

# АТФ КАК ПЕРЕДАТЧИК И УСИЛИТЕЛЬ СИГНАЛОВ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И ЦИТОКИНОВ

© 2000 г.

А. А. КАРЕЛИН,

А. Г. ГЛОБА, В. С. ДЕМИДОВА

*Институт хирургии им. А.В.Вишневского РАМН, Москва*

I. Введение. II. История открытия плазматического мембранного сигнал-трансдуцирующего АТФ. III. Условия образования АТФ на плазматических мембранах клеток-мишеней в ответ на действие факторов роста и цитокинов. IV. Роль сигнального АТФ в активации рецепторных тирозинкиназ для ростовых факторов. V. Возможный механизм синтеза сигналтрансдуцирующего АТФ на плазматической мембране животной клетки. VI. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Изучение фундаментального механизма, посредством которого клетки передают и усиливают внеклеточные информационные сигналы к росту, клеточной пролиферации, дифференцировке, онкогенезу, а также хемотаксису и адгезии, воспринимаемые мембранными рецепторами клеточной поверхности, является одной из центральных проблем современной биологии.

---

*Принятые сокращения:* ОПМЧ — обогащенные плазматическими мембранами частицы; ПМ — плазматические мембраны; РФ — ростовые факторы; ФГА — фитогеммагглютинин; DAPP- $P^1P^5$  — диаденозинпентафосфат; EGF — фактор роста эпидермиса; EPO — эритропоэтин; FCCP — *n*-трифторметоксикарбонилцианид-фенилгидразон; FGF — фактор роста фибробластов; FMLP — N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенилаланин; FN — фибронектин; FSBA — 5'-*n*-фторсульфонилбензоиладенозин; G-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов; GDP — гуанозин-5'-дифосфат; GH — гормон роста (соматотропин); GHL — глицил-гистидил-лизин; GM-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов и моноцитов; Grb<sub>2</sub> — белок, связывающийся с рецепторной тирозинкиназой; HGF — фактор роста гепатоцитов; ILs — интерлейкины; M-CSF — колониестимулирующий фактор макрофагов; MSA — фактор размножения клеток; NGF — фактор роста нервов; (окончание см. сл. стр.)

В последние четыре десятилетия был открыт новый класс гормоноподобных веществ — полипептидные факторы роста и цитокины, вовлеченные в пролиферацию, дифференцировку и трансформацию многих типов клеток, включая иммунокомпетентные. Если успех в изучении молекулярного механизма действия гормонов был достигнут свыше 40 лет тому назад благодаря открытию Сазерлендом сАМР [173], и позднее, благодаря обнаружению Родбеллом GTP-связывающих белков [145], то стремительный прогресс в изучении функций и некоторых механизмов действия РФ и цитокинов был получен к началу и середине 80-х годов. Это открытие  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипорта, открытие РКС, обнаружение высвобождения внутриклеточного  $[\text{Ca}^{2+}]$ , выявление роли протеин-тирозинкиназ (РТК) в передаче ростовых сигналов. Однако центральный и основополагающий механизм действия ростовых факторов, цитокинов и онкобелков на мембраны клеток-мишеней оставался неизвестным.

К концу 80-х годов после классических работ Сазерленда и Ролла [172–174] и позднее выдающихся работ Бериджа [49–51] и Нишицуки [132–135], а также Гилмана [82, 83] оставалась загадочной и необъяснимой одна из наиболее интересных и чрезвычайно актуальных проблем биохимии, а именно — фундаментальный механизм, посредством которого клетки передают и усиливают информационные сигналы РФ, цитокинов, митогенов, стимуляторов хемотаксиса, адгезии и апоптоза, которые воспринимаются мембранными рецепторами клеточной поверхности. Неизвестны были биохимические реакции на ПМ, которые индуцируют ранние события, связанные с запуском сигнальных каскадов, исходящих из ПМ клеток-мишеней и идущих по направлению к ядру клетки.

После того, как Кребсом и Вэлшем была сформулирована концепция [117, 182] о роли сАМР в активации сАМР-зависимых протеинкиназ как класса регуляторных ферментов, был не ясен и загадочен ключевой механизм, который бы обеспечивал активацию тирозиновых киназ для РФ и цитокинов.

Недавно был достигнут большой прогресс в выяснении клеточных сигнальных путей, которые включают фосфорилирование белков и ферментов по остаткам тирозина с помощью рецепторных

---

*Принятые сокращения (окончание):* PDGF — фактор роста, синтезируемый тромбоцитами; РКВ — протеинкиназа В; РКС — протеинкиназа С; РТК — рецепторная тирозинкиназа; TNF- $\alpha$  — фактор некроза опухоли —  $\alpha$ ; VEGGF — фактор роста эндотелия;  $\Delta\mu\text{H}^+$  — разность электрохимических потенциалов ионов водорода;  $\Delta\mu\text{Na}^+$  — разность электрохимических потенциалов ионов натрия; PtdIns 4,5P<sub>2</sub> — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат.

и нерцепторных тирозиновых киназ [77, 126]. К концу 80-х и началу 90-х гг. была показана главная роль тирозиновых киназ в передаче рецептор — опосредуемых внеклеточных сигналов к росту клеток, пролиферации, онкогенезу [60, 95, 153, 177, 188].

Вызывали трудности и сомнения поиск и обнаружение сигнальной молекулы—посредника, которая бы передавала, усиливала или энергетически обеспечивала трансмембранный перенос митогенных сигналов РФ, цитокинов и онкобелков.

До сих пор в схемах трансмиссии сигналов факторами роста после взаимодействия «РФ—рецепторная тирозинкиназа» на ПМ клеток перед дальнейшей активацией каскада фосфорилирования стоит знак вопроса: механизм? [118]. Что за иницирующий сигнальный мессенджер или интермедиат запускает каскад фосфорилирования, исходящий из ПМ и передающий сигнал на рецепторную тирозинкиназу. Какова природа этого интермедиата?

В настоящем обзоре суммированы данные касающиеся обнаружения и выяснения условий и механизма образования генерируемого на ПМ клеток—мишеней АТР и роли его в передаче и усилении сигналов РФ, цитокинов, а также сигналов адгезии, хемотаксиса и апоптоза.

## II. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ПЛАЗМАМЕМБРАННОГО СИГНАЛТРАНСДУЦИРУЮЩЕГО АТР

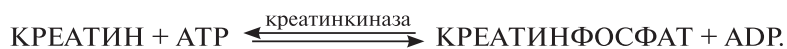
История открытия короткоживущего плазмамембранного сигналтрансдуцирующего АТР началась 20 лет тому назад в 1979—1980 гг. с изучения механизма действия гормона инсулина на накопление общего и свободного креатина в препаратах ОПМЧ, изолированных из скелетных мышц крысы и инкубируемых в системе окисления NADH кислородом [7]. Эта система подобна классической системе окислительного фосфорилирования в митохондриях [106, 121]. В то время было уже известно, что инсулин не только выполняет роль регулятора метаболизма как гормон, снижающий уровень глюкозы в крови, но и оказывает ростстимулирующее действие на клетки [109]. Его можно рассматривать в качестве потенциального РФ в клеточной культуре в системе *in vitro* [89, 108, 110, 113], в том числе при выращивании фибробластов [144].

Клеточная фракция многократно промытых в 0,25 М сахарозе ОПМЧ (грубая фракция ПМ) была изолирована нами в условиях низкоскоростного центрифугирования (1000—2000 g) первоначально из скелетных мышц крысы, а затем из многих других тканей—мишеней для инсулина и других РФ и цитокинов. По

данным электронной микроскопии фракция ОПМЧ из скелетных мышц крысы представляла собой материал, состоящий из фрагментов клеточной мембраны (сарколеммы) с участками цитоплазмы, в которой содержались единичные субсарколеммальные митохондрии и фрагменты ядра [21]. В 1980 г. нас заинтересовал вопрос, каким образом инсулин стимулирует транспорт креатина или накопление его в клетках скелетных мышц крысы и в ОПМЧ, подобно тому как инсулин стимулирует транспорт и накопление в клетках глюкозы и аминокислот. В 1975 г. Хоглэнд и Ченг [88] сообщили, что стимулируемое инсулином накопление креатина в скелетной мышце крысы *extensor digitorum longus* при инкубации ее в среде с инсулином и креатином происходит скорее за счет фосфорилирующей активности креатинкиназы. Согласно этим данным значительная часть креатина транспортируется внутрь мышечных клеток через ПМ в виде фосфокреатина. В 1980 г. нами было показано, что инкубация препаратов ОПМЧ из скелетных мышц крысы в среде, содержащей трис-НСl буфер рН 7,5, ADP, Mg<sup>2+</sup>, креатин, неорганический фосфат, NaF, NADH—связанную систему окисления (NADH, цитохром *c*, молекулярный кислород) в присутствии 4 мкг/мл инсулина, приводила к очень быстрому (менее одной минуты) исчезновению P<sub>i</sub> из инкубационной среды и последующему накоплению общего и свободного креатина в ОПМЧ [7]. Исключение адениловых нуклеотидов (AMP, ADP) или P<sub>i</sub> из инкубационной среды предотвращало накопление общего креатина в ОПМЧ под действием инсулина, что, по всей видимости, указывало на связь между действием инсулина и присоединением неорганического фосфата к ADP в процессе аэробного фосфорилирования на ПМ мышечной клетки [7]. Как известно [75, 76], общий креатин представляет собой сумму свободного и связанного, а разность между общим и свободным креатином является мерой пула тканевого фосфокреатина. Мы предположили, что под действием инсулина в нашей системе происходит перераспределение пула тканевого креатина с увеличением количества и повышением оборота (воспроизводства) фосфокреатина, что является результатом возрастания активности креатинкиназной реакции [21].

Известно, что в тканях, где расход АТФ очень велик, например, в скелетной мышце, роль «энергетического буфера» для АТФ, дополнительного резервуара энергии может выполнять фосфокреатин [158, 159]. И если АТФ действительно синтезировался в ОПМЧ в системе аэробного фосфорилирования в ходе стимуляции их инсулином, то высокоэнергетическая концевая фосфатная группа, отщепляемая от АТФ под действием мышечной креатинкиназы могла

передаваться на добавленный креатин с образованием фосфокреатина (креатинфосфата). Следовательно, уменьшится до минимума количество АТФ, доступного для дефосфорилирования мембраносвязанными АТРазами и АТФ-киназами. В этом случае креатин оказывается идеальным акцептором  $\gamma$ -фосфата АТФ, если этот АТФ был генерирован в системе аэробного фосфорилирования [43]:



Подобно инсулину способностью повышать пул фосфокреатина в ОПМЧ из скелетных мышц крысы при инкубации их в системе аэробного фосфорилирования обладал соматотропин — гормон роста (ГН) [31]. Нами было показано, что связь между мембранным действием инсулина и соматотропина и транспортом креатина в препаратах ОПМЧ из скелетных мышц крысы осуществляется не прямым путем, а через реакцию на клеточной мембране, приводящую к образованию АТФ [21, 31]. Эффект реализуется в две стадии. На первом этапе при взаимодействии инсулина и соматотропина (ГН) с препаратом ОПМЧ из скелетных мышц крысы происходит аэробное образование АТФ. На втором этапе этот АТФ утилизируется в мембранных структурах ОПМЧ, скорее всего за счет фосфорилирующей активности креатинкиназы, что приводит к повышению в ОПМЧ мышечных клеток фосфокреатина [10, 31] или увеличению поглощения из среды добавленного  $^{14}\text{C}$ -креатина [21]. Ситуация напоминает историю сходную с историей открытия сАМР. сАМР был открыт Сазерлендом и Роллом как фактор, который на первом этапе генерировался из АТФ- $\text{Mg}^{2+}$  во фракции ОПМЧ клеток печени в ответ на добавление адреналина и глюкагона в присутствии метилксантинов [173, 174]. На втором этапе этот фактор стимулировал активацию гликогенфосфоорилазы в растворимой фракции гомогената печени в присутствии АТФ и  $\text{Mg}^{2+}$  [143]. Поиск интермедиата, некоего связующего звена между инсулин-рецепторным взаимодействием на ОПМЧ клеток скелетных мышц крысы и увеличением в них пула фосфокреатина в системе NADH-зависимого окисления, завершился в 1981 г. изоляцией, идентификацией и количественной оценкой синтезированного АТФ [8].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соответственно двум этапам реакции нами были использованы две среды инкубации. Первая: АТФ накапливался во фракции ОПМЧ в течение 45–90 с при их инкубации при 30 °С в аэробных условиях, когда инсулин (или родственный ростовой фактор)

инкубировали с фракцией изолированных ОПМЧ в среде, содержащей трис–HCl буфер (pH 7,5), ADP,  $Mg^{2+}$ , P<sub>i</sub>, NaF в процессе окисления NADH в присутствии цитохрома *c*, молекулярного кислорода и негидролизуемых АТР–аналогов, например, ингибитора киназ — FSBA и ионов  $Na^+$ . Поскольку ОПМЧ содержали наряду с ПМ примеси митохондрий, то в состав инкубационной среды мы постоянно вносили ингибиторы митохондриальной дыхательной цепи окисления — ротенон, антимицин А и цианид. АТР высвобождался в надосадочную жидкость после кипячения инкубационных смесей, инкубированных с инсулином. Супернатанты использовались для проведения второй, так называемой «рекомбинантной» серии экспериментов [21]. Для этого аликвоту супернатанта объемом 1 мл из первой среды инкубации вносили во вторую среду, содержащую бикарбонатный буфер Кребса–Рингера (pH 7,4), 0,13% раствор глюкозы, 537 мкг/мл креатина и 1,5 мл той же самой суспензии ОПМЧ, приготовленной на 0,25М сахарозе. Инкубацию в общем объеме 3,5 мл также осуществляли в колбочках Эрленмейера на «гребенке» Кребса в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере 100% кислорода в условиях встряхивания в аппарате Варбурга согласно [36]. В результате наблюдали достоверное увеличение в ОПМЧ уровня фосфокреатина на 10,6% или увеличение поглощения  $1-^{14}C$ –креатина из среды инкубации по сравнению с контролем (без инсулина) [21]. Этот же феномен проявлялся при добавлении во вторую среду инкубации экзогенного АТР в количествах, соответствующих количеству АТР, синтезируемому посредством ОПМЧ в присутствии инсулина (100–300 пкмоль) [21].

Если центрифугировать гомогенаты, приготовленные из скелетных мышц крысы с целью удаления клеточного дебриса, содержащего осколки плазматических мембран, субсарколеммальных митохондрий, ядра клеток, то ответ на инсулинстимулируемое образование АТР в этой растворимой цитозольной системе (супернатант 11000 g) полностью исчезает [13, 17]. Это доказывает, что механизм инсулинстимулируемого синтеза АТР на ПМ связан, во–первых, с окислением NADH. Во–вторых, ведущую роль в синтезе АТР играет ПМ клеток, ее целостность и замкнутость. В растворимой системе (11000 g) или после обработки ОПМЧ Триптоном X–100 синтеза АТР под действием инсулина и РФ не наблюдается [12, 17, 19]. Стимулированное инсулином образование АТР мы показали во фракции ОПМЧ, первоначально изолированной из скелетных мышц крысы путем низкоскоростного центрифугирования и многократного промывания в 0,25 М сахарозе аналогично методу изоляции ОПМЧ из печени [143]. Степень

обогащения фракции ПМ мы контролировали по маркерному ферменту — 5'-мононуклеотидазе [90, 127]. Синтезированный посредством ОПМЧ АТР был изолирован методами ионообменной хроматографии на колонках со смолой Dowex-1x8 (Cl<sup>-</sup> форма 100–200 меш). Критерии идентичности этого фактора с АТР были доказаны методами нисходящей бумажной хроматографии, одномерной тонкослойной хроматографии. Была получена также трисеребряная соль этого АТР [8]. Аденин в продуктах лиофилизации был идентифицирован ультрафиолетовой спектроскопией при 260 нм [8].

### III. УСЛОВИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АТР НА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ КЛЕТОК–МИШЕНЕЙ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ РОСТА И ЦИТОКИНОВ

На сегодняшний день доказано, что в ПМ всех типов животных и растительных клеток присутствует поперечно–ориентированная, цианиднечувствительная NADH–специфичная протонофорная редокс–система [65–68]. Эта трансплазмалеммальная редокс–система осуществляет перенос электронов и протонов от внутриклеточного цитозольного NADH (NADPH) на непроницающие наружные железосодержащие редокс–акцепторы, такие как феррицианид, дифтери–трансферрин, цитохром *c* [66–68, 125], а также на несодержащие железо природные редокс–акцепторы, такие как кислород [129] и свободный радикал аскорбиновой кислоты [131]. Активность этой трансмембранной протонофорной поперечно–ориентированной к плоскости мембраны редокс–системы ассоциируется с контролем роста клеток [66, 67, 125]. Схема общей топографии NADH(P)H–редокс систем ПМ представлена в работе Крейна [68].

Инсулин и РФ стимулируют вышеупомянутую трансплазмембранную электрон–транспортную редокс–систему, сопряженно функционирующую с NADH–оксидазой и с рецепторами РФ [58, 129, 171].

В ПМ всех типов животных клеток присутствует также Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>–АТРаза (в некоторых тканях Na<sup>+</sup>–АТРаза), которые служат генераторами электрохимического трансмембранного потенциала ионов Na<sup>+</sup> —  $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$  [160]. Эти два вышеназванных элемента ПМ — трансплазмембранная NADH–специфичная протонофорная редокс–система и Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>–АТРаза могут функционировать сопряженно в процессе биосинтеза АТР под действием РФ и цитокинов [10, 12, 19].

Величина синтезированного АТФ в вышеупомянутой системе окислительного фосфорилирования на ПМ составляла от 1 до 100 нмоль на 1 мг белка за первую минуту инкубации (в зависимости от типа клетки и природы РФ). Таким образом, всплеск аэробного синтеза АТФ осуществлялся сигналстимулируемым путем клеточными фрагментами, обогащенными плазматическими мембранами в ходе аэробного окислительного процесса, сопряженного с переносом электронов и транспортом ионов [8, 10, 25]. С позиции биоэнергетики такая реакция синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата всегда связана с оксидазной активностью мембран. Стимулируемое инсулином и другими РФ образование АТФ посредством ОПМЧ наблюдалось только в атмосфере кислорода. Если кислород заменяли 100% атмосферой азота или аргона, эффект влияния инсулина на синтез АТФ терялся. По-видимому, это означает, что редокс-цепи ПМ, содержащие системы цианиднечувствительного окисления NADH кислородом [58, 68, 129], ответственны за образование короткоживущего плазмемембранного сигнального АТФ, синтез которого сопряжен с переносом электронов и протонов от NADH и движением  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ионов [28, 101].

Для доказательства образования АТФ именно на ПМ клеток мы использовали фрагменты эритроцитарных ПМ — теней, изолированных из красных кровяных клеток человека [5, 12, 31]. Эритроциты человека лишены внутриклеточных мембран, которые все же в небольшом проценте присутствуют во фракции даже высокоочищенных ПМ многих типов клеток [114]. Эритроциты человека имеют единственную ПМ, которая обладает всеми интегральными свойствами плазматических мембран животных клеток [57]. В ПМ эритроцитов человека присутствуют инсулиновые рецепторы [80, 91] и содержатся окислительно-восстановительные ферменты (оксидоредуктазы), которые стимулируются инсулином и другими ростстимулирующими полипептидными факторами [44, 64, 66, 68, 86, 112, 125, 191].

Инсулинстимулируемое образование короткоживущего сигналтранслирующего АТФ мы подтвердили с помощью включения радиоактивно меченного фосфата [ $^{32}\text{P}$ ] в [ $^{32}\text{P}$ ]АТФ в плазмемембранных фрагментах, изолированных из эритроцитов человека и инкубируемых в аэробных условиях в упомянутой выше среде [31, 102].

Данные, касающиеся изучения температурной зависимости инсулинстимулируемого образования АТФ препаратом ПМ эритроцитов человека и препаратами ОПМЧ из других тканей — мишеней, показали, что максимальная величина образования АТФ наблюдается при 30 °С [10, 31].



В отсутствии в инкубационной среде непроникающих наружных железосодержащих переносчиков электронов синтеза АТФ на ПМ в ответ на действие факторов роста не наблюдается [31, 85]. Было установлено, что для синтеза плазмамембранного сигнального АТФ необходимо присутствие в инкубационной среде таких электронных акцепторов как цитохром *c* или диферри–трансферрин. Цитохром *c* является водорастворимым электронным акцептором, присутствующим в митохондриях, а диферри–трансферрин — природный наружный акцептор электронов, присутствующий в ПМ многих типов клеток [125]. Восстановление наружного диферри–трансферрина сопровождается окислением внутреннего цитоплазматического NADH, что доказывает трансплазмалеммальную природу переноса электронов при стимуляции клеточного роста [125]. Клеточный рост стимулируется посредством диферри–трансферрина и других непроникающих окислителей, которые могут реагировать с диферри–трансферрин–редуктазой [125]. При замене цитохрома *c* на физиологический для наружной поверхности ПМ акцептор электронов диферри–трансферрин, эффект биосинтеза плазмамембранного сигнального АТФ в ответ на РФ полностью сохраняется и даже превосходит цитохром *c* по АТФ–образующей активности [85].

Итак, перенос электронов от NADH на кислород при участии наружных непроникающих железосодержащих аутооксидабельных переносчиков электронов, сопряженный с синтезом АТФ на ПМ животных клеток–мишеней, оказался вовлеченным в фундаментальный аспект жизни клетки — передачу и усиление информационных сигналов к клеточному росту, пролиферации, хемотаксису, апоптозу, адгезии.

Данные, касающиеся условий образования сигналтрандуцирующего АТФ, аэробного, а не гликолитического пути его синтеза, были подробно рассмотрены нами ранее в ряде обзоров и статей [8, 10, 12, 14, 17, 19].

Плазмамембранная природа аэробного синтеза АТФ необычна и кажется невероятной. Ведь до сих пор подобный синтез был присущ митохондриальным мембранам, мембранам хлоропластов растений и фотосинтезирующих бактерий. В ПМ животных клеток подобный синтез АТФ не наблюдали.

Необходимость целостности ПМ клеток–мишеней для проявления стимулированного РФ и цитокинами накопления АТФ подразумевает, что синтез подобного АТФ не связан с реакциями субстратного фосфорилирования (гликолиз). Факт непричастности плазмамембранной аденилаткиназы к синтезу АТФ на ПМ был

установлен нами в экспериментах с присутствием в инкубационной среде специфического ингибитора аденилаткиназы —  $P^1, P^5$ -диаденозинпентафосфата (DAPP), а также удалением из среды всех компонентов, кроме ADP и FSBA [85]. Объектом экспериментов служили ОПМЧ, изолированные из Т-лимфоцитов человека, активированных таким цитокином как hTNF $\alpha$ . Результаты этих экспериментов показали, что наличие в инкубационной среде только ADP, субстрата аденилаткиназы недостаточно для получения эффекта биосинтеза АТР на ПМ, тогда как присутствие в полной инкубационной системе DAPP в концентрациях достаточных для полного ингибирования аденилаткиназы, не подавляло hTNF $\alpha$ -стимулируемый биосинтез АТР (рис. 1) [85]. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что аденилаткиназа не причастна к биосинтезу плазматембранного сигнального АТР, а лишь создает некоторый базальный уровень АТР.

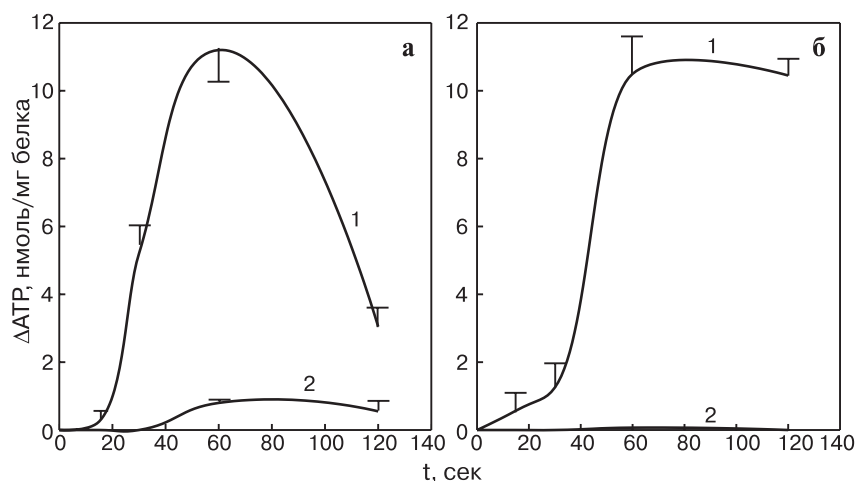


Рис. 1. Биосинтез плазматембранного АТР в стимулированных hTNF $\alpha$  Т-лимфоцитах человека в зависимости от состава инкубационной среды.

а — без DAPP; б — в присутствии 17,6 мкМ DAPP.

1 — полная инкубационная система; 2 — в среде только ADP и FSBA.

Вопрос о биологической целесообразности образования АТР на ПМ клеток-мишеней долгое время оставался открытым. Нами было высказано предположение об участии этого АТР в трансмембранном переносе сигналов к росту, пролиферации, дифференцировке и

онкогенной трансформации клеток [19, 16, 103]. Однако вряд ли мы имели основание называть данный тип АТФ сигналпередающим или сигналтрансдуцирующим до тех пор, пока нами не будет установлена связь образования его на ПМ с проведением пролиферативного стимула в ядро клетки (до стадии экспрессии *c-myc* онкогена) [85]. Мы рассуждали так. Если действительно непосредственно мембранные сигналтрансдуцирующие процессы, происходящие на ПМ клеток при передаче сигналов к клеточному росту ассоциируются с активацией транскрипции ядерного гена *c-myc*, то вслед за синтезом АТФ на ПМ уже через 15–30–60–120 мин должно быть увеличение уровня мРНК ядерного онкогена *c-myc*. И, что особенно важно, блокирование синтеза АТФ на ПМ, например, с помощью противоопухолевого антибиотика адриамицина, теоретически должно сопровождаться через 30, 60, 120 мин подавлением синтеза мРНК *c-myc*. Ростовым факторам, а точнее цитокином, в наших экспериментах служили рекомбинантные человеческий и мышинный TNF $\alpha$  (hTNF $\alpha$ , mTNF $\alpha$ ), которые стимулируют рост и пролиферацию клеток печени [148, 156], клеток кишечника, легкого и кожи человека [167], фибробластов [178].

Известно также, что TNF $\alpha$  вызывает кратковременную индукцию ядерного онкогена *c-myc* в ряде клеток, что связано со стимуляцией пролиферации [111]. Анализ экспрессии ядерного гена *c-myc* в цельных гепатоцитах крысы показал, что TNF $\alpha$  человека и мыши вызывают накопление мРНК *c-myc* онкогена в клетках печени крысы в течение 2 часов [85]. Уровень накопления АТФ на ПМ печени крысы, индуцированный hTNF $\alpha$  и mTNF $\alpha$ , показывает, что TNF $\alpha$  человека (hTNF $\alpha$ ) вызывает более активную стимуляцию накопления АТФ по сравнению с мышинными TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ), что совпадает с более выраженной степенью экспрессии ядерного онкогена *c-myc* [85]. Противоопухолевый антибиотик адриамицин, блокирующий синтез АТФ на ПМ, полностью ингибирует экспрессию гена *c-myc*, которая индуцируется обоими типами TNF $\alpha$  [85]. Поэтому, мы полагаем, что один из главных вопросов о связи всплеска аэробного синтеза АТФ на ПМ клеток под влиянием РФ и цитокинов с внутриклеточной эффекторной ядерной функцией, обуславливающей рост и пролиферацию клеток, следует рассматривать в контексте сигналпередающей роли АТФ.

Известно, что продукт онкогена *c-myc* белок индуцирует транскрипцию клеточных генов, играющих важнейшую роль в пролиферации клеток и, вероятно, в способности клеток к неограниченному размножению [184]. Возможность продемонстрировать блокирование TNF $\alpha$ -стимулируемого синтеза АТФ препаратами

ОПМЧ из клеток печени, инкубированными с адриамицином, с ингибированием синтеза мРНК ядерного онкогена *c-myc*, действительно предполагает связь накопления этого АТР на ПМ в ранние сроки действия TNF $\alpha$  с активацией транскрипции ядерного онкогена *c-myc* [85].

К 1998г явление всплеска аэробного синтеза АТР на ПМ животных клеток нами обнаружено на 25 тканях—мишенях при действии 18 полипептидных факторов роста, рецепторы которых содержат интегральные или периферические мембраносвязанные цитозольные тирозиновые киназы [103, 104].

Перечень полипептидных ростовых гормонов, факторов роста, митогенов, цитокинов, онкобелков, стимуляторов пролиферации иммунокомпетентных клеток и адгезии, вызывающих образование короткоживущего плазматембранного сигналтрансдуцирующего АТР препаратами ОПМЧ, изолированными из различных тканей и клеток—мишеней, приведены в таблице 1.

Из таблицы видно, что образование короткоживущего плазматембранного сигналтрансдуцирующего АТР давали, главным образом, те ростовые гормоны, митогены, стимуляторы клеточной пролиферации, хемотаксиса, адгезии, чьи рецепторы представляют из себя интегральные рецепторные тирозинкиназы (инсулин, EGF, PDGF, VEGF и другие). Равным образом, генерацию АТР на ПМ вызывали те РФ и цитокины, взаимодействия которых со специфическими рецепторами на поверхности клеточных мембран, вызывает транслокацию к ПМ цитозольных тирозинкиназ и связывание (IL-2, Con A, FMLP, TNF $\alpha$  и другие). Быстрая нековалентная ассоциация таких цитозольных тирозинкиназ с ПМ весьма существенна для проведения многих митогенных и хемотаксических сигналов [16, 29].

В результате изучения действия РФ, митогенов, цитокинов, стимуляторов хемотаксиса и адгезии, чьи рецепторы на ПМ содержат интегральные или ассоциируемые с ПМ цитозольные тирозинкиназы, нами была сформулирована концепция синтеза короткоживущего плазматембранного сигналтрансдуцирующего АТР, как передатчика и усилителя передачи митогенных сигналов к росту и делению клеток [10, 12, 14, 17, 19].

На рис. 2 показана схема, отражающая суть концепции и суммирующая вышеизложенные данные.

Связывание различных внеклеточных пептидных РФ, цитокинов, сигналов хемотаксиса и адгезии со своими высокоспецифическими рецепторами на ПМ клетки приводит к синтезу единой молекулы — короткоживущего сигналтрансдуцирующего АТР.

Таблица 1  
**Накопление АТФ препаратами обогащенных  
 плазматическими мембранами частиц (ОПМЧ),  
 изолированных из различных клеток-мишеней  
 под воздействием полипептидных факторов роста,  
 митогенов, цитокинов и онкопротеинов**

Полипептидный фактор роста	Ткани и клетки-мишени	$\Delta$ АТФ нмоль мг белка за 1-ю мин	Физиологический ответ, функция	Ссылка
1	2	3	4	5
Инсулин	Жировая ткань крысы	4,0	Рост клеток в культуре, транспорт сахаров, аминокислот, синтез белка, липогенез	10, 12, 13, 31
	Скелетные мышцы крысы	0,4		
	Печень крысы	0,04		
	Эритроциты человека	0,3		
	Плацента человека	8,3		
	Сердце быка	0,3		
	Лимфоциты крысы	0,2		
Нейроглия из мозга крыс	2,2			
FMLP	Перитонеальные полиморфно-ядерные лейкоциты морской свинки	1,5	Хемотаксис, фагоцитоз, высвобождение лизосомальных ферментов	3, 22
	Нейтрофилы человека	16,6		
Конканавалин А	Скелетные мышцы крысы	0,1	Стимуляция митогенеза, подражает эффектам инсулина	12
GH	Жировая ткань крысы	2,6	Рост многих тканей, мобилизация липидов из депо, транспорт сахаров	31
	Скелетные мышцы крысы (после гипофизэктомии крыс)	0,3		
EGF	Плацента человека	7,5	Стимуляция клеточной пролиферации, митогенной активности многих типов клеток	1, 33, 37
	Печень человека	17,9*		
Пролактин	Молочная железа кролика	1,2	Стимуляция синтеза ДНК, инициация лактации	32
IgE	Тучные клетки крысы	6,3	Секреция гистамина	н/д <sup>1</sup>
IL-2	T-лимфоциты из тимуса крысы	4,6	Стимуляция пролиферации T-и киллерной активности	27
	T-лимфоциты периферической крови человека	2,7		
$\alpha$ -тромбин	Фибробласты из бычьих выйных связок	1,8	Митогенез	19, 30
	Тромбоциты человека	1,2	Секреция серотонина	
	Спленоциты из селезенки мыши	6,1	Митогенез	
Тиреотропный рилинг-гормон	Передняя доля гипофиза быка	0,2— 11,6	Рост клеток GH3-типа в культуре, высвобождение соматотропина	35

Продолжение табл. см. сл. стр.

Окончание табл. 1.

1	2	3	4	5
GM-CSF мышь; GM-CSF человека	Макрофаги из перитоне- ального экссудата мышей линии СЗН	7,8 27,5	Рост, пролиферация и дифференцировка макрофагов, рост и переживание макрофа- гов в культуре	29
"Легкие" фрагменты фибронектина	Фибробласты из бычьих выйных связок	0,5	Стимуляция роста фиброблас- тов, хемотаксис, рост фибро- бластов в культуре	н/д <sup>2</sup>
PDGF	Фибробласты из бычьих выйных связок. Клетки лейомиосаркомы человека	1,5 7,6	Стимуляция пролиферации, митогенеза мезенхимальных клеток, фибробластов, глад- комышечных клеток, клеток глии, хондроцитов. Хемотаксис фибробластов.	н/д <sup>3</sup>
VEGF	Клетки эндотелия аорты быка Клетки гемангиомы человека из подкож- но-жировой ткани Клетки гемангиомы печени человека	15,6 21,6 11,2*	Стимуляция роста клеток эндотелия, роста сосудов, ангиогенез, миграция клеток эндотелия, рост солидных опухолей	1, 2, 23
Фактор размноже- ния клеток MSA	Клетки печени крысы Клетки печени человека	15,6* 7,1*	Стимуляция синтеза ДНК. Стимуляция роста клеток пе- чени, в том числе в клеточной культуре.	1, 20
Фактор роста пече- ни крысы и фактор роста клеток гепатомы крысы GHL	Клетки печени крысы Клетки печени человека	130,6* 0*	Стимуляция роста клеток пе- чени крысы, стимуляция син- теза РНК и ДНК в гепатоци- тах крысы	1, 20
hTNF $\alpha$ че- ловеческий mTNF $\alpha$ мышинный	Клетки печени крысы Клетки печени человека Спленоциты из селезенки мышь линии С57BL/6	3,5* 30,3* 4,6*	Стимуляция роста, дифферен- цировки, адгезии клеток, изо- лированных из печени, жиро- вой, мышечной ткани, гастри- интестинального тракта, ЦНС. Промоция роста фибробластов человека, ПМЯЛ, остеокластов.	1 34
Онкобелок — $\alpha$ -фетопро- теин AFP	T-лимфоциты из перифе- рической крови человека Клетки печени крысы	2,2* 14,5*	Стимуляция роста клеток, кле- точной пролиферации, стиму- ляция регенераторных процес- сов и процесса канцерогенеза.	

Примечание: АТР определяли спектрофлуориметрическим методом.

\* АТР определен биолюминесцентным люциферин-люциферазным методом.

н/д<sup>1-3</sup> — неопубликованные данные: <sup>(1)</sup> Карелин А.А., Писаржевский С.А.;

<sup>(2)</sup> Карелин А.А., Златопольский А.Д., Зайденберг М.А., Зайцева Н.В. и

<sup>(3)</sup> Карелин А.А., Глоба А.Г.

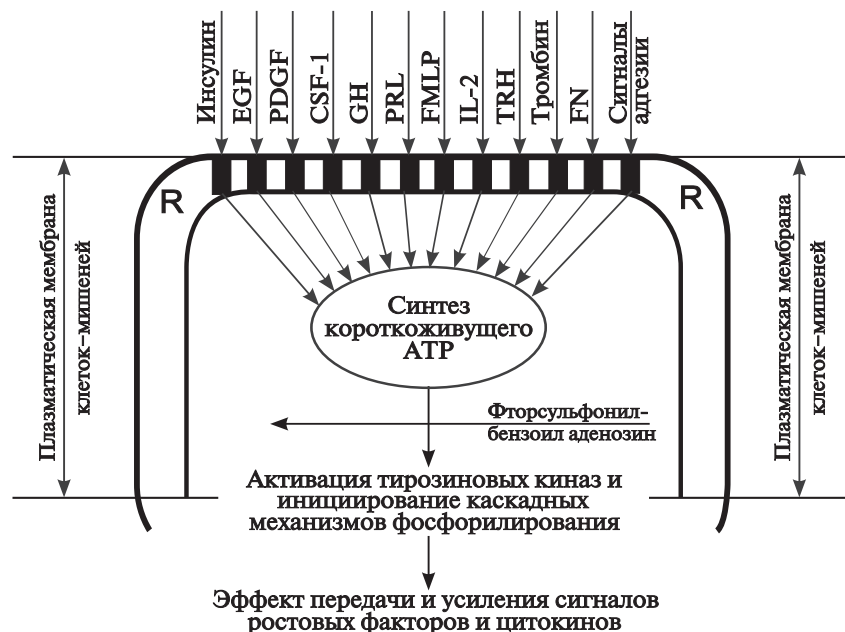


Рис. 2. Гипотетическая схема регуляции трансмиссии и усиления сигналов ростовых факторов и цитокинов; сигнальный АТФ как передатчик и усилитель сигналов к росту клеток и клеточной пролиферации.

На рис. 2 видно, что АТФ является связующим звеном между лиганд–рецепторным комплексом и эффекторным элементом ПМ — протеин(тирозин)–киназами. Таким образом, трансмембранный перенос (трансдукция) сигнальной информации к росту и делению клеток от различных ростовых факторов и цитокинов осуществляется через АТФ–опосредуемую реакцию фосфорилирования с участием тирозинкиназ. Обнаруженный эффект накопления АТФ на ПМ клеток–мишеней (в присутствии АТФ–аналога FSBA и ионов  $\text{Na}^+$ ) в ответ на опосредуемый рецептором ростовой фактор, отражает не только специфический, но и общий феномен пострецепторной активации тирозиновых киназ и, следовательно, усиления сигналов различных полипептидных РФ. Этот АТФ, таким образом, выполняет роль второго мембранного мессенджера или некоего сигнального интермедиата [10, 12, 13, 15, 16, 18], или некоего биотрансдьюсера, энергетически опосредующего контролируруемую рецептором передачу сигналов РФ. Предполагается, что плазма-

мембранный сигнальный АТР может функционировать в качестве общего посредника в каскадном механизме активации ряда киназ. Этот механизм запускается через активацию рецепторзависимых тирозинкиназ [26].

Насколько специфичен описанный выше феномен образования сигналтрандуцирующего АТР из ADP и  $P_i$  в мембранной фракции частиц под действием гормонов и факторов роста? Оказалось, что гормоны, которые связываются со своими рецепторами на клеточной поверхности и, активируя аденилатциклазу, вызывают образование сАМР (адреналин, глюкагон, окситоцин) или гормоны, которые действуют через гуанилатциклазу (АНР — атриальный натрийуретический пептид), не приводили к накоплению сигналтрандуцирующего АТР препаратами мембранной фракции частиц клеток—мишеней. Небольшой всплеск аэробного синтеза АТР наблюдался лишь при действии АСТН (кортикотропина) *in vitro* на ОПМЧ, изолированные из клеток коры надпочечников крупного рогатого скота. Это, скорее всего, можно объяснить тем, что АСТН, помимо активации мембраносвязанной аденилатциклазы и активации синтеза кортикостероидов, стимулирует также рост клеток коры надпочечников [162].

#### ПЛАЗМАМЕМБРАНЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ АТР: РОЛЬ В УСИЛЕНИИ СИГНАЛОВ, ВОСПРИНИМАЕМЫХ РЕЦЕПТОРАМИ РФ

Для рецепторов многих биологически активных регуляторов (и лекарственных веществ) должна существовать некая система усиления полученного внеклеточного сигнала. В большинстве биологических систем реакции, доставляющие энергию при окислении питательных веществ или при извлечении ее из кванта света, приводят к синтезу АТР [161]. Энергия высокоэнергетических связей АТР может использоваться клеткой для проведения нервного импульса, мышечного сокращения, синтеза белков, транспорта ионов и т.п. Но может ли АТР, как донор свободной энергии использоваться для усиления передаваемого внешнего сигнала в клетку? Преобразование сигнала по своей природе сходно с преобразованием и использованием энергии [10, 176]. Примеры соответствующих процессов могут включать в себя поглощение энергии, необходимой для восприятия сигнала, переработки сигнальной информации и, наконец, передачи энергии на сигнальные трансмиттеры [176]. Как оказалось, процесс трансмембранной передачи сигнала внутрь клетки требует затрат энергии в виде АТР [10, 12, 17, 19, 51]. Клетка должна тратить энергию для того, чтобы дать возможность сигнальным системам не только быстро отвечать



на внешние сигналы, но и уметь сверх этого поддерживать чувствительность к этим сигналам на возможно более продолжительный период времени [51].

По образному выражению Мооре [128]: «Мембрану клетки можно сравнить с духовым музыкальным инструментом — трубой или рогом: для того чтобы вызвать звук, то есть опосредовать или усилить эффект звучания передаваемого сигнала, систему нужно энергизовать вдуванием воздуха».

#### **IV. РОЛЬ СИГНАЛТРАНСДУЦИРУЮЩЕГО АТФ В АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНОВЫХ КИНАЗ ДЛЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И ЦИТОКИНОВ**

**ЗАЧЕМ НУЖНО ОБРАЗОВАНИЕ АТФ НА ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЕ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ В ОТВЕТ НА ОПОСРЕДУЕМЫЕ РЕЦЕПТОРАМИ МИТОГЕННЫЕ СТИМУЛЫ К РОСТУ И ДЕЛЕНИЮ КЛЕТОК?**

Говоря о регуляции энергетического обмена в клетке, Рэкер [142] заметил: «Основной принцип контроля, управляющий как гликолизом, так и окислением, гениально прост: АТФ синтезируется только тогда, когда он необходим». Быстрый, в течение 1—2 мин инкубации синтез АТФ на ПМ животной клетки в ответ на действие инсулина и РФ был обнаружен в среде, содержащей все натуральные компоненты аэробного фосфорилирования.

На сегодняшний день твердо установлено, что вызванная РФ и цитокинами активация тирозиновых киназ связана с их рецепторной олигомеризацией или кластерообразованием на ПМ [150, 151, 153]. Олигомеризация (димеризация) или олигогетеродимеризация рецепторов для РФ является необходимой при связывании факторов роста [177]. Связывание лиганда и последующее конформационное изменение внеклеточного домена рецептора вызывают рецепторную олигомеризацию, которая стабилизирует взаимодействие между примыкающими каталитическими цитоплазмическими доменами тирозиновых киназ. Олигомеризация рецепторов РФ является универсальным феноменом, что показано на живых клетках, а также на солюбилизованных и очищенных рецепторах для РФ [187].

Индукционное пептидным лигандом увеличение латеральной диффузии рецепторов на ПМ влечет за собой взаимодействие их с соседними мембранными молекулами, включая редокс-ферменты ПМ и некую АТФазу, что может играть ключевую роль в первых стадиях трансмембранной передачи сигнала [149]. Иными словами, речь идет о синтезе АТФ в определенном компартменте ПМ в

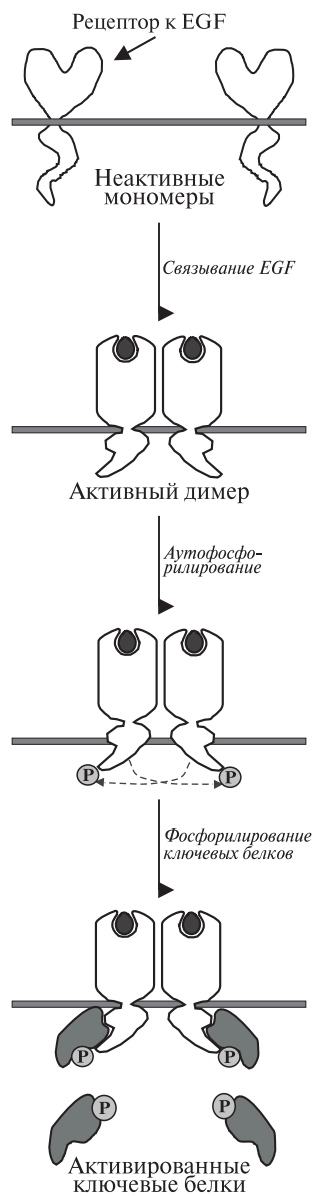


Рис. 3. Молекулярные стадии активации рецепторной тирозинкиназы для EGF [153].

результате сопряжения NADH–оксиданной и АТФазной систем, что вызвано рецепторзависимой передачей сигналов РФ [19]. Этот АТФ быстро переносит свой  $\gamma$ -фосфат, вероятнее всего на рецепторную тирозинкиназу, в результате чего она, аутофосфорилируясь, становится активной. Олигомеризация рецепторных тирозинкиназ для РФ является ответственной как за аутофосфорилирование тирозиновых остатков внутри каталитического домена RTK, так и за активацию внутренне присущей рецептору тирозинкиназной активности [120].

Связывание, например, EGF с внеклеточным доменом рецептора вызывает рецепторную димеризацию и влечет за собой аутофосфорилирование рецепторного каталитического домена, идущего по межмолекулярному механизму (рис. 3). Аутофосфорилирование усиливает способность рецептора фосфорилировать другие белки–мишени сигнального каскада (рис. 3). Как видно из рис. 3, фосфорилированные тирозиновые остатки (фосфотирозины) служат «докинг–центрами» (от англ. dock — пристань) для так называемых Src–гомологичных доменов (SH2–доменов) внутриклеточных сигнальных белков, таких как Src–киназа, PLC- $\gamma$ , GAP, Grb2 и другие [120, 164]. SH2 домены, содержащие около 100 остатков гомологичной аминокислотной последовательности, присоединяются к активированным рецепторным тирозинкиназам РФ с образованием надмолекулярной структуры. Следует подчеркнуть, что димеризация рецепторов на ПМ является необходимой, но недостаточной для активации рецепторных тирозиновых киназ РФ [166]. Необходим некий активатор в виде АТФ, который бы

играл роль триггера, «включателя», спускового крючка, запускающего каскад фосфорилирования, идущий вниз клетки (downstream) по направлению к ядру, где происходит экспрессия факторов транскрипции [19, 85].

Сторонники «безмессенджерowego» пути передачи митогенных сигналов к росту клеток, признающие передачу сигналов лишь за счет конформационных изменений рецепторных цитоплазматических доменов тирозинкиназ, к сожалению, игнорируют функциональное значение образования димеров и кластеров на ПМ для мембранных рецепторов РФ. Поскольку два рецептора (димер) одного и того же семейства РФ имеют больше участков (сайтов) тирозинспецифического фосфорилирования [120], то дополнительный синтез АТФ на ПМ и, следовательно, больший масштаб фосфорилирования (аутофосфорилирования) цитоплазматических доменов рецепторных тирозинкиназ должен приводить к более активному узнаванию, ассоциации и связыванию с рецептором Src-гомологичных доменов SH2 доменов сигнальных белков, чем при активации фосфорилированием только одного мономера-рецептора. Этим, вероятно, определяется целесообразность образования на ПМ сигналтрансдуцирующего АТФ в ответ на действие РФ.

Итак быстрое тирозинспецифическое аутофосфорилирование необходимо для активации рецепторных тирозинкиназ для многих РФ. Максимальное рецепторное фосфорилирование обнаружено через 1 мин после инъекции гормона (фактора роста — пролактина) [183].

Время начала тирозинспецифического фосфорилирования белков на ПМ, вызываемого добавлением РФ, таких как PDGF, EGF, CSF1, к клеткам-мишеням, составляет 1—2 мин [61, 71—73, 97, 138]. Этот период времени вполне сопоставим со временем быстрого синтеза на ПМ клетки короткоживущего сигналтрансдуцирующего АТФ. Поэтому быстро синтезируемый АТФ, образующийся на ПМ клетки-мишени во время или перед началом тирозинспецифического фосфорилирования (аутофосфорилирования), вполне может быть посредником, переносящим сигнальную информацию к клеточному росту от внеклеточного домена рецептора на АТФ-связывающий центр тирозинкиназного домена, находящийся на цитозольной стороне плазмалеммы.

#### ВЗАИМОВЛИЯНИЕ (CROSS-TALK) СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АТФ-АКТИВИРОВАННЫХ RTK ДЛЯ РФ С PLC

В работах [16, 18] были представлены данные литературы о возможности фосфорилирования с помощью АТФ-активированных тирозинкиназ для РФ ключевых сигнальных мембранных фермен-

тов (PLC- $\gamma$ ), генерирующих вторичные мессенджеры. Инсулин, EGF, IGF-1, M-CSF, PDGF, GM-CSF, PDGF не вызывают расщепления PtdIns 4,5P<sub>2</sub>. Однако все они активируют RTK и вызывают продукцию плазматического мембранного сигналтрандуцирующего АТР. Продукт ферментативного гидролиза PtdIns 4,5P<sub>2</sub> диацилглицерин (ДГ) — активатор PKC имеет мимолетный период жизни на мембране клетки, как и сигналтрандуцирующий АТР (около 1 мин). PKC также проявляет свою активность в клетке только в течение очень короткого периода времени [132, 133, 135]. В то же время последствия активации этого фермента для функций клетки, ее роста и трансформации необычайно стойки [107]. Приблизительно такой же период времени активации наблюдался для изоформ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) протеинкиназы В (PKB) в чувствительных к инсулину тканях (скелетные мышцы, клетки L6-миотубул, адипоциты). Упомянутый фермент PKB вовлекается в регуляцию таких физиологических процессов, как метаболизм гликогена и апоптоз [181]. Результаты показали, что каждая из изоформ PKB ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) может активироваться инсулином со сходной кинетикой: 1–2 мин для скелетных мышц и клеток L6-миотубул; 5 мин для адипоцитов [181]. Можно предположить, что пролонгирующая, поддерживающая или усиливающая активация регуляторных белков, таких как PKC, PKB, вызванная инсулином или вышеперечисленными РФ, осуществляется через механизм тирозинспецифического фосфорилирования с помощью АТР-активированных RTK. Иными словами, после генерации на ПМ сигнального АТР последний используется скорее для самофосфорилирования RTK, а затем RTK, будучи активированной, фосфорилируют PLC- $\gamma$  ключевой фермент фосфоинозитидного пути регуляции. В результате активации PLC- $\gamma$  в цитозоль выделяется инозитолтрифосфат (Ins1,4,5P<sub>3</sub>), мобилизующий Ca<sup>2+</sup>. ДГ остается в мембране и активирует PKC. К настоящему времени эта гипотеза хорошо согласуется с рядом работ, выполненных на некоторых клетках с такими РФ, как инсулин, EGF, PDGF, CSF-1 [137, 155, 179–181].

Известно, что в молекуле эфиров форбола, вызывающих образование опухолей, присутствует структура, очень похожая на ДГ [132, 135]. Опухолевый промотор форболовый эфир и РФ обычно действуют согласованно и синергически усиливают пролиферацию клеток и онкогенез [135]. Действительно, имеется некое синергическое действие PKC и тирозинспецифической протеинкиназы [135]. В свете сказанного выше об активации PLC- $\gamma$  с помощью RTK такое синергическое действие двух путей регуляции, кажется, становится понятным. РФ, например EGF, вызывает образование на

ПМ клеток сигнального АТФ. Последний активирует рецепторную тирозинкиназу (RTK). АТФ-активированная RTK может усиливать тирозинспецифическое фосфорилирование PLC- $\gamma$  и этим вызывать ее активацию, по крайней мере, в некоторых типах клетки. В свою очередь, активированная PLC- $\gamma$  генерирует образование ДГ на мембране и содействует мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. ДГ и  $\text{Ca}^{2+}$  потенцируют активацию PKC- $\gamma$ , вызванную эфирами фторбола.

**АТФ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЦЕНТР КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА RTK  
АБСОЛЮТНО НЕОБХОДИМ ДЛЯ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ПЕРЕДАЧИ  
СИГНАЛА РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ**

На рис. 4 представлены схема топологии структуры рецепторной тирозинкиназы для РФ и особенности укладки ее полипептидной цепи. Видны два домена, содержащих  $\alpha$ -спиральную структуру и  $2\beta$ -домена, содержащих складчатую структуру (показано стрелками). Каталитический домен содержит АТФ-связывающий центр, который играет главную роль в активации тирозинкиназ посредством фосфорилирования (аутофосфорилирования) [152]. Над ним сверху справа изображена претерпевающая конформационное изменение каталитическая нуклеотид-связывающая петля [152].

На сегодняшний день твердо установлено, что АТФ-связывающий центр RTK (см. рис. 4) абсолютно необходим для трансмембранной передачи сигналов РФ и для индуцирования как ранних, так и отсроченных ответов клеток, включая митогенез и трансформацию [177].

Добавление к нашей инкубационной среде FSBA, аналога АТФ, специфически протечивающего АТФ-связывающий центр рецепторной тирозинкиназы, например, для рецептора EGF [59], а также для многих других факторов

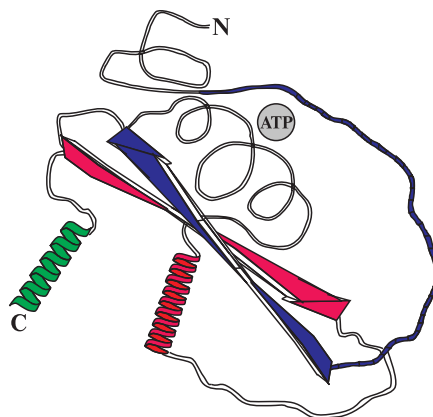


Рис. 4. Схема топологии структуры рецепторной тирозинкиназы для ростовых факторов. Особенности укладки полипептидной цепи.

Показаны N- и C-концевые участки молекулы. Видны два домена, содержащие  $\alpha$ -спиральную и  $\beta$ -складчатую структуру (стрелки). Каталитический домен содержит АТФ-связывающий центр, который играет главную роль в активации тирозинкиназ [152].

роста [102, 105], приводит к резко выраженному накоплению плазмемембранного сигналтрандуцирующего АТР.

Структура FSBA подобна структуре АТР. Тирозинкиназа, «обманутая» структурным сходством, атакует FSBA вместо АТР и в результате именно FSBA, а не АТР попадает в АТР-связывающий центр фермента и, как конечный результат, АТР накапливается в среде [22, 102]. Сигнальный АТР был выявлен и надежно определен именно благодаря этому ингибитору [105].

АТР-связывающий центр был продемонстрирован в рецепторных тирозинкиназах для многих факторов роста [177, 185, 188]. Было показано, что аутофосфорилирование инсулинового рецептора ведет к активации с помощью АТР рецепторной и тирозинкиназы, заключенной в  $\beta$ -субъединице инсулинового рецептора [69, 70, 146, 189], в рецепторе инсулиноподобного фактора роста-1 [147], фактора роста эпидермиса [52, 81], фактора роста из бычьего мозга [94], фактора роста тромбоцитов [73, 74], человеческого колоние-стимулирующего фактора гранулоцитов и моноцитов [99], фактора роста гепатоцитов [1]. АТР как мембранный посредник генерируется на ПМ клетки под действием всех перечисленных выше РФ и цитокинов в величинах от 1 до 100 нмоль/мг белка за первую минуту инкубации. Следовательно, все рецепторные тирозинкиназы используют скорее один и тот же обязательный механизм активации. АТР-связывающий центр рецепторных тирозиновых киназ для РФ специфически блокируется FSBA в концентрации 1–2 мМ [12, 59, 78, 87]. Следствием конкурентного ингибирования АТР-связывающего центра рецепторных тирозиновых киназ с помощью FSBA является резкое увеличение продукции плазмемембранного сигналтрандуцирующего АТР в ответ на действие многих РФ и цитокинов [12, 13, 19, 102, 105]. Это предполагает, что АТР является активатором тирозинкиназ для РФ и что самофосфорилирование участков молекул тирозинкиназ по остаткам тирозина является альтернативным субстратным фосфорилированием. Способность таких конкурирующих с АТР ингибиторов как FSBA связываться с высоким сродством с АТР-связывающим центром каталитического домена многих киназ, в том числе тирозиновых, предполагает, что АТР является общим активатором или общим кофактором многих киназ [54, 63, 105].

Наше доказательство необходимости локального синтеза АТР на ПМ для активации рецепторных тирозинкиназ подтверждается также сообщениями литературы о неоднородности распределения АТР как в клеточных [98], так и во внутримембранных компартментах ПМ [47]. И, наконец, данными о способности молекул

ферментов формировать на мембранных структурах динамические короткоживущие фермент–ферментные комплексы [79, 119, 165], способные прямо передавать синтезируемые интермедиаты, подобные АТФ, от активного центра одного фермента в активный центр другого фермента по эстафетному механизму или по типу канала [39, 165]. Существование межмолекулярных контактов при взаимодействии ферментов в процессе их функционирования на мембране клетки [165] делает правомерным предположение о прямой передаче синтезированного АТФ из активного центра  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в активный центр РТК [19].

Для подтверждения участия плазмемембранного сигнального АТФ в процессе передачи ростового сигнала были проведены эксперименты по ингибированию РТК, первого и главного звена в каскаде реакций фосфорилирования, идущих в направлении к клеточному ядру. Было использовано два ингибитора активности РТК для РФ: структурный аналог тирозина тирфостин–25 и структурный аналог АТФ FSBA (1мкМ). Влияние этих двух ингибиторов на накопление сигнального АТФ в ОПМЧ, изолированных из клеток злокачественной опухоли легкого человека, под действием EGF дало следующий результат. В контроле (без ингибиторов) уровень EGF–стимулируемого накопления АТФ составил 5,4 нмоль/мг белка за 1–ую минуту инкубации. Отмечается значительное повышение EGF–стимулируемого уровня синтеза АТФ в ОПМЧ, изолированных из клеток рака легкого человека в присутствии тирфостина–25 (18,2 нмоль/мг белка). Самый высокий уровень синтеза АТФ в ОПМЧ под действием EGF наблюдался при использовании FSBA — 52,5 нмоль/мг белка за 1–ую минуту инкубации.

При инкубации ОПМЧ с тирфостинами происходит их связывание по остаткам тирозина в белковой глобуле РТК [46, 122]. В этом случае синтезированный под действием EGF аденозин–5′–трифосфат попадает в АТФ–связывающий центр рецепторной тирозинкиназы. Однако  $\gamma$ –фосфат молекулы АТФ из активного центра фермента не может быть перенесен на тирозиновый остаток РТК, так как его место экранировано тирфостинном. В результате тирозинкиназа теряет каталитическую способность к аутофосфорилированию. О механизме ингибирующего действия FSBA сообщено выше.

Нами были проведены также исследования по изучению влияния некоторых РФ и цитокинов на синтез сигнального АТФ препаратами ОПМЧ, изолированными из тканей злокачественных опухолей человека различной локализации (желудок, кишечник, молочная железа, легкое, поджелудочная железа, нервная ткань). Было исследовано влияние нескольких РФ и цитокинов, рецепторы

которых содержат на ПМ интегральные или периферические мембраносвязанные цитозольные тирозинкиназы EGF, FGF, TNF $\alpha$ , IL-2, NGF, AFP, инсулин. Обнаружено, что в ПМ, изолированных из тканей злокачественных опухолей, уровень синтеза сигналтрансдуцирующего АТР значительно превышает таковой в нормальных тканях (данные в печати). Это можно объяснить включением всех резервных возможностей клеток при передаче сигнала к росту в процессе злокачественной трансформации для конкурентного выживания.

Онкобелок  $\alpha$ -фетопротеин (AFP) является большим гликопротеином плазмы крови, синтезируемым в печени эмбрионов и в зародышевом желточном мешке, а также при первичном гепатоцеллюлярном раке у человека [45, 84, 154]. Повышение концентрации в крови AFP отмечено при регенеративных процессах и в процессе канцерогенеза в печени. Определенные типы Т-клеток (Т-лимфоциты) способны узнавать и разрушать раковые клетки и их продукты — антигены. Оказалось, что Т-клетки, имеющие рецепторы к AFP, способны к рецептор-опосредуемому синтезу сигнального АТР. Инкубация препаратов ОПМЧ, изолированных из Т-лимфоцитов в среде, содержащей все компоненты аэробного фосфорилирования и 100 мкг/мл AFP в присутствии 17,6 мкМ DAPP приводила к накоплению 2,55 нмоль/мг белка АТР за первую минуту [34]. Преинкубация образцов ОПМЧ с 10 мкг/мл ФГА приводила к возрастанию количества накопленного АТР до 5,7 нмоль/мг белка за первую минуту инкубации [34].

#### **V. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА СИГНАЛТРАНСДУЦИРУЮЩЕГО АТР НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ**

На сегодняшний день твердо установлено [68, 136, 190], что в ПМ как животных, так и растительных клеток присутствуют NADH-специфичная трансмембранная протонофорная электрон-транспортная редокс-система, которая реагирует снаружи с искусственным непроникающим акцептором электронов феррицианидом. Наружным окислителем, пригодным для восстановления внутреннего NADH, помимо феррицианида, могут служить натуральные акцепторы электронов такие как железосодержащие, трансферрин, цитохром *c*, и, собственно окислитель кислород [62, 169].

Вышеупомянутая трансмембранная (трансплазматическая) редокс-цепь действует как протонный насос: H<sup>+</sup> транспортирует



поперек плазматической мембраны в наружную среду. Она нечувствительна к ингибиторам митохондриальной электрон-транспортной цепи — ротенону, антимицину, цианиду и 2,4-оксихинолин-N-оксиду (НОQNO) [170] и стимулируется протонофорами [68, 168], а также факторами роста, включая факторы роста растений — ауксины [68]. Идея о том, что перенос инсулинового сигнала и других ростовых сигналов через ПМ клетки сопряжен с образованием на ПМ сигналтрансдуцирующего АТФ через механизм  $H^+$ -зависимой редокс-функции плазматической мембраны была впервые сформулирована А.А.Карелиным в 1981 г. [9]. В дальнейшем мы не раз наблюдали феномен усиления протон-транслоцирующего фосфорилирования на ПМ и повышения инсулинстимулируемого синтеза АТФ в присутствии в среде инкубации разобщителя-протонофора FCCP [10, 24, 25, 101].

Равным образом, добавление в инкубационную среду в низкой концентрации (0,3 мкМ)  $Na^+$  — ионофора моненсина, катализирующего  $Na^+/H^+$ -обмен и увеличивающего транспорт протонов в обмен на вход  $Na^+$  в клетку, приводил к повышению накопления АТФ посредством ОПМЧ, изолированных из адипоцитов крысы. Напротив, высокая концентрация моненсина ( $2,8 \cdot 10^{-4}$  М) полностью устраняла стимулирующий эффект [25, 101]. Аналогичный результат по влиянию моненсина на синтез АТФ был получен нами в экспериментах с использованием ОПМЧ, изолированных из тромбоцитов человека, где образование АТФ из ADP и  $P_i$  мы наблюдали под действием  $\alpha$ -тромбина [30].

Для того чтобы доказать роль  $Na^+$  в инсулинстимулируемом биосинтезе АТФ на ПМ, мы провели специальные эксперименты с мембранами эритроцитов — клеток, лишенных, как известно, внутриклеточных мембран и которые, по образному выражению Прессмана [141] являются «созданными самой природой липосомами с единственной мембраной, и без труда получаемыми в больших количествах».

Рис. 5 иллюстрирует уровень биосинтеза плазматического сигналтрансдуцирующего АТФ посредством ПМ эритроцитов человека при различных концентрациях  $Na^+$  в среде.

Видно, что только при концентрации  $Na^+$ , равной 8 мМ, наблюдается биосинтез плазматического сигнального АТФ, а максимальный синтез наблюдается при физиологических концентрациях  $Na^+$  — 140 мМ. Однако, при концентрации, равной 26 мМ удалось получить достоверные результаты с наименьшим разбросом [28].

Открытие роли  $Na^+$  как сопрягающего иона, способного выполнять все биоэнергетические процессы: механический, осмо-

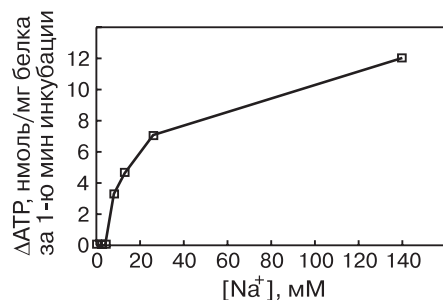


Рис. 5. Уровень биосинтеза плазматического АТФ плазматическими мембранами эритроцитов человека при различных концентрациях  $\text{Na}^+$  в среде [28].

тический, химический — произошло совсем недавно. Эти процессы осуществляются на так называемых «натриевых мембранах» [40, 42]. Плазматическая мембрана животной клетки — эволюционно-молодая «натриевая» клеточная мембрана. Здесь  $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ , создаваемый  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, используется различными переносчиками  $\text{Na}^+$ , метаболит-симпортерами для транспорта внутрь клетки питательных веществ, таких

как аминокислоты, сахара, жирные кислоты и другие соединения [92, 93].

Но может ли  $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$  быть источником энергии не только для совершения осмотической работы, но и для производства химической работы? Как свидетельствуют наши эксперименты, ответ на этот вопрос решается положительно. Быть может, пример с  $\text{Na}^+$ -зависимым синтезом АТФ демонстрирует возможность ПМ животной клетки использовать  $\text{Na}^+$  не только для совершения осмотической работы ( $\text{Na}^+$ , метаболит-симпортеры), но и для производства химической работы — синтеза АТФ.

Данные импульсных экспериментов, полученные нами на цельных живых клетках — адипоцитах крысы, отражают ионные события, совпадающие по времени с инсулинстимулируемым синтезом сигналтрандуцирующего АТФ [25]. Учитывая чрезвычайно большую чувствительность адипоцитов крысы к действию инсулина, мы выбрали этот тип клеток специально для проведения импульсных экспериментов. В опытах с импульсным введением инсулина (100 мкг) вместе с протонофором FCCP (0,1 мкг) в суспензию свежесыведенных адипоцитов мы регистрировали закисление наружной среды [25]. Время изменения значения pH наружной среды после импульсного введения инсулина плюс FCCP в суспензию адипоцитов (3–6 с) соизмеримо со временем транслокации протона через ПМ [25, 28]. После импульсного введения инсулина плюс FCCP в суспензию адипоцитов мы также зарегистрировали вход  $\text{Na}^+$  в клетки из наружной среды. Тот факт, что выход протона в наружную среду может быть сопряжен со встречным движением иона  $\text{Na}^+$  в клетки (антипорт), подтверждают опыты с

$\text{Na}^+$ – ионофором моненсионом. Величина  $\Delta$  АТФ в ОПМЧ из адипоцитов крысы в присутствии моненсина, добавленного в инкубационную смесь (94 мкг/мл) возросла вдвое по сравнению с контролем [25].

Для доказательства того, что вызываемый факторами роста и митогенами входной поток  $\text{Na}^+$  в клетку может быть связан с обращением функционирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ – АТРаза и синтезом АТФ мы провели опыты по влиянию амилорида — блокатора входного потока  $\text{Na}^+$  в клетку [48] на инсулинстимулируемый синтез АТФ изолированными тениями эритроцитов человека. Амилорид использовался нами в достаточно высокой концентрации ( $1 \cdot 10^{-3}$  М;  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М).

Известно, что амилорид в указанных концентрациях может ингибировать натриевый насос —  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ –АТРаза [38, 163].

Из табл. 2 видно, что инсулинстимулируемый синтез АТФ на ПМ эритроцитов человека полностью подавляется амилоридом, добавленным в инкубационную смесь в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М.

Таблица 2  
**Ингибирующее действие амилорида на инсулинстимулируемый синтез АТФ в тениях эритроцитов человека**

Концентрация амилорида, М	Ингибирование синтеза сигналтрандуцируемого АТФ, % (за 1-ю мин инкубации)
0	0
$1,0 \cdot 10^{-3}$	32
$2,5 \cdot 10^{-3}$	100

Полученные факты в сочетании с многочисленными данными о способности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ – АТРаза (как впрочем и  $\text{Ca}^{2+}$ – АТРаза) генерировать АТФ путем обращения ионных градиентов [142] свидетельствуют об определенной общности механизмов функционирования протонных и натриевых АТРаз [41].

Из табл. 3 видно, что ингибитор  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ – АТРаза оубаин, добавленный в концентрации 0,5 мкМ, на 92% подавляет синтез сигналтрандуцирующего АТФ, а внесение в инкубационную среду натриевого ионофора моненсина в концентрации 0,3 мкМ в три раза увеличивает инсулинстимулируемое образование АТФ в эритроцитарных мембранах, как стимулированных инсулином, так и не подвергшихся действию гормона. Введенный в среду инкубации

Таблица 3  
**Влияние оуабаина и моненсина на стимулированное  
 инсулином (0,4 мкг/мл) накопление АТР плазматическими  
 мембранами, изолированными из эритроцитов человека [28]**

Добавка	Накопление АТР за первую минуту инкубации при 30 <sup>0</sup> С, нмоль/мг белка (M ± m)		ΔАТР, нмоль/мг белка
	- Инсулин	+ Инсулин	
Без добавок	12,4 ± 0,2	20,5 ± 0,2	8,1
Оуабаин, 0,5 мкМ	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2	0,6
Моненсин, 0,3 мкМ	32,8 ± 2,5	60,4 ± 2,3	27,7
Оуабаин 0,5 мкМ + моненсин, 0,3 мкМ	15,4 ± 0,4	30,5 ± 0,4	15,1

одновременно с оуабаином моненсин снимал его эффект на ингибирование синтеза АТР [28].

На рис. 6 представлена предложенная нами схема опосредуемого рецептором механизма синтеза сигналтранслирующего АТР под влиянием пептидных РФ и митогенов.

Мы можем допустить, что предполагаемый механизм образования этого АТР на ПМ животной клетки состоит в следующем. Сигналстимулируемое окисление NADH под действием протонфорной трансплазматической протон-выкачивающей NADH-дегидрогеназы приводит к генерации на ПМ ΔΨ за счет движения энергизованного протона через мембрану. Выход протона наружу усиливается протонфором FCCP. И, напротив, противоопухольевый антибиотик адриамицин блокирует протон-выкачивающую NADH-дегидрогеназу и синтез сигнального АТР [85]. Генерация ΔΨ на ПМ как первичное событие, очевидно, прямо или по механизму «дальнего действия» на ПМ изменяет режим работы некой АТРаза, скорее Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТРаза [10] таким образом, что при наличии Na<sup>+</sup> в наружной среде последний может использоваться в качестве ΔμNa<sup>+</sup>-движущей силы для синтеза АТР за счет переходящего обращения функции Na<sup>+</sup>-транспортирующей АТРаза. Этот процесс стимулируется при добавлении в среду низких (0,1–0,3 мкМ) концентраций натриевого ионофора моненсина. Фактором благоприятствующим совершению химической работы на ПМ — синтезу АТР под действием ΔμNa<sup>+</sup> является превышение концентрации Na<sup>+</sup> снаружи клеток над его концентрацией внутри цитоплазмы.

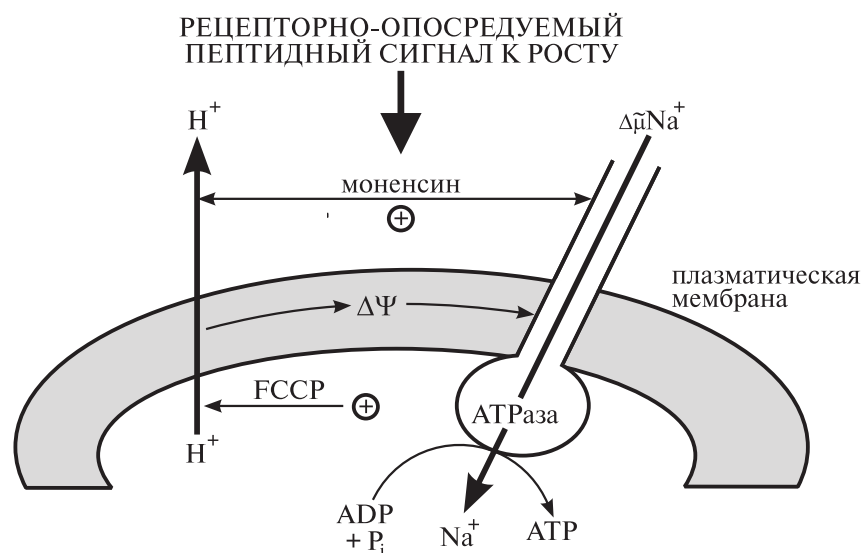


Рис. 6. Схема опосредуемого рецептором синтеза сигналтрансдуцирующего АТФ под влиянием пептидных факторов роста и митогенов.

Активация протонофором FCCP и низкими концентрациями натриевого ионофора моненсина.

Феномен биосинтеза плазматической мембраны сигнального АТФ обнаружен нами на 18-ти пептидных факторах роста, митогенах, цитокинах, стимуляторах клеточной адгезии, хемотаксиса, апоптоза, клеточной дифференцировки, которые, связываясь со своими специфическими рецепторами на ПМ клетки-мишени генерируют АТФ — материальный носитель и медиатор реакции фосфорилирования белков и липидов [135, 186]. Этот сигналтрансдуцирующий АТФ участвует в регуляции фундаментальных клеточных процессов (рис. 7).

Синтез АТФ на ПМ клеток из АДФ и  $P_i$  в ответ на рецепторзависимые сигналы к росту клеток наблюдался нами в препаратах ОПМЧ, изолированных из различных клеток-мишеней: эпителиальных, мышечных, клеток печени, клеток крови, клеток иммунной системы, клеток соединительной ткани, что говорит о неслучайности этого феномена. Мы не думаем, что сходство биохимических механизмов, ответственных за трансмембранную передачу или усиление (амплификацию) ростовых сигналов от столь разнообразных гормонов (инсулин, GH, PRL, TRH), РФ и



Рис. 7. Роль сигналтрансдуцирующего АТР в опосредовании сигналов, ассоциируемых с фундаментальными клеточными процессами.

митогенов (NGF, EGF, PDGF, CSF, VEGF, HGF, MSA, GHL), лектинов (Con A, фитогемагглютинин), цитокинов (IL-2, TNF $\alpha$ ), митогенов ( $\alpha$ -тромбин), хемоаттрактантов (FMLP), сводится лишь к чисто внешнему случайному совпадению. Мы глубоко убеждены, что речь идет о фундаментальном биологическом явлении, присущем сигналпреобразующим системам ПМ животных клеток – способности генерировать химический передатчик и одновременно источник энергии – АТР в качестве быстрого ответа клетки-мишени на внешний стимул, воспринимаемый специфическим рецептором (см. рис. 2). Скорее всего единство механизма действия определенного семейства регуляторов роста означает, что животные клетки создают АТР на ПМ для того, чтобы активировать или обеспечивать энергией мембраносвязанные тирозинкиназы рецепторов РФ [19]. Активированные рецепторные тирозинкиназы способны фосфорилировать по остаткам тирозина целый ряд других сигнальных белков и, таким образом, запускать каскадный механизм фосфорилирования, исходящий от рецепторов РФ на ПМ [19, 153].

Ниже приведены критерии для включения сигналтрансдуцирующего АТФ в качестве передатчика сигнальной информации от внеклеточного домена рецепторов для РФ и цитокинов на эффекторный цитозольный элемент тирозинкиназный домен рецептора, содержащий АТФ–связывающий центр.

1). Сигналтрансдуцирующий АТФ должен быстро синтезироваться *de novo* (1–2 мин) на ПМ клетки в ответ на опосредуемые рецептором стимулы к клеточному росту, пролиферации, хемотаксису, адгезии, миграции, апоптозу; его синтез необходим для активации РТК с помощью механизма их аутофосфорилирования или трансфосфорилирования агрегированных или олигомеризованных рецепторных тирозинкиназных доменов.

2). Добавление АТФ к интактным пермеализованным клеткам–мишеням должно воспроизводить или усиливать рецепторзависимые эффекты инсулина, факторов роста цитокинов.

3). Специфический ингибитор АТФ–связывающего центра FSBA, добавленный к инкубационной среде, содержащей суспензию ОПМЧ, ADP, Mg<sup>2+</sup>, неорганический фосфат, NADH, цитохром *c* (или диферри–трансферрин), кислород, увеличивает продукцию сигналтрансдуцирующего АТФ в ответ на опосредуемый рецептором митогенный стимул к росту.

4). Биохимический ответ на пептидные сигналы к росту локализован только в тех клетках–мишенях, в которых есть соответствующие высокоспецифические рецепторы на ПМ для РФ, цитокинов, митогенов, содержащие интегральный или нековалентно ассоциируемый тирозинкиназный домен, и этот ответ является АТФ–зависимым.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя многочисленные экспериментальные данные, выполненные нами на протяжении 20 лет, можно утверждать, что в ответ на действие полипептидных РФ, цитокинов и онкобелков в процессе трансмембранной передачи сигналов происходит всплеск аэробного синтеза АТФ на ПМ клеток–мишеней, который инициирует каскадный механизм тирозинспецифического фосфорилирования [103, 104]. Можно ожидать, что синтез сигнального АТФ на ПМ в ответ на действие РФ является эволюционно древним механизмом и возник у первых простейших организмов, не имевших митохондрий, как один из основных энергетических механизмов, который вместе с гликолизом осуществлял синтез и поставку АТФ для нужд прокариотических клеток. Однако после появления

митохондрий АТР, продуцируемый в примембранной области с помощью NADH-зависимой электрон-транспортной цепи перестал, по-видимому, выполнять свою энергетическую функцию и стал играть преимущественно роль сигнальной молекулы — сигнал-трансдуцирующего АТР.

За последние 40 лет был открыт новый класс гормоноподобных веществ — полипептидные факторы роста и цитокины, вовлеченные в пролиферацию, дифференцировку, онкогенез и апоптоз [55]. Однако вопрос о клеточных и молекулярных механизмах действия нового класса гормоноподобных веществ оставался открытым. Теперь признается, что мембранные рецепторы для РФ и трансформированные белки многих ретровирусных онкогенов представляют из себя ни что иное как ферменты тирозинкиназы [53, 60, 97, 151, 188]. Тем не менее, вопрос о регуляции функций рецепторных или ассоциируемых с рецепторами цитозольных тирозинкиназ с помощью вторичных мессенджеров был неизвестен. По мнению некоторых исследователей [126] похоже, что нет какого-то единого механизма активации тирозиновых киназ для различных РФ. Это оказалось не так. Поиск и обнаружение сигнальной молекулы-мессенджера, которая бы передавала сигнальную информацию на RTK или же энергетически обеспечила активацию тирозинкиназ для РФ, цитокинов и онкобелков завершился к началу 80-х годов обнаружением синтеза на ПМ аденозин-5'-трифосфата, его изоляцией и идентификацией [8]. Это было сделано на примере гормона и одновременно фактора роста инсулина [8].

Обнаружение синтеза АТР на ПМ клеток-мишеней стало возможным, во-первых, благодаря открытию редокс-функции ПМ эукариотических клеток [124] спустя 30 лет после открытия митохондриальной электрон-транспортной цепи, в которой окисление восстановленного никотинамидадениндинуклеотида кислородом сопровождается накоплением энергии окисления и синтезом АТР. Во-вторых, это стало возможным благодаря открытию в ПМ животных клеток  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРАЗы, которая обеспечивает активный транспорт одновалентных катионов [157], и которая, по-видимому, способна к обращению своего каталитического действия [139, 140]. Трансплазмалеммальная цианиднечувствительная протонофорная редокс-система ПМ способна осуществлять перенос электронов и протонов от внутриклеточного цитозольного NADH на непроницающие наружные железосодержащие редокс-акцепторы, такие как феррицианид, диферри-трансферрин, цитохром *c* [66–68, 131], а также на природный натуральный редокс-акцептор кислород [129] или свободный радикал аскорбиновой кислоты [132]. Выше-



упомянутая трансплазмалеммальная цианиднечувствительная редокс-система присутствует во всех ПМ всех эукариотических клеток [68]. Активность этой поперечно-ориентированной к плоскости ПМ редокс-системы ассоциируется с контролем роста клеток [67, 68]. Как оказалось, инсулин и РФ способны стимулировать трансплазматическую электрон-транспортную редокс-систему, сопряженно функционирующую с NADH-оксидазой ПМ и с рецепторами для РФ [58, 129, 171].

Феномен всплеска аэробного синтеза АТФ на ПМ продемонстрирован нами на 25 тканях-мишенях при действии 18 РФ и цитокинов. Установлено, что механизм синтеза этого АТФ не связан с работой аденилаткиназы (миокиназы) [103, 104].

Стало ясно, что на ПМ животной клетки должен существовать некий общий единый биохимический механизм передачи и усиления внеклеточных полипептидных сигналов, который выводит клетку из состояния покоя. Этот механизм связан с синтезом сигналтрандуцирующего АТФ из ADP и  $P_i$  в ответ на мембранное действие РФ и цитокинов в ходе NADH-зависимого окислительного процесса.

Генерация этого «типа» АТФ происходит на ПМ рецепторзависимым путем в ходе окислительно-восстановительного процесса, сопряженного с переносом электронов и транспортом ионов [12, 13, 19].

На основании приведенных в обзоре данных можно заключить, что плазматический сигналпередающий АТФ генерируется из ADP и  $P_i$  за счет энергии  $\Delta\psi Na^+$ . Мы еще далеки от окончательного решения вопроса, каков молекулярный механизм синтеза этого АТФ на ПМ. Однако, как вытекает из наших экспериментальных данных в ходе электрон-транспортного процесса на внешней мембране животных клеток  $H^+$  и  $Na^+$  совместно участвуют в механизме сигналстимулируемого синтеза АТФ.

Ввиду большой скорости синтеза АТФ на ПМ, чрезвычайно высокого сродства к АТФ-связывающему центру тирозинкиназ, незначительных величин синтеза (1–100 нмоль/мг белка), детекция этого АТФ была затруднительной. Однако, внесение в инкубационную среду аналога АТФ — FSBA, специфического ингибитора АТФ-связывающего центра рецепторных и нерепторных тирозинкиназ (как впрочем и многих других киназ), позволила надежно обнаружить накопление этого АТФ.

Способность плазматического сигналтрандуцирующего АТФ резко возрастать в присутствии в инкубационной среде аналога АТФ FSBA, конкурирующего с АТФ за АТФ-связывающий центр

РТК убедительно доказывает, что имеется прочное сопряжение синтеза этого АТР на ПМ клетки и его утилизации на ПМ [105]. Измерение степени накопления плазмамембранного сигнального АТР в системе *in vitro* при применении различных по структуре селективных ингибиторов АТР–связывающего центра РТК (FSBA, изофлавоноиды, хинолоны, фениламино–пиримидины, пирроло–пиримидины) [175] может оказаться полезным для фармакологии [105]. Такой подход может стать частью общей фармакофорной стратегии при конструировании новых терапевтических средств, в том числе противоопухолевых. Использование определения АТР в типовой инкубационной среде уже оказалось перспективным подходом к созданию некой скрининговой тест–системы для выявления на ОПМЧ клеток–мишеней эффектов действия выделенных или синтезируемых пептидов, перспективных в отношении ростстимулирующей фармакологической активности.

Небольшое время жизни этого «типа» АТР обусловлено, по всей видимости, тем, что рецепторные молекулы и соответствующие ферменты и транспортные системы образуют на ПМ упорядоченные надмолекулярные структуры. Синтезируемый посредством ПМ клеток–мишеней АТР в ответ на действие РФ, цитокинов, онкобелков, сигналов адгезии и апоптоза не покидает пределов компартмента на ПМ. Он прямо диффундирует к АТР–связывающему центру каталитического домена тирозинкиназ по механизму канала или по эстафетному механизму и взаимодействует с ним. Кратковременное самофосфорилирование тирозиновых остатков РТК и образование фосфотирозинов служит в качестве «докинг–центров» для других сигнальных ключевых белков–мишеней, таких как PLC– $\gamma$ , фосфатидилинозитол–3′–киназа, GAP (ras–GTPазу активирующий белок), Grb 2, p60<sup>src</sup> и других, ассоциируемых в надмолекулярную сигналпередающую частицу [19]. То есть, АТР как второй посредник подает сигнал к формированию надмолекулярной структуры (структуроформирующая роль по аналогии с ролью Ca<sup>2+</sup>) и включает активность вышеперечисленных сигнальных белков–мишеней.

Изложенные соображения согласуются с современным представлением о пространственной организации контроля процессов метаболизма, протекающих на мембранах живых клеток [39, 79, 119, 165].

Очевидно в разных типах клеток многие процессы, следующие за связыванием РФ, цитокинов, онкопротеинов со своими рецепторами на ПМ могут быть общими (синтез АТР), а дальнейшие события могут быть подвержены дивергенции, обусловленной

типом клетки, ее состоянием или сочетанным взаимодействием путей передачи сигнала.

Разнообразие и расхождение путей передачи сигналов к клеточному росту, пролиферации, хемотаксису, адгезии не должно удивлять. Ведь различные клетки отличаются друг от друга по своей специализации, содержанию и составу ферментов, а также количеству рецепторов на ПМ, чувствительных к сигналам окружающей среды. И все же есть нечто общее для всех клеток — единый трансмембранный *передатчик* и *усилитель* сигналов к росту, пролиферации, хемотаксису, адгезии, онкогенезу — *сигналтрансдуцирующий АТР*, генерируемый на ПМ клетки-мишени в ответ на рецептор-зависимые стимулы.

Известный принцип кибернетики гласит: регуляция (управление) осуществляется с наименьшей затратой вещества и энергии. Синтез сигналтрансдуцирующего АТР на ПМ клеток-мишени в концентрации ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М) за первую минуту инкубации с РФ, митогеном, цитокином — это синтез АТР *de novo* в очень незначительных количествах. Напомним, что РФ митогены и цитокины действуют снаружи клетки в концентрации  $10^{-12}$ — $10^{-10}$  М (константа диссоциации комплекса EGF-рецептор составляет около  $10^{-10}$  М). Получается, что проведение и усиление сигнала к клеточному росту и пролиферации достигается образованием АТР на ПМ клеток-мишени в концентрациях, превышающих на 5—6 порядков наружную концентрацию РФ, митогенов и цитокинов. Следовательно, амплификация сигнала налицо. Амплификация сигнала становится решающим фактором ферментативной регуляции, обеспечивающим многоступенчатую систему фосфорилирования белков, исходящую от рецепторов гормонов [116]. Анализ этого важного свойства ферментативной регуляции заслуживает особого внимания в будущем. Вполне логично ожидать, что каскады обратимого фосфорилирования запускаются из ПМ с помощью АТР и принимают участие в экспрессии ядерных генов [115]. К настоящему времени это собственно говоря, нами уже доказано [85]. Сегодня уже можно говорить о том, что к ранее известным функциям АТР—АДФ цикла: механическая работа, осмотическая работа, биосинтетический метаболизм — добавилось еще одна функция АТР — передатчика и усилителя сигналов, главным образом, к росту [19, 166]. АТР является универсальным клеточным передатчиком и усилителем ростовых сигналов, цитокинов и онкопротеинов.

Авторы выражают глубокую признательность и благодарность Б.И. Курганову за плодотворное обсуждение, помощь, внимание к работе и полезные критические комментарии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глоба А.Г., Вишневский В.А., Демидова В.С., Абакумова О.Ю., Карелин А.А. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 1996. № 3. С. 271—274.
2. Глоба А.Г., Дан В.Н., Втюрин Б.В., Писаржевский С.А., Демидова В.С., Карелин А.А. // Ангиология и сосудистая хирургия. 1995. № 2. С. 112—113.
3. Глоба А.Г., Зайцева Н.В., Тепляков В.Г., Карелин А.А. // Вопр. мед. химии. 1992. Т.38. № 3. С. 13—18.
4. Демидова В.С. // Исследование некоторых биохимических механизмов трансмембранной передачи инсулинового сигнала (на примере плазматической мембраны эритроцита человека) / Автореф. канд. дисс., канд. биол. наук. М. 1994. 23 С.
5. Демидова В.С., Марчук А.И., Ряполова И.В., Козинец Г.И., Карелин А.А. // Вопр. мед. химии. 1993. Т. 39. № 2. С. 15—19.
6. Карелин А.А. // 4-й Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы докладов. М.: Наука. 1979. Т. 3. С. 239.
7. Карелин А.А. // Вопр. мед. химии. 1980. Т. 26. № 2. С. 220—226.
8. Карелин А.А. // Вопр. мед. химии. 1981. Т. 27. № 5. С. 679—685.
9. Карелин А.А. // 4-я Всесоюзная конференция по биохимии мышц. Тезисы. Л.: Военно-медицинская академия. 1981. С. 46—47.
10. Карелин А.А. // Вестн. АМН СССР. 1983. № 7. С. 74—85.
11. Карелин А.А. // Вопр. мед. химии. 1983. Т. 29. № 6. С. 99—105.
12. Карелин А.А. // Вестн. АМН СССР. 1986. № 8. С. 77—90.
13. Карелин А.А. // Вестн. АМН СССР. 1987. № 7. С. 35—41.
14. Карелин А.А. // Внутриклеточная сигнализация. / Ред. П.Г. Костюк, М.А. Островский. М.: Наука. 1988. С. 97—102.
15. Карелин А.А. // Всесоюзный симпозиум «Биохимия опухолевой клетки». Тезисы докладов. Минск. 1990. С. 42—43.
16. Карелин А.А. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 11. С. 1224—1228.
17. Карелин А.А. // Биохимические проблемы хирургии / Ред. В.Д. Федоров, А.А. Карелин. М.: Изд-во Института хирургии им. А.В. Вишневского РАМН. 1991. С. 202—214.
18. Карелин А.А. // Вопр. мед. химии. 1991. Т. 38. № 6. С. 44—47.
19. Карелин А.А. // Вестн. РАМН. 1994. № 6. С. 27—34.
20. Карелин А.А., Вишневский В.А., Глоба А.Г., Демидова В.С., Абакумова О.Ю. // Новые технологии в хирургической гепатологии. С-Пб. Изд-во: Кировская обл. типография. 1995. С. 447—448.
21. Карелин А.А., Втюрин Б.В. // Вопр. мед. химии. 1982. Т. 28. № 4. С. 118—123.
22. Карелин А.А., Глоба А.Г., Демидова В.С., Марчук А.И. // Вопр. мед. химии. 1986. Т. 32. № 5. С. 93—98.
23. Карелин А.А., Глоба А.Г., Втюрин Б.В., Писаржевский С.А., Демидова В.С., Дан В.Н. // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 41. № 3. С. 17—20.
24. Карелин А.А., Глоба А.Г., Демидова В.С. // 5-й Всесоюзный Биохимический Съезд. Тезисы стендовых сообщений. М.: Наука. 1986. Т. 3. С. 52—53.
25. Карелин А.А., Глоба А.Г., Демидова В.С., Марчук А.И., Рывтинский С.С. // Вопр. мед. химии. 1985. Т. 31. № 2. С. 111—117.
26. Карелин А.А., Демидова В.С., Глоба А.Г. // Клинические и экспериментальные аспекты клеточной сигнализации. М.: Изд-во «Инженер». 1993. С. 35—36.

27. Карелин А.А., Демидова В.С., Глоба А.Г., Марчук А.И., Втюрин Б.В. // *Вопр. мед. химии*. 1989. Т. 35. № 3. С. 120—124.
28. Карелин А.А., Демидова В.С., Марчук А.И. // *Вопр. мед. химии*. 1993. Т. 39. № 6. С. 10—13.
29. Карелин А.А., Зайцева Н.В., Глоба А.Г., Втюрин Б.В. // *Иммунология*. 1991. № 5. С. 48—51.
30. Карелин А.А., Марчук А.И., Писаржевский С.А., Николаев В.И., Николаева Л.Ю. // *Гематология и трансфузиология*. 1987. № 5. С. 25—28.
31. Карелин А.А., Марчук А.И., Рывинский С.С. // *Вопр. мед. химии*. 1983. Т. 29. № 6. С. 99—105.
32. Карелин А.А., Николаев В.И., Писаржевский С.А., Демидова В.С., Николаева Л.Ю. // *Акушерство и гинекология*. 1987. № 5. С. 40—42.
33. Карелин А.А., Николаева Л.Ю., Николаев В.И., Писаржевский С.А. // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1986. Т. 102. № 12. С. 709—712.
34. Карелин А.А., Северин С.Е., Северин Е.С., Глоба А.Г., Демидова В.С., Марчук А.И. // 2-й съезд Биохимического общества РАН. Тезисы. Часть II. Издание ОНТИ ПНЦ РАН. 1997. С. 433—434.
35. Карелин А.А., Шумова Е.А., Глоба А.Г., Зайцева Н.В., Титов М.И. // *Вопр. мед. химии*. 1991. Т. 37. № 1. С. 65—67.
36. Мардашев С.Р., Карелин А.А. // *Методы исследования активности некоторых ферментов в клинике. Труды по новой аппаратуре и методикам. Выпуск VI.* / Ред. С.С.Дебов, В.В.Меньшиков. М.: Изд-во ИММИ им. И.М.Сеченова. 1967. Вып. 6. С. 67—76.
37. Николаев В.И., Николаева Л.Ю. // *Биохимические проблемы хирургии* / Ред. В.Д.Федоров, А.А.Карелин. М.: Изд-во Института хирургии им. А.В. Вишневского РАМН. 1991. С. 215—222.
38. Резник Л.В., Наточин Ю.В. // *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 270. № 4. С. 1008—1010.
39. Рязанов А.Г., Спиринов А.С. // *Успехи биол. химии*. 1988. Т. 29. С. 3—43.
40. Скулачев В.П. // *Биохимия*. 1985. Т. 50. № 2. С. 179—183.
41. Скулачев В.П. // *Энергетика биологических мембран*. М.: Наука. 1989. 564 с.
42. Скулачев В.П. // *Биол. мембраны*. 1986. Т. 3. № 1. С. 5—25.
43. Умбрейт В.В., Буррис Р.Х., Штауффер Дж.Ф. // *Манометрические методы изучения тканевого обмена* / Ред. В.А.Энгельгардт. М.: Наука. 1951. С. 214.
44. Хомичук А.Ю., Тимошин С.С., Орлов С.Н., Покудин Н.И., Кубатиев А.А. // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1991. Т. 111. № 6. С. 586—587.
45. Abelev G.I. // *Adv. Cancer Res.* 1971. Vol. 14. P. 295—358.
46. Anafi M., Gazit A., Gilon C., Ben-Neriah Y., Levitzki A. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. № 7. P. 4518—4523.
47. Aw T.Y., Jones D.P. // *Amer. J. Physiol.* 1985. Vol. 249. P. 385—392.
48. Benos D.J. // *Amer. J. Physiol.* 1982. Vol. 242. № 3. P. 131—145.
49. Berridge M. J. // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. Vol. 56. P. 159—193.
50. Berridge M. J. // *Biochem. J.* 1984. Vol. 220. P. 345—360.
51. Berridge M. J., Irvine R. F. // *Nature*. 1984. Vol. 312. P. 315—321.
52. Bertics P.J., Gill G.N. // *J. Biol. Chem.*, 1985. Vol. 260. P. 14642—14647.
53. Bishop J.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1983. Vol. 52. P. 301—354.
54. Bossemeyer D. // *Cell. Molec. Biol. Lett.* 1998. Vol. 3. № 3. P. 278—279 (abstr.).
55. Bradshaw R.A., Rubin Y.B. // *J. Supramol. Struct.* 1980. Vol. 14. № 2. P. 183—199.

56. Raff M., Bretcher M.S., C. // Nature. 1975. Vol. 258. P. 43—49.
57. Bretcher M.S., Raff M.C. // Nature. 1975. Vol. 258. P. 43—49.
58. Bruno M., Brightman A.O., Lawrence J., Werderitsh D., Morre D.M., Morre D.J. // Biochem. J. 1992. Vol. 284. P. 625—628.
59. Buhrow S.A., Cohen S., Staros J.V. // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. № 8. P. 4019—4022.
60. Cantley L. C., Auger K. R., Carpenter C., Duckworth B., Graciani A., Kapeller R., Soltoff S. // Cell. 1991. Vol. 64. P. 281—302.
61. Carpenter G., King L., Cohen S // Nature. 1978. Vol. 276. P. 409—410.
62. Clark M.G., Partick E.J., Patten G.S., Crane F.L., Luy H., Grebing C. // Biochem. J. 1981. Vol. 200. P. 565—572.
63. Cockroft X., Howe T., Menear K. // Cell. Molec. Biol. Lett. 1998. Vol. 3. № 3. P. 283 (abstr.).
64. Crane F.L., Crane H.E., Sun I.L., MacKellar W.C., Grebing C., Luy H. // J. Bioenerg. Biomembr. 1982. Vol. 14. № 5—6. P. 425—433.
65. Crane F.L., Luy H., Clark M.G. // Membrane and transport. / Ed. A. Martonosi. N.Y.: Plenum Press. 1982. Vol. 2. P. 251—254.
66. Crane F.L., Luy H., Clark M.G. // The Enzyme Biol. Membranes. / Ed. A. Martonosi. N.Y.: Plenum Press. 1985. Vol. 4. P. 465—510.
67. Crane F.L., Morre D.J., Luy H.E. // Oxidoreduction at the plasma membrane: relation to growth and transport. / CRC Press. INC. 2000 Corporate Blvd. N.Y.: Boca Raton. Florida. 1990. 328 p.
68. Crane F.L., Sun I.L., Clark M.G., Grebing C., Luy H. // Biochim. Biophys. Acta: Rev. Bioenerg. 1985. Vol. 811. № 3. P. 233—264.
69. Czech M.P. // Annu. Rev. Physiol. 1985. Vol. 47. P. 357—381.
70. Czech M.P. // Recent Progr. Hormone Res. 1984. Vol. 40. P. 347—373.
71. Deuel T.F., Huang J.S. // J. Clin. Invest. 1984. Vol. 74. № 3. P. 669—676.
72. Downing J.R., Rettenmier C.W., Sherr C.J. // Mol. Cell. Biol. 1988. Vol. 8. № 4. P. 1795—1799.
73. Ek B., Heldin C.H. // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 10486—10492.
74. Ek B., Westermark B., Wasteson A., Heldin C.H. // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 11973—11980.
75. Ennor A.N. // Methods in Enzymology / Eds. S.P. Colowick, N.O. Kaplan. N.Y.: Acad. Press. 1957. Vol. 3. P. 850—861.
76. Ennor A.N., Rosenberg H. // Biochem. J. 1952. Vol. 51. P. 606—610.
77. Fantl J., Johnson D. E., Williams L. T. // Annu. Rev. Biochem. 1993. Vol. 62. P. 453—481.
78. Feige J.J., Cochet C., Pirolet F., Chambaz E.M. // Biochemistry. 1983. Vol. 22. № 6. P. 1452—1459.
79. Fridrich P. // Supramolecular enzyme organization: Quaternary structure and beyond / Ed. P. Fridrich. Budapest: Academician Hiado. 1984. 300 p.
80. Gambhir K.K., Archer J.A., Bradley C.J. // Diabetes. 1978. Vol. 27. P. 701—708.
81. Gill G.N., Bertics P.J., Santon J.B. // Mol. Cell. Endocrinol. 1987. Vol. 51. № 3. P. 169—186.
82. Gilman A.G. // Annu. Rev. Biochem. 1987. Vol. 56. P. 615—649.
83. Gilman A.G. // Cell. 1984. Vol. 36. P. 577—579.
84. Gitlin D., Boesman M. // Comp. Biochem. Physiol. 1967. Vol. 21. P. 327—336.
85. Globa A.G., Solovyev A.S., Terentyev A.A., Demidova V.S., Shulgina M.F., Alesenko A.V., Karelin A.A. // Biochem. Mol. Biol. International. 1998. Vol. 45. № 6. P. 1169—1178.

86. Grebing C., Crane F.L., Luy H., Hall K. // J. Bioenerg. Biomembr. 1984. Vol. 16. P. 517—533.
87. Gullick W.J., Downward J., Foulkes J.G., Waterfield M.D. // Eur. J. Biochem. 1986. Vol. 158. № 2. P. 245—253.
88. Haugland R. B., Chang D. T. // Proc. Exp. Biol. Med. 1975. Vol. 148. P. 1—4.
89. Hayashi L., Larner J., Sato G. // In vitro. 1978. Vol. 14. P. 23—30.
90. Heppel L.A., Hilmoe R.J. // Methods. Enzymol. 1955. Vol. 2. P. 546—550.
91. Herzberg V., Boughtler J.M., Carlisle J., Hill D.E. // Nature. 1980. Vol. 286. № 5770. P. 279—281.
92. Hopfer U. // Amer. J. Physiol. 1978. Vol. 234. P. 89—96.
93. Hoshi T., Himukai M. // Transport and bioenergetics in biomembranes / Eds. R. Sato, Y. Kagawa. N.Y.—Tokyo: Plenum Press. 1982. P. 111—135.
94. Huang S.S., Huang J.S. // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. № 21. P. 9568—9571.
95. Hunter T. // Oncogenes and growth control / Eds. P.Kahn, T.Graft. Berlin: Springer-Verlag. 1988. P. 138—145.
96. Hunter T., Cooper J.A. // Annu. Rev. Biochem. 1985. Vol. 54. P. 897—930.
97. Hunter T., Cooper J.A. // Cell. 1981. Vol. 24. P. 741—752.
98. Jones D.P. // Amer. J. Physiol. 1986. Vol. 250. P. 663—675.
99. Kanakura Y., Druker B., Cannistra S.A., Furukawa Y., Torimoto Y., Griffin J.D. // Blood. 1990. Vol. 76. № 4. P. 706—715.
100. Kanner B.I. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 726. P. 293—316.
101. Karelin A.A., Globa A.G., Demidova V.S. // 19<sup>th</sup> Meeting FEBS. Abstract Book. 1989. Rome (Italy). TU 391 (abstr.).
102. Karelin A.A., Demidova V.S., Globa A.G. // Biochemistry International. 1992. Vol. 27. № 1. P. 75—83.
103. Karelin A.A., Demidova V.S., Globa A.G. // Cellular Regulation by Protein Phosphorylation: Forty Years of Progress. An ASBM Satellite of the International Congress of Biochemistry. Seattle. Washington. Poster Session 5A: Growth Factor Signalling Pathways. 1997. P. 56. (P5A—20 abstr.).
104. Karelin A.A., Demidova V.S., Globa A.G. // The FASEB Journal. ABSTRACTS. 17<sup>th</sup> Intern. Congress Biochem. Mol. Biology. San Francisco. California. 1997. P.A 10—51 (1133 abstr.).
105. Karelin A.A., Demidova V.S., Globa A.G. // Cell. Molec. Biol. Lett. 1998. Vol. 3. № 3. P. 303—304.
106. Kennedy E.P., Lehninger A.L. // J. Biol. Chem. 1949. Vol. 179. P. 957—972.
107. Kikkawa U., Nishizuka Y. // Biochem. Soc. Trans. 1987. Vol. 15. P. 124—125.
108. King G.L., Carpenter G., Cohen S. // Biochemistry. 1980. Vol. 19. P. 1524—1528.
109. King G.L., Kahn R.C. // Nature. 1981. Vol. 292. № 5824. P. 644—646.
110. King G.L., Kahn R.C., Heldin C.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biol. Ser. 1983. Vol. 80. № 5. P. 1308—1312.
111. Kirstein M., Baglioni C. // J. Cell. Physiol. 1988. Vol. 134. № 3. P. 479—484.
112. Knight A.B., McManus T.J. // Fed. Proc. 1974. Vol. 33. P. 1440 (abstr. 999).
113. Koontz J.W., Iwahashi M. // Science. 1981. Vol. 211. P. 947—949.
114. Korn E.D. // In: The Inflammatory Process / Eds. B.W.Zweifach, L.Grant., R.T. McCluskey. N.Y.: Acad. Press. 1974. P. 51—113.

115. *Koshland D.E.Jr.* // Trends Biochem. Sci. 1984. Vol. 9. № 4. P. 145—164.
116. *Koshland D.E.Jr., Goldbeter A., Stock J.B.* // Science. 1982. Vol. 217. P. 220—225.
117. *Krebs E. G.* // Curr. Top. Cell. Regulat. 1972. Vol. 5. P. 99—128.
118. *Krebs E.G.* Plenary lectures // 16<sup>th</sup> Intern. Congress Biochem. Mol. Biology. New Delhi. India. Abstracts. 1994. Vol. 1. P. 6.
119. *Kurganov B.I.* // Organized multi-enzyme system: catalytic properties / Ed. G.R. Welch. N. Y.: Acad. Press. 1985. P. 241.
120. *Lemmon M.A., Schlessinger J.* // Trends Biochem. Sci. 1994. Vol. 19. № 11. P. 459—463.
121. *Lehninger A.L.* // J. Biol. Chem. 1949. Vol. 178. P. 625—644.
122. *Levitzki A.* // In: 16<sup>th</sup> Intern. Congress Biochem. Mol. Biology. New Delhi, India: Abstracts. 1994. Vol. 1. P. 95. (abstr. S 9. 2—4).
123. *Levitzki A.* // Cell. Molec. Biol. Lett. 1998. Vol. 3. № 3. P. 314—315.
124. *Luw H., Crane F.L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1978. Vol. 515. № 2. P. 141—161.
125. *Luw H., Sun I.L., Navas P., Grebing C., Crane F.L., Morre D.J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. Vol. 139. № 3. P. 1117—1123.
126. *Malarkey K., Belham C. M., Paul A., Graham A., Mc Lees A., Scott P. H.* // Biochem. J. 1995. Vol. 309. № 2. P. 361—375.
127. *Mitchell R.H., Hawthorne J.N.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965. Vol. 21. P. 333—338.
128. *Moore R.D.* // Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 737. № 1. P. 1—49.
129. *Morre D.J., Brightman A.O.* // J. Bioenerg. Biomembr. 1991. Vol. 23. P. 469—489.
130. *Nakamura T.* // Laboratory Investigation. 1994. Vol. 71. № 1. P. 35—41.
131. *Navas P., Vilalba J.M., Cordoba F.* // Biochim. Biophys. Acta. 1994. Vol. 1197. № 1. P. 1—13.
132. *Nishizuka Y.* // Cancer. 1989. Vol. 63. № 10. P. 1892—1903.
133. *Nishizuka Y.* // Science. 1984. Vol. 225. № 4668. P. 1365—1370.
134. *Nishizuka Y.* // Science. 1986. Vol. 233. P. 305—312.
135. *Nishizuka Y.* // Trends Biochem. Sci. 1984. Vol. 9. № 4. P. 163—166.
136. *Novak V.A., Ivankina N.G.* // Physiologia plant. 1988. Vol. 73. P. 161—164.
137. *Pike L.J., Eakes A.* // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 1644—1651.
138. *Pike L.J., Gallis B., Casnellie J.E., Bornstein P., Krebs E.G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. № 5. P. 1443—1447.
139. *Post R.L.* // Annu. Rev. Physiol. Palo Alto (California). 1989. Vol. 51. P. 1—10.
140. *Post R.L., Taniguchi K., Toda G.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1974. Vol. 242. P. 80—91.
141. *Pressman B.C.* // Annu. Rev. Biochem. 1976. Vol. 45. P. 501—530.
142. *Racker E.* A new look at mechanism in bioenergetics // N.Y.; San Francisco; L.: Acad. Press. 1976. 197 p.
143. *Rall T.W., Sutherland E.W.* // J. Biol. Chem. 1958. Vol. 232. P. 1065—1076.
144. *Rechler M.M., Podskalny J.M., Goldfine I.D., Wells C.A.* // J. Clin. Endocr. Metab. 1974. Vol. 39. P. 512—521.
145. *Rodbell M.* // Nature. 1980. Vol. 6. P. 17—22.
146. *Rosen O.M., Herrera R., Olowe Y., Petruzzelli L.M., Cobb M.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. Vol. 80. P. 3237—3240.
147. *Sasaki N., Rees—Jones R.W., Zick Y., Nissley S.P., Rechler M.M.* // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. № 17. P. 9793—9804.



148. *Satoh M., Yamazaki M.* // *J. Cell. Physiol.* 1992. Vol. 150. P. 134—139.
149. *Schlessinger J.* // *Trends Biochem. Sci.* 1980. Vol. 5. № 8. P. 210—214.
150. *Schlessinger J.* // *Trends Biochem. Sci.* 1988. Vol. 13. P. 443—447.
151. *Schlessinger J.* // In: *Oncogenes and growth control* / Eds. P.Kahn, T.Graft. Berlin: Spring-Verlag. 1988. P. 77—84.
152. *Schlessinger J.* // *Cellular Signaling by Tyrosine Phosphorylation.* / In: *Cellular Regulation by Protein Phosphorylation: Forty Years of Progress.* An ASBMB Satellite of the International Congress of Biochemistry. Seattle. Washington. August 22. 1997. P. 7.
153. *Schlessinger J., Ullrich A.* // *Neuron.* 1992. Vol. 9. P. 383—391.
154. *Sell S., Becker F.F.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 1978. Vol. 60. P. 19—26.
155. *Sharoni Y., Luzinizer L., Levy J.* // In: *20th Meeting FEBS.* Budapest, Hungary: Abstracts, 1990. P. 274 (P—Th149 abstr.).
156. *Shinozuka H., Kubo Y., Katyal S.L., Coni P., Leddacolumbano G.M., Columbano A., Nakamura T.* // *Lab. Invest.* 1994. Vol. 71. № 1. P. 35—41.
157. *Skou J.C.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. Vol. 23. P. 394—401.
158. *Skulachev V.P.* // *Canad. J. Biochem.* 1980. Vol. 58. P. 161—175.
159. *Skulachev V.P.* // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. № 4. P. 182—184.
160. *Skulachev V.P.* // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. № 11. P. 483—485.
161. *Slater E.C.* // *Compr. Biochemistry.* 1966. Vol. 14. P. 327—396.
162. *Smith E.L., Hill R.L., Lehman I.R., Lefkowitz R.J., Handler P., White A.* // *Principles of biochemistry: general aspects.* / N.Y.: McGraw—Hill. 1983. 339 p.
163. *Soltoff S.P., Mandel L.J.* // *Science.* 1983. Vol. 220. № 4600. P. 957—959.
164. *Songyang Z., Cantley L.C.* // *Trends Biochem. Sci.* 1995. Vol. 20. № 11. P. 470—475.
165. *Srere P.A.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1987. Vol. 56. P. 89—124.
166. *Stryer L.* // *Biochemistry.* 4<sup>th</sup> edition. N.Y.: W.H. Freeman and Company. 1995. P. 352.
167. *Sugarman B.J., Aggarwal B.B., Hass P.E., Figari I.S., Palladino M.A., Shepard H.M.* // *Science.* (Washington D.C.). 1985. Vol. 230. P. 943—945.
168. *Sun I.L., Crane F.L., Luy H., Morre D.J.* // *Fed. Proc.* 1985. Vol. 44. P. 413. (abstr.17).
169. *Sun I.L., Navas P., Crane F.L., Morre D.J., Luy H.* // *Biochem. Internat.* 1987. Vol. 14. №1. P. 119—127.
170. *Sun I.L., Navas P., Crane F.L., Morre D.J., Luy H.* // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 15915—15921.
171. *Sun I.L., Crane F.L., Grebing C., Luy H.* // *Exp. Cell. Res.* 1985. Vol. 156. № 2. P. 528—536.
172. *Sutherland E. W.* // *Science.* 1972. Vol. 177. № 4047. P. 401—408.
173. *Sutherland E. W., Rall T.W.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1957. Vol. 79. P. 3608.
174. *Sutherland E. W., Rall T.W.* // *Pharmacol. Rev.* 1960. Vol. 12. P. 265—300.
175. *Traxler P., Bold G., Buchdunger E., Capraro H.G., Collingwood S., Fabbro D., Furet P., Geiger Th., Imbach P., Mett H., Meyer Th., Ruetz St., Zimmermann J.* // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 1998. Vol. 3. № 3. P. 343.
176. *Tsong T.Y.* // *Trends Biochem. Sci.* 1989. Vol. 14. P. 89—92.
177. *Ullrich A., Schlessinger J.* // *Cell.* 1990. Vol. 61. P. 203—212.
178. *Vilcek J., Palomella V.J., Henriksen—DeStefano D., Swenson C., Feinman R., Hirai M., Tsujimoto M.* // *J. Exp. Med.* 1986. Vol. 163. № 3. P. 632—643.

179. *Vincentini L.M., Cervini R., Zippel R., Mantegazza P.* // FEBS Lett. 1988. Vol. 228. № 2. P. 346—350.
180. *Wahl M.I., Sweatt G., Carpenter G.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. Vol. 142. P. 688—695.
181. *Walker K.S., Alessi D., Cohen P.* // Cell. Regulation by Protein Phosphorylation: Forty Years of Progress. An ASBM Satellite of the Intern. Congress of Biochemistry. Seattle. Washington. Poster Session 4: Insulin Signalling Pathways. 1997. Vol. 1. P. 47. (P4—14 abstr.).
182. *Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G.* // J. Biol. Chem. 1968. Vol. 243. P. 3763—3765.
183. *Waters M.J., Daniel N., Bignon C., Djiane J.* // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. № 10 P. 5136—5143.
184. *Weinberg R.A.* // Trends Biochem. Sci. 1984. Vol. 9. № 4 (100). P. 27—32.
185. *Wilks A.F.* // Progr. Growth Factor Res. 1990. Vol. 2. № 2. P. 97—111.
186. *Wilson J.E.* // J. Teor. Biol. 1984. Vol. 111. № 4. P. 615—623.
187. *Yarden Y., Schlessinger J.* // Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 1434—1442.
188. *Yarden Y., Ullrich A.* // Annu. Rev. Biochem. 1988. Vol. 57. P. 443—478.
189. *Yu K.T., Czech M.P.* // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 5277—5286.
190. *Zamudio I., Canessa M.* // Biochim. Biophys. Acta. 1966. Vol. 120. P. 165—169.
191. *Zamudio I., Cellino M., Canessa-Fischer M.* // Arch. Biochem. Biophys. 1969. Vol. 129. P. 336—345.