Молекулярная эндокринология

Лектор: к.б.н. П.А. Тюрин-Кузьмин

Программа курса

Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Основные положения

Функции системы рецепции и внутриклеточной сигнализации. Общий обзор межклеточной и внутриклетчной систем передачи сигнала. Классификация сигнальных молекул по скорости клеточного ответа, вызываемого ими: нейромедиаторы; гормоны, активирующие метаботропные мембранные рецепторы; гормоны, активирующие внутриклеточные рецепторы. Способы межклеточной сигнализации: эндокринная, паракринная, аутокринная, юкстакринная, интракринная, транссигнализация, криптокринная. Определение понятий рецептор, лиганд, внутриклеточная сигнализация, агонисты, антагонисты, вторичные посредники. Явление "избытка" рецепторов на тканях, его биологический смысл. Зависимость скорости прохождения гормонального сигнала от константы диссоциации лиганда и рецептора.

Классификация рецепторов по локализации в клетке. Классификация рецепторов по механизму передачи сигнала. Мембранные ионотропные рецепторы - каналоформеры. Мембранные метаботропные рецепторы: рецепторы, сопряженные с гетеротримерными G-белками; каталитические рецепторы или рецепторы-ферменты (рецепторные тирозиновые киназы; рецепторные гуанилатциклазы; рецепторные серин/треониновые киназы, рецепторные фосфатазы), цитокиновые рецепторы. Ядерные рецепторы. Основные участники внутриклеточной передачи сигнала рецепторов, сопряженных с G-белками: тримерные G-белки, циклические нуклеотиды, фосфоинозитидный обмен, регулирующий внутриклеточную концентрацию и осцилляции кальция. Десенситизация рецепторов. Каталитические рецепторы или рецепторы-ферменты. Их краткая характеристика на примере рецепторов факторов роста. Адаптерные белки, каркасные адаптерные белки. Интегрины.

Механизмы регуляции ферментативной активности, используемые действующими на клетку сигнальными молекулами. Обратимые ковалентные модификации, белок-белковые взаимодействия, аллостерическая регуляция, ограниченный протеолиз. Долговременные механизмы изменения активности эффекторных белков: изменение уровня экспрессии белка; изменение изоферментного состава белков; изменение внутриклеточной локализации белка.

Физиологические процессы, контролируемые гормонами

Поддержание метаболического баланса. Понятие метаболического баланса. АТФ и цитрат – ключевые регуляторы метаболизма. Роль адреналина в регуляции уровня глюкозы в крови при голоде или активной мышечной работе. Запасание питательных веществ сразу после приема пищи. Реализация питательных веществ в промежутках между приемами пищи. Синтез глюкозы в печени при голодании: роль мышечной ткани в образовании аминокислот-субстратов глюконеогенеза. Кетоновые тела как альтернатвный глюкозе источник питания тканей. Роль инсулина в регуляции уровня глюкозы в крови. Регуляция уровня инсулина в крови. Внутриклеточные механизмы регуляции инсулином уровня глюкозы и активности метаболизма. Глюкагон как катаболический гормон и

функциональный антагонист инсулина. Роль кортизола в регуляции метаболизма. Роль адренокортикотропного гормона и глюкокортикоидов в регуляции метаболизма глюкозы. Адреналин регулирует субстратные циклы гликолиза. Общая схема действия гормонов, регулирующих метаболизм питательных веществ.

Регуляция температуры тела. Роль субстратных циклов гликолиза и разобщения дыхательной цепи в регуляции температуры тела человека. Белок термогенин. Нейрогуморальные механизмы регуляции термогенеза. *Контроль водно-солевого баланса.* Водно-солевой баланс контролируется за счет регуляции уровня катионов и анионов. Нейроэндокринные механизмы поддержания водно-солевого баланса крови. Альдостерон. Ренин-ангиотензиновая система. Вазопрессин. Баланс гормонов с разным физиологическим действием, необходимый для точной регуляции кровяного давления. Временные характеристики и сила действия ангиотензина II, вазопрессина и альдостерона на кровяное давление. *Регуляция роста и деления клеток.* Большинство факторов роста действуют в фазе G1 клеточного цикла. Гормоны прогрессии. Сенситизация неделящейся клетки. Гормоны компетенции. *Дифференцировка стволовых клеток в процессе гематопоэза.* Созревание клеток крови. Единая стволовая клетка крови – гематоцитобласт. Мультипотентные клетки крови. Гематопоэтические факторы роста (цитокины).

Регуляция дифференцировки и клеточный иммунитет. Основы механизма представления антигена В-лимфоцитами. Главный комплекс гистосовместимости II класса (MHC-II). Т-клеточные рецепторы на Т-хелперах. Роль интерлейкинов в развитии иммунного ответа. *Воспалительные реакции.* Направленное движение лейкоцитов в очаг воспаления, лежащее в основе воспалительных реакций. Хемотактические рецепторы лейкоцитов – семидоменные рецепторы. Лиганды хемотактических рецепторов лейкоцитов - цитокины. *Регенерация тканей.* Основные фазы регенерации тканей: воспалительная, пролиферативная и фаза ремоделирования. Цитокины, как медиаторы воспалительной фазы. Факторы роста, управляющие ремоделированием грануляционной ткани, восстановлением эпителиального барьера и формированием новой капиллярной сети в восстанавливающемся участке.

Нервно-мышечная передача. Рецепторы, принимающие сигналы нейромедиаторов – ионные каналы. Скорость передачи сигнала. Синапс. Концентрирование рецепторов на постсинаптической мембране. Выключение синаптической передачи сигнала. Возбуждающее действие нейромедиаторов на примере холинергического нервно-мышечного синапса. Тормозящее действие нейромедиаторов на примере глицина. Метаботропные рецепторы, сопряженные с G-белками, регулируют синаптическую передачу и потенциал действия. *Мышечное сокращение.* Три типа мышечных клеток. Ионные каналы, запускающие сокращение мышечных клеток. Потенциал-зависимые кальциевые каналы. Рецептор-зависимые кальциевые каналы.

Гормоны доставляют сигналы, взаимодействуя с рецепторами

Определение понятий рецептор, лиганд. Обратимость связывания рецептор-лиганд. Изменение конформации рецептора в ответ на связывание лиганда. Сродство и специфичность гормон-рецепторных взаимодействий. *Специальные участки гормонов отвечают за связывание с рецепторами.* Связывание гормона с рецептором. Понятие

молекулярного интерфейса рецептора и лиганда. Перекрестные взаимодействия лигандов и "чужих" рецепторов на примере вазопрессина и окситоцина. Понятие агонистов и антагонистов. Использование антагонистов в качестве лекарственных препаратов. Протеолитический процессинг гормонов на примере проопиомеланокортина. Различие отдельных участов гормона по функциям. Эффекторный участок гормона актон, адресный участок гаптон. *Вспомогательные участки и посттрансляционная модификация стабилизируют гормоны.* Вспомогательные участки гормонов и их функции. Дисульфидные связи в пептидных гормонах. Ковалентно связанные сахара, необходимые для биологической активности некоторых пептидных гормонов.

Гормон взаимодействует с рецептором обратимо. Кинетика связывания гормона с рецептором определяется законом действующих масс. Математическое описание процесса насыщения рецептора (изотерма связывания или изотерма Лангмюра). Использование координат Лайнуивера—Бэрка для определения константы диссоциации гормона от рецептора. График Скэдчарда для анализа зависимости образования гормон-рецепторного комплекса от концентрации гормона. Аномальная форма кривых на графике Скэтчарда и ее причины. Использование графика Хилла для выяснения причин аномального поведения кривых на графике Скэтчарда. Изучение кооперативного связывания гормонов с рецепторами при помощи метода Де Мейтса.

Чувствительность клеток к гормону может регулироваться. Зависимость биологических эффектов гормона от степени оккупации рецептора. Наличие "избытка" рецепторов по сравнению с физиологическими концентрациями гормонов. Усиление гормонального сигнала на стадии внутриклеточной передачи сигнала. Зависимость биологических эффектов гормона от сродства гормона к рецептору и от концентрации рецепторов. Изменение сродства рецепторов к гормонам в результате модификаций рецепторной молекулы. Механизм регуляции чувствительности к гормону путем образования рецепторных кластеров в цитоплазматической мембране. Способы изменения концентрации рецепторов в клетке, связанные с необратимой инактивацией рецепторных молекул. Регуляция сродства мембранных рецепторов к гормону внутриклеточными белками на примере G-белков.

Информация поступает внутрь клеток поэтапно. Мембранные рецепторы. Трансмембранная передача сигнала. Латеральные взаимодействия. Транссигнализация. Поэтапная передача сигнала. *Выключение рецепторов.* 4 основных стадии выключения рецепторов: пост-трансляционная модификация цитоплазматического домена рецепторов – десенситизация; уход рецептора с мембраны – даунрегуляция, разрушение рецепторов в протеасомах или лизосомах или их рециклизация. Разновидности пост-трансляционных модификаций, которым подвергаются рецепторы в процессе десенситизации. Каркасные белки, опосредующие даунрегуляцию рецепторов. Обратимость процессов десенситизации и даунрегуляции. Пролактин как исключение из правила снижения чувствительности клеток к лиганду при продолжителном действии лиганда. Связь явлений "избытка" рецепторов на поверхности клеток и процесса десенситизации. Интернализация рецепторов и ее типы: клатрин-зависимый, кавеолин-зависимый и клатрин/кавеолин-независимый эндоцитоз. Процессы рециклизации и деградации рецепторов в процессе даунрегуляции; сортировка эндосом между этими процессами. Процессы сортировки и адресного перемещения везикул и эндосом в цитоплазме с

участием малых ГТФ-аз семейства Rab. Сигнальные эндосомы; каркасные белки сигнальные каскады, активируемые на эндосомах.

Рецепторы различаются по структуре и способу передачи сигнала

Понятие о рецепторах, агонистах и антагонистах. Сродство агониста к рецептору. Селективность агонистов по отношению к рецепторам различных типов на примере альфа- и бета-адренэргических рецепторов. Концентрационные зависимости связывания гормона с рецептором in vitro и биологического эффекта in vivo.

Скорость развития клеточных реакций связана со способом передачи сигнала. Три способа влияния гормонов на функциональную активность клеток: изменение концентрации ионов, коферментов или субстратов метаболизма в клетке; активация медленных метаболических реакций, связанных с поведением клетки в окружающей среде и накоплением/расходом энергетических ресурсов; запуск длительных морфогенетических изменений. Согласование скорости развития клеточной реакции с основным используемым механизмом проведения гормонального сигнала.

Разнообразие клеточных рецепторов определяется природой лиганда. Общая характеристика, разнообразие и классификация гормонов и нейромедиаторов по типу рецепторов, механизмам передачи сигнала в клетку, конечной мишени внутри клетки и временной шкале развития биологических эффектов. Общие механизмы и этапы передачи внешних сигналов внутрь клетки.

Мембранные рецепторы наиболее многочисленны. Принципы классификации поверхностных рецепторов. Функциональное разделение на ионотропные и метаботропные, структурно-функциональное разделение на основные типы: ионные каналы; семидоменные рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками; однодоменные рецепторные тирозиновые киназы и схожие с ними рецепторы; рецепторы с внутренней ферментативной активностью. Наличие метаботропных и ионотропных рецепторов внутри одного типа на примере никотиновых и мускариновых рецепторов к ацетилхолину и пуринэргических рецепторов.

Лиганд-управляемые ионные каналы наиболее быстрые. Краткая характеристика трех основных групп лиганд-управляемых ионных каналов. Рецепторы, содержащие Cys-петлю: GABA-рецепторы, глициновые, серотониновые, ацетилхолиновые и ZAC-рецепторы. Глутаматные ионотропные рецепторы: каинатные, AMPA- и NMDA-рецепторы. АТФ-управляемые (пуринэргические) ионотропные рецепторы P2X1-7.

Внутриклеточные рецепторы медленно регулируют транскрипцию генов Внутриклеточные рецепторы как лиганд-управляемые транскрипционные факторы. Гормон-чувствительные элементы, лиганд-связывающие домены внутриклеточных рецепторов.

Внутриклеточная передача сигнала использует общие принципы

Общая схема рецепции и внутриклеточной сигнализации мембранных метаботропных рецепторов. Общее понятие о ключевых компонентах этого процесса: рецепторы, непосредственные мишени рецепторов, локализованные на плазматической

мембране, G-белки, вторичные посредники, адаптерные белки, каркасные белки, киназы, фосфатазы. Каскадная оганизация сигнала иформирование сигнальных сетей. Обратная регуляция передачи сигнала и процессы выключения рецепторов – десенситизация и даун-регуляция.

Мишени рецепторов локализуются на мембране. Посттрансляцинные модификации компонентов сигнальных систем, служащие для их локализации на плазматической мембране. Специальные белковые последовательности, локализующие сигнальные белки на плазматической мембране. Модульные домены адаптерных белков, связывающие мембранные фосфолипиды. Гликозилфосфатидилинозитольный якорь (ГФИ), необходимый для заякоривания рецепторов на поверхности клеток.

ГТФ-связывающие белки выполняют роль таймеров и распределителей сигнала. Поверхностные рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками. Принцип действия и динамика лиганд-зависимого взаимодействия рецепторов с тримерными G-белками. Комплекс мембранных G-белков. Субъединичный состав и описание функций субъединиц тримерных G-белков. Разнообразие альфа-субъединиц, их деление на основные группы (Gs, Gi, Gq, G12/13). Классификация рецепторов по преимущестенному сопряжению с одной из этих групп. Многообразие сигнальных сетей, формируемых мембранными G-белками. Примеры взаимодействий сигнальных путей, активируемых различными G-белками. Представители основных семейств малых ГТФ-связывающих белков суперсемейства Ras (Ras, Rab, Rho, Arf, Ran, Miro), отличия их структуры и функций в клетке. ГТФ-азный цикл и регуляция факторами обмена нуклеотидов (GEF, GAP, GDI).

Вторичные посредники усиливают сигнал. Понятие о вторичных посредниках. Участие вторичных посредников в передаче и амплификации рецепторного сигнала. Три уровня усиления сигнала: на уровне рецептора, на уровне G-белка и на уровне вторичных посредников. Классификация вторичных посредников: гидрофильные, гидрофобные и газы. *Сигнал поступает в клетку каскадным или эстафетным способами.* Каскадный принцип передачи регуляторного сигнала. Усиление сигнала.

Адаптерные белки обеспечивают специфичность. Понятие об адаптерных взаимодействиях и модульных белках, их обеспечивающих. Разнообразие адаптерных белков и их модульных доменов: домены узнавания модифицирующих групп, консенсусных белковых последовательностей, фосфолипидов, междоменные взаимодействия. Множественное тирозиновое фосфорилирование как обязательный элемент в передаче сигнала от тирозинкиназных рецепторов. Белковые (модульные) домены, отвечающие за связывание непосредственных мишеней с активированными рецепторами. Адаптерные белки, содержащие домены гомологии с c-Src (SH2), взаимодействия с пролин-богатыми последовательностями (SH3), фосфотирозин-связывающие (PTB) и PH-домены плекстриновой гомологии.

Каркасные белки организуют сигнальные модули. Принцип каркасных взаимодействий. Каркасные (скаффолдовые) белки и их роль в увеличении эффективности взаимодействий компонентов сигнальных модулей, их локализации внутри клетки, переадресации сигнала и формировании регуляторных петель обратной связи. Примеры представителей каркасных белков.

Киназы служат основными исполнителями. Фосфорилирование как основной механизм внутриклеточной передачи сигнала. Протеинкиназы и протеинфосфатазы, липидные киназы и фосфатазы, ферменты с двойной специфичностью. Классификация протеинкиназ и протеинфосфатаз по аминокислотным остаткам модифицикации. Механизм действия сигнальных протеинкиназ на примере прототипной цАМФ-зависимой протеинкиназы (РКА). Доменная организация РКА. Участки модификации в активационной петле киназ, регулируемых фосфорилированием.

Фосфатазы нейтрализуют действие киназ. Основные группы протеинфосфатаз (PP1, PP2A, PP2B, P2C, PTP), их краткая характеристика. Регуляция активности фосфатаз регуляторными субъединицами. Внутриклеточные белковые ингибиторы фосфатаз, активируемые фосфорилированием, на примере белков CPI17 и PHI-1, регулирующих активность миозиновой фосфатазы. Пероксид водорода как новый вторичный посредник и регулятор активности ряда сигнальных протеинкиназ и фосфатаз. Фосфотирозинфосфатазы как основные мишени внутриклеточного пероксида водорода.

Гормоны действуют через разные механизмы регуляции активности ферментов. Общее представление об основных стратегиях, используемых для регуляции активности ферментов. Стратегии, направленные на быстрое изменение удельной активности ферментов (ковалентная модификация, белок-белковые взаимодействия, аллостерическая регуляция и ограниченный протеолиз) и на косвенное изменение их активности (изменение уровня экспрессии и изоформного состава белков). Действие гормонов направлено на необратимые реакции метаболических путей. Основные ковалентные посттрансляционные модификации ферментов, вызываемые действием гормонов. Аллостерическая регуляция на примере фруктозо-2,6-бисфосфата и 2,3-бисфосфоглицерата. Ограниченный протеолиз на примере пищеварительных ферментов и факторов роста. Изменение уровня экспрессии или изоформного состава ферментов на примере стероидных гормонов и убиквитин-зависимой системы деградации белков.

Клетка использует различные способы кодировки сигнала рецепторов. Понятие о пространственно-временном паттерне внутриклеточных сигнальных молекул при передаче гормонального сигнала. Примеры механизмов регистрации клетокой амплитудных характеристик изменения сигнальных молекул. Преобразование частоты кальциевых осцилляций и длительности отдельных пульсов кальция в различные клеточные ответы.

Примеры сигнальных систем клетки

Циклазные системы передачи сигнала. Регуляция аденилатциклазы под действием Gs и Gi белков. цАМФ-зависимая протеинкиназа как классическая мишень этого каскада. Белки EPAC как альтернативная мишень цАМФ. Разные функции PKA и EPAC в регуляции направленной миграции лейкоцитов через эндотелиальный барьер кровеносных сосудов. Патогенное действие холерного и коклюшного токсинов, вызывающих неконтролируемое повышение внутриклеточного цАМФ.

Сигнальные механизмы, опосредуемые ионами Ca^{2+}. Многообразие клеточных ответов, регулируемых кальциевой сигнализацией. Регуляция фосфолипазы С под действием белков семейства Gq/11. Участие βγ-субъединиц тримерных G-белков и адаптерных белков в активации различных изоформ фосфолипазы С. Роль

фосфатидилинозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3) в проведении кальциевого сигнала. Участие IP_3 и диацилглицерола (ДАГ) в активации протеинкиназы С. IP_3 рецепторы и рианодиновые рецепторы, опосредующие кальций-индуцированный выброс кальция и сигнальные молекулы, регулирующие его: Никотиновая кислота аденин-динуклеотид-фосфат (NAADP) и циклическая АДФ-рибоза (cADPR). кальциевые каналы плазматической мембраны и механизмы их регуляции: мембранный потенциал, рецепторная активация, вторичные посредники. Кальций-связывающие домены: С2 домен и EF-рука. Белки, выкачивающие кальций их цитоплазмы: Ca2+ АТФаза плазматической мембраны, кальциевая АТФаза сарко(эндо)плазматического ретикулума, натрий-кальциевый обменник и митохондриальный унипортер.

MAP-киназные каскады. MAP-киназные сигнальные каскады. Структура и организация MAP-киназных сигнальных модулей (Erk1/2, p38, JNK, Erk3 и Erk5/7 каскады). Три киназных уровня с высокой селективностью передачи и умножением сигнала, обеспечиваемых двойной специфичностью киназ второго уровня. Эволюционный консерватизм MAP-киназных каскадов. Механизм активации Raf под действием Ras как пример сходимости сигнальных путей. Роль белок-белкового и ферментативного механизма в снятии автоингибирования Raf-киназы. Роль каркасных белков (KSR, MP1) в пространственной организации MAP-киназных каскадов. Пример участия каркасных белков Ste5p и Pbs2p/Sho1 в переадресации сигнала внутри MAP-киназных каскадов у дрожжей.

PI3-киназный каскад. PI3-киназный сигнальный каскад как основной регулятор клеточного цикла, выживания и роста, пролиферации и миграции клеток. Механизм активации PI3-киназы с участием тирозинкиназного рецептора и Ras. Множественность изоформ PI3-киназ, их субъединичная организация и роль как регуляторных, так и каталитических субъединиц в рецептор-зависимой активации. PI3-киназа как пример сходимости сигнальных каскадов от тирозинкиназных и G-белковых мембранных рецепторов. Ступенчатый механизм активации протеинкиназы B/Akt – основной мишени PI3-киназного каскада. Фосфолипид-зависимые киназы 1 и 2 (PDK1 и PDK2). Переадресация сигнала к комплексу TorC2. Роль сигнальных комплексов TorC1 и TorC2 в регуляции метаболизма, миграции и пролиферации клеток.

Цитокиновый каскад с участием JAK/STAT белков. Рецепторы, ассоциируемые с протеинкиназами, и не обладающие своей ферментативной активностью. Эритропоэтиновый рецептор как типичный представитель этой группы, активирующий транскрипцию генов с участием сигнального каскада JAK-STAT. Доменная организация и механизм действия Янус-киназ (JAK) и сигнальных активаторов транскрипции (STAT-белков). Роль димерных взаимодействий в этой ветви передачи сигнала.