

Полиненасыщенные жирные кислоты как сигнальные молекулы

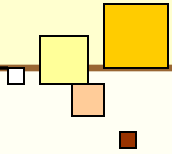
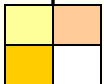
*Марина Глебовна
Сергеева*



Институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва
Семинар 15.02.2007

Полиненасыщенные жирные кислоты как сигнальные молекулы

- 1. Липидомика и липидология
- 2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные липиды: синтез, окисл. метаболизм, мишени
- 3. Фосфолипаза A2
- 4. Ядерные рецепторы (PPARs)
- 5. Использование биоинформатики и подходов системной биологии для анализа воспалительных процессов на уровне клеток



1. Липидомика и липидология

Липидомика - системный анализ липидов и взаимодействующих с ними молекул (белки, нуклеиновые кислоты, глутатион и т.п.).

Появление термина «липидомика»:

[98] Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res.* **2003**, 44(6):1071

Первая книга – 2005 г.

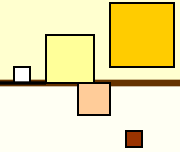
(Feng L and Prestwich GD (eds) **Functional Lipidomics** (Dekker-CRC, New York, 2005)

Появление термина «липидом»:

[20] Kishimoto K, Urade R, Ogawa T, Moriyama T. Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: suitable methods for "lipidome" analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**, 281(3):657

Существует около 1000 (4000) липидов; анализируют более 20 классов (около 95% от массы липидома)

1. Липидомика и липидология



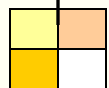
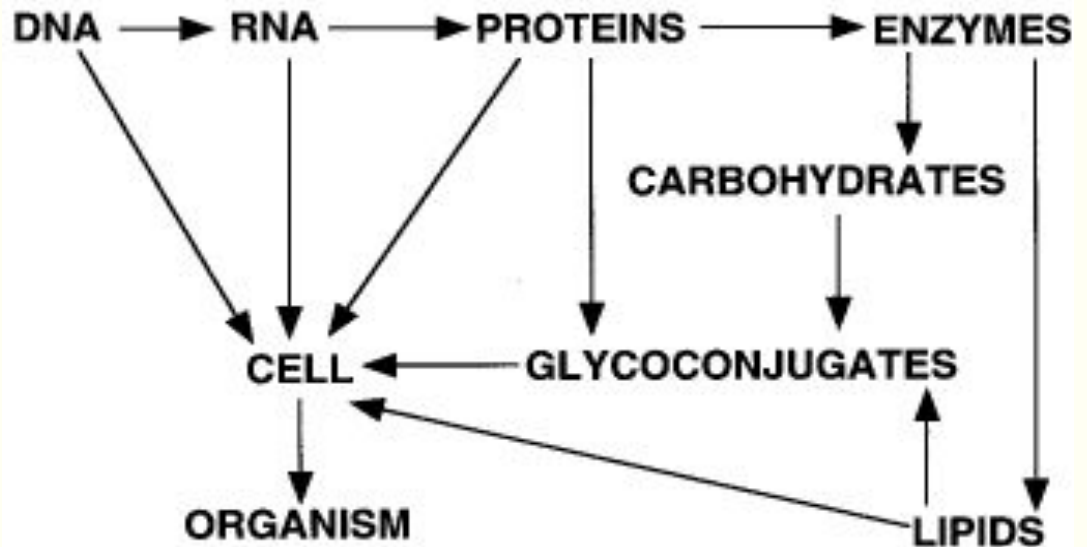
Интерес к липидомике связан с:

1. Изменение общих подходов к изучению клеток

Классическая парадигма:

DNA → RNA → PROTEIN → CELL → ORGANISM

Парадигма постгеномной эры:



1. Липидомика и липидология

Интерес к липидомике связан с:

2. Накоплением данных о нарушении метаболизма липидов при заболеваниях человека

Диабет, изб.вес и др. - ядерные рецепторы (PPAR)

Сердечно-сосудистые заболевания – простагландины и др. эйкозаноиды

Пролиферация клеток, миграция, апоптоз -

полиненасыщенные жирные кислоты,

простагландины и др. эйкозаноиды

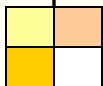
NSAIDs

(3-фосфоинозиды; церамиды; сфингозин-1 фосфат; лизофосфолипиды)

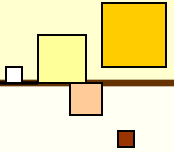
Нейродегенеративные заболевания, шизофрения, депрессия

полиненасыщенные жирные кислоты

Астма – лейкотриены (lukasts + пак)



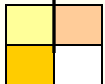
1. Липидомика и липидология



**Интерес к липидомике связан с:
3. Созданием методов, позволяющих анализировать
разнообразные липиды**

ESI/MS; LC/MS/MS

Lipid arrays ([ссылка](#))



1. Липидомика и липидология

Липидология

Интерфазный катализ (sPLA2)

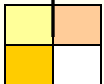
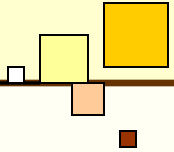
Формирование мембран

Липиды мембран как предшественники сигнальных молекул

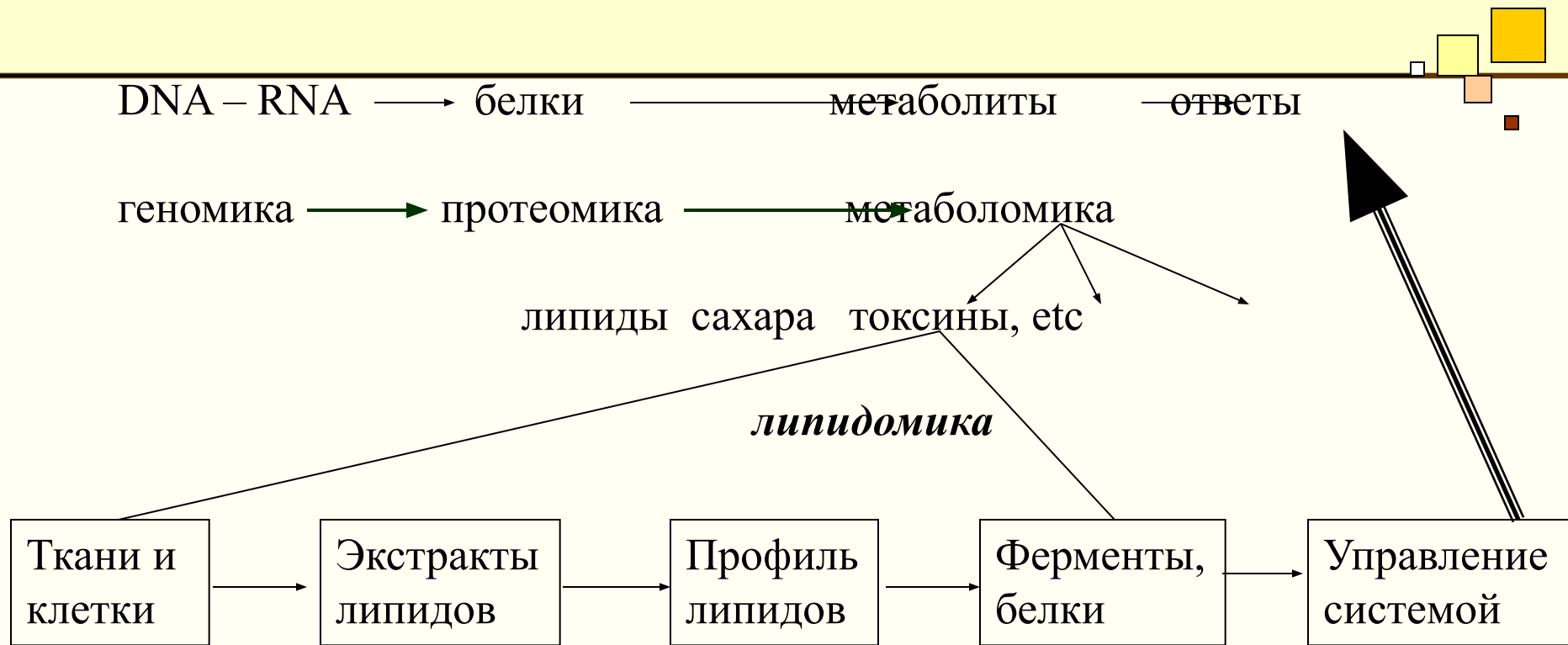
Липид-белковые взаимодействия

«Липидно-аналитические работы» - диагностические цели

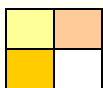
Т.е. структурная и сигнальная липидомика



1. Липидомика и липидология



Место липидомики среди других «-омик»



1. Липидомика и липидология



2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

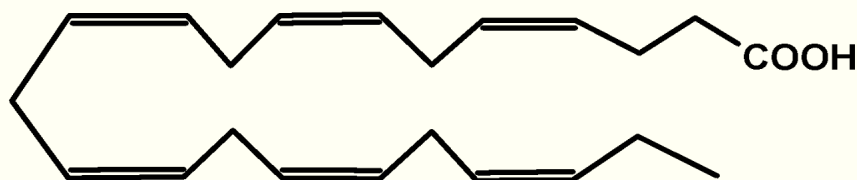
n-7

пальмитоеновая
16:1 ω 7

n-9

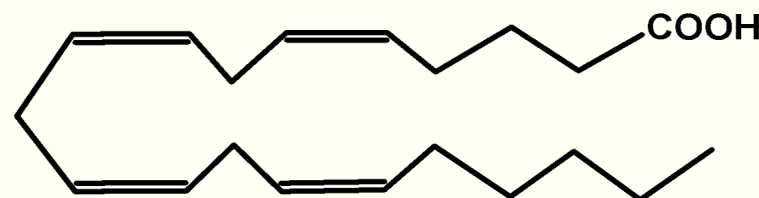
олеиновая
18:1 ω 9

n-3



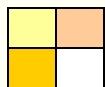
докозагексаеновая
22:6 ω 3
рыба

n-6

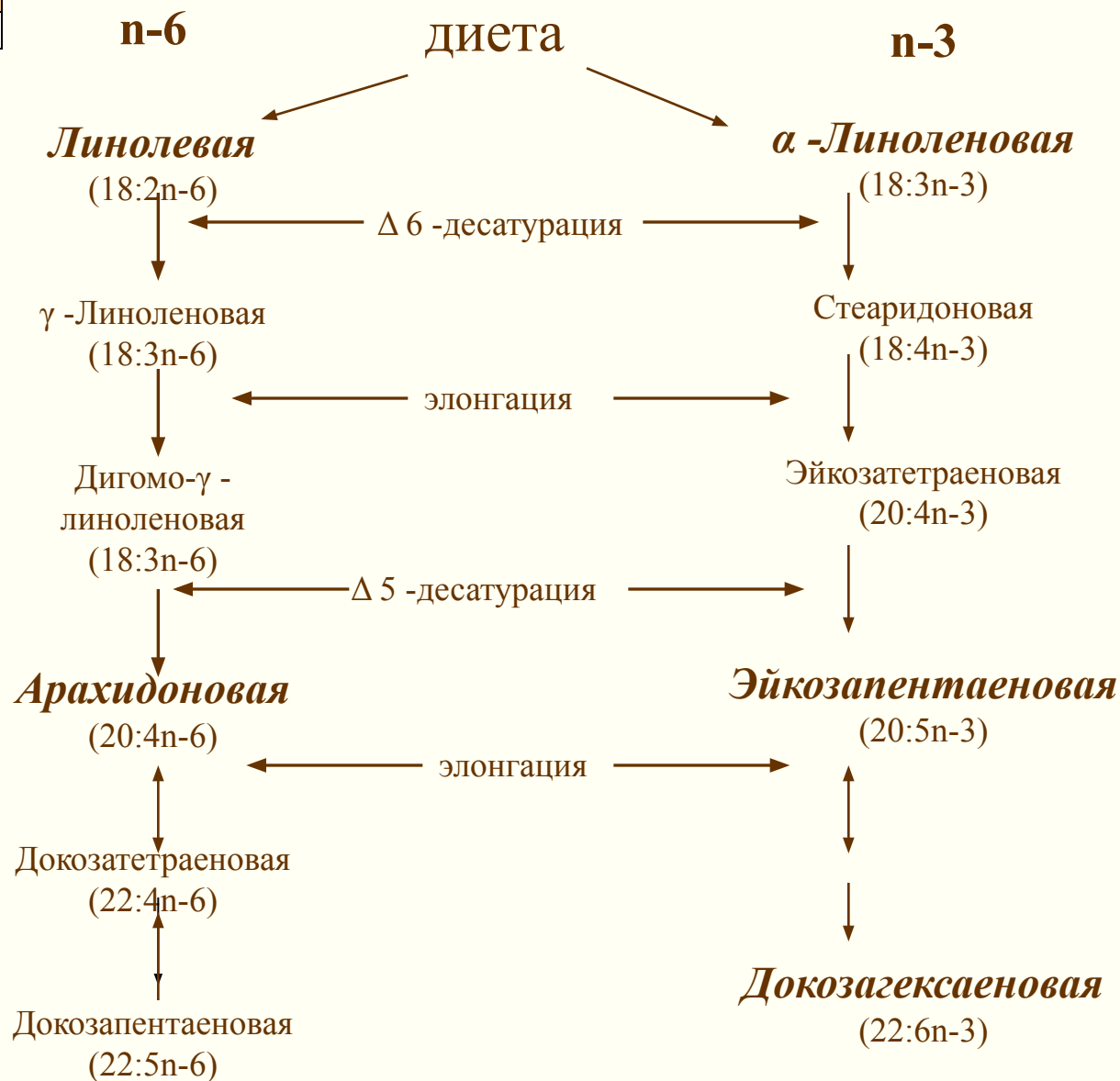


арахидоновая
20:4 ω 6
мясо, яйца

Сердечно-сосудистые заболевания, воспаление, травмы мозга
психозы, шизофрения, нейродегенеративные заболевания



Синтез ненасыщенных жирных кислот



Тромбоциты:
[AA]_о = 5 мМ

1% - 50 μМ (св)

Лейкоциты:
0,1-1 μМ (св)

Островки Лангерганса:
15 μМ (св)

[AA]_{внекл} = 1-10 μМ

ДНА~50% клетки мозга

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

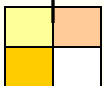
Молекулярная эволюция элонгаз и десатураз человека

	ELOVL1	ELOVL2	ELOVL4	ELOVL5	ELOVL7	ELOVL3	ELOVL6	FADS1	FADS2	FADS3	FADS6
Homo sapiens	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Mus musculus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Rattus norvegicus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Canis familiaris	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Bos taurus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Gallus gallus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	no	1 protein	3 proteins	1 protein		1 protein
Danio rerio	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	no	1 protein	1 protein			1 protein
Takifugu rubripes	1 protein	no	1 protein	1 protein	1 protein	no	1 protein	no			1 protein
Ciona intestinalis	2 proteins						1 protein	1 protein			
Strongylocentrotus purpuratus	1 protein						2 proteins	2 proteins			no
Drosophila melanogaster	2 proteins						1 protein	no			
Anopheles gambiae	2 proteins						1 protein	no			
Apis mellifera	3 proteins						1 protein	no			
Tribolium castaneum	3 proteins						1 protein	no			
Caenorhabditis elegans	3 proteins							2 proteins			
Saccharomyces cerevisiae	3 proteins							no			
Schizosaccharomyces pombe	2 proteins							no			
Dictyostelium discoideum	2 proteins							3 proteins			
Arabidopsis thaliana	2 proteins							2 proteins			
Trypanosoma cruzi	1 protein						2 proteins	1 protein			
Entamoeba histolytica	no							no			
Encephalitozoon cuniculi	no							no			

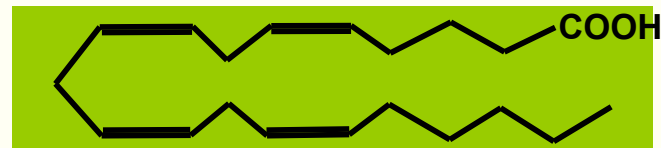
2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

Сигнальные эффекты липидных медиаторов

- 1) сигнал проводится через классические G-белок связывающие рецепторы плазматических мембран;
- 2) сигнал проводится через различные внутриклеточные мишени:
 - а) глутатион;
 - б) белки-участники проведения внутриклеточных сигналов (например, модуляция арахидоновой кислотой активности протеинкиназы C);
 - в) G-белок связывающие рецепторы, локализованные на ядерных мембранах;
 - г) факторы транскрипции, которые связываются с нуклеиновыми кислотами и регулируют экспрессию клеточных белков.



Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



NSAIDs

PGH-синтаза
(циклооксигеназа)

PGH_2

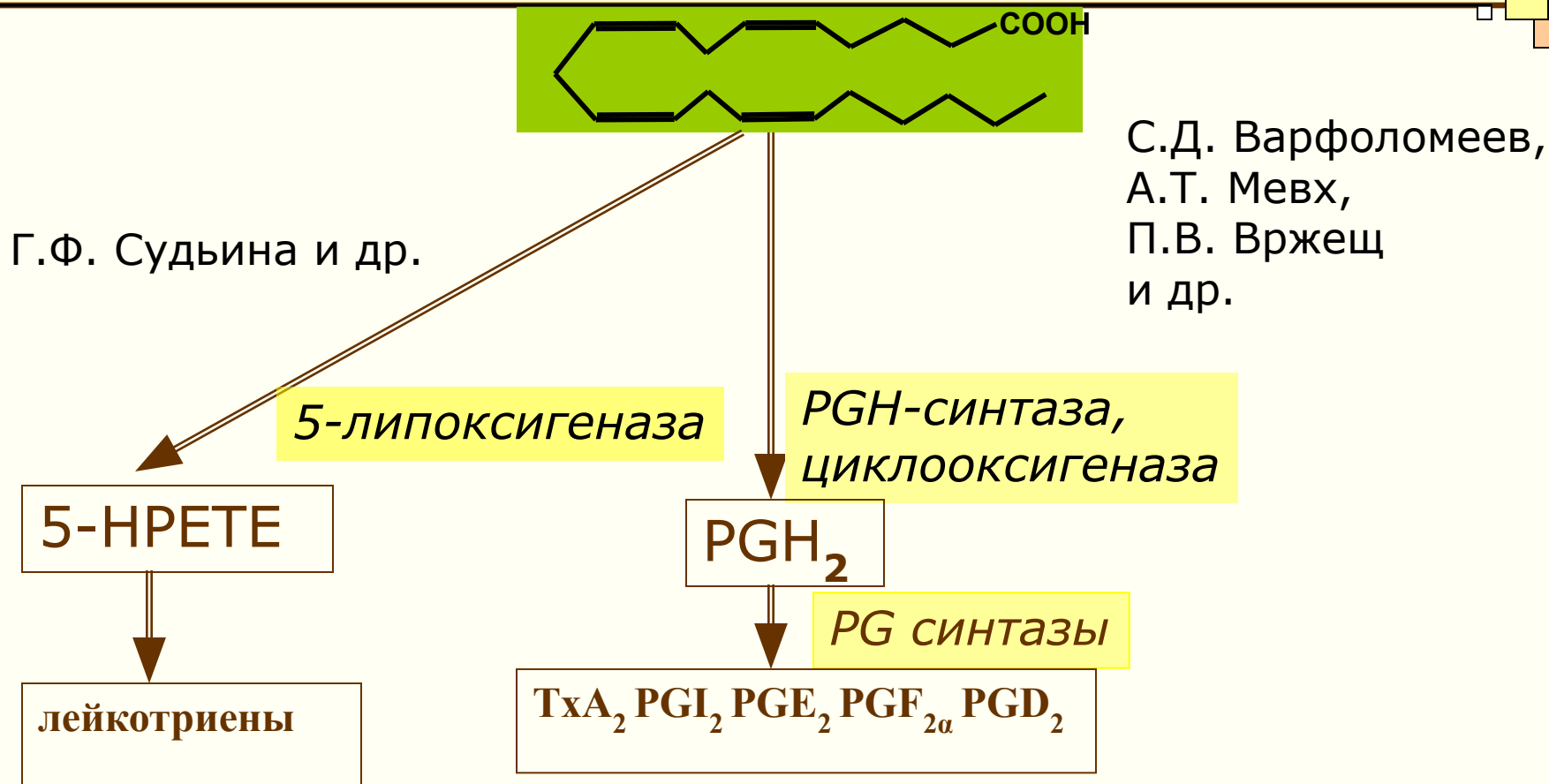
PG синтазы

TxA_2 PGI_2 PGE_2 $PGF_{2\alpha}$ PGD_2

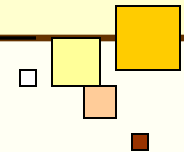
Агрегация тромбоцитов и др. эффекты

С 1978 г.
С.Д. Варфоломеев,
А.Т. Мевх,
Г.Ф. Судьина,
П.В. Вржещ
и др.

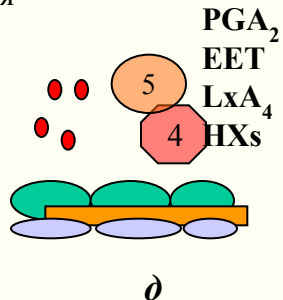
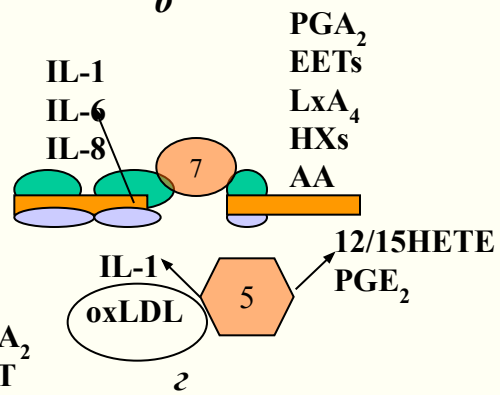
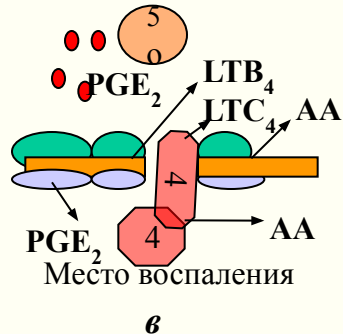
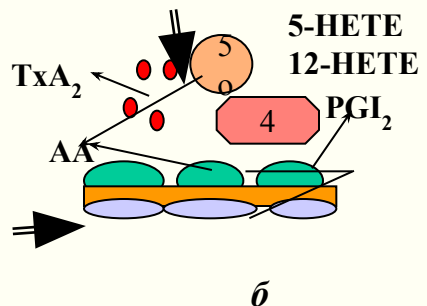
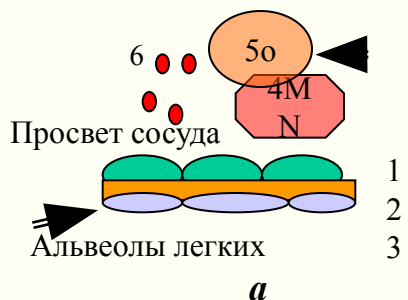
2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

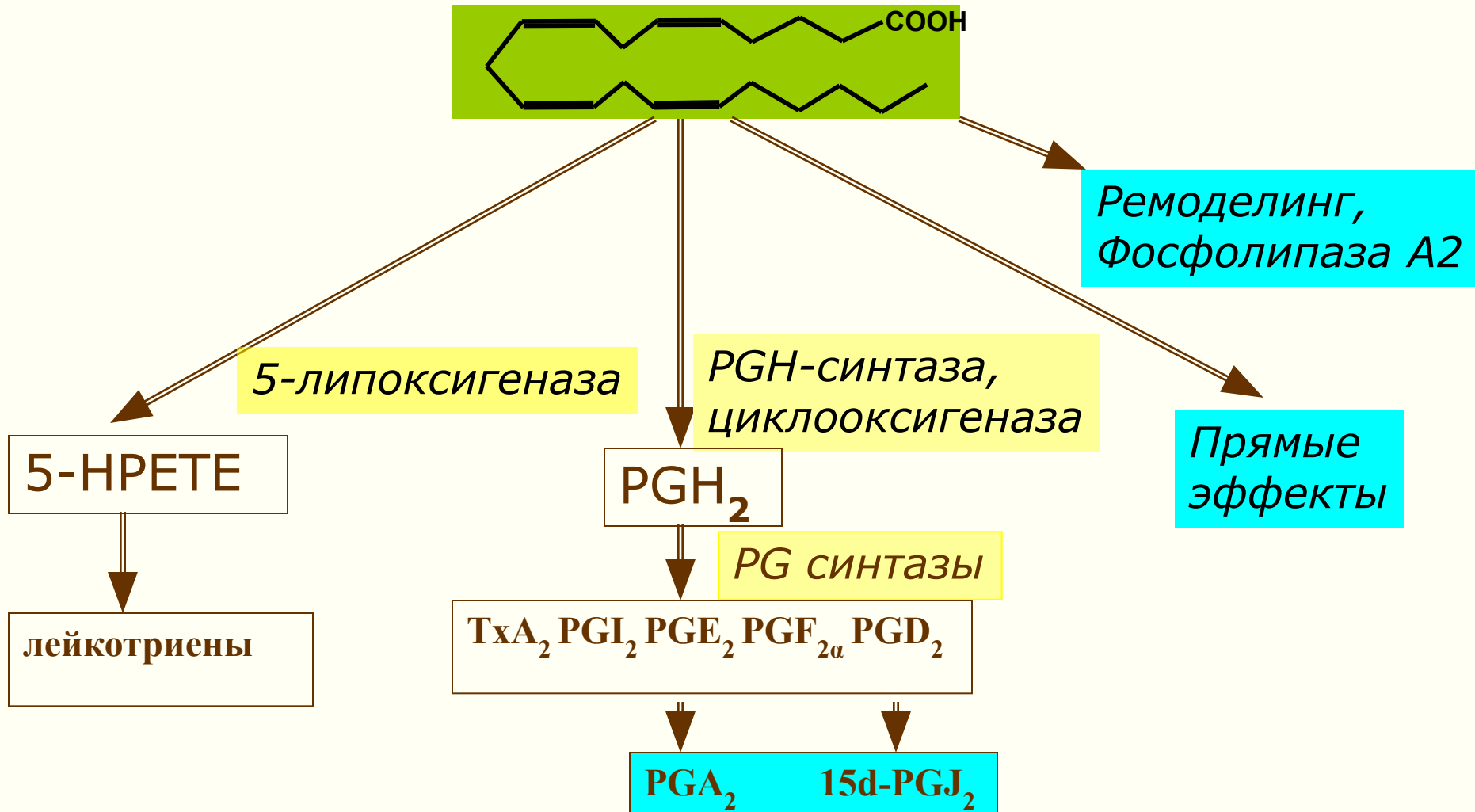


Физическое воздействие,
Тромбин, $TNF\alpha$, АФК, $IL-1\beta$

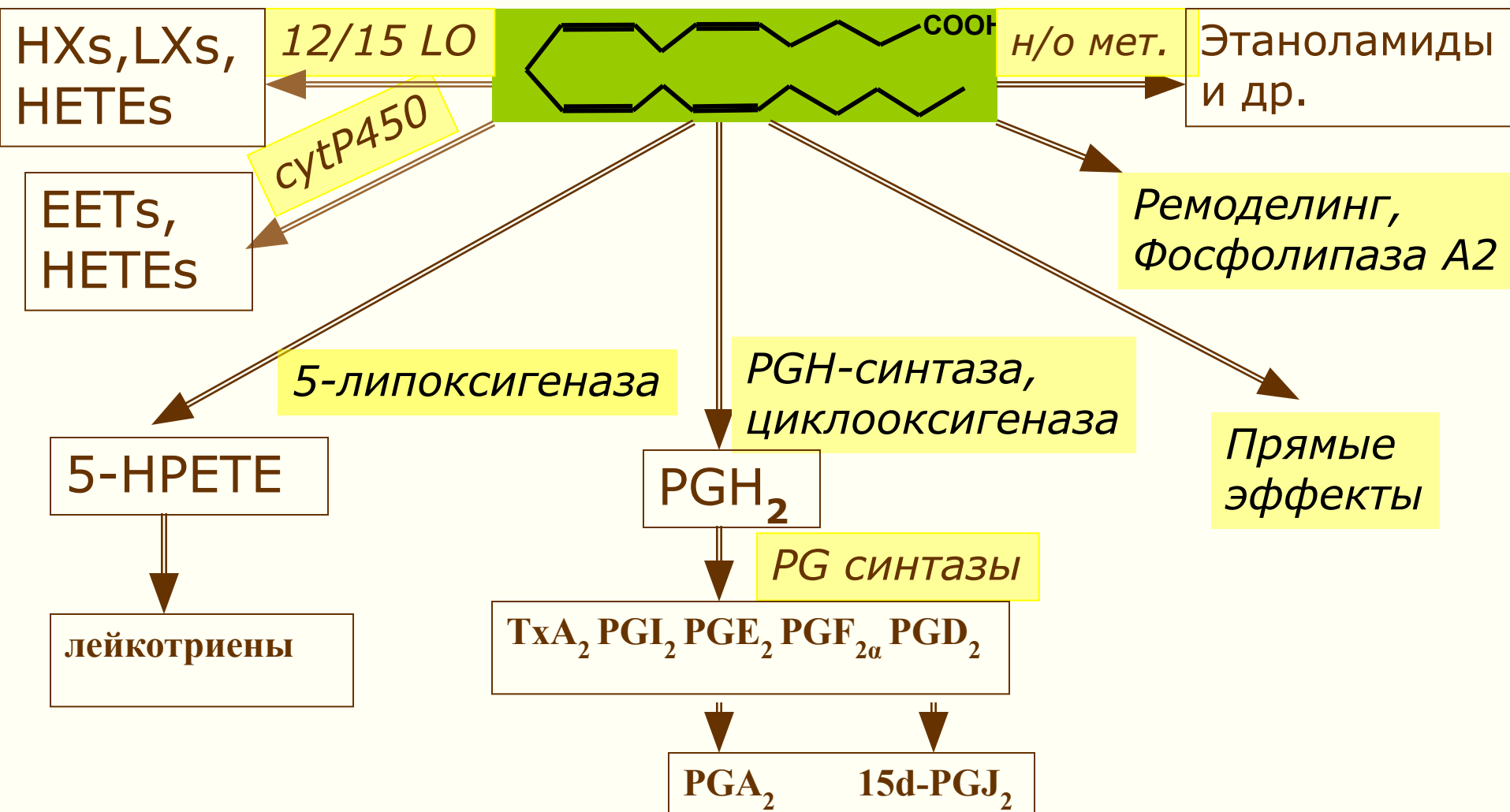


Участие
компонентов
каскада
арахидоновой
кислоты
в регуляции
воспалительного
процесса в легких

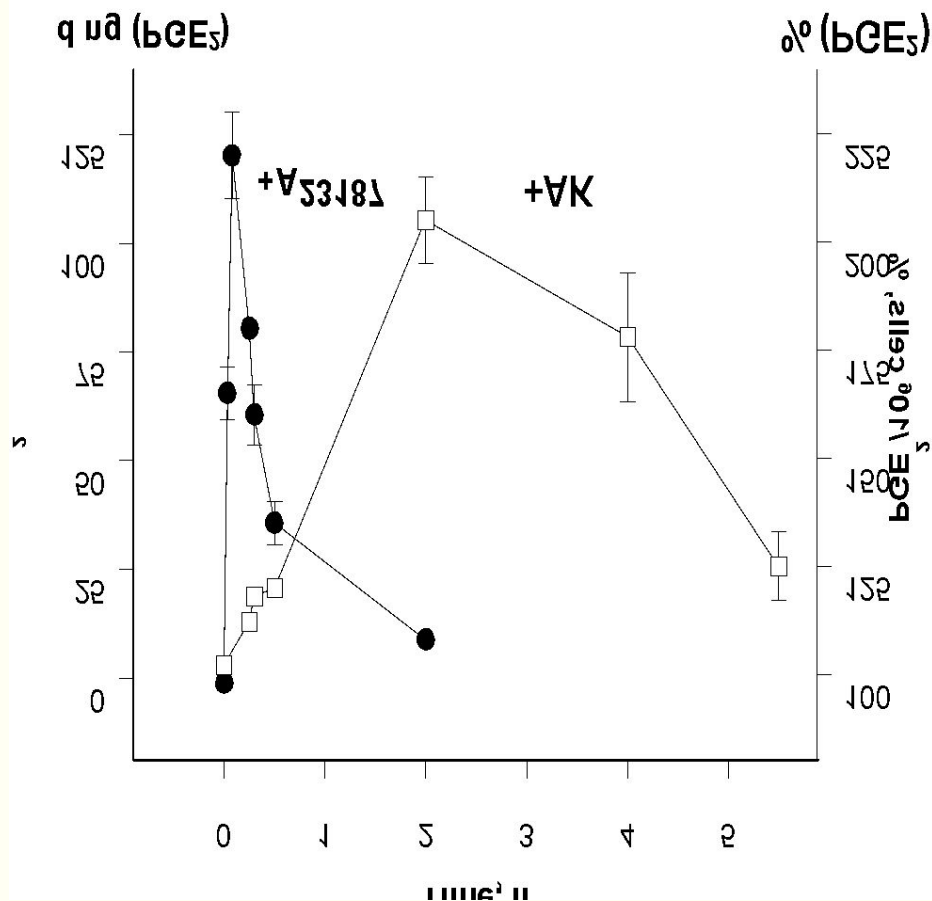
2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

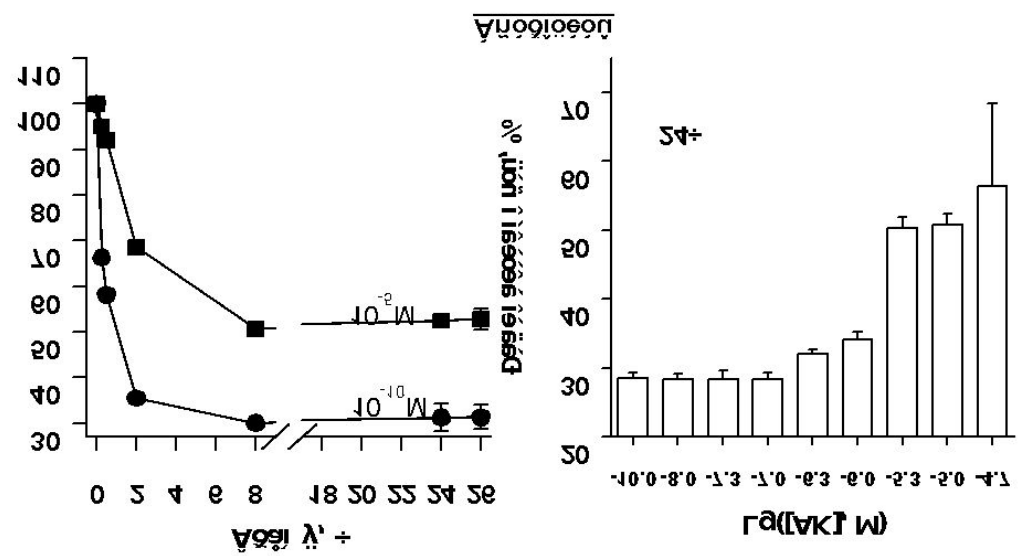
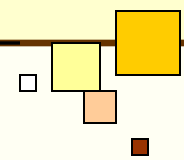


5 μM A23187; 10 μM AA

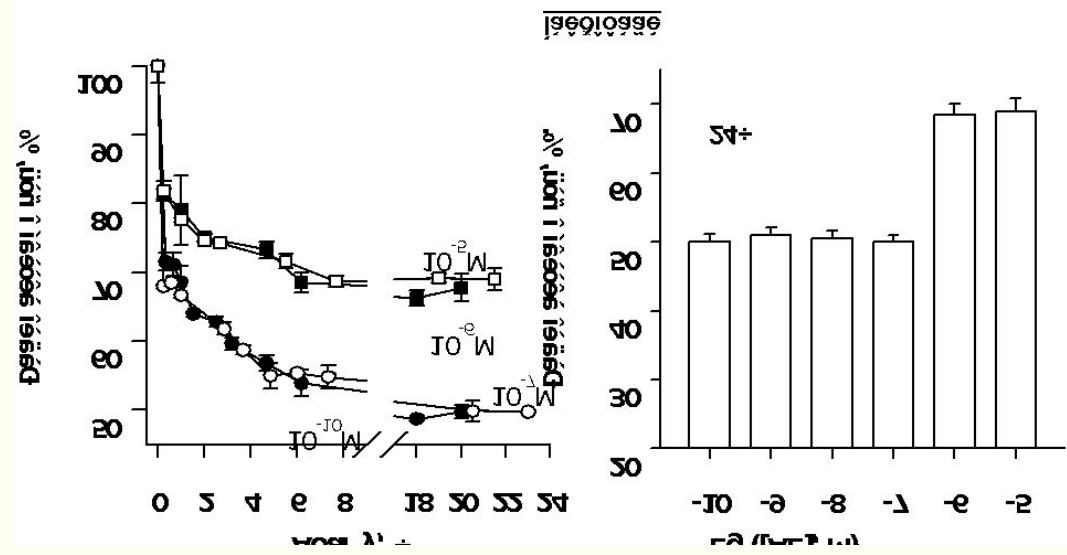
Источники арахидоновой кислоты (АК) при синтезе простаноидов макрофагами

- Эндогенная АК (из внутриклеточных пулов) - субстрат PGH-синтазы;
- Экзогенная АК - регулятор синтеза простаноидов.

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



Новое равновесие в клетках при микромолярных концентрациях арахидоновой кислоты во внеклеточной жидкости

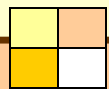


2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

Экзогенная арахидоновая кислота как регулятор клеточных функций

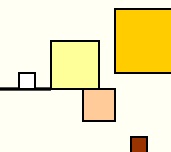
- как меняется чувствительность клеток к провоспалительным веществам в присутствии экзогенной арахидоновой кислоты (1-10 μM)?
- как арахидоновая кислота влияет на метаболизм внутриклеточной арахидоновой кислоты и синтез простагландинов?
- как взаимосвязаны арахидоновая, докозагексаеновая и другие полиеновые жирные кислоты в регуляции функций клеток?
- как арахидоновая кислота влияет на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках?

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



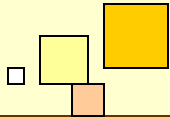
АСТРОЦИТЫ – удобная модель:

- **имеют рецепторы к нейротрансмиттерам**
(гистамин, аденозин, АТФ, ацетилхолин и др);
- **синтезируют при активации TNF- α , интерлейкины, АТФ и др.;**
- **синтезируют 20:4n-6 и 22:6n-3 кислоты, простагландины;**
- **физиологические концентрации агонистов вызывают осцилляции $[Ca^{2+}]_i$; блокада осцилляций разобщает связь между клетками**



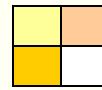
Астроциты как активные партнеры во взаимосвязи с нейронами и эндотелиальными клетками сосудов

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



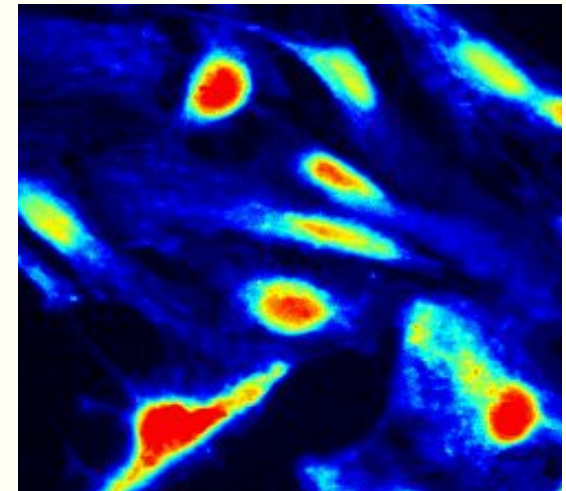
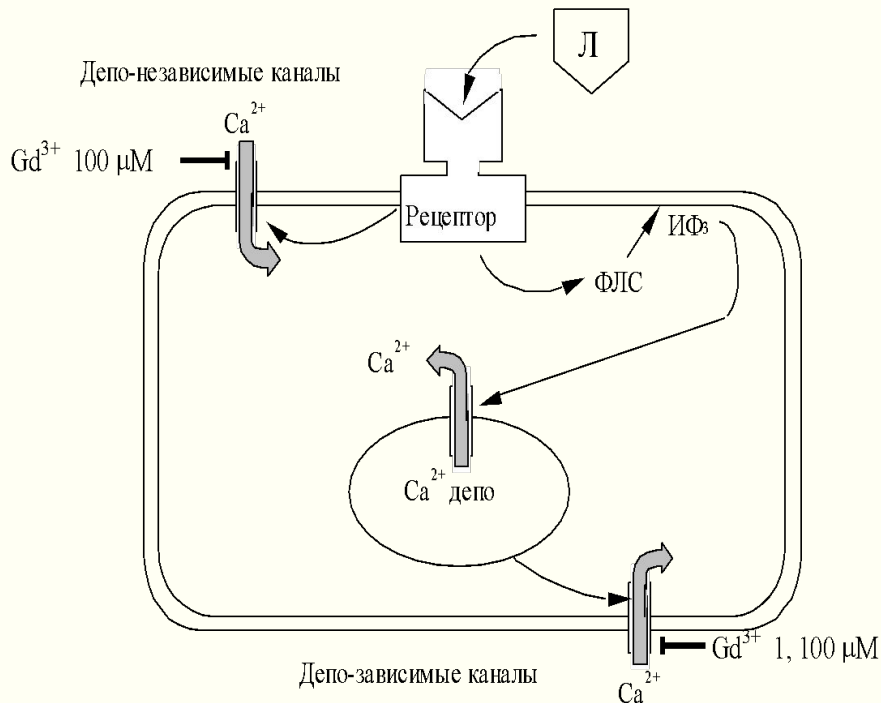
Регуляция концентрации внутриклеточного кальция в астроцитах

Пути появления Ca^{2+} в цитоплазме клеток при активации рецепторов



ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Сравнить специфичность действия внеклеточных кислот (20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3) на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах

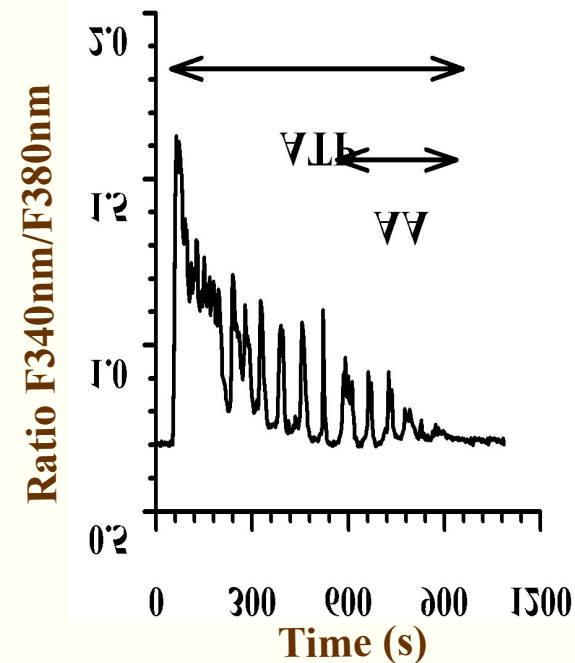


2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

Экзогенная арахидоновая кислота:
блокирует осцилляции $[Ca^{2+}]_i$;

AA=DHA=EPA

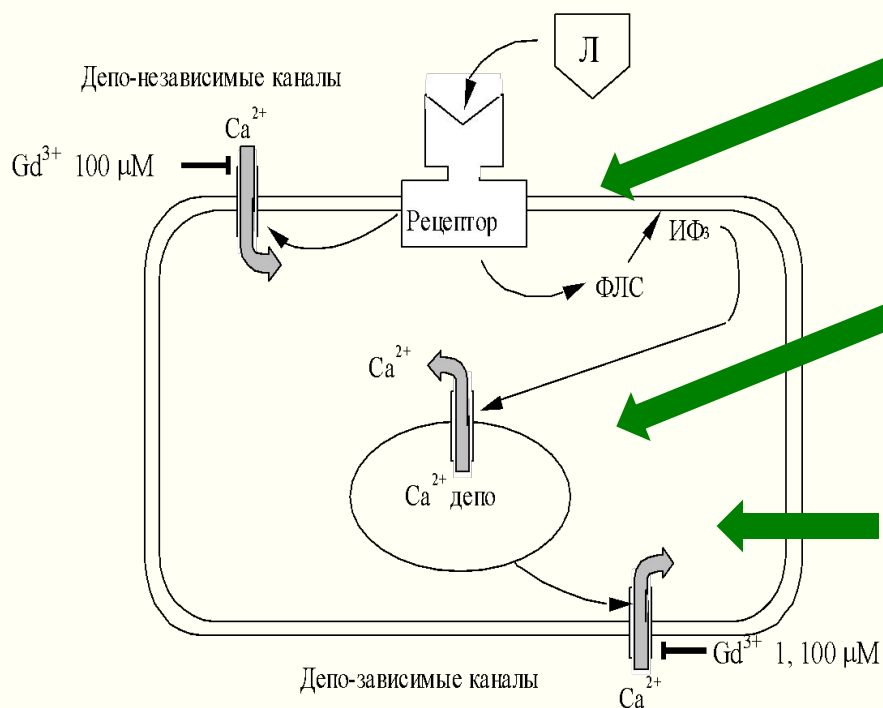
астроциты



Sergeeva M. et al (2003) Cell Calcium. 33(4)283

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

Влияние ПЖК на вход кальция



Первичный ответ на действие агониста (амплитуда ответа) снижается

+ Ca^{2+} 25% AA = DHA, 0% EPA

- Ca^{2+} 25% AA = DHA, 0% EPA

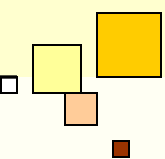
Содержание Ca^{2+} в депо (амплитуда) снижается
55% AA, 40% DHA, 0% EPA

Депо-зависимый вход Ca^{2+} (амплитуда) снижается

Агонист: 65% AA, 45% DHA, 0% EPA

SERCA ингибиторы: 50% AA, 50% DHA, 30% EPA

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы



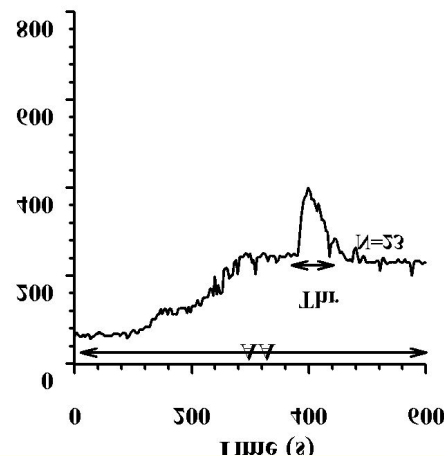
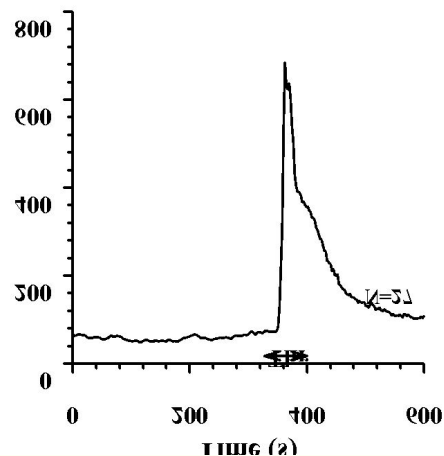
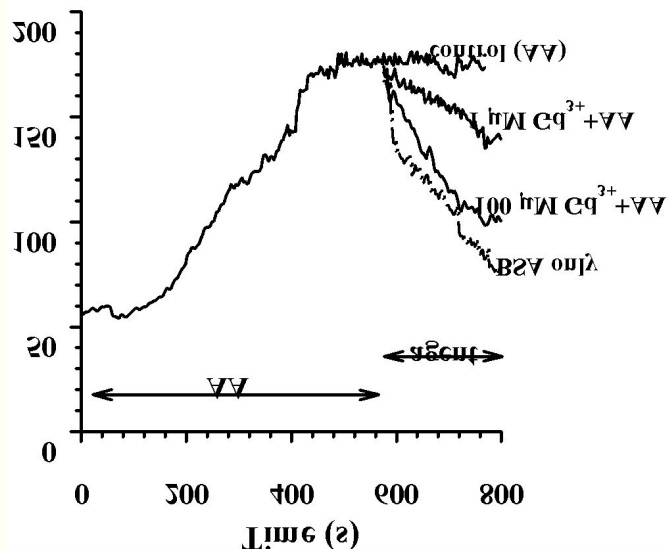
+ Ca^{2+}

$[\text{Ca}^{2+}]_i = 150 \text{ nM}$ AA=DHA

$[\text{Ca}^{2+}]_i = 60 \text{ nM}$ EPA

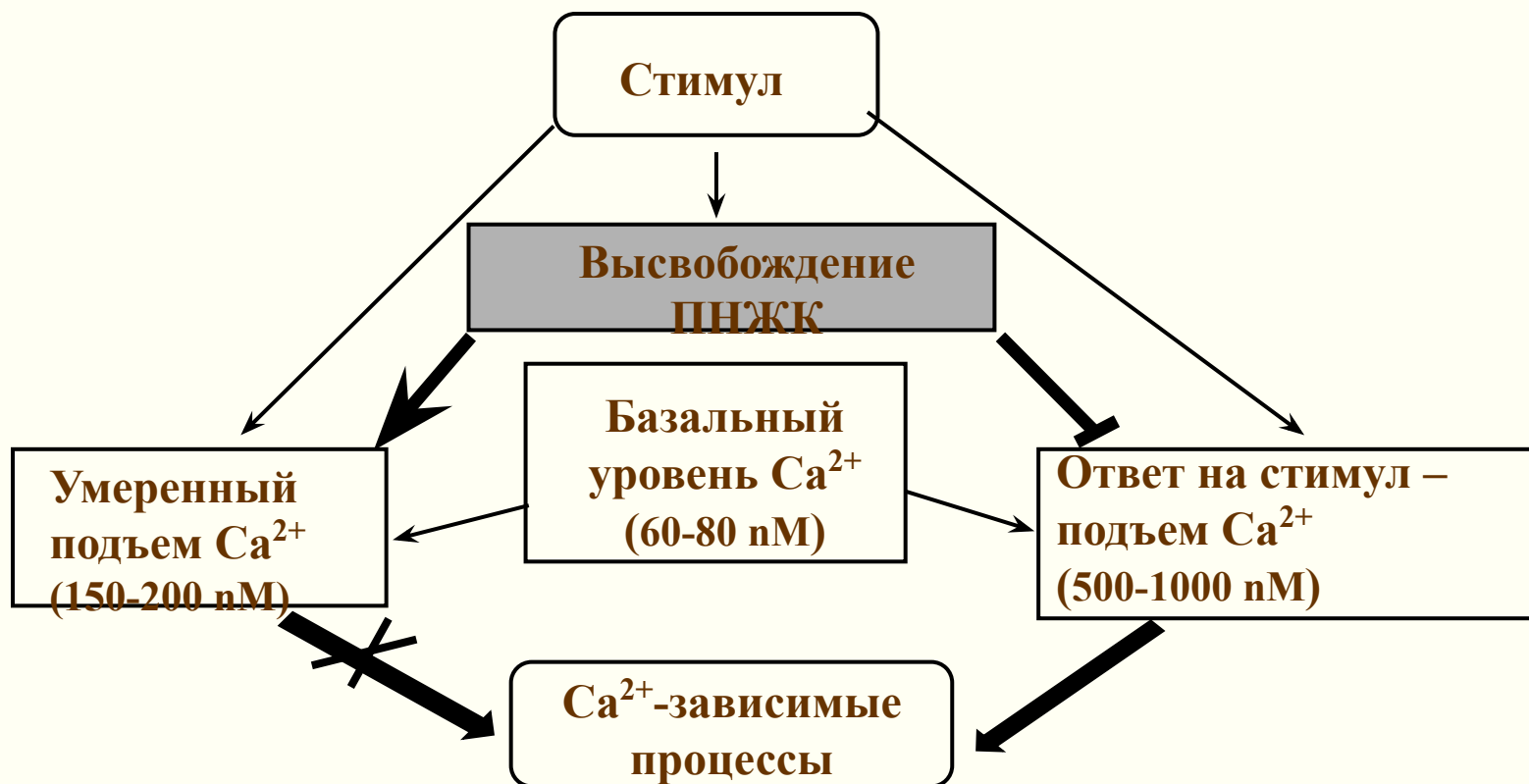
- Ca^{2+} не влияют

**УСТАНОВЛЕНИЕ НОВОГО УРОВНЯ $[\text{Ca}^{2+}]_i$
снижает чувствительность клеток к
дальнейшему стимулированию
AA=DHA > EPA**



2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

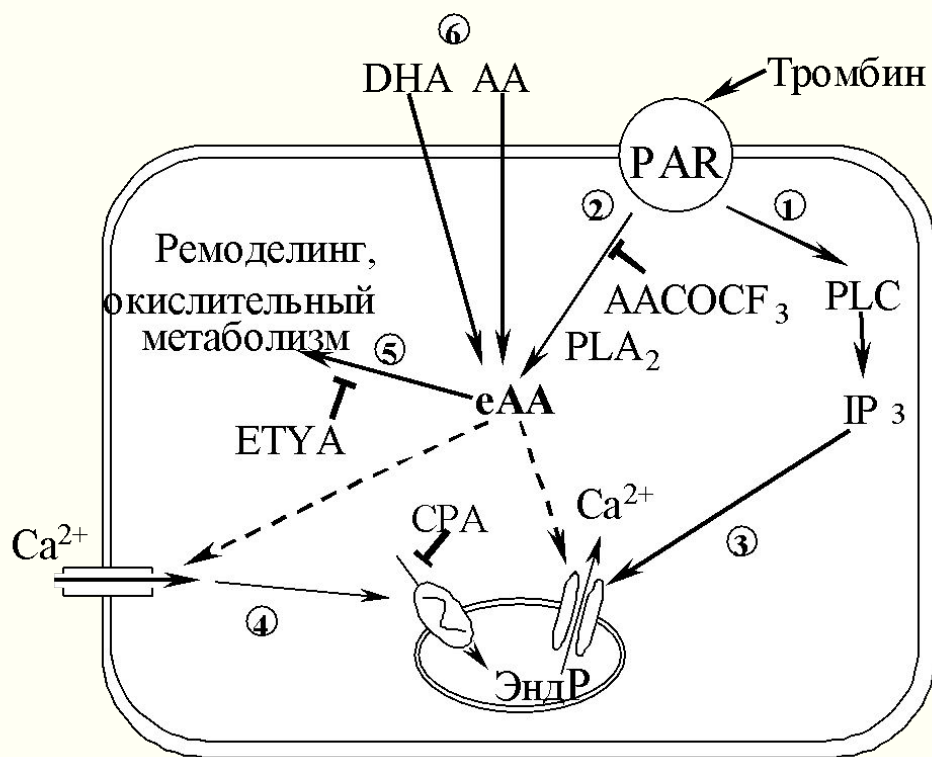
ПЖК ПРИНИМАЮТ УЧАСТИЕ В УСТАНОВЛЕНИИ НОВОГО УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ В АСТРОЦИТАХ – НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ ФУНКЦИЯ



- Как меняется система регуляции внутриклеточного кальция при воспалениях?

2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

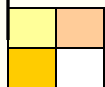
Регуляция ПЖК внутриклеточного кальция в астроцитах



→
Экзогенные

20:4n-6 (AA) и 22:6n-3 (DHA) кислоты **высвобождают эндогенную AA - положительная регуляция;**

→
Эндогенная AA ингибирует агонист-стимулированный подъем **[Ca²⁺]_i** на стадиях входа кальция и его высвобождения из депо - **отрицательная регуляция.**



2. Арахидоновая кислота и другие полиеновые жирные кислоты как сигнальные молекулы

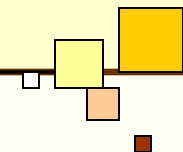
Экзогенная арахидоновая кислота (АК) как регулятор клеточных функций

- меняется чувствительность клеток к провоспалительным веществам в присутствии экзогенных кислот ДГК (22:6n-3), АК (1-10 μМ) - снижается;

арахидоновая кислота влияет на $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах – нейропротекторная функция АК и ДГК;

- экзогенная АК влияет на метаболизм внутриклеточной АК и синтез простагландинов – активирует через высвобождение эндогенной АК, ДГК стимулирует высвобождение АК

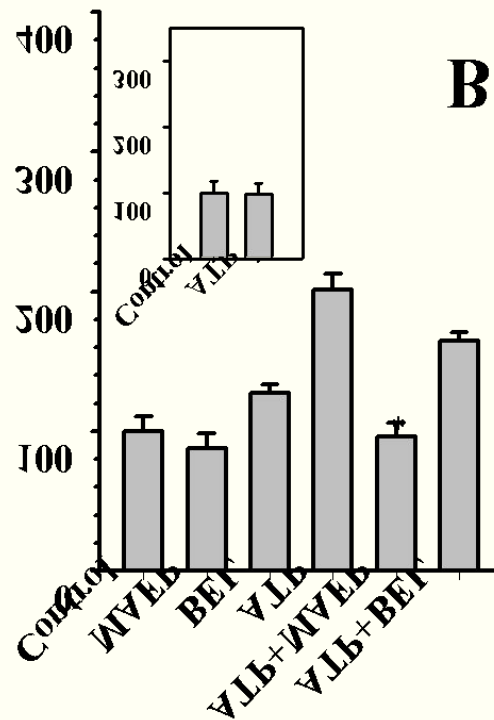
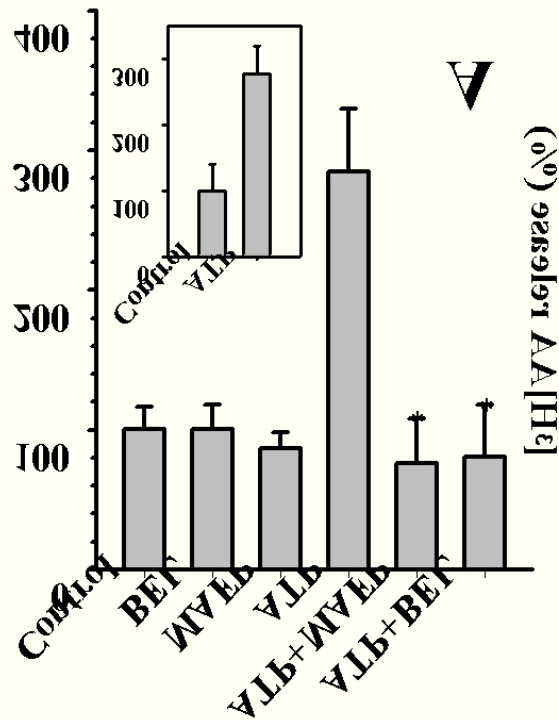
3. Фосфолипаза A2



	PLA2G1B	PLA2G2A	PLA2G2E	PLA2G2D	PLA2G5	PLA2G2F	PLA2G10	PLA2G3	PLA2G7	PLA2G12A	PLA2G12B
Homo sapiens	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Mus musculus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Rattus norvegicus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	2 proteins	1 protein
Canis familiaris	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Bos taurus	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	2 proteins	1 protein	1 protein	1 protein
Gallus gallus	2 proteins	1 protein	1 protein	1 protein		no	no	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Danio rerio	1 protein	no	no	no	no	no	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Takifugu rubripes	2 proteins	no	no	no	no	no	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein	1 protein
Ciona intestinalis				2 proteins				no	2 proteins		no
Strongylocentrotus purpuratus				6 proteins				no	no		no
Drosophila melanogaster				1 protein				1 protein	no	1 protein	
Anopheles gambiae				1 protein				1 protein	no	1 protein	
Apis mellifera				1 protein				1 protein	no	1 protein	
Tribolium castaneum				1 protein				1 protein	1 protein	1 protein	
Caenorhabditis elegans				3 proteins				no	no		no
Saccharomyces cerevisiae				no				no	no		no
Schizosaccharomyces pombe				no				no	1 protein		no
Dictyostelium discoideum				no				no	no		no
Arabidopsis thaliana				no				no	no		no
Trypanosoma cruzi				no				no	1 protein		no
Entamoeba histolytica				no				no	no		no
Encephalitozoon cuniculi				no				no	no		no

3. Фосфолипаза A2

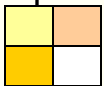
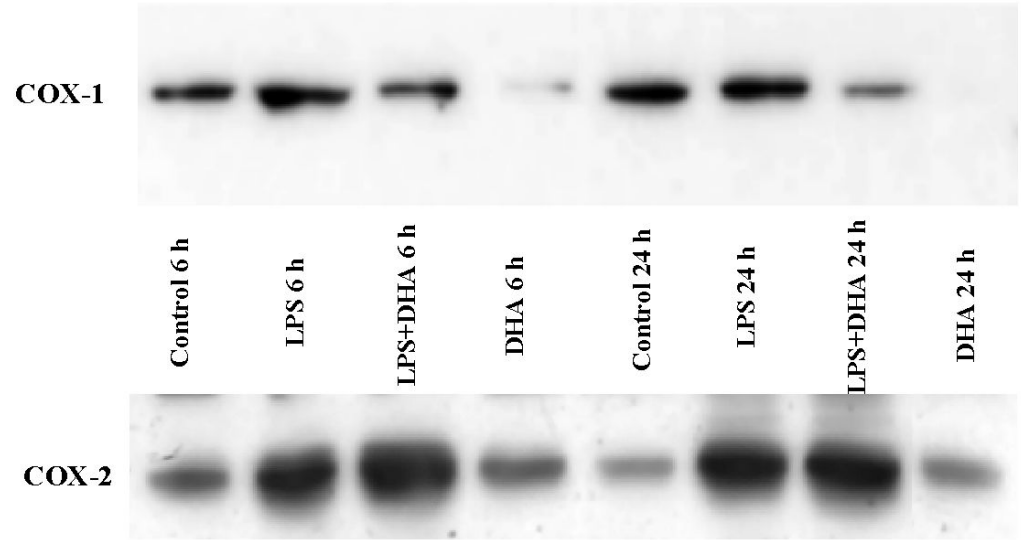
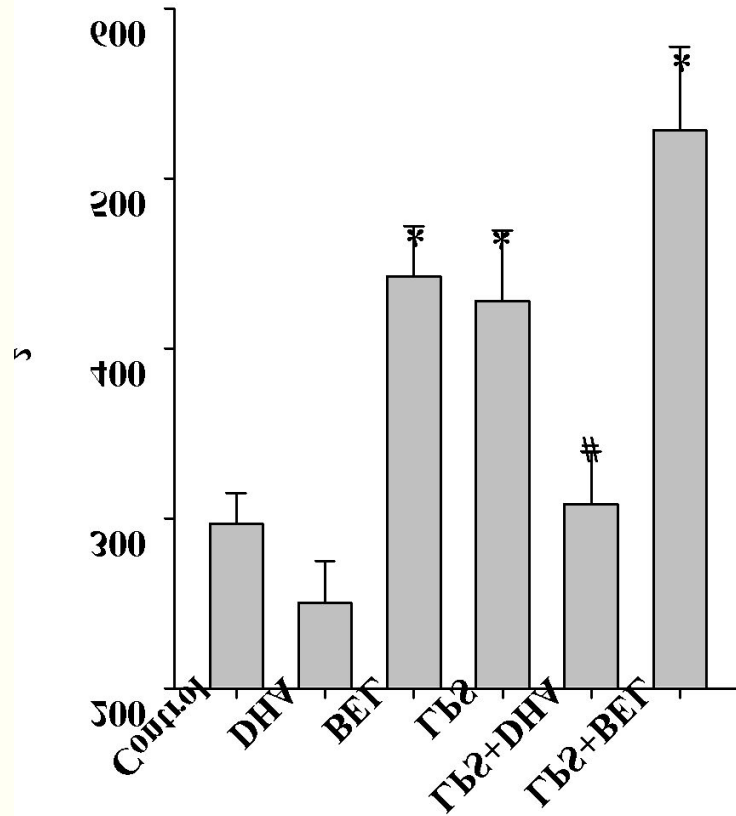
Какая фосфолипаза отвечает за высвобождение эндогенных ПЖК



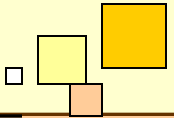
Высвобождение арахидоновой и докозагексаеновой кислот регулируются сPLA2 и iPLA2

3. Фосфолипаза A2

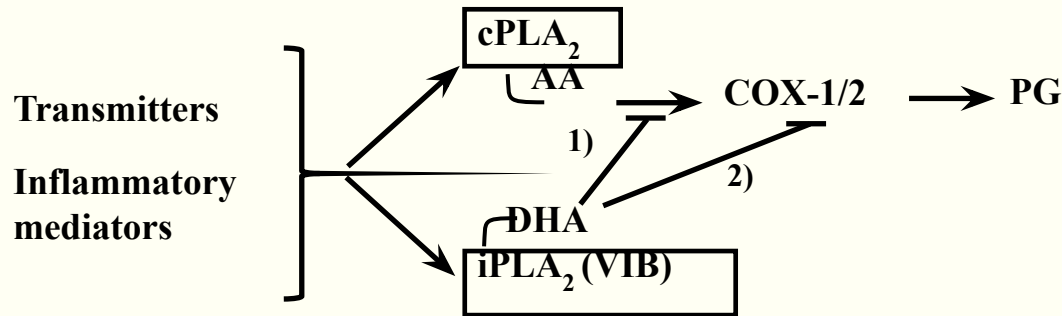
Экзогенная и эндогенная докозагексаеновая кислота ингибирует синтез простаноидов



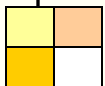
3. Фосфолипаза A2



Новая функция iPLA2 (VIB) – регуляция синтеза простаноидов



- Как независимо регулировать активацию cPLA₂ и iPLA₂?
- Какие изменения в активности ферментов происходят при патофизиологических процессах в мозге?



4. Ядерные рецепторы (PPARs)

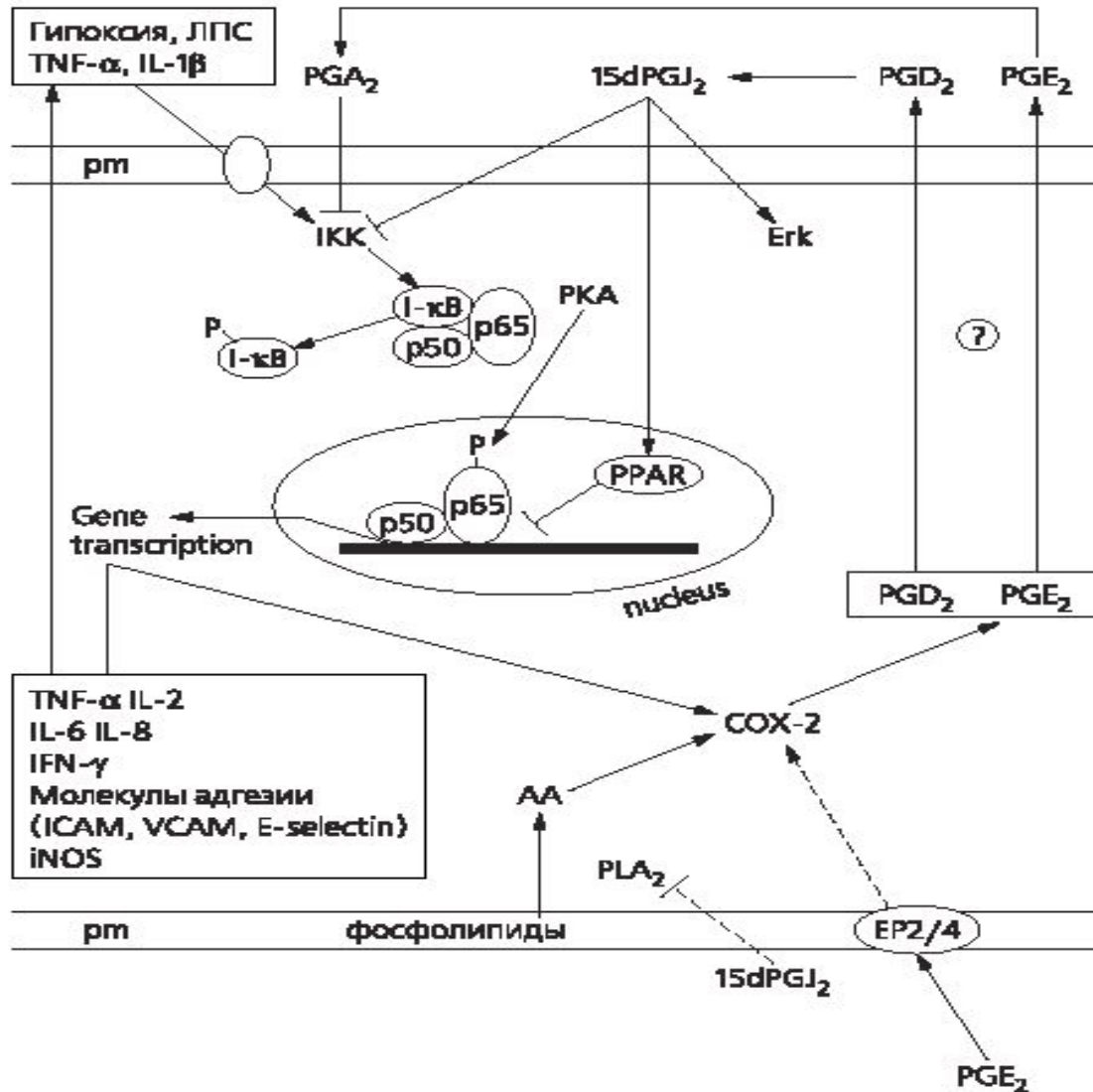
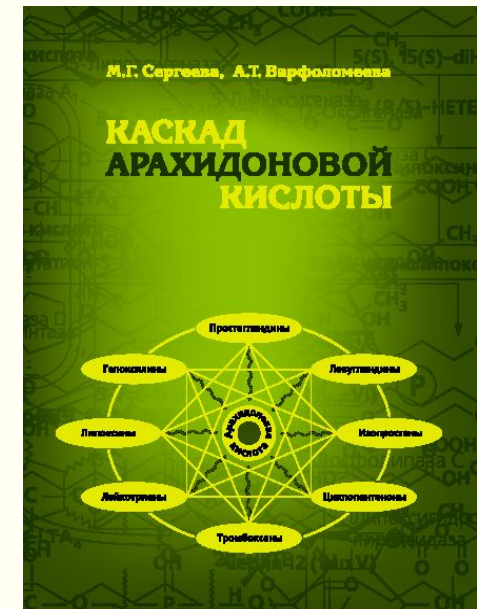


Рис. 9.5. Возможные пути реализации эффектов циклопентеновых простагландинов



4. Ядерные рецепторы (PPARs)

Свойства PPAR

PPARs – лиганд-чувствительные факторы транскрипции суперсемейства ядерных рецепторов. Известно: α , β/δ , and γ

PPARs может образовывать гетеродимеры с рецепторами ретиноидной кислоты (RXRs), связываться с «PP-response elements» (PPRE) и регулировать транскрипцию различных генов (преимущественно активация)

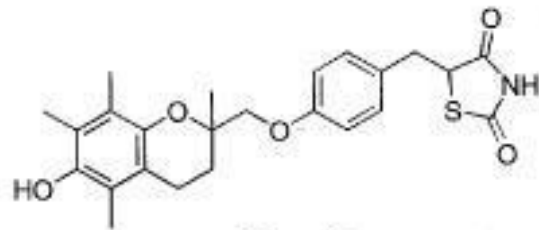
PPAR γ человека экспрессируется в адипоцитах, а также селезенка, мозг, печень, скелетные мышцы и др.

Природные и синтетические агонисты PPAR γ регулируют дифференцировку адипоцитов, гомеостаз глюкозы, воспалительные ответы

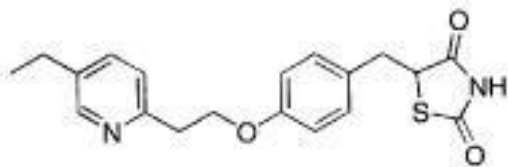
4. Ядерные рецепторы (PPARs)

Структуры лигандов PPAR

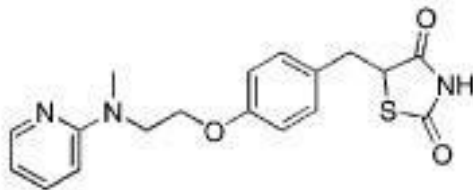
Synthetic



Troglitazone

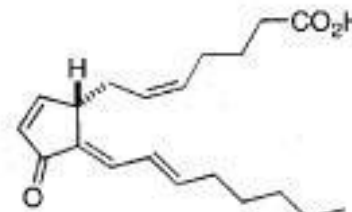


Pioglitazone

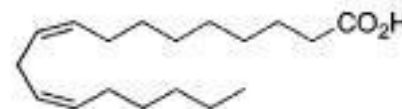


Rosiglitazone

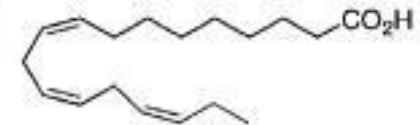
Natural



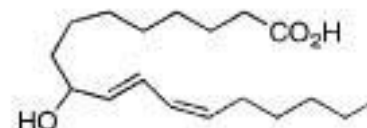
15d-PGJ₂



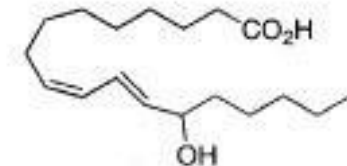
Linoleic acid



Linolenic acid

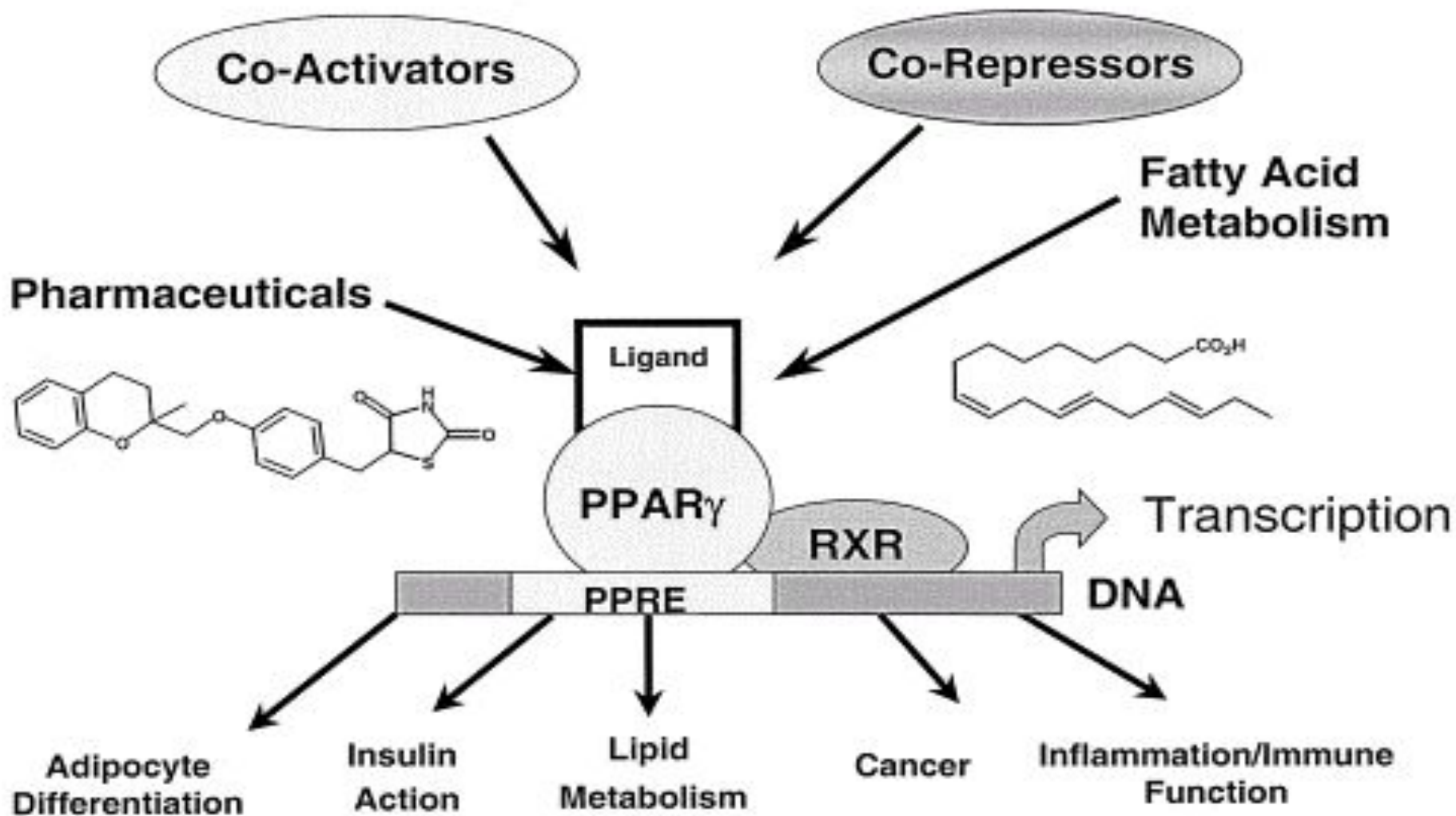


9-HODE

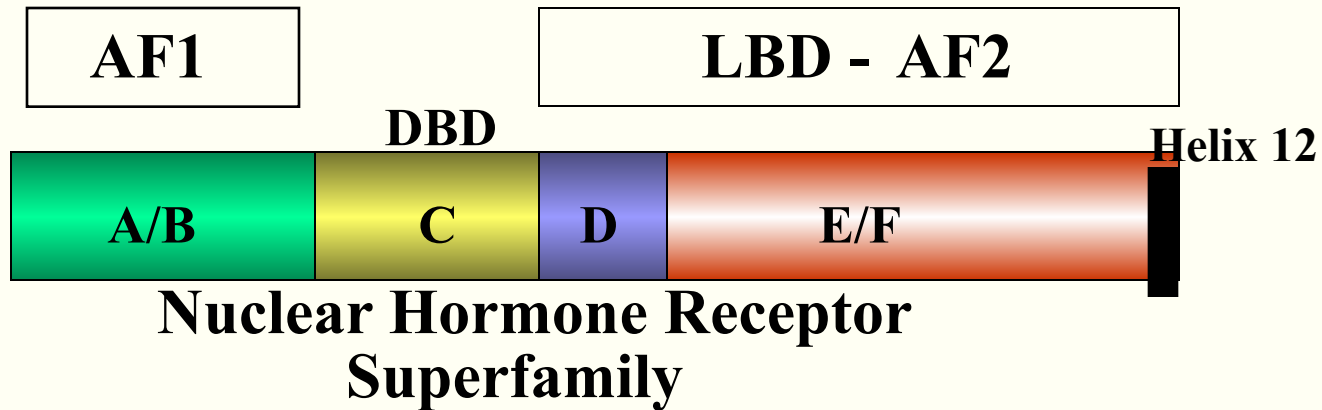


13-HODE

4. Ядерные рецепторы (PPARs)



4. Ядерные рецепторы (PPARs)



Type I family

Steroid family

GR

PR

AR

MR

ER α, β

Type II family

Non-steroid family

TR α, β

RAR α, β, γ

VDR

RXR α, β, γ

PPAR α, γ, δ

CAR, SXR/PXR

LXR α, β , FXR

4. Ядерные рецепторы (PPARs)

Структуры лигандов ядерных рецепторов

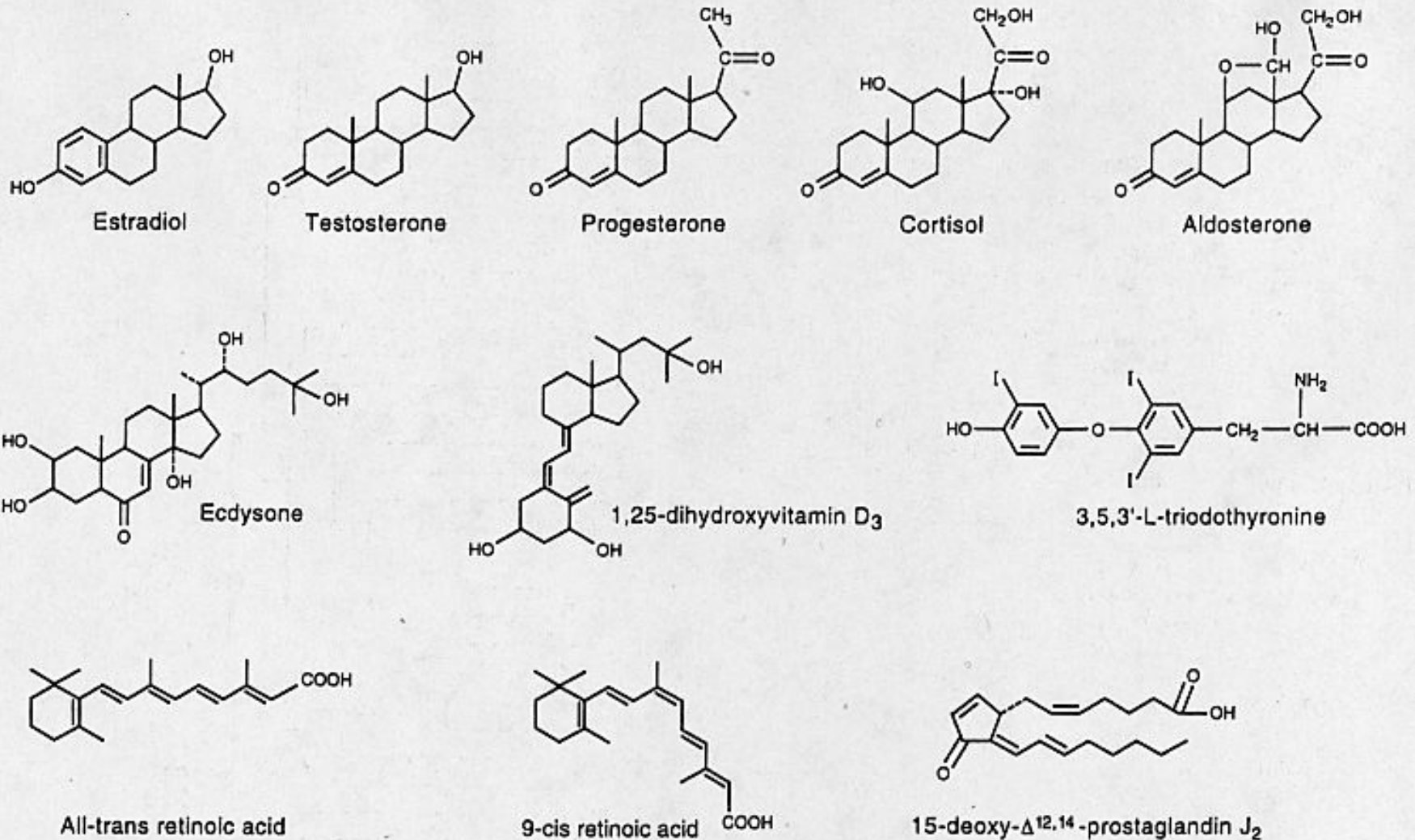


Figure 1. Structures of the Known Ligands for Nuclear Hormone Receptors

5. Использование биоинформатики и подходов системной биологии для анализа воспалительных процессов на уровне клеток

Группа системной биологии липидов

- **Специализация:**

Молекулярная и клеточная биология липидов, биоинформатика, липидомика.

- **Задачи:**

- **Анализ воспалительного процесса на уровне клетки экспериментальными методами:**

- 1) исследование изменений спектра липидных сигнальных молекул в процессе эволюции у разных организмов;
- 2) анализ механизмов регуляции на уровне транскрипции и посттрансляционном уровне циклооксигеназ и фосфолипаз класса A2;
- 3) исследование PPAR, ядерного рецептора, который является ключевым липидным сенсором у млекопитающих

5. Использование биоинформатики и подходов системной биологии для анализа воспалительных процессов на уровне клеток

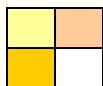
Группа системной биологии липидов

Задачи (продолжение):

Компьютерный анализ систем регуляторных липидов:

- 1) анализ экспериментальных данных микроэреж, получаемых из разных баз данных;
- 2) поиск функциональных кластеров генов с использованием подходов липидомики и транскриптомики;
- 3) предсказание новых мишеней для сигнальных липидов и структуры новых липидподобных синтетических соединений для этих мишеней;
- 4) развитие подходов "-омики" для изучения системных заболеваний с нарушениями в системах сигнальных липидов;
- 5) развитие новых подходов для выделения модулей в сигнальных липидных каскадах с использованием методов биоинформатики.

Общая схема подхода



Группа системной биологии липидов

www.lipidomics.ru

*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского - Факультет
биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

М.Г. Сергеева

А.Т. Мевх

С.А. Грабеклис

С.Е. Алёшин

Н.В. Толмачёва

А.Е. Ивлиев

Университет Отто-фон-Герике

Магдебург, Германия

Георг Райзер

Михаил Строкин

*Институт биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля*

Ю.Каратассо

С.Д.Варфоломеев

Центр по химии лекарственных средств – ВНИХФИ **В.В. Чистяков**