

**Національний університет біоресурсів і природокористування України**  
**Кафедра фізіології, біохімії рослин та біоенергетики**

**Нестерова Н.Г., Бойко О.А.**

## **СИГНАЛЬНІ (ТРАНСПОРТНІ) СИСТЕМИ РОСЛИН**

Конспект лекцій для студентів ОС «Магістр» очної форми навчання аграрних  
вузів III-IV рівня акредитації спеціальності  
**162 «Біотехнологія та біоінженерія»**

Київ 2020

УДК 633;632.9

Наведено конспект лекційного курсу з дисципліни «Сигнальні (транспортні) системи рослин». Вказані підходи щодо вивчення механізмів проходження внутрішньоклітинного сигналіngu, реалізація передачі вторинними месенджерами та управління вихідним сигналом клітин рослин.

Для студентів аграрних ВНЗ з напрямку підготовки «Біотехнологія»

Рекомендовано до друку на засіданні кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики НУБіП України (протокол № 5 від 11. 11. 2020 р) та вченої ради факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України (протокол № 4 від 20. 11. 2020 р).

Укладачі:

Доц., к.с.-г.н.

**Нестерова Наталія Георгіївна**

Доц., зав. каф., к.б.н.

**Бойко Ольга Анатоліївна**

Рецензенти:

Професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття, д.с.-г.н., проф.

**Лісовий Микола Михайлович**

Старший науковий співробітник відділу фізіології дії гербіцидів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, к.б.н. **Радченко Марія Павлівна**

## **СИГНАЛЬНІ (ТРАНСПОРТНІ) СИСТЕМИ РОСЛИН**

Конспект лекцій для студентів ОС «Магістр» очної форми навчання аграрних вузів III-IV рівня акредитації спеціальності

**162 «Біотехнологія та біоінженерія»**

Формат 60x90 1/16. Папір офсетний. Друк цифровий.

Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 4,9. Зам. № 691.

Друк ЦП «Компринт». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.

м. Київ, вул. Предславинська, 28

528-05-42, 067-209-54-30

email: [komprint@ukr.net](mailto:komprint@ukr.net)

## Зміст

Вступ.....	4
Лекція 1. Клітинна трансдукція та сигналінг.....	5
Лекція 2. Можливості сигналінгу. Підсилення сигналу.....	12
Лекція 3. Типи рецепторів у сигналінгу.....	16
Лекція 4. Мембранозв'язані рецептори. Класи рецепторів поверхні клітини.....	23
Лекція 5. Вторинні месенджери. Циклічна аденозин монофосфат (цамф).....	28
Лекція 6. цАМФ – функції та предметна роль.....	32
Лекція 7. Циклічний гуанозинмонофосфат – функціональна роль.....	37
Лекція 8. цГМФ – функціональні особливості.....	40
Лекція 9. Канал потоку іонів кальцію.....	43
Лекція 10. Властивості та функціональна роль $Ca^{2+}$ .....	47
Лекція 11. G-білок. визначення і функції.....	51
Лекція 12. Класифікація GPCR та термінація сигналінгу.....	59
Список використаної літератури:.....	63

## **Вступ**

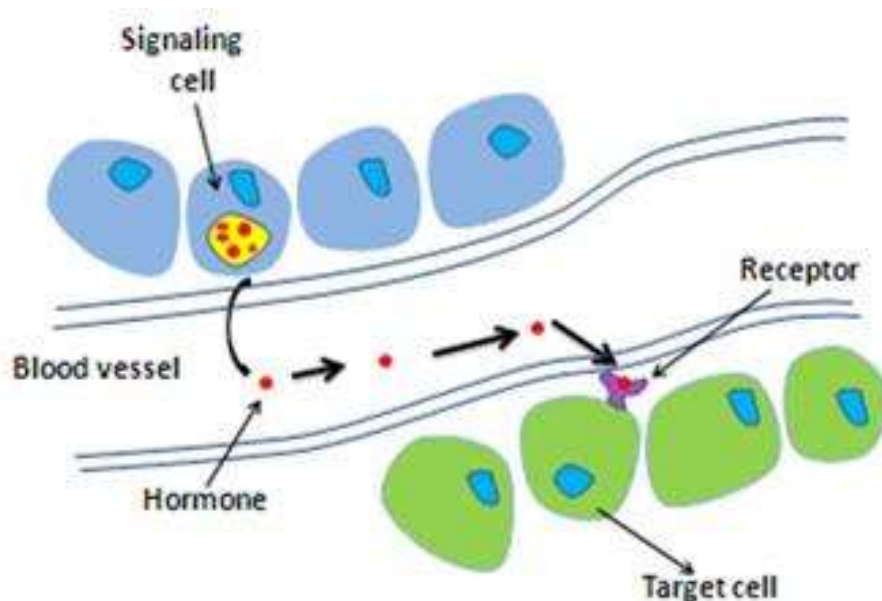
Сучасні дослідження фізіолого-біохімічних функцій організму тісно пов'язані з вивченням механізмів сприйняття і внутрішньоклітинної передачі різних сигналів. Знання щодо принципів формування відповідної реакції клітини на дію екстра клітинних сигналів є особливо важливим для розвитку уявлень про регуляцію функціональної та метаболічної активності клітин. Водночас, це необхідно для глибшого розуміння суті онтогенезу, особливостей взаємодії організмів з навколишнім середовищем і хімічної природи різноманітних біологічних функцій живих об'єктів.

Цей лекційний курс має на меті систематизувати основні відомості про принципи внутрішньоклітинної сигналізації рослин. Детально описані структура, властивості і особливості функціонування компонентів внутрішньоклітинних сигнальних систем рослин, механізми рецепції і трансдукції зовнішніх сигналів. Проте, з огляду на поліфункціональність більшості сигнальних посередників, їх участь у фізіологічних процесах детально не розглядаються.

Лекційний курс не є повноінформативним джерелом відомостей про механізми рецепції і сигналіngu у рослин, і, можливо, не дасть абсолютно усіх відповідей, проте може стати початком засвоєння все ще мало вивченої області біології – механізмів рецепції і сигналіngu у рослин.

## Лекція 1. Клітинна трансдукція та сигналінг

Живі організми постійно отримують та інтерпретують сигнали з навколишнього середовища. Ці сигнали можуть бути світлом, теплом, запахами, дотиком або звуком. Також, клітини тіла людини постійно отримують сигнали від інших клітин, що є важливими для збереження і функціонування клітин, а також для стимулювання процесів поділу клітин та їх диференціації. У тварин швидка реакція на зміни навколишнього середовища опосередковується насамперед нервовою системою та гормонами, включаючи дрібні пептиди, малі непептидні молекули, такі як катехоламіни (дофамін, епінефрин, норадреналін). Тому важливо розуміти і роль різних вторинних месенджерів, які беруть участь у процесі передачі сигналів (сигналінгу). Ці сигнальні молекули вивільняються з клітин і мігрують через кров до їх специфічних клітин-мішеней (рис. 1). Так, деякі молекули переносяться на значні відстані кров'ю, а інші проявляють локальніший вплив. Водночас, певні білки, що пов'язані з мембраною однієї клітини можуть безпосередньо сигналізувати про наявність сусідньої клітини.



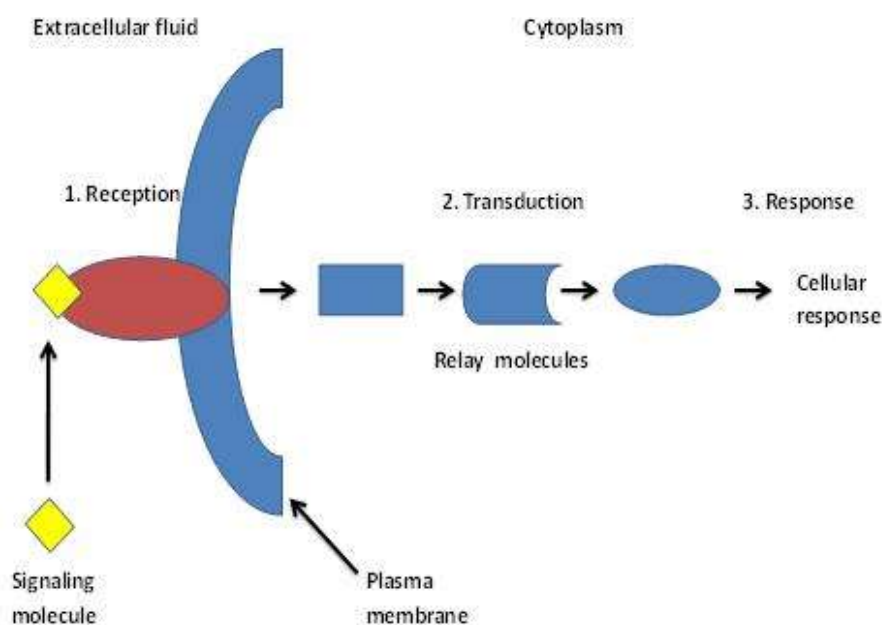
**Рис. 1** Сигнальні молекули, що виокремлюються з клітини і мігрують з кров'ю до клітини-мішені

Клітинний сигналінг умовно може бути поділений на 3 етапи:

**1. Прийом:** клітина виявляє сигнальну молекулу ззовні клітини. Фіксація сигналу починається коли ліганд зв'язується з рецепторним білком на поверхні клітини або всередині клітини.

**2. Трансдукція:** коли сигнальна молекула зв'язується з рецептором, вона змінює рецепторний білок. Ця зміна ініціює процес перетворення. Кожна молекула ретрансляції у ланцюзі передачі сигналу змінює наступну молекулу у ланці.

**3. Відповідь:** нарешті, сигнал запускає специфічну клітинну відповідь, як показано на рисунку 2.



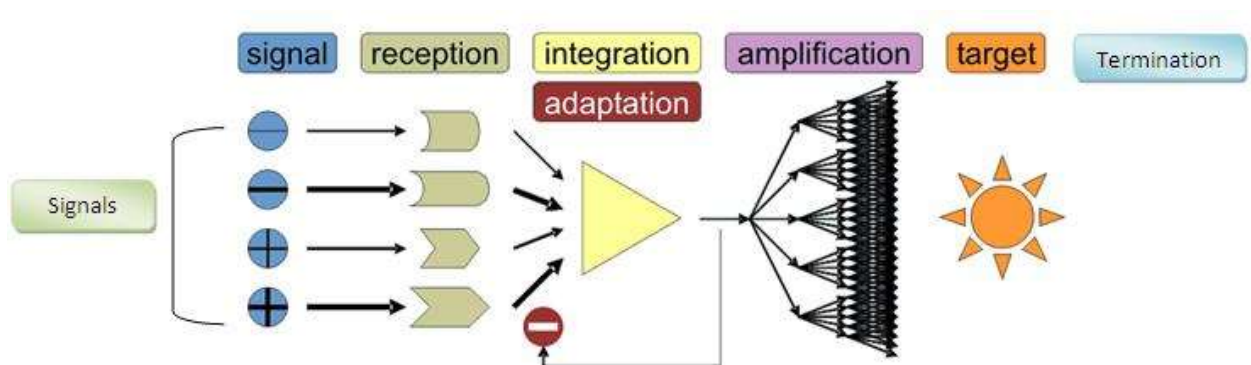
**Рис. 2** Стадії клітинного сигналінгу

**Трандукція сигналу** – це явище, що передбачає передачу сигналу від позаклітинного до внутрішньоклітинного середовища через білок рецепторів клітинної поверхні, що стимулюється внутрішньоклітинними ферментами-мішенями, які можуть бути безпосередньо або опосередковано пов'язані з рецепторами через G білки. Ці внутрішньоклітинні ферменти виступають в

якості сигнальних елементів, розташованих нижче за ланкою, поширюють та посилюють сигнал, ініційований зв'язуванням ліганду. Таким чином, шлях передачі сигналу дозволяє клітинам реагувати на позаклітинні сигнали навколишнього середовища. Так, сигнали можуть бути фізичними та хімічними, такими як світло, кисень, поживні речовини, гормони (рис. 3).

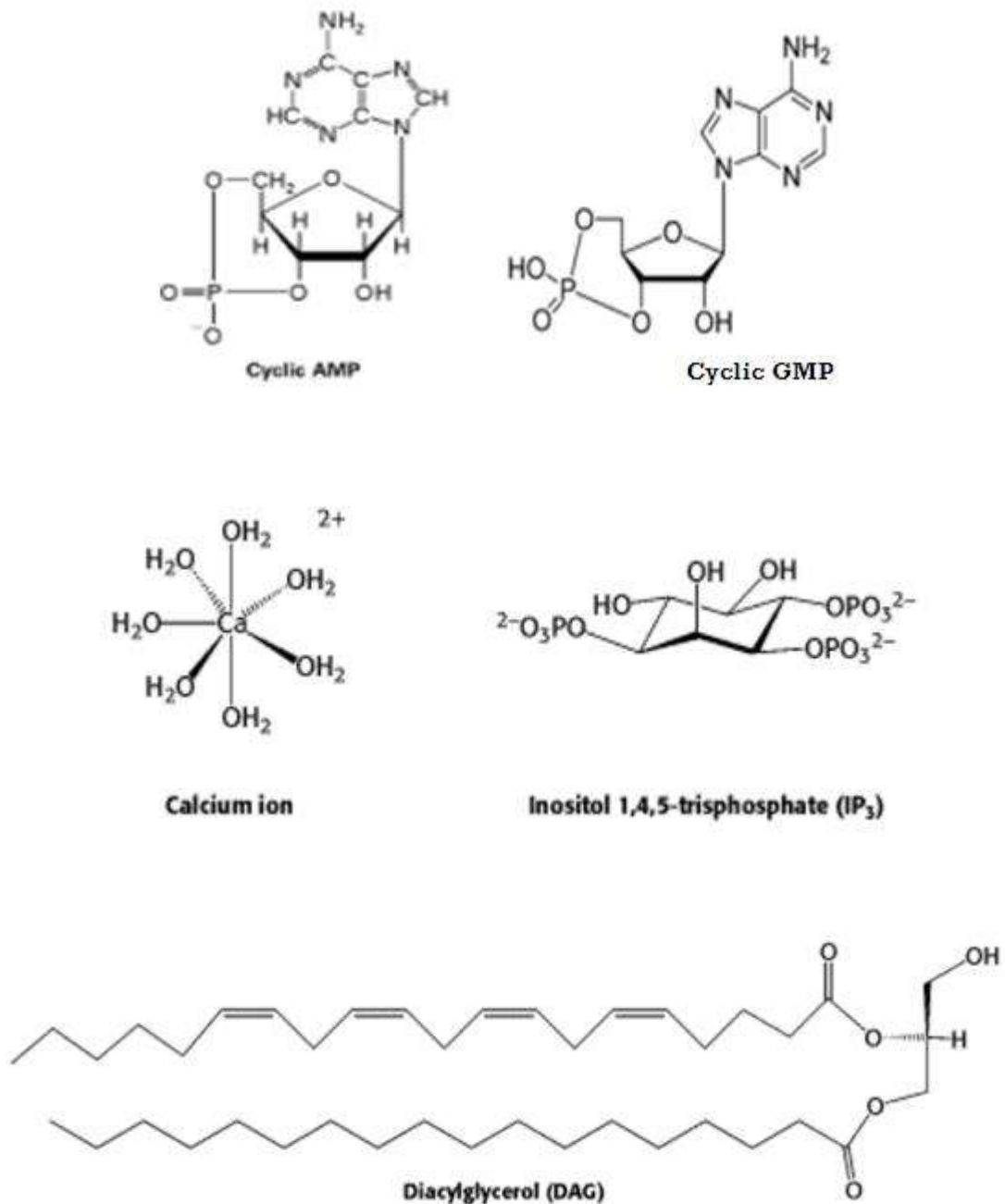
Трансдукція сигналу – це сукупність наступних явищ:

- Прийом сигналу
- Інтеграція
- Ампліфікація
- Цільова мішень
- Термінація



**Рис. 3** Алгоритм трансдукції сигналу

Таким чином, трансдукція сигналу починається з прийому сигналу клітинним рецептором і закінчується зміною клітинної функції. Клітинний рецептор може бути різних типів – рецептор, пов'язаний з G-білком, рецептор тирозинкінази тощо. Процес трансдукції, зазвичай, опосередковується за допомогою каскаду деяких важливих месенджерів, включаючи цАМФ, цГМФ, іон кальцію, інозит 1, 4, 5-трисфосфат, (ІФ 3) та діацилгліцерин (ДАГ). Вторинні месенджери – це внутрішньоклітинні молекули, які змінюють концентрацію у відповідь на сигнали навколишнього середовища і беруть участь у передачі інформації всередині клітини (рис. 4).



**Рис. 4** Вторинні месенджери

Шляхи трансдукції сигналу діють аналогічно молекулярному ланцюгу. Цей шлях залежить від визначених чинників під час трансформації сигналу з позаклітинного середовища у внутрішньоклітинний.

1. Прийом сигналу рецептором клітинної мембрани. Деякі неполярні сигнальні молекули, такі як естрогени та інші стероїдні гормони, здатні



перетинати біліпідну мембрану і, отже, проникати всередину клітини. Потрапивши всередину, ці молекули можуть зв'язуватися з білками, які взаємодіють безпосередньо з ДНК і беруть участь у регуляції транскрипції генів. Таким чином, хімічний сигнал надходить у клітину і безпосередньо змінює структуру експресії генів. Однак більшість сигнальних молекул занадто великі і занадто полярні, тобто вони не здатні перетнути мембрану і не виникає відповідна транспортна система. У цьому випадку ці сигнальні молекули передають сигнал через білки-рецептори клітинної поверхні, не перетинаючи клітинну мембрану. Ці рецептори є внутрішньомембранним білком, який складається як з позаклітинного, так і внутрішньоклітинного домену. Сайт зв'язування, присутній у позаклітинному домені, спеціально розпізнає сигнальну молекулу (тобто, ліганд). Такі сайти зв'язування є аналогами активних ферментних сайтів, за винятком того, що в них не відбувається процес каталізу. Коли ці сигнальні молекули надходять і зв'язуються з сайтом зв'язування на рецепторному білку в позаклітинній області, то відбувається деяка конформаційна зміна в третинній та четвертинній структурі рецептора, що призводить до різкої зміни внутрішньоклітинного домену рецептора. Ці структурні зміни недостатні для отримання відповідної реакції, оскільки вони обмежені невеликою кількістю молекул рецепторів у клітинній мембрані. Інформація прочитана за присутності ліганду, який часто називають первинним месенджером, повинна переноситися в інші форми, які можуть змінювати біохімію клітини.

2. Вторинний месенджер. Вторинні месенджери виконують роль проміжної молекули, яка передає сигнали від рецепторів на клітинній поверхні до цільової молекули всередині клітин, у цитоплазмі чи ядрі.

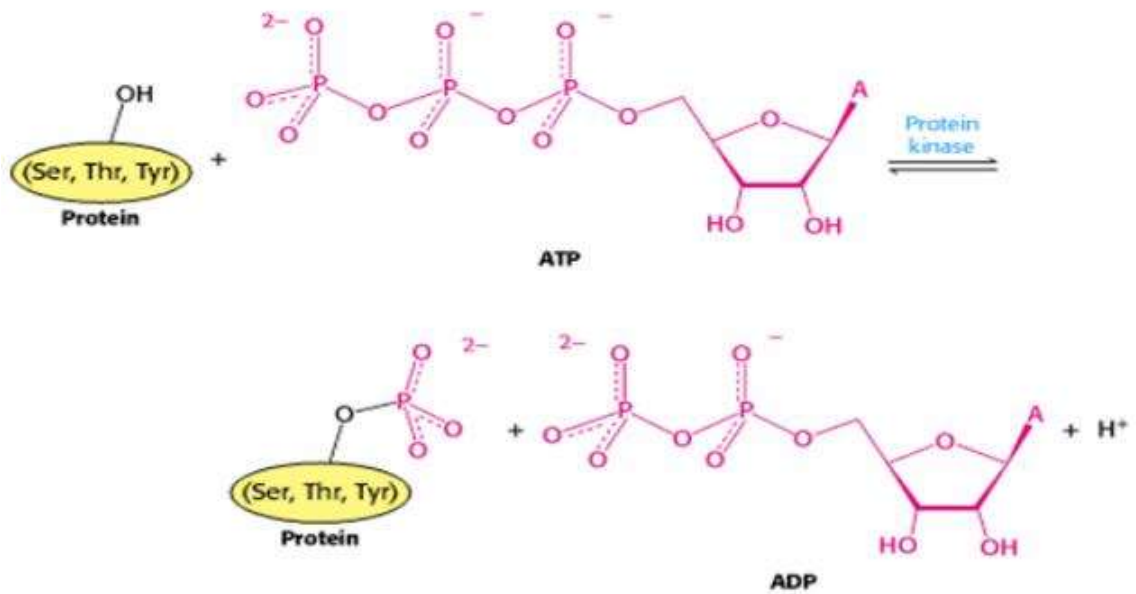
Використання вторинного месенджера має ряд особливостей:

- Вони здатні часто дифундувати в інші компартменти клітини, наприклад ядро, де вони можуть впливати на експресію генів та інші процеси.
- Генерація вторинного месенджера призводить до посилення сигналу. Кожна сигнальна молекула бере участь у генерації декількох вторинних

месенджерів у клітині. Таким чином, низька концентрація сигналу в навколишньому середовищі, навіть така ж незначна як одна молекула, може давати суттєвий внутрішньоклітинний сигнал і відповідь.

– Оскільки звичайні вторинні месенджери генерують різні сигнальні шляхи, то координація передачі сигналу визначається взаємодією цих шляхів. Кілька сигнальних шляхів створюють як можливості, так і потенційні проблеми. Взаємодія між сигнальними шляхами дозволяє клітині обробляти та інтерпретувати кілька входів по-різному в різних контекстах, що призводить до перехресного сигналіngu (крос-сигналінг). Такий сигналінг між вторинними месенджером викликають коливання різних месенджерів даної групи, а також створюють біостабільність між двома стійкими станами. Таким чином, крос-сигналінг точніше передбачає регуляцію клітинної діяльності, ніж окремі незалежні шляхи без перехресних можливостей. Однак, невідповідний крос-сигналінг може спричинити неправильне тлумачення вторинним месенджером, і як наслідок – втрату сигналу.

3. Фосфорилування білка. Фосфорилування білка є найпоширенішим способом передачі інформації, що надходить через вторинний месенджер і передбачає отримання реакцій шляхом активації білкових кіназ. Це така посттрансляційна модифікація білків фосфорилуванням в серинових, треонінових або тирозінових залишках ферментом протеїнкіназою шляхом додавання ковалентно-пов'язаної фосфатної групи з АТФ (рис. 5).

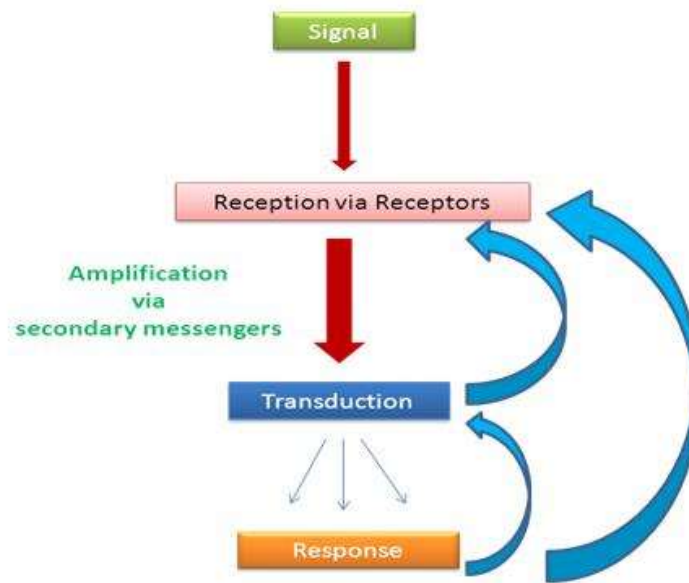


**Рис. 5** Діяльність цАМФ-залежної протеїнкінази

4. Термінація сигналу білковою фосфатазою. Припинення сигналу є завершальним етапом його передачі. Добре відомим є шлях припинення сигналу за допомогою ферменту білкової фосфатази. Процес сигналінгу повинен бути припинений одразу після ініціювання сигналу та передачі інформації, що безпосередньо впливає на інші клітинні процеси. Без такого припинення клітини втрачають свою чутливість до нових сигналів. Водночас, якщо термінація не відбувається в сигнальних процесах, це може призвести до неконтрольованого росту клітин і, таким чином, збільшує ризик виникнення раку.

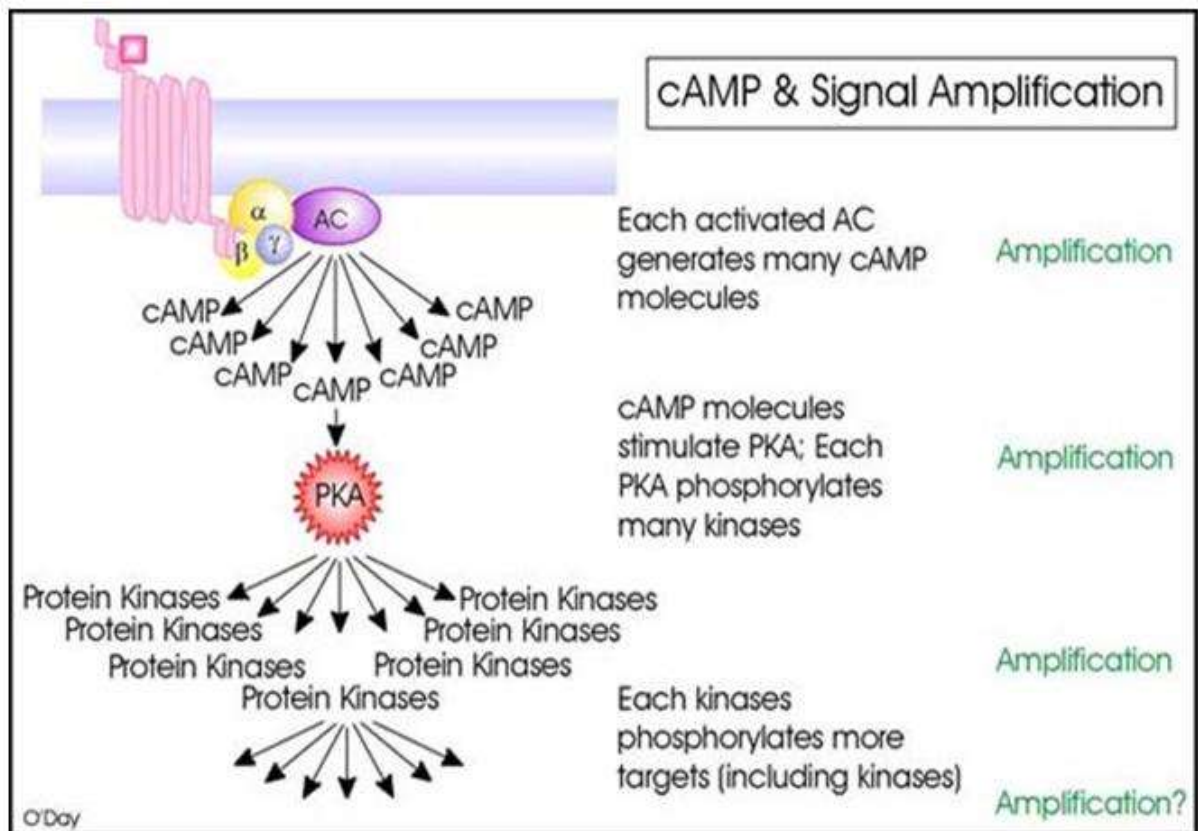
## Лекція 2. Можливості сигналінгу. Підсилення сигналу

**Ампліфікація сигналу** – це явище, при якому рецепторні білки взаємодіють із сигнальними молекулами на поверхні клітини, при цьому, зазвичай сигнали передаються цитоплазмі або ядру вторинними месенджерами, що впливає на активність одного або декількох ферментів чи генів всередині клітини (рис. 6).



**Рис. 6** Алгоритм процесу ампліфікації сигналу

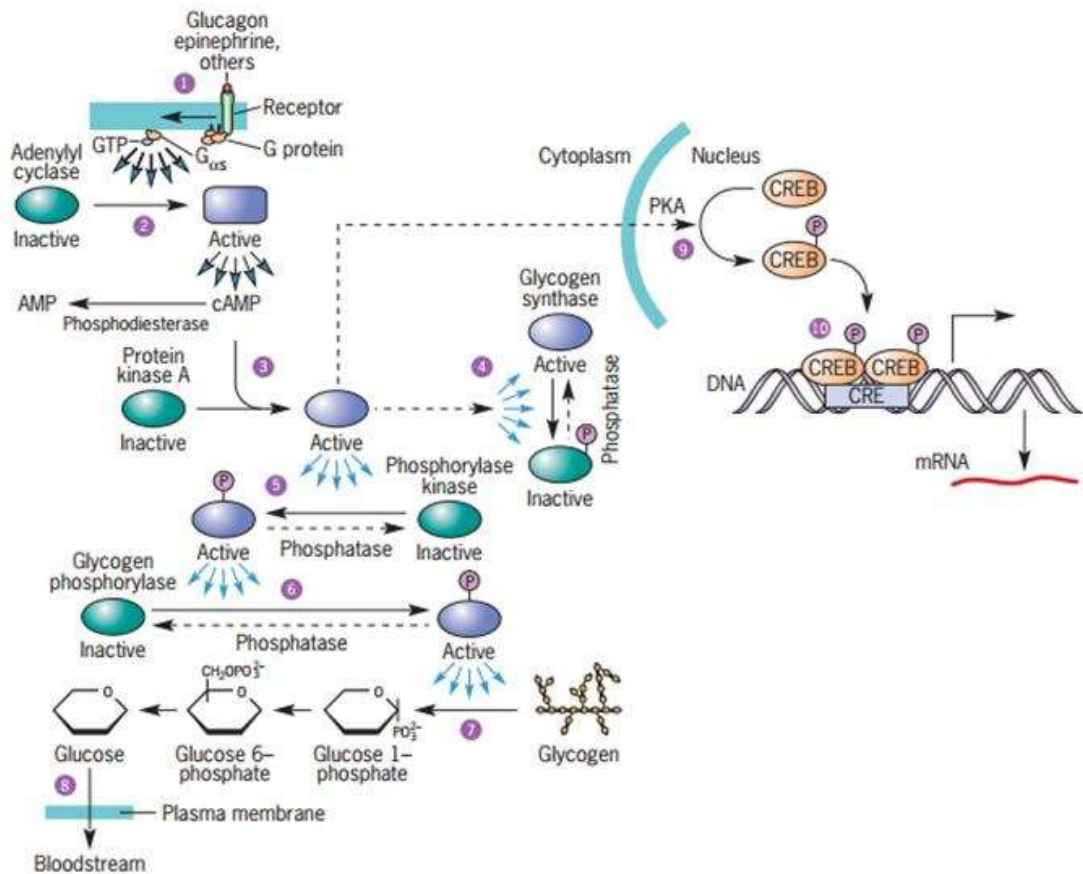
Проте більшість сигнальних молекул локалізуються в такій низькій концентрації, що якби сигнал не був посилений, то їх дія в цитоплазмі була б мінімальною. Отже, більшість рецепторів пов'язаних з ферментами і пов'язаних із G-білком використовують ланцюг іншого білкового месенджера для посилення сигналу під час його передачі. Таким чином, у випадку протеїнкінази один рецептор клітинної поверхні активує багато молекул G-білка, а кожен G-білок активує багато аденілілових циклаз. Кожна цАМФ свою чергу активує протеїнкіназу, яка потім активує кілька молекул певного ферменту (рис. 7).



**Рис. 7** Ампліфікація сигналу та цАМФ

Наприклад, зв'язування однієї молекули (наприклад, глікогену або епінефрину) на клітинній поверхні може активувати багато ефекторних G-білків та аденілілциклазу, кожен з яких може за короткий проміжок часу продукувати велику кількість месенджерів цАМФ. Таким чином, утворення вторинного месенджера забезпечує механізм сильного посилення сигналу, сформованого із вихідного повідомлення. У реакційному каскаді є багато етапів посилення сигналу через молекули цАМФ, які активують протеїнкіназу К, що беруть участь у фосфорилуванні серину, треоніну та тирозину цільового білка. ПКА (активована протеїнкіназа) – це тетрамерний білок, який складається з двох каталітичних та двох регуляторних субодиниць. Зв'язування цАМФ з регуляторними субодиницями викликає конформаційну зміну, що призводить до дисоціації каталітичних субодиниць, які викликають утворення ферментативно активної форми протеїнкінази А, і тепер здатні фосфорилувати залишки серину та треоніну на своїх цільових білках. Підсилюючи сигнал, кожна каталітична субодиниця ПКА

фосфорилує велику кількість молекул фосфорилази кінази, що, у свою чергу, фосфорилує ще більшу кількість молекул фосфорилази глікогену, що може каталізувати утворення значно більшої кількості фосфатів глюкози. Таким чином, те, що починається як важко помітний процесінг на клітинній поверхні, швидко перетворюється на основну мобілізацію глюкози всередині клітини (рис. 8).



**Рис. 8** Алгоритм ампліфікації сигналу у процесі розпаду глюкози

Різна дія деяких гормонів на різні тканини показана у таблиці 1:

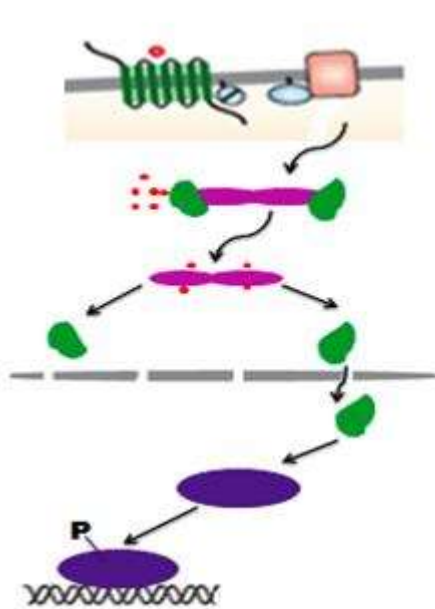
Тканини	Гормони	Дія
Печінка	Епінефрин Глюкагон	Розпад глікогену, синтез глюкози (глюкогенез), інгібування синтезу глікогену
Скелетні м'язи	Епінефрин	Розпад глікогену, інгібування синтезу глікогену

Серцеві м'язи	Епінефрин	Підвищення скоротливості
Жирова тканина	Епінефрин Глюкагон Адренкортикотропний гормон	Катаболізм триацилгліцеролу
Нирки	Вазопресин	Зниження проникності води у епітеліальні клітини
Щитоподібна залоза	Тиреотропний гормон	Секреція тироїдних гормонів
Кістки	Паратроїдний гормон	Зменшення всмоктування кальцію
Яєчники	Лютеїнізуючий гормон	Зниження секреції стероїдних гормонів
Кора надниркових залоз	Адренкортикотропний гормон	Зниження секреції глюкокортикостероїдів

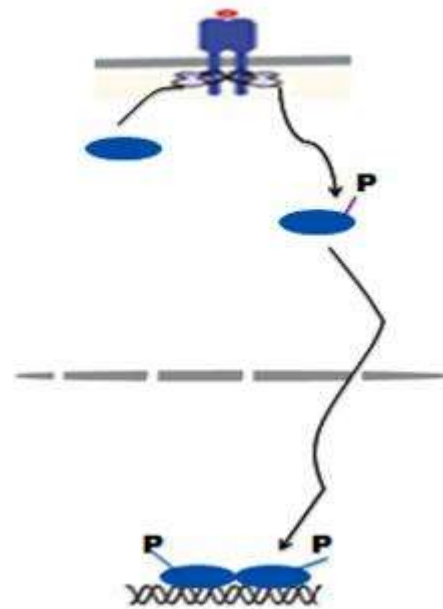
Отже, варто розуміти, що більшість сигнальних молекул виявляються в такій низькій концентрації, що їх вплив на цитоплазму буде мінімальним, якщо сигнал не посилити, тому більшість пов'язаних з ферментами та з G-білками рецепторів використовують ланцюг іншого білкового месенджера для посилення сигналу під час його ретрансляції.

### Лекція 3. Типи рецепторів у сигналінгу

Рецептор – це білкова молекула, що знаходиться на поверхні клітини і приймає хімічні сигнали, що надходять із клітини зовні. Зв'язування специфічних сигнальних молекул з рецептором вказує клітині можливості певних молекул входити або виходити, або спрямовує клітину до процесів ділення або загибелі. Клітини багатоклітинних організмів спілкуються за допомогою позаклітинних медіаторів: або через дифундуючі молекули, або шляхом прямого контакту клітина-клітина. Прикладами власне рецепторів є рецептори, пов'язані з G-білком, цитокінові рецептори, як показано на рис. 9.

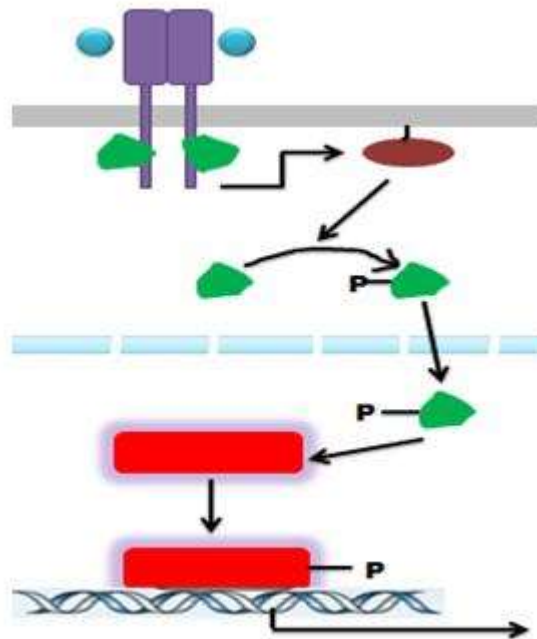


рецептори, пов'язані з G-білком



цитокінові рецептори





рецептори тирозинкінази

**Рис. 9** Приклади рецепторів

Рецептори розташовані або в цитоплазмі, або в плазматичній мембрані, або в ядрі клітини. Молекула, яка специфічно зв'язується з рецептором, називається лігандом. Ліганд може бути пептидом або іншою малою молекулою, наприклад гормоном, нейротрансмітером, фармацевтичним препаратом або токсином. Кожен тип рецептора розпізнає і зв'язує лише певні форми ліганду. Зв'язування ліганду з його рецептором викликає конформаційну зміну цитозольного домену рецептора, що потім запускає подальший каскад сигналізації; тобто він активує або гальмує певний біохімічний шлях. Індуковані лігандом зміни рецепторів призводять до клітинних змін, що становлять біологічну активність лігандів. Більшість сигнальних молекул зв'язуються з рецепторами, експресованими на поверхні клітини-мішені, але деякі сигнальні молекули здатні перетинати плазматичну мембрану і зв'язуватися з внутрішньоклітинними рецепторами в цитоплазмі або ядрі.

## Типи рецепторів на основі розташування у клітині.

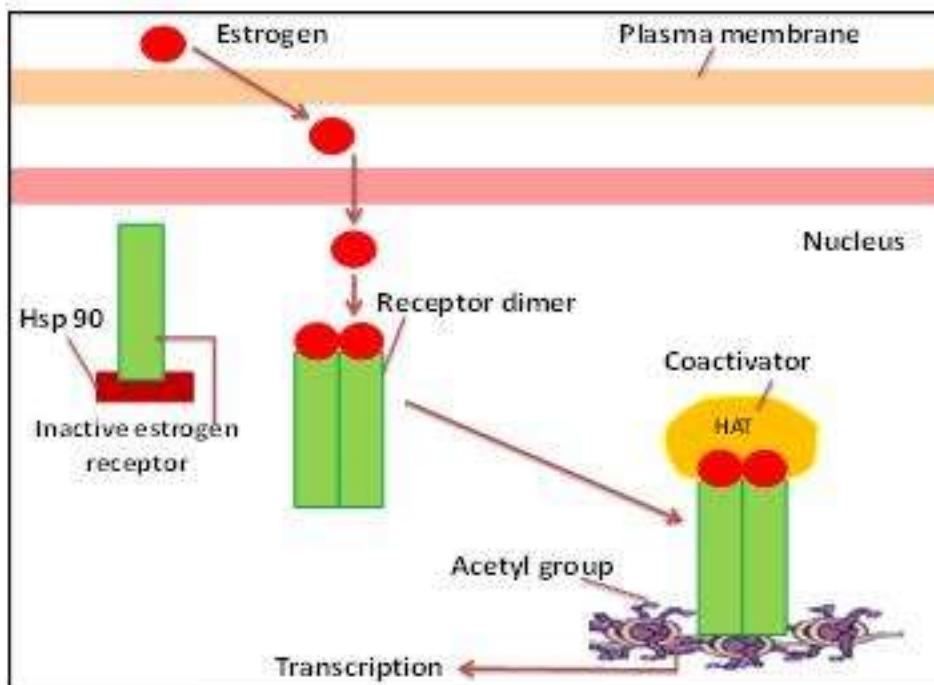
Виділяють три типи рецепторів, присутніх у клітині, залежно від їх розташування.

- Цитозольні рецептори
- Ядерні рецептори
- Мембранозв'язані рецептори

**Цитозольні рецептори** – це спеціалізовані цілісні мембранні білки, які беруть участь у передачі сигналу між клітиною та зовнішнім середовищем. Позаклітинні сигнальні молекули (як правило, гормони, нейромедіатори, цитокіни, фактори росту або молекули розпізнавання клітин) приєднуються до рецептора, викликаючи зміни у функції клітини. Таким чином, рецептори відіграють унікальну і важливу роль у клітинній передачі сигналу. Більшість стероїдних гормонів мають рецептори всередині цитоплазми, що діють, стимулюючи зв'язування їх рецепторів з промоторною областю стероїд-чутливих генів. Прикладами цитозольних рецепторів є рецептори естрогену, рецептори глюкокортикоїдів тощо.

Механізм дії цитозольних рецепторів полягає у наступному. Естроген дифундує по плазматичній мембрані та зв'язується зі своїм рецептором у ядрі. Рецептор естрогену зв'язується з шаперонами Hsp 90 за відсутності гормону естрогену, як показано на рисунку 10. Зв'язування естрогену викликає конформаційну зміну рецептора, витісняючи Hsp 90, а потім призводить до утворення димерів рецептора, який зв'язується з ДНК, зв'язується з коактиваторами з активністю гістон-ацетилтрансферази (ГАТ) та стимулює транскрипцію їх генів-мішеней. В інших випадках рецептор зв'язує ДНК за наявності або за відсутності гормону. Але зв'язування гормонів змінює активність рецептора як транскрипційної регуляторної молекули. Наприклад, за відсутності гормону, рецептор тиреоїдних гормонів асоціюється з комплексом серцевинних компресорів і пригнічує транскрипцію цільових генів. Зв'язування гормону індукує конформаційну зміну, що призводить до

взаємодії рецептора з коактиваторами, а не копресорами, що призводить до транскрипційної активації генів, індукованих гормонами щитовидної залози.



**Рис. 10** Дія рецептору естрогену

**Ядерні рецептори** – це внутрішньоклітинні білки, експресовані в ядрі клітини. Ці рецептори є частиною сімейства білків, відомим як сімейство супер ядерних рецепторів. Ядерні рецептори складають надсімейство димерних факторів С4 цинк-фінгер транскрипції, які зв'язують ліпіднорозчинні гормони та взаємодіють із специфічними елементами відповіді у ДНК. Стероїдні рецептори є гомодимерами білків цинк-фінгер, які знаходяться в ядрі (за винятком глюкокортикоїдного рецептора, який знаходиться в цитозолі до тих пір, поки він не зв'яже свій ліганд). Поки ліганд їх не знайде, деякі стероїдні рецептори всередині ядра асоціюються з гістоновими деацетилазами (ГДАЦ), зберігаючи експресію генів у цих областях хромосоми.

Ядерні рецептори складають надсімейство димерних факторів С4 цинк-фінгер транскрипції. Вони мають модульну структуру і містять такі структурні області:

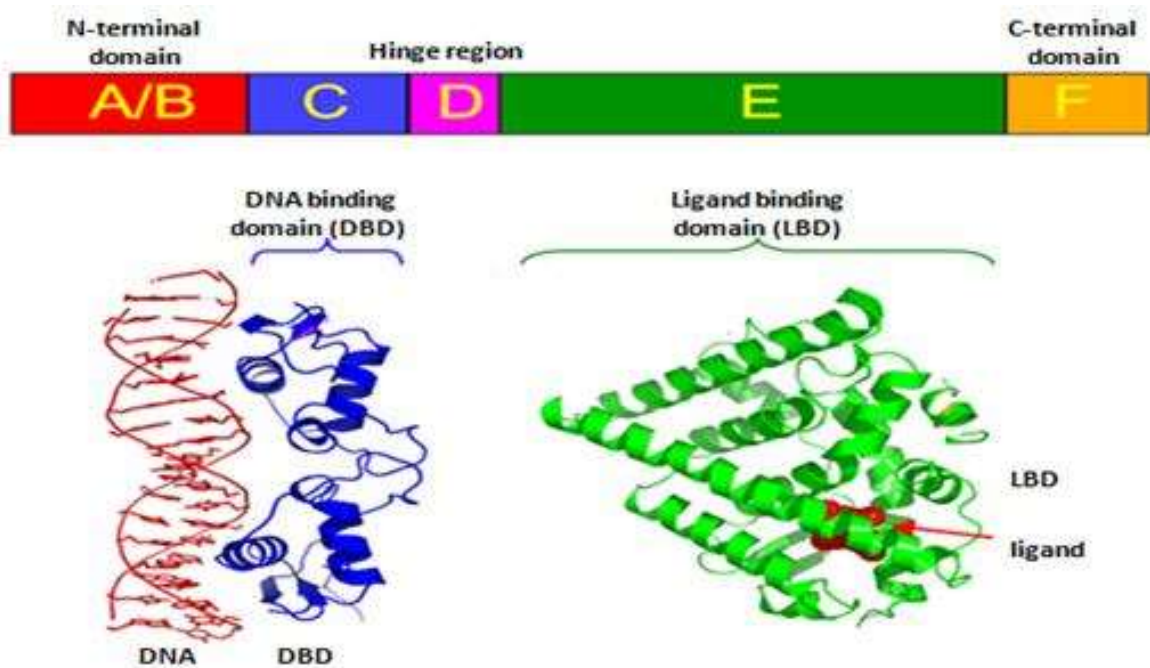
- N-кінцевий регуляторний домен (A-B). Домен A-B сильно змінюється послідовно між різними ядерними рецепторами. Він проявляє функцію активації 1 (AF-1), дія якої не залежить від присутності ліганду. Активізація транскрипції AF-1, як правило, дуже слабка, але вона синергетизується з AF-2 в E-домени для отримання регуляції експресії гена.

- ДНК-зв'язуючий домен; DBD (C). Це надзвичайно високостійкий домен, що містить два цинк-фінгера, що зв'язуються з певними послідовностями ДНК, що називаються елементами відповіді гормону (HRE), як показано на рис. 11.

- Область шарніра (D). Власне гнучкий домен з'єднує DBD з LBD. Це впливає на внутрішньоклітинний розподіл та внутрішньоклітинний обіг.

- Домен, що зв'язує ліганд, LBD (E). Його послідовність має середній ступінь збереженості, але вона зберігається в структурі між різними ядерними рецепторами. Структуру LBD називають альфа-гвинтовою бутербродною складкою, в якій три антипаралельні спіралі альфа (сендвіч-начинка) облямовані двома альфа-спіралями з одного боку та трьома з іншого (хлібом). Порожнина, що зв'язує ліганд, знаходиться у внутрішній частині LBD, а трохи нижче знаходиться три антипаралельні алфа-спіральне наповнення сендвіча. Поряд з DBD, LBD сприяє димеризаційному інтерфейсу рецептора. Крім того, він зв'язує коактиватор та білки основного пресору. LBD також містить функцію активації 2 (AF-2), дія якої залежить від наявності пов'язаного ліганду.

- С-кінцевий домен (F): Він дуже мінливий в послідовностях між різними ядерними рецепторами.



**Рис. 11** Структурна організація ядерних рецепторів (рецептор естрогену)

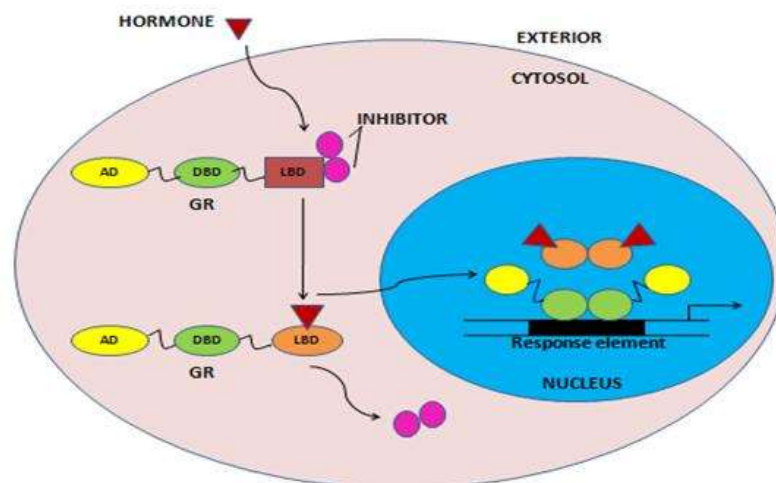
Вгорі – схематична амінокислотна послідовність ядерного рецептора.

Знизу – тривимірні структури областей DBD (пов'язані з ДНК) та LBD (пов'язані з гормоном) ядерного рецептора

Механізм дії внутрішньоклітинних ядерних рецепторів такий: вони реагують на малі гідрофобні сигнальні молекули, які легко дифундують по плазматичній мембрані. Ці молекули зв'язуються з рецепторами, і в рецепторі відбувається конформаційна зміна. Далі йде серія каскаду трансдукції внутрішньоклітинного сигналу. Стероїдні гормони, такі як гормон щитовидної залози, вітамін D3 та ретиноїнова кислота, сильно відрізняються один від одного як за хімічною структурою, так і за функцією. Потрапивши всередину клітини, ці сигнальні молекули зв'язуються з внутрішньоклітинними рецепторами, які експресуються гормонально-чутливими клітинами-мішенями. Ці рецептори є факторами транскрипції, які містять домени для зв'язування ліганду, зв'язування ДНК та транскрипційної активації. Зв'язування ліганду регулює їх функцію активаторів або репресорів цільових генів. Так стероїдні гормони та споріднені молекули безпосередньо регулюють експресію генів. У відповідь ці рецептори працюють з іншими

білками, щоб регулювати експресію конкретних генів, тим самим контролюючи розвиток, гомеостаз та метаболізм організму.

Ядерний рецептор утримується в цитоплазмі шляхом взаємодії між його лігандозв'язуючим доменом (LBD) та інгібіторними білками за відсутності стероїдного гормону. Коли гормон присутній, він легко дифундує через плазматичну мембрану і зв'язується з лігандозв'язуючим доменом. Це викликає конформаційні зміни, тим самим звільняючи рецептор від білків інгібітора. Потім рецептор з пов'язаним лігандом переміщується в ядро, де його ДНК-зв'язуючий домен (DBD) зв'язується з елементами відповіді, дозволяючи лігандно-зв'язуючому домену та додатковому домену активації (AD) на N-кінці стимулювати транскрипцію генів-мішеней, як показано на рисунку 12.



**Рис. 12** Модель гормон-залежної активації гену гомодимерним ядерним рецептором.

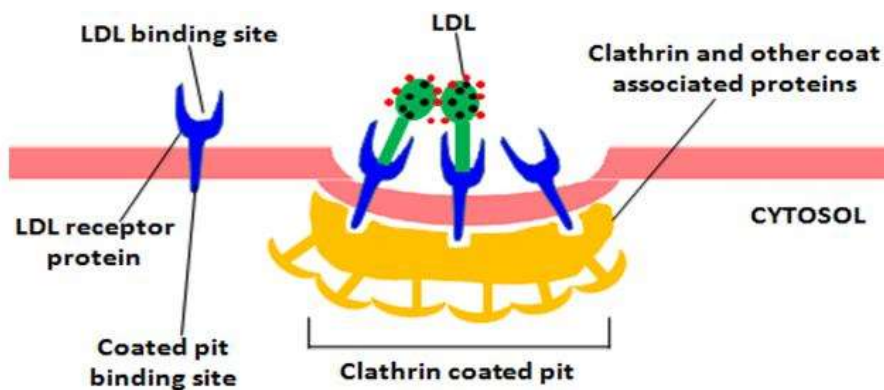
## **Лекція 4. Мембранозв'язані рецептори. Класи рецепторів поверхні клітини**

**Мембранозв'язані рецептори** – це білки безпосередньо пов'язані з клітинною мембраною. Вони можуть проходити по мембрані і можуть передавати сигнал ззовні клітини всередину. Поза клітиною ліганд (наприклад, гормон) зв'яжеться з рецептором, потім кілька хімічних подразників, включаючи стероїдні гормони та газ оксид азоту, перетинають плазматичну мембрану та зв'язують рецептори всередині клітини. Таким чином, рецептор зазнає конформаційних змін, що виявляється всередині клітини. Саме зміна форми – це і є передача сигналу ззовні усередину. Всередині клітини інші білки можуть взаємодіяти з рецептором у його новій формі і можуть вмикатися для продовження сигнального шляху.

Селективна експресія певних рецепторів та пов'язаних з ними механізмів цитоплазматичної трансдукції дозволяє диференційованим клітинам реагувати конкретно на конкретні ліганди. Члени кожної родини рецепторів поділяються на один або кілька структурно гомологічних доменів. У деяких сім'ях члени поділяються за стратегією зв'язування ліганду та передачею сигналу (рецептори семи спіралей, рецептори, пов'язані з G-білком, цитокінові рецептори тощо). Члени інших сімей поділяються за подібною структурою, що зв'язує ліганд (сімейство рецепторів фактора некрозу пухлин), або загальний метод передачі сигналу (рецептор тирозинкінази).

Мембранні рецептори є також у системі Гольджі, яка фіксує білки під час сортування та переносить їх у транспортні везикули назад до ендоплазматичного ретикулюму. Так, більша кількість холестерину транспортується по крові, пов'язаній з білком, у вигляді частинок, відомих як ліпопротеїди низької щільності або ЛПНЩ. Коли клітині потрібен холестерин для синтезу мембрани, вона створює трансмембранний рецептор

для ЛПНЩ і вставляє їх у свою плазматичну мембрану. Потрапивши в плазматичну мембрану, рецептори ЛПНЩ дифундують, поки вони не асоціюються з комірками, вкритими клатрином (рис. 13).



**Рис. 13** Зв'язування білків рецепторів ЛПНЩ з вкритими комірками у плазматичній мембрані клітини

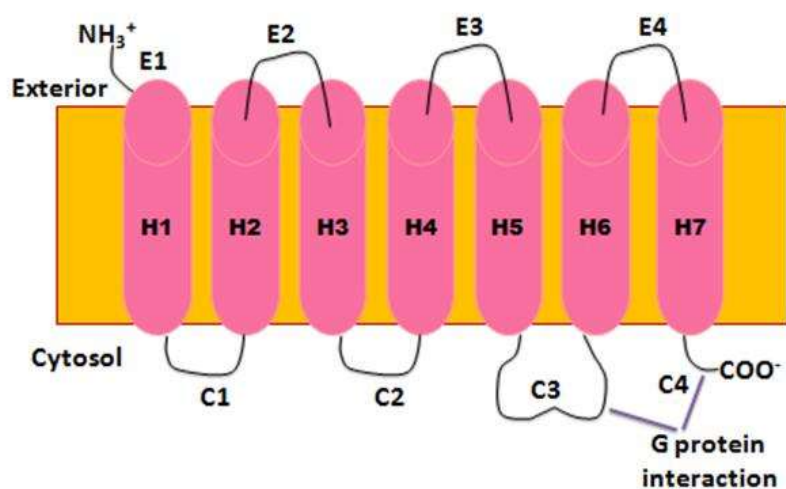
Виділяють **сім** основних класів рецепторів клітинної поверхні:

- рецептори, пов'язані з G-білком
- Цитокінові рецептори
- Рецептори тирозинкінази
- ТФР- $\beta$  рецептори ( $\beta$ -рецептори трансформованого фактора росту)
- Голчасті рецептори
- WNT-рецептори
- Мічений однопрохідний рецептор

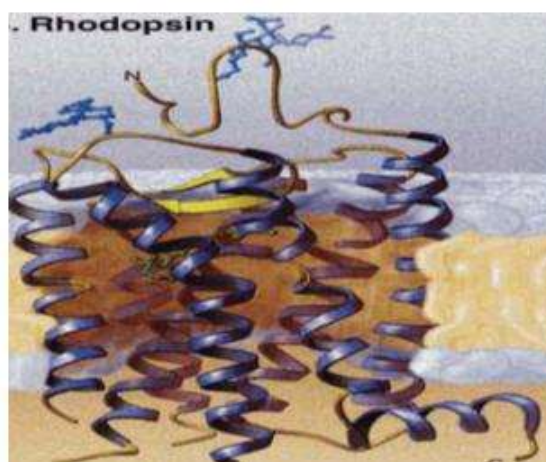
**Структура рецепторів семи спіралей.** Мембранозв'язані рецептори є членами найбільшого сімейства рецепторів плазматичної мембрани, побудованих із серпантинного розташування семи трансмембранних  $\alpha$  спіралей. G-білкові рецептори (GPCR) є прикладами семи трансмембранних  $\alpha$ -спіральних рецепторів. GPCR є у всіх еукаріотичних клітинах від дріжджів до людини. Всі рецептори, пов'язані з G-білком, містять сім областей, що охоплюють мембрану, з їх N-кінцевим сегментом на екзоплазматичній грані та своїм C-кінцевим сегментом на цитозольній поверхні плазматичної



мембрани. На рисунку 14 (а), всі рецептори цього типу мають однакову орієнтацію в мембрані і містять сім трансмембранних - спіральних областей (Н1 – Н7) - чотири позаклітинні сегменти (Е1 – Е4) та чотири цитозольних сегменти (С1–4) С4). Карбоксильно-кінцевий сегмент (С4), петлі С3 і, в деяких рецепторах, також петлі С2 беруть участь у взаємодії з сполученим тримерним G-білком. Довга петля С3 між спіралями 5 і 6 важлива для взаємодії між рецептором і його сполученим G-білком. Ця надродина семипрохідних трансмембранних рецепторних білків включає родопсин, світло-активованій білок в оці хребців (рис. 14 (б)).



**Рис. 14 (а)** Схематична модель рецепторів, пов'язаних із G-білком

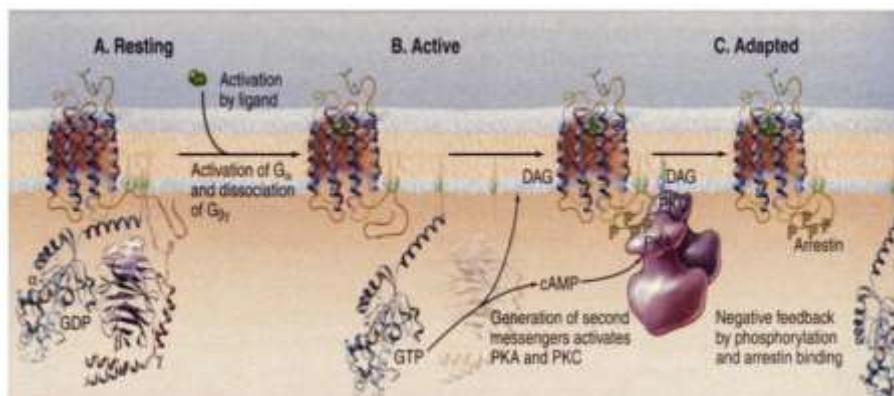


**Рис. 14 (б)** Анатомічна структура рецепторів семи спіралей бичачого родопсину (білка, що активується у хребцях очей за дії світла).

**Механізм дії рецепторів семи спіралей.** Рецепторів цієї родини використовують тримерні GTP-зв'язуючі білки для передачі сигналів ефекторним білкам всередині клітин. Геном людини кодує кілька тисяч рецепторів пов'язаних з білком. До них відносяться рецептори зорової, нюхової (запахи) та смакової систем, рецептори нейромедіаторів та більшість рецепторів гормонів, які контролюють метаболізм вуглеводів, амінокислот та жирів. GPCR по'єднані з тримерними G-білками, що передають власне сигнал. Для ссавців одні нюхові клітини використовують 500-1000 різних семи спіральних рецепторів для розрізнення молекул одоранту.

Фосфорилування С-кінцевого хвоста інактивує багато типів семи спіральних рецепторів. Дві різні системи, іноді діючи на один і той же рецептор, забезпечують негативний зворотний зв'язок. Одна дія полягає у тому, щоб вторинні месенджери, які утворюються у відповідь на активацію рецепторів, стимулювали загальні білкові кінази (включаючи цАМФ), протеїнкіназу А (ПКА) і протеїнкіназу С (ПКС), які фосфорилують активований рецептор. Фосфорилування інгібує рецептор і таким чином, дозволяючи здійснювати перехресні взаємодії між рецепторами. Друга стратегія дії включає клас білкових кіназ, специфічних для самого рецептора. Їх називають кіназами рецепторів, пов'язаних з білком. Ці кінази фосфорилують численні серини або треоніни на С-кінцевому цитоплазматичному хвості активних рецепторів. Фосфорилування сприяє зв'язуванню регуляторного білка – арестину, який інактивує рецептор, блокуючи взаємодію рецептора з тримерними G-білками. Зв'язування арестину з деякими семи спіральними рецепторами сприяє їх виведенню з плазматичної мембрани ендоцитозом. Рецептори, пов'язані з білком, передають сигнали від позаклітинних гормонів до асоційованих білків ефектора. У стані спокою, коли жоден ліганд не пов'язаний з рецептором, субодиниця  $G\alpha$  пов'язана з GDP і комплексується з  $G\beta\gamma$ . Як показано на рисунку 14, зв'язування ліганду зміщує рівновагу від конформації спокою до активної конформації. Активний рецептор сприяє дисоціації GDP від  $\alpha$ -

субодиниці множинних тримерних G-білків, дозволяючи GTP зв'язуватися. Це дисоціює  $G\alpha$  від  $G\beta\gamma$ , кожен з яких активує ефектори нижче за рівнем, які утворюють вторинний месенджер цисАМФ і діацилгліцерин (ДАГ), як показано на рисунку 15. цАМФ і ДАГ активує PKA і PKC, які фосфорилують активні рецептори на їх С-кінці. Це зв'язує арестин, переводячи рецептор в неактивний адаптований стан.



**Рис. 15** Активація та адаптація семи спіральних рецепторів: А – відключений; Б – активний; С – адаптований.

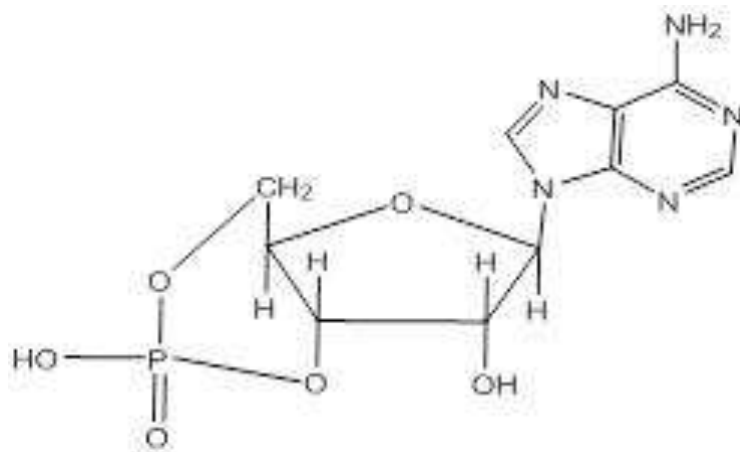
Епінефрин зв'язується з кількома різними рецепторами G-білка. Всі рецептори адреналіну є рецепторами, пов'язаними з G-білком, різні типи поєднані з різними G білками. Ці рецептори представляють особливий інтерес, оскільки вони запускають різні внутрішньоклітинні шляхи передачі сигналу. Обидва підтипи  $\beta$ -адренергічних рецепторів, що називаються  $\beta 1$  і  $\beta 2$ , з'єднані зі стимулюючим G-білком ( $G_s$ ), який активує пов'язаний з мембраною фермент аденілілциклаза. Після активації аденілілциклаза каталізує синтез вторинного месенджера цАМФ. Це зв'язування адреналіну з  $\beta$ -адренергічними рецепторами і викликає підвищення рівня цАМФ.

Варто зазначити, що рецептор тирозинкіназа – це перший рецептор, який було виявлено, а G-білки були виявлені Альфредом Гілманом та Мартіном Родбеллом при дослідженні стимуляції клітин адреналіном. Водночас, шкіра людини містить приблизно 640 000 сенсорних рецепторів, нерівномірно розсіяних по поверхні тіла.

## Лекція 5. Вторинні месенджери. Циклічна аденозин монофосфат (цАМФ)

Як було зазначено раніше, вторинні месенджери – це молекули, які передають сигнали, що надходять на рецептори клітинної поверхні, такі як гормони, фактори росту тощо, на відповідні молекули-мішені в цитозолі та/або ядрі. При цьому, вторинні месенджери служать для посилення сили сигналу. Зв'язування ліганду з одним рецептором на клітинній поверхні може сприяти значним змінам у біохімічній діяльності всередині клітини.

Одним з основних представників є **цАМФ**. цАМФ – важливий вторинний месенджер, що бере участь у безлічі клітинних ефектів та біологічних ролей, регулюючи різні метаболічні процеси та опосередковуючи вплив багатьох гормонів, які зв'язуються зі специфічним рецептором на клітинній мембрані клітин-мішеней, включаючи катехоламіни, АКТГ та вазопресин. Він також відіграє важливу роль у транскрипції деяких генів. У 1971 р. Еарл Сазерленд отримав Нобелівську премію з фізіології чи медицини за свої відкриття щодо механізмів дії гормонів, особливо епінефрину, за допомогою інших месенджерів, таких як цАМФ. цАМФ представлений хімічною формулою  $C_{10}H_{12}N_5O_6P$ , а молекулярна маса – 329,206 (рис. 16).



**Рис. 16** Циклічний аденозинмонофосфат або 3'-5'-циклічний аденозинмонофосфат

[цАМФ складається – аденінова основа + рибоза + 3', 5'-циклічний фосфат]

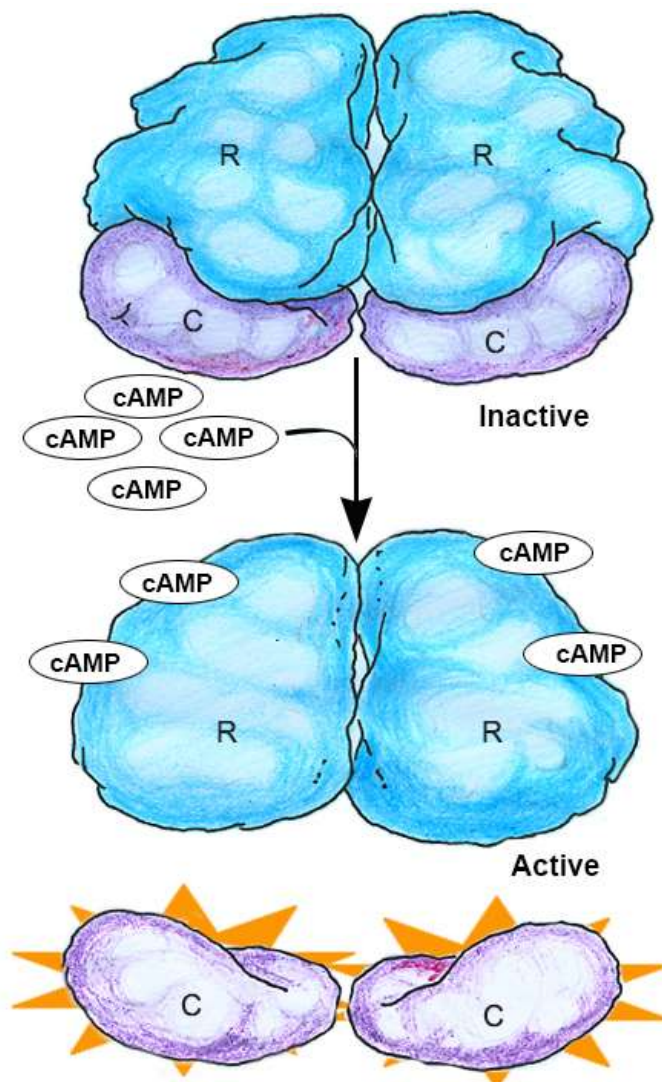
Аденозин в цАМФ – це нуклеозид, що складається з основи пентозного цукру D-рибози та аденіну. Циклічний АМФ містить ефірний зв'язок між фосфатними та рибозними одиницями. Приклад гормонів, які досягають свого ефекту через дію цАМФ як вторинного месенджера: адреналін, глюкагон, лютеїнізуючий гормон (ЛГ).

Зв'язування гормону з його рецептором активує G-білок, який, в свою чергу, активує аденілілциклазу. Отримане в результаті зростання рівня цАМФ викликає відповідну реакцію в клітині будь-яким способом (або обома): зміною молекулярної активності в цитозолі, часто використовують протеїнкіназу А (ПКА) – залежну від цАМФ протеїнкіназу, яка фосфорилує цільові білки; включивши новий шлях транскрипції генів.

### **Функції цАМФ**

**1.** цАМФ як вторинний месенджер, який використовується для внутрішньоклітинної передачі сигналу. Він бере участь у передачі сигналу поза клітиною всередину через процес зв'язування таких рецепторів, як глюкагон та епінефрин або інші сигнальні молекули, до мембранного рецептора клітин. Він бере участь в активації білкових кіназ і регулює вплив адреналіну та глюкагону. цАМФ також зв'язується і регулює функцію іонних каналів, таких як HCN-канали та кілька інших циклічних нуклеотид-зв'язуючих білків, таких як Ерас1.

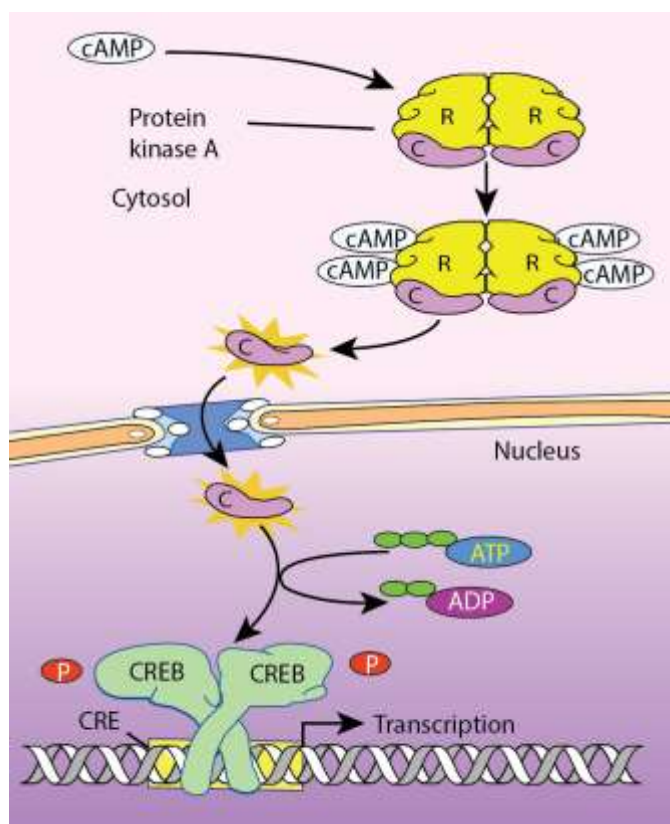
**2.** Регуляція протеїнкінази А цАМФ (Фосфорилування білкової кінази) (рис. 17). Найважливішою функцією цАМФ у клітині тварин є регуляція активності протеїнкінази А. Протеїнкіназа А знаходиться насамперед у неактивній формі в клітині, в якій вона складається з двох регуляторних (R) та двох каталітичних (C) субодиниць разом. Зв'язування цАМФ з регуляторними субодиницями викликає конформаційні зміни, що призводять до дисоціації каталітичної субодиниці, яка викликає утворення ферментативно-активної форми протеїнкінази А, і тепер здатна фосфорилувати залишки серину і тирозину на своїх цільових білках.



**Рис 17 Регуляція протеїн кінази А**

3. Регулювання циклічної експресії гена АМФ через протеїнкіназу А: У багатьох клітинах тварин збільшення цАМФ активує транскрипцію специфічних генів-мішеней, які містять регуляторну послідовність, що називається елементом відповіді на цАМФ, або CRE. У цьому випадку сигнал передається від цитоплазми до ядра каталітичною субодиницею протеїнкінази А, яка здатна потрапити в ядро після звільнення від регуляторної субодиниці. У середині ядра протеїнкіназа А фосфорилує фактор транскрипції, який називається CREB (протеїн, що включає CRE-b), що призводить до активації генів, індукованих цАМФ. Таким чином, такий тип регуляції експресії генів цАМФ відіграє значну роль у контролі

проліферації, виживання та диференціації широкого спектру тваринних клітин (рис. 18).



**Рис. 18** цАМФ-контроль експресії генів

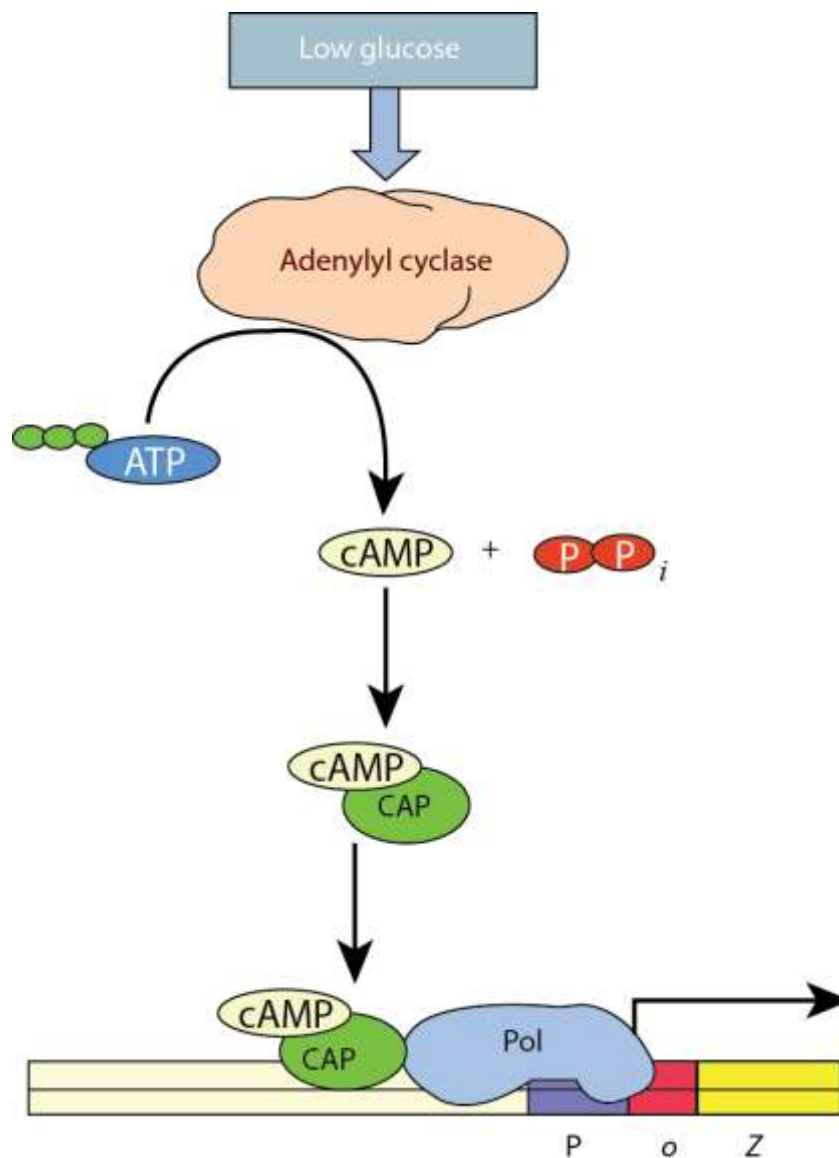
**4.** В еукаріотичних клітинах цАМФ та пов'язані з цим кінази відіграють ключову роль у численних біохімічних процесах, включаючи регуляцію обміну глікогену, цукру та ліпідів. Існує кілька незначних функцій цАМФ, таких як активація кальцієвих каналів, забезпечуючи альтернативний шлях, за допомогою якого гормон, що вивільняє гормон росту, викликає його вивільнення. Домен GEF (коефіцієнт обміну нуклеотидів гуаніну) зазвичай охоплюється N-кінцевою областю, що містить цАМФ-зв'язуючий домен. Коли цАМФ зв'язується, домен роз'єднує і випускає активний домен GEF, що дозволяє Ерас активувати невеликі Ras-подібні білки GТРази, такі як Rap1.

## Лекція 6. цАМФ – функції та предметна роль

5. У бактерій цАМФ відіграє вирішальну роль, і її рівень змінюється залежно від середовища, яке використовується для росту. У *E.coli* цАМФ бере участь у позитивній регуляції *lac*-оперону. цАМФ синтезується з АТФ-аденілілциклазою, в результаті підвищення рівня цАМФ виникає зниження концентрації глюкози, що є джерелом вуглецю. цАМФ потім зв'язується з регуляторним білком транскрипції, протеїном рецептора цАМФ (CRP), який також називається білком катаболічного активатора (CAP). Після зв'язування цАМФ з CAP посилюється зв'язуюча здатність CAP до її ділянки зв'язування (CAP-зв'язуючий сайт) на цільовій ДНК-послідовності, яка в *lac*-опероні розташовується на 60 нуклеотидів вище за стартовий сайт транскрипції, полегшуючи зв'язування РНК-полімерази з сусіднім промотором початку транскрипції *lac*-оперона, збільшуючи її швидкість. При високій концентрації глюкози концентрація цАМФ знижується, а CRP відходить від *lac*-оперону (рис. 19).

6. У деяких видів шламкових форм, таких як *Dictyostelium discoideum*, хемотаксичний рух клітин організований періодичними хвилями цАМФ, які поширюються через клітину. Хвилі є результатом регульованої продукції та секреції позаклітинного цАМФ та спонтанного біологічного осцилятора, який ініціює хвилі у центрах територій.



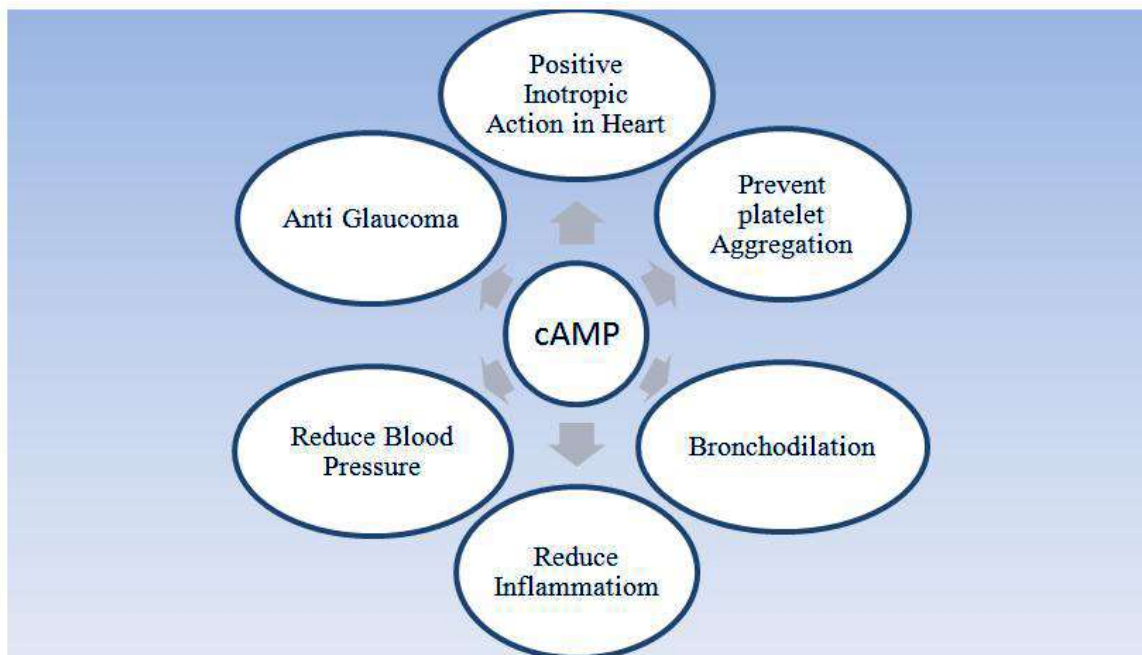


**Рис. 19** Позитивна регуляція lac-оперону шляхом репресії глюкози у поєднанні з підвищенням рівня цАМФ.

7. цАМФ / ПКА відіграє ключову роль у біогенезі мітохондріального відділення. Мітохондрії беруть участь у кількох життєво важливих клітинних функціях. Наприклад, вони беруть участь у виробництві АТФ через процес окислювального фосфорилування, виробництво АТФ через мітохондрії в 15 разів більше, ніж лише гліколіз. Вони також беруть центральну участь у метаболічній регуляції та допомагають різноманітним подіям клітинної сигналізації. Тому мітохондрії мають важливе значення для підтримки, адаптації та виживання еукаріотичних клітин. цАМФ / ПКА сигналізація

врівноважує дихальну активність з мітохондрій-залежним апоптозом через регуляцію транскрипції.

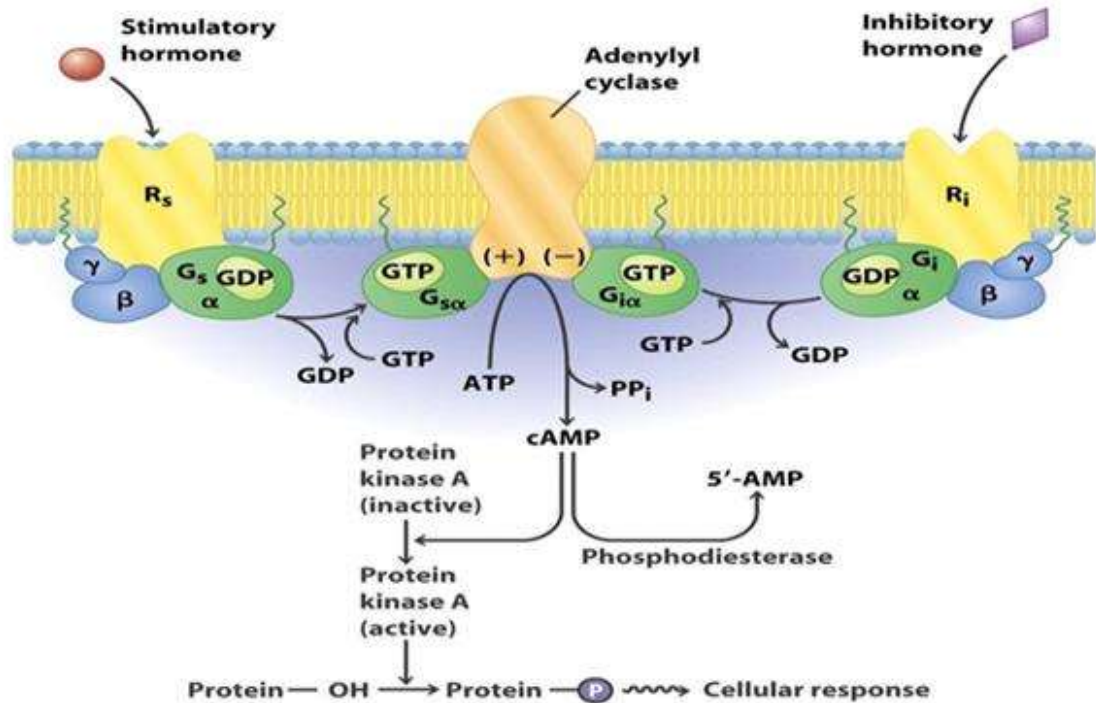
Існує багато можливостей застосування цАМФ для профілактики певних розладів у людини (рис. 20).



**Рис. 20** Активність цАМФ в організмі людини

**Механізм регулювання цАМФ.** Коли стимулюючий гормон зв'язується з рецептором, пов'язаним з білком, в рецепторі відбуваються конформаційні зміни, завдяки яким його неекспонуюча каталітична частина піддається впливу, завдяки якій він може взаємодіяти та активувати G-білок при обміні GDP на GTP в  $G\alpha$  підрозділі. Тепер субодиниця  $G\alpha$  переходить і активує пов'язану з мембраною аденілілциклазу, що полегшує перетворення АТФ в цАМФ. Цей цАМФ зараз готовий до активації протеїнкінази А, яка бере участь у фосфорилуванні кількох білків, які беруть участь у подальших клітинних реакціях. У той же час вироблення цАМФ аденілілциклазою, рівень цАМФ контролюється іншим ферментом, який називається цАМФ фосфодіестеразою, який перетворює цАМФ у 5'-АМФ. З іншого боку, коли інгібіторний гормон зв'язується з рецептором, пов'язаним з G-білком, він

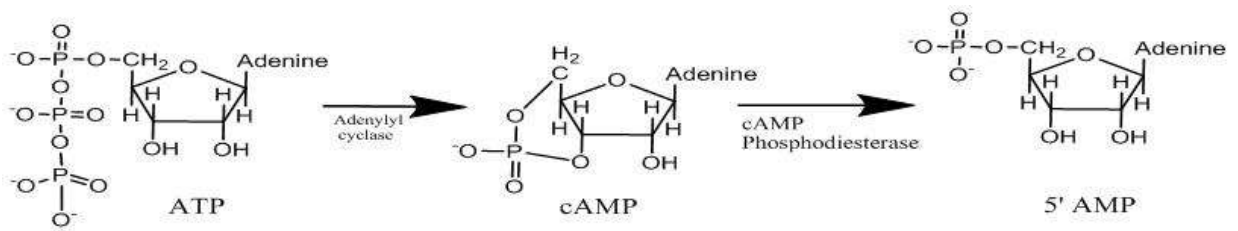
протидіє ефекту, як показано на рисунку 21. У цьому процесі аденілілциклаза інгібується, оскільки GPCR активує G-білок, який містить інгібіторну альфа-субодиницю, яка зв'язується з ферментом і інгібує утворення цАМФ.



**Рис 21** Синтез та регуляція цАМФ

### Синтез та деградація цАМФ.

цАМФ – циклічний нуклеотид, який виконує функції внутрішньоклітинного, а в деяких випадках і позаклітинного вторинного месенджера. Він отримується з аденозинтрифосфату (АТФ) аденілілциклазою, розташованої на внутрішній стороні плазматичної мембрани, і використовується для внутрішньоклітинної передачі сигналу у багатьох організмах, передаючи цАМФ-залежний шлях. Підвищений рівень цАМФ регулюється шляхом деградації, який контролюється ферментом цАМФ-фосфодієстеразою (рис. 22).



**Рис. 22** Синтез і деградація цАМФ

Слід розуміти, що цАМФ синтезується з АТФ під дією ферменту аденілілциклази, а розпад цАМФ в АМФ каталізується ферментом фосфодіестеразою. цАМФ та пов'язані з цим кінази функціонують у кількох біохімічних процесах, включаючи регуляцію обміну глікогену, цукру та ліпідів.

## Лекція 7. Циклічний гуанозинмонофосфат – функціональна роль

Циклічний гуанозинмонофосфат або цГМФ – це циклічний нуклеотид, отриманий з гуанозин трифосфату (ГТФ). цГМФ – це багатофункціональна молекула вторинного месенджера, подібна за дією до цАМФ, але, як правило, проявляє протилежні функціональні ефекти у клітині. Він має молекулярну формулу  $C_{10}H_{12}N_5O_7P$  і має молекулярну масу 345,2 г / моль. Складається цГМФ з гуаніна, цукру рибози та циклічного фосфату між 3' і 5' положеннями рибози (рис. 23), а синтезується він з нуклеотидного ГТФ за дії ферменту гуаніліциклічного циклази.

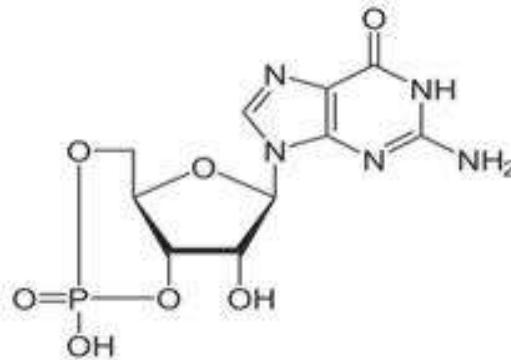


Рис. 23 Гуанозин 3', 5'-циклічний фосфат

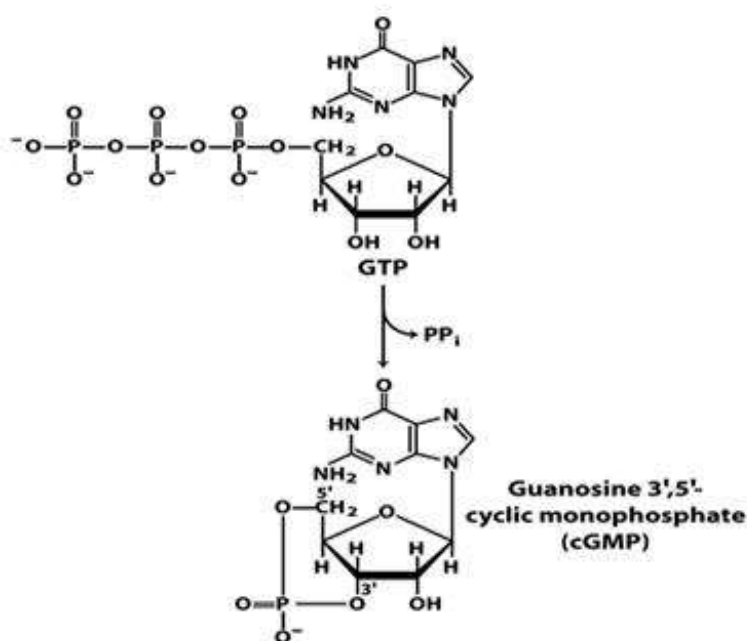
### Синтез цГМФ

ЦГМФ – важлива сигнальна молекула, яка транспортує різні повідомлення у безліч тканин. цГМФ генерується двома шляхами, що відрізняються за характером власне гуаніліциклази (ГЦ), що опосередковує його перетворення з гуанозинтрифосфату (ГТФ) (рис. 24). Гуанілациклаза зазвичай знаходиться в клітині у двох формах – розчинна та мембранно-зв'язана форма. Вони продукуються двома шляхами:

1. **Розчинний шлях**, де цГМФ генерується через активовану оксидом азоту (NO) гуаніліциклазу (ГЦ), яка є цитозольним білком із щільно пов'язаною групою гема. NO є недостатньо неполярним, щоб легко

перетинати плазматичну мембрану клітини-мішені без будь-якого носія і зв'язується з гемовою групою гуанілілциклази та активує продукцію цГМФ.

2. У зв'язаному мембраною шляху ГЦ є трансмембранним білком із позаклітинним лігандом, що зв'язує домен, що проявляє деяку гомологію з системою активованої NO. Ліганди для підмножини мембранних ГЦ є членами сімейства гормонів натрійуретичний пептид (НП), включаючи гормон НП передсердь, В-тип НП гормону В і С-тип НП гормону.



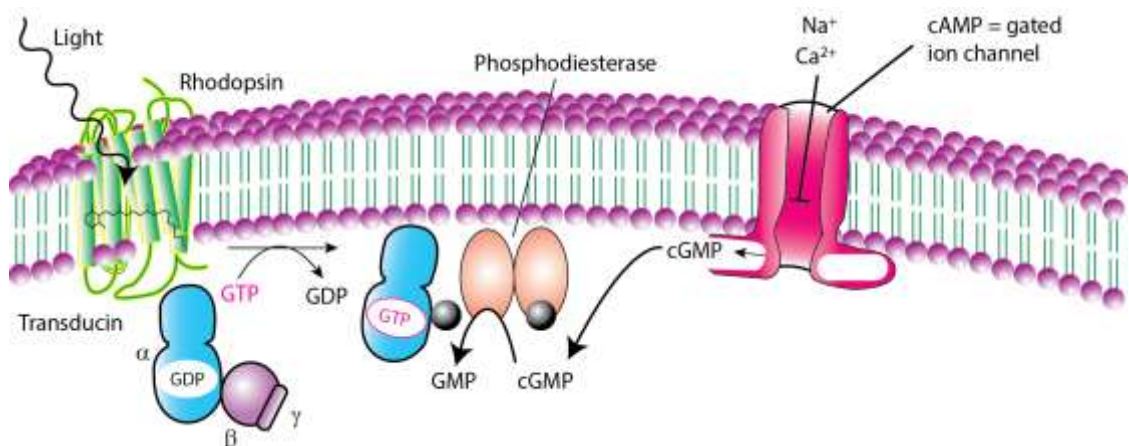
**Рис. 24** Перетворення ГТФ у цГМФ

### Функції цГМФ:

– цГМФ – важлива молекула клітини, яка бере участь у різних процесах у клітинній системі. Коли стимуляція гуанілілциклази призводить до підвищеного рівня цГМФ, то вона опосередковує біологічні реакції, такі як розширення судин, що збільшує кровотік.

– Дія цГМФ регулярно полегшується за рахунок стимуляції залежних від цГМФ протеїнкіназ, хоча власне цГМФ є загальним регулятором провідності іонних каналів, глікогенолізу, клітинного апоптозу та фосфодієстераз.

– Ще одна добре відома роль цГМФ – в хребцях очей, де вона виступає вторинним месенджером, відповідальним за перетворення візуальних сигналів, які сприймаються як світло у нервові імпульси. Фоторецептор у стрижневих клітинах сітківки є рецептором, пов'язаним із G-білком, який називається родопсином. Коли світло потрапляє на позаклітинну сторону родопсину, то в ньому відбуваються деякі конформаційні зміни, завдяки яким його обмежений хромофорний 11-цис-ретинол сітківки перетворюється на форму транс-ретинола, в кінцевому підсумку не виявлена каталітична цитоплазматична сторона родопсина, взаємодіє з трансдуцином G-білка і активізує їх шляхом заміни GDP на GTP на його  $\alpha$ -субодиниці. Потім активована  $G\alpha$  активує цГМФ фосфодіестеразу-6, яка перетворює весь цГМФ в 5 ГМФ. Завдяки цьому рівень цГМФ поступово знижується, залежний від цГМФ іонний канал натрію закривається. Цей канал також є місцем поступання іонів кальцію, тому рівень  $Ca^{++}$  також знижується. Ця критична ситуація, що створюється в клітині, називається **гіперполяризацією**. Але після зниження рівня  $Ca^{++}$  гуанілілциклаза активується і знову починається синтез цГМФ. Таким чином, можемо узагальнити все явище: зміна рівня цГМФ в клітинах ретинола сітківки переводиться на нервовий імпульс шляхом прямого впливу цГМФ на іонні канали в плазматичній мембрані (рис. 25).



**Рис. 25** Передача зорового сигналу – індукована світлом активація родопсину призводить до гідролізу цГМФ, що, в свою чергу, призводить до замикання іонних каналів та ініціації потенціалу дії

## Лекція 8. цГМФ – функціональні особливості

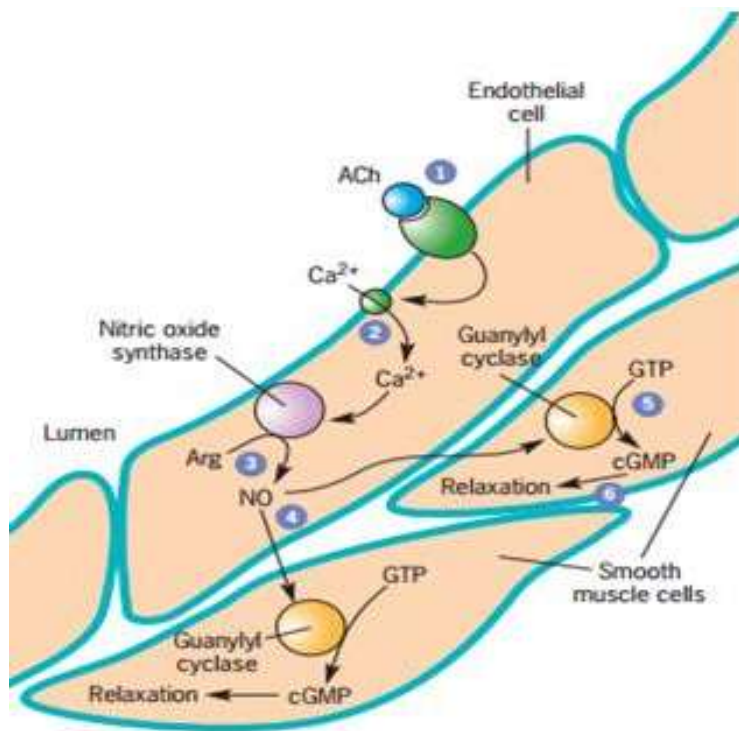
– У нирках, пов'язана з мембраною, гуанілілциклаза активується гормоном передсердного натрійуретичного фактора (АНФ), який вивільняється клітинами в передсерді серця, коли воно розтягується за рахунок збільшення об'єму крові. АНФ потрапляє в нирки з кров'ю з серця і активує мембрану, пов'язану з гуанілілциклазою в клітинах збиральних проток. Внаслідок цього підвищення рівня цГМФ у клітинах викликає посилення ниркової екскреції  $\text{Na}^+$  та води, зумовлене зміною осмотичного тиску. Втрата води викликає зменшення об'єму крові, що протидіє виробленню АНФ. Судинна гладка мускулатура також містить рецептор АНФ-гуанілілциклазу, які вивільняються, і зв'язуючись з рецепторами, АНФ викликає розслаблення судин, що збільшує приплив крові зі зниженням артеріального тиску (рис. 26).

– цГМФ, як і цАМФ синтезуються шляхом отримання пахучого елемента через нюхові рецептори. цГМФ утворюється повільно і має триваліший термін служби, ніж цАМФ. цГМФ в «нюховій тканині» синтезується як мембранною гуанілілциклазою (мГЦ), так і розчинною гуанілілциклазою (рГЦ). Синтез цГМФ в «нюховій тканині» відбувається за рахунок активації рГЦ оксидом азоту, нейромедіатором. цГМФ також потребує підвищення внутрішньоклітинних рівнів цАМФ, а перехресний зв'язок між двома вторинними месенджерами, може бути обумовлений підвищенням рівня внутрішньоклітинного кальцію.

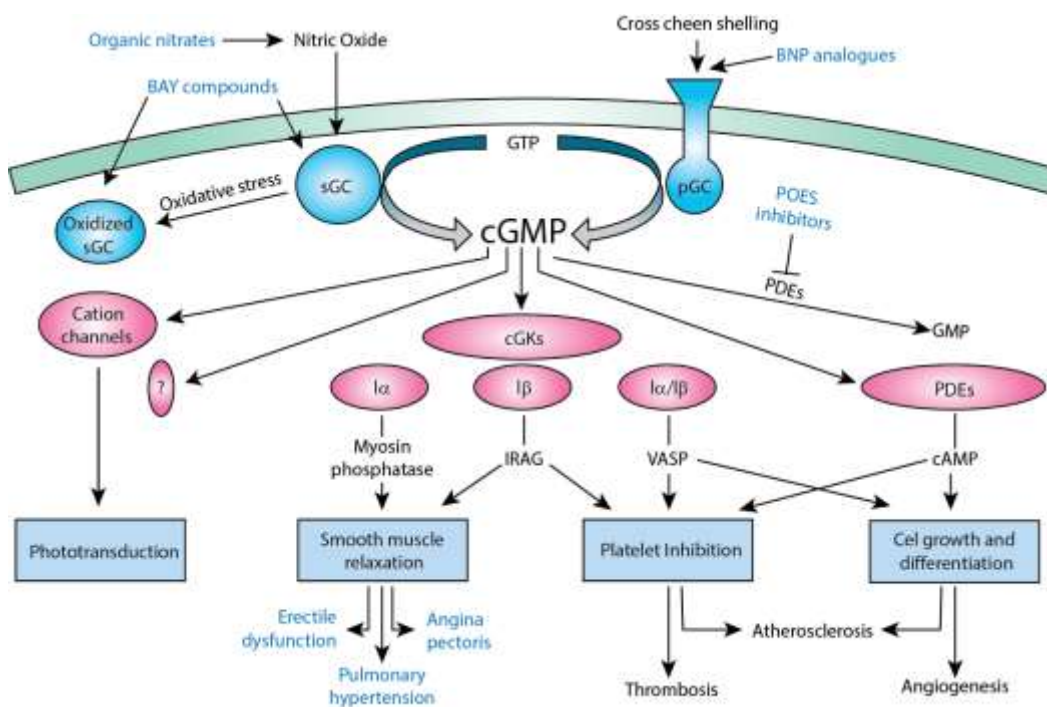
– Розширення судин: NO не є позаклітинним газоподібним вторинним месенджером. NO є нетиповим, оскільки він виступає і як позаклітинний месенджер, опосередковуючи міжклітинну комунікацію, і як вторинний месенджер, діючи всередині клітини, у якій він генерується. NO синтезується L-аргініном, який каталізується синтезами оксиду азоту. NO, що утворюється в ендотеліальній клітині, дифундує по плазматичній мембрані та в сусідні



клітини гладкої мускулатури, де він зв'язує та стимулює гуанілциклазу, яка синтезує цГМФ (рис. 27).

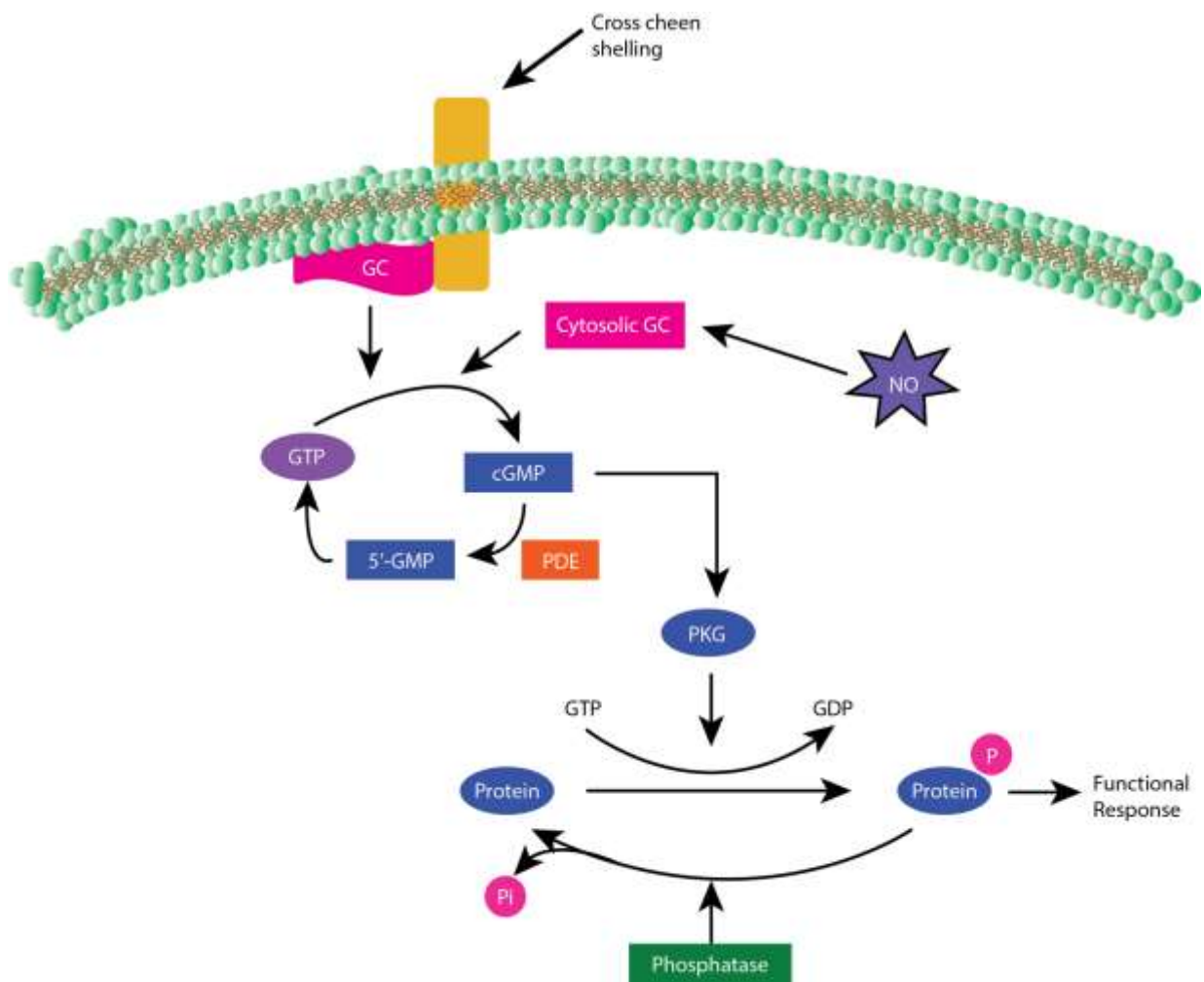


**Рис. 26** Шлях трансдукції сигналу призводить до розширення судини через NO і цГМФ



**Рис. 27** Шляхи генерації цГМФ та певні області її впливу

Власне механізм перетворення ГТФ в цГМФ гуанілациклазою показаний нижче (рис. 28):



**Рис. 28** Регуляторний шлях цГМФ

Таким чином, цГМФ синтезується з нуклеотидного ГТФ за допомогою ферменту гуанілциклази і служить вторинним месенджером для передсердного натрійуретичного пептиду (АНП), оксиду азоту (NO), реакції стрижнів сітківки на світло. Деякі ефекти цГМФ опосередковуються через протеїнкіназу G (ПКГ), залежну від цГМФ протеїнкіназу, яка безпосередньо фосфорилує цільові білки в клітині.

## Лекція 9. Канал потоку іонів кальцію

Іони кальцію також є важливими внутрішньоклітинними месенджерами. Насправді, іони кальцію – це, мабуть, найширше використовувані внутрішньоклітинні месенджери. Кальцій ( $\text{Ca}^{2+}$ ) відіграє важливу роль у фізіології та біохімії організмів і клітини в цілому. Він приймає участь у загальному механізмі сигналізації, оскільки потрапляючи в цитоплазму, він проявляє алостеричну регуляторну дію на багато ферментів і білків. Кальцій є вторинним месенджером, що утворюється шляхом непрямих шляхів трансдукції сигналів, таких як рецептори, пов'язані з G-білком. Іони кальцію впливають майже на кожен аспект клітинного життя. Принципи сигналізації  $\text{Ca}^{2+}$ : від змін конформацій білка, контрольованих  $\text{Ca}^{2+}$ , до механізмів, що контролюють рівень  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі та органелах. Сильно локалізований характер пояснює принципи передачі кльцієвого сигналу та його специфічну роль у збудливості, екзоцитозі, моториці, апоптозі та транскрипції. Зазвичай цитозольні іони кальцію утримуються дуже низько ( $10^{-7}$  М) під впливом насосів  $\text{Ca}^{2+}$  в ЕР, мітохондріях і плазматичній мембрані. Гормональні, нейронні або інші подразники викликають або позитивний потік  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину через специфічні  $\text{Ca}^{2+}$  канали в плазматичній мембрані, або вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕР або мітохондрій, в будь-якому випадку підвищення цитозольної і запускання клітинної відповіді. Це явище називається **іонним потоком кальцію**.

Роль кальцію в клітинній сигналізації. З-поміж основної функції, підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі викликає багато процесів:

- Скорочення м'язів
- Екзоцитоз: а) вивільнення нейротрансмітерів у синапсах (важливо для довготривалих синаптичних змін, що призводять до довгострокової потенціації (ЛТП) та тривалої депресії (ЛТД); б) секреція гормону інсуліну
- Активація Т-клітин і В-клітин, коли вони зв'язують антиген зі своїми антигенними рецепторами (TCR та BCRs відповідно)

- Адгезія клітин до позаклітинного матриксу (ЕСМ)
- Апоптоз
- Різноманітні біохімічні зміни, опосередковані ПКС

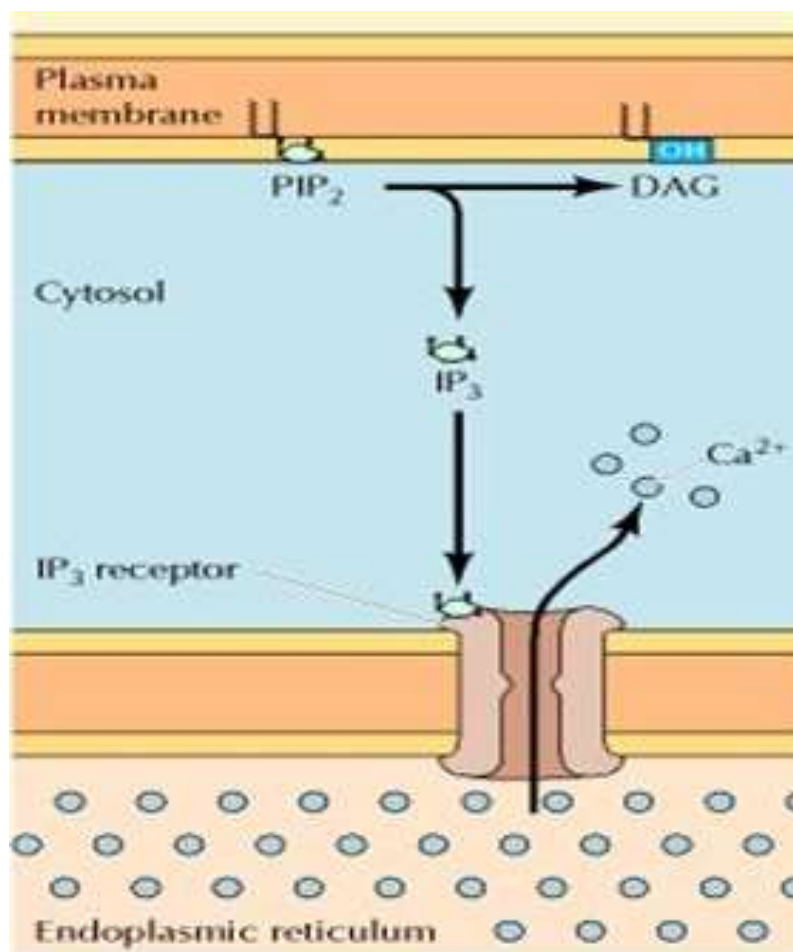
Концентрація іонів кальцію в конкретному клітинному компартменті забезпечується регульованою активністю  $\text{Ca}^{2+}$  насосів,  $\text{Ca}^{2+}$  обмінників та / або  $\text{Ca}^{2+}$  іонних каналів, розташованих всередині мембран, які оточують кожен компартмент.

Існує два основних типи сигнальних рецепторів --рецептор, пов'язаний з G-білком (GPCR), і рецепторний білок-тирозинкінази (RTK). Один з найважливіших шляхів внутрішньоклітинної сигналізації заснований на використанні вторинного месенджера, отриманого з мембранних фосфоліпідів фосфатиділіносітолу 4, 5-бісфосфату (PIP2). PIP2 – другорядний компонент плазматичної мембрани, локалізований на внутрішній поверхні фосфоліпідного шару. Гідроліз PIP2 фосфоліпазою C- $\beta$  стимулюється різноманітними гормонами та нейромедіаторами. Після гідролізу PIP2 розщеплюється на два компоненти – діацилгліцерин (ДАГ) та інозит 1, 4,5-трифосфат (IP3), обидва є також вторинними месенджерами клітини. Діацилгліцерин та IP3 стимулюють різні сигнальні шляхи нижньоспрямованого потоку (мобілізація протеїнкінази C та  $\text{Ca}^{2+}$  відповідно), тому гідроліз PIP2 запускає двосегментний каскад внутрішньоклітинної сигналізації (рис. 29).

Перший вторинний месенджер діацилгліцерин, що утворюється при гідролізі PIP2, залишається пов'язаним з плазматичною мембраною і активує білково серин / треонін кінази, що належать до сімейства протеїнкіназ C, багато з яких відіграють важливу роль у контролі росту клітин та їх диференціації.

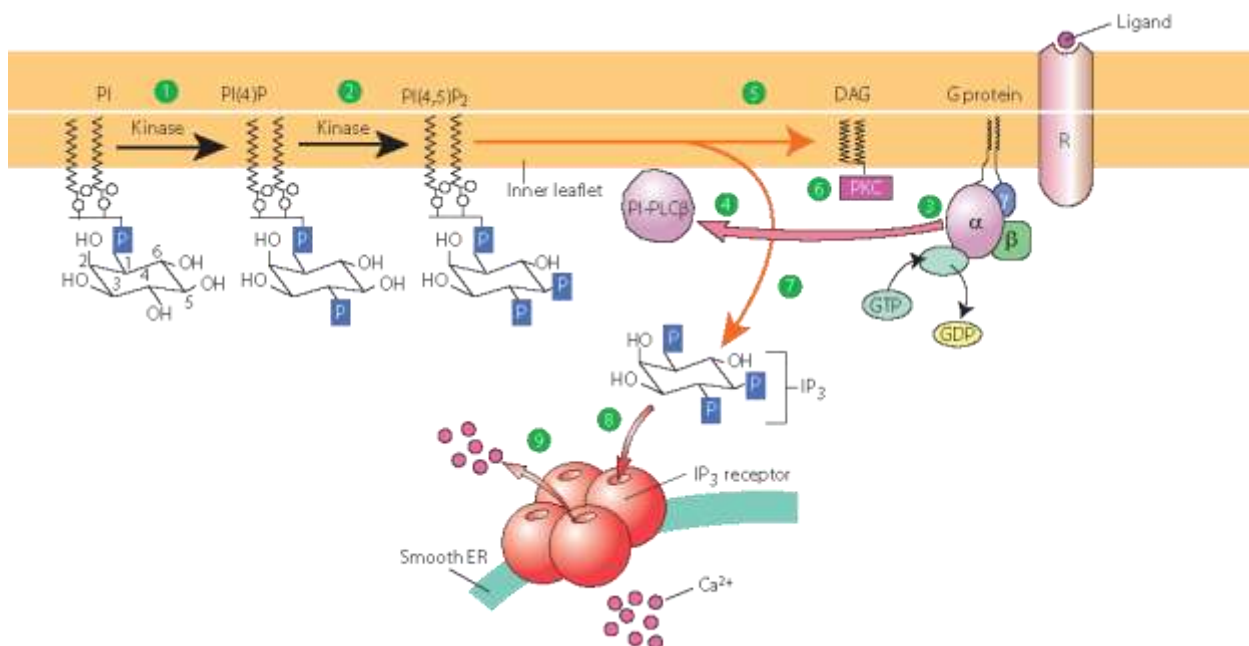
Інший вторинний месенджер, що утворюється при розщепленні PIP2, IP3 – це невелика полярна молекула, яка виділяється в цитозоль, де він

функціонує для сигналізації вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних сховищ.



**Рис. 29** Мобілізація  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою IP<sub>3</sub>

Водночас, інший важливий шлях, в якому позаклітинні месенджери, які так передають сигнал можуть викликати подібну реакцію, як і в сигнальному шляху GPCR. Основна відмінність полягає в тому, що кальцієві канали активують членів підсмейства фосфоліпази C- $\gamma$ , які мають домен SH2, що дозволяє їм зв'язуватися з активованою фосфорильованою формою (рис. 30).



**Рис. 30** Порівняльний шлях GPCR та RTK для вивільнення кальцію з ендоплазматичного ретикулуму

Існують численні інші ізоформи PLC, так, PLC- $\delta$  активується іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , а PLC- $\epsilon$  активується Ras-GTP. Усі ізоформи PLC моделюють однакову реакцію, продукуючи IP<sub>3</sub> і зв'язуючи безліч рецепторів клітинної поверхні до збільшення рівня цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$ . Проте, існує ще один головний шлях, що призводить до підвищення цитозольного  $[\text{Ca}^{2+}]$ , який бере участь у синаптичній передачі. У цьому випадку нервовий імпульс призводить до деполяризації плазматичної мембрани, що запускає відкриття напружених кальцієвих каналів у плазматичній мембрані, дозволяючи припливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  із позаклітинного середовища.

## Лекція 10. Властивості та функціональна роль $\text{Ca}^{2+}$

Виділяють 2 основні властивості, що дозволяють іону  $\text{Ca}^{2+}$  ефективно працювати як сигнальний механізм:

– Рівень  $\text{Ca}^{2+}$  всередині клітини легко виявити. Це пояснюється тим, що рівні  $\text{Ca}^{2+}$  сильно регулюються транспортними системами, які витісняють  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини. Рівень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі становить приблизно 100 нМ, що на кілька порядків нижче, ніж поза клітиною внаслідок насосів  $\text{Ca}^{2+}$ , які активно експортують  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини.  $\text{Ca}^{2+}$  закачується не тільки через плазматичну мембрану, але й в ендоплазматичний ретикулум, який, служить внутрішньоклітинним сховищем  $\text{Ca}^{2+}$ . IP3 діє на вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума, зв'язуючись з рецепторами, які зв'язуються каналами  $\text{Ca}^{2+}$ . В результаті рівень цитозольної  $\text{Ca}^{2+}$  збільшується приблизно до 1 мкМ, що впливає на діяльність різних цільових білків, включаючи протеїнкінази та фосфатази.

–  $\text{Ca}^{2+}$  може легко зв'язуватися з білками і викликати конформаційні зміни.  $\text{Ca}^{2+}$  притягується до негативно заряджених атомів кисню в бічних ланцюгах глутамату та аспарагінів, і незарядженого кисню як у бічних ланцюгах, так і в головних ланцюгах глютаміну та аспарагіну.  $\text{Ca}^{2+}$  легко здатний викликати значні конформаційні зміни за рахунок того, що він може утворювати ліганд до восьми атомів кисню. Це може призвести до зшивання амінокислот у білку, який не існував до введення  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Функції $\text{Ca}^{2+}$ у клітині:

1. Функція білка регулюється формою і зарядом. Зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  запускає зміни форми білка і заряду. Аналогічно, фосфорилування надає негативний заряд, змінюючи білкові конформації та їх взаємодії. Білкові кінази, що містять ~ 2% еукаріотичних геномів, видаляють фосфат з АТФ і ковалентно приєднують його до вільних гідроксильних груп залишків серину, треоніну або тирозину. Здатність іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та фосфатів змінювати локальні

електростатичні поля та білкові конформації є двома універсальними інструментами передачі сигналу.

2.  $\text{Ca}^{2+}$  проявляє і зовсім неочікувану функцію: вона транспортує інформацію, необхідну для скорочення серця.

3. Зміни внутрішньоклітинних  $[\text{Ca}^{2+}]$  виявляються за допомогою зв'язуючих  $\text{Ca}^{2+}$  білків, які регулюють різні  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ферменти.

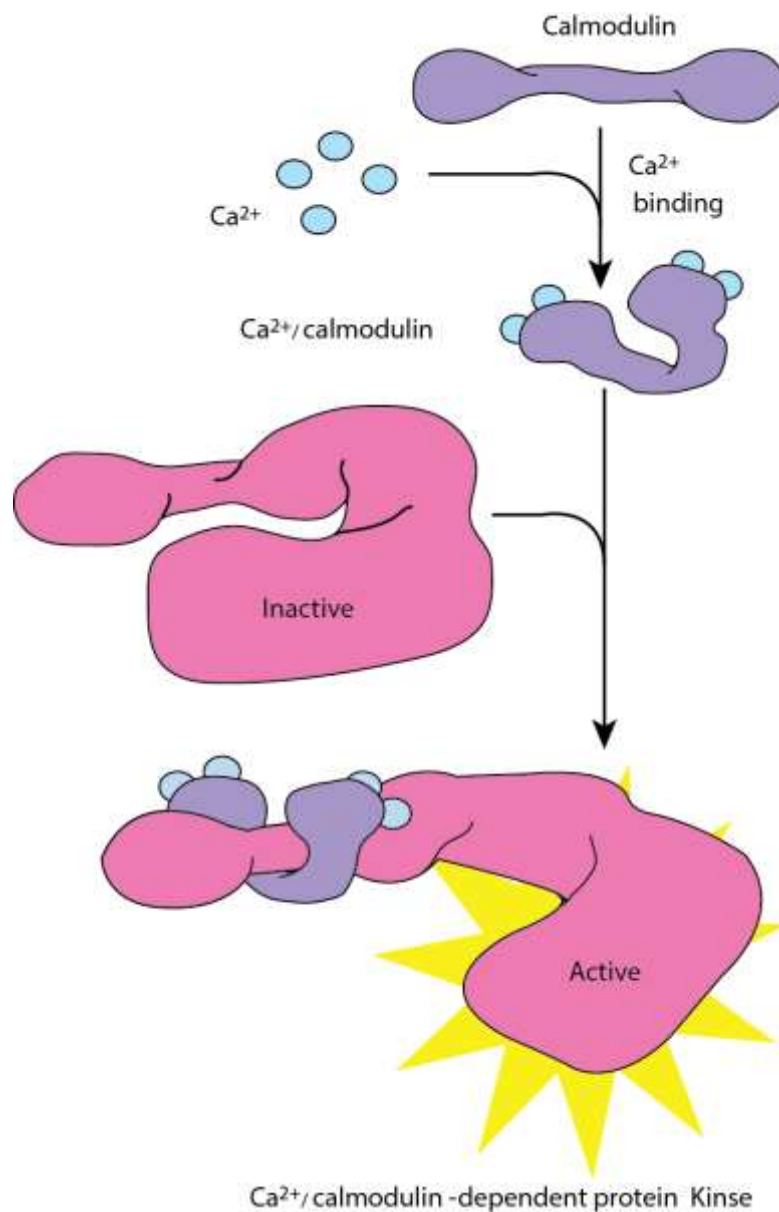
4. Кальмодулін (CaM) (Mr 17 000) – кислий білок з чотирма сайтами зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з високою афінністю. Коли внутрішньоклітинний  $[\text{Ca}^{2+}]$  піднімається до приблизно  $10^{-6}$  М (1 мкМ), зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з кальмодуліном призводить до конформаційної зміни білка. Кальмодулін асоціюється з різноманітними білками і, у своєму  $\text{Ca}^{2+}$  зв'язаному стані, модулює їхню діяльність. Кальмодулін є членом сімейства  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків, який також включає тропонін, який ініціює скорочення скелетних м'язів у відповідь на збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Це сімейство має характерну  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючу структуру (рис. 31).

5. Кальмодулін також є невід'ємною субодиницею сімейства ферментів,  $\text{Ca}^{2+}$  / кальмодулін-залежних білкових кіназ (CaM-кінази I-IV). Коли внутрішньоклітинна  $[\text{Ca}^{2+}]$  збільшується у відповідь на деякий подразник, кальмодулін зв'язує  $\text{Ca}^{2+}$ , зазнає зміни конформації та активує кіназу CaM. Потім кіназа фосфорилує низку цільових ферментів, регулюючи їх діяльність. Кальмодулін також є регуляторною субодиницею фосфорилази b кінази м'язів, яка активується  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким чином,  $\text{Ca}^{2+}$  запускає АТФ, що потребує м'язових скорочень, а також активізує розпад глікогену, забезпечуючи паливом синтез АТФ. Також відомо, що багато інших ферментів модулюють  $\text{Ca}^{2+}$  через кальмодулін.

6. Підвищення внутрішньоклітинного вільного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) є вирішальним ініціюючим сигналом для активації Т-клітин антигеном та іншими подразниками, які зшивають рецептор Т-клітинного антигену (TCR).

7. Наслідки сигналізації  $\text{Ca}^{2+}$ , що пов'язані з низхідним потоком, також включають експресію генів під впливом сигнального потоку.





**Рис. 31** Кальцій-залежний фермент-кальмодулін та Ca<sup>2+</sup> / кальмодулін-залежні протеїнкінази

**Деякі білки, регульовані Ca<sup>2+</sup> та кальмодуліном:**

- Аденілілциклаза (мозок)
- Ca<sup>2+</sup> / кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaM-кінази I до IV)
- Ca<sup>2+</sup> - залежний Na<sup>+</sup> канал (параметрій)
- Ca<sup>2+</sup> - канал вивільнення саркоплазматичного ретикулюма
- кальциневрин (фосфопротеїнова фосфатаза 2B)
- фосфодіестераза цАМФ
- нюховий канал, закритий цАМФ

- канали  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  з закритими цГМФ (стрижневі та конусні клітини)
- глутаматдекарбоксилаза
- кінази легкого ланцюга міозину
- НАД<sup>+</sup>-кіназа та фосфоїнозитид 3-кіназа
- синтаза оксиду азоту
- плазматична мембрана  $\text{Ca}^{2+}$  АТФаза ( $\text{Ca}^{2+}$  насос)
- РНК-геліказа (p68)

Таким чином, іони кальцію, певно, є найширше використовуваними внутрішньоклітинними месенджерами. Зазвичай рівень кальцію в клітині дуже низький (~ 100 нМ). Потрапляння  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль (і вихід з нього) здійснюється за допомогою каналів, захищених напругою.

## Лекція 11. G-білок. Визначення і функції

G-білки (білки, що зв'язують гуанін нуклеотиди) – це сімейство білків, які беруть участь у передачі хімічних сигналів поза клітиною і викликають зміни всередині клітини. Вони передають сигнали багатьох гормонів, нейромедіаторів та інших сигнальних чинників.

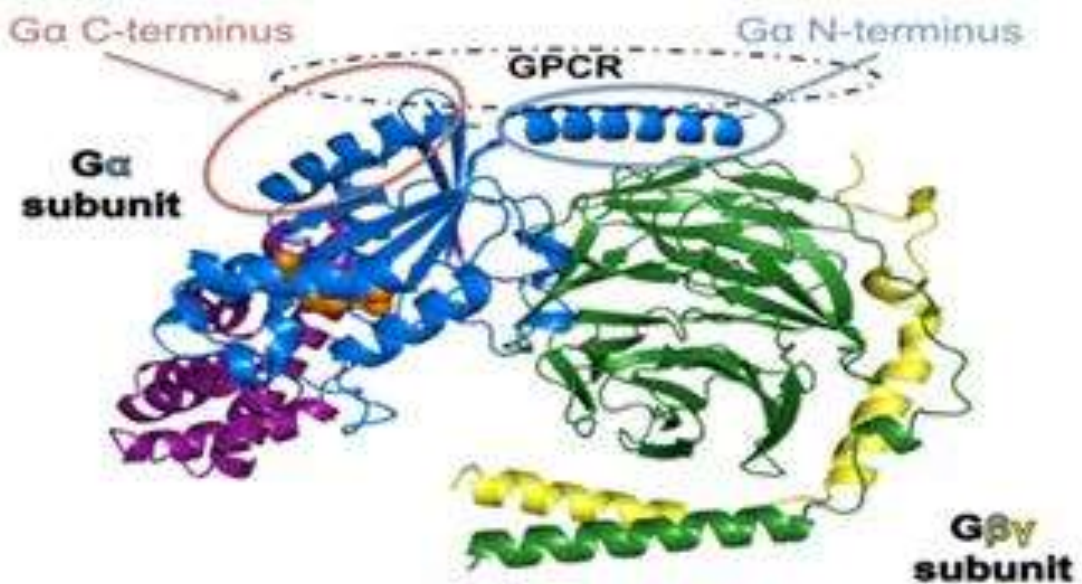
### Типи G-білка.

G-білок може базуватися на двох різних видах білків:

- **Гетеротримерні G-білки:** іноді також відомі як великі G-білки, які активуються рецепторами, пов'язаними з G-білками, і складаються з альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) та гамма ( $\gamma$ ) субодиниць.
- **Малі G-білки:** Вони є білками 20-25 кДа, які належать до надсімейства Ras невеликих GTPases. Ці білки є гомологічними альфа ( $\alpha$ ) субодиницями, що містяться в гетеротримерах, і насправді є мономерними. Однак вони також пов'язують GTP та GDP та беруть участь у передачі сигналів.

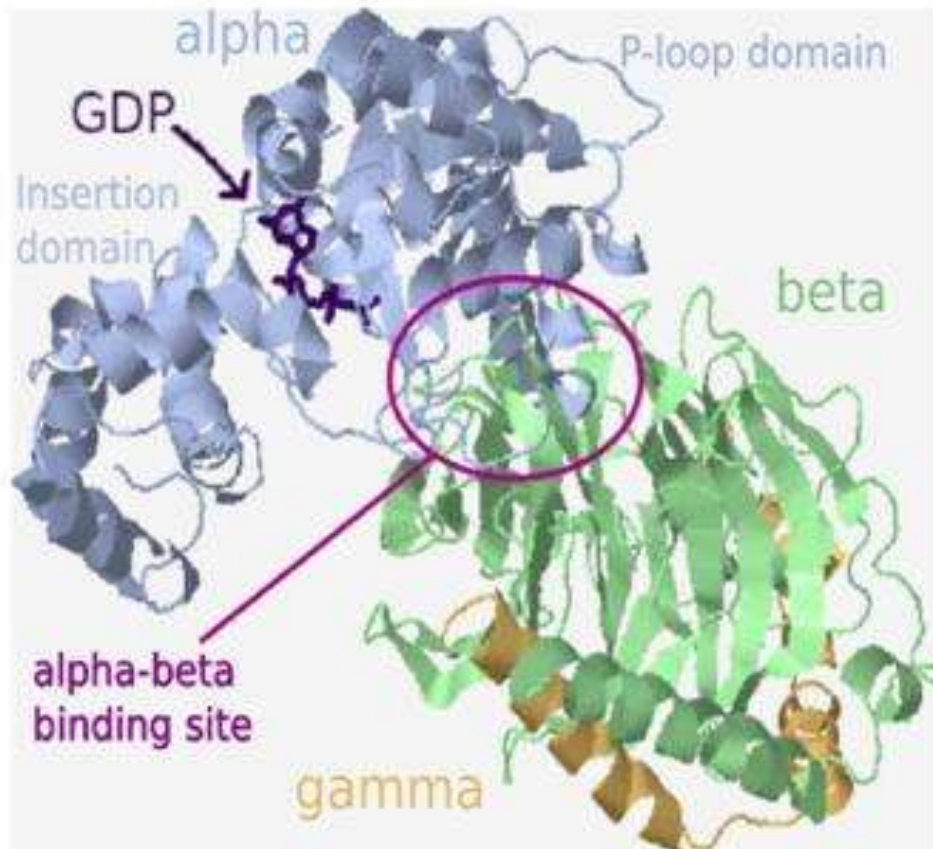
### Гетеротримерний G-білок.

Гетеротримерні G-білки є складними білками, які вперше були охарактеризовані Мартіном Родбелларом. Вони складаються з трьох різних субодиниць –  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$ , молекулярна маса яких становить відповідно 45, 37 та 9 кДа, серед цих  $\alpha$  субодиниця пов'язується з GDP у неактивному стані або GTP в активному стані, отже, гетеротримерний G-білок є частиною надсімейства G-білків. Гетеротримерні G-білки утримуються на плазматичній мембрані ліпідними ланцюгами, ковалентно приєднаними до  $\alpha$  і  $\gamma$  субодиниць (рис. 32).



**Рис. 32** Структура гетеротримерного G-білка

$\alpha$  - субодиниця має два домени – складчастий домен вставки, а інший – P-петля, що містить нуклеозидну трифосфат-гідролазу. P-петля або петля, що зв'язує фосфат, є цільовим доменом сайту АТР або GTP-зв'язування, знайденим у багатьох нуклеотид-зв'язуючих білках. Це багатий гліцином цикл, керований бета-шаром, а за ним – альфа-спіраль. Він взаємодіє з нуклеотидними фосфатними групами та з іоном  $Mg^{2+}$ , який координує  $\beta$ - та  $\gamma$ -фосфати в GTP. Після гідролізу нуклеотидів P-петля не змінює суттєво конформації, а залишається пов'язаною з іншими фосфатними групами.  $\beta$ - та  $\gamma$ - субодиниці зазвичай прикріплені до мембрани ковалентно приєднаними жирними кислотами.  $G\beta\gamma$  також може безпосередньо брати участь у передачі сигналу, оскільки активує широкий спектр сигнальних білків, включаючи кілька ізоформ аденілатциклази (рис. 33).



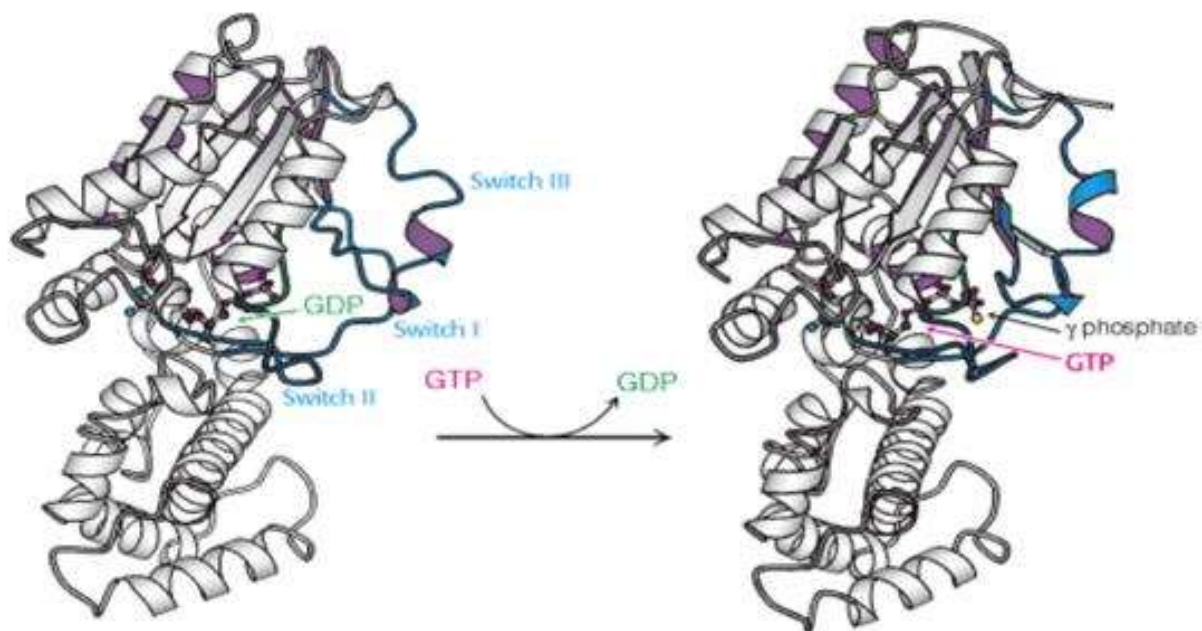
**Рис. 33** Деталізація форми G-білка з петлями та субодинами

### **Невеликий G-білок**

Ці білки належать до великого надсімейства, що називається маленькими G-білками, виходячи з їх невеликих норм від 20 000 до 35 000. Невеликі G-білки, як і гетеротримерні, зв'язують нуклеотиди гуаніну, мають високу GTP-активність і циркулюють через форми, пов'язані з GDP та GTP. Однією об'єднуючою особливістю різних класів G-білків є те, що зв'язування GTP проти GDP різко змінює спорідненість білка до деякої цільової молекули, очевидно, викликаючи великі конформаційні зміни. Можливо, малі G-білки функціонують як молекулярні комутатори, які керують кількома клітинними процесами.

**Конформаційні зміни в G-білку відбуваються під час обміну нуклеотидів.** Коли рецептор G-білкової пари контактує з лігандом, то в GPCR відбуваються деякі конформаційні зміни. Так, активований GPCR взаємодіє з G-білком, викликає конформаційну зміну альфа-субодинами G-

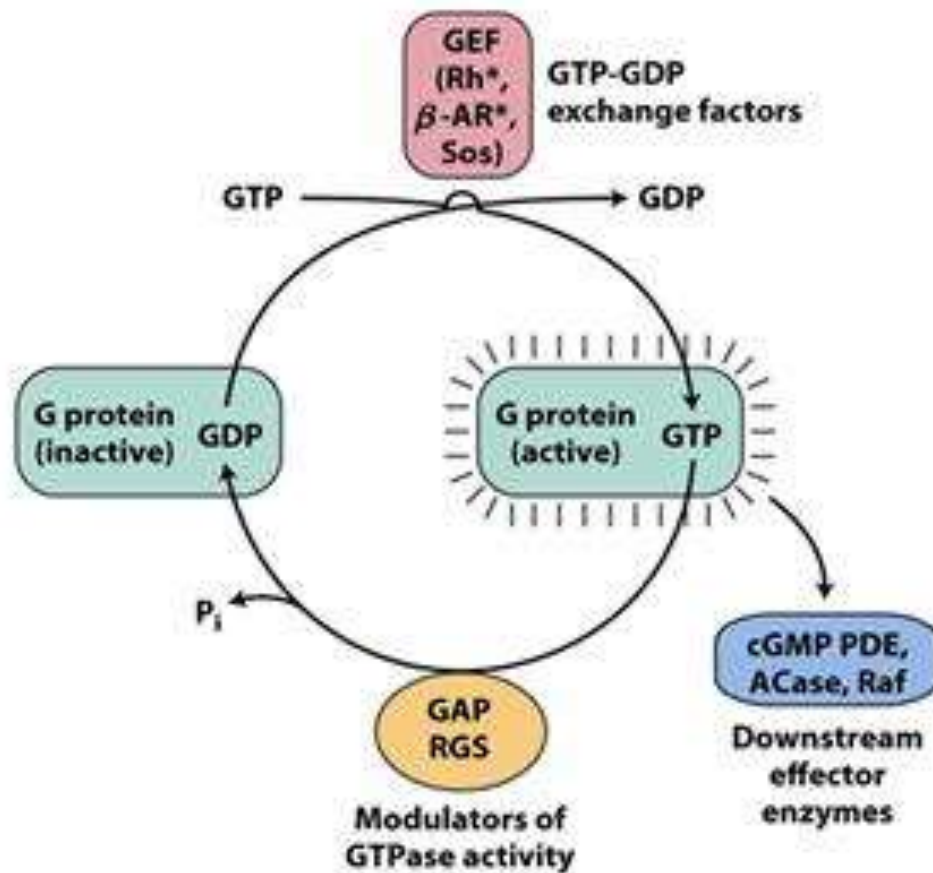
білка. Через конформаційну зміну G-білок, який приєднався до GDP для активації, отримує обмін GTP, через який три пускові області  $\alpha$ -субодиниці закривають нуклеозид трифосфат, генеруючи активну конформацію (рис. 34).



**Рис. 34** Конформаційна зміна G-білка

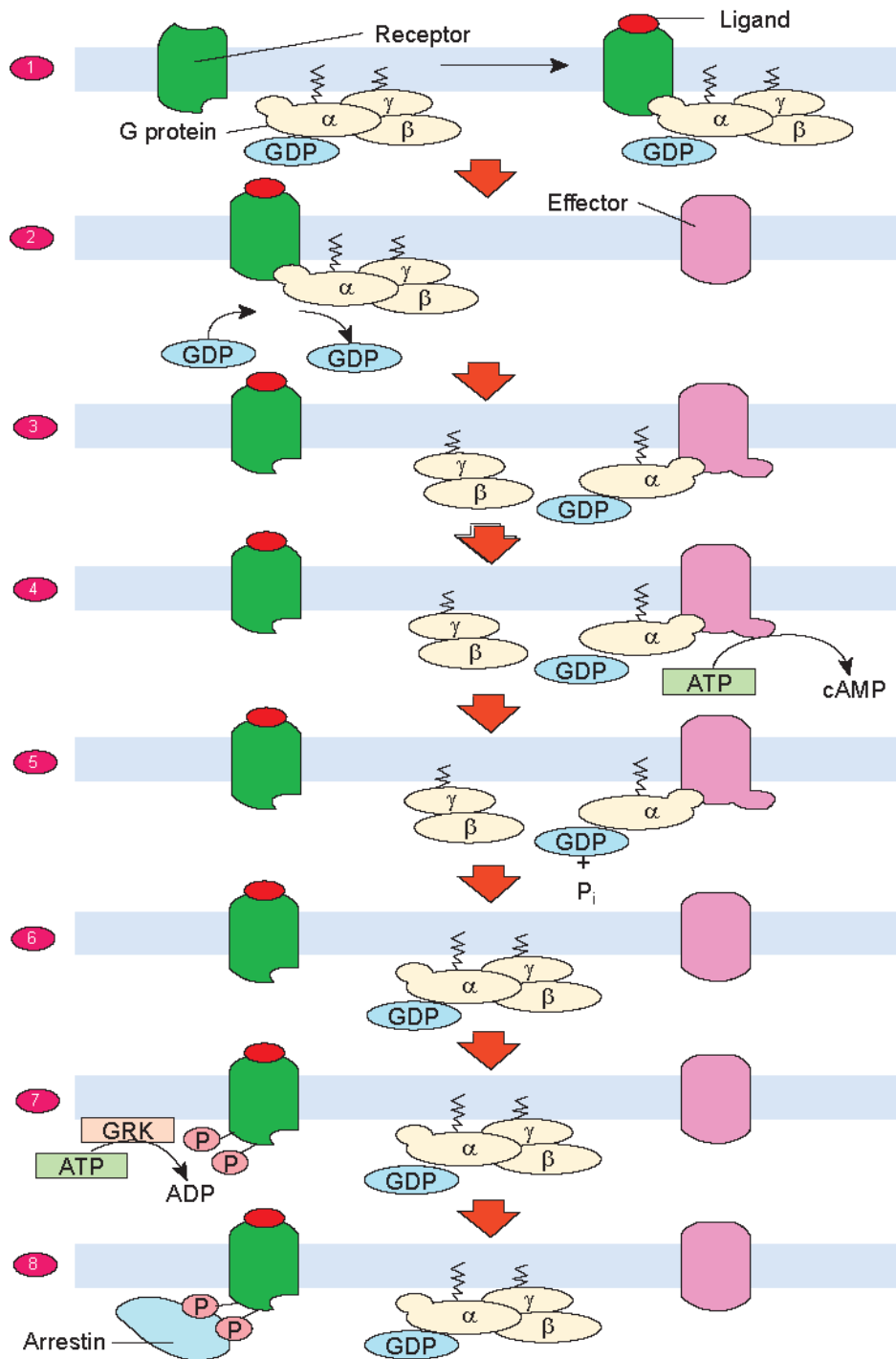
G-білок зазвичай зустрічається у двох станах – активній та неактивній формі. У неактивованому стані нуклеотид гуанілілу, пов'язаний з G-білком, становить GDP. У цій формі G-білок існує як гетеротример, що складається з  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$  субодиниць, в яких  $\alpha$  субодиниця ( $G\alpha$ ) зв'язується з нуклеотидом. Роль рецептора, пов'язаного з гормонами, полягає в каталізації обміну GTP на GDP. Таким чином, неактивний G-білок, перетворений в активну форму, а субодиниця  $G\alpha$  не має великої спорідненості з субодиницями  $G\beta\gamma$ , отже,  $\alpha$ -субодиниця відокремлена від  $\beta\gamma$ -субодиниць. Таке явище має назву активованого стану G-білка. В активованому стані субодиниця  $G\alpha$  стимулює ефекторний білок, такий як аденілілциклаза, що призводить до отримання цАМФ вторинного месенджера, який може активувати одну або більше сигнальних молекул. Іншими ефекторами є фосфодіестераза цГМФ, фосфоліпаза С- $\beta$ . Після дисоціації від субодиниці  $G\alpha$  комплекс  $\beta\gamma$  також набуває функцію сигналізації, і він може по'єднати щонайменше чотири

різних типи ефекторів: PLC- $\beta$ , K<sup>+</sup> іонні канали, аденілілциклазу та РІЗ-кіназу (рис. 35).



**Рис. 35** Регулювання активації та інактивації G-білка

Через певний проміжок часу  $G\alpha$  відключається шляхом гідролізу пов'язаного GTP до GDP та неорганічного фосфату ( $P_i$ ). Це призводить до конформаційних змін, спричинених зниженням спорідненості до ефектора та збільшення спорідненості до  $\beta\gamma$  комплексу, таким чином,  $G\alpha$  субодиниця дисоціює з ефектором і асоціюється з  $\beta\gamma$  субодиницею для реформування неактивної форми G-білка (рис. 36).



**Рис. 36** Механізм активації рецепторів (або інгібування) ефektorів за допомогою гетеротримерних G-білків

Гетеротримерні G-білки мають п'ять різновидів, Gs, Gq, Gta, Gi та G12 / 13. Ця класифікація базується на субодиницях Ga та ефektorах, до яких вони приєднуються. Конкретна відповідь, що формується активованим GPCR, залежить від типу G-білка, з яким він взаємодіє, хоча деякі GPCR можуть



взаємодіяти з різними G-білками і викликати понад одну фізіологічну відповідь.

- Члени сім'ї **Gs** парують рецептори до аденілілциклази. Аденілілциклаза активується GTP-зв'язаними субодинамиціями.

- Члени родини **Gq**, Gq містять субодинамиці G $\alpha$ , які активують PLC- $\beta$ . PLC- $\beta$  гідролізує фосфатиділінозитол бісфосфат, продукуючи інозитол трисфосфат та діацилгліцерин.

- **Трансдуцин (G $\alpha$ )** – варіант G $\alpha$ , який трансдукує зорові подразники шляхом поєднання світло-індукованої конформаційної зміни родопсину до активації специфічної фосфодіестерази, яка потім гідролізує цГМФ до ГМФ. Ця цГМФ-фосфодіестераза (цГМФ-PDE) є  $\alpha\beta\gamma_2$  гетеротетрамером, який активується зміщенням його інгібіторних субодинамиці (PDE) шляхом їх жорсткішого зв'язування з G $\alpha$ . Трансембральний канал, специфічний для катіону, відкритий зв'язуванням цГМФ, закривається в результаті зменшення рівня цГМФ, тим самим запускаючи нервовий імпульс, що вказує на те, що світло було виявлено.

- **G $\alpha$** , активовані G $\alpha$  субодинамиці функціонують, інгібуючи аденілілциклазу

- **G $\alpha$**  – варіант G $\alpha$ , який експресується лише у нюхових сенсорних нейронах та бере участь у передачі одорантного сигналу.

- Члени **G12 $\alpha$**  та **G13 $\alpha$** , G12 / 13 характеризовані фрагментарніше, аніж інші сімейства G-білків, хоча їх невідповідна активація пов'язана із надмірною проліферацією клітин та злоякісною трансформацією.

Таким чином, гетерогенність у G-білках виникає у  $\beta$  та  $\gamma$  субодинамиціях, а також у  $\alpha$ -субодинамиціях. Насправді, у людини виявлено 21 різні субодинамиці  $\alpha$ , 6 різних  $\beta$  субодинамиці та 12 різних  $\gamma$  субодинамиці, деякі з яких є скрізь вираженими, тоді як інші є лише у конкретних клітинах. Отже, клітина може містити декілька тісно пов'язаних між собою G-білків даного типу, які взаємодіють із різною специфікою з рецепторами та ефекторами. Ця складна сигнальна система, ймовірно, дозволяє клітинам реагувати градуїтованим способом на різні подразники.

## Роль G-білка в передачі сигналу

Оскільки органи або клітини, щоб правильно функціонувати в організмі, повинні мати здатність реагувати на сигнали як з віддалених клітин, так і з його внутрішнього середовища. Так, процес, в якому інформація, що передається позаклітинними молекулами месенджера, перетворюється на зміни, що відбуваються всередині клітини, називається передаванням сигналу. У цьому процесі:

- Клітини в різних органах спілкуються один з одним за допомогою позаклітинних сигнальних молекул, що вивільняються одним набором клітин і приймаються іншими.
- Не всі молекули можуть проходити через ліпідний двошаровий елемент клітини, і тому системи передачі сигналу використовуються для передачі зовнішнього сигналу до внутрішньої частини клітини.

G-білки відіграють ключову роль у передачі сигналу за допомогою рецептора пари G-білка, який скорочено називається GPCR. Рецептор пари G-білків містить велике сімейство трансмембранних рецепторів, які відчують молекули поза клітиною та активують всередині сигнальних шляхів клітинні відповіді. Рецептори, пов'язані з G-білками, є лише у еукаріотів, включаючи дріжджі, хоанофлагеляти та тварини. Ліганди, які зв'язують та активують ці рецептори, включають світлочутливі сполуки, запахи, феромони, гормони та нейромедіатори та відрізняються за розмірами від невеликих молекул до пептидів та великих білків. Рецептори, пов'язані з G-білками, беруть участь у багатьох захворюваннях, а також є мішенню приблизно 40% усіх сучасних лікарських препаратів.

## Лекція 12. Класифікація GPCR та термінація сигналіngu

Точний кількісний розмір надсімейства GPCR невідомий, але за допомогою аналізу послідовностей геномів було прописано майже 800 різних генів людини (або  $\approx 4\%$  усього генома, що кодує білок). Незважаючи на те, що було запропоновано численні схеми класифікації, надсімейство класично поділяється на три основні класи (A, B і C), де не виявляється гомологія спільної послідовності між класами. Найбільший досі клас – клас A, на який припадає майже 85% генів GPCR. З GPCR класу A, понад половина з них прогнозується кодувати нюхові рецептори, тоді як решта рецепторів регламентуються відомими ендогенними сполуками або класифікуються як одиночні рецептори. Незважаючи на відсутність гомології послідовності між класами, всі GPCR мають загальну структуру та механізм передачі сигналу (рис. 37).

Загалом, GPCR можна класифікувати на 5 класів на основі гомології послідовності та функціональної подібності.

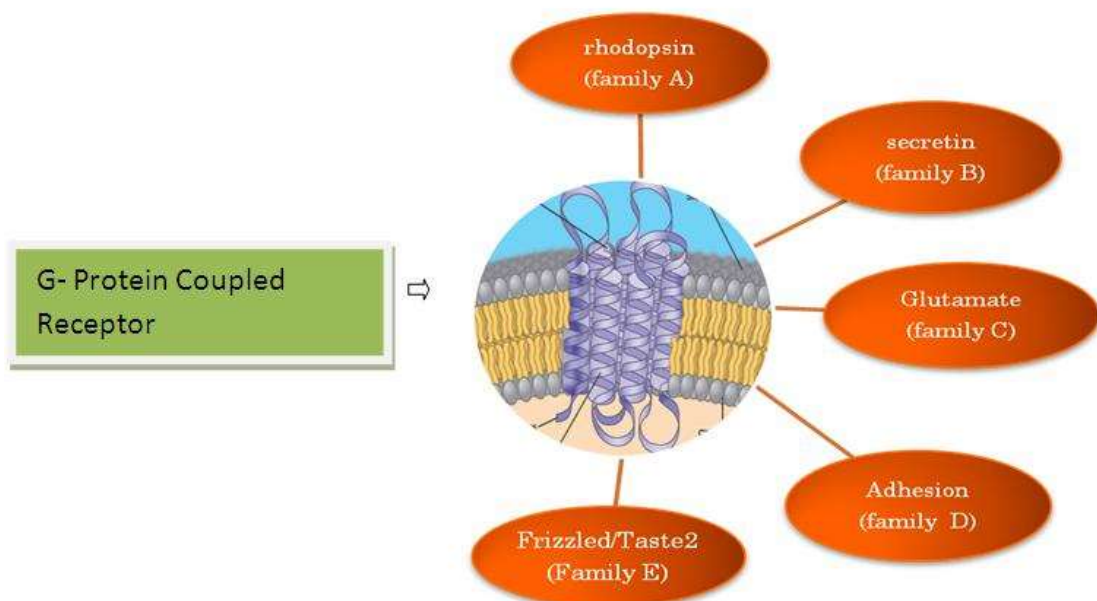


Рис. 37 Класифікація G-білка

GPCR беруть участь у найрізноманітніших фізіологічних процесах. Деякі приклади їх фізіологічних ролей:

1. **Зоровий:** Родопсин, який є комплексом опсинів та хромофорним 11-цис-ретинолом, використовує реакцію фотоізомеризації для перетворення електромагнітного випромінювання в клітинні сигнали за рахунок перетворення 11-цис -ретинольних у трансретинальні.
2. **Нюх:** рецептори нюхового епітелію пов'язують віддушки (нюхові рецептори) та феромони (вомероназальні рецептори)
3. **Регулювання поведінки та настрою:** рецептори в мозку ссавців пов'язують кілька різних нейротрансмітерів, включаючи серотонін, дофамін, глутамат
4. **Регулювання активності імунної системи та запалення:** хемокінові рецептори зв'язують ліганди, які опосередковують міжклітинний зв'язок між клітинами імунної системи; рецептори, такі як гістамінові рецептори, зв'язують медіатори запалення і залучають типові клітини-мішені у відповідь на запалення
5. **Автономна передача нервової системи:** симпатична і парасимпатична нервова системи регулюються GPCR-шляхами, відповідальними за контроль багатьох автоматичних функцій організму, таких як кров'яний тиск, серцебиття та травні процеси
6. **Зондування щільності клітин:** Нова роль GPCR у регулюванні зондування щільності клітин.
7. **Модуляція гомеостазу (водний баланс).**

**Механізм дії.** Коли ліганд зв'язується з GPCR, він викликає конформаційну зміну GPCR, що дозволяє йому діяти як гуаніновий нуклеотидний обмінний чинник (GEF). Потім GPCR активує асоційований G-білок, обмінюючи його пов'язаний GDP на GTP.  $\alpha$ -субодиниця G-білка разом із зв'язаною GTP потім дисоціює з  $\beta$  та  $\gamma$  субодиницями для подальшого впливу на внутрішньоклітинні сигнальні білки або цільові функціональні

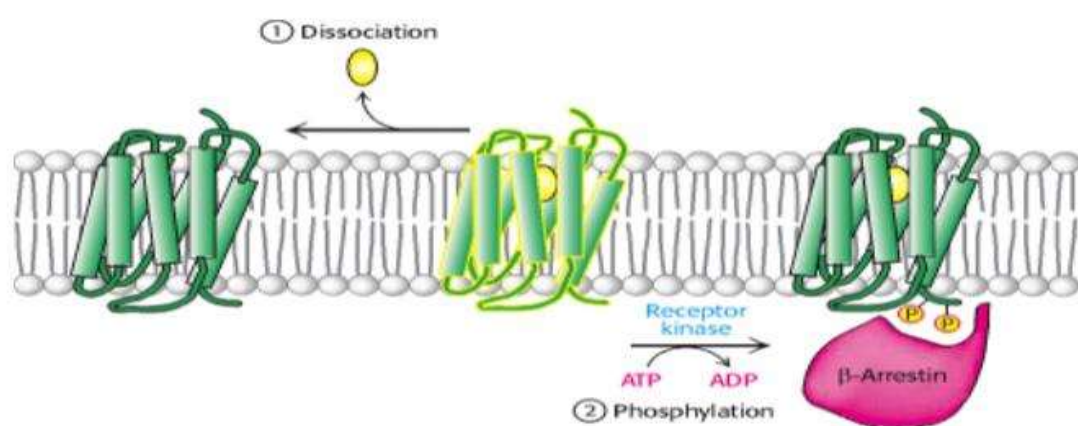
білки безпосередньо залежно від типу субодиниці ( $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$  / o,  $G_{\alpha q}$  / 11,  $G_{\alpha 12}$  / 13).

Є два основні шляхи передачі сигналу, за якими функціонують рецептори, пов'язані з G-білком:

- шлях сигналу цАМФ
- шлях сигналу фосфатиділінозитулу.

### Припинення сигналіngu GPCR і переривання зв'язування з G-білком

Активний рецептор, пов'язаний з гормонами повинен бути скинутий для запобігання постійної активації G-білків. Це скидання здійснюється двома шляхами. По-перше, гормон дисоціює, повертаючи рецептор до початкових, неактивованих станів. Ймовірність того, що рецептор залишається у незв'язаному стані, залежить від концентрації гормону. По-друге, гормоно-рецепторний комплекс деактивується фосфорилуванням залишків серину та треоніну в карбоксильно-кінцевому хвості рецепторної кінази (також її називають G-білковою рецепторною кіназою 2, GRK 2) фосфорилує карбоксильний кінцевий хвіст гормоно-рецепторного комплексу, але не незайнятий рецептор. Нарешті, молекула  $\beta$ -аресталін зв'язується з фосфорильованим рецептором і ще більше знижує його здатність до активації G-білка (рис. 38).



**Рис. 38** Термінація сигналіngu

Водночас, G-білки часто потребують функціонування додаткових білків:

1. Білок, що активує GTPазу (GAP), що стимулює відповідний G-білок до гідролізу зв'язаного GTP. Це підвищення швидкості може бути  $> 2000$  разів. Ефектори  $G_{\alpha}$  та  $G_{\beta\gamma}$ , cGMP-PDE та PLC- $\beta$  відповідно, демонструють активність GAP у напрямку до  $G_{\alpha}$  та  $G_{\beta\gamma}$  (що в іншому випадку би гідролізувало GTP при фізіологічно незначних швидкостях), але AC не виявляє активність GAP ні до  $G_{\beta\gamma}$ , ні до  $G_{\alpha}$ . Однак у людей різноманітне сімейство з 37 білків RGS (для регуляторів сигналізації G-білка) функціонує як GAP для субодиниць  $G_{\alpha}$ , зв'язуючись з ними найщільніше, коли вони перебувають у перехідному стані конформації для гідролізу GTP.

2. Гуаніновий коефіцієнт обміну нуклеотидів [GEF; альтернативно гуаніновий нуклеотидний вивільняючий фактор (GRF)], який спонукає відповідний G-білок до вивільнення пов'язаного GDP. Згодом G-білок зв'язує інший нуклеотид гуаніну (GTP або GDP, з яким більшість G-білків зв'язується приблизно з рівними спорідненостями), але оскільки клітини підтримують концентрацію GTP, що в 10 разів перевищує GDP, це, фактично обмежує шлях GDP для GTP. Для гетеротримерних G-білків комплекси агоніст GPCR функціонують як GEF.

3. Інгібітор нуклеотид-дисоціації гуаніну (GDI).  $G_{\beta\gamma}$  може розглядатися як пов'язаний з ним GDI  $G_{\alpha}$ , оскільки GDP повільно дисоціює від ізольованих субодиниць  $G_{\alpha}$ , але по суті незворотно пов'язаний гетеротримерами.

Таким чином, очевидно, що G-білки – це молекулярні комутатори, які використовують GDP для контролю свого циклу сигналізації. G-білок є неактивний, коли GDP виходить за межі, а для активації білка GDP замінюється на GTP, і тоді G-білок подасть свій сигнал. Система G-білка відіграє центральну роль у багатьох сигнальних завданнях, тому вона стала чутливою мішенню для багатьох лікарських засобів та токсинів. Різноманітність GPCR спостерігається не тільки через множину подразників, на які вони реагують, але і різноманітність внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, які вони активують.

## Список використаної літератури:

1. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Часть 1. Классификация и структура / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 2–9.
2. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Часть 2. Структура и механизм функционирования / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 10–16.
3. Колупаев Ю. Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец. — К. : Основа, 2010. — 352 с.
4. Крутецкая З. И. Механизмы внутриклеточной сигнализации : монография / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова. — СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2003. — 208 с.
5. Лыло В. В. Убиквитинирование протеинов и его функции в клетке / В. В. Лыло // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 6. — С. 5–13.
6. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. — М. : Наука, 2002. — 294 с.
7. Alberts B. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. — 4-th edition. — Garland Science Publishing, 2002.
8. Apel K. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — V. 55. — P. 373–399.
9. Chapman E. J. Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants / E. J. Chapman, M. Estelle // Annu. Rev. Genet. — 2009. — V. 43. — P. 265–285.
10. Chen M. Light signal transduction in higher plants / M. Chen, J. Chory, C. Fankhauser // Annu. Rev. Genet. — 2004. — 38. — P. 87–117.
11. Gehring C. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling — past and present / C. Gehring // Cell Communication and Signaling. — 2010. — V. 8. — P. 15.

12. Kachroo A. Fatty Acid–Derived Signals in Plant Defense / A. Kachroo, P. Kachroo // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2009. — V. 47. — P. 153–176.
13. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins / T. Kakimoto // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 605–627.
14. Kim T.-W. Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors / T.-W. Kim, Z.Y. Wang // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 681–704.
15. Lau O. S. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later / O. S. Lau, X. W. Deng // *Trends Plant Sci.* — 2012. — V. 17(10). — 584–593.
16. Pandey S. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in arabidopsis / S. Pandey, D. C. Nelson, S. M. Assmann // *Cell.* — 2009. — V. 136. — P. 136–148.
17. Rodriguez M. C. S. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants / M. C. S. Rodriguez, M. Petersen, J. Mundy // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 621–649.
18. Wang Z.-Y. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis / Z.-Y. Wang, M.-Y. Bai, E. Oh, J.-Y. Zhu // *Annu. Rev. Genet.* — 2012. — V. 46. — P. 699–722.
19. Yang Z. Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants / Z. Yang // *The Plant Cell.* — 2002. — V. 14. — P. S375–S388.
20. Zielinski R. E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants / R. E. Zielinski // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1998. — V. 49. — P. 697–725.