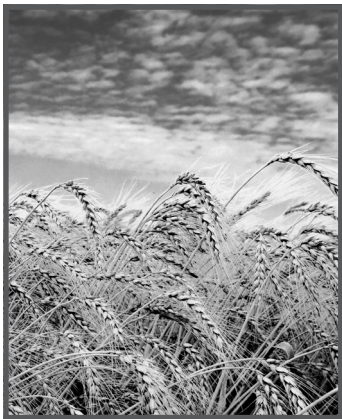


Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

В. Джамєєв

МЕХАНІЗМИ РЕЦЕПЦІЇ ТА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО СИГНАЛІНГУ У РОСЛИН



Навчальний посібник

- Призначення, структура і принципи функціонування сигнальних систем клітин
- Рецепція зовнішнього сигналу
- Передача сигналу всередині клітини
- Механізми передачі сигналу рослинних гормонів

Харків — 2016

УДК 577.2
ББК 28.070
Д 40

Рецензенти:

Колупаєв Ю. Є. — доктор біологічних наук, професор, зав. кафедрою ботаніки та фізіології рослин Харківського національного аграрного університету імені В. В. Докучаєва;

Перський Є. Е. — доктор біологічних наук, професор, зав. кафедрою біохімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Рекомендовано до друку рішенням Вченої ради
Харківського національного університету
імені В. Н. Каразіна
(протокол № 5 от 3.11.14 р.)

Джамєєв В. Ю.
Д 40 **Механізми рецепції та внутрішньоклітинного сигналінгу у рослин : навчальний посібник / В. Ю. Джамєєв. — Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2016. — 208 с.**

ISBN 978-966-285-280-6

У навчальному посібнику викладаються основні відомості про внутрішньоклітинну сигналізацію рослин. Описані структура, властивості та особливості функціонування компонентів внутрішньоклітинних сигнальних систем, механізми рецепції та трансдукції зовнішніх сигналів у рослинних клітинах. Книга написана на основі лекційного матеріалу до спеціального курсу «Внутрішньоклітинні сигнальні системи рослин» і призначена для студентів, які навчаються на біологічних факультетах класичних університетів, а також у вищих навчальних закладах аграрного та педагогічного профілів. Посібник може бути також цікавим для аспірантів, викладачів, науковців та всіх, хто захоплюється біологією.

УДК 577.2
ББК 28.070

© Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2016
© Джамєєв В. Ю., 2016
© Джамєєв В. Ю., макет, 2016
© Джамєєв В. Ю., макет обкладинки, 2016

ISBN 978-966-285-280-6

ЗМІСТ

ВСТУП	7
1. ЗНАЧЕННЯ, СТРУКТУРА ТА ПРИНЦИПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ КЛІТИН	
1.1. Значення сигнальних систем у біологічних об'єктах	8
1.2. Компоненти сигнальних систем	10
1.3. Сутність передачі сигналу	11
1.4. Ефект посилення в сигнальних системах	16
1.5. Транскрипційний каскад	17
1.6. Типи сигнальних механізмів	19
1.7. Дерепресорні сигнальні механізми	20
1.8. Система убіквітин-опосередкованої деградації білків	21
1.8.1. Етап перший — вибір субстрату	22
Убіквітин і убіквітинуювання	22
Убіквітинуючий комплекс	25
Структура SCF-подібної убіквітинуючої лігази	27
Регуляція активності SCF-лігази	27
Зв'язування субстрату з убіквітинуючою лігазою	28
Особливості білків-мішеней убіквітинуючої лігази	29
1.8.2. Етап другий — деградація субстрату	29
26S протеасома	29
Структура 26S протеасоми	30
Корова 20S протеасома	31
Регуляторна 19S частинка	32
Особливості функціонування 26S протеасоми	32
2. РЕЦЕПЦІЯ ЗОВНІШНЬОГО СИГНАЛУ	
2.1. Загальна характеристика клітинних рецепторів	34
2.1.1. Що таке рецептор?	34
2.1.2. Структурно-функціональні особливості рецепторів	35
Субодична та доменна структура	35
Основні механізми активації рецепторів	36
Функціональна активність	38
2.2. Ліганд-зв'язуючі рецептори	39
2.2.1. Локалізація ліганд-зв'язуючих рецепторів	41

2.2.2. Зовнішні рецептори	42
Рецептор-подібні кінази	42
Гістидинові рецепторні кінази	46
Гібридні гістидинові кінази	46
Прокаріотичні двокомпонентні сигнальні системи	46
Двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин	48
Етиленові рецептори	51
2.2.3. G-білок сполучені рецептори (GPCR)	53
G-білок сполучені рецептори тварин	53
G-білки GPCR-типу (GTG)	54
2.2.4. Рецептори-каналоформери	55
2.2.5. Внутрішньоклітинні рецептори	57
Ядерні рецептори тварин	57
Внутрішньоклітинні рецептори рослин	59
F-box рецептори	59
Гормон-чутливі ліпази	61
START-домен рецептори	63
2.3. Світлові рецептори	64
2.3.1. UV-B рецептори	65
2.3.2. Фототропіни	66
Відкриття та функції	66
Структура	67
Світлова активація	68
2.3.3. Криптохроми	71
Функції	71
Структура та механізм активації	72
2.3.4. Фітохроми	74
Різноманітність і значення фітохромів	74
Структура фітохромів	77
Фотосенсорний район	78
Димеризаційний район	78
Активація фітохромів і передача світлового сигналу	79
Світлозалежні зміни структури фітохромів	79
Перенесення фітохромів у ядро	79
Регуляція активності фітохромів	81
Модуляція активності мішеней фітохромів	82
Короткий опис механізму світлової активації фітохромів	84
3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛУ ВСЕРЕДИНІ КЛІТИНИ	
3.1. G-білки	85
3.1.1. Гетеротримерні G-білки	86
3.1.2. Мономерні (малі) G-білки	90
Різноманітність мономерних G-білків	90
Сигнальні мономерні G-білки	91

3.2. Ефекторні молекули та вторинні месенджери	93
3.2.1. Фосфоліпази	94
Фосфоліпази D	96
Фосфоліпази C	99
Поліфосфоінозитид-залежні фосфоліпази C	100
Фосфатидилінозитол і його похідні	101
PI-PLC-опосередкований сигналінг	106
Фосфоліпази A ₂	109
Октадеканоїдний шлях	111
Функції фосфоліпази A ₂	114
Фосфоліпази A ₁ і B, лізофосфоліпази A	114
Взаємодія фосфоліпаз	115
3.2.2. Оксид азоту (NO) та NO-сигналінг	116
Оксид азоту	116
Хімічні та антиоксидантні властивості NO	117
Шляхи утворення NO	118
Нітрат/нітрит-залежні ферментативні шляхи	118
Аргінін-залежні шляхи синтезу	119
Нітрит-залежні неферментативні шляхи	121
NO-сигналінг	122
Нітрозилювання металів	122
S-нітрозилювання цистеїну	124
Нітрування тирозину	126
Зв'язок NO і Ca ²⁺ -сигналів	126
3.2.3. Нуклеотидциклазні сигнальні системи	127
Аденілатциклазна система	128
Ферменти аденілатциклазної системи	128
Роль cAMP у регуляції активності протеїнкінази A тварин	132
Значення cAMP у регуляції активності катаболітних генів у бактерій	133
cAMP-регульовані білки рослин	134
Гуанілатциклази та cGMP	136
3.3. Іони кальцію в системі передачі сигналу	138
3.3.1. Структура Ca ²⁺ -зв'язуючих білків	140
3.3.2. Транспортні системи, що кодуєть кальцієвий сигнал	143
Екстраклітинний транспорт кальцію	143
Ca ²⁺ -АТРази	143
Ca ²⁺ /H ⁺ -антипортери	145
Індуковане надходження кальцію в цитоплазму	146
Потенціал-керовані канали	146
Ліганд-керовані канали	147

3.3.3. Декодування Ca^{2+} -сигналу	149
Активація кальмодулін-залежних білків	149
Модуляція активності транскрипції кальмодуліном	150
Модуляція активності білків кальцій-залежними кінзазами	151
3.4. Ковалентна модифікація сигнальних посередників	154
3.4.1. Значення оборотної ковалентної модифікації	154
3.4.2. Рослинні протеїнові кінзази	156
Кальцій-залежні протеїнові кінзази	157
SnRK — SNF1-подібні кінзази	160
Рецептор-подібні кінзази	162
MAP кінзази	164
Циклін-залежні кінзази (CDK)	165
Казеїнові кінзази CK1 і CK2	167
Родина GSK3/Shaggy	168
CTR1/Raf-подібна родина	169
3.4.3. Протеїнові фосфатази	169
Класифікація фосфатаз	170
Серин/треонінові фосфатази	170
Тирозинового фосфатази	172
Рослинні фосфатази	174
Різноманітність рослинних фосфатаз	174
Значення рослинних фосфатаз	175
4. МЕХАНІЗМИ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ РОСЛИННИХ ГОРМОНІВ	
4.1. Регуляція транскрипції ауксин-регульованих генів	177
4.1.1. Регулятори транскрипції ауксин-регульованих генів та їхня доменна структура	177
4.1.2. Участь Aux/IAA і ARF у регуляції експресії ауксин-регульованих генів	178
4.2. Передача цитокінінового сигналу	181
4.3. Трансдукція гіберелінового сигналу	184
4.4. Передача сигналу АБК через START-домен рецептори	186
4.5. Сприйняття та трансдукція етиленового сигналу	187
4.6. Рецепція та трансдукція брасиностероїдного сигналу	190
ЛИТЕРАТУРА	195
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ	201
ПОКАЖЧИК ТЕРМІНІВ	204

ВСТУП

Сучасні дослідження фізіологічних функцій організмів тісно пов'язані з вивченням механізмів сприйняття та внутрішньоклітинної передачі сигналів. Знання механізмів формування реакції-відповіді клітин на вплив екстраклітинних сигналів є принципово важливим для розвитку уявлень про регуляцію функціональної та метаболічної активності клітин. Це, в свою чергу, необхідно для глибшого розуміння сутності онтогенезу, особливостей взаємодії організмів із навколишнім середовищем і природи різноманітних біологічних функцій живих об'єктів.

Інтенсивне накопичення відомостей в галузі клітинного сигналіngu привело до появи значної кількості тематичних оглядових статей і монографій. Однак більшість з них можна рекомендувати студентам тільки як додаткову літературу, оскільки такі джерела містять величезний масив специфічних даних, який ускладнює сприйняття студентами матеріалу про власне механізми внутрішньоклітинної передачі сигналів. Цей навчальний посібник є спробою автора систематизувати основні відомості про внутрішньоклітинну сигналізацію рослин. У книзі описані структура, властивості та особливості функціонування компонентів внутрішньоклітинних сигнальних систем рослин, механізми рецепції і трансдукції зовнішніх сигналів. У зв'язку з поліфункціональністю більшості сигнальних посередників їх участь у фізіологічних процесах детально не розглядається.

Книга не є всеосяжним джерелом відомостей про механізми рецепції і сигналіngu у рослин, і можливо, не дасть абсолютно всіх відповідей на питання найбільш допитливих читачів. Однак цей навчальний посібник може послужити стартовим майданчиком для початку освоєння поки що маловивченої галузі біології — механізмів рецепції і сигналіngu у рослин.

1. ЗНАЧЕННЯ, СТРУКТУРА ТА ПРИНЦИПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ КЛІТИН

1.1. ЗНАЧЕННЯ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ У БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

Живі організми є відкритими термодинамічними системами, які значною мірою залежать від зовнішнього оточення. З одного боку, середовище існування є джерелом енергії та будівельного матеріалу. Організму необхідно адекватно реагувати на ці джерела, щоб оптимально їх використовувати. З іншого боку, середовище не є стабільним і постійно змінюється, тому може бути фактором дестабілізації. Такі зміни можуть мати як періодичний (сезонні, добові ритми), так і довільний характер. Флуктуації зовнішніх умов спостерігаються не тільки в межах норми реакції організму. Екстремальні умови можуть порушити структурну цілісність та функціональну активність організму, ставлячи під загрозу його існування. У будь-якому випадку, щоб мінімізувати негативний вплив несприятливих умов, організм повинен вміти розпізнавати зміни в навколишньому середовищі і, відповідно, реагувати на них зміною функціональної активності. Така здатність дозволяє організму адаптуватися до мінливих умов, а також ефективно регенерувати пошкодження, спричинені екстремальними умовами.

Здатність розпізнавати зміни в середовищі існування має не тільки організм у цілому, але і кожна його клітина. При цьому зовнішнім (екстраклітинним) щодо окремої клітини є не тільки суто навколишнє середовище, але і внутрішнє середовище організму. Просторово віддалені частини багатоклітинного організму є взаємозалежними та повинні функціонувати

узгоджено. Узгодженість роботи всіх частин організму забезпечується завдяки функціонуванню складної системи передачі міжклітинних сигналів (хімічних, електричних). Біологічні функції клітини, пов'язані з онтогенетичним розвитком організму та реакцією на мінливі зовнішні умови, реалізуються за допомогою розпізнавання екстраклітинного стимулу рецептором і подальшої активації механізмів передачі внутрішньоклітинних сигналів, які приводять до формування реакції-відповіді клітини на зовнішні впливи.

Швидкі та повільні реакції. Сприйняття екстраклітинного сигналу здійснюється клітинними рецепторами, а потім передається у відповідні клітинні компартменти до кінцевих мішеней, від яких залежить функціональна активність клітини. Реакції-відповіді клітини прийнято ділити на швидкі та повільні (рис. 1). **Швидкі реакції** проявляються практично відразу після сприйняття сигналу, оскільки вони пов'язані зі зміною активності систем та їх компонентів, які є у клітині на момент сприйняття сигналу. Прикладом швидких реакцій можуть служити зміни інтенсивності та напрямки трансмембранних іонних потоків і пов'язаних з цим процесів модуляції активності ферментів. **Повільні реакції** залежать від білків, які синтезовані *de novo*, тобто вони пов'язані зі зміною експресії

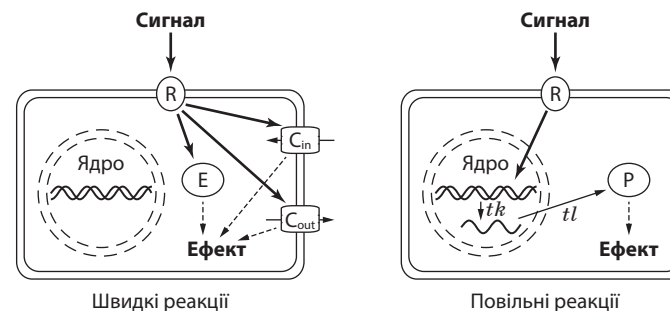


Рис. 1. Швидкі і повільні реакції:

R — рецептор;

E — фермент;

C_{in} — поглинаючий канал;

C_{out} — вивідний канал;

P — білок, синтезований *de novo*;

tk — транскрипція;

tl — трансляція

генів, тому розвиваються протягом більш тривалого часу порівняно зі швидкими. Зміна набору генів, що експресуються, здійснюється за рахунок як модуляції активності вже існуючих транскрипційних факторів, так і синтезу нових транскрипційних регуляторів.

1.2. КОМПОНЕНТИ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ

Системи внутрішньоклітинної трансдукції сигналів складаються з різноманітних компонентів, що розрізняються за призначенням і функціями. Основними компонентами сигнальних систем є рецептори, ефектори, вторинні месенджери, G-білки, модифікуючі сигнальні ферменти, адаптерні молекули та кінцеві мішені.

Рецептори сприймають екстраклітинні сигнали та запускають каскадний сигнальний механізм всередині клітини. Клітини мають різні типи спеціалізованих рецепторів, які розпізнають певний вид сигналу.

G-білки — особливі сигнальні молекули, що мають GTPазну активність. Здатність передавати сигнал залежить від того, який із нуклеотидів (GDP або GTP) міститься в гуаніннуклеотидз'язувальному центрі.

Ефектори (або ефекторні молекули) — це ферменти, що каталізують синтез вторинних месенджерів. До ефекторів також слід віднести кальцієві канали та переносники, від яких безпосередньо залежить концентрація іонів кальцію в цитоплазмі.

Вторинні месенджери — це низькомолекулярні органічні сполуки або іони, здатні забезпечувати передачу сигналу шляхом аллостеричної регуляції сигнальних посередників. Модуляція активності компонентів сигнального ланцюга вторинними месенджерами здійснюється при досягненні ними певної концентрації. На рівні ефекторів забезпечується посилення сигналу, оскільки вони синтезують велику кількість вторинних посередників, які здатні активувати велику кількість сигнальних посередників або кінцевих мішеней.

Адаптерні молекули — білки, які, зазвичай, не виявляють специфічну активність, крім здатності за певних умов взаємо-

діяти одночасно з двома або більше сигнальними посередниками. Взаємодія здійснюється за рахунок комплементарних поверхонь. Наприклад, рецептор може впливати на ефектор чи іншу сигнальну молекулу тільки через адаптерний білок.

Сигнальні молекули-ферменти забезпечують посттрансляційну модифікацію посередників передачі сигналу. (Слід відрізнити від ефекторів, які теж є ферментами, але спеціалізуються на синтезі вторинних месенджерів). Більшість посттрансляційних модифікацій, які використовуються у сигналінгу, має оборотний характер, наприклад приєднання або відщеплення певних груп. Провідну роль серед таких сигнальних посередників виконують протеїнкінази та протеїнфосфатази, що забезпечують функціонування кіназно-фосфатазного циклу.

Кінцеві мішені забезпечують необхідний функціональний стан клітини для конкретних умов. Ними частіше є ферменти або транскрипційні фактори.

Запуск трансдукції сигналу у клітині починається з рецептора і закінчується модуляцією активності кінцевих мішеней. Однак проміжні компоненти сигнальної системи можуть бути представлені широким спектром різноманітних функціональних молекул. Кількість і тип компонентів кожної конкретної сигнальної системи певною мірою специфічні. Наприклад, в одних системах можуть бути відсутні ефектори і вторинні месенджери, а в інших — у передачі сигналу можуть бути залучені кілька типів ефекторних молекул, а відповідно, і вторинних посередників, що діють послідовно або паралельно. Найбільш короткий сигнальний ланцюг спостерігається в тому випадку, коли рецептор є одночасно кінцевою мішенню. Наприклад, існують рецептори ліпофільних лігандів, які одночасно є транскрипційними факторами.

1.3. СУТНІСТЬ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ

Вибірковість взаємодії. Між двома будь-якими макромолекулами або мікромолекулами можлива взаємодія. Однак при наявності величезного розмаїття речовин у клітині спостерігається сувора впорядкованість взаємодій, так би мовити,

їх «усвідомленість». Наприклад, каталітична активність ферментів спрямована на специфічний субстрат, структурні молекули укладаються в агломерати, утворюючи клітинні структури, гормони взаємодіють з певними рецепторами тощо. Подібно до цього специфічно взаємодіють один з одним сигнальні молекули.

Міжмолекулярні взаємодії здійснюються за рахунок слабких сил. Але для того щоб ці сили були досить ефективними та забезпечили вибірковість взаємодії, необхідно утворення багатьох зв'язків. Слабкі сили, як відомо, набувають максимальних значень, якщо взаємодіючі групи містяться на відповідних відстанях одна від одної. Поверхні молекул, які дозволяють утворювати оптимальну кількість слабких зв'язків, називаються **комплементарними** (рис. 2).

При формуванні структурних агломератів, що являють собою статичні комплекси, часто є важливим наявність максимальної кількості слабких зв'язків. Однак при утворенні динамічних систем, для функціонування яких принциповим є не тільки асоціація, але й дисоціація молекулярного комплексу, є необхідним встановлення оптимальної кількості слабких зв'язків, які, з одного боку, забезпечать специфічність взаємодії, а з іншого, не перешкоджатимуть дисоціації.

При специфічній взаємодії макромолекул спостерігається взаємний вплив їхніх електронних густин одна на одну. В результаті це приводить до зміни конформації молекул, що безпосередньо відбивається на їхній активності.

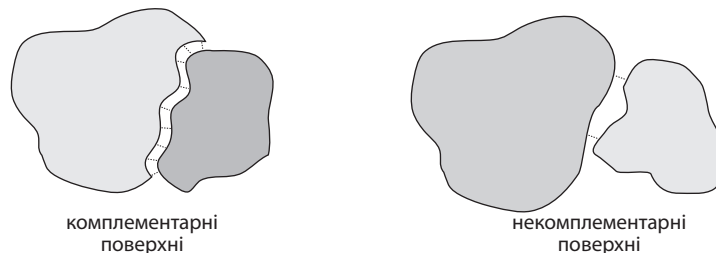


Рис. 2. Комплементарні та некомплементарні поверхні молекул

Механізми передачі сигналу. В основі передачі сигналу лежить молекулярний механізм, за допомогою якого змінюється активність сигнальних посередників. Модуляція активності посередників здійснюється різними способами, серед яких найбільш важливими є:

- 1) **взаємне зв'язування**, яке визначається наявністю комплементарних поверхонь (наприклад, впізнавання гормону рецептором);
- 2) **ковалентна модифікація** (введення або відщеплення груп; утворення або розрив зв'язків у макромолекулах-компонентах сигнального ланцюга);
- 3) **зміна мікрооточення** (зміна концентрації іонів, у тому числі протонів (рН), і низькомолекулярних органічних регуляторів).

Будь-який з цих впливів провокує зміну конформації макромолекули-посередника, від якої залежить її активність. Модуляція активності сигнального посередника визначає його здатність впливати на подальші компоненти сигнального ланцюга (рис. 3). В цілому, акт передачі сигналу в рамках одного посередника можна представити у такому вигляді:

вплив → зміна конформації → зміна активності.

Слід зауважити, що при сприйнятті сигналу активність посередника може змінюватися в різних напрямках і з різною силою. Це залежить від конкретної сигнальної пари та особливостей їх взаємодії. Активність посередника може градієнтно зменшуватися або збільшуватися, а також активуватися з репресованого стану (включатися) або, навпаки, інгібуватися (вимикатися). (Для опису функціонування гіпотетичних сигнальних систем і посередників ми будемо говорити про модуляції, або зміни активності макромолекул-посередників, оскільки активація сигнальної системи може бути пов'язана як з активацією, так і з репресією окремих компонентів і модулів системи).

Для низькомолекулярних регуляторів (вторинних месенджерів), які опосередковують передачу сигналу між двома макромолекулами, суттєвою ознакою участі в сигнальному механізмі є зміна концентрації.

Макромолекулярні посередники

- вплив (прийняття сигналу);
- зміна конформації;
- зміна активності (готовність до передачі сигналу)

Низькомолекулярні посередники

- модуляція активності ефекторів або іонних каналів;
- зміна концентрації вторинних месенджерів;
- модуляція активності сигнальних посередників

Трансдукція сигналу від рецептора до кінцевих мішеней, у якій може бути задіяно багато компонентів, є, власне, по чергову зміною активності переносників сигналу, а в разі вторинних месенджерів — їхньої концентрації.

Наприклад, рецептор у результаті активації набуває здатності взаємодіяти з адаптерним білком, через який він стимулює ефектор. Ефектор каталізує синтез вторинних месенджерів, які модулюють активність протеїнових кіназ тощо.

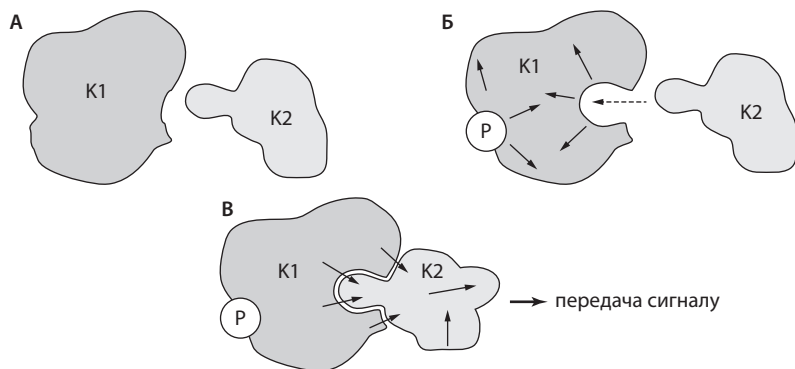


Рис. 3. Передача сигналу:

А — компоненти K1 і K2 не взаємодіють один з одним;

Б — ковалентна модифікація компонента K1 (фосфорилування) проковує зміну конформації молекули, в результаті чого утворюється поверхня, некомплементарні поверхні молекули компонента K2;

В — компоненти K1 і K2 взаємодіють: K2 набуває конформацію, що дозволяє взаємодіяти з наступним компонентом сигнальної системи

Таким чином, кожен сигнальний переносник впливає на черговий компонент системи трансдукції сигналу, змінюючи його функціональний стан. Причому модуляція активності одного компонента зумовлює зміну активності іншого. Послідовна зміна стану переносників сигналу являє собою каскад реакцій, тому такий спосіб передачі внутрішньоклітинних сигналів часто називають **каскадним механізмом** (рис. 4).

При опису сигнальних систем для позначення відносного розташування компонентів часто використовують терміни **апстрим** (англ. upstream — вгору за течією) і **даунстрим** (англ. downstream — униз за течією). Всі регулятори, від яких стікається сигнал на конкретний компонент, є щодо нього апстрим сигнальними компонентами. Тоді як регулятори, на які передається сигнал, називають даунстрим сигнальними компонентами. Припустимо, що в сигнальній системі функціонують 5 компонентів і передача сигналу здійснюється в напрямку $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5$. Тоді відносно компонента 3 регулятори 1 і 2 є апстрим, а 4 і 5 — даунстрим сигнальними партнерами.

У спрощеному варіанті каскадний механізм може бути представлений у вигляді лінійної послідовної передачі сигналу. Однак насправді найчастіше поширення сигналу в клітині має віяловий характер, тобто стимуляція одного рецептора модулює активність, зазвичай, багатьох кінцевих мішеней. Наприклад, під впливом конкретного гормону в клітині активується експресія цілого набору генів.

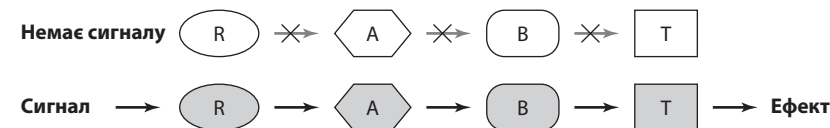


Рис. 4. Каскадний механізм.

Сигнальна система, що складається з рецептора R, кінцевої мішені T і проміжних компонентів A і B, за відсутності сигналу перебуває в неактивному стані. Стимулювання рецептора відповідним сигналом приводить до послідовної модуляції активності всіх компонентів системи, що в результаті приводить до розвитку реакції-відповіді на сигнал (ефект)

Крім того, чимало інтраклітинних сигнальних систем тісно пов'язані одна з одною. Взаємодіючи, вони можуть сприяти взаємному посиленню, послабленню, а також прояву якісно іншого ефекту порівняно з тим, який проявляється за функціонування цих систем окремо. Каскадні механізми можна представити у вигляді сигнальної мережі, що пронизує клітину. Сигнальні шляхи можуть бути настільки переплетені та взаємозалежні, що часом важко ідентифікувати причинно-наслідкові зв'язки при вивченні механізмів трансдукції сигналу.

1.4. ЕФЕКТ ПОСИЛЕННЯ В СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМАХ

Важливою характеристикою механізму внутрішньоклітинної передачі сигналу є **ефект посилення**. Завдяки цій властивості клітини здатні формувати відповідні реакції значної сили на вплив слабких зовнішніх сигналів. **Загальний принцип ефекту посилення** — збільшення кількості сигнальних посередників у процесі поширення сигналу. Посилення сигналу здійснюється тільки на конкретних ділянках сигнального ланцюга. Якщо посередники беруть участь у передачі сигналу в еквімолярних кількостях, то посилення не відбувається. Наприклад, при передачі сигналу шляхом взаємного зв'язування одна макромолекула модулює активність тільки однієї молекули. Однак якщо в сигнальному механізмі беруть участь ферменти, спостерігається підсилюючий ефект. Так, ефекторна молекула внаслідок активації синтезує велику кількість вторинних месенджерів, які регулюватимуть активність значної кількості сигнальних посередників, у тому числі кінцевих мішеней (рис. 5).

На ділянці посилення сигналу, крім збільшення кількості однотипних регуляторних молекул, у сигнальний механізм можуть залучатися посередники різних типів. Наприклад, такі вторинні месенджери, як іони Ca^{2+} , здатні модулювати активність декількох типів сигнальних посередників — ферментів, транскрипційних факторів, іонних каналів та ін.

Ефект посилення забезпечується в результаті функціонування таких процесів:

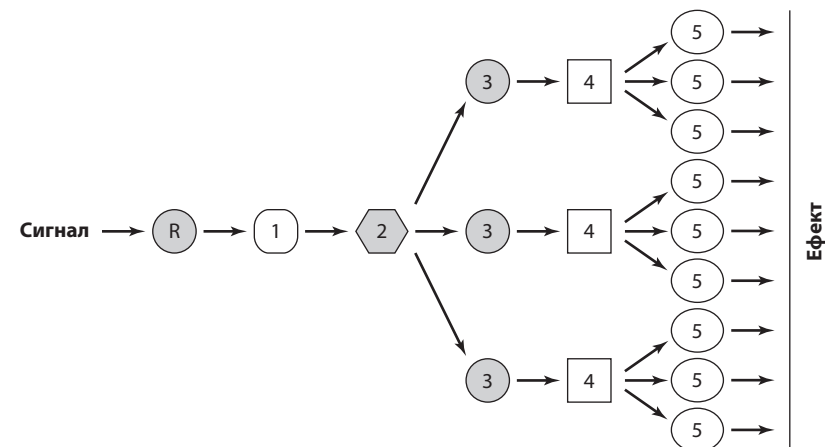


Рис. 5. Ефект посилення в сигнальних системах. Ефект посилення спостерігається на етапі 2–3 і 4–5. Компоненти 2 і 4 модулюють активність багатьох мішеней. Компоненти 1 і 3 взаємодіють з компонентами 2 і 4, відповідно, в еквімолярних кількостях

- синтез вторинних месенджерів ефекторами;
- посттрансляційна модифікація сигнальних макромолекул (кінази, фосфатази та ін.);
- трансляція і транскрипція;
- зміна швидкості потоку іонів Ca^{2+} через мембрану (Ca^{2+} -канали і переносники).

1.5. ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ КАСКАД

Розвиток реакції-відповіді на зовнішні впливи часто супроводжується активацією генів, що кодують транскрипційні регулятори. Новосинтезовані фактори транскрипції беруть участь у регуляції експресії другої групи генів. Таким чином, сигнальний механізм може включати в себе не тільки активацію транскрипційних факторів, але і їх синтез. Механізм, що включає кілька послідовних транскрипцій, називають **транскрипційним каскадом** (рис. 6).

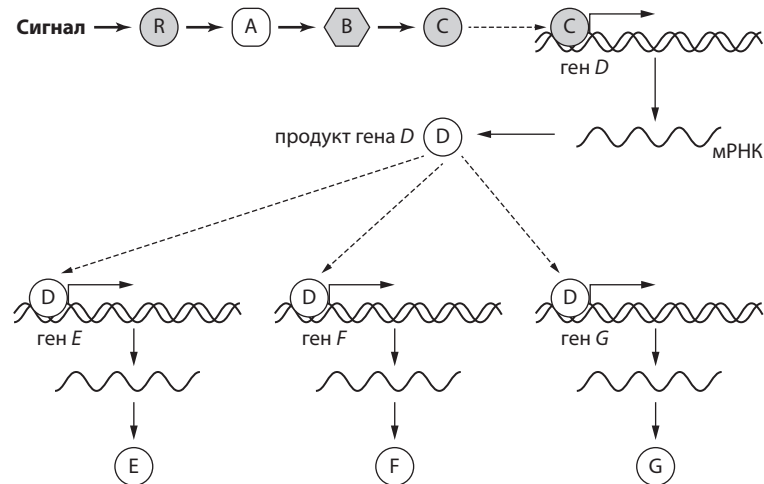


Рис. 6. Транскрипційний каскад.

Зовнішній сигнал, що сприймається клітинним рецептором R через компоненти A і B передається на транскрипційний фактор C, який активує експресію гена D, що кодує транскрипційні фактор D. Транскрипційний фактор D стимулює транскрипцію генів E, F і G, які кодують білки E, F і G

Транскрипційний каскад являє собою досить поширене явище. Група генів, активність яких змінюється під дією зовнішнього сигналу в першу чергу, називається **ранніми**. Гени, активність яких модулюється новосинтезованими транскрипційними регуляторами, називаються **пізніми**. Більшість ранніх генів є регуляторними. Вони кодують транскрипційні регулятори, компоненти убіквітинуючої системи та інші регуляторні білки. Продукти ранніх генів багато в чому визначають зразок експресії пізніх генів, від яких безпосередньо залежить функціональна активність клітини.

Регуляторний механізм, який включає в себе послідовний синтез кількох груп транскрипт-факторів, на перший погляд, може здаватися повільнодіючим і громіздким. Проте це необхідно для здійснення регуляції генної експресії з позиції максимальної економічності процесів. За зміни умов, зазвичай, активується та репресується велика кількість генів. Забезпечує

чити миттєву модуляцію відразу всіх необхідних генів досить складно, оскільки для цього потрібна значна кількість транскрипційних факторів і компонентів сигнальних систем, які активують ці транскрипт-фактори. Причому синтез і тих, й інших молекул необхідно підтримувати на певному рівні в неіндуктивних умовах. Підтримання в робочому стані численних сигнальних систем, що забезпечують пряму активацію великої кількості генів, не вигідно для клітини. Система регуляції шляхом послідовної активації синтезу кількох транскрипційних факторів потребує мінімальних витрат на постійне підтримання порівняно невеликої кількості сигнальних систем. Крім того, синтез факторів регуляції транскрипції внаслідок активації каскадних механізмів створює ефект посилення. Активація експресії одного гена приводить до неодноразової транскрипції, причому кожен утворений транскрипт після сплайсингу може служити матрицею для синтезу багатьох молекул білка. Істотне підвищення кількості регуляторних білків дає значний ефект для розвитку реакції-відповіді клітини. Таким чином, каскадна система регуляції, що включає послідовну активацію експресії генів, які кодують транскрипційні фактори, дає незначну затримку в часі, однак є економічною і сприяє посиленню сигналу.

1.6. ТИПИ СИГНАЛЬНИХ МЕХАНІЗМІВ

Сигнальні системи клітин супроводжується зміною активності посередників сигнальної системи та кінцевих мішеней. Ці зміни в окремо взятому каскадному механізмі можуть мати різноспрямований характер. Крім того, один і той самий зовнішній сигнал, з одного боку, стимулює активацію (або підвищення активності) одних кінцевих мішеней, але в той же час приводить до репресії інших. Тому описати однозначно напрям зміни активності, що відбуваються в каскадному механізмі, напевно чи можливо. Швидше, варто говорити про те, як працюють ключові модулі регуляторної сигнальної системи. У цьому плані можна розрізняти **активаторні**, **репресорні** та **дерепресорні** сигнальні механізми.

Активаторні механізми пов'язані із посиленням або включенням активності сигнальних посередників або кінцевих мішеней, а **репресорні** — з ослабленням або вимиканням.

Дерепресорні сигнальні системи характеризуються тим, що один із компонентів системи активно репресується у відсутності стимулу, в результаті чого система перебуває в репресованому стані. Активація системи приводить до інгібування репресора й активації сигнальної системи. Таким чином, репресія репресора забезпечує активацію (дерепресію) системи.

1.7. ДЕРЕПРЕСОРНІ СИГНАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ

Зняття дії репресорів може здійснюватися за рахунок механізмів двох основних типів (рис. 7):

- 1) інактивації репресора шляхом модуляції його активності;
- 2) руйнування репресора через спрямований протеоліз.

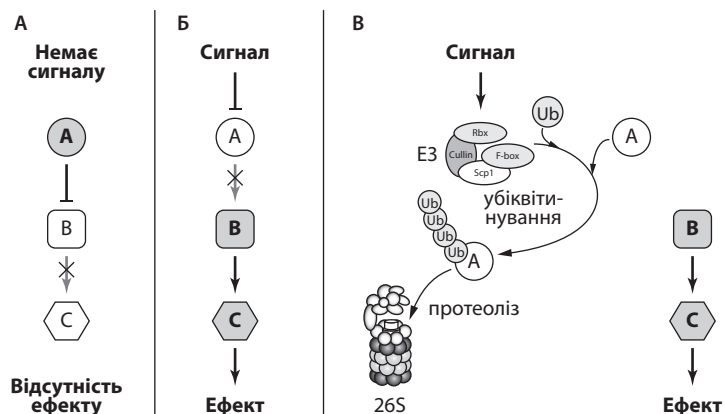


Рис. 7. Дерепресійна регуляторна система.

A — компонент A (негативний регулятор) у відсутності сигналу активно інгібує компонент B і підтримує систему в репресованому стані; B — під дією зовнішнього сигналу компонент A інактивується, що сприяє дерепресії системи;

B — негативний регулятор A під впливом сигналу залучається в убіквітин-опосередкований селективний протеоліз

У першому випадку репресор залишається фізично присутнім у клітині, але в репресованому стані (рис. 7-Б). Інгібування репресора досягається будь-яким зі способів модуляції активності, характерних для сигнальних систем (див. вище розділ 1.3 «Сутність передачі сигналу»). Це може бути зв'язування репресора регуляторним білком-інгібітором, ковалентна модифікація молекули репресора або її взаємодія з низькомолекулярними регуляторами. Найбільш поширений спосіб «вимикання» репресора — його ковалентна модифікація кіназами або фосфатазами (фосфорилування/дефосфорилування).

Другий механізм пов'язаний з функціонуванням убіквітин-залежного селективного протеолізу (рис. 7-В). Принцип цього механізму полягає в тому, що під дією специфічного зовнішнього сигналу репресори певного типу впізнаються убіквітуючою протеїновою лігазою, яка приєднує до білкового субстрату поліубіквітинові мітки. Мічені таким способом репресори в подальшому піддаються деградації у протеасомній системі.

1.8. СИСТЕМА УБІКВІТИН-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ БІЛКІВ

В усіх живих клітинах відбувається постійне оновлення структурних блоків і функціональних систем клітини. Білки, що втратили нативну структуру в результаті необоротної денатурації і з цієї причини не здатні виконувати свої функції, руйнуються протеазами, а утворені внаслідок протеолізу вільні амінокислоти використовуються для синтезу нових білків. Протеази впізнають білки із порушеною структурою за рядом характерних ознак, наприклад, за наявності на поверхні молекул гідрофобних амінокислот.

Існує також механізм, який відрізняється від звичайного протеолізу тим, що він приводить до руйнування білків, що не мають ознак порушення структури та функціональної активності і при цьому протеолізу піддаються не всі білки, а лише білки певного типу. Такий механізм називають **селективним**, або **спрямованим протеолізом**.

Селективний протеоліз здійснюється у два етапи (рис. 7-В). Спочатку білки, призначені для руйнування, розпізнаються особливим мультиполіпептидним комплексом, який приєднує до особливих ділянок цих білків поліубіквітинові ланцюжки. Цей комплекс називають убіквітинуючою протеїновою лігазою і в загальній системі убіквітинування позначають E3. Потім убіквітиновані білки притягаються до 26S протеасоми та руйнуються. Оскільки в механізмі, який описується, руйнуванню білків передують їх убіквітинування, його називають також **убіквітин-опосередкованим протеолізом білків**.

1.8.1. Етап перший — вибір субстрату

Убіквітин і убіквітинування

Убіквітин — це низькомолекулярний висококонсервативний білок з молекулярною масою 8,5 кД. Він складається з 76 амінокислотних залишків і має кислі властивості, оскільки містить значну кількість залишків дикарбонових амінокислот: аспарагінової та глутамінової кислот (рис. 8). Поліпептидний ланцюг убіквітину з карбокситермінального боку молекули замикає залишок гліцину, через карбоксильну групу якого здійснюється кон'югування убіквітину з білками-мішенями або один з одним за допомогою утворення ізопептидного зв'язку. До складу убіквітину входять 7 залишків лізину, які займають положення 6, 11, 27, 29, 33, 48 і 63. Через ці лізінні залишки можлива кон'югація убіквітинів один з одним. Убіквітин в еукаріот кодується кількома генами, а синтез здійснюється у вигляді неактивного поліубіквітинового попередника або окремої копії, зшитой із рибосомними білками. Процесинг убіквітину відбувається за участю деубіквітинуючих ферментів.

```

1      5 6      10 11      15      20      25 27 29 30      33 35      40
MQIFVKTLLTGKTITLLEVERPSDTIENVKAKIQDKEGIRPPDQ
41      45 48 50      55      60 63 65      70      75 76
QRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLLVLRRLRGG

```

Рис. 8. Амінокислотна послідовність молекули убіквітину

Убіквітин-подібні білки. У природі були виявлені білки, близькі за структурою до убіквітину. Низькомолекулярні білки, що мають високий ступінь схожості з убіквітином, поділяють на дві групи:

- білки з убіквітин-подібним доменом (**UDP — ubiquitin-domain proteins**);
- убіквітин-подібні модифікатори (**Ubl — ubiquitin-like modifiers**).

Білки з убіквітин-подібним доменом (UDP) не утворюють кон'югатів з білками. Взаємодіючи за рахунок слабких зв'язків з убіквітином або убіквітин-подібними модифікаторами, вони виконують роль адаптерів. Убіквітин-подібні модифікатори (Ubl), так само як і убіквітин, здатні кон'югувати з білками через карбокситермінальний гліцин. До убіквітинподібних модифікаторів належать SUMO (Small ubiquitin-like modifier), NEDD8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8), ISG15 (IFN-stimulated gene 15), FAT10 (F-adjacent transcript 10) та інші.

Убіквітинуванням називають процес утворення ізопептидного зв'язку між ε-аміногрупою залишку лізину білка-мішені та карбоксильною групою С-кінцевого гліцину убіквітину. Убіквітинування є однією з можливих посттрансляційних модифікацій білків поряд з фосфорилуванням, глікозилюванням та ін.

Процес убіквітинування в більшості випадків не обмежується приєднанням однієї молекули убіквітину. Білок може нести одну або кілька убіквітинових молекул, а також поліубіквітинові ланцюжки різної форми та довжини. Значна частина убіквітинованих білків несе поліубіквітинові групи. Кон'югація двох молекул убіквітину здійснюється шляхом утворення ізопептидного зв'язку між С-кінцевим гліцином і ε-аміногрупою одного із семи залишків лізину убіквітину. Спочатку були виявлені поліубіквітинові ланцюжки, в яких убіквітини з'єднані один з одним через лізин-48. Проте пізніше було показано, що всі сім лізінів убіквітину можуть брати участь в утворенні поліубіквітинових груп. Якщо в процесі поліубіквітинування використовуються лізінні залишки в одному положенні, то утворюються лінійні ланцюжки. При використанні кількох сайтів самокон'югації можливе утворення розгалуже-

них поліубіквітинових структур. Особливості поліубіквітинового ланцюжка, тобто його довжина та сайти самокон'югації, мають вирішальне значення у визначенні долі убіквітинового білка.

Ковалентна модифікація білків шляхом убіквітування має надзвичайно різноманітне значення для функціональної активності клітин. Можна виділити три основні групи функцій, для яких має значення убіквітування.

Деградація білків. Вперше значення убіквітування було показано для взаємодії білків з протеасомами, яка приводила до руйнування убіквітинованих білків. Найбільш поширеним сигналом для протеолізу є поліубіквітиновий лінійний ланцюжок, що складається з чотирьох і більше убіквітинових мономерів, які з'єднані один з одним через лізин-48. Вважається, що всі поліубіквітинові ланцюжки, за винятком тих, які утворені через лізин-63, можуть бути використані як мітки для деградації.

Активність хроматину. Убіквітуванню піддаються гістонові білки H2A та H2b. В одній нуклеосомі з убіквітином кон'югується зазвичай одна з цих молекул. Наявність убіквітинової мітки характерна для еухроматинової ділянки геному. Відомо, що посттрансляційні модифікації нуклеосомних гістонів важливі для тривимірної структури та функціональної активності хроматину, а також клітинної пам'яті. Убіквітування є динамічним процесом, який має більше значення для власне remodelювання хроматину, а не для підтримки його структури.

Модуляція активності функціональних білків. Убіквітування негістонових білків не завжди приводить до деградації, а може тільки змінювати їх активність. Зазвичай це пов'язано з моноубіквітиновими або поліубіквітиновими модифікаціями з незначною кількістю убіквітинових мономерів у ланцюжку. Наприклад, моноубіквітиновані білки беруть участь у регуляції трансмембранного переносу, ендоцитозу, експресії генів і репарації ДНК. Поліубіквітинові лінійні ланцюжки, що утворені через лізин-63, важливі для генерації сигналів, які відіграють ключову роль у регуляції репарації ДНК, трансмембранного переносу, ендоцитозу, активації протеїнкіназ, трансляції та транскрипції.

Убіквітинуючий комплекс

Центральне місце в системі убіквітин-опосередкованої деградації білків посідає убіквітинуюча лігаза (E3), яка розпізнає відповідні білки-мішені та забезпечує їх убіквітування. В системі убіквітування беруть участь ще два ферменти (E1 і E2), які контролюють попередню активацію убіквітину (рис. 9).

Мінімальний убіквітинуючий комплекс складається з трьох ферментів:

- 1) E1 — убіквітин-активуєчий фермент;
- 2) E2 — убіквітин-кон'югуєчий фермент;
- 3) E3 — убіквітинуюча протеїнова лігаза.

На першому етапі відбувається активація убіквітину. **Убіквітин-активуєчий фермент (E1)** утворює тіоефірний зв'язок між консервативним залишком цистеїну та карбокситермінальним залишком гліцину убіквітину. Цей процес потребує витрати метаболічної енергії у вигляді АТР. Потім убіквітин переноситься від E1 на **убіквітин-кон'югуєчий фермент (E2)**. У цьому випадку для утримання убіквітину також використовується консервативний залишок цистеїну ферменту. За взаємодії E2 з третім компонентом — **убіквітинуючою протеїновою лігазою (E3)** — убіквітин переноситься на специфічний залишок лізину білка-мішені. Залежно від типу убіквітин-протеїнової лігази убіквітин може бути перенесений на молекулу субстрату безпосередньо від E2, або ж убіквітин попередньо ковалентно зв'язується з реакційним центром E3, а потім приєднується до субстрату.

Відомі убіквітин-протеїнові лігази за структурою каталітичних доменів можна поділити на три групи:

- 1) HECT (Homologous to E6AP Carboxyl Terminus);
- 2) RING (Really Interesting New Gene);
- 3) U-box або PHD.

HECT-домени ковалентно зв'язують убіквітин, приймаючи його від кон'югуєчого ферменту E2, а потім переносять на субстрат. Лігази, які містять RING і U-box, не утворюють тіоефірного зв'язку з убіквітином, а здійснюють його пряме перенесення від E2 на субстрат. У рослинних організмах переважно функціонують RING-вмісні SCF-подібні убіквітинові лігази.

У ряді випадків поліубіквітування контролюється додатковими E3-лігазами, які містять U-box-домен, які в системі убіквітування також називають E4-лігазами.

У геномі еукаріотичних організмів кодуються сотні E3-лігаз різних класів, що свідчить про надзвичайну важливість цих ферментів.

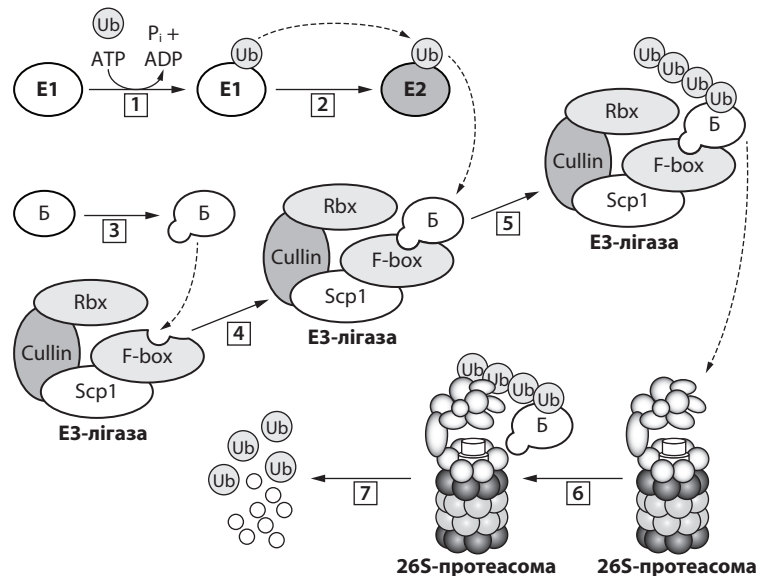


Рис. 9. Система убіквітин-опосередкованої деградації білків.

Умовні позначення:

E1 — убіквітин-активуєчий фермент;

E2 — убіквітин-кон'югуючий фермент;

E3 — убіквітинуюча протеїнова лігаза;

Ub — убіквітин;

Б — білок-мішень.

Етапи механізму селективного протеолізу:

1 — убіквітин-активуєчий фермент (E1) зв'яже убіквітин;

2 — убіквітин переноситься на убіквітин-кон'югуючий фермент (E2);

3 — білок-мішень під дією сигналу набуває поверхню, комплементарну F-box субодиниці убіквітинуючої лігази;

4 — білок-мішень зв'язується з F-box субодиницею E3;

5 — лігаза E3 приєднує до мішені поліубіквітинову групу;

6 — поліубіквітинова мішень зв'язується 26S протеасомою;

7 — 26S протеасома відщеплює убіквітин і руйнує білок-мішень

Структура SCF-подібної убіквітинуючої лігази

SCF-лігаза є мультимерним комплексом, який складається з чотирьох основних субодиниць: RBX, Cullin, F-box, і SKP1 (рис. 9).

RBX — каталітична субодиниця. Виконує власне лігазну функцію, каталізує перенесення убіквітину від убіквітин-кон'югуючого ферменту на білок-мішень. Реакційний центр субодиниці містить домен RING-H2 пальці. RING-finger-домени E3-ензимів включають мотив з восьми цистеїнових і гістидинових залишків, що містить два іони цинку.

Cullin — регуляторна субодиниця. Через цю субодиницю здійснюється модуляція активності E3-лігази різними регуляторами. Cullin утворює з RBX міцно зв'язаний функціонально активний димер, здатний каталізувати формування мультиубіквітинового ланцюжка.

F-box — забезпечує вибір субстрату для убіквітування. Субодиниця має лейцин-збагачений домен F-box, за яким названа субодиниця. Через F-box домен здійснюється взаємодія убіквітинуючої лігази з білками-мішенями.

SKP1 — структурно-регуляторна субодиниця. Об'єднує RBX-Cullin димер і F-box субодиницю в єдиний функціональний комплекс.

Регуляція активності SCF-лігази

Регуляція активності SCF-лігази здійснюється в процесі оборотної посттрансляційної модифікації субодиниці Cullin шляхом приєднання/відщеплення убіквітин-подібного білка RUB1. Приєднання RUB1 до Cullin багато в чому нагадує процес убіквітування. Спочатку RUB1 активується гетеродимерним RUB1-активуєчим комплексом шляхом утворення тіоефірного зв'язку між карбокситермінальним амінокислотним залишком RUB1 і цистеїном однієї із субодиниць RUB1-активуєчого ферменту. Доречі, одна із субодиниць цього ферменту гомологічна амінотермінальному домену убіквітин-активуєчого ферменту E1, а друга — карбокситермінальному домену E1. Потім RUB1 переноситься на RUB1-кон'югуючий фермент (RCE1), який при-

єднує цей білок до субодиниці Cullin. Видаляється RUB1 від Cullin за допомогою сигналосоми COP9.

Як показують дослідження, для розвитку нормального функціонування E3-лігази дуже важливою є підтримка циклічного кон'югування/видалення RUB1. Точна роль даного регуляторного циклу ще не з'ясована. Існує кілька припущень з цього приводу. Відповідно до одного з них, приєднання RUB1 до Cullin і його видалення може бути пов'язано зі зміною компарментації SCF-подібної убіквітинової лігази. Інша гіпотеза припускає, що RUB1-кон'югаційний цикл має значення в опосередкуванні взаємодії SCF-подібної убіквітинової лігази з 26S протеасоми.

Зв'язування субстрату з убіквітинуючою лігазою

Одним з відповідальних етапів убіквітин-опосередкованого протеолізу білків є вибір білка-мішені убіквітинуючою лігазою. Загальний принцип механізму впізнавання пов'язаний з формуванням комплементарних поверхонь, які дозволяють специфічну взаємодію протеїнової лігази та субстрату. За дією зовнішніх сигналів активуються процеси, які стимулюють зміни структури білка-мішені або F-box субодиниці лігази. Зазвичай достатньо зміни конформації одного з цих компонентів. При цьому поверхня однієї молекули підлаштовується під поверхню іншої. Якщо для забезпечення взаємодії білка-мішені та лігази E3 необхідна участь третього компонента, що виконує роль адаптерного білка, то зв'язування субстрату лігази може стимулюватися внаслідок зміни структури адаптерного білка.

Таким чином, специфічна взаємодія лігази E3 і субстрату забезпечується процесами, в результаті яких стимулюється зміна структури, принаймні, одного з компонентів:

- 1) білка-мішені;
- 2) F-box субодиниці убіквітинуючої лігази;
- 3) адаптерного білка, через який здійснюється взаємодія субстрату та лігази.

При цьому не існує універсального механізму — взаємопізнавання білка-мішені і F-box субодиниці лігази E3 досягається різними способами.

Особливості білків-мішеней убіквітинуючої лігази

Білки, які залучаються до убіквітин-опосередкованого протеолізу, мають особливу ділянку, необхідну для взаємодії з F-box доменом убіквітинуючої лігази. Дану ділянку молекули називають **дегроном**, оскільки він функціонально пов'язаний з деградацією молекули. Мутації у межах дегрону приводять до збільшення стабільності білка та порушення процесів, в яких вони беруть участь.

Білки-мішені, що зазнають деградації під впливом різних сигналів, виконують різноманітні функції, переважно регуляторні. Значна частина таких білків є транскрипційними регуляторами. Наприклад, репресори транскрипції ауксин-регульованих генів родини Aux/IAA убіквітинуються під дією ауксину та згодом руйнуються 26S протеасою. Особлива ділянка молекули, що складається з 13 амінокислотних залишків (дегрон), визначає рівень стабільності білка. Дегрон є необхідним для взаємодії білка-мішені з F-box субодиницею убіквітинуючої лігази. F-box білки, що зв'язують репресори Aux/IAA (TIR1, AFB1, AFB2, AFB3), одночасно виконують функції рецепторів ауксину (див. розділ «F-box рецептори»).

1.8.2. Етап другий — деградація субстрату

26S протеасома

Протеолітична активність у клітинах еукаріот локалізована в лізосомах і 26S протеасомах. У лізосомах деградують тільки мембранні, а також чужорідні білки, що потрапили у клітину шляхом ендоцитозу. Значна частина клітинних білків (до 90 %) руйнується 26S протеасомами. 26S протеасома (рис. 10) має особливу структуру, яка дозволяє локалізувати протеолітичну активність у внутрішній порожнині комплексу, вхід до якої строго регулюється та для більшості білків є закритим. Завдяки цьому, присутність 26S протеасоми в цитоплазмі, нуклеоплазмі та інших компартментах клітини є абсолютно безпечним для нативних білків. Щоб потрапити в порожнину 26S протеасоми,

білок має бути позначений особливим чином. Міткою слугує поліубіквітиновий ланцюжок, що складається не менше ніж із чотирьох убіквітинів, послідовно з'єднаних один з одним через лізин-48. Мічені (убіквітиновані) білки розпізнаються та зв'язуються 26S протеасомою, розгортаються за допомогою АТФ-залежних компонентів протеасоми, а потім проникають в її порожнину, де піддаються руйнуванню. Убіквітинова мітка перед проникненням білка в протеолітичну порожнину, знімається ізопептидазами та розбирається на окремі убіквітини, які згодом вдруге використовуються для процесу убіквітування.

Структура 26S протеасоми

Протеасома складається з двох основних модулів:

- коро́ва (каталітична) 20S протеасома;
- регуляторна 19S частинка.

Регуляторні частинки приєднуються до 20S протеасоми з однієї або з двох сторін, формуючи відповідно структури

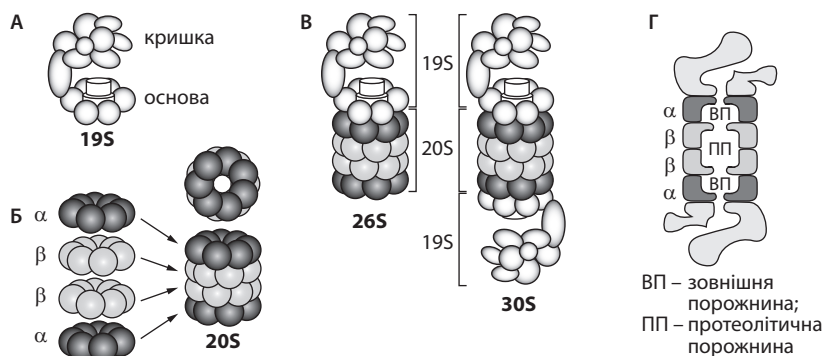


Рис. 10. Структура 26S протеасоми.

А — 19S частинка;

Б — 20S частинка (розташування гептамерних кілець у частинці, вид зверху та збоку);

В — 26S і 30S протеасоми;

Г — схематичне зображення 30S протеасоми в розрізі

з коефіцієнтами седиментації 26S і 30S (рис. 10-В). Для позначення обох структур зазвичай використовують термін «26S протеасома», вкладаючи в нього функціональний сенс. Термін «30S протеасома» використовується в тому випадку, якщо необхідно акцентувати увагу на структуру та фізичні властивості даного комплексу.

Корова 20S протеасома

20S протеасома складається з 28 субодиниць, що формують чотири гептамерних кільця, які складені одне на одне у вигляді стопки (рис. 10-Б). В еукаріот зовнішні кільця зібрані із семи різних α -субодиниць (позначаються відповідно α_1 – α_7), а внутрішні — із семи β -субодиниць (β_1 – β_7). У прокаріотів як α -, так і β -субодиниці не розрізняються за структурою. Внутрішня порожнина протеасоми поділена на три відділи (рис. 10-Г). Дві зовнішні порожнини, у формуванні якої залучені α - і β -субодиниці, передують вхід у центральну протеолітичну порожнину, сформовану лише β -субодиницями. У клітинах еукаріот протеолітичну активність мають β -субодиниці лише трьох типів: β_1 виявляють каспазоподібну активність, β_2 — трипсиноподібну і β_3 — хемотрипсиноподібну активність. У прокаріот усі 14 ідентичних β -субодиниць 20S протеасоми виявляють каталітичну активність.

Усі частинки, з яких зібрана 20S протеасома, мають високу гомологію та схожу просторову структуру. Однак α -субодиниці, на відміну від β -субодиниць, мають додаткову N-кінцеву α -спіраль. Ця ділянка молекули α -субодиниці є принципово важливою для обмеження доступу у внутрішню порожнину протеасоми. У прокаріотів усі α -субодиниці рівною мірою роблять внесок у відкривання пори, а в еукаріот основна роль належить субодиниці α_3 . У цієї субодиниці N-кінцева α -спіраль найбільше виступає у канал і взаємодіє з іншими шістьма α -субодиницями. Вільна 20S протеасома не бере участі в протеолізі, оскільки канали доступу в протеолітичну порожнину у неї закриті. Для відкривання каналу й активації протеолізу необхідна взаємодія 20S протеасоми з однією або двома регуляторними 19S частинками.

Регуляторна 19S частинка

19S частинка складається щонайменше із 17 субодиниць. Крім основних субодиниць, до складу 19S частинки можуть входити додаткові білки, які беруть участь у збірці та регуляції активності протеолітичного комплексу.

У структурі 19S частинки прийнято розрізняти основу та кришку (рис. 10-А). Дев'ять субодиниць формують основу частинки, яка кріпитися на полюсах 20S протеасоми. Шість із дев'яти субодиниць основи виявляють АТФ-азну активність. Решта субодиниць 19S частинки утворюють кришку.

Приєднання 19S частинки до 20S протеасоми супроводжується конформаційними перебудовами в амінотермінальних ділянках α -субодиниць зовнішніх гептамерних кілець. У результаті цього поря протеасоми переходить у відкриту конформацію. Однак доступ у протеолітичну порожнину суворо контролюється регуляторною часткою, найбільш важливою функцією якої є вибіркоче зв'язування субстрату.

Особливості функціонування 26S протеасоми

Субстрат впізнається за наявністю поліубіквітинованих груп і зв'язується кількома субодиницями. У впізнаванні та зв'язуванні субстрату, крім субодиниць 19S частинки, можуть брати участь лабільно асоційовані з нею допоміжні білки. Субодиниці, які беруть участь у впізнаванні субстрату, не тільки розпізнають просторову структуру поліубіквітинового ланцюга, але й сприяють правильній орієнтації убіквітинованого субстрату на протеасомі. Коректне розташування субстрату дозволяє його подальше розгортання та транслокацію в протеолітичну порожнину за рахунок АТФ-азної активності субодиниць основи 19S частинки. Розгортання поліпептидного ланцюга є необхідною умовою, оскільки розмір пори 20S протеасоми не дозволяє білку з розвиненою просторовою структурою проникати в канал протеасоми.

У процесі взаємодії субстрату з протеасомою стимулюється ізопептидазна (деубіквітинуюча) активність однієї із субодиниць кришки 19S частинки. Поліубіквітинові ланцюжки знімаються

із субстрату та розщеплюються ізопептидазами на окремі убіквітини, які вдруге можуть бути використані в убіквітинуванні.

Потрапляючи в протеолітичну порожнину 26S протеасоми, поліпептидні ланцюги білків-субстратів гідролізуються до коротких поліпептидів, що включають від 3 до 25 амінокислотних залишків.

В еукаріотичних клітинах 26S протеасоми можуть дисоціювати на 20S і 19S частинки, які здатні знову об'єднуватися у функціонально активні 26S протеасоми. Крім 19S частинки, існує багато білків, які здатні взаємодіяти з 20S протеасомою і формувати альтернативні форми протеасоми. Основною відмінністю таких протеасом є їхня нездатність зв'язувати убіквітинований субстрат і відсутність АТФ-азної активності. Дані протеасоми використовуються клітиною для убіквітин-незалежного протеолізу. Убіквітин-незалежний протеоліз може бути пов'язаний з такими функціями:

- гідроліз коротких пептидів до амінокислот;
- участь у репарації ДНК (руйнування хроматинових білків для забезпечення доступу до ДНК ферментам репарації);
- руйнування денатурованих білків (білки з порушеною структурою часто мають на поверхні молекули великі гідрофобні ділянки розгорнутих ланцюгів, які впізнаються протеасомою; гідроліз білків з порушеною структурою часто не потребує витрати АТФ на розгортання ланцюга);
- процесинг білків (зазвичай, ендопроотеоліз — розрив у поліпептидний ланцюг вноситься на значній відстані від кінців молекули білка; в порожнину протеасоми проникає поліпептидний ланцюг, складений у вигляді шпильки).