

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского"**

А.Д. Перенков

**ПОСОБИЕ К СЕМИНАРСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО КУРСУ
«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОНКОЛОГИЯ».
ЧАСТЬ 1. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией
Института биологии и биомедицины для студентов ННГУ,
обучающихся по направлению подготовки
06.03.01 «Биология»

Нижегород
2022

УДК 577.2(076.5)
ББК Е07-5я73
П62

П62 Перенков А.Д. Пособие к семинарским занятиям по курсу «Молекулярная онкология». Часть 1. Сигнальные пути опухолевых клеток. Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2022. – 62 с.

Рецензент: д.б.н., доц. **М. В. Ведунова**

В учебно-методическом пособии изложены основные принципы и особенности работы сигнальных путей, характеризующихся нарушениями при развитии опухоли. Пособие предназначено для студентов института биологии и биомедицины, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология», изучающих молекулярную онкологию, мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов, биохимию и физиологию опухолевого роста.

Ответственный за выпуск:
председатель методической комиссии Института биологии и
биомедицины ННГУ, к.б.н., **Е.Л. Воденева**

УДК 577.2(076.5)
ББК Е07-5я73

© Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, 2022
© Перенков А.Д. 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1.Механизмы межклеточной сигнализации клеток	5
1.1 Основные домены взаимодействия между белками при передаче внутриклеточного сигнала.....	8
1.2 Сигнальные пути и раковые стволовые клетки.....	9
2. Основные сигнальные пути стволовых опухолевых клеток	11
2.1 Сигнальный путь NF-κB.....	11
2.2 Сигнальный путь PI3K-AKT	15
2.3 Сигнальный путь MAPK / ERK.....	20
2.4 Сигнальный путь Jak-STAT.....	38
2.5 Сигнальный путь Smad.....	41
2.6 Сигнальный путь Notch.....	44
2.7 Сигнальный путь Hh.....	48
2.8 Сигнальный путь Wnt.....	51
ЛИТЕРАТУРА	60

ВВЕДЕНИЕ

Пособие предназначено для оказания помощи студентам в самостоятельной подготовке к занятиям по дисциплине «Молекулярной онкологии», которое изучается в 7 семестре, а также по курсу «Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов», изучаемое в 8 семестре студентами очной формы обучения по направлению подготовки 06.03.01 «Биология».

Методическое пособие позволяет студентам получить необходимые знания в области фундаментальных основ сигнализации клеток, а также современных представлений о сигнальных путях, которые используются нормальными и опухолевыми стволовыми клетками для дифференцировки, пролиферации и миграции.

Проведение семинарских занятий направлено на углубленное изучение сигнальных путей, которые способствуют поддержанию стволовых и опухолевых клеток. Каждому занятию должно предшествовать обязательное ознакомление с материалом лекционного курса и соответствующей литературой, рекомендуемой к теме каждого занятия.

1. Механизмы межклеточной сигнализации клеток

Клетки многоклеточного организма нуждаются в обмене информацией друг с другом для координации функций, таких как регуляции развития и организации в ткани, контроля процессов роста и деления. Координация функций осуществляется в основном внеклеточными сигнальными молекулами, которые могут действовать как на ближайшие клетки, так и на клетки, находящиеся на большом удалении. Рецепцию (получение) сигнала осуществляют белки, которые могут находиться как на поверхности (чаще трансмембранные белки), так и внутри клетки. Связывание сигнальной молекулы с рецептором, приводит к его активации и инициирует передачу внутриклеточного сигнала через один или несколько путей. Внутриклеточный сигнальный путь заканчивается белками-эффекторами, которые непосредственно и изменяют функционирование клетки. Белки-эффекторы чаще всего являются белками-регуляторами генов, частями цитоскелета, компонентами метаболического пути или ионными каналами.

По способу доставки сигнальных молекул делятся на:

1. Интракринный – способ, при котором рецептор и сигнальная молекула находится внутри одной клетки;
2. Аутокринный – способ, при котором сигнальная молекула выделяется клеткой, которая сама же ее рецептирует;
3. Юкстакринный – способ, при котором сигнальная молекула рецептируется соседней клеткой, соединенной с клеткой, секретирующей сигнальную молекулу, щелевым контактом;
4. Контактный – способ, при котором сигнальная молекула находится на поверхности одной клетке и непосредственно взаимодействует с рецептором, находящимся на поверхности другой клетки.
5. Паракринный – способ, при котором сигнальная молекула секретируется и доставляется до клетки с подходящим рецептором, которая находится на удалении и при этом не используется кровяное русло.
6. Эндокринный (гуморальный) – способ, при котором сигнальная молекула секретируется и доставляется до клетки с подходящим рецептором через кровяное русло (рис. 1).

Разные способы доставки сигнальных молекул имеют разное время ответа клеток, однако скорость ответа на внеклеточный сигнал зависит еще и от характера ответа клетки-мишени. Если ответ клетки заключается в изменении уже существующих белков (например, белков цитоскелета, белков метаболического пути или ионных каналов), то они происходят от миллисекунд до минуты, в то же время, когда для ответа требуется изменение экспрессии генов и синтез новых белков, он занимает от нескольких минут до нескольких часов.

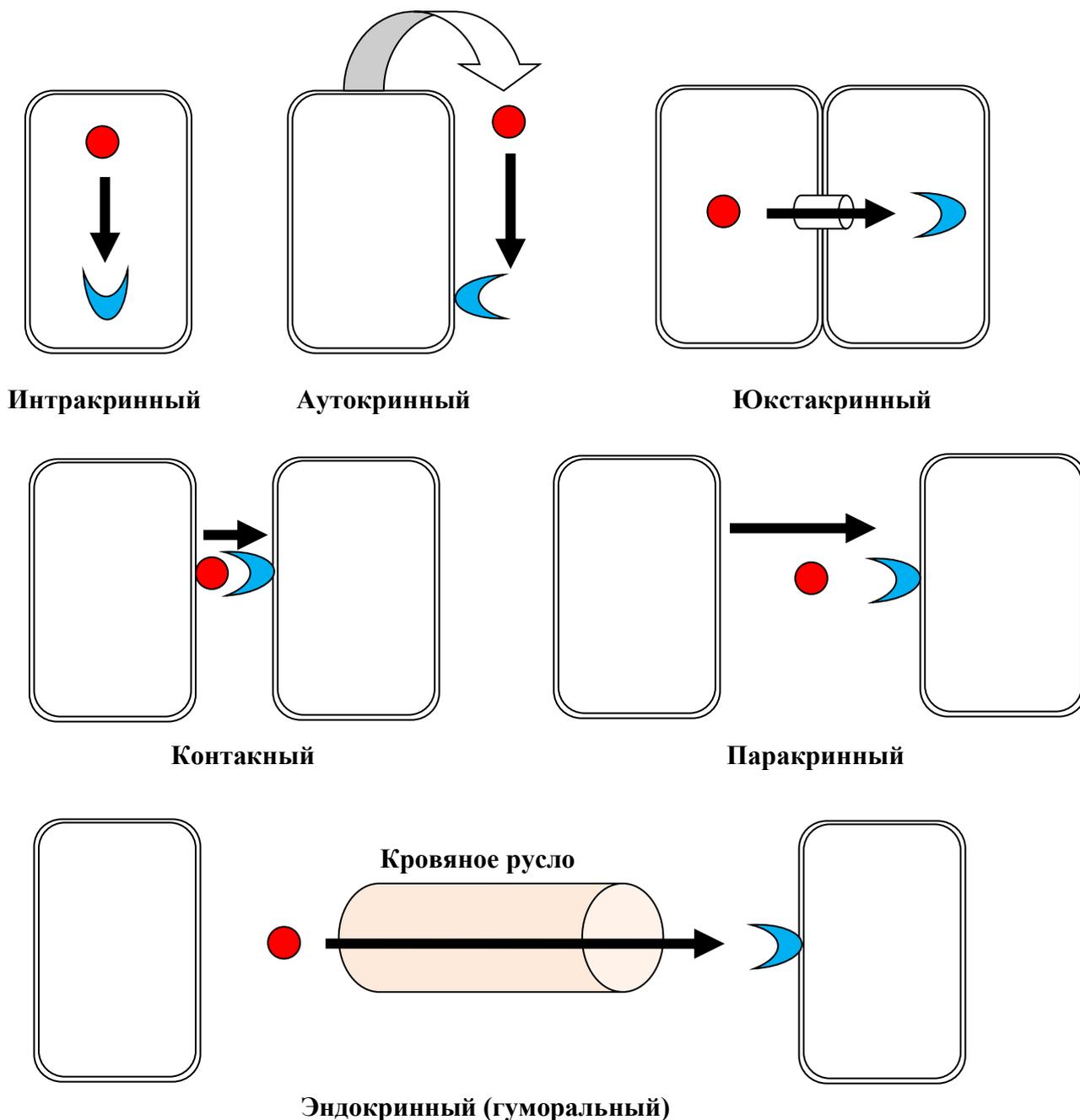


Рис. 1. Способы доставки сигнальных молекул:

● – сигнальная молекула; ☾ – рецептор; □ – щелевой контакт

Клетка-мишень воспринимает сигнальные молекулы через поверхностный рецептор, который специфически связывает их, передает сигнал внутрь клетки и запускает ответ. Гораздо реже рецепторы располагаются внутри клетки-мишени, и для связывания с ними сигнальные молекулы должны преодолеть плазматическую мембрану клетки. Сигнальные молекулы, рецепторы которых расположены внутриклеточно, имеют маленькие размеры и содержат много гидрофобных групп. Чаще всего к этой группе относятся гормоны: стероидные,

тиреоидные, а также ретиноиды и витамин D. Внутри клетки они обычно связываются с внутриклеточными рецепторами, которые являются эффекторами (транскрипционными факторами) и изменяют их способность регулировать транскрипцию генов.

Передача сигнала от рецептора к белку-эффектору происходит через целый ряд промежуточных белковых молекул. Для передачи сигнала обычно используется каскадное фосфорилирование промежуточных белков за счет их протеинкиназной активности. Протеинкиназы – это ферменты ковалентно присоединяющие один или несколько фосфатных групп к определенным аминокислотам в сигнальном белке. В зависимости от аминокислот, которые модифицируют протеинкиназы, их делят на тиразиновые, серин/треониновые, двойной специфичности и гистидиновые протеинкиназы, встречающиеся у прокариот. Большинство протеинкиназ человека – это серин/треониновые и, в меньшей степени, тиразиновые протеинкиназы. В реакции фосфорилирования используются фосфатные группы молекул АТФ, превращая ее в АДФ. В паре с протеинкиназами работают протеинфосфатазы, функцией которых является удаление фосфатных групп с сигнальных белков, тем самым реализуя обратную регуляцию. Фосфорилирование приводит к изменению в структуре белка иницируя последующую передачу сигнала дальше по каскадному механизму, который заканчивается на белках-эффекторах.

Другой важный способ передачи сигналов внутри клетки происходит через GTP-связывающие белки, которые часто ассоциированы с поверхностными рецепторами. GTP-связывающие белки в активном состоянии связаны с GTP и инактивируются при его гидролизе до GDP. Существует два основных типа GTP-связывающих белков: крупные тримерные GTP-связывающие белки (G-белки) и небольшие мономерные GTPазы (малые G-белки). Переключение G-белков из неактивного состояния в активное осуществляют факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (Guanine Exchange Factor, GEF), а инактивируют GTPаза-активирующие белки (GTPase-Activating Protein, GAP), за счет усиления скорости гидролиза связанного GTP.

Передача сигнала от рецептора внутрь клетки возможна несколькими путями:

1. Рецептор имеет внутриклеточный домен с протеинкиназной активностью (EGF, PDGF, VEGF, M-CSF, SCF);
2. Протеинкиназы не являются частью рецептора, но связаны с его внутриклеточным доменом (большинство интерлейкинов, интерфероны);
3. С рецептором связаны адаптерные молекулы, которые после самосборки «платформы» рекрутируют протеинкиназы (IL1a, b, IL18, IL33).

Каждая клетка многоклеточного организма подвержена одновременно действию множества (сотен) различных сигнальных молекул. При этом клетки отвечают на сигнальные молекулы селективно, в зависимости от своих свойств (типа клеток). Однако, практически любой клетке требуется минимальный набор

сигналов, поддерживающих ее жизнедеятельность. Полное отсутствие экзогенных сигналов обычно инициирует гибель клетки путем апоптоза. Ответ клетки на экзогенный сигнал зависит не только от набора рецепторов, которые она несет на своей поверхности, но и от внутриклеточных белков, при помощи которых она передает сигнал. Поэтому одна и та же сигнальная молекула может действовать на разные типы клеток по-разному. Это реализуется либо за счет того, что одну и ту же сигнальную молекулу связывают два разных рецептора или за счет того, что один и тот же рецептор в разных типах клеток может быть связан с разными сигнал-передающими белками. Так, например, нейромедиатор ацетилхолин снижает частоту и силу сокращений клеток сердечной мышцы и стимулирует сокращение клеток скелетных мышц.

Известно, что обычно для изменения в активности клетки требуется не один сигнал от одного рецептора, а от группы рецепторов и часто ответ клетки зависит от того, какие еще рецепторы взаимодействуют со своими сигнальными молекулами. Для ряда рецепторов, также характерно взаимодействие с несколькими различными сигнальными молекулами. Например, Toll-подобный рецептор 2 способен распознавать молекулы как эндогенного (белки теплового шока, гистоны, бигликаны), так и экзогенного происхождения (бактериальные гликолипиды, липопротеины, липопептиды, липотейхоевая кислота, пептидогликан, зимозан грибов).

1.1 Основные домены взаимодействия между белками при передаче внутриклеточного сигнала

Передача сигнала от рецептора к белку-эффектору опосредуется небольшой группой доменов. Домен (domain) – это участок полипептидной цепи белка, выполняющий какую-либо его функцию (например, цитоплазматический домен, трансмембранный домен и т.п.). Домены SH2, SH3, РТВ и РН опосредуют большинство взаимодействий между сигнальными белками (таблица 1).

Таблица 1

Домены взаимодействия между белками при передаче внутриклеточного сигнала

Домен	Белки, содержащие домен	Лиганд домена
SH2	Src, GRB2, RasGAP	Фосфотиразин
SH3	Src, GRB2, crk	Пролин богатые регионы
РТВ	SHC-трансформирующий белок, IRS-1, X-11a	Фосфотиразин
РН	PLC δ , PKB/АТК, PDK1	Фосфатидилинозитол

Домены SH были названы в честь их гомологии с тремя основными доменами протеинкиназы Src: каталитический домен SH (Src Homology 1, SH1) 1, цитоплазматический SH2-домен и SH3-домен. Src – это тирозинкиназа, участвующая в процессах эмбрионального развития и клеточного роста. Src

(сокращение от «sarcoma») является первой описанной протеинкиназой из одноименного семейства Src-киназ.

Домен SH2, включает примерно 100 аминокислот и содержится во многих внутриклеточных сигнальных белках. Домены SH2 напрямую связываются с другими белками с фосфорилированными остатками тирозина, включая фосфорилированные цитоплазматические домены поверхностных рецепторов. Белки содержащие домены SH2 можно разделить на две группы: первая – это белки с ферментативной активностью, такие как фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа (PI3K), фосфолипаза C (PLC- γ) гамма, нерцепторные представители семейства Src тирозинкиназ и белок, Ras ГТФаза активирующий белок (RasGAP); вторая группа – это, так называемые, адаптерные молекулы, такие как GRB2, crk и Shc, которые сами не имеют ферментативной активности, но служат как платформа для сборки белков с протеинкиназными доменами.

Еще одним известным доменом расположенным на цитозольных сигнал-передающих белках является SH3-домен, длиной 60–70 аминокислот. Домены SH3 связываются преимущественно с левозакрученными α спиралями, богатыми пролином. Помимо сигнальных белков Src и GRB2, многие белки цитоскелета несут SH3-домены.

Домен связывания фосфотирозина (Phosphotyrosine-Binding, PTB) функционально сходен с SH2 доменом, хотя и имеет другую трехмерную структуру, связывает фосфорилированные тирозины в определенной пептидной последовательности активированных рецепторов или внутриклеточных сигнальных белков. Показано наличие PTB доменов в IRS-1 (insulin receptor substrate-1) и адаптерном белке Shc. Обнаружение того, что Shc несет как домен PTB, так и домен SH2, что подтверждает функциональные различия между этими двумя доменами.

Многие сигнальные белки включают домены гомологии к плекстрину (Pleckstrin Homology, PH), которые состоят из 100 аминокислот и связывают заряженные головные группы фосфоинозитидов (PIP2 – фосфатидилинозитол (4,5) – бисфосфат) и PIP3 – фосфатидилинозитол (3,4,5) – трифосфат), синтезируемых в плазматической мембране в ответ на внеклеточный сигнал. Хотя PH домены разных белков обладают низкой гомологией аминокислотной последовательности, но их трехмерная структура очень схожа. Домены PH обнаружены, например, в протеинкиназе B (PKB) и PLC. Эти домены позволяют белку пристыковываться к мембране и взаимодействовать с другими рекрутированными туда сигнальными белками.

1.2 Сигнальные пути и раковые стволовые клетки

Раковые стволовые клетки (РСК) представляют собой небольшую группу опухолевых клеток, обладающих способностью к бесконечному делению и дифференцировке в гетерогенные опухолевые клетки. Считается, что РСК ответственны за иницирование, рост и рецидив опухолей. Первая популяция РСК была идентифицирована у больных острым миелоидным лейкозе человека

в 1994 году. Впоследствии РСК были обнаружены, выделены и культивированы из различных опухолей человека, включая опухоль мозга, меланому и опухоль груди, печени, поджелудочной железы, толстой кишки и опухоли простаты. Эти клетки обладают способностью к самообновлению и дифференцировке, а также способствуют рецидиву опухоли, метастазированию, гетерогенности, множественной лекарственной устойчивостью и устойчивостью к радиации, за счет способности оставаться в фазе G0 и давать начало новым опухолям. Опухолевые стволовые клетки обычно обладают маркерными поверхностными белками, такими как CD133, нестин, CD44, однако каждый тип опухоли уникален и имеются свои особые маркерные молекулы (таблица 2).

Таблица 2

Биомаркеры опухолевых стволовых клеток человека

Опухоль	Маркеры
Молочной железы	CD29+, CD49f+, CD90+, CD133+, ALDH+, CD44+/CD24-, ESA+/CD44+/CD24
Простаты	EpCAM+, CD117+, $\alpha\beta$ 1+, ALDH+, CD44+, EZH2+, CD133+, CXCR4+, E-cadherin+
Мозга	CD49f+, CD90+, CD44+, CD36+, EGFR+, A2B5+, L1CAM+, CD133+
Печени	CD24+, CD133+, CD13+, CD44+, CD206+, OV-6+, CD90+, EpCAM+
Толстой кишки	CD200+, EpCAM+, CD133+, CD166+, CD206+, CD44+, CD49f+, ALDH+
Легких	CD166+, CD90+, CD87+, ALDH+, CD44+, CD133+
Меланома	CD20+, CD271+, ALDH+, CD133+

Существует две теории, касающихся клеток-родоначальников опухолей: стохастическая и иерархическая. Стохастическая теория утверждает, что любая клетка данной опухоли может при метастазировании, трансплантации или переносе в условия *in vitro* стать родоначальницей новой опухоли. Иерархическая теория утверждает, что такими свойствами обладает лишь небольшая часть клеток опухоли, так называемые раковые стволовые клетки. Согласно иерархической теории, в пределах опухоли сосуществуют несколько типов клеток с разными свойствами и в этом смысле она устроена подобно нормальным тканям, где в большинстве случаев регенерация, рост и восстановление паренхимы происходят путем асимметричного деления резидентных или циркулирующих стволовых клеток и дифференцировки части дочерних клеток. При этом обе теории допускают возможность возникновения опухоли из одной единственной клетки-прародительницы, т.е. опухоль обладает свойствами клональности. Стоит отметить, что в настоящий момент нет единого взгляда на верность одной из теорий и полное отвержение другой, что связано в первую очередь с высокой гетерогенностью опухоли, которая в разных условиях

ведет себя по разному, проявляя более ярко то свойства концепции иерархической, то стохастической.

Поддержание нормальных стволовых клеток осуществляется за счет интеграции внешних и внутренних сигналов. Многочисленные внутренние сигналы, а также сигналы микроокружения позволяют стволовым клеткам сохранять эпигенетические метки, обеспечивая их самообновление. Кроме того, постоянная связь со своей нишей позволяет взрослым стволовым клеткам воспринимать изменения окружающей среды и реагировать на них, балансируя между своим ростом и регенеративным потенциалом или иницируя программы терминальной дифференцировки.

Было установлено несколько эволюционно консервативных сигнальных путей, играющих ключевую роль в развитии стволовых клеток: Notch, Wingless-type (Wnt), Sonic hedgehog (Shh), Jak-STAT, MAPK / ERK, PI3K, NF- κ B и Smad пути. Показано, что эти множественные сигнальные пути участвуют в поддержании тканевого гомеостаза, пролиферации и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ESC), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS-клетки), стромальных / стволовых клеток, полученных из жировой ткани (ASC). Все это навело ученых на мысль, что эти сигнальные пути могут играть роль и в опухолевых стволовых клетках. И действительно позже было показано, что опухолевые клетки характеризуются нарушениями в работе этих сигнальных путей. Стоит отметить, что важную регуляторную роль в развитии опухоли играют: ангиогенез, гипоксия, опухолеассоциированные макрофаги и фибробласты, внеклеточный матрикс и экзосомы.

2. Основные сигнальные пути стволовых опухолевых клеток

2.1 Сигнальный путь NF- κ B

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – это семейство транскрипционных факторов, активируемых различными сигнальными путями при стимуляции клеток во время иммунных, воспалительных или стрессовых ответов. Некоторые члены семейства играют важную роль в эмбриональном развитии. NF- κ B принадлежит к категории «быстродействующих» первичных факторов транскрипции, то есть факторов транскрипции, которые присутствуют в клетках в неактивном состоянии и не требуют синтеза нового белка для активации. Все это позволяет NF- κ B первым реагировать на клеточные стимулы. Сигнальный путь NF- κ B играет важную роль в реализации врожденного и адаптивного иммунного ответа, в поддержании гематопоетических стволовых клеток. В клетках иммунной системы он активируется различными поверхностными рецепторами, такими как Toll-подобные рецепторы, рецепторами фактора некроза опухолей α (Tumor Necrosis Factor α , TNF α), интерлейкином 1-бета (IL-1 β), а также бактериальным липополисахаридом (LPS), активными формами кислорода (ROS), ионизирующим излучением и др. Стоит отметить, что в нервных клетках

сигнальный путь NF-κB играет важную роль в пластичности, обучении и памяти. NF-κB в нервной системе может активироваться факторами роста (BDNF, NGF) и синаптической передачей нейромедиаторов (например, глутаматом). Недавно была показана важная роль NF-κB в эмбриональном развитии многих органов и тканей, таких как нервная и мышечная ткани, участвует в морфогенезе легких и печени.

У млекопитающих семейство NF-κB состоит из пяти членов: p65 (RelA), RelB, Rel (c-Rel), и белки предшественники NF-κB1 (p105) и NFκB2 (p100), которые перерабатываются в свои активные формы, p50 и p52 соответственно. Они образуют разнообразные гомодимеры и гетеродимеры, каждый из которых активирует свой собственный специфический набор генов (рис. 2). Белки NF-κB постоянно присутствуют в цитоплазме покоящихся клеток, однако они связаны с ингибиторными белками IκB (inhibitor of nuclear factor kappa B), мешающими транспорту NF-κB в ядро и активации транскрипции генов с мотивами 5'-GGGRNNYYCC-3'. У млекопитающих встречается три основных белка IκB (IκB α, β и ε). Передача сигнала с активацией NF-κB очень сильно зависит от конкретного рецептора и может отличаться. Существуют два основных сигнальных пути, которые приводят к диссоциации ингибитора белка IκB от димера NF-κB. Первый путь называется канонический или классический, связанный с обязательной активацией IκB-киназы (IKK). IKK – это мультибелковый комплекс, содержащий две серин-треониновые киназы (IKKα и IKKβ) и регуляторный белок NEMO (NFκB Essential Modifier — основной модификатор NFκB), или IKKγ.

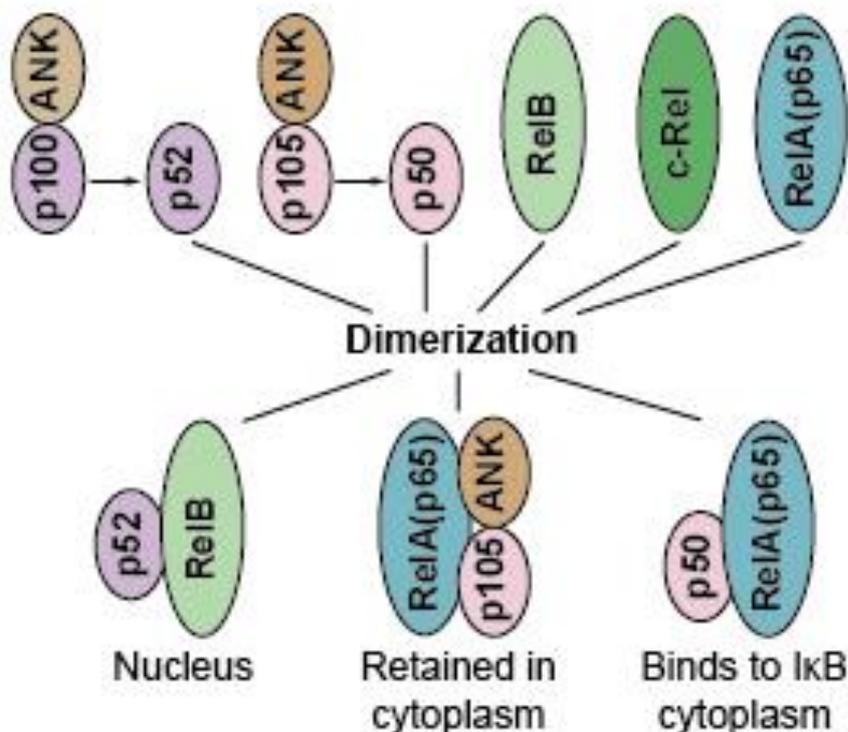


Рис. 2. Варианты димеризации белков семейства NF-κB [<https://www.creative-diagnostics.com/The-NF-kB-Signaling-Pathway.htm>]

Каноническая передача сигналов начинается с рецептора провоспалительных цитокинов на клеточной поверхности или с рецепторов патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), таких как рецептор фактора некроза опухоли (TNFR), толл-подобных рецепторов (TLR) и рецепторов Т / В-клеток (рис.3). Эти рецепторы связываются со своими лигандами и передают сигнал через клеточную мембрану, вызывая активацию комплекса киназы IκB (IKK).

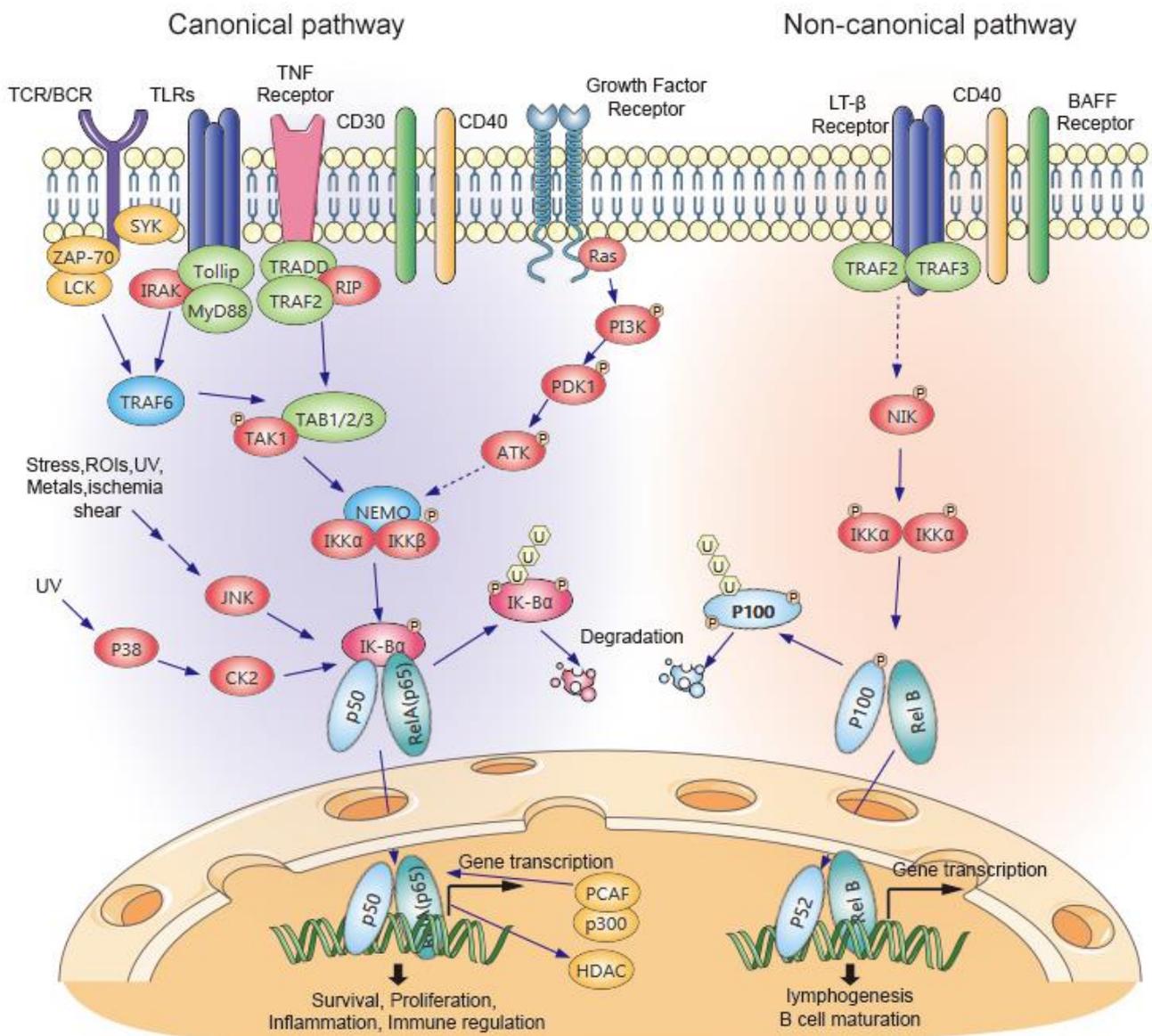


Рис. 3. Схема сигнального пути NF-κB [https://www.creative-diagnostics.com/The-NF-κB-Signaling-Pathway.htm]

IKK фосфорилирует белки IκB, что приводит к изменению его конформации и делает доступными сайты убиквитинилирования. Убиквитинилированные белки IκB подвергаются деградации в протеосомах, освобождая димерные белки NF-κB, которые транспортируются в ядро и активируют транскрипцию генов.

Среди таких генов, — ген, кодирующий $I\kappa B\alpha$, который после синтеза белка опять связывается с $NF\kappa B$, блокируя его. Таким образом происходит отрицательная обратная связь, которая реализуется в течении часа. Так же активируется транскрипция генов цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, TNF- α , GM-CSF), хемокинов (IL-8, MCP-1, MIP-1, MIP-2 RANTES), ферментов (COX2, iNOC, PLA2), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1, ECAM-1, E-селектин), системы апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL, IAP-1, 2, FLIP) и другие. Еще одной важной мишенью $IKK\beta$ является Trp2 (Tumor Progression Locus 2). Фосфорелирование Trp2 (является MAPKKK) приводит к его активации и передачи сигналов через MAPK сигнальный путь (рис. 4).

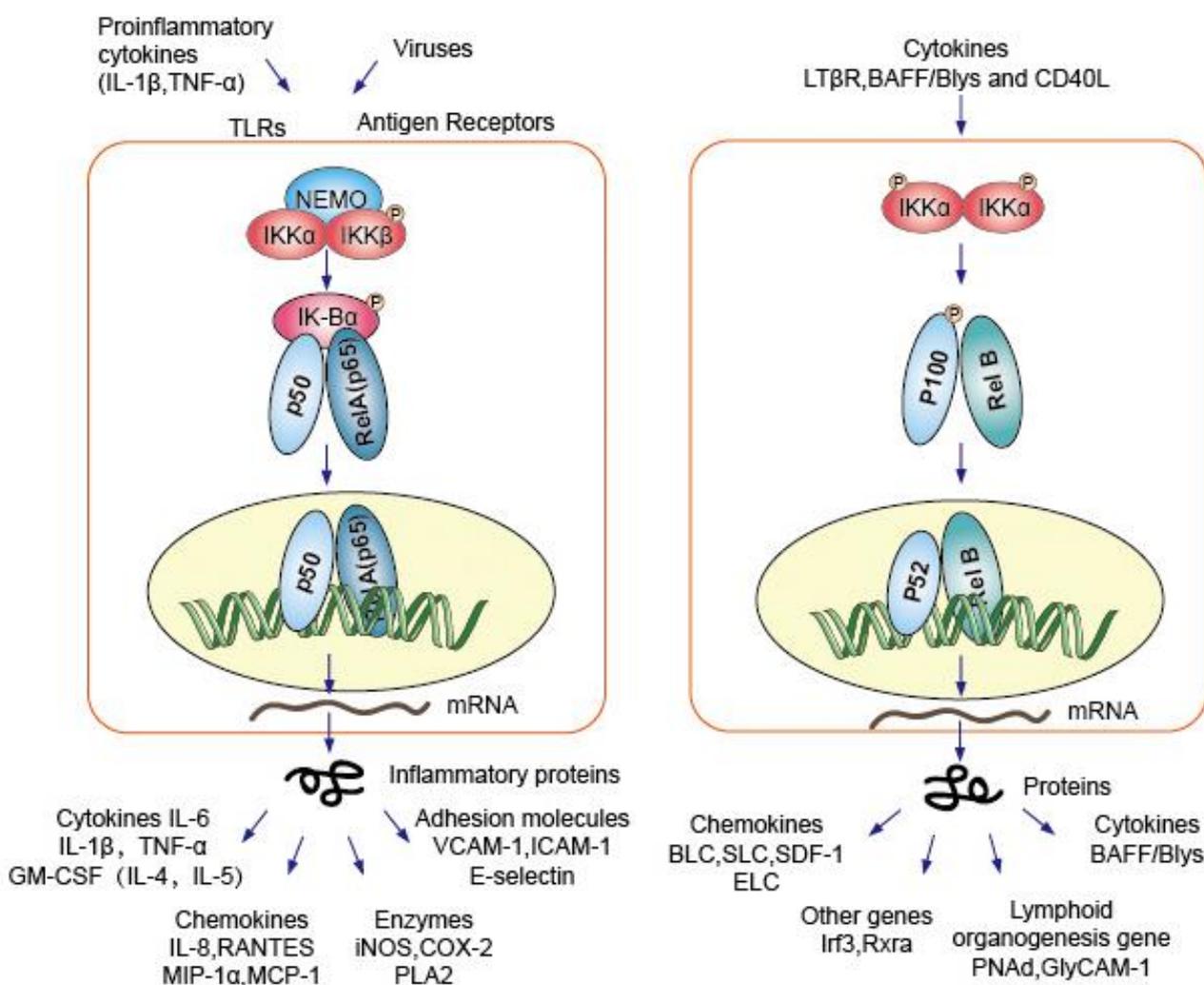


Рис. 4. Мишени активации сигнального пути $NF\kappa B$ [<https://www.creative-diagnostics.com/The-NF-kB-Signaling-Pathway.htm>]

Еще один путь активации $NF\kappa B$ называется неканоническим или альтернативным. Этот путь не зависит от $IKK\beta$ и $IKK\gamma$, но зависит от гомодимера $IKK\alpha$. Передача сигналов в цитоплазму по этому сигнальному пути происходит через рецепторы $LT\beta$, $CD40$ или $BAFF$. После активации рецепторы передают

сигнал через белки TRAF 2 и 3 (TNF receptor-associated factor 2 и 3), которые инициируют фосфорилирование белка NIK (NF-κB-inducing kinase). Протеинкиназа NIK затем фосфорилирует гомодимеры IKKα. Мишенью гомодимеров IKKα в этом пути является NF-κB2/p100, который фосфорилируется по двум С-концевым сайтам. Фосфорилирование этих сайтов важно для процессинга p100 до p52, который также зависит от полиубиквитинирования и протеасомной деградации. Однако, вместо того, чтобы привести к полной деградации p100, как это происходит с IκB, убиквитинирование p100 инициирует только деградацию его ингибирующего С-концевого домена. Как только С-концевой домен разрушается, N-концевая часть NF-κB (полипептид p52) высвобождается. Поскольку p100 чаще всего связан с RelB, активация этого «альтернативного» пути приводит к ядерной транслокации димеров p52-RelB. Предполагается, что альтернативный путь играет центральную роль в экспрессии генов, участвующих в развитии и поддержании вторичных лимфоидных органов. Димер p52-RelB активирует транскрипцию генов участвующих в органогенезе лимфоидных органов (PNA_d, glyCam-1), хемокинов осуществляющих хоуминг В клеток в лимфоидные ткани (BLC, SLC, SDF-1, ELC), цитокинов (BAFF/Blys) и ряда других генов (ICAM, Irf3, Rxa).

2.2 Сигнальный путь PI3K-AKT

PI3K-Akt – это путь внутриклеточной передачи сигнала, который способствует пролиферации, выживанию клеток, росту и ангиогенезу в ответ на внеклеточные сигналы. Ключевые белки – это фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) и Akt / протеинкиназа В. Передача сигнала начинается от поверхностного рецептора с протеинкиназной активностью (RTK, receptor tyrosine kinase). RTK представляют собой высокоаффинные рецепторы клеточной поверхности для многих факторов роста, цитокинов и гормонов (инсулин, IGF-1, EGF, FGF, PDGF и др.). Этот рецептор имеет три функциональных домена: домен связывания с лигандом, трансмембранный домен и внутриклеточный домен с тирозинкиназной активностью. Когда лиганды, такие как факторы роста, связываются с RTK, два мономера RTK сближаются и образуют димер, что приводит к активации внутриклеточного домена с тирозинкиназной активностью и автофосфорилированию RTK. Дальнейшая передача сигнала от рецептора внутрь клетки связана с активацией PI3K.

PI3K является членом семейства липидкиназ, которая способна фосфорилировать гидроксильную группу в 3 положении инозитольного кольца фосфатидилинозитола. PI3K состоит из двух доменов: каталитического домена p110 (серин-треонин протеинкиназа) и регуляторного домена p85. Каталитическая субъединица (p110) имеет четыре подтипа: p110α, p110β, p110γ и p110δ (серин-треонин протеинкиназа), а регуляторная субъединица существует в семи вариантах: p85α, p85β, p55α, p55γ, p50α, p101 и p87. Семейство ферментов PI3K подразделяется на 3 основных класса (I, II и III) по их первичной структуре,

субстратной специфичности и регуляции. Каталитические субъединицы для PI3K класса I. представляют собой p110 α , p110 β , p110 γ и p110 δ (которые являются продуктами генов PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG и PIK3CD соответственно). Класс I PI3K является наиболее охарактеризованным семейством и представленным у человека. У млекопитающих PI3K класса I присутствуют во всех типах клеток, при этом p110 γ и p110 δ присутствуют больше в лейкоцитах. Субъединицы p110 первоначально были разделены на класса IA (p110 α , p110 β и p110 δ), которые связывают регуляторную субъединицу типа p85, p55, p50 и класса IB (p110 γ), которых связывает субъединицы p101 и p87 (рис. 5).

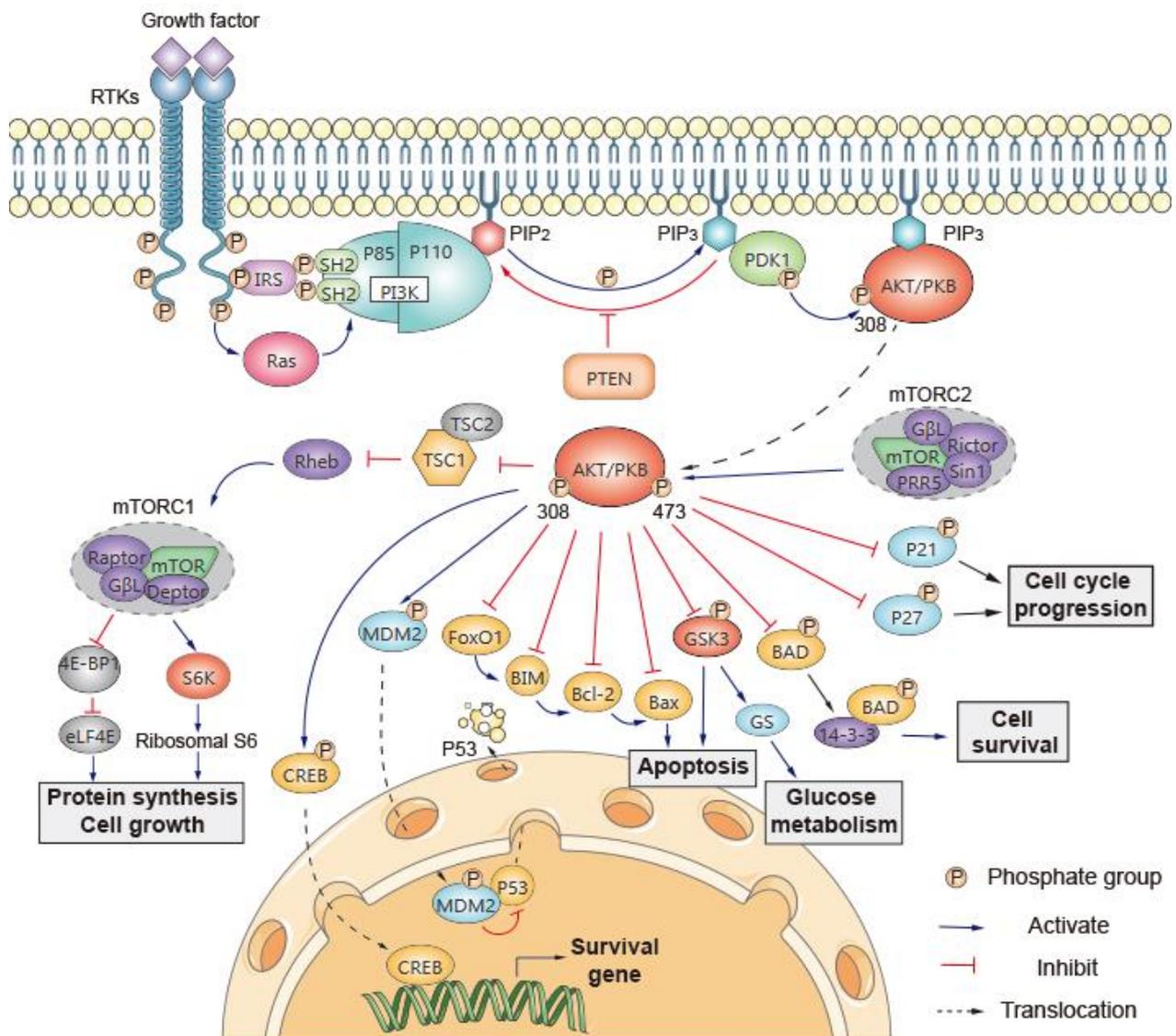


Рис. 5. Мишени активации сигнального пути NF- κ B [<https://www.creative-diagnostics.com/PI3K-AKT-Signaling-Pathway.htm>]

PI3K класса II были обнаружены на основе их гомологии последовательностей с PI3K класса I и класса III, а не в функциональном контексте. У млекопитающих есть 3 известных члена, PI3K-C2 α (PIK3C2A),

PI3K-C2 β (PIK3C2B) и PI3K-C2 γ (PIK3C2G), однако, мало известно о роли этого семейства в передаче сигнала. PI3K класса III имеют только одного известного представителя – это вакуолярный сортировочный белок 34 или VPS34 (vacuolar protein sorting), но его физиологическое значение остается неясным.

Активация PI3K обычно происходит в результате прямой стимуляции через регуляторную субъединицу (SH2 домены p85), связанную с активированным рецептором (с участками фосфорилированного тирозина), например, при взаимодействии с рецепторами ассоциированными с G белками (GPCR, G-protein-coupled receptors), или косвенной активации через адапторные молекулы, такие как белки субстрата инсулинового рецептора (IRS, insulin receptor substrate), GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), которые связываются с фосфорелированными концами рецепторов через домены SH2. Активированный GRB2 своим С-концевым доменом SH3 связывается с двумя богатыми пролином последовательностями в Grb2 ассоциированным белком (Gab, Grb2-associated binder). Взаимодействие Gab с Grb2 инициирует его фосфорилирование и появление сайтов связывания для многих белков: PI3K, SHP2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2), фосфолипаза C (PLC, phospholipase C), Ras ГТФаза активирующий белок (RasGAP, Ras-GTPase-activating protein), которые он активирует и выступает в качестве адапторного белка. p85 узнает своим SH2 доменом мотив фосфо-YXXM (где, XX – любые аминокислоты) и изменяет свою конформацию активируясь. PI3K может также активироваться малыми GTP-связывающими белками Ras или Rab-5A (чаще p110 β). Взаимодействие PI3K с фосфорилированным тирозином приводит к аллостерической активации фермента.

Активированная PI3K фосфорилирует фосфатидилинозитол-4,5 бисфосфат (PIP₂), превращая его в инозитол-3,4,5-трисфосфат (PIP₃). PIP₂ присутствует в небольшом количестве во внутренней половине липидного бислоя плазматической мембраны в виде фосфолипидов. PIP₃ рекрутирует к плазматической мембране две несущие PH-домены протеинкиназы — Akt (также известную как протеинкиназа B, или PKB) и фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу 1 (Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1, PDK1). После такого взаимодействия PDK1, активируется и фосфорилирует 308 тирозин в расположенном рядом домене PKB / Akt. Дополнительный сайт в концевом гидрофобном мотиве S473 Akt фосфорилируется посредством mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2) или ДНК зависимой протеинкиназой (DNA-ПК), инициируя активацию Akt.

У млекопитающих существует три изоформы серин / треонинкиназы АКТ: АКТ1 (PKB α), АКТ2 (PKB β) и АКТ3 (PKB γ), которые являются ключевыми молекулами в пути передачи сигнала PI3K. Аминокислотная структура АКТ, включает домен гомологии плекстрина (PH), центральный каталитический домен и концевой гидрофобный регуляторный домен. PH домен способствует взаимодействию АКТ с PIP₃; каталитический домен содержит сайты связывания АТФ, а концевой домен богат пролином. Считается, что фосфорилирование АКТ является изоформ-специфичным. Более того, активация и стабилизация АКТ

регулируется фосфорилированием множества сайтов, кроме двух основных сайтов. АКТ1 имеет 31 потенциальный сайт фосфорилирования, АКТ2 имеет 22 сайта фосфорилирования, а АКТ3 имеет 18 сайтов.

Разные изоформы Akt имеют большинство одинаковых субстратов, однако, были установлены и специфические. Все изоформы Akt способны фосфорилировать PRAS40 (богатый пролином субстрат Akt с молекулярной массой 40 кДа), но только Akt1 может фосфорилировать связанный с актином белок палладин, а AS160, только Akt2.

Активированная Akt фосфорилирует различные белки-мишени плазматической мембраны, цитозоля и ядра. Субстратом Akt являются белки связанные с апоптозом, ростом и пролиферации клетки. Akt увеличивает выживаемость клеток, блокируя экспрессию проапоптотических белков семейства Bcl-2 содержащих 3 домена BH (Bcl-2 homolog) (Bax, Bim и др.), путем воздействия на транскрипционные факторы, такие как FoxO1 (Forkhead box protein O1) и p53. Семейство Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) у человека включает более 20 белков, которые выполняют как проапоптотическую так и антиапоптотическую функцию. Akt может способствовать деградации p53 посредством фосфорилирования и активации MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), который взаимодействует с p53 и инициирует его протеосомальную деградацию, т.к. является E3 убиквитин-протеин лигазой. Еще одной мишенью РКВ является протеинкиназа GSK3 (Glycogen synthase kinase 3), которая инактивируется после фосфорилирования по N-концевому регуляторному сайту. GSK3 отвечает за метаболизм глюкозы и регуляцию апоптоза (активатор).

Мишенями РКВ являются белки синтеза и роста клеток. Одна из наиболее консервативных функций Akt - это его роль в стимулировании роста клеток за счет ингибирования TSC 1, TSC 2 (Tuberous Sclerosis Complex) и косвенной активации комплекса mTOR 1 (mTORC1), который ограничивала TSC2. mTORC1 является критическим регулятором инициации трансляции и биогенеза рибосом, играет эволюционно консервативную роль в контроле роста клеток. Он может активировать S6K и эукариотический иницирующий фактор 4E (eIF4E) - связывающий белок 1 (4E-BP1). S6K может активировать рибосомный S6 и способствовать синтезу белка и росту клеток.

Akt способен активировать AS160 (Akt substrate of 160 kDa или TBC1, domain family member 4, TBC1D4), TBC1D1 и PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2). TBC1D1 и TBC1D4 участвуют в транслокации транспортера глюкозы GLUT4 к плазматической мембране. PFKFB2, участвует как в синтезе, так и в деградации фруктозо-2,6-бисфосфата, регуляторной молекулы, которая контролирует гликолиз у эукариот.

Akt фосфорилирует белки, регулирующие клеточный цикл и пролиферацию. Функция белков P21 (Waf1, Cip1) и P27 (Kip2) - поддерживать клетку в состоянии покоя в фазе G1, за счет ингибирования белков CDK. Белок Akt может также фосфорилировать P21, P27 и ингибировать их антипролиферативные эффекты, удерживая в цитоплазме. Таким образом, он может способствовать переходу клетки в синтетическую фазу и пролиферации.

Кроме того, было показано, что Akt регулирует белки, участвующие в работе нейронов, включая рецептор ГАМК, ataxin-1 и белки хантингтина. Akt способствует миграции и инвазии клеток посредством фосфорилирования палладина и виментина. Akt также регулирует передачу сигналов NF-κB путем фосфорилирования IKKα. Фосфорилирует транскрипционный фактор CREB в 133 положении серина, активируя его и инактивируя GSK3, которая блокирует действие CREB. CREB (cAMP response element-binding protein) активирует транскрипцию генов метаболизма (PEPCK, цитохром С, аминокислотсинтаза), ростовых факторов (BDNF, FGF6, инсулин), антиапоптотических белков Bcl-2, белков клеточного цикла (циклин D1 и циклин А) и транскрипционных факторов (ATF-3, STAT3, c-Fos). Akt способен активировать фосфорилированием эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), которая синтезирует NO, поддерживающий кардиоваскулярный гомеостаз. Мишенью Akt являются и некоторые другие белки клетки.

Обратная регуляция сигнального пути PI3K-Akt представлена несколькими белками: PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), белок фосфатазы 2A (PP2A, Protein phosphatase 2A), PHLPP (PH domain Leucine rich repeat Protein Phosphatases) (рис. 6).

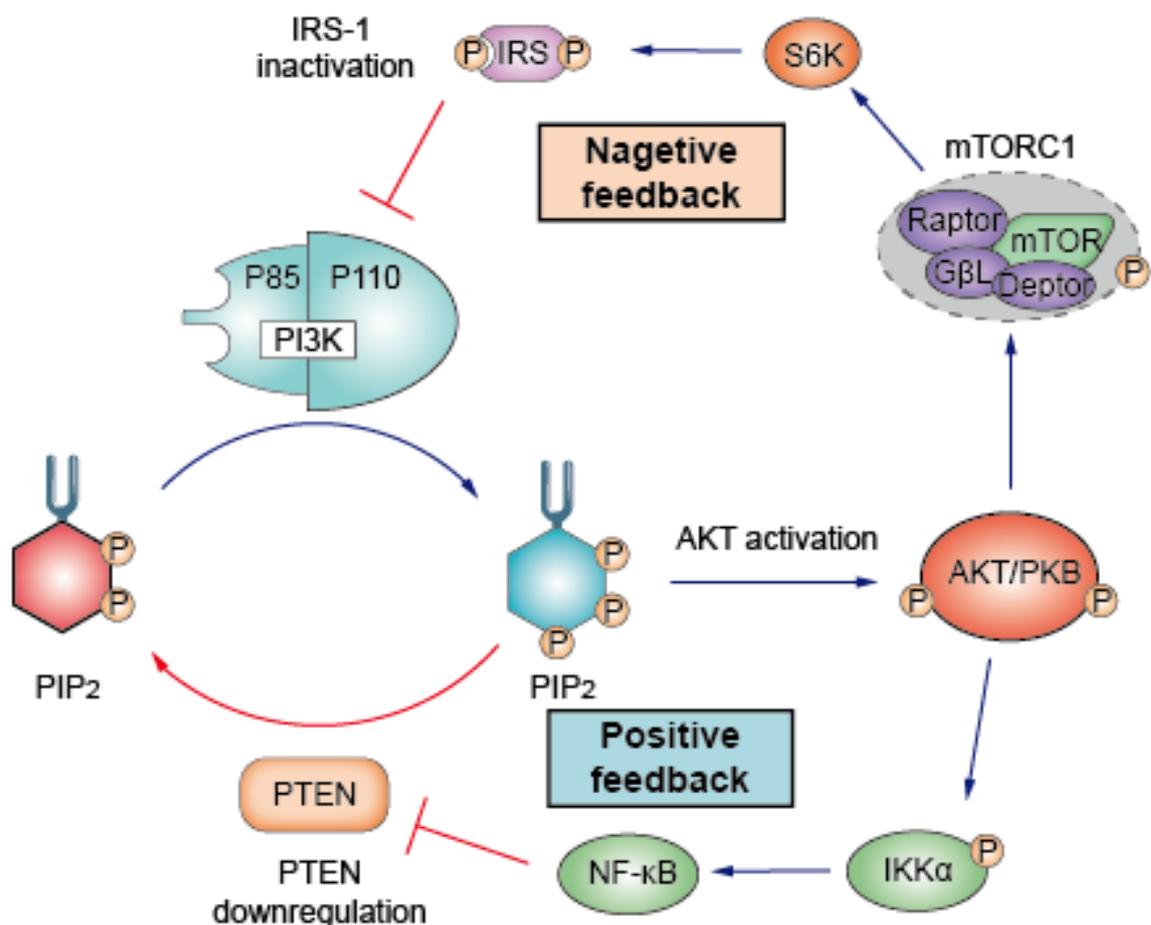


Рис. 6. Схема регуляции PI3K-Akt сигнального пути [<https://www.creative-diagnostics.com/PI3K-AKT-Signaling-Pathway.htm>]

PTEN является основным регулирующим белком, который может превращать PIP3 в PIP2, путем дефосфорилирования. PP2A способна дефосфорилировать Akt по Thr308, а фосфатаза PHLPP дефосфорилирует Akt по Ser473. Еще одним регулятором является mTORC1, который активирует транскрипцию S6K1, способную фосфорилировать IRS-1 по нескольким сериновым остаткам, предотвращая связывание с RTK и мешая активации PI3K.

В свою очередь активируемый Akt NF-κB путь инициирует транскрипцию PPAR β/δ (peroxisome-proliferator-activated receptor β/δ) и фактор некроза опухоли α (TNFα), которые подавляют экспрессию PTEN, являясь примером положительной регуляции.

2.3 Сигнальный путь MAPK / ERK

Каскад ERK (extracellular-signal-regulated kinase) активируется множеством внеклеточных агентов, включая факторы роста (EGF, FGF, PDGF), гормоны (фолликулостимулирующий гормон и лютеинизирующий гормон), цитокины (IL-1, TNF-α, LPS) и нейротрансмиттеры (дофамин, серотонин, глутамат), вызывая, в основном, пролиферацию и дифференцировку. Иницируется мембранными рецепторами, такими как RTK (реакция на ультрафиолет), рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), ионные каналы (кальциевый канал), интегрины и др. Эти рецепторы передают сигнал, рекрутируя адаптерные белки (Grb2, Shc, Crk и др.) и промежуточные белки (SOS, C3G и др.), которые, в свою очередь, вызывают активацию Ras или Rap1 на плазматических мембранах (рис. 7).

Передача сигналов через большинство RTK и интегринов связана с адаптерными белками IRS1, SHC (Src homology 2 domain containing transforming protein), FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate 2), которые взаимодействуют с рецептором и фосфорилируются. Они заякориваются на мембране за счет взаимодействия с PIP3 и с ними способен взаимодействовать Grb2, который связывается с фосфорилированными участками через домены SH2. После этого GRB2 посредством домена SH3 связывается с двумя богатыми пролином последовательностями Gab, инициирует его фосфорилирование и появление сайтов связывания для многих белков: PI3K, SHP2, PLC и др. Кроме того с SH3 доменом GRB2 связывается богатый пролином конец белка, кодируемый геном SOS (Son of Sevenless, относится к Ras-GEF), который тоже способен заякориваться на мембране за счет взаимодействия с PIP3 своим PH доменом. SOS стимулируют диссоциацию GDP, последующий захват GTP из цитозоля и его присоединение к белку Ras, что активирует его. Когда SOS активирует Ras, Ras еще сильнее стимулирует SOS, и образуется простая положительная обратная связь.

Еще один путь передачи сигнала через белки Ras связан с активацией Gab фосфолипазы C (PLC). Фосфолипаза C гидролизует фосфатидилинозитол (PIP2) на два вторичных медиатора инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы вовлекаются в последующие этапы сигнальных путей. В

частности, они модулируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и протеинкиназу С, соответственно. IP₃ является вторичным мессенджером и мигрирует к эндоплазматическому ретикулуму (ЭР), где взаимодействует с кальциевыми каналами, увеличивая цитоплазматический уровень кальция, который необходим для активации РКС. Кальций является универсальным внутриклеточным медиатором и в норме в цитоплазме его концентрация мала ($\sim 10^{-7}$ М), в то время как в ЭР и внеклеточном пространстве значительно выше ($\sim 10^{-3}$ М), что создает градиент концентрации ионов Ca²⁺. Градиент концентрации ионов позволяет в секунды, при открытии каналов, увеличить концентрации в цитозоле кальция в десятки раз и активировать Ca²⁺-зависимые белки клетки, такие как РКС.

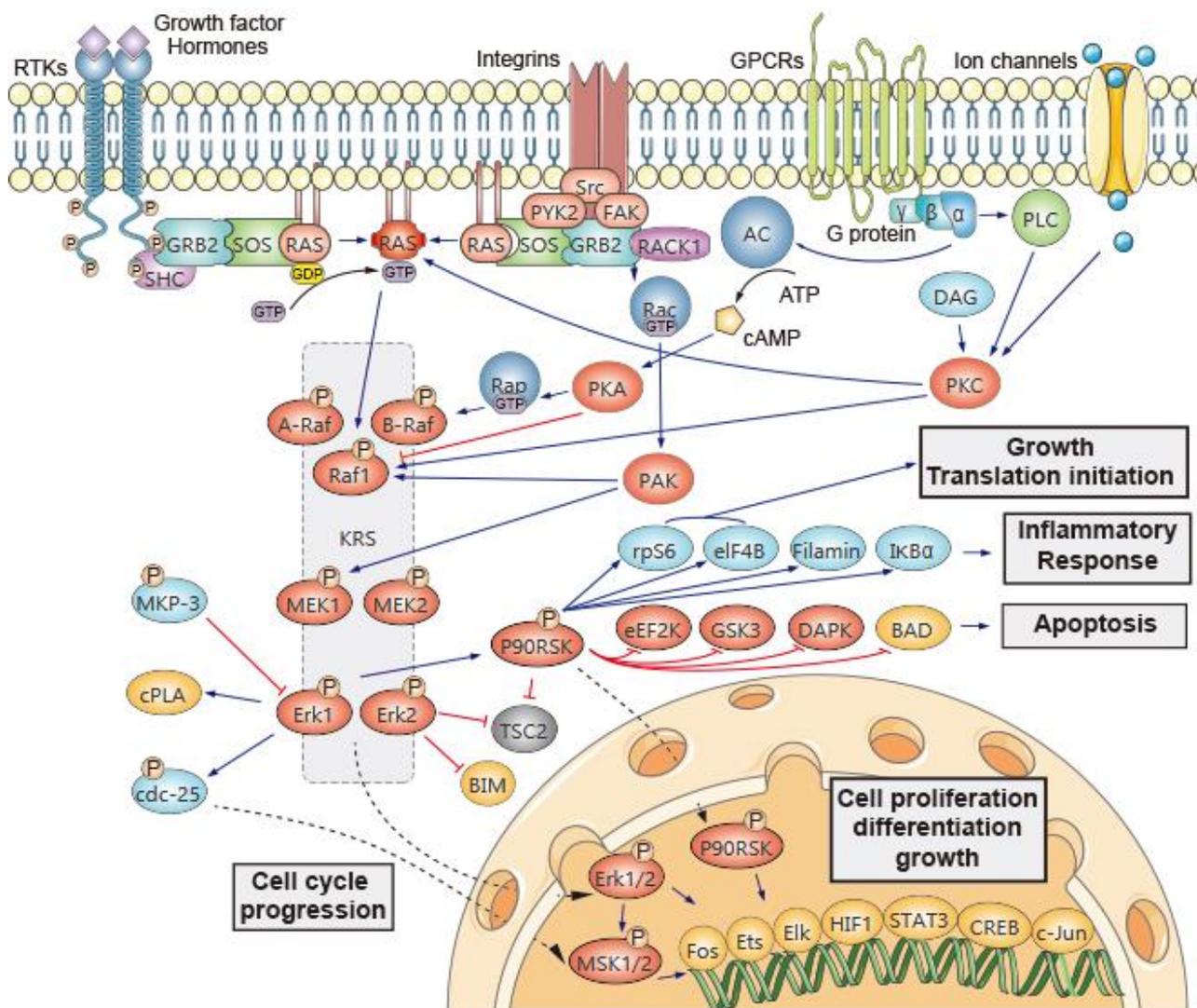


Рис. 7. Схема сигнального пути ERK [https://www.creative-diagnostics.com/Erk-Signaling-Pathway.htm]

Поддержание низкой концентрации кальция в цитоплазме способствуют Ca²⁺-насос, использующий энергию гидролиза АТФ для откачки Ca²⁺ из цитозоля. Мышечные и нервные клетки, интенсивно использующие кальциевую сигнализацию, несут на мембране дополнительный транспортный белок Ca²⁺

(Na^+ -зависимый Ca^{2+} -обменник), сопрягающий выходящий ток Ca^{2+} с входящим током Na^+ . Еще один переносчик кальция находится в мембране ЭР (Ca^{2+} -насос) и позволяет ЭР захватывать из цитозоля большое количество Ca^{2+} против значительного градиента концентрации. Самым важным белком инициирующим передачу сигнала через увеличение кальция внутри цитозоля является кальмодулин, содержащийся во всех эукариотических клетках (до 1 % всей массы белка клетки). Кальмодулин содержит четыре активных сайта связывания ионов Ca^{2+} . Связывание с кальмодулином ионов кальция вызывает его конформационные изменения и способность связываться с белками-мишенями, т.к. он не обладает ферментативной активностью. Мишенями кальмодулина являются ферменты и мембранные транспортные белки (всего более 40 мишеней). Например, кальмодулин активирует Ca^{2+} -насос плазматической мембраны, который используя энергию гидролиза АТФ, осуществляет удаление кальция из цитозоля и возвращает уровень кальция к первоначальному уровню, что является примером обратной регуляции. Кальций также может активировать семейство серин-треониновых протеинкиназ Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых киназ (CaM-киназ). Некоторые CaM-киназы фосфорилируют белки-регуляторы генов, например, белок CREB, и таким образом активируют или ингибируют транскрипцию генов. Наиболее изученной является CaM-киназа II, которая чаще всего встречается в нервной ткани.

DAG может быть расщеплен с высвобождением арахидоновой кислоты, которая сама по себе может служить сигнальной молекулой или может быть использована для синтеза других малых липидных сигнальных молекул — эйкозаноидов. Второй функцией диацилглицерина является активация важной серинтреониновой протеинкиназы, которая, поскольку она зависима от Ca^{2+} , носит название протеинкиназы C (Protein Kinase C, PKC). Начальное вызванное IP₃ повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле влияет на PKC таким образом, что она переносится из цитозоля на цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны. Там она активируется сочетанием Ca^{2+} , диацилглицерина и отрицательно заряженного мембранного фосфолипида фосфатидилсерина. Еще одним источником Ca^{2+} являются мембранные кальциевые каналы, работа которых так же связана с активацией PKC. Активированная PKC фосфорилирует белки-мишени, характерные для данного типа клеток. Например, в мозге PKC активирует белок SOS. Третьей функцией DAG является прямая активация Ras-GRP, путем его заякоривания на мембране, а также косвенно посредством PKC-опосредованного фосфорилирования Ras-GRP. Ras-GRP (RAS guanyl nucleotide-releasing protein) способствует специфической активации Ras, путем замены GDP на GTP в составе белка и играет важнейшую роль в активации, развитии и дифференцировке T и B лимфоцитов. Ras-GRP это семейство белков выполняющие свои функции в разных клетках, так RasGRP1 участвует в активации и передачи сигнала от TCR (T cell receptor), а RasGRP1 и RasGRP3 играет роль в B клетках (передача сигнала от BCR), RasGRP2, через Rap, играет роль в контроле адгезии тромбоцитов, тогда как RasGRP4 контролирует активацию Ras в тучных клетках.

Активация каскада ERK еще связана с рецепторами, сопряженными с G-белком (G-Protein-Coupled Receptor, GPCR). GPCR включают самое крупное семейство поверхностных рецепторов, передающих сигналы от гормонов, нейромедиаторов, хемокинов, включает световые, вкусовые и обонятельные рецепторы. У человека обнаружено более 700 таких рецепторов, лигандами которых являются не только белки и пептиды, но и производные аминокислот, жирных кислот, фотоны света и множество других химических соединений, связанных со вкусом и запахом. При этом один и тот же лиганд может активировать разных представителей семейства GPCR, так серотонин активирует 14 представителей, адреналин – 9, ацетилхолин – 5 и т.д. Разные представители GPCR, реагирующие на один лиганд представлены на разных клетках и опосредуют разные ответы. Суперсемейство GPCR включает 5 семейств: радопсиновые рецепторы, секретинное, глутаматовое, семейство молекул адгезии и frizzled/taste2 семейство.

Несмотря на большое число представителей и выполняемых функций, все белки GPCR имеют сходное строение и состоят из полипептидной цепи пересекающих мембрану семь раз. Еще одно сходство связано с ассоциацией некоторых представителей этих рецепторов с G – белками.

Когда лиганд связывается с GPCR, он вызывает конформационные изменения в GPCR, что позволяет ему действовать как фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF). Затем GPCR может активировать связанный G-белок, заменяя в его составе GDP на GTP. G-белок связан с цитоплазматической мембраной и в некоторых случаях физически связан с рецептором до его активации, тогда как в других – он связывается только с активированным рецептором. G-белки состоят из трех субъединиц — α , β и γ . В неактивном состоянии α -субъединица связана с GDP, а после замены на GTP, G-белок активируется и освобождаются сайты связывания с мишенями. Это происходит двумя путями: либо после связывания с GTP из комплекса диссоциирует α -субъединица, либо изменяется конформация таким образом, что α -субъединица перестает закрывать активный центр G-белка. Мишенями G-белка служат ферменты или ионные каналы плазматической мембраны, передающие сигнал внутрь клетки. α -субъединица является GTPазой и гидролизует GTP до GDP, способствуя обратной перестройке в G-белке (или повторной ассоциации с ним), приводящей его в неактивную форму. Ускорению гидролиза способствует связывание α -субъединицы с белком RGS (Regulator of G protein Signaling), который служит GTPаза-активирующим белком (GAP) и ускоряет гидролиз GTP. У человека существует 25 белков RGS, каждый из которых взаимодействует со своим специфическим набором G-белков.

G-белки в зависимости от α -субъединицы делятся на четыре семейства: G_i , G_s , $G_{12/13}$ и $G_{q/11}$. Семейства G_s и G_i регулируют активность аденилатциклазы, тогда как G_q активирует фосфолипазу $C\beta$, а $G_{12} / 13$ может активировать малые семейства GTPаз. Белки семейства G_s (стимулирующие G белки) способны активировать аденилилциклазу, в то время как белки семейства G_i (ингибирующие G белки) ингибируют аденилилциклазу, через регуляцию

ионных каналов. Аденилатциклаза представляет собой трансмембранный белок с каталитическим внутриклеточным доменом. У млекопитающих обнаружено 8 изоформ аденилатциклазы. Gs-ассоциированный с GTP, контактируя с аденилатциклазой, активирует ее до момента гидролиза GTP до GDP. Активированная аденилатциклаза из АТФ синтезирует циклическую АМР (сАМР). сАМР служит внутриклеточным медиатором и обычно находится в цитозоле на низком уровне (10^{-7} М), но внеклеточный сигнал способен за секунды увеличить ее концентрацию более чем в двадцать раз. Гидролиз сАМР осуществляют сАМР-фосфодиэстеразы, до аденозин-5'-монофосфата (5'-АМР). В большинстве клеток действие циклического АМР опосредовано активацией циклической АМР-зависимой протеинкиназы (Cyclic AMP-dependent Protein Kinase, PKA), Ерас (Exchange protein activated by сАМР) и ионных каналов (cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGC) аллостерическим путем. PKA состоит из комплекса двух каталитических субъединиц и двух регуляторных субъединиц. Связывание сАМР с регуляторными субъединицами изменяет их конформацию и инициирует диссоциацию каталитических субъединиц от регуляторных. Каталитические субъединицы активируются и фосфорилируют белки-мишени, в которых открыт мотив аргинин-аргинин-Х-серин (Х – любая аминокислота). Белки-мишени PKA включают фосфорилирование IκB и активацию NF-κB, подавление NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells), CREB, PPARα (Peroxisome proliferator-activated receptors), COX9 (cytochrome c oxidase subunit 9), Bad (BCL2 associated agonist of cell death), Rho (входит в суперсемейство мономерных GTPаз Ras), Raf1 (протеинкиназа семейства MAPKKK), Gli3 (транскрипционный фактор, в основном репрессор), активирует множество ионных каналов и обменников Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} и Cl^{-} .

сАМР активирует белки Ерас 1 и 2, являющиеся факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) для Rap1 и Rap2, а также, вероятно, и для некоторых других белков суперсемейства Ras. Наконец, сАМР способна связываться с катионными каналами HCN (hyperpolarizing cyclic nucleotide-gated), CRIS (cyclic nucleotide receptor) и Popdc (Popeye domain containing).

Передача сигнала от RTK может происходить и через белки CRK-C3G. CRK – это семейство адапторных белков, включающих трех членов: CRKI, CRKII и CRK-подобный белок (CRKL). CRK связываются с рецепторами факторов роста (EGFR, TrkA, IGF-R, PDGFRα, VEGFR, Met, EphB2), рецепторами интегринов (через адапторные белки семейств Cas, Cap и комплекса IPP), бактериальных и вирусных патогенов и апоптотических клеток. Белки CRK содержат домены связывания с фосфорилированным мотивом SH2 и домен SH3, связывающийся с пролин богатыми регионами белков. Так, например, CRKL состоит из N-концевого домена SH2, за которым следуют два домена SH3 (SH2-SH3N-SH3C). Домены SH2 CRKL связываются со специфическим мотивом (Y-x-x-P), присутствующим в стыковочных белках, таких как p130CAS (известный как BCAR1), паксиллин и GAB. N-концевой домен SH3 связывается с белками, которые содержат мотив, богатый пролином (PxxPxK), такими как SOS,

RAPGEF1 (известный как C3G), p85 и BCR-ABL1. Все белки активируемые CRKL инициируют обмен GDF на GTF в белках семейства Ras.

Инициация сигнального пути MAPK / ERK может происходить разными путями, но все они связаны с активацией белков семейства Ras. Суперсемейство Ras включает более 50 членов и состоит из множества семейств мономерных GTPаз, но только семейства Ras и Rho передают сигналы от поверхностных рецепторов. Ras GTPазы имеют несколько общих черт: их молекулярная масса составляет 18–28 кДа, способность связывать и гидролизовать GTP. У человека семейство Ras представлено в основном H-Ras (Harvey-Ras), K-Ras (Kirsten-Ras), N-Ras (Neuroblastoma-Ras), Rap1 и Rheb, а семейство Rho - Rho, Rac и Cdc42. H-Ras, K-Ras и N-Ras размером 21 кДа и участвуют в передаче сигналов от RTK, Rap1 активируется cAMP-зависимой GEF и влияет на адгезию клеток за счет активации интегринов, а Rheb активирует mTOR для стимуляции клеточного роста. Представители семейства Rho передают сигналы от поверхностных рецепторов на цитоскелет и другие органеллы (рис. 8).

Несмотря на то, что белки семейств Ras и Rho выполняют различные функции, действуют они по одному и тому же принципу. Эти белки содержат одну или несколько ковалентно связанных липидных групп, закрепляющих белок на цитоплазматической мембране. Белки суперсемейства Ras имеют два различных конформационных состояния: активное — при связанном GTP и неактивное — при связанном GDP. Поэтому на активность этих белков действуют факторы обмена гуаниновых нуклеотидов Ras (Ras-GEF), которые стимулируют диссоциацию GDP и последующий захват GTP из цитозоля и GTPаза-активирующие белки Ras (Ras-GAP), увеличивающие скорость гидролиза связанного GTP, т. е. инактивируют белки Ras.

Фосфорилирование тирозина и активация Ras активированными RTK обычно непродолжительны и тирозин-специфичные протеинфосфатазы быстро снимают фосфорилирование, а GAP индуцируют инактивацию активированных Ras за счет гидролиза GTP до GDP. Поэтому для стимуляции дифференцировки или пролиферации клеток, эти короткоживущие сигнальные процессы должны передать сигнал в ядро для изменения профиля экспрессии генов. Для этого используются белки митоген-активируемого протеинкиназного модуля (Mitogen-activated Protein Kinase Module, MAPK модуль). Белки MAPK высококонсервативные и практически идентичны у всех организмов от дрожжей до человека. MAPK модуль включает три белка, являющихся протеинкиназами. Последняя в каскаде названа MAP-киназой (MAPK), перед ней киназа MAP-киназы (MAPKK), которая фосфорилирует и активирует MAP-киназу. Первый компонент, который активирует Ras, называется киназой киназы MAP-киназы (MAPKKK), которая фосфорилирует и активирует MAPKK. У млекопитающих эти киназы называются: Raf (= MAPKKK), Mek (= MAPKK) и Erk (= MAPK). Для разделения ответов от разных рецепторов используются каркасные белки, предотвращающие пересечения между MAP-киназными модулями, что позволяет одновременно функционировать, по крайней мере, 5 параллельным

МАР-киназным модулям. В этих модулях содержится не менее 7 Raf, 7 Mek и 12 Erk.

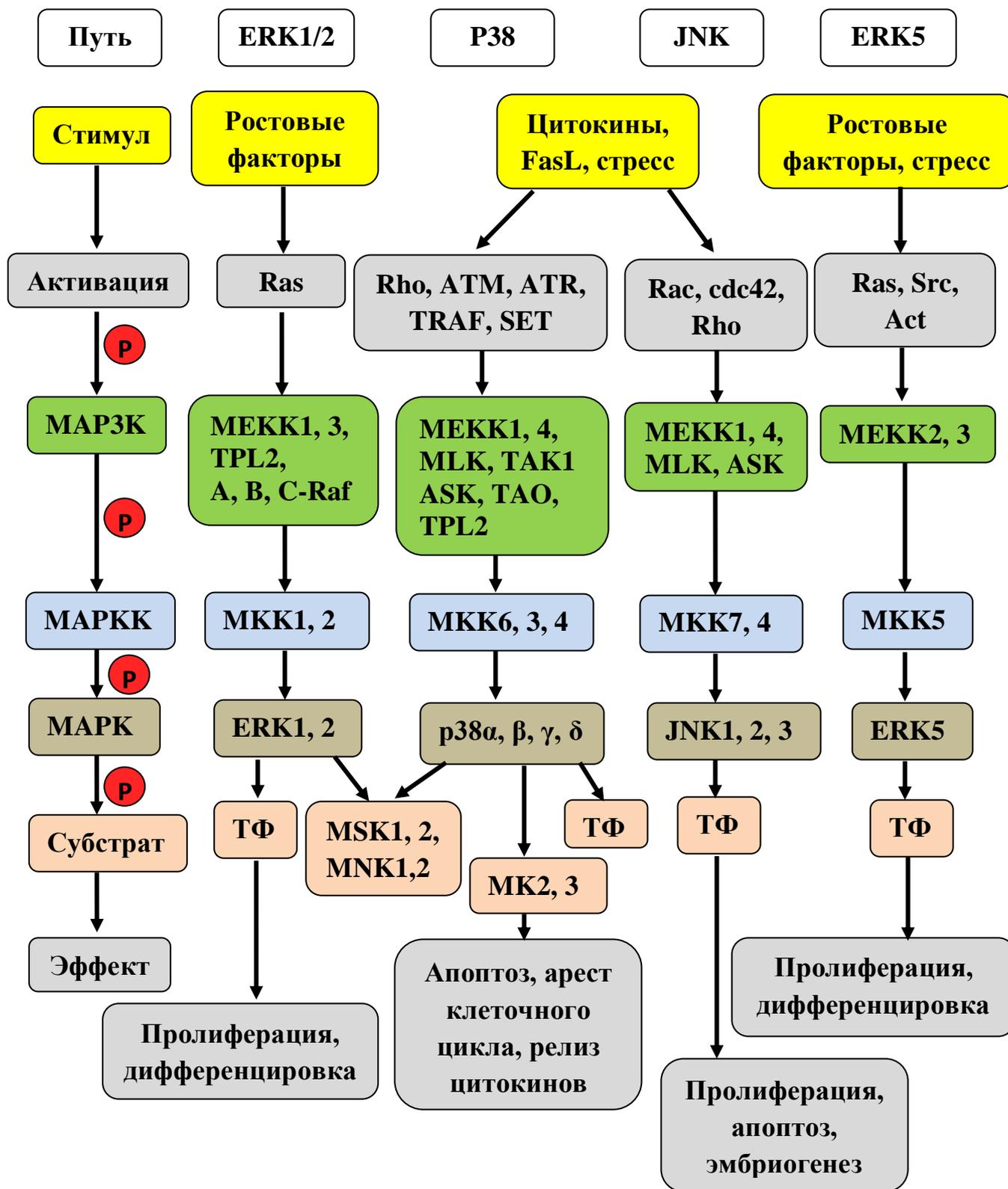


Рис. 8. Схема сигнального пути МАРК/ЕРК в клетках млекопитающих [https://www.creative-diagnostics.com/MAP-Kinase-Signaling-Pathways.htm]

Белки Raf (A-Raf, B-Raf и C-Raf) обычно находятся в цитозоле, фосфорилированы по 259 и 621 позициям серина, связаны с ингибиторным белком 14-3-3. Raf содержат три консервативные области: консервативную область 1 (CR1), CR2 и CR3. Протеинкиназный домен локализован в области CR3 на С-конце, в то время как области CR1 и CR2 на N-конце и регулируют активность белка. В активации белка Raf участвует целый комплекс молекул, включая GTP-Ras, РНВ (Prohibitin), PP2A (протеинфосфатаза 2А). Обязательным в активации Raf является его взаимодействие с прогибитином, который повсеместно экспрессируется и локализуется в основном в митохондриях, а также в цитоплазме и ядре. Показано, что взаимодействие РНВ с Raf необходимо для его фосфорилирования в 338 позиции серина и 341 позиции тирозина, диссоциации от белка 14-3-3 и закрепления на мембране клетки вблизи белков Ras. Протеинфосфатаза 2А (PP2A) способна дефосфорилировать серин в 259 и 621 регуляторных позициях Raf, облегчая диссоциацию 14-3-3 и способствуя взаимодействию с белками Ras. Активный Ras (Ras-GTP) связывается с RBD (связывающий домен Ras) в области CR1 Raf с очень высокой аффинностью иницирует его фосфорилирование в 338 позиции серина и 341 позиции тирозина, которые необходимы для его полной активации. После активации Raf образуют гетеродимеры, которые взаимодействуют с каркасным белком KSR (Kinase suppressor of Ras). KSR1 является белком, объединяющим все модули MAPK вместе. Raf фосфорилирует MEK1/2 в 217 и 221 позиции серина по MAPKK-типичному мотиву Ser-Хаа-Ala-Хаа-Ser/Thr в активационной петле. Активированный MEK1/2 взаимодействует со своим единственным известным субстратом – ERK1/2. MEK1/2 – единственные протеинкиназы с двойной специфичностью, которые могут фосфорилировать как регуляторные остатки Thr в 202 позиции, так и в 204 Tyr ERK1/2, вызывая его активацию. На сегодняшний день идентифицировано около 200 различных субстратов ERK1/2, расположенных как в цитоплазме (например, PLA2, RSK), так и в ядре (например, Elk1, c-Fos и c-Jun).

Субстраты ERK1/2 в цитозоле включают белки SOS, которые фосфорилируются после стимуляции фактором роста. Фосфорилирование SOS дестабилизирует комплекс SOS-GRB2, иницируя его диссоциацию с плазматической мембраной и блокируя активацию Ras. Еще один цитозольный субстрат ERK1/2 это рецептор EGF, который фосфорилируется в 669 позиции Thr, и, таким образом, ингибируется его киназная активность. Наконец, ERK1/2 фосфорилируют фосфатазу МКР (MAPK phosphatases), что снижает деградацию этих ферментов в протеосомах и способствует дефосфорилированию и инактивации самого ERK1/2. Все рассмотренные субстраты осуществляют обратную отрицательную регуляцию сигнального пути MAPK / ERK.

ERK1/2 способны фосфорилировать по 197 Thr и 202 Thr цитозольные серин / треониновые протеинкиназы MAPK-взаимодействующая киназа 1 (MNK1) и MNK2, активируя их. MNK1 и, вероятно, MNK2 активируют фактор инициации эукариот-4Е (eIF-4Е) путем его фосфорилирования по 209 Ser. Считается, что фосфорилирование eIF-4Е по Ser209 усиливает сродство этого

фактора инициации к 7-метилгуанозиновым кЭП-структурам, направляя рибосомы к 5'-концам мРНК и повышая эффективность трансляции. ERK1 и ERK2 косвенно регулируют транскрипцию генов путем фосфорилирования рибосомальной протеинкиназы S6 (RSK), семейства широко экспрессируемых серин / треониновых киназ, активируемых в ответ на митогенные стимулы, включая факторы роста и эфиры форбола. Сайты фосфорилирования RSK1 включают 573 Thr, 380 Ser и 221 Ser. Активные RSK, по-видимому, играют важную роль в регуляции транскрипции, перемещаясь в ядро и фосфорилируя такие факторы, как c-fos по 362 Ser, SRF (serum response factor) по 103 Ser, CREB по 133 Ser, Elk-1 (Ets-like Gene 1) по 383 Ser и др. ERK осуществляет активацию фосфолипазы A2 (PLA2), которая расщепляет мембранные фосфолипиды с образованием арахидоновой кислоты, необходимой для синтеза эйкозаноидов.

После активации ERK1 и ERK2 могут осуществлять транслокацию в ядро и фосфорилировать множество мишеней, включая факторы транскрипции, митоген и стресс-активируемые протеинкиназы (MSK, Mitogen- and Stress-activated Protein Kinases). ERK фосфорилирует MSK1 в 581 позиции Thr, в 376 позиции Ser и в 212 позиции Ser. MSK фосфорилируют и активируют AP-1 (Activator Protein 1), активирующий фактор транскрипции 1 (ATF1) в 63 позиции Ser, и могут быть более важными, чем RSK в фосфорилировании и активации CREB. Было также обнаружено, что MSK фосфорилируют гистон H3 по 10 и 28 Ser, белки HMG-14 (High mobility group-14) по 6 Ser.

ERK так же способен фосфорилировать BRF1 (B-related Factor 1), который является субъединицей TFIIIВ (RNA polymerase III transcription factor), что приводит к увеличению эффективности трансляции, индукции синтеза тРНК и 5S рРНК. Эксперименты продемонстрировали, что ERK также активирует синтез рибосомной РНК с помощью фосфорилирования UBF (Upstream Binding Factor) по 117 и 201 позиции Thr. Кроме того, ERK ингибирует TSC2 (Tuberous Sclerosis 2) посредством фосфорилирования по 664 Ser, что приводит к активации комплекса mTOR и усилению трансляции. TSC2 инициирует гидролиз GTF до GDF в малом G белке Rheb, активирующим комплекс mTOR1. TSC2 фосфорилируется и инактивирует Akt.

Другой прямой мишенью ERK является продукт протоонкогена c-Myc (Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog). Myc – это короткоживущий фактор транскрипции, который активирует около 15% генов. Фосфорилирование Myc по 62 Ser стабилизирует его, позволяя образовать гетеродимер с Max (Myc Associated Factor X) и активировать транскрипцию генов. Однако, фосфорилирование Myc по 58 Thr с помощью GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) по 62 Ser, приводит к протеасомной деградации Myc, после убиквитинилирования убиквитинлигазой (E3) FBW7 (WD Repeat Domain Containing 7).

Активация ERK1/2 способствует фосфорилированию Vim и Vid, вызывая их протеасомную деградацию, таким образом ингибируя апоптоз. Отдельным путем активация ERK1/2 фосфорилирует ядерный FOXO3a (Forkhead box protein O3a) по 294, 344, 425 позициям Ser, облегчает взаимодействие FOXO3a-MDM2.

Это взаимодействие инициирует деградацию FOXO3a посредством MDM2-зависимому пути и, как следствие, к подавлению генов, участвующих в апоптозе и остановке клеточного цикла, таких как Bcl2-подобный белок 1 (BIM) и ингибитор циклинзависимой киназы p27.

Показана возможность фосфорилирования белков STAT3 по 727 позиции Ser с помощью ERK и регуляция развития, дифференцировки во многих типах клеток. Erk1/2 может активировать белок Cdc22, путем фосфорилирования, инициируя переход из фазы G1 в S-фазу и G2 в M-фазу.

Обратная связь MAPK модуля связана с увеличением концентрации протеинфосфатазы (за счет увеличения транскрипции гена), которая удаляет фосфаты с тирозинов и треонинов, тем самым инактивируя белки модуля. Еще один пример обратной связи представлен фосфорилированием и инактивацией белка Raf, протеинкиназой Erk.

ГТРАЗЫ Ras способны активировать и другие молекулы MAPKKK, названные MEKK2/3 (mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 2/3), аналогичным образом, как и Raf. Фосфорилирование MEKK2/3 может инициировать и тирозинкиназа Src при стрессовых воздействиях на клетку. MEKK2 активируется рецепторами HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) и FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), а MEKK3 - IL-1R, TLR4 и LPS.

MEKK2 или MEKK3 после активации связываются с N-концевым доменом MEK5 и фосфорилируют его по 311 Ser и по 315 Thr. MEKK2 имеет более высокую аффинность связывания с MEK5 по сравнению с MEKK3. MEK5 способен фосфорилировать ERK5 (известная как big mitogen-activated protein kinase 1, BMK-1) по 218 Thr и по 220 Tyr, находящихся в регуляторной петле киназного домена. Белок ERK5 человека содержит 816 аминокислот и состоит из N-концевого киназного домена (78-406 аминокислотных остатков) и уникального C-концевого хвоста (410-816 аминокислотных остатков), который выполняет аутоингибиторную функцию. C-конец также содержит область, взаимодействующую с фактором MEF-2 (myocyte enhancer factor 2) (440–501 аминокислотных остатка), сигнал ядерной локализации (NLS) (505–539 аминокислотных остатков) и домен активации транскрипции (664–789 а.о.). Активация ERK5 требует двойного фосфорилирования остатков треонина и тирозина внутри мотива TEY в петле активации киназного домена.

Фосфорилирование ERK5 вызывает изменение конформации ERK5 и обнажает NLS домен, необходимый для транслокации в ядро. Помимо фосфорилирования по мотиву TEY, ERK5 способен фосфорилировать свой C-концевой хвост по остаткам серина и треонина (732 Thr, 753 Ser). Эти остатки на C-конце также фосфорилируются с помощью CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) во время митоза и / или ERK1/2.

Активация ERK5 показана при окислительном и осмотическом стрессах, гипоксии, под действием провоспалительных цитокинов (IL-6), EGF, FGF, PDGF и VEGF. Активация ERK5 инициирует его перемещение в ядро и фосфорилирование белков мишеней. ERK5 фосфорилирует фактор транскрипции Sap1 (serum response factor accessory protein 1), который

активирует транскрипцию через SRE (Serum Response Element) и экспрессию c-Fos. Другой мишенью ERK5 являются белки MEF2A, MEF2C и MEF2D (myocyte enhancer factor 2), которые являются транскрипционными факторами и активируются фосфорилированием (312, 319 Thr в MEF2A, 386, 387 Ser в MEF2C и 179 Ser в MEF2D). PML (promyelocytic leukemia protein) представляет собой фактор транскрипции, который действует как опухолевый супрессор, ингибируя пролиферацию и индуцируя апоптоз посредством активации ингибитора CDK p21. Показано, что ERK5 взаимодействует с PML и ингибирует активность путем его фосфорилирования по 403 Ser и 409 Thr. ERK5-опосредованное фосфорилирование нарушает взаимодействие PML-MDM2 и подавляет экспрессию опухолевого супрессора p53. ERK5 способен фосфорилировать и активировать транскрипционный фактор c-MYC, протеинкиназу SGK (serum/glucocorticoid-inducible kinase) и другие субстраты. До настоящего времени сигнальный путь опосредованный MEKK2/3-MEK5-ERK5 изучен недостаточно, и остается много дискуссионных вопросов, в том числе и о субстратах активации.

ГТРазы семейства Rho включают около 20 представителей, разделенных на 5 подсемейств, которые регулируют актиновый цитоскелет, микротрубочки, контролируя форму, полярность, подвижность и адгезию клеток; они также регулируют клеточный цикл, транскрипцию генов и мембранный транспорт. Rho играют ключевую роль в направлении клеточной миграции и роста аксонов, опосредуя ответы цитоскелета на активацию рецепторов направления. Первое подсемейство называется Rho и включает: RhoA, RhoB и RhoC, которые имеют высокую гомологию и участвуют в образовании эластичных волокон и фокальной адгезии клеток. Второе подсемейство – Rac содержит: Rac1, Rac2, Rac3 и RhoG, которое участвует в образовании псевдоподий и мембранных складок. Третье подсемейство - Cdc42: Cdc42, TC10, TCL, Wrch1 и chp / Wrch2, участвуют в образовании филоподий. Четвертое – Rnd: Rnd1, Rnd3 / RhoE и Rnd2, являются антагонистом сигнального пути семейства Rho. Пятое подсемейство – Rho ВТВ: Rho ВТВ1 и Rho ВТВ2, функции которых остаются неясными. Среди всех членов суперсемейства Rho Cdc42, Rac1 и RhoA являются наиболее изученными Rho GTPases (рис. 9).

Белки Rho активируются GEF и инактивируются GAP, у человека обнаружено около 60 Rho-GEF и 70 Rho-GAP, некоторые из них специфичны к определенному представителю семейства, тогда как другие менее специфичны. В отличие от Ras, которые связаны с мембраной даже в неактивном состоянии, белки Rho находятся в цитозоле и часто связаны с ингибиторами диссоциации гуаниновых нуклеотидов (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors, GDI), которые мешают ГТРазам взаимодействовать с Rho-GEF в плазматической мембране, т.к. закрывают домен связывания Rho с мембраной. У млекопитающих обнаружено 3 белка GDI. Активация белков Rho осуществляется аналогично белкам Ras, но в основном связана с белками адгезии в меньшей степени рецепторами ростовых факторов и GPCR. После активации

путем его интеграции на мембране и связывании с GTP белки Rho взаимодействуют с более чем 60 различными белками мишенями.

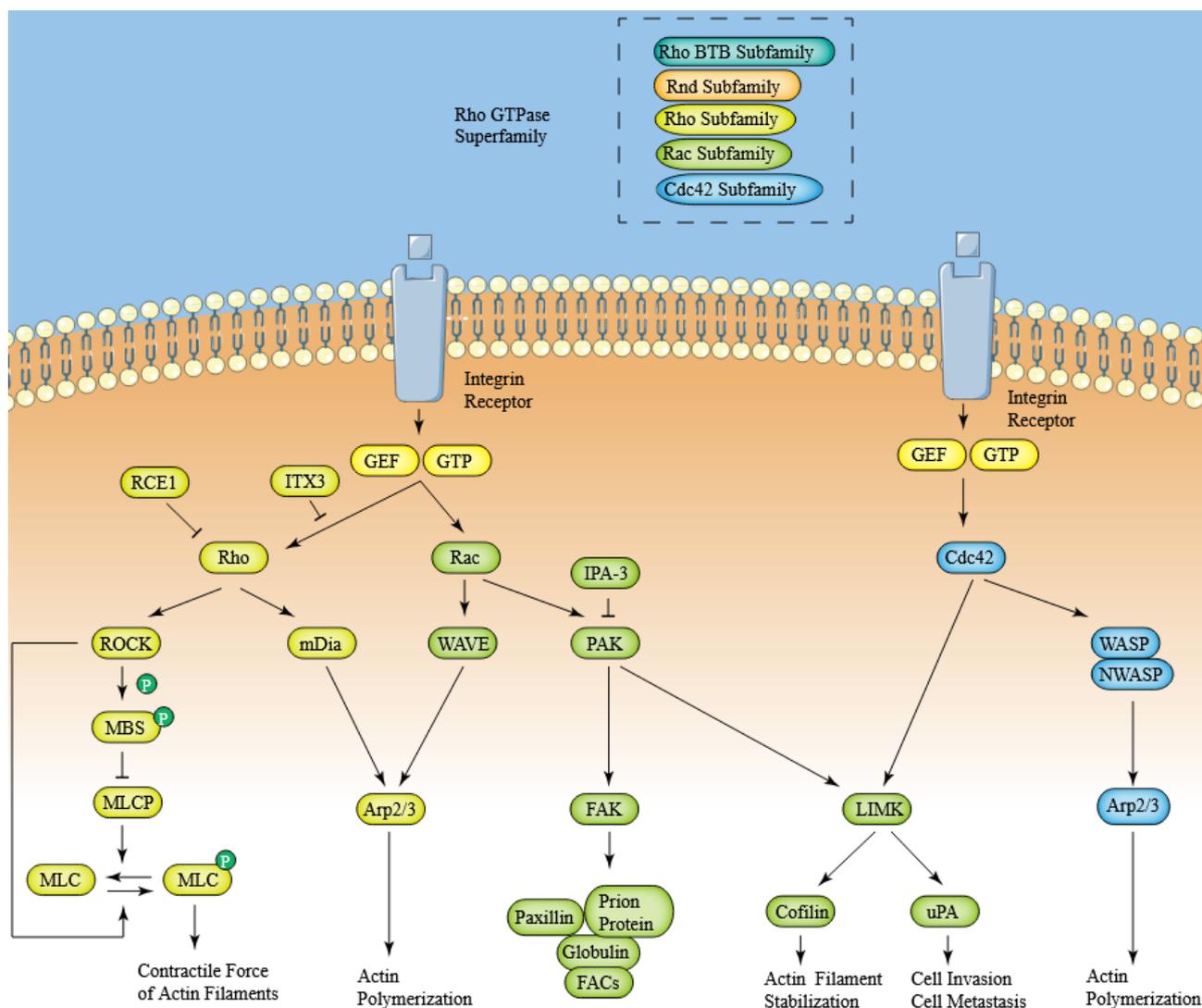


Рис. 9. Схема передачи внутриклеточного сигнала суперсемейством ГТФаз Rho [<https://www.creative-diagnostics.com/rho-signaling-pathway.htm>]

RhoA контролирует сборку и функционирование сократительного кольца в области деления. Он активируется в клеточном кортексе в будущем сайте деления, где способствует образованию актиновых филаментов, сборке миозина II и сокращению кольца. RhoA стимулирует формирование актиновых филаментов за счет активации форминов, а сборку миозина II и сокращение кольца — за счет активации нескольких протеинкиназ, включая серинтреонинкиназу ROCK1/2 (Rho kinase). Киназа ROCK ингибирует фосфатазу MLC (MLCP), удаляющую фосфатные группы легких цепей миозина II (MLC, myosin light chain); в некоторых типах клеток она также может напрямую фосфорилировать MLC, активируя их. Фосфорилирование регуляторной субъединицы MLC (R MLC) стимулирует образование биполярных филаментов миозина II и его моторную активность, способствуя сборке и сокращению

актомиозинового кольца. ROCK также активирует некоторые другие протеинкиназы, например, киназу LIM (LIMK1), которая затем вносит вклад в образование стабильных сократительных актиновых пучков за счет ингибирования деполимеризующего фактора кофилина. Еще одна мишень Rock – это фосфоинозитидфосфатаза PTEN, которая дефосфорилирует положение 3 инозитольного кольца в 3 позиции, тем самым негативно регулирует передачу сигналов Akt/PKB. Другой известный субстрат ROCK - это CRMP-2 (collapse response mediator protein-2) который, связывает микротрубочки и способствует их сборке, стимулирует, например, рост аксонов. ROCK-опосредованное фосфорилирование CRMP-2 ингибирует его способность связываться с тубулином и тем самым вызывая коллапс конуса роста. Помимо важной роли в делении клеток RhoA играет центральную роль в регуляции формы, полярности и передвижения клеток. RhoA напрямую стимулирует полимеризацию актина через активацию форминов, которые добавляют мономеры актина к быстрорастущим концам актиновых филаментов, а также ROCK, фосфорилирующий LIMK с последующим ингибированием кофилина, что опять же способствует увеличению количества актиновых филаментов. Согласованное действие ROCK и форминов необходимо для регуляции полярности клеток и организации микротрубочек. ROCK фосфорилирует TAU и MAP2, белки, регулирующие стабильность микротрубочек. Кроме ROCK мишенями RhoA являются как минимум еще 19 различных белков (PRKcA, PKN1, PKN2, RTKN1, RTKN2, RHPN1, RHPN2, KTN1, CIT, DIAPH1, KCNA2, ITRP1, PLD, MYBP1, PIP5K, FAK, BORG, MBS, GDIA).

Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) играет роль в широком спектре клеточных процессов зависящих от актинового цитоскелета, таких как цитокинез, фагоцитоз, миграция клеток, морфогенез и хемотаксис. В клетках млекопитающих CDC42 преимущественно локализуется в аппарате Гольджи, на плазматической мембране и на многочисленных везикулярных структурах, распределенных по всему цитозолю. Для CDC42 показано две изоформы, одна из которых наиболее изучена и повсеместно экспрессируется, тогда как другая экспрессируется лишь в головном мозге.

Cdc42 опосредует передачу сигналов от рецепторных тирозинкиназ ростовых факторов, рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), рецепторы цитокинов, интегринов, так же под Cdc42 активируется действием физического и химического стресса. Активация Cdc42 аналогична другим белкам Ras, после этого Cdc42 способна взаимодействовать с более чем 30 белками-мишенями: p70 S6 киназа, MLK2, MLK3, MEKK1, MEKK4, PAK1, PAK2, PAK3, PAK4, MRCK α , MRCK β , ACK1, ACK2, PI3K, PLD, PLC- β 2, WASP, N-WASP, MSE55, BORGs, IQGAP1, IQGAP2, CIP-4. Одной из основных мишеней Cdc42 являются белки семейства WASp (Wiskott-Aldrich syndrome protein), которые широко экспрессируются в большинстве клеток, особу. Роль играют в клетках иммунной системы. Белки WASp могут существовать в двух конформациях: в неактивной, свернутой и активной развернутой. Cdc42-GTP стабилизирует открытую форму белка WASp, позволяющую ему связывать комплекс ARP2/3 (actin-related

protein-2/3) и усиливать его способность к росту актиновых филаментов. Более того, CDC42 опосредованная активация серин-треонин протеинкиназы PAK (p21-activated kinase) фосфорилирует LIMK, которая фосфорилирует и ингибирует кофилин, регулируя тем самым сборку актиновых филаментов. Таким способом CDC42 участвует в хемотаксисе и направленной миграции макрофагов, моноцитов, Т-клетках, фибробластах и других клетках иммунной системы. PAK так же способна фосфорилировать DLC1 и TCoV, которые стабилизируют микротрубочки, MEKK1,3, способные фосфорилировать и активировать MEK4. MEK4 после активации может фосфорилировать белки JNK (c-Jun N-terminal kinase), которые мигрируют в ядро и фосфорилируют c-Jun, объединяющийся с c-Fos и образуется транскрипционный фактор AP-1 (Activator protein 1). PAK способна активировать NIK (NF-κB-inducing kinase), фосфорилирующая IKK, тем самым способствуя передачи сигнала по NF-κB сигнальному пути. Мишенями PAK также являются Raf1, комплекс Arp2/3, филамин А, влияющие на рост актиновых филаментов. Активируемые PAK p47 rhoх/p67 rhoх способствуют работе NADPH оксидазы семейства Nox, играющие критическую роль в фагоцитирующих клетках иммунной системы. PAK1 фосфорилирует LIM-киназу по треонину 508 в петле активации, увеличивая опосредованное LIM-киназой фосфорилирование актин-регулирующего белка кофилина. Таким образом, активированные GTP фазы могут регулировать деполимеризацию актина посредством PAK1 и LIM-киназы, модулирующей длину микрофиламентов. Наконец, PAK регулирует активность трансмембранной гуанилилциклазы и продукцию второго мессенджера cGMP.

Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) экспрессируется в большинстве клеток, как и другие представители семейства Rho существует в двух конформационных состояниях, в неактивной форме, связанной с GDP, и в активной форме, связанной с GTP. В ответ на внеклеточные сигналы взаимное преобразование этих состояний происходит через GEF, которые превращают Rac1 в его активную форму и GAP, которые инактивируют Rac. Передача сигналов через Rac1 осуществляется от молекул адгезии, гормонов, ростовых факторов и цитокинов. Rac1-GTP активирует белки PAK, комплекс WAVE (WASp verprolin-homologous protein), который действует аналогично WASp и активирует ARP2/3.

Таким образом, GTPазы семейства Rho в основном связаны с движением и изменением формы клеток, притом Cdc42 ассоциирована с образованием филоподии, Rac – с формированием ламеллоподии, а Rho – с уropодой.

В отдельную группу выделяют сигнальные пути, индуцируемые стрессом и включающие активацию JNK и p38, обе молекулы могут активироваться при передаче сигнала от белков суперсемейства Ras. p38 MAPK контролирует апоптоз, дифференцировку и выброс цитокинов макрофагами и нейтрофилами. Члены семейства p38 обладают мотивом TGY в сегменте активации. Подобно JNK, передача сигналов путем активации p38 ассоциирована со стрессовыми сигналами, такими как осмотический, окислительно-восстановительный, радиационный стресс или УФ стресс. В настоящее время идентифицировано 5

различных протеинкиназ Р38: p38 α , p38 β 1, p38 β 2, p38 γ , p38 δ . Распределение этих киназ Р38 различно: p38 α , p38 β 1, p38 β 2 широко распространены в различных клетках и тканях, тогда как p38 γ экспрессируется только в клетках скелетных мышц, а p38 δ – в основном в железистой ткани. Инициация передачи сигнала начинается с активации малых G белков, таких как Ras, Rho, Rac, Cdc42 или TRAFs (TNF receptor associated factors), передающими сигналы, например, от Toll подобных рецепторов. Еще одна группа сигналов передается при повреждении ДНК, например от белков ATM (ataxia telangiectasia mutated) и ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein). Малые G белки активируют MAPKKK: MLK2, 3 (Mixed – Lineage Protein kinases) и MEKK1-4 (еще называемые MKK1-4); TRAF активируют белки ASK (Apoptosis signal-regulating kinase 1), TAK1 (Transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase 1) и MEKK4, а белки повреждения ДНК – TAO1 и TAO2 (Thousand and one amino acid). Протеинкиназы MAPKKK фосфорилируют MAPKK: MKK3, MKK6 и MKK4. MKK6 способна фосфорилировать после активации все MAPK: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , тогда как MKK3 фосфорилирует p38 α , p38 γ , p38 δ , а MKK4 только p38 α и p38 δ в 180 Thr и 182 Tyr (рис.9). Фосфорилировать MKK3 и MKK6 может и TPL2, активируемая IKK β . p38 α также может активироваться аутофосфорилированием в кардиомиоцитах при ишемии сердца и в Т-лимфоцитах, стимулированных TCR. Большинство субстратов разных p38 MAPK перекрываются, однако обнаружены и специфические субстраты. Для p38 α и p38 β обнаружено более 100 субстратов фосфорилирования, значительная часть из которых – транскрипционные факторы. Например, p38 α и p38 β активируют факторы транскрипции ATF2 (activating transcription factor 2), MEF2 (myocyte enhancer factor 2), CHOP (C/EBP homologous protein), ELK1 (Ets like gene 1), и другие. Другие субстраты p38 α и p38 β представляют собой протеинкиназы, такие как MK2, 3 (MAPK-activated protein kinase 2), MSK1/2 и MNK1/2. p38 δ MAPK фосфорилирует eEF2K (eukaryotic elongation factor 2 kinase), PKD1 (protein kinase D1) или сигнальный адаптер p62. p38 γ MAPK фосфорилирует фактор транскрипции MyoD. p38 γ ассоциируется с белками, содержащими PDZ-домен, например, SNTa1 (α 1-syntrophin), SAP (synapse-associated protein), 90/PSD (postsynapse density 95), hDlg (human disk large also known as SAP97) и протеинтирозинфосфатаза PTPN1, которые она фосфорилирует их при стрессовых условиях, активируя тем самым. Кроме того, p38 γ и p38 δ являются основными p38 MAPK, фосфорилирующие нейрональный белок Tau, связанный с микротрубочками, и HSF-1 (heat shock factor 1) (рис. 10).

Путь p38 α и p38 β MAPK регулируют клеточный цикл при переходах из G0 в G1/S и G2/M. В зависимости от типа клеток, p38 α может активировать или ингибировать переход из фазы G1 в S фазу путем регуляции циклинов (циклин A или D1), а также путем фосфорилирования белка ретиномы, опухолевого супрессора p53 и активации белка p16. С другой стороны, активация p38 MAPK в клетках млекопитающих в ответ на различные стрессы инициирует остановку клеточного цикла в контрольной точке G2/M и способствует восстановлению ДНК. Контрольные точки клеточного цикла необходимы для

контроля повреждения ДНК во время деления клетки, гарантирую целостность генома. Для p38 γ и p38 δ MAPK так же показана возможность остановки клеточного цикла в фазе G2 в ответ на воздействие ионизирующего излучения.

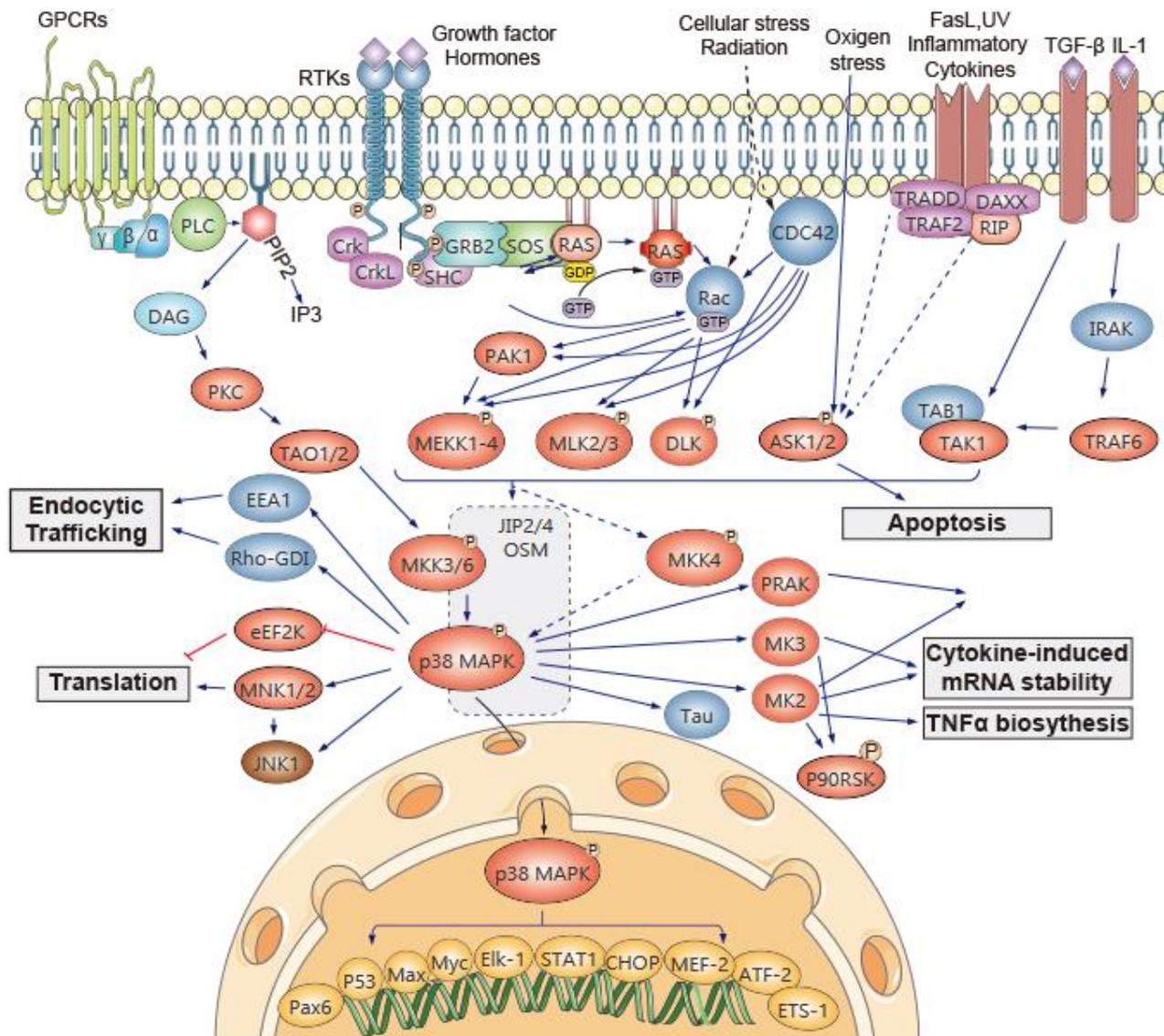


Рис. 10. Схема сигнального пути p38 [https://www.creative-diagnostics.com/P38-Signaling-Pathway.htm]

p38 α также участвует в регуляции апоптоза, путем воздействия на про- и антиапоптотические белки; тогда как p38 β , по-видимому, взаимодействует только с антиапоптотическими белками. Активация p38 α и p38 β MAPK играет важную роль в синтезе ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α и IL-6), за свет воздействия на протеинкиназу MSK1, которая фосфорилирует 276 позицию серина в p65 (NF- κ B).

Регуляция сигнального пути p38 включает две группы фосфатаз: первая группа включает серин/треонин фосфатазы PP2A и PP2C, вторая – включает тирозин фосфатазы STEP (Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase), HePTP (hematopoietic protein tyrosine phosphatase), PTP-SL (STEP-like protein tyrosine

phosphatase). Активность p38 MAPK так же регулируют семейство фосфатаз DUSP (Dual-specificity phosphatase) с двойной специфичностью.

Сигнальный путь JNK так же ассоциирован со стрессом и включает три гена, кодирующих белки JNK (JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) и JNK3 (MAPK10)). Кроме того, известно еще по крайней мере 10 различных сплайсированных изоформ JNK. JNK1 и JNK2 экспрессируются повсеместно, тогда как JNK3, в основном, в клетках нервной системы. JNK активируются двойным фосфорилированием остатков Thr183 и Tyr185 в петле активации. Это фосфорилирование катализируется MKK4 и MKK7. Основными целями JNK являются: активаторный белок 1 (AP1), факторы транскрипции c-Jun, JunB, JunD и родственные им белки Fos (рис. 11).

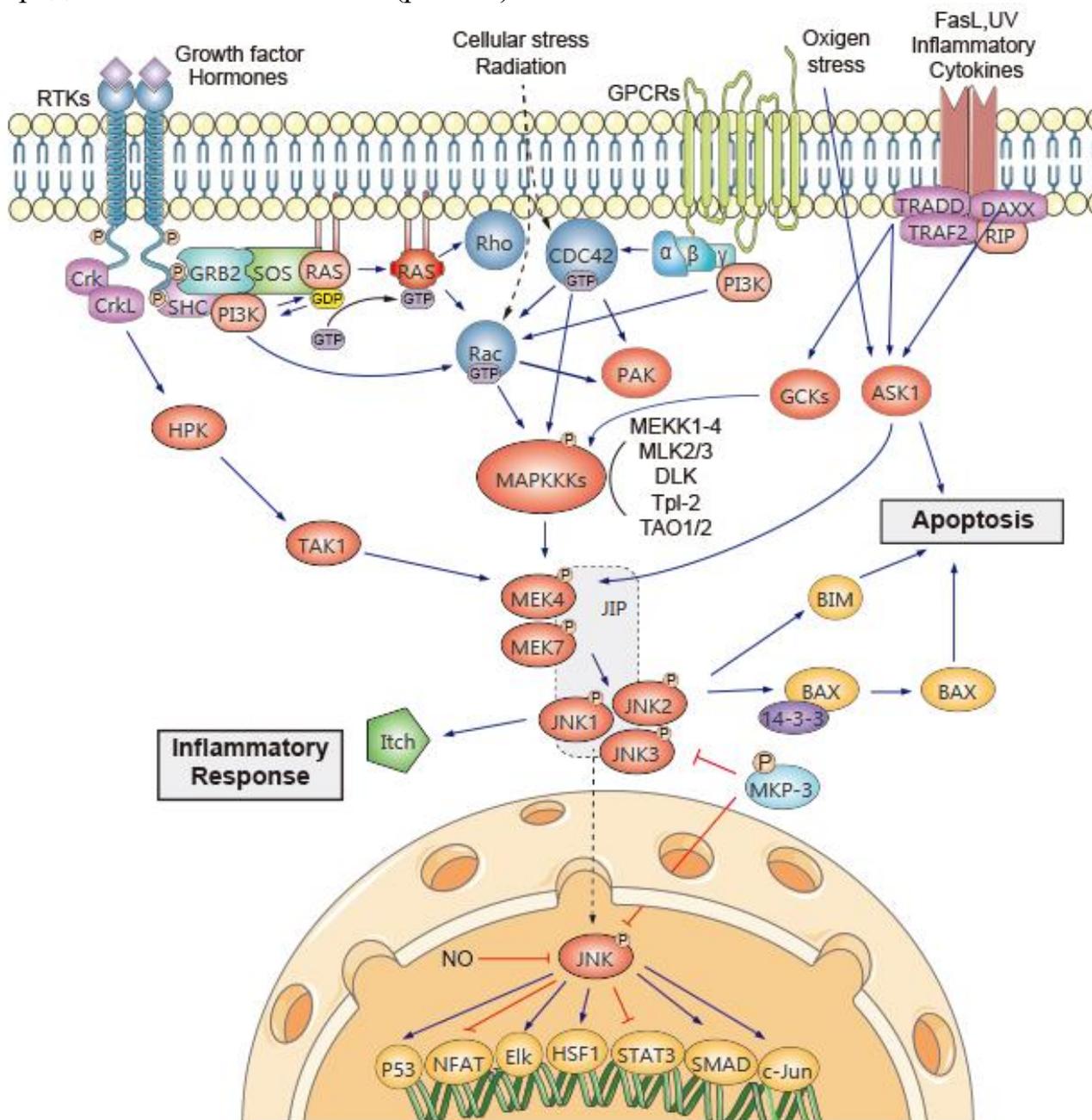


Рис. 11. Схема сигнального пути JNK [https://www.creative-diagnostics.com/MAP-Kinase-Signaling-Pathways.htm]

JNK фосфорилирует N-концевую часть этих молекул, вызывая их активацию и, следовательно, активируя транскрипцию генов. Другими мишенями JNK являются белки, участвующие в контроле клеточного цикла (p53), выживания, гибели клеток (активация BIM, BAD, BAX и инактивация BCL-2, FLIP), миграции, инвазии и транскрипции генов. Как и ERK1/2, JNK также активируются митогенами, хотя преимущественно активируются под действием стрессов, токсинов, ингибиторов трансляции (циклогексимид и анизомицин), патоген ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), молекулярными паттернами, ассоциированными с повреждением (DAMP), а также провоспалительными цитокинами. Как и все MAPKK, MKK4 и MKK7 регулируются фосфорилированием Ser/Thr, катализируемым множеством MEKK, в зависимости от стимула и типа клетки. Специфичность действия MAPK, как всех других отчасти определяется каркасными белками (табл. 3). Свежие данные моделирования показывают, что в зависимости от клеточных условий пространственная организация киназ на каркасных белках может либо усиливать, либо ингибировать распространение сигнала через каскад киназ. Еще один способ регулирования сигнального пути JNK это фосфатазы: MKP-7 и VHS представляют собой фосфатазы JNK, которые также дефосфорилируют p38 α и p38 β . Другими MKP, о которых сообщается, являются DSP2 (Dual specificity protein phosphatase), MKP1-6. Хотя мало что известно о фосфатазах, которые действуют на вышестоящие MAPKK и MAPKKK, сообщалось, что фосфосерин / треониновая протеинфосфатаза 5 (PP5) подавляет индуцированную гипоксией передачу сигналов ASK1/MEK4/JNK.

Таблица 3

Каркасные белки MAPK сигнального пути

Сигнальный путь	Каркасный белок	MAPKKK	MAPKK	MAPK	
ERK1/2	KRS1/2	Raf	MEK1/2	ERK1/2	
	IQGAP1/2/3				
	β -Arrestin				
	Paxillin				
JNK	JIP1	MLK3/DLK	MKK7	JNK1	
	JIP2	MLK2/3		JNKs	
	JIP3	MLK2/3/DLK			
	JIP4	MEKK			MKK4
	PHOSH1/2/3	MLK			MKK4/7
p38	JIP4	MEKK3	MEK3/6	p38 MAPKs	
	OSM		MEK3		
ERK5	MEK5	MEKK2/3	-	ERK5	

Активность JNK также регулируется убиквитилированием. Активация MEKK1 не только стимулирует его способность фосфорилировать и активировать MEK1 и MEK4 в путях ERK1/2 и JNK, но также приводит к убиквитилированию самого MEKK1. Это убиквитилирование впоследствии

ингибирует катализируемое MEKK1 фосфорилирование MEK1 и MEK4, тем самым подавляя активацию MEKK1 путей ERK1/2 и JNK.

2.4 Сигнальный путь Jak-STAT

ЯК (Janus kinase) - СТАТ (signal transducer и activator of transcription) сигнальный путь играет важнейшую роль в контроле иммунной реакции. ЯК-СТАТ передает информацию от внеклеточных химических сигналов в ядро, что приводит к экспрессии генов, участвующих в иммунитете, пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток. Механизм передачи сигналов ЯК-СТАТ состоит из трех основных частей: поверхностного рецептора, Янус киназ (ЯК) и транскрипционного фактора СТАТ.

Многие цитокины, факторы роста и некоторые гормоны передают сигналы через ЯК-СТАТ, включая интерлейкины 2-7 (IL2-7), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), эритропоэтин, эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), интерфероны (IFN) и др. Рецепторы указанных лигандов содержат в своем составе длинный цитоплазматический домен с сайтом связывания ЯК и участком фосфорелирования, так же характеризуются димеризацией при связывании с лигандом (рис. 12).

Янус киназы это ферменты, содержащие два потенциальных активных центра и поэтому были названы в честь Януса, римского бога с двумя лицами. На сегодняшний день лучше всего охарактеризованы четыре члена семейства ЯК: ЯК1, ЯК2, ЯК3 и Тук2. Все они обладают молекулярной массой около 130 кДа и приблизительно на 40% гомологичны по аминокислотным последовательностям. ЯК1, ЯК2 и ТУК2 экспрессируется повсеместно, тогда как экспрессия ЯК3 в основном ограничена стволовыми кроветворными клетками миелоидного и лимфоидного пути. ЯК, по-видимому, связаны с цитоплазматическими доменами многих рецепторов цитокинов, но остаются каталитически неактивными до связывания лиганда с рецептором. Представители ЯК семейства содержат семь доменов JH1-JH7. JH1 – это киназный домен, содержащий два тирозина, которые могут фосфорилироваться. JH2 - это псевдокиназный домен. Домены JH6 и JH7 опосредуют связывание ЯК с рецепторами. ЯК белки ассоциированы с рецептором и активируются после его связывания с лигандом, которое приводит к димеризации рецептора. Когда янус киназы сближаются, за счет димеризации рецептора, они фосфорелируют друг друга по остаткам тирозина в JH1 домене, усиливая свою киназную активность. Активированные ЯК фосфорелируют рецептор, с которым они связаны, формируя сайты для связывания SH2 содержащих белков (СТАТ, GRB, PI3K).

Еще один компонент в передаче сигнала это белки СТАТ. Из названия следует что, эти белки составляют неотъемлемую часть передачи цитоплазматического сигнала, инициируемого некоторыми регуляторными молекулами, и активируют транскрипцию определенных генов в ядре. К настоящему времени идентифицировано по крайней мере шесть различных

белков STAT млекопитающих (STAT1-STAT6) размером от 84 до 113 кДа. Все STAT демонстрируют значительную гомологию последовательностей и состоят из консервативного домена расположен на N-конце, за которым следует ДНК-связывающий домен, а затем домены SH3 и SH2; после этого идет Y домен, который представляет собой короткую последовательность, содержащую остаток тирозина, (фосфорилируется JAK). Карбоксильный концевой домен (Tr) способен связываться с ДНК и активировать транскрипцию. Домен SH2 связывает фосфотирозин, таким образом закрепляя STAT на поверхности активированного рецептора.

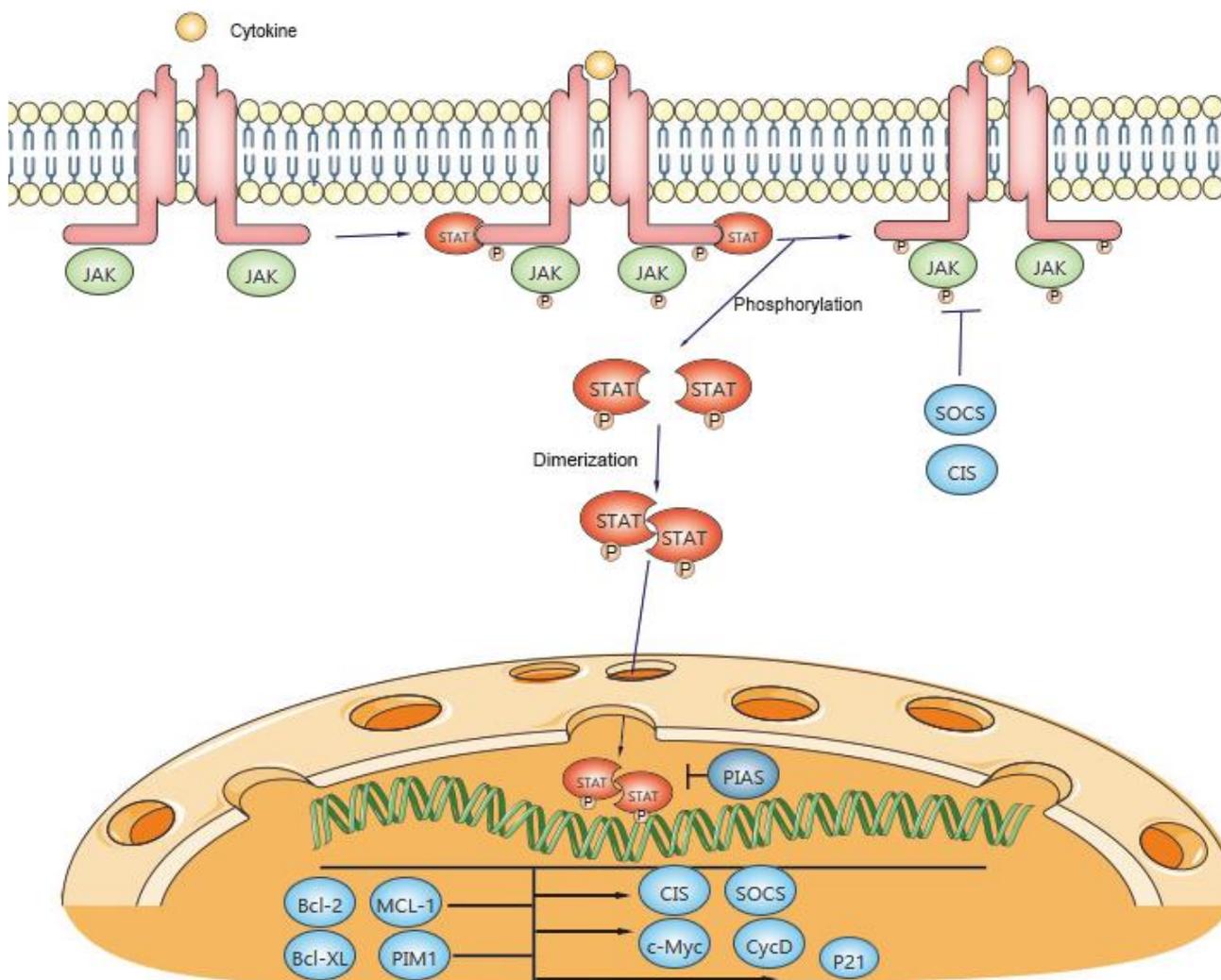


Рис. 12. Схема сигнального пути JAK - STAT [https://www.creative-diagnostics.com/jak-stat-signaling-pathway.htm]

После связывания SH2 содержащих белков (STAT, GRB, PI3K) с фосфорелированным тирозиновым доменом рецептора происходит их фосфорелирование по средствам JAK. Такая модификация SH2 содержащих белков приводит к их активации и запуску соответствующих каскадов. Белки STAT после фосфорелирования диссоциируют от рецептора и образуют димеры между собой за счет связывания с фосфотирозинами друг друга через SH2

домены. Димерные формы STAT транспортируются в ядро и активируют транскрипцию генов: антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1, PIM1), негативной регуляции (CIS, SOCS), клеточного цикла (c-Мус, циклин D, p21), липидного метаболизма (AOX), дифференцировки (GFAP), цитокинов и др.

Разные представители семейства белков JAK и STAT агрегируются на разных рецепторах (табл. 4).

Таблица 4

Ассоциация рецепторов цитокинов и белков JAK- STAT

Рецепторы цитокинов	JAK	STAT	Эффекты
IL-2, 7, 9, 15, 21	JAK1, 2	STAT1, 3, 5, 6	Пролиферация и выживание Т клеток, функционирование регуляторных Т клеток, Т клеток памяти и В клеток
IL-12, 13	JAK2, TYK2	STAT3, 4	Дифференцировка Т клеток, эффекторная функции лимфоцитов
INF α , β , γ	JAK1, 2, TYK2	STAT1, 2, 3	Антивирусная защита клеток
IL-10, 19, 20, 22, 26	JAK1, 3, TYK2	STAT3	Активация В клеток, противовоспалительный эффект, поддержание эпителия
EPO, TPO, G-CSF, ростовые факторы, лептин, IL-3, 5	JAK2	STAT3, 5	Гематопоз, рост и усиления анаболизма клетки
IL-6, 11, 13, OSM, LIF	JAK1, 2, TYK2	STAT1, 3, 6	Пролиферация и выживание Т клеток, поддержание Т клеток памяти, функционирование Т регуляторных клеток и В лимфоцитов, заживление ран

Передача сигналов через JAK-STAT путь жестко контролируется рядом различных механизмов. Ключевые регуляторы этого пути включают SOCS (suppressors of cytokine signaling), PIAS (Protein inhibitors of activated STATs) и PTP (protein tyrosine phosphatases).

Белки SOCS обычно экспрессируются на низких уровнях и быстро индуцируются после активации цитокинами пути JAK-STAT. Существует восемь членов семейства CIS-SOCS (CIS, также известных как CISH и SOCS1-SOCS7). Каждый представитель семейства CIS-SOCS содержит центральный SH2 домен, N-концевой домен переменной длины и C-концевой домен известный как SOCS-бокс, который состоит из 40-аминокислот. У SOCS1 и SOCS3 обнаружен небольшой KIR (kinase inhibitory region) домен. Белки SOCS могут взаимодействовать с фосфорилированными тирозинами, через SH2 домен и с Elongin BC через SOCS домен. Таким образом SOCS способны конкурировать с SH2 содержащих активационными белками (STAT, GRB, PI3K) за

фосфотирозин в составе рецептора, агрегированного с JAK. CIS в свою очередь аналогичным образом взаимодействует и ингибирует белки STAT (рис. 13).

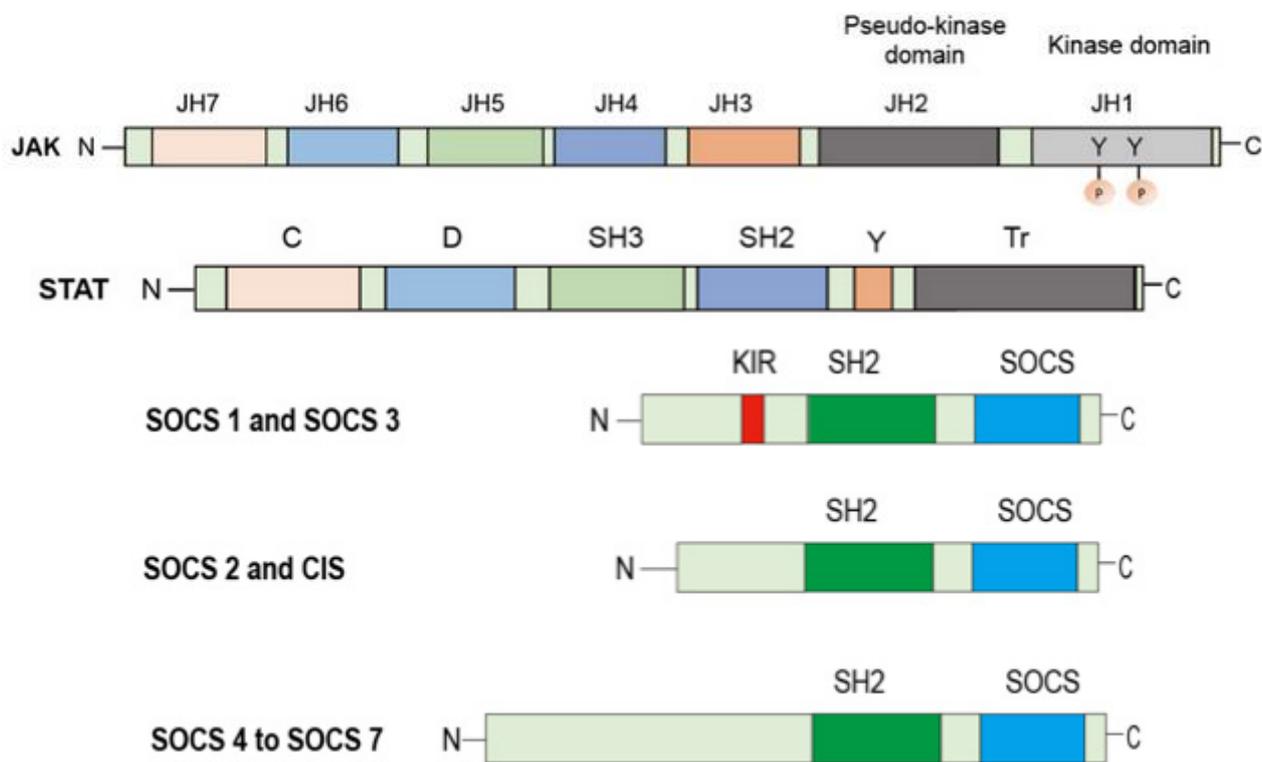


Рис. 13. Схема доменного строения белков JAK, STAT, SOCS [https://www.creative-diagnostics.com/jak-stat-signaling-pathway.htm]

Другой негативный регулятор в передаче сигналов по JAK-STAT сигнальному пути является PIAS. Это семейство белков состоит из четырех членов: PIAS1, PIAS3, PIASX и PIASY84. Существуют различные варианты сплайсинга белков PIAS. Показано, что после цитокиновой стимуляции PIAS1, PIAS3 и PIASX взаимодействуют с STAT1, STAT3 и STAT4, соответственно, ингибируя димеризацию белков STAT и дальнейшую передачу сигнала.

STAT также могут быть инактивированы фосфатазами РТР как в цитоплазме, так и в ядре. Например, SHP2 участвует в дефосфорилировании STAT5 в цитоплазме.

2.5 Сигнальный путь Smad

Сигнальный путь Smad назван в честь цитоплазматических белков, осуществляющих передачу сигнала от поверхностных рецепторов в ядро. Аббревиатура Smad произошла от двух белков SMA (small worm phenotype) *Caenorhabditis elegans* и семейства белков MAD (Mothers Against Decapentaplegic) *Drosophila*, которые гомологичны человеческим белкам Smad. Они повсеместно экспрессируются на протяжении всего развития организма и во всех тканях

взрослого человека, многие из них характеризуются альтернативным сплайсингом мРНК (рис. 14).

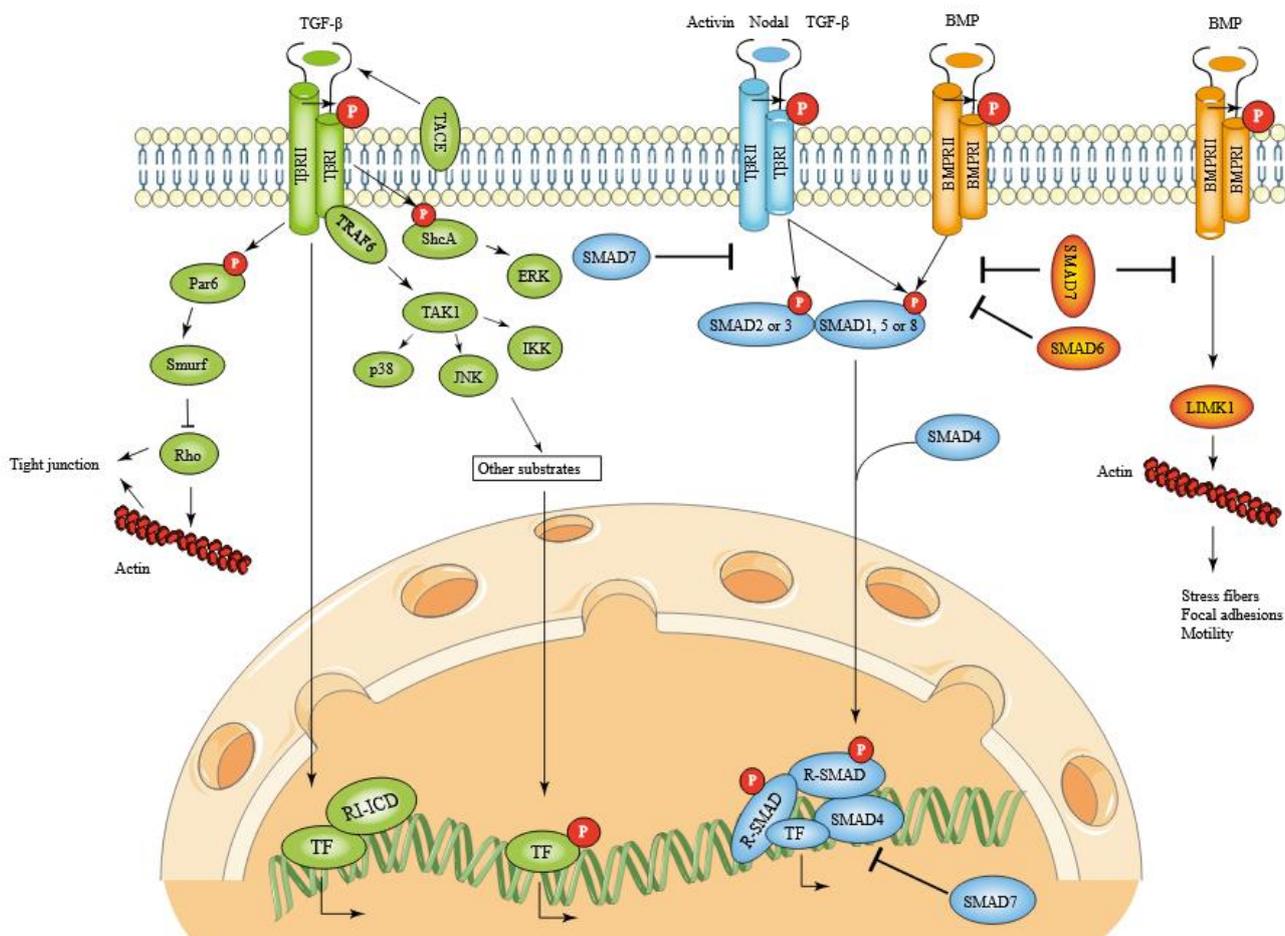


Рис. 14. Схема сигнального пути Smad [https://www.creative-diagnostics.com/tgf-b-smad-signaling-pathway.htm]

Белки Smad ассоциированы с рецепторами, передающими сигнал от суперсемейства белков TGF-β (Transforming growth factor beta), которое включает такие белки как BMP (bone morphogenetic proteins), активины, ингибины, GDF (growth differentiation factors), GDNF (glial-derived neurotrophic factors). Эти белки регулируют широкий спектр биологических процессов, таких как морфогенез, эмбриональное развитие, дифференцировка взрослых стволовых клеток, иммунная регуляция, заживление ран и воспаление. Рецепторы белков суперсемейства TGF-β представляют собой гетеротетрамеры с серин/треонинкиназной активностью, состоящий из димера рецептора типа II и димера рецептора типа I. Сначала белки суперсемейства TGF-β взаимодействуют с димером рецептора типа II, что способствует привлечению димера рецептора типа I и образованию стабильного комплекса рецептора типа II-TGF-β-рецептора типа I. Образование комплекса способствует сначала аутофосфорелированию рецептора типа II, а затем и фосфорелированию рецептора типа I, который после этого приобретает протеинкиназную

активностью. Активированный рецептора типа II напрямую связывает и фосфорилирует латентный белок-регулятор гена семейства Smad.

Семейство белков Smad по функциям можно разделить на три группы: 1) Smad, регулируемые рецепторами (R-Smad), включают Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 и Smad8; 2) общий Smad (Co-Smad), включающий Smad4; 3) ингибирующие Smad (I-Smad), которые включают Smad6 и Smad7. R-Smad связываются с мембранными рецепторами T β RI и активируются после фосфорелирования. В зависимости от лиганда на мембране присутствуют соответствующие рецепторы, с которыми агрегируют разные R-Smad. Если лиганд TGF- β , активин или Nodal, то рецептор будет ALK4, 5 и 7 (activin receptor-like kinase), соответственно, а фосфорелируются Smad2 или Smad3. Исключение ALK1, который предпочтительно экспрессируется в эндотелиальных клетках, связывает TGF- β , BMP-9 или BMP-10 и активирует Smad 1 или 5. Представители семейства BMP активируют Smad1, Smad5 или Smad8 (рис. 15).

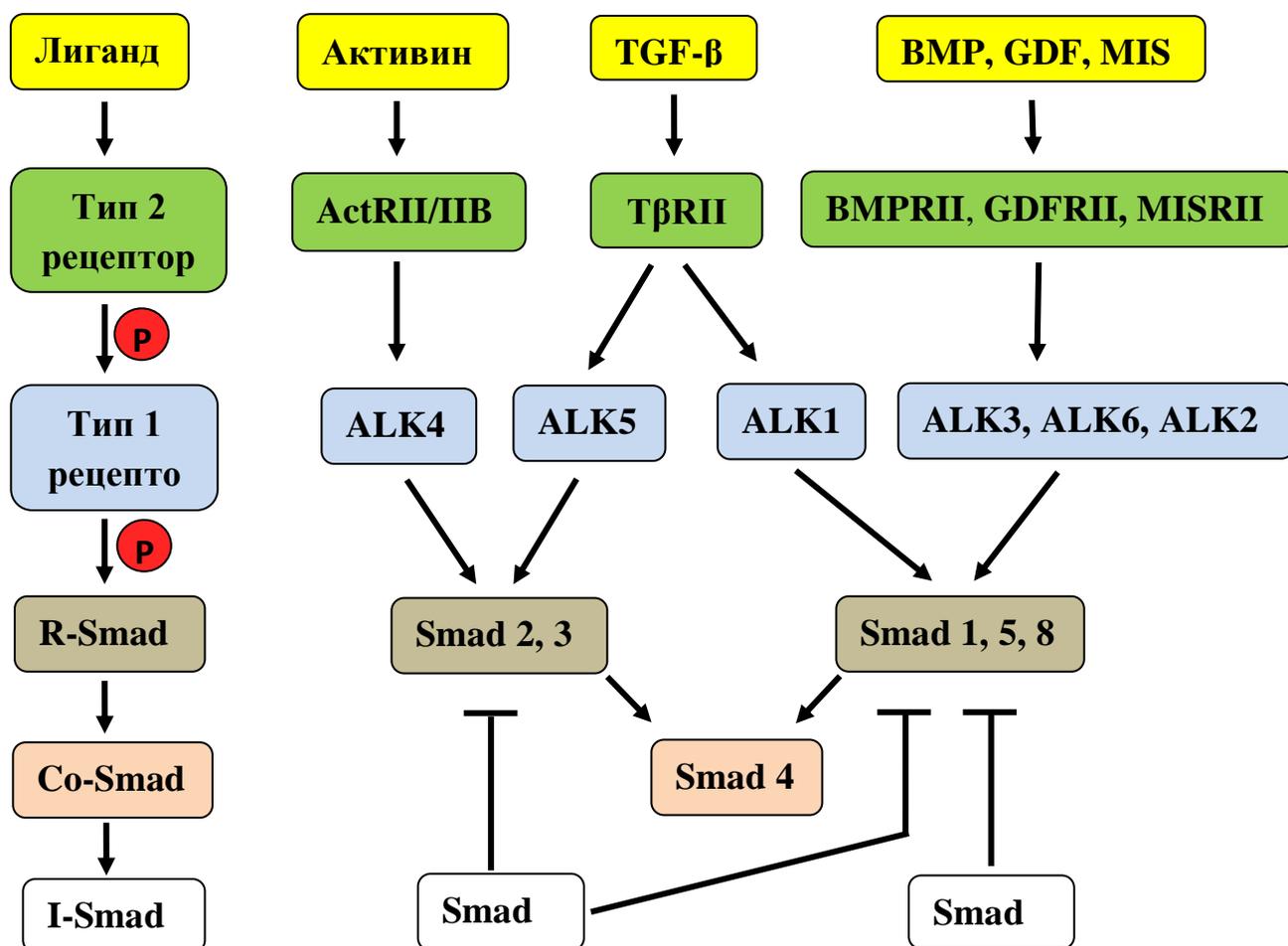


Рис. 15. Схема сигнального пути Smad

После фосфорелирования R-Smad меняют свою конформацию, агрегируют с Co-Smad (Smad4) и мигрируют в ядро, где активируют транскрипцию около 500 зависимых генов. Эффект от передачи сигнала Smad во многом зависит от сопутствующих сигналов и для активации генов требуются коактиваторы. Для

комплекса Smad2, 3, 4 показано взаимодействие с AP-1, Fox, Sp1, IRF7, bZIP, RUNX, и др., а для комплекса Smad1, 5, 9, 4 – CBP/300, MSG1, SMIF, ARC105, и др. Например, передача сигнала от TGF- β приводит к транскрипции генов связанных с ингибирование пролиферации (p15, p21, p57, 4EBP1), индукцией апоптоза (Bik, Bim, Dapk, Fas, GADD45 β) и аутофагии (ATG5, 6, 7, Dapk), синтез тромбоспондина, FoxP3, PDGF-B, VEGF, MMP2, 9, осуществляет репрессию генов, связанных с пролиферацией (E2F-1, c-Myc, CDC25A), ингибирует транскрипцию антиапоптотических генов (Bcl-2, Bcl-xL) и генов отвечающих за иммунный ответ (Fas лиганд, GATA-3, гранзимы A, B, INF- γ , NKG2D, перфорины, NKP30, T-bet) и др.

I-Smad (Smad 6,7) являются генами мишенями для других белков Smad, тем самым создавая негативную петлю регуляции сигнального пути. Белки I-Smad способны конкурировать с R-Smad за сайты связывания с рецепторами, способны активировать убиквитинлигазу Smurf (Smad Ubiquitylation Regulatory Factor), деградирующую рецептор и R-Smad, а также рекрутируют протеинфосфатазу, дефосфорелирующую рецептор.

Стоит отметить, что TGF- β осуществляет передачу сигнала и через другие белки. Так, например, TGF- β может активировать MAPK/ERK, JNK, p38 сигнальные пути. T β RII и T β RI передают сигнал через TRAF6 и TAK1, активирующие JNK, p38 и IKK, а также через ShcA для активации пути ERK. T β RI может непосредственно фосфорилировать PAR6 за счет привлечения Smurf1 и осуществлять деградацию RhoA, что приводит к диссоциации плотных контактов клетки. В BMP-ассоциированной передаче сигналов, не связанной с Smad, рецепторы BMP типа II связываются и активируют LIMK1, что ведет к ингибированию кофилина, фактора разборки актина.

2.6 Сигнальный путь Notch

Notch сигнальный путь является эволюционно консервативным и регулирует дифференцировку клеток во время развития и поддерживает гомеостаз тканей, например путем обновления тканей, таких как эпителий кишечника. Играет важнейшую роль в созревании T лимфоцитов и некоторых ILC клеток (innate lymphoid cells). Notch является рецепторным, трансмембранным белком, состоящим из трех основных высококонсервативных доменов: NECD (Notch extracellular domain), связывающийся с лигандом и состоящий из 29–36 EGF (epidermal growth factor) подобных фрагментов, NRR (negative regulatory region), осуществляющий негативную регуляцию и состоящий из 3 LNR-Notch повторов (LIN-12/Notch-related region), NICD (Notch intracellular domain), который способен гидролизироваться и мигрировать в ядро. Notch - это семейство рецепторов, которое у млекопитающих включает четыре представителя (Notch1-4). После синтеза предшественник Notch подвергается протеолизу фуринов подобной конвертазой в аппарате Гольджи по NRR домену. Исходная длинна первичного транскрипта составляет 300 кДа, а после гидролиза образуется два фрагмента, образующие между собой гетеродимер, состоящий из

110–120 кДа фрагмента NRR, трансмембранного, NICD доменов и 200 кДа фрагмента NRR, NECD доменов. Между собой эти два фрагмента удерживают Ca^{2+} -зависимыми ионными связями. Процесс расщепления регулируется с-Src и с-Src опосредованным Notch1-фурином взаимодействием. После расщепления область EGF подобных доменов NECD гликозилируется (О-фукоза, О-ацетилглюкозамин, О-глюкоза), что способствует усилению взаимодействия с лигандом и стабилизирует рецептор на мембране клетки. Обработанный рецептор затем транспортируется эндосомами к плазматической мембране, где способен взаимодействовать с лигандом (рис. 16).

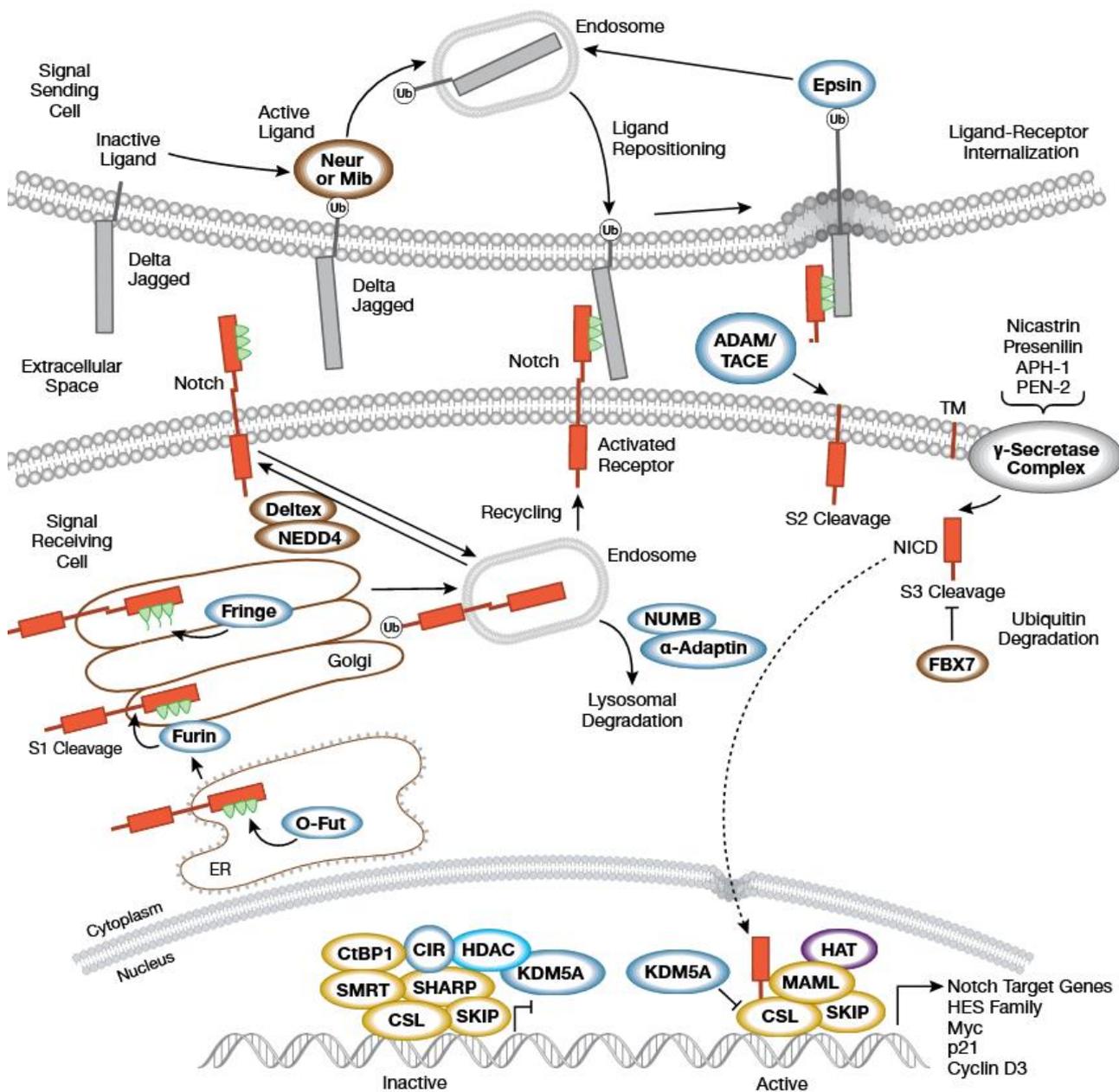


Рис. 16. Схема сигнального пути Notch [https://www.cellsignal.com/pathways/notch-signaling-pathway]

Канонические лиганды, которые представляют собой трансмембранные белки, семейств Delta подобных (DLL1, DLL3, DLL4) белков и Jagged (Jag1, Jag2). Все лиганды Notch содержат DSL (Delta) домен и консервативную область EGF подобных доменов (от 6 до 14 повторов у разных представителей). Лиганды Notch могут находиться и взаимодействовать с рецептором на одной клетке так и на разных.

По каноническом пути связывания лиганда с рецептором происходит через EGF подобные домены на обеих молекулах, инициируется отщепление 200 кДа внеклеточного фрагмента Notch. Связывание приводит к убиквитинированию лиганда убиквитинирован лигазами RING E3 (Mind bomb (Mib) или Neuralized) и эписин-зависимому эндоцитозу комплекса рецептор-лиганд в клетку на поверхности которой расположен лиганд. Оставшийся 120 кДа фрагмент Notch после диссоциации большей части внеклеточной части становится доступен для расщепления α -секретазой ADAM 10 и 17 (A disintegrin and metalloproteinases 10 и 17, известных как TACE, TNF- α -converting enzyme) в области NRR. Это инициирует последнее протеолитическое расщепление с помощью γ -секретазного комплекса (включающий presenilin, nicastrin, APH1 и PEN2), который связывается с 12 аминокислотными остатками внеклеточного домена Notch, оставшегося после расщепления TACE. Результатом расщепления становится отделение от мембраны клетки оставшегося NICD домена, который транспортируется в ядро и агрегирует с транскрипционными факторами CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1), Maml (mastermind-like). Мишенями сигнального пути Notch является транскрипция белков семейства Hes и Hey. Это эволюционно консервативные белки обычно действующие как репрессоры транскрипции. Из семи белков Hes (Hes1-7) все, кроме Hes2 и Hes3 нацелены на регуляцию Notch пути, как и все три белка Hey (Hey1, Hey2, HeyL). Было показано, что Hes1, 3 и 5 вовлечены в задержку дифференцировки нейрональных стволовых клеток как у взрослых, так и в эмбриогенезе. Hes4 стимулирует остеогенез и ингибирует адипогенез, воздействуя на Twist-1. Hes7 играет заметную роль в сомитогенезе. Белки Hey необходимы для развития сосудов, а также участвуют в ряде других процессов. Например, HeyL играет решающую роль в пролиферации мышечных стволовых клеток, а Hey2 связан с транскрипцией амилоидного β -белка. Hey1 ингибирует дифференцировку нервных стволовых клеток в мозге. Другие гены-мишени сигнального пути Notch включают CCND1, CDKN1A, GATA3, PTCRA, PreT α , c-Мус, BCL-2, IRF-6, Cyclin D, p21 и др.

После транскрипции таргетных генов Notch, белок Maml рекрутирует Cdk8, который фосфорилирует NICD, а также рекрутирует ряд белков, которые убиквитинируют NICD (FBW7), что в конечном итоге приводит к его деградации, возвращая комплекс в состояние репрессии транскрипции, что является примером обратной регуляции сигнального пути. Показаны и ряд других протеинкиназ регулирующих активность сигнального пути Notch (табл. 5).

Регуляция активности Notch 1 различными протеинкиназами

Мотив	Аминокислота	Киназа	Эффект
RKKS Q DG	S2198	ILK	Дегградация белка, убиквитинилирование
LTP S PES	S2514 S2517	CDK3, 8, 19	Дегградация белка
SPPT S MQ	T2542	GSK3 β	Дегградация белка
PFL T PSP	T2512	DYRK2	Дегградация белка, убиквитинилирование
DQW S SSSPHS	S2522-5	NLK	Блокирует взаимодействие с Mam1, инактивируя сигнальный путь

Часто фосфорелирование Notch инициирует его узнавание со стороны протеин убиквитин лигаз E3, таких как Deltex, ITCH (AIP4), Nedd4 и др.

Гидрокселирование – это еще одна дополнительная, недавно открытая посттрансляционная модификация Notch ICD (intracellular domain). Аспарагин-гидроксилаза HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) ингибирующий фактор (FHN1, также известный как HIF1AN), играющий важную роль при гипоксии (гидрокселирует HIF1 α), способен гидрокселировать и Notch ICD по двум остаткам аспарагина (N1945 и N2012). Данные *in vitro* предполагают, что FHN1 негативно регулирует передачу сигналов Notch, но биологическое значение модификаций, опосредованных FHN1, до конца не изучено.

Совсем недавно было показано, что ацетилирование и деацетилирование Notch ICD влияет на передачу сигналов в эндотелиальных клетках и макрофагах, где деацетилаза Sirt1 (sirtuin 1) ингибирует передачу сигналов Notch.

Передача сигналов Notch1 связана со множеством других сигнальных путей, таких как PI-3K/Akt, NF- κ B, mTOR и TGF- β . Фосфатаза, PTEN, является основным негативным регулятором передачи сигналов Akt. HES1, один из генов-мишеней Notch1, связывается с промоторной областью PTEN и подавляет экспрессию, что приводит к стабилизации активного белка Akt. Akt в свою очередь воздействует на сигнальный путь NF- κ B и комплекс mTOR. Notch1-ICD (intracellular domain) активирует передачу сигналов NF- κ B посредством прямого взаимодействия с комплексом CBM (CARMA1, BCL10 и MAL1) и путем CSL-опосредованной регуляции транскрипции p100 и p52, которые являются субъединицами NF- κ B. Комплекс CBM важен для активации IKK, которые фосфорелируют I κ B. Notch1-ICD способствует сборке комплекса CBM и инициирует передачу сигнала по NF- κ B пути. Notch1-ICD так же ингибирует экспрессию опухолевого супрессора p53, который является ключевым регулятором апоптоза клеток, уменьшая функционально важные остатки фосфора (Ser15, 20 и 392) в комплексе белков mTOR и PI-3K/Akt. Notch1-ICD образует транскрипционный комплекс со Smad3, компонентом канонической передачи сигналов TGF- β и регулирует экспрессию Hes1 путем связывания с

промотором. Эти перекрестные передачи сигналов между сигнальными путями представляют собой очень сложные процессы регуляции клеток во время их дифференцировки, развития и остаются во многом не изученными.

Еще одной не до конца изученной проблемой остается цис и транс расположение лиганда относительно рецептора. В каноническом пути лиганды связываются и активируют рецептор на соседних клетках (транс-активация), но лиганды также способны взаимодействовать с рецепторами на одна и той же клетка (цис-ингибирование и цис-активация). Цис-ингибирование, как было показано, играет важную роль во многих процессах, включая нейроэпителиальную дифференцировку и постнатальную дифференцировку эпидермиса человека. Например, DLL1 действует как транс-активатор и цис-ингибитор на Notch1 сигнальный путь.

2.7 Сигнальный путь Hh

Эволюционно консервативный сигнальный путь Hedgehog (Hh) необходим для нормального эмбрионального развития и играет решающую роль в поддержании, обновлении и регенерации взрослых тканей организма. Hedgehog обнаружены в *Drosophila*, где мутация этого гена приводит к формированию личинки, покрытой колючими выростами, напоминающими иголки ежа (hedgehog — еж), что и дало названия этим белкам. Hh это семейство сигнальных молекул, включающих у млекопитающих три представителя: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) и Desert hedgehog (Dhh). Sonic hedgehog получил свое название по имени героя компьютерной игры, Desert hedgehog и Indian hedgehog это виды ежей, ушастый и индийский ежи, соответственно. Shh играет особенно заметную роль в дифференцировке клеток нервной ткани, тогда как Ihh – в развитии скелета. Действие Dhh ограничено гранулезными клетки яичников и клетками сертоли семенников.

Все молекулы Hh синтезируются как белки-предшественники, которые подвергаются автокаталитическому расщеплению и сопутствующей модификацией холестерина на карбоксильном конце белка. Кроме того, на N – конце белков Hh подвергается пальмитоилированию — это ковалентное присоединение к белку остатка одной из высших жирных кислот с образованием тиоэфирной связи. Чаще всего происходит присоединение пальмитиновой кислоты к сера-содержащей аминокислоте, чаще всего цистеину, реже к серину или треонину. Таким образом активные формы всех белков Hedgehog, помимо жирнокислотной цепи, также несут ковалентно связанный холестерин. В секреции Hh участвует трансмембранный белок DISP1 (Dispatched1), а Scube2 (signal peptide, CUB domain, EGF-like 2) связывается с Hh в межклеточном пространстве и усиливает передачу сигнала. В межклеточном пространстве белки Hedgehog за счет наличия модификаций олигомеризуются и формируют бусину, поверхность которой представлена гидрофильными аминокислотами, а внутренняя часть гидрофобными холестерином и жирной кислотой (рис. 17).

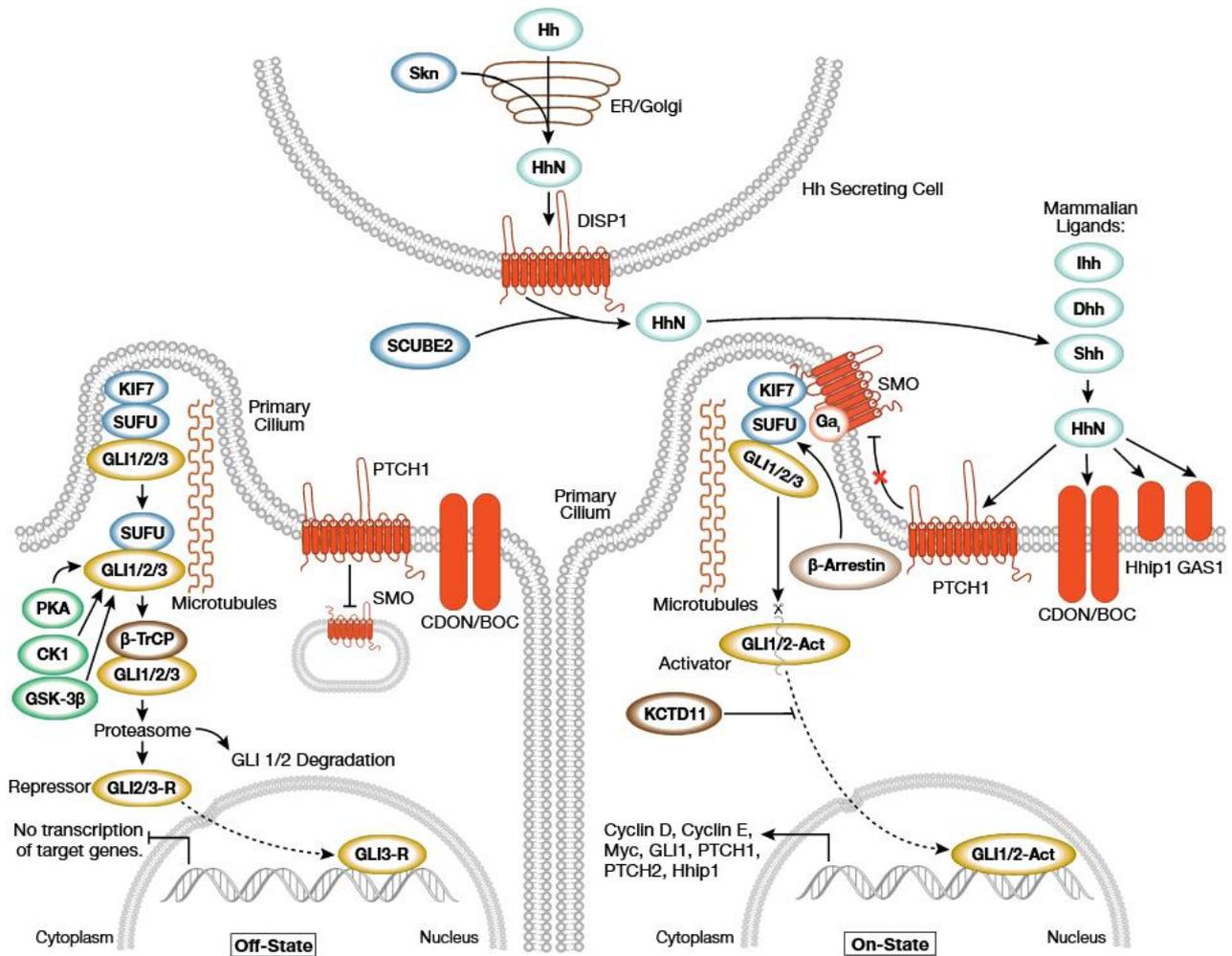


Рис. 17. Схема сигнального пути Hedgehog [https://www.cellsignal.com/pathways/hedgehog-signaling-pathway]

Нн-белки инициируют передачу сигналов посредством связывания с каноническим рецептором РТСН (Patched) и корецепторами GAS1 (growth-arrest-specific 1), CDON (CAM-related/down-regulated by oncogenes) и BOC (brother of Cdo). РТСН непосредственно связывается с пальмитиновой частью белка Нн. РТСН имеет два подтипа, РТСН1 и РТСН2, которые гомологичны между собой на 54%. РТСН2 имеет более короткий цитоплазматический домен и экспрессируется главным образом в коже, сперматоцитах, тогда как РТСН1 представлен более широко. В качестве корецептора для РТСН1 выступают CDON и BOC, а для РТСН2 - GAS1. Связывание Нн с РТСН приводит к изменению внутриклеточного домена рецептора и узнаванию его убиквитинпротеинлигазами Smurf1, 2 с последующей интернализацией комплекса внутрь клетки и деградацией. В отсутствии лиганда РТСН, по еще не до конца изученному механизму, ограничивает активность GPCR (G-protein-coupled receptors) – подобного мембранного белка Smoothened (SMO), удерживая его во внутриклеточных везикулах. В этом процессе предполагают важную роль

внутриклеточного домена PTCH, а поэтому считается, что PTCH2 слабее ограничивает SMO, чем PTCH1. Деградация PTCH приводит к тому, что Smo мигрирует из везикулы и внедряется в мембрану клетки, посредством взаимодействия с β -аррестином. Перед миграцией на мембрану клетки SMO фосфорилируется и активируется за счет ассоциации с протеинкиназами CK1 α , GPCR киназой 2 (GRK2) и PKA (cAMP -proteinkinase). SMO локализуется на первичной ресничке, которая выступает с поверхности большинства клеток позвоночных. Таким образом, первичная ресничка служит центром сигнального пути Hedgehog, что, по-видимому, увеличивает скорость и эффективность передачи сигнала.

Как только SMO накапливается в первичных ресничках, белковый комплекс, содержащий белок Kif7 (Kinesin Family Member 7) и SUFU (Suppressor of Fused), динамически доставляется к нему. Передача активирующего сигнала от SMO к SUFU, по-видимому, зависит от взаимодействия SMO с белками Evc1 и Evc2 (Ellis-van Creveld ciliary complex subunit 1, 2). SUFU необходим для подавления активности транскрипционных факторов GLI (glioma-associated oncogene homologue) в нестимулированных клетках, посредством прямого связывания GLI. У млекопитающих существуют три изоформы GLI, которые являются конечной целью сигнального пути Hh. Все белки GLI содержат активаторный домен на своем С-конце; GLI2 и GLI3 также имеют N-концевой репрессорный домен, поэтому GLI1 обычно индуцирует экспрессию генов и считается биомаркером активации пути, а GLI2 и 3 может индуцировать или подавлять экспрессию генов.

В отсутствие лиганда Hh, комплекс SUFU-GLI2,3 подвергается процессингу со стороны протеинкиназ CK1 α , GSK-3 β и PKA, где SUFU выступает платформой для фосфорилирования белков GLI. Фосфорилированные белки GLI узнают убиквитин протеин лигазой E3 - β -TrCP (Beta-transducin repeats-containing proteins) с последующим убиквитинилированием и частичной деградацией в протеасомах. Комплекс GLI1, 2 полностью деградирует в протеасомах, а GLI2, 3 процессируется с образованием укороченных форм (лишенных активаторного С-домена), осуществляющих репрессию транскрипции генов в ядре (GLI2, 3R). Еще одной убиквитинпротеинлигазы E3, которая убиквитинилирует белки GLI, является SPOP (Speckle-type POZ protein). SPOP, в отличие от β -TrCP, участвует в деградации активированных белков Gli2 и 3.

Активация SMO способствует быстрой диссоциации комплекса SUFU-GLI, таким образом высвобождая белки GLI, которые мигрируют в ядро и активируют транскрипцию. При первичной стимуляции лигандом Hh в клетке присутствуют только GLI2 и 3, которые активируют транскрипцию GLI1, за счет активаторного С-домена. Появившийся белок GLI1, ассоциируется с GLI2 усиливая транскрипцию GLI зависимых генов. GLI взаимодействуют с GACCACCCA мотивом доменом, содержащим «цинковый палец». К основным таргетным генам относятся Cyclin D, Cyclin E, Myc, GLI1, GLI2, PTCH1, PTCH2, Nhip1, CCND1, IGF2, BCL-2, CFLAR, FOXF1, FOXL1, PRDM1 (BLIMP1), JAG2,

GREM1, Follistatin, SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug), ZEB1, ZEB2 (SIP1), TWIST2 и др.

Новые данные свидетельствуют о том, что сигнальный путь Hh может взаимодействовать с другими сигнальными компонентами, такими как TGF- β , K-Ras, Notch и Wnt (β -катенин зависимый). Однако, все эти взаимодействия продемонстрированы в настоящий момент на опухолевых клеточных линиях.

2.8 Сигнальный путь Wnt

Термин «Wnt» образован от «Wingless» и «int». Онкогены Int, включая Int1, были впервые идентифицированы в опухоли молочной железы мыши. В 1987 году исследователи секвенировали ген Wingless дрозофилы и обнаружили, что это гомолог int-1. Таким образом, семейство int / Wingless стало семейством Wnt, а int1 стало Wnt1. Название Wnt представляет собой сочетание int и Wg и означает «Wingless-related integration site». Wnt - это секретируемые лиганды, которые регулируют рост, подвижность и дифференцировку клеток во время эмбрионального развития. Wnt действуют паракринным образом, активируя различные сигнальные каскады внутри клеток-мишеней, по сути являясь дозозависимым морфогеном. Семейство генов Wnt состоит из ряда высококонсервативных генов, включая 19 генов у человека и мыши, 7 генов у дрозофилы и 5 - у *C. elegans*. Характеристика членов семейства представлена в таблице 6. Семейство белков Wnt включает большое количество гликопротеинов, богатых цистеином (23–24 остатков), которые имеют длину 350-400 аминокислот и около 40 кДа. Белок Wnt1 участвует в развитии среднего мозга и мозжечка. Wnt2 участвует в развитии ткани молочной железы, Wnt2b связан с развитием клеток печени, Wnt3a играет важнейшую роль в морфогенезе развивающейся нервной трубки. Wnt4 регулирует пролиферацию, выживаемость и дифференцировку стромальных клеток эндометрия. Также было показано, что Wnt5a необходим во время эмбриогенеза для удлинения первичной передне-задней оси, для разрастания конечностей и полового бугорка, подавляет экспрессию коллагена II типа в хондроцитах. Wnt6 играет роль в формировании сердца плода. Wnt7a в эмбриональном развитии, контролирует формирование дорсального и вентрального концов конечностей, развития скелета и уrogenитального тракта. Wnt9a регулирует эмбриональное развития костей, их минерализацию и созревание хондроцитов. Wnt10a играет роль в нормальном развитии эктодермы, зубов, сосочков языка и потовых протоков, требуется для нормального функционирования волосяного фолликула. Существует и другие представители, однако до конца функции многих белков семейства Wnt не ясны.

После трансляции белки Wnt в эндоплазматическом ретикулуме связываются с множественными процессинговыми ферментами. Основные посттрансляционные модификации это гликозилирование и ацилирование. Число гликозидных остатков значительно варьируется между разными представителями Wnt, например, Wnt1 несет четыре, а Wnt3a несет два сайта связывания на N-конце. Ацилирование происходит пальмитолеиновой кислотой

консервативного остатка серина (S239), с помощью ацилтрансферазы Porcupine (PORCN). После модификаций Wnt связывается с восьмипроходным белком-шапероном Wntless (WLS), который облегчает транспорт ацилированных лигандов Wnt к плазматической мембране и способствует его секреции Wnt. Как именно гидрофобные лиганды Wnt транспортируются к рецептору не совсем понятно. Существует много предположений о механизмах транспорта Wnt на значительные расстояния. Одно из них предполагает участие белков-шаперонов, которые часто используются клетками для защиты гидрофобных структур, за счет связывания с ними, способствуя стабилизации и улучшению растворимости. Одним из таких потенциальных белков является sFRP (Frizzled-related proteins), который связывается с Wnt и способен транспортироваться с ним к рецептору на дальние расстояния. Еще один предложенный механизм включает взаимодействия белков Wnt с гепарансульфатными протеогликанами (HSPGs), компонентом внеклеточного матрикса. HSPG связываются с множеством лигандов и традиционно считаются корецепторами, способствующими связыванию лигандов со своими рецепторами. Кроме того, было показано, что HSPGs взаимодействуют со многими морфогенами. Считается, что HSPGs усиливают распространение Wnt за счет его стабилизации в гидрофильной среде. Другой вариант доставки предполагает использование экзосом, небольших (50-100 нм) двумембранных структур, которые используются при межклеточной сигнализации. Было показано наличие в экзосомах белков Wnt, которые связаны и стабилизированы с помощью шаперона WLS. Существуют и другие предположительные механизмы транспорта, например с помощью липопротеинов или цитонем (тонкие клеточные выступы, которые специализируются на обмене сигнальными белками между клетками). На кончике цитонем сосредоточены скопления белков Wnt с белками-шаперонами WLS, которые при удлинении цитонемы достигают клетки-мишени, содержащей рецептор Wnt (табл. 6).

Таблица 6

Предполагаемые механизмы межклеточного транспорта белков Wnt

Механизмы	Wnt белки	Организм, где обнаружено
Wnt связанные шапероны	Wnt3a, Wnt5a	Человек (клеточная линия HEK293)
HSPGs	Wnt11	Xenopus (эмбрион)
Липопротеины	Wnt5a	Мышь (эпителиальные клетки)
Экзосомы	Wnt3a	Человек (клеточная линия HEK293)
Цитонемы	Wnt8a	Человек (опухолевые клетки желудка)

После транспортировки белки Wnt связываются семейством рецепторов Frizzled (FZD) своим N-концевым богатым цистеином доменом. У человека имеется десять рецепторов FZD, все они являются семипроходными белками, ассоциированными с G-белками (GPCR), которые являются родственными

белками SMO (сигнального пути Hh). Передачу сигналов через рецепторы FZD делят на два пути: канонический или β -катенин зависимый и неканонический. По каноническому пути Wnt связываются с FZD рецептором и корецепторами LRP5/6 (low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein). LRP5 и LRP6 содержат более 1600 аминокислот и представляют собой уникальную группу семейства LDLR. Белки LRP5 и LRP6 идентичны на 70%. Цитоплазматический домен LRP5/6 содержит около 200 аминокислот и пять мотивов PPPSPxS, названных от А до Е, которые присутствуют у всех животных начиная от беспозвоночных. Интересно, что мутанты LRP6 и LRP5, у которых отсутствует внеклеточный домен, ведут себя как конститутивно активированные рецепторы. Эти результаты подчеркивают критическую важность мотива PPPSPxS.

Лиганды Wnt связываются с богатым цистеином доменом (CRD) FZD и с LRP5/6, инициируя сборку гетеротримерного комплекса FZD-LRP5/6. Комплекс передает сигнал в цитоплазму за счет цитоплазматический доменов рецепторов, через два основных каркасных белка Disheveled и Аксин. Disheveled (у человека есть три представителя DVL1-3) – это многофункциональный белок, который служит центром канонической и неканонической передачи сигналов Wnt. Впервые идентифицированные у *Drosophila*, имеют длину около 700 аминокислот и содержат три основных домена примерно по 80-90 аминокислот каждый: DIX (Disheveled, Axin), PDZ (Postsynaptic density 95, discs large, zona occludens-1) и DEP (Disheveled, Egl-10, Pleckstrin). PDZ и DEP осуществляют взаимодействие с FZD, а DIX домен способен осуществлять полимеризацию DVL, обеспечивая платформу для низкоаффинных белок-белковых взаимодействий, например, между DVL и Axin. Большинство рецепторов FZD, за исключением неканонической группы FZD3/6, содержат карбоксиконцевой мотив S/TxV, который обычно участвует в связывании PDZ домена DVL. Белок DVL так же способен взаимодействовать с киназами СК1 ϵ и СК2 (casein kinase), которые способны его фосфорилировать при передаче сигналов Wnt. В отсутствии лиганда Wnt, DVL связан с FZD в мономерной форме, а сигнал от лиганда способствует олигомеризации DVL на мембране.

Другой каркасный белок Аксин содержит около 850 аминокислот и является ключевым негативным регулятором β -катенин зависимого пути. Аксин имеет карбоксиконцевой домен DIX, который был назван для удобства DAX, чтобы отличить его от домена DVL DIX. DAX проявляет свойство полимеризации, аналогичное DIX, но менее динамичное. Исследования на моделях млекопитающих утверждают, что олигомеризация DAX является критической для функции Аксин, как негативного регулятора β -катенин зависимого сигнального пути. Аксин напрямую связывается с DVL посредством взаимодействия доменов DAX-DIX, что как предполагают ведет к ингибированию аксина. В отсутствии платформы DVL, Аксин связывается с β -катенином, GSK3, СК1 α и APC (adenomatous polyposis coli) и дополнительными белками, формируя «комплекс деградации β -катенина» (рис. 18).

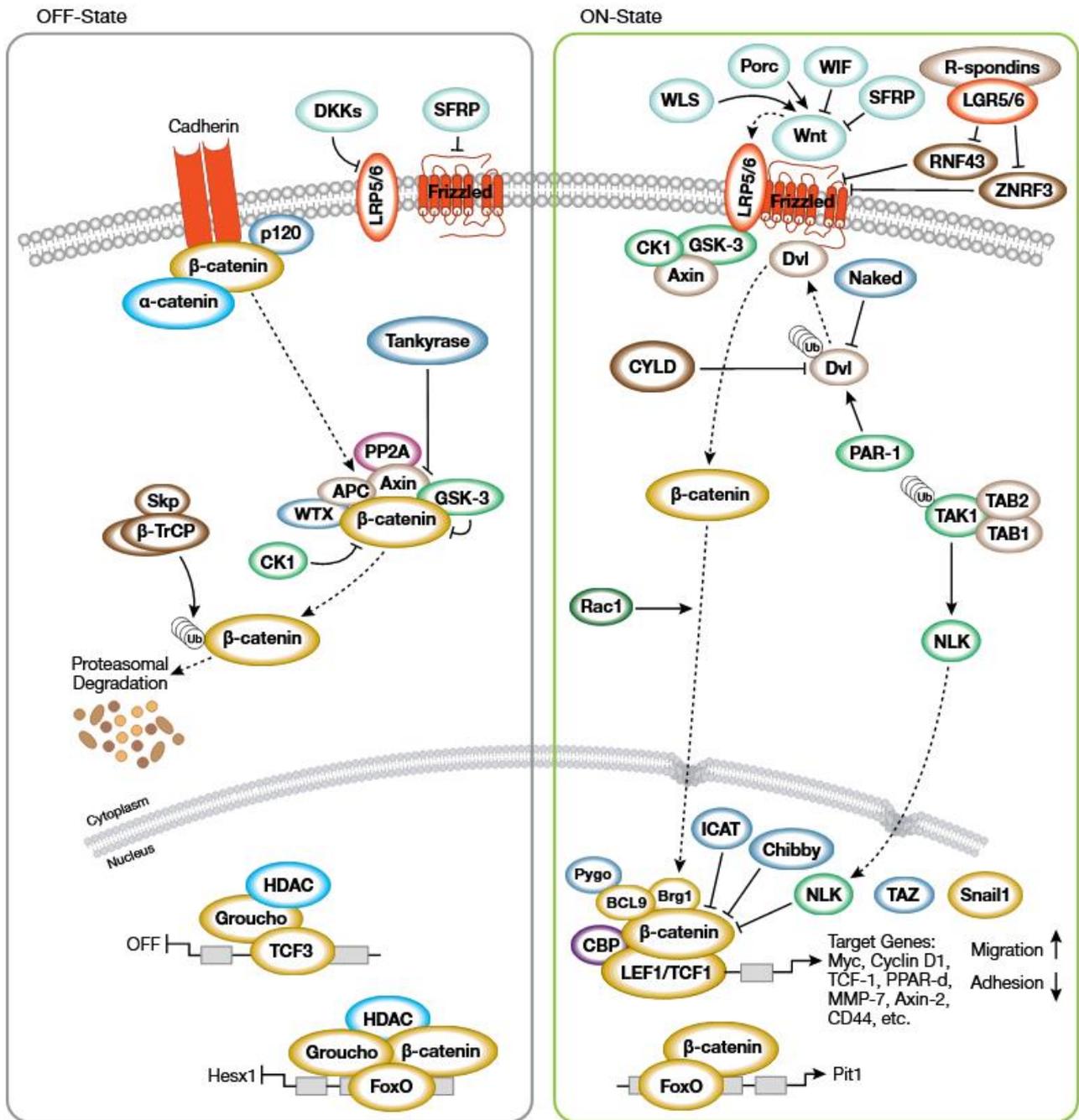


Рис. 18. Схема сигнального пути Wnt

[<https://www.cellsignal.com/pathways/wnt-beta-catenin-signaling-pathway>]

β-катенин – это белок состоящий из 781 аминокислоты, принадлежащий к семейству белков armadillo (броненосцы). Первоначально он был обнаружен в конце 1980-х как белок, связанный с E-cadherin и охарактеризован при первичном скрининге генов, необходимых для эмбрионального развития *Drosophila*. Центральная область β-катенина включает 12 повторов Armadillo (ARM), фланкированных определенным N-концевым доменом (NTD) и карбоксильным концевым доменом (CTD). Между последним повтором ARM и гибкой частью CTD находится специфическая консервативная спираль, которая важна для сигнальной активности β-катенина. Каждый повтор ARM включает

мотив из 42 аминокислот и образует три спирали треугольной формы. Все повторы ARM образуют суперспираль с длинной положительно заряженной бороздкой. Клеточный β -катенин существует в трех различных пулах: мембранном, цитоплазматическом и ядерном. Вновь синтезированный β -катенин взаимодействует с E-кадгерином и служит структурным белком, локализованным на клеточной мембране (мембранный пул). Цитоплазматический пул обычно без внешнего сигнала отсутствует, т.к. свободный β -катенин связывает комплекс деградации. Когда комплекс деградации перестает функционировать, например, при передаче сигнала β -катенин мигрирует в ядро (ядерный пул) и способен активировать транскрипцию генов. β -катенин выполняет две основные функции в клетке: структурную роль в адгезионных контактах и сигнальную функцию в качестве транскрипционного фактора.

Межклеточные соединения необходимы для поддержания полярности, целостности клеток и тканей. Позвоночные животные имеют трех основных систем межклеточного соединения: плотного и адгезионного контактов, щелевого соединения. Адгезионные контакты клетки формируют белки кадгерин/катенин связанные с микрофиламентами клетки. Классические кадгеринины представляют собой однопроходные трансмембранные гликопротеины, опосредующие кальций-зависимую внутриклеточную адгезию. Кадгеринины включают множество подтипов, таких как E (эпителиальные), N (нейрональные), VE (сосудисто-эндотелиальные), P (плацентарные), R (сетчатки) - и K (почечные) -кадгеринины. E-кадгерин является основным медиатором внутриклеточной адгезии в эпителиальных клетках. Внеклеточная область E-кадгерина связывается с другими кадгеринами, присутствующими в соседних клетках. Его внутриклеточная часть взаимодействует с молекулами катенина, состоящими из β -катенина, γ -катенина и других регуляторных белков. α -катенин напрямую связывается с N-концевой областью β -катенина и тем самым соединяет комплекс кадгерин-катенин с актиновыми филаментами, что способствует кластеризации белков адгезионного соединения и стабилизирует клеточную адгезию. Без стимула Wnt большая часть β -катенина располагается на мембране. Он способствует формированию комплекса E-кадгерин/ β -катенин, созданию эпителиального барьера и ограничению инвазии и метастазирования клеток.

β -катенин является основным компонентом канонического пути передачи сигналов Wnt, регулирующего эмбриональное развитие, регенерацию тканей, поддержание стволовых клеток и гомеостаз тканей взрослых. В каноническом пути сигнал Wnt является главным регулятором β -катенина. Он индуцирует стабилизацию β -катенина в цитоплазматическом пуле и инициирует внутриклеточную передачу сигналов через ядерную транслокацию β -катенина. В «выключенном» состоянии Wnt цитозольный β -катенин жестко регулируется комплексом деградации β -катенина. После того, как два каркасных белка Аксин и APC узнают свободный β -катенин, они привлекают протеинкиназы SK1, а затем и GSK3 β , которые индуцируют его серин-треониновое фосфорилирование

(табл. 7). Фосфорилированный β -катенин узнается убиквитин лигазой E3 (β -TrCP) и происходит убиквитинирование с последующей быстрой деградации в протеасомах.

Таблица 7

Регуляция β -катенина

Локализация	Регуляторы	Сайты	Функции
Мембранная	Fer, Fyn, c-Met	Y142	Ослабляет связывание с α -катенином
	c-Src, cMet, EGFR	Y654	Диссоциирует комплекс E-кадгерин / β -катенин
	Ab1	Y489	Диссоциирует комплекс E-кадгерин / β -катенин
	c-Src	Y86	Способствует разделению Y654 и E-кадгеринов
	PKD1	T120	Транспортирует β -катенин в аппарат Гольджи
	PT1B	Y654	Удаляет фосфатную группу с Y654
Цитоплазматическая	CK1	S45	Формирует сайт узнавания для β -Trcp
	GSK3 β	S33, S37, T41	Формирует сайт узнавания для β -Trcp
Ядерная	Fer, Fyn, Yes, Src	T142	Способствует связыванию β -катенина с ядерным транспортером Vcl9
	АКТ, PKA	S552, S675	Усиливает активацию репортера β -катенина / TCF
	PKAL	S663	Усиливает транскрипционную активность
	CK1	S45	Sox9 переносит комплекс деградации «GSK3 β - β TRCP-CK1-Axin» в ядро и уменьшает ядерный β -катенин
	GSK3 β	S33, S37, T41	Sox9 переносит комплекс деградации «GSK3 β - β TRCP-CK1-Axin» в ядро и уменьшает ядерный β -катенин

В результате взаимодействия Wnt с рецепторами на мембране образуется гетеротример FZD-LRP5/6, с DVL связывается Аксин, на который садятся протеинкиназы GSK3 β и CK1. За счет сближения Аксина с цитоплазматическим

доменом рецепторов LRP5/6, происходит их фосфорилирование. Аксин узнает и садится на цитоплазматическую часть LRP5/6 и затем следует дополнительное фосфорилирование LRP5/6. Таким образом комплекс деградации не формируется, β -катенин накапливается в цитоплазме и транспортируется в ядро, где вытесняет репрессор Groucho из комплекса TCF/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer-binding factor) и привлекает коактиваторов транскрипции генов CBP/p300 (CREB-binding protein), PYGO (Pygopus), BCL9 (B cell lymphoma 9) и др. Основные гены, которые активирует β -катенин зависимый сигнальный путь это cyclin-D1, Axin 2, c-Myc, CCND1, DKK1, ITF2, PPAR-d, CD44, MMP-2,7, c-jun, fra-1, claudin-1, VEGF, FGF18, и др.

Неканонический сигнальный путь Wnt делится на PCP (planar cell polarity) путь и Ca^{+2} -Wnt путь. Путь PCP участвует в регуляции полярности клетки, адгезии, поддержания стволовых клеток, эмбриональном развитии, а также инвазии и миграции клеток. В этом сигнальном пути участвуют обычно Wnt4, Wnt5a, Wnt5b и Wnt11, связываются с рецепторами семейства FZD3, 6 и корецепторами ROR1, ROR2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, 2), PTK7 (protein tyrosine kinase 7) или receptor-like tyrosine kinase (RYK). Передача сигнала Wnt инициирует фосфорилирование DVL через протеинкиназы CK1, после чего Ps-DVL (фосфорилированный DVL) взаимодействует с C-концевым доменом, богатым пролином, корецепторных молекул, которые необходимы для эффективного ингибирования канонической передачи сигналов Wnt. Затем Ps-DVL двумя независимыми путями способен активировать малые ГТФазы Rho и Rac. RhoA, как и профилин 1 активируется через молекулу Daam1 (disheveled associated activator of morphogenesis 1), которая ассоциирована с DVL после активации. Профилин – это актин-связывающий белок, участвующий в обеспечении динамической реструктуризации актинового цитоскелета. Daam1 представляет собой семейство белков Formin и, как было показано, регулирует гастрюляцию. Белки Formin играют центральную роль в регуляции реорганизации цитоскелета в клетках млекопитающих и содержат три основных домена, называемых доменом связывания ГТФазы (GBD), доменом гомологии Formin 1 (FH1) и доменом гомологии Formin 2 (FH2). Предполагается, что эти белки существуют в цитоплазме в аутоингибированном состоянии, которое опосредуется доменом DAD (diaphanous autoinhibitory domain). Этот домен расположен на C конце и служит для создания закрытой конформации белка Daam1. Вероятно, взаимодействие Daam1 с активированным DVL, через DAD домен приводит к изменению конформации белка на активную. Затем FH1 и FH2 домены взаимодействуют с профилином 1 инициируя полимеризацию актина. С помощью GBD домена Daam1 может взаимодействовать с GEF, GAP и способствовать активации RhoA.

DVL способен непосредственно активировать Rac1. Показано, что N-концевой домен (1-81 аминокислоты) DVL критически важен для активации Rac1, однако в этом процессе играет важную роль Rac1 специфический GEF - Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1). Видимо DVL в процессе активации Rac1 посредством Tiam1 выступает в качестве каркасного белка,

объединяющего Ras1 и Tiam1 пространственно. Активированный Ras1 передает сигнал на JNK. Более подробный механизм передачи сигналов белков семейства Rho описаны выше.

Передача сигналов Wnt - Ca²⁺ играет центральную роль в судьбе клеток во время раннего эмбриогенеза, межнейрональной коммуникации, воспалительной реакции и так далее. Передача сигналов Wnt - Ca²⁺ инициируется в основном с помощью Wnt5a (Wnt11) и Fzd2, 7, а также корецепторами ROR2 или RYK. В настоящее время ведется много споров о механизмах передачи внутриклеточных сигналов Wnt – Ca²⁺ сигнального пути, но все сходятся во мнении, что ее результатом является активация фосфолипазы Cβ (PLCβ). В исследованиях показано, что активация ROR2 происходит путем фосфорилирования со стороны GSK3β, которая, как и в случае с каноническим путем активации, находится на аксине связанным с активированным DVL. А сам Wnt в такой модели физически сближает Fzd с ROR2, тем самым делая его цитоплазматический домен доступным для фосфорилирования по Ser 864. Дальнейшие события связаны с активацией G-белков, в котором участвует цитоплазматический доменом FZD, DVL, а также как предполагают, играют определенную роль активированные ранее ROR2 или RYK. После взаимодействия Wnt с FZD и корецепторами, происходит активация DVL (фосфорилирование со стороны CK1), а затем и корецепторов (за счет комплекса Ps-DVL-Аксин- GSK3β), которые блокируют канонический путь передачи сигнала. С активированным Ps-DVL способен связываться белок Daple (Dishevelled-binding protein), который без активации сигнального пути Wnt связан с цитоплазматическим неактивным DVL. После активации сигнального пути Wnt, Daple связывается с Ps-DVL и запускает активацию тримерных G-белков (Gαi / βγ) на мембране, т.к. содержит домен GEF. Для процесса активации тримерных G-белков обязательно необходимо образование комплекса FZD- Ps-DVL-Daple. Gα в свою очередь активирует PLCβ, которая расщепляет фосфолипиды мембраны с образованием инозитол-1,4,5-трисфосфатов (IP3). Оставшийся фрагмент фосфолипида, после гидролиза PLCβ, DAG, вместе с Ca²⁺, активирует PKC, которая дополнительно стимулирует Cdc42 и способствует полимеризации актина. С другой стороны, IP3 связывается IP3 рецепторами (IP3R) на мембране эндоплазматического ретикулума, открывая кальциевые каналы и повышая уровень Ca²⁺ в цитоплазме. Снижение уровней Ca²⁺ в просвете ЭПР инициирует изменение конформации белков STIM1/2 (Stromal interaction molecule 1), которые становятся способными активировать белки ORAI (Calcium release-activated calcium channel protein) на плазматической мембране и индуцировать поступление Ca²⁺ в цитоплазму. Кроме того, накопление Ca²⁺ в цитоплазме активирует SERCA (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), которая действует как насос ионов Ca²⁺, из цитоплазмы в ЭПР, являясь негативным регулятором ионов кальция в цитоплазме. Повышенная концентрация Ca²⁺ активирует фосфатазу кальциневрин и несколько кальций-зависимых киназ, включая PKC и САМКII. Повышенная активность кальциневрина, в свою очередь, активирует ядерный фактор активированных Т-клеток (NF-AT). NF-AT активирует транскрипцию

генов клеточного цикла (CDK4, 6, c-Myс, Cyclin A2, Cyclin D1, Cyclin D3, p15, p21), антиапоптотических (Bcl-2, BDNF, c-FLIP) и проапоптотических генов (FasL, TNF- α , TRAIL, Trim17) и другие гены, например, гены цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ и др.).

Напротив, стимуляция САМКII стимулирует TGF β -активированную протеинкиназу 1 (ТАК1), которая впоследствии активирует немо-подобную киназу (NLK), что приводит к фосфорилированию TCF и ингибированию передачи сигналов по канонического пути Wnt. Комплекс Wnt-Fzd-Dvl также активирует специфичную для циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) PDE6 (Phosphodiesterase 6), тем самым истощая клеточный сGMP и инактивируя протеинкиназу G (PKG), что, в свою очередь, увеличивает клеточную концентрацию Ca²⁺. Индуцированная G-белком активация p38 посредством митоген-активируемой протеинкиназы 3/6 (МКК3/6) необходима для активации PDE6. Более того, индуцированное p38 фосфорилирование активирующего фактора транскрипции 2 (ATF2) по 69 и 71Thr важно для его активации. Гены мишени ATF2 можно разделить на гены связанные: с клеточным циклом (CCNA1, CCND1, GADD45, p21WAF1, RB1 и SERPINB5), с иммунными и воспалительными реакциями (ELAM1, HBG1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL23A, IL6, IL8 и TNF α), с транскрипционными факторами коактиваторами ATF2 (ATF3 и JUN) и с регуляцией апоптоза (ACHE, BCL2L1, CHOP, DP5 и TRAIL). Помимо этого, ATF2 регулирует экспрессию белков межклеточной и внутриклеточной сигнализации (PDGFRA, MMP2, PLAУ, HSPA5).

Регуляция Wnt сигнального пути осуществляют мембранные убиквитин лигазы RNF43 (Ring finger protein 43) и ZNRF3 (Zinc and Ring Finger 3), которые способны убиквитинилировать лизины в цитоплазматическом домене FZD, вызывая эндоцитоз и разрушение этих рецепторов в лизосоме. Другим регулятором Wnt являются мембранные рецептор LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) и его лиганд RSPO (R-spondin ligand family members), которые при взаимодействии нейтрализуют убиквитин лигазы RNF43 и ZNRF3, тем самым способствуя передачи сигнала. YAP/TAZ (Yes-associated protein/ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) также являются регуляторами Wnt и конкурируют с LRP5/6 за домен взаимодействия Аксина с корецепторами. Таким образом, ассоциация Аксина с YAP/TAZ ингибирует сигнальный путь Wnt.

ЛИТЕРАТУРА

1. Atlas of genetics and cytogenetic in oncology and hematology [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://atlasgeneticsoncology.org//index.html>, свободный.
2. Aznar N., Midde K., Dunkel Y. et al. Daple is a novel non-receptor GEF required for trimeric G protein activation in Wnt signaling // *Elife*. 2015. – P. 1–40.
3. Cell signaling technology [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://www.cellsignal.com/>, свободный.
4. Creative Diagnostics [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://www.creative-diagnostics.com/signaling-pathway.htm>, свободный.
5. Cuenda A. Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) in Cancer // *Encyclopedia of Cancer*. 2019. – № 3. – P. 472–480.
6. Cusabio [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://www.cusabio.com/pathway.html>, свободный.
7. Grumolato L., Liu G., Mong P., et al. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors // *Genes Dev*. 2010. – V. 24. – № 22. – P. 2517–2530.
8. Guo Y.J., Pan W.W., Liu S.B. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis // *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*. 2020. – V. 19. – P. 1997–2007.
9. Lee H.J., Kim M.Y., Park H.S. Phosphorylation-dependent regulation of Notch1 signaling: the fulcrum of Notch1 signaling // *BMB Rep*. 2015. – V. 48. – № 8. – P. 431–437.
10. Luo L.Y., Hahn W.C. Oncogenic Signaling Adaptor Proteins // *J. Genet Genomics*. 2015. – V. 42. – № 10. – P. 521–529.
11. MacDonald B.T. He X. Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ β -Catenin Signaling // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012. – V. 12. – № 4. – P. 1–23.
12. Pakvasa M., Haravu P., Boachie-Mensah M. Notch signaling: Its essential roles in bone and craniofacial development // *Genes & Diseases*. 2020. – P. 1–18.
13. Pereira D.M., Cecilia M.P. Rodrigues Targeted Avenues for Cancer Treatment: The MEK5–ERK5 Signaling Pathway // *Trends in Molecular Medicine*. 2020. – P. 1–14.
14. Routledge D., Scholpp S. Mechanisms of intercellular Wnt transport // *Development*. 2019. – P. 1–12.
15. Shi X., Wang J., Lei Y., et. al. Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer // *Molecular Medicine REPORTS*. 2019. – P. 4529–4535.
16. Stecca B., Rovida E. Impact of ERK5 on the Hallmarks of Cancer // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. – № 20. – P. 1–22.
17. The WNT [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://wnt.stanford.edu>, свободный.
18. Tubita A., Lombardi Z., et. al. Beyond Kinase Activity: ERK5 Nucleo-Cytoplasmic Shuttling as a Novel Target for Anticancer Therapy // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. – № 21. – P. 1–17.

19. Wang B., Li X., Liu L., Wang M. β -Catenin: oncogenic role and therapeutic target in cervical cancer // Biol Res. 2020. – V. 53. – № 33. – P. 1–11.
20. Xu X., Zhang M., Xu F., Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities // Molecular Cancer. 2020. – V. 19. – № 165. – P. 1–35
21. Yang L., Shi P., Zhao G., et. al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020. – V. 5. – № 8. – P. 1–35.

Алексей Дмитриевич Перенков

**ПОСОБИЕ К СЕМИНАРСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО КУРСУ
«МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОНКОЛОГИЯ».
ЧАСТЬ 1. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Учебно-методическое пособие

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.