

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
Кафедра химии

Сигнальная трансдукция: вторичные мессенджеры

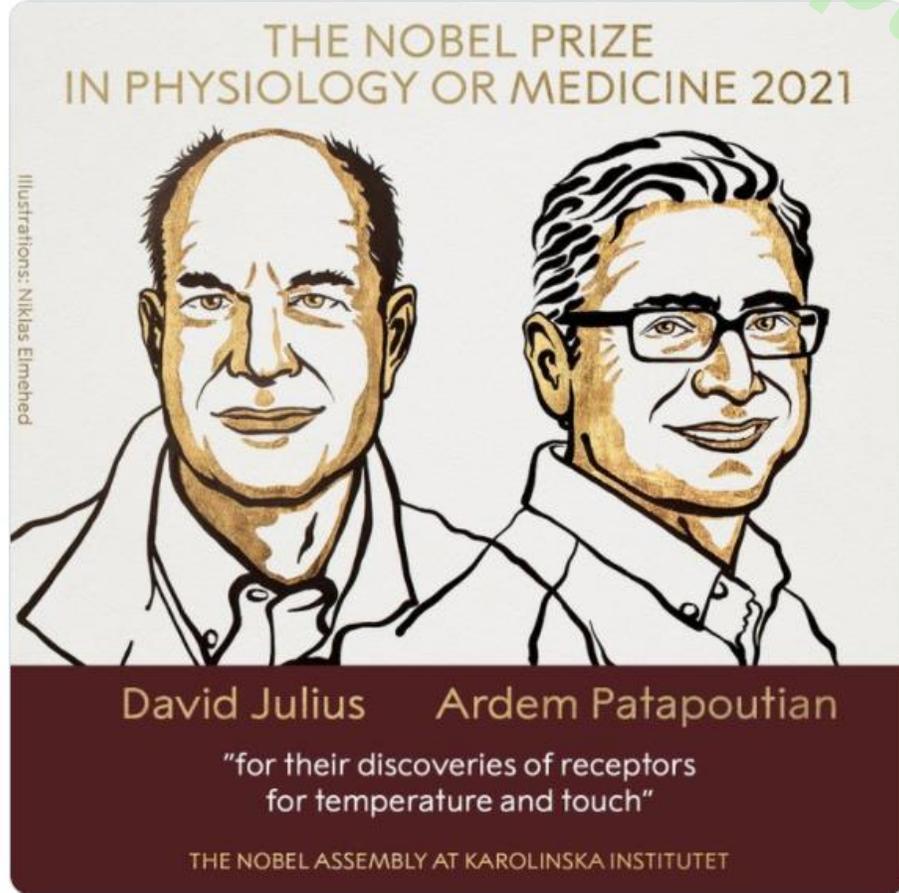
Д.б.н. Сгибнев А.В.

Нобелевскую премию по физиологии и медицине вручили за исследование рецепторов температуры и осязания

THE NOBEL PRIZE
The Nobel Prize
@NobelPrize

BREAKING NEWS:

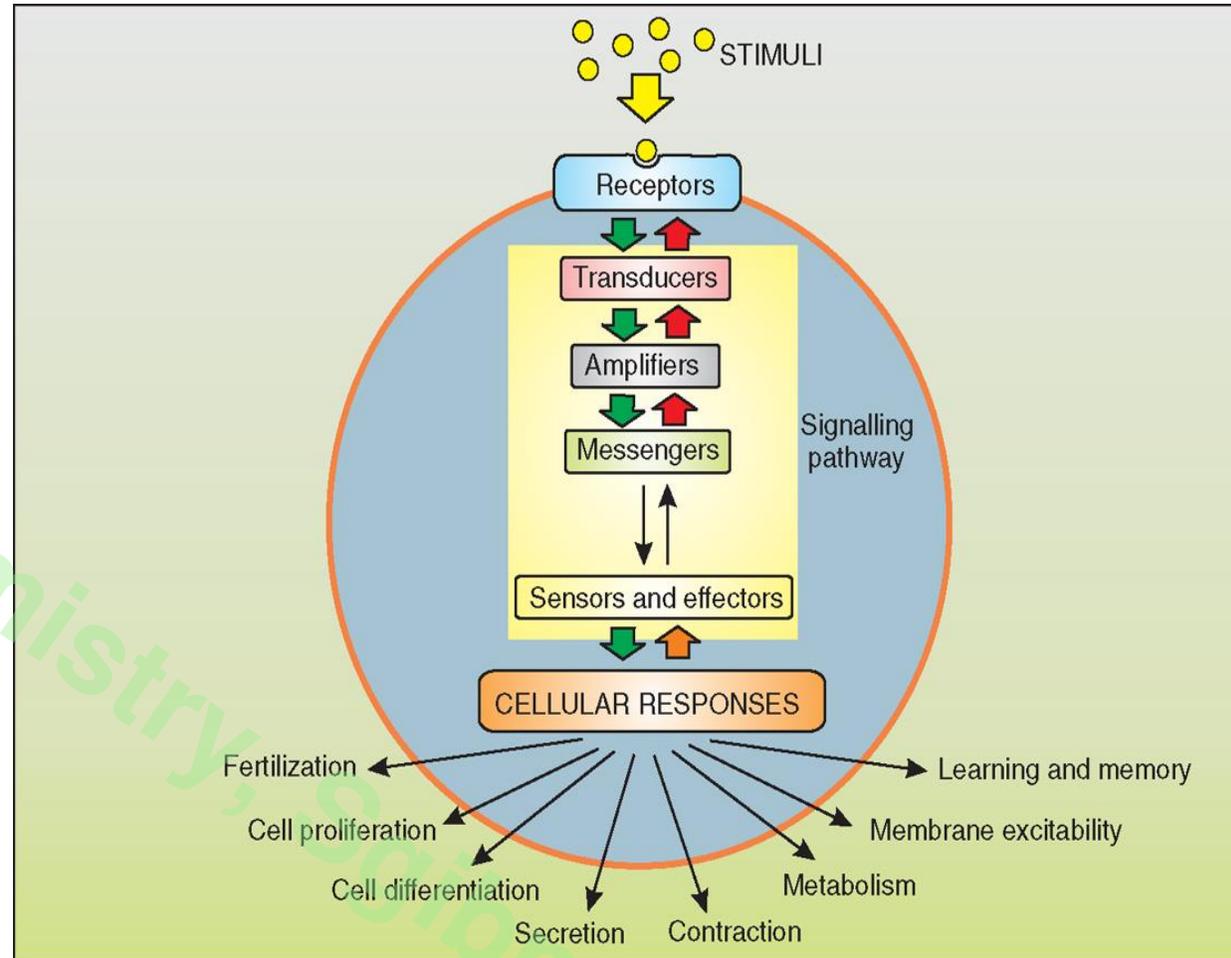
The 2021 #NobelPrize in Physiology or Medicine has been awarded jointly to David Julius and Ardem Patapoutian "for their discoveries of receptors for temperature and touch."



- Нобелевский комитет в Стокгольме назвал имя лауреатов премии в области медицины или физиологии.
- Ими стали Дэвид Джулиус и Ардем Патапутян. Они открыли, каким образом температура или, например, прикосновение превращаются в человеческие ощущения.
- Открытие Джулиуса и Патапутяна нобелевское жюри сочло прорывным. "Лауреаты нынешнего года позволили нам понять, как температура или механическая сила иницируют нервные импульсы, которые позволяют нам воспринимать мир и адаптироваться", - заявили в комитете.

Механизмы клеточной сигнализации

- Типичные сигнальные пути инициируются через рецепторы, которые воспринимают присутствие сигнала.
- Сигнал проходит через ряд внутриклеточных преобразователей и вторичных мессенджеров, которые могут/не могут привести к усилению сигнала.
- В конечном итоге активируются сенсоры вторичных мессенджеров, которые модулируют эффекторные молекулы, которые вызывают клеточные реакции.



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

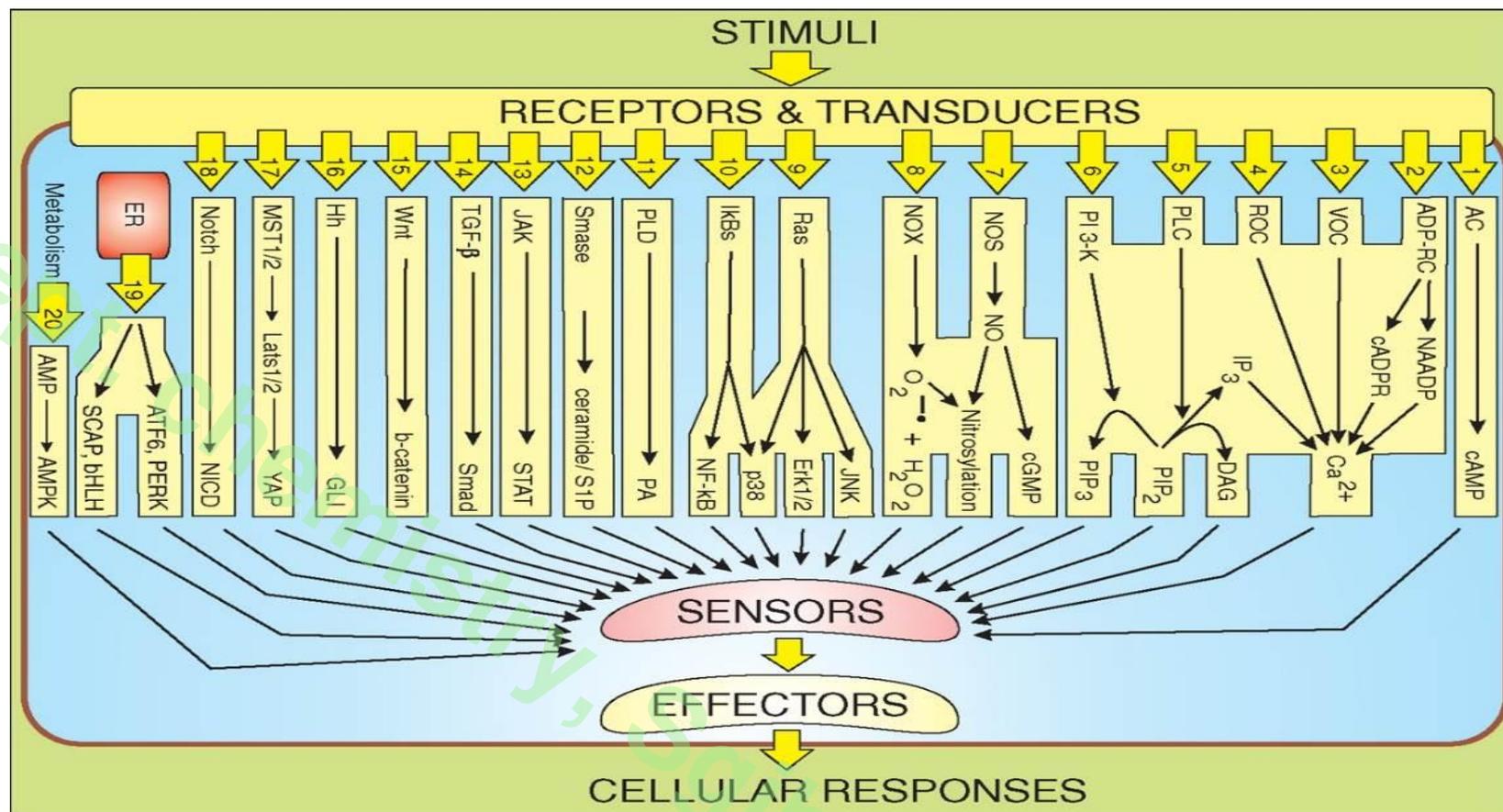
Основные сигнальные путей, используемые клетками для регулирования клеточных процессов

Клетки имеют ряд сигнальных систем, которые способны реагировать либо на внешние, либо на внутренние раздражители.

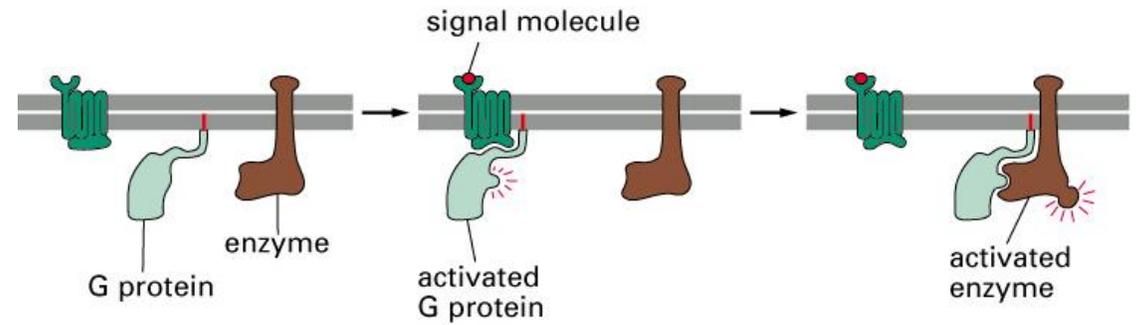
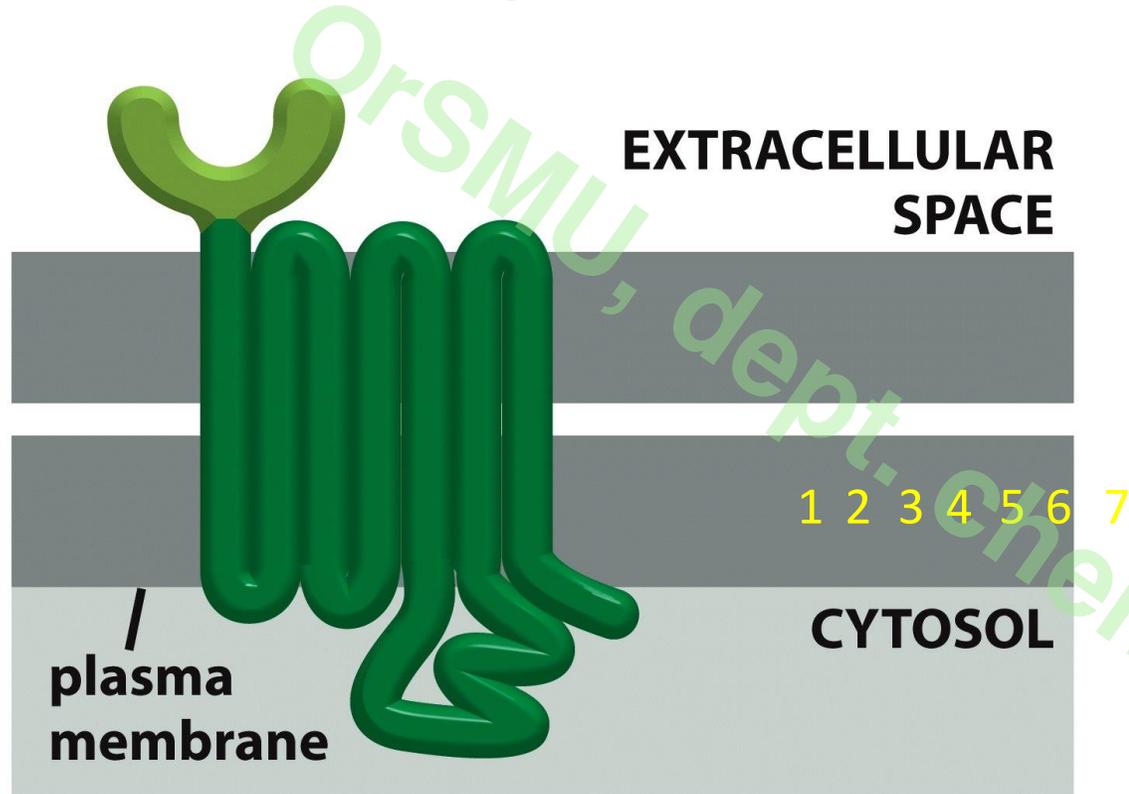
Внешние стимулы, действующие на рецепторы клеточной поверхности, соединяются с преобразователями для передачи информации в клетку с использованием ряда различных сигнальных путей (пути 1-17).

Внутренние стимулы, поступающие из ЭР (или метаболизм), активируют сигнальные пути независимо от внешних сигналов (пути 18 и 19).

Все эти пути генерируют вторичные мессенджеры, которые затем стимулируют эффекторы, вызывающие различные клеточные реакции (названия этих сигнальных путей обычно отражают основные компоненты пути).



Рецепторы, связанные с G-белком (GPCRs)

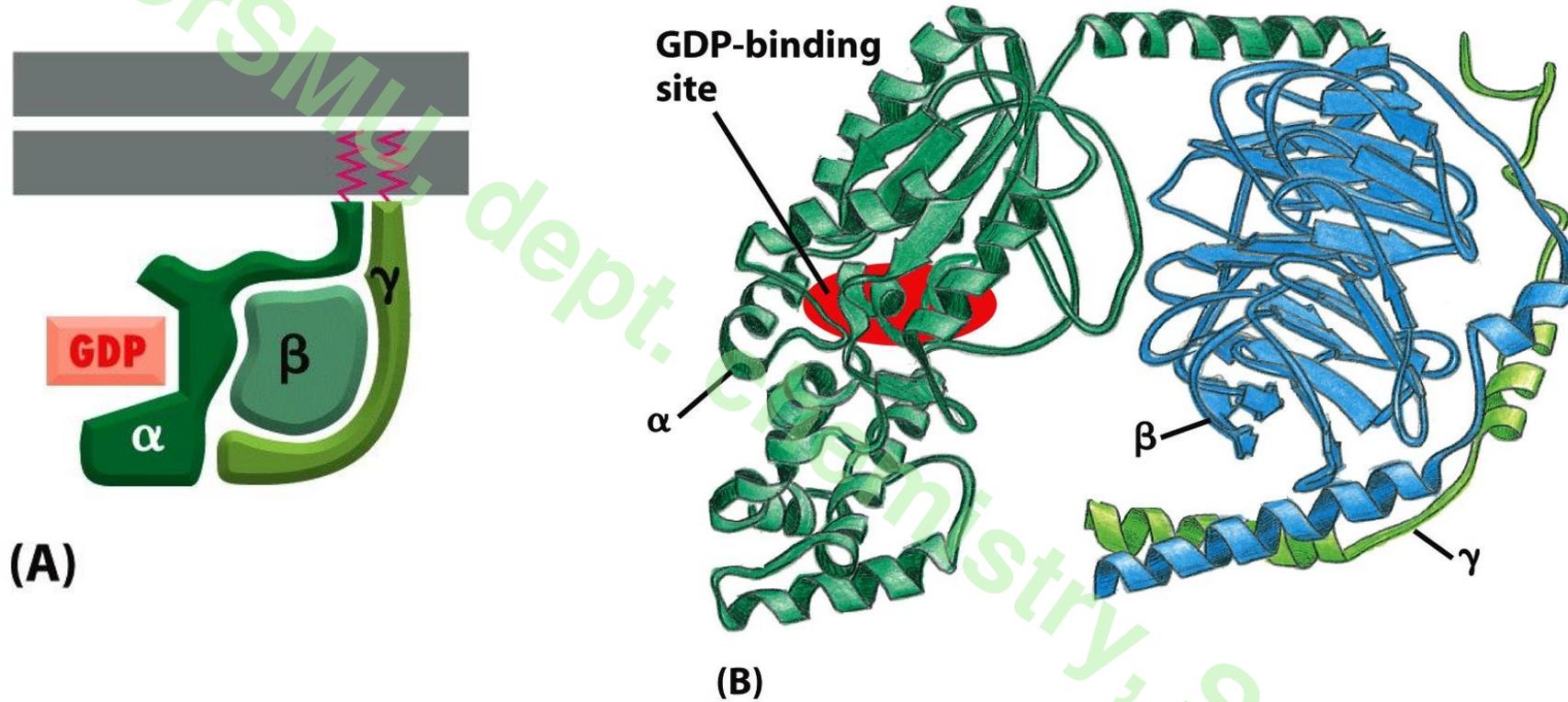


Эти рецепторы активизируют свои мишени косвенно, через промежуточный G-белок.

Рецепторы, связанные с G-белком, опосредуют клеточные ответы на широкий спектр сигнальных молекул.

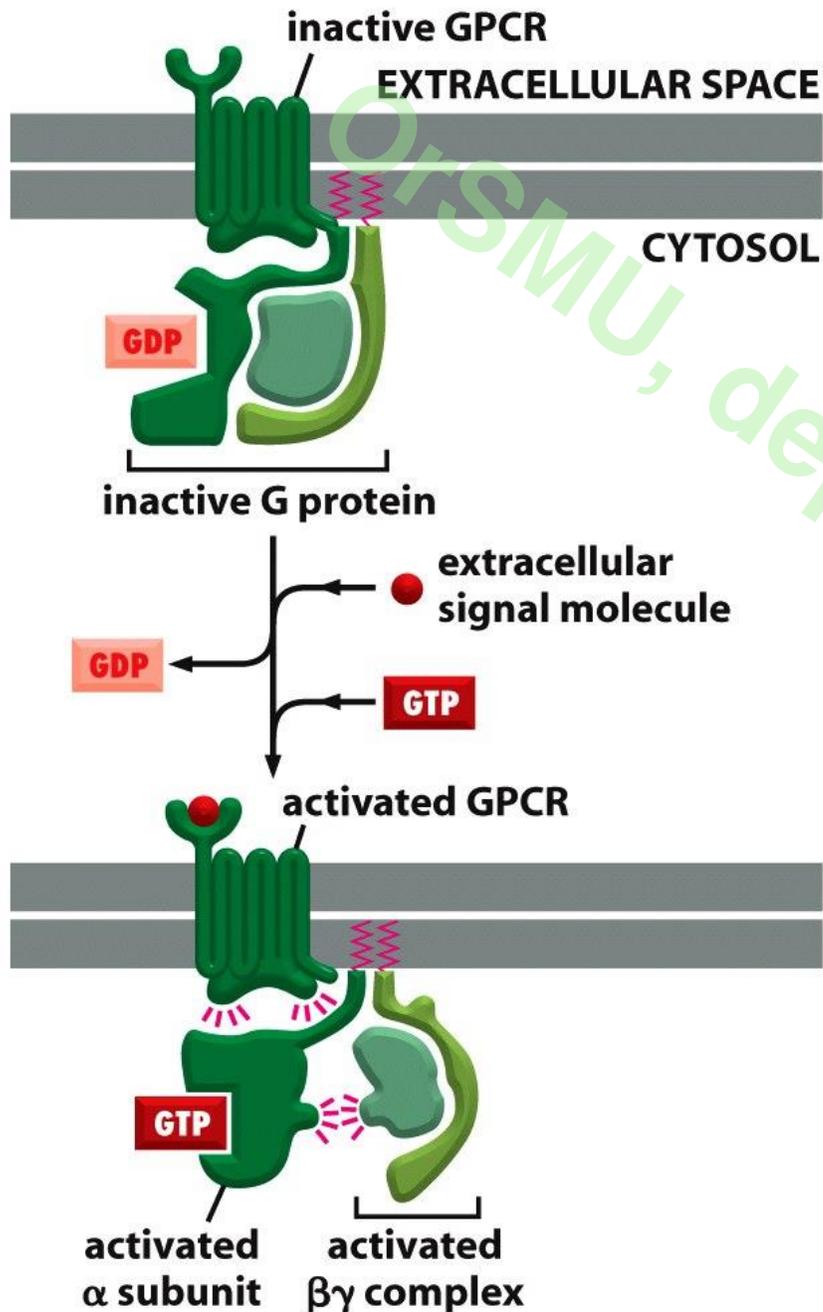
Все они обладают сходной архитектурой и состоят из одной полипептидной цепи, которая пересекает бислой семь раз.

Структура неактивного гетеротримерного G-белка



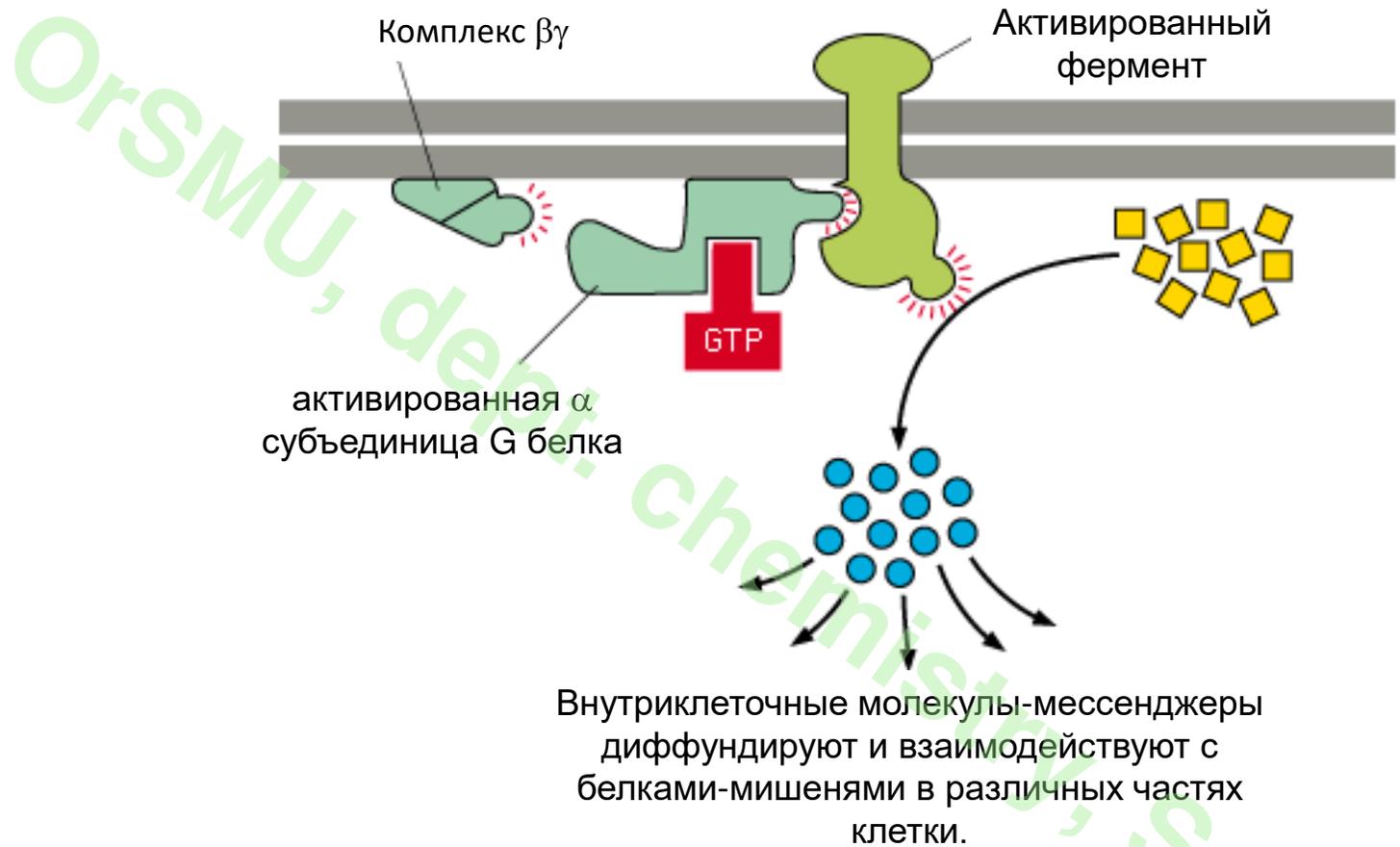
Тримерные GTP-связывающие белки (G-белки) функционально связывают рецепторы GPCR со своими белками-мишенями.

Белок G состоит из трех субъединиц: α , β и γ . Субъединица α связывает гуаниновые нуклеотиды и активна при связывании с GTP.



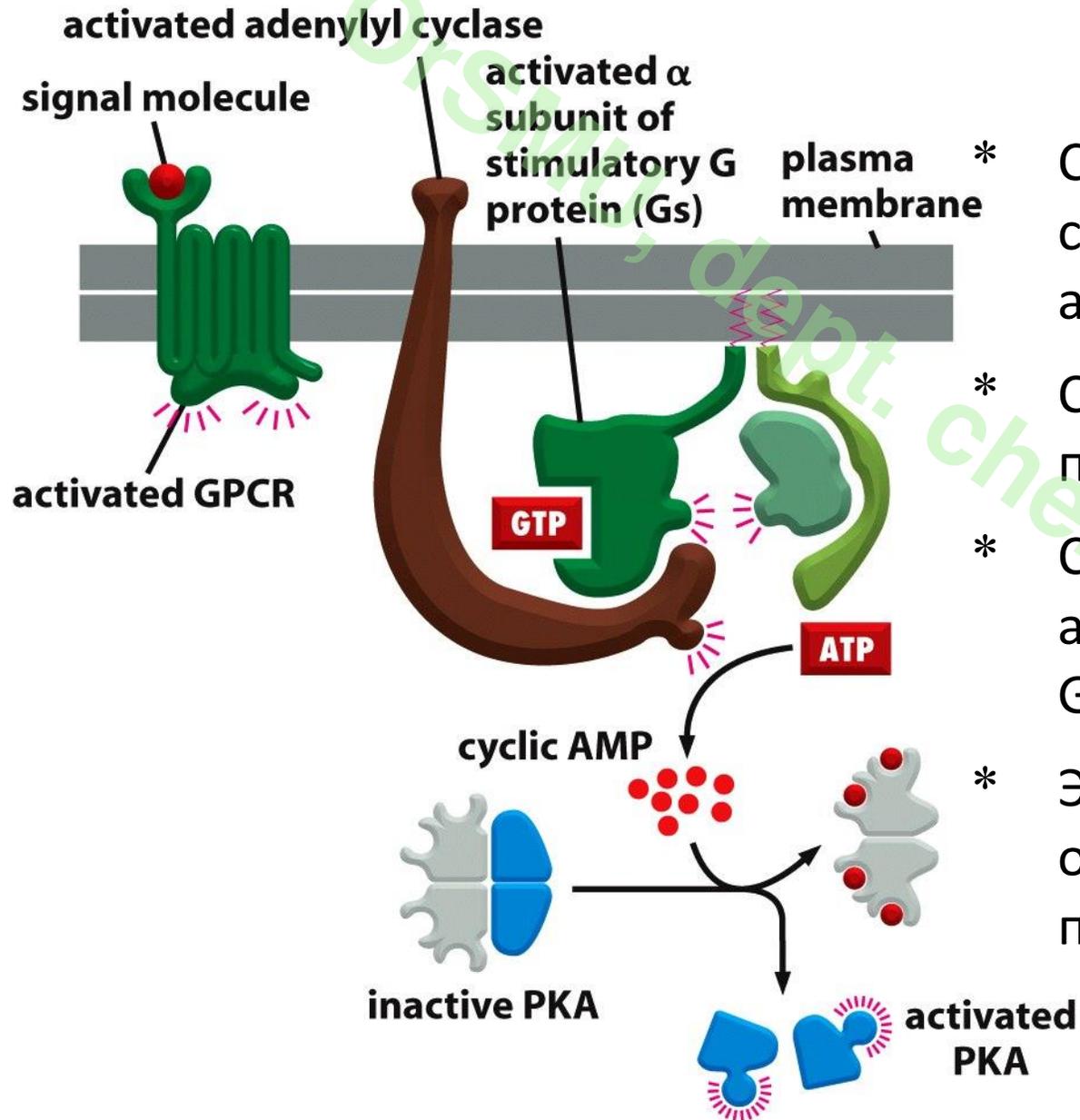
Рецепторы, связанные с G-белком (GPCRs)

- Когда GPCRs связываются с лигандом, они претерпевают конформационное изменение, которое позволяет им взаимодействовать с G-белком.
- Это взаимодействие заставляет белок G выбрасывать связанный GDP и заменять его на GTP. Этот обмен заставляет тример диссоциировать на два активированных компонента: субъединицу α , связанную с GTP, и комплекс $\beta\gamma$.



- * Активация рецептора обычно приводит к производству внутриклеточных (вторичных) мессенджеров, которые, в свою очередь, передают сигнал дополнительным клеточным белкам.
- * Дважды наиболее распространенными вторичными мессенджерами, используемыми в этих сигнальных путях, являются цАМФ и Ca^{2+} .

Внутриклеточные эффекты увеличения концентрации сАМР



G протеины и аденилатциклаза

* Связывание лиганда некоторыми рецепторами, связанными с G-белком, приводит к активации аденилатциклазы (АЦ).

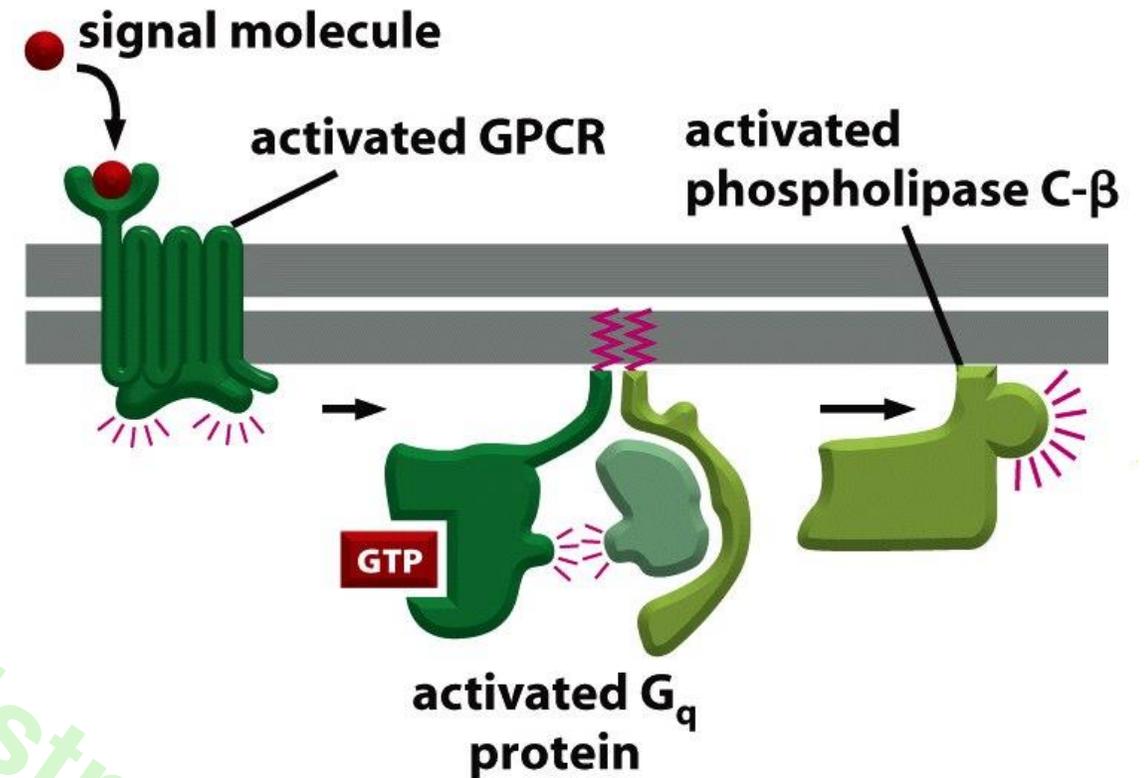
* Субъединица α стимулирующего G-белка (G_s) передает сигнал от этих рецепторов АЦ.

* Связывание с АЦ стимулирует внутреннюю активность ГТРаза субъединицы α_s . Гидролиз ГТР инактивирует α_s , а следовательно, и АЦ.

* Эффекты цАМФ в первую очередь опосредуются цАМФ-зависимой протеинкиназой (ПКА).

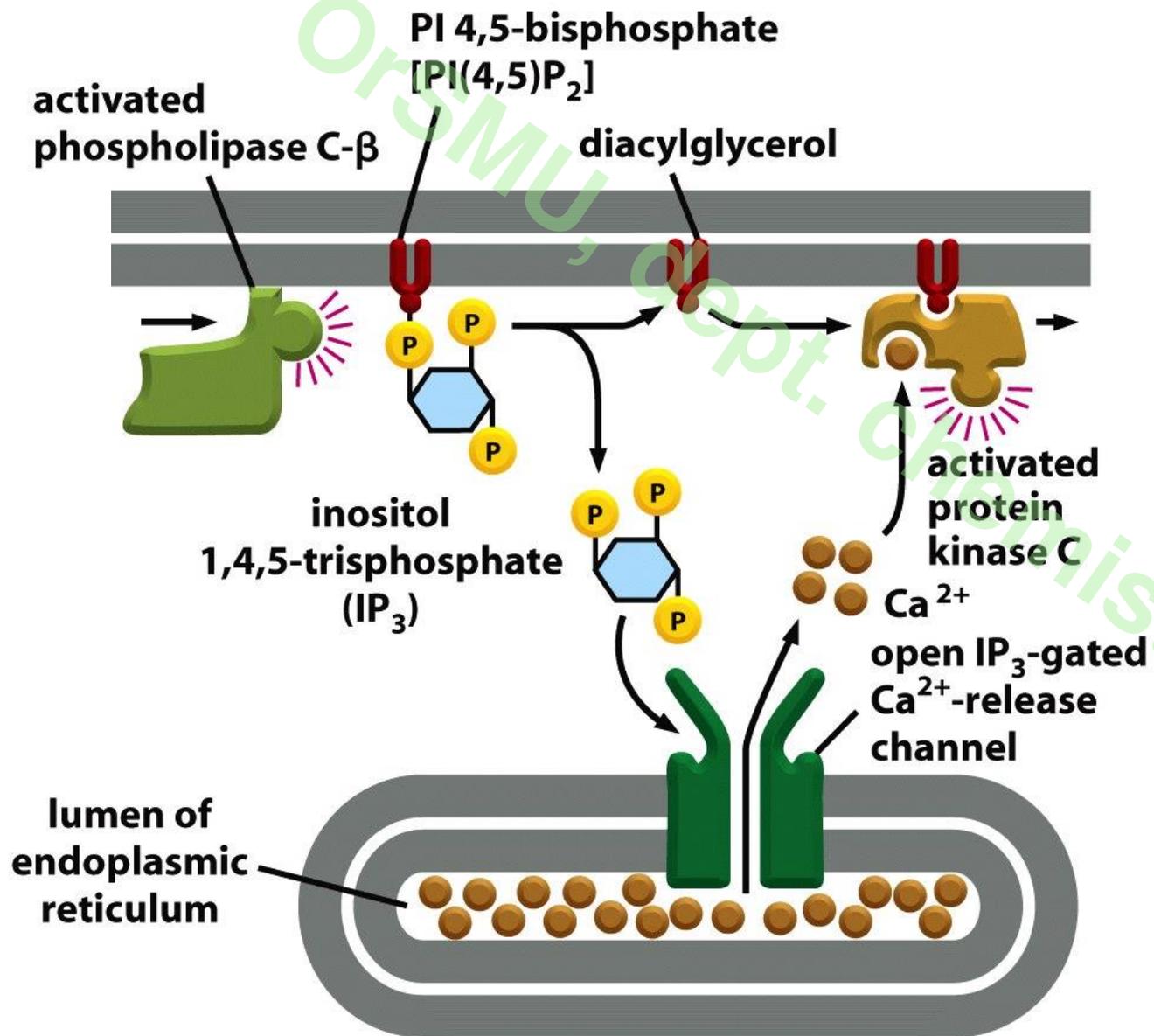
G-белки и инозитолфосфатная система передачи сигнала (кальций- фосфолипидный механизм передачи сигнала)

- * Многие GPCR проявляют свои эффекты через G-белки, которые активируют связанный с плазматической мембраной фермент - фосфолипазу C_β (PLC_β).
- * Активированная PLC_β расщепляет фосфатидинозитол 4,5-бисфосфат с образованием двух продуктов: инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃) и диацилглицерола (ДАГ).
- * ИФ₃ представляет собой водорастворимую сигнальную молекулу, которая запускает открытие Ca²⁺ каналов, управляемых ИФ₃, в мембране ЭР.
- * Открытие этих каналов приводит к выходу в цитоплазму Ca²⁺, хранящихся в просвете ЭР.
- * ДАГ остается в плазматической мембране и вместе с Ca²⁺ участвует в активации протеинкиназы C (PKC).



Многие GPCR проявляют свои эффекты через G-белки, которые активируют связанный с плазматической мембраной фермент - фосфолипазу C-β (PLC-β)

G-белки и инозитолфосфатная система передачи сигнала

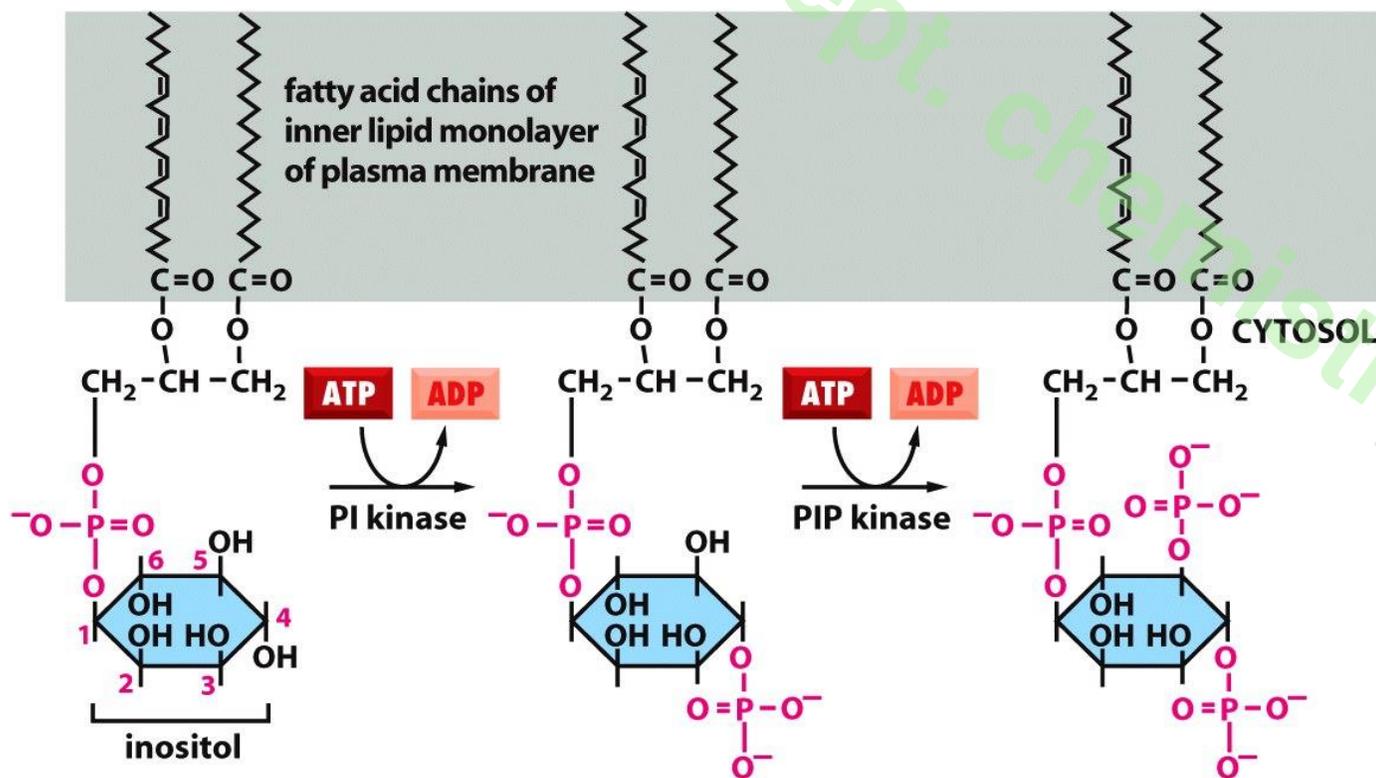


Активированная PLC β расщепляет фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP $_2$) с образованием двух продуктов: инозитол-1,4,5-трифосфата (IP $_3$) и диацилглицерола.

Есть различные фосфорилированные формы фосфатидинозитола

fatty acid chains of outer lipid monolayer of plasma membrane

fatty acid chains of inner lipid monolayer of plasma membrane



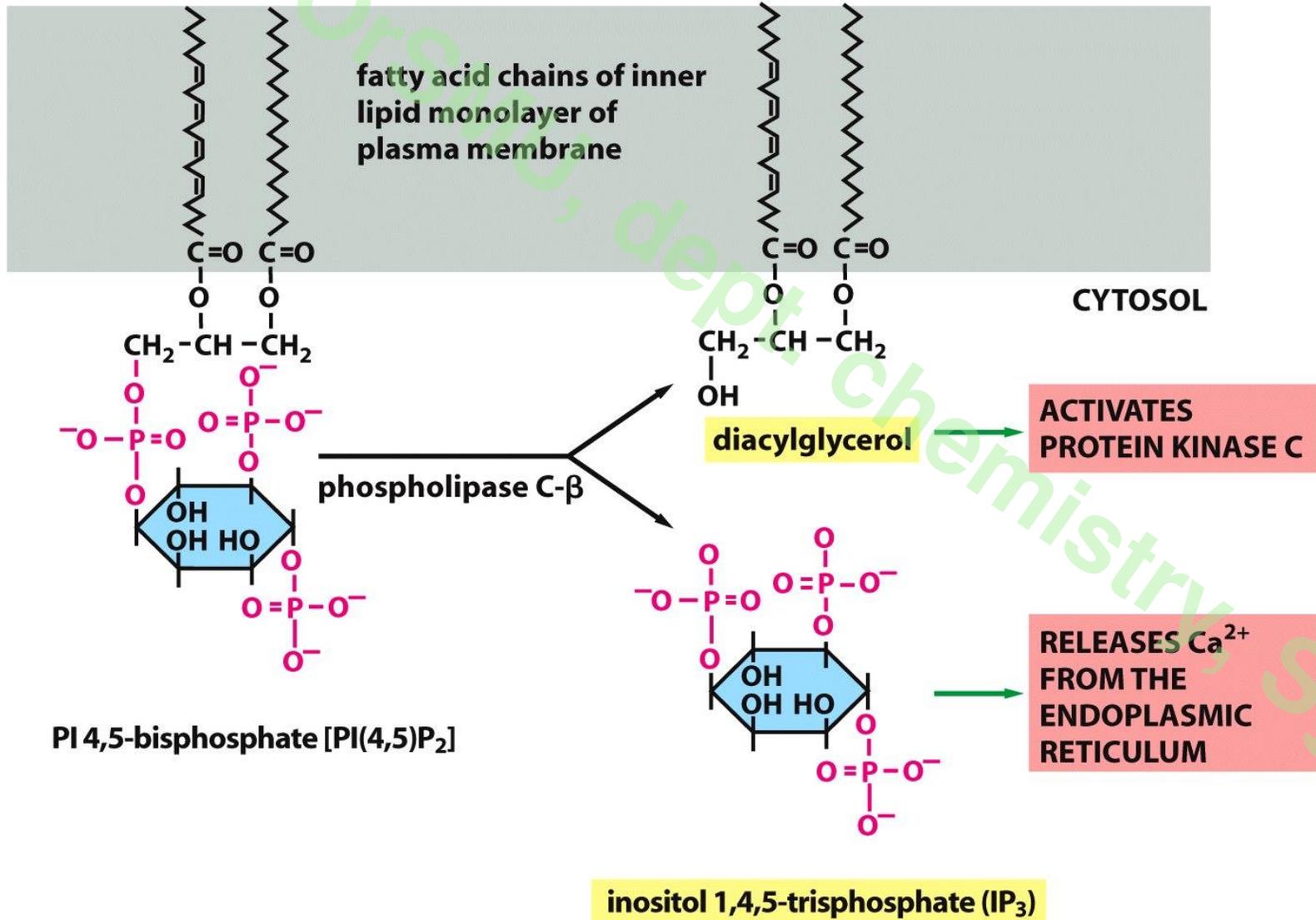
phosphatidylinositol (PI)

PI 4-phosphate [PI(4)P]

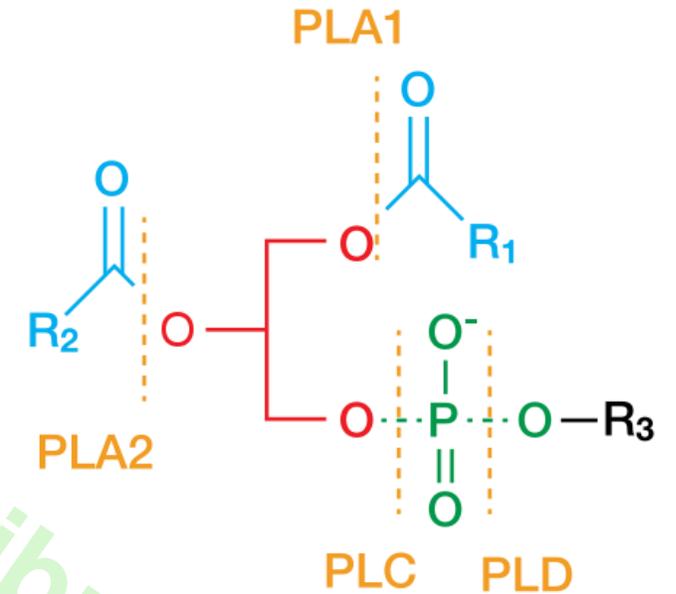
PI 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂]

Фосфатидинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ2) является второстепенным фосфолипидным компонентом клеточных мембран. Наиболее распространенные жирные кислоты в составе ФИФ2 - стеариновая в 1 положении и арахидоновая во 2.

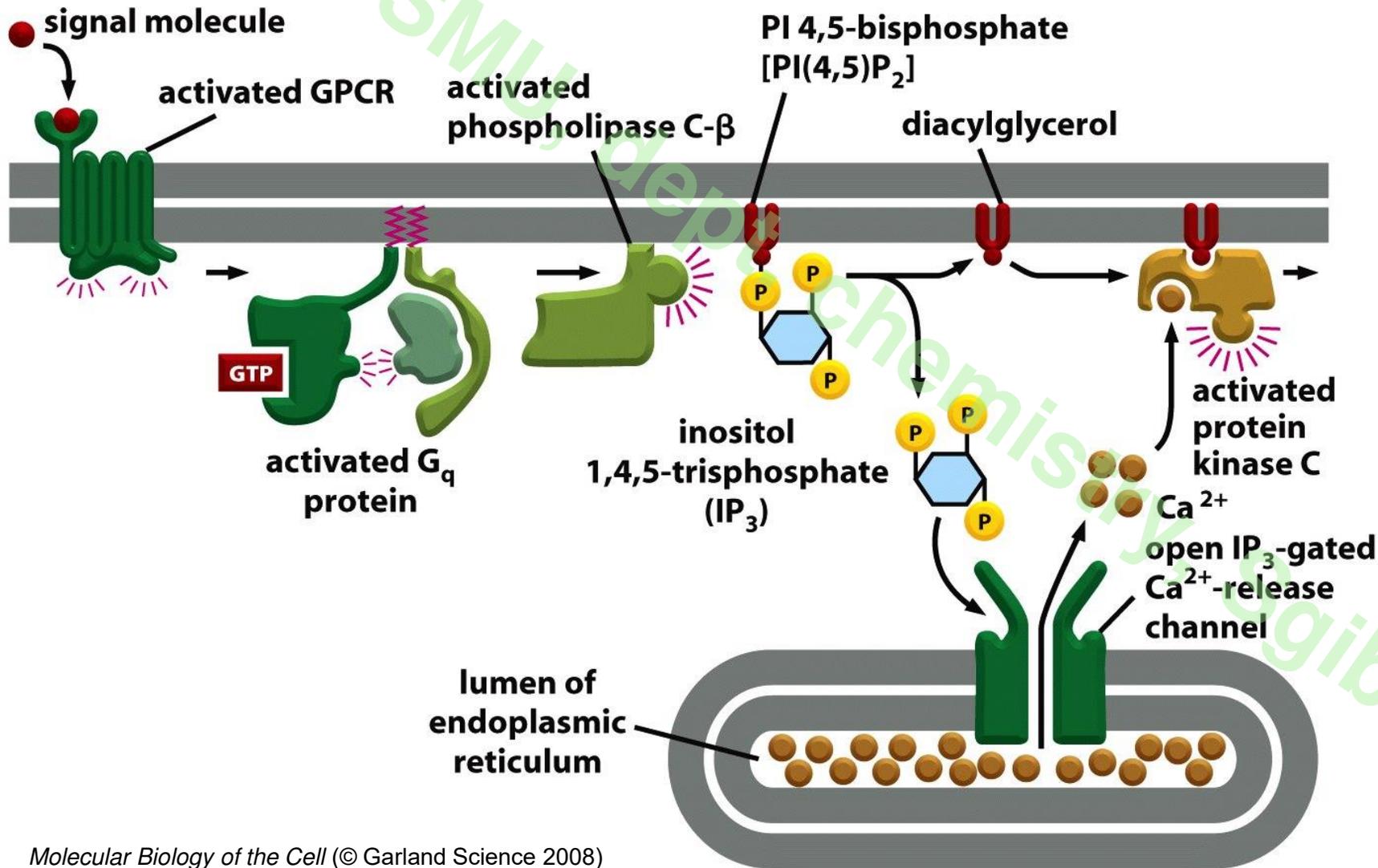
Гидролиз ФИ(4,5)Ф₂ фосфолипазой С-β



Фосфолипаза С (PLC) - это класс мембранно-ассоциированных ферментов, которые расщепляют фосфолипиды непосредственно перед фосфатной группой

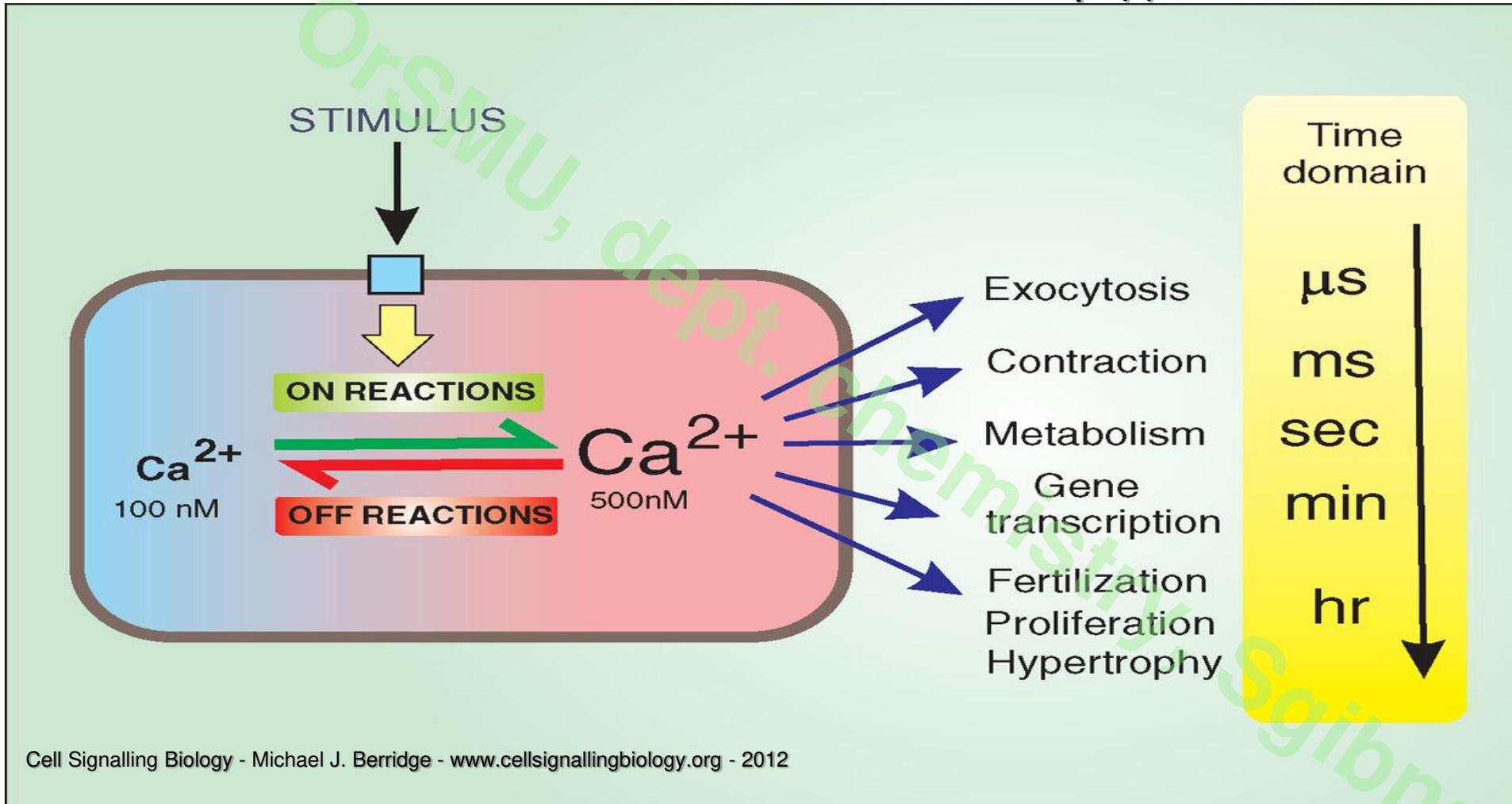


GPCRs повышают концентрацию Ca^{2+} в цитозоле и активируют PKC



Резкое повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (до 500-1000 нМ) происходит в результате открывания кальциевых каналов плазматической мембраны или внутриклеточных кальциевых депо (гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума).

Основные механизмы механизм передачи сигналов Ca^{2+}



Концентрация Ca^{2+} в клетках в состоянии покоя составляет приблизительно 100 нМ, но она увеличивается до 500 нМ или более после стимула

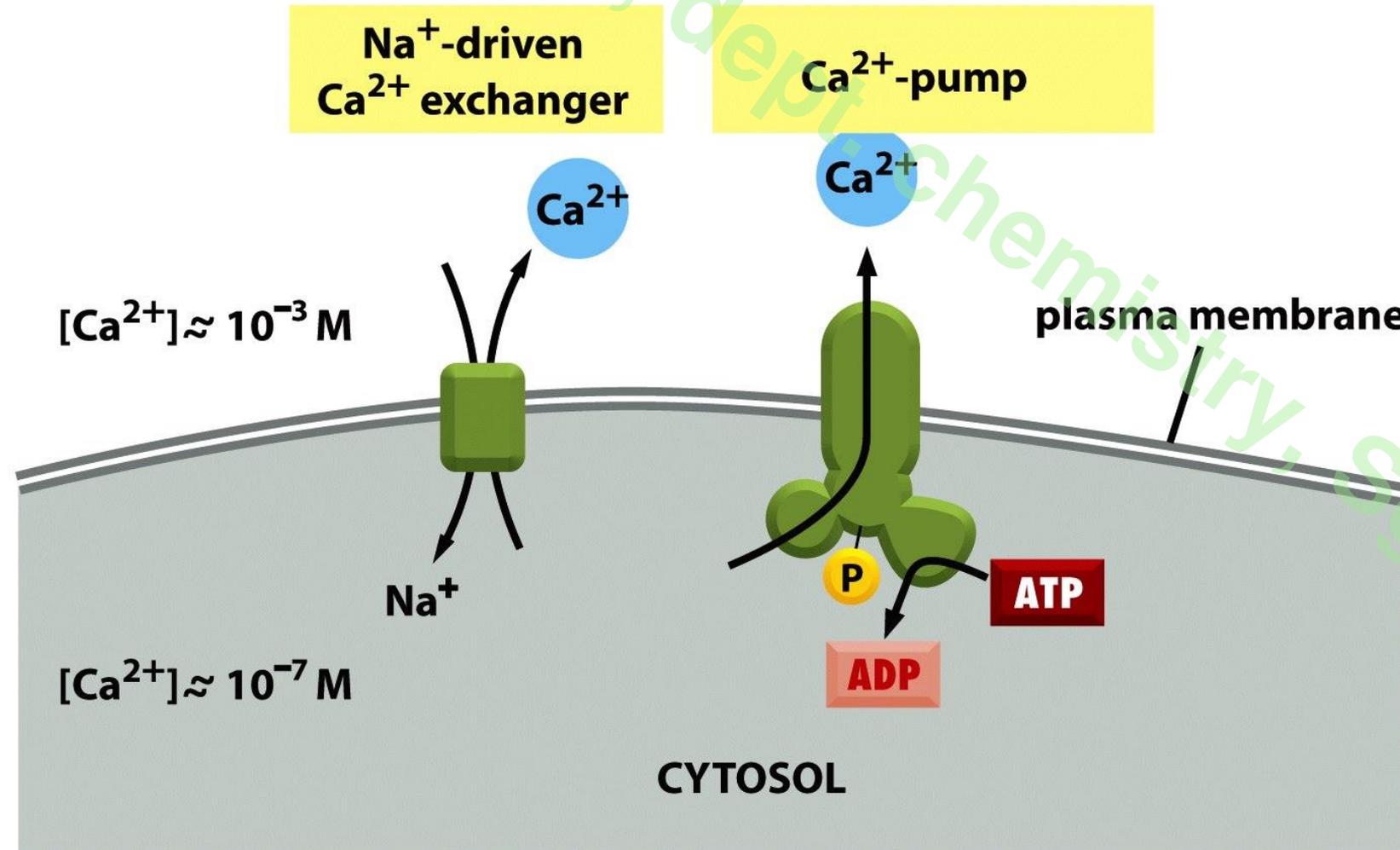
Cell Signalling Biology - Michael J. Berridge - www.cellsignallingbiology.org - 2012

Ca^{2+} - это универсальный вторичный мессенджер, способный активировать множество различных клеточных процессов, действующих в очень широком временном диапазоне.

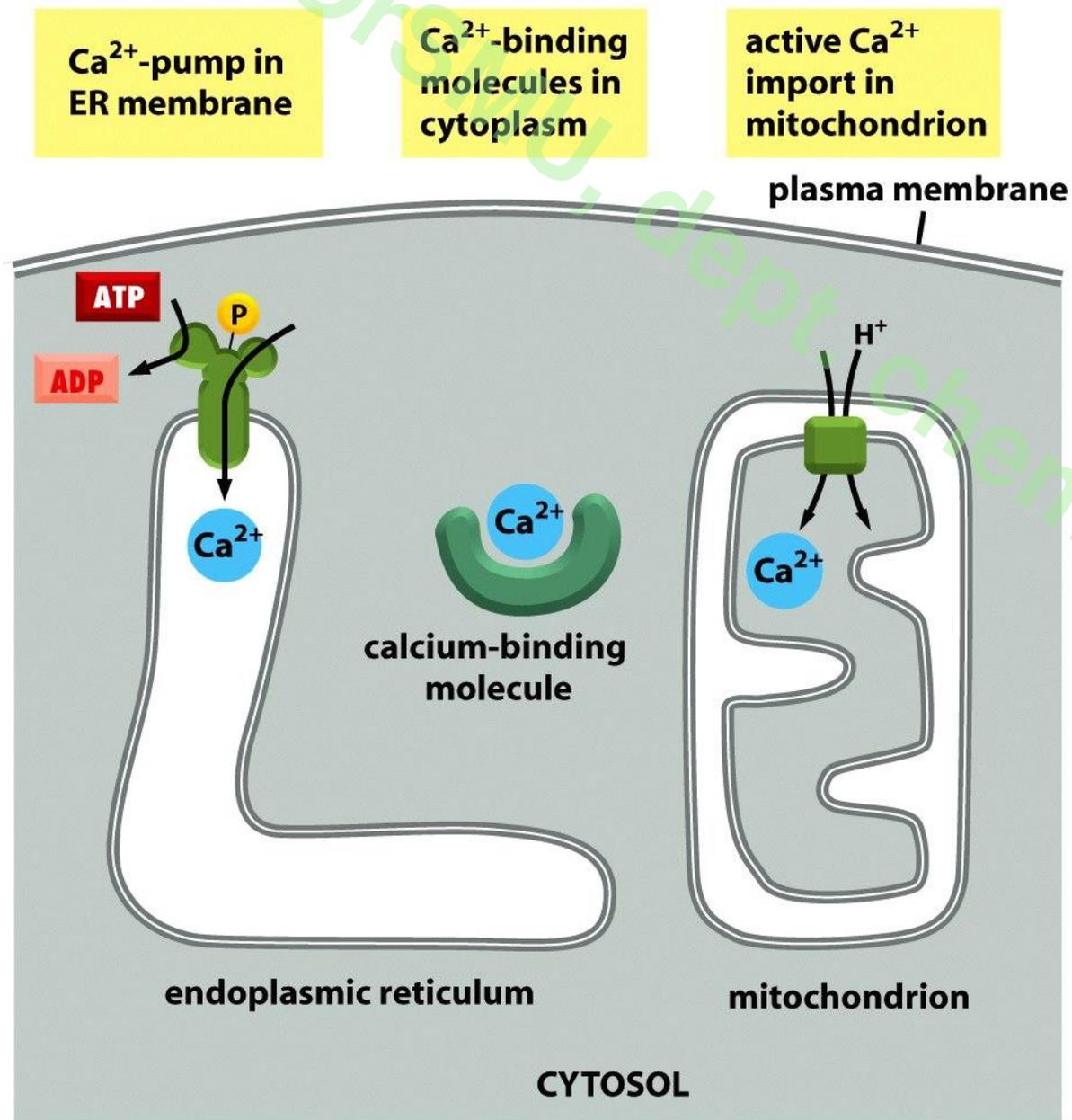
Поддержание низкой $[Ca^{2+}]$ в цитоплазме: 2 способа

Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме не стимулированной клетки очень низка (10-100 нМ).

Низкий уровень Ca^{2+} может поддерживаться кальциевыми АТФ-зами и натрий-кальциевыми обменниками внешней мембраны клетки (выведение Ca^{2+} из клетки во внеклеточное пространство) или...

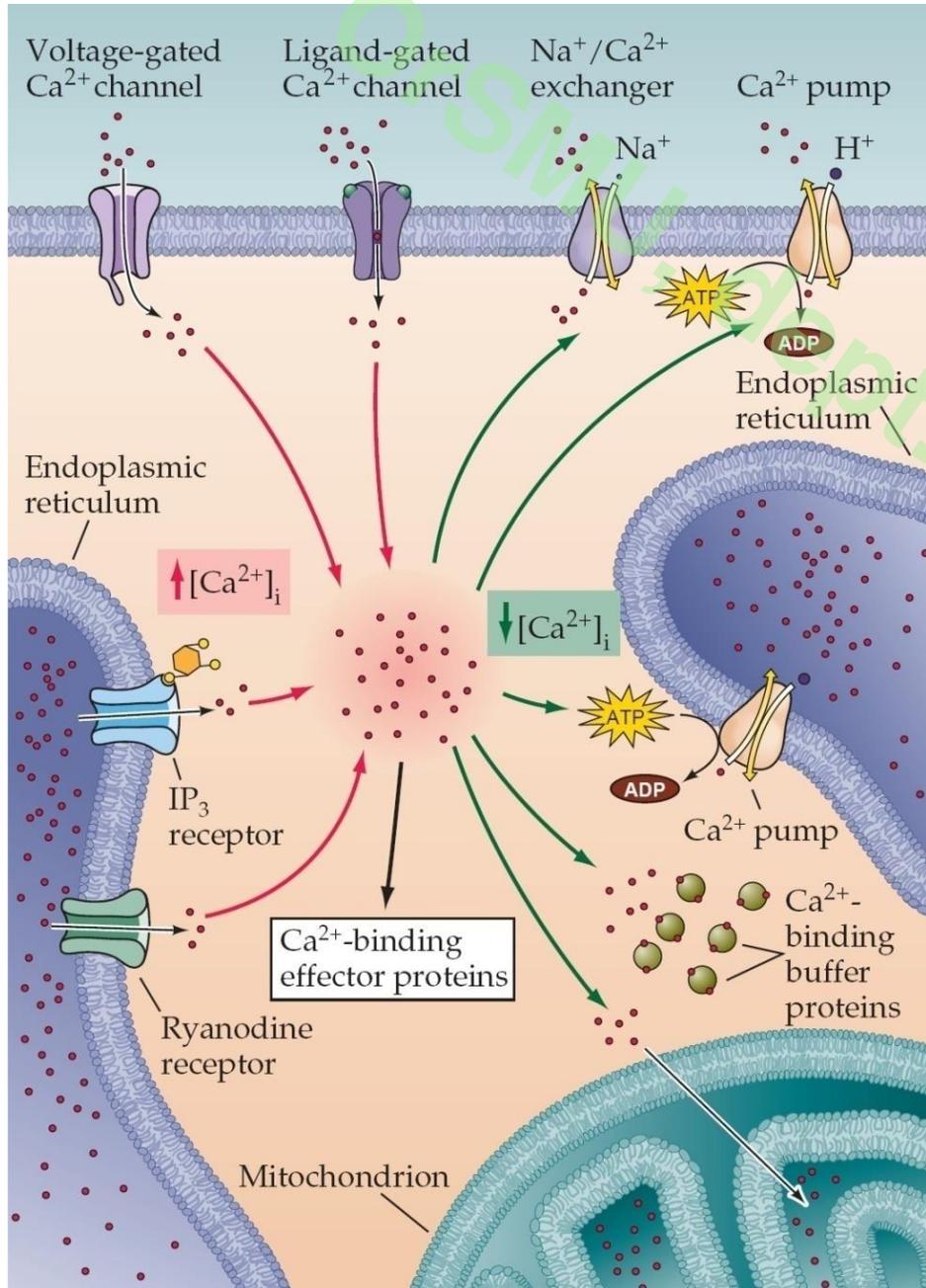


Поддержание низкой $[Ca^{2+}]$ в цитоплазме



...Ca²⁺ может закачиваться в митохондрии и ЭПР или связываться Ca²⁺-связывающими белками.

Ca²⁺: поддержание внутриклеточной концентрации



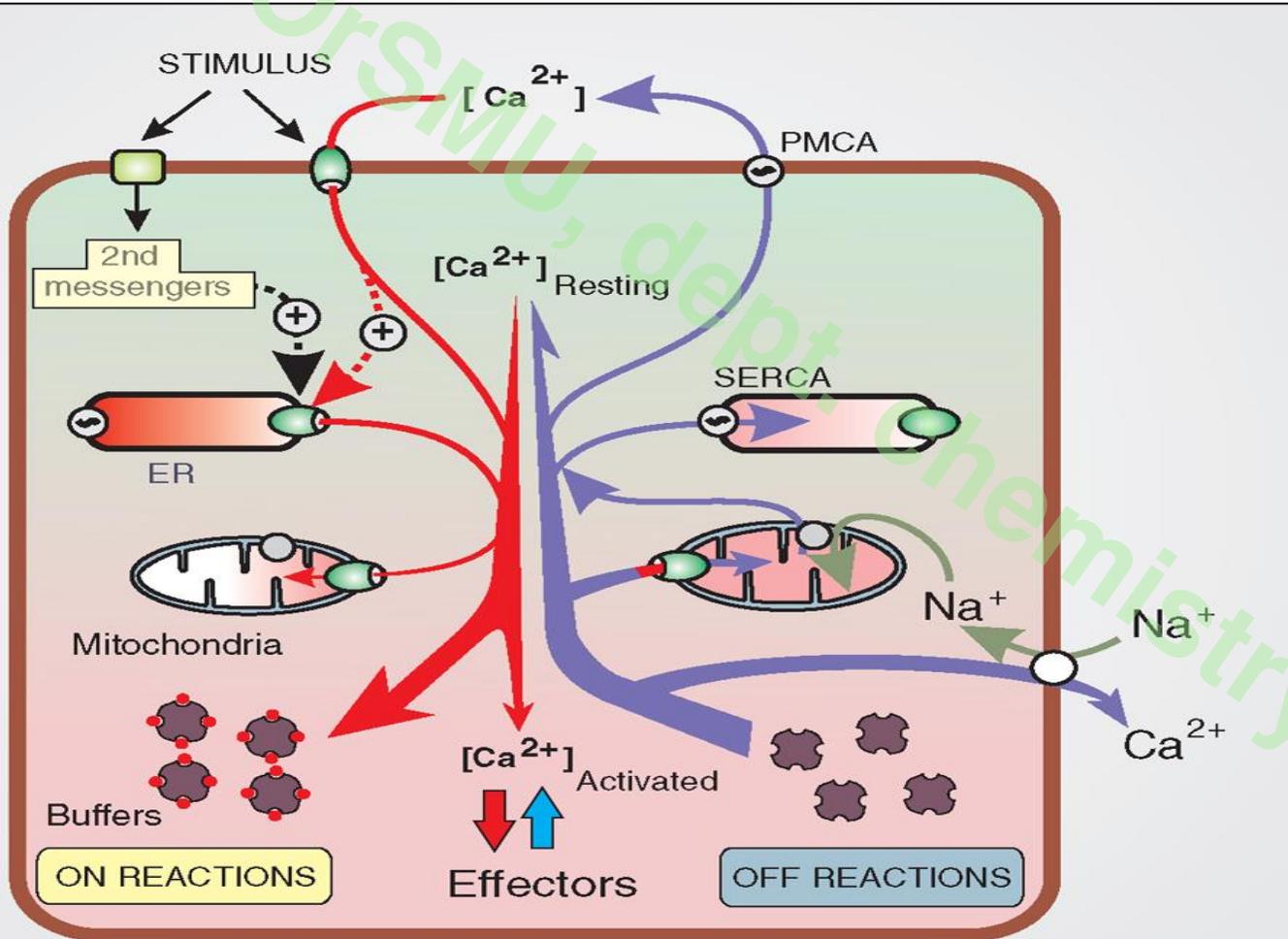
Высокий градиент Ca^{2+} поддерживается системами **активного транспорта** (Ca^{2+} -насосом и Na^+/Ca^{2+} -обменником).

Цитоплазматический Ca^{2+} закачивается специальными Ca^{2+} -насосами в эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Эти органеллы выступают в роли **внутриклеточных Ca^{2+} -депо**.

В клетках присутствует Ca^{2+} -связывающий белок **калбиндин** (от англ., *Ca^{2+} -binding protein*), который выступает в качестве **Ca^{2+} -буфера**.

Такие буферные системы, обратимо связывающие Ca^{2+} , **демпфируют амплитуду и кинетику** Ca^{2+} -сигнала внутри клетки.

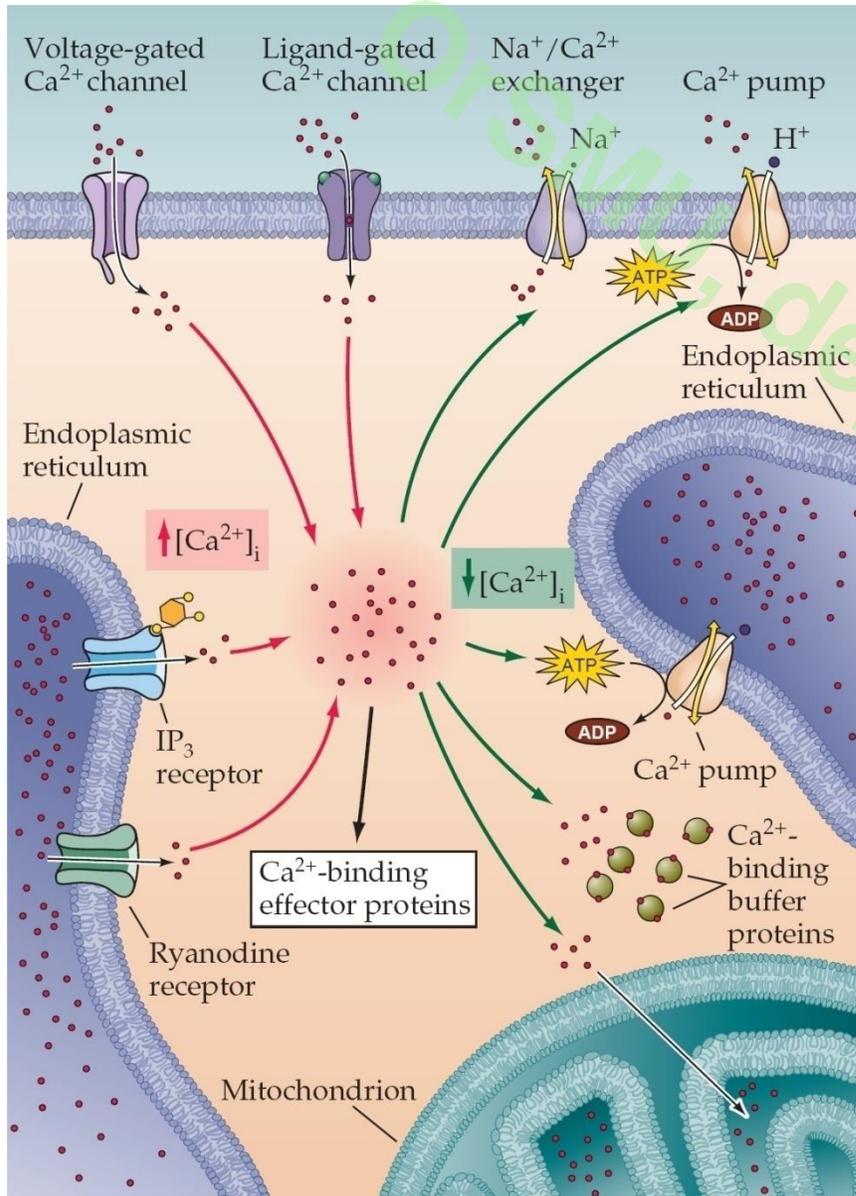
Регуляция динамики передачи сигналов Ca^{2+}



Динамика передачи сигналов Ca^{2+} регулируется взаимодействием между реакциями включения и выключения, которые контролируют потоки Ca^{2+} как через плазматическую мембрану, так и через мембраны органеллы, (эндоплазматический ретикулум и митохондрии).

Внешние стимулы активируют реакции включения, которые вводят Ca^{2+} в цитоплазму либо через каналы в плазматической мембране, либо из внутренних хранилищ, таких как ER. Реакции выключения удаляют Ca^{2+} из цитоплазмы (в состоянии покоя, эти реакции выключения поддерживают низкую концентрацию Ca^{2+}

При повышении в цитоплазме концентрации Ca^{2+}



Ca^{2+} поступает в клетку из внеклеточной среды по **потенциал- и лиганд-зависимым Ca^{2+} -каналам** плазматической мембраны.

Ca^{2+} высвобождается в цитозоль из цистерн **эндоплазматического ретикулума**. Эти каналы активируются в ответ на различные внутриклеточные сигналы:

- **Инозитол-трифосфатный (ИФ3-) рецептор**. ИФ3 является вторичным посредником, синтезируемым в результате активации метаботропных рецепторов.

- **Рианодиновый рецептор**. Рианодин является экзогенным лигандом, который связывается с этим рецептором и частично открывает Ca^{2+} -канал. Этот рецептор активируется внутриклеточным Ca^{2+} , а в мышечных клетках – при деполяризации плазматической мембраны.

Рианодиновый рецептор

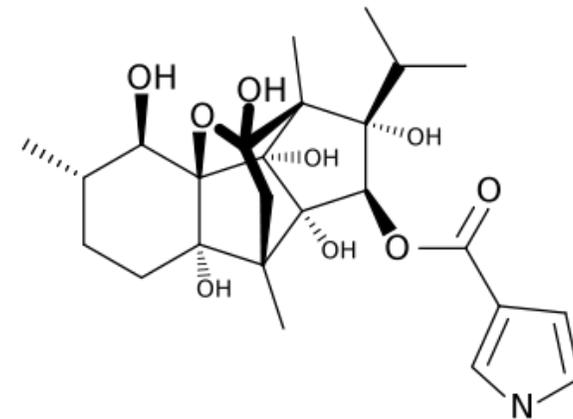
Рианодин – алкалоид растительного происхождения, который связывается с этим рецептором и частично открывает Ca^{2+} -канал.

Этот рецептор активируется **внутриклеточным Ca^{2+}** (положительная обратная связь).

В сердце и поджелудочной железе активируется также другим вторичным посредником - циклической АДФ-рибозой.

На каналы изолированные из мышц позвоночных и ракообразных рианодин в концентрациях от нМ до мкМ оказывает активирующее влияние, тогда как в концентрациях выше 100 мкМ он вызывает полное закрытие каналов.

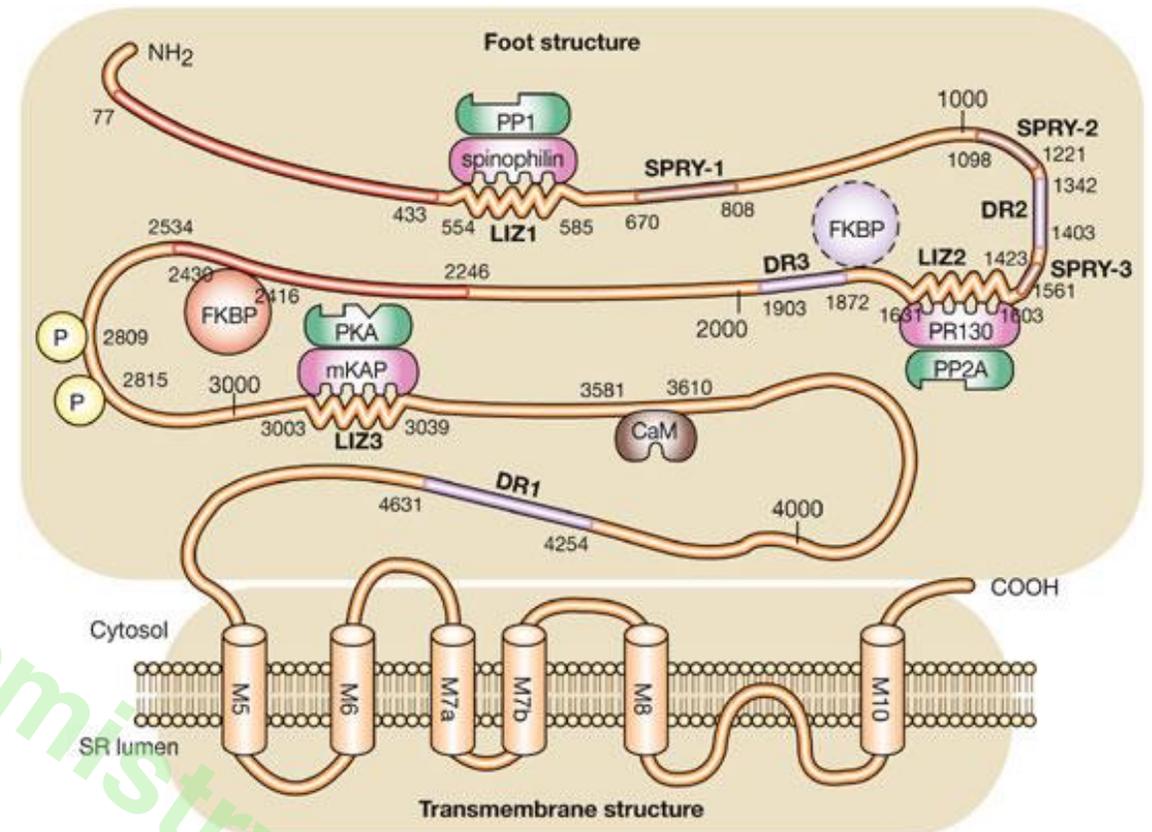
RyR активируются миллимолярными **концентрациями кофеина**. Высокие (более 5 ммоль/л) концентрации кофеина вызывают выраженное повышение (от микромолярной до пикомолярной) чувствительности RyR к Ca в присутствии кофеина, так что базальные концентрации Ca становятся активирующими.



Рианодиновый рецептор

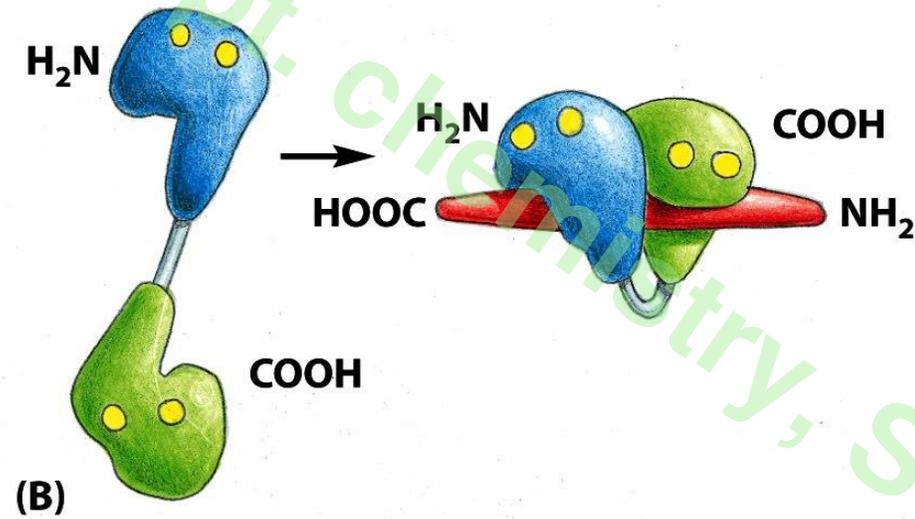
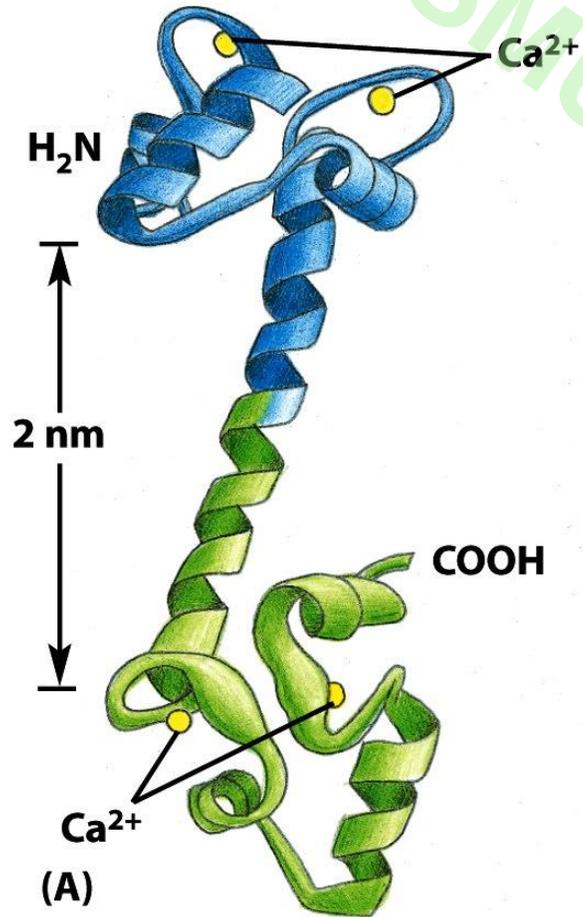
- Показаны первичная структура сердечного рианодинового рецептора и связывающие домены протеинфосфатаз 1 и 2А, протеинкиназы А, кальмодулина и FKBP12.6.
- Протеинфосфатазы 1 и 2А и протеинкиназа А связываются с сердечным рианодиновым рецептором через свои специфические адаптерные белки. Указаны три основных расходящихся (негомологичных) области. Показаны шесть трансмембранных сегментов.

CaM- кальмодулин; DR – негомологичные области; Кальстатин-2; LIZ - лейцин-изолейциновая «молния»; PKA – протеинкиназа А; PP - протеинфосфатаза; SR -саркоплазматический ретикулум.



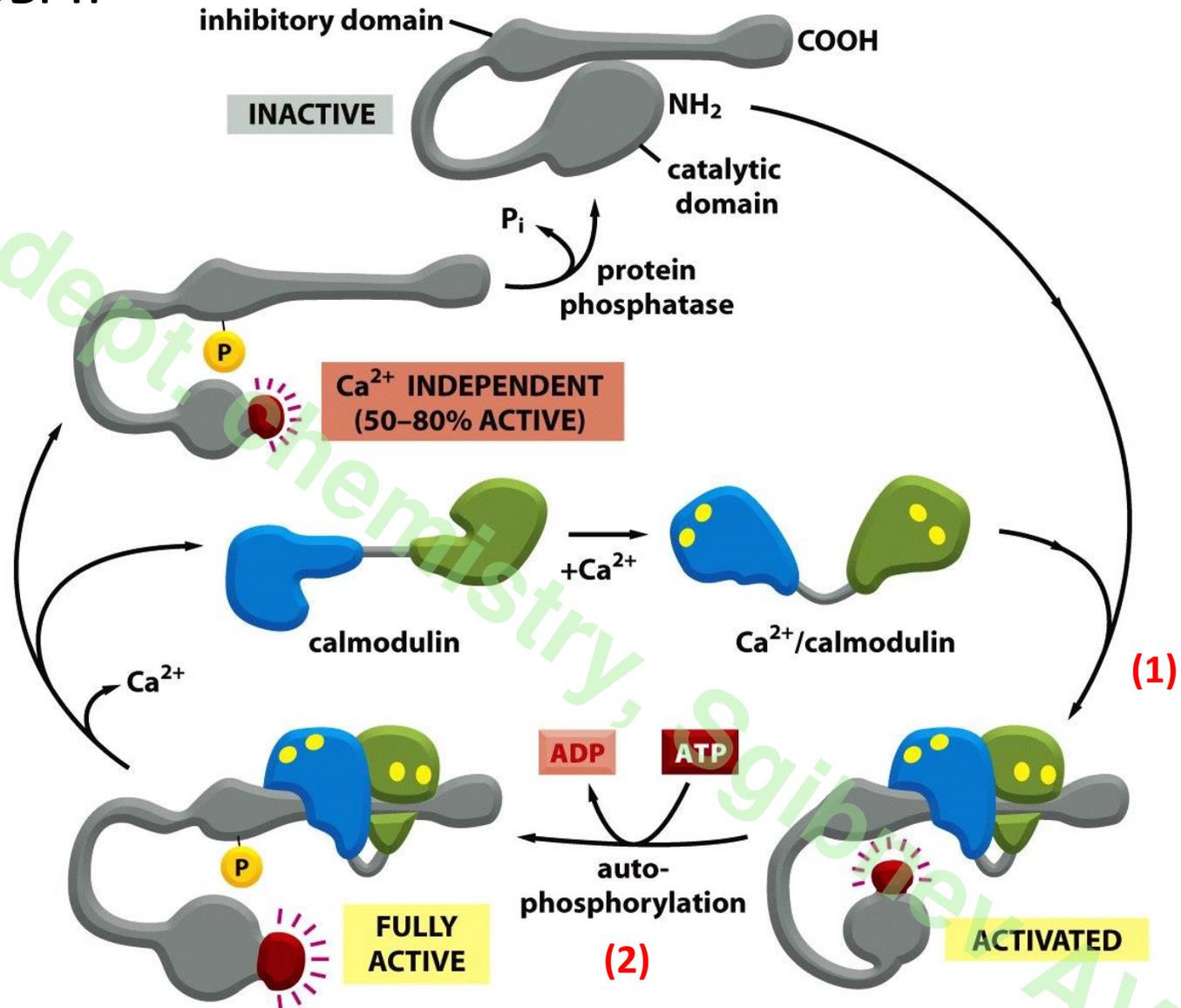
Yano M *et al.* (2006) Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: 43–52

Кальмодулин: основной Ca^{2+} -связывающий белок в цитоплазме



Связывание кальция часто приводит к существенным структурным изменениям в комплексе Ca^{2+} / кальмодулин

Активация СаМ-киназы II

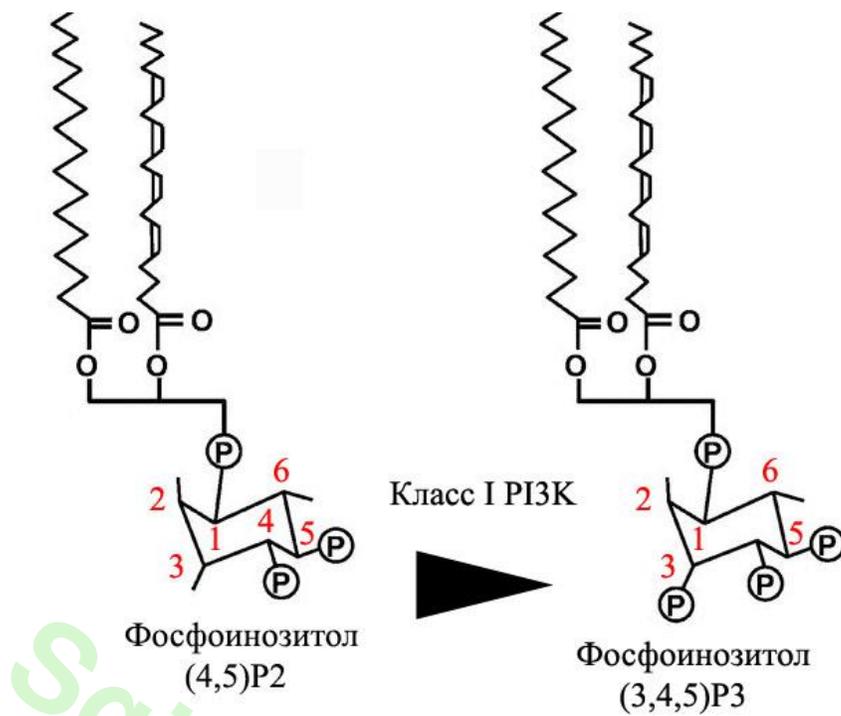
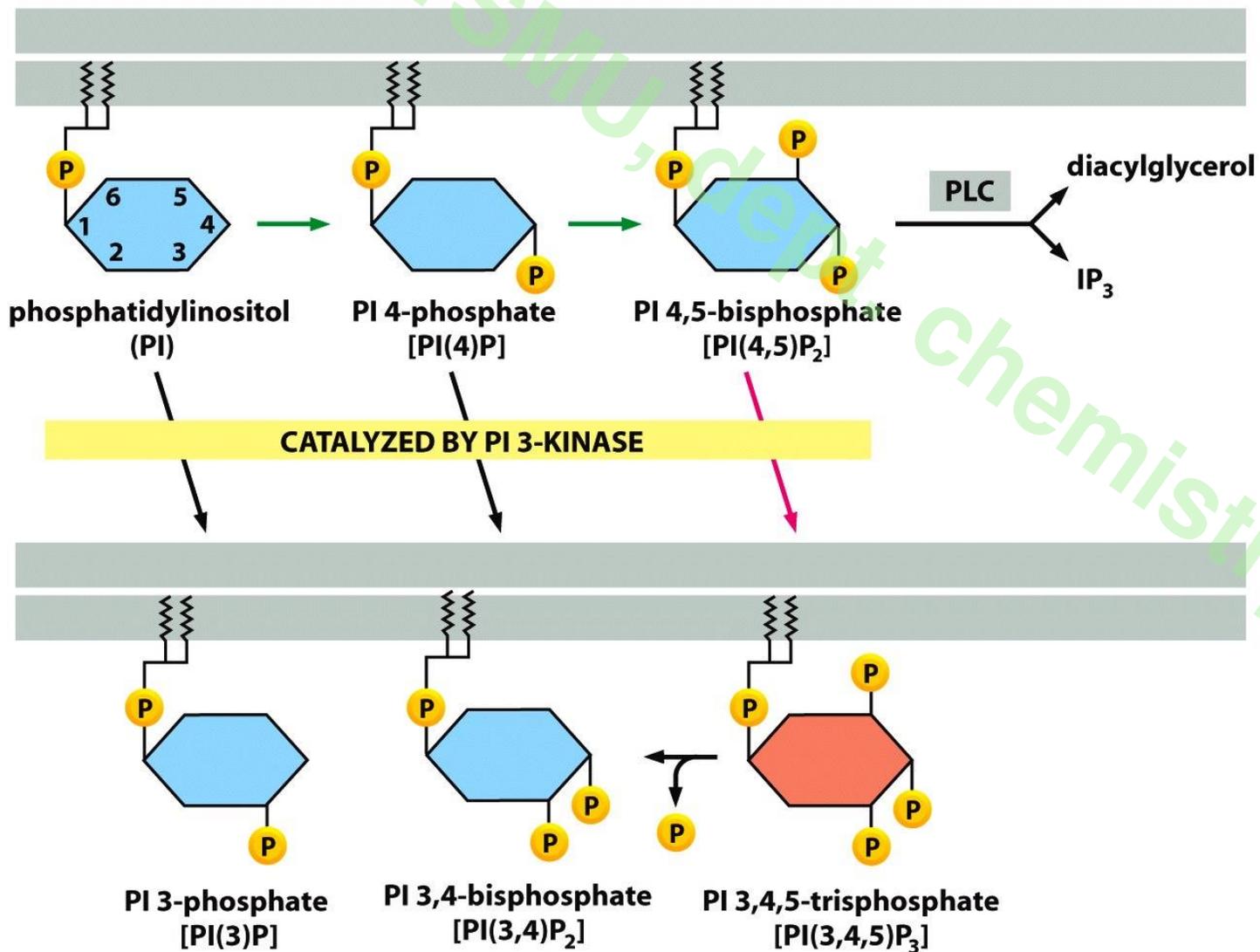


Фосфатидилинозитол (3,4,5) –трифосфат используется в других сигнальных путях

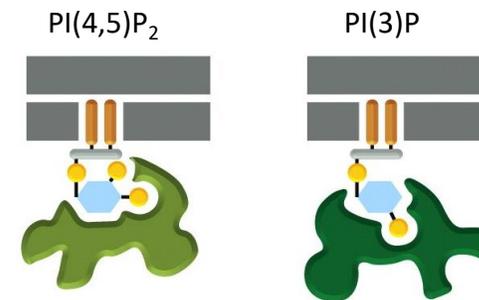
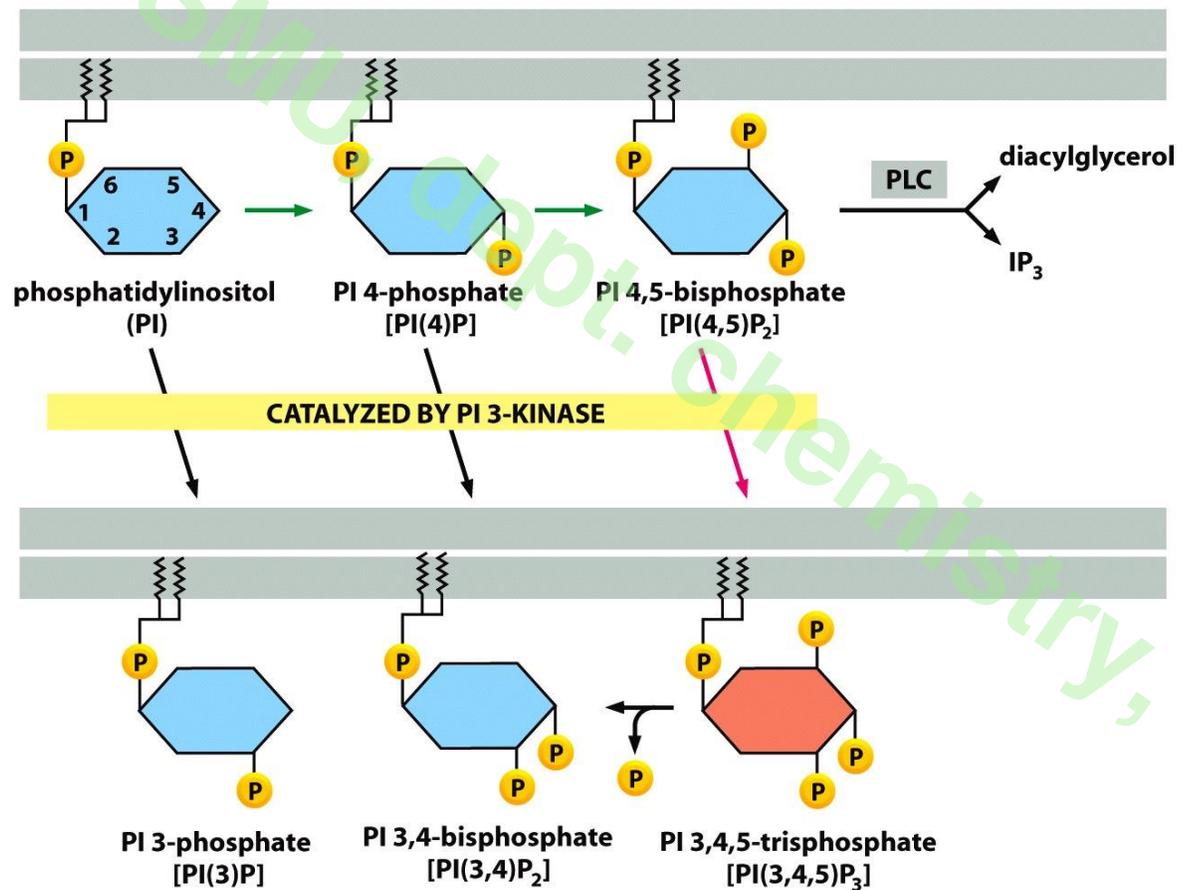
Передача сигналов с помощью фосфоинозитид-3-киназы

- Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) связывается с внутриклеточными доменами активированных молекул рецепторных тирозинкиназ.
- Эта киназа в первую очередь фосфорилирует инозитолфосфолипиды в 3' положении инозитолового кольца, а не белки.
- Один из этих продуктов, PI (3,4,5) P3, служит местом стыковки различных сигнальных белков.
- Некоторые из этих последних белков содержат домен гомологии плекстрина (PH), который опосредует взаимодействие с PI (3,4,5) P3. Протеинкиназа Akt представляет собой белок, содержащий домен PH, который является частью сигнального пути, обычно важного для стимулирования роста и выживания клеток.

Создание докинг-сайтов (сайтов стыковки) на основе PI с помощью фосфоинозитол-3-киназы



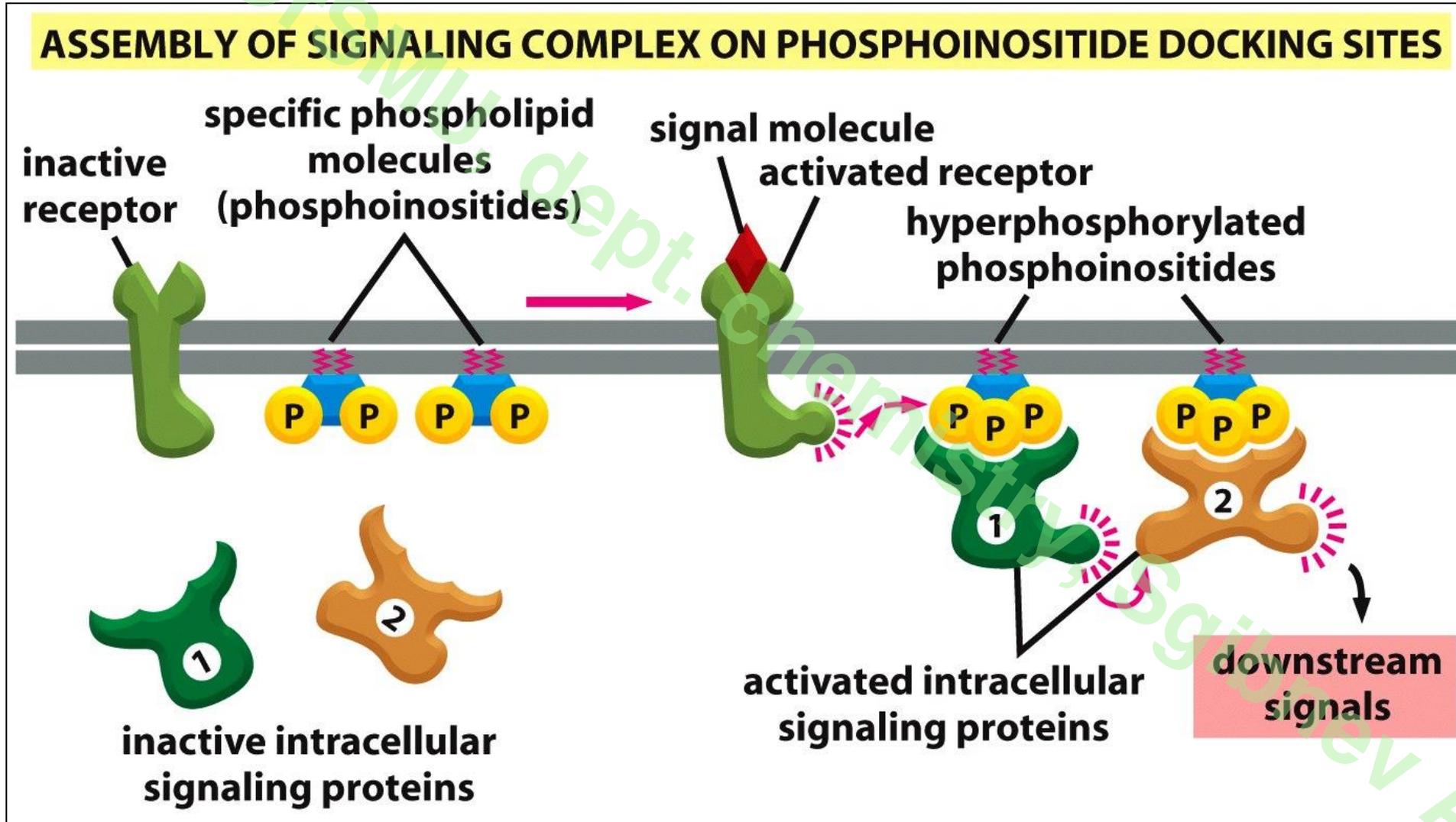
Создание докинг-сайтов (сайтов стыковки) на основе PI с помощью фосфоинозитол-3-киназы



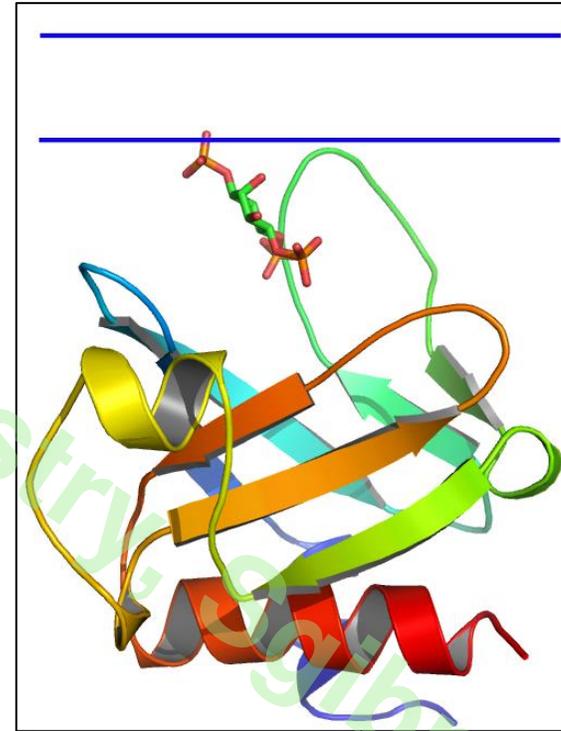
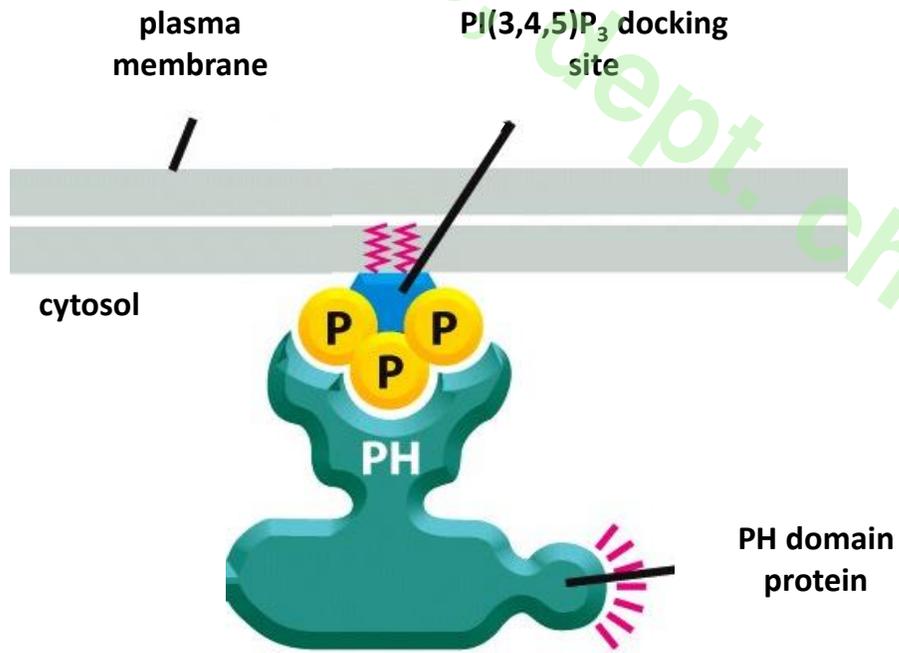
Головные группы фосфоинозитидов распознаются белковыми доменами, которые различают различные фосфорилированные формы.

Sgibnev AV

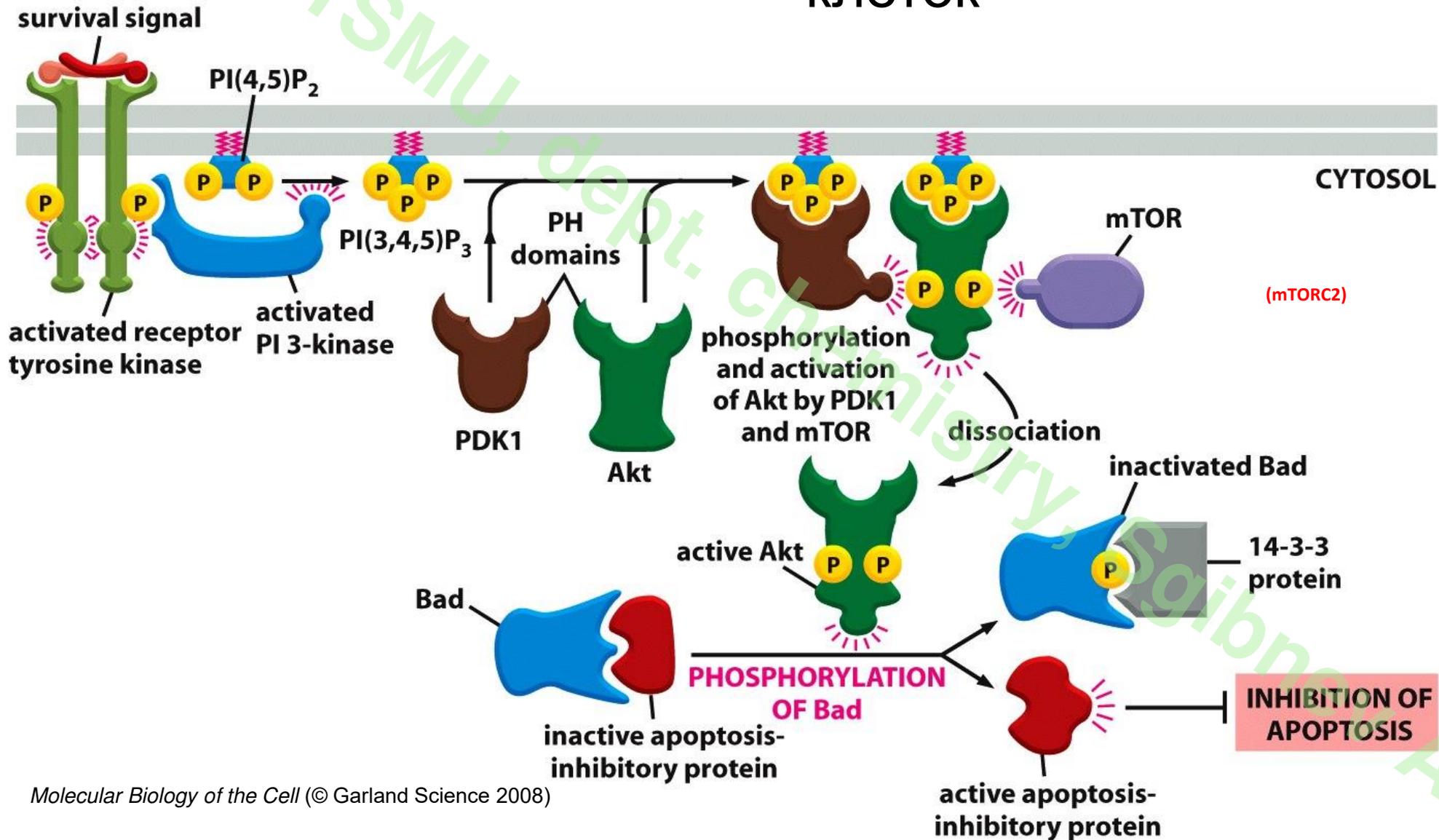
Передача сигналов с помощью фосфоинозитол-3-киназы



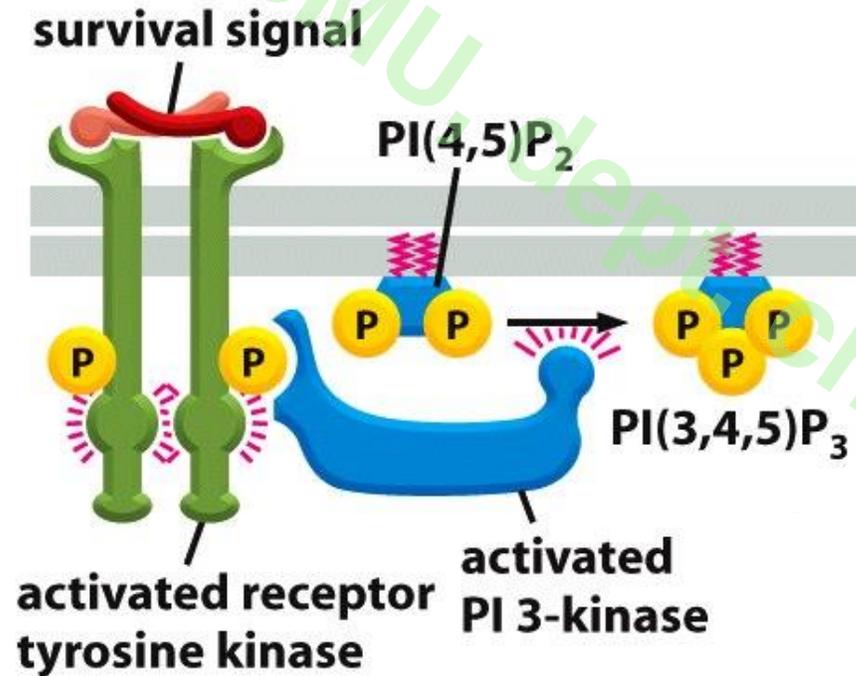
Домены гомологии плекстрина (PH) могут
связываться с $PI(3,4,5)P_3$



Путь передачи сигналов PI3K-Akt: обеспечение выживаемости клеток



1. Продукция PI(3,4,5)P₃

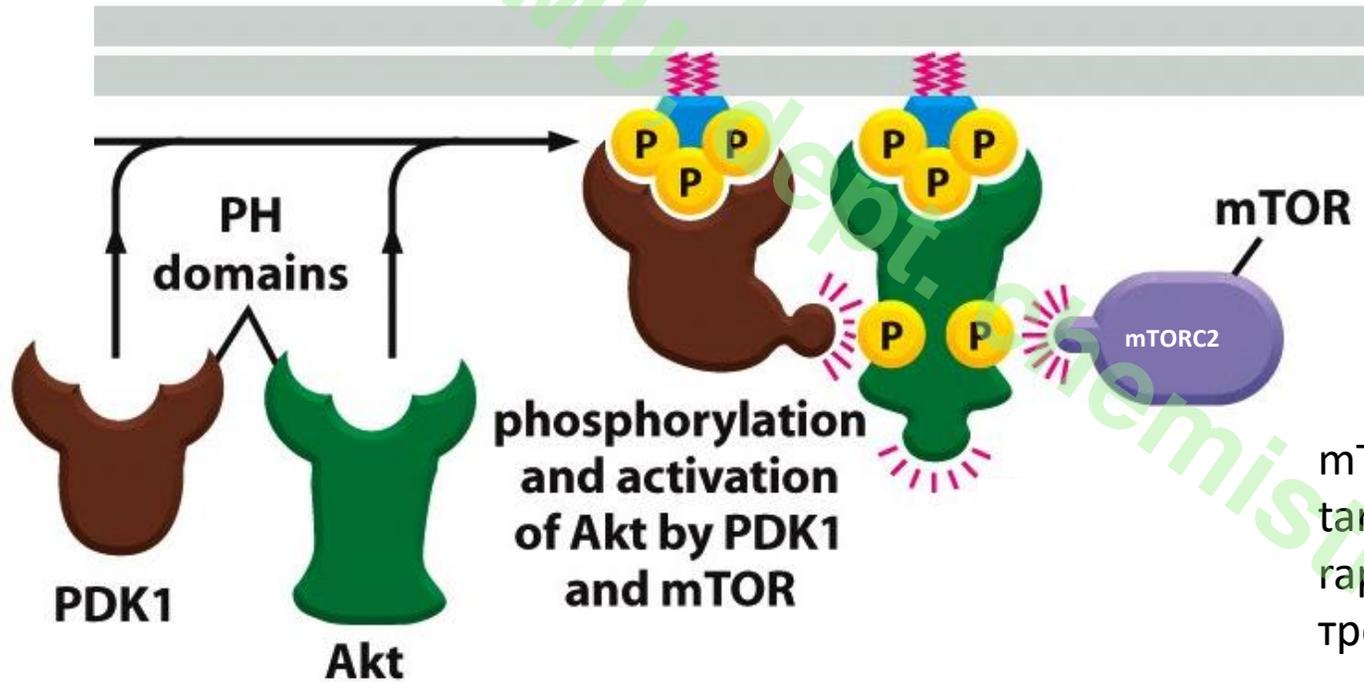


Путь передачи сигналов PI3K-Акт является основным путем, активируемым гормоном инсулином и инсулиноподобными факторами роста (IGF).

Члены семейства сигнальных белков инсулиноподобного фактора роста (IGF) стимулируют выживание и рост многих животных клеток.

Эти IGF связываются со специфическими RTK, которые активируют PI3K с образованием PI(3,4,5)P₃.

2. Рекрутирование и активация Akt

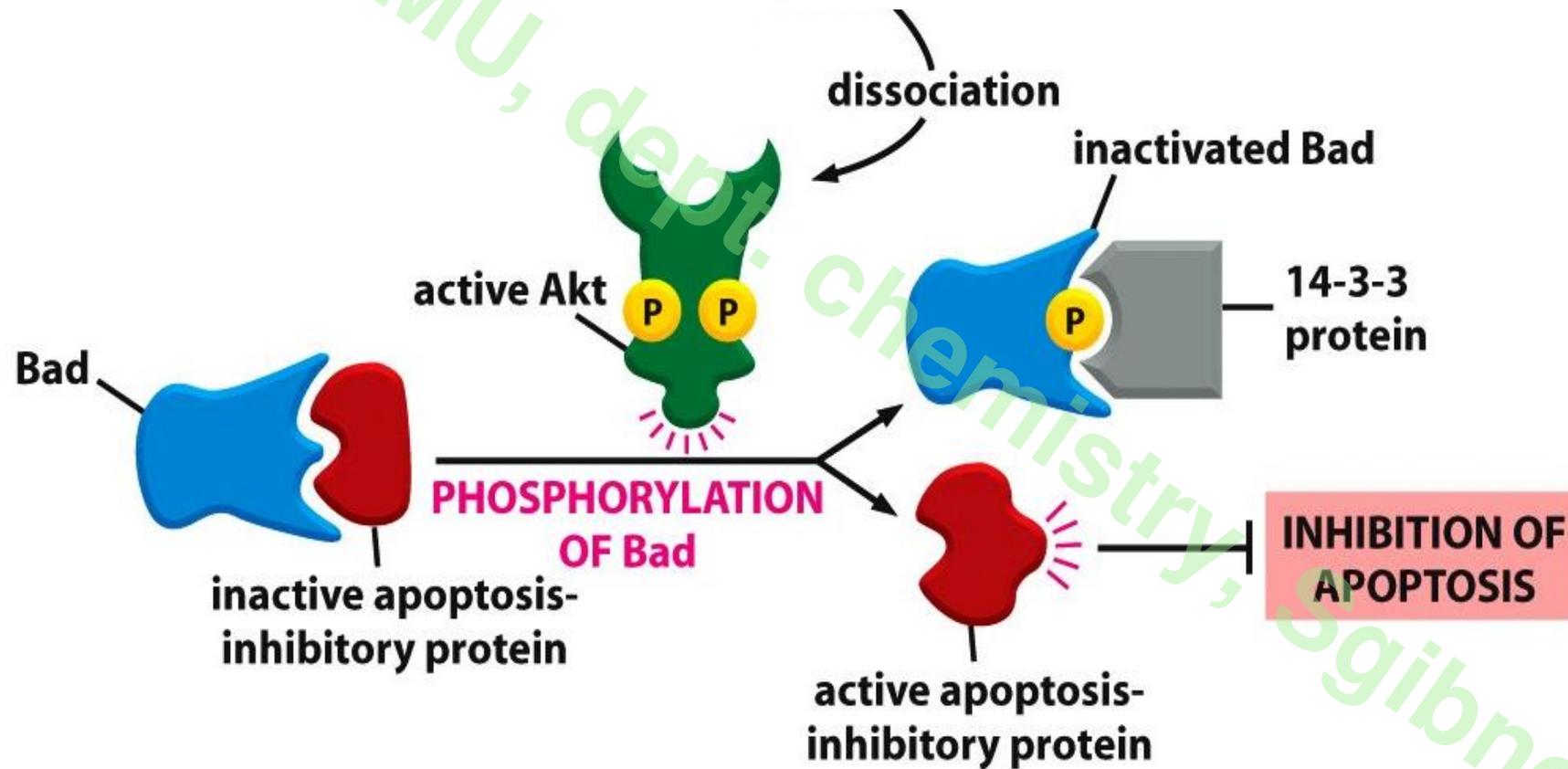


Обратите внимание, что требуется два фосфорилирования для активации Akt.

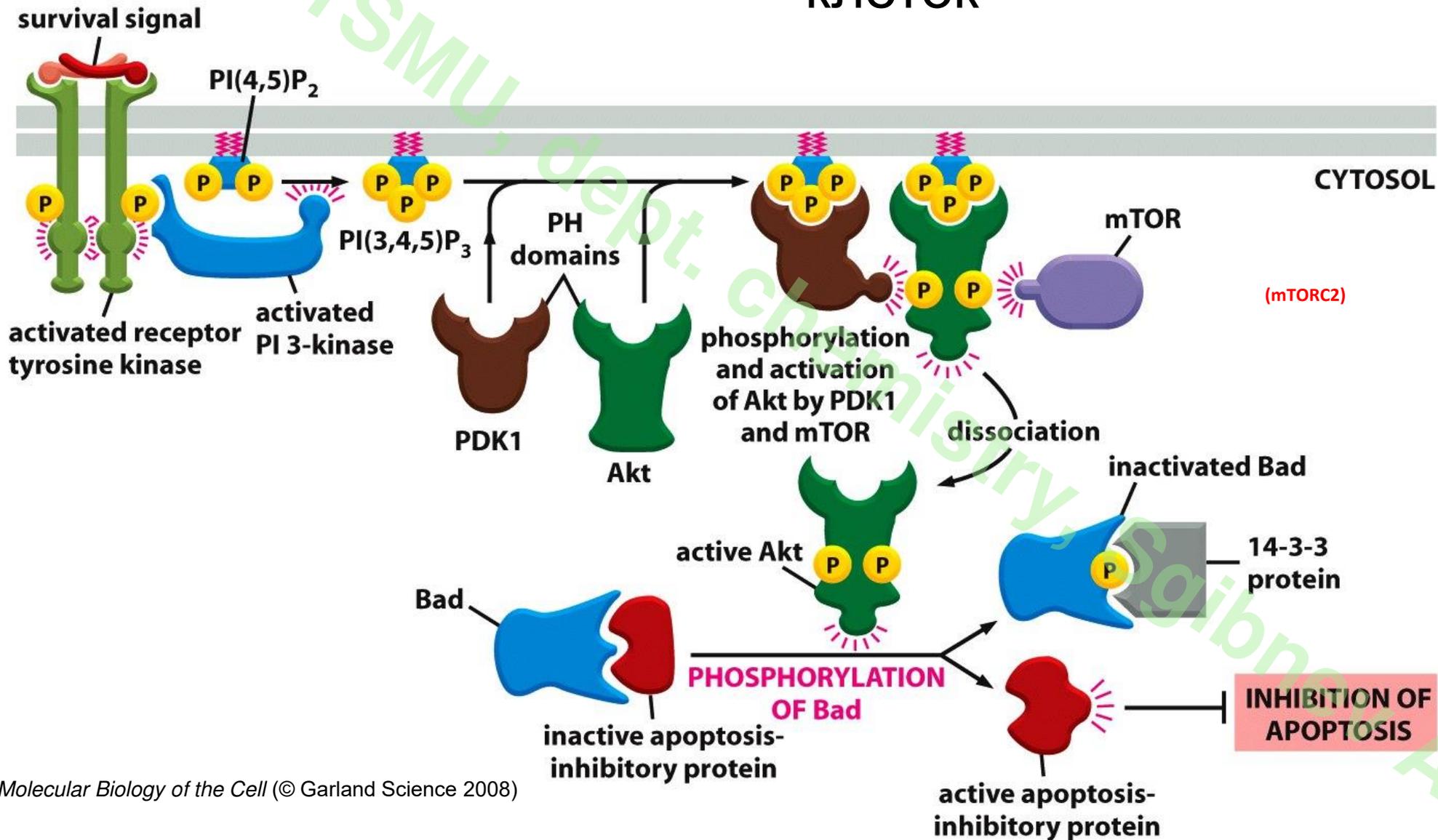
mTOR - вишень рапамицина млекопитающих (англ. target of rapamycin (TOR); mammalian target of rapamycin (mTOR)— протеинкиназа серин-треониновой специфичности

PDK1 = Phosphoinositol-Dependent Kinase 1

3. Фосфорилирование BAD и ингибирование апоптоза



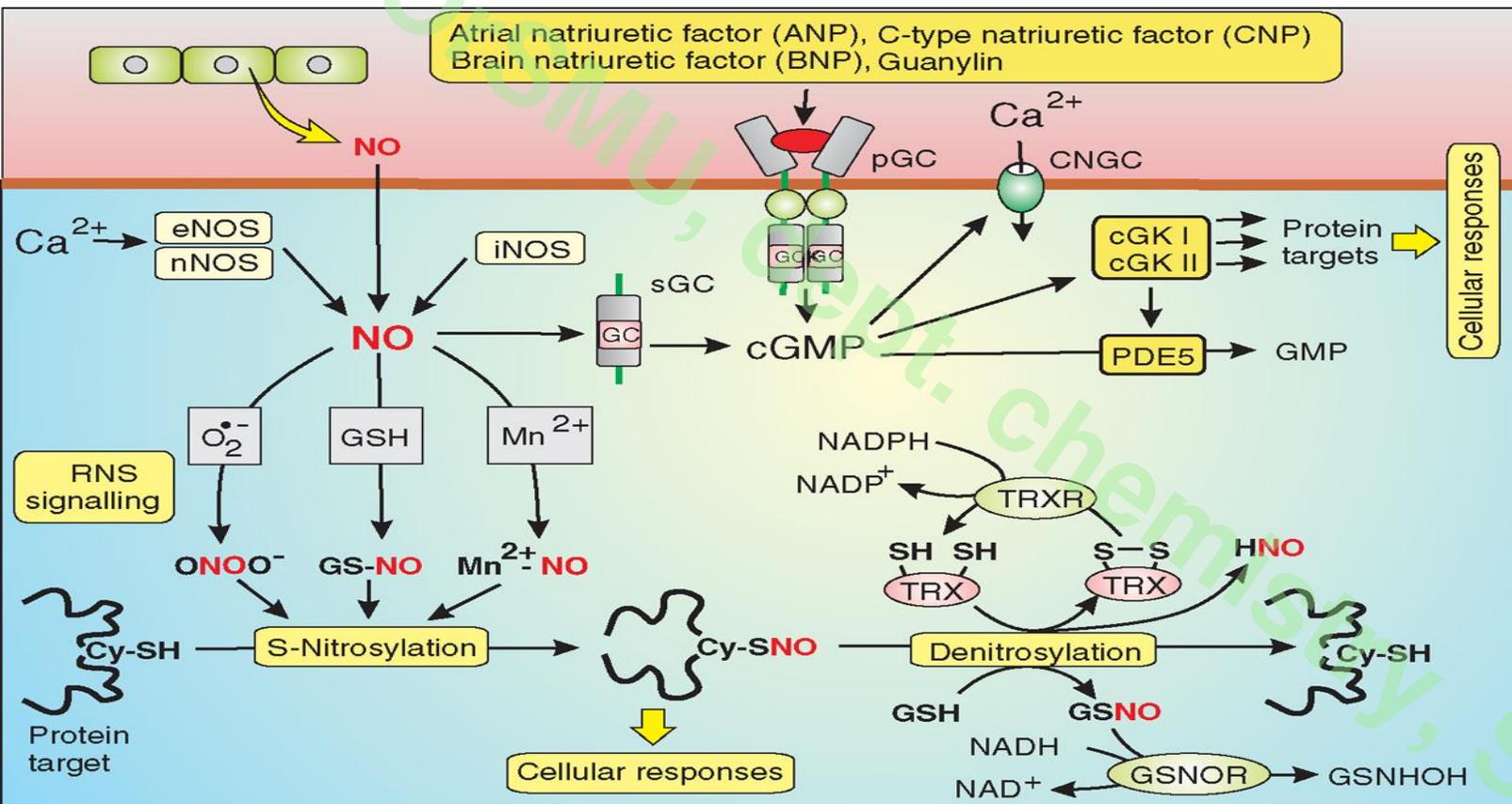
Путь передачи сигналов PI3K-Akt: обеспечение выживаемости клеток



OrSMU, dept. Chemistry, Sgibnev AV

Трансдукция других типов: участие NO,
сGMP и ROS сигнализация

Пути передачи сигналов с участием NO и cGMP



NO:

1 может стимулировать растворимую гуанилилциклазу (sGC) (образование (cGMP), который активирует каналы управляемые циклические нуклеотидами (CNGC) или cGMP-зависимую протеинкиназу (cGK).

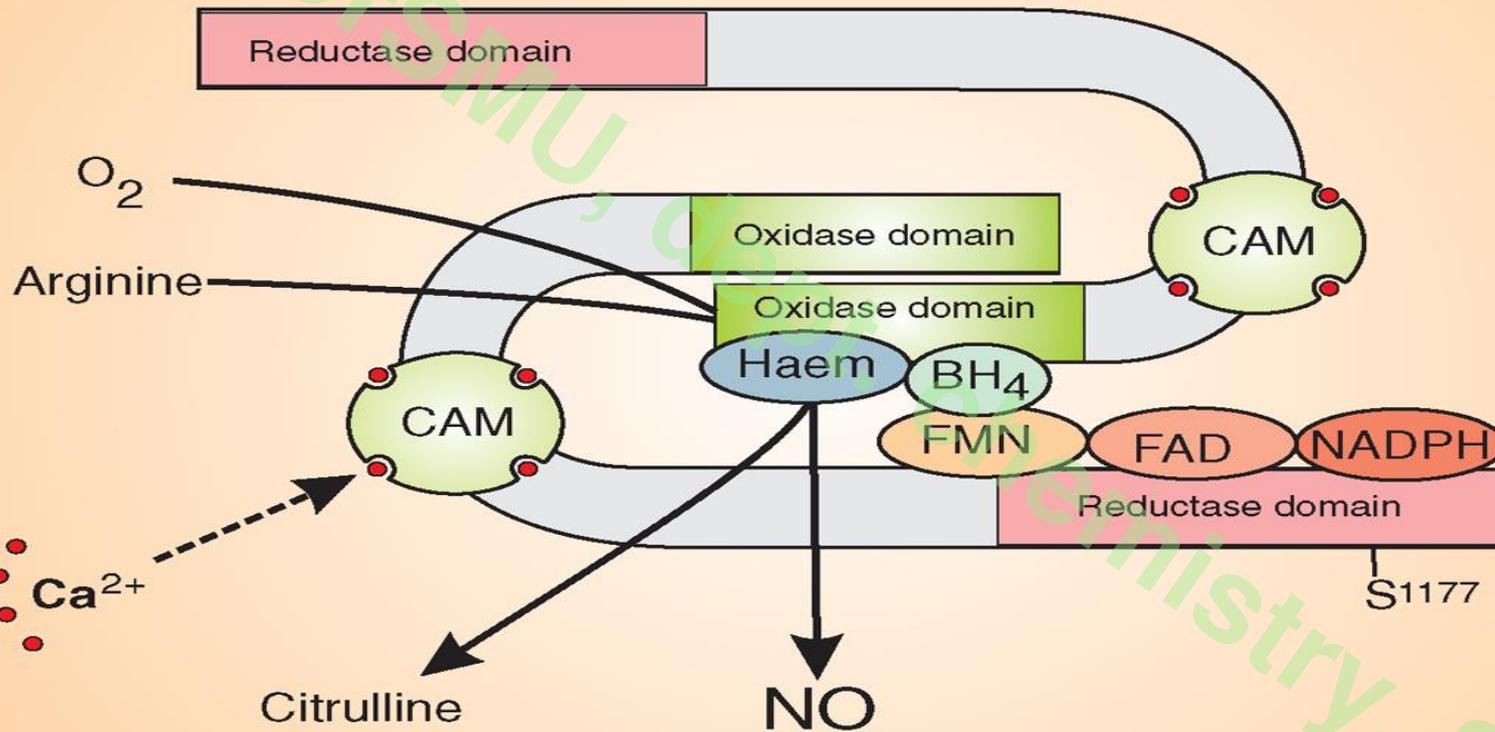
2. cGMP также образуется гуанилциклазой плазматической мембраны (pGC), (предсердный натрийуретический пептид (ANP), натрийуретический фактор головного мозга (BNP), С-тип натрийуретического фактора (CNP) и гуанилин).

Другое основное действие — это сигнальные механизмы реактивных форм азота (RNS), которые зависят от реакции S-нитрозилирования, которая отменяется реакциями денитрозилирования.

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

Оксид азота (NO) может либо диффундировать из других клеток в виде паракринного сигнала, либо генерироваться внутри клетки различными NO-синтазами (NOS).

NO-синтаза



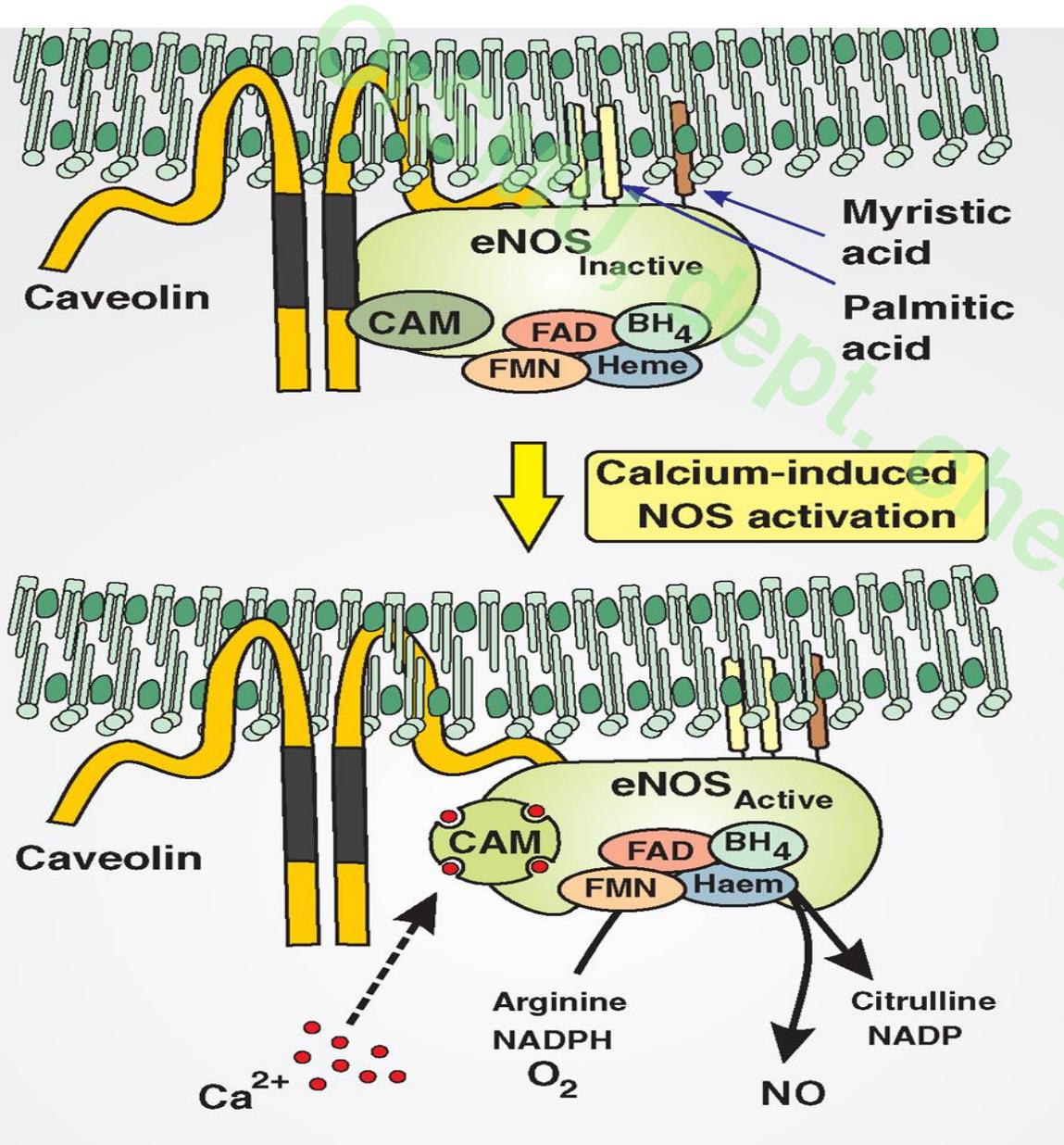
2 мономера NOS расположены рядом друг с другом, так что редуктазный домен одного из них функционирует вместе с оксидазным доменом его соседа.

Димер фермента также функционирует как каркас для организации других компонентов реакции (флавинадениндинуклеотид (FAD), флавинаденинмононуклеотид (FMN), гем и тетрагидробиоптерин (BH₄) и кальмодулин (CaM)).

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

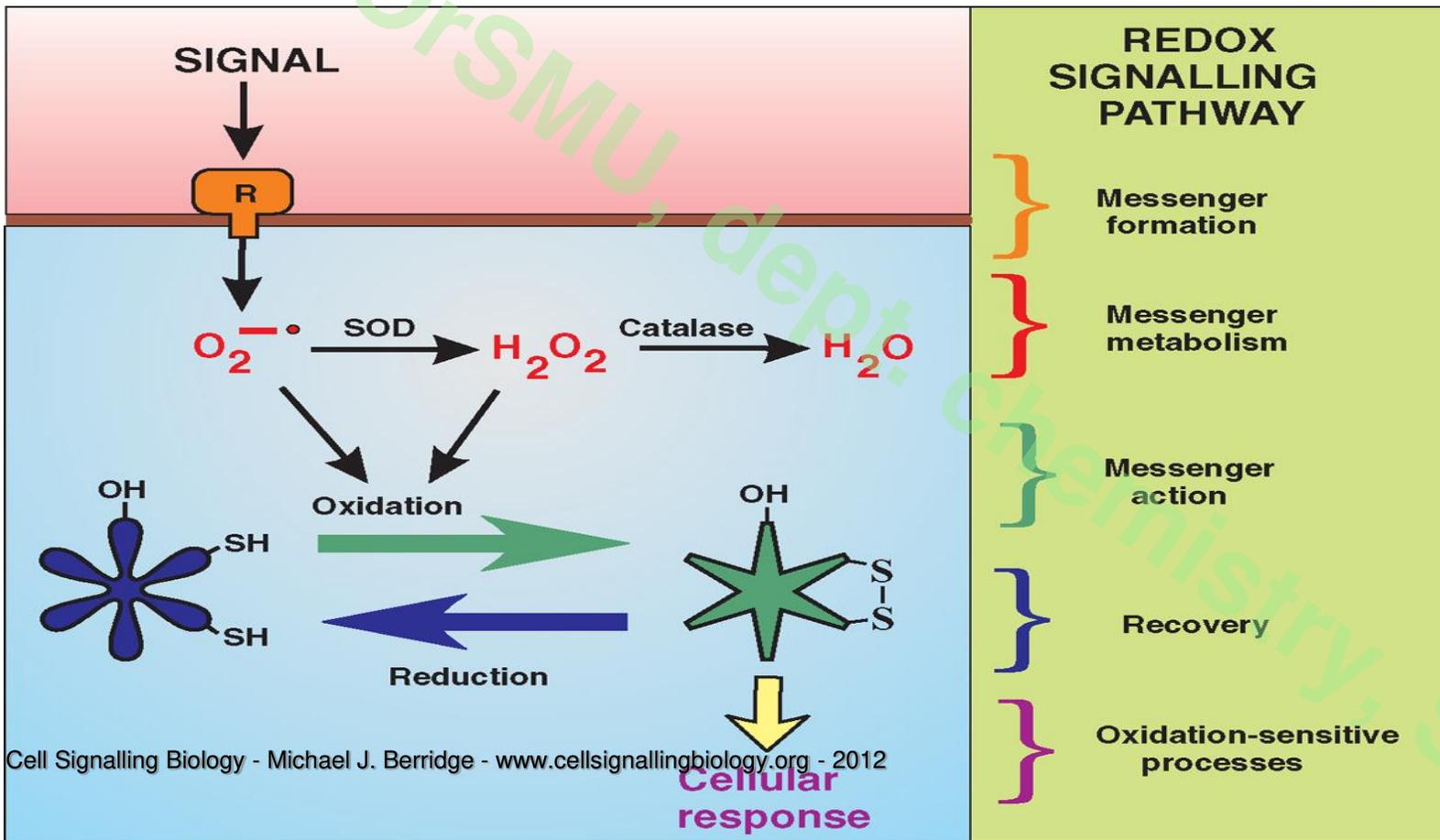
Синтез NO управляется NADPH-зависимым потоком электронов, который проходит от редуктазы к оксидазному домену. Присоединенный гем является концевым акцептором электронов, который связывает кислород, внедряемый в аргинин, с образованием гидроксиаргинина, который распадается с высвобождением NO.

Ca²⁺-зависимая активация эндотелиальной синтазы оксида азота



eNOS расположена на мембране кавеол, мембранная локализация обеспечивается N-концевой миристиновой кислотой и двумя остатками пальмитиновой кислоты, прикрепленными к двум остаткам Cys, (связь с кавеолами зависит от присоединения eNOS к кавеолу, который отвечает за сохранение активности фермента в покое). Конкуренция между кавеолуином и кальмодулином (CaM) за сайт связывания кавеолина на eNOS. В отсутствие Ca²⁺ преобладает кавеолуин, но когда Ca²⁺ увеличивается и связывается с CaM, последний снимает ингибирующий эффект кавеолина, и фермент активируется для выработки NO из аргинина с использованием кислорода и NADPH в качестве косубстратов.

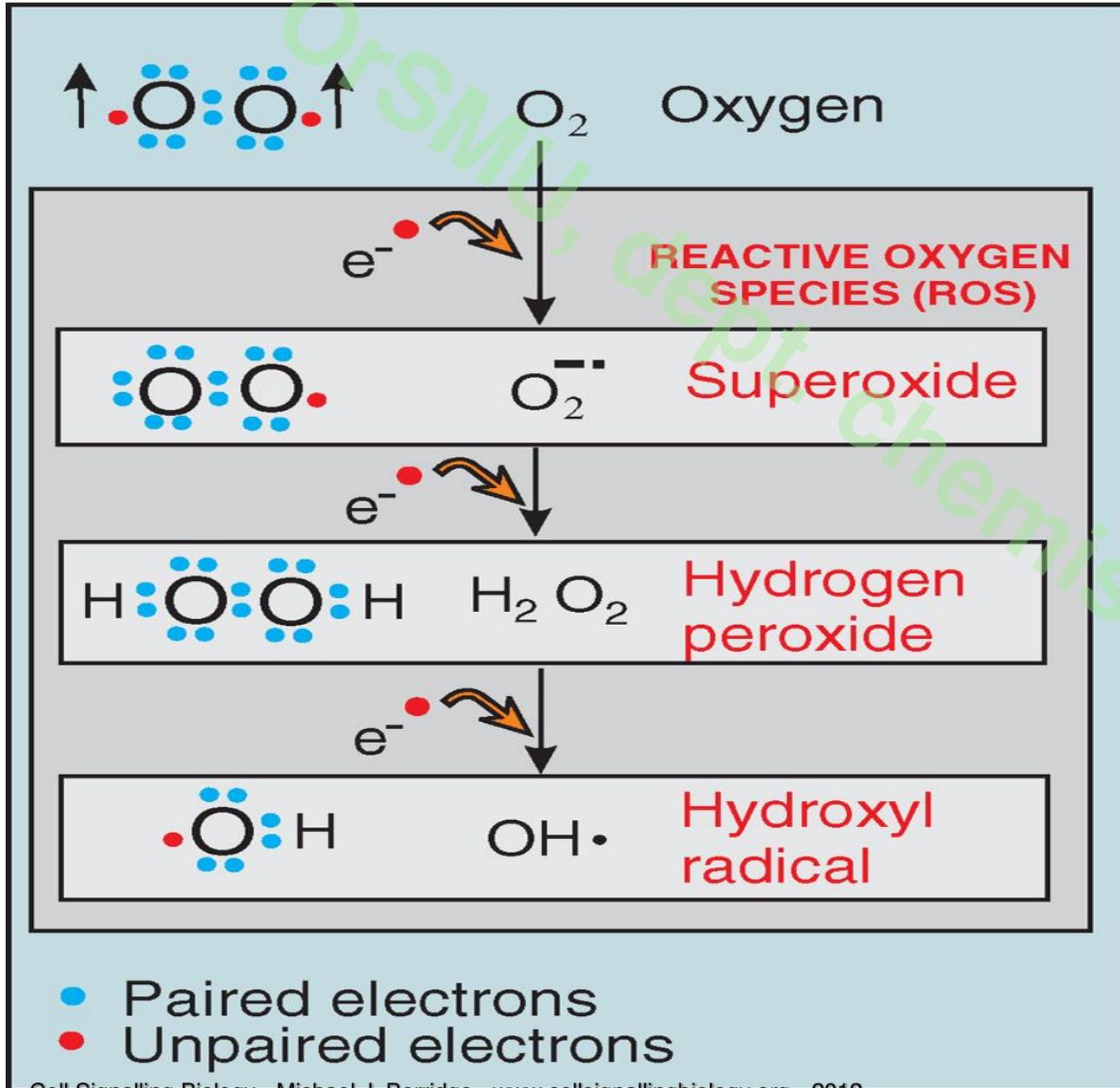
Основные характеристики окислительно-восстановительной сигнализации (redox signalling)



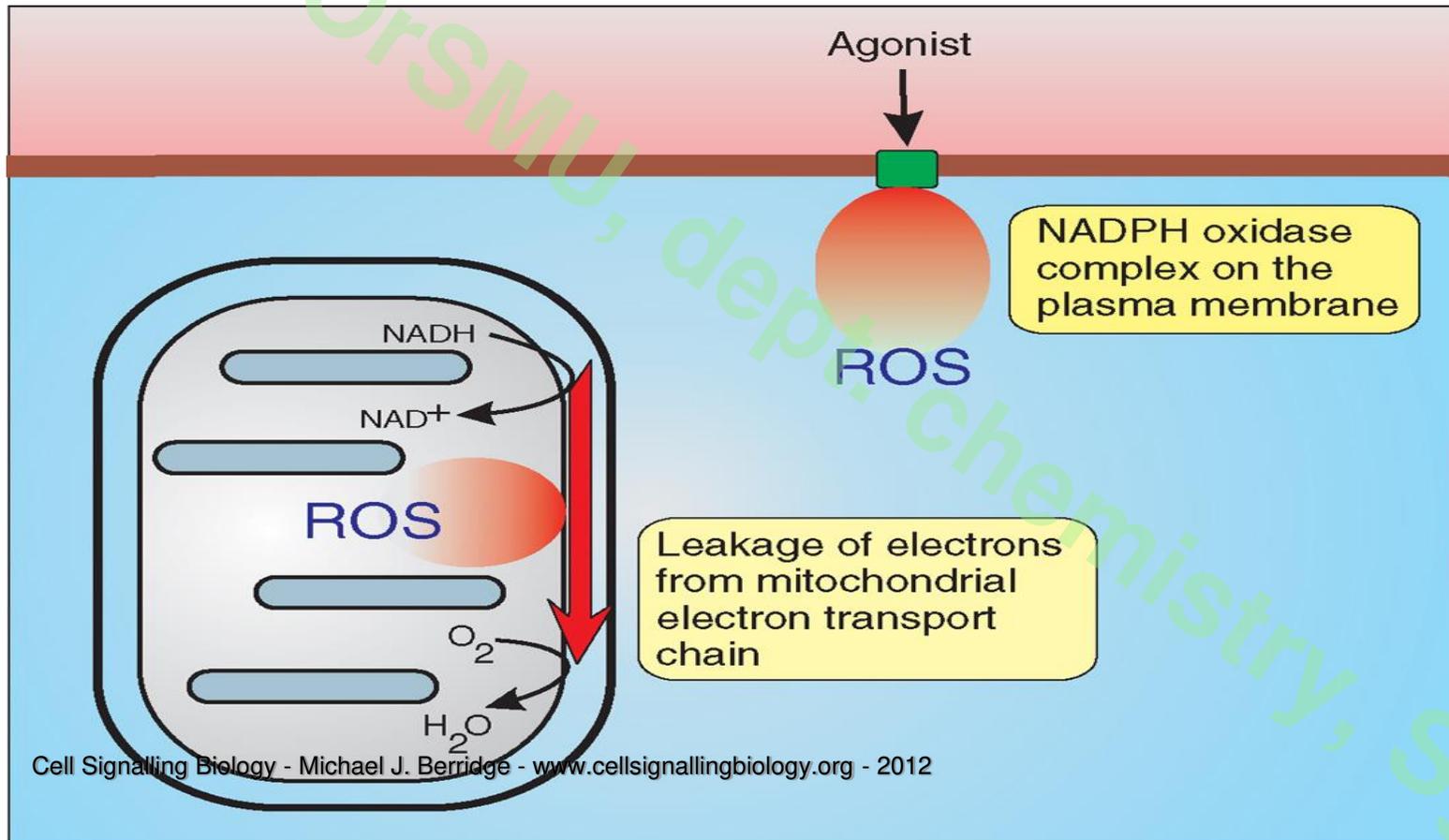
Процессы редокс-сигнализации начинаются с внешнего сигнала, активирующего рецептор (R), который затем генерирует активные формы кислорода (супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), который затем в H_2O_2). $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 диффундируют в клетку, где они окисляют определенные белки, образуя внутреннюю дисульфидную связь.

Восстановление осуществляется различными ферментными системами, которые возвращают целевой белок в его восстановленное состояние. Окисленный белок стимулирует различные клеточные процессы.

Образование и метаболизм активных форм кислорода (ROS)



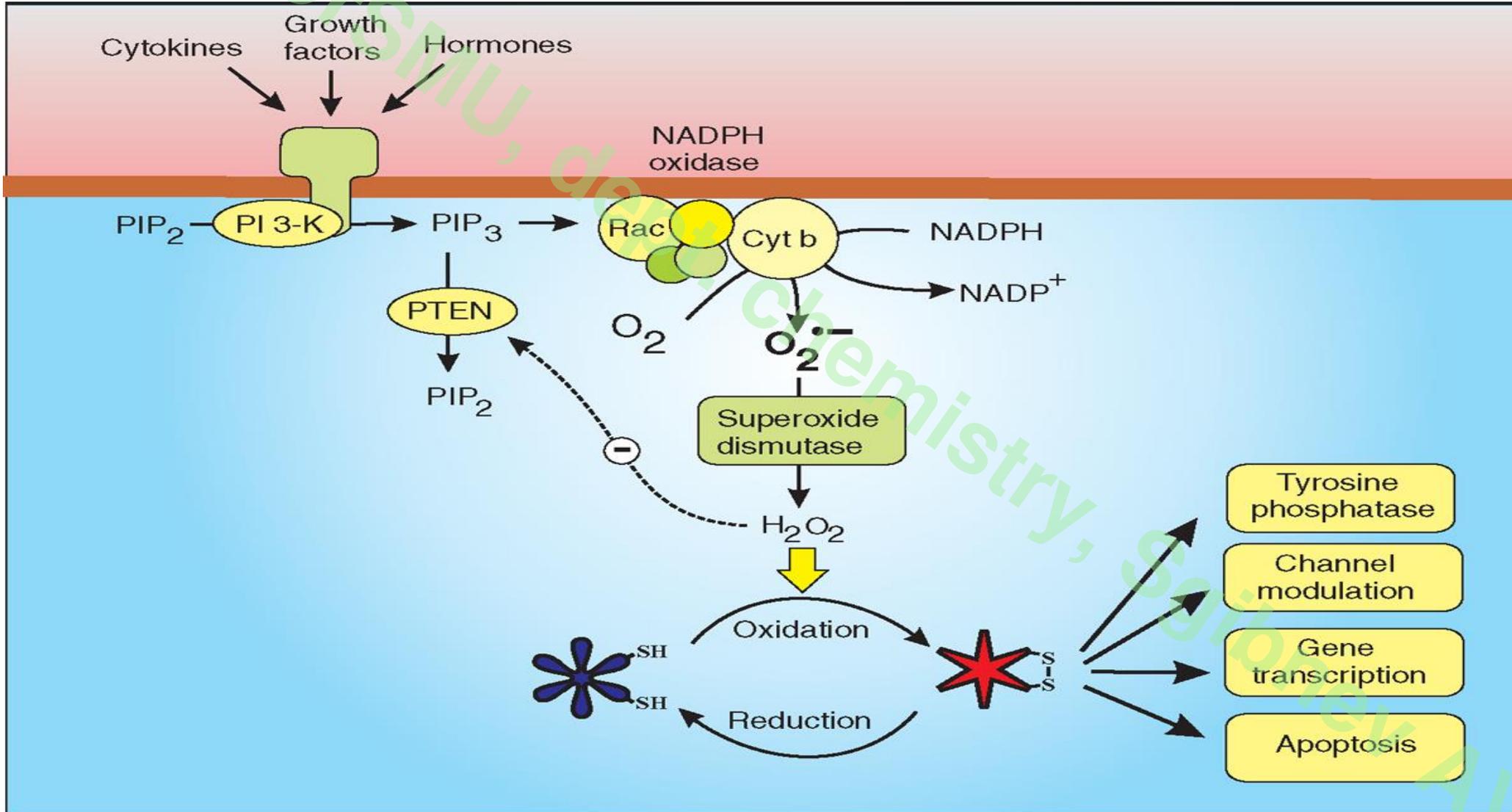
Сайты образования активных форм кислорода



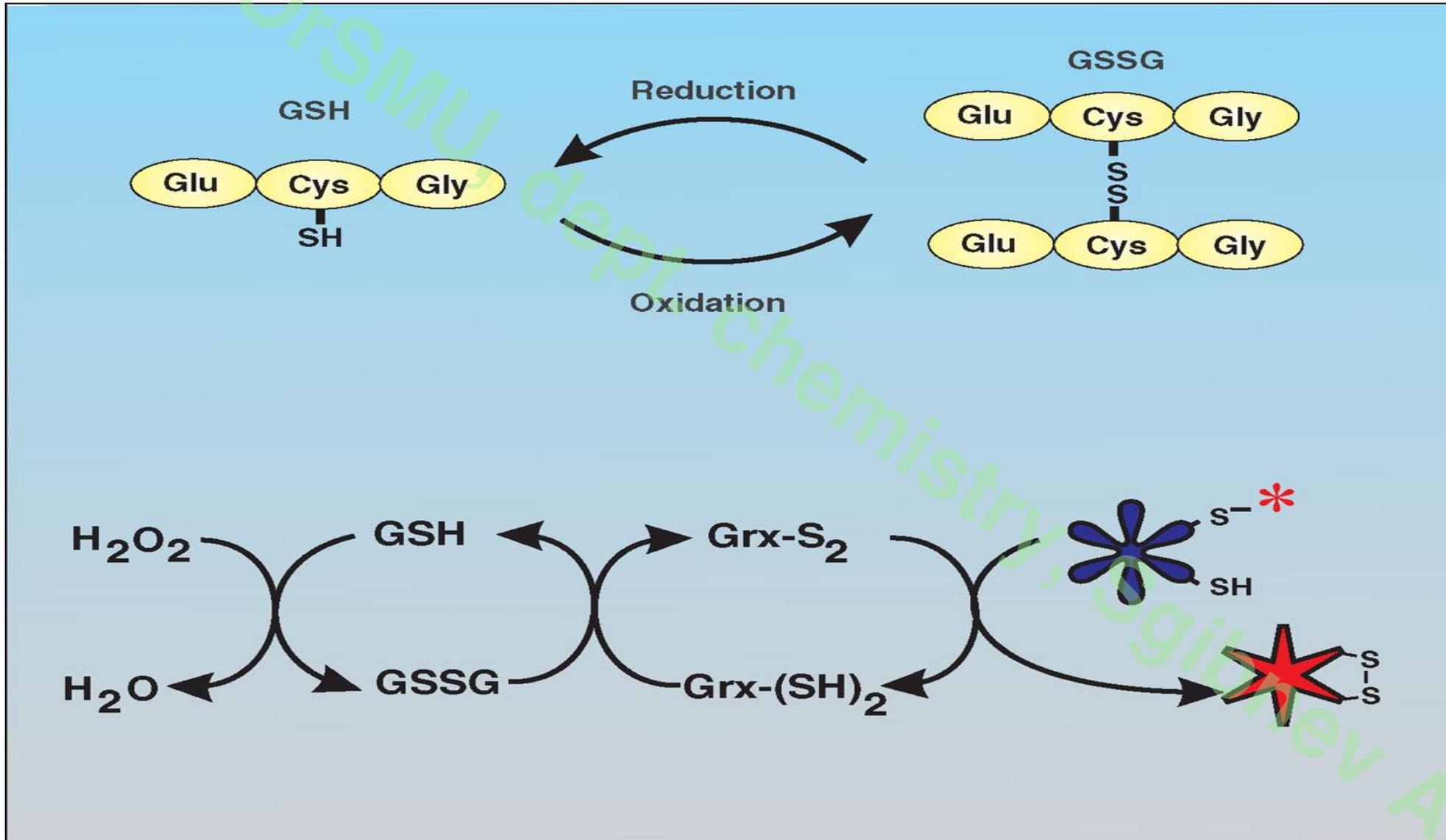
Два основных места образования активных форм кислорода (АФК). Есть два основных места образования АФК в клетках. Один из них находится на уровне плазматической мембраны, где комплекс НАДФН-оксидазы активируется сигнальными путями клетки. Другой - в митохондриях, где АФК образуются в результате утечки электронов из цепи переноса электронов.

Производство ROS проявляется в виде микродоменов, что указывает на то, что передача сигналов ROS может быть сильно локализована в клетках.

Образование активных форм кислорода на мембране



Превращения GSH/GSSG - причина включения/выключения редокс-сигнала



[Grx- (SH)
глутатионредокс
ин

Метаболизм H₂O₂



Пероксиредоксины (Prx)

Характерная особенность каталитического механизма этой группы антиоксидантных ферментов — окисление тиоловой R-SH группы редокс-активного цистеина активного центра до R-SOH состояния пероксидным субстратом (например, липидной гидроперекисью).

Всем спасибо!

OrSMU, dept. chemistry, Sgibnev AV