

Молекулярные механизмы лейкозогенеза

Лекция № 2

Механизмы реализации сигнальной трансдукции

Д.А. Домнинский

ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
Минздравоохранения России, Москва

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

Molecular mechanisms of leukaemogenesis

2. Mechanisms of signal transduction

D.A. Domninskiy

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Предисловие

В лекции № 1 было показано, как множество различных белков могут объединяться в комплексы активации или репрессии транскрипции РНК, меняя активность генов. Генетические aberrации, приводящие к нарушению функционирования таких комплексов при лейкозах, относятся к так называемым мутациям класса II (лекция № 1, рис. 1). Но не следует забывать, что для синтеза белка важна не только скорость трансляции мРНК, но и ее стабильность, которая весьма эффективно контролируется микроРНК. В этой лекции будут рассмотрены геномные aberrации из числа мутаций класса I, активирующие пути сигнальной трансдукции. К классу I относятся также мутации, которые нарушают регуляцию клеточного цикла и запрограммированной смерти клеток (апоптоза). Эти клеточные процессы здесь обсуждаться не будут, они подробно освещены в серии публикаций [1–3].

Глава I. Основные сигнальные пути в клетке

Передача сигналов между клетками (сигнальная трансмиссия) может быть эндокринной, паракринной и аутокринной. Сигналами для клеток крови служат гормоны, факторы роста, цитокины, хемокины и т. п. Процесс преобразования сигнала на пути от клеточной мембраны к ядру называется сигнальной трансдукцией. Здесь мы рассмотрим компоненты сигнальной трансдукции, которые наиболее часто подвергаются нарушениям при лейкозах. В силу того, что такие нарушения специфичны для каждого типа гематологической опухоли, их принято считать рекуррентными (от англ. *recurrence* — повторение).

К компонентам сигнальной трансдукции относятся молекулы, воспринимающие сигнал на поверхности клетки (мембранные рецепторы), и разнообразные молекулы-эффекторы (исполнители), кото-

рые с помощью белок-белковых взаимодействий передают этот сигнал к ядру, активируя на конечном этапе специфичные факторы транскрипции. Рецептор и связанные с ним эффекторы формируют сигнальный путь (signalling pathway). Между разными сигнальными путями за счет использования идентичных эффекторов может происходить перекрестное соединение (интеграция сигналов), в результате чего в клетке образуются так называемые сигнальные сети (signalling network). Поэтому сигнальную трансдукцию можно представить как скоординированную эстафету, в которой информация, полученная от внеклеточных сигналов, передается к внутриклеточным эффекторам, и далее — к ядру. Для успешного прохождения любого сигнала необходимо, чтобы все компоненты сигнального пути были собраны в нужном месте и именно в то время, когда это необходимо [4]. Поэтому разные клетки (или одна и та же клетка, но в разное время) будут по-разному реагировать на сигналы одинаковой интенсивности. Чувствительность клетки к уровню интенсивности сигнала, т. е. к концентрации лиганда в окружающей среде, зависит от количества и стабильности рецепторных комплексов на ее поверхности (см. Приложение 1). После того как рецептор связался с лигандом, для передачи сигнала необходимо, чтобы внутри клетки были надлежащим образом собраны комплексы эффекторов, передающих сигнал в ядро (см. Приложение 2). Таким образом, как и в случае дифференцировки HSCs (hematopoietic stem cell; гемопоэтическая клетка; ГСК), клеточный ответ на внешние стимулы зависит от тонкой «настройки» молекулярных механизмов, индуцируемых внешними (инструктивными) и внутренними (стохастическими) сигналами (см. лекцию № 1).

На рис. 1 показаны основные типы мембранных клеточных рецепторов (немембранные, так называемые ядерные рецепторы, будут рассмотрены в сле-

Приложение 1. Липидная сигнализация [5, 24–27]

Физико-химические исследования клеточных мембран показали, что липидная часть мембран неоднородна и находится в постоянном изменении. Мембраны содержат липиды различного типа (стероиды, фосфолипиды, сфинголипиды и т. п.), обладающие разными свойствами и неравномерно распределенные в мембране. В мембранах постоянно образуются и диссоциируют скопления липидов определенного типа (микродомены), которые получили название «липидных плотиков» (lipid rafts) в связи с тем, что они обладают способностью «дрейфовать» по мембране. Одной из важнейших функций липидных плотиков считается локальное формирование молекулярных ансамблей, состоящих из различных сигнальных молекул (рецепторов и эффекторных белков). Такие ансамбли могут «собираться» из-за повышенного сродства трансмембранных доменов рецепторов к определенному липидному окружению, а также в результате специфичных белок-белковых или белок-липидных взаимодействий. Таким образом, липидные плотики, несущие предварительно собранные сигнальные комплексы, способствуют быстрому и эффективному ответу рецепторов на связывание лиганда.

Тропность сигнальных белков к определенным липидным плотикам может быть обусловлена и модификацией белков. Действительно, многие сигнальные белки подвергаются модификации — ковалентному присоединению к белку различных жирных кислот, которые получили название «якорь» из-за их способности «привязывать» белки к определенным участкам клеточных мембран. Такие «заякоренные» белки являются не только компонентами системы сигнальной трансдукции, но и играют важную роль в жизни клеточных мембран, так как могут быть сигналами для индукции различных перестроек мембранного комплекса (формирование и слияние мембранных пузырьков, пиноцитоз, фагоцитоз, интернализация участков клеточных мембран, несущих рецепторы, и т. п.).

Белки (на рис. 1П окрашены голубым цветом) связываются с жирными кислотами (красный цвет) через различные химические радикалы, которые определяют тип якоря. Ацильные (арильные) якоря, с помощью которых с мембраной связываются, например, протеинкиназы SRC и ABL, обычно содержат миристиновую (C14, имеет 14 атомов углерода) или пальмитиновую (C16) жирные кислоты (миристилирование является важным фактором регуляции активности этих ферментов). Пренильные якоря, используемые G-белками, например RAS, содержат фарнезиловую (C15) и геранилгераниловую (C20) жирные кислоты (процесс прениляции также существенен для функционирования G-белков). Из рис. 1П видно, что эти 2 типа якорей связываются с разными аминокислотами (цистеин или глицин), находящимися на разных (COOH или NH₂) концах белковых молекул. GPI якоря (glycosylphosphatidylinositol), содержащие 2 молекулы жирной кислоты, используются белками, контактирующими с внешней поверхностью клеточной мембраны.

Мембранные липиды могут сами быть сигнальными молекулами. Для сигнальной трансдукции наиболее важными являются различные производные фосфатидилинозитола (PI, phosphatidylinositol), которые выполняют в клетке разнообразные сигнальные функции.

Возможность фосфорилировать и дефосфорилировать сахарный остаток (инозитол) по нескольким позициям делает PI универсальным стыковочным (или докинг, docking) сайтом для целого ряда белков. В верхней части рис. 2П показаны различные фосфорилированные производные PI (волнистые линии — жирные кислоты, внедренные в липидный бислой мембран). PI(4,5)P₂, например, обозначает PI, в котором остаток инозитола фосфорилирован (P в желтом кружке) в 2 позициях (P2): по 4-му и 5-му атому углерода в сахарном кольце (4, 5), и т. п. Реакции фосфорилирования PI осуществляются тирозинкиназами, наиболее известной из которых является фосфоинозитол 3-киназа (PI3K, phosphoinositide 3-kinase), катализирующая образование PI(3,4,5)P₃, который, в свою очередь, служит стыковочным сайтом для протеинкиназы B (PKB, также известной как AKT). PI(3,4,5)P₃ «связывается» и другими белками, имеющими PH-домены (pleckstrin homology — название дано по белку плекстрину, у которого впервые был обнаружен такой домен). Связывание PKB с PI(3,4,5)P₃ приводит к активации фермента и запуску PI3K-AKT-mTOR сигнального пути. Ингибируют этот процесс 2 фосфатазы: SHIP (SH2 domain containing inositol 5-phosphatase) и PTEN (phosphatase and tensin homologue), которые дефосфорилируют стыковочный сайт для PKB и прерывают индукцию сигнализации. С точки зрения онкологии в этой группе ферментов PI3K является потенциальным онкогеном, а SHIP и PTEN — генами-супрессорами опухоли.

Кроме этой важной функции, PI-производные могут сами активировать некоторые клеточные сигнальные пути, выступая в роли так называемых вторичных посредников (наряду с цАМФ, цГМФ, ионами Ca²⁺ и азотом). В нижней части рис. 2П показано, как под воздействием фосфолипазы C_γ2 (PLC_γ2) PI-липиды могут распадаться на свободный инозитолтрифосфат (IP₃) и связанный с мембраной диацилглицерин (DAG, diacylglycerol). При этом DAG представляет собой активирующий стыковочный сайт для протеинкиназы C, а высвобождение IP₃ приводит к тому, что он мигрирует в цитоплазму и «открывает» Ca²⁺ каналы в эндоплазматическом ретикулуме, вызывая тем самым целый спектр сигнальных реакций.

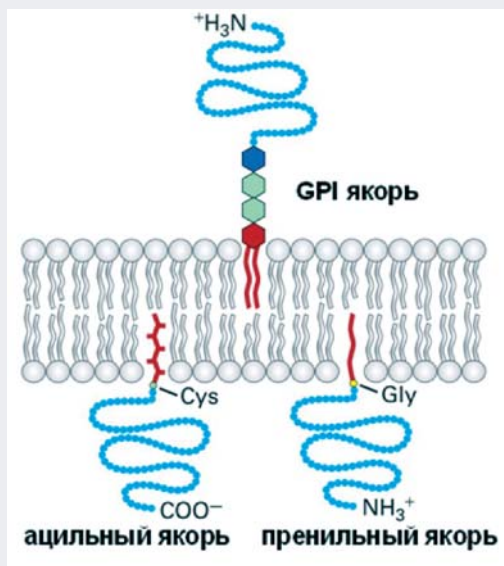


Рис. 1П. Адаптирован из работы H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira et al. [5]

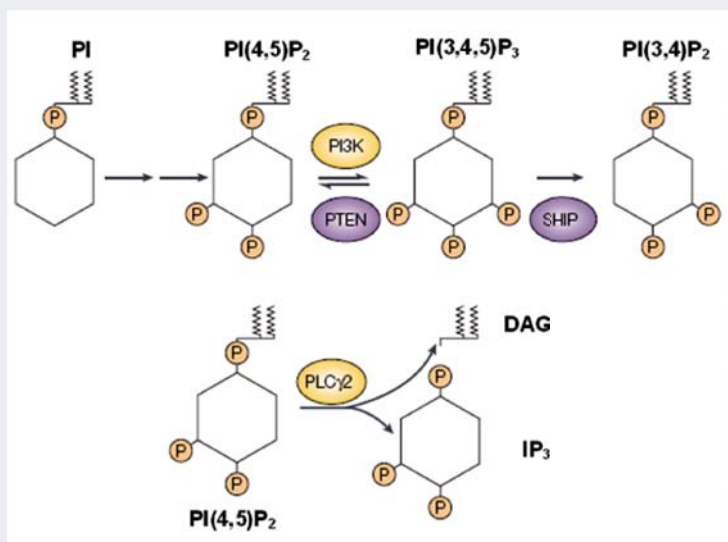


Рис. 2П. Адаптирован из работы T. Kurosaki [27]



Приложение 2. Модификация сигнальных белков. Способы рекрутирования сигнальных белков [4, 28–29]

Основным типом модификации белков сигнальной трансдукции является их фосфорилирование и дефосфорилирование. В зависимости от участка белка, подвергаемого фосфорилированию, эта реакция может вызвать противоположные эффекты — активацию белка или его ингибирование. Кроме того, фосфорилированные аминокислотные остатки часто служат стыковочными сайтами для других белков. Фосфорилирование происходит по остаткам аминокислот, содержащих гидроксильную группу. Таких аминокислот всего 3 (тирозин, серин и треонин), поэтому протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование белков, подразделяются на 2 большие группы: тирозиновые и серин-треониновые протеинкиназы (или просто «киназы»). Протеинкиназной активностью обладают многие клеточные рецепторы, которые относят к группе рецепторных протеинкиназ (тирозиновых и серин-треониновых, см. главу II). Процессы дефосфорилирования белков осуществляются протеинфосфатазами, которые тоже делятся на тирозиновые и серин-треониновые фосфатазы, в зависимости от того, какой аминокислотный остаток они дефосфорилируют. Фосфатазы, связанные с клеточной мембраной, относят к группе рецептор-подобных (receptor-like) протеинфосфатаз.

Кроме фосфорилирования сигнальные белки иногда подвергаются гидролизу, как, например, Notch рецепторы (см. рис. 3П). Но значительно чаще модуляция активности сигнальных белков осуществляется с помощью их убиквитинирования (см. Приложение 3).

Для эффективного прохождения сигнала от клеточной мембраны к ядру необходимо, чтобы различные эффекторные белки сигнальной трансдукции, поочередно активирующие друг друга фосфорилированием (так называемый «киназный каскад»), были сближены в пространстве и времени. Такую работу выполняют различные вспомогательные (адапторные) белки, которые содержат стыковочные сайты (как правило, представляющие собой фосфорилированные остатки аминокислот в окружении определенного набора других аминокислот), специфичные для связывания нескольких сигнальных белков.

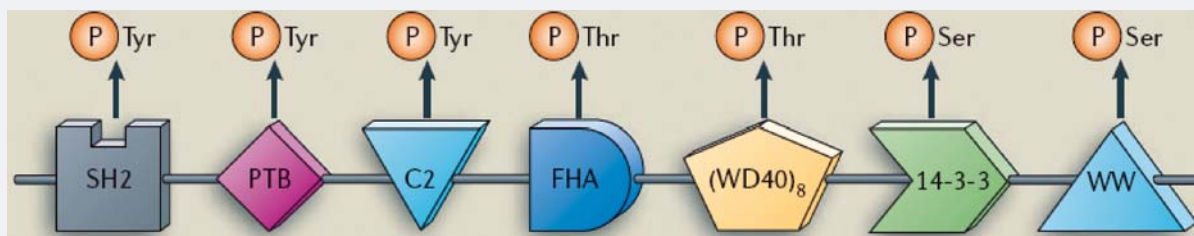


Рис. 3П. Адаптирован из работы B. Seet, I. Dikic, M. Zhou, T. Pawson [28]

На рис. 3П показаны некоторые домены белков, распознающие и связывающиеся с фосфорилированными остатками тирозина или серина. Аббревиатуры: SH2 (Src-homology domains 2); PTB (phosphotyrosine-binding domain); C2 (conserved region 2 of protein kinase C); FHA (forkhead-associated); (WD40)₈ —

домен впервые выявлен в белке, содержащем WD40-повтор (W — триптофан, D — аспарат); 14-3-3 (домен впервые выявлен в белке 14-3-3, чье название просто соответствует его позиции при классификации белков нервной ткани с помощью гель-электрофореза); WW (домен содержит 2 соседних остатка триптофана).

Адапторные белки, имеющие модульное строение (содержат несколько различных стыковочных сайтов), условно подразделяют на несколько категорий.

Адапторы — как правило, небольшие белки, имеющие 2 участка связывания для 2 белков-эффекторов (на рисунке стрелкой указаны взаимодействия таких белков — А и В, связанных с адаптором). «Платформы» или «скэффолд» (scaffolds) белки — крупные молекулы, имеющие несколько доменов для взаимодействия, способные связывать и регулировать несколько белков сигнального пути. Стыковочные или докинг (docking) белки имеют аналогичные структурные и функциональные особенности, что и у скэффолд белков, но их отличительной чертой является способность локализоваться на мембране (поэтому эти белки иногда называют «якорями») рядом с активированным рецептором.

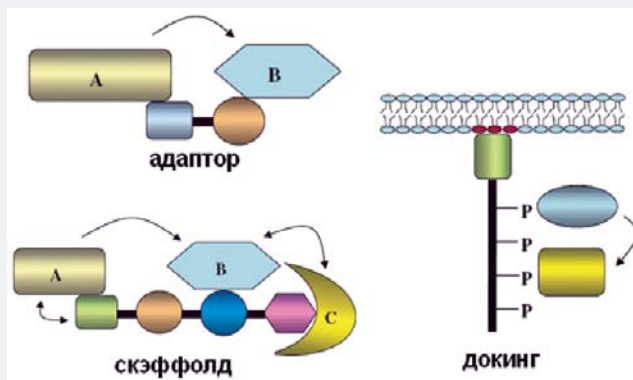


Рис. 4П. Адаптирован из работы L. Buday, P. Tompa [29]

ков, но их отличительной чертой является способность локализоваться на мембране (поэтому эти белки иногда называют «якорями») рядом с активированным рецептором.

дующей лекции). По биологической функции эти рецепторы можно условно (учитывая процессы интеграции сигналов) подразделить на 2 группы: рецепторы, индуцирующие сигналы выживания и пролиферации клеток (1–4) и рецепторы, индуцирующие клеточную дифференцировку (5–7). В соответствии с этим, геномные aberrации, влияющие на те или иные сигнальные пути, можно, с той же оговоркой, отнести к мутациям класса I (рецепторы типа 1–4) и класса II (рецепторы типа 5–7). Мутации или хромосомные транслокации в генах, кодирующих ком-

поненты сигнальных путей рецепторов типа 1–4, относятся к самому обширному классу рекуррентных генетических aberrаций при лейкозах. Мутации в генах, кодирующих компоненты сигнальных путей рецепторов типа 5–7, встречаются в основном на терминальных стадиях развития опухоли. Хотя здесь есть одно исключение: мутации и хромосомные транслокации, затрагивающие гены, кодирующие Notch рецепторы, очень часто встречаются при острых Т-клеточных лейкозах [6]. Рецепторы типа 1–4 подробнее будут рассмотрены в последующих главах.

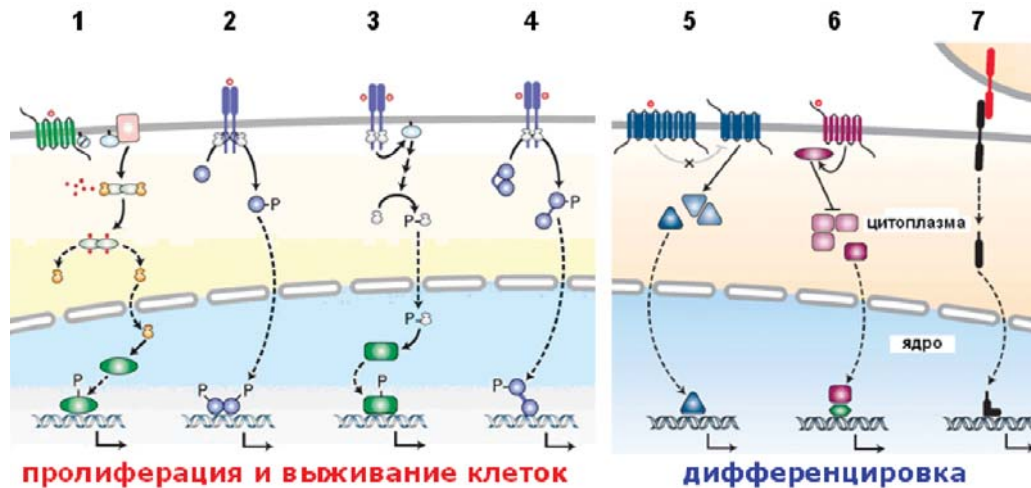


Рис. 1. Семь основных типов рецепторов клеточной поверхности

Представлена схема семи основных типов мембранных рецепторов: 1 — рецепторы, связанные с большими, трехсубъединичными G-белками (см. главу II); 2 — рецепторы цитокинов, связанные с цитоплазматическими JAK (Janus kinase) тирозинкиназами; 3 — тирозинкиназные рецепторы (цитоплазматическая часть рецептора обладает тирозинкиназной активностью); 4 — TGF- β (transforming growth factor β) рецепторы, цитоплазматическая часть рецептора обладает серин-треонин киназной активностью; 5 — Hedgehog (Hh) рецепторы, в стимулированном (связанном с лигандом) состоянии путем протеолиза активируют освобождение факторов транскрипции из ингибирующих белковых комплексов; 6 — WNT рецепторы, в стимулированном состоянии индуцируют освобождение фактора транскрипции (β -катенина) из мультибелкового комплекса (происхождение названий двух последних рецепторов см. в лекции № 1, Приложение 1); 7 — Notch рецепторы (от англ. notch — метка, зарубка; название связано с тем, что рецептор реагирует со своими лигандами, которые также прикреплены к поверхности клеток путем простого физического «сцепления» — один из его лигандов так и называется — Jagged, «зазубрина»); в стимулированном состоянии претерпевают протеолитическое расщепление, в результате которого высвобождаются их цитоплазматические домены, являющиеся факторами транскрипции. По расположению в мембране рецепторы можно разделить на 2 группы: интегральные рецепторы (2, 3, 4 и 7) и змеевидные (serpentine) рецепторы (1, 5 и 6), белковая часть которых несколько раз (обычно 7 раз) пересекает липидный бислой мембраны. P — фосфорные группы. Подробности см. в тексте. Рис. адаптирован из работы H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira et al. [5].

Если рассматривать систему сигнальной трансдукции в общем виде, то выявляется определенная закономерность. На «входе» в систему существует множество лигандов и их рецепторов (известно более 200 видов рецепторов, причем для некоторых из них не выявлены лиганды — такие рецепторы получили название «орфановых», от англ. orphan — сирота). На «выходе» из системы активируется несколько сотен факторов транскрипции, которые имеют своей мишенью около 20 тыс. генов. При этом сегодня известно всего около 30 внутриклеточных сигнальных путей, которые совместно используются рецепторами разных типов. На рис. 2 эта закономерность показана графически на примере семейства тирозинкиназных рецепторов ERBB (avian erythroblastic leukemia viral v-Erb-b oncogene homolog), также известных как рецепторы эпидермального фактора роста — HER (human epidermal growth factor receptor) [7]. Из рисунка видно, что «узким» местом в цепи сигнальной трансдукции является область передачи сигнала от рецептора к факторам транскрипции, так как количество эффекторов здесь ограничено. В то же время, считается, что именно на этом участке сигнализации, называемом одними авторами «основным процессом» (core process) [7], а другими — критическими «узлами» (critical nodes) [8], осуществляется формирование разнообразия клеточных ответов на внеклеточные сигналы. Ограниченное число эф-

фекторных молекул компенсируется большим количеством их комбинаций на адапторных белках (адапторы, скэффолд и докинг белки, см. Приложение 2). То, что именно адапторные белки определяют специфичность сигнальной трансдукции, недавно было продемонстрировано в серии изящных экспериментов на дрожжах. В этих работах с помощью генно-инженерных манипуляций были получены искусственные химерные гены белков-эффекторов, в которых те части молекул, которые отвечают за активацию определенного набора факторов транскрипции (и, соответственно, за определенный клеточный ответ), были соединены со стыковочными доменами белков-эффекторов из других сигнальных сетей. То есть полученные химерные гены кодировали эффекторные белки, у которых каталитическая активность оставалась неизменной, но стыковаться они могли только с «чужими» адапторными белками. Введение таких генов в клетки дрожжей приводило к формированию «неправильных» комплексов на адапторных белках, что вызывало изменение клеточного ответа на анализируемую внешнюю стимуляцию ([9], а также обзоры [10, 11]).

Следует также отметить, что именно в верхней и нижней области «песочных часов» сигнальной трансдукции сосредоточены белки, кодирующие гены которых наиболее часто подвергаются абберациям при лейкозах. Причем в верхней части схе-

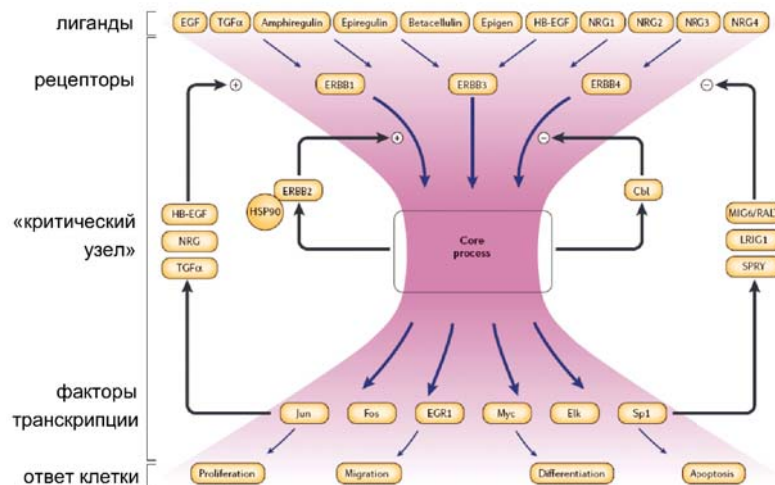


Рис. 2. Система сигнальной трансдукции ERBB-семейства рецепторов

Слева отмечены основные участники процесса сигнальной трансдукции. Здесь мы не будем «расшифровывать» компоненты данной системы, чтобы не усложнять общую картину, а отметим только ключевые моменты (см. также текст лекции). Выделенная цветом часть рисунка отражает количественный состав различных «отделов» системы сигнальной трансдукции — от лигандов до факторов транскрипции. По форме это напоминает песочные часы, «узким местом» которых является центральная часть, где передача сигнала контролируется небольшим количеством эффекторных молекул (см. Приложение 2). Именно эта область, названная авторами «основным процессом» (core process), может вносить существенный вклад в определение вида клеточного ответа на сигналы извне (см. текст лекции). Следует также отметить наличие позитивных и негативных (на рис. — слева и справа от «узкого места») соответствующих цепи сигнальной трансдукции. В позитивных петлях нижестоящие эффекторы (протеинкиназы) могут, например, активировать сигнализацию за счет фосфорилирования вышестоящих эффекторов и/или вызывать диверсификацию сигнальных путей путем создания на адапторных белках дополнительных стыковочных сайтов для других эффекторов. В негативных петлях обратной связи одной из мишеней сигнального пути может быть, например, протеинфосфатаза, активация которой приводит к дефосфорилированию (уничтожению) стыковочных сайтов рецепторного комплекса или к инактивации вышестоящих эффекторов. Очень часто эффекторами негативных петель регуляции являются Ub-лигазы, активация которых приводит к деградации рецептора (см. Приложение 3). Рис. адаптирован из работы A. Citri, Y. Yarden [7].

мы, приведенной на рис. 2, находятся белки, мутации генов которых относятся к классу I, а в нижней части — к классу II. Вполне вероятно, что одной из причин такого эффекта может служить большое количество потенциальных опухолеродных мишеней в верхней и нижней частях сети сигнальной трансдукции. В средней части («горлышко» песочных часов) сети сигнальной трансдукции, отвечающая за модулирование и разнообразие ответов и используемая совместно многими типами рецепторов, имеется на 1–2 порядка меньше потенциальных мишеней.

Глава II. Фосфорилирование — важнейший механизм сигнализации

Важнейшими регуляторами путей сигнальной трансдукции являются протеинкиназы, поэтому их активность обычно строго контролируется и регулируется. Почти любое нарушение в системе протеинкиназной сигнализации, происходящее в результате генетических изменений, приводит к нарушению регулировки их активности и инициации злокачественной трансформации клетки [12]. По своей структуре и клеточной локализации протеинкиназы подразделяются на рецепторные и цитоплазматические, а по каталитической активности — на тирозиновые и серин-треониновые (см. Приложение 2).

Рецепторы, ассоциированные с протеинкиназной активностью, подразделяют на 3 основные группы (рис. 1).

Первая группа. Тирозинкиназные рецепторы (RTKs, receptor tyrosine kinases), цитоплазматическая часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Лигандами RTKs обычно являются различные факторы роста.

Вторая группа. Рецепторы цитокинов не обладают собственной киназной активностью, но их цитоплазматический домен содержит стыковочные сайты для связывания с нерецепторными JAK (Janus kinase) тирозинкиназами, которые и производят фосфорилирование эффекторных белков при стимулировании рецептора. Такое название (в честь двуликого бога Януса) JAK киназы получили из-за того, что в отличие от других протеинкиназ они имеют 2 киназных домена (один из них, правда, неактивен). Основной мишенью JAK киназ является семейство цитоплазматических факторов транскрипции STAT (signal transducer and activator of transcription), которые после активации перемещаются в ядро и активируют транскрипцию своих генов-мишеней.

Третья группа. Цитоплазматическая часть рецепторов трансформирующего фактора роста β (TGF- β) обладает серин-треонин киназной активностью. TGF- β рецепторы активируют цитоплазматические

факторы транскрипции SMAD (similar to mothers against decapentaplegic), которые могут, как и STAT, активировать в ядре транскрипцию определенных генов-мишеней или взаимодействовать в цитоплазме с эффекторами других путей сигнальной трансдукции (интеграция сигналов). Такое странное название белки SMAD получили из-за их гомологии с MAD белком дрозофилы, мутации гена которого вызывают репрессию морфогена *DPP* (decapentaplegic), причем это воздействие наблюдается только у самок (результат так называемого «материнского эффекта»). В итоге к имени морфогена была добавлена фраза из названия популярных в США общественных организаций — «матери против...».

Активность протеинкиназ подвергается в клетках строгому контролю и «самоконтролю», и при отсутствии внешнего воздействия они находятся в состоянии автоингибирования [12–14]. На рис. 3 показаны и обсуждены механизмы автоингибирования цитоплазматических и рецепторных протеинкиназ, а также способы их активации. К уже сказанному стоит добавить, что для активации цитоплазматиче-

ских протеинкиназ большое значение имеет их окружение, т. е. место, где они располагаются. В клетке наибольший «уровень» протеинкиназной активности сосредоточен в областях инициации сигнальной трансдукции, т. е. в участках, соседствующих с мембранными микродоменами, несущими рецепторы (см. Приложение 1). Именно в этих клеточных «отсеках» (цитоплазматических компартментах) концентрируется наибольшее число различных протеинкиназ и адапторных белков (см. Приложение 2), готовых к взаимодействию друг с другом при стимуляции рецепторов. Для того чтобы попасть в эти компартменты и активироваться, многим протеинкиназам необходимо претерпеть модификацию и приобрести «якорь», который направит их к активным мембранным участкам (см. Приложение 1).

Активное состояние рецептора после взаимодействия с лигандом недолговечно. Специфичный липидный состав мембранных микродоменов рецепторов и локально повышенная киназная активность вокруг активированных рецепторов приводят к рекрутированию в эти компартменты различ-

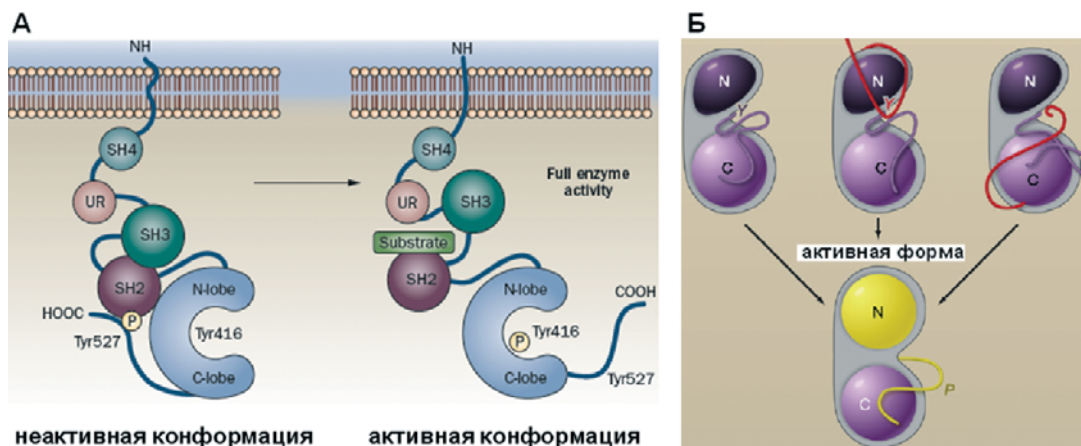


Рис. 3. Механизм активации протеинкиназ

На рис. 3А представлен механизм активации цитоплазматической тирозинкиназы SRC. SRC была первой протеинкиназой, у которой была детально изучена структура, поэтому некоторые белковые домены и многие белки, содержащие подобные домены, имеют в своем названии аббревиатуру SH (Src-homology domains). У SRC выделяют 4 функциональных SH домена: SH1 — каталитический домен, состоящий из N- и C-концевых частей (lobe), содержащий в C-части так называемую A-петлю (петлю активации); SH2 — домен, связывающийся с фосфорилированным тирозином (Tyr); SH3 — домен, связывающийся с богатыми пролином участками других белков; SH4 — домен, содержащий сигналы для модификации SRC остатками жирных кислот (миристилирование, см. Приложение 1). Фосфорилирование C-концевого Tyr527 приводит к связыванию с ним SH2 домена и автоингибированию SRC (компактная, неактивная конформация белка). Дефосфорилирование Tyr527 фосфатазами и связывание SH2 и/или SH3 доменов SRC с белками-субстратами приводит к формированию активной конформации фермента. Фосфорилирование Tyr416 в A-петле приводит к ее смещению и «открытию» каталитического участка для связывания субстрата.

На рис. 3Б вы можете видеть рецепторные тирозинкиназы (RTKs), которые состоят из нескольких функциональных доменов: внеклеточный домен (ED, extracellular domain), осуществляющий взаимодействие с лигандом; трансмембранный домен (TM, transmembrane), определяющий локализацию рецептора в определенном участке мембраны (см. Приложение 1), и цитоплазматический подмембранный домен (JM, juxtamembrane, эти домены на рис. не показаны). За JM-доменом располагается киназный домен, который, как и у SRC, состоит из N- и C-концевых частей. Автоингибирование RTKs у разных рецепторов осуществляется с помощью различных механизмов. Например, взаимодействие A-петли (фиолетовая полоска) с каталитическим участком препятствует его связыванию с субстратом (левый верхний рис.). Ингибирование может осуществляться JM-доменом (красная полоска), который, взаимодействуя с каталитическим центром и A-петлей, стабилизирует неактивную конформацию RTK. Фосфорилирование определенных Tyr в JM-домене снимает это ингибирующее взаимодействие (центральный верхний рис.). У некоторых RTKs неактивная конформация вызывается, как и у SRC, взаимодействием C-концевого участка белка (красная полоска) с киназным доменом (правый верхний рис.). Активация RTKs при всех типах автоингибирования происходит после связывания ED-доменов с «двухвалентным» лигандом, что приводит к димеризации рецепторов и разрушению неактивной конформации их цитоплазматических доменов. Активация рецептора всегда сопровождается фосфорилированием (P) A-петли (желтая полоска на нижнем рис.) в киназном домене. Рис. адаптирован из работ M. Lemmon, J. Schlessinger и C. Swanson, R. Paniagua, T. Lindstrom, W. Robinson [13, 15].

ных белков, служащих сигналами к эндоцитозу (интернализации рецепторов) [16]. Надо отметить, что даже в эндосомах многие рецепторные комплексы продолжают активно индуцировать пути сигнальной трансдукции, а некоторые рецепторы, например EGFR (epidermal growth factor receptor), даже попадают в ядро [17, 18]. Но в конце концов весь этот сложный белковый комплекс сигнальной трансдукции подвергается деградации в 26S протеасомах (см. Приложение 3).

Глава III. RAS-сигнализация

Рецепторы, связанные с так называемыми G-белками (GPCRs, G protein-coupled receptors), относятся к змеевидным рецепторам, белковая часть которых имеет 7 трансмембранных α -спиралей и 7 раз пересекает мембрану (рис. 1). Цитоплазматический домен рецепторов ассоциирован с «заякоренными» на мембране G-белками (название связано с тем, что эти белки активируются ГТФ (GTP)). С GPCRs связаны так называемые гетеротримерные G-белки, состоящие из 3 субъединиц (α , β и γ). Лигандами GPCRs являются многие гормоны (глюкагон, серотонин, вазопрессин, АКТГ и т. п.) и хемокины. Пути сигнальной трансдукции, индуцированные этими рецепторами, в основном связаны с проводящими путями вторичных посредников, включая цАМФ и IP_3 /DAG (см. Приложение 1) [19].

При лейкозах рекуррентные aberrации затрагивают другой класс G-белков — так называемые малые G-белки, к которым относятся белки RAS-семейства [20]. Эти небольшие белки (20–35 КДа), состоящие из одной субъединицы, имеют на удивление очень много функций в клетке и взаимодействуют с большим количеством других белков, хотя, как видно на примере адапторных белков — чем больше взаимодействий, тем сложнее должна быть структура. G-белки находятся в активном состоянии, когда они связаны с ГТФ, в этом состоянии они принимают активную конформацию, позволяющую им взаимодействовать и активировать другие белки (в частности, белки-эффекторы сигнальной трансдукции). Так как G-белки, в особенности онкобелки RAS, обладают огромным онкогенным потенциалом, то природа позаботилась о строгом контроле их активности. Во-первых, как и протеинкиназы, они обладают мощным «самоконтролем», который заключается в том, что они являются ГТФазами, т. е. могут сами гидролизовать ГТФ до ГДФ и переходить в неактивное состояние. Кроме этого, существует большое число ферментов, которые регулируют активность G-белков. Активация G-белков зависит от действия белков GEFs (guanine nucleotide-exchange factors), которые катализируют $GDF \rightarrow GTF$ реакцию, а дезактивация — от действия белков GAPs (GTPase activating proteins), ак-



Приложение 3. Убиквитинирование как один из важнейших способов регуляции [30–32]

Посттрансляционная модификация аминокислотных остатков (фосфорилирование, метилирование, прениляция и т. п.) является основным способом изменения физико-химических свойств белков, определяющим их активность и функцию. В последние годы стало ясно, что важную роль в регуляции активности белков играет их убиквитинирование, т. е. ковалентное связывание с небольшим регуляторным белком убиквитином (Ub, ubiquitin), состоящим всего из 76 аминокислот. Первоначально Ub считался своеобразной «меткой», с помощью которой отбраковывались ненужные или патогенные (например, с дефектной третичной структурой) белки. Помеченные Ub белки транспортируются к 26S протеасоме, где подвергаются деградации до олигопептидов (журналисты придумали для Ub романтическое название — «поцелуй смерти»).

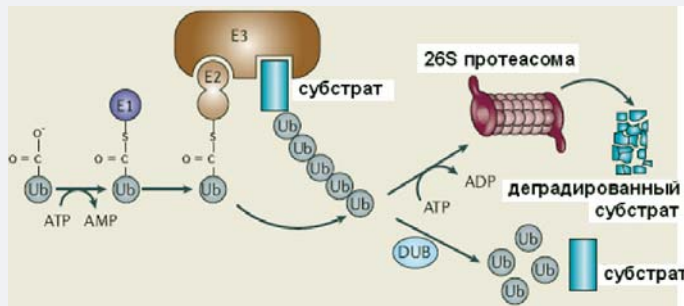


Рис. 5П. Адаптирован из работы D. Hoeller, C.-M. Hecker, I. Dikic [31].

ющих поли-Ub цепочки (DUB, de-ubiquitylating enzyme). Убиквитинирование является важным регуляторным механизмом, с помощью которого можно быстро остановить какой-либо процесс, разрушив белки, принимающие в нем участие. Деградация белков в 26S протеасоме имеет и другое значение — образующиеся при этом пептиды используются клетками иммунной системы в реакциях презентации антигена.

Сигналом для деградации белка служат именно поли-Ub цепочки, однако частичное убиквитинирование, т. е. введение в белок-мишень одной или двух молекул Ub, является важным регуляторным механизмом. Это связано с тем, что единичные молекулы Ub могут служить сигналом для связывания белка-мишени с другими регуляторными белками. В зависимости от контекста (так же как и при фосфорилировании или метилировании белков) Ub-связанный белок может при этом активироваться или, наоборот, ингибироваться. В последнее время выявлен еще целый ряд Ub-подобных белков, например, SUMO (ubiquitin-related modifier), которые принимают участие в регуловке многих клеточных процессов.

АТФ-зависимый комплекс убиквитинирования состоит из нескольких белков: Ub-активирующего фермента (E1), Ub-конъюгирующего фермента (E2) и Ub-лигазы (E3), которая катализирует присоединение Ub к субстрату (белку-мишени) с последующей достройкой поли-Ub цепочки. Ub-лигаза является ключевым ферментом комплекса убиквитинирования. По структуре каталитического домена Ub-лигазы подразделяются на 2 типа: ферменты, содержащие RING- (really interesting new gene) или HECT- (homologous to E6-associated protein C-terminus) домены. Причем, если HECT-лигазы являются мономерными белками, то RING-лигазы функционируют в составе сложных мультибелковых комплексов. Процесс убиквитинирования обратим, его можно остановить с помощью ферментов, разрушающих поли-Ub цепочки (DUB, de-ubiquitylating enzyme).

тивирующих ГТФазную активность G-белков, т. е. ускоряющих их переход в неактивную конформацию. Степень активности RAS белков зависит от баланса между активностями *GEFs* и *GAPs*. Так как *GEFs* и *GAPs* модулируют активность потенциальных онкобелков (*RAS*), то с точки зрения онкологии *GEFs* можно отнести к онкогенам, а *GAP* — к генам-супрессорам опухоли. Совместная локализация *RAS*, *GEFs*, *GAPs* и эффекторных белков является ключевым условием для *RAS*-зависимой сигнальной трансдукции. Большое значение для ее реализации имеют посттрансляционные модификации *RAS* (см. Приложение 1).

Онкогенные мутации в *RAS*-генах наблюдаются в ~ 30 % опухолей человека. Удивительным является уникальная «стандартизация» этих мутаций: во всех мутантных *RAS*-белках, обнаруженных и в ретровирусах, в которых онкогены *RAS* были впервые идентифицированы (см. лекцию № 1, Приложение 1), и при крупномасштабном молекулярном скрининге больных — выявляется один и тот же комплект активирующих мутаций, которые затрагивают 12, 13

и 61-й кодоны онкогена. Такие мутации приводят к конститутивной (постоянной) активации *RAS*-белка и онкогенезу [21].

Заключение

Описанные выше процессы проиллюстрированы на рис. 4 на примере сигнализации от рецептора инсулин-подобного фактора роста (IGF1R). Показаны основные компоненты *RAS*-*RAF*-*MAPK*-сигнального пути, главного пути активации клеточной пролиферации, и *PI3K*-*AKT*-*mTOR*-сигнального пути, активирующего выживаемость клеток. *RAS*-*RAF*-*MAPK*-сигнальный путь сопряжен с последовательной активацией ряда *MAP* киназ (*MAPK*, *mitogen-activated protein kinase*), получившей название «киназный каскад», который заканчивается фосфорилированием серин-треонин киназ *ERK* (*extracellular signaling regulated kinase*). Активация *ERK* приводит к изменению конформации белка и «открытию» на его поверхности сигнальной последовательности аминокислот — *NLS* (*nuclear localization signal*), которую узнают транс-

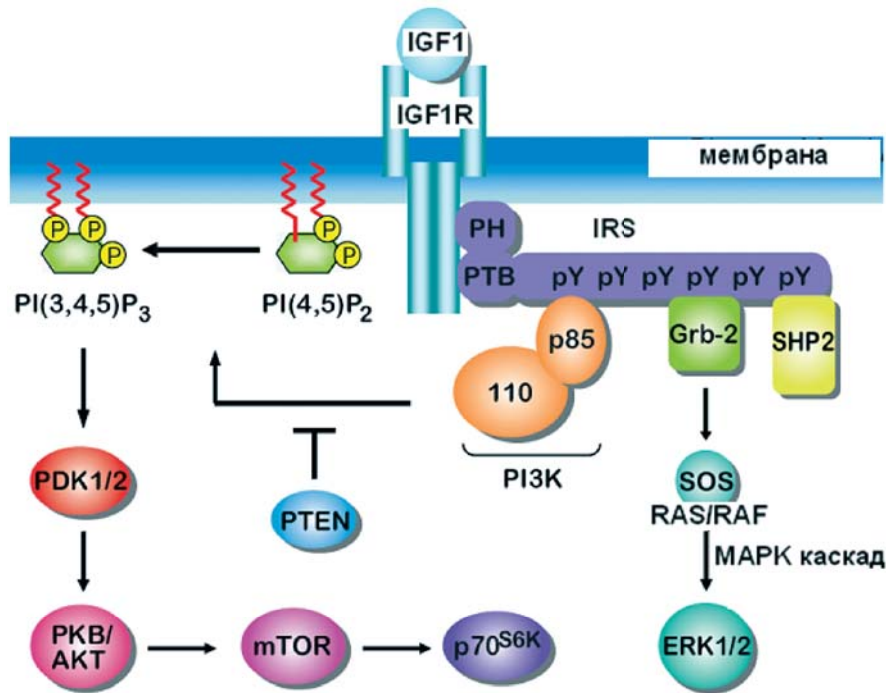


Рис. 4. Сигнализация инсулин-подобного фактора роста IGF1 (insulin-like growth factor 1) через его рецептор IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor)

Особенностью инициации этого типа сигнальной трансдукции является ассоциация рецептора с крупным докинг белком IRS (insulin receptor substrate), который рекрутируется к активированному рецептору с помощью PH- (связь с мембраной) и PTB- (связь с рецептором) доменов на его N-конце (см. Приложение 2). После связывания рецептор активирует (фосфорилирует) остатки тирозина (Y) на C-конце IRS, что приводит к созданию набора стыковочных сайтов (pY) для рекрутирования нижестоящих сигнальных эффекторов. Одним из таких эффекторов является киназа PI3K, состоящая из каталитической (p110) и регуляторной (p85) субъединиц. Активация PI3K приводит к инициации PI3K-AKT-mTOR-пути сигнальной трансдукции (см. Приложение 1 и текст лекции). С IRS также связываются GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) и SHP2 (SH2 domain-containing phosphatase), причем фосфатаза SHP2 активирует адапторный белок GRB2. Дальнейшее взаимодействие GRB2 с G-белком RAS и факторами обмена нуклеотидов (GEFs), такими как SOS (son of sevenless), приводит к активации RAS (см. главу III). RAS иницирует рекрутирование к мембране и активацию серин-треонин киназы RAF (v-raf murine leukemia viral oncogene homolog), которая, в свою очередь, активирует MAP-киназный каскад (*RAS*-*RAF*-*MAPK*-путь сигнальной трансдукции). Рис. адаптирован из работы K. Mardilovich, S. Pankratz, L. Shaw [22].

портные белки и перемещают ERK в ядро. В ядре молекулы ERK активируют определенные наборы факторов транскрипции.

Стимулирование клеточной выживаемости (т. е. снижение чувствительности к сигналам запрограммированной гибели клеток) при активации PI3K-AKT-mTOR-пути реализуется с помощью 2 основных механизмов. Во-первых, в результате фосфорилирования и инактивации ключевого проапоптотическо-

го белка BAD (BCL2 antagonist of cell death), а во-вторых, с помощью активации сигнальных комплексов серин-треонин киназы mTOR (mammalian target of rapamycin), один из которых (mTORC1) ингибирует процессы аутофагии клеток [23].

Следующая лекция будет посвящена рекуррентным генетическим абберациям, характерным для гематологических опухолей миелоидного происхождения.

Л и т е р а т у р а

1. Владимирская Е.Б. Механизмы кроветворения и лейкогенеза (цикл лекций). М.: Династия, 2007.
2. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия 2000;65:5–33.
3. Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров, 2002 (есть несколько электронных версий этого обзора, см., например: <http://longevity-library.narod.ru/1/1.1/1.1.21.htm>).
4. Scott J., Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. Science 2009;326:1220–4.
5. Lodish H., Berk A., Matsudaira P. et al. Molecular cell biology. UK, Freeman & Co, 5 ed., 2004.
6. Ferrando A. The role of Notch1 signaling in T-ALL. Hematology 2009;353–61.
7. Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:505–16.
8. Taniguchi C., Emanuelli B., Kahn R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:85–96.
9. Peisajovich S., Garbarino J., Wie P., Lim W. Rapid diversification of cell signaling phenotypes by modular domain recombination. Science 2010;328:368–72.
10. Pryciak P. Designing new cellular signaling pathways. Chem Biol 2009;16:249–54.
11. Lim W. Designing customized cell signalling circuits. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:293–403.
12. Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001;411:355–65.
13. Lemmon M., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2010;141:1117–34.
14. Hubbard S. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:464–71.
15. Swanson C., Paniagua R., Lindstrom T., Robinson W. Tyrosine kinases as targets for the treatment of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatology 2009;5:317–24.
16. Le Roy C., Wrana J. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:112–26.
17. Sorkin A., von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:609–22.
18. Wang Y.-N., Yamaguchi H., Hsu J.-M., Hung M.-C. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. Oncogene 2010;29:3997–4006.
19. Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. J Cell Physiol 2007;213:589–602.
20. Hancock J. Ras proteins: different signals from different locations. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:373–85.
21. Schubert S., Shannon K., Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:295–308.
22. Mardilovich K., Pankratz S., Shaw L. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. Cell Comm Signaling 2009;7:14–28.
23. Bhaskar P., Hay N. The two TORCs and Akt. Develop Cell 2007;12:487–502.
24. Simons K., Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1:31–9.
25. Wymann M., Schreiner R. Lipid signalling in disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9:162–76.
26. Groves J., Kuriyan J. Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. Nat Struct Mol Biol 2010;17:659–65.
27. Kurosaki T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. Nat Rev Immunol 2002;2:354–63.
28. Seet B., Dikic I., Zhou M., Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:473–83 (см. также постер этих авторов — <http://www.nature.com/nrm/posters/modifications/nrm0706-poster-web.pdf>).
29. Buday L., Tompa P. Functional classification of scaffold proteins and related molecules. FEBS J 2010;277:4348–55.
30. Welchman R., Gordon C., Mayer J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:599–609.
31. Hoeller D., Hecker C.-M., Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer 2006;6:776–88.
32. Chen Z., Sun L. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. Mol Cell 2009;33:275–86.