


УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ П.М. МАШЕРОВА»

Факультет химико-биологических и географических наук

Кафедра химии и естественнонаучного образования

СОГЛАСОВАНО


Заведующий кафедрой

 О.М. Балаева-Тихомирова

10.12.2020

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 Т.А. Толкачёва

10.12.2020

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС  
ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
БИОСИГНАЛИЗАЦИИ**

для специальности второй ступени высшего образования

1-31 80 01 Биология. Функциональная биология

Составители: А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова

Рассмотрено и утверждено

на заседании научно-методического совета 23.12.2020, протокол № 3

УДК 577.2(075.8)  
ББК 28.070я73  
М75

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 7 от 29.06.2021.

Составители: профессор кафедры химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук, профессор **А.А. Чиркин**; заведующий кафедрой химии и естественнонаучного образования ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук, доцент **О.М. Балаева-Тихомирова**

Рецензенты:

профессор кафедры химии УО «ВГАВМ»,  
доктор биологических наук, профессор *В.М. Холод*;  
заведующий кафедрой экологии и географии ВГУ имени П.М. Машерова,  
доктор биологических наук, доцент *Г.Г. Сушко*

**М75 Молекулярные механизмы биосигнализации для специальности второй ступени высшего образования 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология : учебно-методический комплекс по учебной дисциплине / сост.: А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 132 с.**  
ISBN 978-985-517-818-8.

Учебно-методический комплекс разработан для студентов второй ступени очной и заочной форм обучения на факультете химико-биологических и географических наук специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология в соответствии с учебной программой «Молекулярные механизмы биосигнализации» (рег. № УД-23-024/уч. от 26.06.2019 г.), на основе государственного Образовательного стандарта высшего образования второй ступени по специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология ОСВО РБ 1-31 80 01-2019, учебными программами БГУ рег. № УД-3284/уч. от 30.11.2016 г., рег. № УД-5127/уч. от 31.05.2018 г. и учебного плана ВГУ имени П.М. Машерова.

В издании представлены пояснительная записка, теоретический материал, практический блок, задания для самостоятельной работы (вопросы, тесты, задачи), рекомендуемая литература и информация о материально-технической обеспеченности по дисциплине. Описаны теоретические и практические аспекты сигнальных внутриклеточных систем, определяющих реакции экспрессии генов, клеточного цикла и запрограммированной гибели клеток на различные экзогенные и эндогенные воздействия.

УДК 577.2(075.8)  
ББК 28.070я73

ISBN 978-985-517-818-8

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Пояснительная записка</b> .....	4
<b>Тема 1</b> Общие принципы функционирования системы межклеточной коммуникации .....	5
<b>Тема 2</b> Сигнальные молекулы. Рецепция биосигналов .....	14
<b>Тема 3</b> Передача сигнала посредством активации рецепторов, ассоциированных с G-белками .....	25
<b>Тема 4</b> Передача сигнала посредством активации рецепторов с протеинкиназным доменом .....	34
<b>Тема 5</b> Пути биосигнализации, запускаемые цитокинами различных групп. Передача сигнала в клетках системы иммунитета .....	43
<b>Тема 6</b> Межклеточная коммуникация в регуляции индивидуального развития .....	53
<b>Тема 7</b> Молекулярные аспекты передачи информации в нейронах .....	61
<b>Тема 8</b> Рецепторы молекул внеклеточного матрикса. Биосигнализация в регуляции перемещения клетки .....	71
<b>Тема 9</b> Биосигнализация при апоптозе и некрозе .....	81
<b>Заключение</b> .....	92
Ответы к тестам .....	98
Ответы к задачам .....	99
<b>Информационно-методические материалы</b> .....	106
Наименование тем дисциплины и их содержание .....	106
Практические занятия .....	109
Управляемая самостоятельная работа и темы рефератов .....	110
Программные вопросы для контроля .....	112
Список рекомендованной литературы .....	114
<b>Приложение</b> .....	115

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная программа УВО по дисциплине «Молекулярные механизмы биосигнализации» (рег. № УД-23-024/уч. от 26.06.2019 г.), составлена на основе государственного Образовательного стандарта высшего образования второй ступени по специальности 1-31 80 01 Биология. Функциональная биология ОСВО РБ 1-31 80 01-2019, учебными программами БГУ рег. № УД-3284/уч. от 30.11.2016 г., рег. № УД-5127/уч. от 31.05.2018 г. и учебного плана ВГУ имени П.М. Машерова.

Дисциплина «Молекулярные механизмы биосигнализации» тесно взаимосвязана с дисциплинами «Клеточная биология» и «Молекулярная биология раковой клетки», что позволяет ее отнести к важнейшим фундаментальным дисциплинам в системе биологического образования. На первой ступени высшего образования студенты изучают структурно-функциональные и молекулярно-биологические аспекты функционирования эндокринной, паракринной и отчасти аутокринной регуляторных систем в регуляции жизнедеятельности клеток в норме. Для студентов второй ступени высшего образования предлагаются для изучения молекулярные механизмы, называемые внутриклеточными сигнальными путями, которая позволят глубже понять фундаментальные клеточные процессы в норме и патологии: регуляция экспрессии генов, клеточного деления и запрограммированных типов клеточной смерти.

*Цель учебной дисциплины* – сформировать у студентов целостную систему знаний о природе внутриклеточных сигнальных путей для понимания фундаментальных молекулярных основ нормальной жизнедеятельности и патологии на уровне клетки.

В задачи дисциплины входит изучение общих принципов функционирования системы межклеточных коммуникаций, сигнальные молекулы и рецепция биосигналов, передача сигнала посредством активации рецепторов, ассоциированных с G-белками, передача сигнала посредством активации рецепторов с протеинкиназным доменом, пути биосигнализации, запускаемые цитокинами различных групп и передача сигнала в клетках системы иммунитета, межклеточная коммуникация в регуляции индивидуального развития, молекулярные аспекты передачи информации в нейронах, рецепторы молекул внеклеточного матрикса и биосигнализация в регуляции перемещения клетки, биосигнализация при апоптозе и некрозе. Эти вопросы разделены на 9 тем и представлены в презентациях 17 лекций. Изучение дисциплины завершается экзаменом.

*Тема 1*

## ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ

### ГЛОССАРИЙ

**Передача сигнала (сигнальная трансдукция, трансдукция, сигналинг, сигнализация, англ. signal transduction)** – в молекулярной биологии термин относится к любому процессу, при помощи которого клетка превращает один тип сигнала или стимула в другой.

**Внутренние сигналы** – образуются и действуют в одной и той же клетке, часто сигналами выступают метаболиты. Они выполняют роль аллостерических активаторов/ ингибиторов ферментов.

**Внешние сигналы** – управляющие сигналы поступают в клетку из внешней среды.

**Сигнальные молекулы** – эндогенные химические соединения, которые в результате взаимодействия с рецепторами обеспечивают внешнее управление биохимическими реакциями в клетках-мишенях.

**Клетка-мишень** – это клетка, имеющая специализированные воспринимающие рецепторы для данного вида сигнальных молекул.

**Характерный признак клетки-мишени** – способность воспринимать информацию, закодированную в химической структуре гормона.

**Клетки-мишени** отличают соответствующий гормон от множества других молекул и гормонов благодаря наличию на клетке-мишени соответствующего рецептора со специфическим центром связывания с гормоном.

**Эндокринный эффект** – сигнальная молекула поступает с током крови к клетке-мишени из желез внутренней секреции (дистантное действие).

**Паракринный эффект** – сигнальная молекула вырабатывается и действует на клетки в пределах одного органа или ткани.

**Аутокринный эффект** – сигнальная молекула действует на клетку ее образовавшую.

**Динеины и кинезины** – белки внутриклеточного транспорта, которые одним концом прикрепляются к микротрубочке, другим к крупным молекулам и органоидам, обеспечивают их транспорт, используя в качестве источника энергии гидролиз АТФ. Работают в противоположных направлениях. Динеины двигают свой груз в направлении минуса конца трубочки (ретроградно из периферии по направлению к клеточному центру), кинезины в обратном направлении к плюсу конца трубочки (антероградно в противоположном направлении).

**Синцитий** – структура, состоящая из клеток, соединенных цитоплазматическими мостиками. **Функциональный синцитий** применяется к клеткам, связанными щелевыми контактами, что позволяет всей совокуп-

ности клеток работать как единое целое (например, кардиомиоциты и гладкая мускулатура все клетки возбуждаются и сокращаются одновременно). Возбуждение переходит от одной клетки к другой без паузы или снижения амплитуды потенциала действия на границе.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

*Рассмотрим схему: Сигнал – рецептор – (посредник) – ответ.* Клетки, воспринимая и трансформируя различные сигналы, реагируют на изменения окружающей их среды, являясь местом приложения физических (например, кванты света в фоторецепторах), химических (например, вкусовые и обонятельные молекулы, рН), механических (например, давление или растяжение в механорецепторах), раздражителей внешней и внутренней среды организма и сигналов информационного характера (например, гормоны и нейромедиаторы) из внутренней среды организма. Все виды информационных межклеточных взаимодействий реализуются в рамках концепции «сигнал-ответ». Регуляция функций организма, органов и систем органов, а также отдельных клеток осуществляется при помощи регуляторного сигнала *контактно* либо *дистантно*. И при контактном, и при дистантном способе регуляции передача и регистрация сигнала всегда происходит между отдельными клеточными элементами. Одна клетка регулирует, вторая – регулируется.

Контактная регуляция регистрируется, когда регулирующая и регулируемая клетки находятся друг с другом в контакте:

1. Нервная регуляция осуществляется при помощи контактов – синапсов – между регулирующей и регулируемой клетками. Передачу сигнала в синапсе осуществляют нейромедиаторы, а регистрация сигнала происходит при помощи молекулярных рецепторов, встроенных в постсинаптическую мембрану.

2. Щелевые контакты (нексусы, англ. *gap junction*, лат. *nexus*), объединяющие отдельные клетки в так называемые функциональные синцитии. Через щелевые контакты осуществляется электротоническое, метаболическое и информационное сообщение между контактирующими клетками. Пример функционального синцития: миокард – совокупность кардиомиоцитов.

Дистантная регуляция (гуморальная) регуляция характеризуется тем, что регулирующая и регулируемая клетки расположены на расстоянии друг от друга, иногда весьма значительном. Для дистантной регуляции необходим материальный агент передачи сигнала между дистантно расположенными клетками. Такими агентами являются информационно активные вещества (гормоны, цитокины, факторы роста и т.д.). Молекулы таких веществ на пути от клетки-регулятора до регулируемой клетки-мишени

находятся в различных жидкостях организма: в крови, ликворе, лимфе, тканевой жидкости. Отсюда и термин для дистантной регуляции – *гуморальная регуляция*. Различают три варианта гуморальной регуляции: эндокринная, паракринная, аутокринная.

Межклеточные сигнальные вещества условно делятся на три группы:

- гормоны – регуляторы, образуемые эндокринными клетками и попадающие к клеткам мишеням через кровь;
- нейромедиаторы – соединения, передающие сигнал в синапсах от пресинаптического окончания к постсинаптической мембране;
- гистогормоны (цитокины и факторы роста) – регуляторы, выделяемые неэндокринными клетками во внесосудистое пространство и обладающие поэтому местным действием. В ряде случаев грань между представителями этих групп может стираться.

*Гормонпродуцирующие структуры делятся на четыре группы:*

1. Центральные эндокринные органы (гипоталамус, гипофиз, эпифиз).
2. Периферические эндокринные железы (щитовидная, паращитовидные, корковое и мозговое вещество надпочечников).
3. Органы, объединяющие эндокринные и неэндокринные функции (поджелудочная железа, почки, тимус, гонады, плацента, сердце).
4. Одиночные гормонпродуцирующие клетки (составляющие диффузную эндокринную систему) – эндокринные клетки в разных отделах нервной, пищеварительной и дыхательной систем.

*Выделяют также гормоны неэндокринных органов:*

- Гормоны почек: эритропоэтин – стимуляция эритропоэза в костном мозгу, ренин – катализирует образование в крови ангиотензиногена, кальцитриол – всасывание кальция.
- Гормоны тимуса: тимопоэтины – образование предшественников Т-лимфоцитов, тимозин – созревание Т-лимфоцитов, ЛСГ (лимфоцитоestimлирующие гормоны) – увеличение антитело-образования и др.
- Гормоны плаценты: хорионический гонадотропин, пролактин, кортикотропин, соматотропин, эстрогены, прогестерон – течение беременности; релаксин – подготовка тканей к родам.
- Гормоны сердца: натрий-уретические факторы.

*Существует правило: одна клетка – один гормон.* Это правило справедливо для островков Лангерганса поджелудочной железы: глюкагон образуется в А-клетках, инсулин – в В-клетках, соматостатин – в D-клетках, ВИП (вазоактивный интестинальный полипептид) – в D1-клетках, ПП (панкреатический полипептид) в PP-клетках.

APUD – система, это клетки, в которых, наряду с пептидным гормоном, продуцируется какой-либо биогенный амин, получаемый при декарбоксилировании аминокислот (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation* – поглощение и декарбоксилирование предшественников аминов). К этой си-

стеме относятся нейроэндокринные клетки нервной системы и некоторые клетки эндокринных желез и отдельных гормонпродуцирующих клеток.

Также выделяют группу молекул, называемых *гистогормонами*.

Гистогормоны (аукоиды) вырабатываются неэндокринными клетками, распространяются путем диффузии в межклеточном пространстве, оказывают лишь местное действие по двум типам: *паракринное* – если действует на другую (нежели клетка-продуцент) клетку и *аутокринное* – когда выделившийся в межклеточную среду гистогормон связывается с мембранными рецепторами самой клетки-продуцента и оказывает на последнюю соответствующее влияние.

Все гистогормоны делятся на 1) цитокины – интерлейкины и ФНО (фактор некроза опухолей), интерфероны, малые цитокины и КСФ (колониестимулирующие факторы) и 2) факторы роста.

- Цитокины участвуют в воспалительных, иммунных и других защитных реакциях). Обычно они вырабатываются не постоянно.

- Интерлейкины выделяются активированными лейкоцитами и обеспечивают взаимодействие клеток в ходе реакций: с помощью ИЛ-1 макрофаги (моноциты) активируют эндотелиоциты при воспалении; ИЛ-2 вызывает бласттрансформацию Т-хелперов; ИЛ-4 стимулирует бласттрансформацию В-клеток; ИЛ-5 стимулирует синтез IgM. Фактор некроза опухолей (ФНО) усиливает многие эффекты ИЛ-1.

- Интерфероны – небольшие сигнальные белки, которые выделяются клетками, инфицированными вирусами. Они ограничивают белковый синтез путем усиления распада мРНК, что предупреждает образование новых вирусных частиц.

- Факторы роста: из 4-й группы цитокинов КСФ (колониестимулирующие факторы) являются белковыми стимуляторами факторы роста представляют собой белки, стимулирующие (либо ингибирующие) деление и развитие определенных клеток, например, ЭФР (эпидермальный фактор роста), НФР (фактор роста нейронов), ФРФ (фактор роста фибробластов), ФРГ (фактор роста гепатоцитов) и др.

*Нейромедиаторы и нейромодуляторы* включают низкомолекулярные вещества и разнообразные пептиды.

Одиночными клетками мозга вырабатывается много нейропептидов. Они участвуют в передаче сигнала в синапсах, т.е. выступают в качестве нейромедиаторов или ко-нейромедиаторов. В последнем случае имеется в виду, что в одном и том же нервном окончании образуется сразу несколько разных медиаторов – как правило, один из них имеет непептидную природу, а остальные являются пептидами.

Нейромодуляторы – это нейропептиды, которые не могут сами передавать в синапсах сигнал, но влияют на передачу такового истинными медиаторами (облегчают или затрудняют ее).



*Выделение и рецепция нейромедиаторов.* Транспорт нейромедиаторов осуществляется в составе везикул по микротрубочкам с помощью биохимических моторов динеинов и кинезинов. Выделение нейромедиатора из пресинаптического окончания в синаптическую щель осуществляется путем экзоцитоза. Известны 2 типа рецепторов. *Ионотропные* (быстродействующие) рецепторы служат одновременно ионными каналами, которые открываются при связывании медиатора с рецепторной частью белка; в зависимости от природы ионных каналов, их открытие может вести как к возбуждению постсинаптической клетки, так и к ее торможению. *Метаботропные* (медленнодействующие) рецепторы: здесь сигнал передается как у гидрофильных гормонов, с помощью внутриклеточных посредников.

*Непептидные и пептидные нейромедиаторы ЦНС.* К медиаторам возбуждающего действия относят серотонин (производное 5-гидрокситриптофана), гистамин (производное гистидина), глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, ацетилхолин.

К медиаторы тормозного типа относят дофамин, норадреналин (производные тирозина), ГАМК (гамма-аминомасляная кислота, производное глутаминовой кислоты), глицин, таурин, аденозин (АМФ), АТФ, АФ<sub>4</sub>Ф (диаденозинтетрафосфат). Пептидные медиаторы (рецепторы метаботропного (медленного) типа: люлиберин (10 аминокислот), ВИП (вазоактивный интестинальный пептид, 28 аминокислот), соматостатин (циклический пептид, 14 аминокислот), вещество Р (11 аминокислот), нейропептид Y (36 аминокислот).

Нейромодуляторами являются только пептиды (их известно более 700). Они содержат от 2 до 60 аминокислотных остатков, чаще имеют линейную структуру. Образуются в нейронах в виде единого полипептидного предшественника, например, (проопиомеланокортин). При его последующем частичном протеолизе высвобождаются некоторые гормоны (меланостимулирующие, липотропин, кортикотропин), эндорфины и энкефалины (пептиды с морфиноподобным действием), которые транспортируются в везикулах до нервных окончаний. Их протеолиз продолжается.

В отличие от типичных медиаторов, нейропептиды существуют в биосредах продолжительное время. Для каждого есть рецептор. Все это дает многообразные эффекты. Выделим в качестве примера цАМФ-опосредованные пути: G-белок (альфа + бета + гамма-субъединицы + ГДФ) после связывания гормона с рецептором диссоциирует и альфа-субъединица связывается с ГТФ и перемещается вдоль мембраны до аденилатциклазы и активирует ее путем превращения АТФ в 3',5'-циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Затем в альфа-субъединице проявляется ГТФазная активность (ГТФ → ГДФ + P<sub>n</sub>). В результате альфа-субъединица возвращается в исходное состояние: отделяется от аденилатциклазы, возвращается и объединяется с бета и гамма-

субъединицами + ГДФ. ГТФазная активность альфа-субъединицы обеспечивает обратимость ее влияния на аденилатциклазу.

цАМФ активирует протеинкиназу А, состоящую из двух рецепторных субъединиц и двух каталитических субъединиц (2R+2C), три этом рецепторные субъединицы ингибируют каталитические. После присоединения 4 молекул цАМФ (по 2 цАМФ на 2 R) освобождаются каталитические субъединицы (2C – активный фермент).

Внутриклеточные сигнальные пути являются основным содержанием дисциплины «Молекулярные механизмы биосигнализации». Схематично эти пути представлены на рисунок 1, приложение. К данной схеме мы будем постоянно обращаться по мере изучения тем данной дисциплины. В мембране клетки показаны 9 типов рецепторов, с которыми связываются внеклеточные биорегуляторы. От рецепторов внутри клеток формируются сигнальные пути, состоящие из ферментов, продуктов их реакций, сигнальных молекул и др. Чаще всего сообщают о 17 внутриклеточных сигнальных путях. По этим сигнальным путям информация передается на три фундаментальных процесса: экспрессия генов, клеточное деление и запрограммированная гибель клеток (апоптоз).

В данном пособии процессы будут рассматриваться в последовательности против часовой стрелки от рецепторов, 7 раз пересекающих мембрану клетки (GPCR).

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### *Вопросы*

1. Объясните, чем отличаются гистогормоны от других групп межклеточных сигнальных веществ.
2. Опишите в чем заключается концепция «сигнал–ответ».
3. Объясните правило «одна клетка – один гормон». Приведите примеры.
4. Укажите, как осуществляется нервная регуляция.
5. Опишите, как осуществляется контактная регуляция и назовите ее виды.
6. Опишите, как осуществляется дистантная регуляция (гуморальная).
7. Что такое APUD – система?
8. Назовите гистогормоны (аукоиды), их функции и приведите классификацию.
9. Как осуществляются выделение и рецепция нейромедиаторов?
10. Охарактеризуйте цАМФ-опосредованные пути биосигнализации.

## ТЕСТЫ

1. Рецепторы по своей химической природе являются:

- 1) углеводами;
- 2) липидами;
- 3) неорганическими молекулами;
- 4) гормонами;
- 5) белками.

2. Выберите виды сообщения, которые осуществляются через щелевые контакты между контактирующими клетками. а) электротоническое; б) гормональное; в) метаболическое; г) информационное; д) химическое:

- 1) а, в, г;
- 2) а, г, д;
- 3) б, в, д;
- 4) в, г, д;
- 5) а, б, в.

3. К межклеточным сигнальным веществам относят: а) витамины; б) гормоны; в) антибиотики; г) нейромедиаторы; д) гистогормоны.

- 1) а, б, г;
- 2) б, г, д;
- 3) б, в, г;
- 4) а, г, д;
- 5) а, б, д.

4. Укажите, какие виды сигнальных молекул выделяют при классификации по физическим свойствам:

- 1) органические и липофобные;
- 2) нейромедиаторы и гормоны;
- 3) нейромедиаторы и липофильные;
- 4) гормоны и липофильные;
- 5) липофильные и липофобные.

5. Укажите гормонпродуцирующие структуры, которые относятся к периферическим эндокринным железам: а) гипоталамус; б) щитовидная железа; в) гипофиз; г) эпифиз; д) паращитовидная железа; е) корковое и мозговое вещество надпочечников; ж) поджелудочная железа; з) почки; и) сердце.

- 1) б, д, е;
- 2) а, г, д;
- 3) в, з, и;
- 4) а, д, ж;
- 5) в, г, з.

6. Укажите гормонпродуцирующие структуры, которые относятся к центральным эндокринным органам: а) гипоталамус; б) щитовидная железа; в) гипофиз; г) эпифиз; д) паращитовидная железа; е) корковое и мозговое вещество надпочечников; ж) поджелудочная железа; з) почки; и) сердце.

- 1) в, г, д;
- 2) а; в; г;
- 3) а, ж, з;
- 4) д, е, и;
- 5) б, в, ж.

7. Выберите гистогормоны, которые являются небольшими сигнальными белками и выделяются клетками, инфицированными вирусами:

- 1) интерлейкины;
- 2) ФНО (фактор некроза опухолей);
- 3) интерфероны;
- 4) КСФ (колоний-стимулирующие факторы);
- 5) факторы роста.

8. Укажите гормоны неэндокринных органов – почек: а) тимопоэтины; б) прогестерон; в) эритропоэтин; г) ренин; д) соматотропин; е) кальцитриол; ж) тимозин; з) пролактин; и) натрий-уретические факторы.

- 1) а, в, г;
- 2) д, ж, з;
- 3) г, д, е;
- 4) в, г, е;
- 5) б, в, д.

9. Назовите группу молекул нейропептиды, которые не могут сами передавать в синапсах сигнал, но влияют на передачу такового истинными медиаторами (облегчают или затрудняют ее):

- 1) интерлейкины;
- 2) гистогормоны;
- 3) интерфероны;
- 4) нейромедиаторы;
- 5) нейромодуляторы.

10. Укажите, какие виды медленнодействующих рецепторов, которые участвуют в выделении и рецепции нейромедиаторов:

- 1) липофобные;
- 2) гормоноподобные;
- 3) метаботропные;
- 4) ионотропные;
- 5) липофильные.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Известно, что ацетилхолин является одним из основных медиаторов нервной системы. В результате обследования испытуемого было установлено, что блокатор ацетилхолинергической передачи возбуждения в синапсах атропин вызвал расширение зрачка, увеличение частоты и силы сердечных сокращений, уменьшение перистальтики желудочно-кишечного тракта. При этом не изменилась сократительная функция скелетной мускулатуры. На какие постсинаптические рецепторы действует ацетилхолин при выделении его в синаптическую щель? Объясните возможные причины различного действия атропина в нервно-мышечных синапсах соматической нервной системы и в синапсах вегетативной нервной системы на внутренних органах.

**Задача 2.** В эксперименте на кролике электрическое раздражение гипоталамуса, таламуса и ретикулярной формации вызывает характерные изменения электрической активности коры головного мозга. В чем состоят эти изменения при раздражении гипоталамуса? Таламуса? Ретикулярной формации?

**Задача 3.** В пре- и постсинаптических окончаниях вегетативной нервной системы выделяются различные медиаторы и олигопептиды. В чем сходство и различие выделения медиаторов в пре- и постсинаптических окончаниях симпатической и парасимпатической нервной системы? Какой физиологический эффект наблюдается после симпатической и парасимпатической денервации?

**Задача 4.** Ганглии вегетативной нервной системы имеют различную локализацию, а пре- и постганглионарные волокна симпатической и парасимпатической нервной системы имеют разную скорость проведения возбуждения. В чем различия симпатической и парасимпатической иннервации внутренних органов? Какие влияния – симпатической или парасимпатической нервной системы – сказываются быстрее на функциях внутренних органов и почему?

## Тема 2

# СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ. РЕЦЕПЦИЯ БИОСИГНАЛОВ

## ГЛОССАРИЙ

**Сигнальная трансдукция (сигналинг)** – любой процесс, при котором клетка превращает один тип сигнала или стимула в другой.

**Амплификация сигнала** – явление, при котором относительно слабый стимул может вызывать значимый ответ.

**Сигнальный каскад** – способ организации сигнальных путей при котором количество молекул белков и других веществ, принимающих участие в передаче сигнала, возрастает на каждом последующем этапе по мере удаления от первоначального стимула.

**Экссудат (выхожу наружу)** – процесс выделения жидкости в ткань при воспалении.

**Редактирование генома** – один из видов генной инженерии, в котором может быть проведено включение, удаление или перемещение фрагментов ДНК в геноме организма, с использованием специфически спроектированных эндонуклеаз, или «молекулярных ножниц».

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

*Межклеточный сигналинг у микроорганизмов.* Система межклеточной коммуникации у микроорганизмов носит название системы *quorum sensing* (QS). Сегодня система QS определяется как система координированной экспрессии генов в популяции, зависящая от показателя ее плотности, с использованием малых сигнальных молекул. Этот механизм был впервые описан в 1970 году Нильсоном у морской бактерии *Vibrio fischeri* в качестве системы регуляции биолюминесценции. С помощью системы QS микроорганизмы способны регулировать многие процессы жизнедеятельности, в частности патогенность, вторичный метаболизм, формирование биопленки и многое другое. Система QS встречается не только у бактерий, но и у некоторых низших эукариот, таких как дрожжеподобные грибы родов *Candida* и *Cryptococcus*. С помощью этой системы микроорганизмы способны взаимодействовать не только с себе подобными, но и осуществлять межцарственную коммуникацию, в том числе и с высшими эукариотами.

*Сигналинга в системе бактерия – растение.* Свойство бактерий вида *Agrobacterium tumefaciens* вызывать у растений корончато-галловую болезнь связано с присутствием в их клетках крупных (95-156 мДа) конъюгированных Ti-плазмид (от англ. *tumor-inducing* – вызывающий опухоль). В процессе инфицирования растений часть генетического материала

Ti-плазмид – тДНК (от англ. *transferred DNA* – передаваемая) перемещается в растительные клетки и интегрируется в хромосомы, оставаясь частью наследственного материала. Гены тДНК экспрессируются в трансформированных растительных клетках, нарушают их фитогормональный баланс и определяют синтез специфических соединений. Таким образом, агробактерии являются природными «генными инженерами», осуществляющими поразительный по филогенетической дальности перенос генетической информации. Поэтому на основе агробактерий сконструированы эффективные векторные системы для генетической инженерии растений. Роль микробно-растительной сигнализации существенна, поскольку агробактериальная трансформация происходит в результате сложного процесса взаимодействия между бактериальными и растительными клетками. В этом процессе одной из решающих стадий является рецепция агробактериями особых сигнальных молекул, присутствующих в экссудатах поврежденных тканей растений. Сигнальные молекулы индуцируют экспрессию генов области *vir* (агробактериальных Ti-плазмид), контролирующей вырезание тДНК и ее перенос в клетки растений. Агробактериальная трансформация наблюдается у широкого круга голосеменных и двудольных растений, однако, она отмечена лишь у весьма незначительного числа однодольных растений. Одной из причин ограничений агробактериальной трансформации однодольных считается присутствие в их клетках сигнальных молекул, индуцирующих процессинг и перенос тДНК.

Нобелевская премия 2012 года была присуждена ученым Д. Гердону и С. Яманака, впервые продемонстрировавшим возможность перепрограммирования соматических клеток в эмбриональное состояние. С помощью смеси четырех факторов внутриклеточных сигнальных путей (*Okt4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) удалось перепрограммировать ядерную соматическую клетку у мышей в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). Сегодня получение индуцированных стволовых клеток является широко распространенным способом аутологичной клеточной терапии при заболеваниях животных и человека. В том же 2012 году была опубликована статья шести авторов, двум последних из которых – Д. Дудна (Jennifer A. Doudna) и Э. Шарпентьер (Emmanuelle Charpentier) присудили Нобелевскую премию по химии 2020 года за редактирование геномов. Суть работы заключалась в доказательстве того, что кластерные системы с регулярными интервалами коротких палиндромных повторов (CRISPR) / CRISPR-ассоциированные с нуклеазой Cas-9 обеспечивают бактерии и археи адаптивным иммунитетом против вирусов и плазмид за счет использования РНК CRISPR (crRNA) для подавления инвазивных нуклеиновых кислот. Защита клеток включает создание пары crRNA с транскриптивирующей crRNA (tracrRNA), направляющей CRISPR-связанный белок Cas9 для введения двухцепочечных разрывов в чужеродную целевую ДНК. В работе описано семейство рибонуклеаз, которые используют пары РНК для сайт-

специфического расщепления инвазивной ДНК вирусов и обосновано использования такой системы для редактирования геномов.

На более высоких уровнях взаимодействующих живых организмов большую роль играют *феромоны* (греч. Φέρω «несу» + ὀρμάω «возбуждаю, побуждаю») – собирательное название веществ – продуктов внешней секреции, выделяемых некоторыми видами животных и растений, которые обеспечивают химическую коммуникацию между особями одного вида. Феромоны (видовые биологические маркеры) являются химическими сигналами, управляющими нейроэндокринными поведенческими реакциями, процессами развития, социального поведения и размножения. Феромоны модифицируют физиологическое и эмоциональное состояние, обмен веществ и поведение других особей того же вида. Как правило, феромоны синтезируются и выделяются специализированными клетками (железами). Первыми феромоны удалось обнаружить группе немецких исследователей под руководством А. Бутенандта. В результате многолетней работы им удалось выделить из желез самок шелкопряда простое по химическому строению вещество, привлекавшее самцов того же биологического вида. Полученное вещество было названо бомбикол – из-за латинского названия шелкопряда, *Bombyx mori*. Результаты их работы были опубликованы в 1962 году. Ими была проделана огромная работа, в результате которой из нескольких десятков тысяч самок *Bombyx mori* было выделено всего 4 мг бомбикола (рисунок 2, приложение).

Феромоны являются сигнально-коммуникативными молекулами, которые могут распространяться в воздухе и воде. Они передают сигналы от одного организма к другому и влияют на поведение реципиента. Эти вещества в целом называются феромонами, что означает в переводе приносить, управлять. Различают: феромоны – релизеры, которые вызывают немедленный поведенческий эффект, например, сигнал тревоги и феромоны-праймеры, вызывающие длительный физиологический эффект в воспринимаемом организме (отношение особи насекомых к определенной касте).

Известны несколько *классификаций феромонов*.

1. По взаимодействию между видами животных:
  - а. Алломоны (они дают выгоду донору, именно тому, кто вырабатывает феромоны).
  - б. Кайромоны (они дают выгоду тому, кто их воспринимает).
2. По практическому использованию феромонов:
  - а. Феромоны-ловушки (используют вместо инсектицидов и ядохимикатов).
  - б. Феромоны-микроорганизмы, выделяющие феромоны, например, при конъюгации (обменом ДНК плазмид донора и реципиента). Если заингибировать этот процесс, то можно уменьшить конъюгацию, например, при борьбе с внутрибольничной инфекцией.



*Виды феромонов.* В учебной литературе можно встретить специальные названия феромонов:

- эпагоны – половые аттрактанты;
- гамофионы – феромоны полового созревания;
- гонофионы – феромоны, запускающие смену пола;
- лихневмоны – феромоны, маскирующие животное под другой вид.
- одмихнионы – метки пути, указывающие дорогу;
- торибоны – феромоны тревоги и страха;
- этофионы – феромоны поведения;

*Типы сигнализации многоклеточного организма.* Клетки многоклеточного организма нуждаются в обмене информацией друг с другом – для регуляции своего развития и организации в ткани, для контроля процессов роста и деления и для координации функций. Взаимодействие животных клеток осуществляется тремя способами:

1) клетки выделяют химические вещества, служащие сигналами для других клеток, расположенных на некотором расстоянии;

2) они несут на своей поверхности связанные с плазматической мембраной сигнальные молекулы, оказывающие влияние на другие клетки при непосредственном физическом контакте;

3) образуют щелевые контакты, прямо соединяющие цитоплазму двух взаимодействующих клеток, что делает возможным обмен малыми молекулами.

*Варианты химической коммуникации животных.* Известно 3 варианта химической коммуникации клеток внутри животного организма, различающиеся по расстояниям, на которых они действуют:

- 1) эндокринная;
- 2) паракринная сигнализация;
- 3) синаптическая передача.

В первом случае выделяемые эндокринными клетками сигнальные молекулы-гормоны разносятся током крови по всему организму и достигают самых удаленных клеток-мишеней. Во втором случае из-за быстрой инактивации или связывания клетками-мишенями сигнальные молекула-медиаторы диффундируют на расстояния порядка миллиметра. При синаптической передаче диффузия ограничивается расстояниями около 0,05 мм. Во всех случаях диффузия сигнальной молекулы должна завершаться ее связыванием с особым белком клетки-мишени – рецептором.

Охарактеризуем три варианта химической коммуникации животных. Химические *сигнальные механизмы различаются по расстояниям*, на которых они действуют:

1) в случае эндокринной сигнализации специализированные эндокринные клетки выделяют гормоны, которые разносятся кровью и воздействуют на клетки-мишени, находящиеся иногда в самых разных частях организма (до метров);

2) в случае паракринной сигнализации клетки выделяют локальные химические медиаторы, которые поглощаются, разрушаются или иммобилизуются так быстро, что успевают подействовать только на клетки ближайшего окружения, быть может, в радиусе около миллиметра;

3) при синаптической передаче, используемой только в нервной системе, клетки секретируют нейромедиаторы в специализированных межклеточных контактах, называемых химическими синапсами, Нейромедиаторы диффундируют через синаптическую щель, обычно на расстояние около 50 нм, и воздействуют только на одну постсинаптическую мембрану клетки-мишени.

Прослеживается аналогия между ферментативными реакциями и системами передачи информации с помощью сигнальных молекул. Каждая биохимическая реакция протекает с обязательным участием определенного фермента. Ферментативная реакция есть своеобразный сигнальный процесс, процесс передачи информации. Молекула субстрата, реагирующего вещества, является сигналом для своего приемника – фермента. Под действием такого сигнала происходит изменение конформации, структуры фермента, организуется индуцированная подгонка субстрата к активному центру фермента. Сама сигнальная молекула модифицируется и как продукт реакции покидает фермент и служит новым сигналом для следующей реакции. А фермент играет роль трансформирующего устройства, перекодирующего поступающую информацию в виде молекулы субстрата.

Особый интерес представляют расстояния, преодолеваемые сигнальными молекулами. Феромоны могут распространяться в воздухе на расстояние до 4-х км. Расстояния, преодолеваемые сигнальными молекулами в организме, могут измеряться метрами перемещения на такие большие расстояния обусловлены не диффузией, а различными видами транспорта, например, движением крови, лимфы и др. Вблизи клетки, на расстояниях порядка микрометра от ее поверхности, молекулы достигают рецепторных мембранных структур уже посредством диффузии. Наличие рецепторных структур на мембранах клеток часто резко ускоряет взаимодействие сигнальной молекулы с рецептором.

Не менее важными являются условия, определяющие транспорт сигнальных молекул. Будучи нерастворимы в водных средах, гидрофобные сигнальные молекулы транспортируются кровью специальными белками-транспортерами, от которых они отделяются, перед тем как проникнуть в клетку. Внеклеточные сигнальные молекулы в зависимости от своей гидрофильно-гидрофобных свойств могут связываться с рецепторами на поверхности клеток или проникать через липидный бислой и соединяться с внутриклеточными рецепторами. Гидрофильные молекулы не способны прямо перемещаться в плазматической мембране, поэтому они и связываются с рецепторами на поверхности клетки-мишени. Но многие гидрофоб-

ные молекулы могут перемещаться через плазматическую мембрану и связываться с рецепторами внутри клетки.

*Экзогенная сигнализация* включает также восприятия запахов (обоняние), вкуса веществ, действие электромагнитных волн видимого диапазона, механических колебаний акустического диапазона, тепловых и механических раздражителей. Установлено, что молекулярные механизмы рецепции этих видов внешних воздействий имеют ряд общих черт с функционированием внутриклеточной биосигнализации. В 2021 году Нобелевскую премию по физиологии и медицине присуждена Давиду Джулиусу и Ардему Патипутяну за исследование молекулярных основ восприятия тепла, холода и механической силы: открытие нового класса рецепторов (TRPM8), активирующихся пониженной температурой, и нового рецептора TRPV1 в нервных окончаниях кожи, реагирующего на тепло.

*Рецепции биосигналов.* Связывание лиганда с рецептором запускает ряд событий, в результате которых внеклеточные сигналы передаются в клетку, изменяя экспрессию генов. Одиночные рецепторные молекулы могут передавать сигналы, взаимодействуя с лигандом, но сигнальный путь, как правило, включает связывание лигандом двух или более рецепторных молекул. Рецепторы в основном находятся на поверхности клеток-мишеней, но также могут располагаться в цитоплазме или ядре. Знание свойств основных типов рецепторов и способов передачи сигнала внутрь клетки важно для понимания процессов нормального и неконтролируемого (опухолевого) роста клеток.

*Различают следующие основные типы рецепторов (рисунок 3, примечание):*

- 1) рецепторы, обладающие собственной тирозинкиназной активностью;
- 2) рецепторы, являющиеся каналами в плазматической мембране;
- 3) 7-ТМ (трансмембранные) G-белок-связанные рецепторы.

Для рецепторов первого типа, обладающих собственной тирозинкиназной активностью лигандами являются большинство факторов роста, например EGF, TGF- $\alpha$ , HGF, PDGF, VEGF, FGF, лиганд c-KIT и инсулин. Рецепторы данного семейства, обладающие собственной тирозинкиназной активностью, имеют внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный участок и цитоплазматический хвост.

Связывание с лигандом вызывает димеризацию рецептора, фосфорилирование тирозина и активацию тирозинкиназных рецепторов. Активная киназа фосфорилирует и тем самым активирует многочисленные эффекторные молекулы (молекулы, опосредующие эффекты взаимодействия рецептора с лигандом). Активация эффекторных молекул может происходить напрямую либо при участии адаптерных белков. Прототипный адаптерный белок GRB-2, связывающий гуанозинтрифосфат и гуанозиндифос-

фат, замещает фактор SOS. SOS воздействует на гуанозинтрифосфатсвязывающий белок (G-белок) RAS и катализирует образование комплекса RAS-гуанозинтрифосфат, запускающего каскад митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК). Активные МАРК стимулируют синтез и фосфорилирование факторов транскрипции, например FOS и JUN. Активированные различными сигнальными каскадами факторы транскрипции стимулируют образование факторов роста, рецепторов факторов роста и белков, непосредственно контролирующих входение клетки в клеточный цикл.

Другими эффекторными молекулами, активируемыми рецепторами с внутренней тирозинкиназной активностью, являются фосфолипаза C и фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K). Фосфолипаза C катализирует распад мембранных инозитолфосфолипидов на инозитол-1,4,5-трифосфат, важную эффекторную молекулу, повышающую концентрацию кальция, и диацилглицерол, активирующий серин/треонинпротеинкиназу C, которая, в свою очередь, активирует различные факторы транскрипции. PI3K фосфорилирует мембранные фосфолипиды, создавая продукты, активирующие киназу Akt (протеинкиназу B), которая участвует в клеточной пролиферации и выживаемости клеток путем ингибирования апоптоза. Изменения тирозинкиназной активности и мутации рецепторов были обнаружены при многих формах злокачественных опухолей и являются важными терапевтическими мишенями.

Существует группа рецепторов, не обладающих собственной тирозинкиназной активностью. Лигандами этих рецепторов являются многие цитокины, например IL-2, IL-3 и другие интерлейкины, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  и IFN- $\gamma$ , эритропоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гормон роста и пролактин. Эти рецепторы передают внеклеточные сигналы в ядро, активируя белки из семейства Janus-киназ (JAK). JAK связываются с рецепторами и активируют цитоплазматические факторы транскрипции – трансдукторы сигнала и активаторы транскрипции (STAT), которые непосредственно проникают в ядро и активируют транскрипцию генов. Цитокиновые рецепторы также могут активировать другие сигнальные пути, например путь МАРК.

Особый интерес представляют 7-ТМ трансмембранные G-белоксвязанные рецепторы (GPCR). Эти рецепторы передают сигнал в клетку с помощью тримерных гуанозинтрифосфатсвязывающих белков (G-белков). Рецепторы содержат семь трансмембранных сегментов альфа-спирали и являются самым большим семейством рецепторов плазматической мембраны, составляя около 1% генома человека. Большое количество лигандов действуют через этот тип рецепторов, в том числе хемокины, вазопрессин, серотонин, гистамин, адреналин и норадреналин, кальцитонин, глюкагон, паратиреоидный гормон, адренокортикотропный гормон (АКТГ) и родопсин. Эти рецепторы являются мишенью огромного количества широко

распространенных фармацевтических препаратов. Связывание с лигандом приводит к конформационному изменению рецепторов, активируя их и позволяя взаимодействовать с различными G-белками.

Активация G-белка происходит путем обмена гуанозиндифосфата, присутствующего в неактивных белках, на гуанозинтрифосфат, активирующий белок. Среди многих ответвлений этого сигнального пути имеются такие, в которых в качестве вторичных мессенджеров участвуют кальций и цАМФ. Активация G-белок-связанных рецепторов (а также тирозинкиназных рецепторов может приводить к образованию инозитол-1,4,5-трифосфата, который высвобождает кальций из эндоплазматического ретикулула. Кальциевые сигналы, как правило колебательного характера, имеют несколько мишеней, включая белки цитоскелета, хлорные и калиевые ионные насосы, ферменты, например, кальпаин, и кальцийсвязывающие белки, например, кальмодулин. Известно, что цАМФ активирует более ограниченный набор мишеней, включающий протеинкиназу А и цАМФ-зависимые белки, например, транскрипционный фактор CRP (сАМР receptor protein), также называемый CAP (активатный белок генов катаболизма). Последний фактор формирует комплекс с цАМФ и таким образом становится возможным его связывание с ДНК. Генетические дефекты, затрагивающие сигнальные пути G-белок-связанных рецепторов, ассоциированы с пигментным ретинитом, дефицитом АКТГ и гиперпаратиреозом. Рецепторы стероидных гормонов, как правило, расположены в ядре и действуют как лиганд-зависимые факторы транскрипции. Лиганды проникают через клеточную мембрану и, связываясь с неактивными рецепторами, активируют их. Затем активированный рецептор взаимодействует со специфической последовательностью ДНК, известной как гормональный чувствительный элемент гена-мишени, или связывает другие факторы транскрипции. Кроме стероидных гормонов к лигандам данного семейства рецепторов относят тиреоидный гормон, витамин D и ретиноиды. Существует группа рецепторов, называемая рецепторами, активирующими пролиферацию пероксисом. Это ядерные рецепторы, участвующие во многих реакциях, включая липогенез, воспаление и атеросклероз. Их исследуют, например, при оценке соответствия генотипа и фенотипа спортсмена избранному виду спорта.

В соответствии со схемой, приведенной в разделе «тема 1», дальнейшее изложение материала будет происходить против часовой стрелки, начиная от рецептора GPCR (рецептором третьего вида).

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### **Вопросы**

1. Опишите межклеточный сигналинг у микроорганизмов.
2. Приведите пример сигналинга в системе бактерия – растение.
3. В чем заключается процесс перепрограммирования соматических клеток в эмбриональное состояние?
4. Охарактеризуйте феромоны и дайте их классификацию.
5. Назовите типы сигнализации многоклеточного организма.
6. Как осуществляется рецепция биосигналов и назовите типы рецепторов.
7. Опишите свойства рецепторов, обладающие собственной тирозинкиназной активностью.
8. Назовите свойства рецепторов, являющихся каналами в плазматической мембране.
9. Охарактеризуйте 7-ТМ трансмембранные G-белок-связанные рецепторы (GPCR).

### **ТЕСТЫ**

1. Укажите процессы жизнедеятельности, которыми микроорганизмы способны управлять в рамках системы QS:
  - 1) окраска клеток и размножение;
  - 2) образование биопленок и патогенность;
  - 3) фагоцитоз и питание;
  - 4) эндоцитоз и деление;
  - 5) индукция апоптоза.
2. Назовите фермент, который использует пару РНК для направленного сайт-специфического расщепления инвазивной ДНК вирусов:
  - 1) липаза;
  - 2) лигаза;
  - 3) CRISPR-связанный белок Cas9
  - 4) трансфераза;
  - 5) инвертаза.
3. Укажите природу первого ферромона выделенного из желез самок шелкопряда – бомбикола:
  - 1) насыщенный многоатомный спирт;
  - 2) насыщенный многоатомный спирт;
  - 3) насыщенный одноатомный спирт;
  - 4) ненасыщенный одноатомный спирт;
  - 5) углевод.

4. Назовите феромоны, которые вызывают немедленный поведенческий эффект на воздействие:

- 1) бомбикол;
- 2) праймеры;
- 3) алломоны;
- 4) кайромоны;
- 5) релизеры.

5. Определите специальные названия феромонов, которые вырабатываются при тревоге и страхе:

- 1) гамофионы;
- 2) гонофионы;
- 3) лихневмоны;
- 4) торибоны;
- 5) этофионы.

6. Выберите вид феромонов, выработка которых дает выгоду донору, именно тому, кто вырабатывает феромоны:

- 1) бомбиколы;
- 2) праймеры;
- 3) алломоны;
- 4) кайромоны;
- 5) релизеры.

7. Укажите, как называется тип химической коммуникации, при которой сигнальные молекулы разносятся током крови по всему организму и достигают самых удаленных клеток-мишеней:

- 1) эндокринная сигнализация;
- 2) паракринная сигнализация;
- 3) синаптическая сигнализация;
- 4) экзогенная сигнализация;
- 5) эндогенная сигнализация.

8. Выберите вид сигнализации, который включает восприятия запахов (обоняние), вкуса веществ, действие электромагнитных волн видимого диапазона, механических колебаний акустического диапазона, тепловых и механических раздражителей.

- 1) эндокринная сигнализация;
- 2) паракринная сигнализация;
- 3) синаптическая сигнализация;
- 4) экзогенная сигнализация;
- 5) эндогенная сигнализация.

9. Укажите семейство рецепторов, которые имеют внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный участок и цитоплазматический домен, обладающий ферментативной активностью:

- 1) рецепторы, обладающие собственной тирозинкиназной активностью;
- 2) рецепторы, являющиеся каналами в плазматической мембране;
- 3) 7-ТМ (трансмембранные) G-белок-связанные рецепторы;
- 4) митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК);
- 5) Janus-киназа (JAK).

10. Выберите эффекторные молекулы, которые фосфорилируют мембранные фосфолипиды, а образовавшиеся продукты, активирующие киназу Akt (протеинкиназу B), способствуют клеточной пролиферации и выживаемости клеток путем ингибирования апоптоза:

- 1) митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК);
- 2) фосфолипаза C;
- 3) фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K);
- 4) протеинкиназа A;
- 4) Janus-киназа (JAK).

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Ротенон (токсичное вещество, вырабатываемое одним из видов растений) резко подавляет активность митохондриальной НАДН-дегидрогеназы. Токсичный антибиотик антимицин сильно ингибирует окисление убихинола. Допустим, что оба эти вещества блокируют соответствующие участки дыхательной цепи с равной эффективностью. Какой из них будет при этом более мощным ядом? Дайте аргументированный ответ.

**Задача 2.** Многие патогенные микроорганизмы (возбудители гнойных инфекций, газовой гангрены) содержат фермент гиалуронидазу, которая способствует внедрению этих микроорганизмов в ткани, а также возникновению и распространению патологического процесса. Почему это происходит?

**Задача 3.** Обнаружено, что при раздражении вагосимпатического ствола у лягушки сначала наблюдается уменьшение силы и частоты сердечных сокращений вплоть до остановки сердца в диастолу. Потом наблюдается восстановление сердечной деятельности, причем некоторое время сердце сокращается с большей частотой и силой, чем до раздражения вагосимпатического ствола. При раздражении вагосимпатического ствола после аппликации атропина наблюдается увеличение частоты и силы сердечных сокращений. Чем обусловлено начальное уменьшение силы и частоты сердечных сокращений? Почему после прекращения раздражения вагосимпатического ствола наблюдается усиление сократительной деятельности сердца? Почему при раздражении вагосимпатического ствола после аппликации не наблюдается вагусного торможения?



### Тема 3

## ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ПОСРЕДСТВОМ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С G-БЕЛКАМИ

### ГЛОССАРИЙ

**Эффекторные молекулы** – молекулы, которые запускают образование внутриклеточных посредников.

**Нейромедиаторы** (нейротрансмиттеры, посредники) – биологически активные химические вещества, посредством которых осуществляется передача электрохимического импульса от нервной клетки через синаптическое пространство между нейронами, а также, например, от нейронов к мышечной ткани или железистым клеткам.

**Рецепторы хемокинов** – рецепторы группы GPCR, которые активируют клеточный ответ посредством взаимодействия с тримерными G-белками.

**Гетеротримерные G-белки** – белки с четвертичной структурой, состоящие из трех субъединиц: альфа( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ ), которые опосредуют эффекты сигнальных молекул, связывающихся рецепторами группы GPCR.

**Хемокины** – семейство структурно-гомологичных цитокинов, которые стимулируют передвижение лейкоцитов и регулируют их миграцию из крови в ткани.

**Орфановый рецептор** («рецептор-сирота», «сиротский рецептор») – клеточный рецептор, эндогенный лиганд которого еще не обнаружен и потому неизвестен.

**Бета-2-адренергические рецепторы** ( $\beta$  2-адренорецепторы, ADRB2) – один из подтипов адренорецепторов. Эти рецепторы чувствительны в основном к адреналину, а норадреналин действует на них слабо, так как эти рецепторы имеют к нему низкую аффинность.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Известны четыре типа основных сигнальных механизмов, в зависимости от активируемых рецепторов:

1. Рецепторы, связанные с G-белками
2. Рецепторы, связанные с тирозинкиназой
3. Связанные с лигандами ионные каналы
4. Внутриклеточные рецепторы

**G-белки** (англ. *G proteins*) – это семейство белков, относящихся к ГТФамам и функционирующих в качестве вторичных посредников во

внутриклеточных сигнальных каскадах. G-белки названы на основании того, что в своем сигнальном механизме они используют *замену ГДФ на ГТФ* как молекулярный функциональный «выключатель» для регулировки клеточных процессов. G-белки были обнаружены и исследованы А. Гилманом и М. Родбелом, которые получили за это открытие Нобелевскую премию в 1994 году.

G-белки делятся на две основных группы:

- гетеротримерные («большие») G-белки;
- «малые» G-белки.

Гетеротримерные G-белки – это белки с четвертичной структурой, состоящие из трех субъединиц: альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ ). Малые G-белки – это белки из одной полипептидной цепи, они имеют молекулярную массу 20–25 кДа и относятся к суперсемейству Ras малых ГТФаз. Их единственная полипептидная цепь гомологична  $\alpha$ -субъединице гетеротримерных G-белков. Обе группы G-белков участвуют во внутриклеточной сигнализации.

У всех гетеротримерных G-белков сходный механизм активации: они активируются при взаимодействии со специфическими рецепторами, сопряженными с G-белками, при этом *обменивают ГДФ на ГТФ* (при активации) и распадаются на  $\alpha$ - и  $\beta\gamma$ -субъединицы.  $\alpha$ -Субъединица, связанная с ГТФ, воздействует на следующее звено в цепи передачи сигнала.  $\beta\gamma$ -Субъединица также может вызывать собственные эффекты.

Инактивация G-белков происходит в результате медленного гидролиза ГТФ до ГДФ  $\alpha$ -субъединицей, после чего происходит реассоциация (объединение) субъединиц. В работе многих G-белков участвуют вспомогательные белки:

- GAPs (GTPase Activating Proteins, белки-активаторы ГТФазной активности) ускоряют гидролиз ГТФ, ускоряя инактивацию G-белков. Особенно важна функция GAPs для малых G-белков, так как альфа-субъединицы гетеротримерных G-белков часто сами обладают достаточной ГТФ-азной активностью. К GAP-белкам относятся белки семейства RGS.

- GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors, факторы обмена гуаниловых нуклеотидов), ускоряют обмен ГДФ на ГТФ и таким образом активируют G-белки. Обычно для G-белка GEF-ом служит активированный лигандом рецептор.

- AGS белки (Activator of G-protein Signaling, активаторы передачи сигнала G-белками), которые могут активировать G-белок независимо от воздействия на него рецептора.

Рецепторы, сопряженные с G-белком, (англ. *G-protein-coupled receptors, GPCRs*), имеющие также название *семистиральные рецепторы* или *серпентины*, составляют большое семейство трансмембранных рецепторов (7-ТМ рецепторы). GPCR выполняют функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигналов, приводящих к клеточному ответу.

Рецепторы этого семейства обнаружены только в клетках эукариот: у дрожжей, растений, животных. Эндогенные лиганды-агонисты (усилители сигналов), которые связываются и активируют эти рецепторы, включают гормоны, феромоны, нейромедиаторы, светочувствительные вещества, пахучие вещества, и различаются в своих размерах от небольших молекул и пептидов до белков. Нарушение работы GPCR приводит к возникновению множества различных заболеваний, а сами рецепторы являются мишенью до 40% выпускаемых лекарств. Рецепторы кодируют до 800 генов у человека.

Рецепторы, связанные с G-белками участвуют в регуляции следующих основных физиологических процессов:

- зрение: опсины используют реакцию фотоизомеризации для превращения электромагнитных волн в клеточные сигналы. Родопсин, например, использует превращение *11-цис*-ретинала в *полностью-транс*-ретиаль для этой цели;
- обоняние: рецепторы обонятельного эпителия связывают пахучие вещества (обонятельные рецепторы) и феромоны (вомероназальные рецепторы);
- поведение и настроение: рецепторы в мозге млекопитающих связывают несколько различных нейромедиаторов, включая серотонин, дофамин, гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) и глутамат;
- иммунитет и воспаление: хемокиновые рецепторы связывают лиганды, которые осуществляют межклеточную коммуникацию в системе иммунитета; гистаминовый рецептор связывает гистамин и вовлекает определенные типы клеток в воспалительный процесс;
- вегетативная нервная система: как симпатическая, так и парасимпатическая системы регулируются посредством рецепторов, связанных с G-белками, ответственными за многие автоматические функции организма, такие как поддержание кровяного давления, частоты сердечных сокращений и пищеварения.

Таким образом, рецепторы, сопряженные с G-белками, имеют семь  $\alpha$ -спиралей, пронизывающих мембрану. Они активируются внешним сигналом в виде связывающегося лиганда. Это создает конформационные изменения в рецепторе, вызывающие активацию G-белка. Дальнейший эффект зависит от типа G-белка. Семейство GPCR включает рецепторы органов чувств (реагирующие, например, на свет или молекулы пахучих веществ); аденозина, бомбезина, брадикинина, эндотелина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, фактора роста гепатоцитов, меланокортинов, нейропептида Y, опиоидных пептидов и многих десятков других биоактивных веществ, в том числе и гормонов. Существует также GPCR, лиганды и стимулы для которых еще не определены, их называют рецепторами-сиротами, или орфановыми рецепторами.

В отличие от других рецепторов, когда лиганды связываются на внешней стороне мембраны, лиганды GPCR обычно связываются в *транс*-

мембранном домене. Известно, что неактивный G-белок связан с рецептором в его неактивном состоянии. Как только лиганд распознан, рецептор меняет конформацию и таким образом механически активирует G-белок, который отсоединяется от рецептора. Теперь рецептор может или активировать следующий G-белок, или переключиться обратно в свое неактивное состояние. Считается, что молекула рецептора существует в конформационном равновесии между активным и неактивным состояниями. Связывание лиганда может сдвинуть равновесие в сторону активного состояния.

Существуют три типа лигандов:

- *агонисты* – смещают равновесие в сторону активного состояния;
- *обратимые агонисты* – смещают равновесие в сторону неактивного состояния;
- *нейтральные агонисты* – не влияют на равновесие.

На рисунке 4 (приложение) представлены 3 этап действия гетеротримерного G-белка:

1. Неактивный гетеротримерный белок.
2. Активация после связывания рецептором лиганда (замена ГДФ на АТФ).
3. Альфа-субъединица+ГТФ активируют фермент (аденилатциклазу или фосфолипазу С.

Таким образом, гетеротримерные G-белки, также называемые гуанозиннуклеотид-связывающими белками, состоят из трех разных субъединиц, называемых альфа-, бета- и гамма-субъединицами и обозначаемых соответственно  $G_\alpha$ ,  $G_\beta$  и  $G_\gamma$ . Когда лиганд-агонист активирует G-белок-связанный метаботропный рецептор, альфа-субъединица G-белка ( $G_\alpha$ ) заменяет ГДФ на ГТФ, вследствие чего изменяется ее пространственная конфигурация, и димер  $G_{\beta\gamma}$  диссоциирует из связи с  $G_\alpha$ -субъединицей. Это позволяет обеим частям G-белка –  $G_\alpha$  и  $G_{\beta\gamma}$  независимо друг от друга активировать их собственные (различные у  $\alpha$ -субъединицы и у  $\beta\gamma$ -димера) нисходящие сигнальные каскады. Одной из важных функций  $\beta\gamma$ -димера является ингибирование, через цепь внутриклеточных событий, активности  $\alpha$ -субъединицы, что обеспечивает важную отрицательную обратную связь и эффективно ограничивает сигнал рецептора как по силе, так и по продолжительности.

При рассмотрении функционирование этой сигнальной системы необходимо оценить взаимодействие G-белка и эффекторных молекул. В системе сигнализации эффекторными называют молекулы, которые запускают образование внутриклеточных посредников. Рецепторы, сопряженные с G-белком передают сигнал на эффекторные молекулы: аденилатциклаза, фосфолипаза С, фосфолипаза А2, цГМФ-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов, и несколько типов ионных каналов. У каждого G-белка может быть несколько мишеней (эффекторных молекул). На рисунке 5

(приложение) продемонстрированы эффекты трех наиболее важных эффекторных белков в том числе 2 ферментов (1, 2) и канала (3).

Установлено, что большое количество первичных лигандов регулируют лишь несколько вторичных посредников. Таким образом, специфичность действия первично связывающихся лигандов определяется локализацией рецептора на определенных клетках, в которых вторичные мессенджеры вызывают экспрессию белков, специфичных для данной клетки.

Рассмотрим передачу сигнала посредством активации рецепторов, связанных с G-белками.

*Аденилатциклаза* (КФ 4.6.1.1.) – катализирует превращение АТФ в 3',5'-АМФ (цАМФ - циклическую форму АМФ). В процессе передачи сигнала аденилатциклаза может быть активирована G-белками, связанными с рецептором GPCR. Активация аденилатциклазы приводит к образованию цАМФ, функционирующей в качестве вторичного посредника (взаимодействует с протеинкиназой А, ионными каналами, связанными с циклическими нуклеотидами, и регулирует их функции). Адреналин вызывает в организме эффект, называемый «fight or flee» (бей или беги) – усиливается тонус мышц, увеличивается частота сердечных сокращений. Адреналин связывается с бета2-адренорецептором на плазматической мембране клеток печени. В результате связывания лиганда с внешней стороны плазматической мембраны, изменяется конформация всего адренорецептора и активируется сопряженный с адренорецептором, внутриклеточный тримерный G-белок. Активная часть G-белка ( $\alpha$ -субъединица + ГТФ) присоединяется к ферменту аденилатциклазе и активирует ее, что ведет к образованию цАМФ. Далее цАМФ распространяется по всей клетке и связывается с цАМФ-зависимой протеинкиназой А, причем с одной молекулой протеинкиназы связывается 4 молекулы цАМФ. Активированная протеинкиназа А разделяется на четыре части, две из которых обладают каталитическими активностями. Каждая из каталитических субъединиц способна фосфорилировать киназу фосфорилазы, активируя фермент. Киназа фосфорилазы фосфорилирует гликогенфосфорилазу. Активированная гликогенфосфорилаза в печени расщепляет гликоген, при этом образуется глюкозо-1-фосфат  $\rightarrow$  глюкозо-6-фосфат, который затем дефосфорилируется и превращается в глюкозу, последняя поступает в кровь. Поскольку адреналин является гормоном острого стресса, описанный механизм позволяет обеспечить мышцы энергией за счет аэробного гликолиза для борьбы или убегания (в течение секунд). Кроме этого, протеинкиназа А (ПКА) фосфорилирует ряд ферментов, среди которых киназа фосфорилазы гликогена, гликогенсинтаза, гормончувствительная липаза, транскрипционный фактор CREB (*cAMP-response element-binding protein*).

Когда концентрация адреналина в крови уменьшается, молекулы адреналина естественным образом отсоединяются от бета2-адренорецептора. Если адреналин не отсоединяется от бета2-адренорецептора, то рецептор

фосфорилируется киназой бета2-адренорецептора, а затем инактивируется  $\beta$ -аррестином. Это общий принцип отмены гормонального сигнала. G-белок сам обладает ферментативной активностью и медленно (в течение секунд или минут) превращает ГТФ в ГДФ. После этого он отходит от аденилатциклазы, и фермент инактивируется. Фермент фосфодиэстераза катализирует превращение цАМФ в АМФ. Ферменты фосфатазы дефосфорилируют киназу фосфорилазы и гликогенфосфорилазу.

*Фосфолипаза С* (КФ 3.1.4.3.) – фосфолипаза, гидролизующая фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком глицерофосфолипида и полярной фосфатной группой. Относится к фосфодиэстеразам, как и фосфолипаза D. Фосфолипаза С является ключевым ферментом метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей.

Выделяют два основных механизма активации фосфолипазы С (рисунок 6, приложение):

- рецепторы большинства гормонов, повышающих концентрацию кальция в цитоплазме клеток, сопряжены с фосфолипазой С за счет G-белков;
- рецепторы факторов роста активируют фосфолипазу С путем фосфорилирования.

Существует несколько путей ингибирования фосфолипазы С гормонами. Фосфолипаза С активируется субъединицами  $G_{\alpha q}$  или  $G_{\beta\gamma}$  G-белка. Таким образом, она является частью G-белок-связанного рецептора (*G protein-coupled receptor*) и соответствующего сигнального пути или частью трансмембранного рецептора с внутренней или ассоциированной тирозинкиназной активностью.

Фосфолипаза С гидролизует фосфатидилинозитол ( $\text{ФИФ}_2$ ,  $\text{PIP}_2$ ) на два вторичных медиатора инозитолтрифосфат ( $\text{ИФ}_3$ ,  $\text{IP}_3$ ) и диацилглицерол (ДАГ, DAG). Эти медиаторы вовлечены в последующие этапы сигнальных путей. В частности, они модулируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и протеинкиназу С, соответственно.

Например, норадреналин (на рисунке 6 - NE) активирует цепи внутриклеточной сигнализации с участием внутриклеточных липидов в роли вторичных посредников. Норадреналин, связываясь с рецептором, через G-белок активирует фосфолипазу С, которая гидролизует фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат ( $\text{ФИФ}_2$ ) с образованием двух вторичных посредников –  $\text{ИФ}_3$  и ДАГ.  $\text{ИФ}_3$ , связываясь со своими рецепторами на мембранах эндоплазматического ретикулума, открывает кальциевые каналы, что ведет к высвобождению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (цистерн эндоплазматического ретикулума) в цитоплазму, т.е. обеспечивает увеличение цитоплазматической концентрации ионов кальция. Такое увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  активирует протеинкиназу С. ДАГ также активирует этот фермент, но по  $\text{Ca}^{2+}$ -независимому механизму.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### **Вопросы**

1. Перечислите, основные сигнальные механизмы, которые выделяют в зависимости от активируемых рецепторов.
2. Охарактеризуйте семейство G-белков.
3. Назовите вспомогательные белки, участвующие в работе G-белков.
4. Приведите примеры физиологических процессов, в которых участвуют рецепторы, связанные с G-белками.
5. В чем заключаются 3 этапа действия гетеротримерного G-белка.
6. Как происходит передачу сигнала через активацию рецепторов, связанных с G-белками.
7. Охарактеризуйте аденилатциклазу.
8. Охарактеризуйте фосфолипазы А и С.
9. Как реализуется отмена гормонального сигнала?

## ТЕСТЫ

1. Укажите характеристики относящиеся гетеротримерным G-белкам: а) имеют четвертичную структуру; б) состоят из трех субъединиц: альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ ); в) состоят одной полипептидной цепи; г) участвуют во внутриклеточной сигнализации; д) относятся к суперсемейству Ras ГТФаз.

- 1) а, в, г;
- 2) в, г, д;
- 3) а, в, г;
- 4) б, г, д;
- 5) а, б, г.

2. Укажите характеристики малых G-белков: а) имеют четвертичную структуру; б) состоят из трех субъединиц: альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ ); в) состоят одной полипептидной цепи; г) участвуют во внутриклеточной сигнализации; д) относятся к суперсемейству Ras ГТФаз.

- 1) а, в, г;
- 2) в, г, д;
- 3) а, в, г;
- 4) б, г, д;
- 5) а, б, г.

3. Выделите функции вспомогательных GAPs (GTPase Activating Proteins, белки-активаторы ГТФазной активности) G-белков участвуют вспомогательные белки: а) ускоряют обмен ГДФ на ГТФ; б) активируют G-белки; в) ускоряют гидролиз ГТФ; г) ускоряют инактивацию G-белков; д) активируют G-белок независимо от воздействия на него рецептора.

- 1) а, б, в;
- 2) б, в;

- 3) в, г;
- 4) а, б;
- 5) а, б, д.

4. Выделите функции вспомогательных GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors, факторы обмена гуаниловых нуклеотидов): а) ускоряют обмен ГДФ на ГТФ; б) активируют G-белки; в) ускоряют гидролиз ГТФ; г) ускоряют инактивацию G-белков; д) активируют G-белок независимо от воздействия на него рецептора.

- 1) а, б, в;
- 2) б, в;
- 3) в, г;
- 4) а, б, д;
- 5) а, б.

5. Укажите для каких GPCR, лиганды и стимулы еще не определены:

- 1) орфановыми рецепторами;
- 2) рецепторы, связанные с G-белками;
- 3) рецепторы, связанные с тирозинкиназой;
- 4) связанные с лигандами ионные каналы;
- 5) внутриклеточные рецепторы.

6. Выберите лиганды, которые участвуют в смещении равновесие в сторону неактивного состояния:

- 1) агонисты;
- 2) обратимые агонисты;
- 3) нейтральные агонисты;
- 4) конформационные агонисты;
- 5) конфигурационные агонисты.

7. Выберите молекулы, которые не относятся к эффекторным молекулам, на которые рецепторы, сопряженные с G-белком могут передавать сигнал:

- 1) аденилатциклаза;
- 2) фосфолипаза C;
- 3) каталаза;
- 4) фосфолипаза A2;
- 5) цГМФ-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов.

8. Укажите, какой фермент катализирует превращение АТФ в 3',5'-АМФ (цАМФ - циклическую форму АМФ):

- 1) протеинкиназа А;
- 2) киназа фосфориллазы;
- 3) гликогенфосфориллаза;
- 4) аденилатциклаза;
- 5) глюкозо-6-фосфата.



9. Выберите фермент, который фосфорилирует протеинкиназа А(ПКА):

- 1) киназа фосфоорилазы гликогена;
- 2) лигазу;
- 3) гликогенсинтаза;
- 4) гормончувствительная липаза;
- 5) транскрипционный фактор CREB.

10. Выберите фермент, который является ключевым ферментом метаболизма фосфатилиинозитола и липидных сигнальных путей:

- 1) аденилатциклаза;
- 2) фосфолипаза С;
- 3) каталаза;
- 4) фосфолипаза А<sub>2</sub>;
- 5) цГМФ-специфическая фосфодиэстераза фоторецепторов.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Регуляция желудочной секреции осуществляется нервными и гуморальными механизмами. В частности, при поступлении пищи в желудок она воздействует на G-клетки, которые выделяют гастрин. Каким образом гастрин усиливает желудочную секрецию?

**Задача 2.** Для снятия тахикардии в клинической практике используют фармакологические препараты, блокирующие  $\beta$ -адренорецепторы (например, пропранолол). Почему блокада  $\beta$ -адренорецепторов может снять приступ тахикардии? Можно ли применять эти препараты у людей, склонных к бронхоспазмам? Можно ли применять эти препараты при пониженном артериальном давлении?

**Задача 3.** В практике «скорой помощи» для купирования приступа печеночной колики, вызванной спазмом желчевыводящих путей, используют вещества, блокирующие мускариновые холинорецепторы (М-холиноблокаторы, например, платифиллин). Какой физиологический механизм обуславливает лечебный эффект М-холиноблокаторов в этом случае? Какие сопутствующие физиологические эффекты могут при этом наблюдаться?

**Задача 4.** В офтальмологической практике для расширения зрачков используют раствор атропина, являющегося М-холиноблокатором. Почему закапывание раствора атропина вызывает расширение зрачка? Могут ли при этом наблюдаться изменения частоты и силы сердечных сокращений? Может ли при этом измениться сократительная функция скелетной мускулатуры?

## Тема 4

# ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ПОСРЕДСТВОМ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ С ПРОТЕИНАЗНЫМ ДОМЕНОМ

## ГЛОССАРИЙ

**Аутофосфорилирование** – это тип посттрансляционной модификации белков. У эукариот этот процесс происходит путем добавления фосфатной группы к остаткам серина, треонина или тирозина для регулирования каталитической активности.

**Адаптерный белок**, передающий сигнал (STAP) является вспомогательным по отношению к основным белкам в пути передачи сигнала. Обычно адаптерные белки содержат множество белков-связывающих модулей, которые связывают белок-связывающих партнеров вместе и способствуют созданию более крупных сигнальных комплексов.

**Каскад арахидоновой кислоты** – мишень действия нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Благодаря сочетанию болеутоляющего, жаропонижающего и противовоспалительного действия НПВП являются наиболее часто применяемыми в мире лекарствами. Достаточно упомянуть, что их получают около 20% стационарных больных с различными заболеваниями внутренних органов и суставов.

**Трансмембранные домены** – области белка, которые являются гидрофобными, и взаимодействуют с гидрофобными цепями жирных кислот фосфолипидного бислоя.

**Конформация молекулы** (от лат. *Conformatio* «форма, построение, расположение») – пространственное расположение атомов в молекуле определенной конфигурации, обусловленное поворотом вокруг одной или нескольких одинарных сигма-связей.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Рецепторы к инсулину, инсулиноподобному фактору роста (ИФР) и эпидермальному фактору роста (ЭФР) и другим ростовым факторам принадлежат к группе рецепторов, структурно и функционально отличной от GPCR. В отличие от GPCR, они пронизывают клеточную мембрану только один раз и передают сигнал посредством активации тирозинкиназы, которая входит в состав этих рецепторных молекул, поэтому их обычно и называют *тирозинкиназами*. К их основным лигандам относятся гормоны (инсулин, ИФР) и паракринные/аутокринные регуляторы (тромбоцитарный фактор роста ТромбФР, ОФРФ и ЭФР). Таким образом, за счет тирозинового фосфорилирования эти рецепторы опосредуют многие физиологические процессы, та-

кие как пролиферация, миграция, дифференцировка и апоптоз клеток. Это объясняет повышенный интерес к этим рецепторам онкогенетиков.

*Рецепторы, обладающие собственной тирозинкиназной активностью.* Лигандами этих рецепторов являются большинство факторов роста, например EGF, TGF- $\alpha$ , HGF, PDGF, VEGF, FGF, лиганд c-KIT и инсулин (рисунок 7, приложение). Структуру рецепторов с тирозинкиназной активностью составляют трансмембранные белки с одним мембранным доменом. Как правило это гомодимеры, альфа- и бета-субъединицы которых связаны дисульфидными связями.

Рецепторы данного семейства, обладающие собственной тирозинкиназной активностью, имеют 3 домена:

- внеклеточный лиганд-связывающий домен;
- трансмембранный участок;
- цитоплазматический хвост.

Связывание с лигандом вызывает димеризацию рецептора, фосфорилирование тирозина и активацию тирозинкиназных рецепторов.

*Строение рецепторов.* Лигандспецифичность обуславливается уникальными аминокислотными последовательностями, образующими внеклеточный домен, который определяет трехмерную конфигурацию рецептора. Трансмембранные домены гетерогенны, в то время как внутриклеточные – гомологичны. При связывании с лигандом они претерпевают конформационные изменения и аутофосфорилирование.

*Передача сигнала тирозинкиназными рецепторами.* Связывание лиганда (например, фактора роста с рецептором вызывает димеризацию рецептора и аутофосфорилирование остатков тирозина. Адаптерные (или замыкающие) белки (например, GRB-2 и SOS) связывают рецептор, делая неактивным белок RAS. Переход RAS из неактивной формы в активную и обратно регулируется белками-активаторами гуанозинтрифосфатазы (GAP). Активированный RAS взаимодействует с RAF (МККК) и активирует его. Затем МККК фосфорилирует MEK (МКК), участника сигнального пути MAPK, потом МКК фосфорилирует ERK (MAPK). Активированная MAPK фосфорилирует другие цитоплазматические белки и ядерные факторы транскрипции, запуская клеточный ответ. Фосфорилированный тирозинкиназный рецептор также может связывать другие элементы, например, фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), активирующую другие сигнальные системы.

*Активация эффекторных молекул.* Активация эффекторных молекул может происходить напрямую либо при участии адаптерных белков. Прототипный адаптерный белок GRB-2, связывающий гуанозинтрифосфат и гуанозиндифосфат, замещает фактор SOS. SOS воздействует на гуанозинтрифосфатсвязывающий белок (G-белок) RAS и катализирует образование комплекса RAS-гуанозинтрифосфат, запускающего каскад митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK).

*Рецептор к ИФР-1.* Строение рецептора к ИФР-1 напоминает строение инсулинового рецептора с его двумя трансмембранными доменами, соединенными дисульфидными мостиками, образованного двумя  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами. Ген рецептора к ИФР-1 расположен на хромосоме 15 (15q25-26) и содержит 21 экзон. Связывание лиганда (например, инсулина) с внеклеточным доменом запускает димеризацию рецептора. Это приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков как на рецепторе, так и на внерецепторных субстратах. Фосфорилирование тирозиновых остатков на рецепторе происходит в специфических участках, которые затем связывают множество вспомогательных протеинов, обладающих собственными сигнальными свойствами. К таким протеинам относятся фосфолипаза С, фосфоинозитид-3-киназа (ФИ-3-К), ГнРГ-ассоциированный пептид (ГнРГ-АП) и белок, связанный с рецепторами факторов роста-2 (Grb-2).

*Создание каркаса для сложных сигнальных путей.* Несмотря на то, что описанные взаимодействия могут запускать немедленные сигнальные эффекты, другие вспомогательные протеины (такие как Grb-2) способны создавать «каркас» для более сложных сигнальных сетей, например пути *RAS-RAF-MEK*. Этот сигнальный путь вовлекает множество других протеинов, запуская процессы ядерной транскрипции и синтеза белка. У гормона роста и пролактина рецепторы относятся к другой группе, также обладающей единым трансмембранным сегментом и коротким цитоплазматическим сегментом. Однако, в отличие от рецепторов к ИФР-1/инсулину, они не обладают внутренней тирозинкиназной активностью, а взаимодействуют с другими растворимыми молекулами и трансдукторами (например, так называемой киназой Януса 2, JAK-2), обладающими тирозинкиназной активностью.

*MAP-киназный путь.* Кроме ранее указанных для рецепторов, сопряженных с G-белками, существует важный дополнительный сигнальный путь – *каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAP-киназ)*, регулирующих выживание, дифференцировку и апоптоз. Принцип их действия заключается в поэтапном фосфорилировании MAP-киназами верхнего уровня MAP-киназ нижнего уровня. Сначала комплекс лиганд-рецептор активирует малые ГТФазы, которые запускают киназы киназ MAP-киназ (МАРККК). Те, в свою очередь, активируют киназы MAP-киназ (МАРКК), которые запускают эффекторные MAP-киназы (МАРК). Далее МАРК фосфорилирует факторы, определяющие будущее клетки – дифференцировку или апоптоз.

Рецепторы с протеинкиназным доменом могут передавать сигнал через мессенджеры на основе фосфатидилинозитолов: диацилглицерола (ДАГ) и инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ) – ключевых участников фосфатидилинозитольного пути. Эти вещества образуются под действием гормональных сигналов из мембранного полифосфоинозида – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата ( $PIP_2$ ). Как обсуждалось в предыдущей теме  $\beta\gamma$ -субъединицы G-белков, а также вторичные мессенджеры тирозинкиназных рецепторов активируют фосфатидилинозитол-3-киназу 1 типа ( $PI3K1$ ), превращающую

фосфатидилинозитолбифосфат в  $PIP_3$ , и активируют фосфолипазы  $C\beta$  и  $C\gamma$ .  $\alpha$ -Субъединица  $G_q$ -белков стимулирует фосфолипазу  $C\delta$ , которая вместе с  $C\beta$  и  $C\gamma$  изоформами обеспечивает образование  $DAГ$  и  $IP_3$ . Выделившийся в цитоплазму  $IP_3$  активирует  $Ca^{2+}$  –  $IP_3$ -зависимые каналы эндоплазматического ретикулума, повышая внутриклеточную концентрацию ионов кальция  $Ca^{2+}$ . Высокая внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  активирует фосфолипазу  $A_2$ , отвечающую за активность каскада арахидоновой кислоты (и, соответственно, синтез простагландинов, лейкотриенов и тромбоксана), а также кальмодулина. Остающийся в мембране  $DAГ$  совместно с цитоплазматическим  $Ca^{2+}$  активирует протеинкиназу  $C$  (ПКС), фосфорилирующую зависимые белки. Помимо этого, мембранный  $PIP_3$  отвечает за активацию протеинкиназ  $C\gamma$  и  $C\epsilon$ , ингибирующих апоптоз, и эффекторных протеинкиназ ( $Akt$  и др.) также обеспечивающих выживание клетки.

*Серин-треонин протеинкиназы.* Эти киназы хорошо известны как регуляторы многочисленных клеточных процессов. К их числу относятся участники *MAP-каскада трех киназ: RAF, MAPKK и MAPK*. Этот модуль из трех киназ является может быть наиболее важным узлом передачи сигнала. Он очень консервативен и уже в дрожжах используется по нескольким назначениям, а у млекопитающих он вовлечен в сигнальные системы множества рецепторов.

*Серин-треониновые протеинкиназы.* Серин-треониновые протеинкиназы (КФ 2.7.11.1.) фосфорилируют гидроксильную группу в остатках серина или треонина. Активность этих протеинкиназ регулируется несколькими факторами (например, повреждениями ДНК), а также некоторыми химическими сигналами, в том числе, цАМФ, цГМФ,  $DAГ$ ,  $Ca^{2+}$ , кальмодулином. Киназа фосфорилазы (КФ 2.7.11.19.) была открыта Кребсом в 1959 году и является первым описанным ферментом семейства серин/треониновых протеинкиназ. Киназа фосфорилазы превращает неактивную гликогенфосфорилазу *b* в активную форму гликогенфосфорилазу *a*, последняя отщепляет от гликогена остатки глюкозо-1-фосфата. Киназа фосфорилазы активируется протеинкиназой *A*.

*Передача сигналов от факторов роста семейства TGF-бета.* Передача сигнала от рецепторов ростовых факторов  $TGF$ -бета идет иным путем. Рецептор  $TGF$ -бета представляет собой гетеротетрамерную серин-треонинкиназу, который активирует путем фосфорилирования белки  $SMAD$  (цитоплазматические медиаторы  $SMAD$  1, 2, 3, 4, 5 и др.). Каждый рецептор взаимодействует со своим собственным членом семейства ростовых факторов  $TGF$ бета. И таким образом внутри клетки, вероятно, возникает специфический для данного ростового фактора отклик. Разные  $SMAD$  после активации связываются и образуют гетеродимерные комплексы с одной и той же медиаторной молекулой, известной как  $SMAD$  4. Считают, что этот белок может относиться к супрессорам опухолей. Образующийся комплекс перемещается в ядро, где он регулирует (активирует или репрес-

сирует) экспрессию ряда генов. Таким образом, трансформирующие факторы роста TGF-бета передают свои сигналы в клетку через SMAD факторы. Фосфорилирование SMAD3 осуществляемое TGF-бета рецептором, усиливает его взаимодействие с СВР/p300. Белки p300 и фосфорилированный SMAD3 совместно усиливают активацию транскрипции. Поэтому СВР/p300 являются важными компонентами TGF-бета сигнального пути и возможно участвуют в противоопухолевых функциях SMAD2 и SMAD4.

В завершение обсуждения материалов темы 4 суммируем материалы по протеинкиназному действию.

*Протеинкиназа А*, или цАМФ-зависимая протеинкиназа, относится к семейству ферментов, активность которых зависит от уровня цАМФ в клетке. Протеинкиназа А участвует в регуляции метаболизма гликогена, липидов, моносахаридов, ее субстратами могут быть другие протеинкиназы или другие метаболические ферменты. Ее следует отличать от АМФ-зависимой протеинкиназы, или АМФК, которая играет важную роль в поддержании энергетического баланса клетки и активируется посредством АМФ, а не цАМФ. Протеинкиназа А участвует в цАМФ-стимулируемой транскрипции генов, которые имеют цАМФ-реактивный элемент в регуляторном участке. Повышение концентрации цАМФ ведет к активации протеинкиназы А, которая в ответ фосфорилирует транскрипционный фактор CREB по остатку серина 133; CREB своим фосфорилированным участком связывает коактиватор транскрипции и стимулирует транскрипцию.

*Протеинкиназа В (Akt)*. Akt1 ингибирует процессы апоптоза, принимает участие в регуляции клеточного цикла, индуцирует синтез белка и поэтому является ключевым белком, регулирующим рост тканей, а также отвечает за развитие мышечной гипертрофии. Регуляция активности Akt осуществляется путем связывания фосфолипидов в мембране. Akt содержит PH-домен (Pleckstrin Homology domain, 120 остатков аминокислот), который высокоаффинно связывает фосфатидилинозитол-трифосфат и фосфатидилинозитолдифосфат. PH-домены выполняют функции заякоривания в мембранах. PIP<sub>2</sub> может быть фосфорилирован только PIP<sub>3</sub>-киназами, и только в случае, когда клетка получила сигнал к росту. PIP<sub>3</sub>-киназы могут быть активированы рецепторами, связанными с G-белками или рецепторами с тирозинкиназной активностью (например, инсулиновым рецептором). Только после активации PIP<sub>3</sub>-киназы фосфорилируют PIP<sub>2</sub> в PIP<sub>3</sub>. Akt регулирует многие процессы, направленные на выживание клетки, например, фермент может фосфорилировать проапоптотический белок BAD (из семейства Bcl-2) по остатку серина 136, что вызывает диссоциацию BAD из Bcl-2/Bcl-X комплекса и приводит к утере белком BAD своей проапоптотической функции. Кроме того, Akt активирует транскрипционный фактор NF-κB (nuclear factor-κappa B), и включает транскрипцию генов выживания. Akt требуется для инсулин-индуцируемой транслокации транспортера глюкозы GLUT4 в плазматическую мембрану. Киназа-3 гликогенсинтетазы (GSK3) может быть ингибирована фосфорили-

рованием Akt, что вызывает синтез гликогена. Akt1 также связана с васкуляризацией и ростом опухолей.

*Протеинкиназа C (PKC)*. Это семейство протеинкиназ классифицируют по вторичным посредникам на три семейства: традиционные, или классические (*conventional*), оригинальные (*novel*), или нестандартные и атипичные (*atypical*). Для активации традиционных протеинкиназ C требуется наличие ионов  $Ca^{2+}$ , DAG или фосфатидилхолина. Оригинальные протеинкиназы C активируются молекулами DAG и не требуют наличия  $Ca^{2+}$ . И традиционные, и оригинальные протеинкиназы C активируются через сходные сигнальные пути, например, с помощью фосфолипазы C. Все ферменты семейства протеинкиназ C состоят из регуляторного и каталитического доменов, связанных шарнирной областью. Каталитические районы высоко консервативны между разными изоформами. Субстратами протеинкиназы C являются следующие белки: MAP-киназы, Raf-киназы и др. Белки-субстраты протеинкиназы C играют важную роль в поддержании формы клеток, способности к движению, секреции, трансмембранном транспорте, регуляции клеточного цикла.

*МАРК (митоген-активируемые киназы)* (КФ 2.7.11.24) отвечают на внеклеточные стимулы (митогены) и регулируют многие клеточные процессы (экспрессию генов, деление, дифференцировку и апоптоз) и вовлечены в работу многих неядерных белков – продуктов онкогенов. Внеклеточные стимулы ведут к активации МАРК через сигнальный путь, который состоит из МАРК, МАРКК (МАР2К) и МАРККК (МАР3К). МАР3К активируется внеклеточными стимулами и фосфорилирует МАР2К, затем МАР2К фосфорилированием активирует МАРК. Такой сигнальный МАРК-каскад консервативен.

После ознакомления с материалом этой главы обратитесь к схеме 1. Обратите внимание на то, что рецепторы с тирозинкиназной активностью (RTK) размещены справа (лиганды ростовые факторы) и слева (лиганды факторы выживания) от G-рецепторов (GPCR). Найдите протеинкиназы PKA, PKC и Akt (PKB) и выделите внутриклеточные пути от рецепторов с тирозинкиназной активностью к регуляции генов в ядре и апоптозу.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСП

### **Вопросы**

1. Опишите рецепторы, обладающие собственной тирозинкиназной активностью.
2. Каков механизм передачи сигнала тирозинкиназными рецепторами?
3. Каково строение тирозинкиназных рецепторов?
4. Поясните механизм создания каркаса для сложных сигнальных путей.
5. Охарактеризуйте сигнальный путь RAS-RAF-MEK.

6. Охарактеризуйте передачу сигналов от факторов роста семейства TGF-бета.
7. Опишите протеинкиназу А.
8. Опишите протеинкиназу В (Akt).
9. Опишите протеинкиназу С (PKC).
10. Охарактеризуйте передачу сигналов от факторов роста семейства TGF-бета.
11. Опишите MAPK (митоген-активируемые киназы).

## ТЕСТЫ

1. Выберите характеристики, которые характерны для рецепторов к инсулину, инсулиноподобному фактору роста (ИФР) и другим ростовым факторам в отличие от GPCR рецепторов: а) пронизывают клеточную мембрану только один раз; б) пронизывают клеточную мембрану несколько раз; в) передают сигнал посредством активации тирозинкиназы; г) передают сигнал без активации тирозинкиназы; д) тирозинкиназной активностью обладает цитоплазматический домен рецептора.

- 1) а, б, в;
- 2) а, в, г;
- 3) а, в, д;
- 4) б, г, д;
- 5) в, г, д.

2. Укажите, какой из физиологических процессов не опосредуется этими рецепторами за счет фосфорилирования тирозиновых остатков:

- 1) пролиферация;
- 2) миграция;
- 3) передача нервного импульса;
- 4) дифференцировка клеток;
- 5) апоптоз клеток.

3. Связывание рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью с лигандом вызывает следующие процессы: а) димеризацию рецептора; б) тримеризацию рецептора; в) фосфорилирование тирозина; г) активацию тирозинкиназных рецепторов; д) дезактивацию тирозинкиназных рецепторов.

- 1) а, в, г;
- 2) б, в, д;
- 3) а, в, д;
- 4) а, в, д;
- 5) б, в, г.



4. Выберите из приведенного перечня белки-активаторы, которые регулируют переход RAS из неактивной формы в активную:

- 1) протеинкиназа В (Akt);
- 2) протеинкиназа С (PKC);
- 3) малатдегидрогеназа;
- 4) гуанозинтрифосфатазы (GAP);
- 5) MAP-киназа.

5. Установите верную последовательность связывания белков при передаче сигнала тирозинкиназными рецепторами:

- 1) RAS → SOS → GAP → RAF → MEK → ERK;
- 2) MEK → RAS → GAP → RAF → SOS → ERK;
- 3) SOS → RAF → GAP → RAS → MEK → ERK;
- 4) RAF → RAS → GAP → SOS → MEK → ERK;
- 5) SOS → RAS → GAP → RAF → MEK → ERK.

6. Выберите протеины, которые не являются вспомогательными и не обладают собственными сигнальными свойствами:

- 1) фосфолипаза С;
- 2) фосфоинозитид-3-киназа (ФИЗК);
- 3) ГнРГ-ассоциированный пептид (ГнРГ-АП);
- 4) фосфоорилаза;
- 5) белок, связанный с рецепторами факторов роста-2 (Grb-2).

7. Установите ферменты, которые фосфорилируют гидроксильную группу в остатках серина или треонина:

- 1) Серин-треониновые протеинкиназы;
- 2) PIP3-киназы;
- 3) MAP-киназа;
- 4) фосфолипазы А2;
- 5) протеинкиназы С.

8. Регуляция активности протеинкиназы В (Akt) осуществляется путем:

- 1) активации протеинкиназы С
- 2) активация PIP3-киназы;
- 3) повышения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ ;
- 4) активации фосфолипазы А2;
- 5) усилению синтеза простагландинов.

9. Выберите вещества, которые необходимы для активации оригинальных (*novel*) протеинкиназ С

- 1) ионы  $Ca^{2+}$ ;
- 2) ионы  $Na^{+}$ ;

- 3) диацилглицерол (ДАГ);
- 4) фосфатидилхолин;
- 5) фосфолипаза А2.

10. Установите фермент, активность которого зависит от уровня цАМФ в клетке:

- 1) протеинкиназа В (Akt);
- 2) протеинкиназа С (PKC);
- 3) дегидрогеназа;
- 4) MAP-киназа;
- 5) протеинкиназа А.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Чем можно объяснить, что АТФ и цАМФ не конкурируют между собой за центры связывания в протеинкиназе, так что с регуляторными субъединицами связывается только цАМФ, а с каталитическими – только АТФ?

**Задача 2.** В скелетные мышцы глюкоза проникает медленно, и ее концентрация в них низкая – около 0,01 – 0,1 мМ. Почему для активации глюкозы в этих условиях предпочтительней фермент гексокиназа, а не глюкокиназа?

**Задача 3.** Адреналин стимулирует процесс гликогенолиза в мышцах. Как это отразится на концентрации глюкозы в крови?

**Задача 4.** После действия лекарственного препарата на нервно-мышечный синапс возбуждение перестало передаваться с нерва на мышцу. Перфузия этой области ацетилхолином не сняла возникшую блокаду. Как установить, на какое звено в цепи синаптических процессов действует препарат?

*Тема 5*  
**ПУТИ БИОСИГНАЛИЗАЦИИ,  
ЗАПУСКАЕМЫЕ ЦИТОКИНАМИ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП.  
ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА В КЛЕТКАХ  
СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА**

**ГЛОССАРИЙ**

**Плейотропия** – явление множественного действия гена. Выражается в способности одного гена влиять на несколько фенотипических признаков.

**Агрегация** – это взаимодействие денатурированных молекул белка, которое сопровождается образованием более крупных частиц.

**Синергия** – (греч. «сотрудничество, содействие, помощь, соучастие, сообщничество» от др.-греч. σύν «вместе» + ἔργον «дело, труд, работа, (воз)действие») – усиливающий эффект взаимодействия двух или более факторов, характеризующийся тем, что совместное действие этих факторов существенно превосходит простую сумму действий каждого из указанных факторов.

**Синергизм** (греч. synergia содействие, сотрудничество) – взаимодействие различных биохимических и физиологических процессов, отдельных элементов (частей) целого организма, направленное на достижение оптимального в данный момент конечного приспособительного эффекта.

**Гемопоз** (выработка, образование), кроветворение – это процесс образования, развития и созревания клеток крови – лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов у позвоночных.

Классифицируют эмбриональный (внутриутробный) гемопоз и пост-эмбриональный гемопоз.

**Каноническая активация** – процесс активации (канонический / классический). Активация NF-κB инициируется сигналом деградации белков IκB. Это происходит в первую очередь за счет активации киназы, называемой киназой IκB (IKK). IKK состоит из гетеродимера каталитических субъединиц IKKα и IKKβ и «главного» регуляторного белка, называемого NEMO (эссенциальный модулятор NF-κB) или IKKγ.

**Направленное перепрограммирование клеток** – это искусственно индуцируемый процесс преобразования дифференцированной соматической клетки одного вида в другой без возвращения к стадиям с более высокой потентностью, основой которого является активация участков генома, детерминирующих развитие клетки в необходимом направлении.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Цитокины – небольшие пептидные информационные молекулы. Цитокины имеют молекулярную массу, не превышающую 30 кДа. Цитокин выделяется на поверхность одной клетки и взаимодействует с рецептором находящейся рядом другой клетки. Таким образом, от одной клетки передается сигнал к другой клетке, который запускает в ней дальнейшие реакции. Основными продуцентами цитокинов являются лимфоциты. Кроме лимфоцитов их секретируют макрофаги, гранулоциты, ретикулярные фибробласты, эндотелиальные клетки и другие типы клеток. Они регулируют межклеточные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия. Термин предложен в 1974 г. С. Коэном (S. Cohen).

Функции цитокинов в организме:

- регуляция продолжительности и интенсивности иммунных реакций (противоопухолевая и противовирусная защита организма);
- регуляция воспалительных реакций;
- участие в развитии аутоиммунных реакций;
- определение выживаемости клеток;
- участие в механизме возникновения аллергических реакций;
- стимуляция или подавление роста клеток;
- участие в процессе кроветворения;
- обеспечение функциональной активности или токсического воздействия на клетку;
- согласованность реакций эндокринной, иммунной и нервной систем;
- поддержание гомеостаза (динамического постоянства) организма;
- регуляция процесса оплодотворения, закладки органов (включая систему иммунитета) и их развитие;
- регуляция нормально протекающих (физиологических) функций организма;
- регуляция клеточного и гуморального иммунитета (местных и системных защитных реакций);
- регуляция процессов восстановления (регенерации) поврежденных тканей.

*Классификация цитокинов по механизму биологического действия:*

1. Цитокины, регулирующие воспалительные реакции:
  - провоспалительные (интерлейкины 1, 2, 6, 8, интерферон и другие);
  - противовоспалительные (интерлейкины 4, 10, и другие).
2. Цитокины, регулирующие клеточный иммунитет: интерлейкин-1 (ИЛ-1 или IL-1), ИЛ-12 (IL-12), ИФН-гамма (IFN-гамма), ТРФ-бета и другие).
3. Цитокины, регулирующие гуморальный иммунитет (ИЛ-4, ИЛ-5, ИФН-гамма, ТРФ-бета и другие).

*Классификация цитокинов по характеру действия:*

- интерлейкины (ИЛ-1 – ИЛ-18) – регуляторы иммунной системы (обеспечивают взаимодействие в самой системе и ее связи с другими системами);
- интерфероны (ИФН-альфа, бета, гамма) – противовирусные иммунорегуляторы;
- факторы некроза опухолей (ФНО-альфа, ФНО-бета) – обладают регуляторным и токсическим действием на клетки;
- хемокины (MCP-1, RANTES, MIP-2, PF-4) – обеспечивают активное перемещение различных видов лейкоцитов и других клеток;
- факторы роста (ФРЭ, ФРФ, ТФР-бета) – обеспечивают и регулируют рост, дифференцировку и функциональную активность клеток;
- колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ) – стимулируют дифференцировку, рост и размножение ростков гемопоэза (кроветворных клеток).

*Медицинское использование цитокинов:*

- костный морфогенетический белок (ВМР), используемый для лечения состояний, связанных с костями;
- эритропоэтин (ЭПО), используемый для лечения анемии;
- гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), используемый для лечения нейтропении у онкологических больных;
- гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), используемый для лечения нейтропении и грибковых инфекций у онкологических больных;
- интерферон альфа, используемый для лечения гепатита С и рассеянного склероза;
- интерферон бета, используемый для лечения рассеянного склероза.
- интерлейкин 2 (IL-2), используемый для лечения рака;
- интерлейкин 11 (IL-11), используемый для лечения тромбоцитопении у онкологических больных;
- интерферон гамма используемый для лечения хронической гранулематозной болезни и остеопетроза (клинический остеосклероз, мраморная болезнь).

*Классификация рецепторов цитокинов:*

- суперсемейство иммуноглобулинов (Ig), которые повсеместно присутствуют в нескольких клетках и тканях тела позвоночных и имеют структурную гомологию с иммуноглобулинами (антителами), молекулами клеточной адгезии и даже некоторыми цитокинами. Примеры: типы рецепторов IL-1;
- семейство гемопоэтических факторов роста (тип 1), члены которого имеют определенные консервативные мотивы во внеклеточном аминокислотном домене;

- рецептор IL-2 принадлежит к этому типу, дефицит  $\gamma$ -цепи (общей для некоторых других цитокинов) напрямую ответственен за х-сцепленную форму тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID);
- семейство интерферонов (тип 2), члены которого являются рецепторами IFN  $\beta$  и  $\gamma$ ;
- семейство факторов некроза опухолей (TNF) (тип 3), члены которого имеют общий внеклеточный связывающий домен, богатый цистеином, и включает несколько других нецитокиновых лигандов, таких как CD40, CD27 и CD30, помимо лигандов, по которым названо семейство (TNF).
- семь трансмембранных спиралей, наиболее часто встречающийся рецепторный мотив в животном мире. Все рецепторы, связанные с G-белком (для гормонов и нейротрансмиттеров), принадлежат к этому семейству.
- хемокиновые рецепторы, два из которых действуют как связывающие белки для ВИЧ (CD4 и CCR5), также принадлежат к этому семейству.
- семейство рецепторов интерлейкина-17 (IL-17R), которое демонстрирует небольшую гомологию с любым другим семейством рецепторов цитокинов. Структурные мотивы, консервативные между членами этого семейства, включают: внеклеточный фибронектин-подобный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен SERIF. Известными членами этого семейства являются IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL17RD и IL-17RE.

*Биологические эффекты цитокинов.* Спектры биологических активностей цитокинов в значительной степени перекрываются: один и тот же процесс может стимулироваться в клетке более чем одним цитокином. Во многих случаях в действиях цитокинов наблюдается синергизм. Цитокины – антигеннеспецифические факторы, поэтому специфическая диагностика инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний с помощью определения уровня цитокинов невозможна. Но определение их концентрации в крови *дает информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток*; о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень и о прогнозе заболевания. Цитокины регулируют активность гормональной оси гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников: например, интерлейкин 1, воздействуя на гипоталамус, усиливает синтез кортиколиберина, что, в свою очередь, повышает выработку кортикотропина (АКТГ).

*Цитокины и иммунный ответ.* Цитокины начинают синтезироваться клетками только при наличии чужеродного агента в организме. Это способствует развитию иммунной реакции, охраняющей постоянство внутренней среды организма от всего генетически чужеродного.

*Цитокины и биосигналинг.* Подавляющее большинство цитокиновых рецепторов можно классифицировать на относительно небольшое число семейств и суперсемейств, члены которых функционируют схожим образом. Большинство цитокинов посылают сигналы клеткам по путям, очень похожим на пути других цитокинов, которые связываются с тем же классом

рецепторов. Отдельные цитокины часто используют несколько путей передачи сигнала, чем частично объясняется плейотропное действие этих молекул.

*Центральное значение имеет путь NF-κB и путь Jak/STAT.*

*Jak тирозинкиназа (рус. «янус киназа»).* JAK – тирозинкиназы, фосфорилируют STAT-факторы. Janus kinase, названы так благодаря присутствию в одной молекуле *двух киназных доменов*. Они ассоциированы с рецепторами цитокинов, но неактивны пока (аналогично рецепторам факторов роста) рецепторы не агрегируют под действием цитокинов. После агрегации происходит активация Jak за счет их трансфосфорилирования. Активированные *Jak* фосфорилируют множество тирозинов в цитоплазматической части рецепторов. К этим фосфотирозинам присоединяются молекулы белков, известных под общим названием белки STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Белки STAT димеризуются и проникают в ядро. Там они сами или с участием других белковых факторов индуцируют транскрипцию тех генов, которые должны индуцироваться данным цитокином (рисунок 8, приложение).

*Передача сигнала в клетках системы иммунитета.* Сигнальный путь NF-κB (произносится НФ-капаБи) – внутриклеточный сигнальный путь, центральным компонентом которого является транскрипционный фактор NF-κB (*nuclear factor κB*). Этот сигнальный путь активируется в ответ на такие внешние стимулы, как факторы некроза опухоли, интерлейкин 1 и некоторые характерные для патогенов молекулы (*pathogen-associated molecular patterns* или PAMPs). NF-κB контролирует очень большую группу генов, которые отвечают за процесс воспаления, пролиферацию клеток и апоптоз. Сигнальный путь NF-κB является компонентом других путей, например сигнального пути TNFα и Toll-подобных рецепторов. Особую роль этот сигнальный путь играет в развитии В-лимфоцитов: при недостаточной его активности созревающие лимфоциты гибнут раньше времени в результате апоптоза. Гиперактивация сигнального пути NF-κB характерна для некоторых типов злокачественных путей, например, для диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Сигнальный путь NF-κB содержит 4 основных класса сигнальных компонентов: белки семейства NF-κB/Rel; ингибиторы ядерного фактора κB (IκB); киназы IκB (IKK); вспомогательные белки. К семейству транскрипционных факторов NF-κB относятся 5 белков: NFκB1 (p50/105), NFκB2 (p52/100), RELA (p65), RelB, REL (c-Rel). Все члены этого семейства имеют сходный N-концевой Rel-гомологичный ДНК-связывающий домен. С этим же доменом взаимодействуют IκB (ингибитор). Эти белки формируют гетеродимеры и именно в такой форме регулируют транскрипцию белки p50 и p52 могут образовывать гомодимеры, которые негативно регулируют транскрипцию целевых генов.

*Каноническая активация.* Канонические сигнальные цепи начинаются с В- и Е-клеточных рецепторов антигена, рецепторов цитокинов и других. Сигнал передается на IKK-комплекс, который фосфорилирует IκB. Каталитическую функцию выполняет субъединица IKKβ. Фосфорилированный

IкВ расщепляется протеасомой, что позволяет димерам NF-кВ переместиться в ядро клетки. Как правило, по такому пути активируются наиболее распространенные белковые димеры p50/p65 и p50/c-Rel.

*Схематическое представление механизма действия фактора транскрипции NF-кВ.* После стимулирующего сигнала (действие лимфокинов, антигенов, УФ-света и др.) индуцируется фосфорилирование комплекса фактора с ингибитором, диссоциация и деградация ингибитора, миграция фактора из цитоплазмы в ядро, индукция фактор-зависимых генов, среди которых гены лимфокинов, иммуноглобулинов и ингибитора IкВ. Ингибитор транспортируется в цитоплазму, фосфорилируется одной из киназ и присоединяется к фактору в цитоплазме, ингибируя его. Так осуществляется обратная связь. В качестве фактора NFкВ здесь представлен комплекс p50 и p65 субъединиц. Показано также, что связанный со своим участком кВ на ДНК, фактор взаимодействует с основным транскрипционным комплексом через коактиватор p300/CBP.

*Виды макрофагов.* В настоящее время макрофаги подразделяют на клетки M1, M2 и M0 типа или «классического» (провоспалительного), «альтернативного» (противовоспалительного) и неактивированного фенотипа соответственно. В ходе иммунного ответа макрофаги могут менять свой фенотип – этот процесс смены фенотипа получил название «репрограммирование». Известно, что присутствие в опухоли большого количества M1-макрофагов тормозит ее рост, а в некоторых случаях может вызвать даже практически полную ремиссию. И наоборот: M2-макрофаги выделяют молекулы – факторы роста, которые дополнительно стимулируют деление опухолевых клеток, то есть благоприятствуют развитию злокачественного образования. Экспериментально было показано, что в опухолевом окружении обычно преобладают именно M2-клетки. Под действием веществ, выделяемых опухолевыми клетками, активные M1-макрофаги «перепрограммируются» в M2-тип.

Перепрограммированные клетки перестают синтезировать противоопухолевые цитокины, такие как интерлейкин-12 или фактор некроза опухолей (TNF), и начинают выделять в окружающую среду молекулы, ускоряющие рост опухоли и прорастание кровеносных сосудов, которые будут обеспечивать ее питание, например фактор роста опухолей (TGFβ) и фактор роста сосудов (VGF). Они перестают привлекать и инициировать другие клетки иммунной системы и начинают блокировать местный (противоопухолевый) иммунный ответ.

*Роль белков семейства NF-кВ.* Ключевую роль в этом перепрограммировании играют белки семейства NF-кВ. Эти белки являются транскрипционными факторами, контролирующими активность множества генов, необходимых для M1 активации макрофагов. Наиболее важные представители этого семейства – белки p65 и p50, вместе образующие гетеродимер p65/p50, который в макрофагах активирует множество генов, связанных с острым воспалительным ответом, таких как TNF, многие интерлейкины, хемокины и



цитокины. В то же время другой гомодимер семейства NF- $\kappa$ B – белки p50 /p50 – обладает противоположной активностью: связываясь с теми же самыми промоторами, он блокирует их экспрессию. Таким образом, возможная судьба – растущая опухоль привлекает новые макрофаги, которые перепрограммируются и стимулируют ее рост вместо уничтожения.

*Структура TLR.* TLR представляют собой интегрированные трансмембранные гликопротеины 1 типа. Они, как и рецепторы к интерлейкину-1 (IL-1RS), имеют:

- поверхностный (ранее именуемый внеклеточный) домен, ответственный за связывание лиганда. Он представлен N-концевой областью аминокислотной последовательности из 19-25 повторяющихся участков, обогащенных лейцином (LRR);
- переходный участок следует далее, отвечающий за прикрепление рецептора к клеточной мембране, обогащенный цистеином;
- внутренняя дистальная (цитоплазматическая) часть рецептора представлена Toll / IL1-рецептор (TIR) – доменом, получившим свое название из-за одинакового строения этого участка у TLR и у рецепторов цитокинов семейства IL-1. При этом домен TIR рекрутирует адапторные сигнальные молекулы.

В зависимости от локализации TLR в клетке выделяют рецепторы, расположенные на цитоплазматической мембране (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10) и на мембранах внутриклеточных органелл (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9) – лизосом, эндосом, аппарата Гольджи. Лигандами рецепторов, локализованных на цитоплазматической мембране, являются поверхностные структуры микроорганизмов – липопротеин, липополисахариды, флагеллин, зимозан. Рецепторы, локализованные на мембранах внутриклеточных органелл, распознают молекулы ядерных структур микроорганизмов, но могут быть активированы и поврежденными молекулярными структурами собственного организма. В состоянии покоя неактивированные TLR находятся на мембране клеток в мономерном состоянии, а при активации TLR образуют димеры. Например, гетеродимер TLR1 и TLR2 улавливает трехациальные липопептиды бактерий. TLR2 может также образовывать гетеродимер с TLR6, и этот димер также распознает липопептиды бактерий. Адапторные белки и сигнальные процессы, зависящие от TIR, которые ведут к активации нуклеарного фактора транскрипции (NF- $\kappa$ B) и/или интерферон (IFN)-регулирующего фактора (IRF).

Следовательно, распознавание бактериальных и небактериальных лигандов специфическими TLR приводит к активации факторов транскрипции, таких как нуклеарный фактор  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), и членов семейства IRF. Связывание лигандов вызывает гомодимеризацию или гетеродимеризацию TLR, а также рекрутинг адапторных молекул.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### **Вопросы**

1. Перечислите и функции, характерные для цитокинов в организме.
2. Какие группы цитокинов выделяют по механизму биологического действия?
3. Перечислите классификацию цитокинов по характеру действия.
4. Опишите медицинское использование цитокинов.
5. Какие группы рецепторов цитокинов выделяют?
6. Охарактеризуйте биологические эффекты цитокинов.
7. Опишите действие цитокинов в биосигналинге.
8. Опишите особенности NF-κB пути.
9. Опишите особенности Jak/STAT пути.
10. Охарактеризуйте Jak тирозинкиназу.
11. Охарактеризуйте передачу сигнала в клетках системы иммунитета.
12. Опишите схему механизма действия фактора транскрипции NF-κB.
13. Перечислите виды макрофагов.
14. Укажите, в чем заключается роль белков семейства NF-κB.
15. Какова структура TLR?

## ТЕСТЫ

1. Выберите клетки, которые являются основными продуцентами цитокинов:
  - 1) макрофаги;
  - 2) гранулоциты;
  - 3) лимфоциты;
  - 4) ретикулярные фибробласты;
  - 5) эндотелиальные клетки.
2. Укажите цитокины, которые выполняют роль противовирусных иммунорегуляторов:
  - 1) интерлейкины (ИЛ-1–ИЛ-18);
  - 2) интерфероны (ИФН-альфа, бета, гамма);
  - 3) факторы некроза опухолей (ФНО-альфа, ФНО-бета);
  - 4) хемокины (MCP-1, RANTES, MIP-2, PF-4);
  - 5) факторы роста (ФРЭ, ФРФ, ТФР-бета).
3. Определите цитокины, которые обеспечивают активное перемещение различных видов лейкоцитов и других клеток:
  - 1) интерлейкины (ИЛ-1–ИЛ-18);
  - 2) интерфероны (ИФН-альфа, бета, гамма);
  - 3) факторы некроза опухолей (ФНО-альфа, ФНО-бета);
  - 4) хемокины (MCP-1, RANTES, MIP-2, PF-4);
  - 5) факторы роста (ФРЭ, ФРФ, ТФР-бета).

4. Выберите цитокин, который в медицинских целях используется для лечения анемии:

- 1) эритропоэтин (ЭПО);
- 2) интерферон альфа;
- 3) интерферон бета;
- 4) интерлейкин 2 (IL-2);
- 5) нтерлейкин 11 (IL-11).

5. Укажите цитокин, который в медицинских целях используется для лечения гепатита С и рассеянного склероза:

- 1) эритропоэтин (ЭПО);
- 2) интерферон альфа;
- 3) интерферон бета;
- 4) интерлейкин 2 (IL-2);
- 5) нтерлейкин 11 (IL-11).

6. Укажите сигнальный путь, осуществляемый за счет Janus kinase, которая активируется трансфосфорилированием и взаимодействует затем со STAT-белками:

- 1) Wnt – сигнальный путь;
- 2) Notch – сигнальный путь;
- 3) Hh – сигнальный путь;
- 4) NF-κB – сигнальный путь;
- 5) Jak/STAT – сигнальный путь.

7. Выберите сигнальный путь, который контролирует группу генов, отвечающих за процессы воспаления, пролиферации и апоптоза:

- 1) Wnt – сигнальный путь;
- 2) Notch – сигнальный путь;
- 3) Hh – сигнальный путь;
- 4) NF-κB – сигнальный путь;
- 5) Jak/STAT – сигнальный путь.

8. Выберите семейство рецепторов цитокинов, которое повсеместно присутствуют в нескольких клетках и тканях тела позвоночных и имеют структурную гомологию с иммуноглобулинами (антителами), молекулами клеточной адгезии и даже некоторыми цитокинами:

- 1) иммуноглобулинов (Ig);
- 2) гемопоэтических факторов роста (тип 1);
- 3) интерферонов (тип 2),
- 4) факторов некроза опухолей (TNF) (тип 3), 5
- 5) хемокиновых рецепторов.

9. Выберите вид макрофагов, которые относятся к «альтернативному» (противовоспалительному) типу:

- 1) M1;
- 2) M2;
- 3) M0;
- 4) M3;
- 5) M2 и M1.

10. Укажите особенность структуры поверхностного домена, в TLR (интегрированные трансмембранные гликопротеины 1 типа):

1) N-концевой областью аминокислотной последовательности из 19-25 повторяющихся участков, обогащенных цистеином, ответственной за связывание лиганда;

2) отвечает за прикрепление рецептора к клеточной мембране, обогащен лейцином;

3) данный участок имеет одинаковое строение у TLR и у рецепторов цитокинов семейства IL-1, рекрутирует адапторные сигнальные молекулы;

4) N-концевой областью аминокислотной последовательности из 19-25 повторяющихся участков, обогащенных лейцином, ответственной за связывание лиганда;

5) отвечает за прикрепление рецептора к клеточной мембране, обогащен цистеином.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** К врачу обратился пациент с признаками аллергической реакции. Больной Г., 14 лет, обратился в аллергологический кабинет с жалобами на приступы удушья и кашель с выделением небольшого количества вязкой, слизистой мокроты. Заболел после того, как приобрел аквариум и начал кормить рыб сухой дафнией. Объясните, почему врач не назначил анализ на определения уровня цитокинов. При каких заболеваниях назначается и не назначается данный анализ. Какое обследование была назначено пациенту.

**Задача 2.** У пациента в ходе обследования установлено «перепрограммирование» активных M1-макрофагов в M2-тип. Объясните суть данного процесса и вывод, который при этом можно сделать.

**Задача 3.** 2,4-ДНФ (сильный разобщающий агент) пытались одно время использовать для борьбы с ожирением. Теперь такого рода разобщающие агенты уже не применяются в качестве лекарственных препаратов, поскольку известны случаи, когда их применение приводило к летальному исходу. На чем могло быть основано такое использование 2,4-ДНФ? Почему прием разобщающих агентов может вызвать смерть?

**Тема 6**  
**МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ**  
**В РЕГУЛЯЦИИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

**ГЛОССАРИЙ**

**Плюрипотентность биологических соединений** – способность определенных веществ вызывать несколько различных биологических реакций.

**Плюрипотентные клетки** – клетки, которые могут дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов (плаценты и желточного мешка). В отличие от них, тотипотентные клетки могут дать начало всем типам клеток, включая клетки внезародышевых органов.

**Пальмитиновая кислота (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COOH** – гексадекановая кислота) – наиболее распространенная в природе одноосновная насыщенная карбоновая кислота (жирная кислота).

**β-катенин** – это белок с двойной функцией, участвующий в регуляции и координации межклеточной адгезии и транскрипции генов. В организме человека белок CTNNB1 кодируется *CTNNB1* геном. У дрозофилы гомологичный белок называется броненосцем. β-Катенин является субъединицей белкового комплекса кадгерина и действует как преобразователь внутриклеточного сигнала в сигнальном пути Wnt.

**Фурин** – фермент, сериновая протеаза клеток животных, расположенная в аппарате Гольджи, по структуре напоминает бактериальный протеолитический фермент субтилизин.

**Деацетилазы гистонов** – ферменты, катализирующие удаление ацетильной группы ε-N-ацетил-лизина гистонов, внесенные ферментами гистонацетилазами в остатки K3 и K14 гистона H3 и K5, K8, K12 и K16 гистона H4, а также остатки некоторых лизинов гистонов H2A и H2B. Модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, гистондеацетилазы играют важную роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

**Сигнальный путь Wnt** – один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей. Название Wnt – это комбинация Wg (*wingless*) и Int (рус. «уинт»). Ген дрозофилы *wingless* первоначально был идентифицирован по рецессивной мутации, подавляющей у мушки развитие крыльев. Гомологичный ген позвоночных *Int* вначале изучали в связи с присутствием в его локусе нескольких мест интеграции генома вируса рака молочных желез

мышь. Исследование функций этих двух генов привело к открытию целого класса лигандов, регулирующих эмбриональное развитие животных.

*Структура Wnt-белков.* Структура Wnt сходна со строением кисти руки. Роль большого пальца в этой структуре выполняет аминоконцевой домен, состоящий из пучка альфа-спиралей. Он содержит 10 остатков цистеина, которые стабилизируют эту структуру, образуя 5 дисульфидных связей. Роль указательного пальца выполняет карбоксиконцевой домен, преимущественно состоящий из двух бета-складок, поддерживаемых шестью дисульфидными связями. Участок между большим и указательным пальцем – «ладонь» – обладает высокой степенью гибкости. К аминоконцевому домену – «большому пальцу» ковалентно присоединяется ацильная группа – пальмитолеиновая жирная кислота. Этот ковалентно присоединенный углеводородная цепочка необходима для того, чтобы Wnt мог взаимодействовать с транспортными и мембранными белками. Изменения аминоконцевого домена белков Wnt могут играть важную роль в регуляции его активности. Так, например, трансмембранный белок протеаза Tiki может подавлять Wnt-сигнал, отщепляя восемь аминокислот с аминоконцевого участка. Участок «ладони» является местом посадки гликозильных групп – олигосахаридных цепей.

*Биогенез и секреция Wnt.* Молекулы Wnt в процессе созревания в эндоплазматическом ретикулуме подвергаются гликозилированию, а затем ацилированию. Затем в сопровождении белка Wntless из аппарата Гольджи они попадают в секреторные везикулы, внутри которых пересекают плазматическую мембрану, после чего секретируются. Wntless извлекается из отработанных секреторных везикул и переносится обратно в аппарат Гольджи с помощью комплекса Retromer.

*Канонический путь передачи сигнала.* В основе канонического пути Wnt-сигнализации лежит стабилизация цитоплазматического белка  $\beta$ -катенина. Активированное состояние: Wnt-сигнал начинается с образования комплекса Wnt с LRP5/6 и рецептором Фрайззлед (Frizzled), что приводит к активации белка Dishevelled. Это ингибирует «деградационный комплекс» и «выключает» убиквитилирование  $\beta$ -катенина. В результате накапливающийся в цитоплазме свободный  $\beta$ -катенин проникает в ядро и активирует транскрипцию с помощью транскрипционных факторов TCF/LEF и ряда других (рисунок 9, приложение).

*Роль канонического Wnt-сигнального пути:*

- формирование дорсо-вентральной оси тела в раннем эмбриогенезе;
- определение локализации нервной трубки;
- определение границ тканей и органов в позднем эмбриогенезе.

*Роль неканонического Wnt-сигнального пути:*

- PCP-путь отвечает за экспрессию генов кадгеринов, отвечающих за миграцию клеток;
- Wnt/Ca<sup>2+</sup>-путь регулирует уровень ионов кальция в клетке.

*Роль Wnt /  $\beta$ -катенин в стволовых клетках.* Стволовые клетки в основном характеризуются двумя свойствами: способностью к самообновлению и способностью к дифференцировке в различные типы клеток. Эти процессы регулируются различными факторами роста, в том числе белками Wnt. Накопленные данные показывают, что сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенина играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности, а также в процессах перепрограммирования соматических клеток. Так, в частности, рецептор WNT из семейства Frizzled, называемый FZD7, играет ключевую роль в поддержании плюрипотентных клеток в недифференцированном и плюрипотентном состоянии.

*Hedgehog (Hh) сигнальный путь.* *Hedgehog (Hh)* ген был идентифицирован в 1980 году Nusslein-Volhard с соавторами путем генетического анализа сегментации фруктовой мушки дрозофилы. У млекопитающих обнаружены три гомолога полипептида Hedgehog: Desert (*Dhh*), Indian (*Ihh*) и Sonic (*Shh*). *Dhh* – ближайший гомолог полипептиду *Hh* дрозофилы. Все они играют роль в процессах развития организма, но наиболее изученным является полипептид и одноименный путь Sonic Hedgehog (*Shh*). В развитии сигнальный путь – «*Hh* путь» важен для поддержания тканевой полярности и популяции стволовых клеток. Инактивация этого пути вызывает пороки развития, такие как голопрозэнцефалия, тогда как гиперактивация этого пути найдена в большей части базально-клеточных карцином (БКК) и многих некожных раковых образованиях. Ключевая роль *Hh* сигналинга в человеческом раке подчеркивает важность изучения этого пути для здоровья человека.

*Стимуляция транскрипции.* В целом, общие сигнальные механизмы *Hh* пути сохранились в эволюции от мухи до людей. Классический *Hh*-сигналинг инициируется, когда растворимые лиганды *Shh*, *Dhh* или *Ihh* связываются с трансмембранным рецептором Patched (PTCH) в результате чего выключается его ингибирующее влияние на трансмембранный рецептор Smoothed (SMO), который в свою очередь активирует семейство транскрипционных факторов GLI (ассоциированный с глиомой онкоген) (GLI1, GLI2 и GLI3), регулирующих экспрессию генов, кодирующих белки пути *Hh*. Они принадлежат семейству белков, содержащих, так называемые «цинковые пальцы»: GLI1/GLI2 – активаторы и GLI3 – репрессор. Как транскрипторные факторы, Gli молекулы могут регулировать целевую генную экспрессию прямым взаимодействием с последовательностью, расположенной в промоторной области целевых генов (рисунок 10, приложение).

Провитамин D3 является более мощным ингибитором SMO, чем циклопамин (широко применяемый ингибитор SMO, обладающий тератогенными свойствами). Если *Shh* взаимодействует с *PTCH1*, то рецептор PTCH1 теряет возможность ингибировать рецептор SMO, в результате чего SMO находится в активном состоянии. После этого SMO активирует факторы транскрипции GLI. Если SMO функционирует как онкоген, то в

большинстве клеточных линий медуллобластомы и астроцитомы наблюдается высокая экспрессия мРНК SMO. Поэтому *PTCH1* является *геном опухоли супрессии* в сигнальном пути Hh. Кроме того *PTCH1* является *геном-мишенью* для факторов транскрипции GLI, которые изменяют экспрессию мРНК *PTCH1*, что наблюдалось в 50% клеточных линий медуллобластомы и астроцитомы. *SUFU* – (Suppressor of fused) – негативный регулятор пути Hh (ген локализован на 10q24.3). Он препятствует транспорту факторов транскрипции GLI через цитоплазму в ядро, в результате чего факторы GLI не взаимодействуют с генами-мишенями и не изменяют уровень их экспрессии. В клеточных линиях и первичных образцах астроцитомы, медуллобластомы уровень мРНК *SUFU*, ниже, чем в нормальных клетках.

*Notch* – *сигнальный путь*. Ген *Notch1* кодирует эволюционно консервативный 300-kDa трансмембранный рецептор. Белок Notch рецептор в процессе посттрансляционной модификации расщепляется в сети транс-Гольджи на две субъединицы ферментами фурин-подобными протеиназами. После транспорта к мембране эти субъединицы формируют гетеродимерный Notch рецептор через кальций-зависимые, нековалентные взаимодействия.

Каскад Notch сигналинга инициируется в клетках млекопитающих после связывания мембраносвязанного лиганда (Jagged 1,2 и DSL 1,3,4) с одним из четырех гетеродимерных трансмембранных Notch рецепторов (N1-4). После связывания лиганда, две последовательные протеолитические реакции высвобождают активный Notch в цитозоль (N-IC). Первое расщепление производится металлопротеазой, ФНО –  $\alpha$ -конвертирующим ферментом (TACE). Конечное расщепление выполнено  $\gamma$ -секретазным комплексом. Внутриклеточный Notch протеин направляется к ядру благодаря сигналу ядерной локализации (СЯЛ). В ядре N-IC связывается с транскрипторным фактором CSL и формирует большой комплекс транскрипторной активации вместе с Mastermind-протеинами (MAML – ядерные протеины). Укороченными с С-конца молекулы MAMLs могут связаться с N-IC, но неспособны к связыванию других Notch транскрипторных активаторов. Они предотвращают активацию CSL-зависимых генов. В отсутствие N-IC, CSL действует как транскрипторный репрессор его целевых генов, связываясь с ДНК участком TGGGAA в пределах целевых промоторов и с гистоновыми деацетилазами и другими репрессорными белками, служащими для ингибирования транскрипции CSL генов-мишеней. В ядре протеин N-IC вытесняет репрессорный комплекс, связываясь с CSL. Этот комплекс транскрипторной активации способствует транскрипции генов, содержащих CSL-связывающие последовательности.

*Каноническая активация сигнального пути Notch*. На рисунке 11 (приложение) указаны основные участники и некоторые целевые гены:

1. Рецептор Notch расщепляется фуриноподобной протеиназой в комплексе Гольджи и переносится на клеточную поверхность в качестве гетеродимера, возможно его гликозилирование белками Fringe аппарата Гольджи.



2. После экспрессии на поверхности клетки Notch взаимодействует с лигандами (DSL, Jagged1 и др.).

3. После связывания лиганда с рецептором лиганд расщепляется металлопротеазой ADAM и  $\gamma$ -секретазой для освобождения N-IC.

4. N-IC инициирует свои последующие эффекты путем миграции в ядро и связывания с его элементами.

*Значение белков Notch.* Белки семейства Notch обеспечивают межклеточную сигнализацию в эмбриогенезе и взрослом организме. Сигнальный путь, за счет которого происходит передача сигналов между клетками посредством белков семейства Notch, получил одноименное название – Notch. Этот путь является консервативным и регулирует развитие и дифференцировку многих типов тканей у животных и человека, а также влияет на главные клеточные процессы: пролиферацию, дифференцировку и апоптоз.

*Регуляция.* Известно, что мутации доменов, входящих в сигнальный путь Notch, приводят к серьезным заболеваниям опорно-двигательного аппарата (остеопения, остеосаркома, дизостоз, брахидактилия). Это происходит вследствие формирования искаженного набора соматических границ в эмбриогенезе. Причиной такого явления становится нарушение периодичности активации генов, участвующих в передаче Notch-сигналов (*HES1*, *DLL1-3*). Выделяют ряд целевых генов Notch-белков, которые определяют направление сигнального пути Notch. Регуляторами клеточного цикла являются Cyclin D1, NRARP, NF- $\kappa$ B, TP21, pre-Ta. Маркерами злокачественных новообразований служат C-MYC, IGF1-R, SURVIVIN, SLUG. Белки HES1 и HEY1 являются не только непосредственными мишенями для сигнального пути Notch, но также действуют как ингибиторы транскрипционных процессов, тем самым регулируя клеточный цикл.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСП

### **Вопросы**

1. Что собой представляет сигнальный путь Wnt?
2. Какую структуру имеют Wnt-белки?
3. Опишите процессы биогенеза и секреции Wnt.
4. Охарактеризуйте канонический путь передачи Wnt-сигнала.
5. Укажите роль Wnt /  $\beta$ -катенин в регуляции функций стволовых клетках.
6. Что собой представляет Hedgehog (Hh) сигнальный путь?
7. Опишите принцип стимуляции транскрипции.
8. Что собой представляет Notch-сигнальный путь?
9. Какое значение имеют белки Notch?
10. Опишите, каким образом осуществляется регуляция Notch-сигнального пути.

## ТЕСТЫ

1. Аминоконцевой домен у Wnt-белков, состоит из:

- 1) пучка  $\beta$ -спиралей, содержащих 10 остатков цистеина, 5 дисульфидных связей;
- 2) пучка  $\alpha$ -спиралей, содержащих 5 остатков цистеина, 10 дисульфидных связей;
- 3) пучка  $\alpha$ - и  $\beta$ -спиралей, содержащих 10 остатков цистеина, 5 дисульфидных связей.
- 4) пучка  $\alpha$ -спиралей, содержащих 10 остатков цистеина, 5 дисульфидных связей.
- 5) пучка  $\alpha$ -спиралей, содержащих 10 остатков гистидина, 5 дисульфидных связей.

2. Выберите сигнальный путь, регулирующий развитие и дифференцировку тканей, влияющий на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза:

- 1) Wnt – сигнальный путь;
- 2) Notch – сигнальный путь;
- 3) Hh – сигнальный путь;
- 4) NF- $\kappa$ B – сигнальный путь;
- 5) Jak/STAT – сигнальный путь.

3. Укажите сигнальный путь, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток, развитие злокачественных опухолей:

- 1) Wnt – сигнальный путь;
- 2) Notch – сигнальный путь;
- 3) Hh – сигнальный путь;
- 4) NF- $\kappa$ B – сигнальный путь;
- 5) Jak/STAT – сигнальный путь.

4. В структуре Wnt-белков есть аминокислотный домен, к которому ковалентно присоединяется углеводородная цепочка пальмитоолеиновой кислоты. Укажите для чего это необходимо:

- 1) чтобы Wnt-белок мог взаимодействовать с транспортными и мембранными белками;
- 2) чтобы стабилизировать структуру Wnt-белков;
- 3) чтобы придать гибкость участку Wnt-белка, называемого «ладонью»;
- 4) для регуляции активности Wnt-белков;
- 5) чтобы взаимодействовать с олигосахаридными цепями.

5. Определите, для чего необходимо изменение аминокислотного домена в структуре Wnt-белков:

- 1) чтобы Wnt-белок мог взаимодействовать с транспортными и мембранными белками;
- 2) чтобы стабилизировать структуру Wnt-белков;
- 3) чтобы придать гибкость участку Wnt-белка, называемого «ладонью»;
- 4) для регуляции активности Wnt-белков;
- 5) чтобы взаимодействовать с олигосахаридными цепями.

6. В структуре Wnt-белков образно выделяют указательный палец, укажите, какую роль он выполняет:

- 1) АК-домен;
- 2) карбоксиконцевой домен;
- 3) ацильный домен;
- 4) гликозидный домен;
- 5)  $\alpha$ -спиральный домен.

7. Выберите основные значения канонического Wnt-сигнального пути  
а) PCP-путь отвечает за экспрессию генов кадгеринов, отвечающих за миграцию клеток; б) формирование дорсо-вентральной оси тела в раннем эмбриогенезе; в) Wnt/ $Ca^{2+}$ -путь регулирует уровень ионов кальция в клетке; г) определение локализации нервной трубки; д) определение границ тканей и органов в позднем эмбриогенезе:

- 1) а, в;
- 2) б, д;
- 3) б, г, д;
- 4) а, б, в;
- 5) в, г, д.

8. Выберите основные значения неканонического Wnt-сигнального пути  
а) PCP-путь отвечает за экспрессию генов кадгеринов, отвечающих за миграцию клеток; б) формирование дорсо-вентральной оси тела в раннем эмбриогенезе; в) Wnt/ $Ca^{2+}$ -путь регулирует уровень ионов кальция в клетке; г) определение локализации нервной трубки; д) определение границ тканей и органов в позднем эмбриогенезе:

- 1) а, в;
- 2) б, д;
- 3) б, г, д;
- 4) а, б, в;
- 5) в, г, д.

9. Укажите гомологи полипептида Hedgehog, который обнаружен у млекопитающих и участвует в Hh-сигнальном пути а) wingless; б) hedgehog; в) desert; г) indian; д) sonic; е) notch:

- 1) а, б, в;
- 2) в, г, д;
- 3) а, г, д;
- 4) г, д, е;
- 5) а, д, е.

10. В каскад Notch сигналинга после связывания лиганда, необходимы две последовательные протеолитические реакции, которые высвобождают активный Notch в цитозоль. Укажите фермент, который катализирует расщепление на последней стадии:

- 1) металлопротеаза;
- 2)  $\alpha$ -конвертирующий фермент;
- 3)  $\gamma$ -секретазный комплекс;
- 4) гистонозная деацетилаза;
- 5) фуриноподобная протеаза.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** У пациента обнаружено гиперктивация сигнальный пути – Hh. Выявлено, что в клетках снижен уровень мРНК SUFU. Какие выводы можно предположить из этих данных.

**Задача 2.** У больного Р., 44 лет, непереносимость новокаина. Предложите препарат для проведения инфильтрационной анестезии.

**Задача 3.** У больного – отравление тяжелыми металлами. Выберите препарат для оказания неотложной помощи:

а) танин; б) слизь из семян льна; в) серебра нитрат.

*Тема 7*  
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ  
ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ В НЕЙРОНАХ**

**ГЛОССАРИЙ**

**Пространственная конфигурация** – пространственное строение молекул, влияющее на химические свойства, направление и скорость реакций.

**Селективность** – избирательно повышенная проницаемость *ионного* канала для определенных ионов и пониженная для других. Такая *избирательность* определяется селективным фильтром – самым узким местом канальной поры.

**Градиент концентрации** или концентрационный градиент – векторная физическая величина, характеризующая величину и направление наибольшего изменения концентрации какого-либо вещества в среде. Вектор диффузионного потока направлен против вектора градиента концентрации, что, в соответствии с принципом Ле-Шателье, приводит со временем к уменьшению этого потока и градиента концентрации.

**Потенциал покоя** – мембранный потенциал возбудимой клетки (нейрона, кардиомиоцита) в невозбужденном состоянии. Он представляет собой разность электрических потенциалов, имеющих на внутренней и наружной сторонах мембраны и составляет у теплокровных от  $-55$  до  $-100$  мВ. У нейронов и нервных волокон обычно составляет  $-70$  мВ. Возникает вследствие диффузии положительно заряженных ионов калия в окружающую среду из цитоплазмы клетки в процессе установления осмотического равновесия.

**Потенциал действия («спайк»)** – волна возбуждения, перемещающаяся по мембране живой клетки в виде кратковременного изменения мембранного потенциала на небольшом участке возбудимой клетки (нейрона или кардиомиоцита), в результате которого наружная поверхность этого участка становится отрицательно заряженной по отношению к внутренней поверхности мембраны, в то время, как в покое она заряжена положительно. Потенциал действия является физиологической основой нервного импульса.

**Предспайк** – процесс медленной деполяризации мембраны до критического уровня деполяризации (местное возбуждение, локальный ответ).

**Пиковый потенциал, или спайк**, состоящий из восходящей части (деполяризация мембраны) и нисходящей части (реполяризация мембраны).

**Отрицательный следовой потенциал** – от критического уровня деполяризации до исходного уровня поляризации мембраны (следовая деполяризация).

**Положительный следовой потенциал** – увеличение мембранного потенциала и постепенное возвращение его к исходной величине (следовая гиперполяризация).

**Нейрон** – электрически возбудимая клетка, которая предназначена для приема извне, обработки, хранения, передачи и вывода вонне информации с помощью электрических и химических сигналов.

**Аксон** – нейрит (длинный цилиндрический отросток нервной клетки), по которому нервные импульсы идут от тела клетки (сомы) к иннервируемым органам и другим нервным клеткам.

**Синапс** (греч. – соединение, связь) – место контакта между двумя нейронами или между нейроном и получающей сигнал эффекторной клеткой.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### *Молекулярные принципы функционирования ионных каналов*

Ионный канал – это интегральный белок, образующий в мембране пору для обмена клетки с окружающей средой ионами  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ , а также водой, и способный изменять свою проницаемость. В мембране существуют и неионные каналы. Например, аквапорины – это специальные водные каналы, пропускающие через себя воду. Это тоже мембранные каналы, хотя их формально нельзя назвать «ионными каналами». Ионные каналы – порообразующие белки (одиночные либо целые комплексы), поддерживающие разность потенциалов, которая существует между внешней и внутренней сторонами клеточной мембраны всех живых клеток. Относятся к транспортным белкам. С их помощью ионы перемещаются согласно их электрохимическим градиентам сквозь мембрану. Такие комплексы представляют собой набор идентичных или гомологичных белков, плотно упакованных в липидном бислое мембраны вокруг водной поры. Каналы расположены в плазмолемме и некоторых внутренних мембранах клетки. Через ионные каналы проходят ионы  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  и  $Ca^{2+}$ . Из-за открывания и закрывания ионных каналов меняется концентрация ионов по разные стороны мембраны и происходит сдвиг мембранного потенциала. Канальные белки состоят из субъединиц, образующих структуру со сложной пространственной конфигурацией, в которой кроме поры обычно имеются молекулярные системы открытия, закрытия, избирательности, инактивации, рецепции и регуляции. Ионные каналы могут иметь несколько участков (сайтов) для связывания с управляющими веществами.

*Типы ионных каналов.* Возможна классификация по структуре (строению) и происхождению от однотипных генов. По этому принципу, например, выделяют три семейства лиганд-активируемых ионных каналов:

- с пуриновыми рецепторами (АТФ-активируемые);

- с никотиновыми АХ-рецепторами, ГАМК-, глицин- и серотонин-рецепторами;
- с глутаматными рецепторами.

При этом в одно и то же семейство попадают ионные каналы с разной ионной селективностью, а также с рецепторами к разным лигандам. Но образующие эти каналы белки имеют большое сходство в строении и происхождении.

Ионные каналы также можно классифицировать по селективности в зависимости от проходящих через них ионов:

- натриевые,
- калиевые,
- кальциевые,
- хлорные,
- протонные (водородные).

*Типы ионных каналов по способам управления:*

- Совместно-управляемые (NMDA) рецепторно-канальный комплекс). Они открываются одновременно как лигандами, так и определенным электрическим потенциалом мембраны. Можно сказать, что у них двойное управление. Пример: NMDA-рецепторно-канальный комплекс, имеющий сложную систему управления, включающую в себя 8 рецепторных участков-сайтов, с которыми могут связываться различные лиганды.

- Стимул-управляемые (механочувствительные, механосенситивные, активируемые растяжением (stretch) липидного бислоя, протон-активируемые, температурно-чувствительные).

- Актин-управляемые (актин-регулируемые, actin-regulated, actin-gated channels).

- Коннексоны (двойные поры).

*Наиболее часто встречаются два типа каналов:*

- ионные каналы с лиганд-зависимыми воротами (находятся, в частности, в постсинаптической мембране нервно-мышечных соединений);
- ионные каналы с потенциал-зависимыми воротами.

Лиганд-зависимые каналы превращают химические сигналы, приходящие к клетке, в электрические; они необходимы, в частности, для работы химических синапсов. Потенциал-зависимые каналы нужны для распространения потенциала действия.

*Работа ионных каналов.*

- Неуправляемые (независимые) ионные каналы. Эти каналы обычно находятся в открытом состоянии и постоянно пропускают через себя ионы за счет диффузии по градиенту их концентрации и/или по электрическому градиенту зарядов по обе стороны мембраны.

- Некоторые неуправляемые каналы различают вещества и пропускают через себя по градиенту концентрации все молекулы меньше определенной величины, их называют «неселективные каналы» или «поры».

• Существуют также «селективные каналы», которые благодаря своему диаметру и строению внутренней поверхности переносят только определенные ионы.

Примеры:

- калиевые каналы, участвующие в формировании мембранного потенциала покоя,
- хлоридные каналы,
- эпителиальные натриевые каналы,
- анионные каналы эритроцитов.

*Потенциал-зависимые ионные каналы.* Эти каналы отвечают за распространение потенциала действия, они открываются и закрываются в ответ на изменение мембранного потенциала. Например, натриевые каналы. Если мембранный потенциал поддерживается на уровне потенциала покоя, натриевые каналы закрыты и натриевый ток отсутствует. Если мембранный потенциал сдвигается в положительную сторону, то натриевые каналы откроются, и в клетку начнут входить ионы натрия по градиенту концентрации. Через 0,5 мс после установления нового значения мембранного потенциала, этот натриевый ток достигнет максимума. А еще через несколько миллисекунд падает почти до 12 ммоль/литр.

*Типы ионных каналов по способам управления.*

- Неуправляемые (независимые).
- Потенциал-управляемые (потенциал-чувствительные, потенциал-зависимые, voltage-gated).
- Лиганд-управляемые (хемо-управляемые, хемочувствительные, хемозависимые, лиганд-зависимые, рецептор-активируемые).
- Опосредованно-управляемые (вторично-управляемые, ион-активируемые, ион-зависимые, мессенджер-управляемые, управляемые метаботропными рецепторами).

*Потенциал-зависимые ионные каналы.* Во время покоя мембранного потенциала, внутриклеточная концентрация ионов натрия 12 ммоль/литр, а внеклеточная концентрация 145 ммоль/литр. Это значит, что каналы через некоторое время закрываются вследствие инактивации, даже если клеточная мембрана остается деполяризованной. Но закрывшись, они отличаются от состояния, в котором находились до открытия, теперь они не могут открываться в ответ на деполяризацию мембраны, то есть они инактивированы. В таком состоянии они останутся до тех пор, пока мембранный потенциал не вернется к исходному значению и не пройдет восстановительный период, занимающий несколько миллисекунд.

*Лиганд-зависимые ионные каналы.* Эти каналы открываются, когда медиатор, связываясь с их наружными рецепторными участками, меняет их конформацию. Открываясь, они впускают ионы, изменяя этим мембранный потенциал. Лиганд-зависимые каналы почти нечувствительны к изменению мембранного потенциала. Они генерируют электрический по-



тенциал, сила которого зависит от количества медиатора, поступающего в синаптическую щель и времени, которое он там находится.

*Свойства ионных каналов.*

- Ионная специфичность – каналы пропускают только определенные ионы. Например, каналы одного типа пропускают только ионы калия, другого – только ионы натрия и т.д.

- Селективность – это избирательно повышенная проницаемость ионного канала для определенных ионов и пониженная для других. Такая избирательность определяется селективным фильтром – самым узким местом канальной поры. Фильтр, кроме узких размеров, может иметь также локальный электрический заряд.

- Управляемая проницаемость – это способность открываться или закрываться при определенных управляющих воздействиях на канал.

- Инактивация – это способность ионного канала через некоторое время после своего открытия автоматически понижать свою проницаемость даже в том случае, когда открывший их активирующий фактор продолжает действовать.

- Блокировка – это способность ионного канала под действием веществ-блокаторов фиксировать какое-то одно свое состояние и не реагировать на обычные управляющие воздействия. Блокировку вызывают вещества-блокаторы, которые могут называться антагонистами, блокаторами или литиками.

- Пластичность – это способность ионного канала изменять свои свойства, свои характеристики. Наиболее распространенный механизм, обеспечивающий пластичность – это фосфорилирование аминокислот канальных белков с цитоплазматической стороны мембраны ферментами-протеинкиназами.

*Метод локальной фиксации потенциала, patch-clamp.* Метод локальной фиксации потенциала, patch-clamp (*patch* – фрагмент, *clamp* – фиксация) – электрофизиологическая методика для изучения свойств ионных каналов, состоящая в том, что фрагмент клеточной мембраны изолируется с помощью специальной микропипетки. Эта методика дает возможность экспериментатору контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны, а также помещать ее в среду с определенным химическим составом. В этих хорошо контролируемых условиях измеряют ионные токи, проходящие через мембрану, что, в конечном итоге, позволяет делать выводы о том, как ионные каналы реагируют на электрическое и химическое воздействие. Метод настолько чувствителен, что позволяет наблюдать поведение и химические превращения единичных молекул, взаимодействующих с мембраной. Так как ионы – это электрически заряженные молекулы, при их переходе через мембранные каналы переносится и заряд, а значит, через мембрану течет электрический ток. Этот ток можно измерить.

Чем больше разность потенциалов между сторонами мембраны, тем больше ток (рисунок 12, приложение).

#### *Молекулярные аспекты передачи информации в нейронах*

Биоэлектрические явления в нервных клетках: нейроны способны выполнять свои функции благодаря особым свойствам их наружной мембраны. Мембрана нейрона имеет специальные молекулярные устройства, которые 1) позволяют ей генерировать, проводить и воспринимать нервный импульс, 2) практически мгновенно изменять ионную проницаемость и создавать за счет этого трансмембранный ионный ток. Этот комплекс молекулярных событий приводит к направленному распространению нервного импульса по аксону на очень большие расстояния.

*Проведение нервного импульса.* Способность к проведению нервного импульса в аксонах обусловлена, с одной стороны, наличием в его мембранах специфических белковых комплексов, которые представляют собой ионные каналы, управляемые электрическими потенциалами, с другой стороны, наличием белковых структур, поддерживающих ионные градиенты в мембранах, – так называемых ионных насосов.

Насосы расходуют метаболическую энергию для перемещения ионов против концентрационных градиентов между вне- и внутриклеточной средой. Особенно важны различия в концентрациях ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Наружная среда приблизительно в десять раз богаче ионами  $\text{Na}^+$ , чем внутренняя, а внутренняя среда в десятки раз богаче ионами  $\text{K}^+$ , чем наружная. Внеклеточные концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в сотни-тысячи раз выше внутриклеточных.

*Ионные насосы.* Ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  могут медленно проникать через поры в клеточной мембране по градиенту, поэтому ионные насосы непрерывно производят обмен вошедших в клетку ионов натрия на ионы калия из внешней среды. Такое откачивание ионов натрия осуществляется внутренним мембранным белком –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой или  $\text{Na}$ -насосом. Существуют и другие типы ионных насосов, преимущественно называемых по типу ионов, которые они транспортируют, например  $\text{Ca}$ -насосы,  $\text{K}$ -насосы и т.д.

Модель генерации нервного импульса (А. Ходжкин, А. Хаксли, Нобелевская премия 1956 г.). Поскольку концентрация ионов натрия и калия по ту и другую сторону мембраны различаются, внутренняя область аксона имеет значительный отрицательный потенциал по отношению к наружной среде. Когда нервный импульс возникает в основании аксона, трансмембранная разность потенциалов в этом месте локально понижается. Это ведет к тому, что непосредственно за этой зоной с измененным потенциалом вдоль аксона открываются ионные каналы для входа ионов  $\text{Na}^+$ . Процесс является самоусиливающимся: поток ионов натрия через мембрану приводит к открыванию все большего числа ионных каналов. Затем натриевые каналы закрываются, но вслед за этим открывается другая группа каналов – для ионов  $\text{K}^+$ , которые выходят наружу. Этот поток восстанавливает потенциал

внутри аксона до потенциала покоя. Резкий скачок потенциала или электрический «спайк» называется потенциалом действия и является электрическим выражением нервного импульса.

*Преимущество электрического проведения импульса.*

- Деполяризация, связанная с потенциалом действия, распространяется вдоль аксона как волна электрической активности.
- Главное преимущество электрического проведения импульса по аксону состоит в том, что возбуждение быстро распространяется на большие расстояния без какого-либо ослабления сигнала.
- Для возникновения серии нервных импульсов необходимо сложное взаимодействие разных ионных каналов, включая электроуправляемые и хемоправляемые ионные каналы.
- Все нервные импульсы имеют практически одинаковую амплитуду; кодирование информации на этом уровне происходит за счет разной частоты, генерируемой в единицу времени.
- В общем, чем сильнее сигнал, тем выше частота разрядов.

### ***Синапсы***

Нейрон способен иметь до нескольких десятков тысяч межклеточных контактов, большинство из которых обеспечивается определенными морфологическими структурами – синапсами. Клеточную поверхность нейронов можно рассматривать как приемник разнообразнейших сигналов.

Чем выше степень эволюционной организации нервной системы, тем разнообразнее природа химических синапсов. Особенно это касается головного мозга высших млекопитающих, включая человека. Очевидно, химические синапсы оказались эволюционно более выгодными для передачи дискретных сигналов по сравнению с другими типами межклеточных контактов, поскольку на их основе возможна не только передача сигнала, но и его разнообразная модуляция, в том числе гуморальными факторами.

Основой восприятия нейроном химического сигнала в синапсе, а также ряда модулирующих влияний являются рецепторы.

*Типы синапсов:*

Схематически структура синапса может быть представлена следующим образом (рисунок 13, приложение).

Межнейрональные химические синапсы подразделяются на два типа: возбуждающие и тормозные, причем первые способствуют генерации новых импульсов, а вторые приводят к снятию действия приходящих сигналов. Это деление определяется в значительной мере природой рецепторов. Известны случаи, когда один и тот же медиатор оказывает возбуждающее или тормозное действие в зависимости от природы рецептора. В зависимости от места положения синапсов их можно подразделить на сомато-аксональные, дендрито-аксональные, дендрит-дендритные и др. Каждый из этих синапсов имеет свои особенности в функционировании.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### ТЕСТЫ

1. Выберите ионы, которые проходят через ионные каналы:
  - 1)  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Br^-$ ;
  - 2)  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cl^-$ ;
  - 1)  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Br^-$ ;
  - 1)  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ;
  - 5)  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$
2. Укажите тип ионных каналов, которые открываются одновременно лигандами и электрическим потенциалом мембран:
  - 1) коннексоны;
  - 2) стимул-управляемые;
  - 3) совместно-управляемые;
  - 4) лиганд-зависимые;
  - 5) потенциал-зависимые.
3. Выберите тип ионных каналов, которые преобразовывают химические сигналы в электрические:
  - 1) коннексоны;
  - 2) стимул-управляемые;
  - 3) совместно-управляемые;
  - 4) лиганд-зависимые;
  - 5) потенциал-зависимые.
4. Ионные каналы, которые из-за своего строения переносят только определенные ионы, называются:
  - 1) независимыми;
  - 2) неуправляемыми;
  - 3) неселективными;
  - 4) селективными;
  - 5) поры.
5. Укажите, что происходит с натриевым каналами, если мембранный потенциал поддерживается на уровне потенциала покоя:
  - 1) натриевые каналы открыты и ток отсутствует;
  - 2) натриевые каналы закрыты и ток отсутствует;
  - 3) натриевые каналы открыты и в клетку поступают ионы натрия;
  - 4) натриевые каналы закрыты и из клетки выводятся ионы натрия;
  - 5) натриевые каналы открыты и в клетку поступают ионы калия.

6. Укажите, что происходит с натриевым каналами, если мембранный потенциал сдвигается в положительную сторону:

- 1) натриевые каналы открыты и ток отсутствует;
- 2) натриевые каналы закрыты и ток отсутствует;
- 3) натриевые каналы открыты и в клетку поступают ионы натрия;
- 4) натриевые каналы закрыты и из клетки выводятся ионы натрия;
- 5) натриевые каналы открыты и в клетку поступают ионы калия.

7. Выберите тип ионных каналов, которые закрываются из-за инактивации, даже если клеточная мембрана деполяризована:

- 1) коннексоны;
- 2) стимул-управляемые;
- 3) совместно-управляемые;
- 4) лиганд-зависимые;
- 5) потенциал-зависимые.

8. Выберите свойство ионных каналов, которое характеризует способность открываться или закрываться при определенных управляющих воздействиях на канал:

- 1) селективность;
- 2) управляемая проницаемость;
- 3) пластичность;
- 4) блокировка;
- 5) инактивация.

9. Выберите свойство ионных каналов, которое характеризует способность ионного канала через некоторое время после своего открытия автоматически понижать свою проницаемость даже в том случае, когда открывший их активирующий фактор продолжает действовать:

- 1) селективность;
- 2) управляемая проницаемость;
- 3) пластичность;
- 4) блокировка;
- 5) инактивация.

10. Укажите тип ионных насосов, которые производят обмен ионов  $\text{Na}^+$  поступивших в клетку на ионы  $\text{K}^+$  из внешней среды:

- 1) К-насос;
- 2) Са-насос;
- 3) Na-насос;
- 4) Na-K-насос;
- 5) K-Na-насос.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Произойдет ли возбуждение нейрона, если к нему по нескольким аксонам одновременно подавать подпороговые стимулы? Почему? Объясните механизм пространственной суммации.

**Задача 2.** Известно, что ионные каналы мембраны возбудимой клетки регулируют амплитуду мембранных потенциалов. Экспериментально обнаружено, что яд тетродотоксин блокирует натриевые каналы мембраны возбудимой клетки. Как изменится при этом потенциал покоя возбудимости клетки? Как изменится при этом потенциал действия возбудимой клетки? Как при этом изменится распределение ионов на внешней и внутренней стороне клеточной мембраны?

**Задача 3.** Известно, что фазы потенциала действия нервного волокна (быстрая деполяризация и реполяризация) возникают вследствие движения ионов натрия и калия вдоль концентрационных градиентов. В эксперименте на нерв подействовали убаином – веществом, подавляющим активность АТФазы, затем провели длительное ритмическое раздражение нерва. Как при этом изменится распределение ионов на внешней и внутренней стороне клеточной мембраны? Изменится ли величина потенциала покоя и потенциала действия в обработанном убаином нервном волокне?

**Задача 4.** Известно, что проведение возбуждения в синапсе состоит из нескольких стадий. В эксперименте воздействие химического вещества на нервно-мышечные синапсы привело к прекращению передачи возбуждения с нерва на скелетную мышцу. При введении в указанную область ацетилхолина проведение возбуждения через синапс не восстановилось. Введение фермента ацетилхолинэстеразы восстановило проведение возбуждения. Перечислите возможные механизмы прекращения проведения возбуждения в синапсе? Каков механизм действия изучаемого вещества на нервно-мышечный синапс?

**Задача 5.** Известно, что вокруг клеточных мембран возбудимых тканей существует неравномерное распределение ионов. Экспериментально увеличивали градиент концентрации снаружи и внутри возбудимой клетки отдельно для ионов Na, K, Cl и Ca. Как изменится величина потенциала покоя и потенциала действия при увеличении градиента концентрации отдельно для ионов: 1) Na; 2) K; 3) Cl; 4) Ca?

## Тема 8

# РЕЦЕПТОРЫ МОЛЕКУЛ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА. БИОСИГНАЛИЗАЦИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ КЛЕТОК

## ГЛОССАРИЙ

**МАР киназы** – представляют собой серин / треонин-специфичную протеинкиназу, которая действует на киназу киназы МАР. Впоследствии киназа МАР активирует киназу МАР. Могут существовать несколько типов МАРККК, но в основном они характеризуются активируемыми ими киназами МАР.

**Интегрины** могут давать **кластеры** с другими типами рецепторов и с сигнальными молекулами при формировании функциональных мембранных единиц.

**Интегрины** – группа белковых рецепторов на плазматической мембране многих эукариотических клеток, которые участвуют в адгезии (т.е. прилипанию) клеток друг к другу и к поверхностям.

**Цитоскелет** – совокупность фибриллярных компонентов цитоплазмы эукариотических клеток. Основными типами фибрилл в составе цитоскелета являются актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты.

**Адгезия тромбоцитов** – прилипание тромбоцитов к компонентам субэндотелия (в частности, к коллагену) или к чужеродной поверхности (например, к стеклу). Этот процесс осуществляется путем связывания гликопротеидов Ib мембраны тромбоцитов с коллагеном при посредстве фактора VIII и фактора Виллебранда.

**Сродство к лиганду** – мерой сродства участка связывания к лиганду служит концентрация лиганда, необходимая для обеспечения 50% насыщения, чем более низкая концентрация лиганда необходима для связывания его с половиной центров связывания, тем больше аффинность участка связывания к лиганду.

**Промежуточные филаменты (нанофиламенты)** – нитевидные структуры из особых белков, один из трех основных компонентов цитоскелета клеток эукариот. Содержатся как в цитоплазме, так и в ядре большинства эукариотических клеток.

**Белок FAK** – основным сигнальным белком, который связывается с интегрином непосредственно или через белки талин и паксиллин. Во второй модели в качестве основного сигнального функционирует белок Shc, который связан с интегрином через адаптерный белок кавеолин.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### *Рецепторы молекул внеклеточного матрикса*

*Интегриновые рецепторы.* Интегрины – это трансмембранные гетеродимерные клеточные рецепторы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом и передающие различные межклеточные сигналы. От них зависит форма клетки, ее подвижность, они участвуют в регулировке клеточного цикла.

Структурно интегриновые рецепторы представляют собой облигатные гетеродимеры – каждый состоит из одной альфа- и одной бета-субъединицы. У млекопитающих известно 19 альфа- и 8 бета-субъединиц. Показано, что альтернативный сплайсинг порождает дополнительные варианты субъединиц, увеличивая разнообразие комбинаций. Молекулярная масса субъединиц варьирует от 90 до 160 кДа. Альфа-субъединицы определяют специфичность интегрин к лиганду, а бета-субъединицы связаны с компонентами цитоскелета и обеспечивают передачу сигнала в клетке. Интегрины постоянно присутствуют в клетке, но для связывания лиганда необходима их активация. Интегрины – семейство родственных белков с М.м. 100-160 кД, способных узнавать в матриксных белках пептид RGD. Это аминокислотная последовательность ARG-GLY-ASP, узнаваемая в белках интегринами. Встречается в белках клеточных мембран, внеклеточного матрикса и т.д.

Интегрин бета-1 взаимодействует со многими альфа цепями (от альфа-1 до альфа-11 и альфа-V). Некоторые интегрины находятся на поверхности клетки в неактивном состоянии и способны быстро активизироваться под действием цитокинов и связываться с лигандами. Связывание с лигандом изменяет конформационное состояние интегринового рецептора и запускает соответствующую передачу сигнала.

*Характеристика интегринов.* Интегрины являются сигнальными рецепторами, которые контролируют как связывание клеток с белками внеклеточного матрикса, так и внутриклеточные процессы сопровождающие адгезию клеток. Сами интегрины не проявляют ферментативной активности. Вместо этого они взаимодействуют с адаптерными белками, которые связывают их с сигнальными белками. Прочность связывания интегринов с белками внеклеточного матрикса регулируется двумя процессами:

- модуляцией сродства (т.е. изменение прочности связи индивидуальных рецепторов);
- модуляцией связывания (т.е. изменение степени кластеризации рецепторов).

Центральными для обоих регуляторных процессов являются изменения конформации интегринового рецептора, которые происходят или за счет изменений цитоплазматического участка его субъединиц, или за счет изменений внеклеточной концентрации катионов.



При передаче сигнала по схеме inside-out (изнутри наружу) изменения конформации рецептора происходят за счет внутриклеточных сигналов, которые возникают в любом месте клетки (например, на другом рецепторе). При передаче сигнала по схеме outside-in (снаружи внутрь) сигналы возникают на рецепторе (например, при связывании лиганда) и распространяются на другие части клетки. В зависимости от типа интегринов и белков внеклеточного матрикса, природа цитоплазматических белков, связанных с интегриновыми кластерами, сильно изменяется. В соответствии с этим варьирует и ответ клетки на сигнал от интегрин, передающийся по схеме outside-in (снаружи внутрь). Многие процессы передачи сигнала от интегрин перекрываются с процессами передачи сигнала от рецептора фактора роста.

*Роль тромбоцитов.* Основная функция тромбоцитов заключается в образовании кровяного сгустка, который способствует устранению повреждений стенки кровеносных сосудов. Для этого тромбоциты связываются с белками внеклеточного матрикса и с белками свертывания крови. Тромбоциты не должны инициировать образование сгустка в неповрежденной области стенки сосуда. Адгезия тромбоцитов (и других клеток) к внеклеточным белкам контролируется интегриновыми рецепторами. Еще один пример: неподвижные клетки прочно скрепляются с белками внеклеточного матрикса, а когда клетки становятся подвижными, их связь с этими белками ослабляется. Модуляция связывания описывает изменения плотности рецепторов на поверхности клеток, а модуляция сродства относится к изменениям прочности связывания белками индивидуального рецептора

*Прочность связывания интегрин.* Прочность связывания интегрин с белками находится под контролем двух комплементарных механизмов:

- модуляция сродства, при которой изменение конформации рецептора влечет за собой изменение его сродства к лиганду;
- модуляция связывания, при которой изменяется число контактов, образующихся между интегрин и белками внеклеточного матрикса.

Оба механизма могут контролироваться внутриклеточными процессами передачи сигнала, и изменения конформации интегрин являются основным фактором в обоих типах модуляций.

*Активация интегринового рецептора.* На основании данных рентгеноструктурного анализа кристаллов интегриновых рецепторов предложена модель активации интегрин. В неактивном состоянии внеклеточная часть обеих цепей согнута по направлению к плазматической мембране, и рецептор не связывает лиганда. Бедренные и гибридные домены действуют как шарниры для альфа- и бета-субъединиц соответственно. Для активации интегринового рецептора необходимо, чтобы эта *внеклеточная часть рецептора выпрямилась*; считается, что чем более выпрямлен рецептор, тем больше его сродство к лиганду. *В процессе выпрямления рецептора происходит его связывание с лигандом.* Это связывание характеризуется сначала

низким сродством, и оно может способствовать еще большему выпрямлению рецептора. Последующие изменения конформации рецептора находятся под контролем и зависят от локальной концентрации двухвалентных катионов. Модель активации интегрин предполагает, что в неактивном состоянии внеклеточная часть рецептора согнута по направлению к плазматической мембране. По мере выпрямления интегринового рецептора он связывает лиганд, и становится активным. Рецептор, находящийся в полностью выпрямленном состоянии, обладает максимальным сродством к лиганду.

*Образование кластеров.* Когда интегриновые рецепторы образуют кластеры на поверхности клеток, цитоплазматические участки их  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц служат сайтами причаливания для сборки различных белков, которые могут выполнять две функции посредством интегринов:

- формирует связь между внешним окружением клетки и компонентами ее цитоскелета;
- силы растяжения передаются по клетке и на окружающий внеклеточный матрикс.

В полудесмосоме интегрин  $\alpha\beta 4$  связывается с сетью промежуточных филаментов. В противоположность этому, белки, которые собираются вокруг интегринов  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , связывают их с актиновым цитоскелетом, что позволяет клеткам изменять форму и выполнять такие функции, как миграция и деление.

*Фокальные комплексы.* В каждом сайте активации и кластеризации интегринов в культуре клеток с ними связывается группа внутриклеточных белков. При этом образуются фокальные адгезии, которые представляют собой бляшки, хорошо заметные на клеточной поверхности. Через них осуществляется контакт или связывание с субстратом. Кластеры интегриновых рецепторов, которые формируются вскоре после того, как клетки образуют контакт с внеклеточным матриксом, называются фокальными комплексами. По мере того, как эти комплексы мобилизуют в кластер дополнительные цитоплазматические белки, они созревают с образованием фокальных контактов или фокальных адгезий.

*Внутриклеточная передача сигналов.* Сами по себе интегриновые рецепторы не принадлежат к сигнальным белкам. Скорее они создают структурную основу для трехмерной сборки белков, которые переводят изменения связывания интегрин на язык химических сигналов, быстро распространяющихся по клетке. Процесс внутриклеточной передачи сигналов, который запускается связыванием и кластеризацией интегрин называется передачей сигнала по схеме снаружи внутрь. Модели, учитывающие конформационные изменения интегрин, представленные на рисунках ниже, также можно применить для схемы внешнего сигнала (рисунки 14, 15, приложение).

Фокальные адгезии образуются вокруг кластеров интегринов на поверхности клетки и выполняют функцию структурных связей между внеклеточным матриксом и актиновым цитоскелетом. В фокальных адгезиях также находятся многочисленные сигнальные белки.

*Сигналы, распространяющиеся в цитоплазме.* Сигналы, распространяющиеся в цитоплазме (например, от факторов роста), передаются на цитоплазматическую часть интегриновых рецепторов. Эти сигналы модулируют связывание или сродство интегринов на поверхности клеток. Таким образом, говорят о передаче сигнала по схеме изнутри-кнаружи, т. е. из цитоплазмы к внеклеточному пространству. Две модели, описывающие, как интегрины активируются, связывая внеклеточный лиганд, и открывают сайты связывания для белков цитозоля. Сам сигнал активации может иметь внутри- или внеклеточное происхождение. Полудесмосомы и фокальные адгезии представляют собой структурно и функционально различные комплексы белков, связанных с интегрином.

Цитоплазматические участки интегриновых рецепторов связываются со многими сигнальными и адаптерными белками. Представлены две модели строения сигнальных комплексов. Согласно одной модели, основным сигнальным белком является FAK, который связывается с интегрином непосредственно или через белки талин и паксиллин. Во второй модели в качестве основного сигнального функционирует белок Shc, который связан с интегрином через адаптерный белок кавеолин. Оба сигнальных комплекса контролируют процессы с участием MAP киназы.

*Биосигнализация в регуляции перемещения клетки.* Цитоскелет выполняет три главные функции:

1. Служит клетке механическим каркасом, который придает клетке типическую форму и обеспечивает связь между мембраной и органеллами. Каркас представляет собой динамичную структуру, которая постоянно обновляется по мере изменения внешних условий и состояния клетки.

2. Действует как «мотор» для клеточного движения. Двигательные (сократительные) белки содержатся не только в мышечных клетках, но и в других тканях. Компоненты цитоскелета определяют направление и координируют движение, деление, изменение формы клеток в процессе роста, перемещение органелл, движение цитоплазмы.

3. Служит в качестве «рельсов» для транспорта органелл и других крупных комплексов внутри клетки.

*Микротрубочки и движение в клетке.* Они отходят радиально во всех направлениях от структуры вблизи ядра – центросомы.

Микротрубочки состоят из:

- (+)-конец микротрубочек постоянно находится в состоянии роста и разборки, может также быть стабилизирован ассоциированными белками, когда, например, микротрубочки достигают цитоплазматической мембраны.

- (-)-конец заблокирован ассоциированными белками в центриоле.

Микротрубочки принимают участие в поддержании формы клетки. Они же служат направляющими «рельсами» для транспорта органелл. Вместе с ассоциированными белками (динеин, кинезин) микротрубочки способны осуществлять механическую работу, например транспорт митохондрий, движение ресничек (волосоподобных выростов клеток в эпителии легких, кишечника и яйцеводов) и биение жгутика сперматозоида. Кроме того, микротрубочки выполняют важные функции во время деления клеток – перемещение хромосом.

*Фибрилла бактерии.* Схема «электродвигателя» бактерии больше напоминает инженерный чертеж, чем изображение живого организма. Главная деталь «мотора» – белок Mot A с ионными каналами, благодаря которым поток протонов заставляет ротор вращаться, как турбина.

*Перемещение клеток.* Движение начинается с образования актин-зависимых выростов по переднему краю, который состоит из ламеллиподии и филоподий. Эти выросты содержат актиновые филаменты с концами, ориентированными по направлению к мембране. В течение клеточного вытягивания образуются новые точки приклеивания к субстрату по переднему краю. Затем ядро и тело клетки перемещаются вперед силой актин-миозиновых контактов. Сокращение волокон перемещает клетку вперед, что сопровождается откреплением ее от участков сзади.

*Эфрины.* Эфрины – семейство белков, являющихся лигандами эфриновых рецепторов (*erh-рецепторов*). Сигнальные взаимодействия эфринов и *erh-рецепторов* играют важную роль в аксональном наведении, определении топографии связей в развивающейся нервной системе, но отмечена их роль и за ее пределами – например, при ангиогенезе. Эфрины представляют собой присоединяющиеся к мембране белки длиной 205–340 аминокислот.

*Эфрины-лиганды и эфриновые рецепторы.* Эфрины-лиганды делятся на 2 подкласса:

- А-эфрины;
- В-эфрины.

Данная классификация основана на их структуре и типе присоединения к мембране клетки. А-эфрины сцеплены с мембраной при помощи гликозилфосфатидилинозитольного «хвоста». В-эфрины присоединены к мембране с помощью одиночного трансмембранного домена, содержащего короткий PD2-соединяющий мотив. Гены, кодирующие А- и В- эфрины, называются *EFNA* и *EFNB* соответственно. Эфриновые рецепторы, в свою очередь, также делят на ERNA и ERNB, исходя из их способности связывать лиганды – А-эфрины и В-эфрины.

*Управление аксонами.* Во время развития центральной нервной системы сигнальная функция *Erh* и эфринов играет важнейшую роль в опосредовании контактов между аксонами и их пунктами назначения. *Erh* и эфрины управляют аксонами благодаря своей возможности уменьшать

срок жизни конусов роста аксонов, благодаря чему растущие аксоны «отпугиваются» от участков, где экспрессируются эфрины. Конусы роста перемещающихся аксонов реагируют не на абсолютный уровень Eph и эфринов на клетках, связываемых ими, а на относительный; это позволяет аксонам, на которых экспрессируются эфрины либо Eph, двигаться по градиенту эфрин- или Eph-экспрессирующих клеток до тех пор, пока конус роста аксона не будет полностью ингибирован. Несмотря на то, что Eph-эфрин активация чаще всего сопровождается низким сроком существования конуса роста, недавно было выяснено, что этот срок зависит не просто от активации Eph и эфринов, но скорее от соотношения «прямых» сигналов от эфриновых рецепторов и «обратных» сигналов от эфринов.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### *Вопросы*

1. Как построены интегриновые рецепторы?
2. Охарактеризуйте интегрины.
3. Объясните, в чем заключается роль тромбоцитов.
4. Опишите механизмы, контролирующие прочность связывания интегрин с белками.
5. Опишите модель активации интегринового рецептора.
6. Объясните процесс образование кластеров.
7. Что такое фокальные комплексы.
8. Опишите процесс внутриклеточной передачи сигналов.
9. Охарактеризуйте, каким образом сигналы, распространяющиеся в цитоплазме.
10. Объясните роль биосигнализации в регуляции перемещения клетки.
11. Опишите особенности микротрубочек при движении в клетке.
12. Охарактеризуйте семейство белков – эфрины.
13. Опишите суть процесса управления аксонами.

## ТЕСТЫ

1. Укажите основные процессы в клетке на которые влияют интегрины: а) форма клетки; б) устойчивость к неблагоприятным факторам; в) подвижность клетки; г) клеточный цикл; д) химический состав клетки.

- 1) а, б, в;
- 2) а, г, д;
- 3) в, г, д;
- 4) а, в, г;
- 5) б, в, д.

2. Выберите основные функции интегринов в клетке: а) проявляют ферментативную активность; б) контролируют связывание клеток с белками внеклеточного матрикса; в) изменяют конформацию белков; г) регулируют внутриклеточные процессы, сопровождающие адгезию клеток; д) образуют кровяной сгусток, который помогает устранить повреждение стенки кровеносных сосудов.

- 1) а, б;
- 2) г, д;
- 3) б, г;
- 4) а, в, г;
- 5) б, в, д.

3. Установите главную функцию тромбоцитов:

- 1) проявляют ферментативную активность;
- 2) контролируют связывание клеток с белками внеклеточного матрикса;
- 3) изменяют конформацию белков;
- 4) регулируют внутриклеточные процессы, сопровождающие адгезию клеток;
- 5) образуют кровяной сгусток, который помогает устранить повреждение стенки кровеносных сосудов.

4. Прочность связывания интегринов с белками внеклеточного матрикса регулируется за счет:

- 1) изменением конформации интегринового рецептора;
- 2) внутриклеточными сигналами, которые возникают в любом месте клетки;
- 3) сигналами, возникающими на рецепторе и распределяющимися на другие части клетки;
- 4) активации белков;
- 5) агрегации клеток.

5. Передача сигнала по схеме изнутри наружу с изменением конформации рецепторов происходит за счет:

- 1) изменением конформации интегринового рецептора;
- 2) сигналами, возникающими на рецепторе и распределяющимися на другие части клетки;
- 3) внутриклеточными сигналами, которые возникают в любом месте клетки;
- 4) активации белков;
- 5) агрегации клеток.

6. Конформация интегриновых рецепторов происходит из-за: а) изменения цитоплазматического участка субъединиц рецептора; б) изменение внеклеточной концентрации катионов; в) выпрямления интегрированного рецептора и связывание его с лигандом; г) наличия альфа- и бета-субъединицы в строении; д) за счет возможности передавать сигнал.

- 1) а, б;
- 2) г, д;
- 3) б, г;
- 4) а, в, г;
- 5) б, в, д.

7. Активация интегриновых рецепторов происходит из-за:

- 1) изменения цитоплазматического участка субъединиц рецептора;
- 2) выпрямления интегрированного рецептора и связывание его с лигандом;
- 3) изменение внеклеточной концентрации катионов;
- 4) наличия альфа- и бета-субъединицы в строении;
- 5) за счет возможности передавать сигнал.

8. Выберите правильную модель сигнального комплекса «сигнальный белок – белки для связи с интегрином»: а) Shc – адапторный белок, кавеолин; б) FAK – адапторный белок, кавеолин; в) Shc – белки ткани, паксиллин; г) MAP – белки ткани; д) FAK – белки ткани, паксиллин.

- 1) а, б;
- 2) г, д;
- 3) б, г;
- 4) в, д;
- 5) а, д.

9. Укажите функцию, которая не характерна для микротрубочек:

- 1) принимают участие в поддержании формы клетки;
- 2) во время деления клеток участвуют в перемещении хромосом;
- 3) контролируют связывание клеток с белками внеклеточного матрикса;
- 4) необходимы для транспорта органелл;
- 5) способны осуществлять механическую работу.

10. Определите значение белка Mot A с ионными каналами:

- 1) является основным в строении фибрилл бактерий, благодаря которым поток протонов заставляет его вращаться;
- 2) придает клетке типическую форму;
- 3) изменяет конформации рецептора;
- 4) изменяет внеклеточную концентрацию катионов;
- 5) обеспечивает связь между мембраной и органеллами.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** Стеноз (сужение) привратника желудка может быть вызван либо гипертонусом мускулатуры, либо рубцовыми изменениями его стенок, что не дифференцируется по рентгенограмме. Для уточнения диагноза может использоваться введение атропина, являющегося М-холиноблокатором. Какой эффект будет наблюдаться после введения атропина, если стеноз был вызван: гипертонусом мускулатуры? Рубцовыми изменениями стенок? Каково физиологическое обоснование применения атропина в этой ситуации? Какие сопутствующие физиологические эффекты могут при этом наблюдаться?

**Задача 2.** После отборочного тура к международному конкурсу бальных танцев были допущены стажеры и танцевальные пары, имевшие опыт выступления на престижных конкурсах. Перед выступлением в обеих группах возрос уровень адреналина, у некоторых из стажеров в 10 раз. Какое физиологическое и метаболическое действие оказывает адреналин на органы-мишени? Как изменяется уровень глюкозы в крови при повышении концентрации адреналина в крови? Какой процесс протекает в печени при действии адреналина? Как происходит обеспечение энергией сердечной мышцы при сильном эмоциональном стрессе?



## Тема 9

# БИОСИГНАЛИЗАЦИЯ ПРИ АПОПТОЗЕ И НЕКРОЗЕ

## ГЛОССАРИЙ

**Некроз** – один из вариантов местной смерти, который может захватывать клетки, группы клеток, ткани, орган и возникает при наличии повреждающих факторов.

**Апоптоз** – генетически запрограммированная смерть клеток в живом организме, при которой устраняются отдельные клетки из живой ткани.

**Колликвация** – превращение в жидкое состояние, размягчение, растворение тканей.

**Пролиферация** – разрастание ткани организма путем размножения клеток делением.

**Инволюция** – разложение клетки под действием ферментов, выделяющихся из лейкоцитов или под действием бактерий, носит название «гетеролизис».

**Антигенспецифичные клоны** (клонально-селективная теория, теория Бернета) – теория, согласно которой в организме возникают клоны клеток, иммунокомпетентных в отношении различных антигенов; антиген избирательно контактирует с соответствующим клоном, стимулируя выработку им антител.

**НК-клетки** – клетки, которые обеспечивают очень быстрый ответ без участия главного комплекса гистосовместимости (МНС) и антител, на заражение внутриклеточными бактериями и вирусами, уничтожая инфицированные клетки, а также принимают участие в работе противоопухолевого иммунитета.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

*Общая характеристика некроза и апоптоза. Некроз* (от греч. Νεκρός «мертвый»), или омертвление, – патологический процесс, выражающийся в местной гибели ткани в живом организме в результате какого-либо экзо- или эндогенного ее повреждения. Некроз проявляется в набухании, денатурации и коагуляции или колликвации цитоплазматических белков, разрушении клеточных органелл, затем и всей клетки. Наиболее частыми причинами некротического повреждения ткани являются: прекращение кровоснабжения (что может приводить к инфаркту, гангрене) и воздействие патогенными продуктами бактерий или вирусов (токсины, белки, вызывающие реакции гиперчувствительности, и др.). При некрозе развива-

ется интоксикация, формируется очаг воспаления и из-за гибели структурных элементов ткани или органа выпадают функции.

Причины некроза обусловлены различными факторами, на основании которых выделяют этиологические виды некроза:

- *травматический* некроз – является результатом прямого действия на ткань физических (механические, термические, радиационные) и химических (кислоты, щелочи и др.) факторов.
- *токсический некроз* – возникает при действии на ткани токсинов бактериологической и другой природы (микробов и инфекций);
- *трофоневротический некроз* – вызван нарушениями микроциркуляции и иннервации тканей при заболеваниях центральной или периферической нервной системы;
- *аллергический некроз* – следствие развития иммунопатологических реакций;
- *сосудистый некроз* – связан с нарушением кровоснабжения органа или ткани (прекращении циркуляции крови в артериях).

В зависимости от механизма действия этиологического фактора выделяют следующие виды некроза: прямой некроз – при непосредственном травматическом и токсическом повреждении; непрямой некроз – опосредованное действие через сосудистую, нервную и иммунную системы.

Выделяют следующие стадии развития некроза:

- *паранекроз* – обратимые изменения, похожие на некротические.
- *некробиоз* – необратимые дистрофические изменения.
- *смерть клетки* – критериев для установления момента смерти клетки в настоящее время не существует.
- *аутолиз* – разложение мертвого субстрата под действием гидролитических ферментов, выделяющихся поврежденной клеткой.

Морфологические признаки появляются лишь на стадии аутолиза, т.е. через несколько часов после момента наступления смерти клетки. Ранние признаки некроза выявляются с помощью электронно-микроскопического и гистохимического исследований.

По клинико-морфологическим характеристикам выделяют следующие виды некрозов:

- *Коагуляционный (сухой) некроз* характеризуется преобладанием коагуляции, дегидратации, уплотнения. Встречается в тканях с большим содержанием белков и низким – воды. Некротизированные ткани сухие, плотные, серо-желтого цвета.
- *Колликвационный (влажный) некроз* характеризуется расплавлением, некротизированной гидратацией. Встречается в тканях с большим содержанием воды. Примером является серое размягчение (ишемический некроз) головного мозга: очаг дряблой консистенции, неправильной формы, серого-цвета.

- *Инфаркт* – некроз тканей, возникающий при нарушении кровообращения, т.е. сосудистый (ишемический) некроз. Развивается вследствие тромбоза, длительного спазма артерий или функционального перенапряжения органа в условиях недостаточного кровоснабжения (относится только к инфаркту миокарда).

- *Секвестр* – участок мертвой ткани, который не подвергается аутолизу, не замещается соединительной тканью и свободно располагается среди живых тканей. Как правило, сопровождается развитием гнойного воспаления с образованием свищевых ходов, через которые фрагменты секвестра могут выходить. Возникает преимущественно при остеомиелите.

- *Гангрена* – некроз тканей, соприкасающихся с внешней средой и имеющих черную окраску в результате образования сернистого железа.

Благоприятные исходы некроза (связаны с процессами отграничения и репарации, распространяющимися из зоны демаркационного воспаления):

Основные патоморфологические изменения при благоприятном завершении некроза являются:

- *организация* (рубцевание) – замещение некроза соединительной тканью;

- *петрификация* – замещение (пропитывание участка) некроза солями кальция (дистрофическое обызвествление);

- *оссификация* – замещение некроза костной тканью;

- *мутиляция* (самопроизвольная ампутация) – отторжение ткани;

- *инкапсуляция* – отграничение некроза соединительнотканной капсулой;

- *образование кисты* – исход колликвационного некроза.

Неблагоприятные исходы некроза: гнойное расплавление некротических масс и возможно развитие сепсиса.

*Апоптоз* (др.-греч. ἀπόπτωσις – «листопад», от ἀπό- + πτώσις «падение») – регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро (в среднем за 90 минут) фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, *без развития воспалительной реакции*. Морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1-3 часа. Одной из основных функций апоптоза является уничтожение дефектных (поврежденных, мутантных, инфицированных) клеток.

Апоптоз встречается при следующих состояниях:

- *Устранение клеток* во время эмбриогенеза (имплантация, органогенез, инволюция развития).

- *Инволюция* гормонально-зависимых органов после снижения действия соответствующего гормона взрослых (отторжение эндометрия во время менструации, атрофия яичников в менопаузе, регрессия лактирующих молочных желез после прекращения кормления).

- *Смерть клеток в опухолях* (чаще при спонтанной регрессии, но также и в активно растущих опухолях).
- *Смерть иммунных клеток* (Т- и В-лимфоцитов после прекращения стимулирующего действия цитокинов).
- *Атрофия* паренхиматозных органов при обструкции выводящих путей.
- *Смерть клеток вследствие действия цитотоксических Т-лимфоцитов* в реакциях отторжения и трансплантат против хозяина.
- *Клеточные повреждения* при действии вирусов (образование телец Каунсильмена вирусном гепатите В).
- *Клеточная смерть под действием повреждающих факторов*, способных больших дозах к некрозу (умеренные термические, радиационные повреждения, цитотоксические противоопухолевые препараты, гипоксия).

Рассмотрим подробнее состояния, в которых происходит апоптоз.

*Клеточный гомеостаз и морфогенез.* Одной из главных функций апоптоза в многоклеточном организме является поддержание клеточного гомеостаза, то есть постоянства клеточной популяции. При этом обеспечивается правильное соотношение численности клеток различных типов, селекция разновидностей клеток внутри популяции, удаление генетически дефектных клеток. Во взрослом организме программируемая клеточная гибель, уравновешивая митотическое деление, обеспечивает обновление тканей путем поддержания сбалансированной численности клеток.

*Апоптоз и морфогенез.* Апоптоз играет важную роль в формообразовательных процессах, в дифференциации тканей и отдельных частей органов. У животных роль апоптоза в морфогенезе отдельных органов или их частей наиболее отчетливо прослеживается в процессе эмбриогенеза. К примеру, утрата хвоста зародышами амфибий или атрофия у них хорды объясняются массовым апоптозом целых клеточных популяций. На гистологическом сечении лапы эмбриона мыши (*Mus musculus*), сделанное спустя 15 дней развития (эмбриогенез у мышей продолжается в течение 27 дней) между всеми пальцами заметны рудиментарные скопления клеток, которые погибают путем апоптоза в процессе формирования конечности.

*Апоптоз и система иммунитета.* В системе иммунитета животных программируемая клеточная смерть задействована в обеспечении целого ряда жизненно важных функций иммунитета (рисунок 16, приложение). Процесс апоптоза заложен в основу позитивной и негативной селекции Т- и В-лимфоцитов, обеспечивая выживание антигенспецифичных клонов и последующую выбраковку аутореактивных лимфоцитов. На обоих этапах селекции клетки, не прошедшие отбор, погибают в результате апоптоза. Немаловажна роль программируемой клеточной смерти в реализации эффекторной функции цитотоксических Т-клеток и НК-клеток – и те и другие способны инъецировать внутрь клеток-мишеней сериновые протеазы (гранзимы), которые запускают механизм апоптоза.

*Апоптоз и взрослый организм.* Во взрослом организме, атрофия гормонально-зависимых тканей в условиях снижения концентрации соответствующих гормонов также обусловлена апоптозом. Например, процессы такого рода периодически протекают в женских половых органах в течение менструального цикла, или же в предстательной железе при снижении концентрации андрогенов. В растительном организме апоптоз не менее интегрирован в процессы морфогенеза и дифференциации, чем у животных. Программируемая клеточная смерть у растений обеспечивает ксилогенез и флоэмогенез, формообразование листьев, аэренхимогенез, образование корневого чехлика, опадание листьев и созревших плодов, прорастание пыльцевой трубки и др.

*Апоптоз и старение.* К настоящему времени имеются как минимум две точки зрения на связь апоптоза с процессами старения. Согласно одной из версий нормальные (гомеостатические) апоптотические процессы могут участвовать в развитии возрастных патологий и фенотипов старения. К примеру, с апоптотической гибелью постмитотических клеток (кардиомиоцитов, нейронов) связаны процессы старения сердечной мышцы или развитие возрастных нейродегенеративных патологий. Старение иммунной системы также связывают с программируемой гибелью различных типов лейкоцитов в результате возрастных изменений в соотношении про- и антиапоптотических факторов. Возрастная хрящевая дегенерация коррелирует с повышением уровня апоптоза хондроцитов в суставных хрящах у мышей и крыс, а также в межпозвоночных дисках при старении у человека. Согласно другой точке зрения накопление стареющих клеток в тканях объясняется возрастной резистентностью к апоптозу. В качестве примера рассматривается устойчивость стареющих фибробластов к апоптозу, приводящая в итоге к преждевременному старению нормальных фибробластов и, возможно, к нарушению функций соединительной ткани.

*Патологии, обусловленные нарушениями апоптоза.* Организмы с обширными дефектами, обусловленными нарушениями апоптоза, погибают еще на ранних стадиях онтогенеза. Регистрируются лишь локальные дефекты, развившиеся в ходе эмбрионального развития, или же дефекты с ограниченными фенотипическими проявлениями, развившиеся уже во взрослых организмах. Патологические процессы развиваются в случае подавления или усиления апоптоза. При недостаточности апоптоза прогрессируют аутоиммунные процессы и злокачественные новообразования. При усилении апоптоза возникают аплазии и дегенеративные процессы, а также некоторые уродства с дефектами тканей. Нога человека со сросшимися указательным и средним пальцами иллюстрирует результат незавершившегося или нарушенного апоптоза на стадии эмбриогенеза. Основные этапы апоптоза приведены на рисунке 17, приложение.

*Патогенез апоптоза.* Белки семейства Bcl-2 являются основными регуляторами митохондриального пути апоптоза. В семействе Bcl-2 различают проапоптотические и антиапоптотические белки.

На основании структурных и функциональных различий выделяются три подсемейства белков Bcl-2:

- *антиапоптотические Bcl-2 белки*, содержащие 4 ВН-домена: Bcl-2 и другие;
- *проапоптотические Bcl-2 белки*, содержащие 3 ВН-домена: Bax и другие;
- *Bcl-2 белки*, содержащие только ВН3-домен, которые могут исполнять роль активаторов или репрессоров апоптоза.

Ген BAX активируется под действием p53. BAX кодирует проапоптотический белок, который способствует выбросу из митохондрий цитохрома C. В комплексе с APAF1 цитохром C принимает участие в активации каспазы-9, запускающей апоптозный каскад.

Активация p53, вызванная сильными повреждениями ДНК или нарушением регуляцией клеточного цикла, дает мощный апоптогенный сигнал, в реализации которого задействованы различные механизмы индукции каспаз. p53-зависимый апоптоз элиминирует из организма не только поврежденные клетки, но и клетки, в которых наблюдается нерегулируемая стимуляция пролиферации (опухолевые клетки).

#### *Биосигналинг при некрозе и апоптозе*

*Биосигналинг при некрозе.* Как было показано ранее – некроз происходит при действии чрезмерной силы факторов физической, химической и биологической природы. Этот процесс зависит от двух процессов: силы повреждающего воздействия и характеристик ответной неспецифической реакции на повреждение (острой и хронической стресс-реакции).

Общая неспецифическая реакция включает гуморальные и клеточные процессы активации гипофизарно-надпочечниковой оси регуляции. Неспецифические защитные процессы на молекулярном уровне включают обезвреживание ксенобиотиков, репаративный синтез ДНК, свертывающую систему крови, антиоксидантную систему защиты, функционирование лизосомального аппарата, а также системы естественного и приобретенного клеточного и гуморального иммунитета.

*Лизосома* – окруженный мембраной клеточный органоид, в полости которого поддерживается кислая среда (рН 4-4,5) и находится до 60 растворимых гидролитических ферментов. Лизосома отвечает за внутриклеточное переваривание макромолекул, в том числе при аутофагии; лизосома способна к секреции своего содержимого в процессе лизосомного экзоцитоза; лизосома участвует в некоторых внутриклеточных сигнальных путях, связанных с метаболизмом и ростом клетки. На рисунке 18 (приложение) и таблице 1 представлены регуляторные и исполнительные механизмы различных видов клеточной гибели.

Таблица 1 – Пептидазы при различных типах клеточной смерти (Salvesen G.S. et al., 2016)

Protease	Apoptosis	Pyroptosis	Necroptosis	Necrosis	NETosis	Unspecified
Caspase 3, 6, 7, 8, 9, 10	+++	–	(Caspase-8)	–	–	–
Caspase 1, 4, 5	–	+++	–	–	–	–
Granzyme A	–	–	–	–	–	++
Granzyme B	+++	+	–	–	–	–
Cathepsin C (DPP1)	+++	–	–	–	+	–
Cathepsin B	+	+	–	++	–	++
Cathepsin D	+	–	–	++	–	+
Neutrophil Elastase	–	–	–	–	+	–
Calpain 1, 2	+	–	–	++	–	+

В организме среднестатистического взрослого человека в результате апоптоза погибает ежедневно порядка 50-70 миллиардов клеток. Для среднестатистического ребенка в возрасте от 8 до 14 лет число клеток, погибших путем апоптоза, составляет порядка 20-30 миллиардов в день. Суммарная масса клеток, которые на протяжении 1 года жизни подвергаются разрушению, эквивалентна массе тела человека. При этом восполнение утраченных клеток обеспечивается за счет пролиферации – увеличения клеточной популяции путем деления.

Процесс апоптоза часто (например, у млекопитающих) начинается с взаимодействия специфических внеклеточных лигандов с рецепторами клеточной гибели, экспрессированными на поверхности клеточной мембраны. Рецепторы, воспринимающие сигнал апоптоза, относятся к суперсемейству TNF-рецепторов (tumor necrosis factor receptor или кратко TNFR – «рецептор фактора некроза опухолей»). Наиболее изученными рецепторами смерти, для которых описана и определена роль в апоптозе, являются CD95 (также известный как Fas или APO-1) и TNFR1 (также называемый p55 или CD120a). К дополнительным относятся CAR1, DR3 (death receptor 3 – «рецептор смерти 3»), DR4 и DR5.

Процесс апоптоза происходит в рамках модели образования апоптосомы «Цитохром *c* – APAF-1 – CARD – прокаспаза-9». Большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели. Цитохром *c* в цитоплазме клетки участвует в формировании апоптосомы вместе с белком APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1 – «активирующий фактор апоптотической протеазы-1»). Предварительно APAF-1 претерпевает конформационные изменения в результате реакции, протекающей с затратой энергии АТФ. Предполагается, что трансформированный APAF-1 приобретает способность

связывать цитохром *c*. К тому же открывается доступ CARD-домена АРАФ-1 для прокаспазы-9. В итоге происходит олигомеризация 7 субъединиц трансформированного белка АРАФ-1 с участием цитохрома *c* и прокаспазы-9. Так образуется апоптосома, активирующая каспазу-9. Зрелая каспаза-9 связывает и активирует прокаспазу-3 с образованием эффекторной каспазы-3.

У млекопитающих идентифицировано 13 каспаз. Часть из них в апоптозе не участвует (1, 4, 5, 11, 13). Остальные каспазы, которые участвуют в апоптозе, разделяют на инициаторные (2, 8, 9, 10, 12) и эффекторные (3, 6, 7). Инициаторные каспазы активируют эффекторные каспазы, которые в свою очередь провоцируют и непосредственно участвуют в трансформации клетки. В итоге морфологические и биохимические изменения приводят к гибели клетки по типу апоптоза.

*Функции эффекторных каспаз.* Одна из основных функций эффекторных каспаз заключается в прямом и опосредованном разрушении клеточных структур. Гидролизу подвергаются белки ядерной ламины, разрушается цитоскелет, расщепляются белки, регулирующие клеточную адгезию. Другой важной функцией эффекторных каспаз является инактивация белков, блокирующих апоптоз. В частности, расщепляется ингибитор DFF (DNA fragmentation factor – «фактор фрагментации ДНК»), препятствующий активации апоптозной ДНКазы САD (caspase-activated DNase – «ДНКаза, активируемая каспазами»). Разрушению подвергаются и антиапоптозные белки семейства Bcl-2. На последнем этапе, в результате действия эффекторных каспаз происходит диссоциация регуляторных и эффекторных доменов, участвующих в репарации ДНК, мРНК-сплайсинга и ДНК-репликации. Функциональные взаимодействия между инициаторными и эффекторными каспазами (каспаза-2 может существовать в форме двух изомеров, один из которых иницирует, а другой подавляет апоптоз. Общая схема биосигналинга при апоптозе представлена на рисунке 19.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ УСР

### *Вопросы*

1. Что такое некроз? Каковы его причины? Какие изменения происходят при некрозе?
2. Какова классификация некрозов по этиологическим характеристикам? Какие виды некрозов бывают в зависимости от механизма действия этиологического фактора? Охарактеризуйте данные виды.
3. Какие стадии развития некроза выделяют? Чем они характеризуются?
4. По клинико-морфологическим характеристикам выделяют следующие виды некрозов.



5. Что значит благоприятные и неблагоприятные исходы некроза, с какими процессами они связаны? Какие основные патоморфологические изменения при благоприятном завершении некроза бывают?

6. Что такое апоптоз? Каковы его причины? Какие изменения происходят при апоптозе?

7. Перечислите при каких состояниях организма происходит апоптоз.

8. Охарактеризуйте значение апоптоза при морфогенезе и гомеостазе.

9. Охарактеризуйте функции апоптоза в системе иммунитета.

10. Охарактеризуйте апоптоз во взрослом организме и при старении.

11. Опишите биосигналинг при некрозе и апоптозе.

12. Какие функции эффекторных каспаз выделяют?

## ТЕСТЫ

1. Укажите, существующие два варианта местной смерти, т.е. гибели структур в живом организме:

1) пролиферация и колликвация;

3) некроз и колликвация;

2) апоптоз и колликвация;

4) некроз и апоптоз;

5) пролиферация и апоптоз.

2. Выберите этиологический вид некроза, который связан с нарушением микроциркуляции и иннервации тканей при хронических заболеваниях:

1) травматический некроз;

2) токсический некроз;

3) трофоневротический некроз;

4) аллергический некроз;

5) сосудистый некроз.

3. Выберите этиологический вид некроза, который связан с нарушением кровоснабжения органа или ткани:

1) травматический некроз;

2) токсический некроз;

3) трофоневротический некроз;

4) аллергический некроз;

5) сосудистый некроз.

4. Определите правильную последовательность стадий развития некроза:

1) некробиоз – паранекроз – смерть клетки – аутолиз;

2) паранекроз – некробиоз – смерть клетки – аутолиз;

- 3) аутолиз – паранекроз – некробиоз – смерть клетки;
- 4) паранекроз – аутолиз – некробиоз – смерть клетки;
- 5) паранекроз – некробиоз – аутолиз – смерть клетки.

5. Выберите, вид некроза, который характеризуется расплавлением, некротизированной гидратацией и встречается в тканях с большим содержанием воды:

- 1) коагуляционный некроз;
- 2) колликвационный некроз;
- 3) инфаркт;
- 4) секвестр;
- 5) гангрена.

6. Из приведенного перечня, выберите только те, которые относятся к патоморфологическим изменениям, происходящих при благоприятном завершении некроза:

- 1) организация, петрификация, оссификация, мутиляция, образование кисты;
- 2) организация, петрификация, оссификация, гнойное расплавление, сепсис;
- 3) организация, петрификация, сепсис, мутиляция, образование кисты;
- 4) организация, гнойное расплавление, оссификация, мутиляция, образование кисты;
- 5) организация, петрификация, оссификация, мутиляция, сепсис.

7. Укажите с чего начинается процесс апоптоза у млекопитающих:

- 1) взаимодействием специфических внеклеточных лигандов с рецепторами клеточной гибели, экспрессированными на поверхности клеточной мембраны;
- 2) атрофией гормонально-зависимых тканей в условиях снижения концентрации соответствующих гормонов;
- 3) репаративным синтезом ДНК;
- 4) внутриклеточным перевариванием макромолекул;
- 5) инактивацией белков, блокирующих апоптоз.

8. В процессе морфогенеза основной функцией апоптоза является:

- 1) инактивация белков, блокирующих апоптоз.
- 2) позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов, обеспечивая выживание антигенспецифичных клонов и последующую выбраковку аутореактивных лимфоцитов;
- 3) прямое и опосредованное разрушение клеточных структур;
- 4) атрофия гормонально-зависимых тканей в условиях снижения концентрации соответствующих гормонов;
- 5) формообразовательные процессы, дифференциация тканей и отдельных частей органов.

9. Выберите последовательность компонентов, которые принимают участие в образовании модели апоптосомы в процессе апоптоза:

- 1) «цитохром *c* – TNF – CARD – прокаспаза-9»;
- 2) «прокаспаза-9 – APAF-1 – CARD – цитохром *c*»;
- 3) «цитохром *c* – APAF-1 – CARD – прокаспаза-9»;
- 4) «прокаспаза-9 – TNF – CARD – цитохром *c*»;
- 5) «APAF-1 – CARD – цитохром *c* – прокаспаза-9»;

10. Выберите основные функции эффекторных каспаз:

- 1) формообразовательные процессы, дифференциация тканей и отдельных частей органов;
- 2) позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов, обеспечивая выживание антигенспецифичных клонов и последующую выбраковку аутореактивных лимфоцитов;
- 3) обезвреживание ксенобиотиков;
- 4) прямое и опосредованное разрушение клеточных структур и инактивация белков, блокирующих апоптоз;
- 5) атрофия гормонально-зависимых тканей в условиях снижения концентрации соответствующих гормонов.

## ЗАДАЧИ

**Задача 1.** У пациента зафиксированы первые морфологические признаки некроза в сердце только спустя 12–18 ч от момента ишемии, электронно-микроскопическое и гистохимическое исследования могли выявить начало некроза ранее. Предположите, какие изменения при данных исследованиях могли быть диагностированы.

**Задача 2.** У обратившемуся к врачу пациенту, для верификации апоптоза, был использован наиболее достоверными морфологический метод, основанный на обнаружении неспаренных участков ДНК в местах ее расщепления эндонуклеазами – метод уридиновыми основаниями – TUNEL-тест. Отметьте, какие изменения может зафиксировать данный метод при развитии апоптоза.

**Задача 3.** В организме среднестатистического взрослого человека в результате апоптоза погибает ежедневно порядка 50-70 миллиардов клеток. У пациента фиксируются гибель структурных компонентов организма. Предположите, какие признаки позволят врачу отличить развивающийся апоптоз от некроза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные положения о внутриклеточных сигнальных путях были разработаны к началу XXI века. Поэтому следует завершить данное учебное пособие выдержками из доклада известного генетика Владимира Катанаева о современных подходах к разработке лекарств против рака, прочитанной 11 ноября 2010 года в Политехническом музее в рамках проекта «Публичные лекции Полит.ру».

Клетка окружена мембраной, которая служит определенным барьером для поступления информации извне. Для того чтобы этот барьер был проницаем для информации, существуют внутриклеточные пути передачи сигнала, которые схематически изображены на рисунке 20 (приложение). На поверхности клетки имеется рецептор – это белок, который имеет внеклеточные и внутриклеточные домены. Внеклеточные участки ответственны за связывание с информационным сигналом, которым, как правило, является определенное вещество.

Рассмотрим основные процессы от сигнальной молекулы до клеточного ответа (рисунок 21, приложение). Сигнальные молекулы могут быть как низкомолекулярными, неорганическими, органическими, нуклеотидами, липидами, так и высокомолекулярными (белки, липопротеины, нуклеиновые кислоты и др.). После связывания лиганда с рецептором в рецепторе происходит определенное структурное изменение, которое делает внутриклеточную часть рецептора узнаваемой для определенных белков, которые затем передают сигнал далее. В результате систему передачи сигналов можно представить как некоторый каскад реакций, который приводит к активации определенной программы ответа. Программой ответа может быть запуск транскрипции определенных генов, что в свою очередь может приводить к стимуляции пролиферации клеток, то есть к их активному размножению; к дифференцировке клеток, то есть превращению клеток одного типа в клетки другого типа, например, возникновению нейрональных клеток из эпителиальных или возникновению дифференцированных клеток (например, мышечных) из стволовых клеток-предшественников.

В эукариотических клетках существует небольшое количество типов внутриклеточных путей передачи сигналов – их около 17 (таблица 2). Далее эту таблицу можно разбить на участки, которые будут включать в себя те типы внутриклеточной передачи сигнала, которые активны на ранней стадии развития, на поздней стадии развития или у взрослого организма.

*Сигнальные пути ранних этапов развития организма.* Рассмотрим в упрощенном виде первые пять путей передачи сигнала и определяющих раннее развитие организма и изменения, возникающие при малигнизации клеток. На рисунке 22 (приложение) представлен каскад, который запускается лигандом *Wnt*, представляющим собой липогликопротеин довольно крупного размера. Он связывается с рецептором *Frizzled*, что в переводе с английского называется «лохматый».

Таблица 2 – Основные сигнальные пути в эукариотической клетке на разных этапах онтогенеза

№	Stages of ontogenesis	Pathway
1	Early development and later	Wnt pathway
2		Receptor serine/threonine kinase (TGF $\beta$ ) pathway
3		Hedgehog pathway
4		Receptor tyrosine kinase (small G proteins) pathway
5		Notch/Delta
6	Mid-development and later	Cytokine receptor (cytoplasmic tyrosine kinases) pathway
7		IL1/Toll NF $\kappa$ B pathway
8		Nuclear hormone receptor pathway
9		Apoptosis pathway
10		Receptor phosphotyrosine phosphatase pathway
11	Larval/adult physiology	Receptor guanylate cyclase pathway
12		Nitric oxide receptor pathway
13		G-protein coupled receptor (large G proteins) pathway
14		Integrin pathway
15		Cadherin pathway
16		Gap junction pathway
17		Ligand-gated cation channel pathway

Такое название произошло от того, что у дрозофилы, когда была описана мутация в этом гене, ориентация волосков и щетинок на теле мушки оказалась нарушенной. Когда каскад не активен, в цитоплазме клетки работает так называемый аксин-зависимый деструкционный комплекс. Он состоит из ряда белков, которые указаны на рисунке. Задача этого комплекса – фосфорилировать бета-катенин – это важный белок, который выполняет много разных функций в клетке. Когда цитоплазматический бета-катенин фосфорилируется, это приводит к его деградации по протеасомному механизму.

Таким образом, в отсутствие Wnt-лиганда концентрация бета-катенина в клетке крайне низкая. Когда Wnt-лиганд связывается со своими рецепторами, этот аксин-зависимый комплекс реструктурируется, бета-катенин не фосфорилируется, не деградирует, его концентрация увеличивается, он может идти в ядро и запускать транскрипцию генов-мишеней.

На следующем рисунке представлен сигнальный путь, начинающийся от рецептора ростовых факторов (рисунок 23, приложение).

TGF $\beta$  – один из белковых лигандов, которые связываются с димерным рецептором на поверхности клетки. Связывание лиганда обеспечивает физическое приближение двух компонентов димера друг к другу, в результате чего димер активируется, активирует некоторые белки в цитоплазме, называемые SMAD, и активная форма этих белков также идет в ядро и запускает транскрипцию. Одним из механизмов, с помощью которого белки Smad способствуют индуцированному TGF- $\beta$  цитостазу (подавлению де-

ления клеток), является ингибирование фактора транскрипции Мус, который способствует росту клеток. Мус также репрессирует белки p15 (Ink4b) и p21 (Cip1), являющиеся ингибиторами циклин-зависимых киназ клеточного цикла Cdk4 и Cdk2, соответственно. Когда TGF-В отсутствует, в цитоплазме существует репрессорный комплекс, состоящий из Smad3 и факторов транскрипции E2F4 и p107. Однако, когда присутствует сигнал TGF-В, этот комплекс локализуется в ядре, где он связывается с Smad4 и связывается с TGF-В-ингибиторным элементом (ТІЕ) промотора Мус для репрессии его транскрипции. На схеме №1 найдите в области ядра клетки белковые факторы Мус и Mad и проследите путь до рецептора ростовых факторов.

*Рецептор – тирозинкиназный (tyrosine kinase) сигнальный каскад*, который устроен похоже на предыдущий, поскольку рецептор также является димером. Два компонента этого димера сближаются друг с другом при связывании с лигандом, это активирует рецептор, его тирозинкиназную активность. При этом активируется ряд белков, и на выходе имеется запуск транскрипции генов-мишеней. На схеме 1 найдите путь от Ras до MAPK и оцените горизонтальные связи этого пути (рисунок 24, приложение). Последним из пяти сигнальных путей, определяющих раннее развитие является *Notch-зависимый сигнальный путь* (рисунок 25, приложение).

Рецептор называется Notch, и связывание его с лигандом обеспечивает протеолитическое расщепление этого рецептора, и таким образом его внутриклеточная часть освобождается и может идти в ядро и запускать программы развития. Интересно отметить, что протеолитическая деградация в мембране происходит под действием определенного комплекса белков, которые также активны в расщеплении другого медицински значимого белка, а именно предшественника Аbeta-пептида.

Именно неправильная активность этих белков – пресенелина и никастрина – приводит к тому, что Аbeta-предшественник расщепляется неправильно, накапливается Аbeta-пептид, что, в свою очередь, приводит к развитию болезни Альцгеймера.

Кроме того, активность этих сигнальных каскадов лежит в основе малигнизации клеток в различных тканях. Можно предположить, что если бы удалось разработать вещества, которые проникали внутрь клеток и блокировали эти неправильно активированные каскады, то такие вещества могли бы стать основой для лечения соответствующих форм рака.

Далее рассмотрим *сигнальные пути, нарушения которых во взрослом состоянии* могут приводить к развитию опухолей. В этой части заключительной главы учебного пособия использованы материалы известного популяризатора медико-биологических исследований М.Ф. Прохорова (сайты: vrachirf.ru и medach.pro).

**МАРК** – путь важен для патологии сформированного эукариотического организма. К кластеру МАРК (mitogen-activated protein kinase) отно-

сятся внутриклеточные сигнальные пути самых разнообразных функций. Критерием для включения в MAPK-группу является наличие митоген-активируемых протеинкиназ в модуле, в котором, помимо киназ, содержатся протеинфосфатазы и белки-сборщики белковых вспомогательных комплексов (рисунок 26, приложение).

Среди множества киназ, задействованных при передаче сигнала, в кластере MAPK существуют так называемые *Raf-киназы*. Raf – это семейство серин-треонин зависимых протеинкиназ, название которых является акронимом от Rapidly Accelerated Fibrosarcoma. Но быстрорастущая фибросаркома не связана с меланомой кожи. Дело в том, что в глубинных механизмах онкогенеза нередко обнаруживаются перекресты путей, и такие, как в этом случае, в том числе. В контексте данной главы не имеет никакого смысла останавливаться на подробном представлении этапов онкогенеза фибросарком, поэтому остановимся особенностях активности Raf- при меланоме кожи.

Особенным в семействе Raf- может быть V-raf – белок, играющий роль в MAPK-каскаде, чьими эффектами являются дифференцировка и деление клеток. Белок V-raf кодируется одноименным геном. Под действием чрезмерного УФ-облучения в данном гене возникает V600 мутация, заключающаяся в замене валина на лейцин (V600L), лизин (V600K) или глутаминовую кислоту (V600E) в 600-ой позиции, что служит стартером неопластической трансформации в меланоме кожи, а также является мишенью для действия лекарственных средств, объединенных в группу ингибиторов BRAF V600L.

Это так называемые «-нибы»: иматиниб, сорафениб, вемурафениб и т.п. В рандомизированных клинических исследованиях была обнаружена интересная особенность: если при верифицированном мутированном BRAF-статусе пациента низкомолекулярные ингибиторы BRAF приводили к торможению развития меланомы, то потребление «-нибов» пациентами, мутации BRAF у которых вызывали сомнения либо отсутствовали, приводило к мутации другого каскада - *RAS-RAF-MEK-ERK*, патологически активируя его и иницируя неопластическую трансформацию. Таким образом, можно сделать вывод, что низкомолекулярные BRAF-ингибиторы хоть и являются эффективным терапевтическим средством, все же демонстрируют опасную амбивалентность в случае недостаточной диагностики или ошибочной интерпретации BRAF-статуса пациента.

*MEK* является серин-треониновой киназой MAPK-кластера, активируемой в связи с изменениями в вышестоящих звеньях сигнальной цепи (рисунок 27, приложение). Роль MEK заключается в интеграции сигналов от различных факторов роста с последующей активацией пролиферации. Являясь частью MAPK-каскада, MEK участвует в регуляции активности транскрипционных факторов, таких как, например, С-мус. Белок Мус, кодируемый одноименным геном и являющийся протоонкогеном, является

не только «каноничным» примером транскрипторного фактора, но и контролирует структуру хроматина, регулируя ацетилирование гистонов, что в свою очередь влияет на активность экспрессии генов. Мутантный ген Мус, находящийся в 8-ой хромосоме, обнаруживается во многих видах опухолей; классическим примером является транслокация, приводящая к возникновению и развитию лимфомы Беркитта. Эксперименты, направленные на его ингибирование, приводили к лизису опухолевых клеток легкого у мышей. Следовательно, Мус является терапевтической мишенью, в частности, разработка селективных аллостерических ингибиторов Мус является актуальной темой для клинических исследований.

*N-RAS (Neuroblastoma-Ras) – ген, кодирующий одноименный белок, входящий в так называемое суперсемейство Ras – малых ГТФ-аз.* Наряду с NRAS в данное семейство входят гены K-Ras, H-Ras (вызывающие неопластическую трансформацию при заражении вирусом саркомы Кристен и Харви соответственно) и др. На сегодняшний день функция NRAS определена как передача пролиферативных сигналов от рецепторов факторов роста. NRAS, как и все суперсемейство, задействованы в сигнальном пути MAPK (рисунок 28, приложение).

Мутации NRAS обнаруживались в 10-26% случаев меланомы кожи, преимущественно облучаемой УФ. Ингибирование NRAS открыло новые горизонты в терапии меланом, показав на практике значение тесной взаимосвязи всех звеньев сигнального пути. Первым препаратом таргетной терапии меланомы с мутацией NRAS является ингибитор MEK162, благодаря приему которого практически у 70% больных данной категории удается получить реакцию на лечение и добиться стабилизации заболевания.

### ***PI3K – фосфоинозитол-3-киназный путь***

Следующим компонентом пролиферативных сигнальных путей, патологически активированных в клетках меланомы, является PI3K – фосфоинозитол-3-киназный путь, нередко обозначаемый в литературе как «сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR». Это каскад реакций, основные события которого разворачиваются вокруг следующих ферментов: фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), семейства протеинкиназ B, компонентами которого являются серин-треонин киназы AKT 1, 2, 3, и еще одной серин-треонинспецифичной киназы, получившей название «мишень рапамицина» и обозначаемой как mTOR.

Данный сигнальный путь является универсальным для большинства клеток человеческого организма и обеспечивает пролиферацию клеток, метаболизм и дифференцировку. В связи с канцерогенезом в клетках меланомы кожи наибольший интерес представляют компоненты AKT и PTEN (рисунок 29, приложение). PTEN представляет собой фермент фосфатазу, являющуюся негативным регулятором PI3K-пути и кодируемую одноименным геном-онкосупрессором. Путем отщепления фосфатной группы у фосфатидилинозитол-3-фосфатов данный фермент тормозит



(вплоть до полной блокады) проведение сигнала по фосфоинозитол-3-киназному пути. Инактивация PTEN обнаруживается во многих опухолях, поскольку приводит к неконтролируемому делению с утратой дифференцировки, сбоям в метаболизме клетки и извращенному синтезу. Инактивирующие PTEN мутации обнаруживаются в 10-30% меланом.

Другим компонентом PI3K-сигнального пути является семейство АКТ. Семейство АКТ представляет собой группу киназ, которые путем присоединения остатков фосфорной кислоты к различным белкам цитозоля контролируют их активность. Данное семейство выполняет как классические функции, например, регуляцию пролиферации, дифференцировку и изменение цитоскелета, так и важные для канцерогенеза функции ангиогенеза, ухода от апоптоза и приобретения резистентности к цитостатикам. В семейство АКТ входит 3 подвида протеинкиназ: АКТ-1, АКТ-2 и АКТ-3, являющихся продуктами соответствующих генов:

- Akt1 –  $\alpha$ -серин/треониновая протеинкиназа – ингибирование апоптоза, биосинтез белка (в сторону «плюс-ткани», гипертрофия миоцитов и т.п.).

- Akt2 –  $\beta$ -серин/треониновая протеинкиназа- участвует в метаболизме инсулина, индуцирует транспорт глюкозы, осуществляемый ГЛЮТ-4.

- Akt3 –  $\gamma$ -серин/треониновой-протеинкиназы – функция достоверно неизвестна. Известно, что различные виды АКТ гиперэкспрессированы в 45-70% меланом.

Протеинкиназа mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) также демонстрирует треонин-сериновую специфичность, существующую в виде двух внутриклеточных комплексов: TORC1 и TORC2. Мишенью рапамицина называется первый комплекс, являющийся терапевтической мишенью одноименного иммуносупрессора. Но интересует нас сейчас не как мишень рапамицина, а как компонент PI3K-сигнального пути, играющий ключевую роль в процессе клеточного роста. Несмотря на то, что молекула TOR является неделимым производным двух ее субъединиц, последние обладают совершенно разными функциями. Повреждение первого комплекса не несет каких-либо катастрофических последствий для клетки, а нарушение TOR2 приведет к так называемому «аресту» (прекращению) клеточного цикла на этапе фазы G2/M фазе через несколько поколений. Если пострададут обе субъединицы, то клетка «замрет» в фазе G0 в следующем поколении. Таким образом, становится понятно: самостоятельно ли, совместно ли с TOR1, но так или иначе TOR2 оказывает сильнейшее влияние на клеточный цикл.

## ОТВЕТЫ К ТЕСТАМ

### *Тема 1*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	5	1	2	5	1	2	3	4	5	3

### *Тема 2*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	2	3	4	5	4	3	1	4	1	3

### *Тема 3*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	5	2	3	5	1	2	3	4	1	2

### *Тема 4*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	3	3	1	4	5	4	1	2	3	5

### *Тема 5*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	3	2	4	1	2	5	4	1	2	4

### *Тема 6*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	4	2	1	1	4	2	3	1	2	3

### *Тема 7*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	5	3	4	4	2	3	5	2	5	3

### *Тема 8*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	4	3	5	1	3	1	2	5	3	1

### *Тема 9*

№ вопроса	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ответ	4	3	5	2	2	1	1	5	3	4

## ОТВЕТЫ К ЗАДАЧАМ

### Тема 2

№	Ответ
1	Медиатор ацетилхолин действует на два вида постсинаптических рецепторов: М- и Н-холинорецепторы. М-холинорецепторы находятся в нейроорганных синапсах парасимпатической нервной системы. Н-холинорецепторы находятся в нервно-мышечных синапсах и вегетативных ганглиях. Атропин блокирует только М-холинорецепторы. Поэтому блокируется действие парасимпатической нервной системы, а соматическая регуляция скелетной мускулатуры не нарушается.
2	При раздражении гипоталамуса наблюдается ограниченная реакция активации электроэнцефалограммы в передних отделах коры головного мозга. При раздражении таламуса – в первичных сенсорных проекционных зонах. При раздражении ретикулярной системы – генерализованная активация во всех отделах коры. В естественных условиях активация гипоталамуса отражает возникновение мотивационного возбуждения, таламуса – приход возбуждений от рецепторов органов чувств, ретикулярной формации – восходящие активизирующие влияния, имеющие мотивационную окраску.
3	В пре- и постганглионарных окончаниях парасимпатической нервной системы выделяется ацетилхолин. В преганглионарных окончаниях симпатической нервной системы выделяется ацетилхолин, а в постганглионарных окончаниях – норадреналин (исключение – потовые железы). После симпатической и парасимпатической денервации органов наблюдается их повышенная чувствительность к нейромедиаторам и олигопептидам.
4	Ганглии симпатического отдела вегетативной нервной системы расположены цепочками по обе стороны от позвоночника (паравертебральные) и на некотором удалении от него (превертебральные). Преганглионарные волокна короткие, типа В. Постганглионарные волокна короткие, типа С. Влияния парасимпатической нервной системы быстрее сказываются на функциях внутренних органов, так как симпатическая нервная система на периферии на значительном протяжении представлена постганглионарными волокнами типа С, по которым возбуждение распространяется медленнее.

## Тема 2

№	Ответ
1	Более мощным ядом будет антимицин, так как он блокирует поступление водорода на участке от убихинола, а значит водород не поступает не только от ФАД-зависимых дегидрогеназ, но и от НАДН-дегидрогеназы.
2	Гиалуроновая кислота является основным межклеточным веществом. Ее молекулы в виде геля являются своеобразным фильтром, задерживающим микробные и иные крупные частицы, попадающие в организм. Гиалуронидаза микроорганизмов разрушает гиалуроновую кислоту, что позволяет микроорганизмам проникать в кровеносное русло и межклеточное пространство.
3	Начальное уменьшение силы и частоты сердечных сокращений обусловлено влиянием волокон блуждающего нерва. Усиление сократительной функции сердца после прекращения раздражения вагосимпатического ствола обусловлено влиянием симпатической нервной системы. В составе вагосимпатического ствола у лягушки кроме преганглионарных волокон блуждающего нерва (типа В) есть постганглионарные волокна симпатических нервов (типа С). По миелинизированным волокнам типа В возбуждение распространяется быстрее, чем по волокнам типа С. После прекращения раздражения медиатор ацетилхолин быстро инактивируется ацетилхолинэстеразой, а норадреналин еще продолжает действовать. Атропин, являясь М-холиноблокатором, блокирует проведение возбуждения на уровне интрамуральных парасимпатических ганглиев, прекращая таким образом тормозящее действие блуждающих нервов на сердце.

## Тема 3

№	Ответ
1	Гастрин действует как гормон, он выделяется в кровь и с током крови приносится к секреторным железам желудка, вызывая выделение желудочного сока.
2	Норадреналин, являющийся медиатором в постганглионарных окончаниях симпатических нервов, взаимодействует с $\beta$ -адренорецепторами миокарда, приводя к увеличению частоты сердечных сокращений. Применение неселективного $\beta$ -адреноблокатора приводит к снижению частоты сердечных сокращений. Нет. В гладких мышцах бронхов локализованы $\beta_2$ -адренорецепторы, активация которых симпатическими нервами приводит к расслаблению мышц. Соответственно, применение $\beta$ -адреноблокатора приводит к повышению тонуса бронхов. Нет. Применение $\beta$ -адреноблокатора приводит к понижению артериального давления.

3	Активная моторная деятельность желчного пузыря и желчевыводящих путей связана с функцией блуждающих нервов. Блокада М-холинорецепторов гладких мышц вызывает временное выключение влияния вагуса и, следовательно, снижение тонуса и моторики желчевыводящих путей и самого желчного пузыря. Сопутствующими эффектами могут быть сухость во рту, уменьшение спазмов желудка, кишечника, непродолжительное расширение зрачков.
4	Зрачок суживается при сокращении кольцевой мышцы радужки, которая иннервируется парасимпатическими волокнами глазодвигательного нерва. Атропин, избирательно блокируя М-холинорецепторы мышцы, вызывает расширение зрачка. М-холиноблокатор атропин вызывает расширение зрачка, увеличение частоты и силы сердечных сокращений, уменьшение перистальтики желудочно-кишечного тракта (М-холинорецепторы). При этом не изменяется сократительная функция скелетной мускулатуры (Н-холинорецепторы).

#### Тема 4

№	Ответ
1	Различия в заряде, связанном со свободной ОН-группой в фосфате. Общий заряд АТФ = - 3, цАМФ – 0, важна и конфигурация молекул, поэтому не происходит конкуренции за центры связывания.
2	Глюкокиназа работает в печени, гексокиназа - в мышцах. Они являются изоферментами с разным сродством к глюкозе. У гексокиназы оно выше, и поэтому она работает при низких концентрациях глюкозы.
3	Образовавшийся в результате активации гликогенолиза в мышцах лактат поступает в печень и участвует в процессе глюконеогенеза. Активация глюконеогенеза в печени является дополнительным источником глюкозы в крови.
4	Каждый цикл возбуждения состоит из: деполяризации мембраны пресинаптических нервных окончаний, высвобождение ацетилхолина, взаимодействие его с рецептором, расщепление ацетилхолина. Поскольку перфузия ацетилхолина не дала эффекта, остается две возможности – блокада холинорецептора или угнетение холинэстеразы. Взаимодействие ацетилхолина с рецептором приводит к деполяризации, тогда как ацетилхолинэстераза, расщепляя ацетилхолин, устраняет его действие, после чего деполяризация проходит и возможно возникновение нового потенциала действия. Таким образом, если мы обнаружим, что потенциал концевой пластинки и потенциал действия не возникает, то препарат блокирует холинорецептор, если окажется что потенциал действия возникает, но затем отмечается стойкая деполяризация, то препарат угнетает ацетилхолинэстеразу. В обоих случаях мышца не будет возбуждаться.

## Тема 5

№	Ответ
1	<p>Цитокины начинают синтезироваться клетками только при наличии чужеродного агента в организме. Они являются антигеннеспецифическими факторами, поэтому специфическая диагностика инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний с помощью определения уровня цитокинов невозможна. Но определение их концентрации в крови дает информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток; о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень и о прогнозе заболевания.</p> <p>При аллергологическом обследовании больного обнаружено резкое увеличение иммуноглобулинов G и E. Провокационный тест с аллергеном из дафний резко положительный. Реакции дегрануляции базофилов и тучных клеток с аллергеном из дафний положительные.</p>
2	<p>В ходе иммунного ответа макрофаги могут менять свой фенотип – этот процесс смены фенотипа получил название «репрограммирование». Известно, что присутствие в опухоли большого количества M1-макрофагов тормозит ее рост, а в некоторых случаях может вызвать даже практически полную ремиссию. И наоборот, M2-макрофаги выделяют молекулы – факторы роста, которые дополнительно стимулируют деление опухолевых клеток, то есть благоприятствуют развитию злокачественного образования. Экспериментально было показано, что в опухолевом окружении обычно преобладают именно M2-клетки. Под действием веществ, выделяемых опухолевыми клетками, активные M1-макрофаги «перепрограммируются» в M2-тип. Перепрограммированные клетки перестают синтезировать противоопухолевые цитокины, такие как интерлейкин-12 или фактор некроза опухолей (TNF), и начинают выделять в окружающую среду молекулы, ускоряющие рост опухоли и прорастание кровеносных сосудов, которые будут обеспечивать ее питание, например фактор роста опухолей (TGFβ) и фактор роста сосудов (VGF). Они перестают привлекать и инициировать другие клетки иммунной системы и начинают блокировать местный (противоопухолевый) иммунный ответ.</p>
3	<p>Разобщители повышают потребление кислорода и скорость переноса электронов по дыхательной цепи, но разобщают окисление и фосфорилирование. В результате образование АТФ резко снижается, что может вызвать смерть.</p>

## Тема 6

№	Ответ
1	<p>Сигнальный пути–Hh, важен для поддержания тканевой полярности и популяции стволовых клеток. Инактивация этого пути вызывает пороки развития, такие как голопрозэнцефалия, тогда как гиперактивация этого пути найдена в большей части базально-клеточных карцином (БКК) и многих нежных раковых образованиях. Ключевая роль Hh сигналинга в человеческом раке подчеркивает целесообразность изучения этого пути для здоровья человека. Если Shh взаимодействует с <i>PTCH1</i>, то рецептор <i>PTCH1</i> теряет возможность ингибировать рецептор SMO, в результате чего SMO находится в активном состоянии. После этого SMO активирует факторы транскрипции GLI. Если SMO функционирует как онкоген, то в большинстве клеточных линий медуллобластомы и астроцитомы наблюдается высокая экспрессия мРНК SMO. Поэтому <i>PTCH1</i> является геном опухолевой супрессии в сигнальном пути Hh. Кроме того <i>PTCH1</i> является геном-мишенью для факторов транскрипции GLI, которые изменяют экспрессию мРНК <i>PTCH1</i>, что наблюдалось в 50% клеточных линий медуллобластомы и астроцитомы. <i>SUFU</i> – (Supressor of fused) – негативный регулятор пути Hh (ген локализован на 10q24.3). Он препятствует транспорту факторов транскрипции GLI через цитоплазму в ядро, в результате чего факторы GLI не взаимодействуют с генами-мишенями и не изменяют уровень их экспрессии. В клеточных линиях и первичных образцах астроцитомы, медуллобластомы уровень мРНК <i>SUFU</i>, ниже, чем в нормальных клетках.</p>
2	<p>Новокаин является производным парааминобензойной кислоты, поэтому для проведения инфильтрационной анестезии выбираем препарат из другой группы, например, производные ксилидина – лидокаин или тримекаин.</p>
3	<p>При отравлении солями тяжелых металлов необходимо использовать танин, который образует с солями тяжелых металлов нерастворимые соединения и препятствует их дальнейшему всасыванию.</p>

## Тема 7

№	Ответ
1	<p>Возбуждение произойдет, т.к. при одновременном подпороговом возбуждении нескольких синапсов на постсинаптической мембране произойдет суммация подпороговых квантов медиатора (данный вариант является пространственной суммацией).</p>
2	<p>Известно, что потенциал покоя создается преимущественно за счет выхода ионов калия по концентрированному градиенту из клетки. При этом натриевые каналы частично открыты, и некоторое количе-</p>

	<p>ство ионов натрия проходит в клетку, уменьшая потенциал покоя. Следовательно, блокада натриевых каналов тетродотоксином приведет к небольшому увеличению потенциала покоя.</p> <p>При блокаде натриевых каналов становится невозможным возникновение потенциала действия, так как деполяризация клеточной мембраны невозможна. Концентрация ионов натрия на внешней стороне клеточной мембраны незначительно увеличится, так как ионы натрия полностью перестают входить в клетку.</p>
3	<p>Потенциал покоя и потенциал действия возбудимых клеток обусловлены разной концентрацией ионов, в первую очередь, калия и натрия, снаружи и внутри клетки. Разность концентраций ионов поддерживается благодаря калиево-натриевому насосу, работа, которая является энергозависимой и требует АТФазной активности. Следовательно, ингибирование АТФазы приведет к выравниванию концентраций калия и натрия снаружи и внутри нервных волокон в ходе ритмического раздражения нерва. Отсутствие градиента концентрации ионов снаружи и внутри клетки приведет к исчезновению потенциала покоя и полной невозможности возникновения потенциала действия.</p>
4	<p>Возможными причинами прекращения перехода возбуждения с нерва на мышцу в синапсе могут быть: нарушение выделения медиатора ацетилхолина пресинаптической областью; инактивация или блокада холинэргических рецепторов постсинаптической мембраны; ингибирование фермента, разрушающего ацетилхолин. При добавлении ацетилхолина нервно-мышечная передача не восстановилась, следовательно, дело не в недостаточном выделении медиатора. Добавление фермента холинэстеразы, расщепляющего ацетилхолин и освобождающего рецепторы постсинаптической мембраны для взаимодействия со следующими квантами медиатора, восстановило синаптическую передачу. Следовательно, изучаемое вещество является ингибитором холинэстеразы.</p>
5	<p>При увеличении градиента концентрации <math>\text{Na}</math> величина потенциал покоя снизится, величина потенциала действия увеличится. При увеличении градиента концентрации <math>\text{K}</math> величина потенциал покоя возрастет, величина потенциала действия не изменится. При увеличении градиента концентрации <math>\text{Ca}</math> величина потенциал покоя возрастет, потенциала действия не изменится. При увеличении градиента концентрации <math>\text{Ca}</math> величина потенциал покоя снизится, величина потенциала действия не изменится.</p>



### Тема 8

№	Ответ
1	Энергомобилизирующее, адаптационно-трофическое. Стимулирует гликолиз, липолиз, вызывает перераспределение кровотока к скелетной мускулатуре, активизирует дыхание. Повышаются распад гликогена, высвобождение глюкозы из печени в кровь.
2	После введения атропина (М-холиноблокатор) будет наблюдаться расслабление стенок привратника в случае гипертонуса и отсутствие эффекта при рубцовых изменениях. Тонус привратника зависит, в первую очередь, от функций блуждающих нервов. При их выключении атропином посредством блокады М-холинорецепторов тонус снижается. Атропин в этом случае позволяет дифференцировать органические повреждения привратника от функциональных.

### Тема 9

№	Ответ
1	Раньше могли быть выявлено исчезновение ферментов, гликогена из некротизированной клетки, распад ультраструктур могут быть значительно раньше. При электронно-микроскопическом исследовании: в зоне ишемии миокарда обнаруживаются набухание и вакуолизация митохондрий, распад крист. При гистохимическом исследовании (ШИК-реакция): выявляется исчезновение гликогена из зоны ишемии, в то время как в сохранившихся участках он окрашивается в малиновый цвет.
2	При постановке TUNEL-теста ядерный хроматин клеток, вступивших в апоптоз, имеет флюоресценцию при использовании метки или приобретает коричневое окрашивание в случае пероксидазной метки. TUNEL-тест выявляет клетки со сморщенными ядрами с конденсированным хроматином, клетки окрашенными пикнотическими ядрами, апоптозные тельца.
3	Апоптоз захватывает всегда только отдельные клетки или их группы, в то время как некроз может захватывать от части клетки до целого органа. В отличие от некроза, разрушение клетки происходит не активированными гидролитическими ферментами, а с участием специальных $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз, которые разрезают ядро на множество фрагментов. Апоптоз является энергозависимым процессом. Образующиеся фрагменты клеток, апоптозные тельца, фагоцитируются любыми близлежащими клетками (паренхиматозными и стромальными) в течение нескольких минут. Апоптоз не сопровождается развитием воспаления.

# ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

## НАИМЕНОВАНИЕ ТЕМ ДИСЦИПЛИНЫ И ИХ СОДЕРЖАНИЕ

№ п/п	Наименование тем	Содержание
<b>Модуль 1. Общие механизмы молекулярного биосигналинга</b>		
1	Общие принципы функционирования системы межклеточной коммуникации	Способы межклеточной коммуникации в многоклеточных организмах. Виды воспринимаемых клеткой сигналов. Виды ответа на сигнал на молекулярном и клеточном уровне. Принципиальная структура путей внутриклеточной передачи сигнала. Модульная организация сигнальных путей. Понятие амплификации сигнала. Виды вторичных посредников (мессенджеров). Понятие о каркасных и адапторных белках и их роли в передаче сигнала. Экспериментальные подходы к регистрации белок-белковых взаимодействий. Субклеточная локализация компонентов сигнальных путей; значение мембранных доменов в передаче сигналов. Механизмы передачи информации на молекулярном уровне. Механизмы положительной и отрицательной обратной связи и их роль в модуляции сигнала.
2	Сигнальные молекулы. Рецепция биосигналов	Разнообразие химической структуры, биологического значения и способов рецепции эндокринных и паракринных факторов. Эндокринные факторы (гормоны). Локальные гормоны (тканевые медиаторы). Биосинтез и механизмы действия эйкозаноидов и оксида азота. Структура и рецепция ростовых факторов и цитокинов. Понятие о нейромедиаторах и нейромодуляторах. Особенности синтеза, процессинга и секреции пептидных сигнальных молекул. Явление сбрасывания эктодомена. Особенности рецепции гидрофильных и гидрофобных сигнальных молекул. Характеристика рецепторных молекул. Понятие агониста и антагониста. Кинетика связывания рецепторных молекул с агонистами. Методы изучения рецепторных молекул. Типы рецепторных молекул в клетках многоклеточных организмов. Понятие о транскрипционных факторах и ДНК-связывающих доменах. Белки суперсемейства ядерных рецепторов, связываемые ими лиганды. Структурная организация ядерных рецепторов. Механизмы активации и действия ядерных рецепторов; регулируемые ими гены.
3	Передача сигнала посредством активации рецепторов, ассоциированных с G-белками	Общее строение рецепторов, сопряженных с G-белками; связываемые лиганды и механизм активации. Принципы функционирования и разнообразие G-белков. Структура и функциональные группы мономерных и тримерных G-белков. Передача сигнала к эффекторным системам через активацию рецептором тримерных G-белков. Участие аденилатциклазы, цАМФ и протеинкиназы А в процессах внутриклеточной сигнализации. Регуляция метаболизма глюкозы с участием $\beta$ -адренорецепторов. Передача сигнала через активацию

		<p>фосфолипазы C и повышение концентрации ионов <math>Ca^{2+}</math> в цитоплазме. Клеточные процессы и белки-мишени, регулируемые ионами <math>Ca^{2+}</math>. Межклеточные взаимодействия при рецепции ацетилхолина клетками эндотелия кровеносных сосудов. Механизмы регуляции и локализации путей передачи сигнала, запускаемых рецепторами, ассоциированными с G-белками; десенситизация рецептора. Молекулярный механизм передачи сигнала в светочувствительных клетках. Передача сигнала в обонятельных и вкусовых сенсорных клетках.</p>
4	<p>Передача сигнала посредством активации рецепторов с протеин-киназным доменом</p>	<p>Структура тирозинкиназных рецепторов, связывающих факторы роста. Активация тирозинкиназных рецепторов при связывании лигандов. Участие модульных белковых доменов в передаче сигнала и активации белков. Механизм активации белка Ras. Каскад активации MAP-киназ. Структура и участники MAP-киназных каскадов в клетках эукариот. Цитоплазматические и ядерные мишени, регулируемые MAP-киназами. Путь активации фосфатидилинозитол-3-киназы (PI-3-киназы) и его эффекторные мишени. Регуляция передачи сигнала от рецепторов ростовых факторов. Десенситизация рецепторов с тирозинкиназной активностью. Активация рецепторов с серин/треонинкиназным доменом. Сигнальные белки суперсемейства TGF<math>\beta</math> и их функции. Структура и функции Smad-белков, механизм их активации. Гены-мишени, регулируемые с участием белков Smad. Регуляция функционирования белков Smad.</p>
<p><b>Модуль 2. Специальные аспекты молекулярного биосигналинга</b></p>		
5	<p>Пути биосигнализации, запускаемые цитокинами различных групп. Передача сигнала в клетках системы иммунитета</p>	<p>Рецепторы цитокинов, ассоциированные с протеинкиназами семейства JAK: лиганды, структура, механизм активации рецепторов и JAK-киназ. Структура и функции белков STAT. Регуляция транскрипции генов с участием белков STAT. Рецепторы, содержащие цитоплазматический “домен смерти”. Варианты клеточного ответа на активацию рецепторов с “доменом смерти”. Транскрипционный фактор NF-<math>\kappa</math>B, активируемые гены-мишени. Роль белка I-<math>\kappa</math>B в активации NF-<math>\kappa</math>B. Путь передачи сигнала от рецепторов фактора некроза опухолей типа I (TNFRI) к комплексу NF-<math>\kappa</math>B, роль убиквитинлигаз и протеинкиназ. Условия запуска каспазного каскада при активации TNFRI.</p> <p>Организация и функции рецепторов, содержащие цитоплазматический домен TIR. Клеточный ответ на активацию рецепторов с доменом TIR. Особенности организации T-клеточного рецептора, B-клеточного рецептора, рецептора тучных клеток и базофилов Fc<math>\epsilon</math>R I; общая схема внутриклеточной передачи сигнала и ответ клеток иммунной системы на активацию соответствующих рецепторов. Сигнальные вещества и клеточные участники процесса воспаления.</p>
6	<p>Межклеточная коммуникация в регуляции индивидуального развития</p>	<p>Лиганды семейства DSL и рецепторы Notch. Молекулярный механизм передачи сигнала при активации рецептора Notch, влияние этого сигнала на дифференцировку клеток. Белки семейства Wnt и их биологическое значение. Рецепторы белков Wnt. Молекулярный комплекс деградации <math>\beta</math>-катенина</p>

		<p>и регуляция его функционирования. Зависимость пролиферации клеток от межклеточных контактов.</p> <p>Передача сигналов с помощью белков Hedgehog. Особенности внутриклеточного пути передачи сигнала при рецепции сигнала Hedgehog в клетках <i>Drosophila melanogaster</i> и человека.</p>
7	Молекулярные аспекты передачи информации в нейронах	<p>Структура и молекулярные принципы функционирования ионных каналов. Селективный фильтр ионных каналов и его значение в транспорте ионов. Ионные каналы как рецепторы внеклеточных сигналов. Классификация лиганд-управляемых ионных каналов. Молекулярная организация и механизм открытия ацетилхолиновых никотиновых рецепторов. Сигнальная роль лиганд-управляемых <math>Ca^{2+}</math>-каналов. Ионные каналы, управляемые напряжением, молекулярные принципы их открытия и инактивации. Значение ионных каналов, управляемых напряжением, в проведении потенциала действия по аксону нервной клетки.</p> <p>Синаптическая передача сигнала. Цикл использования секреторных везикул в пресинаптическом нервном окончании. SNARE-гипотеза. Роль ионов кальция, белков Rab и SNARE в транспорте и слиянии везикул. Комплекс подготовки секреторной везикулы к слиянию с пресинаптической мембраной и механизм активации слияния мембран. Ионные каналы, активируемые натяжением. Активация волосковых клеток кортиева органа внутреннего уха и молекулярные механизмы формирования потенциала действия и передачи сигнала. Ионные каналы, задействованные в рецепции температуры и болевых ощущений.</p>
8	Рецепторы молекул внеклеточного матрикса. Биосигнализация в регуляции перемещения клетки	<p>Значение молекул внеклеточного матрикса в межклеточной коммуникации. Структура и разнообразие интегриновых рецепторов. Контакты интегринов с внутриклеточными молекулами и механизм активации интегринов. Молекулярная организация комплексов фокальной адгезии. Пути передачи сигнала, запускаемые интегриновыми рецепторами. Клеточный ответ на связывание молекул внеклеточного матрикса. Молекулярные принципы направленного перемещения клетки. Роль мономерных G-белков в регуляции динамики актинового цитоскелета. Структура эфринов и эфриновых рецепторов, внутриклеточная передача сигнала при активации эфриновых рецепторов. Регуляция направления роста аксона с помощью эфринового сигнала.</p>
9	Биосигнализация при апоптозе и некрозе	<p>Цитологические особенности протекания апоптоза и некроза, их биологическое значение. Передача сигнала при запуске апоптоза внешними сигнальными молекулами. Сигнальный каскад при внутриклеточной активации апоптоза, роль митохондрий и нарушений в структуре хромосом. Семейство белков Bcl-2. Каспазы, участвующие в реализации апоптоза (инициаторные и эффекторные каспазы). Активация каспазного каскада при рецепции клетками сигнала FasL. Регуляция запуска апоптоза и антиапоптотические молекулы клетки.</p>
<p><b>Модуль 3. Итоговый контроль – экзамен. Оценка практических навыков обучающегося по молекулярным механизмам биосигналинга</b></p>		

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

№ п/п	Наименование	Обсуждаемые вопросы	Требуемое время
1	2	3	4
<b>Модуль 1. Биохимические аспекты клеточной биологии</b>			
1	Введение в дисциплину		10 мин
2	Общие принципы функционирования системы межклеточной коммуникации	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Методы изучения рецепторных молекул.</li> <li>2. Типы рецепторных молекул в клетках многоклеточных организмов.</li> <li>3. Понятие о транскрипционных факторах и ДНК-связывающих доменах.</li> <li>4. Белки суперсемейства ядерных рецепторов, связываемые ими лиганды.</li> </ol>	50 мин
3	Передача сигнала посредством активации рецепторов, ассоциированных с G-белками	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Механизмы регуляции и локализации путей передачи сигнала, запускаемых рецепторами, ассоциированными с G-белками.</li> <li>2. Десенситизация рецептора.</li> <li>3. Молекулярный механизм передачи сигнала в светочувствительных клетках.</li> <li>4. Передача сигнала в обонятельных и вкусовых сенсорных клетках.</li> </ol>	1 час
4	Передача сигнала посредством активации рецепторов с протеинкиназным доменом	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Активация тирозинкиназных рецепторов при связывании лигандов.</li> <li>2. Участие модульных белковых доменов в передаче сигнала и активации белков.</li> <li>3. Механизм активации белка Ras.</li> <li>4. Каскад активации MAP-киназ.</li> </ol>	1 час
<b>Модуль 2. Организация генома и передача генетической информации</b>			
5	Пути биосигнализации, запускаемые цитокинами различных групп. Передача сигнала в клетках иммунной системы	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Общая схема внутриклеточной передачи сигнала и ответ клеток иммунной системы на активацию соответствующих рецепторов.</li> <li>2. Запуск воспалительного процесса как пример комплексных межклеточных сигнальных взаимодействий.</li> </ol>	1 час
6	Межклеточная коммуникация в регуляции индивидуального развития	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Молекулярный механизм передачи сигнала при активации рецептора Notch, влияние этого сигнала на дифференцировку клеток.</li> <li>2. Белки семейства Wnt и их биологическое значение.</li> <li>3. Рецепторы белков Wnt.</li> </ol>	1 час

7	Молекулярные аспекты передачи информации в нейронах	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Синаптическая передача сигнала. Цикл использования секреторных везикул в пресинаптическом нервном окончании.</li> <li>2. SNARE-гипотеза.</li> <li>3. Роль ионов кальция, белков Rab и SNARE в транспорте и слиянии везикул.</li> </ol>	1 час
8	Рецепторы молекул внеклеточного матрикса. биосигнализация в регуляции перемещения клетки	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Структура и разнообразие интегриновых рецепторов.</li> <li>2. Контакты интегринов с внутриклеточными молекулами и механизм активации интегринов.</li> <li>3. Молекулярная организация комплексов фокальной адгезии.</li> <li>4. Пути передачи сигнала, запускаемые интегриновыми рецепторами.</li> </ol>	1 час
9	Биосигнализация при апоптозе и некрозе	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Передача сигнала при запуске апоптоза внешними сигнальными молекулами.</li> <li>2. Сигнальный каскад при внутриклеточной активации апоптоза.</li> <li>3. Роль митохондрий и нарушений в структуре хромосом.</li> </ol>	1 час
<b>Итого:</b>			8 часов

*Заочная форма обучения:* выполняется практическая работа №5 «Передача сигнала в клетках системы иммунитета»

## УПРАВЛЯЕМАЯ САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА И ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

№	Наименование тем	Содержание	К-во сов	Примечание
1	Общие принципы функционирования системы межклеточной коммуникации	Виды ответа на сигнал на молекулярном и клеточном уровне. Принципиальная структура путей внутриклеточной передачи сигнала. Модульная организация сигнальных путей. Понятие амплификации сигнала.	4	Собеседование
2	Сигнальные молекулы. Рецепция биосигналов	Сигнальные молекулы эндокринной, паракринной и аутокринной систем регуляции.	7	Устный опрос
3	Передача сигнала посредством активации рецепторов, ассоциированных с G-белками	Циклические нуклеотиды, продукты распада фосфатидилинозитола и ионы кальция как внутриклеточные посредники передачи сигнала в клетке.	7	Собеседование
4	Передача сигнала посредством активации рецепторов с протеинкиназным доменом	Структура и функции Smad-белков, механизм их активации. Гены-мишени, регулируемые с участием белков Smad. Регуляция функционирования белков Smad.	7	Собеседование Тесты

5	Пути биосигнализации, запускаемые цитокинами различных групп. передача сигнала в клетках иммунной системы	Особенности организации Т-клеточного рецептора, В-клеточного рецептора, рецептора тучных клеток и базофилов FcεR I.	7	Устный опрос
6	Межклеточная коммуникация в регуляции индивидуального развития	Лиганды семейства DSL и рецепторы Notch. Молекулярный механизм передачи сигнала при активации рецептора Notch, влияние этого сигнала на дифференцировку клеток.	7	Собеседование Тесты
7	Молекулярные аспекты передачи информации в нейронах	Типы передачи информации в аксонах нейронов.	7	Устный опрос
8	Рецепторы молекул внеклеточного матрикса. биосигнализация в регуляции перемещения клетки	Структура эфринов и эфриновых рецепторов, внутриклеточная передача сигнала при активации эфриновых рецепторов.	7	Собеседование
9	Биосигнализация при апоптозе и некрозе	Каспазы, участвующие в реализации апоптоза (инициаторные и эффекторные каспазы). Активация каспазного каскада при рецепции клетками сигнала FasL.	7	Собеседование Контр. работа

1-й уровень заданий для УСП – темы 1, 3, 8

2-й уровень заданий для УСП – темы 2, 5, 7

3-й уровень заданий для УСП – темы 4, 6, 9

Каждый магистрант методом случайного выбора получает тему реферата из 17 тем лекций дисциплины «Молекулярные механизмы биосигнализации».

**Требования к реферату:**

1. Формат Ф4, объем до 10 с.
2. Состав: титульный лист с указанием темы, исполнителя и руководителя.
3. Реферат (до 200 слов)
4. Введение (цель и актуальность); Основная часть; Заключение; Список литературы.
5. Пройти проверку по программе «Антиплагиат».

## ПРОГРАММНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ

### **1. Общие принципы функционирования системы межклеточной коммуникации.**

1.1 Способы межклеточной коммуникации в многоклеточных организмах. Виды воспринимаемых клеткой сигналов. Виды ответа на сигнал на молекулярном и клеточном уровне.

1.2 Модульная организация сигнальных путей. Амплификация внутриклеточного сигнала.

1.3 Каркасные и адапторные белки в передаче сигнала в клетке.

1.4 Субклеточная локализация компонентов сигнальных путей; значение мембранных доменов.

1.5 Механизмы передачи информации на молекулярном уровне; положительная и отрицательная обратная связь в модуляции сигнала.

### **2. Сигнальные молекулы. Рецепция сигналов.**

2.1. Эндокринная, паракринная и аутокринная регуляция сигнальными молекулами.

2.2. Биосинтез и механизмы действия эйкозаноидов, оксида азота и сероводорода.

2.3. Структура и рецепция ростовых факторов и цитокинов.

2.4. Понятие агонистов и антагонистов и механизмы их действия.

2.5. Типы рецепторных молекул в клетках многоклеточных организмов.

### **3. Передача сигнала посредством активации рецепторов, ассоциированных с G-белками.**

3.1. Строение рецепторов, сопряженных с G-белками.

3.2. Тримерные G-белки и функционирование аденилатциклазы и фосфолипазы С образованием цАМФ, инозитол-3-фосфата и диацилглицерола.

3.3. Молекулярные механизмы передачи сигнала в светочувствительные, обонятельные и вкусовые клетки.

### **4. Передача сигнала посредством активации рецепторов с протеинкиназным доменом.**

4.1. Активация тирозинкиназных рецепторов при связывании лигандов.

4.2. Механизм активации белка Ras и каскад MAP-киназ.

4.3. Сигнальные белки суперсемейства TGF $\beta$  и их функции.

4.4. Структура и функции Smad-белков, механизм их активации. Гены-мишени, регулируемые с участием белков Smad. Регуляция функционирования белков Smad.

### **5. Пути биосигнализации, запускаемые цитокинами и передача сигнала в клетках системы иммунитета.**

5.1. Рецепторы цитокинов, ассоциированные с протеинкиназами семейства JAK.

5.2. Регуляция транскрипции генов с участием белков STAT.

5.3. Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B и активируемые гены-мишени.



5.4. Организация и функции рецепторов, содержащих цитоплазматический домен TIR.

5.5. Особенности организации T- и B-клеточного рецепторов.

5.6. Сигнальные вещества и клеточные участники процесса воспаления.

## **6. Межклеточная коммуникация в регуляции индивидуального развития.**

6.1. Молекулярный механизм передачи сигнала при активации рецептора Notch.

6.2. Белки семейства Wnt и их биологическое значение.

6.3. Зависимость пролиферации клеток от межклеточных контактов.

## **7. Молекулярные аспекты передачи информации в нейронах.**

7.1. Ионные каналы как рецепторы внеклеточных сигналов.

7.2. Синаптическая передача сигнала и цикл использования секреторных везикул в пресинаптическом нервном окончании.

7.3. Активация волосковых клеток кортиевого органа внутреннего уха и механизмы передачи сигнала.

## **8. Рецепторы молекул внеклеточного матрикса. Биосигнализация в регуляции перемещения клетки.**

8.1. Структура и разнообразие интегриновых рецепторов, их активация и пути передачи сигнала.

8.2. Клеточный ответ на связывание молекул внеклеточного матрикса и молекулярные принципы направленного перемещения клетки.

## **9. Биосигнализация при апоптозе и некрозе.**

9.1. Внешний путь запуска апоптоза.

9.2. Сигнальный каскад при внутриклеточной активации апоптоза.

9.3. Регуляция запуска апоптоза и антиапоптотические молекулы клетки

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная*

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации: учеб. пособие / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 463 с.
2. Коничев, А.С. Молекулярная биология: Учебник для студентов вузов, обуч. по спец. 032400 «Биология» / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2003. – 398 с.
3. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. Учебник для биологич. специальн. вузов / В.М. Степанов; ред. А.С. Спирин. – М.: Высшая школа, 1996. – 335 с.
4. Чиркин, А.А. Биохимия. Учебное руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
5. Чиркин, А.А. Биологическая химия. Учебник. / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – Минск.: Вышэйшая школа, 2017. – 431 с.
6. Чиркин, А.А. Биохимия филогенеза и онтогенеза: учеб. пособие / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, С.Б. Бокуть. – Минск: Новое знание; М.: ИНФРА-М., 2012. – 288 с.
7. Чиркин, А.А. (ред.) Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: «Вышэйшая школа», 2013. – 491 с.
8. Чиркин, А.А. Перепрограммирование и редактирование генома клетки / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко // Веснік ВДУ. – 2020, № 4 (109). – С. 28–33.

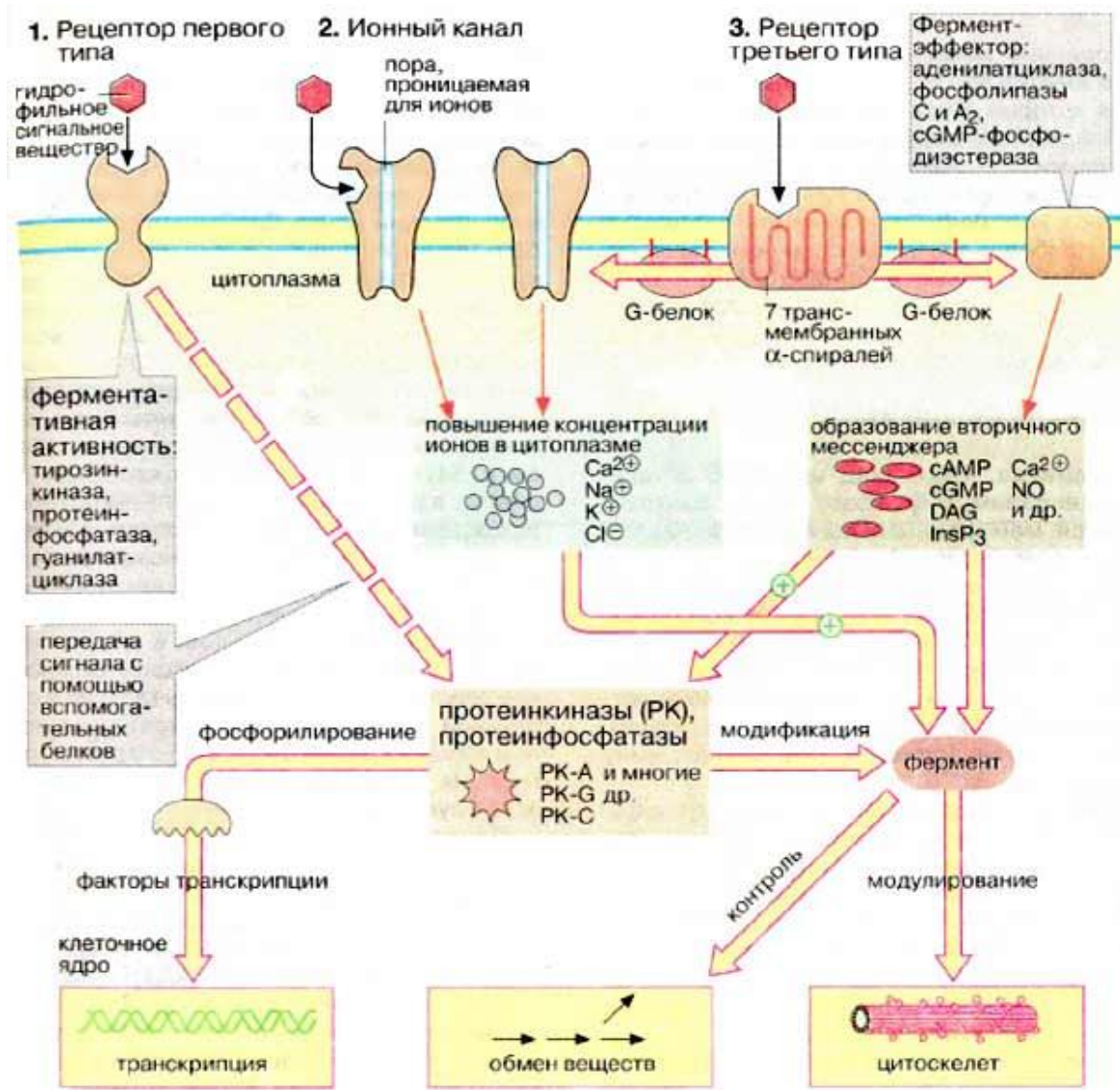
### *Дополнительная*

9. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. – Мн.: Тэхналогія, 2011. – 488 с.
10. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб: Издательство СПбГТУ, 2002. – 522 с.
11. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия с основами молекулярной биологии. УМК. Витебск: ВГУ им. П.М. Машерова, 2006. – 295 с.
12. Чиркин, А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2005. – 134 с.
13. Чиркин, А.А. Биохимия с основами генной инженерии / А.А. Чиркин – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова, 2010. – 181 с.
14. Ярилин А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
15. Murphy K., Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th Ed.– Garland Science, 2016. – 924 p.
16. Berridge M.J. Cell Signalling Biology. – Portland Press Ltd., 2014. (Open online access at <http://www.cellsignallingbiology.org/csb/>)
17. Gomperts B., Kramer I., Tatham P. Signal transduction. 2nd Ed. – Elsevier, 2009. – 576 p.
18. Hancock J. Cell signalling. 3rd Ed.– Oxford University Press, 2010. – 368 p.
19. Сидоров А. В. Физиология межклеточной коммуникации / А.В. Сидоров. Минск: БГУ, 2008.– 215 с.
20. Davies R.W., Morris B.J. Molecular biology of the neuron. 2nd Ed. – Oxford University Press, 2006. – 498 p.

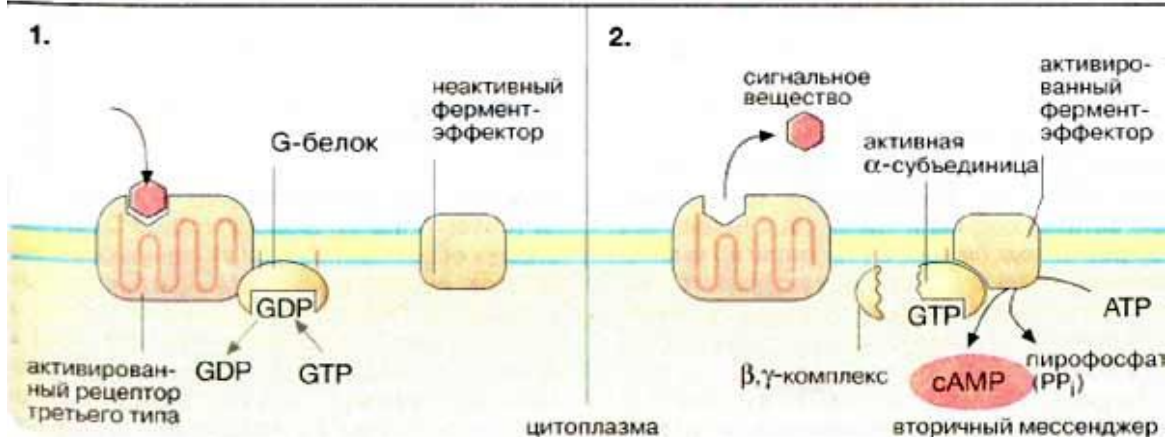
### *Интернет-ресурсы*

21. Энциклопедия генов и геномов университета Киото (Япония). База данных по биохимическим и сигнальным путям живых клеток –<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
22. Курируемая база данных биохимических путей открытого доступа REACTOME – <https://reactome.org/>
23. Виртуальная библиотека ресурсов по биосигнализации – <http://biochemweb.net/signaling.shtml>
24. Лекции известных исследователей по клеточной сигнализации и другим вопросам биологии – <https://www.ibiology.org/playlists/signaling/>.
25. Прохоров М.Ф. Сигнальные пути <https://medach.pro/post/2472>.





#### А. Механизм действия гидрофильных гормонов



#### Б. Преобразование сигнала G-белками

Рисунок 3 – Три типа рецепторов

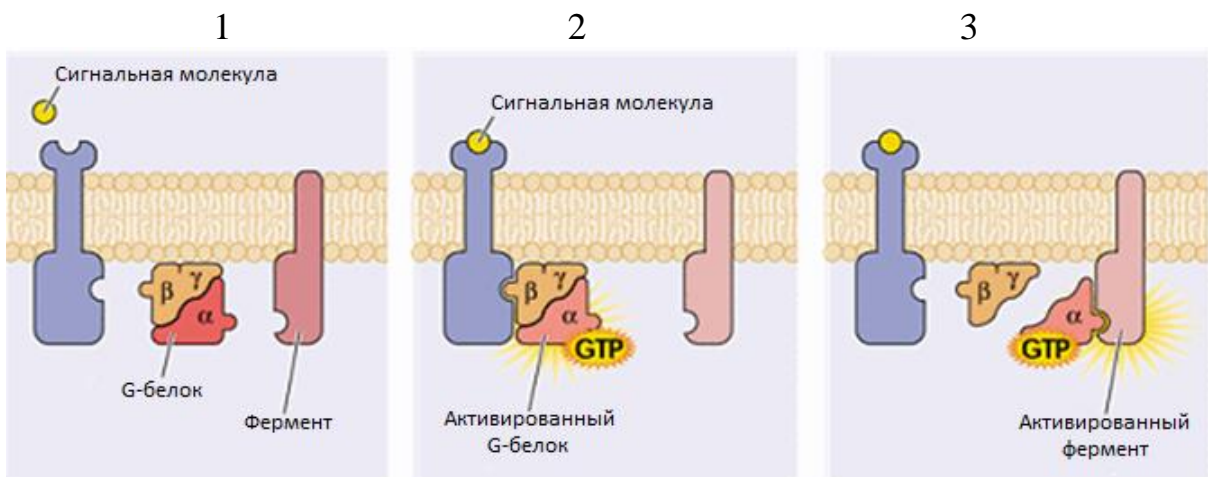


Рисунок 4 – Активация гетеротримерного G-белка

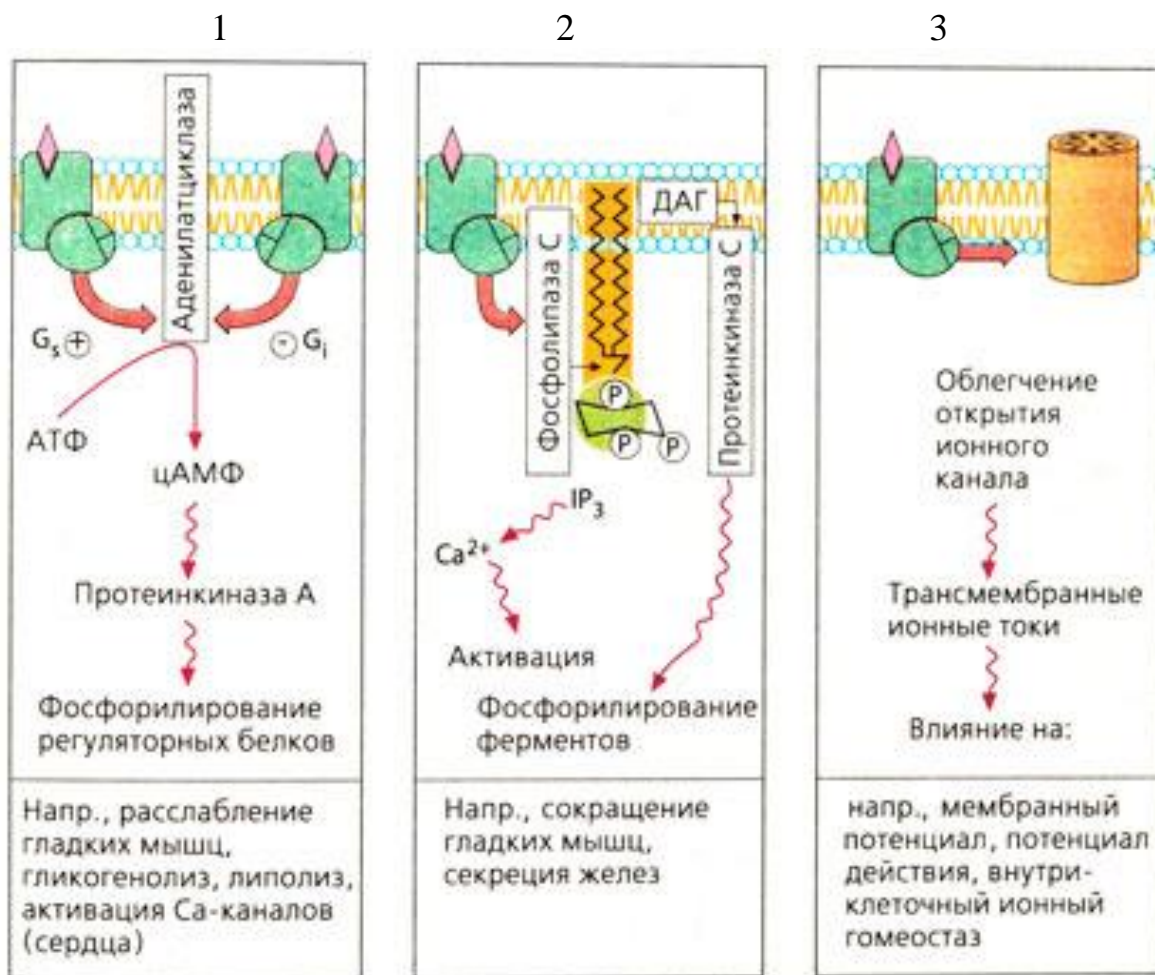


Рисунок 5 – Три типа эффекторов

## Активация фосфолипазы С

Норадреналин (NE) активирует цепи внутриклеточной сигнализации с участием внутриклеточных липидов в роли вторичных посредников. Норадреналин, связываясь с рецептором, через G-белок активирует **фосфолипазу С**, которая гидролизует фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат (ФИФ<sub>2</sub>) с образованием двух вторичных посредников - **ИФ<sub>3</sub>** и **ДАГ**. ИФ<sub>3</sub>, связываясь со своими рецепторами на мембранах эндоплазматического ретикулума, вызывает высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в цитоплазму. Увеличение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  активирует **протеинкиназу С**. ДАГ также активирует **протеинкиназу С**.

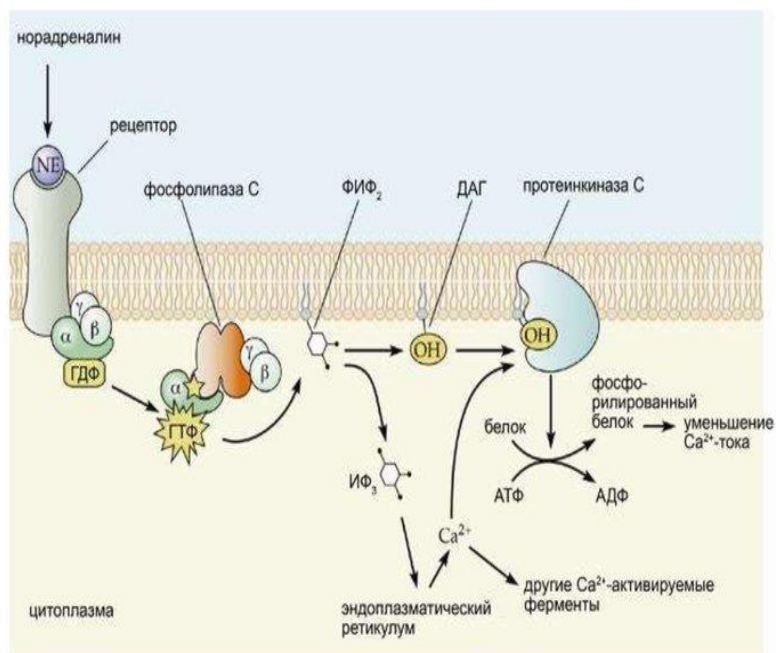


Рисунок 6 – Активация и функционирование фосфолипазы С

## Рецепторы с тирозинкиназной активностью

### Структура:

- ▶ трансмембранные белки с одним мембранным доменом. Как правило, гомодимеры, альфа- и бета-субъединицы которых связаны дисульфидными мостиками. Лиганды: инсулин, факторы роста.

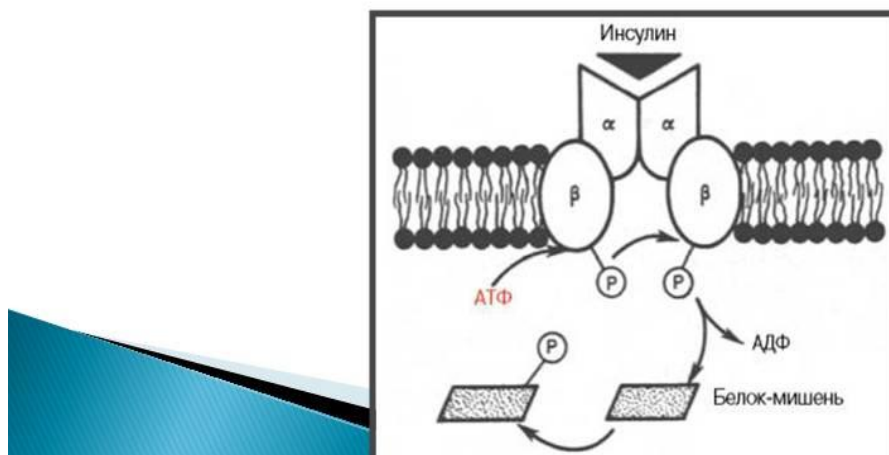


Рисунок 7 – Схема инсулинового рецептора

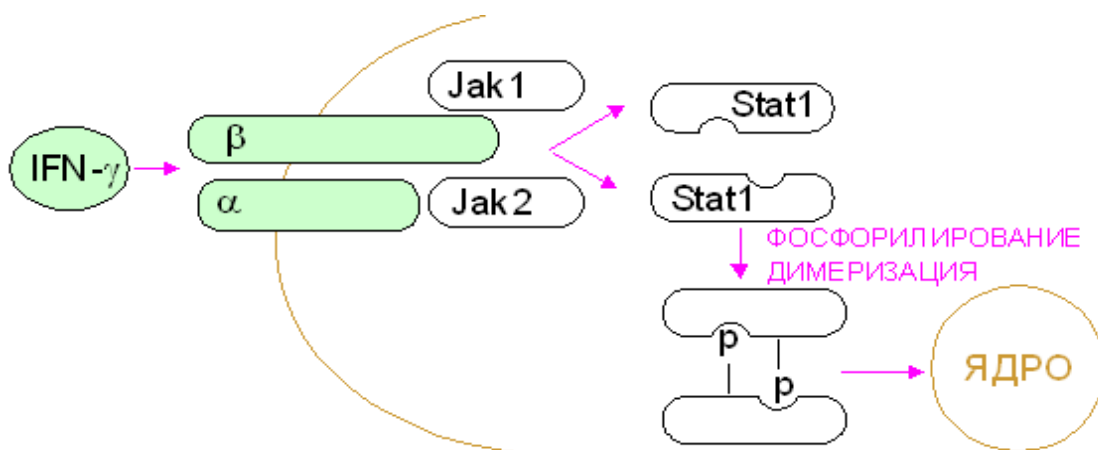


Рисунок 8 – Схема действия Jak-киназ  
(для усвоения этих путей обратитесь к рисунку 1)

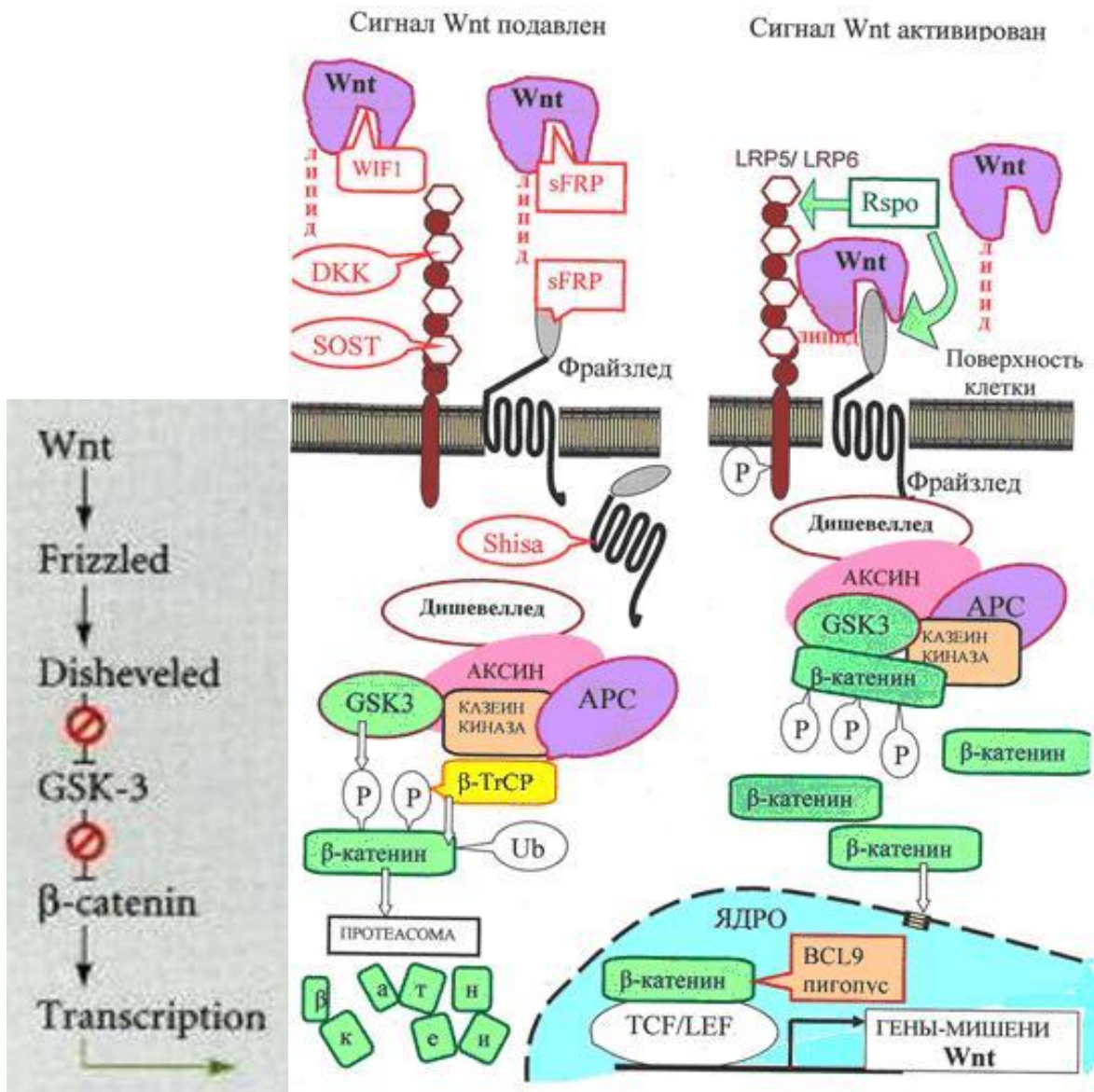


Рисунок 9 – Wnt-сигнальный путь: слева краткая схема; справа путь подавлен и путь активирован



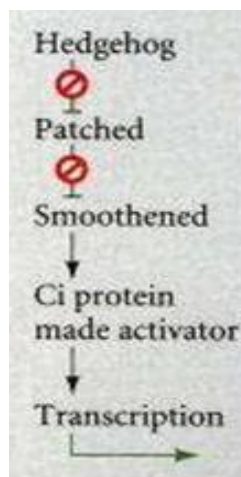
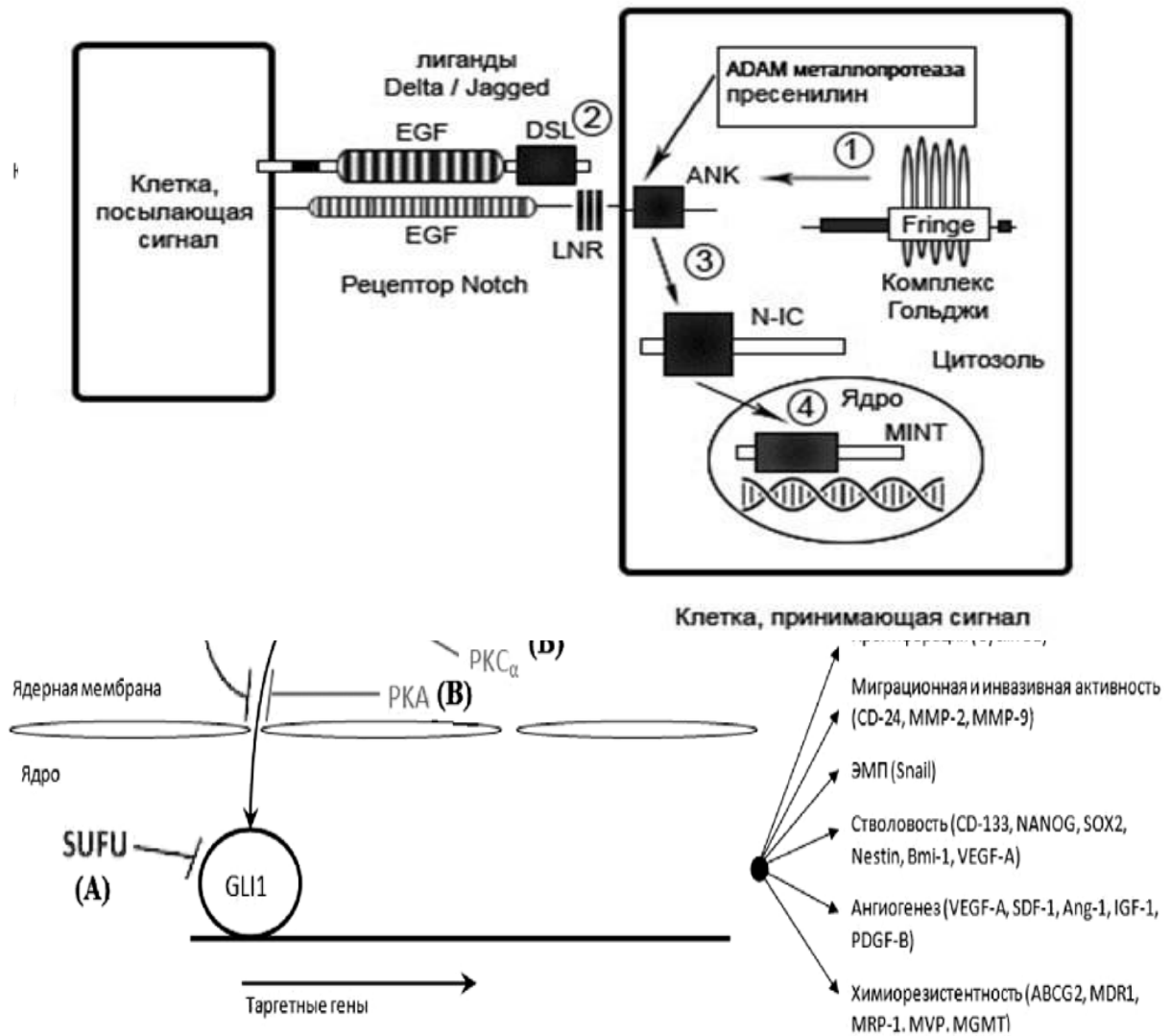


Рисунок 10 – Hedgehog сигнальный путь

Вверху схема функционирования основных компонентов сигнального пути. (А) факторы, препятствующие эффекту сигнального пути, (Б) – активаторы сигнального пути; (В) соединения других сигнальных путей, принимающих участие в регуляции пути Hedgehog. ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход. Внизу краткая схема пути

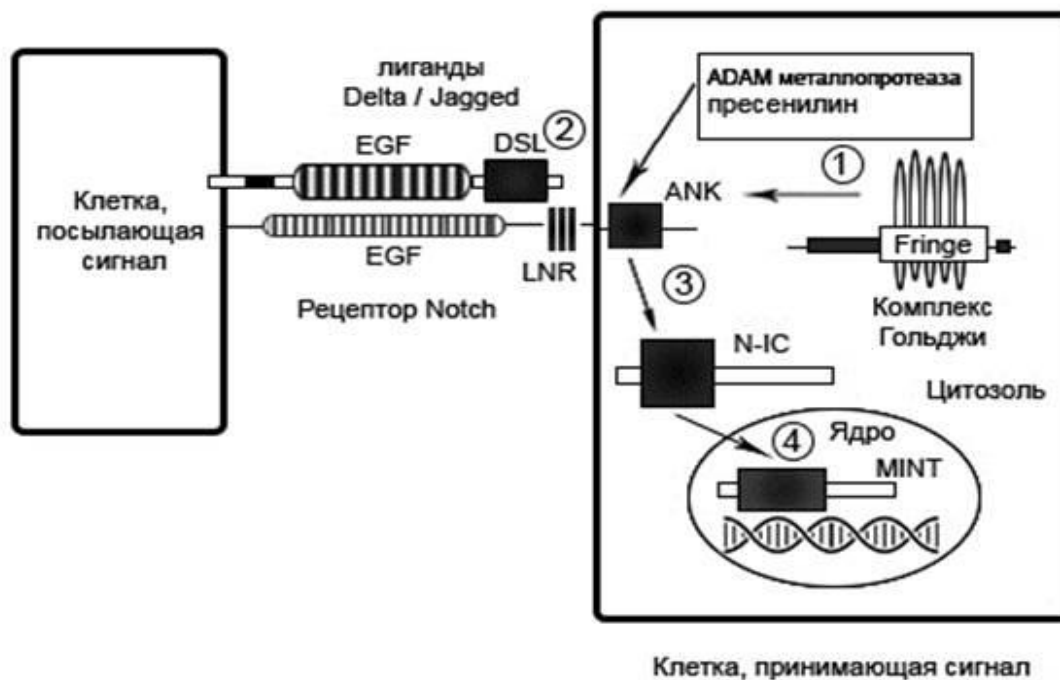


Рисунок 11 – Каноническая активация сигнального пути Notch

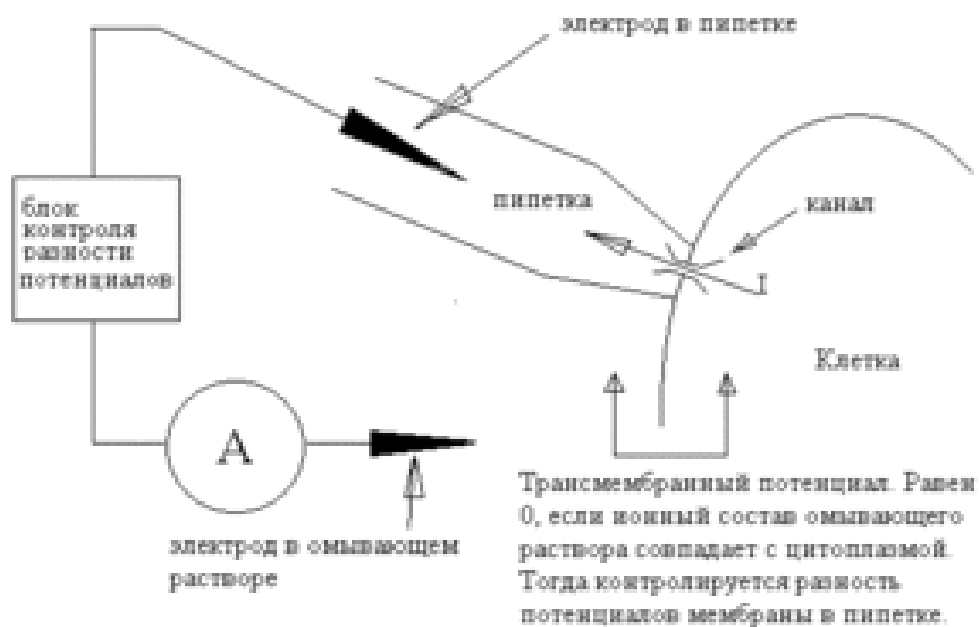


Рисунок 12 –Техника определения трансмембранного потенциала

## Передача сигнала между нейронами

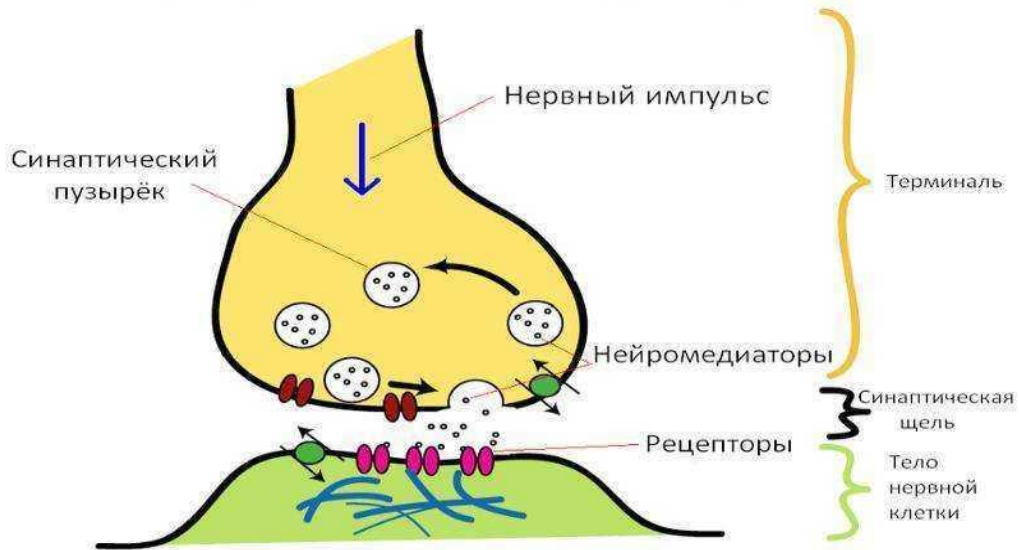


Рисунок 13 – Синапс

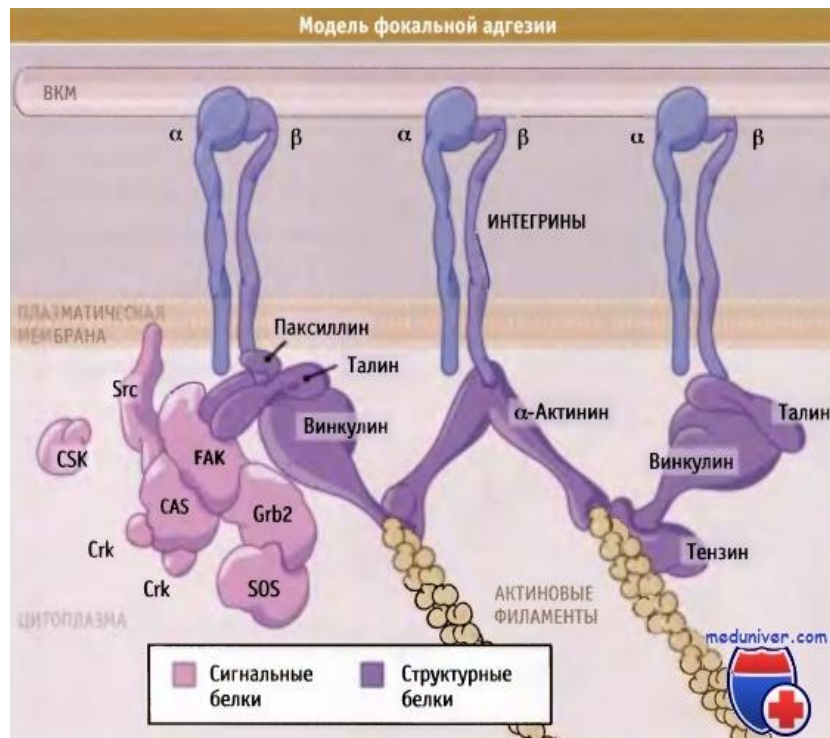


Рисунок 14 – Фокальные адгезии

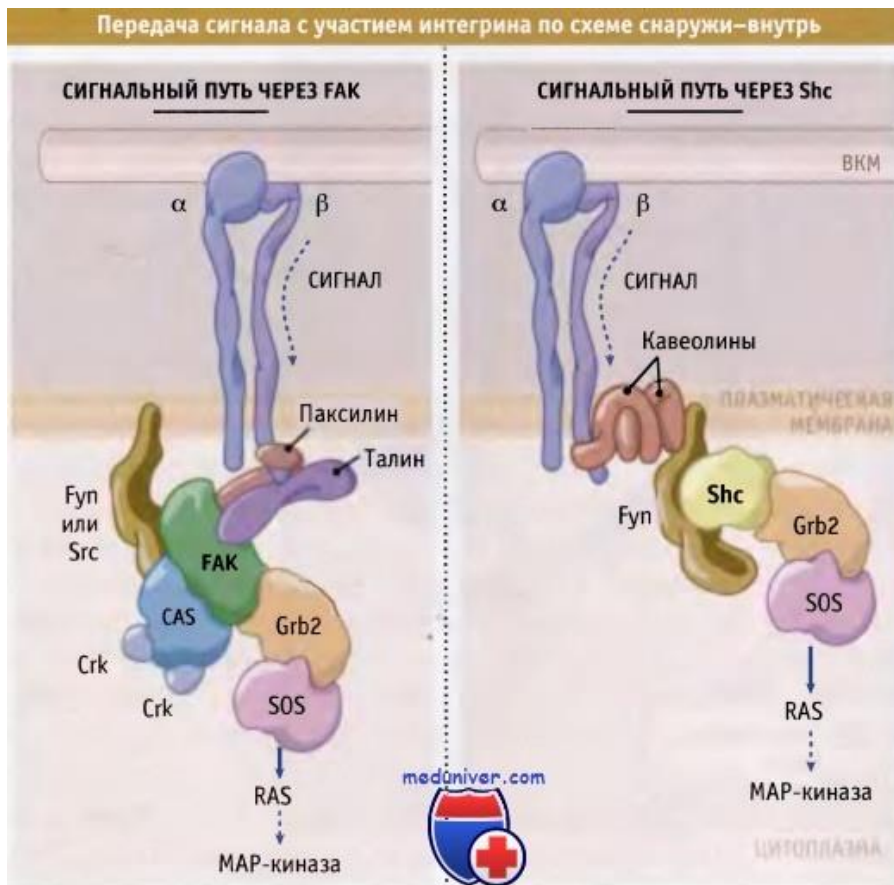


Рисунок 15 – Сигнал через интегрин в ядро

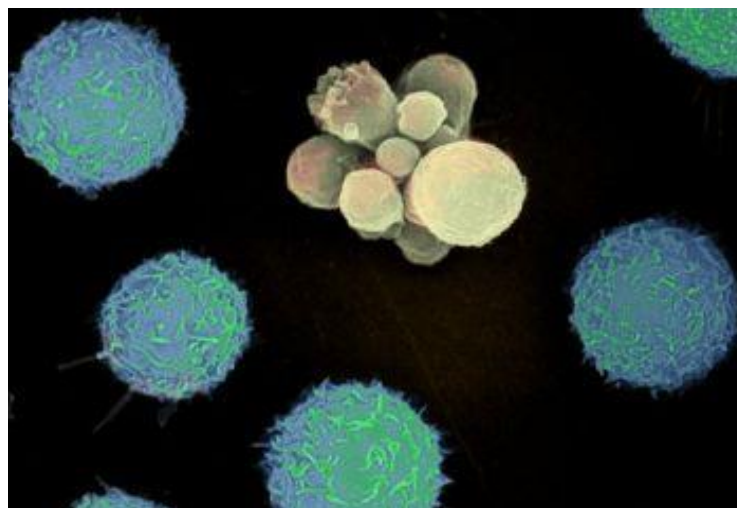


Рисунок 16 – Апоптоз человеческого лейкоцита (микрофотография с помощью сканирующего электронного микроскопа)

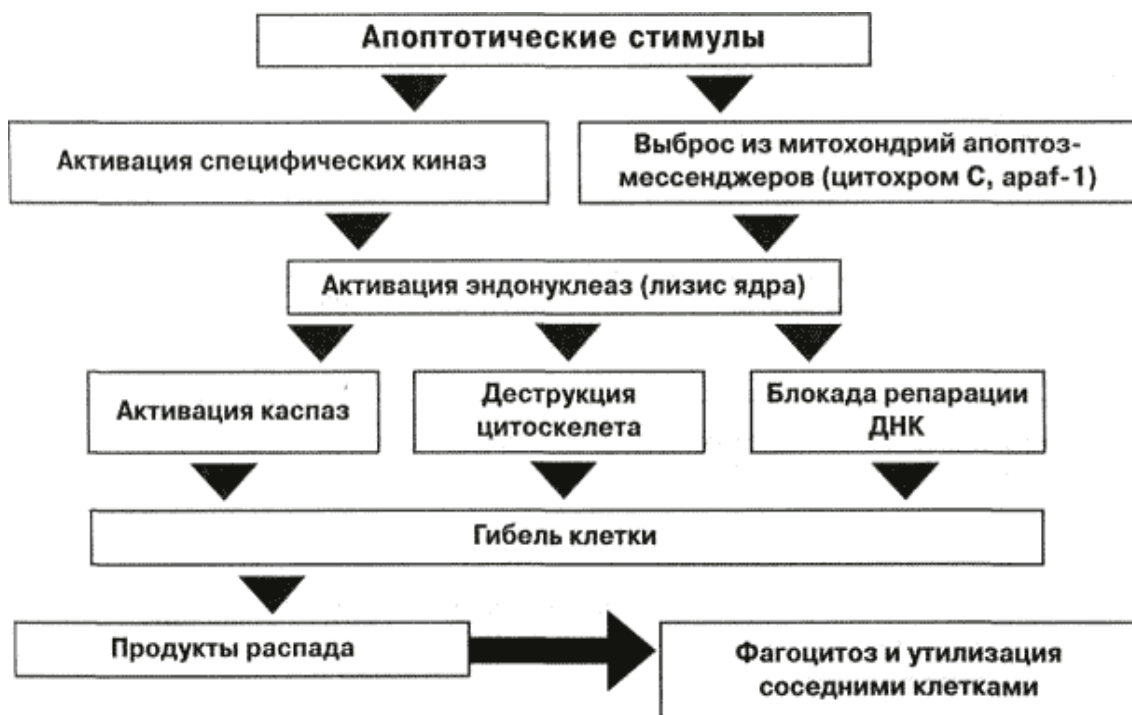


Рисунок 17 – Этапы апоптоза

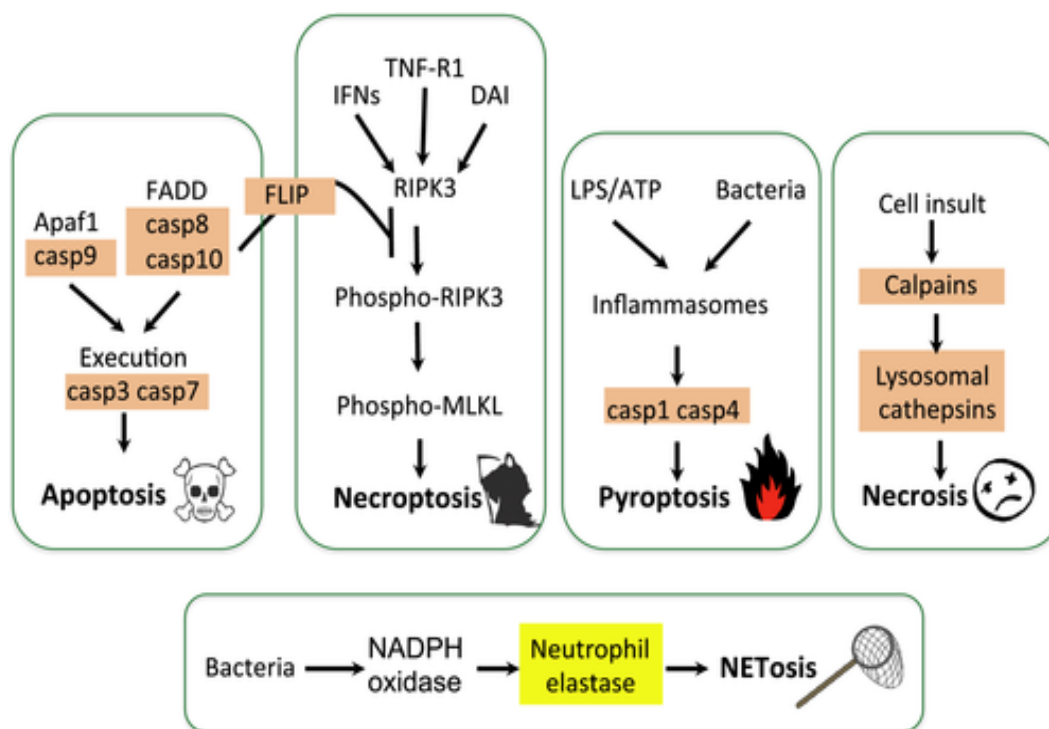


Рисунок 18. – Сигнальные пути и клеточная смерть (Salvesen G.S. et al., 2016)

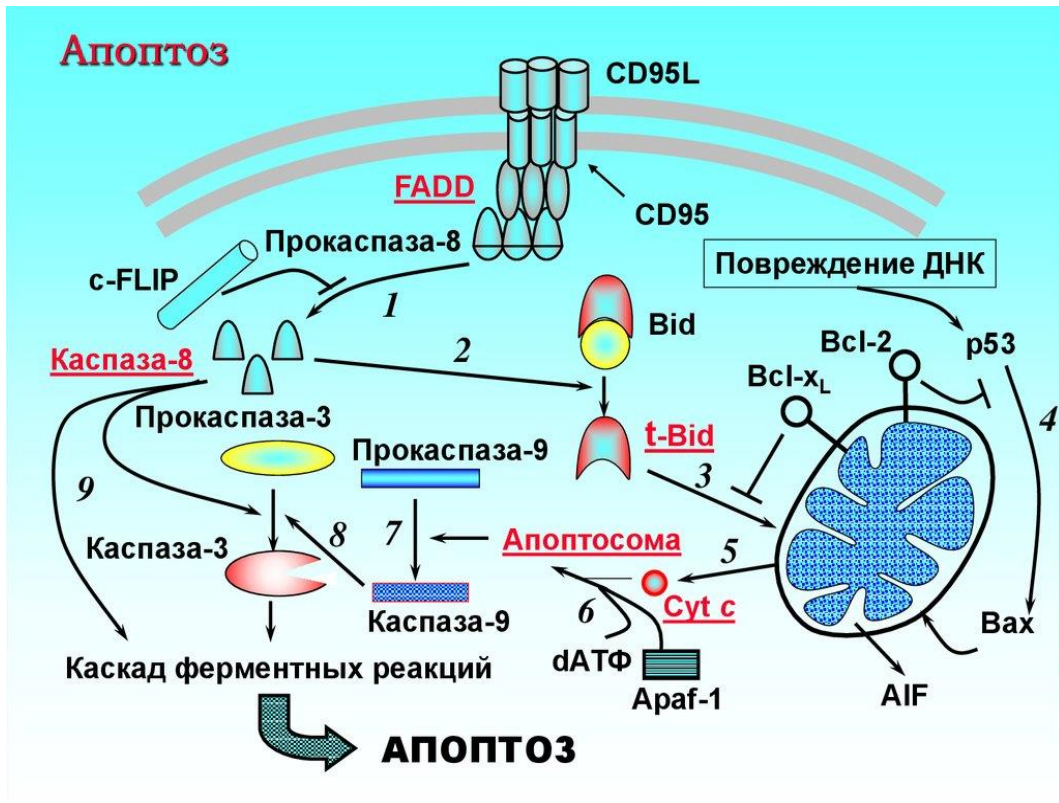


Рисунок 19 – Биосигнализация при апоптозе

## Что такое внутриклеточная передача сигнала?

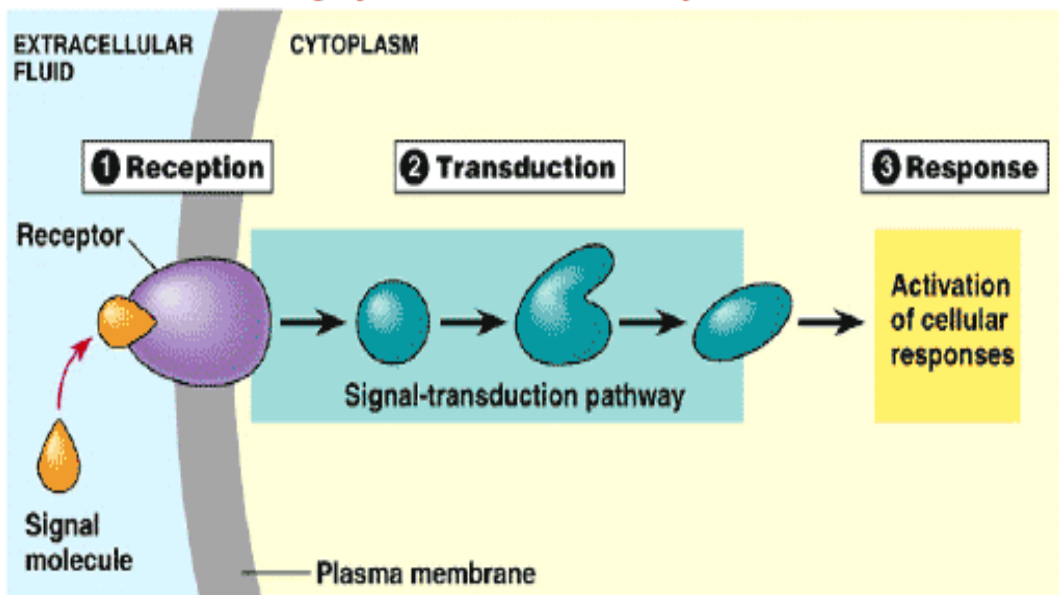


Рисунок 20 – Три этапа передачи сигнала в клетку:  
 1) связывание сигнальной молекулы с мембранным рецептором;  
 2) пути передачи сигнала внутри клетки; 3) клеточный ответ.

### Функциональные классы

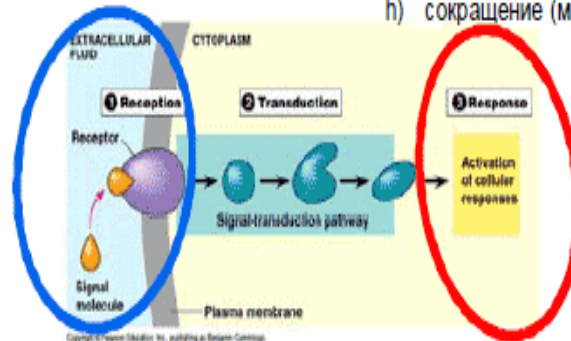
#### активирующих сигналов:

- a) факторы роста,
- b) гормоны,
- c) хемоаттрактанты,
- d) нейротрансмиттеры,
- e) активаторы иммунных клеток,
- f) сигналы целостности ткани,
- g) сенсорные стимулы (запахи, вкусовые сигналы, свет),
- h) другие.

### Типы физиологического

#### ответа клеток:

- a) клеточное деление (пролиферация)
- b) предотвращение клеточного деления
- c) дифференцировка
- d) клеточная смерть (апоптоз)
- e) миграция клеток
- f) генерация потенциала действия (нейроны)
- g) изменение формы клетки
- h) сокращение (мышечные клетки)
- i) секреция (выделение)
- j) фагоцитоз
- k) другие



### Типы активирующих сигналов:

- a) большие органические молекулы (белки, нуклеиновые кислоты, липиды),
- b) малые органические молекулы (пептиды, аминокислоты, нуклеотиды и т.д.),
- c) неорганические молекулы (NO, CO<sub>2</sub>, и т.д.),
- d) физический контакт,
- e) электрические стимулы,
- f) свет,
- g) другие.

### Внутриклеточные «считыватели»

#### сигнала:

- a) Транскрипция (ядро)
- b) Трансляция (мРНК в цитоплазме)
- c) Цитоскелет
- d) Клеточные органеллы (ER, Golgi, везикулы...)
- e) Метаболические реакции
- f) Другие

Рисунок 21 – От сигнала до физиологического ответа клетки (смотреть против часовой стрелки)

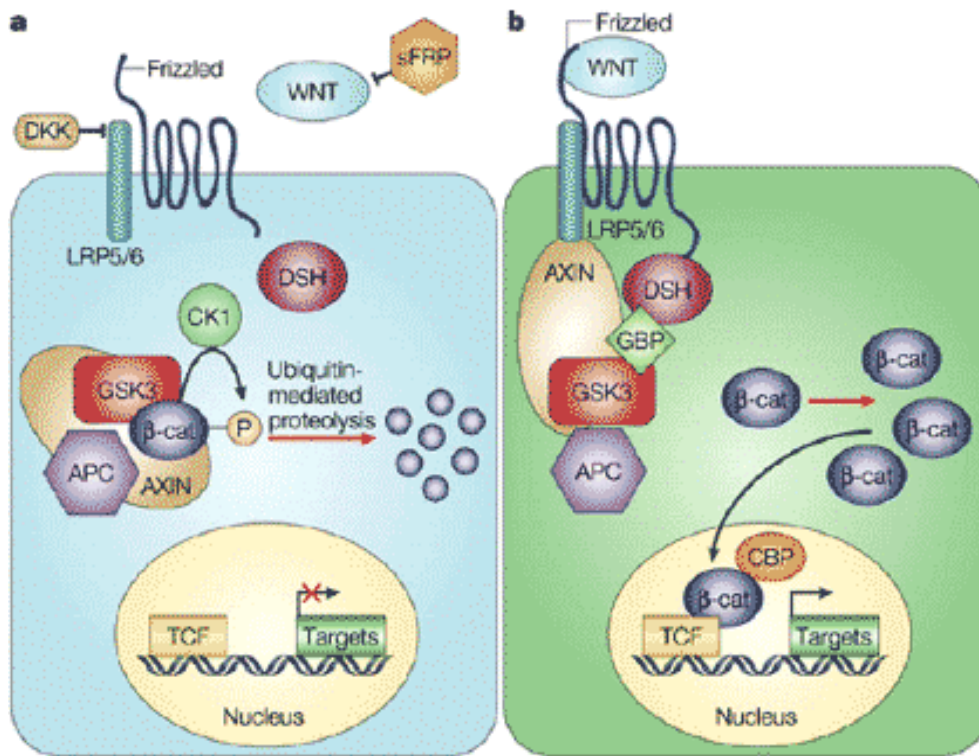


Рисунок 22 – Wnt/Frizzled-сигнальный каскад: а – не активен (нет экспрессии генов); б – путь *Wnt* активен, есть экспрессия генов

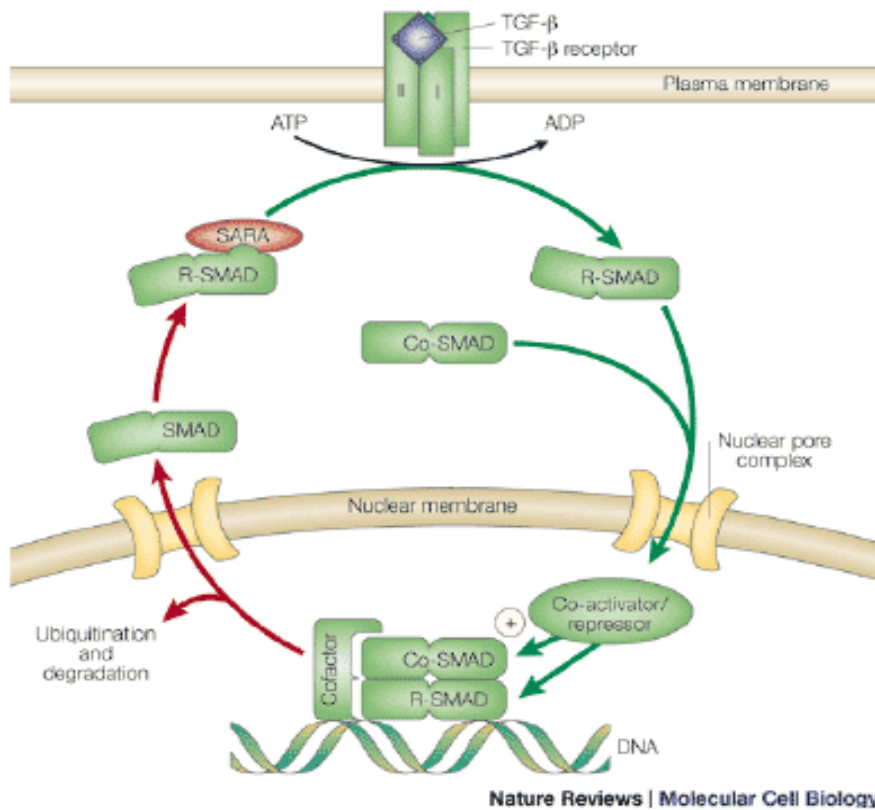


Рисунок 23 – TGFβ-зависимый сигнальный каскад



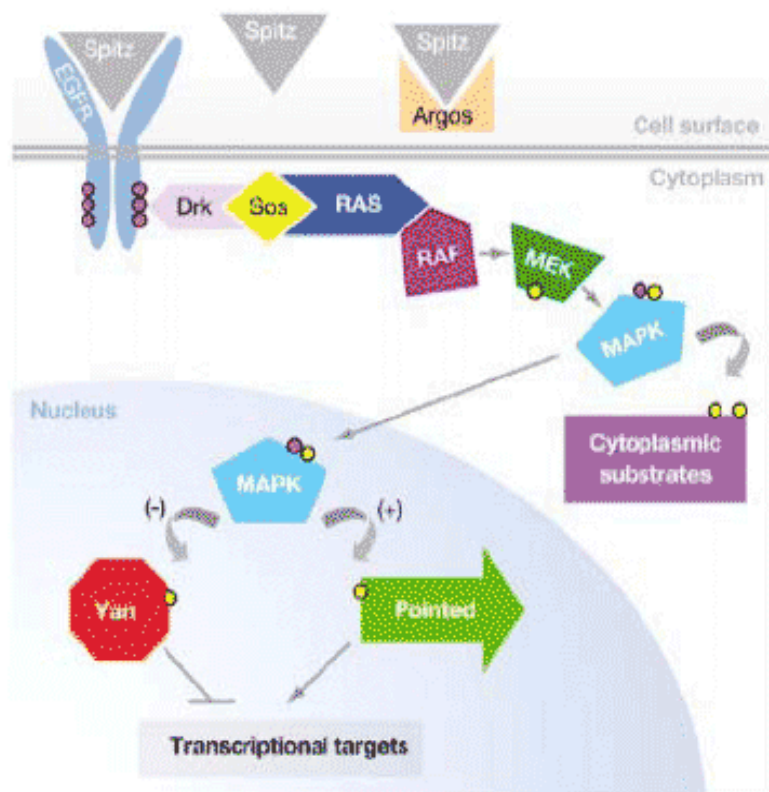


Рисунок 24 – Тирозинкиназный сигнальный каскад

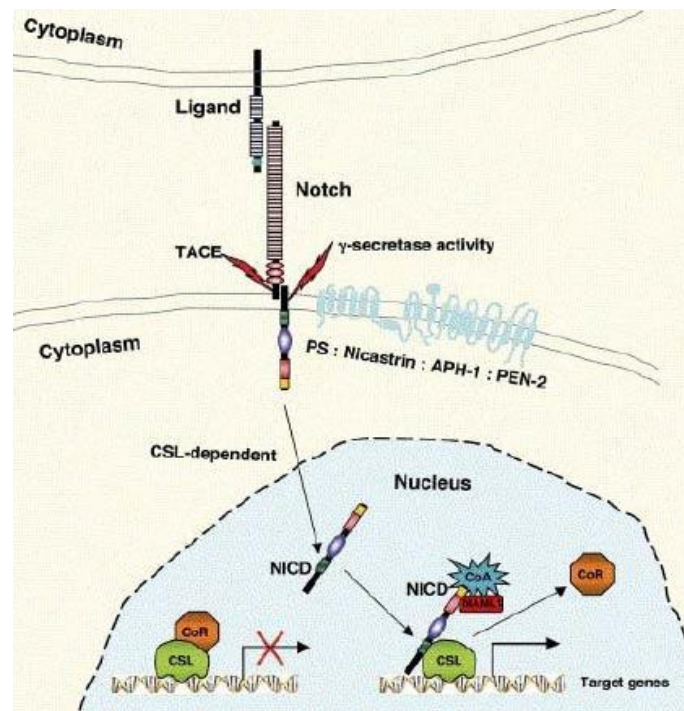


Рисунок 25 – Notch-зависимый сигнальный каскад

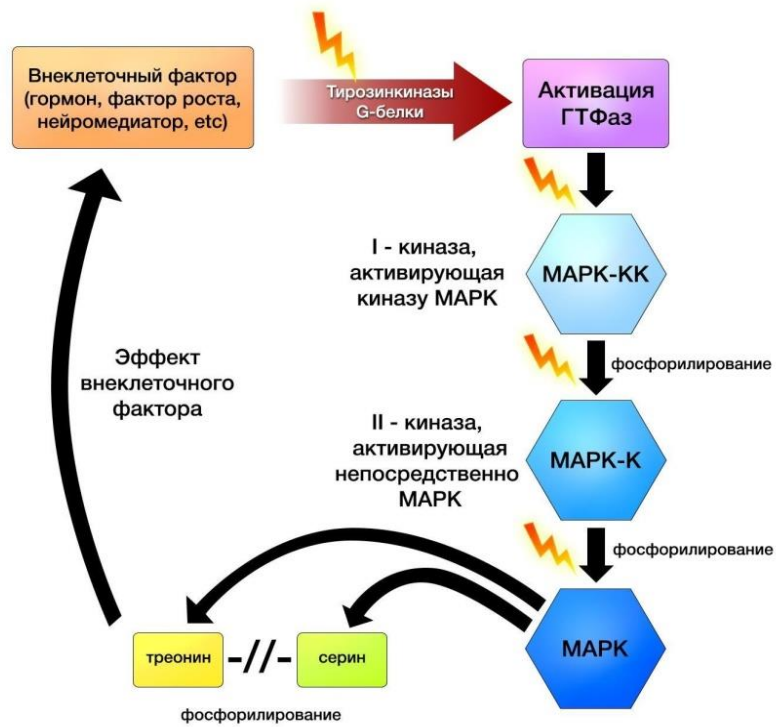


Рисунок 26 – Путь MAPK (митоген-активированной протеинкиназы)

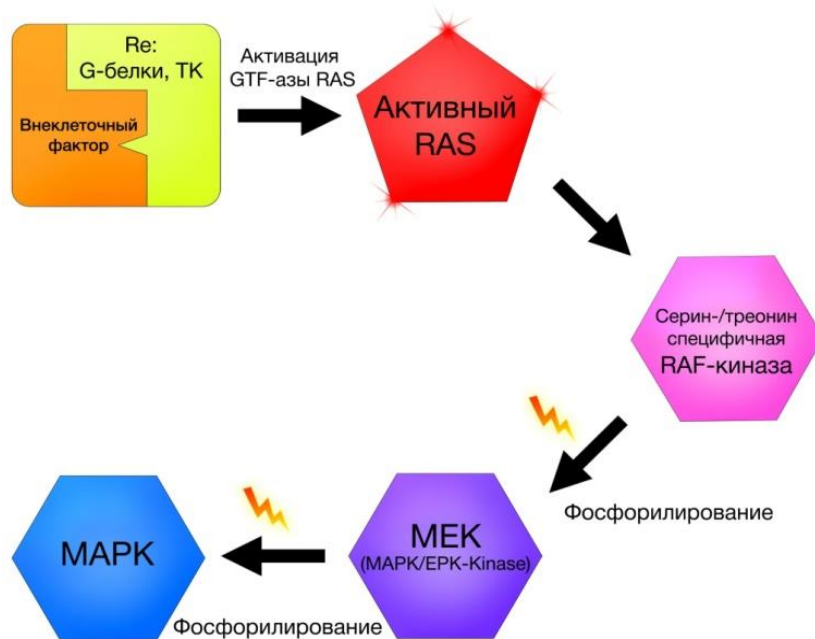


Рисунок 27 – MEK является серин-треониновой киназой MAPK-кластера

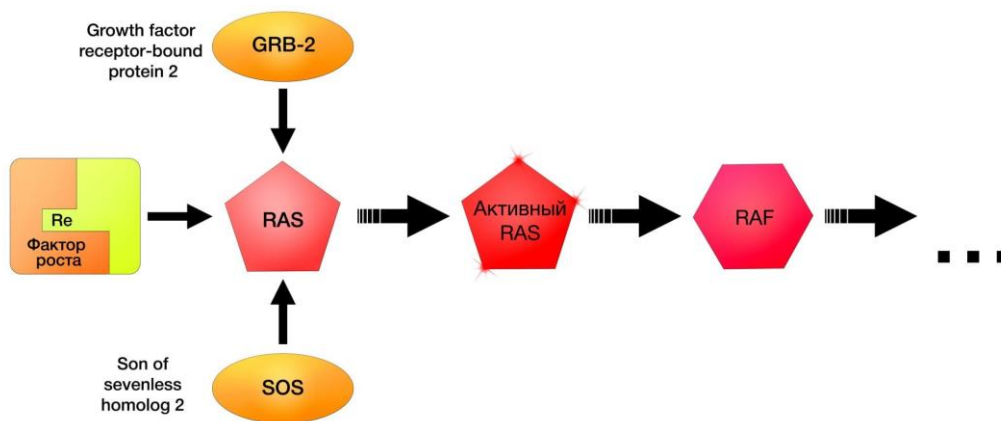


Рисунок 28 – NRAS в начале сигнального пути MAPK

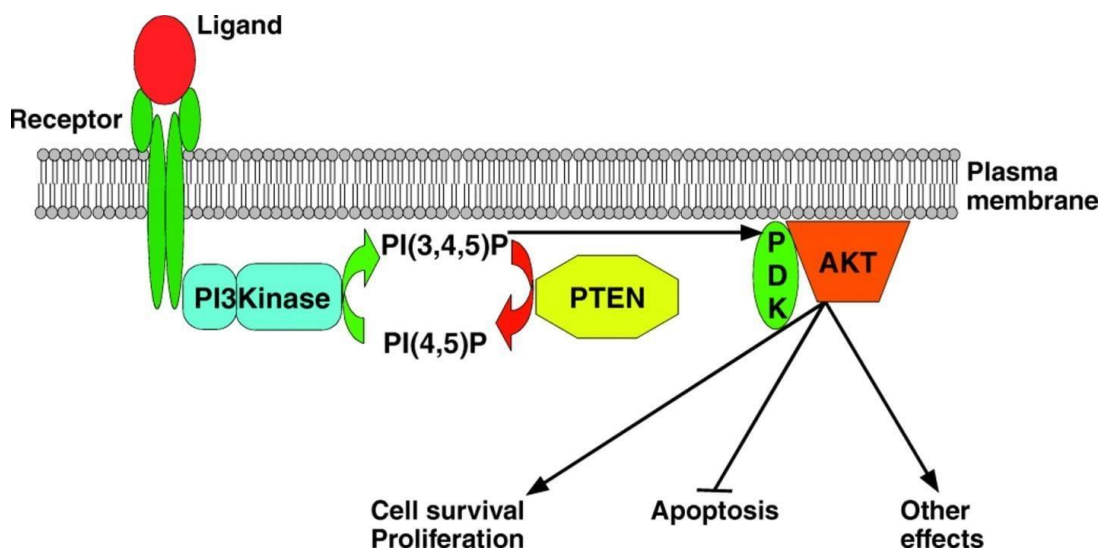


Рисунок 29. – Классический путь PTEN.

Учебное издание

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОСИГНАЛИЗАЦИИ  
ДЛЯ СПЕЦИАЛЬНОСТИ ВТОРОЙ СТУПЕНИ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 1-31 80 01 БИОЛОГИЯ.  
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ**

Учебно-методический комплекс по учебной дисциплине

Составители:

**ЧИРКИН** Александр Александрович  
**БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА** Ольга Михайловна

Технический редактор

*Г.В. Разбоева*

Компьютерный дизайн

*В.Л. Пугач*

Подписано в печать 22.10.2021. Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 7,67. Уч.-изд. л. 7,68. Тираж 30 экз. Заказ 161.

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.