наприклад, експресія гена ПкR індукується всіма ІФ, 2',5'-олігоаденілатсинтази 1 – ІФ- α та ІФ- β , але не ІФ- γ ; IRF-1 – тільки ІФ- γ , NIF-1 – лише ІФ- β (табл. 11.3).

Таблиця 11.3. Приклади білкових продуктів ISGs, стимульованих ІФ I і II типів

Білок	Індуцибельність		Функції
	ІФ I типу (α/β)	ІФ II типу (γ)	
Регуляторні білки			
Транскрипційний фактор IRF-1	+	+	Транскрипційна регуляція ІФ та ІФ-індуцибельних генів
IL-6	-	+	Імуномодулююча відповідь
IL-2	+	-	
Інгібітор циклінозалежної кінази Cdk1p21	?	+	Антипроліферативна дія
Mx-білок	+	-	Антивірусна активність
Ферменти			
2', 5'-олігоаденілат-синтаза (ОАС)	+	-	Антивірусна відповідь
iNOS	-	+	Цитотоксичність макрофагів
Протеїнкіназа R (ПкR)	+	+	Антивірусна активність, активація NF- κ B
Антигени лімфоцитів			
Антигени лімфоцитів	+	+	Активация лімфоцитів
Рецептори			
Рецептори до IgG	-	+	Впливи антитіл
Рецептори до IL	-	+	Імуномодулююча відповідь
Білки клітинної адгезії			
ICAM-1	-	+	Антизапальна дія
VCAM-1	-	+	
Нуклеотидзв'язувальні білки			
Гуанілатзв'язувальні білки	+	+	Антивірусний і антибактеріальний ефекти
РНК-зв'язувальні білки	+	?	Антивірусна дія
Компоненти гкг			
ГКГ II класу	-	+	Презентація антигенів, стимулювання імунітету, опосередкованого T-і B-лімфоцитами
ГКГ I класу	+	+	

**Таблиця 1.4. Біологічні ефекти білків,
стимульованих інтерфероном**

Ген	Функція білка	Механізм дії
ОАС, РНКаза L	Розщеплення РНК	Деградує вірусну РНК
РкR	Фосфорилування eIF-2 α	Блокується синтез білків
p56	Зв'язує eIF-3	
Mx1	ГТФаза, залучена у формування вірусного нуклеокапсиду	Порушення збирання вірусного нуклеокапсиду
ISG15	ISGylation	Цитокіноподібні модифікації білків
PLSCR1	Міграція фосфоліпідів, зв'язування ДНК	Зростає експресія низки ISG
TRAIL/APO2L	Ліганд рецептора загибелі	Апоптоз
XAF1	Блокує інгібітори апоптозних протеаз, зокрема XIAP	
ISG12	? (можливе залучення у ядерний транспорт)	Антивірусний ефект
GBP1*	ГТФаза	Антивірусний ефект; інгібітор ангиогенезу
ISG20	3'-ендонуклеаза (діє на РНК і ДНК)	Антивірусний ефект
PML	Транскрипційний фактор, супресор пухлин; залучений у антипухлинну активність білка p53	Антивірусний і антипухлинний ефекти
ADAR1	Аденозиндезаміназа (діє на dsRNA)	Зміна трансляції
iNOS	NO-синтаза	Антивірусний ефект
Nup98/Nup96	Нуклеопорин – транспорт РНК і білків	Антивірусний ефект
RIG1, MDA5	Цитозольні рецептори, що розпізнають компоненти патогенів	Активация експресії ІФ I типу і виникнення другої хвилі інтерференової відповіді
IRF-7	Транскрипційний фактор-індуктор експресії генів ІФ I типу	
STAT-1	Транскрипційний фактор-індуктор експресії ISGs	Активация експресії ISGs

*Примітки: GBP1 – guanylate binding protein 1, гуанілат-зв'язувальний протеїн 1; Nup98/Nup96 – nucleoporin 98/96 kDa, нуклеопорин 98/96 кД; PLSCR1 – phospholipid scramblase 1, фосфоліпідна скрамблаза 1; PML – promyelocytic leukaemia (від "пром'єлоцитарна лейкемія"); TRAIL/APO2L – tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, ліганд, подібний до фактора некрозу пухлин, здатний індукувати апоптоз; XAF1 – X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1, інгібітор апоптоз-асоційованого фактора 1; XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis proteins, інгібітор апоптозних білків.

ІФ III типу індукує експресію понад 60 різних ISGs, більшість із яких також індукуються дією ІФ I типу (наприклад, 2',5'-олігоаденілатсинтаза, білок MxA, молекули ГКГ I типу). Однак рівень активації транскрипції зазначених генів при дії ІФ III типу часто виявляється зниженим.

Саме індукцією експресії ISGs під впливом ІФ і синтезом відповідних інтерферонзалежних білків пояснюються антивірусні та антипухлинні ефекти останнього (табл. 11.4) [Perry A. et al.].

Серед ISGs є, зокрема, IRF-7, RIG1 та MDA5, які зумовлюють *виникнення другої хвилі ІФ I типу* – цим пояснюється здатність ІФ I типу підвищувати антивірусний захист сусідніх клітин (так звана паракринна дія ІФ I типу). Через індукцію гена IRF-1, продукт якого, як і IRF-7, є транскрипційним фактором, ІФ I типу індукує експресію генів iNOS, PkR та 2',5'-олігоаденілатсинтетази – білків, причетних до реалізації антивірусних властивостей ІФ.

Більшість вірусів виробила ряд стратегій, спрямованих на блокування класичних Jak/STAT шляхів (рис. 11.11). Вони можуть бути пов'язані із блокуванням індукції/експресії ІФ, із запобіганням зв'язуванню рецепторів з ІФ через "уловлювання" вірусами ІФ-рецепторів, зі змінами у внутрішньоклітинних сигнальних шляхах ІФ або ж із безпосереднім інгібуванням експресії ISGs.

Поряд із класичною активацією Jak/STAT сигнальних шляхів, активація Jaks, асоційованих із рецепторами до ІФ, імовірно, безпосередньо чи опосередковано регулює кілька інших каскадів, зокрема MAP-кіназні каскади. Така дивергенція у сигналізації пояснює плейотропні біологічні ефекти ІФнів на клітини-мішені та тканини [Goodbourn S. et al.]. Крім того, детальне вивчення Jak/STAT-сигнального каскаду показало, що активація Jak/STAT шляхів сама по собі не забезпечує генерацію всіх біологічних активностей ІФнів. Кілька інших ІФ-регульованих сигнальних елементів і каскадів необхідні для виникнення багатьох відповідей інтерферонів. Деякі із цих шляхів відбуваються незалежно від Jak/STAT-системи, а інші кооперуються зі STATs для оптимізації транскрипційної регуляції генів-мішеней. Здатність активувати альтернативні сигнальні шляхи доведена для ІФ I і II типів.

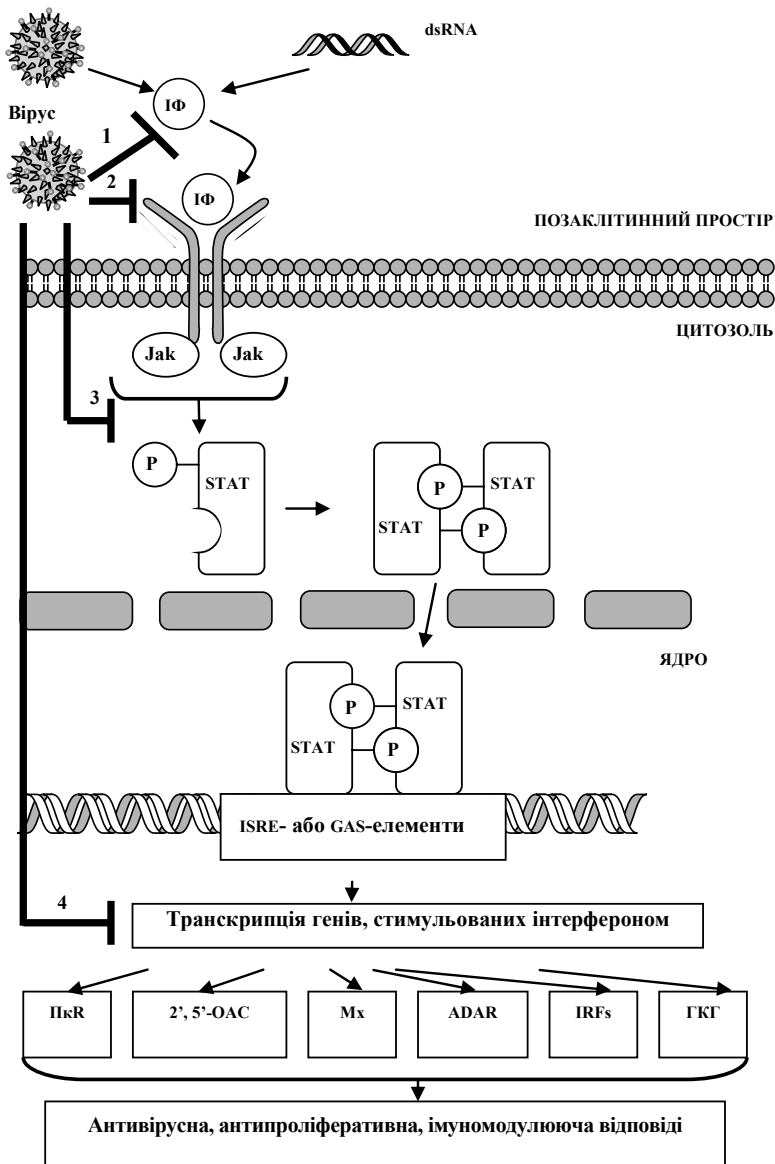


Рис. 11.11. Механізми пристосування вірусів до антипатогенних впливів ІФ

p38-сигнальний каскад є найважливішим із MAPKs щодо генерування ІФ-опосередкованих сигналів. Ця група кіназ включає кілька ізоформ (p38 α , p38 β , p38 γ і p38 δ), які кодуються різними генами, але мають значну структурну гомологію.

Використання інгібіторів p38 та "нокаутованих" мутантів показує, що інгібування активності p38 не блокує ні тирозинове фосфорилування STAT-1 або STAT-2, ні утворення зрілого ISGF3-комплексу, ні зв'язування цих комплексів із ISREs, що вказує на незалежність механізмів, які залучають p38, від активації STAT.

Jaks після активації інтерфероном фосфорилують і активують фактори обміну гуанінових нуклеотидів GEFs, зокрема SH2- і SH3-доменвмісний білок VAV, що веде до подальшої активації ГТФази Rac1, і, можливо, інших малих G білків, які можуть регулювати сигнальний шлях p38-MAPK.

Так, за дії Rac1 спочатку активується кіназа кінази MAPK (MAPKKK), яка, у свою чергу, активує кінази MAPK (MAPKK3 і MAPKK6), які безпосередньо фосфорилують p38, що сприяє активації останнього ферменту (рис. 11.12).

Активована кіназа p38 стимулює мультиплетні розташовані нижче ефектори, зокрема протеїнкінази-2 і -3, які активуються MAPK (MAPKAPK2 і MAPKAPK3 відповідно), кіназу 1, що активується мітогенами і стресом (MSK1), і протеїнкіназу-1, яка взаємодіє з MAPK (*MAPK-interacting protein kinase 1, MNK1*).

Кіназа p38, зокрема, необхідна для здійснення антилейкемічних властивостей ІФ. Крім того, її ефектор MAPKAPK2 активується під впливом ІФ I типу в клітинах-попередниках гемопоетичних клітин, опосередковуючи сигнали, які пригнічують гемопоез. p38 також залучена в антивірусну відповідь ІФ: фармакологічне інгібування p38 або надекспресія домінантнегативних мутантів p38 пригнічує антивірусні властивості ІФ- α проти вірусів везикулярного стоматиту й енцефаломіокардиту, а також проти вірусу гепатиту С (HCV).

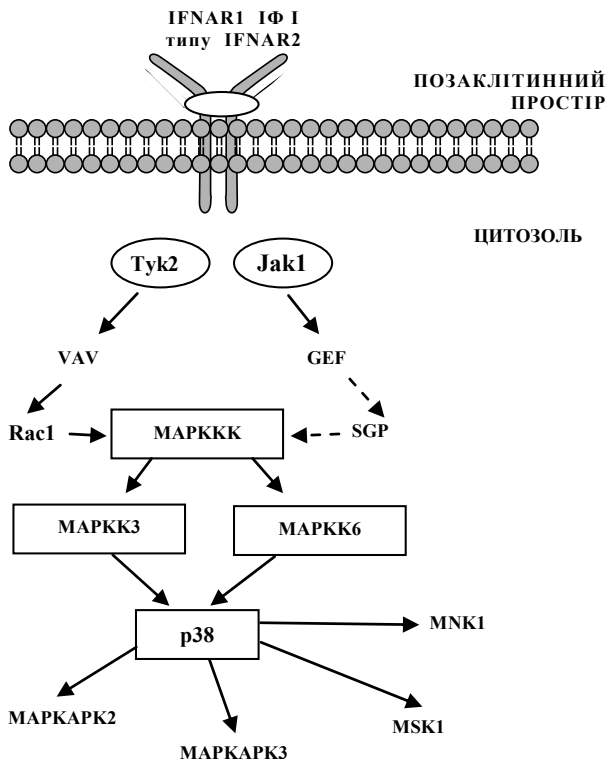


Рис. 11.12. Залучення p38-каскаду MAPK у сигнальні шляхи ІФ I типу

МЕК–ЕРК шлях може активуватися ІФ- α , ІФ- β і ІФ- γ ; однак за деяких умов ІФни можуть і блокувати конститутивну активність МЕК–ЕРК-сигнального шляху.

Мало що відомо про залучення **JNK-шляху** в ІФ-опосередковану сигналізацію. Останні дані вказують на те, що JNKs можуть регулювати індукцію сигналів під час ІФ-відповіді на вірусну інфекцію, що спричиняє видалення вірусінфікованих клітин шляхом апоптозу. Однак невідомо, чи JNKs безпосередньо активуються зв'язуванням ІФ із ІФ-рецепторами, та чи належить їм пряма роль у ІФ-опосередкованій сигналізації.

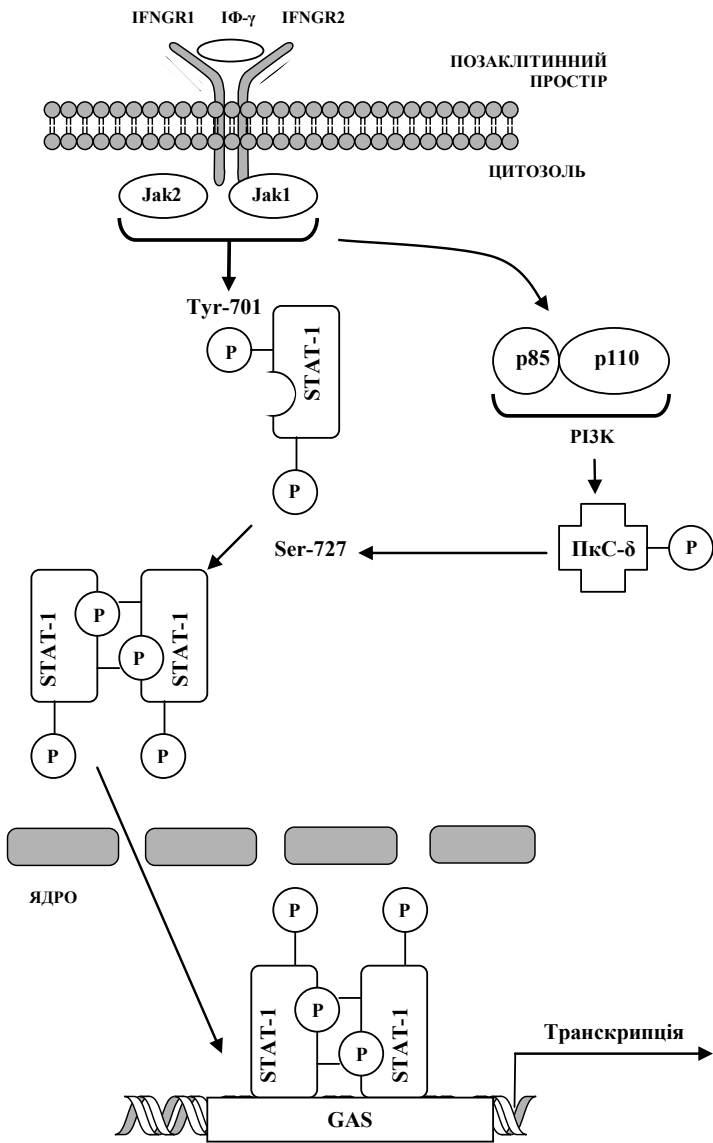


Рис. 11.13. Залучення PI3K-залежних шляхів у IФ-сигналізацію

За дії ІФ- γ допоміжним регулятором Jak/STAT-сигнального шляху може виступати активація РІЗК і ПкС- δ (рис. 11.13). Так, після зв'язування ІФ- γ з II типом ІР за класичним Jak/STAT механізмом активуються Jak1 і Jak2, які фосфорилують STAT-1 за Тут-701. Тирозинфосфорильована форма STAT-1 утворює димери, що транслокуються до ядра і зв'язують GAS-елементи, присутні у промотерах генів, що регулюються ІФ- γ .

При цьому Jaks, що активуються інтерфероном- γ , також регулюють, хоча за ще не зовсім зрозумілим шляхом, активацію каталітичної субодиниці (p110) РІЗК. Активація РІЗК зумовлює наступну активацію ПкС- δ , яка, у свою чергу, регулює фосфорилування STAT-1 за Ser-727. Фосфорилування Ser-727 не є необхідним для транслокації STAT-1 до ядра або для зв'язування STAT-1 із ДНК, але потрібне для повної активації транскрипції генів-мішеней.

Під час відповіді на дію інтерферонів РІЗК-сигнальний шлях може опосередковувати як про-, так і антиапоптозні сигнали залежно від клітинного оточення й від присутності або відсутності активації інших ІФ-залежних сигнальних шляхів. Так, інший розташований нижче ефектор РІЗК – Akt – опосередковує антиапоптозні й ростові сигнали.

Цей ІФ-індуцибельний РІЗК–Akt-сигнальний шлях є одним із пояснень терапевтичних ефектів ІФ- β на перебіг мультиплетного склерозу, які базуються на здатності ІФ- β протектувати астроцити від клітинної загибелі шляхом апоптозу, що характерна для ранніх стадій цього захворювання. Існують дані, що активація РІЗК-сигнального шляху в U266-клітинах мієломи є необхідною для ІФ- α -індукованого апоптозу.

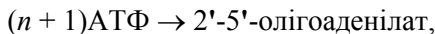
Для кількох інших ІФ-залежних біологічних відповідей також характерне залучення РІЗК, серед них ІФ- γ -стимульована експресія iNOS клітинами мікроглії та регуляція ІФ- β -залежного фосфорилування p65-субодиниці (= REL-A) NF- κ B.

11.4. Біологічні ефекти інтерферонів

Усім інтерферонам тією чи іншою мірою притаманні однакові біологічні активності – антипроліферативні, антивірусні (причому ІФ не має специфічності щодо вірусів) та імуномодулюючі властивості. При цьому дві перші зумовлені індукцією під впливом ІФ синтезу низки ефекторних антивірусних білків і є основними для ІФ I типу (ІФ- α і ІФ- β), а остання – для ІФ- γ , найголовнішими функціями якого є індукція експресії молекул ГКГ II класу та здатності макрофагів розпізнавати вірусну інфекцію і вбивати інфіковані клітини.

Одним із найважливіших ІФ-індукованих білків, що має виражену антивірусну активність, є **2',5'-олігоаденілатсинтетаза** (ОАС) (рис. 11.14). ІФ індукуює транскрипцію ОАС у неактивному стані. Активація 2',5'-ОАС здійснюється під впливом dsRNA.

Цей фермент полімеризує АТФ у серію 2'-5'-зв'язаних олігомерів (2'-5'-олігоаденілатів) у реакції:



через що вірус не може використовувати АТФ як джерело енергії; при цьому також змінюється вірусний геном. *Зворотню реакцію поступового розщеплення 2'-5'-олігоаденілатів з вивільненням АМФ здійснює фермент фосфодіестераза.*

За розміром виділяють кілька типів ОАС, які відрізняються за клітинною локалізацією, рН-оптимумом і синтезують утворення олігоаденілатів різного розміру. Усі ОАС індукуються ІФ I типу (є кілька даних про те, що активація ферменту можлива й за участі ІФ II типу – але опосередковано через активацію IRF-1).

Основною функцією утворених у реакції 2'-5'-олігоаденілатів є активація **2',5'-олігоаденілатзалежної ендорибонуклеази L** (*RNase L*, *РНКаза L*), під впливом якої деградує вірусна РНК [Carroll S. et al.]. РНКаза L – це білок, що має 741 амінокислотний залишок, М. м. 80 кД (мономерна форма; мономер неактивний). Фермент складається із трьох доменів (N-кінцевий домен з анкіриноподібними повторами (дев'ять повторів), кіназоподібний домен і C-термінальний рибонуклеазний).

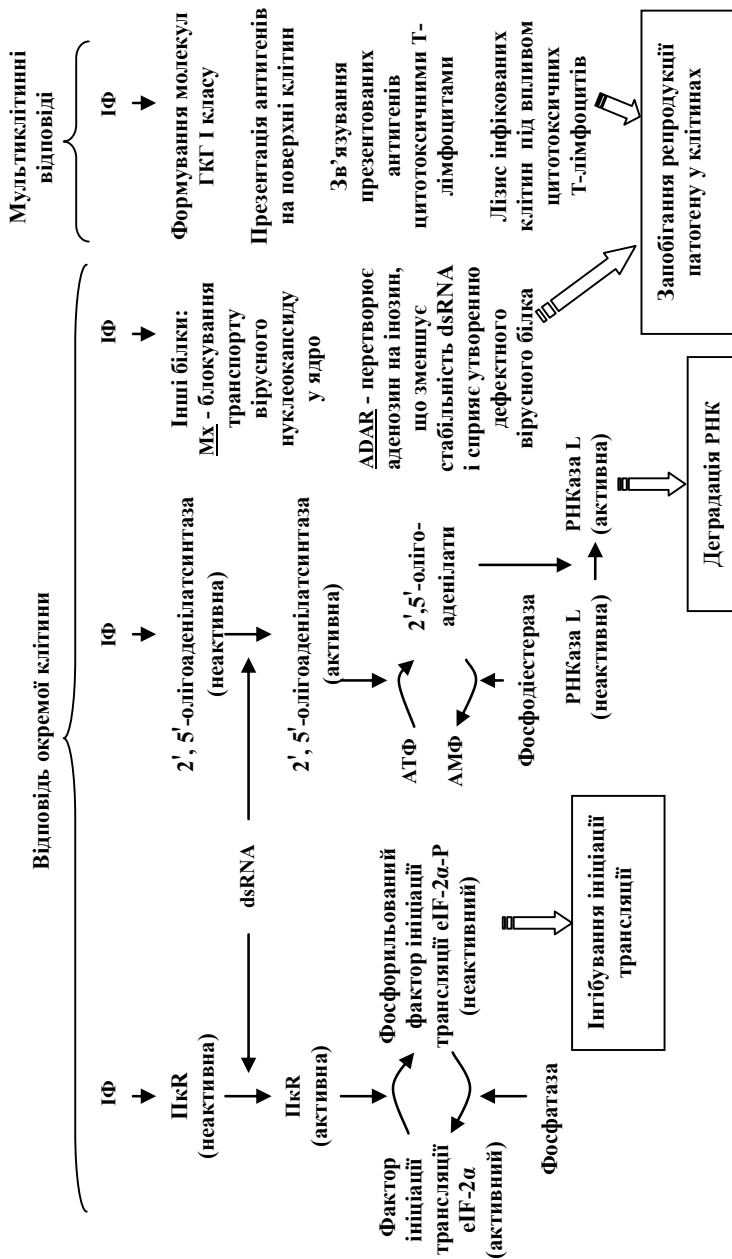


Рис. 11.14. Механізми антивірусної дії ІФ I типу

Перший домен (а саме, повтори 2, 4) відповідає за зв'язування 2'-5'-олігоаденілатів, тоді як С-кінцевий – за каталітичну активність (рис. 11.15).

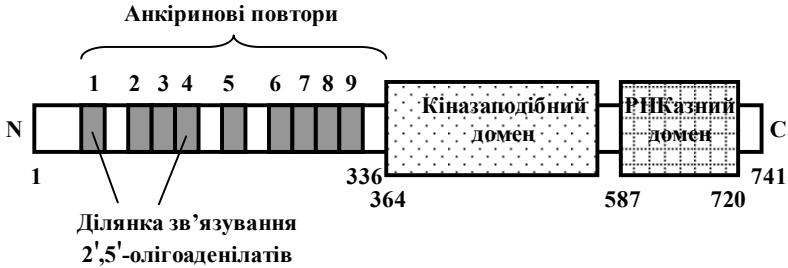


Рис. 11.15. Структура мономера РНКазу L

Зв'язування 2'-5'-олігоаденілатів з РНКазою L індукує конформаційні зміни в молекулі ферменту, наслідком чого стає димеризація і набуття ферментом ендонуклеазної активності. Гомодимеризація та активація потребують взаємодії кіназаподібних доменів обох мономерів. Активованій ензим здатний розщеплювати РНК шляхом ендонуклеолізу за специфічними діадами основ. Ця активність регулюється природним інгібітором РНКазу L (RLI), експресія якого не пов'язана з ІФ-контролем.

За дії РНКазу L деградації може підлягати як вірусна одноланцюгова РНК (ssRNA), так і власна РНК клітини-хазяїна (за тривалої дії збудника). Останній процес здатний ініціювати апоптозну загибель клітини-хазяїна і є одним із пояснень антивірусної й антипухлинної дії ІФ. Крім того, фрагменти ssRNA, що утворюються під впливом РНКазу L, через активацію таких цитозольних PRRs, як RIG1 і MDA5, можуть спричинити **нову хвилю утворення ІФ I типу** (рис. 11.16).

Сигнальний шлях, що залучає ОАС і РНКазу L, є механізмом захисту організму проти вірусів енцефаломіокардиту (encephalomyocarditis, EMCV), гепатиту С (HCV), коров'ячої віспи, ВІЛ, деяких ретровірусів тощо.

У деяких тканинах РНКазу L здатна активуватися і за відсутності інфекції та може брати участь у процесах клітинного диференціювання, імунної активації та діяти як супресор пухлин.

Крім того, нещодавно було показано (Р. Сухадольник), що РНКаза L причетна до розвитку *хронічного синдрому втоми (chronic fatigue syndrome)* [Englebienne P.]. В імунних клітинах пацієнтів із цим розладом РНКаза L розщеплюється під впливом лейкоцитарної еластази людини, продукція якої зростає у відповідь на запалення.

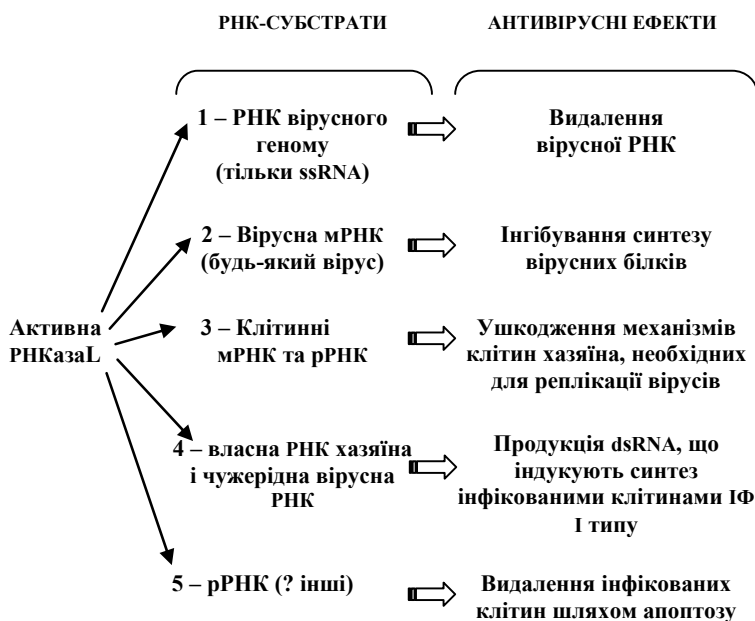


Рис. 11.16. Біологічні активності РНКазы L

Після такого розщеплення малі фрагменти РНКазы L втрачають регуляторні функції самоконтролю, унаслідок чого клітинна РНК розщеплюється з аномально високою швидкістю. Це перешкоджає нормальному функціонуванню клітин і пояснює більшість типових симптомів синдрому. Зокрема, надлишкове розщеплення РНК спричиняє апоптоз імунних клітин, генеруючи загальну дисфункцію імунної системи, унаслідок чого у таких пацієнтів легше розвиваються супровідні інфекції (герпесвірус, мікоплазма, хламідія). Фрагменти РНКазы L також мають здатність до інтерференції з іонними каналами, що викликає

розвиток каналопатій, котрі приводять до таких проявів, як посилене потовиділення, швидкоплинна гіпоглікемія, зниження больового порогу, депресії, зорові проблеми, гіперчутливість до токсичних речовин.

Іншим індукованим інтерфероном білком з антивірусною активністю є **протеїнкіназа R** (ІФ-індукована РНК-залежна ПК, ПкR). Ця серин/треонінова протеїнкіназа міститься у цитоплазмі (де зв'язана з рибосомами) та в ядрі. У людини молекула ПкR має М. м.68 кД, складається із 551 амінокислотних залишків і кодується одним геном, локалізованим у хромосомі 2p21. У структурі молекули виділяють N-термінальний dsRNA-зв'язувальний і С-термінальний кіназний домени. Перший складається із двох тандемних копій консервативного dsRNA-зв'язувального мотиву – dsRBM1 і dsRBM2.

Синтез неактивної ПкR індукується ІФ I і II типу. Подібно до ОАС, активаторами ПкR виступають вірусні dsRNA (мінімальний розмір – 30–45 п. н., оптимум – 80 п. н.; у безпосередню взаємодію із ПкR вступають 11 п. н.). Активація ферменту відбувається при інфікуванні багатьма вірусами, які містять dsRNA або як геном, або як реплікативний інтермедіат. Механізм активації передбачає димеризацію молекули ПкR та її аутофосфорилювання за мультіплетними залишками серину і треоніну. Ще одним активатором цієї протеїнкінази є РАСТ (*PкR-activating protein, ПкR-активуючий білок*).

Активна ПкR фосфорилює низку мішеней [Barber G.], зокрема (рис. 11.17):

- **власну молекулу** (аутофосфорилювання);
- **eIF-2 α** (субодиницю еукаріотичного фактора ініціації трансляції: повний eIF-2 є гетеротримером, який містить субодиниці $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$), що спричиняє порушення трансляції клітинної мРНК і таким чином запобігає синтезу вірусних і клітинних білків;
- **ПкВ** (інгібітор транскрипційного фактора NF-kB), що спричиняє активацію NF-kB та індукцію експресії NF-kB-залежних генів, зокрема гена ІФ I типу (ІФ- β). Так, дія ПкR викликає "другу хвилю" синтезу ІФ;

- інші транскрипційні фактори (IRF-1, p53, STAT-1 тощо), контролюючи ріст клітин, їхню диференціацію, антипухлинні механізми, клітинний цикл, апоптоз;
- tat-білок вірусу ВІЛ.

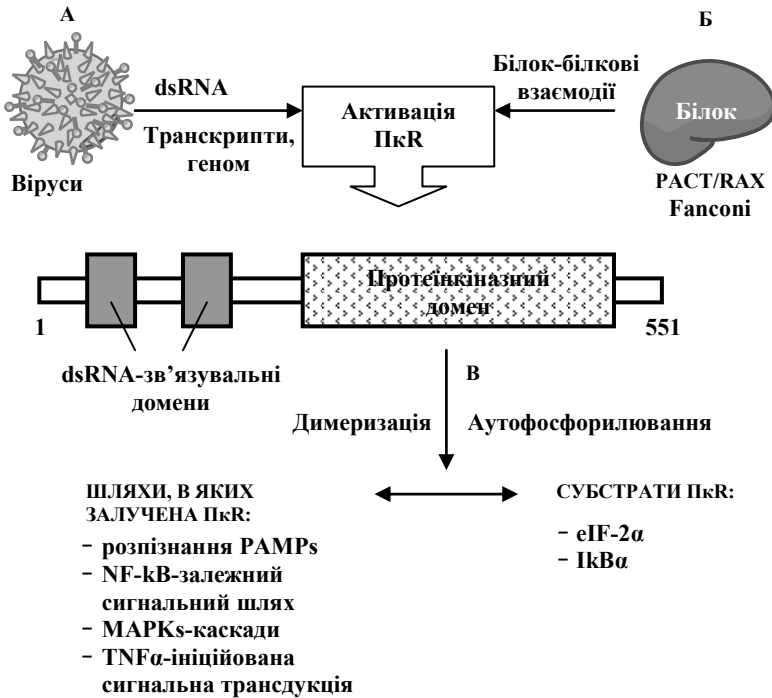


Рис. 11.17. Напрямки антивірусної дії ПкR:
 А – dsRNA-залежна активація ПкR; Б – активація ПкR білок-білковими взаємодіями; В – активація ПкR шляхом димеризації та аутофосфорилування

Численні віруси, однак, уникають активації ПкR, оскільки мають ряд пристосувань, зокрема:

1) зв'язування та ізоляція dsRNA, що позбавляє ПкR від її активатора (наприклад, вірусний білок Sigma 3 у реовірус-інфікованих клітинах та E3-білок у клітинах, інфікованих вірусом коров'ячої віспи, зв'язує dsRNA);

2) **деградація ПкR** (активовані протеази поліовірусу);

3) **блокування димеризації та (або) аутофосфорилування, зокрема за рахунок зв'язування ПкR** (наприклад, у клітинах, інфікованих вірусом грипу, активується білок 58кД, що блокує аутофосфорилування ПкR, а вірус гепатиту С продукує білок NS5A, який зв'язується з доменом, котрий відповідає за димеризацію ПкR, та інгібує цей процес);

4) **інгібування її кіназної активності** (наприклад, у клітинах, інфікованих аденовірусом і вірусом Епштейна – Барра, високі концентрації частково дволанцюгової вірусної РНК інгібують ПкR, а у клітинах, інфікованих поліовірусом, синтезується білок, що зв'язується з eIF-2 та інгібує фосфорилування α -субодиниці активною кіназою);

5) **залучення псевдосубстратів** (у клітинах, інфікованих вірусом коров'ячої віспи, білок K3L має амінокислотну послідовність, гомологічну eIF-2 α , тому може зв'язуватися з кіназою замість eIF-2);

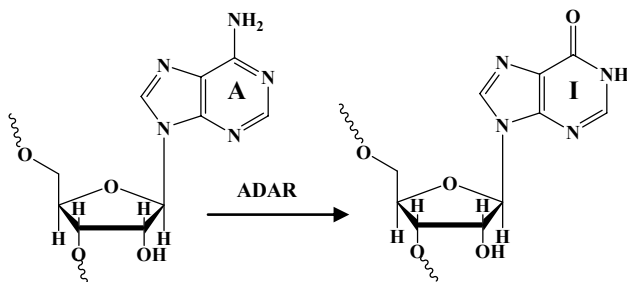
6) **дефосфорилування субстратів** (герпесвіруси виробляють білок, що активує реакції дефосфорилування eIF-2 α , фосфорильованого ПкR).

Мх-білки (*mexovirus proteins, білки міксовірусу*) є індукованими інтерфероном **ГТФазами** з М.м. ~ 80 кД, що належать до суперродини динаміноподібних ГТФаз і, маючи пряму антивірусну активність, діють на широке коло вірусів (віруси грипу, ортоміксо- та параміксовіруси, рабдо- і тогавіруси). Синтез цих білків індукується лише ІФ I типу. У людини ідентифіковано два Мх-білки: МхА (цитоплазматичний, асоційований із внутрішньоклітинними мембранами) і МхВ (міститься у ядрі), їхні гени локалізовані у 21 хромосомі. Мх має два функціональні домени: N-кінцевий ГТФ-зв'язувальний і C-кінцеву ефекторну ділянку, що залучається у самозбирання та розпізнання вірусної мішені.

Мх-білки самостійно гальмують реплікацію вірусів, вони, зокрема, необхідні для резистентності клітин до вірусу грипу. Їхня антивірусна активність залежить як від зв'язування ГТФ, так і від білок-білкових взаємодій з вірусними білками, що насамкінець або порушує синтез вірусних РНК (на реплікацію вірусів грипу та кору так діє МхВ), або блокує транспорт вірусного

нуклеокапсиду в ядро, у якому безпосередньо відбувається вірусна реплікація і транскрипція. Зокрема, МхА зв'язується з нуклеокапсидом грипоподібного вірусу *Thogoto* і блокує його ядерний імпорт, чим дерегулює ріст під час онкогенезу. У випадку буньявірусів (*bunyaviruses*), зокрема *La Crosse virus*, що мають цитоплазматичну фазу реплікації, асоціація МхА з білком вірусного нуклеокапсиду спричиняє утримання вірусного протеїну в перінуклеарному просторі й інгібування вірусної реплікації. Антивірусні ефекти білків Мх спрямовані на ранні стадії життєвого циклу вірусів, одразу після потрапляння їх у клітину-хазяїна та перед ампліфікацією геному.

Синтез **РНК-специфічної аденозиндезамінази ADAR1** (*adenosine deaminase acting on RNA*) індукується ІФ I типу (хоча в науковій літературі є кілька посилань на те, що таку індукцію може здійснювати і γ -ІФ). Молекула цього білка кодується одним геном. На відміну від ОАС і ПкR, що неспецифічно асоціюють (активуються) dsRNA, ADAR1 використовує dsRNA як субстрат для дезамінування аденозину. Так, ADAR1 здійснює каталітичну модифікацію високомолекулярної РНК з перетворенням аденозину (шляхом дезамінування) на інозин:



При цьому dsRNA стає менш стабільною; крім того, інозин розпізнається на рибосомі як гуанозин, утворюється дефектний білок і порушується збирання капсиду вірусу. Подібні "гіпермутації" характерні для таких вірусів, як вірус кору, парагрипу, везикулярного стоматиту, поліомавірусу. Є думка, що ефекти ADAR1 на віруси можуть спричинити постійну (персистентну) латентну інфекцію.

Інтерферон також може індукувати синтез **індуцибельної NO-синтази**. Перший шлях ІФ-залежної індукції iNOS полягає в тому, що ІФ-γ за класичним Jak/STAT шляхом спричиняє транскрипцію фактора транскрипції IRF-1 (рис. 11.18). IRF-1 зв'язується із промотером гена iNOS, вмикаючи його експресію. Другий шлях передбачає активацію NF-κB, яка відбувається за участю активної ПкR. Дисрегуляція ПкR веде до зростання продукції NO, що має багато шкідливих наслідків у імунній системі. Коли ПкR і NO у клітині містяться у надлишку, активності NK і Т-лімфоцитів знижуються, що може зумовити розвиток умовно патогенних інфекцій. З іншого боку, надлишок NO є контрибутом виникнення хронічного запалення, продукції пероксинітритів – дуже сильних окисників, які спричиняють значне окисне ушкодження.

Таким чином, унаслідок надходження вірусу в клітину організму-хазяїна в ній через PRRs-залежні шляхи виробляється інтерферон. Молекули ІФ, діючи через рецептори на сусідніх клітинах, індукують у них синтез низки **антивірусних білків**, таких як ПкR, 2',5'-олігоаденілатсинтетаза, ADAR1, Мх-білок та NO-синтаза. Ці білки сприяють зниженню проникнення вірусних часток, гальмуванню синтезу мРНК і трансляції вірусних білків, блокуванню збирання вірусної частки та виходу її з інфікованих клітин. При цьому клітина переходить у стан несприйнятливості до вірусної інфекції.

У свою чергу, віруси виробили **шляхи пристосування до антивірусної дії ІФ**. Такі стратегії існують на рівнях блокування продукції ІФ (наприклад, білок зовнішнього капсиду реовірусу σ-354, VP35-білок вірусу Ебола та NS1-білок вірусу грипу зв'язують dsRNA і запобігають її ідентифікації RIG1, MDA5 або ПкR; V-білок параміксовірусів асоціює з MDA5 і перешкоджає його активації та продукції ІФ I типу), інгібування взаємодії ІФ із рецепторами (зокрема, поксовіруси (наприклад, вірус віспи) синтезують білки-гомологи до рецепторів ІФ усіх типів, таким чином блокуючи ці рецептори), модуляції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів ІФ (порушення функцій ПкR, 2',5'-ОАС,

ADAR1, РНКазы L тощо) або безпосередньо інгібуючи експресію ISGs. Крім того, віруси спроможні інгібувати функції натуральних кілерів, порушувати експресію молекул ГКГ на поверхні клітин, блокувати активацію комплементу або ж запобігати апоптозу в клітинах організму-хазяїна.

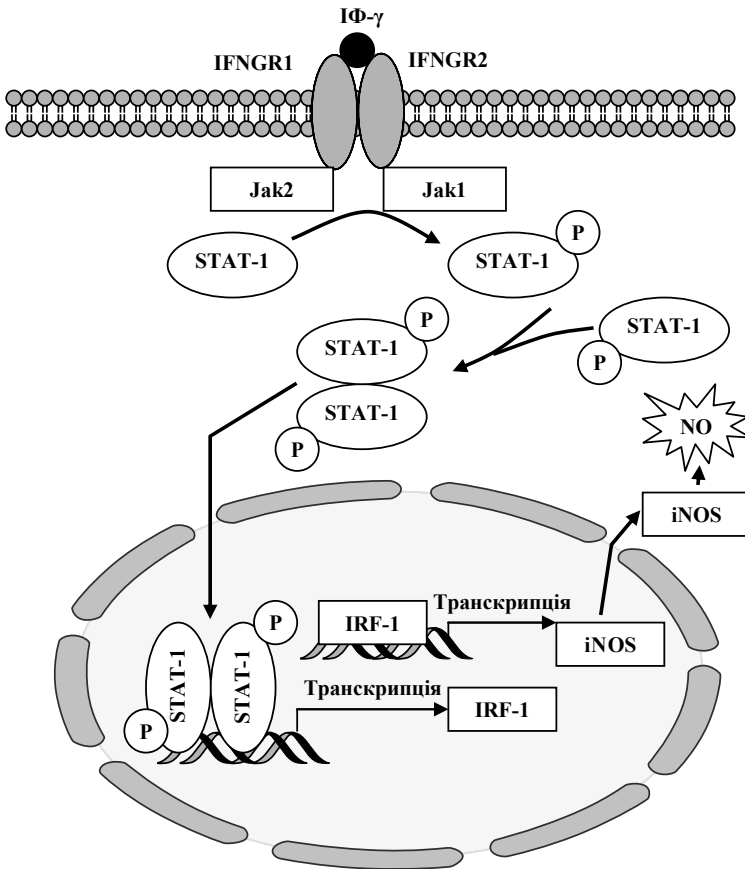


Рис. 11.18. Схема ІФ-залежної індукції синтезу iNOS

Антипроліферативна дія ІФ усіх типів пояснюється активацією цитотоксичних Т-клітин (CD8+), макрофагів, НК, модуляцією регуляції диференціювання і фенотиповою реверсією пухлинних клітин, інгібуванням онкогенів (с-мус, с-газ), імуномодулюючою дією ІФ, спрямованою на "вбивання" пухлинних клітин, зокрема його проапоптозними властивостями, зниженням ангиогенезу та антивірусною активністю проти онкогенних вірусів.

Імуномодулююча дія ІФ-γ є дуже різнобічною, причому ІФ цього типу може стимулювати як захисні, так і патологічні ефекти. Так, ІФ-γ є фактором, що активує макрофаги, і механізмом, за яким Т-клітини активують макрофаги. Надалі активовані макрофаги здатні вбивати внутрішньоклітинні патогени, у тому числі й віруси. ІФ-γ також посилює макрофагальні антипухлинні активності. За дії ІФ-γ зростають і антипухлинні активності цитотоксичних лімфоцитів, зокрема індукується експресія рецепторів цих клітин (CD4 або CD8) через стимуляцію транскрипційних процесів у ядрі клітини-мішені. Зв'язування ІФ-γ посилює експресію антигенпрезентуючими клітинами молекул ГКГ I і ГКГ II. Дія ІФ-γ на Т-лімфоцити ініціює їхню диференціацію із CD4+ Т-клітин до Th1-хелперів. Останні беруть участь у видаленні патогенів, локалізованих внутрішньоклітинно в органелах (зокрема, *Listeria* і *Mycobacterium tuberculosis*). ІФ-γ є одним із факторів активації В-клітин, які при цьому перетворюються на плазмодні клітини і набувають здатності продукувати антитіла. ІФ-γ може спричинити значні зміни на поверхні плазматичної мембрани, що пригнічуватиме адгезію та потрапляння вірусу в клітину, а також здатний стимулювати цитолітичну активність НК-клітин.

Імуномодулююча дія ІФ I та III типів є менш вираженою [González-Navajas J. et al.]. Для ІФ I типу вона в основному зводиться до регуляції функцій НК шляхом індукції продукції ІЛ-15, який сприяє виживанню й проліферації НК. ІФ I типу також стимулює дозрівання дендритних клітин через активацію поверхневої експресії молекул ГКГ (на цій ланці також діє ІФ III типу) і костимуляторних молекул CD80, CD86, CD40,

і є причетним до активації нативних CD8+ клітин, виживання активованих CD4+ і CD8+клітин, регуляції розвитку та проліферації В-клітин.

Серед інших біологічних активностей ІФ варто відмітити **бактерицидний, радіопротективний ефекти та здатність до індукції апоптозу** (остання є більш вираженою за дії ІФ I типу).

Проапоптозні властивості ІФ частково пов'язані з тим, що ІФ *може посилювати активність білка p53 в інфікованих вірусом клітинах*, індуюючи експресію відповідного гена (підрозд. 6.3). На це вказує той факт, що нормальні інфіковані клітини виявляють сильнішу апоптозну відповідь, ніж "нокаутовані" за геном p53. При індукції синтезу p53 у присутності вірусу цей білок функціонує не так, як зазвичай: деякі p53-залежні гени-мішені експресуються за наявності вірусного "вантажу", тоді як інші – ні. Зокрема, це стосується p21, який часом може спричинити клітинне виживання. Можливість залишати такі гени неактивними підвищує проапоптозний ефект p53.

Проапоптозні ефекти ІФ, зокрема індукція p53, є одними із пояснень можливості його застосування в терапії онкологічних захворювань. Так, дія ІФ може поповнити чи навіть замінити ті шляхи хіміо- та радіотерапії, мішенню яких є активація p53-залежного апоптозу; разом із тим, його застосування також може мати ще невідомі сторонні ефекти.

Інші проапоптозні шляхи ІФ-сигналізації можуть залучати ІФ-залежну активацію каспаз, опосередковану IFNAR-залежною стимуляцією JNK- і p38-каскадів, а також залучення мітохондріальних подій.

Деякі сигнальні шляхи, зокрема **РІЗК-сигнальний шлях**, можуть опосередковувати як про-, так і антиапоптозні сигнали, це залежить від клітинного оточення та від присутності або відсутності активації інших ІФ-залежних сигнальних шляхів.

Розділ 12

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ТА ЗАВДАННЯ

Розділ 1

Будова й функції біологічних мембран

1. Ліпідний склад біологічних мембран.
2. Мембранні білки.
3. Динаміка ліпідів і білків у біологічних мембранах.
4. Асиметрія біологічних мембран.
5. Особливості будови гомогенної та гетерогенної плазматичної мембрани.
6. Принципові відміни простої й полегшеної дифузії речовин через біологічні мембрани.
7. Механізми полегшеної дифузії: принципи роботи рухливих переносників, іонних каналів та іонофорів.
8. Типи АТФаз.
9. Явище множинної лікарської резистентності та роль у його розвитку представників АВС-транспортерів.
10. Механізми ендоцитозу.

Розділ 2

Механізми сприйняття сигналу та його передачі всередину клітини: основні сигнальні каскади

1. Основні принципи передачі сигналів усередину клітини від білково-пептидних і стероїдних біологічно активних сполук.

2. Загальна схема аденілатциклазного сигнального каскаду.
3. Біологічні мішені циклічного АМФ.
4. Загальна схема інозитолфосфатного сигнального каскаду.
5. Принципи функціонування ріанодинових рецепторів у скелетному, серцевому та гладенькому м'язах.
6. цАДФ-рибоза і NAADP як вторинні посередники.
7. Порівняльна характеристика тримерних і мономерних G-білків.
8. Інозитолполіфосфати як сигнальні молекули.
9. Мембранозв'язані гуанілатциклази та залучення їх у внутрішньоклітинні сигнальні шляхи.
10. Механізми дії стероїдних гормонів.

Розділ 3

Фосфорилювання тирозину як механізм регуляції внутрішньоклітинних процесів

1. Принципи регуляції активності білків тирозиновими протеїнкіназами.
2. Адаптерні домени (білкові модулі) та їхня роль у білок-білкових і білок-ліпідних взаємодіях.
3. Класифікація тирозинових протеїнкіназ.
4. Принцип функціонування тирозинових протеїнкіназ (на прикладі інсулінового рецептора).
5. MAP-кіназні каскади.
6. Доменна будова цитозольної протеїнкінази cSrc
7. Принципи регуляції активності vSrc та cSrc
8. Класифікація тирозинових протеїнфосфатаз.
9. Структура активного центру цистеїнозалежних РТРs (на прикладі РТР 1B)
10. Механізми регуляції рецепторних тирозинових протеїнфосфатаз.

Розділ IV

РІЗК-залежні сигнальні шляхи

1. Принципи залучення РІЗК у внутрішньоклітинні регуляторні шляхи.
2. Загальний принцип РІЗК/Akt-сигнального каскаду.
3. Класифікація ферментів із РІЗ-кіназною активністю.
4. Залучення РІЗК/Akt-сигнального каскаду в сигнальні шляхи інсуліну.
5. Які ферменти можуть гідролізувати РІ-3,4,5-РЗ?
6. У чому полягає відміна у функціонуванні двох РІ-3,4,5-РЗ-фосфатаз – РТЕН і SHIP?
7. Чому кіназа ПкВ/Akt відносять до протоонкогенів?
8. Чому фосфатаза РТЕН вважається супресором пухлин?
9. У чому полягає відмінність у механізмах активації РІЗК ІА і ІВ класів?
10. Біологічна роль РІЗК-залежних сигнальних шляхів.

Розділ V

Сигнальні шляхи монооксиду азоту

1. Ферментативний і неферментативні шляхи генерування монооксиду азоту. Цикл оксиду азоту.
2. Структура NO-синтази.
3. Характеристика ізоформ NO-синтази.
4. Принципи регуляції конститутивних та індукцибельної ізоформ NO-синтази.
5. Редокс-форми оксиду азоту та особливості залучення їх у внутрішньоклітинну сигналізацію.
6. Розчинна гуанілатциклаза як біологічна мішень оксиду азоту. цГМФ-залежні й цГМФ-незалежні механізми дії NO.
7. Принцип реакції нітрування білків.
8. Принцип реакції S-нітрозилювання білків та її біологічне значення.
9. Внутрішньоклітинні мішені монооксиду азоту.

10. Оксид азоту в регуляції функцій серцево-судинної та нервової систем.

Розділ VI

Участь активних форм кисню і процесів ПОЛ у процесах внутрішньоклітинної трансдукції сигналу

1. Спеціалізований і неспеціалізовані, ферментативні та неферментативні шляхи генерування активних форм кисню в організмі.

2. Які реакції в організмі можуть привести до формування в ньому гідроксильного радикала? Із чим пов'язують його токсичність?

3. Структура фагоцитарної НАДФН-оксидази.

4. Характеристика ізоформ НАДФН-оксидази.

5. Особливості гострої та хронічної регуляції фагоцитарної НАДФН-оксидази.

6. Регуляторні впливи активних форм кисню: оборотні й необоротні окисні модифікації залишків цистеїну.

7. Механізми відновлення внутрішньо- та міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Біологічна роль реакцій S-глутатіонування.

8. Модуляція активними формами кисню внутрішньоклітинних сигнальних каскадів.

9. Принципи регуляції активними формами кисню функцій транскрипційних факторів.

10. Як визначається редокс-статус клітини?

Розділ VII

Участь продуктів пероксидного окиснення ліпідів у сигнальних каскадах

1. Які ключові стадії характерні для процесів ПОЛ?

2. Доведіть, що ПОЛ є ланцюговим процесом.

3. У чому полягає стадія ініціювання ПОЛ?
4. Які реактивні ліпідні радикали утворюються в процесі ПОЛ?
5. За якої умови стає можливим розгалуження ланцюгових реакцій ПОЛ?
6. У яких випадках реакції ПОЛ уповільнюються або обриваються?
7. Які продукти ПОЛ утворюються в біологічних мембранах за ПОЛ?
8. Як продукти ПОЛ можуть впливати на структуру й функції біологічних мембран?
9. Яка сполука є найхарактернішим маркером ПОЛ?
10. Чи проходять процеси ПОЛ у біологічних мембранах за відсутності окисного стресу?

Розділ VIII

Антиоксидантні системи

як модулятори редокс-сигналізації

1. Неферментативні водо- і жиророзчинні антиоксиданти.
2. Ферментативні антиоксиданти: чотири лінії захисту від окисного стресу.
3. Механізми знешкодження супероксидного аніона й пероксиду водню: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза.
4. Пероксиредоксини: класифікація і механізм залучення у відновлення пероксиду водню.
5. Ферменти III лінії антиоксидантного захисту: шляхи відновлення органічних гідропероксидів.
6. Глутатіон: структура, редокс-форми, біологічне значення.
7. Механізми біосинтезу й катаболізму глутатіону. Цикл Мейстера.
8. Глутатіонзалежні ферменти: глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза.

9. У чому полягає спряження глутатіонпероксидазної та глутатіонредуктазної активностей?

10. Системи тіоредоксину та глутаредоксину як компоненти антиоксидантного захисту.

Розділ IX

Дисульфід водню і монооксид вуглецю як газотрансмітери

1. Які сполуки належать до газотрансмітерів?

2. Критерії газотрансмітерів та їхні відміни від класичних вторинних посередників.

3. Шляхи утворення сульфідів водню в організмі: цистатіонін- γ -ліаза, цистатіонін- β -синтаза, 3-меркаптопіруватсульфотрансфераза як H_2S -генеруючі ферменти.

4. Шляхи катаболізму ендogenous сульфідів водню.

5. Роль H_2S у регуляції серцево-судинної та нервової систем.

6. Шляхи утворення монооксиду вуглецю в організмі: гемоксигеназа як CO-формувальний фермент.

7. Характеристика основних ізоформ гемоксигенази.

8. Внутрішньоклітинні мішені монооксиду вуглецю.

9. CO в регуляції функцій іонних каналів.

10. Конвергенція сигнальних шляхів газотрансмітерів.

Розділ X

Сигнальні шляхи похідних сфінголіпідів

1. Загальна характеристика метаболічних шляхів сфінголіпідів.

2. Шляхи генерування кераміду.

3. Класифікація сфінгомієліназ.

4. Основні внутрішньоклітинні мішені кераміду.

5. Біологічні функції керамід-1-фосфату.

6. Сфінгозин і його сигнальні властивості.

7. Сфінгозинкінази: характеристика.
8. Сфінгозин-1-фосфат як позаклітинний ліганд і внутрішньоклітинний посередник.
9. Шляхи катаболізму сфінгозин-1-фосфату.
10. Модель сфінголіпідного реостату: баланс між клітинною проліферацією і загибеллю клітин.

Розділ XI

Сигнальні шляхи інтерферону

1. Загальні принципи залучення системи інтерферону у відповідь на впливи патогенів.
2. PRRs: розпізнавальні рецептори. Класифікація.
3. Класифікація TLRs, їхні ліганди та клітинна локалізація.
4. Сигнальні шляхи TLRs.
5. Цитозольні PRRs та їхні сигнальні шляхи.
6. Типи інтерферонів.
7. Jak/STAT-система в сигнальних шляхах інтерферонів I та II типів.
8. Jak/STAT-незалежні сигнальні шляхи інтерферону.
9. Механізми антивірусної дії інтерферону I типу: синтез антивірусних білків.
10. Імуномодуляторні ефекти інтерферону II типу.

ДОДАТОК

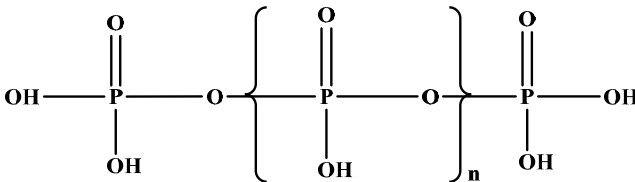
1. Ідентифіковано *три головні рівні лікарської резистентності* до цитотоксичних ліків:

- механізми, що запобігають досягненню ліками їхньої мішені; мішенню найчастіше виступають численні ядерні структури та (або) ферменти. Найбільш вивченим із цих механізмів є Р-глікопротеїн-опосередковане видалення ліків, уведених у клітину;

- взаємодія між ліками та їхньою внутрішньоклітинною мішенню; якісні або кількісні зміни цих взаємодій можуть запобігти специфічним ефектам ліків;

- незалежна від надходження ліків та їхніх взаємодій з мішенню здатність клітини запускати її апоптозну програму у відповідь на специфічне ушкодження, індуковане ліками.

2. *Неорганічні поліфосфати (polyP)* містять від кількох до сотень фосфатних залишків, сполучених фосфоангідридними макроергічними зв'язками, подібно до зв'язків у молекулі АТФ.



Оскільки вони не мають у своєму складі вуглецю, їх класифікують як неорганічні, хоча вони виявлені в усіх живих організмах – від бактерій до людини. polyP мають низку специфічних функцій, але через особливості їхньої структури ці полімери головним чином впливають на гомеостаз фосфатів

і катіонів. polyP-полімер, зокрема, є своєрідним буфером фосфатів, що синтезується і деградує залежно від потреб клітин у фосфатах. Більше того, він виступає хелатором іонів металів, регулюючи таким чином кальцієвий баланс у клітинах. Але крім цього, polyP також має і класичні сигнальні функції. Так, у бактеріальних клітинах цей полімер впливає на їхній патогенез, а в організмі ссавців регулює фібриноліз та агрегацію тромбоцитів.

У прокаріотів синтез polyP є функцією консервативної родини ферментів polyP-кіназ (PPKs), а його деградація здійснюється кількома polyP-фосфатазами. В еукаріотів синтез polyP досліджений погано. Гомолог бактеріальної PPK1 виявлений у клітинах амеби *Dictyostelium discoideum*. Крім того, цей організм має актиноподібну polyP-кіназу (*actin-like polyP kinase*, *DdPPK2*). У дріжджів як polyP-полімераза функціонує Vtc4, субодиниця комплексу шаперона вакуолярного транспортера (*vacuolar transporter chaperone*). Геном ссавців не має генів, гомологічних зазначеним ферментам. Однак є кілька білків ссавців, що мають актиноподібні домени, схожі на ділянки *DdPPK2*. Через те, що ці білки є погано дослідженими, механізми синтезу polyP у вищих еукаріотів нез'ясовані.

3. Дегалогенази – ферменти, які каталізують видалення атомів галогенів із субстрату. Родина дегалогеназ галоїдних кислот поряд із власне дегалогеназами включає, зокрема, фосфатази, β -фосфоглюкомутази, фосфоманномутази тощо. Ці ферменти залучені в широке коло клітинних процесів, зокрема в біосинтез амінокислот і детоксифікацію.

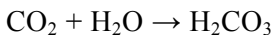
4. FERM-домени (аббревіатура від назв білків, які містять білковий модуль: *four-point one protein*, *e_zrin*, *radixin*, *moezin*) виявлені в численних білках цитоскелета й сигнальних протеїнах, опосередковують міжмолекулярні взаємодії з іншими білками та фосфоліпідами ПМ.

5. SEC14-домен (гомолог білкового продукту гена *Sec14 S. Cerevisiae*, залученого у транспорт фосфатидилінозиту й фосфатидилсерину між різними внутрішньоклітинними мембранами) – білковий структурний домен, що сполучається з невеликими ліпофільними молекулами. Наявний, зокрема, у молекулах α -токоферолзв'язувального білка, а також GEFs, залучених у функціонування малих G-білків.

6. BRO1-домен (~ 390 амінокислотних залишків) характерний для низки еукаріотичних білків (BRO1 дріжджів, PDCD6IP/Alix людини), залучений у спрямування протеїнів до вакуоль, ендосом, лізосом.

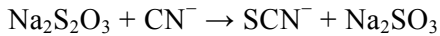
7. MAM-домен (~ 170 амінокислотних залишків) – еволюційно консервативний білковий модуль, виявлений у позаклітинній ділянці багатьох рецепторів (поверхневий глікопротеїн меприн, A5-антиген, рецепторні тирозинові протеїнфосфатази), що містить чотири консервативні залишки цистеїну, здатні формувати дисульфідні зв'язки, і виконує адгезивні функції.

8. Карбоангідраза – цинкзалежний фермент, який каталізує реакцію:



У каталітичному домені молекули карбоангідрази наявні три залишки гістидину (His-94, -96 і -119), що зв'язують іон цинку. У структурі ряду rPTPs, зокрема в РTPC, є ділянки (~ 266 амінокислот), високогомологічні каталітичному домену карбоангідрази. Однак вони містять лише один із трьох залишків гістидину (у РTPC – His-96), унаслідок чого не приєднують іон цинку і не володіють карбоангідразною активністю, а, швидше, виконують певну роль у клітинній адгезії.

9. Роданеза (тіосульфат:ціанід-сульфотрансфераза) – фермент, що каталізує реакцію:

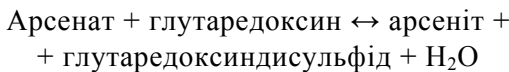


10. PEST-домен – білковий модуль, багатий на залишки проліну (**P**), глутамінової кислоти (**E**), серину (**S**) і треоніну (**T**), він характерний для білків, що мають короткий термін життя у клітині.

11. Під час процесингу мРНК γ -фосфатна група на 5'-кінці молекули її попередника (гетероядерної РНК) спочатку видаляється шляхом дефосфорилування (РНК-5'-трифосфатазна активність) з утворенням 5'-дифосфорильованного кінця; після цього за участю ферменту РНК:гуанілат-трансферази і ГТФ до цієї ділянки молекули приєднується ГМФ, що надалі підлягає метилюванню в позиції N⁷ (фермент гуанін-7-метилтрансфераза).

12. PDZ-домен (від назв трьох білків, у молекулах яких було вперше виявлено цю ділянку – *post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)*, *zonula occludens-1 protein (zo-1)*) – структурний домен (~ 80–90 амінокислот), виявлений у низці сигнальних білків бактерій, дріжджів, рослин і тварин. Він розпізнає короткі амінокислотні мотиви на С-кінці білків-мішеней, бере участь у сполученні трансмембранних білків із цитоскелетом, а також залучений у численні сигнальні шляхи.

13. Арсенатредуктаза (глутаредоксин:арсенат-оксидоредуктаза) – фермент, наявний у про- та еукаріотів, який каталізує реакцію перетворення арсенату в арсеніт:



14. Багаті на тетратрікопептид (*tetratricopeptide-rich, TPR*) **повтори** – структурні ділянки, що виявлені в широкому колі білків, складаються із 34 амінокислот і, опосередковуючи білок-білкові взаємодії, залучаються у створення мультибілкових комплексів. Ці повтори зазвичай утримуються разом, формуючи поодинокий домен, який називається **TPR-домен**.

15. Th2 клітини, або **II тип Т-хелперів** – субпопуляція CD4 + Т-лімфоцитів-хелперів, котрі розпізнають антиген і надалі залучаються в активацію В-лімфоцитів, після чого останні генерують антитіла до розпізнаних Th2 клітинами антигенів, сприяючи розвитку гуморальної імунної відповіді. При активації Th2 клітини синтезують IL-4, -5, -6, -9, -10 і -13, гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулювальний фактор, беруть участь у регуляції біосинтезу IgE, а також у патогенезі алергійних реакцій.

16. Th1 клітини, або **I тип Т-хелперів** – субпопуляція CD4 + Т-лімфоцитів-хелперів, що відповідають за розвиток клітинної імунної відповіді, активуючи цитотоксичні Т-лімфоцити й залучаючись у реагування на широке коло позаклітинних патогенів; Th1 продукують інтерферон- γ , IL-2, -3, гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулювальний фактор, фактор некрозу пухлини- β (лімфотоксин).

17. Ask1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1, кінза 1, що регулюється апоптозними сигналами*) – сигнальний редокс-регульований білок, залучений у механізми реалізації клітинного стресу. Це серин/треонінова протеїнкіназа, член MAPK-каскаду (MAPKKK5), що функціонує у p38 і JNK шляхах. Ask1 активується у відповідь на численні ендо- та екзогенні клітинні стреси й опосередковує апоптоз. У клітинах у стані спокою Ask1 сполучена з відновленою формою білка-репресора тіоредоксину. При окисненні останнього молекулами

ROS тіоредоксин дисоціює від Ask1, після чого Ask1 активується шляхом димеризації та аутофосфорилування залишків треоніну. Ask1 є важливим ефектором Noxs у редоксигналізації, залученій у відповідь клітинного стресу.

18. ZIP-домен (*leucine-zipper domain*, *лейциновий зіпер*) – білковий домен, який часто зустрічається у ДНК-зв'язувальних транскрипційних факторах. У ньому залишок лейцину міститься приблизно в кожному восьмому положенні α -спіралі, унаслідок чого лейцинові залишки виявляються на одному її боці й утворюють амфіпатичну спіраль, один бік якої має гідрофобні властивості. Лейциновий зіпер сприяє утворенню димерного білка внаслідок сполучення двох паралельних α -спіралей подібно до застіжки-блискавки (зіпера), через що й отримав таку назву.

19. Усі клітини імунної системи – лейкоцити – класифікують у три групи: *гранулоцити* (~ 65 %), роль яких зводиться до фагоцитозу й вивільнення різних біологічно активних сполук (наприклад, базофіли вивільнюють гістамін) із накопичувальних гранул; *моноцити крові й макрофаги крові та тканин* (~ 7 %), які є фагоцитуючими та антиген-презентуючими (APCs) клітинами, що руйнують матеріал фагосом на пептиди, які повертаються назад до клітинної поверхні у зв'язаному стані з молекулами головного комплексу гістосумісності II типу (ГКГ II, підрозд. 11.4) і презентуються Т-лімфоцитам; *лімфоцити* (~ 30 %) (В- і Т-клітини), які здійснюють розпізнання антигену (АГ), регулюють тип відповіді та пам'ять. Лімфоцити, у свою чергу, класифікуються у три групи: *У клітини*, що продукують антитіла й забезпечують гуморальний імунітет; мультиплетні підтипи *Т клітин*, що зумовлюють клітинно-опосередкований імунітет, відповідаючи за специфічне розпізнання АГ на АГ-презентуючих клітинах, і здійснюють регуляцію функціонування інших імунних клітин; *НК-клітини* (натуральні кілери), із діяльністю яких пов'язана

ний уроджений імунітет. **Серед Т-клітин** виділяють *Т-хелпери* (CD4+) (~ 53% усіх Т-лімфоцитів), котрі виробляють цитокіни та залучаються в активацію В-клітин; *цитотоксичні* (CD8+) (~ 27%) і *регуляторні Т-лімфоцити*, або супресори, – останні сприяють пригніченню імунної відповіді й не мають маркерів Т-клітин.

20. CpG сайти є динуклеотидними ділянками ДНК, у яких гуаніновий нуклеотид сполучений із цитозиним через залишок фосфорної кислоти (–С–фосфат–G–, тобто цитозин і гуанін сполучені фосфатом). Залишок цитозину в CpG-динуклеотиді може бути метильованим із формуванням 5-метилцитозину (ферменти ДНК-метилтрансферази). У ссавців 70–80% залишків цитозину в CpG-сайтах є метильованими; при цьому метилювання залишків цитозину в межах промотерів генів може спричиняти "мовчання" генів, тобто "вимикати" ген, що спостерігається, зокрема, за численних онкологічних розладів, коли "мовчать" гени супресорів пухлин. CpG-сайти зустрічаються в геномах хребетних рідко (~ 1%) порівняно з геномами бактеріальної чи вірусної ДНК і здебільшого є метильованими, тому неметилювані CpG-динуклеотидні сайти можуть бути розпізнані TLR9, який експресується численними клітинами імунної системи, що сприяє виявленню внутрішньоклітинної вірусної, бактеріальної ДНК та ДНК грибів.

21. Молекули ГКГ II класу презентують пептиди, утворені при руйнуванні фагосомальних антигенів, тобто чужорідного походження (екзогенні). **Т-хелпери активуються** антиген-презентуючими клітинами, якщо їхні рецептори зв'язують презентований АГ.

Молекули ГКГ I класу презентують пептиди, що синтезуються всередині клітини – вірусні, пухлинні або мутовані (ендогенні). **Цитотоксичні Т-лімфоцити** атакують клітини з "чужими" молекулами ГКГ (це причина необхідності гістосумісності при трансплантаціях) або зі "своїми" молекулами ГКГ, що презентують чужорідні пептиди (наприклад вірусні або ракові).

Комплекс ГКГ

	ГКГ I класу	ГКГ II класу
Клітини, що експресують відповідний тип ГКГ	Усі ядерні клітини і тромбоцити	Макрофаги, В-лімфоцити, активовані Т-лімфоцити, моноцити, дендритні клітини
Функція	Зв'язують пептиди (АГ) і презентують їх в імуногенній формі для цитотоксичних Т-лімфоцитів	Основна функція молекул ГКГ класу II – забезпечення взаємодії між Т-лімфоцитами й макрофагами у процесі імунної відповіді: Т-хелпери розпізнають АГ лише після його переробки макрофагами, сполучення утворених фрагментів АГ із молекулами ГКГ класу II та появи цього комплексу на поверхні макрофага
Клітини, що розпізнають антигени, зв'язані з молекулами ГКГ	Цитотоксичні Т-лімфоцити зв'язують антигени, сполучені з молекулами ГКГ I класу і вбивають клітину, чим запобігається репродукція патогену у клітинах	Т-хелпери зв'язуються з комплексом молекула ГКГ II + АГ і надалі активують інші імунні клітини, зокрема В-лімфоцити, які після активації набувають здатності синтезувати антитіла

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Абрамова Е. Б. Протеасома: разрушение во имя созидания / Е. Б. Абрамова, В. Л. Карпов // Природа. – 2003, № 7. – С. 36–45.

Біологічні мембрани: методи дослідження структури і функцій : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Михайлик. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2006. – 215 с.

Біохімічні механізми апоптозу : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, Т. В. Рибальченко, В. К. Рибальченко. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2010. – 310 с.

Вараксин А. А. Значение сероводорода в регуляции функций органов / А. А. Вараксин, Е. В. Пушина // Тихоок. мед. журн. – 2012. – № 2. – С. 27–34.

Гусев Н. Б. Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль / Н. Б. Гусев // Сорос. образоват. журн. – 2000. – № 12. – С. 4–12.

Коржов В. И. Монооксид углерода / В. И. Коржов, А. В. Видмаченко, М. В. Коржов // Журн. АМНУ. – К., 2010. – Т. 16, № 1. – С. 23–37.

Потехина Е. С. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ / Е. С. Потехина, Е. С. Надеждина // Усп. биол. хим. – 2002. – Т. 42. – С. 235–256.

Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В. К. Казимирко, В. И. Мальцев, В. Ю. Бутылин. – К. : Морион, 2004. – 160 с.

Синельник Т. Б. Жовчні кислоти в процесах утворення каналцевої жовчі / Т. Б. Синельник, О. Д. Синельник, В. К. Рибальченко // Фізіол. журн. – К., 2003. – Т. 49, № 6. – С. 80–93.

Структура и функции биологических мембран / П. Г. Богач, М. Д. Курский, Н. Е. Кучеренко, В. К. Рыбальченко. – К. : Вища шк., 1981. – 336 с.

Чумаков П. М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью / П. М. Чумаков // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 34–47.

Agre P. The Aquaporins, Blueprints for Cellular Plumbing Systems / P. Agre, M. Bonhivers, M. Borgnia // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 14659–14662.

Akhtar M. Redox Regulation of Protein Function via Cysteine S-Nitrosylation and Its Relevance to Neurodegenerative Diseases / M. Akhtar, C. Sunico, T. Nakamura // Intern. J. Cell Biol. – 2012. – P. 1–9.

Arana L. Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease / Arana L. [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2010. – Vol. 2. – P. 9–15.

Barber G. The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death / G. Barber // *Cell Death and Different.* – 2005. – Vol. 12. – P. 563–570.

Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? / G. Bartosz // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 77, N 8. – P. 1303–1315.

Benhar M. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions / M. Benhar, M. Forrester, J. Stamler // *Natur Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009, N 10. – P. 721–732.

Bennett M. Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling / M. Bennett, S. Onnebo, C. Azevedo // *Cell. and Mol. Life Sci.* – 2006. – Vol. 63, N 5. – P. 552–564.

Biel M. Cyclic Nucleotide-regulated Cation Channels / M. Biel // *J.B.* – 2009. – Vol. 284. – P. 9017– 9021.

Borden E. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine / E. Borden, G. Sen, G. Uze. // *Nature Rev. Drug discovery*. – 2007. – Vol. 6. – P. 975–990.

Caliendo G. Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H₂S): Development of H₂S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals / Caliendo G., Cirino G., Santagada V. // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53. – P. 6275–6286.

Campos J. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases / J. Campos, K. Gomes, J. Ferreira // *Food and Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 107–119.

Cantrell D. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways / D. Cantrell // *J. Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114, N 8. – P. 1439–1445.

Carroll S. Activation of RNase L by 2',5'-Oligoadenylates: kinetic characterization / S. Carroll, J. Cole, T. Viscount // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272 – № 31. – P. 19193–19198.

Catalgol B. Lipid Rafts and Redox Regulation of Cellular Signaling in Cholesterol Induced Atherosclerosis / B. Catalgol, N. Ozer // *Current Card. Rev.* – 2010. – N 6. – P. 309–324.

Chalfant C. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling / C. Chalfant, S. Spiegel // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118, N 20. – P. 4605–4612.

Chau T. Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK- ϵ similarly activated? / T. Chau, R. Gioia, J. Gatot // *Trends in Biochem. Sci.* – 2008. – Vol. 33, N 4. – P. 171–180.

Clément J. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis / J. Clément, S. Meloche, M. Servant // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18, N9. – P. 889–99.

Corpas F. Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants / F. Corpas, J. Alché, J. Barroso // *Front. Plant Sci.* – 2013. – N 4. – P. 126–129.

Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species / A. Daiber // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) / Bioenergetics.* – 2010. – Vol. 1797, N 6–7. – P. 897–906.

Davidson A. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems / A. Davidson, E. Dassa, C. Orelle // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2008. – Vol. 72, N 2. – P. 317–364.

Dean M. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily / M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini // *J. Lipid Res.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1007–1017.

Deurs B. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean / Deurs B., Roepstorff K., Hommelgaard A. // *Trends Cell Biol.* – 2003. Vol. 13, N2. – P. 92–100.

Ding G. Protein Kinase D-mediated Phosphorylation and Nuclear Export of Sphingosine Kinase 2 / G. Ding, H. Sonoda, H. Yu // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282.– P. 27493–27502.

Dudzinski D. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase / D. Dudzinski, J. Igarashi, D. Greif // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – Vol. 46. – P. 235–276.

DuMond J. The Chemistry of Nitroxyl-Releasing Compounds / J. DuMond, S. King // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – Vol. 14, N 9. – 1637–1648.

Englebienne P. RNase L in Health and Disease: What Did We Learn Recently? / P. Englebienne // *J. of Chronic Fatigue Syndrome.* – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 97–109.

Fantini J. Lipid rafts: structure, Function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases / J. Fantini, N. Garmy, R. Mahfoud // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 20, N 4. – P. 1–22.

Fath M. ABC Transporters: Bacterial Exporters / M. Fath, R. Kolter // *Microbiol. Rev.* – 1993. – P. 995–1017.

Fauman E. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Human Cell Cycle Control Phosphatase, Cdc25A / Fauman E., Cogswell J., Lovejoy B. // *Cell.* – Vol. 93, N 4. – P. 617–625.

Feng H. Role of caveolin-1 and caveolae signaling in endotoxemia and sepsis / H. Feng, W. Guo, J. Han // *Life Sci.* – 2013. – Vol. 93, N 1. – P. 1–6.

Fill M. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels / M. Fill, J. Copello // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 893–922.

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species / T. Finkel // *J. Cell Biol.* Vol. – 2011. – Vol. 194, N 1. – P. 7–15.

Forman H. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species / H. Forman, M. Maiorino, F. Ursini // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49. – P. 835–842.

Francis S. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action / S. Francis, J. Busch, J. Corbin // *Pharmacol. Rev.* – 2010. – Vol. 62. – P. 3525–563.

Gadalla M. Hydrogen Sulfide as a Gasotransmitter / M. Gadalla, S. Snyder // *J. Neurochem.* – 2010. – Vol. 113, N 1. – P. 14–26.

Giustarini D. S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases / D. Giustarini, R. Rossi, A. Milzani // *J. Cell. Mol. Med.* – 2004. – Vol. 8, N 2. – P. 201–212.

Goldston A. Sink or swim: lipid rafts in parasite pathogenesis / A. Goldston, R. Powell, L. Temesvari // *Trends in Parasitology.* – 2012. – Vol. 28, N 10. – P. 417–426.

González-Navajas J. Immunomodulatory functions of type I interferons / J. González-Navajas, J. Lee, M. David // *Nature Rev. Immunology.* – 2012. – Vol. 12. – P. 125–135.

Goodbourn S. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures / S. Goodbourn, L. Didcock, R. Randall // *J. General Virology.* – 2000. – Vol. 81. – P. 2341–2364.

Gottesman M. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters / M. Gottesman, T. Fojo, S. Bates // *Nature Rev. Cancer.* – 2008. – N 2. – P. 48–58.

Guse A. Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR) / A. Guse // *FEBS Journal.* – 2005. – Vol. 272. – P. 4590–1597.

Habib S. Biochemistry of Nitric Oxide / S. Habib, A. Ali // *Ind. J. Clin. Biochem.* – 2011. – Vol. 26. – P. 3–17.

Heiden L. Toll-Like Receptors / L. Heiden, D. Sahu // *Novus Biologicals & Innate Immunity: The Story Toll'd.* – 2014. – 186 p.

Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling / E. Hirsch, C. Costa, E. Ciruolo // *J. Endocrinology.* – 2007. – Vol. 194. – P. 243–256.

Ikushima H. The IRF Family Transcription Factors at the Interface of Innate and Adaptive Immune Responses / H. Ikushima, H. Negishi, T. Taniguchi // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* – 2013. – Vol. 78. – P. 105–116.

Irvine R. Inositide evolution – towards turtle domination? / R. Irvine // *J. Physiology.* – 2005. – Vol. 566, N 2. – P. 295–300.

Ivashkiv L. Signaling by STATs / L. Ivashkiv, X. Hu // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – Vol. 6, N°4. – P. 159–168.

Jiang F. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair / F. Jiang, Y. Zhang, G. Dusting // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – Vol. 63, N 1. – P. 218–242.

Kalyanaraman B. Nitrated lipids: A class of cell-signaling molecules / B. Kalyanaraman // *PNAS.* – 2004. – Vol. 101, N 32. – P. 11527–11528.

Kidd P. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage / P. Kidd // *Alternative Med. Rev.* – 1997. – Vol. 2, N 3. – P. 155–176.

Kim J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis / J. Kim, L. He, J. Lemasters // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 304. – P. 463–470.

Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide / H. Kimura // *Front Physiol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1–3.

Kirkinezos I. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases / I. Kirkinezos, C. Moraes // *Cell & developmental biol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 449–457.

Kohen R. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification / R. Kohen, A. Nyska // *Toxicol. pathology.* – 2002. – Vol. 30, N 6. – P. 620–650.

Lee M. Pattern-Recognition Receptor Signaling Initiated From Extracellular, Membrane, and Cytoplasmic Space / M. Lee, Y. Kim // *Mol. Cells.* – 2007. – Vol. 23, N 1. – P. 1–10.

Lima B. S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling // B. Lima, M. Forrester, D. Hess / *Circulation Res.* – 2010. – Vol. 106. – P. 633–646.

Liu B. ROS and p53: versatile partnership / B. Liu, Y. Chen, Clair D. K. St. // *Free Radical Biol. Med.* – 2008. – Vol. 44, N 8. – P. 1529–1535.

Lloyd-Burton S. Regulation of Ins(1,4,5)P₃-3-kinases by calcium and localization in cells / S. Lloyd-Burton, J. Yu, R. Irvine // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 9526–9535.

Locher K. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters / K. Locher // *Phil. Trans. Royal. Soc. B.* – 2009. – Vol. 364. – P. 239–245.

Lucas K. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP / K. Lucas, G. Pitari, S. Kazerounian // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52, N 3. – P. 375–414.

Luckie D. CFTR and MDR: ABC Transporters with Homologous Structure but Divergent Function / D. Luckie, J. Wilterding, M. Krha // *Current Genomics.* – 2003. – N 4. – P. 109–121.

Lundberg J. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J. Lundberg, E. Weitzberg, M. Gladwin // *Nature Rev. Drug Discovery.* – 2008. – N 7. – P. 156–167.

Mancardia D. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide / D. Mancardia, C. Pennaa, A. Merlinoa // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787, N 7. – P. 864–872.

Mathias S. Signal transduction of stress via ceramide / S. Mathias, L. Penn, R. Kolesnick // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 335. – P. 465–480.

Mathur V. Physiological and Pathophysiological Functions of Nitric Oxide / V. Mathur, Y. Satrawala, M. Rajput // *Der Pharm. Lettre.* – 2010. – Vol 2, N 2. – P. 244–257.

Meer G. Membrane lipids: where they are and how they behave / G. Meer, D. Voelker, G. Feigenson // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 112–124.

Michel T. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? / T. Michel, O. Feron // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 100. – P. 2146–2152.

Miller G. Specificity Determinants in Inositol polyphosphate synthesis: crystal structure of Inositol-1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase / G. Miller, M. Wilson, P. Majerus // *Mol. Cell.* – 2005. – Vol. 18, N2. – P. 201–212.

Mitchell D. S-Nitrosation and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase / D. Mitchell, P. Erwin, T. Michel // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44. – P. 4636–4647.

Nakamura T. Aberrant Protein S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases / T. Nakamura, S. Tu, M. Akhtar // *Neuron.* – 2013. – Vol. 78, N 4. – P. 596–614.

Neubauer H. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kse 2 / H. Neubauer, S. Pitson // *FEBS Journal.* – 2013. – Vol. 280, N 21. – P. 5317–5336.

Niki E. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects / E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338. – P. 668–676.

Nindl G. Hydrogen Peroxide – From Oxidative Stressor to Redox Regulator / G. Nindl // *Cellscience Rev.* – 2004. – Vol. 1, N 2. – P. 1–12.

Ostman A. Protein-tyrosine phosphatases and cancer / A. Ostman, C. Hellberg, F. Bohmei // *Nature Rev. Cancer.* – 2006. – Vol. 6. – P. 307–320.

Paletta-Silva R. NADPH Oxidase Biology and the Regulation of Tyrosine Kinase Receptor Signaling and Cancer Drug Cytotoxicity / R. Paletta-Silva, N. Rocco-Machado, J. Meyer-Fernandes // *Intern. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 3683–3704.

Paolucci N. The Pharmacology of Nitroxyl (HNO) and Its Therapeutic Potential: Not Just the Janus Face of NO / N. Paolucci, M. Jackson, B. Lopez // *Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 113, N 2. – P. 442–458.

Paz S. A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response / S. Paz, M. Vilasco, S. Werden // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21. – P. 895–910.

Pedraza S. Viral recognition by the innate immune system: the role of pattern recognition receptors / S. Pedraza, J. Betancur, S. Urcuqui-Inchima // *Colomb. Med.* – 2010. – Vol. 41. – P. 377–387.

Perry A. The host type I interferon response to viral and bacterial infections / A. Perry, G. Chen, D. Zheng // *Cell Res.* – 2005. – Vol.15, № 56. – P. 407–422.

Platanias L. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon mediated signalling / L. Platanias // *Nature Rev. Immunology.* – 2005. – Vol. 5. – P. 375–386.

Pyne S. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells / S. Pyne, N. Pyne // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 349. – P. 385–402.

Randall R. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures / R. Randall, S. Goodbourn // *J. General Virology.* – 2008. – Vol. 89. – P. 1–47.

Raugei G. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart / G. Raugei, G. Ramponi, P. Chiarugi // *Cell Mol. Life Sci.* – 2002. – Vol. 59, N 6. – P. 941–949.

Ray R. NADPH oxidase and endothelial cell function / R. Ray, A. Shah // *Clinical Science.* – 2005. – Vol. 109. – P. 217–226.

Rees D. ABC transporters: The power to change / D. Rees, E. Johnson, O. Lewinson // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10, N 3. – P. 218–227.

Rhee S. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. / S. Rhee // *Exp. Mol. Med.* – 1999. – Vol. 31, N 2. – P. 53–59.

Rikitake Y. Rho GTPases, Statins, and Nitric Oxide / Y. Rikitake, J. Liao // *Circulation Res.* – 2005. – Vol. 97. – P. 1232–1235.

Rochette L. Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications / L. Rochette, Y. Cottin, M. Zeller // *Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 137, N 2. – P. 133–52.

Rosenberger C. Microbial pathogenesis: Lipid rafts as pathogen portals / C. Rosenberger, J. Brumell, B. Finlay // *Current Biology.* – 2000. – Vol. 10. – P. R823–R825.

Roskoski R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation / R. Roskoski // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 417. – P. 5–10.

Saiardi A. How inositol pyrophosphates control cellular phosphate homeostasis? / A. Saiardi // *Advances in Biol. Regul.* – 2012. – Vol. 52. – P. 351–359.

Schröder M. The mammalian unfolded protein response. / M. Schröder, R. J. Kaufman // *Annual Rev. Biochem.* – 2005. – Vol. 74. – P. 739–789.

Sieczkarski S. Dissecting virus entry via endocytosis / S. Sieczkarski, G. Whittaker // *J. Gen. Virology*. – 2002. – Vol. 83. – P. 1535–1545.

Spiegel S. Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule / S. Spiegel, S. Milstien // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 29. – P. 25851–25854.

Stoker A. Protein tyrosine phosphatases and signaling / A. Stoker // *J. Endocrinology*. – 2005. – Vol. 185. – P. 19–33.

Tagawa M. A possible anticancer agent, type III interferon, activates cell death pathways and produces antitumor effects / M. Tagawa, K. Kawamura, Q. Li // *Clin. Dev. Immunol.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–7.

Tahal T. Sphingosine Kinase: Biochemical and Cellular Regulation and Role in Disease / T. Tahal, Y. Hannun, L. Obeid // *J. Biochem. and Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 39, N 2. – P. 113–131.

Tonks N. Protein tyrosine phosphatases from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction / N. Tonks // *FEBS Journal*. – 2013. – Vol. 280, N2. – P. 346–378.

Tsou R. Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases / R. Tsou, K. Bence // *Front. Neurosci.* – 2012. – N 6. – P. 192–203.

Untereiner A. The Role of Carbon Monoxide as a Gasotransmitter in Cardiovascular and Metabolic Regulation / A. Untereiner, L. Wu, R. Wang // in: A. Hermann, G. Sitdikova, T. Weiger. *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology: Physiology and Pathophysiology*. Chapter 2. – Berlin; Heidelberg : Springer, 2012. – P. 37–70.

Vasiliou V. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family / V. Vasiliou, K. Vasiliou, D. Nebert // *Human genomic*. – 2009. – Vol 3, N 3. – P. 281–290.

Vivanco I. The Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-pathway in human cancer / I. Vivanco, C. Sawyers // *Nature Rev. Cancer*. – 2002. – Vol. 2. – P. 489–501.

Wang R. Shared signaling pathways among gasotransmitters / R. Wang // *PNAS*. – 2012. – Vol. 109, N23. – P. 8801–8802.

Weitzberg E. Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway Implications for Anesthesiology and Intensive Care / E. Weitzberg, M. Hezel, J. Lundberg // *Anesthesiology*. – 2010. – Vol. 113. – P. 1460–1475.

White T. Intracellular calcium signaling through the cADPR pathway is agonist specific in porcine airway smooth muscle / T. White, M. Kannan, T. Walseth // *FASEB Journal*. – 2003. – Vol. 17. – P. 482–484.

Wilkinson W. Carbon Monoxide: an emerging regulator of ion channels / W. Wilkinson, P. Kemp // *J. Physiol.* – 2011. – Vol. 589. – P. 3055–3062.

Wu J. The Noncatalytic Amino Terminus of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 Directs Nuclear Targeting and Serum Response Element Transcriptional Regulation / J. Wu, L. Zhang, A. Bennett // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25, N11. – P. 4792–4803.

Young S. Sphingolipid and Ceramide Homeostasis: Potential Therapeutic Targets / S. Young, J. Mina, P. Denny // *Biochem. Res. Intern.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–12.

Zhu J. Toll-Like Receptor Signaling Pathways –Therapeutic Opportunities / J. Zhu, C. Mohan // *Mediators of Inflammation*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–7.

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

- 2'-5'-олігоденілати, 141, 580
катаболізм, 580
утворення, *див.*
інтерферон:антивірусна
активність:ІФ-індуковані білки:
2'-5'-олігоденілатсинтетаза
- 3'-фосфатидилінозитолзалежна
кіназа-1, *див.* серин/треонінові
протеїнкінази:PDK1
- 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-
редуктаза, *див.*
холестерол:біосинтез
- 3-меркаптопіруват, 482
- 3-меркаптопіруватсульфо-
трансфераза, 483, 485
- 3-оксосфінганінередуктаза, 511
- 5-ліпоксигеназа, 391, 405
- ABC-транспортери, 76, 110, 112,
125-146
BSEP, 136
CFTR, 137-138
MDR1, 172, *див.* множинна
лікарська резистентність
MDR2/3, *див.* фліпаза
MRPs, 174, *див.* множинна
лікарська резистентність
SUR1, SUR2, 139
еукаріотів, 126
класифікація, 126-128
механізм функціонування, 134
мутації, 128-129
напівтранспортери, 132
повні транспортери, 130
прокаріотів, 125-126
стеролін, 142
структура, 129-133
TAP1, TAP2, 136
- Ask1, *див.* серин/треонінові
протеїнкінази:кіназа кінази
МАРК (МАРККК)
- Baa helix, 216
- DAMPs, 542-543
- EF-hand, 215, 396, 403, 404
- eIF-2 (фактор ініціації трансляції
еукаріотів), 443
структура, 584
- GAPs (білки-активатори ГТФаз), 187
- GAS-елементи, 570
- GEFs (фактори обміну гуанінових
нуклеотидів), 187, 193, 276, 326
- GPI (глікозилфосфатидилінозитол), 53
- GPI-заякорені білки, 43, 53
- G-білки, 182
гетеротримерні, 182-186
G_q, 182, 202
G_s, 182
G_i, 182
мономерні малі, 186-188, 276
Ran, 74
Rap1A, 399
Ras, 186-187, 276-278, 346, 432
регуляція оборотним
окисненням, 432, 441
Rho, 276-278, 346
- IκB (інгібітор NF-κB), 338, 438, 554
- IKK (кіназа інгібітора NF-κB), 338, 438
неканонічні форми, 555-557, 562
структура, 554
- IKK-ε/IKK-і, *див.* IKK
(кіназа інгібітора NF-κB):
неканонічні форми
- IP6Ks, *див.*
інозитолгексакісфосфаткінази
- IRS1, 271, 317-319
- Jak/STAT-система, 279, 343, 565-570

Mdm2, *див.* транскрипційні фактори: р53: фізіологічний інгібітор
 NAADP, *див.* нікотинаденіндинуклеотидфосфат
 NMDA-рецептор, 353, 382, 491
 NO, *див.* монооксид азоту
 NO-синтаза, 239, 326, 329-356, ізоформи, 333-336
 eNOS, 333, 488
 iNOS, 333, 655
 nNOS, 333, 491
 кофактори, 332
 механізм каталізу, 332
 регуляція, 336-356
 eNOS, 344
 iNOS, 342
 nNOS, 352
 інгібування кінцевим продуктом, 337
 на рівні транскрипції, 337
 посттранскрипційна, *див.* NO-синтаза:
 сплайсинг-варіанти
 посттрансляційна, 347
 сплайсинг-варіанти, 347
 структура, 330-332
 RAMPs, 542-543
 PI3K/Акт-сигнальний шлях, 304-322
 PRRs, 542
 класифікація, 543
 секретовані PRRs, 543
 трансмембранні PRRs, що розпізнають віруси, *див.* Toll-подібні рецептори
 фагоцитарні (ендоцитарні) PRRs, 543
 цитозольні PRRs, що розпізнають віруси, *див.* цитозольні PRRs
 PSD95 (постсинаптичний білок), 353
 SHIP (інозитол(полі) фосфат-5-фосфатаза), 316
 SUMO, 503
 S-глутатионовані білки, 374, 421
 S-нітрозоглутатіон, 374
 S-нітрозоглутатіонредуктаза, 374
 S-нітрозотіоли, 365
 TAK1, *див.* серин/треонінові протеїнкінази: кіназа кінази
 MAPKKK
 Toll-подібні рецептори, 544
 активатори, 544
 біологічна роль, 543
 класифікація, 544, 546
 сигнальні шляхи, 549-564
 MyD88-залежний, 551, 559
 MyD88-незалежний, 555, 559
 адаптерні білки, 549-551
 MyD88, 549, 551
 TIRAP, 551
 TRAM, 549, 551, 555
 TRIF, 549, 551, 555
 димеризація, 549
 інгібування вірусними білками, 564
 структура, 544
 UPR (відповідь розгорнутих білків), *див.* ЕПР-стрес
 ZO-білки, 163
 α -актинін, *див.* цитозольні якірні білки
 γ -глутамілтрансфераза, 475
 γ -глутамілцистеїнілсинтегаза, 473, 475
 γ -глутамільний цикл, *див.* цикл Мейстера
 Адаптерні білки, 254, 549
 адаптерні домени, 250
 CARD-подібний домен, 561
 PDZ-домен, 353
 PH-домен, 251
 PTB-модулі, 251

SH2-домени, 251-253
 SH3-домени, 251
 TIR-домен, 544, 545, 548
 WW-модулі, 251
 ZIP-домен, 438
 домен загибелі, 511, 517, 551, 561
 адаптивна імунна система, 542
 аденілатциклаза, 188
 регуляція оборотним окисненням, 430, 433
 аденілатциклазний каскад, 180-202
 АДФ-рибозилциклази, 214
 азотистий ангідрид, 361, 389
 азотноватиста кислота, 375
 аквапорини, *див.* транспорт води: аквапорини
 активатори потенціалзалежного Na⁺-каналу, 87-89
 активний транспорт, 76, 110-156
 вторинно-активний, 76, 95, 146-149
 первинно-активний, 76, 95, 110-146
 активні форми азоту, 359, 389
 активні форми кисню, 358, 489
 сигнальні молекули, *див.* пероксид водню: сигнальна молекула
 алкоксильний радикал, 393, 464, 547
 алостеричний контроль, 220
 альдегіддегідрогеназа, 473
 амфітропні білки, 64
 ангіотензин II, 380, 499
 антиоксиданти, 453, 469-471
 неферментативні, 462, 534, 552-554
 аскорбінова кислота, *див.* аскорбінова кислота
 водорозчинні, 469
 жиророзчинні, 469
 ліпоева кислота, *див.* ліпоева кислота
 механізми дії, 470-471
 сечова кислота, *див.* сечова кислота
 токоферол, *див.* токоферол
 ферментативні, 453, 471-479
 4 лінії захисту, 471-473
 глутатіонпероксидаза, *див.* глутатіонпероксидаза
 каталаза, *див.* каталаза
 пероксиредоксини, *див.* пероксиредоксини
 антиоксидантна система, 440
 анулярні ліпіди, 60
 апарат Гольджі, 67
 маркерні ферменти, 68
 апоптоз, 273, 275, 314, 377, 386, 387, 439, 444-453, 461, 493, 504, 508, 518-520, 523-525, 526, 533, 534-536, 562, 577, 579, 582, 590, 591
 антиапоптозні білки, 276
 Bcl-X_L, 314, 439, 450
 Bcl-2, 439, 450
 мітохондріальні події, 450
 вивільнення проапоптозних білків, 451
 відкриття РТР активними формами кисню, 453
 зміна мітохондріальної проникності (МРТ), 451
 компоненти РТР
 білок ANT, 451
 інші компоненти, 533
 порин, 86, 533
 пора зміни проникності (РТР), 451
 проапоптозні білки, 451, 621
 ANT, 451
 Araf-1, 439, 448
 Bad, 314
 Bax, 439, 448
 BIM, 314
 Fas-ліганд, 314
 Fas-рецептор, 439, 448
 каспази, 314, 365, 371, 449
 TNF- α -рецептор, 517
 цитохром c, 451

стимульований ЕПР-стресом, 444-446
арахідонова кислота, 224, 405, 406, 475, 407, 522
аскорбінова кислота, 535, 553
АТФази, 76, 110-125
Ca²⁺-АТФаза ендоплазматичного ретикулума, 433
Ca²⁺-АТФаза плазматичної мембрани, 118-119
Ca²⁺-АТФаза саркоплазматичного ретикулума, 118-119, 433
H⁺,K⁺-АТФаза, 120
Na⁺,K⁺-АТФаза, 113-118
інгібітори, *див.* серцеві глікозиди
H⁺-АТФаза/АТФ-синтаза, 122
протонна помпа остеокластів, 124
типи, 110

Базальна мембрана,
див. позаклітинний матрикс
батрахотоксин, *див.* активатори потенціалзалежного Na⁺-каналу
білівердин, 494
білівердинредуктаза, 495
білірубін, 494, 495
білки позаклітинного матриксу, 172
блок-субстрат інсулінового рецептора, *див.* IRS1
біосинтез холестеролу, 344
блокатори потенціалзалежних Ca⁺-каналів, 93-95
блокатори потенціалзалежного Na⁺-каналу, 86-87
блокатори потенціалзалежного K⁺-каналу, 90

Вазодилітатори, 380
векторні ферменти, *див.* маркерні ферменти

виживання клітин, 276, 306, 310, 312, 368, 386, 445, 461, 519, 534-536, 551, 568
вінкулін, *див.* цитозольні якірні білки
вітронектин, *див.* білки позаклітинного матриксу
властивості мембран, 56-60
асиметричність, 56
вибіркова проникність, 58
динамічні властивості, 58
замкненість, 56
плинність, 56
вроджена глухота людини, 176
вроджена імунна система, 542
вторинні месенджери, 179

Газотрансмітери, 480-507
конвергенція сигнальних шляхів, 504-507
критерії, 481
монооксид азоту, *див.* монооксид азоту
монооксид вуглецю, *див.* монооксид вуглецю
потенційні сигнальні молекули, 481
сульфід водню, *див.* сульфід водню
гем, 331, 332, 337, 356, 363, 376, 396, 412, 493-496
гемоглобін, 325-328, 363, 376, 486, 493
гемоксигеназа, 439, 494-497
ізоформи
HO1, 495
HO2, 496
HO3, 496
механізм реакції, 494, 495
регуляція кінцевим продуктом, 496
гени, що стимулюються інтерфероном, 570-574
геномний стрес, *див.* генотоксичний стрес

генотоксичний стрес, 446
 білки-сенсори, 446
 ATM, 446, 449
 ATR, 446, 449
 ДНК-залежна протеїнкіназа, 446, 449
 генотоксичні агенти, 446
 роль активних форм кисню, 450
 гідроксіамін, 376
 гідроксіламіни, 375, 376
 гідроксильний радикал, 393, 394
 дія на білки, 394
 дія на ліпіди, 395
 дія на нуклеїнові кислоти, 394
 утворення
 із гіпохлорит-аніона, 394
 реакція Фентона, 394, 464
 реакція Хабера – Вейса, 394
 гідропероксиди
 відновлення, 472
 гідропероксиди ліпідів, 393, 464
 гіперполяризуючий фактор, що виробляється ендотелієм, 489
 гіпохлорна кислота, 389, 394
 глікокалікс, 56
 гліколіпіди, 39-40
 гліцерогліколіпіди, 39
 сфінгогліколіпіди, 39
 гангліозиди, 39
 глобозиди, 39
 сульфocereброзиди, 39
 цереброзиди, 39
 гліоксалаза, 473
 глутамат, 354, 382, 476, 491
 глутаредоксин, 424
 глутатіон, 291, 374, 420-422, 424, 425, 440, 469, 471, 473-479
 біологічна роль, 474, 475
 деградація, 475
 синтез, 475
 структура, 473
 характеристика, 473
 глутатіондисульфід, 373, 374, 440, 473, 478
 глутатіонзалежні ферменти, 291, 476-477
 глутатіонпероксидаза, 410, 453, 454, 477
 реакція, 477
 глутатіонредуктаза, 374, 424, 472, 477
 реакція, 474, 478
 глутатіонсинтетаза, 475
 глутатіонтрансфераза, 471, 472, 479
 реакція, 479
 головний комплекс гістосумісності, 568
 I типу, 571
 II типу, 571, 580, 590
 гуанілатциклаза, 224, 236-241
 мембранозв'язана, 236-238, 356
 класифікація, 237
 структура, 236
 функції, 238
 регуляція оборотним окисненням, 509
 розчинна, 238-241, 356, 435, 481, 488, 506
 активатори, 239
 структура, 238, 241, 356
 гуанілатциклазний каскад, 179, 212, 224, 236-243

 Дволанцюгова РНК, 542, 561,

 десмоплагін, *див.* цитозольні
 якірні білки
 детергент, 54
 іонний, 54
 неіонний, 56
 цвітер-іонний, 56
 дигідроцерамідсатураза, 511, 512
 динамін, 152

дипептидази, 475, 476
дихальний вибух, *див.* окисний вибух
діацилгліцерол, 202, 203, 216, 224,
278, 304, 431, 432
діацилгліцеролкіназа, 224
діацилгліцеролліпаза, 224
діоксид азоту, 360, 389

Екзоцитоз, 77, 149, 155

конститутивний, 156
регульований, 156
ексайтотоксичність, 353, 382, 491
елементи відповіді, стимульовані
інтерфероном, 557, 566, 570
ендоплазматичний ретикулум,
63–67, 412
біосинтез білків, 64
генерація активних форм кисню,
391, 412
гладенький, 66
гранулярний, 64
детоксикація, 66, 412, 482
ЕПР-стрес, *див.* ЕПР-стрес
збирання мембран, 65
згортання білків, 444
маркерні ферменти, 67
метаболізм етанолу, 412, 413
модифікація білків, 64, 65
ендоцитоз, 47, 76, 149-155
вірусів, 153-155
кавеолярне поглинання, 152
клатрин-опосередкований, 150
ЛПНЦ, 149-150
рецептор-опосередкований,
47, 149
убіквітин-опосередкований, 153
епоксидгідролаза, 556
ЕПР-стрес, 368, 442-446
білки-сенсори, 442
ВіР/GRP78, 442, 443
протеїнкіназа IRE1, 442, 443

протеїнкіназа PERK, 442, 443
транскрипційний фактор ATF6,
442-444
роль активних форм кисню, 445, 446
естроген, 321

Замикальні контакти, 157-164

септовані контакти, 158
структура, 160-164
функції, 158-160
щільні контакти, 158

Інгібітор H^+ -АТФази/

АТФ-синтази, 121
інгібітори H^+ , K^+ -АТФази, 147
інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфат, 225,
231
інозитол-1,4,5-трифосфат, 202-204,
222, 223
інозитол-1,4,5-трифосфат-3-кіназа,
225, 227-229
інозитол-1,4,5-трифосфат-5-
фосфатаза, 222
інозитол-3,4,5,6-тетракісфосфат-
5/6-кіназа, 227, 229
інозитолпірофосфати, 225
утворення, 229-230
функції, 234-236
інозитолпірофосфатсинтази, 229
дифосфоінозитолпентакісфосфаткі
нази, 229, 230
інозитолгексакісфосфаткінази,
229, 230
інозитолполіфосфати, 225
утворення, 225-229
функції, 231-234
інозитолфосфатний каскад, 202, 201,
223, 224, 278
інсулін, 257, 258, 271-280, 310, 312,
317-320, 351, 426
інтегрини, 171, 174

- інтерферон, 426, 537-591
 - антивірусна активність, 580
 - інгібування вірусними білками, 585, 588, 589
 - ІФ-індуковані білки, 572, 573
 - 2',5'-олігоаденілатсинтетаза, 580-584
 - ADAR1, 587
 - iNOS, *див.*
 - NO-синтаза: ізоформи: iNOS
 - Мх-білки, 586-587
 - ПкR, *див.* серин/треонінові протеїнінази: ПкR
 - антипроліферативна активність, 580, 590
 - бактерицидна активність, 591
 - біологічна роль, 538, 580
 - вірусний інтерферон,
 - див.* інтерферон: типи: I тип
 - друга хвиля утворення, 574, 582
 - загальна схема утворення і дії, 540
 - імунний інтерферон,
 - див.* інтерферон: типи: II тип
 - імуномодулююча активність, 580, 590
 - ІФ I типу, 590
 - ІФ II типу, 590
 - проапоптозна активність, 591
 - радіопротективна активність, 591
 - сигнальні шляхи, 565-579
 - інгібування вірусними білками, 574, 588
 - типи, 538-565
 - I тип, 539
 - інтерферон- β , 539
 - інтерферон- α , 539
 - інтерферон- ω , 539
 - утворення, 540, 542-564
 - II тип, 539
 - інтерферон- γ , 539
 - утворення, 542, 564, 565
- III тип
 - інтерферон- λ , 539
- інтерферонові рецептори, 567
- інтрастеричний контроль, 220
- іонний канал, 76, 78, 82-98
 - Cl⁻-канали, 96, 97, 137
 - властивості, 82
 - епітеліальний натрієвий канал (EnaC), 83
 - лігандзалежний, 83-85
 - NMDA-рецептор, *див.* NMDA-рецептор
 - АТФ-залежні калієві канали (K_{ATP}-канали), 85, 487, 489, 505, 506
 - ацетилхолінзалежний катіонний канал, 84
 - іонні канали, що регулюються циклічними нуклеотидами (CNGCs), 85, 193-195, 241, 357,
 - кальційзалежні K⁺-канали високої провідності (BK_{Ca}-канали), 488, 500, 503
 - кальційзалежні калієві канали (K_{Ca}-канали), 85
 - рецептор до інозитол-1,4,5-трифосфату, *див.*
 - рецептор до інозитол-1,4,5-трифосфату
 - ріанодиновий рецептор, *див.* ріанодиновий рецептор
 - механочутливий, 83
 - потенціалзалежний, 83, 85-95
 - Na⁺-канал, 85-89
 - K⁺-канал, 89-92
 - Ca²⁺-канал, 92-95
 - світлочутливий, 83
 - температурочутливий, 83
 - хвороби іонних каналів, 97

іонофор, 78, 106-109
валіноміцин, 78, 107
граміцидин, 79, 108
IP3K, *див.* інозитол-1,4,5-трифос-
фат-3-кіназа
IP56K, *див.* інозитол-
3,4,5,6-тетракісфосфат-5/6-кіназа
IP-5-фосфатаза, 225, 229

Кавеола, 45, 348-351
кавеолін, 45, 349-351
кадгерини, 157, 165, 167, 168-170
десмоглеїн, 167, 169, 170
десмоколін, 167, 169, 170
кальмодулін, 201, 205, 214-216, 248,
330, 332, 337, 348, 352, 356, 425
кальцій як сигнальна молекула, 205
канал щільного контакту, 175
кардіотонічні стероїди,
див. серцеві глікозиди
каріоферини, *див.* транспортини
каталаза, 377, 410, 411, 414, 416, 453,
454, 469, 472
реакція, 454
катеніни, *див.* цитозольні якірні білки
катиони перехідних металів, 325, 390,
392, 394, 470, 471
кіназа глікогенсинтази 3, 5, 312,
315, 317
клатрин, 149-152
клаудини, 160, 164
колаген XVII типу, 174-178
комунікативні контакти, 174-178
плазмодесми, 175
щільні, 174-178
структура, 175, 176
функції, 177
конексини, 175
конексон, 175
коботоксини, *див.* блокатори
потенціалзалежних Ca⁺-каналів

котранспорт, 76, 77
антипорт, 77
симпорт, 77
кофеїн, *див.* метилксантини
ксантиноксидаза, 327, 328, 390,
408-409

Ламінін, *див.* білки позаклітинного
матриксу
лейкотриєни, 224, 391, 405-407, 522
лізосома, 68
маркерні ферменти, 68
ліпідний радикал, 393, 463
ліпідний рафт, 42-49
ліпосва кислота, 454
ліпоксигенази, 405-407
ліпополісахарид, *див.* PAMPs

Мембранні білки, 50-55
заякорені білки, 53
інтегральні білки, 51
периферійні білки, 51
метилксантини, 201
метіонінсульфоксидредуктаза, 425
мієлопероксидаза, 390, 391, 394
міжклітинні взаємодії, 156-178
класифікація, 157, 158
контактний комплекс, 178
міоглобін, 326, 493
мітогени, 272
мітохондріальна дисфункція, 353,
450-453
мутації в мітохондріальній ДНК, 453
роль активних форм кисню, 453
мітохондрія, 68-70, 409-412
внутрішня мембрана, 69
маркерні ферменти, 69
генерація активних форм кисню,
391, 409, 411, 453
 α -кетоглутаратдегідрогеназа, 411
аконітаза, 411

- гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа, 411
 - дихальний ланцюг, 69, 391, 409, 499
 - моноаміноксидаза, 411
 - піруватдегідрогеназа, 411
 - цитохром *b5*-редуктаза, 411
 - цитохром P450, 411
 - залучення в апоптоз, *див.*
 - апоптоз:мітохондріальні події
 - зовнішня мембрана, 68
 - маркерні ферменти, 69
 - кристи, 69
 - матрикс, 70
 - міжмембранний простір, 69
 - маркерні ферменти, 70
 - мітохондріальна ДНК, 453
 - множинна лікарська резистентність, 135, 140, 142-146
 - модель сандвіча, 26, 27
 - молекулярний кисень, 328, 389, 392, 407, 412
 - молекулярні структури, асоційовані зі збудником, *див.* RAMPs
 - молекулярні структури, асоційовані із загибеллю, *див.* DAMPs
 - монооксид азоту, 239, 323-388, 389, 391, 467, 468, 480, 481, 504-507
 - біологічна роль, 323
 - властивості, 324, 325
 - внутрішньоклітинні мішені, 377
 - напрямки цитотоксичної дії, 377, 378
 - неферментативне утворення, 325-327
 - редокс-форми, 359
 - вільний радикал, 359, 360-365
 - катіон нітрозонію, 359, 365-367
 - нітросил-аніон, 359, 375-378
 - сигнальні шляхи, 356-378
 - цГМФ-залежні, 356, 357
 - цГМФ-незалежні, 358-378
 - у рослин, 386
 - ферментативне утворення, *див.* NO-синтаза
 - фізіологічні функції, 378
 - апоптоз, 387
 - виживання клітин, 386
 - дихальна система, 385
 - ендокринна система, 385
 - імунна система, 384, 385
 - м'язова система, 385
 - некроз, 387
 - нервова система, 380-384
 - нирки, 385
 - серцево-судинна система, 379-380
 - шлунково-кишковий тракт, 384
 - монооксид вуглецю, 480, 481, 493-504
 - катаболізм, 497
 - сигнальні шляхи, 498-503
 - утворення, 493-497
 - фізіологічні функції
 - апоптоз, 504
 - імунна система, 503
 - серцево-судинна система, 503
 - муковісцидоз, 96
 - мультифункціональна кіназа
 - інозитолполіфосфатів, 225, 229
- НАДФН-оксидаза**, 391, 395-405, 499
 - активатори, 395
 - активація EGF-R, 427
 - активація інсуліновим рецептором, 426
 - ізоформи, 396
 - DUOXs, 403-405
 - Nox1, 402
 - Nox3, 402
 - Nox4, 402
 - Nox5, 402, 403
 - Phox, 396
 - активатори, 399
 - механізм каталізу, 399

регуляція, 399-401
структура, 398, 399
натрійуретичний гормон
передсердя, 237, 238
нейродегенеративні розлади, 323, 353,
367-372, 382-384
некроз, 353, 363, 386-388, 451, 452
нікотинатаденіндинуклеотид-
фосфат, 214
нітрат-аніон, 325, 327-329, 361,
364, 388
нітриг-аніон, 325-329, 361, 388
нітровані білки, 325, 326, 362
нітроглицерин,
див. нітрозовозоділятори
нітрозативний стрес, 353, 358, 367,
368, 382
нітрозовозоділятори, 239
нітрозогем, 239, 337, 356, 363
нітрозопероксикарбонат, 363
нітрозоксистерін, 365
нітроліпіди, 360
нітролінолеат, 360, 468, 468
нітропрурид,
див. нітрозовозоділятори
нітротирозин, 362
нуклеопорини, 71

Одноланцюгова РНК, *див.* PAMPs
окисний вибух, 396
окисний стрес, 375, 378, 379, 353,
358, 371, 412, 420, 440
окисні модифікації білків, 416
S-глутатіонування, 294, 374, 417,
420-422
вплив на внутрішньоклітинні
сигнальні шляхи, 294, 295, 420,
422, 424-426, 441
дисульфідиди, 294, 366, 417, 419, 422
метіонінсульфоксид, 425

нітрозилування,
див. посттрансляційні
модифікації:нітрозилування
при зміні редокс-статусу
клітини, 440
сульфеніламідна структура, 294,
289, 419
цистеїнсульфенова кислота, 289,
294, 419, 421
цистеїнсульфінова кислота, 289,
294, 419, 422
цистеїнсульфонова кислота, 289,
294, 419, 422,
оклодини, 164, 160
олігоміцин, *див.*
інгібітор H^+ -АТФази/АТФ-синтази
омепразол, *див.*
інгібітори H^+, K^+ -АТФази
онкогенез, 271, 275, 432, 526, 557, 587
онкогени, 187, 271, 275, 276, 279, 289,
310, 312, 448, 590, 526

Парацелюлярний транспорт, 158, 159
пасивний транспорт, 76, 78-110
полегшена дифузія, 76, 78-110
проста дифузія, 76, 78
пемфігоїд бульозний, 174
пемфігус, 170
первинні месенджери, 179
пероксидне окиснення ліпідів, 363,
386, 388, 463-468
ланцюгова реакція, 464
маркери ПОЛ
4-гідроксिनоненаль, 466
малоновий діальдегід, 466
продукти ПОЛ, 465
стадії, 463, 464
ініціація, 463, 464
обрив ланцюга, 464
продовження, 464
розгалуження, 464

переносники, 76, 78, 80
 родина GLUT, 80-82, 272, 312, 317-320

пермеаза, *див.* переносник

пероксид водню, 289, 389, 391-394, 404, 412, 414

катаболізм, 453-462, 472

сигнальна молекула, 414-441

критерії, 415, 416

окисні модифікації білків,
див. окисні модифікації білків

пероксильний радикал, 393, 464

пероксинітрит, 354, 359, 361-363, 376, 378, 387, 389, 497

пероксиредоксини, 371, 411, 414, 416, 420, 422, 454-462

класифікація, 454

механізм каталізу, 456

1-Cys-Prxs, 456

атипові 2-Cys-Prxs, 456

типові 2-Cys-Prxs, 456

структура, 456

шаперонова активність, 456-461

пероксисома, 68, 390, 414, 454

генерація активних форм кисню, 414

маркерні ферменти, 68

плазматична мембрана, 61-63

апикальна ділянка, 62

базальна ділянка, 62

базолатеральна ділянка, 62

гепатоцита, 62, 63

гетерогенна, 62

гомогенна, 61

еритроцита, 61

латеральна ділянка, 62

маркерні ферменти, 63

синусоїдальна ділянка,
див. базальна ділянка

плакоглобін,
див. цитозольні якірні білки

плакофілін,
див. цитозольні якірні білки

позаклітинний матрикс, 156

поліненасичені жирні кислоти, 463

порини, 109, 110

посттрансляційні модифікації, 50, 53, 336, 347, 415

S-сульфгідрування, 481, 487, 489, 506, 507

АДФ-рибозилування, 185, 186

ацилювання, 53, 336, 348

міристилювання, 182, 336, 348

пальмітилювання, 336, 348, 366

глікозилювання, 64, 67

ізопренілювання, 50, 53, 182, 346, 406

нітрозилювання, 294, 325, 328, 337, 354, 358, 362, 365-375, 382, 415, 489, 506, 507

денітрозилювання, 373, 375

металів, 363, 376

тіолів, 361, 365, 506

транснаїтрозилювання, 368

нітрування, 325, 328, 362, 354, 358

тироzinу, 360, 362, 363, 367, 506

СУМОїлювання, 485, 503, 504

убіквітинування, 339, 341, 342, 354, 448, 554

фосфорилування

роль, 179, 248-250

тироzinу, 248

похідні сфінголіпідів, 508-536

біологічна роль, 508

сфінгозин, 508, 515, 524, 536, сигнальні шляхи, 524, 525

утворення, 524

сфінгозин-1-фосфат, 412, 508, 525-536

біологічна роль, 525

катаболізм, 533, 534

сигнальні шляхи, 530-533

у патологіях, 533, 534

утворення, 525-530

церамід, 508, 509-520, 536, 600-615

- біологічна роль, 509
мегаболіти, 515
сигнальні шляхи, 515-520
утворення, 509-514
 залишковий шлях, 513
 індуктори, 509, 513, 514
 синтез *de novo*, 511-513
 сфінгомієліназний шлях, 509-511
фізіологічні функції
 ендокринна система, 520
 іmunна система, 520
 нервова система, 520
 серцево-судинна система, 520
церамід-1-фосфат, 508, 515, 521-524, 536
 біологічна роль
 виживання клітин, 523
 регуляція хемотаксису, 523
 синтез ейкозаноїдів, 521-523
 паракринна дія, 521, 523
 сигнальні шляхи, 521-524
 утворення, 521
прогресуючий родинний внутрішньопечінковий холестаза, 127, 136
прозапальні цитокіни, 547, 550, 551, 553, 554, 558, 560, 562, 563
проліферація, 216, 217, 222, 259, 271, 272-280, 310, 314, 316, 461, 508, 534-536
простагландини, 224, 366, 391, 405, 407, 408, 522,
протеасома, 339-342, 354
протеїнкіназа, що активується
 церамідом, *див.* серин/треонінові протеїнкінази:САРК
протеїнкінази подвійної специфічності, 248, 296
МАР2К1/МЕК1, 248, 278, 296
МАР2К2/МЕК2, 248, 278, 296
 протеїнкінази, що активуються мітогенами, *див.* серин/треонінові протеїнкінази:МАРКs
Радикал ліпопероксиду, 464
радикал-аніон карбонату, 497
редокс-баланс, 440
редокс-статус клітини, 440
релаксуючий фактор, що виробляється ендотелієм, 379, 506
ретиноїди, 431
ретинол, 432
рецептор до естрогену, 246
рецептор до інозито-1,4,5-трифосфату, 85, 205, 233, 242, 433
 структура, 207
рецептор до церамід-1-фосфату, 521, 523
рецептори, 181
 з ферментативною активністю, 181
 іонотропні, 181
 метаботропні, 181
рецептори до сфінгозин-1-фосфату, 530-532
 класи, 530
 механізм дії, 531
 структура, 531
рецептори, що розпізнають, *див.* PRRs
ріанодин, 208, 209
ріанодиновий рецептор, 85, 207-212, 242, 433
 гладенький м'яз, 212
 серцевий м'яз, 211
 скелетний м'яз, 210
 структура, 209
рідинно-мозаїчна модель, 34
РНКаза L, 170, 141, 580-584
 активація, 582
 біологічна роль, 582
 синдром хронічної втоми, 583
 структура, 582

- роданеза, *див.*
тіосульфатціанідсульфотрансфераза
- родинна гіперхолестеролемія, 150
- рухи ліпідів, 35, 58, 73
латеральна дифузія, 35
обертальні рухи, 35
сегментарні рухи, 35
фліп-флоп переходи, 35
- Сакситоксин**, *див.* блокатори
потенціалзалежного Na⁺-каналу
селеноцистеїн, 477
септичний шок, 379, 490
серин/треонінові протеїнкінази, 248
ATM, 446
ATR, 446
CAPK, 515-518
Chks (чекпойнт-кінази), 446, 449
IRAKs, 550, 551
IRE1, 443
MAPKs, 248, 272-278, 296
ERK, 273, 275-278, 296, 434,
518, 519, 528, 535, 577
JNK, 273, 275, 434, 518, 519,
523, 528, 535, 554
p38, 273, 275, 434, 528
структура каскаду MAPKs,
273-275
mTOR, 315
PDK1, 220, 313, 248, 272
PERK, 443
PI3K, 271, 299, 304-311, 519,
523, 532, 578
класифікація, 304
структура, 305-311
функції, 317
Raf, 276-278, 432
Rock-кіназа, 346, 347
SDK1, 525
ДНК-залежна протеїнкіназа, 446
кіназа MAPK
(MAPKK), 659
кіназа кінази MAPK (MAPKKK),
275, 554
ПкА, 190-192
ПкВ/Акт, 305, 311-315, 519, 523,
532, 579
активація, 313
функції, 314
ПкС, 216-220, 431, 432, 519
ПкD, 220-222
ПкG, 220, 224, 241-243, 248, 357,
382, 498
ПкR, 343, 543, 584-586
активація, 584
інгібування вірусними білками,
585, 586
мішені, 584, 585
структура, 584
Ca²⁺, кальмодулінзалежні
протеїнкінази, 201, 216
сполучені з метаболічними
рецепторами, 195
циклінзалежні кінази, 300
серин/треонінові
протеїнофосфатази, 202
CAPP, 515, 518
регуляція оборотним окисненням,
431, 434
PP1, 202, 515, 518
PP2A, 202, 515, 518
PP2B, 202
PP2C, 202
серинпальмітоїлтрансфераза, 511
сечова кислота, 454, 471
синдром Дабіна – Джонсона, 129
синдром хронічної втоми,
див. РНКазы L:
синдром хронічної втоми
ситостеролемія, 129
СО, *див.* монооксид вуглецю
спряжений транспорт, *див.*
вторинно-активний транспорт
статици, 344-346, 401
стероїдні гормони, 244-247

- механізм дії, 245
 рецептори, 245
 сульфід водню, 480, 482-493
 властивості, 482
 катаболізм, 485, 486
 сигнальні шляхи, 486-493
 утворення, 482-485
 3-меркаптопіруват-
 сульфотрансфераза,
див. 3-меркапто-
 піруватсульфотрансфераза
 цистатіонін-β-синтаза,
див. цистатіонін-β-синтаза
 цистатіонін-γ-ліаза,
див. цистатіонін-γ-ліаза
 фізіологічні функції
 ендокринна система, 492
 нервова система, 491, 492
 серцево-судинна система,
 488-491
 шлунково-кишковий тракт, 492
 сульфідредоксини, 420
 сульфітоксидаза, 486
 супероксиддисмутаза, 391, 392, 410,
 416, 472
 ізоформи, 472
 реакція, 392
 супероксидний аніон, 361, 377,
 387-394, 405-414
 відновлення, 416, 472
 неферментативні джерела, 390, 391
 ферментативні джерела, 390, 391,
 405-414
 неспеціалізовані, 390, 391,
 405-414
 спеціалізовані,
див. НАДФН-оксидаза
 супресор пухлин, 282, 291, 298, 316,
 387, 439, 446
 сфінгозин-1-фосфатліаза, 533, 534, 536
 сфінгозин-1-фосфатфосфатаза, 526,
 534, 536
 сфінгозинзалежна кіназа 1,
див. серин/треонінові
 протеїнкінази: SDK1
 сфінгозинкіназа, 351, 509, 525-530, 536
 активатори, 526, 529
 ізоформи
 SphK1, 527-529
 SphK2, 527-529
 регуляція, 529, 530
 структура, 528
 сфінголіпідний реостат, 508, 534-536
 сфінгомієліназа, 508, 510
 активатори, 510
 апоптоз, 517
 ізоформи, 510
 кисла, 510
 лужна, 511
 нейтральна, 511
 прозапальна відповідь, 517
 сфінгомієлінінсинтаза, 508, 515
 TNF-α-рецептор, *див.*
 апоптоз: проапоптозні білки:
 TNF-α-рецептор
 талін, *див.* цитозольні якірні білки
 танжерська хвороба, 128
 TBK1, *див.* IKK (кіназа інгібітора
 NF-κB): неканонічні форми
 теорія ліпідних рафтів,
див. ліпідний рафт
 теофілін, *див.* метилксантини
 термостабільний ендотоксин, 238
 тетрагідробіоптерин, 331, 332, 375
 тетраетиламоній, *див.* блокатори
 потенціалзалежного K⁺-каналу
 тетродотоксин, *див.* блокатори
 потенціалзалежного Na⁺-каналу
 тиреоїдні гормони, 247
 рецептори, 247
 тирозинові протеїнкінази, 204,
 248-279, 427, 428
 рецепторні, 204, 255-262
 EGF-R, 255, 427
 FGF-R, 255
 PDGF-R, 255

інсуліновий рецептор, 255,
 426, 427
 регуляція оборотним
 окисненням, 427
 класифікація, 257, 258, 259-261
 механізм активації, 258, 262
 структура, 256
 сигнальні шляхи, 271-279
 цитозольні, 263-271
 Jaks, 279, 343, 567
 Src, 266 -271
 класифікація, 264, 265
 структура, 263, 264, 266, 267
 тирозинові протеїнфосфатази,
 280-303
 аспаргатзалежні, 280, 281
 EYAs, 281
 цистеїнзалежні, 280, 281, 282
 Cdc25-фосфатази, 281, 299,
 300-303
 DUSPs, 295
 MKPs, 296, 297, 434
 PTEN, 298, 299, 316, 320,
 321, 430
 РТРМГ1, 299
 Vh1, 295
 Vh1-подібні DUSPs,
 296-299
 LMW PTP, 281, 299, 303, 430
 класифікація, 281
 класичні PTPs, 281, 286-295
 РТР1В, 283, 283, 286, 430
 SHP, 288, 430
 регуляція оборотним
 окисненням, 289-291
 рецепторні, 281, 291-295
 регуляція, 292-295
 структура, 291, 292
 TSPTP, 286
 цитозольні, 281, 283, 284,
 286-291
 механізм каталізу, 284-286
 регуляція оборотним
 окисненням, 289-291, 294,
 295, 429, 430, 434, 441
 сигнатурний мотив, 280, 283
 фосфатази подвійної
 специфічності, 281
 тіол-S-метилтрансфераза, 486
 тіолят-аніон, 368, 420
 тіоредоксин, 374, 422-424, 436, 440,
 456, 457
 тіоредоксинредуктаза, 374, 440,
 тіосульфатцианідсульфотранс-
 фераза, 485
 токоферол, 454, 470, 506
 транскрипційні фактори, 275
 AP-1, 276, 438, 439, 551, 554, 559,
 561, 564
 активація, 438, 439
 структура, 438
 ATF6, 442, 443
 c-Fos, 275, 438
 c-Jun, 275, 438
 FoxO1, 317
 HIF, 439
 IRFs, 551, 556
 IRF-1, 334, 343, 568, 588
 IRF-3, 555, 557, 559, 562
 IRF-5, 557
 IRF-7, 555, 557, 559, 562
 NF-kB, 275, 314, 338, 438, 551, 554,
 559, 561, 564
 активація, 339
 структура, 338
 p53, 314, 387, 439, 446-450, 585, 591,
 активатори, 446, 447
 механізм активації, 447-450
 мішені, 450
 структура, 447
 фізіологічний інгібітор, 448
 STATs, 279, 343, 568, 579, 587
 класифікація, 568, 569

регуляція оборотним окисненням, 438
AP-1, 439
HIF-1, 439
NF-κB, 438
p53, 439
трансмембранні адгезивні білки, 160,
165, 167, 170, 171, 174
транспорт води, 98-106
аквапорини, 100
мутації, 105, 106
структура, 101, 102
функції, 103, 105
осмос, 98
тонічність, 99
транспортини
експортини, 74
імпортини, 74
трансселюлярний транспорт, 159
тромбоксани, 391, 405

Убіквітин, 341

убіквітинлігази, 314, 370, 442, 448, 554
TRAFs, 554
TRAF2, 562
TRAF3, 555, 562
TRAF6, 552, 554, 555, 562
уніпорт, 77

Фібронектин, *див.* білки

позаклітинного матриксу
фліпаза, 35
формальдегіддегідрогеназа, 473
фосфатаза легкого ланцюга
міозину, 243
фосфатаза ліпідного фосфату,
див. сфінгозин-1-фосфатфосфатаза
фосфатази MAP-кіназа,
див. тирозинові
протеїнфосфатази:цистеїнзалежні:
DUSPs:MKPs
фосфатидилінозитол-
3,4,5-трифосфат, 304, 318

фосфатидилінозитол-3-кіназа,
див. серин/треонінові
протеїнкінази:PI3K
фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат,
203, 224, 318
фосфатидна кислота, 35
фосфодіестераза, 197-201, 216, 243,
468, 487, 505, 580
фосфоінозитидний каскад,
див. інозитолфосфатний каскад
фосфоліпаза A2, 405, 522
фосфоліпаза C, 203
PLC-β, 204, 205, 221
PLC-γ, 204, 205, 221, 254, 278
регуляція оборотним окисненням,
428, 432
фосфоліпідгідропероксидглутатіон-
пероксидаза, 472
фосфоліпіди, 35
гліцерофосфоліпіди, 35
кардіоліпін, 36, 69
плазмалоген, 36
фосфатидилетаноламін, 36
фосфатидилінозитол, 36
фосфатидилсерин, 36, 432
фосфатидилхолін, 36
сфінгофосфоліпіди, 35, 38, 508
сфінгомієлін, 38, 508
біосинтез, 509
катаболізм, 509
фосфоліпідний бішар, 34

Хвороба Шарко – Марі – Тута, 178
хемілюмінесценція, 464
хінонредуктаза, 473
холестерол, 41
біосинтез, 345

ЦАДФР, *див.* циклічна АДФ-рибоза
цАДФР/Ca²⁺-сигнальна система,
212-214
цАМФ, *див.* циклічний
аденозинмонофосфат

цГМФ, *див.* циклічний гуанозинмонофосфат
церамідаза, 509, 513, 515, 524
церамідкіназа, 513, 515, 521
активатори, 521
церамідсинтаза, 513
ціагутероподібні токсини,
див. активатори
потенціалзалежного Na⁺-каналу
цикл NO, 327-329
цикл Мейстера, 475
циклічна АДФ-рибоза, 207, 212-214
циклічний аденозинмонофосфат, 180
мішені, 190-195
циклічний гуанозинмонофосфат, 224,
236, 356
мішені, 241-243
циклооксигеназа, 391, 405, 407
цимегидин, *див.* інгібітори
H⁺,K⁺-АТФази
цинкові пальці, 245, 246
окисні модифікації, 431, 432
цистатіонін-β-синтаза, 482, 483-485
структура, 484, 485
функції, 483
цистатіонін-γ-ліаза, 482, 483
структура, 483
функції, 483
цистеїнамінотрансфераза, 483, 485
цитозольні PRRs, 543, 559-564
MDA5, 543, 561
RIG1, 543, 561
PкR, *див.* серин/треонінові
протеїнкінази: PкR
сигнальні шляхи, 561-564
адаптерні білки
IPS1, 561

інгібування вірусними
білками, 564
цитозольні якірні білки, 163, 165,
167, 168, 170, 172, 174
цитохром P450, 66, 67, 363, 391,
412, 494
цитохром с-оксидаза, 497

Шаперон HSP70, *див.* ЕПР-
стрес:білки-сенсори:BiP/GRP78
шаперони, 444

Ядерний поровий комплекс,
див. ядро:ядерна пора
ядро, 70-74, 391
внутрішня мембрана, 70
генерація активних форм
кисню, 391
зовнішня мембрана, 70
ламіна, 70
ядерна оболонка, 70
маркерні ферменти, 74
ядерна пора, 71-74
будова, 71-73
провідність, 73
транспорт речовин, 73,74
якірні контакти, 158, 165-174
адгезивні контакти, 167-170
структура, 168
функції, 168
гемідесмосоми, 167, 174
структура, 174
десмосоми, 167, 170, 171, 200-202
структура, 170
фокальні адгезії, 167, 171-173
структура, 171, 172

ЗМІСТ

Умовні скорочення українських термінів	3
Умовні скорочення англійських термінів з поясненнями	4
ВСТУП	26
РОЗДІЛ 1. Будова і функції біологічних мембран	33
1.1. Хімічна будова біологічних мембран	33
1.1.1. Ліпідний склад біологічних мембран	35
1.1.2. Мембранні білки	50
1.1.3. Вуглеводні компоненти мембран	55
1.2. Властивості мембран	56
1.3. Плазматична мембрана та ендомембрани	60
1.4. Механізми мембранного транспорту	74
1.4.1. Пасивний транспорт. Проста дифузія	78
1.4.2. Пасивний транспорт. Полегшена дифузія	78
1.4.2.1. Рухливі переносники	80
1.4.2.2. Іонні канали	82
1.4.2.3. Транспорт води й аквапорини	98
1.4.2.4. Іонофори	106
1.4.2.5. Порини	109
1.4.3. Активний транспорт.	
Первинно-активний транспорт	110
1.4.3.1. АТФази Р-типу	113
1.4.3.2. АТФази F-типу	122
1.4.3.3. АТФази V-типу	124
1.4.3.4. АВС-транспортери	125
1.4.4. Активний транспорт.	
Вторинно-активний транспорт (котранспорт)	147
1.4.5. Цитоз як активний транспорт	149
1.4.5.1. Ендоцитоз	149
1.4.5.2. Екзоцитоз	155

1.5. Біологічні мембрани	
у формуванні міжклітинних взаємодій	156
1.5.1. Замикальні контакти	158
1.5.2. Якірні контакти	165
1.5.2.1. Адгезивні контакти	167
1.5.2.2. Десмосоми (пластинки прикріплення)	170
1.5.2.3. Фокальні адгезії	171
1.5.2.4. Гемідесмосоми	174
1.5.3. Комунікаційні контакти	174

РОЗДІЛ 2. Механізми сприйняття сигналу

та його передачі всередину клітини:

основні сигнальні каскади	179
2.1. Аденілатциклазний каскад	180
2.2. Інозитолфосфатна система передачі гормонального сигналу (фосфоінозитидний шлях)	202
2.3. Інозитолполіфосфати як сигнальні молекули	224
2.3.1. Шляхи генерування інозитолполіфосфатів	224
2.3.2. Функції інозитолполіфосфатів	231
2.4. Гуанілатциклазна система як самостійний регулятор функцій клітин	236
2.5. Механізми дії стероїдних гормонів	244

РОЗДІЛ 3. Фосфорилування тирозину

як механізм регуляції внутрішньоклітинних процесів

3.1. Класифікація і функції тирозинових протеїнкіназ	254
3.1.1. Рецепторні (трансмембранні) тирозинові протеїнкінази	255
3.1.2. Нерецепторні (цитозольні) тирозинові протеїнкінази	263
3.1.3. Сигнальні каскади за участю тирозинових протеїнкіназ	271
3.1.3.1. <i>PI3K</i> -залежний сигнальний шлях	271
3.1.3.2. <i>MAP</i> -кіназні каскади	272
3.1.3.3. <i>PLC</i> - γ -залежні сигнальні шляхи	278
3.1.3.4. <i>Jak/STAT</i> -система	279

3.2. Класифікація і функції тирозинових протеїнфосфатаз	280
3.2.1 Класичні (фосфотирозин-специфічні) цистеїнзалежні цитозольні протеїнфосфатази	286
3.2.2 Класичні (фосфотирозин-специфічні) цистеїнзалежні рецепторні протеїнфосфатази	291
3.2.3. Фосфатази подвійної специфічності	295
3.2.4. Низькомолекулярна тирозинова протеїнфосфатаза та cdc25-фосфатази	299
РОЗДІЛ 4. РІЗК-залежні сигнальні шляхи	304
4.1. Родина фосфатидилінозитол-3-кіназ	304
4.2. Сигнальні шляхи РІЗК; принцип ПкВ/Akt-залежного шляху	311
4.3. РІР3-фосфатази як регулятори РІЗК-залежних сигнальних шляхів	316
4.4. Біологічна роль РІЗК-залежних сигнальних шляхів	317
РОЗДІЛ 5. Сигнальні шляхи монооксиду азоту	323
5.1. Монооксид азоту: властивості та шляхи утворення в організмі	323
5.2. NO-синтаза: структура, ізоформи, принципи функціонування і регуляції ферментативної активності	329
5.2.1. Структура NO-синтази	329
5.2.2. Ізоформи NO-синтази	333
5.2.3. Принципи регуляції ферментативної активності конститутивних та індукцибельної ізоформ NO-синтази	336
5.2.3.1. <i>Регуляція на рівні транскрипції</i>	337
5.2.3.2. <i>Посттранскрипційна регуляція активності NOS: сплайсинг-варіанти</i>	347
5.2.3.3. <i>Посттрансляційна регуляція активності NOS</i>	347

5.3. Механізми дії NO	356
5.3.1. цГМФ-залежні сигнальні шляхи NO	356
5.3.2. цГМФ-незалежні сигнальні шляхи NO	358
5.3.2.1. Регуляторні впливи радикала оксиду азоту	360
5.3.2.2. Регуляторні впливи катіона нітрозонію	365
5.3.2.3. Регуляторні впливи нітроксильного аніона	375
5.4. Фізіологічні функції NO	378

РОЗДІЛ 6. Участь активних форм кисню у процесах

внутрішньоклітинної трансдукції сигналу	389
6.1. Особливості генерації ROS у клітинах	389
6.1.1. НАДФН-оксидаза: структура і принципи функціонування	395
6.1.2. Ферменти обміну арахідонової кислоти – 5-ліпоксигеназа та циклооксигеназа – як джерела ROS	405
6.1.3. Ксантиоксидаза як джерело активних форм кисню	408
6.1.4. Генерація ROS у електронотранспортних ланцюгах клітини	409
6.1.5. Генерування ROS у пероксисомах	414
6.2. Біохімічні механізми дії ROS як біорегуляторів	414
6.2.1. Окисні модифікації білків у регуляторних впливах ROS	416
6.2.2. Роль ROS в рецептор-опосередкованих шляхах передачі сигналу	426
6.2.3. Вплив ROS на внутрішньоклітинні сигнальні каскади	428
6.2.4. Вплив ROS на функціональний стан транскрипційних факторів та експресію генів	437
6.2.5. Зміна внутрішньоклітинного редокс-статусу як регулятор функцій клітинних білків	440
6.3. Роль ROS у розвитку клітинного стресу: ЕПР-стрес, генотоксичність і мітохондріальна дисфункція	441
6.4. Основні механізми видалення H ₂ O ₂ : каталаза, глутатіонпероксидаза, пероксиредоксини	453

РОЗДІЛ 7. Участь продуктів пероксидного окиснення ліпідів у сигнальних каскадах	463
7.1. Стадії пероксидного окиснення ліпідів.....	463
7.2. Продукти ПОЛ та їхній вплив на біологічні мембрани.....	465
РОЗДІЛ 8. Антиоксидантні системи як модулятори редокс-сигналізації	469
8.1. Неферментативні й ферментативні антиоксиданти.....	469
8.2. Глутатіон як головний компонент системи антиоксидантного захисту.....	473
8.3. Компоненти глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи.....	476
РОЗДІЛ 9. Сульфід водню і монооксид вуглецю як газотрансмітери	480
9.1. Сульфід водню як сигнальна молекула.....	482
9.1.1. Генерування й катаболізм сульфїду водню в організмі.....	482
9.1.2. Біологічна роль сульфїду водню.....	486
9.2. Монооксид вуглецю як сигнальна молекула.....	493
9.2.1. Шляхи ендogenousного утворення і катаболізму монооксиду вуглецю.....	493
9.2.2. Біологічна роль монооксиду вуглецю.....	498
9.3. Конвергенція сигнальних шляхів газотрансмітерів.....	504
РОЗДІЛ 10. Сигнальні шляхи похідних сфінгомїєліну	508
10.1. Церамїд.....	509
10.1.1. Шляхи утворення церамїду.....	509
10.1.2. Церамїд як сигнальна молекула.....	515
10.2. Церамїд-1-фосфат.....	521
10.2.1. Біосинтез церамїд-1-фосфату.....	521
10.2.2. Церамїд-1-фосфат як сигнальна молекула.....	521
10.3. Сфінгозин.....	524
10.3.1. Шляхи генерації сфінгозину.....	524
10.3.2. Сфінгозин як сигнальна молекула.....	524

10.4. Сфінгозин-1-фосфат	525
10.4.1. Біосинтез сфінгозин-1-фосфату	525
10.4.2. Сфінгозин-1-фосфат як сигнальна молекула.....	530
10.5. Модель церамід/Sph-1-P-реостату	534
РОЗДІЛ 11. Сигнальна система інтерферону	537
11.1. Типи інтерферонів	538
11.2. Шляхи синтезу інтерферонів інфікованою клітиною.....	540
11.2.1. Утворення ІФ I типу	542
11.2.1.1. <i>Toll-подібні рецептори</i> <i>та їхні сигнальні шляхи</i>	544
11.2.1.2. <i>Сигнальні шляхи</i> <i>Toll-подібних рецепторів</i>	549
11.2.1.3. <i>Цитозольні PRRs у регуляції експресії</i> <i>генів ІФ I типу</i>	559
11.2.2. Утворення ІФ II типу	564
11.3. Механізми дії інтерферонів	565
11.4. Біологічні ефекти інтерферонів	580
РОЗДІЛ 12. Контрольні запитання та завдання	592
ДОДАТОК	599
Список літератури	607
Предметний покажчик	617

Навчальне видання

ОСТАПЧЕНКО Лариса Іванівна
СИНЕЛЬНИК Тетяна Борисівна
КОМПАНЕЦЬ Ірина Володимирівна

**БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ
ТА ОСНОВИ
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ
СИГНАЛІЗАЦІЇ**

ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ

Навчальний посібник

Редактор *В. Р. Філь*
Технічний редактор *Л. П. Шевченко*

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"



Формат 60×84^{1/16}. Ум. друк. арк. 37,2. Наклад 100. Зам. № 216-7794.
Вид. № Б11*. Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний.
Підписано до друку 27.09.16

Видавець і виготовлювач
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет",
б-р Т. Шевченка 14, м. Київ, 01601
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28
e-mail: vpc@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідчення суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02