

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**Ю.В. ДАНИЛОВИЧ, Г.В. ДАНИЛОВИЧ, О.В. ЦИМБАЛЮК,  
О.Ю. НИПОРКО**

# **Внутрішньоклітинна сигналізація (для непрофільних спеціальностей)**

*Навчальний посібник*

**Київ  
ЦП «Компринт»  
2024**

**ББК 28.07**

**УДК 615.2+577.3**

**Ц61**

*Затверджено вченою радою*

*Навчально-наукового Інституту високих технологій*

*Київського національного університету імені Тараса Шевченка*

*(протокол № 11-24 від 19 грудня 2024 року)*

**Рецензенти:**

**Воробець З.Д.** - доктор біологічних наук, професор, професор кафедри медичної біології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

**Нурищенко Н.Є.** - доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біофізики та нейробиології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Ю.В. Данилович

**Ц61** «Внутрішньоклітинна сигналізація (для непрофільних спеціальностей)»: [Навчальний посібник] / Г.В. Данилович, О.В. Цимбалюк, О.Ю. Нипорко. - К.: ЦП «Компринт», 2024. - 191 с.

**ISBN**

У навчальному посібнику «Внутрішньоклітинна сигналізація (для непрофільних спеціальностей)» розглянуті молекулярні основи регуляції фундаментальних клітинних процесів від рівня експресії генів та перебігу метаболічних реакцій до поділу, росту, диференціації і загибелі. Аналізуються механізми сприйняття і передачі поза(внутрішньо)клітинних сигналів, які забезпечують узгоджене функціонування клітин, тканин та органів.

Для студентів вищих навчальних закладів небіологічного профілю.

**ISBN**

**УДК 615.2+577.3**

**ББК 28.07**

© Ю.В. Данилович, Г.В. Данилович, О.В. Цимбалюк 2024

## **РОЗШИФРОВКА ОКРЕМИХ АНГЛОМОВНИХ АБРЕВІАТУР, ЯКІ ЗУСТРІЧАЮТЬСЯ В ТЕКСТІ**

AP1 – Activating Protein-1  
ATF1 – Activating Transcription Factor 1  
ARE – Antioxidant Response Element, also termed as the EPRE - Electro-Phile Response Element  
AIF – Apoptosis Inducing Factor  
APAF-1 – Apoptosis Protease Activating Factor-1  
BCL-2, BCL-XL – продукти онкогенів В-клітинної лімфоми  
bZIP – basic region, leucine ZIPper  
CSF – Colony-Stimulating Factor  
CREB – cAMP Response Element-Binding protein  
CRE – cAMP Response Element  
CBP/P300 – CREB Binding Protein  
CDK – Cyclin-Dependent protein Kinase  
CAD – Caspase Activated DNAase  
CARD – Caspase Activation and Recruitment Domain  
DBRP – Destruction Box Recognizing Protein  
DD – Death Domain  
EGF – Epidermal Growth Factor  
ERK - Extracellular signal Regulated Kinase  
FADD – Fas-Associated DD-protein  
GAPs - GTPase Activating Proteins  
G-protein - GTP-binding protein  
GDI - Guanosine diphosphate Dissociation Inhibitor  
GEFs - Guanine nucleotide Exchange Factors (одним з них є SOS)  
GRB2 - Growth-factor-Receptor Binding protein  
HIF-1 – Hypoxia-Inducible Factor  
HSF1 – Heat Shock transcription Factor 1  
IL – InterLeukin (IL-1 $\beta$ )  
IGF – Insulin like Growth Factor  
INF - INterFeron (INF $\gamma$ )  
INSIG – INSulin-Induced Gene  
IRS1 – Insulin Receptor Substrate 1  
JAK-STAT – JAnus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription  
JUN – JU-Nana (the japanese word for 17)  
KEEP1 – from english «support»  
MDM2 – Murine Double Minute 2  
MAPKKK - Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase  
MAPKK - Mitogen Activated Protein Kinase Kinase  
MEK – Mitogen-activated ERK-activated Kinase  
MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase  
NRF2 - Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2

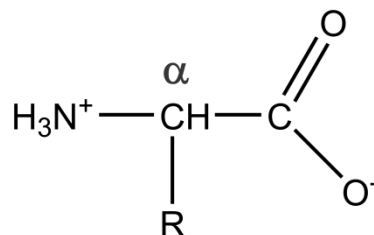
NF- $\kappa$ B – Nuclear Factor kappa B  
NLS - Nuclear Localization Signal  
PTB-domain – Phospho Tyrosine Binding domain  
PDGF – Platelet-Derived Growth Factor  
PKB/Akt – Protein Kinase B  
PDK- Phosphoinositide-Dependent Kinase  
PI-3,4,5- $P_3$  - Phosphatidylinositol-3,4,5-trisPhosphate  
PH-domain – Pleckstrin Homology domain  
PTEN - Phosphatase and TENsin homolog  
PRB – Protein Retino Blastoma  
PTP – Permeability Transition Pore  
PI-4,5- $P_2$  – Phosphatidyl-Inositol-4,5-diPhosphate  
Ras – протеїн надродини малих G-протеїнів (Rho, Ras, Rac....)  
RAF1 - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
SP1 – Specificity Protein 1  
SREBP-1 – Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1  
SRE – Sterol Regulatory Element  
SCAP – SREBP Cleavage-Activating Protein  
Src kinase – від Rous Sarcoma  
SH2-domain - Src Homology region 2  
SH3-domain - Src Homology region 3  
SOS - Son Of Sevenless  
sGC – soluble Guanylyl Cyclase  
TNF – Tumor Necrosis Factor ( $TNF\alpha$ )  
TLRs - Toll-Like Receptors  
TBP – TATA Binding Protein  
TAF – TBP Assotiated Factors  
TFIID – Transcriptional Factor D for polymerase II  
VEGF – Vascular Endothelial Growth factor

## ВСТУП

**Внутрішньоклітинна сигналізація** – біологічна дисципліна, яка вивчає молекулярні основи регуляції фундаментальних клітинних процесів: експресії генів, перебігу метаболічних реакцій, поділу і диференціації, загибелі тощо. Її завданням є дослідження механізмів сприйняття і передачі поза(внутрішньо)клітинних сигналів, які забезпечують узгоджене функціонування клітин, тканин та органів. Порушення внутрішньоклітинної сигналізації призводить до розвитку численних патологій, зокрема злоякісного новоутворення. Дослідження шляхів і регуляції передачі внутрішньоклітинного сигналу лежить в основі розвитку сучасної фармакології.

## РОЗДІЛ 1. ВИБРАНІ ПИТАННЯ БІОЛОГІЇ ПРОТЕЇНІВ, НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ТА БІОМЕМБРАНОЛОГІЇ

**1.1. Протеїни** є структурно-функціональною основою живих організмів. Це високомолекулярні органічні сполуки, побудовані з окремих одиниць – амінокислот, які зв'язані між собою пептидним (амідним) зв'язком. **Амінокислоти** – похідні органічних кислот аліфатичного або ароматичного ряду і містять аміно- та карбоксильну групи (звідки походить й назва). Вони відрізняються між собою природою радикала. До складу більшості протеїнів входять 20 протеїногенних амінокислот, 10 з яких найбільш розповсюджені. Переважна більшість амінокислот містить аміногрупу біля  $\alpha$ -вуглецевого атому ( $\alpha$ -амінокислоти) і належать до оптичних ізомерів L-ряду:

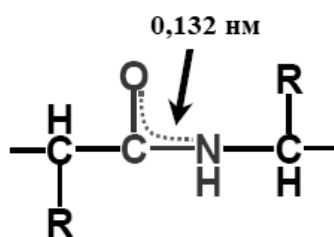


Амінокислота пролін формально належить до імінокислот і містить аміногрупу включену до циклу.

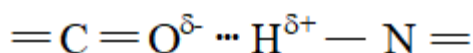
Однією з можливих класифікацій амінокислот є поділ на аліфатичні (моноаміномонокарбонові, моноамінодикарбонові, діаміномонокарбонові) та циклічні (ароматичні, гетероциклічні). До моноаміномонокарбових належать гліцин, аланін, серин, треонін, валін, лейцин, ізолейцин, цистеїн та метіонін. До моноамінодикарбових – аспартат (аспарагінова кислота) та глутамат (глутамінова кислота). Також до 20 амінокислот відносять відповідні аміді останніх, а саме аспарагін та глутамін. До діаміномонокарбових амінокислот належать лізин та аргінін. Фенілаланін та тирозин складають ароматичні, а триптофан, гістидин та пролін гетероциклічні амінокислоти. Також виділяють амінокислоти з неполярними радикалами (гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, тирозин, триптофан та пролін), незарядженими полярними радикалами (серин, треонін, цистеїн, аспарагін та глутамін), негативно (аспартат, глутамат) або позитивно зарядженими (лізин, аргінін та гістидин) полярними радикалами за фізіологічних значень рН біля 7,0. Амінокислоти серин, треонін та тирозин містять гідроксильні групи в бічних радикалах, які можуть підлягати у складі протеїнів регуляторному фосфорилуванню/дефосфорилуванню відповідними протеїнкіназами. Можливе також фосфорилування залишків аспартату та гістидину. Бічні радикали лізину та аргініну містять позитивно заряджені аміногрупи, які є мішенню дії ензимів, що здійснюють регуляторне і зворотне метилування, ацилування, убіквітинування (про це більш детально розповідається нижче). Сульфгідрільна група бічного радикалу цистеїну та сірка у складі метіоніну можуть бути зворотно окиснені, а цистеїн підлягає регуляторному нітрозилуванню. Ці та інші ковалентні модифікації впливають на структуру та функціональну активність протеїнів. Заряджені та полярні амінокислотні радикали беруть участь у іонних взаємодіях та формуванні водневих зв'язків. неполярні радикали забезпечують гідрофодні взаємодії.

*Первинна структура протеїнів.* Це послідовність залишків амінокислот в поліпептидному ланцюзі. Є специфічною і генетично детермінованою. Подібність будови первинних структур різних протеїнів називається гомоло-

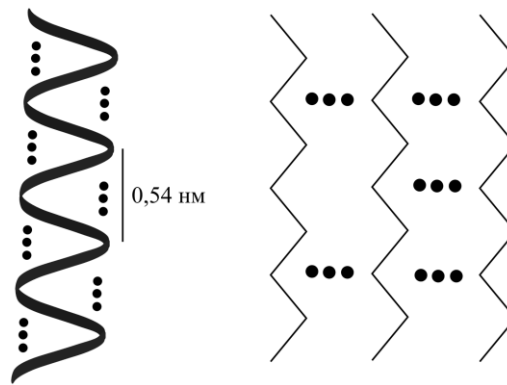
гією і може свідчити про еволюційну спорідненість. Амінокислоти поєднані між собою пептидним зв'язком (це варіант амідного зв'язку або кетоімінного зв'язку). Первинна структура є основою всіх інших. Виділяють N- та C-кінці протеїнової молекули (амінотермінальний та карбокситермінальний). Часто структуру протеїнів описують починаючи з N-кінця. Нижче схематично наведені структура та зазначена довжина пептидного зв'язку, який є проміжним між первинним та вторинним зв'язком і має назву полуторного:



*Вторинна структура протеїнів.* Являє собою розташування поліпептидного ланцюга у просторі. Поширена правозакручена  $\alpha$ -спіраль, до якої входять амінокислоти L-ряду. Стабілізація спіральної структури забезпечується численними слабкими водневими зв'язками, які утворюються між атомами водню імінної групи одного пептидного зв'язку (має частковий позитивний заряд) та киснем карбонільної групи іншого (несе частковий негативний заряд):



Радикали амінокислот безпосередньо не беруть участь в утворенні вторинної структури, але впливають на неї. Зокрема пролін у спіральну структуру не вкладається і формує вигинання поліпептидного ланцюга. Інший варіант вторинної структури – це  $\beta$ -складчастий шар (антипаралельний та паралельний). В багатьох протеїнах чергуються спіралізовані, неструктуровані ділянки та ділянки  $\beta$ -складчастого шару. Схематичне зображення протеїнової спіралі (крок або відстань між витками складає 0,54 нм) та  $\beta$ -складчастого шару (його паралельний варіант) наведені нижче, трьома крапками позначені водневі зв'язки:



*Третинна структура.* За фізіологічних умов поліпептидний ланцюг згортається в регулярну просторову структуру з чітким взаємним розташуванням більш впорядкованих ( $\alpha$ -спіралі,  $\beta$ -складки) та менш впорядкованих (петлі, повороти) ділянок. Процес згортання протеїну – фолдинг – визначається, в першу чергу, електростатичними взаємодіями (між зарядженими атомами та групами), ван-дер-ваальсовими взаємодіями (між будь-якими атомами, що контактують між собою), а також так званим гідрофобним ефектом. Природа цього ефекту полягає в тому, що бокові радикали амінокислотних залишків, які не містять донорів та/або акцепторів водневого зв'язку, відштовхуються мережею водневих зв'язків, яку формують молекули клітинної води, і вимушені асоціювати одна з одною. Таким чином, «класичний» водорозчинний глобулярний білок в результаті згортки отримує гідрофобне ядро і гідрофільну поверхню, яка, в свою чергу, містить амінокислотні залишки з великою кількістю донорів/акцепторів водневого зв'язку.

Регулярність просторової будови обумовлює здатність протеїну селективно розпізнавати інші біомолекули та специфічно взаємодіяти з ними, визначаючи таким чином його біологічну активність, зокрема ензиматичну, транскрипційну, рецепторну та ін. В результаті фолдингу просторово віддалені в поліпептидному ланцюзі амінокислотні радикали зближуються між собою, формуючи активний центр ензиму. Зазначимо, що у багатьох випадках протеїн веде себе як тверде тіло («аперіодичний кристал» за визначенням Шредінгера), зокрема, має точку плавлення, тобто втрачає регулярність структури при нагріванні не поступово, а одномоментно.



До факторів стабілізації третинної структури протеїну, крім зазначених вище електростатичних і ван-дер-ваальсових взаємодій, належать також водневі зв'язки, а також деякі ковалентні зв'язки (міцні хімічні взаємодії за рахунок утворення спільних електронних пар), насамперед дисульфідний зв'язок. Наприклад, в інсуліні є 3 дисульфідних зв'язки, з яких 2 міжланцюгові і 1 внутрішньоланцюговий.

Порушення третинної структури призводить до зниження або зникнення біологічної активності. Конформація протеїну передусім залежить від рН, температури, іонної сили, хімічної модифікації протеїну, а також протеїн-протеїнових та протеїн-ліпідних взаємодій. Нативною, природньою структурою (нативною конформацією) володіють протеїни, які мають біологічну активність. Існує десятки ковалентних модифікацій (посттрансляційні ковалентні модифікації), які змінюють структуру і функції протеїнів, серед них, як вже зазначалося раніше, фосфорилювання, ацилювання (часто приєднання міристинової або пальмітинової кислот, ацетильного залишку), метилювання, глікозилювання, убіквітинування, нітросилування/нітрування, окиснення, АДР-рибозилування тощо. Більшість цих модифікацій здійснюється за участі спеціальних ензимів і має зворотний характер. Вони використовуються клітиною для спрямованої регуляції функціональної активності протеїнів. Найважливішою (найкраще вивченою) модифікацією є фосфорилювання: приєднання залишку фосфорної кислоти від АТФ за допомогою протеїнкіназ; зворотний процес дефосфорилювання здійснюється фосфопротеїнфосфатазами. Важливим при цьому є зміна заряду бічних радикалів амінокислотних залишків, яка регулює, зокрема, взаємодію протеїнів із протеїнами-партнерами або ДНК.

В просторовій структурі більшості протеїнів (особливо таких, що містять більше 200 амінокислотних залишків) можна виділити окремі структурно-функціональні ділянки, що дістали назву *доменів*. Кожен домен згортається в певну унікальну третинну структуру незалежно від інших доменів в складі тієї самої макромолекули і характеризується власною кінетикою згор-

тки. Іншими словами, протеїн під час фолдингу утворює не одну велику глобулу, а декілька більш дрібних, які пов'язані між собою лінкерними ділянками. Прикладами можуть служити каталітичний та регуляторний домени у складі багатьох ензимів. Більш дрібні локальні специфічні амінокислотні послідовності називають *мотивами*: мотив «цинкових пальців», «EF-hand», «спіраль-оберт-спіраль», поліпролінові мотиви тощо.

Деякі протеїни в силу особливостей своєї амінокислотної послідовності, наприклад рівномірно збагачені залишками лізину, в умовах клітини не утворюють регулярної просторової структури. Такі природньо неупорядковані протеїни набувають її лише в результаті специфічної взаємодії з макромолекулами-партнерами, які мають регулярну просторову організацію, зокрема, звичайними «твердими» білками.

Іноді має місце *четвертинна структура*. Тоді такий протеїн називають олігомерним, а окремі субодиниці – протомерами. Кажуть про субодиничну будову протеїну. Стабілізація структури досягається різними типами нековалентних зв'язків. За дії фізико-хімічних факторів (сечовина, органічні розчинники, мінеральні солі, різка зміна рН) відбувається дисоціація субодиниць, при відмиванні – реасоціація. Наявність зв'язків між субодиницями призводить до явища кооперативності як прояву алостеричної взаємодії. Наприклад, зв'язування кисню з однією з чотирьох субодиниць гемоглобіна має наслідком відповідні конформаційні зміни, які покращують зв'язування  $O_2$  з іншими субодиницями – позитивна кооперативність.

Протеїни класифікують за *формою третинної структури*: глобулярна чи фібрилярна. Фібрилярні протеїни – це білки сполучної та покривної тканин, цитоскелету, позаклітинної речовини, міофібрили, які забезпечують клітинний рух; в структурі поширений  $\beta$ -складчастий шар, мають форму стрижня, нитки. Більшість ензимів та факторів транскрипції – глобулярні протеїни. Вони мають форму шара, кульки, сфери. Розрізняють протеїни та поліпептиди (молекулярна маса до 6 тис.), наприклад, трипептид глутатіон, який складається з трьох амінокислотних залишків – глутамату, цистеїну та гліцину.

Синтез протеїнів відбувається на рибосомах (процес трансляції), часто рибосоми зв'язуються з ендоплазматичним ретикуломом. Згортання поліпептидного ланцюга в нативну третинну структуру і її підтримання – фолдинг протеїнів. До цього процесу відносять також і об'єднання субодиниць при формуванні четвертинної структури. Радикали, які взаємодіють при утворенні нативної конформації можуть бути розташовані досить далеко в поліпептидному ланцюзі. Утворення великої кількості міжрадикальних зв'язків зумовлює найбільш термодинамічно стійку конформацію, яка характеризується мінімумом вільної енергії. В модельному міоглобін-подібному протеїні (глобулярна структура) більшість гідрофільних радикалів розташовані на поверхні, а гідрофобні орієнтовані до середини глобули. Втім, міжпротеїнові взаємодії і взаємодії з лігандами забезпечуються також і гідрофобними залишками на поверхні протеїну. При формуванні нативної третинної структури окремі радикали просторово зближуються формуючи активний центр, який і взаємодіє з лігандами. Під *фізіологічно значущим лігандом* розуміється відносно низькомолекулярна сполука, яка оборотно нековалентно зв'язується з макромолекулою – протеїном або ДНК, або надмолекулярним (супрамолекулярним) комплексом, наприклад рецепторами на поверхні клітин. Формування нативної конформації залежить від первинної структури, особливо для невеликих протеїнів, так і наявності спеціальних ензимів, а також численних шаперонів («неньок») або протеїнів теплового шоку (Heat Shock Proteins, HSPs). Останні особливо важливі для утворення та підтримання нативної конформації відносно великих протеїнів. Незалежно від моделі фолдингу та розміру протеїну важливу роль в процесі згортання макромолекули відіграє феномен кооперативності: утворення «правильних» зв'язків між бічними амінокислотними радикалами різко пришвидшує формування наступних зв'язків, тому фолдинг триває не мільярди років, а біля кількох секунд чи навіть менше.

Шаперони або протеїни теплового шоку в процесі фолдингу запобігають агрегації новосинтезованих протеїнів, а також «неправильним» взаємоді-

ям в межах одного поліпептидного ланцюга. Вони також руйнують (лабілізують) «неправильні» слабкі нековалентні зв'язки. Контролюють рефолдинг протеїнів, зокрема після теплової денатурації; інкубація *E. coli* при температурі 42 °C призводить до суттєвого зростання вмісту шаперонів. Приклади шаперонів: Hsp 90,  $\alpha$ -кристалін кришталика ока.

Шаперони забезпечують внутрішньоклітинний транспорт протеїнів (трафік протеїнів): старі нефункціональні протеїни в лізосоми або новосинтезовані в мітохондрії, де утворюються лише 5% власних протеїнів. В останньому прикладі шаперони переносять розгорнуті поліпептиди з експонованими назовні неполярними радикалами крізь дві гідрофобні мітохондрійні мембрани, тобто попереджають передчасний фолдинг, а в матриксі вже інші протеїни забезпечують формування нативної конформації. HSP також підтримують протеїни у стані незавершеного фолдингу. Наприклад, цитозольний рецептор глюкокортикоїдних гормонів (кортикостерон середньої зони кори наднирників) зв'язаний з HSP, при цьому екранована частина поліпептидного ланцюга, яка забезпечує проникнення рецептора в ядро (ядерна мітка). При зв'язуванні ліганду фолдинг завершується, HSP дисоціює і ядерна мітка експонується на поверхні.

Дозрівання протеїнів, а саме фолдинг, посттрансляційні ковалентні модифікації, зокрема глікозилювання і інші мають відношення до функціонування ендоплазматичного ретикулула. Розпад протеїнів відбувається в лізосомах та протеосомах. В останньому випадку деградують короткоживучі протеїни, до яких по залишкам лізину за участі спеціального ензиму лігази приєднується убіквітин (поліпептид з 76 амінокислотних залишків). Помічений таким способом протеїн розкладається протеазами в мультибілкових циліндричних протеосомах. Цей процес більш детально описаний нижче.

Протеїни класифікують за фізико-хімічними властивостями на прості, які складаються лише з амінокислот і складні, що містять також сполуку непротеїнової природи – простетичну групу. До простих протеїнів відносять альбуміни, глобуліни, проламіни, глутеліни, протаміни, пістони та протеїної-

ди. Більшість протеїнів мають кислий характер, втім протаміни і гістони, які містять у своєму складі велику кількість лізину та аргініну, мають лужні властивості. За канонами класичної біохімії складні протеїни називали протеїдами. Серед останніх розрізняють наступні групи.

Глікопротеїни. Простетичною групою є вуглеводи (гексози, аміноцукри, сіалові кислоти, олігоцукри). Цілий ряд ензимів, рецепторів, іонних каналів, гормонів мають глікопротеїдну природу.

Ліпопротеїни. Простетична група – ліпіди. Утворюють з білками нековалентні зв'язки, білкова частина – глобуліни. Розділяються на декілька груп:

-ліпопротеїни високої щільності, в яких співвідношення протеїни:ліпіди складає біля 1:1, включають фосфоліпіди, холестерол;

-низької щільності, які включають 25% протеїну і високий вміст холестеролу (ЛПНЩ);

-дуже низької щільності, 91% ліпідів, включають триацилгліцероли;

-хіломікрони, 1% протеїну, це основна транспортна форма ліпідів в плазмі крові.

Нуклеопроїтеїни, простетична група яких представлена нуклеїновими кислотами (РНК, ДНК). Протеїнова частина включає позитивно заряджені за фізіологічних значень рН протаміни і гістони, яка електростатично зв'язана з негативно зарядженими залишками фосфорної кислоти. Також виділяють хромопротеїни, які мають забарвлену простетичну групу: похідні ізоалоксазину (флавопротеїди) та порфірину (гемопроїтеїди), фосфопротеїни (простетична група – залишки ортофосфорної кислоти) та металопротеїни. В останньому випадку простетичною групою є метал, який міцно зв'язаний з протеїном. До цього класу відносяться численні ензими: супероксиддисмутаза (мідь, цинк – вмісна або марганець - вмісна), карбоксипептидаза (цинк - вмісна); транспортні протеїни з резервною і, подекуди, ензимною функцією (мідь – вмісний церулоплазмін, залізо – вмісний феритин).

**1.2. Ензими** є каталізаторами протеїнової природи, які утворюються в живих організмах і здатні прискорювати перебіг хімічних реакцій – метаболічних процесів: перетворення субстратів з утворенням продукту/продуктів. Вони зустрічаються лише в живих організмах, мають високу специфічність і потужну каталітичну дію. Переважна більшість хімічних реакцій, які відбуваються за участю ензимів, проходять при нормальному тиску, температурі близькій до кімнатної, слабкокислій, нейтральній або слабколужній реакції середовища, тобто за відносно м'яких умов. *Прості ензими* представлені одним або кількома поліпептидними ланцюгами. *Складні ензими* крім амінокислотної частини містять групу непротеїнової природи – *кофактор*: неорганічні іони або органічні молекули. Кофактори органічної природи називаються *коензимами*, часто ними є вітаміни або їх похідні. Коензими можуть бути зв'язані з протеїновою частиною ензиму слабкими електростатичними або вандерваальсівськими силами, наприклад НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид). *Простетичні групи* зв'язані з протеїном міцними, часто ковалентними зв'язками (гемова простетична група, біотин); простетичною групою можуть бути також міцно зв'язані іони металів. Під терміном *холоензим* розуміють активну форму складного ензиму, яка включає і термостабільний кофактор, і термолабільну протеїнову частину або апоензим.

Субстрат зв'язується не з усією молекулою ензиму, а з окремою її ділянкою, яка називається *активним центром*. Активний центр визначає специфічність і каталітичну активність ензиму. У складних ензимах активний центр утворений кофактором і залишками амінокислот; у простих ензимах активний центр представлений певною комбінацією залишків амінокислот, які просторово зближені у нативній молекулі ензиму. Ензими є протеїнами глобулярної будови, активний центр часто-густо знаходиться в заглибині глобули. В ряді випадків виділяють також алостеричний центр, який регулює активний центр; речовина-регулятор, зв'язуючись з алостеричним центром, змінює конформацію протеїну і контролює доступ субстрату до активного центру. Ензими мають ізоформи – *ізоензими*, які утворюються в результаті

експресії різних генів або внаслідок альтернативного сплайсингу. Ізоензими можуть мати відмінні каталітичні, кінетичні властивості та особливості регуляції і виконують специфічні функції в різних тканинах, субклітинних компартментах або за різних функціональних станів.

#### Властивості ензимів.

*Активність ензимів.* Характерною особливістю дії ензимів є їх висока каталітична активність. Вона може бути вища, ніж неорганічних каталізаторів. Активність ензимів характеризується швидкістю хімічних реакцій, які вони каталізують.

*Вплив температури на активність ензимів.* Ензими – термолабільні речовини. Зміна температури зумовлює зміну їх активності. Так, підвищення температури на 10 °С прискорює швидкість хімічних реакцій приблизно у 2 рази. Однак ензими є протеїнами і підвищення їх каталітичної активності відбувається доти, доки не починається денатурація протеїну. Денатурація ензиму викликає руйнування його нативної структури, а це, в свою чергу, зумовлює втрату ензиматичної активності. Температура, при якій ензим має максимальну активність, називається *оптимальною температурою*. Для більшості ензимів, виділених з організму людини і тварин, оптимальна температура коливається від 37 до 45 °С.

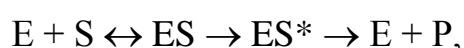
*Вплив рН середовища на активність ензимів.* Вважають, що вплив концентрації водневих іонів на активність ензимів пов'язаний насамперед з їх дією на активні центри. Залежно від рН середовища активний центр може бути в різному ступені іонізований, що впливає на формування активного ензим-субстратного комплексу.

*Специфічність дії ензимів.* Під специфічністю дії розуміють відповідну спрямованість їх впливу на певний субстрат, близьку за своїми властивостями групу субстратів або певний тип зв'язку.

Активність ензимів часто змінюється під дією різних хімічних сполук, що знаходяться в середовищі. Речовини, які підвищують активність, називаються активаторами, а ті, що знижують активність, - інгібіторами.

Більшість дослідників вважають, що механізм дії ензимів у процесах каталізу пов'язаний з утворенням ензим-субстратних комплексів. За цих умов ензим змінює молекулу субстрату так, що енергія, яку необхідно прикласти для переведення її в активний стан, значно зменшується. Ензим знижує енергію активації  $E_a$ , тобто висоту енергетичного бар'єру, в результаті чого зростає частка реакційно-здатних молекул, отже, збільшується швидкість реакції.

Під час каталітичного процесу утворення продукту відбувається поетапно. На першому етапі ензиматичного каталізу субстрат з'єднується з ензимом, на другому – відбуваються активація і видозмінення субстрату з утворенням одного або кількох активних комплексів і на останньому (третьому) етапі – відділення продуктів реакції від ензиму. Схематично ці етапи можна показати так:



де  $E$  – ензим;  $S$  – субстрат;  $ES$  – первинний ензим-субстратний комплекс (первинний проміжний комплекс);  $ES^*$  – активний комплекс;  $P$  – продукт реакції.

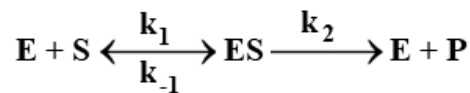
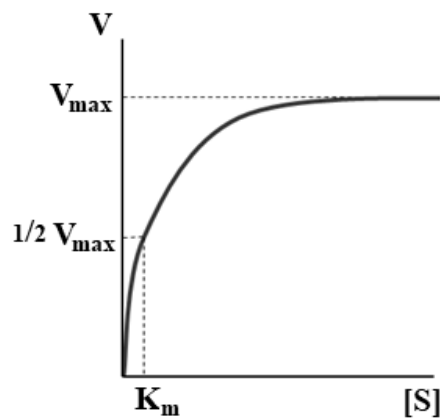
Згідно з моделлю Кошланда активний центр ензиму є динамічною структурою і може змінювати свою конформацію під дією молекули субстрату, тобто субстрат індукує відповідні зміни в молекулі ензиму. Одночасно конформаційні зміни відбуваються і в молекулі субстрату, що створює умови для більш ефективного каталітичного перетворення. Саме тому ця модель отримала назву «*модель індукованої відповідності*». Ензим зумовлює зменшення міцності зв'язків у субстраті, що підвищує реактивну здатність шляхом зміщення електронів (поляризації зв'язків) або розтягнення зв'язків і їхньої деформації.

Кількість амінокислот, які безпосередньо беруть участь в реакції і розташовані в ділянці активного центру обмежена: гістидин, серин, цистеїн, лізин, аспартат та глутамат. Розрізняють поняття “активний центр” – ділянка ензиму, яка об'єднує всі контактні групи, що беруть участь в утворенні акти-



вного ензим-субстратного комплексу. В активному центрі є ділянка, яка забезпечує специфічність (спорідненість) зв'язування субстрату з ензимом – “контактна ділянка” (якірна, адсорбційна) та “каталітична ділянка”, де власне і відбувається реакція.

Кінетика ензиматичних реакцій визначається утворенням ензим-субстратного комплексу, де  $V_{\max}$  – максимальна швидкість реакції, коли весь ензим провзаємодіє з субстратом;  $K_m$  – константа Міхаеліса-Ментен – концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної; є мірою спорідненості ензиму до субстрату і відповідає діючим концентраціям субстратів:



$K_m$  - константа Міхаеліса

$$K_m = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1}}$$

Рівняння Міхаеліса-Ментен

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Регуляція активності ензимів. У такий спосіб забезпечується інтеграція метаболізму в цілому, а також регуляція окремих метаболічних шляхів та поодиноких ензимів.

Існують два загальні принципи регуляції: (а) – шляхом зміни каталітичної активності ензиму; (б) – через зміну кількості ензиму завдяки регуляції його синтезу або на рівні транскрипції, або на рівні трансляції, а також шляхом зміни швидкості деградації протеїну. Перший шлях передбачає існування *регуляторних ензимів*, які є ключовими в різних ланках метаболізму. Це ензими, які перебувають на початку біохімічних шляхів синтезу або розкладу сполук, знаходяться в точках галуження або наприкінці метаболічних шляхів. Перший механізм є швидким і реалізується в межах кількох секунд або хвилин. Він стосується конститутивних, вже преекспресованих в клітині ензи-

мів, хоча рівень їхньої експресії також регулюється залежно від фізіологічної ситуації. Другий шлях має особливе значення для індукцибельних ензимів, які за нормальних умов існування клітин або за функціонального спокою відсутні. Він потребує десятків хвилин або багатьох годин, тобто часу, який необхідний для синтезу протеїну.

*Основні механізми регуляції каталітичної активності включають: алостерична регуляція, регуляція за рахунок ковалентної модифікації, обмежений протеоліз, вплив різних регуляторних сполук, а також інших регуляторних протеїнів і ліпідів.*

Ключові ензими мають один або кілька регуляторних алостеричних центра. Алостерична регуляція заснована на ліганд-протеїнових взаємодіях. Регуляторними лігандами можуть бути звичайні метаболіти та спеціальні сигнальні молекули, наприклад, циклічні нуклеотиди. Алостеричні ензими можуть мати четвертинну будову (наприклад, сАМР-залежна протеїнкіназа А). Регуляція алостеричних модуляторів відбувається шляхом передачі конформаційних змін з алостеричного на каталітичний центри. Наприклад, ключовим ензимом глікогенолізу є фосфорилаза а, яка через активацію кінази фосфорилази знаходиться під контролем алостеричного субодиничного ензиму сАМР-залежної протеїнкінази. Ключовим ензимом гліколізу є фосфофруктокіназа, яка має більше 10 алостеричних регуляторів (АМР, неорганічний фосфат, цитрат, жирні кислоти тощо). Одним із механізмів регуляції алостеричних ферментів є гальмування шляхом негативного зворотного зв'язку, тобто пригнічення кінцевим продуктом реакції (ретроінгібування). Існують і позитивні регуляторні впливи. Такими регуляторами можуть бути субстрати.

Посттрансляційними ковалентними модифікаціями, що регулюють активність ензимів, є фосфорилування/дефосфорилування, ацилювання, метилювання, нітрозилування, АДР-рибозилування і десятки інших. Якщо ковалентна модифікація є регуляторною, вона здійснюється переважно спеціальними ензимами і є зворотнім процесом. При цьому можлива конкуренція між різними типами модифікацій одного амінокислотного залишку. Напри-

клад, залишок лізину може підлягати метилюванню, убіквітинуванню, ацетилюванню. Важливим є також *явище «crosstalk»*. Наприклад, у складі хроматину фосфорилування гістону H3 по серину стимулює асоційований ензим НАТ (ацетилтрансферазу), який здійснює ацетилювання по лізину. Бічний радикал лізину втрачає заряд, зменшується електростатична взаємодія гістону з ДНК, посилюється транскрипційна активність.

Обмежений протеоліз має регуляторне значення як фактор, що змінює первинну структуру ензимів.

На швидкість ензиматичних реакцій впливає концентрація кофакторів: НАД, НАДФ, ФАД, КоА, піридоксальфосфату тощо.

Регуляторне значення мають протеїн-протеїнові взаємодії (з G-протеїнами, протеїнами теплового шоку), протеїн-ліпідні взаємодії, зокрема з мінорними фосfolіпідами мембран.

Швидкість багатьох ензиматичних реакцій перебуває під ендокринним контролем і змінюється внаслідок ендокринних порушень.

*Раціональна класифікація ензимів* включає класи, підкласи, підпідкласи тощо; назва ензиму має цифрову аббревіатуру – 4 цифри разом з конкретною назвою ензиму. Поширені також назви, які ґрунтуються на назві субстрату з додаванням закінчення “-аза” (сахараза), якості реакції (ліпаза, гідролаза). Застосовують і тривіальні назви (пепсин, трипсин).

За раціональною класифікацією виділяють 7 класів; ензими мають закінчення “-аза”.

*Оксидоредуктази* – каталізують окисно-відновні процеси.

*Трансферази* – прискорюють реакції перенесення груп атомів від одних субстратів до інших.

*Гідролази* – каталізують гідролітичні реакції.

*Ліази* – каталізують процеси відщеплення яких-небудь груп не гідролітичним шляхом з утворенням подвійного зв’язку або, навпаки, приєднання відповідних груп атомів по місцю подвійного зв’язку.

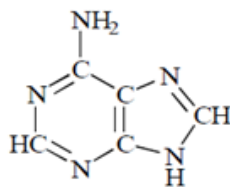
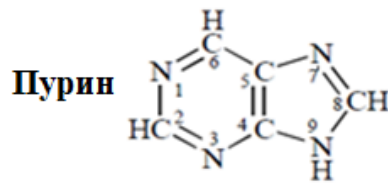
*Ізомерази* – прискорюють процеси ізомеризації органічних сполук.

*Лігази* (синтетази) – каталізують реакції синтезу, які пов’язані з використанням енергії АТФ та деяких інших трифосфатів.

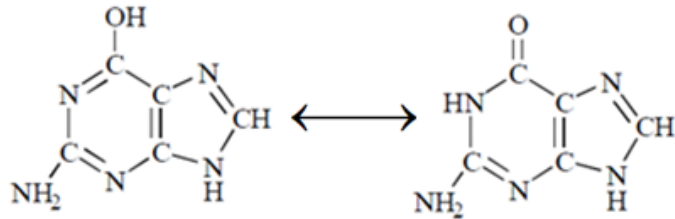
*Транслокази* – транспортні протеїни (іонні канали до них не відносяться).

**1.3. Нуклеотиди.** Є трикомпонентними сполуками і складаються з азотистої основи (пуринового або піримідинового ряду), цукру (рибоза або дезоксирибоза у  $\beta$ -D-рибофуранозній формі) та фосфорної кислоти.

Пуринові основи:

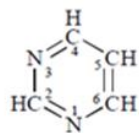


**Аденін (А)**

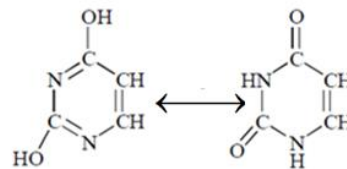


**Гуанін (Г)**

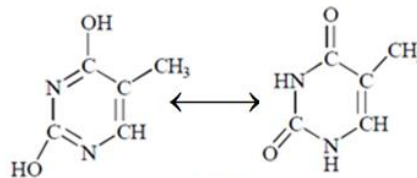
Піримідинові основи:



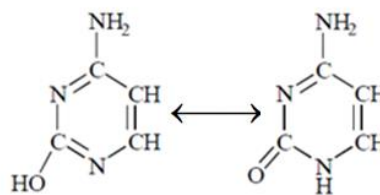
**Піримідин**



**Урацил (У)**



**Тимін (Т)**

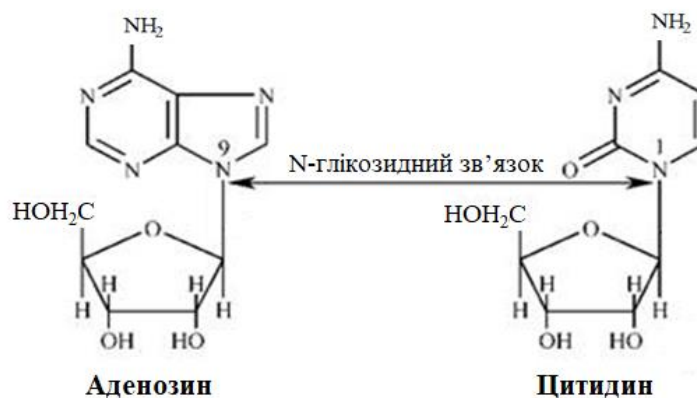


**Цитозин (Ц)**

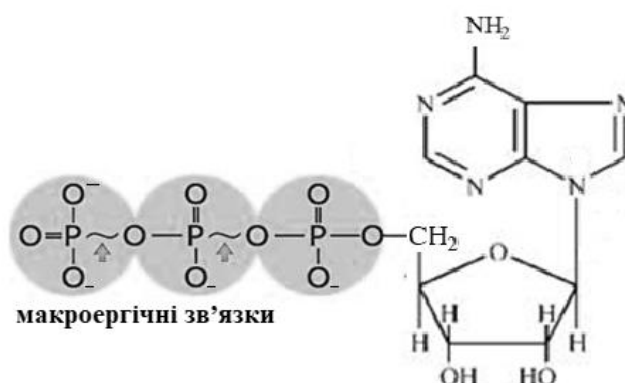
Цукор та фосфорна кислота:



Терміном нуклеозиди позначаються двокомпонентні сполуки, які складаються лише з азотистої основи та цукру. Серед них: аденозин, гуанозин, уридин, тимідин, цитидин. Існують відповідні дезоксиформи (дезоксиаденозин, дезоксицитидин тощо):



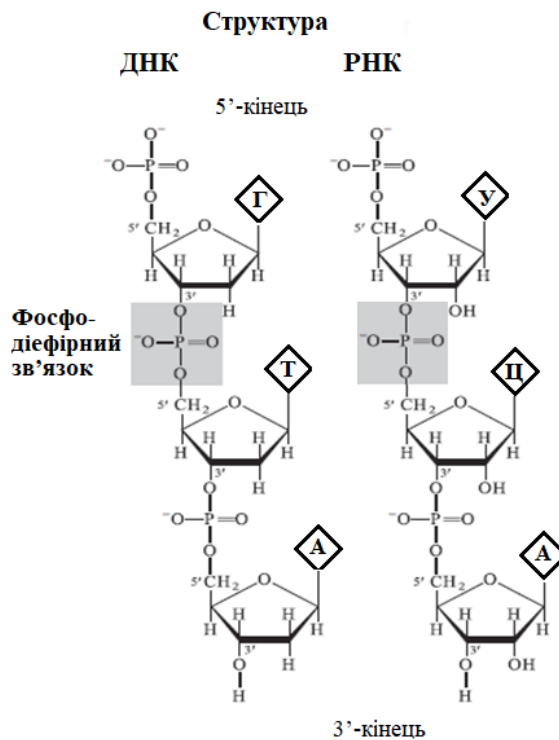
Назви нуклеотидів є похідними від назви відповідного нуклеозиду із зазначенням залишків фосфорної кислоти (1-3): гуанозинмонофосфат (ГМР), аденозиндифосфат (АДР), дезоксицитидинмонофосфат (дЦМР) тощо. Нижче наведена формула АТР – аденозинтрифосфорної кислоти, яка за рН 7,0 існує у вигляді аніону  $ATP^{4-}$  та формує комплекс з іонами  $Mg^{2+}$  ( $Mg-ATP^{2-}$ ):



Сполуки, гідроліз яких супроводжується відносно великими змінами стандартної вільної енергії (енергії Гібса) – високоенергетичні сполуки або макроергічні сполуки. Зміни стандартної вільної енергії при гідролізі АТФ ( $\Delta G^{0'}$ ) складає -30,6 кДж/моль або -7,3 ккал/моль. До макроергів відносяться і інші клітинні сполуки, які мають відносно велику величину  $\Delta G^{0'}$  – фосфоенолпіруват, фосфогліцеролфосфат, креатинфосфат тощо. На відміну від них енергія гідролізу глюкозо-6-монофосфату становить лише -3,3 ккал/моль. Вільна енергія, яка вивільнюється при гідролізі ефірів фосфорної кислоти має місце через те, що продукти гідролізу містять менше вільної енергії, ніж вихідні речовини. З точки зору молекулярних механізмів, в основі дії АТФ лежить перенесення  $\gamma$ -фосфату на залишки серину, треоніну та тирозину за участі протеїнкіназ з наступною зміною конформації та біологічної активності протеїнів.

Похідні нуклеотидів володіють високою біологічною активністю. Зокрема циклічні нуклеотиди, а саме сАМР та сGMP, які утворюються за дії аденілат- та гуанілатциклази на АТФ та ГТФ відповідно, є регуляторними і сигнальними молекулами в клітині. Нуклеотиди, які входять до складу дегідрогеназ, забезпечують тканинне дихання та окисне фосфорилування шляхом спрямованого транспорту протонів і електронів в мітохондріях. Зокрема, НАД(Р) (нікотинамідаденіндинуклеотид(фосфат)) складається з аміду нікотинової кислоти, аденіну, 2 залишків рибози та 2(3) залишків фосфорної кислоти. ФАД (флавінаденіндинуклеотид) включає в себе гетероцикл ізоалоксазин, спирт рибітол, аденін, рибозу та 2 залишки фосфорної кислоти. ФМН (флавімононуклеотид) має у своєму складі ізоалоксазин та спирт рибітол.

**1.4. Нуклеїнові кислоти.** В полінуклеотидному ланцюзі окремі нуклеотиди поєднуються між собою фосфодієфірним зв'язком; фосфорильована спиртова група в положенні 5' рибози або дезоксирибози взаємодіє з вільною спиртовою групою на 3'-кінці цукру. Напрямок ланцюга позначається 5' → 3':



*Структура ДНК (дезоксирибонуклеїнової кислоти).* До складу можуть входити десятки тисяч нуклеотидів.

Первинна структура – послідовність розміщення нуклеотидів у поліну-клеотидному ланцюзі. Нуклеотидний склад ДНК описується правилами Чар-гаффа, один з варіантів формулювань яких наступне:

- сума пуринових нуклеотидів дорівнює сумі піримідинових;
- молярний вміст аденіну (А) відповідає молярному вмісту тиміну (Т);
- молярний вміст гуаніну (Г) відповідає молярному вмісту цитозину (Ц);
- відношення  $A+T / G+C$  є видоспецифічною ознакою.

В полінуклеотидних ланцюгах можливі повтори окремих блоків нукле-отидів один за одним або з перериваннями, а також повторення блоків у зво-ротному порядку або поліндроми.

Вторинна структура. Це розташування полінуклеотидних ланцюгів у просторі. Була запропонована англійцями Дж. Уотсоном і Ф. Кріком у 1953 р. на основі правил Чаргаффа та даних рентгеноструктурного аналізу (Р. Франклін та ін.). Ця модель дає змогу адекватно описати як генетична ін-формація зберігається, реплікується та відтворюється (реалізується). Класич-на структура ДНК в ядрі еукаріотичної клітин являє собою подвійну правоза-

кручену спіраль. Залежно від фізико-хімічних факторів та функціональної потреби існують різновиди спіралі. Полінуклеотидні ланцюги розташовані антипаралельно (3'-кінці навпроти 5'-кінців). Обернені один до одного відносно менш гідрофільними азотистими основами, зовні розміщені високополярні іонізовані фосфорні залишки (рис. 1):

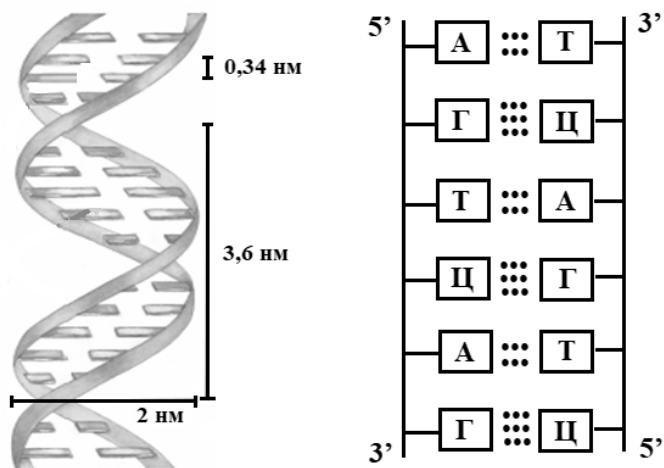


Рис. 1. Схематичне зображення подвійної спіралі ДНК та комплементарних основ

Аденін одного ланцюга зв'язаний двома водневими зв'язками з тиміном іншого ( $A = T$ ), гуанін трьома водневими зв'язками з цитозином ( $G \equiv C$ ). Цей принцип структурно-хімічної відповідності називається комплементарністю. Стабілізація подвійної спіралі досягається також за рахунок гідрофобних взаємодій. Пари азотистих основ в Уотсон-Кріківській спіралі В розташовані паралельно у вигляді стопок. Делокалізовані  $\pi$ -електрони сусідніх азотистих основ утворюють єдину  $\pi$ -електронну структуру (перекриваються  $\pi$ -орбіталі). Це стекінг-взаємодія, яка суттєво стабілізує подвійну спіраль.

Дволанцюгові ДНК мітохондрій, хлоропластів, а також деяких вірусів і бактерій замкнені в кільце за рахунок існування «липких» кінців з обох боків подвійної спіралі ділянок неспарених комплементарних основ. В мікроорганізмах зустрічаються також одноланцюгові ДНК.

Третинна структура ДНК. Дволанцюгові або кільцеві ДНК утворюють в просторі суперспіралізовані ділянки. У еукаріотів третинна структура реа-



лізується у формі комплексів ДНК з гістоновими та негістоновими протеїнами. При цьому має місце іонна взаємодія між іонізованими за фізіологічних значень рН залишками фосфорної кислоти ДНК та позитивно зарядженими бічними амінокислотними радикалами відповідних протеїнів. Надмолекулярний нуклеопротеїновий комплекс називається хроматином і становить основу еукаріотичних хромосом. Під електронним мікроскопом хроматин має вигляд намистин, які чергуються з лінкерними ділянками, утворюючи нуклеосомну структуру. Гістоновий октамер формує нуклеосомний кор, на який намотується суперспіралізована у вигляді соленоїду ДНК (рис. 2). До складу октамеру входять наступні гістонові протеїни: H2a, H2b, H3 та H4 (по дві молекули). До лінкерної ділянки входить гістон H1. Нуклеосоми укладаються у вигляді товстих фібрил – 30 нм волокон. Останні утворюють суперспіралізовані петлі, які включають одиниці транскрипції і реплікації хроматину. Таким чином рівень компактизації ДНК перевищує 10000 разів. Активний в транскрипційному відношенні хроматин складає лише 10%.

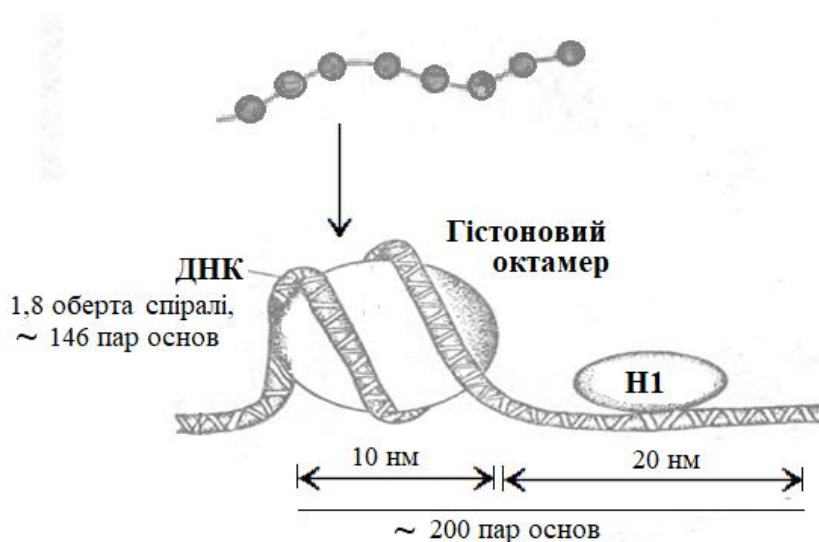
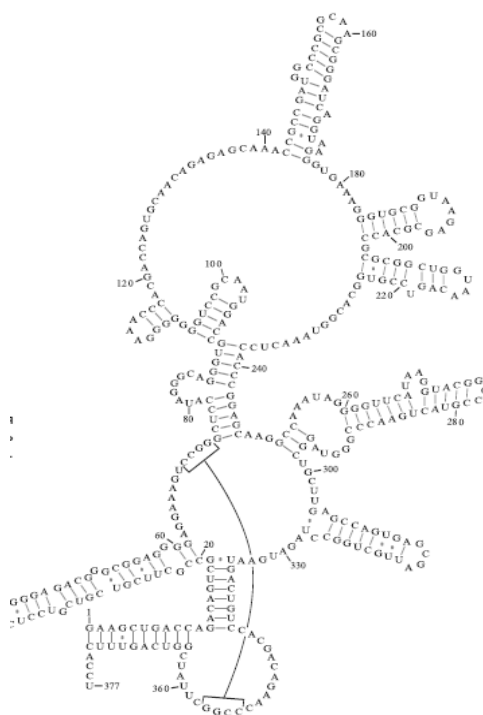


Рис. 2. Схематичне зображення нуклеосомної структури ДНК

*Структура РНК (рибонуклеїнової кислоти).* Це полінуклеотиди, до складу яких входять азотисті основи А, У, Г, Ц, а цукрова складова – рибоза. *Транспортні (тРНК)* транспортують активовані за участі АТР амінокислоти до рибосом – місця синтезу протеїнів, процесу трансляції. *Рибосомні (рРНК)*

входять до складу трансляційного комплексу. *Матричні* (мРНК) є матрицями для синтезу протеїнів на рибосомах.

мРНК мають триплетну будову, де функціональною одиницею є послідовність з трьох нуклеотидів, триплети відповідають певним амінокислотам. За участі ДНК-залежних РНК-полімераз переписується інформація з триплетів ДНК на триплети мРНК за принципом комплементарності, цей процес має назву транскрипція. Існують інші види регуляторної РНК. РНК складається з одного полінуклеотидного ланцюга, який закручується у вигляді спіралі з відповідною послідовністю петель та шпильок, формуючи вторинну структуру (рис. 3):



*Рис. 3. Приклад просторової будови РНК. Відмічені неспіралізовані ділянки (петлі) та спіралізовані, які містять комплементарні основи (шпильки)*

Петлі містять численні некомплементарні ділянки, в тому числі через наявність у складі мінорних основ; в ділянках шпильок виникають зв'язки між комплементарними основами  $A = U$  та  $G \equiv C$ . Довжина цих спіральних ділянок незначна. Має місце також і третинна структура РНК - певна конформація, яка залежить від рН, іонної сили і температури. В деяких вірусах зустрічаються подвійні спіралі РНК.

рРНК складає близько 80% всієї клітинної РНК, вона відносно стабільна і входить до складу нуклеопротейдних немембранних часточок рибосом. У еукаріотів існує 4 види РНК, зокрема 28S та 14S, де S – коефіцієнт седиментації, який пропорційний швидкості осадження частинок за певного відцентрового прискорення і залежить від маси і форми. рРНК мають вторинну структуру, яка забезпечується взаємодією основ, причому 2/3 молекули складають шпильки, а 1/3 являє собою петлі. Містить метильовані нуклеотиди.

тРНК нараховує більше 60 видів, отже 1 амінокислота може кодуватися кількома тРНК (явище виродженості генетичного коду). тРНК виконують адаптерну функцію і реалізують кодову залежність між амінокислотою та відповідним кодоном мРНК. Її спіральні ділянки (до 50% всієї молекули) формуються за принципом комплементарності, петлі містять значну кількість міnorних основ (наприклад, нуклеозид псевдоуридин не містить N-глікозидного зв'язку, а дигідроуридин має відновлений гетероцикл). Зі зростанням рівня метилювання тРНК підвищується її активність. Мінорні та хімічно модифіковані основи протидіють дії власних нуклеаз, які здатні розщеплювати РНК.

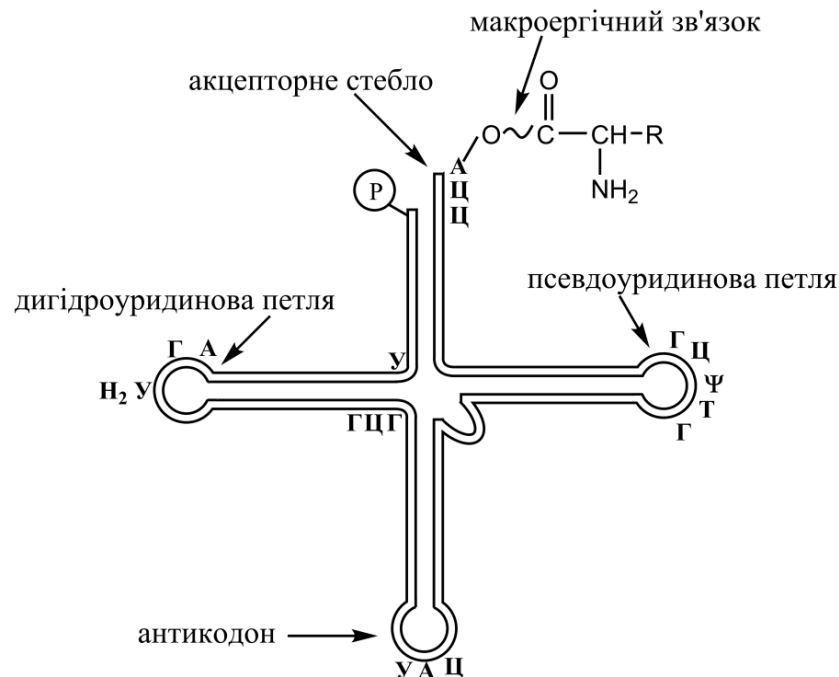
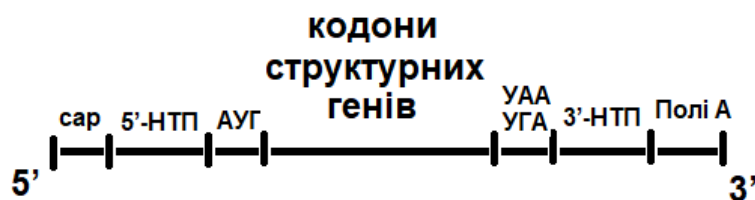


Рис. 4. Просторова структура тРНК. Зазначені мінорні основи:  $UH_2$  – дигідроуридин та  $\psi$  – псевдоуридин в ділянках петель

Вторинна структура тРНК нагадує листок конюшини (рис. 4). На 3'-кінці міститься акцепторне стебло з послідовністю нуклеотидів Ц-Ц-А. Аденін формує макроергічний зв'язок з активованою за участі АТР амінокислотою, внаслідок чого утворюється аміноацил-тРНК; цей процес каталізується аміноацил-тРНК-синтетазою. Взаємодію з аміноацил-тРНК-синтетазою обумовлює дигідроуридинова петля тРНК. Псевдоуридинова петля, яка містить псевдоуридин ( $\psi$ ), забезпечує зв'язок з рибосомою. тРНК містить петлю з антикодоном – триплетом нуклеотидів, який комплементарний кодону мРНК.

мРНК є відносно короткоживучою формою з гетерогенними розмірами, які відображають різну масу поліпептидів. Її первинна послідовність кодує відповідну первинну структуру протеїнів, а також визначає власну вторинну та третинну структури. На 5'-кінці еукаріотичної мРНК міститься «сар», який складається з 7-метилгуаніну, пірофосфатного залишку та метильованого аденіну (рис. 5):



*Рис. 5. Схематичне зображення еукаріотичної мРНК*

«Сар» взаємодіє з трансляційним комплексом і захищає від розщеплення нуклеазами. Ділянка на 3'-кінці складається з послідовності кількох аденінів і позначається полі-А; вона забезпечує транспорт мРНК з ядра, а також і захист від нуклеаз. Внаслідок здійснення транскрипції у клітинному ядрі в структурі про-мРНК закодовані як екзони (кодуючи протеїн фрагменти ДНК), так і інтрони (некодуючи протеїн фрагменти ДНК). У ході процесингу залишаються лише ділянки, які відповідають ексонам і синтезується зріла мРНК за дії ензимного комплексу, який включає нуклеази і лігази. За участі складних ензимних комплексів на рибосомах з активованих амінокислот, що

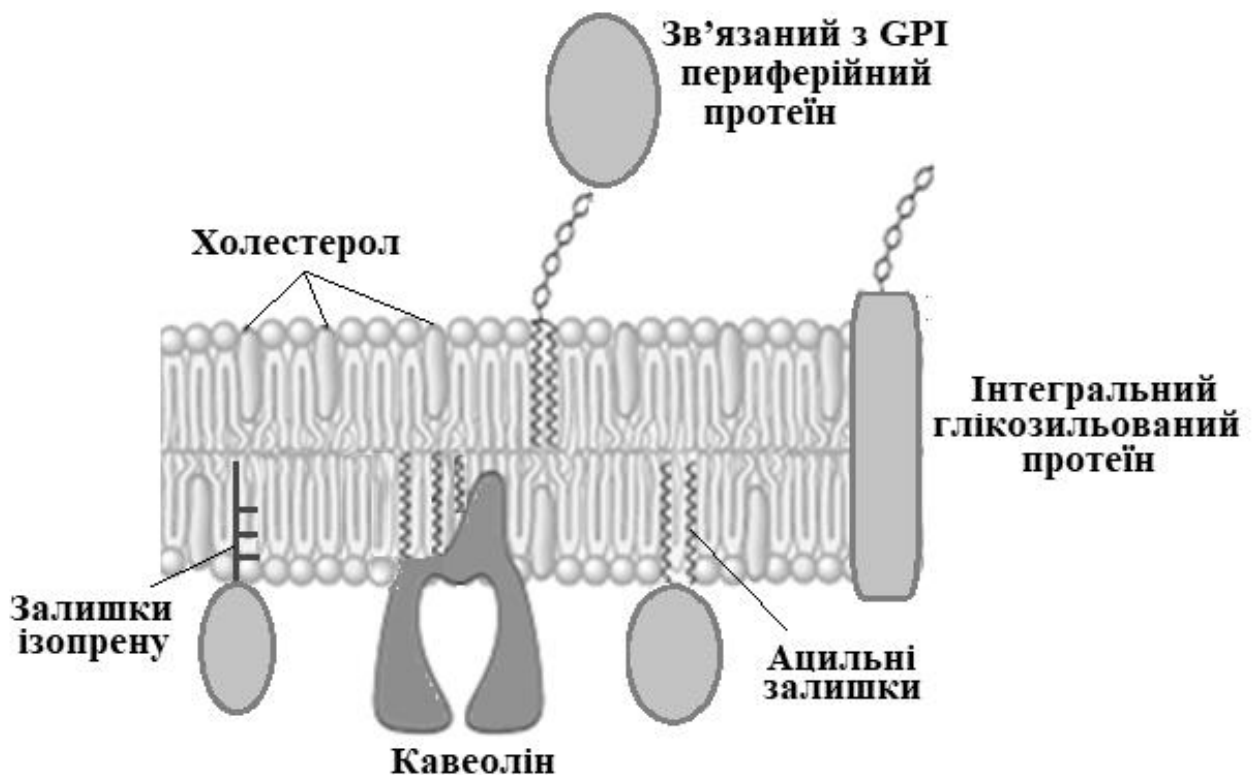
зв'язані з тРНК, на матриці мРНК синтезується протеїнова молекула. Триплети нуклеотидів (кодони) відповідають певним амінокислотам.

*Функції нуклеїнових кислот:* зберігання, відтворення (реалізація) та передача інформації. Зберігання пов'язано з існуванням нуклеопротеїдних комплексів та механізмами репарації (ензиматичної корекції) пошкоджень. Відтворення – це керуюча функція ДНК щодо метаболізму клітини. Вона включає передусім регуляцію біосинтезу ензимів та факторів транскрипції, яка реалізується при дії на клітину гормонів, нейротрансмітерів, цитокінів тощо шляхом зміни концентрації в цитоплазмі сигнальних молекул ( $Ca^{2+}$ , циклічні нуклеотиди, ліпідні месенджери і інш.), а також спрямованого впливу на протеїн-протеїнові взаємодії та збирання сигнальних комплексів. Передача інформації пов'язана з реплікацією ДНК, яка передуює клітинному поділу і здійснюється напівконсервативним шляхом; має злагоджений і дуже складний ензиматичний механізм для запобігання змін у генетичній інформації. Реплікація та біосинтез протеїнів відносяться до реакцій матричного синтезу.

**1.5. Елементи біомембранології.** Одноклітинні організми та окремі клітини багатоклітинних організмів відділені від оточуючого середовища мембранами. Це є принциповою умовою існування високоорганізованих форм життя і колись було основним фактором уособлення протоклітин від світового океану. З іншого боку, сталим на сьогодні є уявлення і про неклітинні форми життя.

Цитоплазма клітин розділена на компартменти – функціонально і просторово відокремлені ділянки, чітка локалізація яких також значною мірою пов'язана з існуванням субклітинних мембранних структур. Мембрани координують перебіг біохімічних реакцій, беруть участь в перетворенні енергії та сприйнятті сигналів. Біологічні мембрани мають однотипну будову: ліпідний бішар, в якому розташовані молекули протеїнів (рис. 6). Наразі загальноприйнятим є уявлення про рідинно-мозаїчну структуру субклітинних мембран. Характерною особливістю біологічних мембран є відносно високий вміст

фосфоліпідів. Ацильні жирнокислотні ланцюги фосфоліпідів та ядра стеролів орієновані до середини ліпідного бішару; гідрофобні взаємодії між ними стабілізують мембрану і надають їй пластичність. Гідрофільні залишки (фосфорна кислота, спиртові групи) орієнтовані до поверхні бішару. Співвідношення і типи протеїнів і ліпідів відрізняються в різних субклітинних мембранних структурах. Наприклад, в плазматичній мембрані достатньо високий вміст холестеролу, а у внутрішній мітохондрійній – кардіоліпіну.



*Рис. 6. Типова будова плазматичної мембрани вищих тварин*

Периферійні протеїни не міцно зв'язані з внутрішньою/зовнішньою поверхнею мембрани завдяки електростатичним взаємодіям і водневим зв'язкам. До периферійних протеїнів належать інтегрини, які забезпечують взаємодію між клітинами та передачу сигналів від позаклітинного матриксу.

Іноді протеїни досить міцно пов'язані з мембраною за рахунок ковалентно приєднаних до протеїну ліпідних якорів. Ними можуть бути залишки ізопрену (пренілювання), або ацильні залишки (ацилювання), часто в останньому випадку має місце пальмітилювання та міристилювання. Характерною

є взаємодія з глікозилінованим фосфатидилінозитолом - GPI. GPI-протеїни локалізовані на зовнішній частині плазматичної мембрани і виконують функції рецепторів, молекул адгезії, гідролаз та інгібіторів протеаз тощо, беруть участь у взаємодії мембранних мікродоменів. Будова різних GPI-протеїнів доволі складна і вирізняється фрагментами цукрів, ліпідів та видом протеїну. Один з варіантів такої структури наведено на рис. 6. Жирнокислотні залишки фосфатидилінозитола вмонтовуються у ліпідний бішар, інозитол зв'язується глікозидним зв'язком з глюкозаміном, який у свою чергу із ще трьома залишками манози. Кінцева маноза утворює зв'язок з фосфоетаноламіном, а останній ковалентно взаємодіє з С-кінцем протеїну.

У складі багатьох мембранних протеїнів є ковалентно зв'язані з протеїновою частиною олігосахаридні залишки. Вуглеводовмісний домен глікопротеїнів розташований завжди на зовнішній поверхні плазмалеми. Рецепторні та каналні протеїни часто мають глікопротеїнову будову. Ділянки глікозилювання позначаються на схемах літерою  $\psi$ .

Інтегральні протеїни занурені у ліпідний бішар; їхні бічні гідрофобні амінокислотні залишки взаємодіють з ліпідами. Деякі протеїни кілька разів пронизують бішар за рахунок гідрофобних амінокислотних послідовностей, формуючи у мембрані  $\alpha$ -спіральні фрагменти (домени); такі структури містять біля 20 амінокислотних залишків. Серед інтегральних протеїнів поширена також структура багат шарових  $\beta$ -циліндрів.

Ліпіди у складі мембран перебувають у двох станах: рідинновпорядкованому і рідиннонепорядкованому; в останньому випадку ацильні залишки внутрішньої частини мембрани перебувають у тепловому русі. Ліпіди і протеїни здатні до латерального пересування в межах площини мембрани, яке обмежується взаємодією з білками цитоскелету та наявністю мембранних рафтів (плотів). Плазматична мембрана має на своїй поверхні особливі ділянки з характерним ліпідним профілем, збагачені холестеролом та сфінголіпідами – мембранні рафти, що дрейфують у ліпідному «океані». Мембранні рафти містять специфічні протеїни, які функціонально пов'язані між собою, в

ряді випадків утворюючи сигнальні комплекси. Інвагінації ділянок мембрани з рафтами разом з внутрішнім ліпідним шаром у цитозоль забезпечується спеціальними білками кавеолінами і називаються кавеолами.

*Транспорт речовин крізь мембрани* в багатьох випадках здійснюється за участі спеціальних протеїнів. Транспортуються незаряджені та заряджені сполуки. Найпростіший варіант транспорту – пасивна дифузія за градієнтом концентрації крізь ліпідний бішар, яка може бути посилена трансмембранними протеїнами і тому має назву полегшена дифузія. Цим шляхом до клітин спеціальними транспортерами Glut переноситься глюкоза, зокрема ізоензим Glut1 активується за дії інсуліну в м'язовій, жировій тканинах та печінці.

Інший варіант транспорту здійснюється проти концентраційного градієнту і спряжений з використанням метаболічної енергії (АТР, градієнт іонів). Первинно-активний транспорт забезпечується АТР і здійснюється помпами, наприклад  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРазами,  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазами. Характерною особливістю їхнього функціонування є конформаційні зміни протеїнів у процесі транспорту. Вторинно-активний транспорт забезпечується енергією електрохімічного градієнту іонів, що створюється за рахунок енергії гідролізу АТР. Наприклад,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза створює на плазматичній мембрані електрохімічний градієнт  $\text{Na}^+$ , який вже використовується як рушійна сила для роботи  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  - обмінника, що транспортує  $\text{Ca}^{2+}$  проти значного електрохімічного градієнту цього катіону з клітини. Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії забезпечується електрохімічним градієнтом іонів водню внаслідок окиснення субстратів дихання і функціонування електронно-транспортного ланцюга. В цьому конкретному випадку позитивно заряджені іони Са пересуваються у бік значного (біля -180 мВ) негативного заряду, який формується на внутрішньому боці внутрішньої мітохондрійної мембрани, тобто реалізується електрофоретичний механізм транспорту.

Якщо крізь мембрану переноситься лише одна речовина, то цей транспортний процес називається уніпортом (акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями, транспорт глюкози). Якщо в одному напрямку транспортуються дві речовини –



симпорт, наприклад, в кишковому епітелії транспортується глюкоза разом з  $\text{Na}^+$ . Функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази є прикладом антипортного транспорту.

Транспорт речовин, який здійснюється шляхом полегшеної дифузії або внаслідок функціонування pomp та обмінників часто характеризується кінетичними закономірностями характерними для ензиматичних реакцій – насиченням за субстратом переносу та специфічністю. Ці транспортні процеси залежать від температури. Саме тому описані протеїни відносять до ензимів – транслоказ.

Важливим варіантом транспорту є іонні канали, які до транслоказ не належать. Транспорт в цьому випадку здійснюється за участі протеїнів, що формують гідрофільну пору в мембрані. Каналам властива ненасичуваність за субстратом переносу і дуже висока провідність. Вони виявляють певну специфічність до іонів і керуються змінами трансмембранного електричного потенціалу, зв'язуванням лігандів, іншими регуляторними молекулами.

## **РОЗДІЛ 2. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО КЛІТИННЕ СИГНАЛЮВАННЯ. ПЕРВИННІ ТА ВТОРИННІ МЕСЕНДЖЕРИ. РЕЦЕПТОРИ. ГОЛОВНІ ТИПИ І ПРИНЦИПИ ТРАНСДУКЦІЇ КЛІТИННОГО СИГНАЛУ**

Фундаментальною основою функціонування клітини є здатність реагувати на сигнали, що виникають у позаклітинному середовищі. У випадку розгляду внутрішньоклітинної сигналізації *сигналом* будемо називати інформацію, яка сприймається відповідними спеціалізованими структурами клітини і трансформується у клітинну відповідь. Під інформацією в цьому курсі буде майже завжди розумітися зміна певного фізико-хімічного параметру. В ряді випадків можна говорити також про виникнення внутрішньоклітинного сигналу.

*Обов'язковими етапами передачі сигналу є хімічні процеси.* Позаклітинний сигнал може бути зміною концентрації хімічної сполуки або фотонами, або механічним подразненням тощо. Таким способом бактеріальна клітина рухається у напрямку поживних речовин, світла, оптимального рН, осмо-

тичного тиску тощо. Вона сприймає сигнали про наявність токсичних речовин, за несприятливих умов утворює спори. У багатоклітинному організмі клітини обмінюються інформацією про зміни іонного складу, концентрацію глюкози, метаболічні процеси в окремих тканинах, розташування клітин під час розвитку зародка. Передача сигналів між клітинами і механізми внутрішньоклітинної сигналізації задіяні в таких процесах як ріст, проліферація, диференціювання, збудження, рух, секреція, агрегація, хемо/фоторецепція, запрограмована клітинна загибель. *Внутрішньоклітинна сигналізація є фундаментальною основою регуляції клітинних функцій в цілому та окремих метаболічних шляхів зокрема.* Існує велика кількість біологічних сигналів і варіантів відповідей на них, але наразі сформоване уявлення про кілька еволюційно консервативних шляхів передачі сигналу в клітині, що дозволяє казати про *виродженість сигнальних шляхів.* Принципово важливими процесами на різних рівнях організації живого є регульоване і специфічне фосфорилування/дефосфорилування ефекторних протеїнів і зміна іонної проникності субклітинних мембран. Геном людини складає біля 28 тис. генів; близько 10% від цієї кількості складають протеїни, які забезпечують внутрішньо- і міжклітинну сигналізацію, більше 500 належать ензимам-протеїнкіназам.

Незалежно від природи первинного сигналу клітина трансформує його у вигляді зміни концентрації певних молекул в цитоплазмі та ефективності протеїн-протеїнових взаємодій. Тому використовується термін сигнальна молекула, зокрема сигнальний протеїн. В багатьох випадках в процесі передачі сигналу змінюється конформація молекул протеїнів плазматичної мембрани, реалізуються складні протеїн-протеїнові та протеїн-ліпідні взаємодії. *Процес трансформації сигналу у зміни концентрації внутрішньоклітинних сигнальних молекул або/і ефективності протеїн-протеїнових взаємодій, та, в кінцевому рахунку, у клітинну відповідь має назва передача (трансдукція) клітинного сигналу.* При цьому особливу роль відіграють оборотні зміни конформації спеціальних сигнальних протеїнів або ефекторних протеїнів. Первинним сигналом може бути гормон, нейротрансмітер, цитокін, фактор росту тощо.

Такі сполуки мають назву *первинні месенджери* (первинні посередники). Сигнальна молекула, концентрація якої в клітині змінюється за дії первинного месенджера, має назву *вторинного месенджера* (вторинного посередника). В багатьох випадках первинний месенджер взаємодіє зі специфічною протеїновою молекулою (молекулами) на поверхні плазматичної мембрани або в цитоплазмі – *рецептором*. Процес передачі сигналу від поверхні клітинної мембрани на цитозольні ефекторні системи має назву *трансдукція сигналу крізь плазматичну мембрану*. Історично саме цей зміст вкладався в термін «трансдукція клітинного сигналу». Кавеоли (і мембранні рафти) можуть містити співлокалізовані компоненти певних сигнальних шляхів, рецепторні молекули, іонні канали та взаємодіють з протеїнами цитоскелету, наприклад, актиновими філаментами – мікрофіламентами. Просторове (структурно-функціональне) об'єднання протеїнів, які належать до певного сигнального шляху має назву *сигналосома* (*сигнальний модуль, сигнальний комплекс*). Кажуть про тимчасове і оборотне збирання сигнального модуля в процесі трансдукції сигналу в клітині. Будь-яка сполука, що взаємодіє з рецептором, має назву *ліганд*. Фізіологічно-значуща *ліганд-рецепторна взаємодія* зумовлена утворенням нековалентних зв'язків і в нормі є оборотною. Сполуки, які активують передачу сигналу від рецепторів мають назву *агоністів*; сполуки, які зв'язуються з рецептором, але блокують передачу сигналу від нього є *антагоністами*.

До загальних закономірностей трансдукції клітинного сигналу відносять: специфічність, високу афінність (спорідненість), кооперативність, ампліфікацію, десенсибілізацію, інтегрування і деякі інші. *Специфічність* визначається відповідністю структури рецептора та первинного месенджера. У багатоклітинних організмів специфічність досягається також розташуванням специфічних рецепторів лише на певних типах клітин: тиротропін-релізінг фактор гіпоталамуса взаємодіє лише з клітинами передньої частки гіпофіза, клітини інших тканин не містять відповідні рецептори. Специфічність відповіді досягається також особливостями метаболізму різних типів клітин.

Наприклад, еритроцити та гепатоцити містять рецептори для епінефрину (адреналіну). В гепатоцитах епінефрин викликає глікогеноліз. Втім еритроцити не містять глікогену та ензимів його катаболізму. Рецептори мають *високу спорідненість* (низьку  $K_d$ ) до своїх лігандів, зазвичай  $K_d$  є нижчою за нМ (для феромонів навіть  $10^{-15}$  М), що вказує на дуже високу чутливість рецепторів до досить низьких концентрацій сигнальних молекул. *Кооперативність* у ліганд-рецепторній взаємодії проявляється значними змінами активності рецептора за незначних змін концентрації ліганду. *Ампліфікація* - явище посилення сигналу (упродовж мілісекунд на кілька порядків) при проходженні від рецептора до ефекторних молекул. Наприклад, зв'язування одного ліганду з одним рецептором призводить до залучення ефекторного ензиму – кінази. Один рецептор активує декілька кіназ, кожна з яких фосфорилує і залучає до трансдукції багато ефекторних молекул нижчого рівня тощо. Якщо первинний месенджер діє впродовж тривалого часу, то сигнальна система зазнає *десенсibiliзації* – *зниження чутливості*. Це приклад регуляції за принципом зворотного зв'язку, а саме негативної зворотної регуляції. В основі цього явища часто лежить фосфорилування рецептора та видалення його з поверхні мембрани. При зниженні концентрації ліганду протягом певного часу активність рецептора може відновлюватися. В окремих випадках ліганд-рецепторний комплекс зазнає інтерналізації і піддається у цитозолі протеолізу. Аналогічне десенсibiliзації явище спостерігається, коли ми заходимо з темного приміщення на яскраве світло. Якщо два сигнали протилежно впливають на клітинні параметри, то відповідь може бути наслідком *інтегровано-го внеску* сигналу з обох рецепторів. Втім у складних системах часто спостерігається *неадитивність*, коли відповідь не є простою сумою окремих парціальних внесків. Ще одним загальним принципом функціонування сигнальних систем є *мережевий принцип*, коли у відповідь на окремий сигнал клітина відповідає як єдина система, бувають задіяні елементи різних сигнальних каскадів, що нагадує відповідь павутини на потрапляння до неї мошки. Для сигнальних систем характерна *виродженість*: сотні первинних месенджерів

реалізують свій ефект через обмежену кількість консервативних сигнальних шляхів. З іншого боку, за дії одного первинного месенджера можуть включатися різні сигнальні шляхи.

Первинними месенджерами можуть бути не лише екзогенно синтезовані сполуки, але й ендогенні клітинні метаболіти. Наприклад, АТР та глутамат, що синтезуються клітиною, є первинними месенджерами для цієї ж самої клітини, коли екскретуються назовні. Такі регулятори мають назву *аутокринних регуляторів*. Коли клітина (тканина) синтезує назовні речовини, які впливають на функціонування оточуючих клітин/тканини, то це має назву *паракринна регуляція*.

Серед первинних месенджерів виділяють: гормони (в тому числі тканинні або місцевої дії), цитокіни, фактори росту, нейротрансмітери, ейкозаноїди, пурини, газоподібні месенджери, одоранти, феромони тощо. Гідрофільні первинні месенджери (катехоламіни, ацетилхолін, серотонін, АТР, інсулін тощо) є лігандами рецепторів, які локалізовані на поверхні клітин. Гідрофобні первинні месенджери (стероїдні, тиреоїдні гормони) мають рецептори у ядрі або зв'язуються з рецепторними протеїнами у цитоплазмі, втім можуть взаємодіяти і з рецепторами на плазмалемі.

*Гормони* - біологічно-активні речовини різної хімічної природи, які продукуються ендокринними залозами (внутрішньої секреції) безпосередньо в кров. Є регуляторними молекулами, чинять вплив на експресію генів, активність ензимів, клітинний цикл, ріст та розвиток організму. Можуть діяти на рецептори поверхні клітини та цитозольні рецептори (стероїдні гормони зокрема). Працюють за низьких концентрацій ( $10^{-9}$  М –  $10^{-12}$  М), мають високу специфічність дії. За хімічною структурою поділяють на гормони протеїнової природи (прості протеїни, глікопротеїни), пептидної, похідні амінокислот та ліпоїдної природи. До місцевих/тканинних гормонів, які можуть діяти безпосередньо або поблизу місць утворення в тканинах, відносять: гістамін (похідне амінокислоти гістидину, секретується спеціалізованими імунними клітинами сполучної тканини – тучними клітинами), серотонін (похідне амінокис-

лоти триптофану, секретується тромбоцитами), брадікікін й інші. Вони викликають розширення судин і збільшують проникність судинної стінки, що зумовлює вихід лейкоцитів з циркуляторного русла у місця запалення. Фізичне пошкодження тканини або проникнення інфекції ініціює специфічну відповідь, спрямовану на усунення подразника та мінімізацію наслідків його дії – реакцію запалення. Назва гормони походить від грецької «приводити в дію», «збуджувати». Ряд дослідників розуміють під гормонами всі первинні месенджери загалом, але в цьому курсі ми будемо притримуватись більш вузького значення цього терміну.

*Цитокіни* – загальна назва для біологічно-активних сполук протеїнової природи різної дії, первинних месенджерів. Були спершу відкриті як екстракційні сигнальні молекули, що взаємодіють з клітинами імунної системи (імуноцитокіни) і модулюють їхні проліферативні властивості. Згодом встановили, що вони взаємодіють з клітинами різних типів. Включають в себе окремі фактори росту, фактори некрозу пухлин (Tumor Necrosis Factor, TNF), інтерлейкіни (Interleukin, IL), колонієстимулювальний фактор (Colony Stimulating Factor, CSF). Виділяють в окрему групу прозапальні цитокіни (Interferon,  $INF\gamma$ ,  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  тощо) та хемокіни, які ініціюють хемотаксис інфламаторних клітин в місця запалення й інші. Серед інтерлейкінів виділяють як прозапальні (IL-1, 2, 6, 8), так і антизапальні медіатори (IL-4, IL-10). При дослідженні компонентів, які необхідні для підтримання життєздатності ізольованих тканин та забезпечення поділу клітин, були відкриті *ростові фактори*. Середовище культивування клітин/тканин ссавців містить поживні речовини, вітаміни у буферному сольовому розчині, необхідним компонентом є сироватка тварин, наприклад бичача ембріональна сироватка, яка містить фактори росту. З тромбоцитів був ізольований пептид масою 30 кДа, що мав мітогенні властивості і одержав назву тромбоцитарний ростовий фактор (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF). Ідентифіковано декілька десятків поліпептидів, які мають подібні властивості, наприклад епідермальний ростовий фактор (Epidermal Growth Factor, EGF), інсуліноподібний ростовий фактор (Insu-

lin Like Growth Factor, IGF), ростовий фактор ендотелію судин (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Ростові фактори ініціюють множинні ефекти, зокрема контролюють ріст клітин, диференціювання, контролюють експресію сотень генів, деякі здатні регулювати апоптоз.

Речовинами, які регулюють запалення, проникність та тонус судинної стінки, є *ейкозаноїди*, що мають функції ауто/паракринних регуляторів. Назва ейкозаноїди пішла від грецького слова «двадцять», оскільки вони є похідними арахідонової (C<sub>20</sub>, 4 подвійних зв'язка) або інших ненасичених (поліненасичених жирних кислот). До них головно відносяться простагландини, лейкотрієни та тромбоксани. Протизапальний та протибольовий ефекти аспірину пов'язані з його інгібуванням синтезу простагландинів.

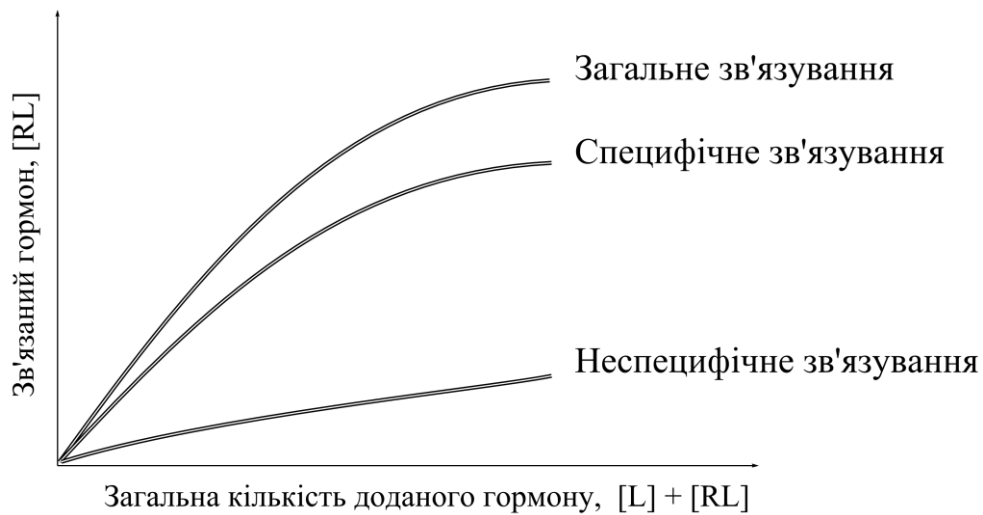
*Нейротрансмітери* вивільняються в синапсах, які поєднують нервові клітини між собою або нервові і м'язові. В пресинапсі, у відповідь на деполяризацію нервового закінчення та зростання концентрації Ca<sup>2+</sup>, везикули, які містять нейротрансмітер, зливаються з пресинаптичною мембраною, внаслідок чого сполука вивільнюється у синаптичну щілину і взаємодіє з відповідними рецепторами на постсинаптичній мембрані. В подальшому зміна іонної провідності постсинапса може викликати деполяризацію мембрани і збудження наступної нервової або м'язової клітини. В центральній нервовій системі глутамат є найважливішим збуджуючим медіатором, а ГАМК (гамма-аміномасляна кислота) та гліцин – гальмівними. В нейром'язовій передачі центральна роль належить ацетилхоліну.

Взаємодія ліганда з рецептором призводить до конформаційних змін останнього і біологічної активності. Рецепторним протеїном може бути ензим, регулятор ензиму, іонний канал, регулятор експресії генів. Рецептор може знаходитися на поверхні клітини або в цитоплазмі (ядрі). Ліганд-рецепторна взаємодія є зворотною і обумовлена водневими зв'язками, гідрофобними та електростатичними взаємодіями. При кількісному аналізі зв'язування ліганду з рецептором використовують метод Скетчарда. Згідно закону діючих мас:



$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{1}{K_d}$$

Константа рівноваги, тут константа асоціації  $K_a$ , є зворотною величиною до константи дисоціації  $K_d$ . Чим менша величина  $K_d$ , тим більша афінність (спорідненість) ліганда до рецептора. Зв'язування ліганду з рецептором здатне до насичення:



Коли зв'язування досягає рівноваги, загальна кількість центрів зв'язування  $V_{\max}$  дорівнює сумі кількості незайнятих [R] і зайнятих [RL] центрів. Наприклад, радіоактивно мічений ліганд додають до мембранної фракції, що містить рецептор, через певний час (досягнуто стан рівноваги) незв'язаний ліганд відмивають. Для того, щоб віддеференціювати неспецифічне зв'язування, додають надлишок неміченого ліганду, який конкурує з міченим лише за центри зв'язування. В наведених нижче координатах (рис. 7) досягається лінеаризація, що дозволяє розрахувати основні параметри зв'язування  $V_{\max}$  та  $K_d$ .

В багатьох випадках величина  $K_d$  знаходиться в межах  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  М, що свідчить про дуже міцне зв'язування – високий афінітет. За наявності кооперативних ефектів графік відхиляється від лінійного. Значення  $K_d$  еквівалентно концентрації ліганда, при якій половина рецепторів зв'язана з лігандом. Важливою кількісною характеристикою ефективності дії ліганда, яку визна-



чають в експериментах, є також його концентрація, яка викликає напівмаксимальну клітинну відповідь ( $EC_{50}$ ).

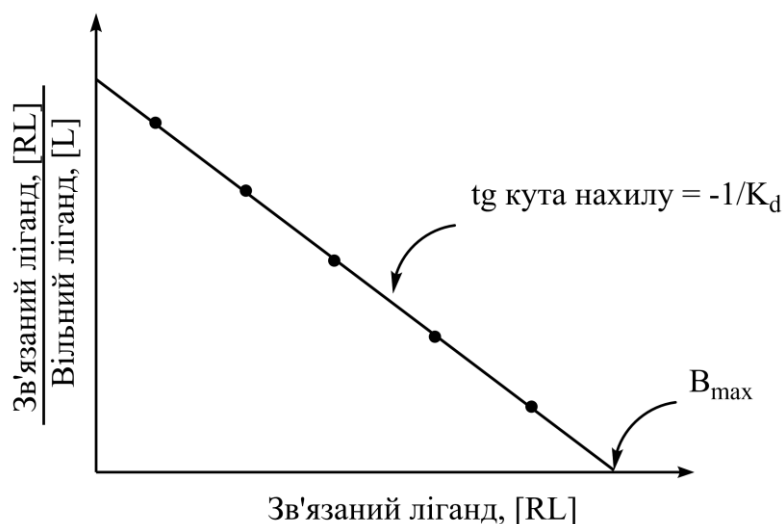


Рис. 7. Графік Скетчарда,  $R$  – рецептор,  $L$  - ліганд

За концентрації  $10^{-10}$  М кількість ліганда в об'ємі клітини діаметром 12 мкм складає 60 молекул. Внаслідок явища ампліфікації окупація лише 2% рецепторів може призвести до повноцінної функціональної відповіді клітини, наприклад, у випадку посилення метаболізму глюкози в адипоцитах за дії інсуліну. Надлишковість рецепторів є дискусійним питанням, можливо це потрібно для відповіді на дуже низькі концентрації деяких гормонів у випадку невисокої їх спорідненості до рецепторів. Цей же факт потребує наявності надійного негативного зворотного зв'язку, оскільки подальше зростання вторинного месенджера вже не призведе до адекватної відповіді, але затягне її у часі і може бути токсичним для клітини.

Поверхня клітини містить 10-20 тис. рецепторів до окремих гормонів. Для виділення рецепторів їх солюбілізують з мембрани за допомогою детергентів і очищують афінною хроматографією; через хроматографічну колонку наповнену сорбентом з пришитим лігандом пропускають грубу фракцію солюбілізованих з мембрани протеїнів. Рецепторні протеїни одержують за допомогою ДНК-клонування й інших рекомбінантних ДНК-методів.

До вторинних месенджерів відносяться сполуки різної хімічної будови з відносно низькою молекулярною масою. Це іони ( $\text{Ca}^{2+}$ ), циклічні нуклеотиди (сAMP, сGMP), ліпідні молекули або продукти перетворення ліпідів (фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат, діацилгліцерол, інозитол-1,4,5-трисфосфат, похідні сфінголіпідів, ейкозаноїди тощо), «газоподібні» месенджери (NO, CO,  $\text{H}_2\text{S}$ ), пероксид водню та деякі інші. Наразі *сформовано декілька критеріїв, які дозволяють віднести певну сполуку до категорії вторинних месенджерів*. Ось головні з них:

- вміст вторинного месенджера в клітині змінюється, найчастіше зростає, за дії позаклітинних агоністів (первинних месенджерів);
- штучне введення вторинного месенджера в клітину призводить до клітинної відповіді, аналогічній дії первинного месенджера;
- зворотність дії;
- існування надійних механізмів зниження концентрації вторинного месенджера;
- наявність конкретних клітинних (біохімічних) мішеней.

Розрізняють основні шість типів/механізмів трансдукції клітинного сигналу та відповідних структур, які забезпечують цей процес:

- *іонні канали плазматичної мембрани*, які змінюють провідність у відповідь на зміну концентрації сигнальної молекули або мембранного потенціалу;
- *ензими-рецептори* (рецепторні ензими): первинний месенджер, наприклад інсулін чи IGF, зв'язується з позаклітинним доменом рецепторного протеїну, що призводить до зміни конформації і стимулювання ензиматичної активності внутрішньоклітинного (цитозольного) домену;
- *рецептори, які безпосередньо не виявляють ензиматичної активності, але при зв'язуванні ліганду залучають до трансдукції сигналу внутрішньоклітинні ензими*: JAKs-STATs (Janus Kinases, Signal Transducer and Activator of Transcription proteins) сигнальний шлях, який активується, наприклад, за дії  $\text{INF}\gamma$  на клітини і супроводжується зміною експресії генів;

- *рецепторні протеїни*: при зв'язуванні сигнального ліганду з рецептором, наприклад епінефрину з  $\beta$ -адренорецептором, у трансдукцію сигналу залучається внутрішньоклітинний GTP-зв'язувальний протеїн (G-протеїн), в подальшому активується ключовий ензим сигнального шляху, який утворює внутрішньоклітинний вторинний месенджер;

- *ядерні рецептори* гідрофобних сигнальних молекул (наприклад, стероїдних гормонів): при зв'язуванні з лігандом рецепторний протеїн змінює конформацію і набуває можливості регулювати експресію генів;

- *рецептори адгезії* (наприклад, інтегрини), які взаємодіють, зокрема, з колагеном позаклітинного матриксу, що визначає перебудови цитоскелету, міграцію клітин або прикріплення їх до матриксу тощо.

### РОЗДІЛ 3. ОКРЕМІ ВІДОМОСТІ ПРО СТРУКТУРУ І РЕГУЛЯЦІЮ ГЕНОМУ

**3.1. Ген** – ділянка ДНК, яка кодує поліпептидний ланцюг або функціональну молекулу РНК. В еукаріотичному геномі окремі субодиниці протеїну часто кодуються різними генами. Еукаріотичні гени крім кодуючих поліпептидні ланцюги ділянок (екзонів) включають некодуючі послідовності (інтрони). Тому внаслідок транскрипції утворюється незріла про-мРНК, яка дозріває у мРНК (процесинг), внаслідок чого можуть утворитися сплайс-варіанти протеїнів. Між генами знаходяться некодуючі ділянки ДНК – спейсери. Спейсерні ділянки можуть бути сайтами/локусами зв'язування ДНК-залежного РНК-полімеразного комплексу та регуляторних протеїнів. Ділянки зв'язування РНК-полімерази називаються промоторами; вони або безпосередньо розташовані на початку гена, або відокремлені функціональними локусами. Схема окремих елементів регуляції функціонування гену за участі транскрипційного фактору p53 наведена нижче (рис. 8). У еукаріот РНК-полімераза зв'язується з промотором у комплексі з загальними факторами транскрипції протеїнової природи. В промоторі виділяють окремі нуклеотид-

ні послідовності – бокси (ТАТА-бокс, рідше ГЦ-бокс), що можуть виконувати ініціаторну функцію. Загальні фактори транскрипції знаходяться в усіх клітинах, вони необхідні для зв'язування РНК-полімерази і прочитування будь-якого гену. В промоторній ділянці з ТАТА-боксом взаємодіє протеїн ТВР (TATA Binding Protein), що ініціює приєднання кількох ТАФ-протеїнів (TBP Assotiated Factors). Цей комплекс і складає загальні фактори транскрипції ТFIID (Transcriptional Factor D for polymerase II). Інші транскрипційні фактори (специфічні) підвищують активність лише певних генів, а локуси ДНК, з якими зв'язуються ці фактори належать як промотаним ділянкам, так і енхансерним. Енхансери можуть бути розташовані далеко від відповідного гена, але внаслідок суперспіралізації ДНК і утворення петель енхансери зближуються з промоторами. Для певних генів існує декілька енхансерів, що взаємодіють з різними транскрипційними факторами.

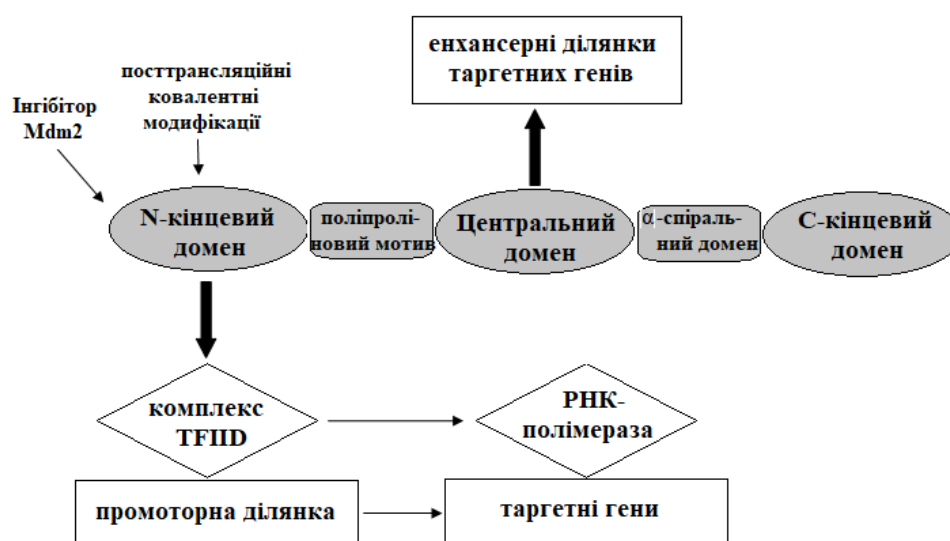


Рис. 8. Структура транскрипційного фактору p53 та схема його взаємодії з промоторними і енхансерними ділянками відповідних генів

Геноспецифічні фактори транскрипції сприймають та передають клітинний сигнал до апарату транскрипції та хроматину. Мають модульну структуру і включають наступні домени: ДНК-зв'язувальний, димеризації, активації і регуляції. В більшості випадків активні форми транскрипційних факторів є димерами (гомо- чи гетеродимерами) або мають олігомерну структуру. В людському геномі ідентифіковано понад 2 тисячі транскрипційних факторів.

У ДНК-зв'язувальних протеїнах наявні подібні структурні елементи, деякі з яких схематично зображено й описано нижче (рис. 9):

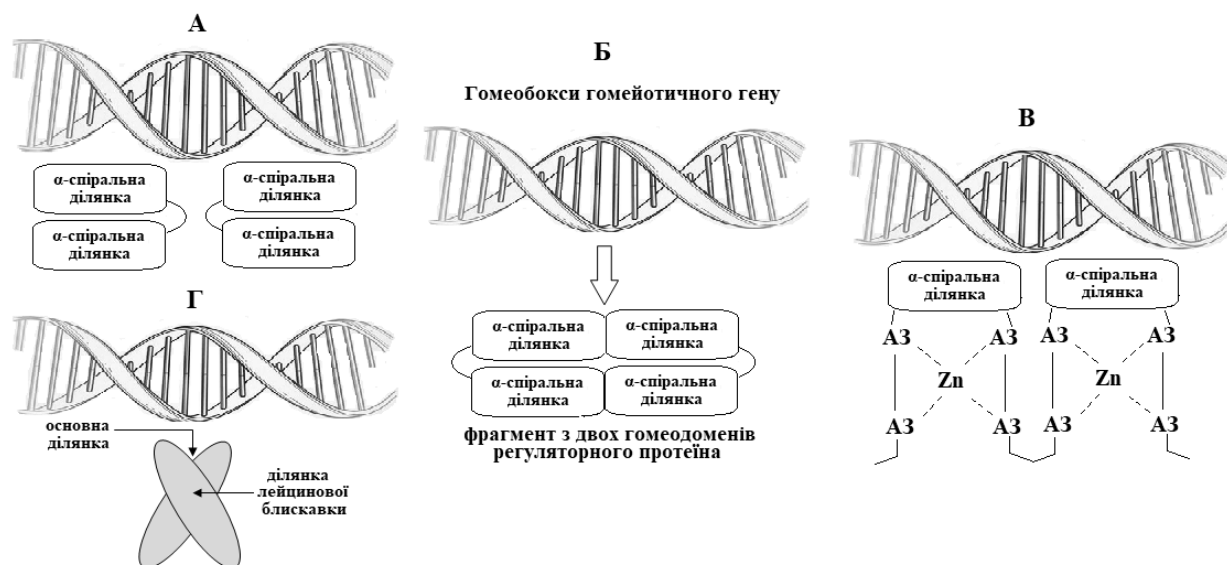


Рис. 9. Деякі основні структури ДНК-зв'язувальних протеїнів, АЗ – амінокислотний залишок

Серед них протеїни, що містять *мотив «спіраль-оберт-спіраль»*. Вони складаються з двох субодиниць, які взаємодіють з паліндромними послідовностями ДНК (послідовності, які з урахуванням полярності ланцюгів, прочитуються однаково з обох боків). Кожна субодиниця включає дві  $\alpha$ -спіралі, що поєднані петлею. З ДНК взаємодіє одна з цих спіралей. Це найрозповсюдженіша структура у протеїнів-репресорів прокариот. Гени, які відповідають за ембріональний розвиток у еукаріот називаються *гомейотичними генами*. Продукти цих генів, регулюючи транскрипцію, відповідають за структурно-функціональні перебудови тканин та складаються з окремих доменів – гомеодоменів. Гомейотичний ген містить екзони (гомеобокси), які кодують окремі гомеодомени. Кожний гомеодомен має мотив «спіраль-оберт-спіраль», одна з  $\alpha$ -спіралей цього мотиву взаємодіє з ДНК. Важливими транскрипційними факторами є протеїни, що містять *мотиви «цинкових пальців»*. «Пальців» може бути декілька десятків. Кожний «палець» стабілізований атомом цинка, який утворює координаційні зв'язки з двома залишками цистеїну та двома залишками гістидину (існують інші конфігурації). На зовнішній поверхні

«пальця» знаходиться  $\alpha$ -спіраль, яка взаємодіє з ДНК. До таких протеїнів відносяться рецептори стероїдних гормонів. Транскрипційні фактори, що мають лейцинову блискавку, складаються з 2 субодиниць (гомодимери або гетеродимери), які поєднуються між собою гідروفобними взаємодіями між залишками лейцину. Зв'язок з ДНК забезпечується основною ділянкою, яка збагачена лізином/аргініном.

**3.2. Коротка характеристика вибраних специфічних транскрипційних факторів.** *AP-1* (Activating Protein-1). Являє собою родину димерних bZIP (basic region, leucine zipper) протеїнів, компонентами яких є Jun, Fos, ATF/CREB та інші. Основний регіон bZIP домену взаємодіє з ДНК, а лейцинова блискавка відповідає за димеризацію протеїнових партнерів.

*NRF2* (Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2). Це також протеїни родини bZIP, які регулюють детоксикацію електрофільних ксенобіотиків та відповідь на окисний стрес. Активують зазначені фактори електрофіли та  $H_2O_2$ . Ці протеїни зв'язуються з електрофіл-чутливими елементами E<sub>h</sub>RE в промоторах генів-мішеней. Протеїнами партнерами є маленькі MAF-протеїни (гомодимеризація), але можливі гетеродимери із Jun.

*CREB* (cAMP Response Element-Binding protein) є одним з 3 членів родини cAMP-чутливих транскрипційних факторів (CREB, CREM, ATF-1 (Activating Transcription Factor 1)). CREB зв'язується в гомодимерній формі з консервативною послідовністю ДНК – CRE (cAMP Response Element). CREB має у своєму складі сайти димеризації, зв'язування з ДНК та N-термінальний активаційний домен, які включає 2 регіони: фосфорилування (P box) та ділянку, що містить 2 глутамін-багаті послідовності. Фосфорилування CREB (Ser133) дозволяє провзаємодіяти з коактиватором CBP (CREB Binding Protein), інша назва p300, та стимулює CREB-залежну транскрипцію. Регуляторне фосфорилування здійснюється більше, ніж 20 протеїнкіназами.

*TP53* (p53). Мутації в гені цього транскрипційного фактора мають місце в 75% випадків злоякісної трансформації. Це найважливіший пухлинний

супресор. Забезпечує комплексну клітинну відповідь на дію ДНК-пошкоджуючих агентів, включаючи окисний стрес. До таких факторів належать нерепаровані пошкодження ДНК (одноланцюгові нерепаровані розриви), порушення розходження хромосом під час мітозу, руйнування мікротрубочок тощо. p53 активує гени, що зупиняють поділ клітини (*P21*, *GADD45*), стимулюють апоптоз (*BAX*, *KILLER*, *PIG*) та репресують гени, які блокують апоптоз (*BCL2*, *RELA*), активує гени, що гальмують ангиогенез. В клітинах p53 постійно синтезується і постійно розкладається, тому в нормі його стаціонарна концентрація низька. За дії стресорних чинників швидкість деградації знижується, а також відбувається активація шляхом ковалентної модифікації. Трансактиваційний домен в N-термінальній частині необхідний для регуляції таргетних генів (див. рисунок вище). Він містить пролін-багату ділянку, яка взаємодіє з негативним регулятором MDM2 (Murine Double Minute 2), що впливає на стабільність p53. Центральний домен через атом цинку зв'язується з енхансерною ділянкою ДНК. У C-термінальній частині міститься регіон, який забезпечує тетрамеризацію та ділянки, які взаємодіють із сигналами, що забезпечують імпорт/експорт транскрипційного фактора в ядро. На N-кінці знаходяться залишки серину/треоніну, що фосфорилуються протеїнкіназами, які активуються, наприклад, у відповідь на пошкодження ДНК (ДНК-протеїнкіназа, протеїн АТМ тощо). Кінази знімають також блокувальний вплив MDM2. Взаємодія з енхансерами регулюється шляхом фосфорилювання, ацетилювання, глікозилювання C-кінцевого домену, що визначає специфічність відповіді, оскільки різні енхансери відповідають різним генам.

*NOTCH*. Рецептори і ліганди цього сигнального шляху є мембранними протеїнами і для його активації необхідним є міжклітинна взаємодія. Активация NOTCH передбачає частковий протеоліз і наступне вивільнення з плазмалеми внутрішньоклітинного домена NICD (NOTCH IntraCellular Domain) після взаємодії з лігандом сусідньої клітини. Відщеплення NICD опосередковується  $\gamma$ -секретазним комплексом і полегшується попереднім протеолітичним відщепленням NECD (NOTCH Extracellular Domain) відповідною мета-

лопротеїназою. Цей сигнальний шлях залучений в диференціацію нейронів, формування кровоносних судин, розвиток ембріону тощо.

*NF-κB* (Nuclear Factor kappa B). Найпоширеніша композиція цитоплазматичного комплексу є *NF-κB/I-κB*. Зв'язування інгібіторного протеїну *I-κB* попереджає транслокацію *NF-κB* в ядро і взаємодію з ДНК. Класичними активаторами цього транскрипційного фактору є прозапальні цитокіни, такі як *TNF-α* (Tumor Necrosis Factor), *LPS* (LipoPolySaccharides, бактеріальні ліпополісахариди), *IL-1* (Interleukin-1). Вони стимулюють кіназний комплекс (IKK) та викликають фосфорилування *I-κB*. Наслідком є протеосомна деградація останнього, транслокація *NF-κB* в ядро і зв'язування із промоторними/енхансерними ділянками таргетних генів. Таргетні гени кодують прозапальні цитокіни, хемокіни, фактори адгезії, ростові фактори та ензими, які продукують вторинні регулятори запалення на кшталт циклооксигенази-2, індукцибельної NOS та гемоксигенази.

*SP1* (Specificity Protein 1) є членом великої родини ДНК-зв'язувальних протеїнів, які містять мотив з 3 цинкових пальців (*Cys2His2 – type zinc finger*), який необхідний для розпізнавання GC-багатих регіонів в промоторних послідовностях. *SP1* містить 2 глутамін-багатих мотива, необхідних для транскрипційної активності; поряд міститься сайт збагачений серином/треоніном, який може підлягати регуляторному фосфорилуванню.

*HIF-1* (Hypoxia-Inducible Factor-1) відіграє суттєву роль у відповіді на гіпоксію на системному та клітинному рівнях. Задіяний в ангиогенезі та еритропоезі. Забезпечує метаболічну адаптацію до гіпоксії шляхом активації гліколізу. Цей димерний комплекс побудований з індукцибельної (*HIF-1 α*) та конститутивної (*HIF-1 β*) субодиниць. Обидві мають характерну протеїнову структуру: основна ділянка, спіраль-петля-спіраль (*bHLH*). Гетеродимер зв'язується з послідовністю ДНК (*G/ACGTG*) в гіпоксія-чутливих елементах (*HREs*) промоторів таргетних генів. *HIF-1 α* містить два багаті на залишки проліну консервативні домени. Гідроксилування цих залишків каталізується пролілгідроксилазою (*PHD*) за нормоксії. Це призводить до взаємодії *HIF-1α*



з протеїном pVHL (Hippel–Lindau tumor suppressor), наслідком чого є протеасомна деградація комплексу. За гіпоксії вміст HIF-1 $\alpha$  зростає. До цього ж призводить підвищення концентрації в клітині окисників O<sub>2</sub><sup>•-</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*SREBP-1* (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1) є родиною транскрипційних факторів, які зв'язуються із стерол-регуляторним елементом (SRE), активуючи гени, що кодують ензими, задіяні у синтезі холестеролу, інших ліпідів та включенні ліпопротеїнів в клітини. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> суттєво впливає на активність SREBP1 в клітинах з високою чутливістю до інсуліну, обумовлюючи акумуляцію в них ліпідів. SREBP локалізовані в мембранах ЕПР. Вони мають структуру: N-термінальний домен, що має будову протеїнів bHLHZip родини (основна ділянка, спіраль-петля-спіраль, лейцинова блискавка), центральний домен, який містить 2 трансмембранних регіони, та C-термінальний домен, який щільно зв'язується з C-термінальним доменом активаторного протеїну SCAP, що розчеплює SREBP (SREBP Cleavage-Activating Protein). Комплекс SREBP–SCAP зв'язаний з ендоплазматичним ретикуломом разом з протеїном INSIG (Insulin-Induced Gene). Протеолітична активація SREBP регулюється холестеролом та оксистеролом. За їхньої присутності SREBP–SCAP разом з INSIG перебувають в ендоплазматичному ретикулумі. За відсутності стеролів SREBP–SCAP дисоціює від INSIG та транслокується до Гольджі. Тут SREBP активується шляхом двох послідовних протеолітичних розщеплень; активований N-термінальний домен транслокується в ядро і зв'язується з SRE.

*HSF1* (Heat Shock transcription Factor 1). Під впливом стресорних чинників, зокрема окисного стресу, мономерні HSF1 підлягають активаційному процесу, який включає дисоціацію від комплексу з Hsp90, тримерізацію, переміщення в ядро, фосфорилювання, зв'язування з ДНК та активацію таргетних генів.

*Стероїдні гормони* внаслідок значної гідрофобності транспортуються кров'ю до органів-мішеней у комплексі з білками (ліпопротеїдні комплекси). Надалі вони звільняються від переносника, дифундують у клітину, проника-

ють до ядра і зв'язуються з рецепторними протеїнами, які змінюють свою конформацію та взаємодіють з протеїнами партнерами, утворюючи гомо- або гетеродимери. Останні взаємодіють з регуляторними послідовностями ДНК – HRE (Hormone Response Element), що змінює ефективність транскрипції певних генів. Стероїди мають і неklasичні механізми передачі сигналу, зокрема рецептори на поверхні плазмалеми. Так, прогестерон, взаємодіючи з серпентиновим рецептором, знижує активність аденілатциклази, зменшує концентрацію cAMP; рецептор-стероїдний комплекс у цитоплазмі активує MAP-кіназний каскад.

#### РОЗДІЛ 4. СИГНАЛЬНІ ПРОТЕЇНИ

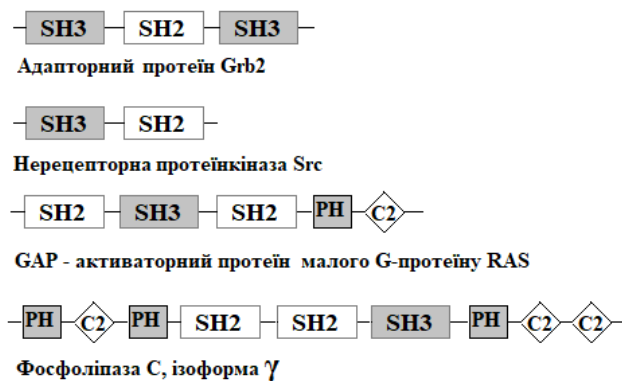
Сигнальні протеїни спроможні одержувати і трансформувати сигнали. Вхідні сигнали активують їх, а ті, в свою чергу, передають сигнал на інші сигнальні або ефекторні протеїни. До них відносять кінази, фосфатази, G-протеїни тощо. Звичайні ензими перетворюють велику кількість субстратів, тоді як сигнальні протеїни взаємодіють з обмеженою кількістю молекулярних мішеней. Головною структурною особливістю сигнальних протеїнів є їхня доменна (використовують також термін модульна) будова. Саме вона дозволяє ефективно взаємодіяти з елементами сигнальних каскадів. Домени можна розділити на домени, які забезпечують протеїн-протеїнову взаємодію і прикріплення до мембрани, та домени, що володіють каталітичними властивостями та забезпечують регуляцію. Важливе значення мають також неструктуровані ділянки сигнальних протеїнів, які можуть набувати оптимальної структури внаслідок передачі сигналу. Невелика кількість сигнальних доменів присутні у протеомі в сотнях копій: SH2 (Src (від саркоми Рауса) Homology 2 domain), SH3 (Src Homology 3 domain), PTB (Phosphotyrosine Binding domain), Pro-rich (пролін-багатий мотив), PH (Pleckstrin Homology domain), C2 – Ca<sup>2+</sup>-зв'язувальний домен тощо. Вони регулюють різноманітні клітинні процеси, утворюючи величезну кількість комбінацій. Важлива роль

у збиранні сигнальних комплексів належить *адаптерним/риштувальним протеїнам* (scaffold proteins). Вони не володіють власною ензиматичною активністю і забезпечують зворотну взаємодію між іншими сигнальними протеїнами у процесі трансдукції сигналу.

Сигнальні протеїни мають різні пострасляційні ковалентні модифікації, які регулюють їхню взаємодію з протеїнами-мішенями, що розташовані нижче або вище в цьому чи іншому сигнальному каскадах. Сигнальні протеїни об'єднуються в сигнальні комплекси або сигнальні модулі.

Сигнальні протеїни регулюються взаємодією з низькомолекулярними сполуками органічної або неорганічної природи та пострасляційними ковалентними модифікаціями. Серед першої групи виділяють регуляторні протеїни (комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін, цикліни), вторинні месенджери (циклічні нуклеотиди як алостеричні регулятори протеїнкіназ), метаболіти та іони металів, наприклад  $\text{Ca}^{2+}$  як активатор РКС (Protein Kinase C), PLA2 (Phospholipase A2), PLC (Phospholipase C) тощо. Ці регулятори здатні змінювати ензиматичну активність, безпосередньо взаємодіючи з активним центром чи змінюючи його конформацію, або субклітинну локалізацію сигнальних протеїнів.

Нижче наведено декілька прикладів структури сигнальних протеїнів (рис. 10). Багато сигнальних протеїнів в нормально функціонуючих клітинах кодуються так званими протоонкогенами. Такі протеїни виконують належні сигнальні функції і часто позначаються літерою «с», тобто конститутивні. Внаслідок мутацій протоонкогени можуть перетворюватись на онкогени, що призводить до утворення неповноцінних сигнальних протеїнів і злоякісної трансформації клітини. Наприклад, зазначені протеїни не підлягають негативній регуляції в процесі передачі сигналу і залишаються постійно активними, наслідком чого є безперервний поділ за дії мітогенів і порушення диференціації.



*Рис. 10. Доменна (модульна) будова вибраних сигнальних протеїнів. Розшифровка абревіатур наведена в тексті*

Посттрансляційні ковалентні модифікації (ПТМ) розділяють на дві великі групи: відносно стабільні та більш короткотривалі. До першої відносять ліпидування, глікозилювання, біотинування, утворення дисульфідних зв'язків. Вони є доволі тривалими і забезпечують такі функції як компартменталізація, транспорт, секреція протеїнів. У другому випадку модифікації є нетривалими, повністю зворотними і використовуються для безпосередньої регуляції сигнальних протеїнів. ПТМ можуть змінювати конформацію сигнального протеїну, наприклад, фосфорилування петлі активації рецепторних тирозинкіназ призводить до відкриття їхніх активних центрів. Зворотні ПТМ є молекулярною передумовою взаємодії протеїнів-партнерів і формування сигнальних модулів. Специфічні ПТМ розпізнаються специфічними доменами протеїнів-партнерів. До основних зворотних регуляторних ПТМ відносять: фосфорилування по залишкам серину/треоніну та тирозину, ацетилювання лізину, метилювання лізину та аргініну, убіквітинування, сумоїлювання, недилування лізину, АДР-рибозилування, нітрозилування, окислення цистеїну, гідроксилування проліну. Сигнальні протеїни можуть підлягати множинним ПТМ, одна модифікація може здійснюватися для різних амінокислотних залишків сигнального протеїну. Водночас один амінокислотний залишок може підлягати альтернативним ПТМ, в останньому випадку має місце конкуренція між різними ПТМ. Наприклад, ДНК-зв'язувальний домен та домен тетрамеризації транскрипційного фактору р53 підлягають множин-

ному фосфорилюванню, ацетилюванню, убіквітинуванню та сумоїлюванню. Водночас, залишки лізину гістонів можуть альтернативно метилюватися, ацетилюватися чи убіквітинуватися. Ці ефекти залежать від конкретних шляхів проходження сигналу.

*Фосфорилювання.* Здійснюється протеїнкіназами (найчастіше серин/треоніновими або тирозиновими), зворотний процес забезпечується фосфатазами. Фосфорилюванню підлягають також залишки аспартату та гістидину (останнє характерне для прокариотів). Людський геном містить гени для більше, ніж 500 протеїнкіназ. Приєднання фосфорних залишків змінює конформацію сигнальних протеїнів, а негативні заряди фосфатних груп сприяють реалізації електростатичних ефектів. Фосфатні групи сигнальних протеїнів є молекулярною основою взаємодії з відповідними доменами протеїнів-партнерів. Наприклад, SH2-, РТВ-, С2 – домени сигнальних протеїнів взаємодіють з фосфотирозином протеїнів-партнерів, 14-3-3-протеїни – з фосфосерином, FHA (Fork Head Associated domain) – з фосфотреоніном. Це забезпечує збирання сигнальних модулів, специфічну локалізацію в клітині та алостерично регулює каталітичну активність. Фосфорилювання бічних радикалів амінокислот надає їм заряд «2-», що лежить в основі електростатичної взаємодії з позитивно зарядженими радикалами аргініну/лізину та термінальними аміногрупами протеїнів, які часто належать залишкам гліцину. Поява чотирьох атомів кисню фосфатної групи зумовлює можливість утворення водневих зв'язків з різними частинами протеїну, особливо гуанідиновими групами аргініну.

*Ацетилювання.* Здійснюється по залишкам лізину. Дуже важливе для ремоделювання та модифікації хроматину. Каталізується протеїнлізінацетильтрансферазами (KATs, де К – однолітерне позначення лізину) або, інша назва цих ензимів, протеїнгістонацетильтрансферазами (HATs). Зворотний процес деацетилювання здійснюється протеїнлізіндеацетилазами (KDACs) або протеїнгістондеацетилазами (HDACs). Внаслідок ацетилювання зникає позитивний заряд біля ε-аміногрупи лізину і послаблюється електростатична вза-

ємодія та формування водневих зв'язків, наприклад, з негативно зарядженими фосфатними залишками ДНК в хроматині. Це сприяє втраті нуклеосомної структури і локальному розплітання хроматину. Набуття ацетильних залишків є молекулярною основою взаємодії з бромодоменами протеїнів-партнерів, які регулюють транскрипцію. Ацетилювання може призвести також до конформаційних змін відповідних протеїнів. В протеомі наразі ідентифіковано біля 3600 сайтів ацетилювання, що співставне із регуляторним фосфорилуванням. Ця ПТМ впливає на фундаментальні клітинні процеси метаболізму, секреції, перебудови цитоскелету, транскрипції тощо. Наприклад, протеїнгістонацетилтрансферазною активністю володіє CBP (CREB Binding Protein, де аббревіатура CREB – cAMP Response Element-Binding protein) або p300; CREB – один з універсальних регуляторів транскрипції в клітині. Протеїнгістонацетилазну активність має родина сіртуїнів. Класичні KDACs містять цинк в активному центрі і здійснюють деацетилювання за звичайним гідролітичним механізмом. Вони задіяні в сигнальній трансдукції, регуляції клітинного циклу та апоптозу. Сіртуїни використовують NAD як кофактор, відіграють важливу роль в регуляції метаболізму та виживанні клітини в умовах стресу.

*Метилування.* Здійснюється за залишками лізину та аргініну. Відбуваючись в гістонах, напрочуд важливе для ремоделювання хроматину та регуляції транскрипції, а також забезпечує епігенетичні механізми. Зворотний процес метилування/деметилування лізину забезпечується протеїнлізинметилтрансферазами (KMTs, HMTs) та протеїнлізиндеметилазами (KDMs, HDMs) відповідно. Протеїнаргінінметилтрансферази та протеїнаргініндеметилази забезпечують метилування/деметилування аргініну. Метилування аргініну має наслідком приєднання одного або двох метильних залишків, наслідком чого є утворення асиметричного (ADMA) або симетричного диметиларгініну відповідно. Протеїнаргінінметилтрансферази каталізують перенесення метильної групи від S-аденозилметіоніну (SAM) на гуанідинову групу аргініну. Залишок лізину здатний приєднувати від однієї до трьох метильних

груп. Ця ПТМ суттєво не змінює заряд кінцевих аміногруп лізину, але поява додаткових метильних груп є молекулярною основою розпізнавання і взаємодії з протеїнами-партнерами. Метильований лізин розпізнається протеїнами які містять хромодомени, домени Tudor, МВТ (Malignant Brain Tumor) тощо. Метильований аргінін розпізнається родиною протеїнів Tudor, що важливо як для функціонування хроматину, так і цитозольних протеїнів.

Серед лізиндеметилаз виділяють дві групи ензимів. Перша група видаляє одну або дві метильні групи і належить до FAD-вмісних аміноксидаз, внаслідок деметилування утворюються також пероксид водню і формальдегід. Друга група може видаляти три метильні групи і відноситься до ферум-вмісних оксигеназ.

*Убіквітинування.* Це зворотне приєднання до лізину протеїну-мішені невеликого пептиду убіквітину (76 амінокислотних залишків) через С-термінальний гліцин. Функції убіквітинування надзвичайно широкі і співставні у еукаріотів із значенням фосфорилування/дефосфорилування. Однією з найважливіших є приєднання залишків убіквітину до протеїнів, яке є сигналом для протеосомної деградації- селективного протеолізу в 26 S протеосомі. Цей механізм задіяний у процесах внутрішньоклітинної сигналізації (протеосомна деградація I-кВ), забезпечує розщеплення регуляторних протеїнів при проходженні клітинного циклу. Спрямований протеоліз є важливим як для нормального метаболізму протеїнів і підтримання динамічної рівноваги між їх синтезом та розпадом, так і для знешкодження протеїнів, які втратили нативну конформацію внаслідок стресорних факторів (окисного стресу), а також старих, не здатних до функціонування протеїнів. По різному приєднаний до протеїнів-мішеней убіквітин слугує міткою також для їхньої лізосомної та аутофагосомної деградації.

Моно- або поліубіквітинування (формування поліубіквітинових ланцюгів на протеїнах-мішенях) як посттрансляційна ковалентна модифікація регулює численні сигнальні шляхи в клітині, зокрема ті, які забезпечують біосинтез протеїнів (транскрипцію), реплікацію та репарацію ДНК, внутрішньоклі-

тинний трафік протеїнів, ендоцитоз тощо. Спрямування внутрішньоклітинного сигналу залежить від кількості убіквітинових залишків, що приєднуються до протеїнів, їх взаємного розташування, зокрема в поліубіквітинових ланцюгах, взаємодії з тими чи іншими протеїнами-партнерами. Різна структура ланцюгів дає можливість взаємодіяти з різними мішенями, що і визначає клітинну відповідь. Таким чином поліубіквітинування забезпечує збирання сигнальних комплексів. Наприклад, аміногрупа бічного радикалу лізину-48 (K48) однієї молекули убіквітину здатна взаємодіяти з С-термінальним гліцином іншої молекули. Таким чином формується поліубіквітиновий мотив під назвою K48, який розпізнається протеосомаю. Можливі і інші комбінації молекул убіквітину за участі інших залишків лізинів (K11, K63), а також взаємодії між N- та С-кінцевими амінокислотними залишками (M1). При цьому утворюються поліубіквітинові ланцюги різної довжини та розгалуженості. Також до протеїну може бути прикріплено декілька моноубіквітинових мотивів. Таке поліубіквітинування або численне моноубіквітинування вже не задіяне в протеосомній деградації, а регулює протеїнкіназні сигнальні комплекси, бере участь у модифікації хроматину, транскрипційних факторів, комплексів репарації ДНК тощо. В цьому випадку убіквітиновані протеїни взаємодіють зі специфічними протеїнами-партнерами, спеціальні домени яких розпізнають убіквітинові залишки і дешифрують сигнал, який кодується цими залишками. Ці убіквітин-зв'язувальні домени належать убіквітиновим рецепторам. Інші регуляторні модифікації сигнальних протеїнів, зокрема фосфорилування, можуть модулювати процеси убіквітинування.

Біохімічний механізм убіквітинування забезпечуються трьома протеїнами, які позначаються як E1 (убіквітин-активувальний ензим), E2 (убіквітин-кон'югувальний) та E3 (убіквітинлігаза) (рис. 11). Особливе значення відіграє родина убіквітинлігаз, що сполучає залишки убіквітину з лізинами протеїнів-мішеней і забезпечує субстратну селективність. В свою чергу убіквітинлігази піддаються регуляторним впливам в процесі трансдукції сигналу, наприклад фосфорилуванню, і мають визначену субклітинну локалізацію.



Зворотний процес деубіквітинування забезпечується відповідною родиною ензимів. Приєднання одного залишку убіквітину чи поліубіквітинування залежить від типу ензимів E2 та E3.

Як приклад функціонування цих ензимів наведемо поліубіквітинування протеїну-мішені з послідуною протеосомною деградацією. Спочатку убіквітин за участі АТР карбоксильною групою гліцину приєднується до сульфгідрильної групи ензиму E1. Надалі активований убіквітин переноситься на E2; E2 та протеїн, який модифікується, зв'язані з E3. Далі убіквітин ковалентно зв'язується з протеїном-мішенню за участі E3. Постадійне приєднання залишків убіквітину призводить до формування поліубіквітинового ланцюга, який є міткою для АТР-залежної протеосомної деградації, як схематично зображено нижче (рис. 11):

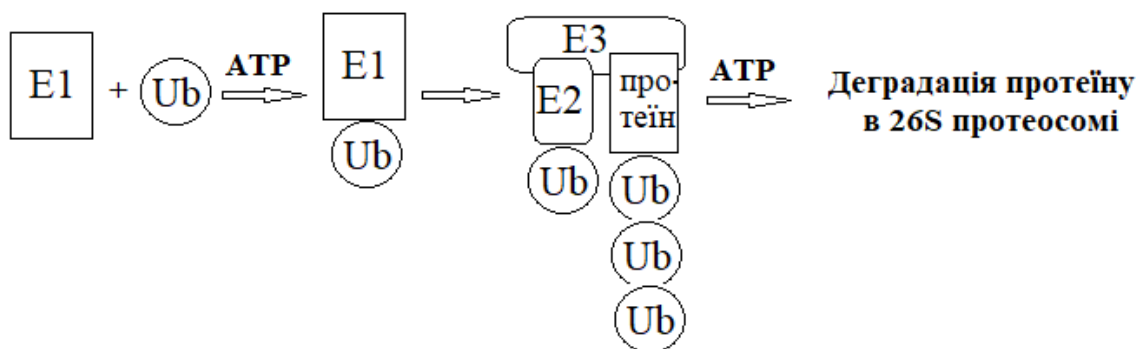


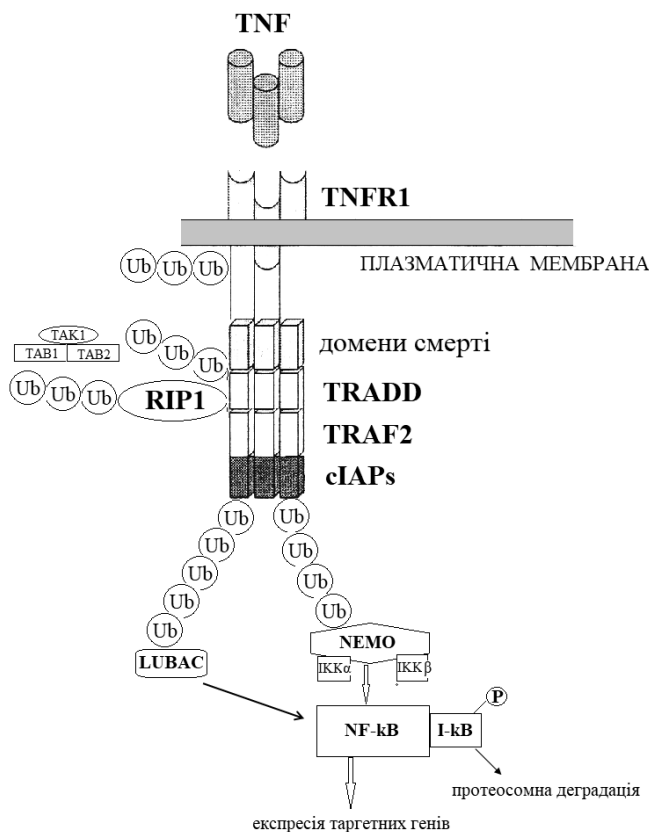
Рис. 11. Схема убіквітин-залежної протеосомної деградації протеїну

Геном людини кодує біля 600 різних варіантів убіквітинлігаз, а також більше як 20 протеїнів-партнерів, які містять різні убіквітин-зв'язувальні домени. Такі домени присутні і в протеосомах. Отже, доречно казати про внутрішньоклітинне убіквітинове сигналювання.

Яскравим прикладом ролі убіквітинування в трансдукції сигналу є його залучення в активацію NF-κB (рис.12).

При зв'язуванні фактору некрозу пухлин (TNF-α) з відповідним гетеротримерним рецептором (TNF-R1) відбувається асоціація його субодиниць, активація і залучення цілого ряду сигнальних протеїнів у TNF-рецепторний сигнальний комплекс: TRADD (Tumor necrosis factor Receptor

type 1-Associated DEATH Domain protein), RIP1 (Receptor-Interacting serine/threonine Protein kinase 1), TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2).



*Рис. 12. Залучення транскрипційного фактору NF-κB в трансдукцію сигналу від фактору некрозу пухлин. Пояснення до схеми та розшифровка абрєвіатур наведені в тексті*

Ці протеїни забезпечують зв'язування та активацію E3 убіквітинлігаз cIAPs (cellular Inhibitor of Apoptosis) типу RING. Надалі відбувається поліубіквітування компонентів TNF-рецепторного сигнального комплексу: TNF-R1, TRADD, RIP1 і власне cIAPs. Це спричинює подальше залучення та активацію сигнальних протеїнів TAB1, TAB2 (TAK-Binding proteins, адаптерні протеїни), TAK1 (TGF-β-Activated Kinase 1) та LUBAC (Linear Ubiquitin chain Assembly Complex, убіквітинлігаза). Протеїн NEMO (NF-κB Essential Modulator), компонент інгібіторного кіназного комплексу (IKK), поліубіквітується, до нього приєднуються лінійні поліубіквітинові ланцюги. Після цього субодиниці IKKα та IKKβ аутофосфорилується, що призводить до їх активації. Також фосфорилується інгібіторний протеїн IκB, який в подальшому пі-

длягає дії E3 убіквітинлігазного комплексу (типу RING), мітиться поліубіквітиновим мотивом (K48) і підлягає протеосомній деградації. Звільнений NF-κB (димер p65-p50) фосфорилується, активується і транслокується у ядро, де зв'язується з промоторними ділянками генів-мішеней.

Описані ковалентні модифікації по залишкам лізину подібними до убіквітину протеїнами, зокрема SUMO (сумоїлювання) та Nedd (недилювання), які регулюють процеси біосинтезу протеїнів і їхній транспорт в клітині.

*Ліпидування.* Посттрансляційна модифікація пов'язана з ковалентним приєднанням до сигнального протеїну полімерів ізопрена (пренілювання) або залишків жирних кислот (ацилування). Цей процес призводить до закріплення протеїнів в плазматичну мембрану за рахунок розташування ліпідної частини паралельно жирнокислотним залишкам біліпідного шару. Локалізація таких протеїнів переважно цитоплазматична. Ліпидування впливає на властивості протеїнів, зокрема зростає гідрофобність, зумовлює їхню компартменталізацію біля цитозольного боку плазмалеми та регулює протеїн-протеїнові взаємодії. Пренілювання здійснюється шляхом приєднання ізопреноїдної групи, 15-вуглецевого фарнезилу або 20-вуглецевого геранілгеранілу, до залишку цистеїну протеїнів за дії фарнезилтрансферази чи геранілгеранілтрансферази. Цей процес зворотний і необхідний для нормальної внутрішньоклітинної сигналізації. Приєднання ліпідного фрагменту відбувається по консенсусній амінокислотній послідовності CAAX, де C – цистеїн, A – аліфатичний амінокислотний залишок, а X – амінокислота, яка визначає тип приєданого ізопренового полімеру. Пренілювання є важливою модифікацією малих G-протеїнів (Ras, Rho, Rab), яке забезпечує їх локалізацію в активному стані біля цитоплазматичного боку плазматичної мембрани. Порухення механізмів пренілювання протеїнів Ras фарнезилтрансферазою розглядається як один з механізмів злоякісної трансформації клітин.

S-пальмітилювання є зворотною посттранскрипційною модифікацією, при якій пальмітинова кислота (C<sub>16</sub>) ензиматично приєднується до цистеїнового залишку протеїнів. Зворотний процес каталізується пальмітоїлтіоестера-

зами. Таким чином забезпечується локалізація протеїну біля цитоплазматичного боку плазмалеми і компартменталізація сигнальних подій в клітині. Приєднання міристинової кислоти (C<sub>14</sub>) до протеїнів – N-міристилювання, здійснюється по аміногрупі гліцину ензимом N-міристоїлтрансферазою, є процесом котрансляційним і незворотним. Міристилюванню, наприклад, піддаються ендотелійна NO-синтаза та проапоптичний протеїн Bid, який в міристильованому вигляді взаємодіє з мітохондріями і викликає вивільнення з них цитохрому c.

## **РОЗДІЛ 5. РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ В ЕУКАРІОТІВ**

Експресія генів з утворенням функціонально-активного протеїну включає в себе ряд ключових етапів: реорганізація і хімічна модифікація хроматину; формування первинного транскрипту (пре-мРНК); перетворення пре-мРНК у зрілу мРНК, а саме процесинг пре-мРНК, сплайсинг і транспорт мРНК з ядра до цитозолу; трансляція – синтез протеїну на рибосомах.

Під регуляцією транскрипції мається на увазі усунення з хроматину гальмівних елементів, ковалентна модифікація протеїнів хроматину та ДНК, реорганізація складної третинної структури хроматину, розплітання ділянки хроматину, де буде відбуватися транскрипція і втрата нуклеосомної структури, зв'язування з промоторною ділянкою ДНК-залежної РНК полімерази у комплексі з загальними факторами транскрипції, а також регуляція експресії саме визначених генів специфічними транскрипційними факторами. Ініціація транскрипції пов'язана з реорганізацією хроматину в промоторних ділянках і зв'язуванням з промотором апарату транскрипції (рис. 13). До останнього належить, зокрема, ДНК-залежна РНК-полімераза II, загальні фактори транскрипції (найголовніший TFIID, транскрипційний фактор D для ДНК-залежної РНК-полімерази II), специфічні фактори транскрипції, багатокомпонентний протеїновий комплекс - медіатор (26 субодиниць), а також ензими, які модифікують і ремодулюють хроматин.

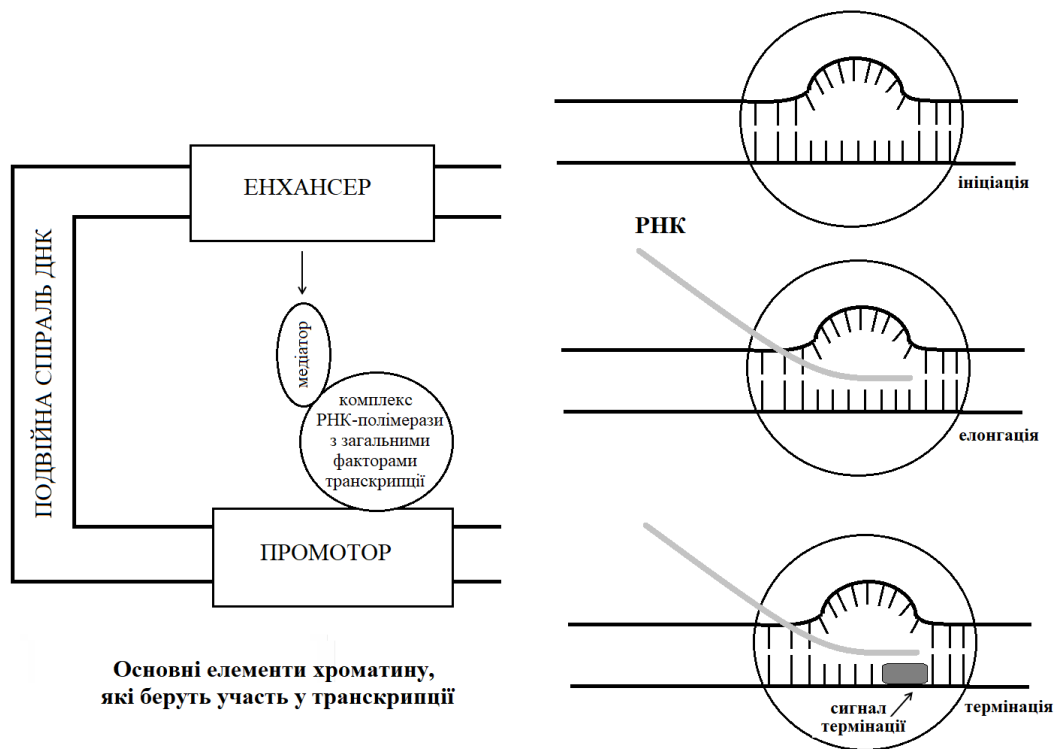


Рис. 13. Головні етапи транскрипції

До складу протеїнового комплексу, який розпізнає специфічні нуклеотидні послідовності промоторної ділянки і спрямовує дію полімерази II входить TFIID, який зв'язується з ТАТА-боксом. Інший мультипротеїновий комплекс TFIIN володіє геліказною активністю, тобто розплітає дволанцюгову ділянку ДНК, що є необхідним для перебігу транскрипції. Він містить субодиницю CDK7, яка володіє кіназною активністю і фосфорилує карбокси-термінальний домен (CTD) великої субодиниці РНК-полімерази II. CDK7 контролює перехід від ініціації транскрипції до елонгації; процес фосфорилування регульований і відповідні сайти фосфорилування специфічні.

Медіатор забезпечує зв'язок між РНК-полімеразой II, загальними факторами транскрипції та специфічними факторами транскрипції; він стабілізує транскрипційний комплекс біля промотора у відповідь на взаємодію зі специфічними транскрипційними факторами.

Функції специфічних транскрипційних факторів – вибір генів для транскрипції шляхом зв'язування з певними регуляторними ділянками ДНК як в

промоторному регіоні, так і з енхансерами. Вони посилюють або пригнічують активність транскрипційної машини. Активність специфічних транскрипційних факторів регулюється в процесі трансдукції сигналу, найбільш часто шляхом фосфорилування, і вони залучаються в регуляцію транскрипції через медіатор. Загальні фактори транскрипції необхідні для формування базального ініціаційного комплексу на промоторі і задіяні у транскрипції всіх генів.

Специфічне фосфорилування С-термінального домену (CTD) на великій каталітичній субодиниці (Rpb1) РНК-полімерази II є необхідним як для ініціації транскрипції, так і елонгації. Крім того, CTD необхідний для кепування, поліаденілювання та сплайсингу мРНК, оскільки транскрипція і процесінг мРНК є тісно пов'язаними подіями. Протеїни, які зумовлюють кепування та поліаденілювання взаємодіють з CTD, а ця взаємодія регулюється шляхом фосфорилування CTD. CTD фосфорилується різними циклін-залежними протеїнкіназами (CDK). Зокрема, CDK7/циклін H зв'язані з загальним фактором транскрипції TFIID, а CDK8/циклін C асоційована з медіаторним комплексом і задіяна в репресії транскрипції.

**5.1. Геноспецифічні транскрипційні фактори і інші регулятори транскрипції.** У процесі транскрипції крім специфічних факторів беруть регуляторну участь і асоціюються з транскрипційним комплексом також коактиватори та корепресори. До них відносяться гістонлізинацетилтрансферази (HATs), гістонлізіндеацетилази (HDACs) та інші ензими, які модифікують гістони та ДНК. До групи корегуляторів відносять також ДНК-топоізомерази та полі-АДР-рибозополімерази тощо. Зокрема, репресія транскрипції пов'язана з неактивною структурою хроматина, а саме нерозплетеними нуклеосомними фрагментами в ділянках генів, які експресуються, або їхніх регуляторних ділянках, а також репресуючим впливом HDACs та гістонметилтрансфераз.

Залежно від їхньої ролі в сигнальній трансдукції транскрипційні фактори розділяють на конститутивні та регуляторні. Конститутивні фактори пос-

тійно присутні в ядрах клітини, їхня активність не залежить від внутрішньоклітинної сигналізації. Вони контролюють постійну експресію генів, продукти яких виконують найголовніші структурні та метаболічні функції, наприклад NF1 (NeuroFibromin 1), SP1 (Specificity Protein 1) та інші.

Активність регуляторних транскрипційних факторів залежить від типу клітини та конкретних шляхів трансдукції сигналу. Серед цієї групи виділяють транскрипційні фактори, які синтезуються у процесі розвитку та диференціації тканин і контролюють експресію генів, що відповідають за ці процеси («транскрипційні фактори розвитку»). Часто ці фактори не потребують додаткової посттрансляційної модифікації. Таким прикладом є протеїн MyoD, який відноситься до транскрипційних факторів типу HLH (спіраль-петля-спіраль) і регулює диференціацію м'язів.

До другої великої підгрупи регуляторних транскрипційних факторів відносяться ті, які безпосередньо беруть участь в трансдукції клітинного сигналу і задіяні в процесах передачі сигналу від позаклітинних рецепторів або внутрішньоклітинних факторів. До таких протеїнів належать: рецептори стероїдних гормонів; фактори транскрипції, які реагують на зміни ендогенних параметрів клітини (вміст холестеролу – SREBPs, пошкодження ДНК – p53); насамкінець до цієї групи належать транскрипційні фактори, які змінюють свою активність при зв'язуванні лігандів з позаклітинними рецепторами (NF- $\kappa$ B, AP1, STATs, NOTCH і багато інших).

Концентрація транскрипційного фактору в тому чи іншому клітинному компартменті регулюється кількома способами. По-перше, на рівні транскрипції цього протеїну, сплайсингу та трансляції. По-друге, шляхом регульованої деградації, наприклад шляхом убіквітування та протеосомного розщеплення. По-третє, на рівні регуляції субклітинної локалізації, коли трансдукція сигналу призводить до переміщення транскрипційного фактору з цитозолу до ядра та навпаки. Зв'язування низькомолекулярних ефекторів також виступає регулятором транскрипційних факторів. Такими прикладами є зв'язування  $Ca^{2+}$  або стероїдних гормонів з протеїнами партнерами у цитозолі.

лі або ядрі. Важливим регуляторним чинником є взаємодія з інгібіторними протеїнами.

Особливо важливою є регуляція активності транскрипційних факторів шляхом посттрансляційної ковалентної модифікації. Таким чином досягається зміна субклітинної локалізації протеїну а також ефективність його взаємодії з протеїнами-партнерами. Прикладами цієї регуляції є фосфорилування, ацетилювання, метилювання, редокс-регуляція та обмежений протеоліз. Частото-густо фосфорилування призводить до активації, транслокації в ядро і взаємодії з відповідними нуклеотидними послідовностями. Такими прикладами можуть бути фактори транскрипції, які фосфорилуються серин/треоніновими протеїнкіназами MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) та STATs. Відомі і приклади негативної регуляції фосфорилуванням. Задіяний у процесах імунної відповіді транскрипційний фактор NF-AT у фосфорильованій формі має цитозольну локалізацію, тоді як за дії фосфатази кальцинейрину дефосфорилується і транслокується у ядро.

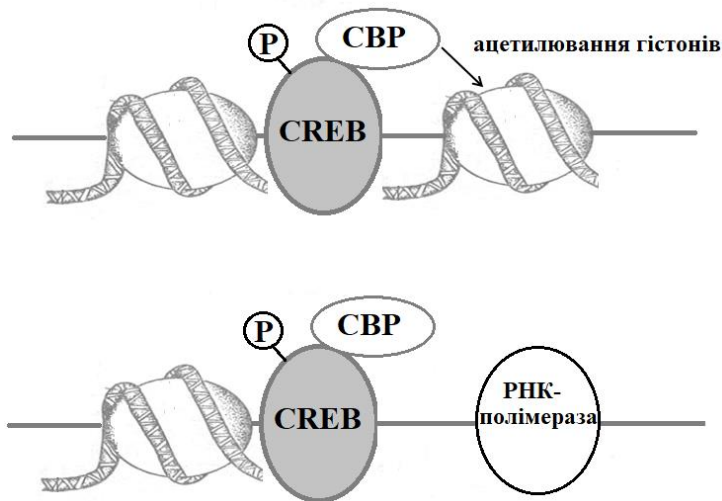


Рис. 14. Активація транскрипції CREB-залежних генів

У деяких випадках фосфорилування дозволяє ефективно взаємодіяти транскрипційному фактору з протеїном-коактиватором. Наприклад, CREB зв'язується з регуляторною нуклеотидною послідовністю CRE (рис. 14). Це зв'язування стимулюється коактиватором CBP. Останній володіє гістонацетилювальною активністю, яка зумовлює транскрипційну спроможність



відповідної ділянки хроматину, а саме розплітання нуклеосоми. cAMP-залежне фосфорилування протеїнкіназою А фактору CREB за залишком серину зумовлює взаємодію цього транскрипційного фактору з СВР.

В еукаріотичному геномі центральну роль регуляторів експресії відіграють зворотні ковалентні модифікації гістонів та ДНК. Гістони ацетилюються/деацетилюються по залишках лізину відповідними ацетилазами/деацетилазами, метилуються/деметилуються по залишках лізину та аргініну та зворотно фосфорилуються за залишками серину/треоніну. Крім цього, до модифікаторів належать також убіквітінування і сумоїлювання по залишках лізину, а також АДР-рибозилування по залишках аргініну. Регуляторну функцію мають також механізми, які змінюють протеїновий склад нуклеосоми. ДНК мають змогу зворотно метилуватися за залишками цитозину. Ці регуляторні події є частиною загальних шляхів трансдукції клітинного сигналу, а також є чинниками епігенезу, оскільки ковалентні модифікації можуть передаватися дочірнім клітинам під час поділу. Зазначені модифікації регулюють структуру нуклеосоми (відкрита чи закрита для транскрипції) та взаємодію транскрипційного апарату з промоторними ділянками.

Ацетилювання гістонів (передусім H4) здійснюється гістонацетилтрансферазами за термінальними аміногрупами залишків лізину, що призводить до втрати позитивних зарядів цих залишків, послаблює взаємодію з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК, робить нуклеосомну структуру менш стійкою та, в багатьох випадках, асоційовано з посиленням транскрипційної активності. Ацетильовані сайти стають місцями зв'язування протеїнових комплексів, які містять у своєму складі бромодомени. Ці домени знаходяться у складі NATs, метилуючих ензимів тощо. Зворотний процес деацетилювання гістондеацетилазами знижує транскрипційну активність.

Метилування гістонів H3 та H4 здійснюється відповідними метилтрансферазами за залишками лізину/аргініну і може мати наслідком як посилення, так і пригнічення транскрипції. Зворотний процес забезпечується деметилазами. Кінцеві аміногрупи можуть приєднувати від одного до трьох метиль-

них залишків. Останні розпізнаються протеїнами, які містять хромодомени. Через ці домени залучаються коактиватори/корепресори транскрипції. Ацетилювання та метилювання амінокислотних залишків може мати конкурентний або синергістичний характер; це ж стосується й інших ковалентних модифікацій хроматину.

Фосфорилування по серину/треоніну характерне для всіх гістонів, зокрема лінкерного H1. У ссавців важливою в цьому процесі є кіназа MSK1/2 (Mitogen and Stress Activated Kinase 1 or 2), яка активується ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases) у межах MAP-кіназного месенджерного каскаду. Тобто забезпечується зв'язок між мітогенними стимулами і активацією транскрипції. Внаслідок проходження сигналу від рецепторів факторів росту залучається система Ras (малий G-протеїн) - ERK, MSK фосфорилується, активується і транслокується у ядро. Надалі відбувається фосфорилування хвостової частини гістона H3 за залишком Ser10, яке стимулює гістонацетиルトрансферазу і відповідне ацетилювання лізину (Lys14) у хвостовій частині гістона H3, що посилює транскрипційну активність.

Іншим прикладом є стимуляція рецепторів андрогенів, внаслідок чого активується PKC $\beta$ , яка фосфорилує H3 за залишком Thr6. Внаслідок цього пригнічується відповідна деметилаза і стимулюється триметилювання Lys4, що активує транскрипцію. Наведені приклади ілюструють перехресну регуляцію ензимів, які ковалентно модифікують хроматин, і відповідних протеїнових комплексів – корегуляторів транскрипції, які зв'язуються з модифікованими амінокислотними залишками (*явище crosstalk*).

Метилювання цитозину пригнічує експресію генів. Більше того, метилювання цитозину розглядають як центральний механізм епігенезу у хребетних. Процес каталізується ДНК-метилтрансферазою і здійснюється в ділянках так званих –Ц-Г- острівців – збагачених цими динуклеотидами сайтах, які часто розташовані біля або всередині промоторної ділянки. В останньому випадку метилювання острівців призводить до гальмування транскрипції. Донором метильних груп, як і у випадку модифікації гістонів, є S-

аденозилметіонін. 5'-метилцитидинові залишки розпізнаються відповідними протеїнами, які знижують транскрипцію через залучення HDACs та метилтрансфераз.

**5.2. Альтернативний сплайсинг.** Сплайсинг є однією з важливих передумов різноманіття протеїнів, які виконують визначені функції: мають каталітичні особливості, специфічну тканинну та субклітинну локалізацію, відрізняються типами протеїн-протеїнової взаємодії тощо. Внаслідок альтернативного сплайсингу можуть виникати десятки ізоформ протеїнів, втім утворення їх особливих варіантів в тих чи інших клітинах визначається як структурою пре-мРНК, так і взаємодією із регуляторними протеїнами. Функціональна активність останніх залежить від конкретного варіанту передачі сигналу в клітині, а отже від фізіологічної ситуації.

Інтрони у вищих еукаріотів займають до 90% всього геному. «Вирізають» інтрони та «склеюють» екзони ензими, які належать складним рибонуклеопротеїновими частинкам – сплайсосомам; до складу цих комплексів входять малі ядерні РНК. Схематичне зображення сплайсингу наведено нижче (рис. 15):

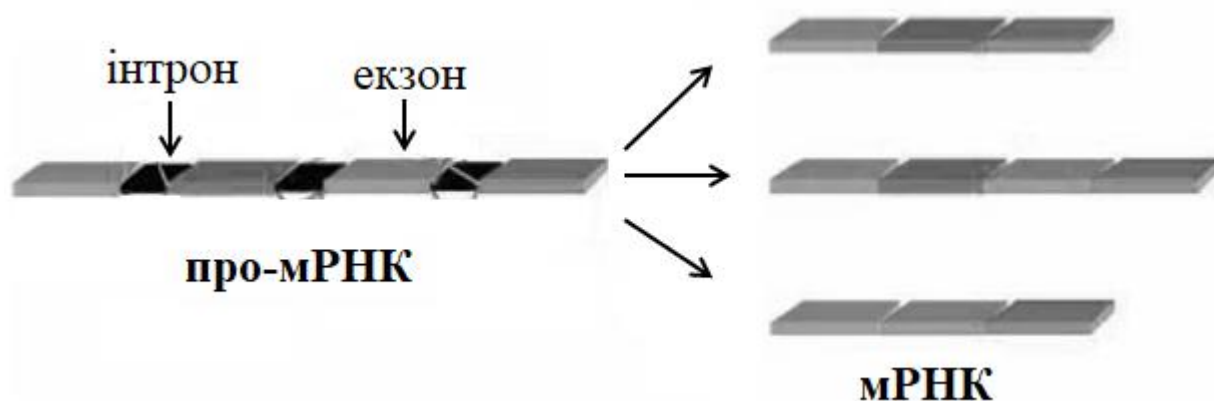


Рис. 15. Схеми альтернативного сплайсингу

Пре-мРНК містять ділянки, які включають біля десятка нуклеотидів, що стимулюють сплайсинг (енхансери) або пригнічують його (сайленсери). Регуляторами виступають SR-протеїни, які містять домен з дипептидними

мотивами, що включають залишки аргініну і серину, а також домен розпізнавання РНК. Ці протеїни взаємодіють з рибонуклеопротеїновим комплексом сплайсисоми і регулюються через фосфорилування залишків серину в межах різних сигнальних шляхів. Вони зв'язуються з ехансерами всередині екзонів і спрямовують сплайсисому до визначених інтронів. Сплайсинг і транскрипція у вищих еукаріотів тісно пов'язані. Це досягається шляхом зв'язку компонентів сплайсисоми з РНК-полімеразою II, а точніше з С-кінцевим доменом її каталітичної субодиниці.

**5.3. Трансляція.** Ініціація синтезу поліпептиду починається з 5'-кінця мРНК (CAP-залежна трансляція). Процес трансляції значною мірою контролюється саме на рівні ініціації. Спочатку до 5'-кінця мРНК приєднується мала рибосомна субодиниця 40S. Далі задіяний 5'-регіон, що нетранслюється, та відбувається залучення ініціаторного кодону AUG (зв'язується з met-tRNA у еукаріотів). Надалі до цього комплексу включається велика 60S субодиниця рибосоми. Кодон AUG неоднаково прочитується в різних положеннях структурного гену. Синтез поліпептиду починається з N-термінальної амінокислоти. На цьому N-кінці може бути розташована сигнальна послідовність, внаслідок чого синтезуються різні протеїни відмінної клітинної локалізації. Ініціація трансляції потребує циклізації (замкнення) мРНК за допомогою комплексу протеїнів як показано на схемі (рис. 16):

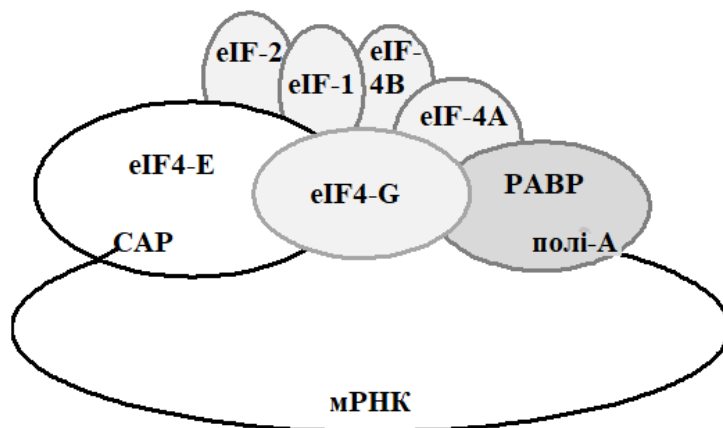


Рис. 16. Схема ініціації трансляції. Зазначено основні фактори трансляції. Пояснення в тексті

Важливими у цьому процесі є такі протеїни: eIF-4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E), eIF-4G та Poly(A)-Binding Protein (PABP). Фактор трансляції 4E зв'язується при цьому з ділянкою CAP на 5'-кінці мРНК, а саме з метилгуанозином. PABP взаємодіє з полі-А ділянкою на 3'-кінці мРНК, а фактор трансляції 4G є адаптером, який зв'язує 4E та PABP. До складу комплексу входять також інші фактори трансляції: eIF-4A, eIF-4B, eIF-1, eIF-2 тощо. З 40S субодиноцею зв'язується потрібний комплекс, до складу якого входять eIF-2, met-tRNA та GTP, формуючи 43S преініціюючий комплекс.

Існують два механізми контролю трансляції: неспецифічний контроль за трансляцією більшості мРНК, що здійснюється на рівні протеїнів eIF-4E, eIF-4G і PABP, а також специфічний стосовно окремих мРНК, який забезпечується зв'язуванням регуляторних протеїнів у ділянці послідовності на 5'-кінці, яка не транслюється, та мікро-РНК у ділянці 3'-НТП. У першому варіанті посилюється трансляція за дії гормонів, ростових факторів, мітогенів; послаблюється за депривації поживних речовин, дії стресорних чинників тощо. У другому варіанті відбувається більш специфічна регуляція трансляції. Прикладом останньої є трансляція залізов'язувального протеїну феритину залежно від концентрації заліза, яка наведена на схемі (рис. 17):

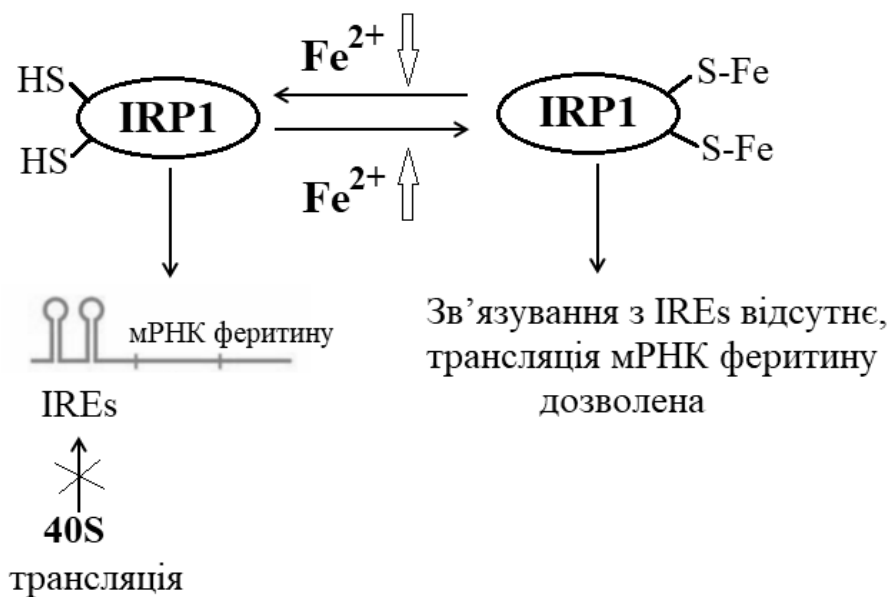


Рис. 17. Схема регуляції залізом трансляції феритину

На 5'-кінці феритинової мРНК в НТП розміщена структура IREs (Iron Resposable Elements), яка регулюється IRPs (Iron Regulatory Proteins). IREs має шпилькову структуру; при зв'язуванні IRPs блокується взаємодія з 40S субодиницею рибосоми, а мРНК підлягає деградації. IRPs є два типа: активність IRP2 регулюється шляхом зв'язування заліза, окиснення та наступної протеосомної деградації; IRP1 включає 4Fe-4S кластери, формування яких посилюється із зростанням концентрації  $Fe^{3+}$  як зображено на схемі. В останньому випадку IRP1 не спроможний зв'язатися з регуляторною ділянкою, 40S субодиниця взаємодіє з мРНК і трансляція посилюється. Цікаво, що формування 4Fe-4S кластерів трансформує IRP1 в активну аконітазу циклу Кребса. Це є яскравим прикладом багатofункційності протеїнів у клітині.

Неспецифічний контроль (глобальний) за трансляцією може здійснюватись інсуліном або інсуліноподібним ростовим фактором, а також за дії інших ростових факторів з боку MAPK/ERK – сигнального шляху. За дії інсуліну відбувається активація PKB (Protein Kinase B), фосфорилування та активація кінази mTOR (mammalian Target Of Rapamycin, подібна до PI3K, Phosphoinositide 3-Kinase), яка фосфорилує 4EBP1 (протеїн, що зв'язує і інгібує фактор трансляції 4E) за залишками серину/треоніну. При цьому відбувається дисоціація останнього від 4E, що дає можливість трансляційному фактору взаємодіяти з 5'-CAP, 4G, 4A, 40S, тобто збирається активаційний комплекс і посилюється трансляція. Кіназа S6, яка входить до складу S40 рибосомної субодиниці і, відповідно, трансляційного комплексу на CAP кінці, також фосфорилується і активується mTOR.

Збирання 43S преініціаційного комплексу відбувається шляхом активації eIF-2 за дії гормонів та стресорних факторів (рис. 18). Фактор трансляції 2 є GTPазою, де в активному центрі GДР замінюється на GTP. При зв'язуванні GTP відбувається взаємодія з метіонін-тРНК та 40S субодиницею; цей потрійний комплекс надалі зв'язується з 5'-CAP, іншими факторами ініціації і запускається трансляція. Фактор трансляції 2 знаходиться під контролем протеїну eIF-2B, який виступає тут фактором обміну гуанінових нуклеотидів.

Фосфорильований фактор 2 зв'язується з eIF-2B, але в ньому не відбувається обміну гуанінових нуклеотидів, тому трансляція блокується. Кіназами, які це роблять є: PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase), яка активується у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулу, та PKR (Protein Kinase R), що забезпечує відповідь на дію інтерферону внаслідок впливу дволанцюгової РНК мікроорганізмів тощо.

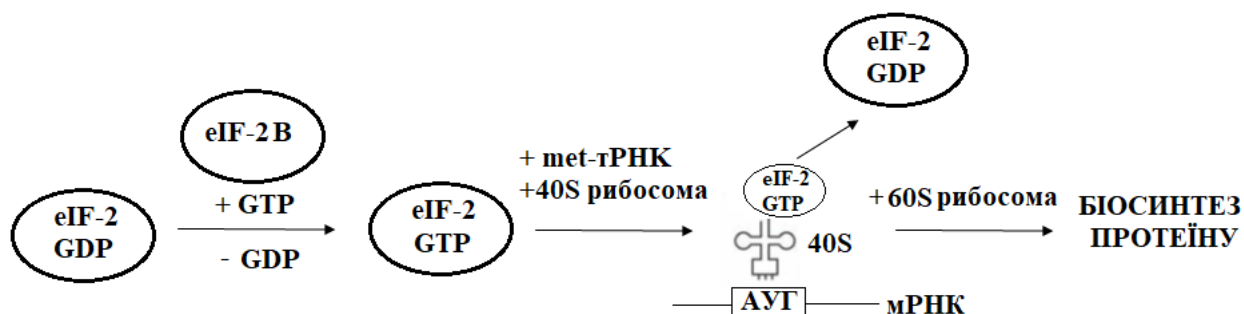


Рис. 18. Збирання преініціаційного комплексу в процесі трансляції

**5.4. РНК-сайленсинг/інтерференція.** Це явище забезпечується малими некодуючими мРНК довжиною 20-30 нуклеотидів (малі регуляторні РНК). Беруть участь в цьому процесі переважно мікроРНК (miRNAs) та малі інтерферуючі РНК (siRNAs), а також деякі інші типи. У такий спосіб регулюються ефективність дії транскрипційних факторів та експресія генів, протеїнові профілі клітини. мікроРНК утворюються відповідними генами, формуючи шляхом комплементарних взаємодій внутрішньомолекулярні дволанцюгові структури. siRNAs формуються з довгих дволанцюгових РНК або ендогенно, або екзогенно внаслідок потрапляння до клітини вірусів, транспозонів або спрямованої трансфекції. Регуляторні РНК зв'язуються з мРНК-мішенями за принципом комплементарності. Спричинена siRNAs інтерференція називається також власне РНК-інтерференція.

При дозріванні регуляторних РНК спочатку відбувається розщеплення дволанцюгових попередників ендонуклеазами на короткі фрагменти. Надалі має місце асоціація одного з ланцюгів з родиною регуляторних протеїнів Argonaute (Ago) і утворюється інтерферуючий комплекс RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Останній зв'язується з мРНК за принципом комплементарності.

тарності та порушує її циркуляторну транслуючу структуру; можливе також деаденілювання мРНК з наступним розщепленням. Окремі мікроРНК можуть інтерферувати з цілим спектром метаболічно поєднаних мРНК, призводячи до пригнічення певних взаємопов'язаних клітинних функцій, наприклад у процесах розвитку. Цей механізм використовується також клітиною для блокування проліферації транспозонів та вірусів. Туморогенез часто пов'язується з порушенням функціонування мікроРНК.

Регуляція утворення та активності мікроРНК відбувається на рівні транскрипції, розщеплення РНКазми та редагування зрілої мікроРНК. Численні промотори мікроРНК містять сайти зв'язування важливих транскрипційних факторів як от р53 та Мус, отже досягається зміна експресії залежно від фізіологічної ситуації. Пошкодження ДНК і активація р53 супроводжується також стимуляцією процесінгу окремих мікроРНК. Ензими, які чинять дезамінування РНК (так зване редагування), також задіяні у процесі регуляції активності та стабільності мікроРНК.

МікроРНК гальмує синтез певних протеїнів на рибосомах та обмежує активність транскрипційних факторів. Особливостями регуляції з боку мікроРНК, порівняно з дією факторів транскрипції, є лише інгібувальний вплив на процеси, висока швидкість пригнічення синтезу протеїнів на рибосомах та регуляторна дія лише в певних клітинних компартментах, наприклад ділянках синапсів. Регуляторна дія мікроРНК та транскрипційних факторів взаємодоповнює в сигнальних мережах. Дія мікроРНК специфічна щодо етапу розвитку тканини та тканинспецифічна. МікроРНК можуть кодуватися інтронами, які розташовані поруч з екзонами генів, що регулюються. Таким чином досягається узгодженість між експресією мікроРНК та мРНК, яке підлягає регуляції. Один тип мікроРНК може пригнічувати десятки мРНК протеїнів, які належать до окремого сигнального або метаболічного шляху; таким чином досягається більша надійність інгібування біологічної відповіді. Водночас мРНК якогось одного протеїну може бути об'єктом регуляції різних мікроРНК; в цьому випадку інгібувальний ефект досягається шляхом синер-



гестичного впливу. мРНК біля 60% генів протеїн-кодуючого людського геному містить ділянки зв'язування мікроРНК. Наприклад, EGF знижує рівень окремих мікроРНК в клітинах-мішенях на ранніх стадіях передачі сигналу, що призводить до швидкої індукції онкогенних транскрипційних факторів.

## **РОЗДІЛ 6. ІОННІ КАНАЛИ ЯК СИСТЕМА ТРАНСДУКЦІЇ СИГНАЛУ**

*Іонні канали плазматичної мембрани електрозбудливих клітин, нейронів та міоцитів, виконують функцію сигнальних трансдукторів, які зумовлюють реакцію клітини на різноманітні подразники (первинні месенджери, зміна електричного потенціалу, фотони, механічне подразнення). При цьому змінюється іонна провідність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  каналів і змінюється трансмембранний електричний потенціал. Концентрація  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  і  $\text{Ca}^{2+}$  більше в позаклітинному середовищі, а  $\text{K}^+$  - у цитоплазмі. Виражений трансмембранний електричний потенціал існує на плазматичній мембрані клітин електрозбудливих тканин, таких як нейрони та міоцити, але існує і на інших типах клітин. Нерівноважний розподіл іонів на плазмалемі, передусім  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  (також  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Cl}^-$ ) лежить в основі потенціалу спокою на мембрані, величина якого всередньому сягає величини  $-60$  –  $-70$  мВ зі знаком мінус на внутрішній поверхні мембрани. При збудженні клітини виникає потенціал дії – деполяризація, електричний потенціал при цьому сягає величини  $0$  мВ і навіть позитивних значень (овершут). Це явище головно забезпечується надходженням  $\text{Na}^+$  до клітини за концентраційним градієнтом. З часом електричний потенціал досягає стану спокою, в цьому процесі важливе значення належить  $\text{K}^+$ -каналам (реполяризація) (рис 19).*

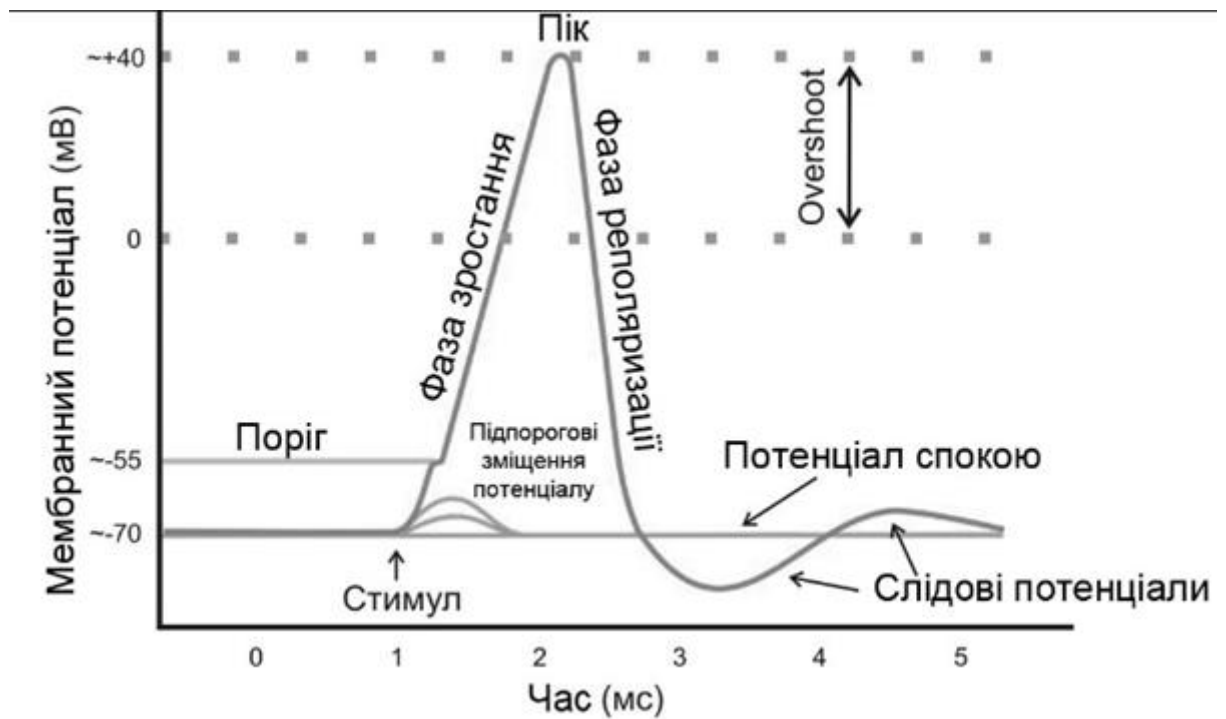


Рис. 19. Зміни мембранного потенціалу за деполяризації/реполяризації

Канали забезпечують транспорт іонів за градієнтом концентрації. За 1 секунду канали транспортують мільйони іонів, тому вони працюють доли секунди і швидко інактивуються. Напрямок руху іону крізь поляризовану мембрану залежить від різниці його концентрацій по обидва боки мембрани та електричного потенціалу на ній:  $\Delta G = RT \ln(C_{in}/C_{out}) + ZFV_m$ , де  $\Delta G$  – зміна вільної енергії (сила, що спонукає іон до спонтанного переходу через канал),  $R$  – газова стала,  $Z$  – заряд іона,  $F$  – стала Фарадея,  $V_m$  – величина трансмембранного потенціалу.

Нерівноважна концентрація потенціалоутворювальних іонів виникає внаслідок роботи  $Na^+, K^+$ -АТРази плазмалеми ( $Na^+$ -помпи). За рахунок енергії АТР вона створює нерівномірний розподіл зарядів на мембрані, транспортуючи три іони  $Na$  назовні в обмін на два іони  $K$  у клітину. Окремі ізоформи цього ензиму інгібуються отрутою оубаїном (отрутою для стріл) або строфантином  $G$ . Важливе значення в підтриманні потенціалу спокою та реполяризації відіграють іони  $K$ , транспорт яких з клітини забезпечується стаціонарно відкритими каналами.

Канали плазмалеми більшою-меншою мірою селективні. Іони мають гідратну оболонку, для процесу транспорту має значення її величина, іон при проходженні повинен її скинути, а також міцність, яка характеризується ентальпією гідратації. Важливу роль при проходженні іону має міцність взаємодії катіона з  $\text{COO}^-$  – групами пори каналу, геометрія і хімічна природа селективного фільтра каналу. В електрофізіологічних дослідженнях канали характеризуються провідністю, яка вимірюється в См (пСм), величина, що зворотна опорю, Ом. Для дослідження електрофізіологічних характеристик каналів зазвичай використовують мікроелектродну техніку, зокрема метод patch-clamp.

Вважають, що еволюційно першим виник  $\text{K}^+$ -канал, внаслідок мутації з'явився  $\text{Ca}^{2+}$ -канал, а потім  $\text{Na}^+$ -канал. Структура каналів доволі консервативна.

*Na<sup>+</sup>-канали.* Активується за незначної деполяризації мембрани, пропускає вхідний  $\text{Na}^+$ -струм, в результаті чого створюється висхідна фаза потенціалу дії. Складається з  $\alpha$  та  $\beta$  субодиниць.  $\alpha$ -Субодиниця пороутворювальна, що доведено в досліджах із її вбудовуванням у штучні ліпідні мембрани, а також експресією в ооцитах *Xenopus*. Вона містить багато залишків сіалових кислот і має масу 260-270 кДа (виділена з мозку щура).  $\beta$ -Субодиниця забезпечує розташування  $\alpha$ -субодиниці в мембрані і захищає її від протеолізу. З мозку щура виділена структура, яка включає одну  $\alpha$ , а також  $\beta 1$  (зв'язана з нею нековалентно) та  $\beta 2$ -субодиницю (прикріплена дисульфідним зв'язком з  $\alpha$  – субодиницею).  $\alpha$ -Субодиниця складається з 4 дуже подібних трансмембранних доменів. Кожний домен включає 6 трансмембранних сегментів (S1–S6). Гідрофільну пору формує ділянка між S5–S6 кожного домену (рис. 20).

Уявлення про зовнішню частину пори одержують на основі вивчення дії природних отрут тетродотоксину та саксітоксину, а внутрішньої – аналізуючи блокувальну дію локальних анестетиків. Селективний фільтр міститься на зовнішньоклітинній частині пори, пропускає лише  $\text{Na}^+$  (діаметр катіону 0,10 нм) і не пропускає  $\text{K}^+$  (діаметр катіону 0,13 нм). Представлений двома кільцями амінокислот, які сумарно несуть негативні заряди: «-4» - зовнішнє

кільце, «-1» - внутрішнє. Мутації у внутрішньому кільці змінюють селективність каналів.

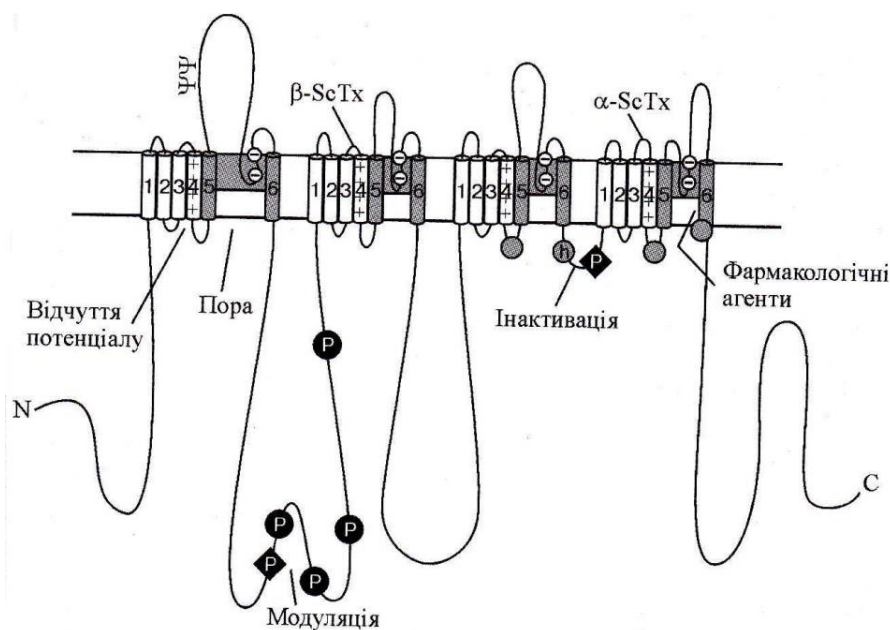


Рис. 20. Структура  $\text{Na}^+$ -каналу

Воротний або шлюзовий механізм формується також кожним з доменів, а його стан (відкритий/закритий) контролюється сенсором напруги – зарядженою молекулою протеїну, яка включає сегмент S4 кожного домену. Сенсор напруги містить структури, що повторюються: за позитивним залишком аргініну/лізину йдуть 2 гідрофобних залишки. Участь саме цих сегментів у механізмах чутливості каналів до зміни електричного потенціалу на мембрані доведена методами молекулярної біології та електрофізіології. Зокрема, змінюються вольт-амперні характеристики при штучній заміні природних амінокислотних залишків на інші. За деполяризації S4-сегмент рухається у зовнішньому напрямку, що ініціює конформаційні зміни, які відкривають канал.

В  $\text{Na}^+$ -каналі присутні “активаційні” ворота, які часто позначають літерою m, а також інактиваційні ворота – h;  $\text{K}^+$ -канал містить лише активаційні ворота. Оскільки із цитоплазматичного боку пора, вірогідно, утворюється S6-сегментами, саме вони можуть виконувати, згідно однієї з гіпотез, функцію активаційних воріт, які відкривається у відповідь на рух S4. Із використанням

антитіл проти певних амінокислотних послідовностей первинної структури і досліджуючи за цих умов кінетику інактивації встановлено, що компонентами інактиваційних воріт є структури III і IV доменів. Після кожного відкриття  $\text{Na}^+$ -каналу настає короткий рефрактерний період, під час якого канал не може відкритися знову, тому хвиля деполяризації розповсюджується в напрямку від тіла нейрона до кінця аксона.

$\text{Na}^+$ -канал виділяють і очищають афінною хроматографією із використанням селективних токсинів з електричного органу вугря, де вміст цих структур є напрочуд високим. Наступним етапом є визначення амінокислотного складу невеликого фрагменту і конструювання відповідної послідовності ДНК-пробника, яку використовують для визначення комплементарної ДНК в геномній бібліотеці. Останню потім клонують, визначають нуклеотидну, а потім і первинну амінокислотну послідовності.

Блокаторами  $\text{Na}^+$ -каналів є місцеві анестетики (кокаїн, прокаїн, лідокаїн тощо), а також токсини, які при потраплянні до організму, викликають параліч м'язів. Серед останніх відомі тетродотоксин японської риби голкобрюх, саксітоксин водоростей та батрахотоксин південноамериканської жаби. Фіксують канал у відкритому стані, і, відповідно, викликають судоми одна з компонент отрути скорпіона та рослинний аконітин.

*$\text{K}^+$ -канали.* Послугують підтримці стану спокою плазмалеми та поверненню в цей стан. Деполяризація індукує відкриття потенціал-керованих  $\text{K}^+$ -каналів, що призводить до реполяризації мембрани. Кодуються одним геном, який продукує один протеїн –  $\alpha$ -субодиницю, чотири молекули якого об'єднуються у структуру подібну  $\text{Na}^+$ -каналу. Цей тип  $\text{K}^+$ -каналів має субодиничний склад  $4\alpha 4\beta$ ,  $\alpha$ -субодиниця включає лише один домен, який містить шість сегментів. Альтернативний сплайсинг відповідає за утворення різноманітних видів каналів. Потенціал-керовані  $\text{K}^+$ -канали з скелетного м'язу блокуються тетраетиламонієм (ТЕА), а також катіонами  $\text{Ba}^{2+}$  та  $\text{Cs}^+$ . Описана родина  $\text{K}^+$ -каналів, які активуються за зростання концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Серед них виділяють підтипи з низькою провідністю, які інгібуються

пептидом бджолоїної отрути апаміном, проміжною провідністю та з високою провідністю, що блокуються TEA. Існують  $K^+$ -канали, які інгібуються за зростання внутрішньоклітинної концентрації АТР і пригнічуються глібенкламідом та 4-амінопіридином. Калієві канали різної провідності і фармакології ідентифіковано наразі у внутрішній мітохондрійній мембрані, де вони беруть участь в регуляції біоенергетичних, сигнальних і транспортних процесів.

*Нікотиновий ацетилхоліновий рецептор* відноситься до групи так званих істинно рецептор-залежних каналів, які включають групу протеїнів, що поєднують рецепторну та каналну функції або безпосередньо взаємодіють із каналною структурою. Це ліганд-залежний іонний канал, що у нормі стимулюється ацетилхоліном. Він активується також при зв'язуванні алкалоїду нікотину (н-ХР). Нікотиновий ацетилхоліновий рецептор складається із 5 субодиниць:  $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Субодиниця  $\alpha$  включає 4 трансмембранні сегменти М1-М4, де М1-М2 є пороутворювальними, N-кінцеву позаклітинну терміналь, яка зв'язує ацетилхолін та цитоплазматичну петлю між М3-М4, що містить ділянки фосфорилування та зв'язування антитіл, див. схему на рис. 21.

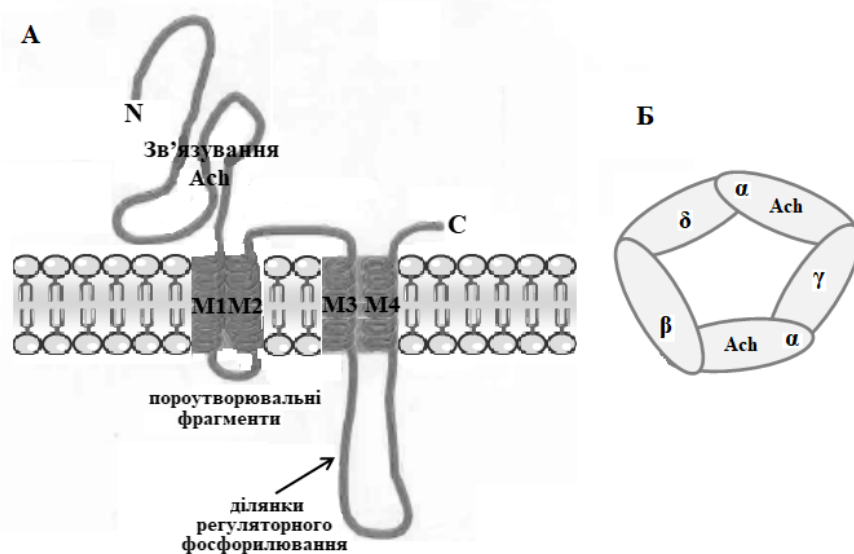


Рис. 21. Структура нікотинового ацетилхолінового рецептора: А – будова  $\alpha$ -субодиниці; Б – загальне розташування субодиниць, ACh – зазначено дві ділянки зв'язування ацетилхоліну

Приєднання однієї молекули ацетилхоліну покращує приєднання другої, що є проявом позитивної кооперативності. За дії ацетилхоліну канал пе-

реходить у відкритий стан, подальша експозиція ліганда веде до його десенсibilізації і закриття. Ацетилхолін дисоціює і розщеплюється ацетилхолінес-теразою, канал переходить у початковий закритий стан і готовий до взаємодії з ацетилхоліном (рис. 21).

Нікотинний ацетилхоліновий рецептор знайдено у постсинаптичних мембранах і в ділянках нервово-м'язового з'єднання. Він є неселективним катіонним каналом проникним для  $Ca^{2+}$ , але за фізіологічних умов транспортує переважно  $Na^+$ . Нікотинні холінорецептори наявні також у мітохондріях, де задіяні в регуляції функціонування як самих органел, так і процесів мітохондрій-залежного апоптозу.

До істинно рецептор-залежних каналів відносять також NMDA-рецептор (від N-метил-D-аспартат), який активується глутаматом,  $P_2$ -пуринорецептори, що стимулюються АТР/АДР і багато інших. Останній приклад яскраво ілюструє багатофункціональність регуляторних молекул в клітині. АТР, окрім забезпечення енергією у хімічній формі, виконує функції первинного месенджера, є попередником вторинного месенджера (сАМР), регулює перебіг апоптозу тощо.

Іншою великою групою холінорецепторів є мускаринові, що чутливі до алкалоїду мускарину (м-ХР). Виділяють не менше п'яти типів цих рецепторів, які опосередковують свою активність через спряження з гетеротримерними G-протеїнами. Наприклад, підтип М3-холінорецепторів діє через  $G_{q/11}$ -протеїни і активує мембранозв'язану ізоформу фосфоліпази С (PLC $\beta$ ). Підтип М2-холінорецепторів спряжений з ефекторними системами через  $G_{i/o}$ -протеїни, що призводить до інгібування мембраноасоційованої аденілатциклази та активації неселективних катіонних каналів плазмалеми. Особливо значення описані структури мають для функціонування гладеньких м'язів.

*Ca<sup>2+</sup>-канали плазматичної мембрани.*  $Ca^{2+}$  – універсальний вторинний месенджер, який регулює численні метаболічні процеси, контролює секрецію нейромедіаторів, обумовлює спряження між збудженням та скороченням в м'язах тощо. Концентрація  $Ca^{2+}$  в позаклітинному середовищі та люмені ен-

доплазматичного ретикулула складає ммоль/л, а у цитоплазмі - в середньому 100 нмоль/л. Підтримується низька концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі, що необхідно для прояву сигнальної функції, значною мірою за рахунок енергозалежного мембранного транспорту. Так, в скелетному м'язі на рівні плазматичної мембрани локалізовані  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза та  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник. В ендоплазматичному ретикулумі (у м'язах саркоплазматичному) функціонує  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза. У мітохондріях ідентифіковані  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник та  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер. Надходить  $\text{Ca}^{2+}$  при збудженні клітини з позаклітинного середовища за градієнтом концентрації крізь канали. Важливе значення мають канали, які селективно блокуються дигідропіридинами – дигідропіридинові (DHP) рецептори. Вони являють собою потенціал-залежні або потенціал-керовані високопорогові канали L-типу (від “long lasting”), які відкриваються при зниженні мембранного потенціалу до -10 мВ.

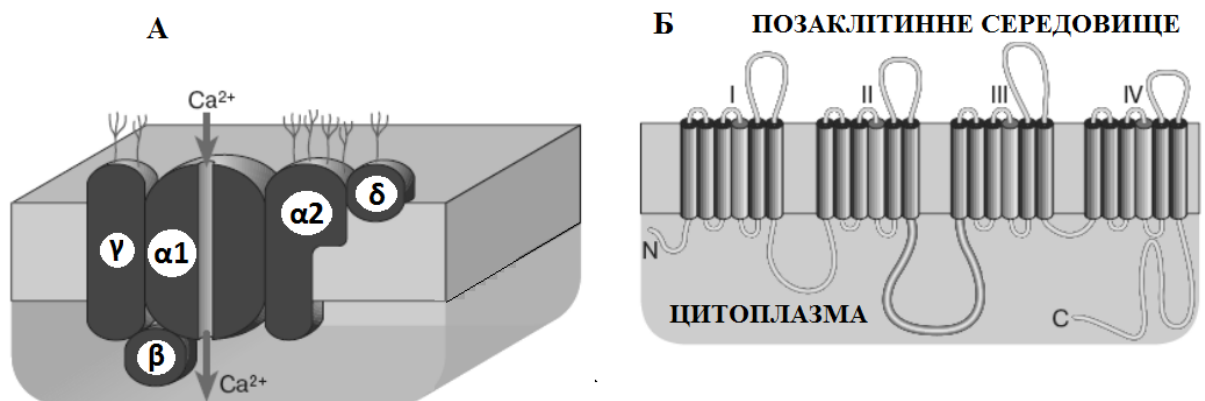


Рис. 22. Структура потенціал-керованого  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу L-типу: А – взаємне розташування субодиниць каналу в мембрані; Б – будова пороутворювальної  $\alpha$ -субодиниці

$\text{Ca}^{2+}$ -канал L-типу включає пороутворювальну  $\alpha_1$ -субодиницю (165 кДа) подібну до  $\alpha$ -субодиниці  $\text{Na}^+$ -канала. Зокрема в ній розрізняють 4 домєна, кожний з яких включає 6 сегментів, S5–S6 є пороутворювальними, а S4 – сенсор напруги. Субодиниця  $\beta$  функціональна подібна до відповідної структури  $\text{Na}^+$ -канала. Субодиниці  $\alpha_1$  і  $\beta$  фосфорилуються РКА, внаслідок чого активність каналу підвищується, водночас PKG – залежне фосфорилування знижує активність.  $\text{Ca}^{2+}$ -канал L-типу включає також  $\alpha_2$ ,  $\gamma$  і  $\delta$  субодиниці,



причому  $\alpha_2$  і  $\delta$  пов'язані між собою дисульфідним місточком, а між іншими субодиницями існують лише нековалентні зв'язки. Всі 5 субодиниць кодуються 4 генами, оскільки  $\alpha_2$  і  $\delta$  є результатом протеолізу одного пептиду (рис. 22).

Селективний фільтр  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу L-типу представлений чотирма залишками глутамату в зовнішній частині каналу, які розміщені попарно. Провідність в скелетному м'язі складає 20 пСм, причому швидкість його активації/інактивації в цій тканині повільніша, ніж в гладеньких м'язах та кардіоміоцитах. В скелетному м'язі він не інгібується при зростанні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі, а в інших типах м'язів інгібується. Ці особливості є наслідком специфіки електро(фармако)механічного спряження в різних типах м'язів, про що мова піде нижче. Потенціалкеровані канали L-типу забезпечують ефективне надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину, що забезпечує його месенджерну функцію.

Відомими блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу є неорганічні іони (Cd, Zn, Mn, Co, Ni) та органічні сполуки класу дигідропіридинів (ніфедипін, німодипін, нікардипін), фенілалкіламінів (верапаміл, Д600) та бензотіазепінів (ділтіазем). Деякі з органічних блокаторів застосовують для лікування серцево-судинних і окремих психічних захворювань. Дигідропіридини взаємодіють із позаклітинною петлею між S5, S6 третього домену та з S6 четвертого домену. Ділянка зв'язування із р'анодиноним рецептором,  $\text{Ca}^{2+}$ -каналом сарко(ендо)плазматичного ретикулула розташована в цитоплазматичній петлі між S6 та S1 сегментами другого та третього домену відповідно. Крім  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів L-типу виділяють також низькопорогові  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, які активуються за незначної деполяризації (T-тип), інші канали (N-, P-тип) залежно від виду тканини.

Виділяють групу каналів, які зв'язані з рецептором через систему гетеротримерних G-протеїнів. До них відносяться неселективні катіонні канали, що активуються при зв'язуванні ацетилхоліну з M2-холінорецепторами. Існують  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, які регулюються вторинними месенджерами, зокрема

інозитол-1,4,5-трисфосфатом (IP<sub>3</sub>), інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфатом (IP<sub>4</sub>), cGMP/cAMP, іонами Ca тощо (рис. 23).

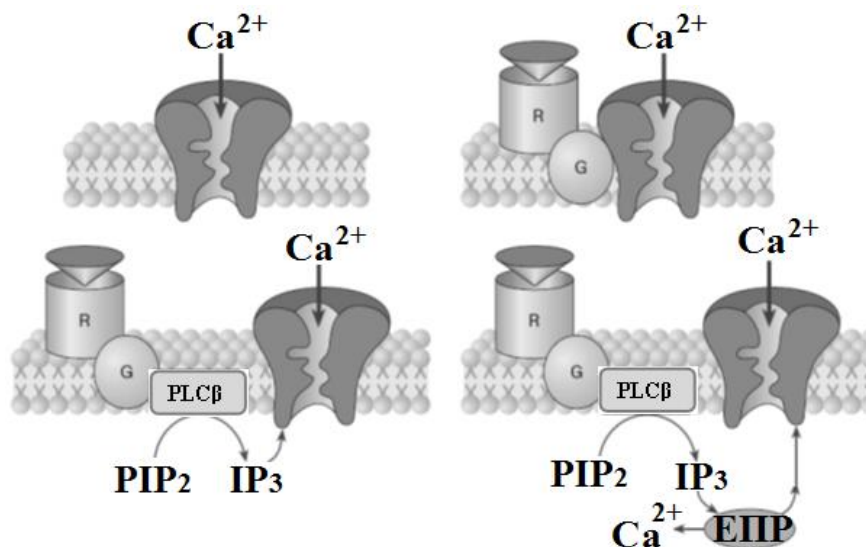


Рис. 23. Різні типи Ca<sup>2+</sup>-каналів плазматичної мембрани та принципи їх регуляції: R - рецепторний протеїн, G – гетеротримерні G-протеїни, PLCβ – фосфоліпаза C, β-ізоформа, ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

В фоторецепторних клітинах сітківки ока вони стимулюються cGMP, в сенсорних нейронах, які зумовлюють смак і нюх, cAMP або IP<sub>3</sub>. Інша група каналів плазматичної мембрани активуються спустошенням Ca<sup>2+</sup>-пулу сарко(ендо)плазматичного ретикулуму – це так звані пул-керовані Ca<sup>2+</sup> канали.

## РОЗДІЛ 7. РЕЦЕПТОРНІ ЕНЗИМИ

Рецепторні ензими складаються з ліганд-зв'язувального домену на зовнішній поверхні плазматичної мембрани, домену з активним каталітичним центром на цитозольному боці та трансмембранного сполучного домену (рис. 24).

Часто ці ензими у тварин є *тирозинкіназами*, які фосфорилують залишки тирозину у протеїнах-мішенях, у рослин розповсюджено фосфорилування залишків серину/треоніну. Особливості будови трьох основних класів *рецепторних тирозинкіназ* представлено на рисунку 24. В ряді випадків при зв'язуванні ліганду – первинного месенджера з рецептором відбувається його димеризація, зміна конформації з наступним реципрокним аутофосфорилу-

ванням цитозольних ділянок. Класичним варіантом такого типу передачі сигналу є сигнал від інсуліну або інсуліноподібного ростового фактору (IGF), у цьому випадку рецепторні субодиниці стаціонарно зв'язані.

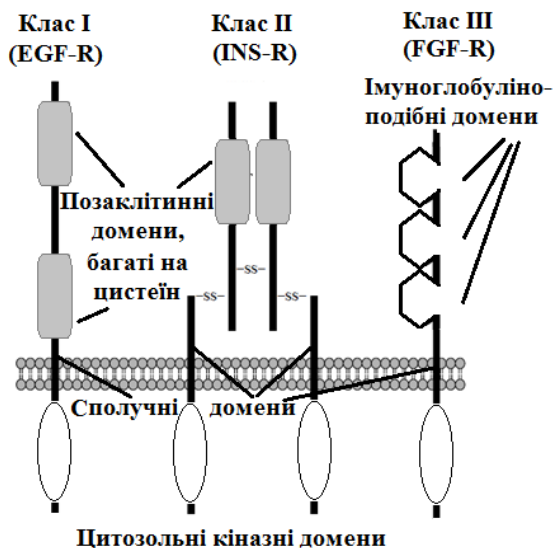


Рис. 24. Структура рецепторних ензимів на прикладі різних типів рецепторних тирозинкіназ

Іншими прикладами рецепторних ензимів є гуанілатциклази (гуанілілциклази), які активуються натрійуретичним фактором передсердя або оксидом азоту. У цьому випадку стимуляція рецепторного протеїну призводить до зростання вмісту вторинного месенджера cGMP.

**7.1. Трансдукція сигналу від рецептору інсуліну.** Рецептор інсуліну є гомодимером, мономер складається з  $\alpha$ - та  $\beta$ -доменів пов'язаних дисульфідним зв'язком. Домени  $\alpha$  взаємодіють з інсуліном, внаслідок чого змінюється конформація рецептору і активується тирозинкіназна здатність  $\beta$ -доменів, які фосфорилують по залишкам тирозину протеїни-мішені (рис. 25). На першому етапі відбувається реципрокне фосфорилування трьох критичних залишків тирозину (1158, 1162, 1163) сусідніх цитозольних карбокситермінальних ділянок  $\beta$ -доменів. Таке аутофосфорилування веде до відкриття активного центру і наступного фосфорилування інших протеїнів. При цьому петля ак-

тивації, яка в неактивному стані блокувала активний центр, зміщується внаслідок появи значних негативних зарядів. Протеїном-мішенню є IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1, субстрат рецептору інсуліну), який взаємодіє з фосфотирозинами рецептору завдяки наявності у складі молекули домену РТВ (PhosphoTyrosine Binding domain). В геномі людини знайдено 24 гена, що кодують РТВ-домени. Після набування власних фосфорильованих залишків тирозину він стає центром самозбирання сигнального комплексу або центром нуклеації. Зокрема до нього приєднується протеїн Grb2 (Growth-factor-receptor binding protein 2), який містить SH2-домен. Grb2 включає інший протеїн-зв'язувальний домен SH3, який взаємодіє з пролін-багатими мотивами протеїнів-партнерів. Таким протеїном є Sos (Son of sevenless), що містить збагачену залишками амінокислоти проліну ділянку. Sos взаємодіє з малим мономерним G-протеїном Ras і ініціює заміну GDP на GTP в активному центрі останнього. Активований таким чином Ras, залишок ізопрену якого зв'язується з цитозольною частиною плазматичної мембрани, стимулює серин/треонінову протеїнкіназу Raf1 (Rapidly accelerated fibrosarcoma 1). Остання належить до родини мітоген-активованих протеїнкіназ, MAP-кіназ, а саме підкласу серин/треонінових кіназ кіназ MAP-кіназ, МККК. Raf1 фосфорилує і активує кіназу MAP-кіназ MEK (Mitogen-activated, ERK-activated Kinase), яка належить до треонін/тирозинових кіназ підкласу МКК. Протеїн 14-3-3 зв'язує залишок фосфосерину у складі Raf і сприяє взаємодії з MEK. Остання фосфорилує і активує серин/треонінову MAP-кіназу ERK (Extracellular Responsive Kinase). Просторово зближує Raf/MEK/ERK протеїн MP1. ERK транслокується в ядро, де фосфорилує і активує фактори транскрипції, наприклад, Elk1, який зв'язується з SRF (Serum Response Factor) і регулює транскрипцію генів, що необхідні для поділу клітини. Описані тут сигнальні події, які призводять до збирання сигнального модуля, схематично представлено нижче (рис. 25, А).

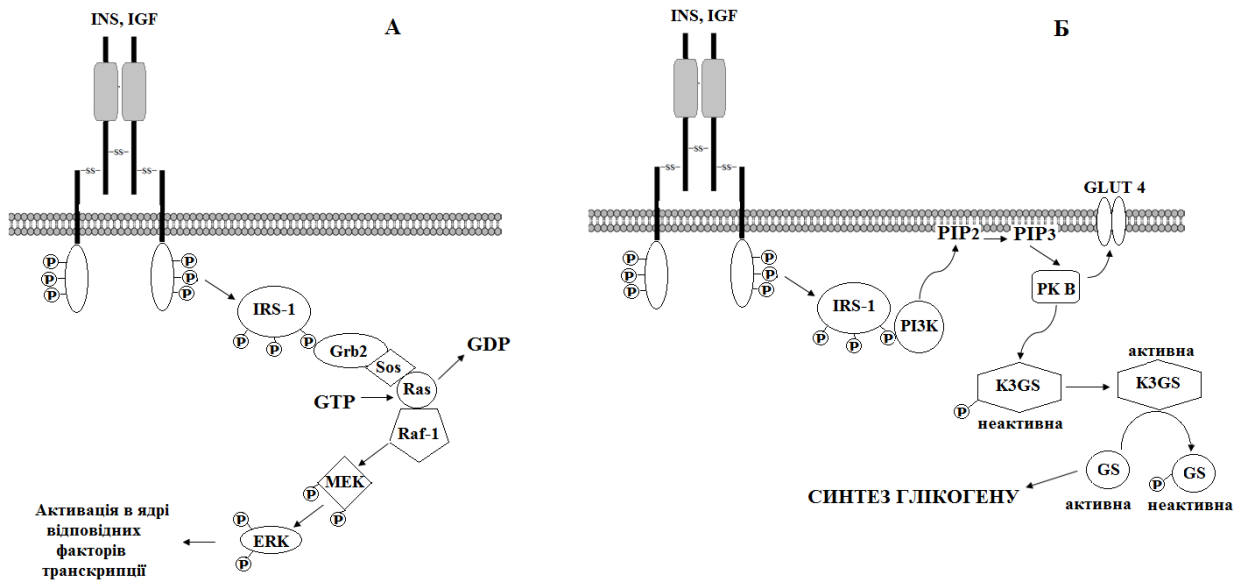


Рис. 25. Трансдукція сигналу від рецептора інсуліну. Пояснення до схеми до розшифровка абрєвіатур наведені в тексті

З фосфорильованим IRS1 зв'язується через SH2-домен фосфоінозитид-3-кіназа (PI3K) (рис. 25, Б). Остання фосфорилує мембранний фосфоліпід фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (PIP2) і перетворює його у фосфатидилінозитол-3,4,5-трисфосфат (PIP3). Обидва належать до мінорних мембранних регуляторних фосфоліпідів і вторинних месенджерів ліпідного походження. З PIP3 зв'язуються протеїни, які мають у своєму складі домен плекстринової гомології (PH-домен). PH-домени сигнальних протеїнів включають 100 амінокислотних залишків, їхні третинні структури в різних протеїнах гомологічні. Вони взаємодіють з фосфоліпідами,  $\beta\gamma$ -димерами G-протеїнів та протеїнами цитоскелету), послідовність зі 100 амінокислотних залишків). PH-домен містить РКВ або Акт-кіназа (рис. 26):



Рис. 26. Будова протеїнкінази B

Протеїни, що містять РН-домени взаємодіють також з актином цитоскелету. В процес активації РКВ залучена інша кіназа PKD, яка містить РН-домени, взаємодіє з плазматичною мембраною і спричинює активацію Акткінази шляхом її фосфорилування.

РКВ – серин/треонінова протеїнкіназа, яка фосфорилує кіназу 3 глікогенсинтази (K3GS). У активному нефосфорильованому стані K3GS фосфорилує глікогенсинтазу, що спричинює її інактивацію і сповільнює синтез глікогену. Внаслідок фосфорилування РКВ K3GS інактивується. За цим механізмом в печінці і м'язах інсулін стимулює синтез глікогену. РКВ ініціює також переміщення транспортера глюкози інсулінозалежних тканини Glut4 з внутрішньоклітинних везикул до плазматичної мембрани, як це зображено на схемі (рис. 25, Б).

За допомогою групи специфічних фосфатаз, деякі з яких контролюються зовнішніми факторами, клітина здатна швидко припинити трансдукцію сигналу і роз'єднати протеїни сигнального модуля. Процес дефосфорилування PIP3 з утворенням PIP2 забезпечує фосфатаза PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), що припиняє цей шлях трансдукції, тобто має місце негативний зворотний зв'язок. При деяких онкозахворюваннях клітини містять дефектний ген PTEN, отже сигнал не переривається і клітини весь час діляться, пухлина росте. На прикладі передачі сигналу від інсуліну можна побачити деякі спільні принципи внутрішньоклітинної сигналізації: ампліфікація сигналу від рецептору за рахунок послідовного функціонування каскаду кіназ різної специфічності та зв'язок дії одного первинного месенджера одразу з кількома сигнальними шляхами.

Інсулін продукується  $\beta$ -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози. З порушенням синтезу або передачі клітинного сигналу за участі інсуліну пов'язане таке тяжке захворювання як діабет. Виділяють декілька різновидів діабету, але в експериментальній біології часто говорять про діабети I та II типів. У випадку інсулінозалежного діабету I типу спостерігається деструкція  $\beta$ -клітин та зниження продукції інсуліну. Виділяють аутоімунний та

вірусіндукований, пов'язаний з краснухою, епідемічним паротитом тощо, різновиди діабету I типу. В лабораторній практиці у піддослідних тварин островки Лангерганса руйнують антибіотиком стрептозотоцином. Резистентність до інсуліну спостерігається за інсулінонезалежного діабету II типу. В цьому випадку концентрація інсуліну в плазмі крові може навіть бути нормальною, але порушення механізмів сигналювання призводить до нечутливості тканин-мішеней до інсуліну. Описані варіанти мутацій в рецепторі інсуліну та IRS1, які можуть бути молекулярною основою виникнення цього типу діабету. Також до розвитку діабету II типу призводить ожиріння (метаболічний синдром) та шкідливі звички.

Подібний вищеописаному варіант трансдукції сигналу відбувається також від рецепторів багатьох факторів росту, зокрема EGF (Epidermal Growth Factor) та PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), які володіють внутрішньою тирозинкіназною активністю і здатні фосфорилувати IRS1. На відміну від рецептору інсуліну, багато цих рецепторів утворює димери лише після зв'язування з лігандами. Крім того, існують рецептори, які володіють тирозинфосфатазною активністю, а їхніми лігандами є компоненти позаклітинного матриксу або поверхні інших клітин; активація цих рецепторів призводить до гальмування впливу кіназ.

На прикладі трансдукції сигналу від інсулінового рецептору можна проілюструвати принцип, коли сигнальні модулі збираються за рахунок протеїн-протеїнових взаємодій, а самі протеїни є мультивалентними. Ці загальні риси організації сигнальних систем добре видно на прикладі взаємодії SH2- та SH3-доменів, які було описано у складі прототипової нерцепторної протеїнкінази Src. У збиранні сигнальних модулів беруть участь також адаптерні або/і риштувальні протеїни. SH2-домени взаємодіють з фосфотирозинами протеїнів партнерів, а SH3-домени з відповідними поліпроліновими мотивами. Grb2 виступає адаптерним протеїном, який містить SH2- та SH3-домени і взаємодіє з фосфотирозином протеїну IRS1 та поліпроліновим мотивом Sos. IRS1 функціонує як риштувальний протеїн при трансдукції сигналу від інсу-

ліну, на платформі якого збираються сигнальні комплекси: сигнальний шлях, що пов'язаний з Grb2, та той, який асоційований з PI3K. Тобто рибозувальні протеїни просторово зближують протеїни певного сигнального каскаду. Прикладом рибозувального протеїну є також MP1.

Протеїн Sos регулює функціонування малого G-протеїну Ras, виступаючи тут для нього фактором GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor), який прискорює обмін GDF на GTF в активному центрі малого G-протеїну. Для різних G-протеїнів описано багато різних GEFs. Слід зазначити, що в регуляції функціонування малих G-протеїнів беруть участь також інші фактори, такі як GDI (GDP Dissociation Inhibitor) та GAPs (GTPase Activating Proteins). Перші з них пригнічують дисоціацію GDF з активного центру і гальмують роботу малих G-протеїнів. Другі пришвидшують гідроліз GTF в активному центрі.

*Структура SH2-доменів.* Залишок фосфотирозину зв'язується у заглибленні на поверхні SH2-домену, утворюючи з відповідними амінокислотами водневі та електростатичні зв'язки. Важливе значення у цій взаємодії належить двом позитивно зарядженим аргінінам SH2-домену. Критичними для визначення специфічності взаємодії з SH2-доменами мають амінокислотні залишки на карбоксикінцевому боці фосфотирозину. Фосфотирозин позначається як залишок «0», наступні амінокислотні залишки цифрами від «+1» до «+5». Деякі SH2-домени, наприклад нерецепторних протеїнкіназ Src, Fyn взаємодіють з негативно зарядженими залишками у положеннях «+1» та «+2». Інші, зокрема PLC $\gamma$  (Phospholipase C, gamma) та фосфатаза SHP2 (Src Homology region 2-containing protein tyrosine Phosphatase 2), взаємодіють з аліфатичними амінокислотами у положеннях від «+1» до «+5», тому SH2-домени мають видовжену гідрофобну заглибину. За таким механізмом визначається специфічність взаємодії протеїнів-партнерів.

*Src-кіназа* відноситься до великої групи нерецепторних (цитоплазматичних) тирозинкіназ. Вона містить у своєму складі SH2-домен і SH3-домен. Виділяють vSrc – онкогенну форму та cSrc - звичайну конститутивну, яка



експресується в більшості клітин; такі позначення використовуються і у випадку інших сигнальних протеїнів. В активному стані фосфотирозин субстрату взаємодіє з SH2-доменом, а поліпроліновий мотив субстрату – з SH3-доменом. Це дає змогу активному центру кінази фосфорилювати залишки тирозину у субстраті. У аутоінгібованому фосфорильованому стані Src-кінази власний фосфотирозин взаємодіє з власним SH2-доменом, а власний поліпроліновий мотив – з SH3-доменом. Внаслідок цього активний центр не має змоги взаємодіяти з субстратом.

В іншому прикладі фосфорилювання по залишку серину призводить до самоінгібування *кінази-3-глікогенсинтази*, коли фосфосерин взаємодіє з власним фосфосеринзв'язувальним доменом. Внаслідок дефосфорилювання відбувається звільнення фосфосеринзв'язувального центру, фосфосерин субстрату з ним взаємодіє і до активного центру кінази підходять залишки серину, які фосфорилюються.

**7.2. JAK/STATs – сигнальний шлях.** В цьому випадку трансдукції сигналу сам рецептор не володіє протеїнкіназною активністю, але при зв'язуванні ліганда одержує можливість взаємодіяти з цитозольними розчинними кіназами. До такої системи належить JAK/STATs (Janus Kinase, Signal Transduction and Activators of Transcription) сигнальний шлях. За цим механізмом може передаватися сигнал від INF $\gamma$ , що має наслідком, зокрема, стимуляцію експресії iNOS, або гормону лептину, а також еритропоєтину – цитокіну, що утворюється в нирках, і регулює дозрівання еритроцитів через зміни в експресії певних HIF-залежних генів (рис. 27). При взаємодії з еритропоєтином відповідний рецептор на поверхні плазматичної мембрани димеризується, його цитозольна частина зв'язує JAK (JAK1, JAK2), які активуються і реципрокно фосфорилюють кілька залишків тирозину рецепторних субодиниць. Надалі фосфотирозини розпізнають і зв'язують SH2-домени у складі STAT5, останній фосфорилюється, димеризується і в ядрі змінює експресію генів. Міткою, яка забезпечує перенесення STAT5 у ядро послуговує відк-

риття внаслідок фосфорилування послідовності NLS (Nuclear Localization Signal) (рис. 27).

У сигнальні шляхи, ініційовані еритропоетином, може залучатися також Grb2, а далі відбувається активація MAP-кіназного каскаду, як і у випадку інсуліну. До розчинних тирозинкіназ, які взаємодіють з цитозольною частиною рецепторів при зв'язуванні ліганду й активуються, належать протеїни родини Src. Ще один приклад рецептора, що асоційований з розчинною протеїнкіназою, – Toll-подібний рецептор, який у ссавців відповідає за розпізнавання бактеріальних ліпополісахаридів.

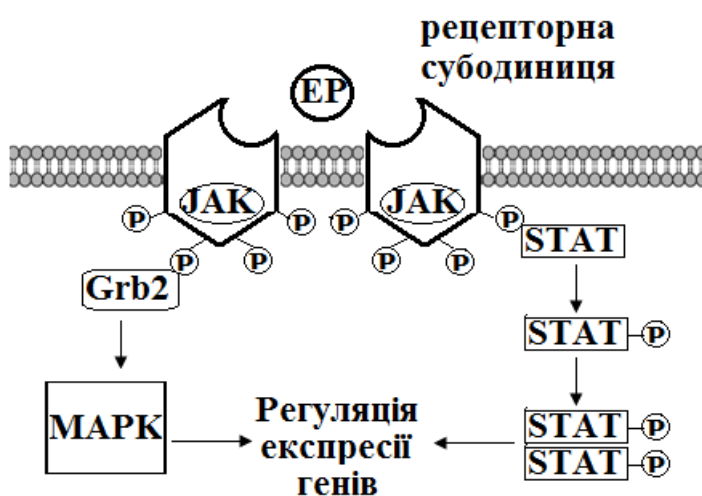


Рис. 27. Трансдукція сигналу гормону еритропоєтину (EP). Пояснення до схеми та розшифровка абревіатур наведені в тексті

До рецепторних ензимів належать гуанілатциклази (гуанілілциклази), які каталізують синтез cGMP з GTP. Після припинення дії сигналу cGMP розщеплюється до 5'-GMP за допомогою фосфодіестераз. У нирках в клітинах збірних ниркових трубочок присутня одноланцюгова гуанілатциклаза, яка пронизує плазматичну мембрану. Позаклітинний домен має рецепторну функцію, а цитозольний відповідає за синтез cGMP. Внаслідок збільшення об'єму крові, а також надмірного артеріального тиску, клітини передсердя секретують натрійуретичний пептид або натрійуретичний фактор передсердя. Кров переносить його до нирок, де він активує гуанілатциклазу, а підвищення вмісту cGMP індукує вивільнення нирками іонів натрію разом з водою.

У гладеньком'язових клітинах судин присутній в мембрані аналогічний ензим, внаслідок активації якого натрійуретичним пептидом відбувається розслаблення судинної стінки. В плазматичній мембрані епітелія тонкого кишківника також наявний подібний ензим, який cGMP-залежно регулює секрецію іонів хлора у просвіт кишківника. В нормі він активується гуаніліном, але також і ендотоксином грамнегативних бактерій (*E. coli*), тому ці бактерії спричинюють діарею.

В багатьох типах клітин присутня розчинна (цитозольна) гуанілатциклаза, яка містить гемову простетичну групу і активується оксидом азоту. Внаслідок цього спостерігається розслаблення судинної стінки, змінюється проникність мікрокапілярів і знижується агрегація тромбоцитів. В багатьох випадках ефекти cGMP опосередковані подальшою активацією cGMP-залежної протеїнкінази (PKG), яка фосфорилує ефекторні протеїни, наприклад  $Ca^{2+}$ -канали та помпи по залишкам серину/треоніну, що знижує концентрацію  $Ca^{2+}$  в цих клітинах.

## **РОЗДІЛ 8. ПРОТЕЇНТИРОЗИНФОСФАТАЗНА СИГНАЛЬНА СИСТЕМА**

Функціональними антагоністами тирозинкіназ у внутрішньоклітинних сигнальних каскадах є тирозинові протеїнфосфатази (PTPs – Protein Tyrosine Phosphatases). Ці ензими забезпечують відщеплення залишку фосфорної кислоти від фосфотирозинвмісного субстрату. Протеїн-тирозинфосфатази (скорочено тирозинфосфатази) є регуляторами внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, залучених у контроль клітинного росту, диференціювання, проліферації. Порушення їхнього функціонування призводить до злоякісної трансформації.

Протеїн-тирозинфосфатази можна розділити на дві групи: рецепторні (рецептороподібні) і цитоплазматичні (рис. 28). Обидві групи каталізують гідроліз фосфотирозину у складі сигнальних протеїнів, мають гомологічний каталітичний домен і діють за спільним механізмом. Окрім цих основних

класів існують також тирозинфосфатази з подвійною специфічністю, які гідролізують як фосфотирозин, так і фосфосерин, наприклад фосфатаза CDC25.

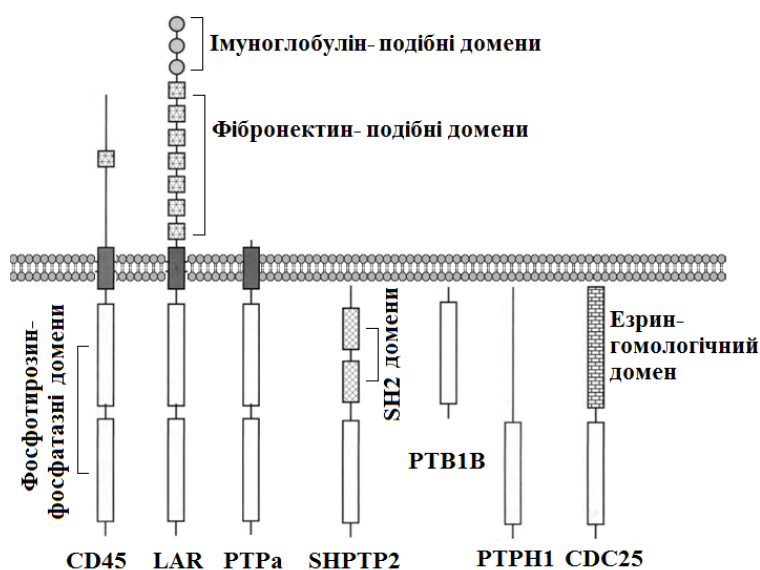


Рис. 28. Схема будови рецепторних (CD45, LAR, PTPα) та нерецепторних (SHPTP2, PTP1B, PTPH1, CDC25) протеїн-тирозинфосфатаз

Каталітичний центр тирозинфосфатаз містить консервативну амінокислотну послідовність гістидин/валін-цистеїн-(X)5-аргінін-серин/треонін-гліцин/аланін/пролін (X — будь-яка амінокислота), яка бере участь у зв'язуванні тирозинфосфатів і каталізі. Іншим каталітично важливим залишком є аспарагінова кислота, розташована в протеїновій петлі (петля P), яка є віддаленою від цистеїну активного центру. Ця петля зазнає конформаційних змін, коли субстрат зв'язується з ензимом. В активному центрі тирозинфосфатаз локалізований залишок цистеїну (існує у вигляді тіолат-аніону) і аргініну. Позитивно заряджений аргінін стабілізує положення цистеїнового залишку. Тіолат-аніон здійснює нуклеофільну атаку на фосфотирозин субстрату, в результаті чого в активному центрі утворюється цистеїн-фосфат. Розташування фосфат-аніону в цистеїн-фосфаті стабілізується залишком аргініну і позитивним дипольним кінцем близько розташованої α-спіралі. На наступній стадії фосфат вивільняється з проміжного цистеїн-фосфату шляхом нуклеофільної атаки молекули води, що ілюструє каталітичний механізм «пінг-

понг». Дефосфорилуванню тирозину сприяє аспарагінова кислота, яка віддає протон фенольному залишку.

Загальна будова рецепторних тирозинфосфатаз (rPTPs) подібна до трансмембранних рецепторів (рис. 28). Вони мають трансмембранний, цитоплазматичні і, в деяких випадках, великий позаклітинний домен із дуже мінливою структурою. Відмінності у структурі позаклітинних доменів рецепторних тирозинфосфатаз відповідають особливостям будови лігандів, з якими вони сполучаються. У межах С-термінальної внутрішньоклітинної частини rPTPs виділяють мембранопрксимальний (D1) і мембранодистальний (D2) домен. Домен D1 є власне каталітичним, тоді як D2 є неактивним, але за структурою подібним до активного. D2 домен опосередковують димеризацію rPTPs, залучаючись таким чином у регуляцію передачі сигналу. Вони мають вищу чутливість до дії окисників порівняно з D1, унаслідок чого можуть слугувати редокс-сенсорами. Конформаційні зміни у D2, індуковані окисненням, можуть передаватися на позаклітинний домен.

Рецепторні тирозинфосфатази залучені у передачу сигналу від антигенів, мітогенів, інтерлейкінів, інтерферонів, беруть участь у регуляції адгезивних і міграційних властивостей клітин, дефосфорилуванні протеїнів цитоскелету. Молекулярні механізми дії rPTPs включають дефосфорилування представників тирозинових протеїнкіназ Src-, Jak-родин, MAPK тощо.

Виявлено ліганди для рецепторних тирозинфосфатаз, які функціонують як їх специфічні регулятори. Так, у клітинах нервової тканини було ідентифіковано, що поверхневий протеїн контактин є позаклітинним лігандом РТР (РТР $\alpha$ ). Продемонстрована роль рецепторів РТР в сигнальних шляхах адгезії нервових клітин. Виявлено, що рецепторна тирозинфосфатаза РТРf специфічно інгібується плейотрофіном - цитокіном, який бере участь у ангіогенезі пухлин.

Деякі з rPTPs виступають супресорами пухлин, унаслідок чого їхня втрата або мутація можуть призвести до неконтрольованої клітинної проліферації та трансформації. Тирозинфосфатази цієї групи включають варіабе-

льну позаклітинну частину, яка має структуру, подібну до молекул клітинної адгезії (CAM, Cell Adhesion Molecules), з IgG-подібними доменами (IgL).

Регуляція активності rPTPs здійснюється кількома шляхами, одним із найважливіших є їхня регуляторна димеризація. Переважна більшість rPTPs у вигляді димерів є неактивними, оскільки в димеризованому стані відбувається реципрокне інгібування каталітичних D1-доменів. На N-кінці кожного D1-домену наявна послідовність спіраль-петля-спіраль ("клин"), яка при димеризації взаємодіє з активним сайтом розташованого поруч сусіднього D1. У ряді випадків зв'язування ліганду інгібує активність rPTPs шляхом індукції димеризації. Водночас PTP $\alpha$  у вихідному стані є неактивним гомодимером, а зв'язування ліганду спричиняє руйнування димеру і активацію ензиму. За останнім механізмом відбувається регуляція активності головної трансмембранної тирозинфосфатази лімфоїдних клітин – CD45-рецептора.

Обмежений протеоліз і зміна субклітинної локалізації також є способами регуляції активності rPTPs. Розщеплення rPTPs субтилізиноподібними протеазами спричиняє втрату ними позаклітинного домену і може бути одним із механізмів, залучених у термінацію rPTPs-залежних сигнальних шляхів. Деякі rPTPs можуть підлягати внутрішньоклітинному розщепленню, наприклад, кальпаїнозалежний гідроліз PTP $\alpha$  сприяє вивільненню її каталітичного домену в цитозоль.

Цитозольні PTPs (рис. 28) залучаються у трансдукцію сигналу від антигенів, інтерферонів, інтерлейкінів, дофаміну, G-протеїнів. Вони беруть участь у дефосфорилуванні протеїнів ядра, а отже здійснюють контроль проліферації, чергування фаз клітинного циклу, причетні до регуляції апоптозу лімфоцитів тощо.

Розташовані в цитозолі тирозинфосфатази мають каталітичний домен та структурні елементи, які визначають субклітинну локалізацію та асоціацію з ефекторними молекулами. Ці структурні елементи забезпечують розташування тирозинфосфатаз з цитозольного боку плазматичної мембрани, в ядрі, асоціацію з цитоскелетом, а також з іншими сигнальними протеїнами. Усі

вони мають один консервативний протеїнфосфатазний домен і один регуляторний, який надає ензиму правильної внутрішньоклітинної локалізації та специфічності щодо субстрату, а також містить сайти для посттрансляційної модифікації. Показано, що SH2-домени PTPs опосередковують зв'язування фосфорильованих залишків тирозину активованих рецепторних тирозинкіназ. Це забезпечує зворотне дефосфорилування останніх і припинення сигналу. До SH2-вмісних PTPs відноситься SH-PTP1, який регулює передачу сигналів гемопоетичними рецепторами, а також SH-PTP2 (SYP), що бере участь у передачі сигналів від рецепторів цитокінів та факторів росту.

Класичним прикладом цитозольних тирозинфосфатаз є PTP1B. Цей ензим, зокрема, причетний до дефосфорилування інсулінового рецептора та тирозинкінази Jak2.

Внаслідок того, що активний центр цитозольних PTPs містить залишок цистеїну, регуляція цих ензимів може здійснюватися шляхом його оберненого окиснення, що пригнічує каталітичну здатність. Це є одним із механізмів, за якими активні форми кисню пролонгують тривалість сигналювання за участю тирозинкіназ. Активація рецепторів факторів росту та інсуліну супроводжується продукцією пероксиду водню, який здатний окиснювати PTPs.

Залишок цистеїну активного центру rPTPs та PTPs може бути окиснений до різних кінцевих продуктів за дії  $H_2O_2$  та інших клітинних оксидантів. При утворенні цистеїнсульфенової кислоти (Cys-SOH) остання надалі у внутрішньомолекулярній реакції здатна взаємодіяти з сусідньою аміногрупою, при цьому утворюється сульфеніламідна структура. Зокрема, при окисненні PTP1B утворюється сульфеніламідний зв'язок. Це спричинює конформаційні зміни в каталітичному центрі тирозинфосфатаз, які є оборотними. Утворення цистеїнсульфінової (Cys-SO<sub>2</sub>H) та цистеїнсульфонової (Cys-SO<sub>3</sub>H) кислот є необоротними процесами. Тобто сульфеніламід захищає залишок цистеїну в активному центрі від необоротного окиснення. rPTPsможуть також підлягати оборотним модифікаціям шляхом глутатіонування і нітрозилування. Особ-

ливим механізмом регуляції функцій rPTPs є стабілізація неактивних димерів, наприклад РТР $\alpha$ , за дії окисників.

В клітині існує складна взаємодія між активністю тирозинфосфатаз і тирозинкіназ. Як правило, активність рецепторних тирозинкіназ знижується у випадку посилення роботи тирозинфосфатаз. За обробки клітин інгібіторами РТРs відбувається незалежна від ліганду активація рецепторних тирозинкіназ і відповідних низхідних сигнальних шляхів. Гальмівна дія тирозинфосфатаз на передачу сигналів активованими рецепторними тирозинкіназами може бути пов'язана з відщепленням залишку фосфату від активованої рецепторної тирозинкінази, яка зазнала аутофосфорильовання після зв'язування ліганду. Іншими потенційними мішенями тирозинфосфатаз у контролі передачі сигналів рецепторними тирозинкіназами є фосфорильовані ефекторні молекули останніх, наприклад, IRS.

Тирозинкінази можуть також зазнавати позитивної регуляції з боку тирозинфосфатаз. Прикладом цього механізму є нерцепторна тирозинкіназа Src. Фосфорильовання кінази Src по тирозину-527 пов'язане з пригніченням її активності. SH2-домен кінази Src зв'язується з фосфорильованим тирозином на С-кінці, що призводить до блокування активного центру. Тому відщеплення інгібуючого фосфатного залишку фосфатазою призводить до активації кінази. Нерцепторні тирозинкінази Lck та Fyn також активуються фосфатазою CD45 шляхом дефосфорильовання тирозину.

Існують численні докази того, що порушення регуляції тирозинкіназ відіграє вирішальну роль у пухлиноутворенні, а мутації генів тирозинкіназ можуть перетворити їх в онкогени. Тому тирозинфосфатази можуть відігравати роль пухлинних супресорів. Втрата гальмівної функції тирозинфосфатаз при передачі сигналу в тирозинкіназному месенджерному каскаді може призвести до некоординованого збільшення фосфорильовання тирозину і, таким чином, до неконтрольованих процесів проліферації та росту. Описано інгібіторну дію тирозинфосфатаз щодо утворення пухлин.



## РОЗДІЛ 9. ТРАНСДУКЦІЯ СИГНАЛУ ЗА УЧАСТІ ГЕТЕРОТРИМЕРНИХ G-ПРОТЕЇНІВ

Ще одним варіантом передачі внутрішньоклітинного сигналу є його трансдукція від *рецепторів, які спряжені з ефекторними ензимами (ключовими ензимами сигнального каскаду) через гетеротримерні G-протеїни*. У геномі людини закодовано понад 1000 рецепторів цього типу, які активуються багатьма гормонами і нейротрансмітерами, а також реагують на такі стимули як світло, запахи, смакові подразники. Прикладом зазначеного механізму передачі сигналу є  *$\beta$ -адренергічні рецептори* (класифікуються на  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  та  $\beta_3$  підтипи), які містяться в м'язах, печінці, жировій тканині і прискорюють розпад глікогену та жирів. Природним лігандом цих рецепторів виступає епінефрин або адреналін, синтетичним агоністом є ізопротеренол, а антагоністом – пропранолол. Антагоністи  $\beta$ -адренорецепторів використовують для лікування серцево-судинних захворювань, зокрема гіпертензії. Цей рецептор є інтегральним протеїном із сьома гідрофобними ділянками, що пронизують мембрану 7 разів і мають довжину 20-28 амінокислотних залишків. Тому у науковій літературі можна зустріти назви *серпентинові рецептори, рецептори з сьома трансмембранними доменами або рецептори спряжені з G-протеїнами, GPCR*.

Гетеротримерні G-протеїни складаються з субодиниць  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ . Втім, субодиниці  $\beta$  і  $\gamma$  настільки міцно пов'язані між собою, що в фізіологічних умовах ніколи не роз'єднуються, тому можуть розглядатися як одна функціональна одиниця.  $G_\alpha$ -субодиниця містить нуклеотид-з'язувальний домен з ензиматичною GTP-азною активністю та визначає загальну біологічну функцію G-протеїну: коли вона містить GTP, протеїн перебуває в активованому стані, а після гідролізу нуклеотиду переходить в GDP-з'язаний неактивний стан.

G-протеїни можуть перебувати у трьох станах, які змінюють один одного в GTP-азному циклі. Коли рецептор, з яким контактує G-протеїн не стимулюється агоністом, в активному центрі  $G_\alpha$ -субодиниці міститься GDP і

протеїн загалом перебуває в неактивному стані. Після того, як стимул викликає активаційні зміни у структурі рецептора, внутрішньоклітинна частина рецептора змінює своє положення щодо G-протеїну та індукує структурні перебудови  $G_\alpha$ -субодиниці, яка втрачає спорідненість до GDP і нуклеотид дисоціює. Так G-протеїн переходить у наступний стан, який називають «порожнім», оскільки у нуклеотид-зв'язувальному сайті у даний момент відсутній гуаніновий нуклеотид. Оскільки конформація нуклеотид-з'язувального сайту  $G_\alpha$ -субодиниці при «порожньому» стані має суттєво вищу спорідненість до GTP, G-протеїн зв'язує GTP та переходить в активний стан. Саме в активному стані G-протеїни здатні передавати сигнали до ефекторних протеїнів, забезпечуючи внутрішньоклітинне поширення сигналу. Варто відзначити, що зв'язування GTP з  $G_\alpha$ -субодиницею призводить до її дисоціювання від комплексу  $\beta\gamma$ -субодиниць. Після цього  $G_\alpha$ - і  $\beta\gamma$ -субодиниці впливають (активують або пригнічують) на власні ефекторні протеїни (ензими, іонні канали). Оскільки, як уже згадувалося, нуклеотид-зв'язувальний сайт  $G_\alpha$ -субодиниці володіє невеликою GTP-азною активністю, через деякий час відбувається гідроліз GTP і G-протеїн переходить у неактивний стан, а його субодиниці формують гетеротримерний комплекс.

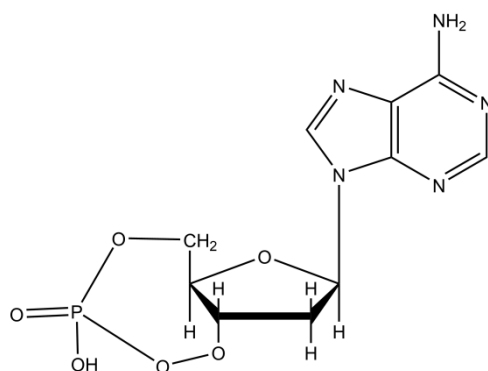
Виокремлюють дві групи протеїнів, які модулюють ефективність передавання сигналу через G-протеїн. Перші – GAP (протеїни, які активують GTP-азу) – знижують ефективність такої трансдукції, оскільки зв'язуються з  $G_\alpha$  та прискорюють внутрішню активність GTP-ази субодиниці  $G_\alpha$ . Другі – GEF (протеїни-фактори обміну гуанінових нуклеотидів) – посилюють загальну ефективність трансдукції сигналу, оскільки спричинюють зниження афінності нуклеотид-зв'язувального сайту до GDP та пришвидшують його дисоціацію.

G-протеїни класифікуються за їх субодиницями  $G_\alpha$ . На основі подібності амінокислотних послідовностей  $G_\alpha$ -субодиниць та схожості функцій G-протеїни поділяються на чотири родини:  $G_{as}$ ,  $G_{ai}$ ,  $G_{aq}$  та  $G_{\alpha 12}$ . У родині  $G_{as}$  є два члени:  $G_{as}$  і  $G_{\alpha olf}$ . Протеїни  $G_{as}$  (індекс «s» означає стимуляцію аденілат-

циклази) експресується в більшості типів клітин, тоді як  $G_{olf}$  (індекс «olf» означає олфакторний, нюховий) вибірково ідентифіковані в сенсорних нюхових нейронах. Родина  $G_{ai}$  – найбільша; вона об'єднує протеїни  $G_{ai1}$ ,  $G_{ai2}$ ,  $G_{ai3}$ ,  $G_{ao}$ ,  $G_{at}$ ,  $G_{ag}$  і  $G_{az}$ . Протеїни з  $G_{ai}$ -субодинами (індекс «i» вказує на інгібування аденілатциклази) були виявлені у більшості типів клітин. Протеїни з субодинами  $G_{ao}$  ідентифіковано в нейронах. Субодина  $G_{at}$  (індекс «t» означає трансдуктин – протеїн, який трансдукує зорові стимули) має дві ізоформи:  $G_{at1}$  експресуються в паличках, а  $G_{at2}$  – в колбочках сітківки ока.  $G_{ag}$  (індекс «g» означає гасдуктин – протеїн, який опосередковує смакову рецепцію) міститься в клітинах смакових рецепторів. Протеїн  $G_{az}$  ідентифіковано в нейронах і тромбоцитах. Родина протеїнів  $G_{aq}$  об'єднує  $G_{aq}$ ,  $G_{a11}$ ,  $G_{a14}$  і  $G_{a15/16}$ . Перші два протеїни ( $G_{aq}$  і  $G_{a11}$ ) експресуються практично у всіх типах клітин, тоді як  $G_{a14}$  переважно виявляють у тканинах нирок, легень і печінки, а  $G_{a15/16}$  – лише в гемопоетичних клітинах. Родина  $G_{a12}$  об'єднує протеїни  $G_{a12}$  і  $G_{a13}$ , які експресуються у більшості типів клітин.

Хоча субодинами  $\beta$  і  $\gamma$  досить різноманітні (у геномі людини є 5 генів  $G_{\beta}$  і 12  $G_{\gamma}$ ), вони переважно мають загальною подібну біохімічну активність. Як і  $G_{\alpha}$ -субодинами за допомогою пренілування утримуються поряд з мембраною. Тут після активації гетеротримерного G-протеїну та дисоціації від  $G_{\alpha}$ -субодинами, комплекс  $\beta\gamma$ -субодинами діє на власні протеїни-мішені (примембранно розташовані ензими, іонні канали тощо).

Розглянемо типовий каскад внутрішньоклітинних змін, який індукується при активації  $\beta$ -адренорецептора. При зв'язуванні епінефрину відбуваються конформаційні зміни рецептора, зокрема його цитозольної карбокситермінальної частини, яка взаємодіє з гетеротримерним G-протеїном (рис. 29). В аденілатциклазному сигнальному каскаді розрізняють стимуляторні  $G_s$  та інгібіторні  $G_i$  типи G-протеїнів. Внаслідок активації рецептором  $G_s$  стимулюється утворення сАМР аденілатциклазою; гормони, які діють через  $G_i$  інгібують активність аденілатциклази. Формула сАМР наведена нижче:



Внаслідок активації системи гетеротримерних G-протеїнів у  $G_{\alpha}$ -субодиниці відбувається заміщення GDP на GTP в активному центрі,  $\alpha$ -субодиниця відокремлюється від  $\beta\gamma$ -субодиниць, які через ізопреновий залишок зв'язані з цитозольною частиною мембрани, і переміщується в площині плазмалемі до найближчої молекули аденілатциклази (рис. 29).

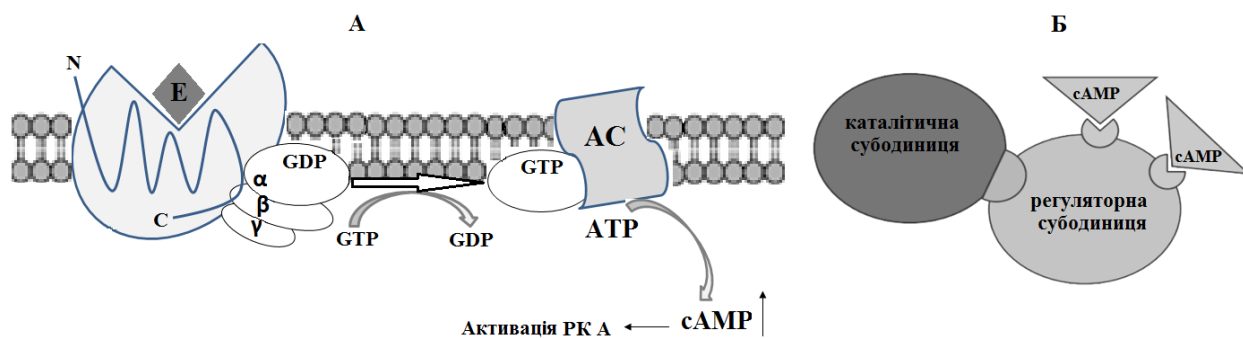


Рис. 29. Приклад функціонування аденілатциклазного месенджерного каскаду: А – трансдукція сигналу від серпентиного рецептора епінефрину, Е – епінефрин, АС – аденілатциклаза; Б – схема будови аденілатциклази

$G_{\alpha}$ -субодиниця утримується з цитозольного боку мембрани за рахунок ковалентно приєднаного залишку пальмітинової кислоти. Аденілатциклаза активується, GTP розщеплюється за рахунок власної GTPазної реакції і  $G_{\alpha}$ -субодиниця стає неактивною, знову утворюючи комплекс з  $\beta\gamma$ -субодиницями. Як уже згадувалося, процес функціонування гетеротримерних G-протеїнів є оборотним, спільний в основних рисах для всіх G-протеїнів цього типу і отримав в науковій літературі назву «цикл гетеротримерних G-протеїнів». Термінація сигналу в аденілатциклазній месенджерній системі досягається також деградацією cAMP до 5'-AMP відповідною *фосфодіестеразою*. Аденілатциклаза (аденілілциклаза) – інтегральний протеїн плазматич-

ної мембрани, в активному центрі якого на цитозольному боці здійснюється синтез cAMP з АТР. Описані також цитозольні ізоформи аденілатциклази, зокрема в мітохондріях.

Одним з біологічних ефектів cAMP є активація розпаду глікогену. cAMP активує серин/треонінову протеїнкіназу А (РКА). РКА фосфорилує і активує кіназу фосфорилази b, остання фосфорилує по 2 залишкам серину і активує фосфорилазу b, що перетворює її на фосфорилазу a, яка відщеплює від глікогену залишки глюкозо-1-монофосфату. В неактивному стані РКА являє собою тетрамер з 2 регуляторних та 2 каталітичних субодиниць, причому аутоінгібувальна ділянка регуляторної субодиниці блокує центр зв'язування субстрату. При зв'язуванні 4 молекул cAMP з регуляторними субодиницями вони дисоціюють від каталітичних і доступ субстрату до активного центру звільняється. Первинний гормональний сигнал, в цьому випадку епінефрину, посилюється на декілька порядків, що визначає дію дуже низьких концентрацій первинних месенджерів. Кофеїн та теофілін (метилксантини) інгібують фосфодіестеразу, збільшують період напіврозпаду cAMP і належать до збуджувальних сполук.

У разі довготривалої дії епінефрину відбувається десенсибілізація рецептора. З мембранозв'язаними  $G_{s\beta\gamma}$  взаємодіє цитозольна кіназа  $\beta$ -адренергічного рецептора ( $\beta$ ARK), яка фосфорилує залишки серину на карбокситермінальній частині рецептору.  $\beta$ ARK відноситься до родини кіназ рецепторів, спряжених з G-протеїнами (GPK), які фосфорилують цитозольні частини серпентинових рецепторів. Це фосфорилування ініціює зв'язування  $\beta$ -арестину ( $\beta$ arr або арестин 2). Арестин перешкоджає взаємодії між рецептором і G-протеїном і ініціює переміщення рецептору у внутрішньоклітинні везикули. У везикулах відбувається дефосфорилування рецептору і він повертається до плазматичної мембрани, його чутливість до епінефрину відновлюється. Арестини здатні діяти як риштувальні протеїни, що збирають компоненти та ініціюють інший сигнальний каскад.  $\beta$ -Арестин, який пов'язаний з серпентиновим рецептором ангіотензину, зв'язує протеїнкінази Raf1, MEK,

ERK, запускаючи MAP-кіназний месенджерний каскад. Це приклад того, як різні первинні месенджери, інсулін та ангіотензин, ініціюють один сигнальний шлях.

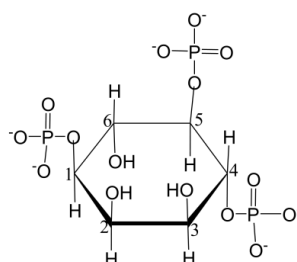
Різні гормони і інші фізіологічно-активні сполуки можуть викликати клітинну відповідь через зміни рівня cAMP. Кінцевий ефект буде залежати від типу рецепторів в тканині, типу G-протеїну, комплексу ензимів, на які діє РКА та компартменталізації сигнальних подій – локалізації в певних ділянках клітини. Глюкагон зв'язується з рецепторами на мембрані адипоцитів жирової тканини, активує через  $G_s$ -протеїн аденілатциклазу, РКА і гормоночутливу ліпазу, яка зумовлює мобілізацію триацилгліцеролів і окиснення жирних кислот. Зв'язування соматостатину з рецептором активує  $G_i$ -протеїн, що призводить до зниження концентрації cAMP в клітинах. Подібно діє у жировій тканині простагландин  $E_1$ , який інгібує аденілатциклазу і протидіє ефектам епінефрину та глюкагону. У тканинах, які містять  $\alpha_2$ -адренорецептор, епінефрин діє через  $G_i$ -протеїн і навпаки знижує концентрацію cAMP.

Елементи аденілатциклазного месенджерного каскаду компартменталізовані за допомогою риштувальних протеїнів AKAPs (cAMP-dependent protein Kinase Anchoring Proteins). Наприклад, РКА локалізована в окремих мікродоменах клітини через регуляторні субодиниці, зв'язані із відповідними “якірними” протеїнами. Ідентифіковані AKAPs асоційовані з актиновими філаментами (протеїн езрін), центросомами, мембранами ендоплазматичного ретикулуму, мітохондріями, плазмалемою тощо. Таким чином відбувається фосфорилування ефекторних протеїнів лише в певних мембранних компартментах. Наприклад,  $\beta$ -адренорецептор розташований в одному мембранному рафті, який містить також гетеротримерні G-протеїни, аденілатциклазу, протеїнкіназу А, специфічну протеїнфосфатазу. У скелетних м'язах потенціалкерівані  $Ca^{2+}$ -канали L-типу зв'язані з РКА через AKAP15: фосфорилування РКА підвищує їхню активність; вважають, що до зазначеного комплексу входить також аденілатциклаза. Таке розміщення забезпечує формування високоінтегрованої сигнальної одиниці (концепція сигналосоми). Взаємодія між

риштувальними протеїнами може сприяти залученню до рафта певних сигнальних протеїнів, або навпаки вилучати їх. В одному рафті може відбуватися фосфорилування рецепторної тирозинкінази, а відповідна фосфотирозинфосфатаза може розташовуватись в іншому рафті.

Існують токсини, які перешкоджають нормальній передачі сигналу через гетеротримерні G-протеїни аденілатциклазного каскаду. *Холерний токсин* діє в кишківнику. Він викликає ADP-рибозилування  $G_{\alpha}$ -субодиниці гетеротримерного  $G_s$ -протеїну по залишкам аргініну, внаслідок чого блокується її GTPазна активність. Це призводить до неконтрольованого зростання вмісту cAMP, що зумовлює постійну секрецію  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  та води у порожнину кишківника, дегідратації та втрати електролітів організмом. *Кашлюковий токсин* стимулює ADP-рибозилування  $G_{\alpha}$ -субодиниці  $G_i$ -протеїну по залишкам цистеїну, що зумовлює неможливість заміни GDP на GTP в активному центрі і також постійну активацію аденілатциклази.

**9.1. Фосфоліпаза С. Вторинні месенджери ліпідної природи.** Ряд клітинних сигналів діють через *фосфоліпазу С* (PLC $\beta$ , PLC $\gamma$ ), ізоформи протеїнкінази С (PKC) та вторинні месенджери інозитол-1,4,5-трисфосфат (IP $_3$ ) та діацилгліцерол (DAG), див. рис. 30. Останні відносяться до *вторинних месенджерів ліпідної природи/походження*, є або ліпідами, або продуктами розщеплення ліпідів. До них відносять також PIP $_2$ , PIP $_3$ , IP $_4$  (інозитол-1,3,4,5-тетракісфосфат) і десятків інших сигнальних молекул включно з сфінгозидами, див. нижче. Фосфоліпаза С ( $\beta$ ) є зв'язаним з плазматичною мембраною ферментом, який викликає розщеплення фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфата (PIP $_2$ ) з утворенням IP $_3$  та DAG (рис. 30). Формула IP $_3$  наведена нижче:



При зв'язуванні агоніста залучається гетеротримерний G-протеїн родини  $G_q$  ( $G_{q/11}$ ). Взаємодія з рецептором призводить до конформаційних змін протеїнів і заміщення GDF на GTP в  $\alpha$ -субодиниці гетеротримерного комплексу, дисоціації останньої і активації фосфоліпази C ( $\beta$ ). Водорозчинний  $IP_3$  дифундує до периферійних ділянок ендоплазматичного ретикулула субплазмалемної локалізації, зв'язується з  $IP_3$ -рецептором, який є одночасно  $Ca^{2+}$ -каналом і викликає вивільнення  $Ca^{2+}$  в цитозоль (рис. 30).

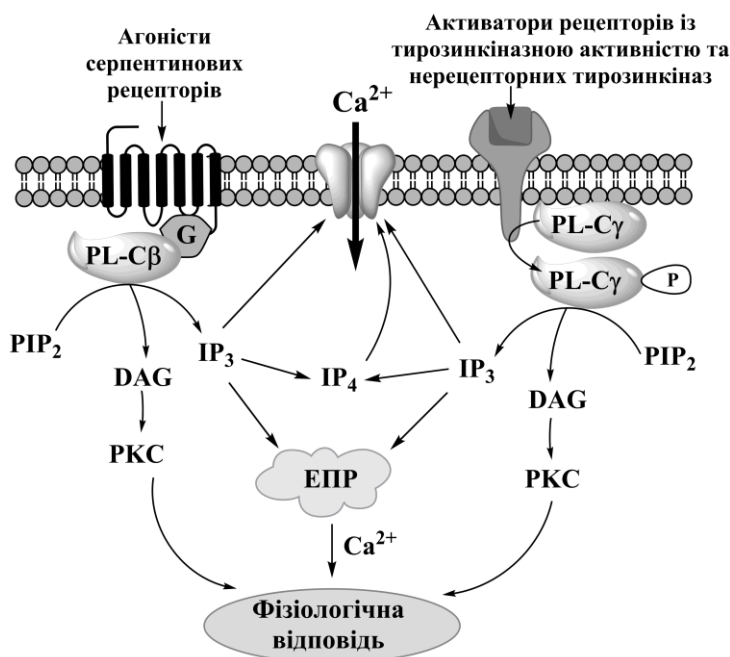


Рис. 30. Трансдукція сигналу за участі різних ізоформ фосфоліпази C. Пояснення в тексті, ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

Іони  $Ca^{2+}$  та гідрофобний DAG активують відповідні чутливі ізоформи РКС. Ізоформи РКС поділяються на 3 групи в залежності від структури регуляторних доменів: сРКС -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (класичні), пРКС -  $\delta$ ,  $\epsilon$  (нові), аРКС, наприклад  $\zeta$  (атипові). Всі ізоформи регулюються шляхом фосфорилування за залишками тирозину тирозинкіназами. Будова  $Ca^{2+}$ , DAG – чутливих ізоформ РКС представлена на схемі (рис. 31).

Синтетичними аналогами DAG є форболові ефіри, які мають потужний і тривалий активуючий вплив на РКС, перешкоджають нормальному росту і поділу клітин, виступають потужними проонкогенними ксенобіотиками.



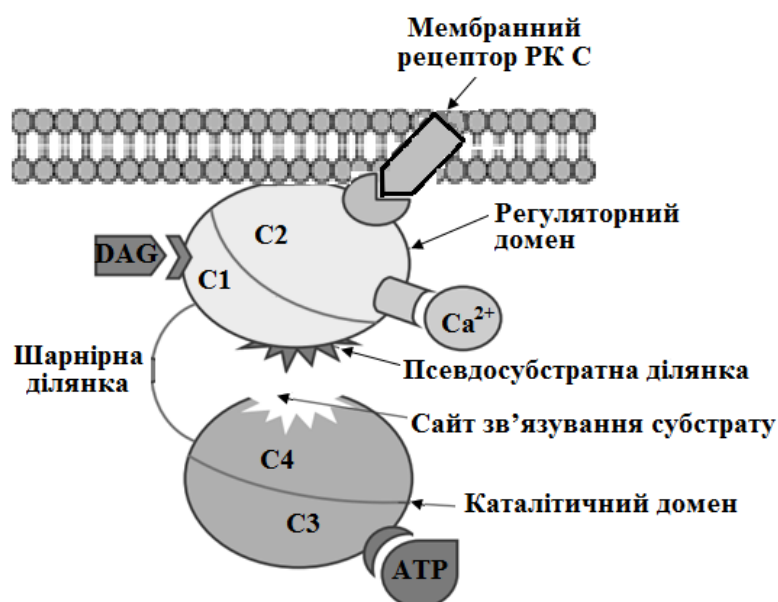
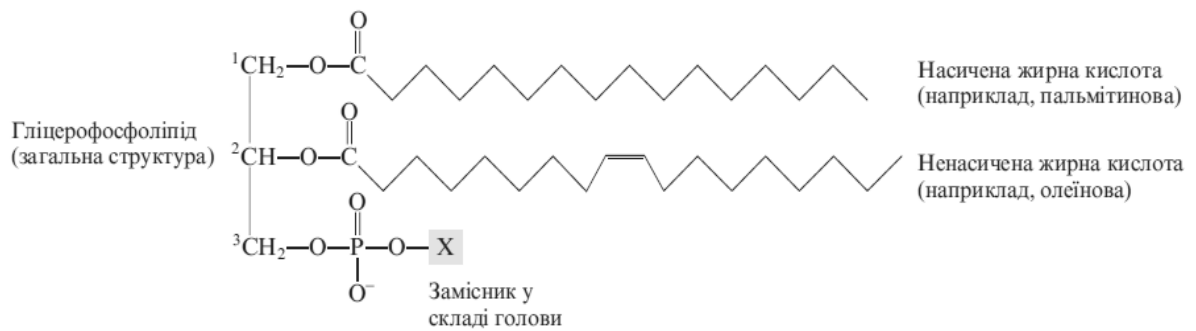


Рис. 31. Структура «класичної» протеїнкінази С

PLC $\gamma$  є розчинним, тобто цитозольним ензимом, який містить у своєму складі SH2-домен і взаємодіє з рецепторами, що мають внутрішню тирозинкіназну активність або з нерепторними тирозинкіназами. Активація PLC $\gamma$  таким шляхом також веде до утворення ліпідних месенджерів і розвитку Ca $^{2+}$ -сигналу (рис. 30). Через суттєвий зв'язок з Ca $^{2+}$ -сигналізацією існує термін Ca $^{2+}$ -поліфосфоінозитидна месенджерна система, з якою пов'язана також сигнальна система оксиду азоту та активних форм кисню.

Через вищеописаний механізм діють різноманітні первинні месенджери: ацетилхолін (M $_1$  та M $_3$  холінорецептори в клітинах гладеньких м'язів), епінефрин ( $\alpha_1$ -адренорецептори), окситоцин, серотонін, АТР, ростові фактори (PDGF, наприклад).

**9.2. Окисний обмін арахідонової кислоти. Ейкозаноїди.** Особливе значення для синтезу ейкозаноїдів мають арахідонова (АК; C $_{20:4}$ ) та ейкозапентаєнова поліненасичені жирні кислоти. Представники останніх входять до складу гліцерофосфоліпідів біля другоговуглецевого атома в молекулі гліцеролу. АК міститься ускладі фосфатидилсерину, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилхоліну і фосфатидилінозитулу:



У макрофагів АК складає до 25% жирних кислот мембран. Ейкозаноїди є сигнальними молекулами, зокрема вторинними месенджерами, і виконують функцію ауто/паракринних регуляторів. Вони впливають на активність фосфоліпази С, аденілатциклази, гуанілатциклази, викликають вивільнення  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума тощо. Ейкозаноїди беруть участь в різних фізіологічних процесах, як-от імунна відповідь, запалення, секреція, скорочення гладеньких м'язів, агрегація тромбоцитів, больові реакції, синтез стероїдних гормонів, секреція шлункового соку тощо. Їхня кількість збільшується також при різних патологічних станах: тривалі процеси запалення, атеросклероз, ішемічна хвороба серця, алергічні реакції тощо.

Важливе фізіологічне значення належить  $\omega$ -3 (омега-3) поліненасиченим жирним кислотам, які містять подвійний зв'язок біля третього атому вуглецю, починаючи від метильного кінця жирної кислоти. До них відносяться  $\alpha$ -ліноленова ( $C_{18:3}$ ), ейкозапентаєнова ( $C_{20:5}$ ) та декозагексаєнова ( $C_{22:6}$ ) кислоти. В організмі тварин попередником поліненасичених жирних кислот є  $\alpha$ -ліноленова, яка шляхом подовження та десатурації перетворюється на інші кислоти, зокрема арахідонову. Остання не належить до  $\omega$ -3 жирних кислот. Тому  $\alpha$ -ліноленова кислота повинна потрапляти до організму з їжею і відноситься до незамінних жирних кислот. Омега-3 жирні кислоти містяться у значній кількості в морепродуктах, що робить останні корисними для функціонування серцево-судинної системи.

Прямим шляхом вивільнення АК з мембранних фосфоліпідів є активація *фосфоліпази*  $A_2$ , яка здійснюється при ліганд-рецепторній взаємодії за участі гетеротримерних G-протеїнів; при цьому утворюється вільна АК та лі-

зофосфоліпиди. Другий шлях реалується за участі фосфоліпази C, в мембрані утворюється DAG, який метаболізується DAG-ліпазою з вивільненням АК. DAG залучає до сигнального шляху чутливі ізоформи PKC, які фосфорилують і активують фосфоліпазу A<sub>2</sub>. За дії епідермального фактору росту відповідна рецепторна тирозинкіназа також фосфорилує і стимулює фосфоліпазу A<sub>2</sub>. DAG може фосфорилуватися DAG кіназою з утворенням фосфатидної кислоти, яка метаболізується за дії фосфоліпази A<sub>2</sub>. В різних клітинах переважає той чи інший шлях утворення АК.

Ізоформи фосфоліпази A<sub>2</sub> є Ca<sup>2+</sup>-залежними ензимами, які поділяються на позаклітинні і внутрішньоклітинні. Секретуємі фосфоліпази A<sub>2</sub> I-III групи мають невелику масу (13-15 кДа), містять значну кількість дисульфідних зв'язків, активуються мілімолярними концентраціями позаклітинного Ca<sup>2+</sup>, який є необхідним для прояву каталітичної активності, і стійкі до зовнішніх впливів, а також малоспецифічні до фосфоліпідів. Їх знайдено в отрутах змій, ящірок, комах, а також в тромбоцитах, підшлунковій залозі, печінці тощо. Ідентифіковані цитозольні високомолекулярні фосфоліпази A<sub>2</sub> (IV група), які мають масу кілька десятків кДа, не містять дисульфідних зв'язків та активуються іонами Ca в субмікромолярній концентрації, які необхідні для переміщення і зв'язування з плазмалемою; вони містять на N-кінці Ca<sup>2+</sup>-зв'язувальний домен. В макрофагах підвищують активність фосфоліпази A<sub>2</sub> фактори, які стимулюють фагоцитоз, ендотоксини, бактеріальні ліпополісахариди, імунні комплекси, фактори комплемента, а також Ca<sup>2+</sup>-іонофор A-23187, форболові ефіри тощо. Інгібіторами фосфоліпази A<sub>2</sub> є протизапальні глюкокортикоїди.

АК підлягає окисному метаболізму з утворенням ейкозаноїдів – простагландинів, тромбоксанів, лейкотрієнів та гідроксикислот (рис. 32).

В цьому процесі беруть участь мембранозв'язані циклооксигенази, цитозольні ліпоксигенази та епоксигенази (цитохром p-450 подібні ензими). Циклооксигенази є гем-вмісними мембранозв'язаними ензимами, зокрема у фібробластах вони локалізовані в мембранах ендоплазматичного ретикулума та ядра.

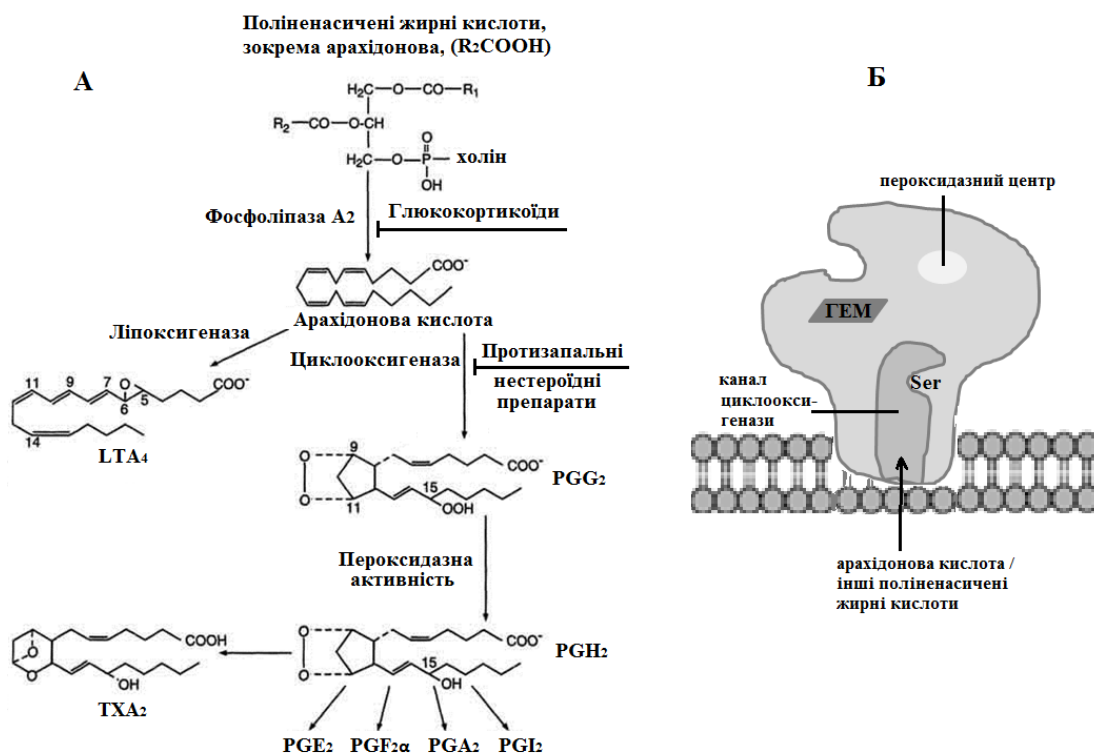


Рис. 32. Утворення ейкозаноїдів: А – схема окисного обміну арахідонової кислоти,  $\text{LTA}_4$  – лейкотрієн  $A_4$ ,  $\text{TXA}_2$  – тромбоксан  $A_2$ ,  $\text{PGG}_2$ ,  $\text{PGH}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGA}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  – простагландини  $G_2$ ,  $H_2$ ,  $E_2$ ,  $F_{2\alpha}$ ,  $A_2$ ,  $I_2$ ; Б – структура простагландинсинтазного комплексу, Ser – амінокислота серин в активному центрі циклооксигенази

Циклооксигеназа разом з пероксидазним центром утворює простагландинсинтазний комплекс. Внаслідок його функціонування утворюється простагландин  $\text{H}_2$ , який є попередником інших ейкозаноїдів. Після включення кисню в молекулу АК в положеннях С-9,11 та С-15 утворюються нестабільні проміжні продукти – ендопероксиди, в подальшому синтезуються простагландини і тромбоксани як зазначено на схемі. В тромбоцитах основним продуктом циклооксигенази є тромбоксан  $A_2$ , який стимулює їхню агрегацію. Діючи на гладенькі м'язи він викликає констрикцію судин та бронхів. В ендотелії утворюється простагландин  $I_2$  (простациклін), який інгібує агрегацію тромбоцитів і викликає релаксацію гладеньких м'язів. Як сигнальна молекула він діє через аденілатциклазний месенджерний каскад. Потужним стимулятором скорочення гладенького м'язу матки є простагландин  $F_{2\alpha}$ .

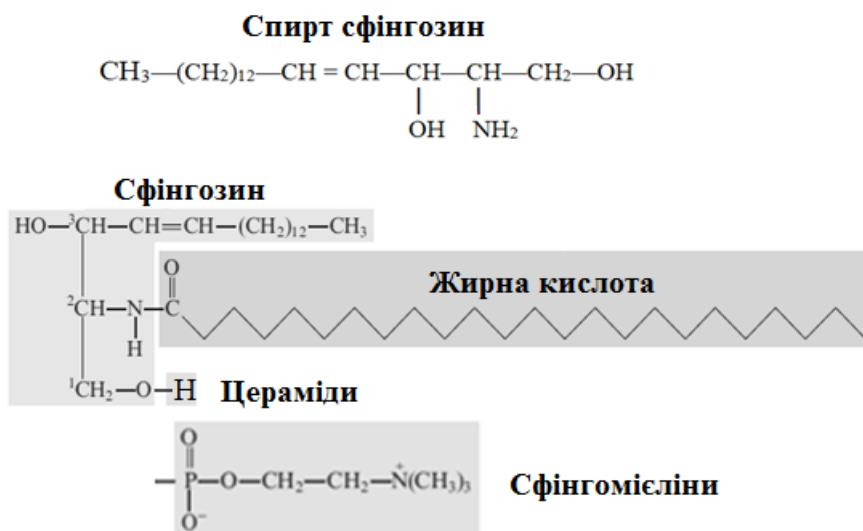
Інгібіторами циклооксигеназ є нестероїдні протизапальні препарати: аспірин, анальгін, індометацин, ібупрофен, що лежить в основі їхнього знеболювального та жарознижувального ефектів. Аспірин (ацетилсаліцилова кислота) ковалентно модифікує залишок серину в активному центрі шляхом ацетилювання, блокуючи приєднання субстрату.

Ліпоксигенази є залізо-вмісними цитоплазматичними ензимами, які каталізують включення однієї молекули кисню в АК з утворенням спочатку гідропероксиподних, а потім і лейкотрієнів. Важливе значення має 5-ліпоксигеназа. Лейкотрієни є медіаторами алергійних і запальних процесів, в значній кількості синтезуються в нейтрофілах, еозинофілах, моноцитах, макрофагах тощо. Фенольні сполуки і, зокрема, біофлаваноїди блокують їхню активність.

Епоксигеназний шлях окиснення АК пов'язаний з цитохромами родини р-450, що локалізовані в мембранах ендоплазматичного ретикулума та мітохондрій. Це неспецифічні монооксигенази, які відповідають за метаболізм гідрофобних сполук; епоксигенази приєднують атом кисню по подвійному зв'язку в ненасичених жирних кислотах з утворенням епоксидів. В ендоплазматичному ретикулумі цитохроми заякорені в мембрані за допомогою 1-2 трансмембранних сегментів, на цитозольному боці розташована гемова простетична група.

## РОЗДІЛ 10. СИГНАЛЬНА СИСТЕМА СФІНГОЛІПІДІВ

В основі структури сфінголіпідів лежить спирт сфінгозин:



Сфінгомієліни (N-ацил-сфінгозин-1-фосфохоліни) входять до складу клітинних мембран, зокрема складають мієлінову оболонку нервів, і включають спирт сфінгозин, жирну кислоту, фосфорну кислоту та холін. До похідних сфінгомієлінів належать метаболічно поєднані сполуки – ліпідні месенджери, такі як сфінгозин, сфінгозин-1-фосфат, цераміди та церамід-1-фосфат. Ці сполуки беруть участь в сигнальних шляхах похідних сфінгомієліну. Вони залучені у регуляцію фундаментальних біологічних процесів проліферації, росту, диференціації, апоптозу.

Цераміди утворюються за дії на сфінгомієлін сфінгомієлінази, при цьому від сфінгомієліну відщеплюється фосфохоліновий залишок. Існують і інші шляхи генерації церамідів. Церамідкіназа перетворює церамід в церамід-1-фосфат. Під впливом церамідаз з церамідів відщеплюється ацильний залишок з утворенням сфінгозину, який підлягає дії сфінгозинкінази.

*Цераміди* володіють антипроліферативними та проапоптозними властивостями. Їхнім утворенням пояснюється, в ряді випадків, терапевтична дія опромінення та хіміотерапії у онкохворих. Водночас *церамід-1-фосфат* має антиапоптозну дію та виступає медіатором запалення. Зокрема церамід-1-фосфат активує цитозольну фосфоліпазу A<sub>2</sub> і таким чином стимулює синтез

ейкозаноїдів. Аналогічним протилежним впливом на апоптоз володіють сфінгозин та сфінгозин-1-фосфат.

Стимулюють продукцію керамідів канабіоїди, зокрема ендогенний анандамін, вітамін Д<sub>3</sub> в активній формі (1,25-дигідроксикальциферол), TNF- $\alpha$ , інтерферони, ендотоксини, а також іонізуюче опромінення та тепловий шок. За дії керамідів активуються специфічні протеїнкінази (CAPK, Ceramide Activated Protein Kinase) та протеїнфосфатази (PP1, PP2A), а також РКС. В залежності від типу клітин та механізмів генерації кераміду реалізується декілька варіантів трансдукції сигналу. Більш поширеним є проапоптозний шлях пов'язаний з активацією JNKs (c-Jun N-terminal Kinases). В цьому ж напрямку буде діяти і залучення катепсину D під впливом керамідів. З іншого боку, можлива реалізація ефектів керамідів через сигнальні шляхи CAPK-Raf1-ERK та РКС-NF $\kappa$ B. Цераміди мають виражений вплив на мітохондрії, спричинюючи мітохондрійну дисфункцію та ініціюючи мітохондрій-залежний апоптоз. Зокрема вони викликають деполяризацію внутрішньої мітохондрійної мембрани, посилюють генерацію активних форм кисню та стимулюють вивільнення з мітохондрій проапоптогенних факторів.

Напротивагу кераміду, керамід-1-фосфат володіє мітогенними властивостями. Ця біологічна активність пов'язана із посиленням передачі сигналу за участі NF- $\kappa$ B, ERK, PI3K/Akt тощо. Також інгібуються вище зазначені фосфатази PP1 та PP2, які мають проапоптичні ефекти і активуються керамідами. Церамід-1-фосфат може виконувати функції і первинного месенджера. Зв'язуючись з рецептором на плазматичній мембрані, він таким чином стимулює хемотаксис.

Запуск програми клітинної загибелі за дії *сфінгозину* пов'язаний із таким впливом на сигнальні шляхи як активація JNK та p38 MAP-кіназних каскадів з одного боку, а з іншого – інгібування MAP-кіназного каскаду ERK, РКВ та РКС. Така спрямованість впливу закономірно призведе до зниження проліферативної активності, життєздатності клітин та апоптозу.

Поряд з цим дія *сфінгозин-1-фосфату* має протилежний характер. Він є фактором посилення проліферативної активності і запобігає проапоптичній дії керамідів та сфінгозину. Ця сигнальна молекула може діяти як первинний месенджер, зв'язуючись із рецепторами на плазматичній мембрані і залучаючи у процес сигналювання гетеротримерні G-протеїни, так і як вторинний месенджер. Як антиапоптозний чинник сфінгозин-1-фосфат викликає активацію сигнальних каскадів пов'язаних з ERK, PKB, транскрипційними факторами NF-κB, AP1, натомість пригнічується сигнальний шлях JNK. Також має місце протекторна дія щодо мітохондрій та зниження експресії ряду проапоптичних протеїнів. Сигнальна активність сфінгозин-1-фосфату включає також модуляцію аденілатциклазного месенджерного каскаду, активацію фосфоліпази C та посилення IP<sub>3</sub>-залежного вивільнення Ca<sup>2+</sup> з ендоплазматичного ретикулуму.

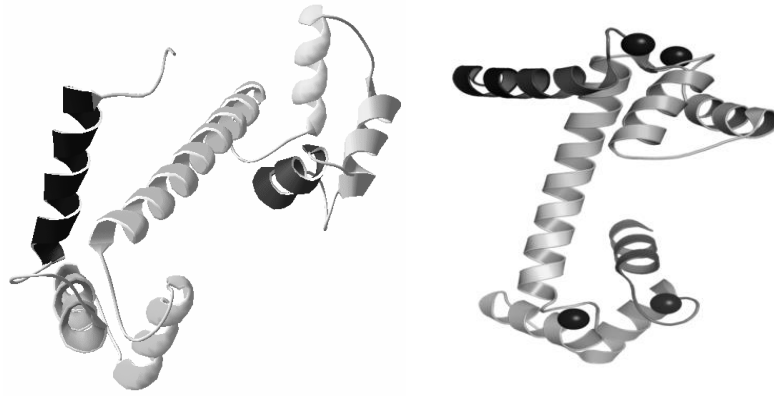
Ключовими ензимами, які регулюють рівні кераміду, сфінгозину та сфінгозин-1-фосфату в клітині є сфінгозинкінази (описані дві ізоформи). До активаторів сфінгозинкінази відносяться вітамін D<sub>3</sub>, естрогени, численні гормони та ростові фактори. Інгібування сфінгозинкінази має проапоптичну дію і може бути використано з метою хіміотерапії онкохворих. Водночас чинники, які посилюють синтез сфінгозин-1-фосфату знижують рівні керамідів і сфінгозину, отже сприяють виживанню клітин, проліферації, в тому числі пухлинних клітин.

## РОЗДІЛ 11. ТРАНСДУКЦІЯ Ca<sup>2+</sup> СИГНАЛУ

Молекулярні механізми трансдукції Ca<sup>2+</sup> сигналу включають в себе канали, помпи, обмінники, спеціалізовані Ca<sup>2+</sup>-зв'язувальні протеїни та відповідні ефекторні білки. Підвищення концентрації внутрішньоклітинного іонізованого Ca<sup>2+</sup> послуговує сигналом до активації цитозольного метаболічного апарату та зміни експресії генів. Для того, щоб кальцій ініціював фізіологічний відповідь, він, в ряді випадків, повинен зв'язатися з внутрішньоклітинними протеїновими рецепторами, які опосередковують його функціональну



активність. Одним з таких рецепторів як прокаріотичних, так і еукаріотичних клітин є *кальмодулін*. Із використанням імуноцитохімічного методу було показано, що кальмодулін знаходиться як в цитозолі, так і в мембранозв'язаному вигляді. Кальмодулін відноситься до висококонсервативних протеїнів, його структура практично однакова на усіх рівнях організації живого. Протеїн має молекулярну масу приблизно 17 кДа і ізоелектричну точку 4,1-5,1, яка обумовлена високим вмістом амінодикарбонових кислот. Кількість  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних ділянок дорівнює чотирьом, олігомерної структури молекула не утворює. У всіх досліджених кальмодулінів відсутній триптофан, в ряді випадків наявний лише один залишок цистеїну, тобто немає внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків, в деяких кальмодулінах присутня мінорна амінокислота триметиллізин, N-кінець кальмодулінів ацетильований. Висока термостабільність кальмодуліна використовувалась в процесі його виділення і очищення. Зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до експресії на поверхні молекули значних гідрофобних ділянок, які мають важливу роль при взаємодії протеїну з ефекторними молекулами. Остання властивість раніше широко застосовувалась при виділенні кальмодуліна у чистому вигляді на колонці з фенілсефарозою. Кальмодулін відноситься до класу  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних протеїнів, які мають структуру типу "EF-hand" з загальним принципом організації:  $\alpha$ -спіраль-петля- $\alpha$ -спіраль (рис. 33). Протеїни родини «EF-hand» мають спеціально побудовані центри зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$ . Центральний елемент такого центру –  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальна петля, яка складається з 12 амінокислотних залишків, частина яких містить у бічних радикалах карбоксильні групи.  $\text{Ca}^{2+}$  розташовується в центрі октаедра і стабілізується шістьма лігандами, які розташовані в його верхівках. З обох боків від  $\text{Ca}^{2+}$  зв'язувальної петлі розташовані  $\alpha$ -спіральні ділянки. При аналізі кристалічної структури ці дві спіралі подібні вказівному і великому пальцям правої руки.



*Рис. 33. Структура кальмодуліна і зміни його конформації при зв'язуванні  $\text{Ca}^{2+}$ , чорними кульками зображені іони кальцію*

Більш простим  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальним протеїном є кальбіндин, який експресується в стінці кишківника за участі вітаміну  $\text{D}_3$  і сприяє всмоктуванню  $\text{Ca}^{2+}$ . Його молекулярна маса складає біля 9 кДа, дві  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні петлі роташовані антипаралельно, а  $\alpha$ -спіралі кожної петлі взаємоперпендикулярно як розсунуті пальці руки. Зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  не супроводжується суттєвими змінами конформації. Кальмодулін і тропонін С мають вже чотири  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні центри, що згруповані попарно у вигляді гантелі, між двома шарами якої розташована “ручка” – довга  $\alpha$ -спіраль (рис. 34). При зв'язуванні  $\text{Ca}^{2+}$  суттєво змінюється конформація протеїну: в N-кінцевій частині паралельні “ручці”  $\alpha$ -спіралі стають їй перпендикулярні, а зв'язуюча їх петля відходить убік.

В структурі багатьох протеїнів-мішеней кальмодуліну присутня  $\alpha$ -спіральна ділянка, циліндрична поверхня якої вкрита позитивно зарядженими амінокислотними радикалами лізину та аргініну, а також гідрофобними залишками амінокислот. При зв'язуванні з  $\text{Ca}^{2+}$  конформаційні зміни призводять до експонування гідрофобних поверхонь біля N- та C-кінцевих глобулярних ділянок, центральна  $\alpha$ -спіраль кальмодуліну вигинається (плавиться) і обгортає амфіфільну спіраль субстрату, причому негативно заряджені амінокислотні залишки центральної спіралі кальмодуліну взаємодіють з позитивно зарядженими радикалами субстрату (рис. 34).

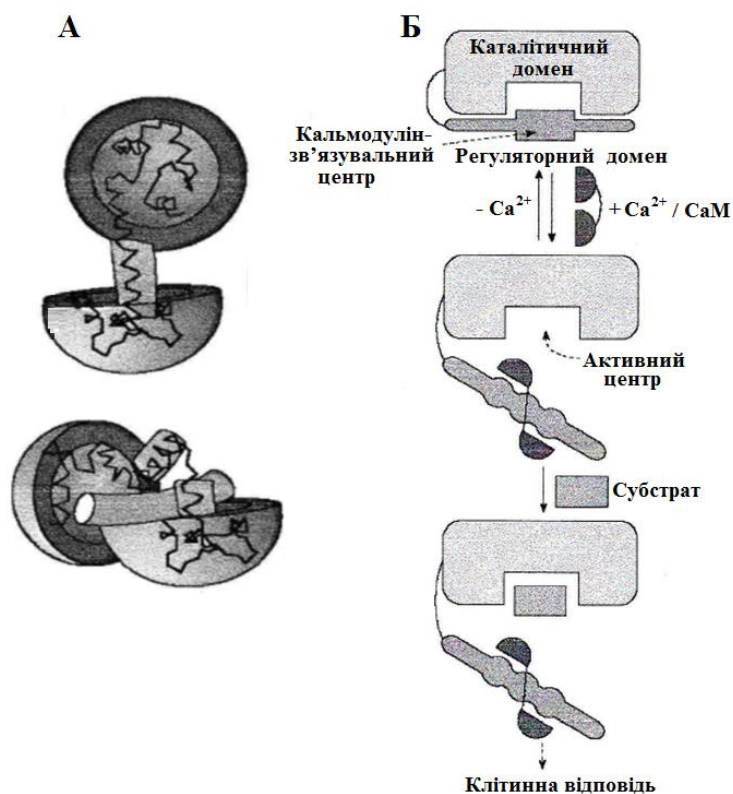


Рис. 34. Структура кальмодуліна і  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежних протеїнкіназ: А – характерна «гантелеподібна» будова кальмодуліна, зображене обгортання  $\alpha$ -спіральної ділянки кальмодуліна навколо циліндричної поверхні субстрату; Б – механізм активації комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін відповідної протеїнкінази, CaM - кальмодулін

Кальмодулін-залежні ензими мають у своєму складі каталітичний домен і зв'язаний з ним регуляторний домен (рис. 34). Останній містить псевдосубстратну ділянку, яка взаємодіє з активним центром каталітичного домену і перешкоджає доступу субстрату. При зв'язуванні комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін з регуляторним доменом він залишає каталітичний центр, що дає змогу субстрату надходити до нього.

Комплексоутворення  $\text{Ca}^{2+}$  з кальмодуліном кооперативне, тому зв'язування одного іону підвищує спорідненість до сусідньої ділянки і робить протеїн більш чутливим до малих змін  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ключова роль кальмодуліну як внутрішньоклітинного рецептора кальцію полягає в тому, що комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін здатний активувати такі ключові ензими клітини, як аденілат- та гуанілатциклазу, фосфодіестеразу

циклічних нуклеотидів, регуляторні ензими глікогенолізу і глюконеогенезу, ключові ензими циклу Кребса, конститутивні NO-синтази, фосфоліпази A<sub>2</sub> і ряд інших. Слід відзначити активацію кальмодуліном ряду кіназ, які шляхом фосфорилування регулюють каналну провідність плазматичної мембрани і енергозалежний транспорт Ca<sup>2+</sup> в субклітинних структурах. Для гладенького м'язу роль кальмодуліну, крім того, обумовлюється активацією Ca<sup>2+</sup>-кальмодуліном кінази легких ланцюгів міозину, які фосфорилують пару регуляторних ланцюгів міозину, що ініціює взаємодію важких ланцюгів з актином.

Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін-залежні протеїнкінази класифікують на 2 класи: спеціалізовані, наприклад вищезгадано кіназа легких ланцюгів міозину, та багатofункційні, які регулюють секрецію нейромедіаторів, активність транскрипційних факторів, метаболізм глікогену тощо. Біля 2 % протеїнів головного мозку являють собою Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін-залежна протеїнкіназа II типу (Ca<sup>2+</sup>/CaM-кіназу II). Її активність пов'язують з процесами нейропластичності, які лежать в основі процесів запам'ятовування і навчання. Ca<sup>2+</sup>/CaM-кіназа II складається із N-кінцевого каталітичного домену, регуляторного, який зв'язує кальмодулін і підлягає регуляторному аутофосфорилуванню (Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін залежному і Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін незалежному), а також містить псевдосубстратну аутоінгібіторну ділянку, та C-термінального, асоціативного. Холофермент складається із 6 мономерів, пов'язаних через асоціативні домени (рис. 35).

Антипсихотики фенотіазини (трифлуоперазин, хлорпромазин) є інгібіторами кальмодуліну. Кальмодулін, який зв'язав Ca<sup>2+</sup> і фенотіазин, не здатний активувати протеїни-мішені. Спорідненість фенотіазинів до кальмодуліну корелює із їхньою нейрорептичною здатністю.

Молекула кальмодуліна може підлягати посттрансляційній модифікації, зокрема фосфорилуванню, ацетилюванню, метилюванню, частковому протеолізу, що здатне впливати на активність цього протеїну.

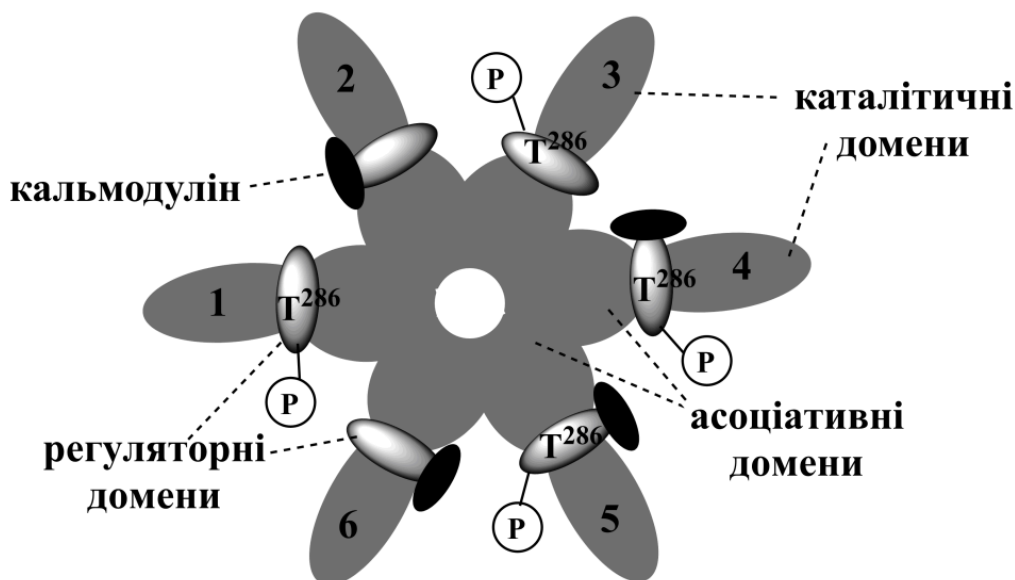


Рис. 35. Структура  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежної протеїнкінази II, вказані залишки треоніну (T), які підлягають регуляторному фосфорилуванню

Активація клітин, зокрема м'язових, супроводжується виникненням  $\text{Ca}^{2+}$ -транзєнтів – короткотривалих генералізованих підвищень концентрації катіона в цитоплазмі (міоплазмі). Наступне зниження концентрації досягається енергозалежними процесами та зв'язуванням з буферами. Серед енергозалежних процесів особливе значення відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи, локалізовані на рівні плазматичної мембрани (PMCA) та сарко(ендо)плазматичного ретикулума (SERCA). Нагадаємо, що в міоцитах ендоплазматичний ретикулум має назву саркоплазматичний. У сучасній спеціальній літературі доволі поширеним є термін сарко(ендо)плазматичний ретикулум для різних типів клітин. В препаратах гладеньком'язових клітин великих судин після  $\text{Ca}^{2+}$ -навантаження парціальний внесок PMCA у наступне зниження концентрації катіона сягає 50%, інші 50% припадають на роботу SERCA та  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника плазматичної мембрани. Інші дослідники вважають, що 60-80%  $\text{Ca}^{2+}$  після транзєнту в клітинах гладенького м'язу секвеструється SERCA, оскільки за інгібування PMCA спостерігається релаксація інтактних смужок аорти щурів. Ці результати свідчать про важливу роль сарко(ендо)плазматичного ретикулума в механізмах зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі. Для забезпечення життєво необхідних функцій збільшення

концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  проходить швидко і в необхідному ступені, що досягається його звільненням з сарко(ендо)плазматичного ретикулу:  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення через канали р'янодинового рецептора та  $\text{IP}_3$ -залежне.

### 11.1. Структурно-функціональні властивості PMCA та SERCA.

PMCA ( $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани) належить до pomp Р-типу, в процесі функціонування яких утворюється проміжний фосфорильований по залишку аспартату інтермедіат. Топологію помпи розроблено на основі відомої відповідної структури сарко(ендо)плазматичного ретикулу. Вона містить 10 трансмембранних спіралізованих ділянок та 3 цитоплазматичні петлі (А-, N- та Р), а також цитоплазматичні С- та N-термінальні кінці. Біля 80% помпи розміщено в цитоплазмі. Схематичне зображення PMCA наведено на рис. 36.

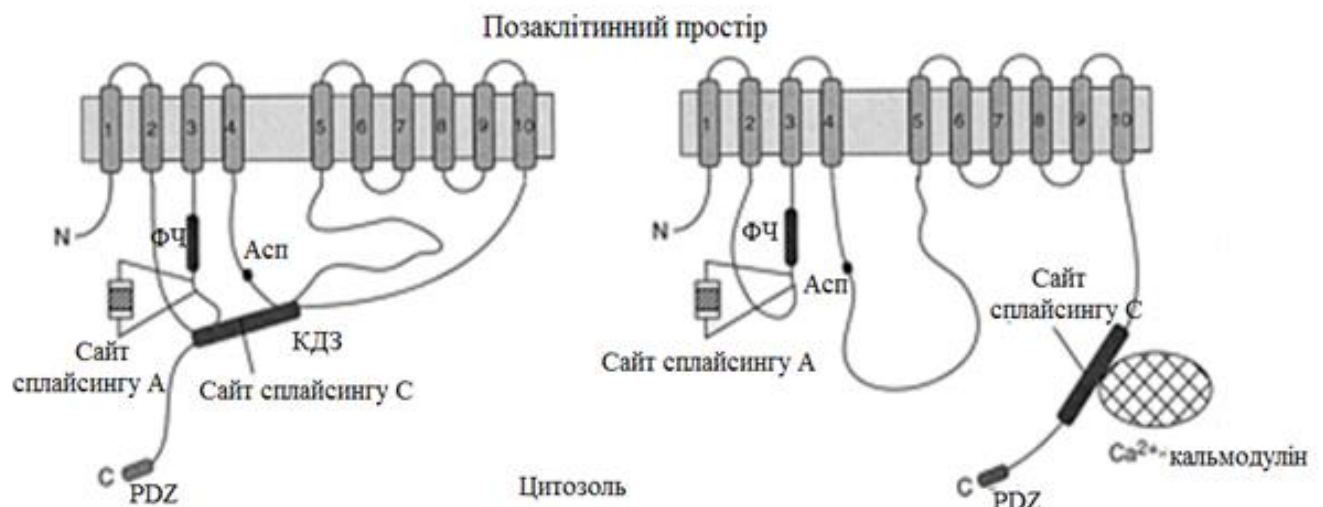


Рис. 36. Будова PMCA у стані функціонального спокою (ліворуч) та за активації  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодуліном (праворуч), ФЧ – сайт активації кислими фосфоліпідами мембрани, КДЗ – кальмодулін-зв'язувальний домен, PDZ – PDZ-домен, Асп – залишок аспартату

А-петля утворена внутрішньоклітинною ділянкою між сегментами 2 та 3, більшість структури представлена  $\beta$ -складчастим шаром. Ця петля бере участь у спряженні гідролізу АТР та транслокації  $\text{Ca}^{2+}$  та містить ділянку, яка зв'язує регуляторні кислі фосфоліпіди. N-петля розташована в цитозолі між

4 і 5 сегментами, містить залишок аспартату, який фосфорилується. N-петля має підвищену рухливість, що забезпечує тісну взаємодію між нею і A-петлею в процесі гідроліза АТФ ( $Mg\text{-ATP}^{2-}$ ) й транспорту  $Ca^{2+}$ . Ці дві структури є характерними для всіх АТФаз Р-типу. Особливістю будови РМСА є Р-петля, яка являє собою видовжений С-термінальний домен, який в процесі каталізу набуває петлеподібної структури, що містить як  $\beta$ -складчастий шар, так і  $\alpha$ -спіралі. Він включає ділянку регуляторного зв'язування з  $Ca^{2+}$ -кальмодуліном та PDZ-домен - протеїновий модуль, що забезпечує взаємодію з нейрональною NO-синтазою (nNOS).

У конформації  $E_1$  РМСА має високий афінітет до  $Ca^{2+}$  з цитозольного боку (біля  $10^{-7}$  М). Приєднання  $Ca^{2+}$  та АТФ до конформера  $E_1$  і фосфорилування аспартату призводить до структурних змін і переходу у фосфорильований  $E_2$ -конформер,  $Ca^{2+}$  вивільнюється у позаклітинне середовище, аспартат дефосфорилується. Фосфорильована форма помпи має низьку афінність до  $Ca^{2+}$  (біля  $10^{-3}$  М), тому катіон вивільняється у позаклітинне середовище, а  $E_2$  переходить в  $E_1$ .  $E_1\text{-P}$  є високоенергетичним фосфорильованим інтермедіатом,  $E_2\text{-P}$  є низькоенергетичним фосфорильованим інтермедіатом. Транспорт  $Ca^{2+}$  супроводжується коттранспортом  $H^+$ .

Селективні інгібітори РМСА наразі невідомі, хоча пропонується застосовувати з цією метою пептиди калоксини; перспективним є також використання макроциклическої сполуки С-90, яка належить до калікс[4]аренів.

У випадку *SERCA-помпи* ( $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФази сарко(ендо)плазматичного ретикулула) каталітичний цикл починається зі зв'язування  $Ca^{2+}$  з цитозольної частини з подальшим фосфорилуванням  $E_1$  і утворенням високоенергетичного інтермедіату, енергія якого призводить до суттєвих конформаційних змін з утворенням низькоафінного і низькоенергетичного  $E_2$  та транспорту  $Ca^{2+}$  в люмен. Цикл закінчується гідролізом фосфатного залишку, коттранспортом  $H^+$  та переходом в  $E_1$  стан. Основним регулятором *SERCA* є *фосфоламбан* – невеликий протеїн з 52 амінокислотних залишків, який перебуває у динамічній рівновазі між моно- і пентамерною формами, причому саме мо-

номер зв'язується із SERCA. Дефосфорильований фосфоламбан взаємодіє із цитоплазматичним і трансмембранним доменами SERCA, знижуючи  $V_{\max}$  і уявну спорідненість до  $\text{Ca}^{2+}$ . Фосфорилування фосфоламбана призводить до дисоціації від SERCA і активації останньої, що може відбуватися шляхом cAMP, cGMP- (у гладенькому м'язі) або  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежного (у скелетному м'язі, кардіоміоцитах) фосфорилування.

Специфічними інгібіторами SERCA є алкалоїд рослинного походження тапсигаргін та циклопіазонієва кислота. Ці сполуки є напрочуд важливими інструментами в дослідженнях процесів  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналювання та регуляції  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза, оскільки не впливають на інші  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи.

На фоні інтенсивного поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  сарко(ендо)плазматичним ретикуломом необхідно, щоб іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в люмені була оптимальна кількість, оскільки при збільшенні її знижується активність SERCA. Це передбачає існування  $\text{Ca}^{2+}$ -буферів, але катіон повинен легко дисоціювати від них під час вивільнення з ретикулума. До таких протеїнів належать *кальсеквістрин* та *кальретикулін*, які мають високу ємність, зв'язуючи 25-50 іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на одну молекулу протеїну та низьку афінність (1-4 мМ) до  $\text{Ca}^{2+}$ . Периферійний сарко(ендо)плазматичний ретикулум збагачений кальсеквістрином біля  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Кальретикулін розташований більш рівномірно, хоча обидва протеїни мають гомологію (крос-реактивність з антитілами).

**11.2. Властивості пасивного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  з сарко(ендо)плазматичного ретикулума.  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ріанодинового рецептора.** Ці структури особливо важливі для електрозбудливих тканин. На початкових етапах досліджень здійснювалось інтенсивне вивчення їх фармакології із застосуванням фрагментів сарко(ендо)плазматичного ретикулума, які отримували із застосуванням методів центрифугування. Виявилось, що транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  крізь ці канали активується кофеїном, аденіловими нуклеотидами,  $\text{Ca}^{2+}$  у мікромольних концентраціях, поліамінами, жирними кислотами, деякими локальними анестетиками. Водночас рутенієвий червоний,  $\text{Mg}^{2+}$  та  $\text{Ca}^{2+}$  в мі-



лімолярних концентраціях ефективно його пригнічували. В середині 80-х років минулого сторіччя було знайдено, що алкалоїд рослинної природи ріанодин з високою спорідненістю зв'язується з ріанодиновим рецептором, що дало можливість застосувати для його виділення афінну хроматографію. Ріанодиновий рецептор був одержаний в очищеному вигляді за солубілізації нейонним детергентом в середовищі з високою іонною силою і наступною афінною хроматографією або диференційним центрифугуванням у градієнті густини цукрози. При вбудовуванні у фосфоліпідні бішари була підтверджена його фармакологія і досліджені електрофізіологічні властивості. З використанням методів молекулярної біології і генної інженерії було здійснено трансфекцію відповідних генів зі скелетного м'яза в ооцити китайського хом'яка.

Дані електронної мікроскопії свідчать, що канал має 4-пелюсткову гомотетрамерну будову зі стороною 27 нм, з люменального боку розташована базальна платформа, що оточена периферійними долями. Від базальної платформи бере початок центральний канал, від якого відходять чотири радіальні канали. Вважають, що через базальну платформу  $\text{Ca}^{2+}$  потрапляє в центральний канал і через радіальні канали в цитоплазму. За відсутності інших регуляторів, крива залежності інтенсивності вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  від концентрації екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  має дзвоноподібний характер з максимумом в мікромольному діапазоні, що передбачає існування двох центрів зв'язування катіону з високою (активаторних) та низькою (інгібіторних) спорідненістю.

Із підвищенням чутливості  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ріанодинового рецептора до екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  пов'язана злаякісна гіпертермія, яка спостерігається в латентній формі у кожного з 15000 дітей, але не завжди проявляється у фенотипі. В основі цієї патології лежить заміна лише однієї амінокислоти в скелетній ізоформі рецептора, що має наслідком активацію вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  екзогенним катіоном у низьких субмікромольних концентраціях. При цьому спостерігається масований викид  $\text{Ca}^{2+}$  з сарко(ендо)плазматичного ретикулула при застосуванні загальноживаних локальних анестетиків і зростання теплопродукції в скелетному м'язі. Має місце м'язова ригідність, частий пульс,

підвищення температури до 43 °С. Аномальне зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до гіперактивації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної кінази фосфорилази глікогена, наслідком чого є посилений розпад глікогену та глюкози, зростання теплопродукції та накопичення лактату, що призводить до ацидозу. У однієї з м'ясних порід свиней внаслідок вродженої гіперчутливості ріанодинового рецептора до екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігається швидка загибель від стресу при забої.

*$\text{IP}_3$  – рецептори.* У більшості клітин ссавців напівмаксимальна концентрація  $\text{IP}_3$ , яка вивільнює  $\text{Ca}^{2+}$  з сарко(ендо)плазматичного ретикулума, знаходиться в межах 0,1-2 мкМ. Канальну природу  $\text{IP}_3$ -рецепторів підтверджує швидка кінетика вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  та слабка залежність транспорту від температури: в пермеабілізованих клітинах спостерігається при 0-4 °С.  $\text{IP}_3$ -чутливі канали вдалося ідентифікувати вбудовуючи у ліпідні бішари фрагменти сарко(ендо)плазматичного ретикулума гладеньком'язевих клітин аорти. Вони виявилися потенціал-нечутливими, не активувались кофеїном, були резистентними до рутенієвого червоного, але блокувались гепарином та іншими полісахаридами, що мали в структурі  $\text{IP}_3$ -подібні фрагменти. Проникність  $\text{IP}_3$ -чутливих каналів на порядок нижча, ніж кофеїн-чутливих. Структурно вони є гомотетрамерами, дія  $\text{IP}_3$  на викид  $\text{Ca}^{2+}$  є висококооперативною. Транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  залежний від екзогенного катіону. Активується  $\text{Ca}^{2+}$  за низьких і інгібується за високих концентрацій.

Використання агентів, які спустошують  $\text{Ca}^{2+}$ -пул сарко(ендо)плазматичного ретикулума або штучно, шляхом інгібування SERCA тапсигаргіном чи циклопіазонієвою кислотою, або стимуляцією пасивного транспорту катіону з ретикулума через збільшення цитозольного рівня  $\text{IP}_3$ , призводить до зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі. Було доведено, що це зростання обумовлене транспортом  $\text{Ca}^{2+}$  з позаклітинного середовища через так звані SOCCs-канали (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels), які, як припускають, утворені протеїнами родини TRP (Transient Receptor Potential). Втім, є докази того, що пул-керований транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  обумовлений функціонуванням двох

протеїнових структур STIM 1 (Stromal Interaction Molecule 1) та Orai 1 або CRAC (Calcium Release-Activated calcium Channel protein 1). Перша з них є  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальним протеїном, що виступає сенсором спустошення сарко(ендо)ретикулярного люмену, а друга формує власне каналну структуру. Вірогідно, між обома структурами існує морфологічний зв'язок. TRP включає шість трансмембранних сегментів. Orai організований у чотири трансмембранні сегменти.

Існує складний морфофункціональний зв'язок між позаклітинним пулом  $\text{Ca}^{2+}$ , його сарко(ендо)плазматичним і мітохондрійним депо та концентрацією катіона в цитозолі. Має місце наявність прямих і зворотних, негативних та позитивних взаємодій між системами пасивного і енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в субклітинних мембранних структурах. Внаслідок цього виникає явище неадитивності, коли зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі не є простою сумою парціальних внесків окремих  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем.

У сарко(ендо)плазматичному ретикулумі гладеньком'язових клітин виділяють три регіони: периферійний, центральний та глибокий. Периферійний розташований близько від плазматичної мембрани і кавеол, центральна частина контактує з міофіламентами, а більш глибокі ділянки зв'язані із мембранами ядра. Одна з функцій периферійного сарко(ендо)плазматичного ретикулума буферна, яка полягає в акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , що надійшов крізь плазмалему до клітини, з подальшим векторним транспортом його у позаклітинне середовище. Функціонування периферійного ретикулума створює високу концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , достатню для активації  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника та  $\text{K}^+$ -каналів плазматичної мембрани. Також висунуто припущення про наявність гетерогенних кампартментів сарко(ендо)плазматичного ретикулума: 1) чутливого до ріанодину та кофеїну; 2) до  $\text{IP}_3$ ; 3) не чутливого до цих агентів.

Мітохондрії розташовані у безпосередній близькості біля периферійного та центрального сарко(ендо)плазматичного ретикулума та плазмалемою, що передбачає легкий обмін катіону між цими структурами. Продемонстрований взаємозв'язок між вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з ретикулума та його акумуляці-

єю мітохондріями. В ізольованих клітинах гладенького м'язу артерій головного мозку щурів показано, що ефективність надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину внаслідок деполяризації залежить від інтенсивності поглинання катіону мітохондріями.

**11.3. Сучасні методи реєстрації  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу.** При вивченні трансмембранного обміну іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та вмісту іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинних компартментах використовують різні методичні підходи, а саме: двопробневу спектрофотометрію із застосуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих металохромних барвників (арсеназо, мурексид, амідо чорний), електрометрію ( $\text{Ca}^{2+}$ -селективний електрод), ізотопну техніку ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ), біолюмінісцентні виміри ( $\text{Ca}^{2+}$ -чутливі протеїни гідробіонтів – обелін, акварин), спектрофлуориметрію ( $\text{Ca}^{2+}$ -селективні флуоресцентні індикатори) тощо. Донедавна добре апробованим підходом для реєстрації накопичення кальцію клітинними компартментами слугувала радіоізотопна техніка із застосуванням  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , яка дозволяє досліджувати зміни загального вмісту кальцію, тобто сумарно як іонізованого, так і зв'язаного із мембранними структурами. Оскільки функціональне значення у регуляції клітинних процесів належить передусім іонізованому  $\text{Ca}^{2+}$ , важливим є дослідження його змін із використанням саме  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих зондів.

Для здійснення високоякісних, доступних і швидких вимірів змін концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  наразі використовують різні типи синтезованих для оптичних досліджень зондів, на кшталт біолюмінісцентних акваринів, флуоресцентних протеїнів та низькомолекулярних  $\text{Ca}^{2+}$ -флуоресцентних індикаторів, зокрема Rhod-2 AM, Indo-1 AM, Fura-2 AM, Fura-2FF AM, Fluo-4 AM тощо. Перевагою багатьох з них є висока специфічність і можливість інтенсивного збудження зонду при 488 нм, що дозволяє його використання на стандартних приладах, обладнаних аргонним лазером, як це має місце у випадку протокових цитометрів та лазерних конфокальних мікроскопів.

Більшість флуоресцентних індикаторів використовують у вигляді їх ацетоксиметильних або ацетатних естерів, які є незарядженими сполуками і

відносно легко проникають крізь клітинні мембрани. Неспецифічні внутрішньоклітинні естерази розщеплюють складноєфірні зв'язки, наслідком чого є утворення зарядженої форми зонду (кислотної), яка слабо проникає крізь мембрани, а, отже, накопичується або в цитозолі, або в окремих органелах залежно від фізико-хімічної природи зонду. Ця форма зонду є активною, при взаємодії з  $\text{Ca}^{2+}$  зростає флуоресцентний сигнал. Застосування методів молекулярної біології та генно-інженерних підходів дозволяє штучно експресувати в клітинах  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливі флуоресцентні або біолоюмінісцентні протеїни, зокрема в різних компартментах.

**11.4. Просторово-часові характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу.** Складна взаємодія між  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними системами мембранних субклітинних структур та висока буферна ємність цитозолу щодо  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до появи унікальних просторових і часових закономірностей передачі  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу. До таких феномінів відносять спарки, пуфи,  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі,  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляції тощо. Ідентифікація цих явищ стала можливою через застосування  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих флуоресцентних зондів та методів прецизійної мікроскопії, зокрема конфокальної, при роботі на поодиноких клітинах.

У формуванні „ $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі” беруть участь як ріанодинові, так і  $\text{IP}_3$ -рецептори сарко(ендо)плазматичного ретикулума. Згідно моделі Беріджа, спочатку  $\text{IP}_3$ , який генерується PLC за дії відповідних агоністів, викликає локальне підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  поблизу мембрани ретикулуму у субплазмалемному регіоні. Надалі відбувається вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ретикулуму через кофеїн-чутливі канали, це стимулює подальше  $\text{Ca}^{2+}$ -індукований вихід  $\text{Ca}^{2+}$  і фронт  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі розповсюджується від початкового джерела збудження. Розрахунки показали, що концентрація  $\text{IP}_3$  достатньо висока, щоб окупувати всі молекули відповідних рецепторів, але вихід  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігається лише в так званих „гарячих ділянках” або „гарячих плямах” (*hot spots*). Це ділянки змінної локалізації, які виникають як наслідок локального збільшення кількості  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$  або відповідних рецепторів і часто розташовані у субплаз-

малемному регіоні сарко(ендо)плазматичного ретикулума, де концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  набагато більша, ніж в інших цитозольних компартментах і досягає навіть значень десятків мкмоль/л. Назва пішла від методики візуалізації  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах із використанням флуоресцентних зондів або протеїнів у вигляді червоних ділянок високої концентрації катіона в процесі комп'ютерної обробки сигналів у конфокальній мікроскопії.  $\text{Ca}^{2+}$  починає дифундувати вздовж ретикулуму і підвищує чутливість  $\text{IP}_3$ -рецепторів до  $\text{IP}_3$ . Локальні зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  біля мембрани ретикулума інактивують відповідні канали, зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечує робота SERCA. Таким чином здійснюється процес гасіння «гарячих ділянок».

Гіпотеза про *осциляції внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$*  була висунута Раппом і Беріджем, які знайшли, що серотонін, який активує вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в клітини слинної залози личинок м'ясної мухи, викликає постійну за величиною періодичну зміну трансмембранного потенціалу. Швидкість секреції слини корелює з частотою осциляцій електричного потенціалу, залежить від концентрації серотоніна і пригнічується блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Також на  $\beta$ -клітинах підшлункової залози та передньої долі гіпофіза було доведено, що коливання мембранного потенціалу є наслідком періодичної активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних калієвих і хлорних каналів, що дало можливість припустити, що спостерігаються періодичні зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі.

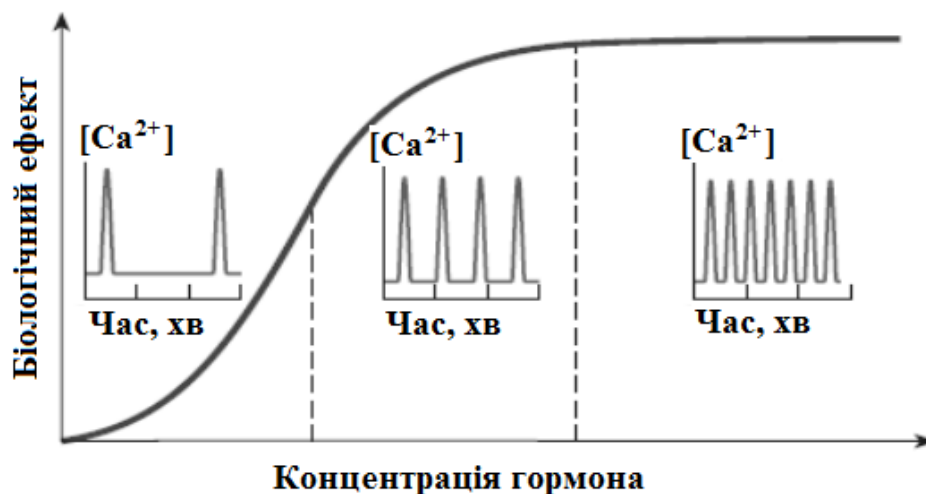


Рис. 37. Співвідношення гормон-індукованих осциляцій  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині різної частоти і біологічної відповіді

Осциляції  $\text{Ca}^{2+}$  були продемонстровані на гепатоцитах за дії вазопресину та адреналіну. Їм були притаманні наступні особливості: концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  збільшувалась від 100-200 до 600-800 нМ за 3 с, пік тривав 7-15 с, потім концентрація знижувалася до базального рівня, інтервал між окремими осциляціями сягав від 20 с до 4 хв в залежності від концентрації гормонів. Схематично агоніст-індуковані осциляції  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині представлені на рис. 37.

Картина  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляцій кожної окремої клітини унікальна і повторюється при повторному введенні гормону. Накладання відповідей окремих клітин унеможливорює реєстрацію осциляцій в дослідах, проведених на клітинних суспензіях. Осциляції відтворюються при штучному введенні в цитоплазму клітин  $\text{IP}_3$ . Останнє можна реалізувати шляхом навантаження клітин спеціальними наноконтейнерами, які містять  $\text{IP}_3$ , що надалі руйнуються лазерним променем. Амплітуда і тривалість осциляцій збільшуються під дією кофеїну та невеликого зростання  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі.

Осциляції  $\text{Ca}^{2+}$  переважно спостерігаються також і в популяціях клітин, зв'язаних між собою міжклітинними контактами, тобто коливання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в окремих клітинах узгоджуються. У випадку кардіоміоцитів та синцитію гладеньких м'язів хвиля  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  може розповсюджуватися крізь міжклітинні контакти. Як в збудливих, так і в незбудливих клітинах дифундувати між ними може також й  $\text{IP}_3$ .

У цитоплазмі окремих клітин гормони і фактори росту за зростання концентрації практично не впливають на амплітуду підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , проте посилюють частоту його осциляцій, як це зазначено на вищенаведеній схемі (рис. 37). Звичайно рівень  $\text{Ca}^{2+}$  змінюється приблизно від 100 до 500 нМ, а частота від одного коливання за хвилину до одного коливання за секунду.  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ефекти гормонів і факторів росту прямо пропорційні частоті осциляцій цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Ефективність насичення катіоном  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальних протеїнів пропорційна частоті  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляцій, тому  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні протеїни сприймають частотну інформацію і трансформують її в повільні зміни метаболізму, функціонального стану та морфології (рис. 37).

Візуалізація  $Ca^{2+}$ -треків в гладеньком'язових клітинах. Використання  $Ca^{2+}$ -чутливих флуоресцентних зондів та методів лазерної конфокальної мікроскопії дозволило візуалізувати  $Ca^{2+}$ -треки в клітинах гладеньких м'язів. На відміну від скелетних міоцитів  $Ca^{2+}$  не вивільнюється на регулярних відстанях в міоплазмі, а утворює біля сарко(ендо)плазматичного ретикулума так звані *FDS (Frequent-Discharge Sites)*, яке є проявом спонтанної базальної активності  $Ca^{2+}$ -каналів. У порталній вені кролів відмічають єдиний FDS, локалізований поблизу ядра, але в субсарколемній області. А в малих мезентеріальних артеріях мурчаків спостерігають в різних частинах клітини два-три FDS. Спричинене FDS зростання флуоресценції  $Ca^{2+}$ -чутливого зонду називається „спарками” від англійського слова *spark* – іскра, спалах. Активація міозитів здебільшого може призвести до зростання спаркової активності, тобто кількості спалахів зонду за одиницю часу та їхньої інтенсивності. У більшості гладеньком'язових клітин спарки є наслідком активації ріанодинових рецепторів. У деяких клітин візуалізуються більш видовжені „пуфи” як наслідок активації  $IP_3$ -рецепторів. Спарки асоційовані зі *STOCs (Spontaneous Transient Outward Currents)* – проявом активації кластерів  $Ca^{2+}$ -залежних  $K^+$ - та  $Cl^-$ -каналів. Назагал, кожне  $Ca^{2+}$ -вивільнення з сарко(ендо)плазматичного ретикулума асоційоване із активацією  $Ca^{2+}$ -залежних  $K^+$ -,  $Cl^-$ -, неспецифічних катіонних каналів плазматичної мембрани та відбувається у периферійному ретикулумі з субплазмалемною локалізацією. Сам факт реєстрації спарків як локальних ділянок є наслідком буферної ємності цитозоля, що суттєво знижує дифузію катіону в міоплазмі.

Індуковане деполяризацією або агоністами генералізоване зростання  $Ca^{2+}$  в міоплазмі (*транзієнт*) досягається шляхом  $Ca^{2+}$ -індукованого вивільнення, що передбачає відносно гомогенне розташування  $Ca^{2+}$ -вивільнюючих місць в міоплазмі. Ці місця займають біля 5-7% міоплазми і візуалізуються поблизу сарко(ендо)плазматичного ретикулума із використанням флуоресцентних похідних ріанодину.



### 11.5. Електромеханічне/фармакомеханічне спряження (ЕМС/ФМС)

ЕМС/ФМС - послідовність біохімічних подій між збудженням плазматичної мембрани шляхом деполяризації або зв'язування ліганда з рецептором та скороченням м'язевого волокна.

У скелетному м'язі ЕМС/ФМС включає 2 основні події: деполяризація Т-трубочок, які є інвагінацією плазматичної мембрани в міоплазму, і дифузія  $\text{Ca}^{2+}$  із термінальних цистерн до міофіламентів. Т-трубочка і дві прилеглі до неї термінальні цистерни сарко(ендо)плазматичного ретикулула утворюють тріаду. За даними електронної мікроскопії між Т-трубочкою і термінальними цистернами розташована тріадна щілина (15 нм), в якій містяться "стопи", а саме ріанодинові рецептори, що кріпляться до мембран термінальних цистерн. Канали дигідропіридинового рецептору Т-трубочок групуються по 4; кожна з цих груп зв'язана з кожним другим ріанодиновим рецептором. Постульований механічний зв'язок між дигідропіридиновими та ріанодиновими рецепторами. Конформаційні зміни у дигідропіридинових рецепторах при розповсюдженні потенціалу дії по Т-трубочках передаються на ріанодинові рецептори і  $\text{Ca}^{2+}$ -канали термінальних цистерн відкриваються. Описана модель спряження підтверджена із використанням моноклональних антитіл проти протеїнів, які беруть участь у цьому процесі. В подальшому  $\text{Ca}^{2+}$  взаємодіє з тропоніном С і активується актоміозинова скоротлива система.

У гладенькому м'язі і кардіоміоцитах загально прийняте уявлення про " $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ ", відповідне англійське скорочення CICR. Сутність його полягає в тому, що невелике підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазми за рахунок входу катіону із позаклітинного пулу індукує вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з сарко(ендо)плазматичного ретикулула крізь канали ріанодинового рецептора та подальший розвиток процесу скорочення. Фармакомеханічне спряження досягається шляхом активації PLC та  $\text{IP}_3$ -залежного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з сарко(ендо)плазматичного ретикулула. В клітинах гладеньких м'язів спостерігається слабкий розвиток Т-системи, а сарко(ендо)плазматичний ретикулум становить відносно невеликий відсоток від

об'єму цитоплазми. Важливе значення в останньому випадку мають пул-кервані  $\text{Ca}^{2+}$  канали плазмалемі. Плазматична мембрана виконує ключову роль у забезпеченні сполучення процесів збудження - скорочення, оскільки в безкальцієвому середовищі з ЕГТО натрієвий потенціал дії практично не викликає скорочувальної відповіді.

Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в міоплазмі призводить до утворення комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін, який активує кіназу легких ланцюгів міозину. Остання фосфорилує пару 20 кДа регуляторних ланцюгів міозину, що ініціює взаємодію важких ланцюгів з актином і розвиток скорочення. Зворотній процес забезпечується роботою фосфатази легких ланцюгів міозину.

Схема ЕМС/ФМС в гладенькому м'язі виглядає наступним чином (рис. 38), основні її елементи описані вище.

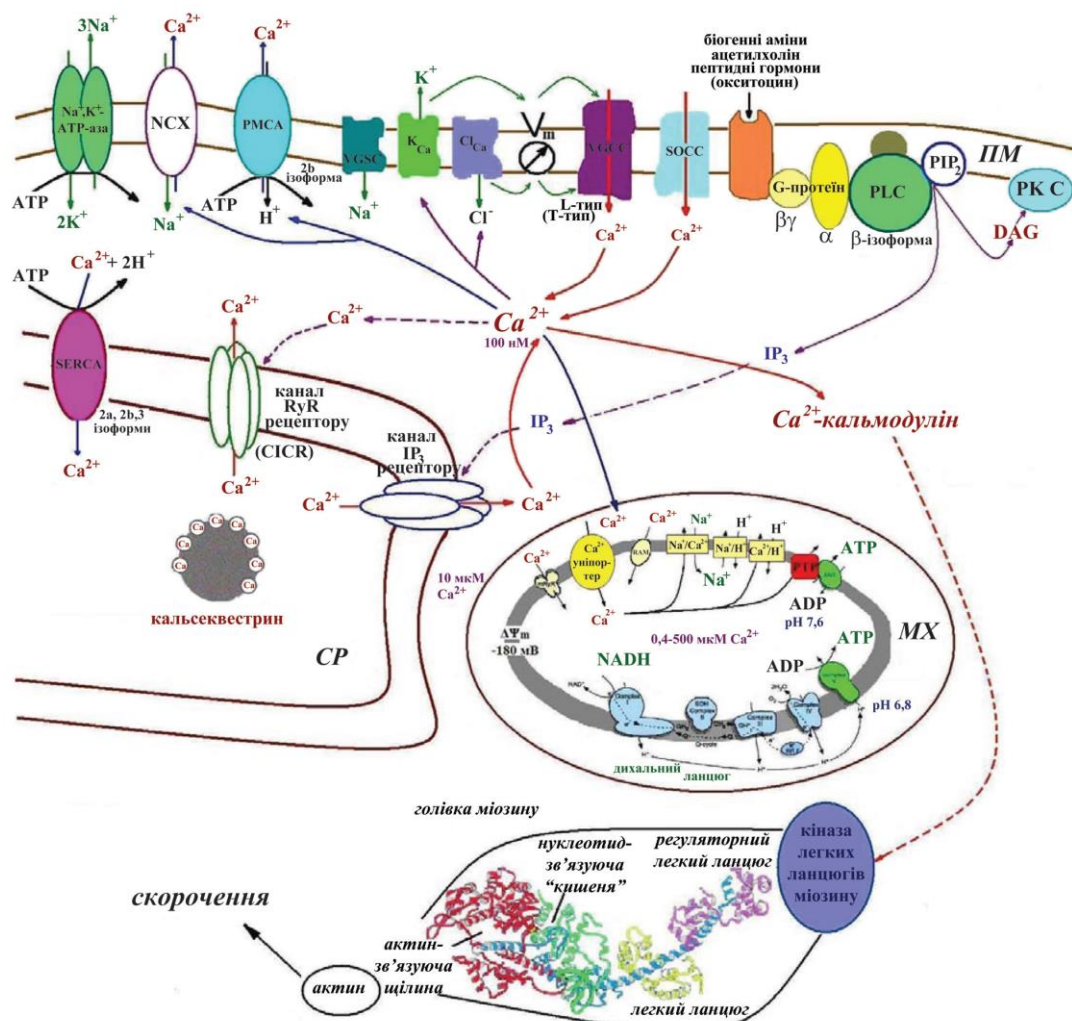


Рис. 38. Йон-транспортувальні субклітинні системи, функціонування яких контролює скоротливу активність гладенькомязових клітин: РМСА – каль-

*цієва помпа плазматичної мембрани, SERCA – кальцієва помпа саркоплазматичного ретикулула, VGCC – потенціалкеровані (воротні) кальцієві канали, SOCC – депокеровані кальцієві канали, VGSC – потенціалкеровані (воротні) натрієві канали, PKC – протеїнкіназа C, PLC – фосфоліпаза C, PIP<sub>2</sub> – фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат, IP<sub>3</sub> – інозитол-1,4,5-трисфосфат, DAG – діацилгліцерол, K<sup>+</sup><sub>Ca</sub> – Ca<sup>2+</sup>-залежні калієві канали, K<sup>+</sup>-калієві канали, Cl<sup>-</sup><sub>Ca</sub> – Ca<sup>2+</sup>-залежні хлорні канали, CICR – кальційіндуковане вивільнення кальцію, NCX – Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обмінник. Вказані на схемі ізоформи протеїнів характерні для гладенького м'яза матки*

Стимуляцію агоністом гладеньком'язової клітини можна розділити на дві фази: (1) - швидке транзйентне підвищення концентрації Ca<sup>2+</sup> в міоплазмі і Ca<sup>2+</sup>-кальмодулін залежне фосфорилування легких ланцюгів міозину, що супроводжується розвитком скорочення; (2) - фаза підтримання сили скорочення в умовах низької концентрації Ca<sup>2+</sup>, яка зв'язана із залученням Rho-кінази. Rho-кіназа активується в процесі деполяризації та Ca<sup>2+</sup>-кальмодуліном, а фосфорилування нею фосфатази легких ланцюгів міозину по залишкам тирозину призводить до інгібування останньої. В процес активації Rho-кінази залучений малий G-протеїн Rho та відповідний фактор обміну гуанінових нуклеотидів. Таким чином, роль Ca<sup>2+</sup> полягає у активації кінази легких ланцюгів міозину та Rho-опосередкованому інгібуванню фосфатази легких ланцюгів міозину.

## **РОЗДІЛ 12. АКТИВНІ ФОРМИ АЗОТУ І КИСНЮ ЯК СИГНАЛЬНІ МОЛЕКУЛИ**

### **12.1. Оксид азоту, активні форми азоту (АФА, англійською RNS).**

Оксид азоту – невелика молекула, яка містить неспарений електрон, що робить її реакційноздатною, проте серед вільнорадикальних частинок вона є порівняно стійкою. Оксид азоту достатньо неполярний, щоб добре розчинятися в ліпідах, і не має заряду, що дозволяє проникати крізь клітинні мембрани і дифундувати на відстані в кілька клітинних діаметрів. Оксид азоту є од-

нією з найбільш універсальних сигнальних і регуляторних молекул, виконуючи месенджерні функції та виступаючи у ролі ауто/паракринного регулятора. У науковій літературі оксид азоту та його похідні часто називають активними формами азоту. Окремі хімічні властивості оксиду азоту та його похідних ( $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^-$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ), які важливі для функціонування клітини, перелічені нижче:

- реакції в водних аерованих розчинах з утворенням нітритів та нітратів, що виводяться з організму;
- взаємодія з тіолами з утворенням нітрозотіолів, наприклад, нітрозоглутатіону;
- реакції з залізо-сірчаними центрами, які особливо важливі для функціонування мітохондрій, де їхня кількість велика;
- реакції з амінами, зокрема вторинними амінами;
- взаємодія з гемовим залізом, яка лежить в основі активації розчинної гуанілатциклази та зворотнього інгібування цитохром с-оксидази за фізіологічних умов;
- взаємодія з негемовим залізом, яка забезпечує регуляцію ліпоксигеназ та заліозберігаючого і транспортувального протеїну феритину.

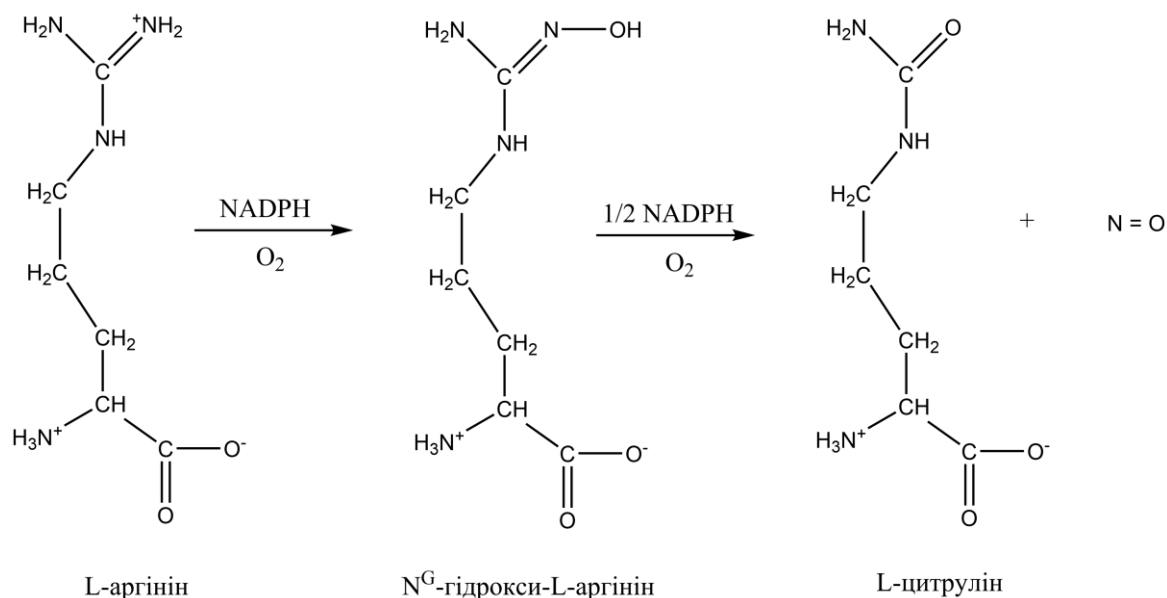
Нітрування по залишкам тирозину і триптофану та нітрозилування цистеїну належать до ковалентних посттрансляційних модифікацій протеїнів, які змінюють структуру і функції останніх.

З біологічною активністю АФА тісно пов'язані *активні форми кисню*, АФК (англійською *ROS*). Кисень має два неспарених електрона на різних орбіталях. Одноелектронне відновлення кисню призводить до генерації супероксид-аніона ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), а надалі пероксиду водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Приєднання ще одного електрона супроводжується утворенням гідроксил-радикала ( $\cdot\text{OH}$ ). Час напівжиття супероксид-аніона біля  $10^{-6}$  с, а гідроксил-радикала  $10^{-9}$  с. Найбільш стабільним з АФК за відсутності металів змінної валентності є  $\text{H}_2\text{O}_2$ , який наразі визнаний сигнальною та регуляторною молекулою за низьких фізіологічних концентрацій. Клітини синтезують АФК в ході нормальної життєдія-

льності. Аналогічно іншим посттрансляційним модифікаціям, окиснення амінокислот змінює конформацію і властивості сигнальних протеїнів – протеїнази, протеїнофосфатази та факторів транскрипції. У фізіологічних концентраціях АФА та АФК ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  М) є сигнальними та регуляторними молекулами, а у високих виявляють цитотоксичність. Тому біологічні ефекти є високою мірою концентраційнозалежними. Особливо яскраво ця особливість ілюструється явищем надмірного утворення пероксинітриту при взаємодії оксиду азоту та супероксид-аніону (за умов їхньої гіперпродукції) – сполуки, яка є чинником широкого спектру патологічних процесів в організмі. Серед них запалення, нейродегенеративні захворювання, діабет, атеросклероз, дисфункції серцево-судинної системи тощо. Пероксинітрит нітрує в протеїнах залишки тирозину і триптофану, інактивує ензими, викликає посилення перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), пошкоджує нуклеїнові кислоти. Особливо небезпечним є продукт розкладу пероксинітриту гідроксил-радикал. Гідроксил-радикал пошкоджує різноманітні біосубстрати, зокрема нуклеїнові кислоти, маючи мутагенну та летальну дію, інактивує ензими, викликає ПОЛ. Не існує систем ензиматичного захисту проти цього вільного радикала, лише багатоатомні спирти є його скавенджерами. Втім, гідроксил-радикал має дуже малий термін існування та зовсім невеликий радіус дії. Надмірна генерація АФК особливо небезпечна в мітохондріях, де внаслідок порушення роботи електронно-транспортного ланцюга утворюється надмірна кількість супероксид-аніону. Водночас ці субклітинні структури є також і джерелом оксиду азоту. В мітохондріях надмірна генерація пероксинітриту призводить до їхньої дисфункції та зрештою загибелі клітини. Саме тому біологічну активність АФА та АФК часто порівнюють з «дволиким Янусом»: за низьких концентрацій – сигнальна, регуляторна функції у фізіологічній ситуації, за надмірної продукції – дисфункція і загибель клітини.

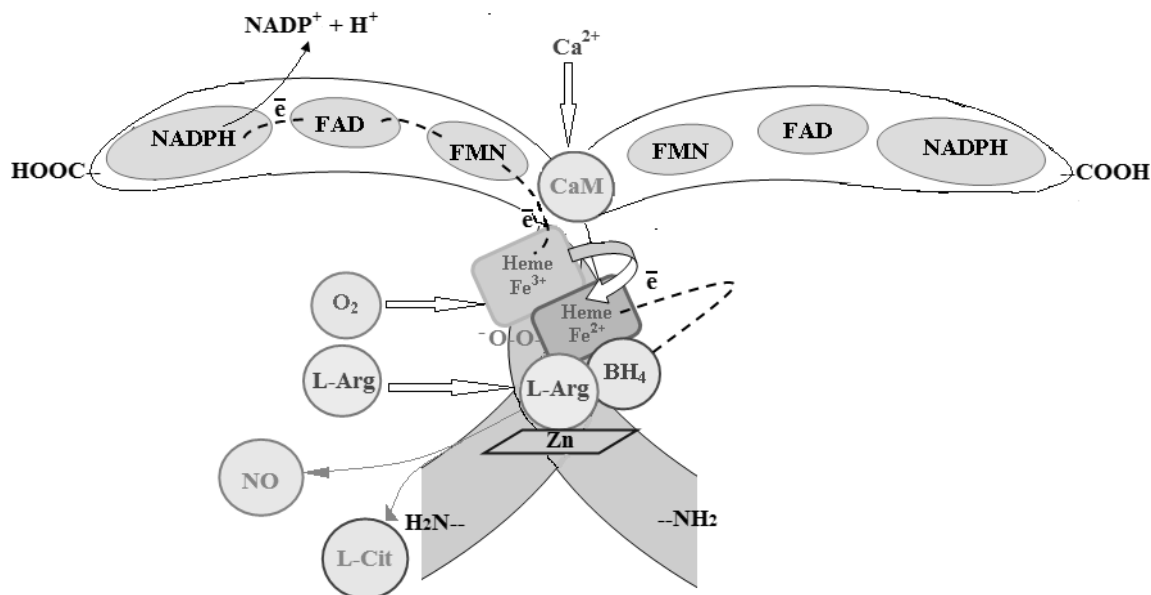
*Біосинтез NO. Механізми і регуляція NO-синтазної реакції.* Природним субстратом NO-синтази (NOS) є L-аргінін. Ензим каталізує п'ятиелектронне двостадійне окислення L-аргініну. Він повинен двічі зв'язати й активувати

O<sub>2</sub>, при цьому джерелом електронів для цього виступає NADPH. Конкурує за субстрат аргіназа, активність якої зростає за низки патологій, пов'язаних із ендотелійною дисфункцією на фоні посилення запальних процесів (старіння, цукровий діабет). Загальна схема NO-синтазної реакції виглядає наступним чином:



Виділяють nNOS, яку вперше ідентифіковано в нейронах, вона відноситься також до 1 типу (нейрональна), є Ca<sup>2+</sup>-залежним, конститутивним ензимом. Постійна присутність в клітинах та Ca<sup>2+</sup>-залежність характеризує також вперше описаний в ендотеліоцитах 3 тип NOS (ендотелійна) або eNOS. На відміну від них характерна для клітин імунної системи, зокрема макрофагів, iNOS (2 тип, індукцйбельна) є Ca<sup>2+</sup>-незалежною. Конститутивні ізоформи преекспресовані в клітині, характеризуються базальною продукцією NO, для їх активації потрібні секунди. Головним регулятором виступає комплекс Ca<sup>2+</sup>-кальмодулін і, відповідно, сполуки, які викликають зростання концентрації внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup>. Індукцйбельна експресуються за дії бактеріальних ліпополісахаридів, прозапальних цитокінів (інтерферони, інтерлейкіни, фактори некрозу пухлин), γ-опромінення. Вони незалежні від Ca<sup>2+</sup>, оскільки міцно зв'язують кальмодулін у відповідному сайті, мають значний час активації, бо період експресії може тривати кілька годин.

*Структура NOS.* Активні форми всіх трьох типів ензимів представлені гомодимерами. У кожному мономері розрізняють кілька доменів. Починаючи з С-кінця розрізняють редуктазний, невеликий кальмодулінзв'язувальний та оксигеназний домени. Під час каталізу NOS використовують ряд коензимів: гемова простетична група, FAD, FMN, кальмодулін і  $\text{Ca}^{2+}$  для конститутивних ізоформ, тетрагідробіоптерин ( $\text{BH}_4$ ), а також катіон цинку, який бере участь в димеризації. За кількістю коензимів NOS – один з найскладніше регульованих ензимів. FAD є первинним акцептором електронів від NADPH, а FMN переносить електрони від FAD на гем оксигеназного домену іншої субодиниці, відновлюючи залізо у його складі ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ). При цьому з гемовою групою зв'язується і послідовно відновлюється  $\text{O}_2$ , активна форма якого окислює гуанідинову групу L-аргініну. За нестачі L-аргініну або коензимів порушується sprzęження між редуктазною і оксигеназною компонентами NOS, що має наслідком посилення продукції супероксид-аніону та пероксиду водню. Структура NOS схематично представлена на рис. 39.



*Рис. 39. Функціонально активний гомодимер NOS. Схематично зображено взаємне розташування коензимів, відмічені сайти зв'язування  $\text{O}_2$  та L-аргініну: L-Arg - L-аргінін, L-Cit - L-цитрулін, Heme – гем. На рисунку можна побачити напрямок транспорту електронів (двох електронів) від NADPH, пунктирна лінія, та процес активації  $\text{O}_2$*

*Субклітинна локалізація.* Конститутивні NOS часто-густо зв'язані з мембранами. eNOS внаслідок ацилювання асоціює з кавеолами та активується фосфорилуванням. nNOS завдяки специфічній амінокислотній послідовності (PDZ-домену) стаціонарно зв'язана з мембранами. iNOS має переважно розчинну форму.

*Регуляція синтезу та активності NOS.* Вміст в клітині та активність NOS регулюються на рівні транскрипції, процесінгу мРНК, трансляції, пост-трансляційних ковалентних модифікацій, а також шляхом протеїн-протеїнових і протеїн-ліпідних взаємодій та зміною доступності коензимів і субстрату.

Той факт, що рівень експресії конститутивних NOS відносно постійний не означає, що він не може підлягати довготривалій регуляції. Одним з важливих факторів, який впливає на вміст в клітинах eNOS, є парціальний тиск O<sub>2</sub>. Гіпоксія супроводжується зростанням експресії цього ензиму. Зростає рівень eNOS в клітинах також й при посиленні тиску на судинну стінку, тобто артеріального тиску. Важливе значення у посиленні експресії eNOS відіграють транскрипційні фактори NF-κB, KLF2 (Krüppel-Like Factor 2), HIF.

Рівень iNOS в клітині регулюється на рівні транскрипції, зокрема такими факторами, як NF-κB, Jun/Fos, CREB, STATs, IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1), активаторами яких виступають Janus-, MAP-кінази та ізоформи протеїнкінази C. Активація синтезу iNOS під впливом ліпополісахаридів та інтерлейкіну-1 β відбувається через звільнення NF-κB від інгібіторного фактору I-κB шляхом фосфорилування останнього відповідною кіназою з подальшою протеосомною деградацією I-κB як описано вище. Ініціація транскрипції iNOS за дії інтерферону γ реалізується в межах Jak/STATs-сигнального шляху.

Альтернативному сплайсингу піддаються мРНК nNOS. Можливі принаймні три варіанти протеїну, які відрізняються тканинною локалізацією. Один із варіантів було ідентифіковано як мітохондрійну форму ензиму



(mtNOS), яка регулює споживання кисню мітохондріями шляхом зворотного інгібування цитохром с-оксидази.

До посттрансляційних ковалентних модифікацій eNOS відносять передусім ацилювання, фосфорилування та нітрозилування продуктом реакції. Вони визначають субклітинну локалізацію та регулюють процес активації.

Структуруювальний елемент кавеол кавеолін є потужним інгібітором eNOS. Зв'язування кавеоліну з оксигеназним доменом eNOS порушує взаємодію із кальмодуліном, можливо шляхом стеричного блокування. Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін регулює транспорт електронів в редуктазному домені, а також від редуктазного на оксигеназний. Тетрагідробіоптерин може виступати дисоціюючим переносником електронів. Окремі особливості регуляції та локалізації eNOS наведено на схемі (рис. 40):

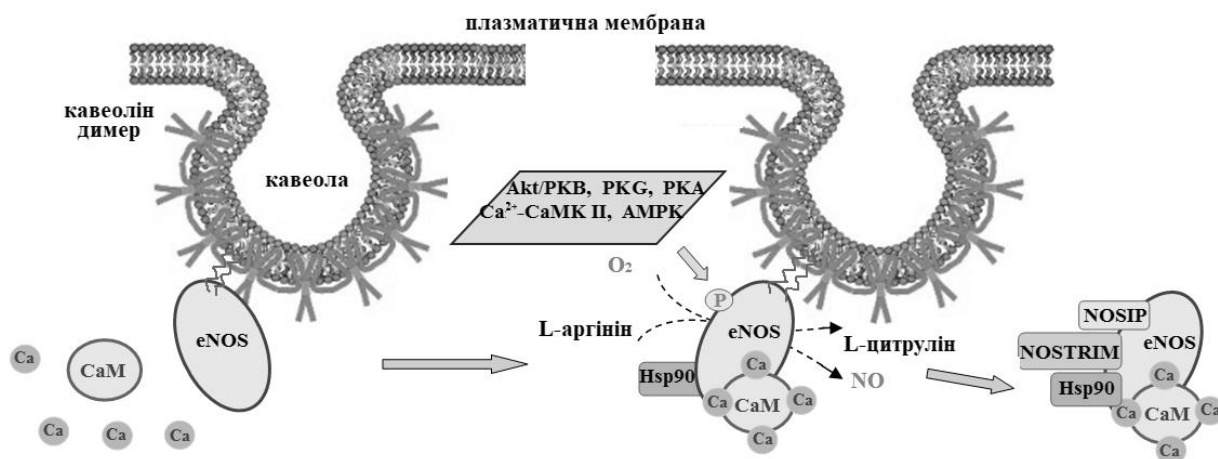


Рис. 40. Регуляція активності eNOS в кавеолі. Міристилювання та пальмітилювання показані двома зигзагоподібними кривими прикріплюють eNOS до плазматичної мембрани. Взаємодія з кавеоліном інгібує активність eNOS. Hsp90 (Heat shock protein 90) та комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM активують її. Akt/PKB, PKG, PKA та інші кінази, через фосфорилування, також активують eNOS. Взаємодія eNOS з протеїнами NOSIP (NOS Interacting Protein) та NOSTRIN (NOS Traffic INDucer) призводить до транслокації її від кавеол до внутрішньоклітинних мішеней, в результаті чого активність eNOS зменшується

Конститутивні NOS продукують низькі фізіологічно-значущі кількості NO, концентрація якого в тканинах часто знаходиться у наномолярному діапазоні.

*Функціональне значення eNOS.* Фізіологічні ефекти NO є наслідком його біохімічних властивостей. З функціональною активністю eNOS пов'язані три найбільш вивчені ефекти. Одним з перших був доведений факт розслаблення судинної стінки при постійному виділенні NO ендотелієм. При додаванні інгібіторів eNOS спостерігається зниження активності ензиму і адекватне цьому підвищення артеріального тиску. Можливою основою цього є ланцюг біохімічних подій: підвищення рівня NO → активація розчинної гуанілатциклази → зростання рівня cGMP → активація PKG → фосфорилування Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних протеїнів субклітинних мембранних структур → зменшення концентрації вільного Ca<sup>2+</sup> в міоплазмі → релаксація гладенького м'язу судинної стінки.

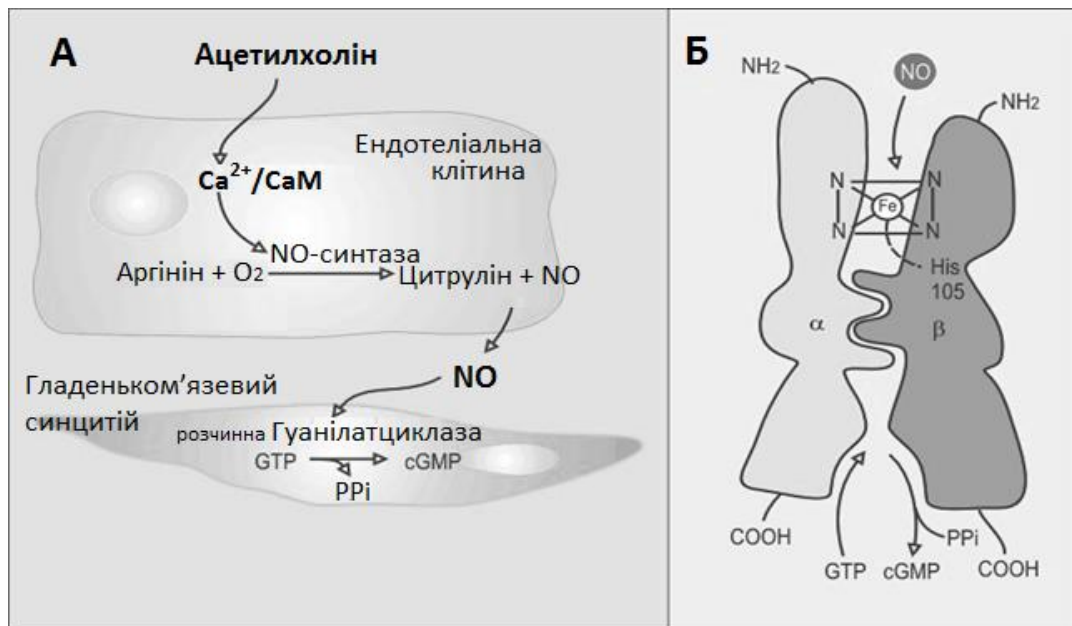


Рис. 41. Схема ендотелій-залежної релаксації гладенького м'язу (А) та структура розчинної гуанілатциклази (Б), CaM – кальмодулін, His – залишок гістидину

Утворення комплексів із залізом гему лежить в основі активації розчинної, тобто цитозольної форми, гуанілатциклази (sGC) з подальшою активацією PKG, що є “класичним” шляхом передачі сигналу в клітині за участі

NO. Розчинна гуанілатциклаза складається з двох різних субодиниць, N-кінцева частина яких утворює зв'язок з гемом; гем-дефіцитна форма ензиму не активується NO (рис. 41).

В основі зниження концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  і розслаблення можуть лежати як активація енергозалежного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  з міоплазми, так і інгібування його надходження в міоплазму, а також гальмування взаємодії актина з міозином.

Другим “класичним” ефектом NO є дезагрегуюча та антиадгезивна дія на тромбоцити. Цим шляхом досягається антитромболітичний ефект. Процес зупинки кровотечі внаслідок пошкодження судини забезпечуються шляхом активації тромбоцитів. За дії колагену судинної стінки починається процес тромбоутворення, що супроводжується агрегацією, ростом тромбоцитарного згустка, активацією інтегринів, зростанням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі тромбоцитів та стимуляцією секреції гранул. Спонтанна активація тромбоцитів, патологічний процес тромбоутворення, пригнічується оксидом азоту. Механізм дії NO може бути пов'язаний із cGMP-залежним зниженням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі.

Третій “класичний ефект” оксиду азоту полягає в тому, що NO бере участь в регуляції проникності мікросудин, впливаючи на адгезію і транспорт лейкоцитів, передусім нейтрофілів, та тромбоцитів крізь судинну стінку. Вихід з крові плазми та лейкоцитів супроводжує розвиток запальних процесів в тканинах. За низької концентрації оксид азоту знижує проникність судинної стінки. Водночас за наявності прозапальних цитокінів спостерігається протилежний ефект. Можливо, це пов'язано зі зростанням експресії iNOS і гіперпродукцією NO.

*Значення nNOS в різних тканинах.* В центральній і периферійній нервовій системі знайдена nNOS. Нітрергічні закінчення здійснюють регуляцію гладеньких м'язів судин, зокрема судин мозку, шлунково-кишкового і уrogenітального трактів, бронхів. Вважають, що NO бере участь в процесах навчання та формуванні пам'яті, зоровому аналізу, термочутливості, нюху, сприйнятті води, їжі, механізмах ноцицепції. NO контролює вивільнення

нейромедіаторів та знижує тривожність. Оксид азоту модулює функціонування системи «гіпоталамус-гіпофіз-надниркова залоза». Унікальність NO як нейротрансмітера полягає в тому, що, через свої фізико-хімічні властивості, він не акумулюється у синаптичних пухирцях, а дифундує з нервових терміналей. Через це його відносять до газотрансмітерів. Проникаючи до сусіднього нейрона, оксид азоту часто-густо стимулює розчинну гуанілатциклазу і реалізує cGMP-залежні ефекти.

У скелетному м'язі nNOS взаємодіє з дистрофін-асоційованим протеїновим комплексом сарколеми. Це створює ефективний взаємозв'язок між надходженням  $Ca^{2+}$  з позаклітинного середовища у міоплазму та синтезом NO. Оксид азоту, який утворюється в діючому м'язі, дифундує і викликає розширення просвіту та посилення кровотоку в прилеглих судинах. Це пов'язує активність м'язів із їхнім кровопостачанням. В основі однієї з форм м'язової дистрофії лежать мутації в дистрофіні, що спричинює дисоціацію nNOS від мембрани, зниження синтезу NO та зменшення локального кровотоку.

У серцевому м'язі nNOS локалізована в сарко(ендо)плазматичному ретикулумі та асоційована з  $Ca^{2+}$ -каналами р'янодинового рецептора, які активуються NO нітрозилуванням. Водночас, оксид азоту, який продукується eNOS кавеол, пригнічує активність  $Ca^{2+}$ -каналів L-типу плазмалеми теж шляхом нітрозилування. Тобто NO гальмує транспорт  $Ca^{2+}$  у кардіоміоцити, протекуючи від  $Ca^{2+}$ -перевантаження, але стимулює вивільнення катіону з ретикулума у напрямку контрактильного апарату. Це яскравий приклад компартименталізації різних ізоформ сигнального ензиму в клітині та різних біохімічних ефектів вторинного месенджера, що забезпечує тонку регуляцію біохімічних процесів.

*Значення iNOS.* Індуцибельна NOS продукує високі цитотоксичні кількості NO часто на фоні посиленої генерації АФК за дії прозапальних цитокінів та бактеріальних ліпополісахаридів, що в нормі виконує захисні функції.

В імунних процесах NO впливає як на елементи неспецифічного захисту, так і на специфічну ланку імунітету. Спостерігається посилений синтез NO в імунологічних фільтрах (печінці, легенях) при потраплянні в організм збудників малярії, туберкульозу, грибкових захворювань тощо. Оксид азоту регулює проліферацію Т-хелперів. Він бере участь в аутоімунних реакціях, відторгненні трансплантанта, у протипухлинному захисті. Важливе значення має гіперпродукція NO разом з АФК за фагоцитозу. Це знову яскравий приклад подвійної ролі NO - «дволикого Януса». За низьких фізіологічних концентрацій, що продукуються конститутивними NOS, регуляція в організмі власних функцій. За високих цитотоксичних концентрацій, які генеруються іNOS, захист від інфекцій та злоякіснотрансформованих клітин.

*NO в мітохондріях.* В мітохондріях існують власні системи синтезу NO, що працюють як за нормального парціального тиску кисню (утворення з L-аргініну), так і за гіпоксії. Матриксні ензими та комплекси електронно-транспортного ланцюга є добрими мішенями дії оксиду азоту через наявність у їхньому складі залізо-сірчаних центрів та гемових простетичних груп. Окрім того, функціонування електронно-транспортного ланцюга завжди супроводжується генерацією АФК – процес, який інтенсифікується за мітохондрійної дисфункції.

Інгібування цитохром с-оксидази, термінального ензиму відновлення  $O_2$  до  $H_2O$  в електронно-транспортному ланцюзі, оксидом азоту в наномольних концентраціях є процесом зворотнім. Це супроводжується гальмуванням дихання і фосфорилування, що може мати фізіологічне значення у випадку регуляції рівномірного киснепостачання у стінках великих судин. Вищі концентрації NO роблять інгібування незворотнім, при цьому спостерігається різке падіння електричного потенціалу на внутрішній мембрані, відкриття пори перехідної провідності і набухання мітохондрій внаслідок порушення осмотичного балансу між матриксом та оточуючим середовищем. При цьому мітохондрійні фактори, які запускають апоптоз, вивільняються у цитозоль. Пероксинітрит додатково активує відкриття пори перехідної провідності.

Отже, за високих концентрацій на тлі гіперпродукції АФК оксид азоту запускає залежний від мітохондрій шлях загибелі клітини.

*Патогенез окремих захворювань та NO.* Продемонстровано, що донори NO (нітрогліцерин, нітросорбід, інші фармпрепарати) та L-аргінін (тівортін) знижують об'єм інфаркту міокарда. За гіпертонії вазодилатація на ацетилхолін порушена, водночас інфузія L-аргініну знижує кров'яний тиск.

Патогенез атеросклерозу включає зростання вмісту холестеролу та окислених ліпопротеїнів низької щільності в плазмі крові та судинній стінці. Формуються атеросклеротичні бляшки, центральним етапом чого є адгезія формених елементів крові до ендотелію, зокрема відбувається інфільтрація моноцитів в інтиму ендотелію (рис. 42). Тривалі запальні процеси в організмі супроводжуються зростанням рівня прозапальних цитокінів, посиленням генерації АФК та експресії iNOS. Таким чином з'являються передумови гіперпродукції високореакційних форм азоту і кисню, пошкодження ендотелію судин. Підвищення рівня холестеролу та окислених ЛПНЩ запобігає відновленню тетрагідробіоптерину, також пригнічується як експресія eNOS, так і синтез нею NO. Знижується біодоступність NO в судинній стінці, розвивається ендотелійна дисфункція, що є передумовою серцево-судинних захворювань, зокрема, гіпертонічної хвороби. Посилений атерогенез є головною причиною інфарктів та інсультів.

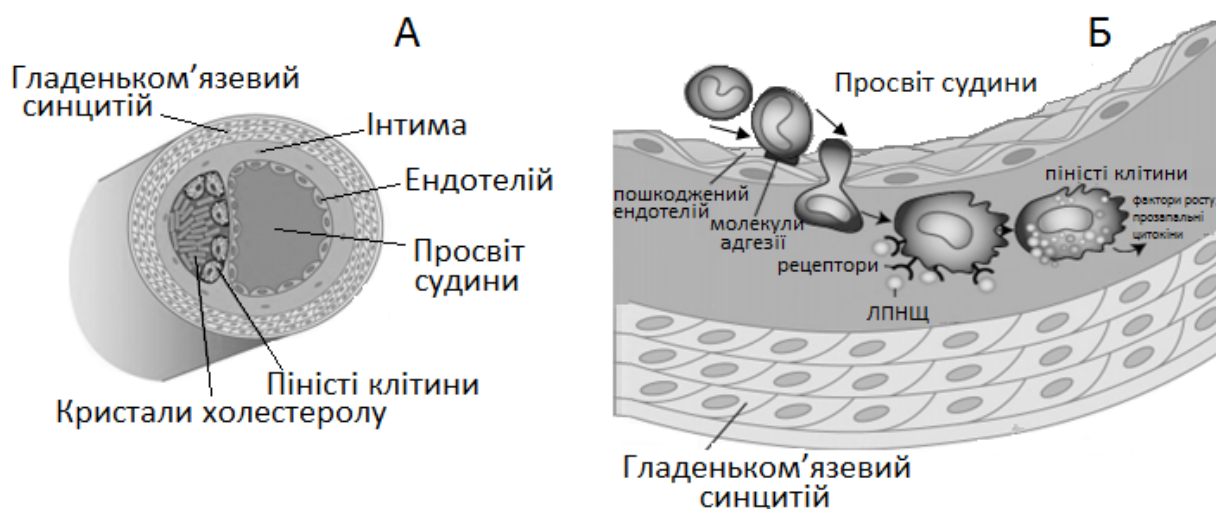


Рис. 42. Окремі етапи формування атеросклеротичної бляшки в судині: А – судинна стінка на початковому етапі атерогенезу; Б – механізм проникнен-

*ня моноциту в судинну стінку крізь пошкодженій ендотелій та утворення піністої клітини (макрофагальної), ЛПНЩ – окислені ліпопротеїни низької щільності*

Антиадгезивний та вазодилаторний ефекти NO перешкоджають розвитку патологічних явищ. При терапії донорами NO, L-аргініном і тетрагідробіоптеріном частина описаних проявів послаблюється.

Патогенез цукрового діабету, зокрема резистентність до інсуліну, також пов'язані з порушеннями в системі NO. За нормальних умов інсулін стимулює продукцію оксиду азоту eNOS в ендотелії шляхом активації РІЗК/РКВ-сигнального шляху, а саме має місце активаційне фосфорилування eNOS з боку РКВ. За інсулінонезалежного діабету цей механізм порушується. Миші, нокаунтні (створюються штучні умови, коли відповідні гени не працюють) за рецептором інсуліну або IRS1/2, є гіпертензивні, в них розвивається атеросклероз. У випадку інсулінозалежного діабету механізм деструкції  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса пов'язаний із цитотоксичною дією прозапальних цитокінів і гіперпродукцією NO шляхом зростання експресії iNOS.

*Синтез NO за умови дефіциту  $O_2$ .* За гіпоксії/ішемії в тканинах NOS інгібується внаслідок зниження доступності  $O_2$ . Водночас нестача кисню призводить до запуску нітритредуктазних реакцій, результатом яких є утворення NO з нітритів. Нітритредуктазні системи вищих еукаріотів – це гем-вмісні протеїни гемоглобін, міоглобін, цитохром с-оксидаза мітохондрій, мікросомальні цитохроми p-450 у дезоксиформі. Якщо вміст кисню в тканинах знижується, гемове залізо зв'язує нітрит-аніони, на цій молекулярній платформі і відбувається відновлення  $NO_2^-$  до NO. Окислене залізо, в свою чергу, відновлюється відповідними редуктазами. Реакції синтезу NO з L-аргініну за нормоксії, його окислення до нітрит-аніонів, які за гіпоксичного стану відновлюються знову до NO, утворюють цикл.

*NO у прокариот.* На відміну від ензимів еукаріот в NOS бактерій відсутній редуктазний домен. У грампозитивних бактерій відсутній також і кальмодулінзв'язувальний домен. Багато видів бактерій не мають генів, що від-

повідують за синтез  $\text{BH}_4$  і тетрагідрофолат виступає як редокс-активний агент. Існує точка зору, що бактеріальні NOS є попередниками еукаріотичних форм, що набули редуктазний домен на більш пізніх еволюційних етапах. Однією з причин виникнення NOS була адаптація до появи кисню в атмосфері.

Функціональна активність NOS у прокариот вивчається. Стрептоміцети, які викликають паршу коренеплодів, виділяють в зоні контакту з клітинами господаря мікотоксин, що інгібує синтез клітинної стінки. Нітрування цього мікотоксину за залишком триптофану активними формами азоту є необхідною умовою прояву активності.

Ще один приклад є парадоксальним, оскільки бактерії (наприклад, збудник сибірської виразки) захищаються від дії фагоцитуючих клітин господаря шляхом утворення NO. Але синтез NO розділений у часі: бактерії починають синтез вже через кілька секунд після зараження і продовжують його протягом 2 годин, тоді як індукційна NOS фагоцитуючих клітин активується через 8-12 годин після інфікування.

Показано, що бактеріальні NOS беруть участь в захисті від пошкоджень, спричинених УФ-радіацією, причому вірогідною мішенню дії NO є процеси, пов'язані із репарацією і стимуляцією росту. NO знижує також чутливість бактерій до антибіотиків, а одним з механізмів цього ефекту може бути безпосередній вплив на структуру останніх.

Отже, оксид азоту – майже універсальна сигнальна та регуляторна молекула. За низьких концентрацій він забезпечує нормальне функціонування клітин різних типів. За гіперпродукції, особливо у випадку надлишкового утворення активних форм кисню, проявляються цитотоксична дія NO та його похідних. Останнє має як фізіологічно значущу захисну дію, так і може призвести до загибелі клітин за розвитку патологічного процесу.

В ряді джерел оксид азоту разом з монооксидом вуглецю (CO) та сірководнем ( $\text{H}_2\text{S}$ ) відносять до групи *газоподібних месенджерів*. Їхня фізіологічна активність подекуди має спільні риси, як-от релаксація гладеньких м'язів, антиадгезивний та дезагрегуючі ефекти. Ендогенним джерелом CO є гемокси-

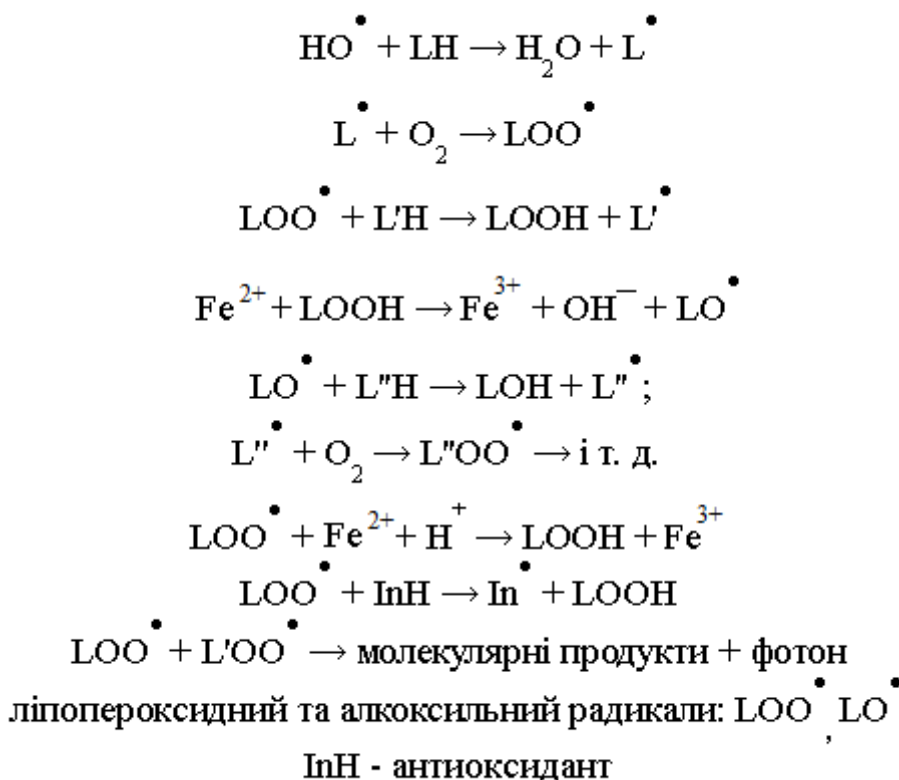


геназна реакція, тоді як сірководень утворюється переважно за метаболізму цистеїну. Важливим ефектом  $H_2S$  в клітинах є активація калієвих каналів, зокрема АТР-чутливих. Монооксид карбону здатний до активації рочинної гуанілатциклази.

**12.2. Метаболізм, вибрані біохімічні і фізіологічні ефекти активних форм кисню.** Фізіологічними концентраціями  $H_2O_2$  вважаються мікромольні і субмікромольні, хоча локальні, наприклад в ендосомі, можуть бути суттєво вищими. Основними джерелами АФК в нормі є флавінові оксидази, передусім NAD(P)H-оксидаза, мітохондрії, реакції окисного обміну арахідонової кислоти, мікросомальна цитохромна система. За гіпоксії посилюється значення ксантиоксидази. Термінують АФК-сигнал (ROS signaling) і підтримують низьку фізіологічно значущу концентрацію АФК в клітині пероксиредоксини, глутатіонзалежна антиоксидантна система, каталаза. Значна роль належить супероксиддисмутазі, яка конвертує супероксид-аніон у пероксид водню. Вищеперелічені ензими разом з відповідними неензиматичними процесами є системами антиоксидантного захисту. Неензиматична система представлена антиоксидантами. Антиоксиданти - сполуки, які уповільнюють реакції вільнорадикального окислення. Вони здатні зв'язувати вільні радикали з утворенням неактивних похідних. Серед природніх антиоксидантів можна відмітити вітамін Е (токофероли), аскорбат, низькомолекулярні тіоли (глутатіон), біофлаваноїди; в медицині та промисловості використовують також синтетичні антиоксиданти.

За зміщення анти-прооксидантної рівноваги і генерації надлишку АФК розвивається окисний або оксидативний стрес, який супроводжується посиленням перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) (див. схему нижче). ПОЛ – це явище окислення ненасичених жирних кислот по подвійним зв'язкам з утворенням пероксидів ліпідів, яке супроводжується генерацією вільних радикалів різної хімічної природи. Інтенсивне перекисне окислення пошкоджує клітинні мембрани, інактивуються мембранозв'язані ензими тощо. Для оці-

нки інтенсивності ПОЛ використовують аналіз вмісту продуктів – дієнових кон'югатів (рання стадія) та малонового альдегіду (пізня стадія). Утворення активних форм кисню та вільнорадикальні реакції ліпідів лежать в основі власної хемілюмінесценції (біолюмінесценції):



Зазначені процеси в тканинах посилюються за присутності вільних металів змінної валентності, зокрема заліза (фентінівські умови).

Поряд з цим, використовують термін нітрозативний стрес, акцентуючи увагу на надмірній продукції активних форм азоту. Часто-густо за патологічних умов має місце одночасна гіперпродукція активних форм азоту та кисню в клітинах. Вона ж є одночасно причиною і наслідком мітохондрійної дисфункції.

*NAD(P)H-оксидазний комплекс (NOX)*. За дії мікроорганізмів та розчинних стимуляторів в професійних фагоцитах (нейтрофілах, гранулоцитах, моноцитах) розвивається дихальний вибух. До 90% кисню, котрий споживається нейтрофілами за дихального вибуху, витрачається на синтез супероксид-аніону, який разом з іншими активними формами азоту та кисню бере участь у знищенні мікроорганізмів. Ізоформи NOX містяться в плазматичній

мембрані, мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі еукаріотичних клітин. Частина з них продукують  $O_2^-/H_2O_2$  внутрішньоклітинно у низьких сигнальних концентраціях.

Структура NOX. Її краще розглянути на прикладі NOX2, яка експресується в нейтрофілах та моноцитах, а також в інших клітинах у менших кількостях. Складається з мембранозв'язаних та цитозольних субодиниць, які збираються в активний комплекс за стимуляції клітин. Зв'язаною з плазматичною мембраною компонентою є цитохром  $b_{558}$ , який включає глікозилізовану по аспартату (gp91 або gp91 phox, phagocyte oxidase) та неглікозилізовану субодиниці (p22). N-кінцева ділянка gp91 містить шість трансмембранних  $\alpha$ -спіралей та ділянки глікозилування на позаклітинних  $\beta$ -петлях. До C-кінцевої цитозольної частини входять сайти зв'язування NAD(P)H та FAD. N-кінцевий фрагмент p22 містить дві трансмембранні  $\alpha$ -спіралі, а C-кінець – неспіралізований поліпроліновий мотив, який взаємодіє з SH3-доменом цитозольної субодиниці p47, а також ділянки фосфорилування по треоніну в процесі активації, які також взаємодіють з p47. Під час збирання комплексу p22 залучає цитозольні субодиниці, зв'язуючи p47. До складу цитохрому входять також дві гемові простетичні групи, які розташовані паралельно площині мембрани з різних її боків між III та V трансмембранними доменами. Тобто флавоцитохром  $b_{558}$  містить всі компоненти оксидази, але його активність повністю залежить від цитоплазматичних кофакторів. Субодиниця p47 виступає як регуляторний і адаптерний протеїн, який посилює взаємодію інших компонентів в 50-100 разів.

Структура p47. В ізоформах NOX1 та NOX3 позначається як NoxO – організуюча субодиниця. Починаючи з N-кінця протеїну виділяють PX (phox) домен, який бере участь у взаємодії з фосфоліпідами мембран та актином цитоскелета і є різновидом PH-домену. Надалі розташовані два SH3-домени, які взаємодіють з поліпроліновими фрагментами, полікатіонна ділянка, збагачена аргініном і лізином та одинадцять ділянок фосфорилування по серину, дві з яких є критичними для самозбирання та активації. На C-кінцевому фрагме-

нті розташований поліпроліновий мотив. У нестимульованій клітині p47 знаходиться окремо або у вигляді комплексу з цитозольними субодинамиціями p67 та p40. Фосфорилування по серину здійснюється ізоформами PKC, MAP-кіназами, PKB, казеїнкіназою 2 тощо, що залежить від характеру стимуляції. До стимуляції p47 самоінгібована за рахунок взаємодії SH3-доменів з полікатіонним фрагментом та PX-доменом. Фосфорилування призводить до зміни конформації, демаскування SH3-доменів і їх взаємодії з поліпроліновими мотивами протеїнів-партнерів p22 та p67.

Структура p67. В ізоформах NOX1 та NOX3 позначається як NoxA – активуюча субодинамиця. Включає чотири N-кінцевих мотива TPR (Tetratricopeptide Repeat), які забезпечують GTP-залежне зв'язування з субодинамицею Ras. Надалі розташований “домен активації”, який взаємодіє з цитохромом b<sub>558</sub>, що бере участь у транспорті електронів та абсолютно необхідний для активації NOX. За ним розташовані поліпроліновий мотив і два SH3-домена. Регуляторне фосфорилування p67 здійснюється по залишкам треоніну.

Механізми активації NOX 1-3. При зв'язуванні лігандів (інсулін, фактори росту) з відповідними рецепторними тирозинкіназами фосфорилується і активується PLC $\gamma$ , яка містить SH2-домен. Внаслідок гідролізу PIP2 утворюється DAG та IP3, зростає концентрація Ca<sup>2+</sup> в цитозолі, активується PKC та інші протеїнкінази. Подібна послідовність сигнальних подій може мати місце і за умови залучення нерцепторних тирозинкіназ. Фосфорилування p47 знімає аутоінгібування цієї субодинамиці, що ініціює збирання комплексу. Рецептор-залежна активація Ras і PI3K призводить до фосфорилування PIP2 з утворенням PIP3. PX-домени субодинамиць p47 та p40 взаємодіють з мембраною через PIP3 (рис. 43). Фактор GEF малого G-протеїну Ras1/2 також включає PH-домен і в процесі рецептор-залежної активації стимулює Ras. Далі G-протеїн зв'язується з p67 і активує його. На C-кінцевій ділянці Ras знаходиться залишок ізопрену, який забезпечує взаємодію з мембраною, важливим у структурі G-протеїну є також “домен вставки”.

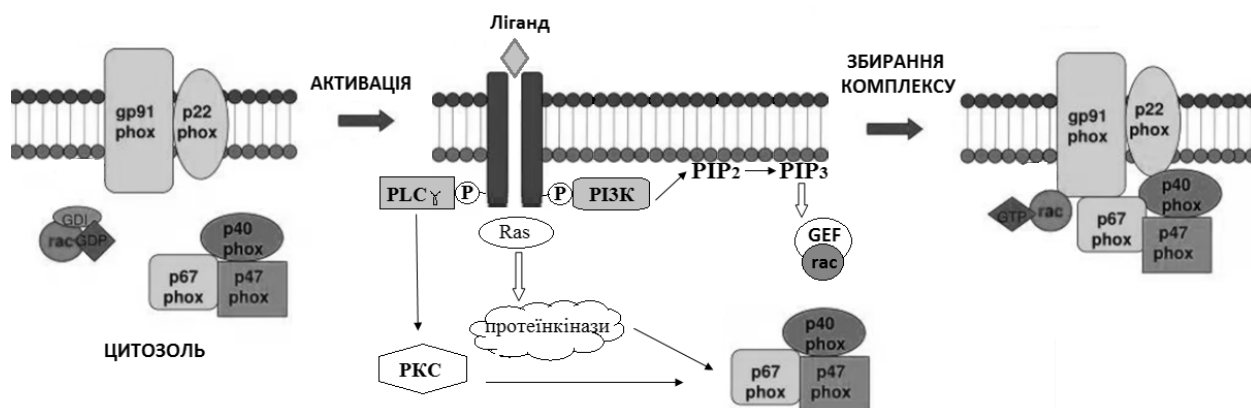


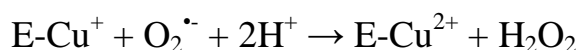
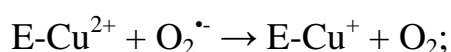
Рис. 43. Активація збирання  $NAD(P)H$ -оксидазного комплексу на прикладі  $NOX2$ . Пояснення в тексті

Системи антиоксидантного захисту клітини, які регулюють функціонування АФК-сигнальної системи. Експресія антиоксидантних ензимів регулюється цілим спектром факторів транскрипції, зокрема NF- $\kappa$ B, HIF-1, AP-1 тощо. Наприклад, транскрипційний фактор NRF2, зв'язуючись з ділянкою ARE промоторів, посилює експресію антиоксидантних ензимів. У процесі одноелектронного відновлення кисню найперше утворюється супероксид-аніон. Його перетворення на пероксид водню – сигнальну і регуляторну молекулу, може відбуватися як неензиматично, так і за участі супероксиддисмутази.

Супероксиддисмутаза (супероксид: супероксид редуктаза). Супероксиддисмутаза (SOD) представлена родиною металоензимів, які каталізують реакцію дисмутації супероксидних радикалів ( $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). SOD розглядають як першу ланку антирадикального захисту. Ензими розрізняються за первинною структурою та природою металів, які належать активному центру. Cu,Zn-SOD можна розглядати як еукаріотичний цитозольний ензим, Fe-SOD та Mn-SOD як прокаріотичні ензими, втім Mn-SOD міститься в мітохондрійному матриксі еукаріот. SOD мають здебільшого внутрішньоклітинну локалізацію, але невелика частина їхньої активності знайдена в позаклітинних рідинах ссавців, де описаний глікозильований тетрамер Cu,Zn-SOD. За активністю SOD тканини ссавців розрізняються у десятки разів. Найвища активність Cu,Zn- і Mn-SOD знайдена в печінці. Висока активність Cu,Zn-

SOD притаманна еритроцитам, що дозволяє використовувати кров як джерело для виділення і очищення ензиму.

Cu,Zn-SOD (SOD1) являє собою гомодимер з масою субодиниці 16 кДа. Порівняння амінокислотних послідовностей SOD із різних джерел вказує на висококонсервативну структуру. В мідь-зв'язувальний центр всіх ензимів входить чотири залишки гістидину, в цинк-зв'язувальний центр – два залишки гістидину та один аспартату. Необхідним для прояву ензиматичної активності є аргінін-143, а також єдиний на субодиницю дисульфідний місточок. Встановлено, що SOD вищих еукаріот має ацетильовану N-кінцеву послідовність. Нативний димер являє собою витягнутий еліпсоїд. Кожна субодиниця Cu,Zn-SOD має структуру бочонка (бета-бареля), сформованого вісьмома антипаралельними  $\beta$ -шарами і містить три виступаючих зовнішні петлі. Найбільша петля включає дисульфідний місток і ділянку зв'язування цинку. Розділення двох активних центрів у просторі і їх уявна ідентичність дозволяють припустити, що сильна димерна взаємодія забезпечує скоріше структурну стабільність SOD, а не ензиматичну функцію. Катіони міді та цинку розташовані на дні глибокого, вузького каналу, утвореного 18 амінокислотними залишками. Каталітичний цикл цього ензиму включає відновлення та окислення міді в активному центрі:



Мітохондрійний ізоензим (SOD2) має масу 79 кДа і виділений із матриксу. Він є тетрамером і чутливий, на відміну від SOD1, до кислотності середовища. Промотори генів обох ізоформ містять ділянки зв'язування для глюкокортикоїдів та прогестерону. Крім того, АФК здатні індукувати ген SOD2.

Екстрацелюлярна ізоформа (SOD3) знайдена у позаклітинному середовищі, а також в травних секретах, синовіальній рідині та сечі. Вона є гомотетрамерним глікопротеїном із масою 135 кДа, синтезується в клітинах гладенького м'язу судин, може бути слабко зв'язана із поверхнею плазматичної

мембрани за участі гепарансульфату. Вважають, що функція цієї ізоформи полягає у захисті від супероксид-радикалів позаклітинного середовища, де вони продукуються лейкоцитами та за умови ішемії-реперфузії. В ендотелії встановлюється динамічна рівновага між вільною і зв'язаною з плазмалеомою формою SOD3. В судинній стінці ензим забезпечує біодоступність оксиду азоту шляхом елімінації супероксид-аніону та відповідного унеможливлення його взаємодії з NO.

Зростання експресії SOD1 в клітині призводить до психічних вад, оскільки порушується обмін нейромедіаторів, в метаболізмі яких бере участь супероксид-аніон. Крім того, у пацієнтів знижується продукція  $O_2^{\cdot-}$  і мікробіцидна активність лейкоцитів. Низький вміст гену SOD1 або його відсутність чи мутації призводять до аміотрофічного латерального склерозу, який проявляється у треморі кінцівок, порушенні координації рухів та паралічі внаслідок втрати рухових нейронів за окисного стресу. Також має місце канцерогенез, зокрема тканини печінки, через підвищення проліферації на фоні окисного пошкодження макромолекул. Артеріоли мозку зазнають гіпертрофії, що призводить до погіршення вазодилатації.

Пероксидази. Група ензимів, яка відновлює пероксиди до спиртів або до води:  $ROOR_1 + \text{донор електронів} + 2H^+ \rightarrow ROH + R_1OH$ . Субстратом може виступати як  $H_2O_2$ , так і пероксиди ліпідів, а також інших органічних сполук. Ензими можуть бути або гем-вмісні (каталаза), або містять залишки цистеїну/селеноцистеїну в активному центрі.

До пероксидаз відносяться основні ензими, які підтримують низьку концентрацію  $H_2O_2$  в цитозолі – пероксиредоксини (Prx1, Prx2). Інші форми Prx розташовані в ендоплазматичному ретикулумі та мітохондріях, Prx4 та 6 є секреторними протеїнами. Вміст Prx в цитозолі напрочуд високий і сягає від 0,2 до 1% всіх розчинних протеїнів. Після окислення пероксидом водню Prx відновлюються за рахунок низькомолекулярних тіолів (тіоредоксин, глутатіон, глутаредоксин) або аскорбату. Трансдукція сигналу від рецепторів інсуліну та факторів росту супроводжується локальним зростанням

концентрації пероксиду водню. При цьому Prx1 інактивується в районі плазматичної мембрани внаслідок фосфорилування рецепторними тирозинкіназами, а Prx2 – шляхом окислення пероксидом водню. Внаслідок цього біля тирозинкіназного рецептору формується зона із підвищеним вмістом  $H_2O_2$ . Prx здатні відновлювати органічні пероксиди до спиртів, а також руйнують пероксинітрит (пероксинітритредуктазна активність). Каталітичний механізм в усіх випадках подібний.

Молекула Prx не містить простетичних груп, але на N-кінці розташовується так звана пероксидазна сульфгідрільна група, яка здатна окислюватись пероксидом водню з утворенням сульфенової кислоти (Cys - S<sub>p</sub>OH). Остання відновлюється лише за наявності достатньої кількості внутрішньоклітинних тіолів. За особливостю будови виділяють три підгрупи Prx: двоцистеїнові, одноцистеїнові та нетипові двоцистеїнові Prx. Молекула двоцистеїнових Prx крім пероксидазної групи містить на C-кінці також редуруючу сульфгідрільну групу. Ензим є гомодимером і розташування субодиниць таке, що пероксидазна група однієї субодиниці розташована разом із редуруючою групою іншої (рис. 44).

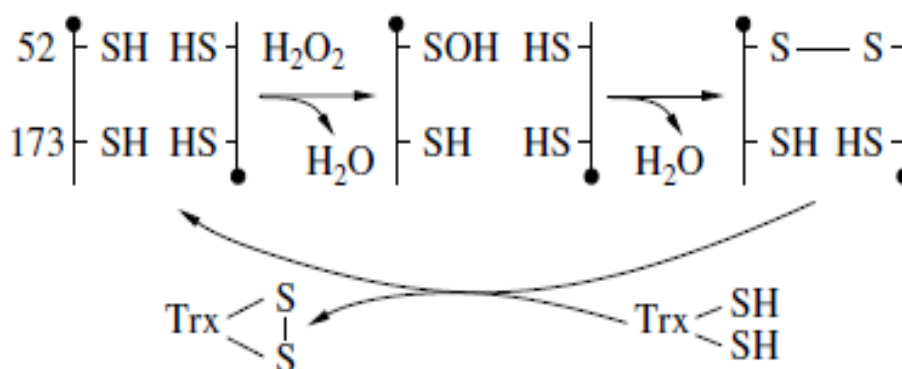


Рис. 44. Схема функціонування двоцистеїнових пероксиредоксинів, Trx - тіо-редоксин

В ході реакції, яка протікає шляхом тіол-дисульфідного обміну утворюється дисульфідний зв'язок між пероксидазною і редуруючою групами субодиниць, який відновлюється за участі внутрішньоклітинних тіолів.



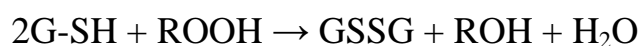
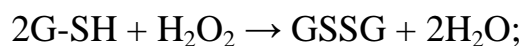
Тіоредоксин відновлюється за участі тіоредоксинредуктази – флавопротеїну, що використовує НАДРН як джерело відновлювальних еквівалентів. У нетипових двоцистеїнових P<sub>rx</sub> пероксидазна та редукуюча групи утворюють внутрішньоланцюговий дисульфідний зв'язок. У випадку одноцистеїнових P<sub>rx</sub> єдина пероксидазна група гомодимеру окислюється до сульфенової кислоти.

Будь-яке підвищення вмісту H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клітині вище за пороговий рівень призводить до окислення сульфгідрільних груп P<sub>rx</sub> до сульфінової або сульфонової кислот (Cys - S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H або Cys - S<sub>p</sub>O<sub>3</sub>H), що супроводжується втратою каталітичної активності. Існує аргументоване припущення, що пероксиредоксини за рахунок високої цитозольної концентрації відіграють роль редокс-буферів, які підтримують низький рівень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клітині за відсутності сигналу. Внаслідок рецептор-залежної стимуляції синтезу пероксиду водню ця система тимчасово інактивується і дає можливість проходженню редокс-сигналу. Ідентифікований ензим сульфїредоксин, який відновлює сульфінати за присутності АТР, глутатіону або тіоредоксину. Коли рівень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клітині знижується глутатіонпероксидазою та каталазою, сульфїредоксин повільно відновлює пероксиредоксини.

Пероксиредоксини здатні утворювати високомолекулярні протеїнові комплекси (до 1000 кДа, маса мономерів 22-30 кДа), які складаються із дисків, що розташовані стопками. Такий процес відбувається внаслідок гіперокислення протеїнів, при цьому втрачається пероксидазна активність, водночас з'являється шаперонна. Фосфорилування P<sub>rx</sub> по залишку Thr90, який розташований біля пероксидазної групи, також переключає ензим від пероксидазної до шаперонної активності. Фосфорилування призводить до появи від'ємного заряду біля пероксидазної групи, що підвищує рK<sub>a</sub> останньої і робить її нечутливою до дії пероксиду водню. Отже, P<sub>rx</sub> здатні захищати протеїни від неправильної укладки і агрегації, які супроводжують окисний стрес.

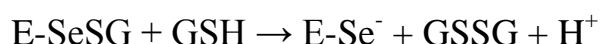
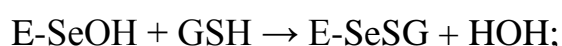
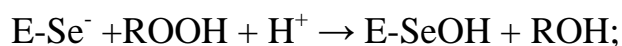
### Глутатіонпероксидаза (глутатіон: пероксид водню оксидоредуктаза).

Разом з глутатіонредуктазою та глутатіон-S-трансферазою відноситься до глутатіон-залежної антиоксидантної системи. Каталізує реакції відновлення глутатіоном пероксиду водню до води або органічних гідропероксидів до спиртів. Сам глутатіон при цьому окислюється:



До органічних гідропероксидів, які є субстратами цієї реакції, відносяться гідропероксиди поліненасичених жирних кислот (лінолевої, лінолено-вої), пероксиди холестеролу, прогестерону, гліцеролу, вітаміну К, тиміну, урацилу, простагландинів, аліфатичних та циклічних вуглеводів тощо.

Глутатіонпероксидаза (ГПО) - це гомотетрамер, маса субодиниці складає 18-25 кДа. Кожна субодиниця складається з 187-201 амінокислотного залишку, одним з яких є унікальна амінокислота селеноцистеїн. До складу каталітичного сайту входить три амінокислоти: селеноцистеїн, глутамат та триптофан, які в нативній конформації просторово зближені. Центр зв'язування глутатіону містить чотири залишки аргініну і один лізину. Селеноцистеїн відіграє ключову роль в каталізі:



Для синтезу ГПО в клітині абсолютно необхідний селен, який поступає до організму з рослинною їжею, крім того селен посилює активність ензиму. Його індукторами виступають також жіночі статеві гормони та  $\text{Ca}^{2+}$ . Дефіцит вітаміну А знижує активність ГПО в печінці.

Крім вищеописаної ГПО1, яка є загально розповсюдженою і міститься в цитозолі та мітохондріях, існує ряд ізоформ ензиму.

ГПО2 (селенонезалежна) ототожнюється з окремими формами глутатіон-S-трансферази. Вона розташована в епітелії кишківника, каталізує дегра-

дацію лише органічних гідропероксидів і послуговує бар'єром для ксенобіотиків, які містяться в їжі.

ГПО3 є селенозалежною і міститься в плазмі крові, де захищає форменні елементи та протеїни від  $H_2O_2$  та органічних гідропероксидів. Синтезується в нирках. Основна її функція – збільшення біодоступності NO як вазорелаксанта та інгібітора агрегації тромбоцитів. Захищає також фібриноген від посттрансляційних модифікацій АФК.

ГПО4 є мембранозв'язаною формою, яка здатна відновлювати гідроперокси фосфоліпідів, що інтегровані в мембрану, і гідроперокси у складі ліпопротеїнів низької щільності. Вважають, що вона тотожна фосфоліпідгідропероксид глутатіонпероксидазі.

Дефіцит ГПО1 призводить до пошкодження мітохондрій і знижує продукцію енергії, наслідком чого є затримка росту та розвитку. Погіршується діяльність серця, розвивається атеросклероз, посилюються окисні пошкодження нейронів мозку, спостерігається катаракта. Однією з причин цих патологічних процесів є зниження біодоступності NO внаслідок взаємодії з АФК.

Відновлює глутатіон глутатіонредуктаза. Це локалізований в цитозолі FAD-вмісний ензим, який складається з двох ідентичних субодиниць.

У знешкодженні вторинних продуктів пероксидації важливу роль відіграють глутатіон-S-трансферази. Вони зв'язують з глутатіоном найбільш токсичні продукти ПОЛ.

Каталаза (пероксид водню: пероксид водню оксидоредуктаза). Ензим знайдений в пероксисомах, де відбувається окислення жирних кислот, одним з продуктів якого є пероксид водню, а також синтез холестеролу та жовчних кислот. Каталазна активність знайдена також в цитозолі. В багатьох тканинах активність каталази і супероксиддисмутази змінюються односпрямовано. Ензим перешкоджає накопиченню продукту супероксиддисмутазної реакції, розщеплюючи пероксид водню на воду і кисень:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ . Каталаза має масу 248 кДа, являє собою тетрамер з чотирьох поліпептидних ланцюгів, кожний з яких містить гемову групу. Ензим має надвисоку швидкість каталі-

зу: за 1 с розкладається 44000 молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В ході реакції утворюється комплекс ензиму з однією, а потім з другою молекулою пероксиду водню. Деградація  $\text{H}_2\text{O}_2$  супроводжується переходом каталази з одного конформаційного стану в інший: ферикаталази, коли атом заліза координований із молекулами води, до сполуки, в якій залізо утворює комплекс із киснем. Каталаза здатна проявляти також і пероксидазну активність при зростанні концентрації ензиму та донорів протонів:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RH} \rightarrow \text{R}^\bullet + 2\text{H}_2\text{O}$ . Найбільш висока активність каталази в пероксисомах печінки, а також в лейкоцитах, де каталаза захищає від наслідків дихального вибуху.

До активного центру, який формується за участю 4 гемових груп, веде вузький канал, що забезпечує проникнення лише дрібних молекул. При дисоціації субодиниць активність втрачається. Кожна субодиниця каталази містить великий домен з антипаралельними  $\beta$ -шарами та спіральними включеннями, а також малий домен з чотирма  $\alpha$ -спіралями.

*Біохімічні і фізіологічні ефекти АФК. Інгібування тирозинфосфатазної та стимуляція тирозинкіназної активностей.* Стимуляція сигнальних каскадів тирозинкіназних рецепторів з боку пероксиду водню може бути наслідком інгібування фосфотирозинфосфатаз, наприклад РТР-1В. Цей ензим протидіє випадковій активації рецепторів із тирозинкіназною активністю. При зв'язуванні лігандів кіназна активність рецепторів зростає, а РТР-1В інгібується  $\text{H}_2\text{O}_2$ , який одночасно продукується NAD(P)H-оксидазою. Протеїни-мішені пероксиду водню, зокрема фосфотирозинфосфатази, часто мають специфічне розташування залишків цистеїну в активних центрах: Cys-X-X-X-X-X-Arg-, де X – будь-яка амінокислота. Внаслідок дії позитивно зарядженого аргініну сульфгідрільна група іонізована і здатна окислюватись  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Активація кінази Src. Прикріплення клітин до позаклітинного матриксу супроводжується генерацією  $\text{H}_2\text{O}_2$  та активацією Src-кінази шляхом окислення залишку цистеїну. Обробка клітин, які експресують онкогенну форму v-Src антиоксидантами або мутація по  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чутливому цистеїну супрово-

джується зменшенням активності розчинної тирозинкінази, зниженням інвазивності клітин і здатності до субстрат-незалежного росту.

Регуляція утворення PIP<sub>3</sub>. Ras-залежна активація P13-кінази призводить до фосфорилування PIP<sub>2</sub> з утворенням PIP<sub>3</sub>. Зворотна реакція дефосфорилування здійснюється фосфатазою PTEN. Остання інактивується H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> шляхом окислення Cys-124.

Інсуліноподібні ефекти. Екзогенний H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активує P13-кіназу та Akt/PKB в інсулінозалежних клітинах. Припускають, що дія інсуліну супроводжується збиранням і активацією NAD(P)H-оксидази, генерацією H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> з подальшим інгібуванням фосфотирозинфосфатаз.

Відмічені біохімічні особливості дії пероксиду водню як сигнальної і регуляторної молекули можуть лежати в основі нижче описаних фізіологічних ефектів.

Стимуляція проліферації і ангиогенезу. Зростання проліферативної активності (посилення включення <sup>3</sup>H-тимідину) продемонстровано для лімфоцитів, фібробластів, міобластів, клітин лінії HeLa. Пероксид водню посилював формування контактів між ендотеліоцитами *in vitro*.

Посилення міграції клітин. Пероксид водню стимулює трансендотеліальну міграцію лімфоцитів, що активує запальні процеси. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> утворюється в ділянці тканинних уражень і призводить до переміщення в цю ділянку лейкоцитів. В моделях відновлення подряпини клітинного моношару та хемотаксису крізь напівпроникну мембрану за присутності H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> посилюється міграція кератиноцитів та гладеньком'язових клітин.

Стимуляція ендоцитозу. В ендотеліоцитах H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> посилює включення в клітини декстрану із флуоресцентною міткою.

Інші приклади впливу пероксиду водню на активність ензимів, які містять функціонально важливі сульфгідрильні групи, є інгібування Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТРази, Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-АТРази плазматичної мембрани, ацетилхолінестерази, ензимів електронно-транспортного ланцюгу та матриксу мітохондрій. Зазначені

ефекти знімаються за присутності дитіотреїтолу та  $\beta$ -меркаптоетанолу – хімічних агентів, які захищають –SH-групи від окисної модифікації.

Активація розчинної гуанілатциклази. Механізм стимуляції може включати метаболізм  $H_2O_2$  за участю цитозольної каталази, яка взаємодіє з ензимом, формуючи так званий проміжний комплекс I. Помірне окислення сульфгідрильних груп розчинної гуанілатциклази також є фактором стимуляції. Ці ефекти можуть лежати в основі інгібувальної дії  $H_2O_2$  за низьких концентрацій на агрегацію тромбоцитів та релаксації судинної стінки.

$H_2O_2$ -керовані  $O_2$ -сенсори легень і кровоносних судин. Відповідні структури розташовані в нейроепітеліальних тільцях легень, які складають біля 1% клітин легеневої тканини та розташовані в місцях галуження дихальних шляхів, а також в клітинах каротидного синусу судин. Сенсор включає два основні елемента: NAD(P)H-оксидазу та розташований поряд  $K^+$ -канал, який активується  $H_2O_2$  (рис. 45).

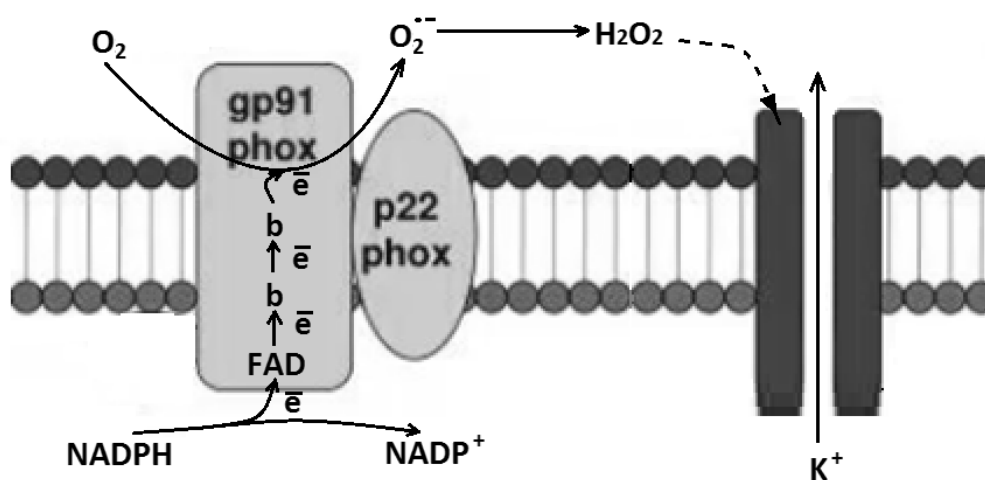


Рис. 45. Схема функціонування  $H_2O_2$ -керованого  $O_2$ -сенсору легень та кровоносних судин

Перехід від стану спокою до фізичного навантаження супроводжується посиленням споживання  $O_2$  в тканинах, інтенсифікується мітохондрійне дихання і знижується парціальний тиск  $O_2$ . За цих умов зменшується генерація  $H_2O_2$  NAD(P)H-оксидазою, знижується провідність  $K^+$ -каналів і плазматична мембрана деполаризується. Це призводить до виділення серотоніну та кате-

холамінів, які спричинюють релаксацію клітин гладеньких м'язів та розширення просвіту дихальних шляхів або кровоносних судин.

Компартменталізація  $H_2O_2$  в клітинах. Тирозинкіназні рецептори ростових факторів розташовані в рафтах плазматичної мембрани і після взаємодії з лігандом інтерналізуються в ендосому. Мембрана ендосоми містить також NAD(P)H-оксидазу. Супероксид-аніон синтезується у простір ендосоми і, конвертуючись в  $H_2O_2$ , створює високу локальну концентрацію останнього. Біля ендосоми локалізовані пероксиредоксини, а також фосфопротеїнфосфатази.  $H_2O_2$  дифундує з ендосоми, пероксиредоксини тимчасово інактивуються, а  $H_2O_2$  пригнічує активність фосфопротеїнфосфатаз. Це посилює фосфорилування залишків тирозину відповідних рецепторів і передачу сигналу. Подібна послідовність біохімічних подій, як припускають, реалізується у випадку дії EGF.

Більш детально розглянемо механізм активації MAP-кіназ, опосередкований АФК-залежною регуляцією кінази ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase-1), яка контролює MAP-кіназні підкаскади p38 і JNK. Активність ASK1 залежить від тіоредоксина – тіолвмісного протеїна, який виступає сенсором АФК. У відновленій формі тіоредоксин містить дві сульфгідрильні групи і взаємодіє з ASK1. При зростанні концентрації  $H_2O_2$  сульфгідрильні групи окислюються за участі тіоредоксинпероксидази, що призводить до дисоціації тіоредоксину від ASK1. Це надає змогу ASK1 взаємодіяти з активаторним фактором TRAF2 (TNF-receptor Associated Factor). Процес активації зворотній, що забезпечується тіоредоксинредуктазою за присутності NADPH. ASK1 фосфорилує і активує кінази наступного рівня (МКК3/4/6/7), які послідовно фосфорилують p38 і JNK як це зазначено на схемі трансдукції сигналу в MAP-кіназному месенджерному каскаді (рис. 46).

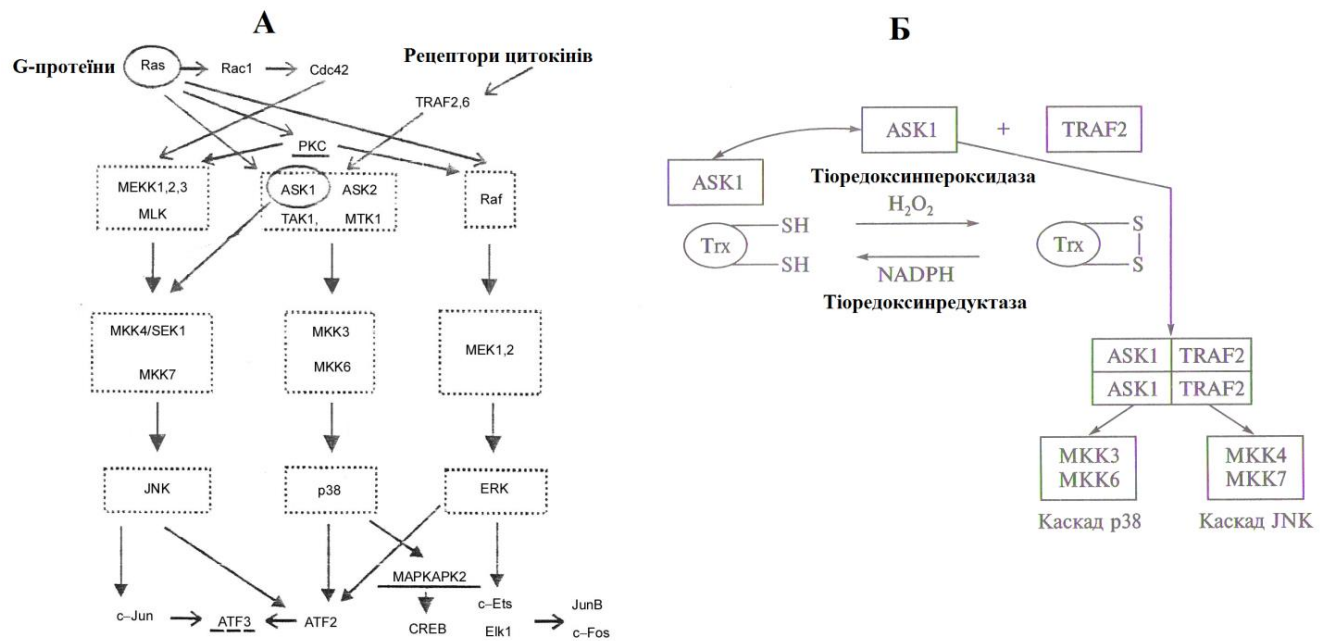


Рис. 46. АФК-залежна активація ASK1: А - місце ASK1 в MAP-кіназному месенджерному каскаді, зазначені три головні елементи MAP-кіназного месенджерного каскаду (МККК, МКК, МК) та вибрані фактори транскрипції, які знаходяться під їхнім контролем; Б – механізм регуляції ASK1 тіоредоксином. Позначення аналогічні тим, які наведено на інших рисунках

Активовані MAP-кіназами фактори транскрипції, наприклад, NF-κB, NIF1, AP-1 і інші, зв'язуючись з відповідними регуляторними ділянками генів, індуюють ряд ензимів – каталазу, супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу, гемоксигеназу й інші. Останні функціонують в клітині як антиоксидантні системи, що захищають її від гіперпродукції АФК, спричиненої окисним стресом, дією ксенобіотиків тощо. Ці дані дозволяють розглядати функціонування MAP-кіназної системи як механізм захисту від цитотоксичної дії надмірних кількостей АФК. Водночас, АФК через MAP-кіназний каскад стимулюють синтез прозапальних інтерлейкінів, хемокінів, що забезпечує мобілізацію захисних систем в імунокомпетентних клітинах та металопротеїназ, які здійснюють контроль за станом міжклітинного матрикса. За дії ксенобіотиків MAP-кіназна система індукує хінооксидоредуктазу, епоксигідроксилазу, UDP-глюкуронозилтрансферазу, ізоформи цитохрому P450, котрі забезпечують метаболізм ксенобіотиків і також захищають від наслідків окисного стресу.



## РОЗДІЛ 13. СИГНАЛЬНА СИСТЕМА ІНТЕРФЕРОНІВ

Інтерферони (ІФ) – це цитокіни, які являють собою невеликі глікопротеїни. Вони виробляються клітинами тварин, що проконтактували з вірусами, бактеріями, ліпополісахаридами тощо. Особливо ефективно індукують утворення ІФ віруси з дволанцюговою РНК, наприклад реовіруси. Інтерферони взаємодіють зі специфічними рецепторами на поверхні плазматичної мембрани, що призводить до запуску відповідних сигнальних шляхів. ІФ можуть діяти як паракринні, так і аутокринні регулятори. Інтерферони є елементами вродженої імунної системи, яка забезпечує першу ланку відповіді на потрапляння до організмів патогенів і реалізується протягом кількох годин. В подальшому залучається адаптивна імунна система, яка продукує антигени і формує імунну пам'ять. Інтерферони володіють противірусною, антипроліферативною та імуномодулюючими властивостями.

До інтерферонів I типу (ІФ I) належать інтерферони  $\alpha$ , або лімфоцитарний, та  $\beta$ , або фібробластний, які складаються з 166 амінокислотних залишків.  $\alpha$ -ІФ продукується макрофагами, гранулоцитами, лімфоцитами.  $\beta$ -ІФ синтезується моноцитами, епітеліоцитами, фібробластами. Їхніми індукторами виступають віруси, дволанцюгові РНК та у випадку  $\beta$ -ІФ також бактерії і полісахариди, що призводить до протимікробної дії. До II типу інтерферонів належить  $\gamma$ -інтерферон, який складається з 146 амінокислотних залишків. Його синтез активується мітогенами Т-лімфоцитів, клітинами пухлин, антигенами сенсibilізованих лімфоцитів.  $\gamma$ -ІФ продукується Т-лімфоцитами, макрофагами, дендритними клітинами, іншими імунними клітинами та спричинює імуномодулюючу дію. Виділяють також інтерферони III типу. Рецептори до ІФ I експресуються на всіх соматичних клітинах. Рецептори до ІФ II у великих кількостях містяться в плазмалемі Т-клітин, В-клітин, макрофагів, фібробластів тощо.

Експресія ІФ I регулюється екзогенними та ендогенними чинниками, пов'язаними із потраплянням до організму антигенів та/чи клітинною заги-

беллю. При цьому зазначені агенти зв'язуються з рецепторами *PRRs* (*Pattern Recognition Receptors*). Лігандами цих рецепторів виступають дволанцюгові ДНК, одно- або дволанцюгові РНК, глікопротеїни вірусів та бактеріальні ліпополісахариди, а також такі протеїни як флагелін та зимозан. В процесі ушкодження клітин господаря вивільняються протеїни теплового шоку, АТР, гепарансульфат, власна ДНК, які також слугують лігандами для *PRRs*. До *PRRs*, які залучені у розпізнавання вірусної інфекції, різноманітних патогенів та їх компонентів, залучені Toll-подібні рецептори, які забезпечують індукцію ІФ І та розвиток реакції запалення.

*Toll-подібні рецептори* експресуються як в імунокомпетентних клітинах, так і в керацитах шкіри, слизовій оболонці кишківника, клітинах мікроглії тощо. Toll-подібні рецептори належать до суперродини рецепторів до ІЛ-1 і включають більше дев'яти підтипів. Зокрема підтипи 1, 2, 4, 5 та 6 розташовані в плазматичній мембрані і залучені в передачу сигналу від ліпополісахаридів, пептидогліканів, флагеліну, зимозану тощо, які є компонентами поверхні грамнегативних, грампозитивних бактерій, джгутикових та дріжджів відповідно. Водночас рецептори 3, 7, 8, 9 підтипів розташовані у мембрані ендосом, де взаємодіють з бактеріальними та вірусними ДНК, вірусними дволанцюговими РНК, які потрапляють туди після ендоцитозу вірусів та бактерій клітинами господаря.

Toll-подібні рецептори є глікопротеїнами, які містять позаклітинний, трансмембранний та цитоплазматичний домени. При зв'язуванні ліганду утворюють гомо- або іноді гетеродимери. Позаклітинний домен характеризується багатими на амінокислоту лейцин повторами (*leucine-rich repeats*). Цитоплазматична частина рецептору містить *TIR-домен* (*Toll/Interleukin-1 Receptor domain*), який забезпечує передачу сигналу від активованого рецептора шляхом взаємодії з відповідними TIR-вмісними адаптерними протеїнами. Індукцію ІФ І типу в інфікованій клітині викликають рецептори 3, 7, 8 та 9 підтипів ендосом, а також 4 підтип плазматичної мембрани. Серед TIR-вмісних адаптерних протеїнів суттєве значення належить MyD 88 (*Myeloid Differenti-*

ation primary response gene 88). Цей протеїн містить на С-кінці TIR-домен, який забезпечує взаємодію з відповідними рецепторами, а на N-термінальному кінці так званий *Death Domain (DD)*, що обумовлює залучення у сигнальний модуль інші DD-вмісні протеїни, зокрема IRAKs (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinases). Разом із протеїнами-партнерами MyD 88 здійснює контроль над експресією прозапальних цитокінів, зокрема хемокінів, інтерлейкінів (IL-2, IL-6, IL-12), TNF- $\alpha$ , ІФ I тощо, в цей процес залучаються транскрипційні фактори NF- $\kappa$ B, AP-1 та IRFs (Interferon Regulatory Factors).

Після зв'язування лігандів і димеризації рецепторів відбувається залучення до їх цитозольної частини MyD 88, а через DD-домен в сигнальний комплекс рекрутуються протеїнкінази IRAK 4 та IRAK 1. Надалі IRAK 4 фосфорилує IRAK 1. Фосфорильований IRAK 1 зв'язує і активує TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6). Димер IRAK1-TRAF6 дисоціює від комплексу і активує кіназу TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$  Activated Kinase 1). TRAF6, як й інші члени цієї родини, є убіквітинлігазою, що здійснює поліубіквітинування і відповідну активацію TAK1. TAK1 взаємодіє з регуляторними протеїнами TAB1 та TAB2 (Transforming growth factor  $\beta$  Activated protein kinase 1, 2). Внаслідок цього відбувається активація NF- $\kappa$ B та AP1. Вищеописаний сигнальний механізм реалізується у випадку трансдукції сигналу від переважної більшості Toll-подібних рецепторів, хоча існують додаткові шляхи передачі сигналу для їх окремих підтипів. TAK1 є кіназою MAP кіназ, вона фосфорилує й активує JNK та p38. Надалі відбувається активація AP1 та зростання експресії інтерферонів. Окрім того, TAK1 фосфорилує та активує ІКК, що призводить до відповідного фосфорилування і протеосомної деградації інгібіторної субодиниці I- $\kappa$ B, зростання експресії залежних від NF- $\kappa$ B генів.

*Механізми дії інтерферонів різних типів на клітини подібні (рис. 47). Зв'язування інтерферонів з цитокіновим рецептором на поверхні клітин-мішеней веде до його активації, димеризації та залучення до сигналювання цитозольних JAK-кіназ. Останнє призводить до реципрокного фосфорилу-*

вання власне JAK-кіназ, а також і цитозольної частини рецептора, залишки тирозину яких набувають фосфатних груп. Це слугує молекулярною основою взаємодії з SH2-вмісними протеїнами, зокрема STATs. У випадку ІФ I в передачу сигналу залучаються Янус-кінази JAK1 та Tyk2 (Tyrosine kinase 2), тоді як при передачі сигналу від рецепторів ІФ 2 беруть участь JAK1 та JAK2. STAT фосфорилується, димеризується і транслокується до ядра, де активує транскрипцію генів, які кодують вірус-інгібіторні протеїни. STATs можуть утворювати як гомодимери (STAT1-STAT1), так і гетеродимери (STAT1- STAT2).

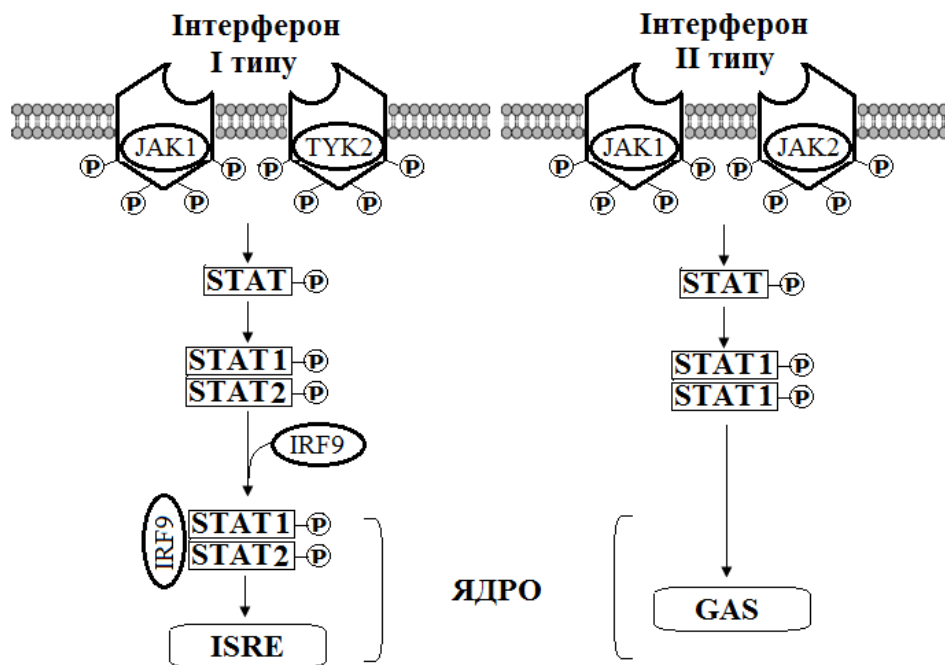


Рис. 47. Трансдукція сигналу за участі інтерферонів різних типів. Розшифровка абревіатур наведена в тексті

STAT1 визначає антивірусну, прозапальну і імуномодулюючу дію інтерферонів, викликаючи індукцію відповідних генів: головного комплексу гістосумісності, костимуляторних молекул, елементів системи комплементу, хемокінів, iNOS. Цей транскрипційний фактор опосередковує також антипроліферативні та проапоптозні ефекти інтерферонів.

STAT-2 є необхідним для відповіді на  $\alpha$ -ІФ та  $\beta$ -ІФ. STAT-1, STAT-2 та ще один транскрипційний фактор IRF-9 (Interferon Regulatory Factor 9) фор-

мують гетеромерний транскрипційний комплекс ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3), який відіграє ключову роль у  $\alpha$ -ІФ та  $\beta$ -ІФ сигналюванні. Цей комплекс транслокується до ядра і зв'язується з ISREs (IFN-Stimulated Response Elements) промоторних ділянок відповідних генів. Як ІФ I, так і II також індукують утворення STAT1–STAT1 гомодимерів, які транслокуються до ядра і зв'язується з GAS-елементами (IFN-G-Activated Site), присутніми у промоторі кожного ІФ-стимульованого гена (ISG, IFN-Stimulated Gene). Сигнальні шляхи ІФ III типу подібні до ІФ I типу. Комбінація різних STAT-вмісних комплексів може бути необхідною для оптимальної активації транскрипції низки генів. Інтерферони індукують експресію сотень генів, яка опосередковує численні біологічні відповіді.

Активация Jak/STATs сигнальних шляхів не забезпечує реалізацію всіх біологічних активностей інтерферонів I і II типів. Янус-кінази безпосередньо чи опосередковано регулюють кілька сигнальних каскадів, зокрема MAP-кіназний месенджерний шлях. Дивергенція у сигналюванні забезпечує плейотропні клітинні ефекти інтерферонів. Кілька інших ІФ-регульованих сигнальних елементів і каскадів необхідні для виникнення множинних відповідей. Деякі із цих шляхів відбуваються незалежно від Jak/STATs сигнальної системи. p38-сигнальний каскад є найважливішим із MAPKs щодо генерування ІФ-опосередкованих сигналів. Jak1 та Tak2 після активації інтерфероном фосфорилують і залучають до трансдукції сигналу фактори обміну гуанінових нуклеотидів, що призводить до подальшої активації малих G-протеїнів (Rac1), які регулюють сигнальний шлях p38. За дії Rac1 активується MAPKKK, надалі MAPKK3 і MAPKK6, які безпосередньо фосфорилують p38. Активована кіназа p38 стимулює протеїнкінази-2 і -3, які активуються MAPK (MAPKAPK2 і MAPKAPK3 відповідно). Також в процес передачі сигналу залучається MSK1 (Mitogen and Stress activated protein Kinase), і MNK1 (MAPK-interacting protein Kinase 1).

Кіназа p38 залучена в антивірусну відповідь ІФ зокрема  $\alpha$ -ІФ і необхідна для реалізації антилейкемічних властивостей ІФ. MAPKAPK2 активується

під впливом ІФ I типу в клітинах-попередниках гемопоетичних клітин, опосередковуючи сигнали, які пригнічують гемопоез.

За дії ІФ- $\gamma$  допоміжним регулятором Jak/STAT-сигнального шляху може виступати активація PI3K і  $\delta$ -ізоформи PKC. При цьому Янус-кінази беруть участь у активації PI3K. Остання фосфорилує і активує PKC- $\delta$ , яка, у свою чергу, регулює фосфорилування STAT-1 за Ser-727. Це потрібне для повної активації транскрипції генів-мішеней. Під час відповіді на дію інтерферонів PI3K-сигнальний шлях може опосередковувати як про-, так і антиапоптозні сигнали.

*Біологічна активність ІФ I пов'язана з посиленням експресії ряду протеїнів. Серед них 2',5'-олігоаденілатсинтетаза та протеїнкіназа R, які за дії ІФ I синтезуються в неактивному стані. Активаторами цих ензимів виступають передусім дволанцюгові вірусні РНК. 2',5'-олігоаденілатсинтетаза здійснює полімеризацію АТР, що пригнічує процес використання вірусами АТР для власних потреб. Олігоаденілати активують ендонуклеазу L, яка забезпечує деградацію вірусної одноланцюгової РНК.*

Протеїнкіназа R (РНК-залежна) є серин/треоніною протеїнкіназою, яка здатна фосфорилувати I- $\kappa$ B, що веде до активації NF- $\kappa$ B і посилення експресії залежних від нього генів. Цікаво, що при цьому відбувається зростання транскрипції в тому числі ІФ I, тобто спостерігається друга хвиля синтезу інтерферонів. Також за дії PKR фосфорилується еукаріотичний фактор ініціації трансляції eIF-2, що порушує синтез мРНК в клітині і відповідно утворення протеїнів патогенів. Фосфорилування таких транскрипційних факторів як IRF-1, STATs, p53 у низці випадків ініціює апоптоз і пригнічує розвиток пухлинних клітин.

## РОЗДІЛ 14. СЕНСОРНА ТРАНСДУКЦІЯ В ОРГАНАХ ЗОРУ ХРЕБЕТНИХ (ФОТОТРАНСДУКЦІЯ)

Світло через зіницю і кришталик потрапляє на сітківку ока. Сітківка складається з декількох шарів нейронів: первинні фотосенсорні нейрони (палички та колбочки), вставні/проміжні нейрони та гангліонарні нейрони, які через зоровий нерв передають сигнал до мозку. Палички сприймають світло низької інтенсивності, але не розрізняють кольорів (зір у сутінках), колбочки менш чутливі до світла, але розрізняють кольори (синій, зелений і червоний). В обох типах клітин виділяють зовнішній сегмент, який містить впорядковані стопки мембранних дисків з родопсином і cGMP-активовані іонні канали для  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$ , а також внутрішній сегмент, де локалізовані мітохондрії, ядро та  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза. Активація каналів викликає зниження мембранного потенціалу, а  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРази – зростання електричного потенціалу (гіперполяризацію мембрани). У темряві концентрація cGMP достатня для забезпечення оптимальної активності каналів, що підтримує величину потенціалу спокою біля -45 мВ. За дії світла фототрансдукція забезпечує послідовну активацію родопсину, аналога гетеротримерних G-протеїнів трансдукцину та фосфодіестерази, яка розщеплює cGMP з утворенням неактивного 5'-GMP. Канали знижують провідність і мембрана гіперполяризується приблизно до -75 мВ. Цей електричний сигнал надалі інтегрується вставними нейронами і передається на зоровий нерв. В подальшому рівень cGMP відновлюється гуанілатциклазою і величина потенціалу на мембрані досягає стану спокою.

У дисках зовнішнього сегменту паличок і колбочок розташовується протеїн родопсин, який складається з активної форми вітаміну А ретиналюта протеїну опсину. Він сім разів пронизує дискову мембрану, отже подібний до серпентинових рецепторів. Світлопоглинальним пігментом (хромофором) є ретиналь, який ковалентно зв'язаний з залишком лізину опсину і розташований вглибині подвійного шару. За дії світла відбувається фотохімічна реакція і 11-цис-ретиналь перетворюється на повністю-транс-ретиналь. Це індукує

конформаційні зміни опсину, його карбокситермінальний кінець взаємодіє у цитозолі зовнішнього сегменту з трансдуцином, який складається з  $T_{\alpha}T_{\beta}T_{\gamma}$ -субодиниць. Активованій родопсин ініціює заміну GDP на GTP в  $T_{\alpha}$ -субодиниці, що ініціює її дисоціацію від комплексу і подальше зв'язування з інгібувальною субодиницею фосфодіестерази. Остання є інтегральним ензимом дискової мембрани, а її активний центр розташований у цитозолі зовнішніх сегментів. Це специфічна щодо cGMP фосфодіестераза, яка зменшує концентрацію cGMP в цитозолі, наслідком чого є зниження провідності каналів і гіперполяризація мембрани паличок/колбочок. Інгибування надходження  $Ca^{2+}$  у фоторецепторну клітину на фоні активації  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$ -обмінника веде до зниження концентрації  $Ca^{2+}$  в цитозолі та активації ще одного інтегрального ензиму дискової мембрани гуанілатциклази, внаслідок чого концентрація cGMP повертається до рівня спокою, а мембрана паличок/колбочок реполяризується (рис. 48).

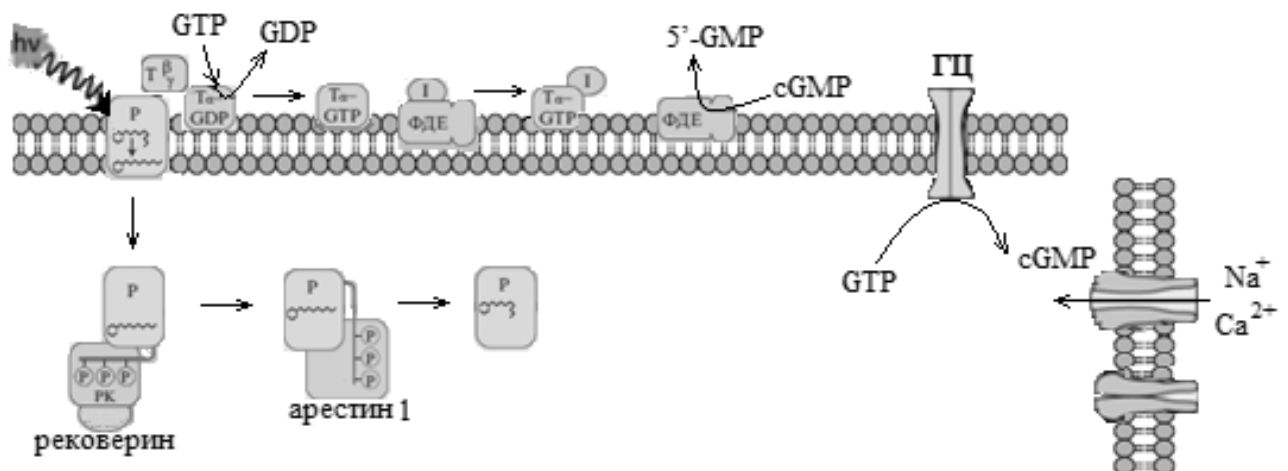


Рис. 48. Фототрансдукція в сітківці ока хребетних: *P* – родопсин, *T* – трансдуцин, *ФДЕ* – фосфодіестераза, *I* – інгібувальна субодиниця фосфодіестерази, *ГЦ* – гуанілатциклаза, *РК* – родопсинкіназа

Тривале освітлення призводить до десенсибілізації родопсину. За низької концентрації кальцію  $Ca^{2+}$ -зв'язувальний протеїн рековерин припиняє інгібувати родопсинкіназу, яка фосфорилує залишки серину/треоніну в карбокситермінальній частині родопсину. Родопсинкіназа десенсибілізує рецептор подібно до  $K_{\beta}$ -АР. Фосфорильований карбокситермінальний домен родопси-



ну зв'язує арестин 1 (гомологічний арестину 2), що блокує зв'язування і активацію трансдуцину. Через певний час арестин повільно дисоціює, родопсин дефосфорилується, повністю-*транс*-ретиналь заміщується на *цис*-ретиналь. Тобто відновлюється стан готовності до нової фототрансдукції (рис. 48).

Три типи колбочок сприймають світло трьох ділянок спектра за рахунок відмінних за амінокислотною послідовністю опсинів, внаслідок чого 11-*цис*-ретиналь перебуває у дещо відмінному оточенні, що і визначає різний максимум поглинання. Внаслідок значної ампліфікації сигналу око може сприймати зміну освітлення лише у кілька фотонів.

## **РОЗДІЛ 15. СИГНАЛЮВАННЯ У ПРОЦЕСАХ СПРИЙНЯТТЯ ЗАПАХУ І СМАКУ ХРЕБЕТНИХ**

*Нюхові нейрони* мають розгалуджені дендрити – війки, які занурені у слизовий шар. Одорант (нюховий подразник) з повітрям потрапляє до слизового шару та безпосередньо, або зв'язуючись зі спеціальними протеїнами, взаємодіє з рецепторами плазматичної мембрани війок. Ці рецептори являють собою варіант серпентинових рецепторів, а їхня цитозольна частина взаємодіє з гетеротримерним G-протеїном ( $G_{olf}$ ), який є аналогом  $G_s$ -протеїну або трансдуцину. Взаємодія з рецептором призводить до заміни GDP на GTP в субодиниці  $G_\alpha$ , яка дисоціює і активує мембранозв'язану аденілатциклазу, концентрація cAMP підвищується, на мембрані війок відкриваються cAMP-активовані  $Ca^{2+}$ - або  $Na^+$ -канали. При цьому відбувається незначна деполяризація – рецепторний потенціал. За умови дії достатньої кількості одоранта та активації  $Ca^{2+}$ -залежних Cl<sup>-</sup> каналів у нейроні виникає повноцінний потенціал дії, ця електрична активність сприймається мозком.  $Ca^{2+}$  знижує спорідненість каналів до cAMP, що зменшує чутливість до одорантів. GTP гідролізується, cAMP розщеплюється фосфодіестеразою, рецепторна кіназа фосфорилує і тимчасово інактивує рецептор, одорант дисоціює, в ряді випадків мета-

болізується; таким чином припиняються передача нюхового сигналу. В іншому варіанті трансдукції рецептори одорантів спряжені з PLC, надалі відкриваються  $\text{Ca}^{2+}$  канали, що активуються  $\text{IP}_3$ .

*Смакові нейрони* зосереджені в смакових бруньках на поверхні язика. В них серпентинові рецептори спряжені з G-протеїнами, що носять назву густдущини і дуже схожі на трансдущин. При трансдукції солодкого смаку альфасубодиниця густдущину активує аденілатциклазу, остання РКА, що викликає фосфорилування та інактивацію  $\text{K}^+$  каналів плазмалеми смакових нейронів. Блокування вихідного струму  $\text{K}^+$  спричинює деполаризацію, електричний сигнал передається до центрів нервової системи.

## РОЗДІЛ 16. СИГНАЛЮВАННЯ В МІКРООРГАНІЗМАХ І РОСЛИНАХ

*E.coli* реагує на появу у середовищі поживних речовин (амінокислот, вуглеводів) зміною напрямку руху. Атрактанти зв'язуються з рецепторним доменом на зовнішній поверхні інтегральних мембранних протеїнів, тоді як внутрішній цитозольний домен володіє протеїнкіназною активністю і фосфорилує залишок гістидину цитозольного домену. Тобто в цьому випадку працює рецепторна His-кіназа або перший компонент *двокомпонентної системи*. Вона також каталізує перенесення фосфатної групи від гістидину на залишок аспартату другого цитозольного компонента системи або регулятора відповіді. Останній переміщується до основи джгутіка і регулює рух. Таким способом сприймається і передається сигнал при зміні температури, рН, парціального тиску кисню тощо. У прокаріотів знайдені також серин/треонінові протеїнкінази, малі мономерні G-протеїни, SH3-домени і інші сигнальні протеїни.

В рослинах ідентифіковано подібні до тваринних елементи трансдукції сигналу, втім особливістю є відсутність РКА та РКГ. Менш поширені гетеротримерні G-протеїни, тирозинкінази, поодинокі серпентинові рецептори, майже відсутні ядерні стероїдні рецептори. Знайдено іонні канали, зокрема ті, що регулюються циклічними нуклеотидами та фосфоліпідами. В рослин-

них об'єктах не виявлено родопсину, проте існують інші світлочутливі пігменти. Сигнальні молекули представлено малими пептидами (близько сотні), похідними амінокислот (індолицтова кислота або ауксин), брасиностероїдами, аналогами простагландинів (жасмонат) та газоподібними сигнальними молекулами (етилен).

Наприклад, у проходженні сигналу від етилену задіяні як елементи прокаріотичної двокомпонентної системи, так і MAP-кіназного каскаду. Етиленовий рецептор плазматичної мембрани має гомодимерну будову і є двокомпонентною системою, один мономер якої містить і рецепторний домен (позаклітинний) і домен регулятора відповіді (цитозольний). Амінокислотна послідовність рецептору подібна до послідовності рецепторної His-кінази і, можливо, володіє подібною активністю. Надалі включається серин/треонінова протеїнкіназа CTR1, яка гомологічна Raf-кіназі і є МККК. У рослин в середовищі без етилену CTR1 перебуває в активному стані та інгібує MAP-кіназний сигнальний каскад. Етилен інактивує CTR1, внаслідок чого включаються шляхи проходження внутрішньоклітинного сигналу і залучаються транскрипційні фактори, які контролюють проростання насіння, дозрівання плодів тощо.

## РОЗДІЛ 17. РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

У культурі тваринні клітини мають клітинний цикл біля 24 годин. Фаза  $G_1$  циклу є найбільш тривалою (до 12 годин). В цей період синтезуються РНК та протеїни. В кінці фази  $G_1$  (від англ. Gap – проміжок між поділами) клітина проходить точку рестрикції, коли наступний її поділ стає неминучим. Після цього настає синтетична фаза S, під час якої подвоюється ДНК, а синтез протеїнів і РНК триває. Надалі клітина переходить до фази  $G_2$ , де продовжується синтез РНК і протеїнів. Потім відбувається поділ ядра з розходженням дочірніх хроматид, власне мітоз або M-фаза, та утворюються дві дочірні

клітини (цитокінез). Далі диференційовані клітини виходять з циклу – фаза  $G_0$ . Деякі залишаються такими все своє життя, наприклад гепатоцити та адипоцити, інші знову входять в ранню фазу  $G_1$  клітинного циклу.

У точно визначені проміжки часу фосфорилують субстрати і контролюють клітинний цикл циклін-залежні протеїнкінази CDKs (Cyclin-Dependent protein Kinases). CDKs утворюють гетеродимери з регуляторною і активаційною субодиницею – циклоном. Без циклінів CDK мають дуже низьку активність. Наразі ідентифіковано біля десятка циклінів і майже стільки ж CDK. CDK функціонують у М-фазі, причому для нормального перебігу мітозу необхідна їх початкова активація, а потім інгібування. Регулювання CDK здійснюється за кількома механізмами.

*Шляхом фосфорилування.* Фосфорильований залишок Tyr15 розташований біля АТР-зв'язувальної ділянки і тому CDK інактивована, бо негативний заряд блокує зв'язування АТР. Це блокування знімається специфічною фосфатазою. Якщо одна з ниток ДНК розривається, то активується кіназа, яка фосфорилує та інгібує вищезгадану фосфатазу, і клітинний цикл зупиняється в  $G_2$ -фазі до моменту репарації ДНК. З іншого боку, CDK може фосфорилувати цю фосфатазу і ще більше стимулювати власну активність. У CDK функціонує Т-петля, яка зв'язується в ділянці активного центру і блокує взаємодію з субстратами; фосфорилування Thr<sup>160</sup> у складі цієї петлі переміщує її за межі субстратв'язувальної щілини шляхом електростатичної взаємодії з залишками аргініну.

*Шляхом протеосомної деградації циклінів.* Посилення активності CDK призводить до фосфорилування й активації протеїну DBRP (Destruction Box Recognizing Protein), який зв'язується з сигнальною послідовністю N-кінця циклінів. Останнє має наслідком приєднання до циклінів залишків убіквітину відповідною убіквітинлігазою та їхню протеосомну деградацію. Тобто це регуляція за принципом зворотного зв'язку. Дефосфорилує DBRP відповідна фосфатаза.

*Цитокіни та фактори росту* контролюють клітинний цикл через MAP-кіназний месенджерний каскад, зокрема в цьому процесі залучені фактори транскрипції Jun та Fos, а також транскрипційний фактор E2F. Таким способом регулюється синтез циклінів, CDK та необхідних для реплікації ДНК ензимів.

*CDK контролюють клітинний цикл* за багатьма механізмами, наприклад, регулюють активність протеїну ретинобластоми (pRb), який вперше знайдено в лінії пухлинних клітин сітківки ока. Цей протеїн затримує поділ клітин в G<sub>1</sub>-фазі за наявності одноланцюгових пошкоджень ДНК. Нефосфорильований pRb зв'язує транскрипційний фактор E2F і блокує транскрипцію залежних від нього генів, які відповідають за реплікацію ДНК (ДНК-полімераза  $\alpha$ , рибонуклеотидредуктаза тощо). CDK фосфорилують pRb, E2F звільнюється і блокування циклу припиняється. При пошкодженні ДНК залучаються кінази ATM та ATR, які фосфорилують та активують протеїн p53, що посилює транскрипцію p21. Останній інгібує активність CDK. Цикл блокується.

## **РОЗДІЛ 18. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА І ОСНОВНІ ШЛЯХИ ПЕРЕБІГУ АПОПТОЗУ**

Функціонування клітин в багатоклітинному організмі за низки випадків закінчується генетично запрограмованою загибеллю клітин - **апоптозом**. Апоптоз сприяє збереженню порядку і нормального функціонування біологічних систем, захищає від мутантних, хворих клітин, тих, які закінчили свій життєвий цикл або виявились по тим, чи іншим причинам непотрібними. У процесі апоптозу фосфатидилсерин переходить із внутрішнього моношара плазмалеми у зовнішній, зменшується клітинний об'єм, зморщується плазматична мембрана, відбувається конденсація ядра і його фрагментація, спостерігаються розриви ДНК. Клітини подрібнюються на мембранні везикули (апоптозні тільця) з внутрішньоклітинним вмістом, які потім поглинаються

сусідніми або спеціалізованими фагоцитуючими клітинами. Субпопуляція Т-лімфоцитів (Т-кілери) мають змогу розпізнавати інфіковані клітини і викликають їх загибель за механізмом апоптозу. Цікавими прикладами апоптозу є формоутворення листя (*Monstera*), осінній листопад і дозрівання плодів. Тобто в нормальному організмі апоптоз є механізмом для підтримання гомеостазу. На противагу цьому, для **некрозу** характерні розриви плазматичної і внутрішньоклітинних мембран, руйнування органел, звільнення лізосомальних ензимів, вихід вмісту цитоплазми у міжклітинне середовище та розвиток запалення.

Апоптоз включається під впливом зовнішніх або внутрішніх сигналів і відбувається шляхом активації каскаду *каспаз*, яких налічується більше 14 ізоформ - еволюційно-консервативних протеаз, що містять залишки цистеїну в каталітичному сайті. Тобто апоптоз можна розглядати як фізіологічну відповідь, яка реалізується за допомогою специфічних сигнальних механізмів.

Виділяють кілька шляхів, за якими реалізується апоптоз, але головних серед них два. Важливе місце займає *рецептор-опосередкований механізм включення апоптозу*. Первинними месенджерами цього шляху виступають FAS-ліганди, які, зокрема, є інтегральними протеїнами Т-лімфоцитів. FAS-ліганди відносяться до великої родини факторів некрозу пухлин (TNF) і мають гомотримерну структуру. Відповідні рецептори на поверхні клітин називають FAS-рецепторами. Взаємодія FAS-лігандів з рецепторами призводить до кластерізації останніх і взаємодії їх цитозольних частин з адаптерними молекулами. З адаптерами взаємодіють ефекторні молекули - прокаспази. Взаємодія адаптера з рецептором і ефектором здійснюється шляхом взаємодій невеликих протеїнових доменів, зокрема, DD-доменів (Death Domain). Через адаптер FADD (FAS-Associated DD-protein) до процесу залучається центральна ініціююча прокаспаза 8. Комплекс FAS-ліганд-рецептор-адаптер-прокаспаза називається *апоптосою*. Прокаспази мають дуже незначну протеолітичну активність, яка складає 1-2% активності зрілих каспаз. Схема вищеописаних процесів наведена нижче (рис. 49). Просторове зближення

прокаспаз 8 призводить до само- або перехресного їх протеолізу, розщепленню на субодиниці з наступною специфічною асоціацією останніх (стадія процесінгу) та утворенню зрілої каспази 8. На цьому етапі ініціації інгібітори апоптозу (протеїни Bcl-2, Bcl-xL, вперше описані в В-клітинній лімфомі у якості продуктів онкогенів) та промотори апоптозу (протеїни Bax, Bad, Bak, Bid) можуть блокувати або посилити перебіг клітинної загибелі. Для цих протеїнів характерно утворення гетеродимерів, де партнери пригнічують один одного. Каспаза 8 шляхом протеолізу перетворює прокаспазу 3 в ефекторну каспазу 3, після чого апоптоз стає незворотнім. Відбувається активація інших ензимів родини каспаз,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -залежної ендонуклеази, що веде до розщеплення ДНК на нуклеосомні фрагменти. Каспази 3 та 7 також розщеплюють антиапоптозні протеїни (Bcl-2), а також інгібувальний фактор ICAD.

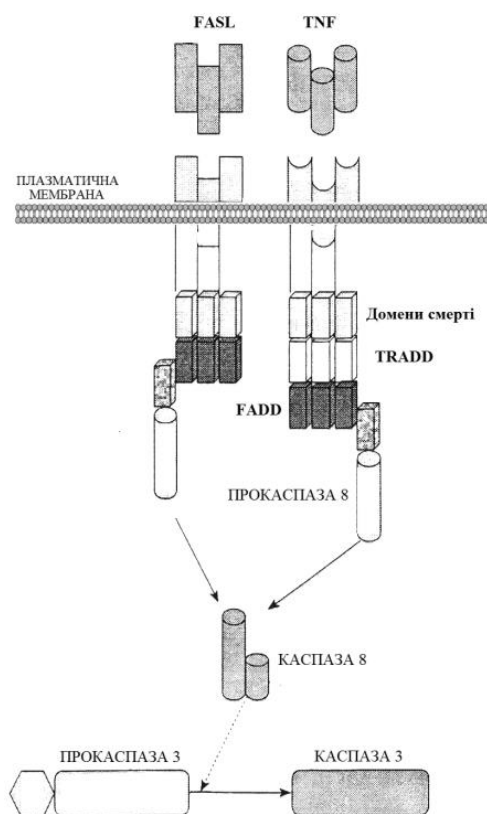


Рис. 49. Схема перебігу основних етапів рецептор-опосередкованого апоптозу

Внаслідок розщеплення інгібувального фактору CAD (Caspase Activated DNase) активується, що також веде до розщеплення ДНК на нуклеосомні фрагменти. Крім того, каспази гідролізують протеїни-ламіни, які армують

ядерну мембрану. Це веде до конденсації хроматину. Руйнуються протеїни, які формують цитоскелет. Інактивуються системи репарації, реплікації ДНК та сплайсингу мРНК.

Якщо сигналом до загибелі клітин виступають хеміотерапевтичні сполуки, УФ- та  $\gamma$ -опромінення, гіперпродукція NO чи АФК, то запускається шлях апоптозу, пов'язаний з дисфункцією мітохондрій (рис. 50).

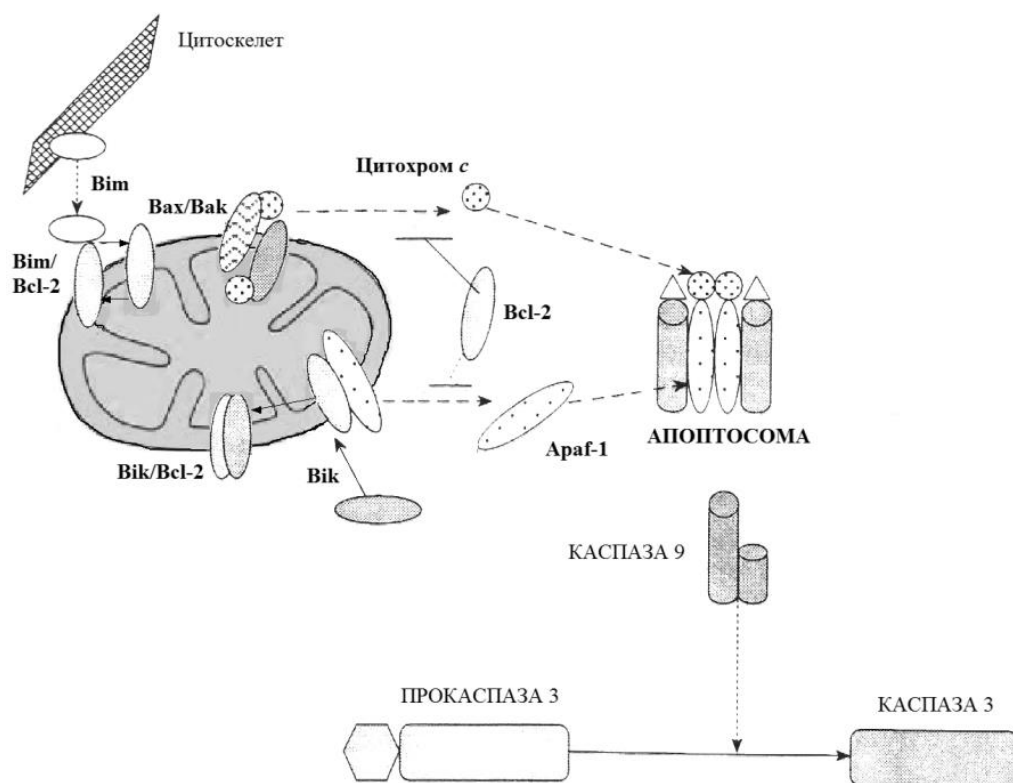


Рис. 50. Схема перебігу основних етапів опосередкованого мітохондріями апоптозу

Цей механізм індукується також ендогенними факторами, такими як нерепаровані розриви ДНК через залучення p53, підвищення концентрації вільного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  вище 1 мкМ, патологічне зниження вмісту в клітині NAD(P)H, АТР, АDP, відновленого глутатіону, гіперпродукція вільних радикалів за окисного вибуху тощо. За дії цих чинників різко знижується електричний потенціал на внутрішній мембрані мітохондрій, формуються гігантські пори діаметром біля 2,9 нм або пори перехідної провідності, РТР (Permeability Transition Pore), порушуються процеси окисного фосфорилування. Наразі склад РТР повністю не з'ясований. Існують докази, що він включає в



себе цитозольні протеїни (гексокіназу), протеїни зовнішньої мітохондрійної мембрани, а саме потенціалзалежний аніонний канал (VDAC), периферійний бензодіазепіновий рецептор (PBR), внутрішньомембранні мітохондрійні протеїни (креатинкіназу), АТР/АДР-антипортер, матриксний протеїн циклофілін Д. Згідно сучасних уявлень, основним структурним елементом пори є АТР-синтаза.

Провідність пори регулюється комплексом, до складу якого входять протеїни родин Bcl-2 та Bax. Зміна їхнього синтезу та стехіометрії протеїн-протеїнових комплексів буде впливати на проникність. Білок Bcl-2 та подібні “зачиняє” пору, а Bax й подібні за апоптогенного сигналу переміщуються до мітохондрійної мембрани і стимулюють відкриття пори. JNK, яка активується АФК, стрес-факторами, прозапальними цитокінами, через фосфорилування й інактивацію Bcl-2 стимулює апоптоз. РКВ, яка стимулюється факторами росту, шляхом фосфорилування та інактивації Bax перешкоджає апоптозу. За дії АФК у АТР/АДР-антипортері внутрішньоклітинної мембрани відбувається окислення SH-групи Cys-56. Після цього транспортер активно формує РТР.

Внаслідок відкриття пори порушується осмотичний баланс між матриксом та цитозолем, розбухає мітохондрійний матрикс, розривається зовнішня мітохондрійна мембрана і у цитозоль вивільнюються компоненти міжмембранного простору мітохондрій та матриксу. Серед цих компонентів найважливішими є прокаспази 2, 3, 9, апоптоз-індукувальний фактор AIF, цитохром с. Цитохром с разом з фактором АРАФ-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) за присутності АТР активують прокаспазу 9. АРАФ-1 є протеїном з молекулярною масою 130 кДа, що містить CARD-домен (Caspase Activation and Recruitment Domain). Гідроліз АТР призводить до конформаційних перебудов АРАФ-1, який набуває властивості зв'язувати цитохром с. Комплекс АРАФ-1-цитохром с олігомеризується, утворюючи восьмигранне кільце. До нього, як до арматури, приєднуються молекули прокаспази 9, а до них і прокаспаза 3, причому взаємодіють відповідні CARD-домени. Цей комплекс також називається

вають апоптосоною. Просторове зближення прокаспази 9 запускає міжмолекулярний протеолітичний процесинг з утворенням активної каспази 9, яка розщеплює і активує прокаспазу 3.

До додаткових механізмів вивільнення мітохондрійних міжмембранних протеїнів можна віднести гіперполяризацію внутрішньої мембрани з відповідним порушенням іонного транспорту і подальшим порушенням цілісності зовнішньої мембрани. Можливе також відкриття так званого гігантського протеїнового каналу зовнішньої мембрани.

Активація факторів транскрипції NF-κB та AP-1 пригнічують програмовану загибель клітин. Фосфорилування і інактивація протеїнів-промоторів апоптозу здійснюється ростовими факторами та цитокінами не тільки через активацію цитозольної PKB, а й PKA. АФК, які безпосередньо не взаємодіють з мітохондріями, також здатні ініціювати апоптоз. У цьому процесі важливу роль відіграє фосфатидилсерин зовнішнього шару плазмалеми. В нормальній клітині фосфатидилсерин розташований у внутрішньому шарі, причому транспорт фосфоліпіда забезпечується спеціальною АТРазою. Ця АТРаза інактивується окисленим фосфатидилсерином або не впізнає його. Існує спеціальний рецептор, який реагує на фосфатидилсерин зовнішнього шару плазмалеми. Від цього рецептору до мітохондрій передається сигнал апоптозу.

## **РОЗДІЛ 19. ПРОТЕЇНИ ЦИТОСКЕЛЕТУ ТА ТРАНСДУКЦІЯ СИГНАЛУ**

*Опорно-рухова субмембранна система або цитоскелет.* Цитоскелет спочатку був ідентифікований у найпростіших. У амеби – це досить лабільна ектоплазма гомогенної або фібрилярної структури. У інфузорії клітинний скелет постійний і представлений мікрофіламентами та мікротрубочками. У подальших ультраструктурних дослідженнях зазначені елементи були знайдені в спеціалізованих структурах: ворсинках, війках, джгутиках. Нем'язові клітини вищих організмів також здатні до руху. Наприклад, фібро-

бласти, оброблені гліцерином, який збільшує неспецифічну проникність мембрани, скорочувались при додаванні АТФ. Основна характеристика цитоскелету – динамічна нестабільність, яка досягається шляхом полімеризації-деполімеризації фібрилярних структур.

Цитоскелет вищих організмів побудований в основному з трьох структур: мікрофіламенти або мікрофібрили товщиною 5-7 нм, мікротрубочки (товщина 22 нм) та проміжні філаменти або скелетові фібрилярні структури (10 нм).

У структурному відношенні опорно-рухова субмембранна система є спеціалізованою частиною загальної внутрішньоклітинної системи. Але вона може виконувати і спеціалізовані функції, пов'язані з рецепцією і транспортом в плазмалемі. Протеїни цитоскелету відіграють роль у механізмах трансдукції клітинних сигналів. Вони обумовлюють специфічну локалізацію і координують переміщують протеїни плазматичної мембрани, у тому числі сигнальні. Мікрофіламенти часто асоційовані з мембранними рафтами та кавеолами.

*Протеїни цитоскелету.* Актин - протеїн, з якого складаються актинові філаменти або мікрофіламенти. Мономерний актин, що позначається як G-актин, є грушоподібної форми з масою 42 кДа і діаметром 4 нм. Молекула стабілізована внаслідок зв'язування  $Ca^{2+}$ . За наявності АТФ він полімеризується, перетворюючись на F-актин. Кожен філамент актина являє собою дві нитки шароподібних молекул, які обвиваються одна навколо одної з утворенням спіралі, подібно намисту (рис. 51).

У людини і ссавців ідентифіковано 7 генів, які кодують різні ізоформи протеїну, тоді як у рослин знайдено близько 60 генів. Молекула дуже консервативна, являє собою один поліпептид, N-кінцева частина якого ацетильована і містить 4-6 негативно заряджених залишків амінокислот. Амінокислотна послідовність в серцевому і скелетному м'язах включає 375 залишків, присутній 3-метилгістидин як наслідок посттрансляційної модифікації. Мономер зв'язує АТФ, АДФ,  $Mg^{2+}$  та  $Ca^{2+}$ . Складається з чотирьох доменів, між якими розташований сайт зв'язування з нуклеотидами та катіонами. Може гідролізувати АТФ та обмінювати АДФ на АТФ. При зв'язуванні АТФ змінюється

конформація молекули, за відсутності нуклеотиду протеїн швидко денатурує. G-актин і, відповідно, F-актин - полярна структура. Розрізняють “+”-кінець, який полімеризується швидше, та “-”-кінець, що полімеризується повільніше.

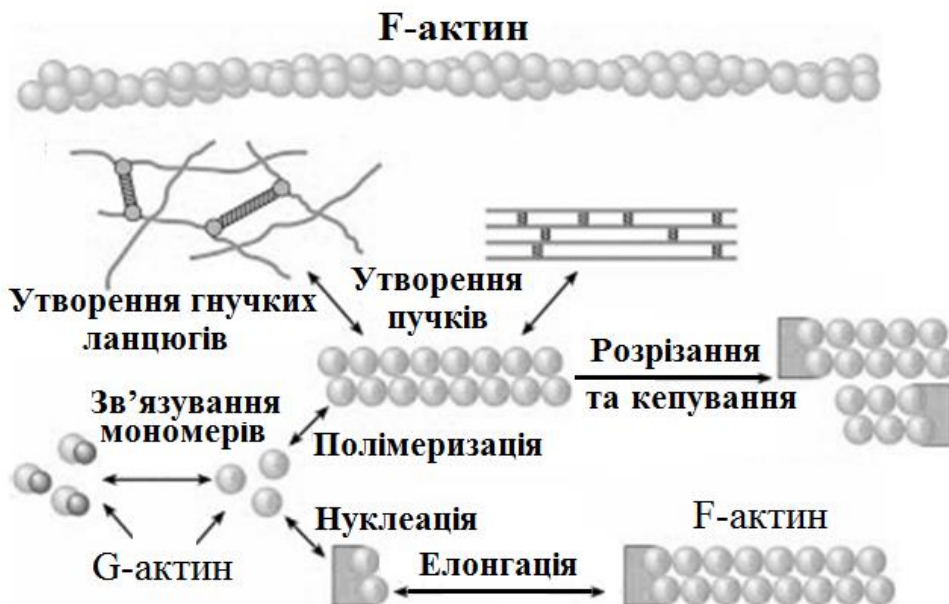


Рис. 51. Полімеризація актину

Полімеризація актину включає низку етапів, як зазначено на рисунку 51:

1. Активація мономерів, яка здійснюється при зв'язуванні  $Mg^{2+}$ , а також  $Na^+$  та  $K^+$ .

2. Нуклеація - процес “затравки”, якою виступає тример. Димер є нестійким, проте формування тримеру стабілізує комплекс, в подальшому приєднуються додаткові молекули і формується “сайт нуклеації”. Це лаг-фаза полімеризації.

3. Елонгація. Всі субодиниці філаменту мають однакову полярність і розташовуються АТР-зв'язувальною щілиною до мінус-кінця, де елонгація повільніша у 10 разів. Гідроліз АТР впливає на кінетику полімеризації, але не є критичним для її здійснення.

4. Стабілізація. Фаза рівноваги, при якій довжина полімеру залишається постійною за рахунок того, що приєднання і від'єднання мономерів йде з постійною швидкістю.

Регуляція полімеризації актину. Її здійснюють актиноподібні протеїни – Arp (Actin related protein), які гомологічні актину на 30-60%. Зокрема розрізняють Arp1, Arp2, Arp3 та інші. Особливе значення має гетеродимерний комплекс Arp2/Arp3, який має підвищену спорідненість до мінус-кінця актинових філаментів і є матрицею, на якій відбувається нуклеація. Зазначений комплекс включає в себе ще сім додаткових субодиниць регуляторних протеїнів. Він здатний приєднуватись до бічних частин філаментів, забезпечуючи їх розгалуження виключно під кутом  $70^\circ$  з утворенням мережі. Комплекс прискорює полімеризацію актину у 2-3 рази.

У клітинах еукаріот перебудови актинового цитоскелету відбуваються у відповідь на позаклітинні стимули, якими можуть виступати хімічні речовини або світло. Рецепторний протеїн передає сигнал на систему малих G-протеїнів (Rho/Rac/Cdc42) і на актиновий цитоскелет, що ініціює полімеризацію. Для цього процесу необхідний також протеїн-активатор WASP. Його абревіатура пішла від назви синдрому Wiscott-Aldrich - рідкого X-зчепленого захворювання, для якого характерні екзема, тромбопенія, кризава діуреза та імунодефіцит. WASP є багатодоменим протеїном і здатний зв'язувати комплекс Arp2/Arp3, малі G-протеїни, PIP2, мономерний актин, профілін тощо. На С-кінці WASP зв'язується мономерний актин і комплекс Arp2/Arp3, що просторово полегшує процес полімеризації. На N-кінці розташовані сайти взаємодії з G-протеїнами та PIP2, при їх зв'язуванні активується конформаційна перебудова протеїну. Деякі патогенні мікроорганізми використовують зазначені сигнальні механізми. Бактерія *Listeria monocytogenes*, що викликає енцефаліт, містить гомолог WASP мембранний протеїн ActA, який прискорює полімеризацію актину. Зазначена бактерія швидко рухається в цитозолі за рахунок актинових філаментів господаря. Збудник дизентерії *Shigella flexneri* містить мембранний протеїн, який здатний активувати WASP господаря за участі Cdc42, надалі Arp2/Arp3 ініціює полімеризацію актину.

PIP2 регулює збирання та розбирання актинових філаментів, взаємодіючи з низкою актин-зв'язувальних протеїнів. Серед них профілін, який секвеструє та сприяє збиранню актинових філаментів, гельзолін та северин, що їх розрізають, а також  $\alpha$ -актинін, який викликає взаємодію актинових філаментів один з одним. Взаємодія актин-зв'язувальних протеїнів з PIP2 сприяє полімеризації актину, а з  $\text{Ca}^{2+}$  – деполімеризації. Стимульований PIP2 профілін взаємодіє з G-актином з боку “+” кінця, залишаючи АТФ-зв'язувальний “-” кінець вільним для взаємодії з “+” кінцем філаменту. Комплекс профілін-Mg-АТР-актин подовжує “+”-кінець актинового філаменту. При приєднанні комплексу до філаменту профілін дисоціює від актину. Профілін діє також як фактор обміну нуклеотидів, підвищуючи пул АТР-актину, переводячи АТР-зв'язуючий сайт в більш відкриту конформацію. Профілін сприяє гідролізу АТР. Взаємодія профіліну з пролін-багатими мотивами сигнальних протеїнів мембран (Vasp, Mena) сприяє локалізації профілін-актинових комплексів біля мембрани.

У макрофагів продемонстровано регуляторну роль гельзоліну. Він взаємодіє з плазматичною мембраною, ендоплазматичним ретикулумом, мітохондріями та зв'язує PIP2, що блокує його функцію. При зростанні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі до мікромолярного рівня гельзолін звільняється та відкривається його актин-зв'язувальний сайт. Він взаємодіє із актиновими філаментами, змінюючи конформацію субодиниць і порушуючи зв'язки між ними, а також блокуючи “+” кінець актину і викликаючи фрагментацію та деполімеризацію філаментів.

Тубулін. Являє собою глобулярний протеїн з масою 50 кДа. Форми  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубуліну утворюють димери. Останні можуть залишатися в цитозолі у розчиненому стані або полімеризуватися за дії АТР з утворенням протофіламентів. Тринадцять протофіламентів формують спіральну полу структуру - мікротрубочку. Мікротрубочки є полярними утвореннями, оскільки їх субодиниці мають визначену орієнтацію у просторі. На кінцях мікротрубочки ростуть внаслідок полімеризації: “+” кінець росте швидше, “-” кінець повільніше.

Самоскладання трубочок стимулюється мінорними MAP-протеїнами, які також зумовлюють термостабільність структури. В організмі теплокровних мікротрубочки руйнується на холод, причому більш стабільними вони є в ЦНС. Адгезія клітин супроводжується самозбиранням мікротрубочок із глобулярного тубуліна, ці ж процеси мають місце при екзоцитозі.

*Моторні протеїни.* За участі АТФ спеціальні моторні протеїни кінезини рухаються по мікротрубочці до її плюс-кінця у напрямку до периферії клітини, а інші протеїни динеїни до її мінус-кінця, тобто до центру. Це один з механізмів спрямованого транспорту органел, ензимів та факторів транскрипції. Кінезин “повезе” органели чи протеїни до периферії клітини, а динеїн – до центру. Можливо, субстрати, які транспортуються, містять різні “мотори”, переключення між якими досягається шляхом фосфорилування. Вважають, що мікротрубочки є “магістральними дорогами” в клітині, а мікрофіламенти – “дорогами місцевого призначення”. До моторних протеїнів відносяться також міозини.

Кінезин масою 380 кДа є димером, хоча пропонуються й інші структури. В кожному мономері виділяють шароподібну голівку, сполучну ніжку та хвіст, який сполучається з органелою або протеїном, що транспортується. При гідролізі АТФ голівка змінює свій кут по відношенню до мікротрубочки за допомогою ніжки, як це зображено на схемі (рис. 52):

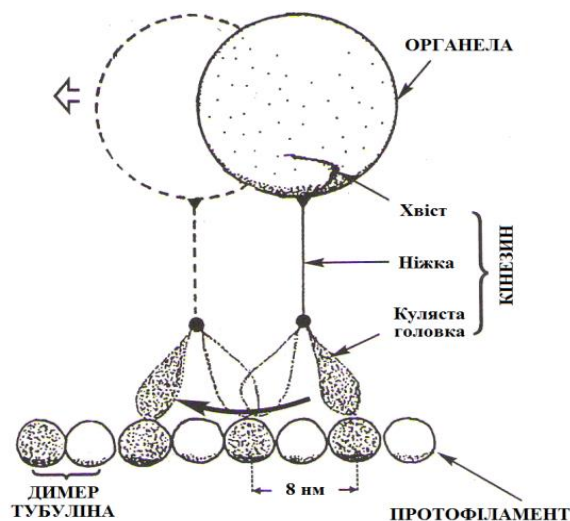


Рис. 52. Будова кінезину

Динеїн масою 1200 кДа складається з двох важких ланцюгів, які взаємодіють з мікротрубочками, а дрібні субдиниці захоплюють органелу або протеїн (рис. 53):

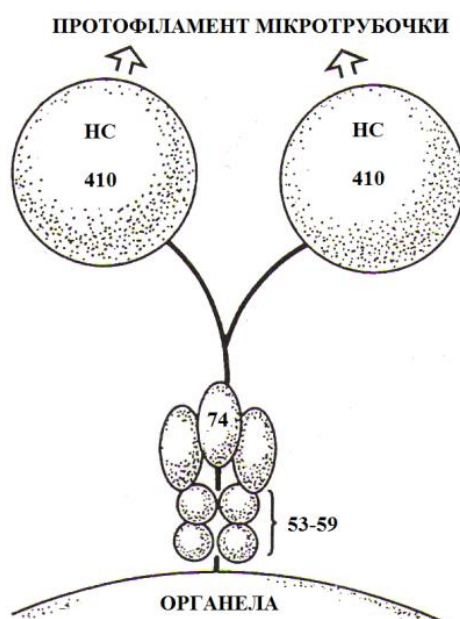


Рис. 53. Будова динеїну

Цитоскелетні та моторні протеїни забезпечують компартменталізацію сигнальних подій в клітинах. Один із способів цього полягає у зміні субклітинної локалізації сигнальних протеїнів в мікродоменах клітини з метою вибіркової модуляції специфічних мішеней в процесі трансдукції сигналу. Нижче наведено кілька прикладів цього.

1. Як було зазначено раніше, ізоформи РКА локалізовані в окремих мікродоменах через регуляторні субдиниці, зв'язані із відповідними “якірними” протеїнами АКАРs. Ідентифіковано езрін, який зумовлює солокалізацію РКА з актиновими філаментами.

2. Кінезин зв'язується зі структурними протеїнами JIP. Останні утворюють комплекси із JNK, МКК4, МКК7 і іншими елементами MAP-кіназного сигнального шляху. Таким чином забезпечується спрямований транспорт цих сигнальних протеїнів.

3. Атипова протеїнкіназа С і кіназа ІКК фосфорилують та інактивують І-кВ. При цьому І-кВ у комплексі з NF-кВ солокалізується з мікротрубочками



і взаємодіє із легкими ланцюгами динеїну, що захищає I-кВ від фосфорилування. За умови дії TNF $\alpha$  легкі ланцюги окислюються і димеризуються з утворенням дисульфідних зв'язків, дисоціюють від інгібувального фактору, що забезпечує його фосфорилування. Поряд з цим, NF-кВ транслокується в ядро по мікротрубочкам за допомогою динеїну. Активація ядерного фактору супроводжується фосфорилуванням кінезину та його інгібуванням, при цьому динеїн залишається активним.

4. Накопичення пухлинного супресору p53 в цитозолі є ознакою злоякісного фенотипу. Встановлено, що p53 зв'язується з клітинними мікротрубочками і транспортується до ядра за допомогою динеїну. В пухлинних клітинах мутації С-кінцевої ділянки p53 порушують його взаємодію із динеїном і пригнічують транспорт p53 в ядро, що, в свою чергу, унеможлиблює експресію проапоптичних протеїнів.

*Значення цитоскелету в регуляції секреції інсуліну.* Як відомо, джерелом інсуліну є  $\beta$ -клітини підшлункової залози. Секреція інсуліну пов'язана з екзоцитозом інсуліновмісних везикул. Цитоскелет  $\beta$ -клітин представлений мікротрубочками та мікрофіламентами. Мікротрубочки забезпечують транспорт везикул від ендоплазматичного ретикулума до апарату Гольджи та плазматичної мембрани. Мікрофіламенти забезпечують бар'єр між везикулами та плазматичною мембраною, їхнє руйнування цитохалазином та токсином *C. Botulinum* призводить до посилення секреції інсуліну. Філаменти актину регулюють також злиття везикул з плазматичною мембраною та внутрішньоклітинний транспорт інсуліну.

В ендоплазматичному ретикулумі препроінсулін внаслідок протеолітичного процесингу перетворюється в проінсулін і по мікротрубочкам транспортується до апарату Гольджи, де утворює інсулін, надалі інсулін пакується в крупні щільні везикули. Наразі вважають, що в процесі транспорту задіяний кінезин. Руйнування мікротрубочок вінкрестином або колхіцином гальмує перетворення проінсуліну в інсулін.

За дії ацетилхоліну чи глюкози, які є факторами стимуляції секреції інсуліну, відбувається активація СаМ кінази-II та РКА, посилюється фосфорилування асоційованого з мікротрубочками протеїну MAP-2 та синапсину I, що призводить до зростання стабільності системи мікротрубочок та мікрофіламентів. Важливе також фосфорилування моторних протеїнів, зокрема міозину для актинових мікрофіламентів та кінезину. За низької концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  кінезин фосфорилується казеїнкіназою-2, зв'язується з мікротрубочками і транспортує везикули до плюс-кінця. При зростанні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  відбувається дефосфорилування кінезину. Представник Rho-родини малих G-протеїнів Cdc42 глікозилюється і активується за дії глюкози, що стимулює полімеризацію актину.

*Регуляція цитоскелетом дії інсуліну.* Цитоскелет задіяний в розподілі субстрату рецептора інсуліну, транслокації транспортеру глюкози та інтерналізації інсулінового рецептору. Функціонально активні IRS, які зв'язані з цитоскелетом, при взаємодії з інсуліновим рецептором фосфорилуються по залишкам тирозину, одночасно відбувається переміщення PI3K до цитоскелету. IRS, локалізований в цитозолі, не є субстратом інсулінового рецептору. Можливо, зв'язок субстрату рецептора інсуліну з цитоскелетом забезпечує більш ефективну його конформацію для взаємодії як з рецептором, так і з сигнальними протеїнами. Пул IRS в цитозолі зростає за фосфорилування по серину/треоніну, що може лежати в основі резистентності клітин до інсуліну.

Цитоскелет безпосередньо пов'язаний із функціонуванням транспортеру глюкози. Кінезин забезпечує транспорт GLUT4 до плазматичної мембрани, а динеїн – до ядра. Кінезин активується в системі PI3K та нової лямбда ізоформи PKC, а також за участі фосфопропротеїну Rab4A (member RAS oncogene family). Динеїн за цих умов інгібується. Інтерналізація всередину клітини комплексу інсулін-інсуліновий рецептор, який транспортується в лізосому, а рецептор вивільнюється, залежить від функціонування мікрофіламентів та проміжних філаментів.

## ЛІТЕРАТУРА

### Основна

1. Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. Fifth, Completely Revised Edition / Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. - 845 p.
2. Остапченко Л.І., Синельник Т.Б., Компанець І.В. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти: навч. посіб. / К. : ВПЦ "Київський університет", 2016. – 639 с.
3. Нельсон Д.Л., Кокс М.М. Основи біохімії за Ленінджером. Переклад з англ. за ред. Комісаренко С.В. / 2016. – 1280 с.
4. Helmreich E.J.M. The biochemistry of cell signaling / Oxford Univer. press, 2002. – 358 p.
5. Gomperts V.D., Tatham P.E.R., Kramer I.M. Signal Transduction, 1st Edition / Academic Press; 2003, 440 p.
6. Цимбалюк О.В., Драган А.І., Толстанов Г.М., Войтешенко І.С., Давидовська Т.Л., Грабчук Г.П., Нипорко О.Ю. Міжклітинні взаємодії: [Навчальний посібник] / К.: ЦП «Компринт», 2023. - 142 с.
7. Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M.P. Molecular cell biology. Seventh edition / W. H. Freeman and Company, New York, 2013. - 1247 p.
8. Textbook of receptor pharmacology / edited by John C. Foreman, Torben Johansen. — 2nd ed. - CRC Press, 2003. - 302 p.
9. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>.
10. Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S46–S55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>.
11. Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y., & Wang, M. W. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>.
12. Bassler, J., Schultz, J. E., & Lupas, A. N. (2018). Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals. *Cellular signalling*, 46, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.03.002>.
13. Khannpnavar, B., Mehta, V., Qi, C., & Korkhov, V. (2020). Structure and function of adenylyl cyclases, key enzymes in cellular signaling. *Current opinion in structural biology*, 63, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.03.003>.
14. Delmas, P., Coste, B., Gamper, N., & Shapiro, M. S. (2005). Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron*, 47(2), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.07.001>.

15. Jackson, L., Qifti, A., Pearce, K. M., & Scarlata, S. (2020). Regulation of bifunctional proteins in cells: Lessons from the phospholipase C $\beta$ /G protein pathway. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 29(6), 1258–1268. <https://doi.org/10.1002/pro.3809>.
16. Шуба Я.М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів, Київ., Наукова Думка, 2010, 448 с
17. Campbell A.K. Intracellular calcium / West Sussex, UK, John Wiley & Sons, Ltd, 2015. - 789 p.
18. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури і функції / П.Г. Костюк, О.П. Костюк, О.О. Лук'янець – Київ, "Наукова думка", 2010, – 175 с.
19. Бурлака А.П., Сидорик Е.П. Редоксзависимые сигнальные молекулы в механизмах опухолевого процесса / К.: «Наукова думка», 2014. – 256 с.
20. Губский Ю.И. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз / Винница.: Нова Книга, 2015. – 360 с.

#### **Додаткова**

21. Byrne J.H., Heidelberger R., Waxham M.N. From molecules to networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. Third edition / Elsevier Inc., 2014. - 692 p.
22. Pollard T., Earnshaw W., Lippincott-Schwartz J., Johnson G. Cell Biology. 3rd Edition / Elsevier, 2017. - 882 p.
23. Hammond, C. Cellular and molecular neurophysiology. Third edition. - Amsterdam: Elsevier, 2008. - 405 p.
24. Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual review of biochemistry*, 87, 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
25. Cooper D. M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *The Biochemical journal*, 375 (Pt 3), 517–529. <https://doi.org/10.1042/BJ20031061>.
26. Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 83(2), 101–130. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(03\)00052-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(03)00052-x).
27. Haga T. (2013). Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 89(6), 226–256. <https://doi.org/10.2183/pjab.89.226>.
28. Bassler, J., Schultz, J. E., & Lupas, A. N. (2018). Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals. *Cellular signalling*, 46, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.03.002>.
29. Scarlata S. (2019). The role of phospholipase C $\beta$  on the plasma membrane and in the cytosol: How modular domains enable novel functions. *Advances in biological regulation*, 73, 100636. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100636>.

30. Textbook of medical physiology. Arthur C. Guyton, John E. Hall, 11th ed. 2006. – 1116 p.
31. Alexander, S. P. H., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & CGTP Collaborators (2019). The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *British journal of pharmacology*, 176 Suppl 1(Suppl 1), S21–S141. <https://doi.org/10.1111/bph.14748>.
32. Offermanns S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 83(2), 101–130. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(03\)00052-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(03)00052-x).
33. Kankanamge, D., Tennakoon, M., Karunarathne, A., & Gautam, N. (2022). G protein gamma subunit, a hidden master regulator of GPCR signaling. *The Journal of biological chemistry*, 298(12), 102618. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102618>.
34. Давидовська Т.Л., Цимбалюк О.В., Грабчук Г.П. Войтешенко І.С. Нипорко О.Ю., Федоренко Т.В. Науменко А.М. Латищенко Л.А. Фізика біосистем у формулах, термінах, схемах. Київ, Видавництво ЦП "КОМПРИНТ" 2017 р., 210 с.
35. Garcia, M. A., Nelson, W. J., & Chavez, N. (2018). Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4), a029181. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>
36. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):269-80. doi: 10.1007/s00441-0092011 Mar 1;3(3):a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994. PMID: 0834-6. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19693543; PMCID: PMC2784866.
37. Michael M, Parsons M. New perspectives on integrin-dependent adhesions. *Curr Opin Cell Biol*. 2020 Apr;63:31-37. doi: 10.1016/j.ceb.2019.12.008. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31945690; PMCID: PMC7262580.
38. Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(3), 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>.
39. Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Aug;28(8):397-406. doi: 10.1016/j.tips.2007.06.003. Epub 2007 Jul 13. PMID: 17629961.
40. Deupi X, Kobilka B. Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem*. 2007;74:137-66. doi: 10.1016/S0065-3233(07)74004-4. PMID: 17854657.

## ЗМІСТ

	<b>Вступ</b>	Стр. 5
<b>РОЗДІЛ 1</b>	Вибрані питання біології протеїнів, нуклеїнових кислот та біомембранології.	Стр. 5
<b>РОЗДІЛ 2</b>	Загальні уявлення про клітинне сигналювання. Первинні та вторинні месенджери. Рецептори. Головні типи і принципи трансдукції клітинного сигналу.	Стр. 33
<b>РОЗДІЛ 3</b>	Окремі відомості про структуру і регуляцію геному.	Стр. 43
<b>РОЗДІЛ 4</b>	Сигнальні протеїни.	Стр. 50
<b>РОЗДІЛ 5</b>	Регуляція експресії генів в еукаріотів.	Стр. 60
<b>РОЗДІЛ 6</b>	Іонні канали як система трансдукції сигналу.	Стр. 73
<b>РОЗДІЛ 7</b>	Рецепторні ензими.	Стр. 82
<b>РОЗДІЛ 8</b>	Протеїнтирозинфосфатазна сигнальна система.	Стр. 91
<b>РОЗДІЛ 9</b>	Трансдукція сигналу за участі гетеротримernih G-протеїнів.	Стр. 97
<b>РОЗДІЛ 10</b>	Сигнальна система сфінголіпідів.	Стр. 110
<b>РОЗДІЛ 11</b>	Трансдукція $Ca^{2+}$ сигналу.	Стр. 112
<b>РОЗДІЛ 12</b>	Активні форми азоту і кисню як сигнальні молекули.	Стр. 131
<b>РОЗДІЛ 13</b>	Сигнальна система інтерферонів.	Стр. 161
<b>РОЗДІЛ 14</b>	Сенсорна трансдукція в органах зору хребетних (фототрансдукція).	Стр. 167
<b>РОЗДІЛ 15</b>	Сигналювання у процесах сприйняття запаху і смаку хребетних.	Стр. 169
<b>РОЗДІЛ 16</b>	Сигналювання в мікроорганізмах і рослинах.	Стр. 170
<b>РОЗДІЛ 17</b>	Регуляція клітинного циклу.	Стр. 171
<b>РОЗДІЛ 18</b>	Загальна характеристика і основні шляхи протікання апоптозу.	Стр. 173
<b>РОЗДІЛ 19</b>	Протеїни цитоскелету та трансдукція сигналу.	Стр. 178
	<b>Література</b>	Стр. 187

**Навчальне видання**

**ДАНИЛОВИЧ** Юрій Володимирович

**ДАНИЛОВИЧ** Ганна Вікторівна

**ЦИМБАЛЮК** Ольга Володимирівна

**НИПОРКО** Олексій Юрійович

**Внутрішньоклітинна сигналізація  
(для непрофільних спеціальностей)**

*Навчальний посібник*