

В. Ю. Джамеев

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛИНГ У РАСТЕНИЙ

Учебное пособие



УДК 577.2
ББК 28.070
Д 40

Рецензенты:

Колупаев Ю. Е. — профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой ботаники и физиологии растений Харьковского национального аграрного университета имени В. В. Докучаева;

Перский Е. Э. — профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биохимии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина.

Рекомендовано к печати Ученым советом
Харьковского национального университета
имени В. Н. Каразина
(протокол № 5 от 3.11.14)

Джамеев В. Ю.
Д 40 Внутриклеточный сигналинг у растений: учебное пособие / В. Ю. Джамеев. — Х. : АССА, 2015. — 224 с.

ISBN 978-617-7312-05-4

В данном учебном пособии излагаются основные сведения о внутриклеточной сигнализации растений. Описаны структура, свойства и особенности функционирования компонентов внутриклеточных сигнальных систем, механизмы рецепции и трансдукции внешних сигналов в растительных клетках. Книга написана на основе лекционного материала к специальному курсу «Внутриклеточные сигнальные системы растений» и предназначена для студентов, обучающихся на биологических факультетах классических университетов, а также в высших учебных заведениях аграрного и педагогического профилей. Пособие может быть также интересным для аспирантов, преподавателей, научных работников и всех увлекающихся биологией.

УДК 577.2
ББК 28.070

ISBN 978-617-7312-05-4

© Джамеев В. Ю., 2015
© ЧП «АССА», 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1. ЗНАЧЕНИЕ, СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК	
1.1. Значение сигнальных систем в биологических объектах	8
1.2. Компоненты сигнальных систем	10
1.3. Сущность передачи сигнала	12
1.4. Эффект усиления в сигнальных системах	16
1.5. Транскрипционный каскад	18
1.6. Типы сигнальных механизмов	20
1.7. Дерепрессорные сигнальные механизмы	20
1.8. Система убиквитин-опосредованной деградации белков	22
1.8.1. Этап первый — выбор субстрата	22
Убиквитин и убиквитинирование	22
Убиквитинирующий комплекс	25
Структура SCF-подобной убиквитинирующей лигазы	27
Регуляция активности SCF-лигазы	28
Связывание субстрата с убиквитинирующей лигазой	29
Особенности белков-мишеней убиквитинирующей лигазы ..	29
1.8.2. Этап второй — деградация субстрата	30
26S протеасома	30
Структура 26S протеасомы	31
Коровая 20S протеасома	32
Регуляторная 19S частица	32
Особенности функционирования 26S протеасомы	33
2. РЕЦЕПЦИЯ ВНЕШНЕГО СИГНАЛА	
2.1. Общая характеристика клеточных рецепторов	35
2.1.1. Что такое рецептор?	35
2.1.2. Структурно-функциональные особенности рецепторов ..	36
Субъединичная и доменная структура	36
Основные механизмы активации рецепторов	37
Функциональная активность	39
2.2. Лиганд-связывающие рецепторы	40
2.2.1. Локализация лиганд-связывающих рецепторов	42
2.2.2. Внешние рецепторы	44
Рецептор-подобные киназы	44

Гистидиновые рецепторные киназы	47
Гибридные гистидиновые киназы	48
Прокариотические двухкомпонентные сигнальные системы	48
Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений	50
Этиленовые рецепторы	52
2.2.3. G-белок сопряженные рецепторы (GPCR)	55
G-белок сопряженные рецепторы животных	55
G-белки GPCR-типа (GTG)	56
2.2.4. Рецепторы-каналоформеры	57
2.2.5. Внутриклеточные рецепторы	59
Ядерные рецепторы животных	59
Внутриклеточные рецепторы растений	61
F-box рецепторы	61
Гормон-чувствительные липазы	63
START-домен рецепторы	65
2.3. Световые рецепторы	67
2.3.1. UV-B рецепторы	68
2.3.2. Фототропины	68
Открытие и функции	68
Структура	70
Световая активация	71
2.3.3. Криптохромы	74
Функции	74
Структура и механизм активации	75
2.3.4. Фитохромы	77
Разнообразие и значение фитохромов	77
Структура фитохромов	80
Фотосенсорный район	80
Димеризационный район	82
Активация фитохромов и передача светового сигнала	82
Светозависимые изменения структуры фитохромов	82
Перенос фитохромов в ядро	83
Регуляция активности фитохрома	85
Модуляция активности мишеней фитохрома	85
Краткое описание механизма световой активации фитохрома	86
3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРИ КЛЕТКИ	
3.1. G-белки	88
3.1.1. Гетеротримерные G-белки	89
3.1.2. Мономерные (малые) G-белки	93
Разнообразие мономерных G-белков	93

Сигнальные мономерные G-белки	94
3.2. Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры	96
3.2.1. Фосфолипазы	97
Фосфолипазы D	99
Фосфолипазы C	102
Полифосфоинозитид-зависимые фосфолипазы C	104
Фосфатидилинозитол и его производные	104
PI-PLC-опосредованный сигналинг	109
Фосфолипазы A_2	113
Октадеканойдный путь	114
Функции фосфолипазы A_2	117
Фосфолипазы A_1 и B, лизофосфолипазы A	118
Взаимодействие фосфолипаз	119
3.2.2. Оксид азота (II) и NO-сигналинг	120
Оксид азота	120
Химические и антиоксидантные свойства NO	121
Пути образования NO	122
Нитрат/нитрит-зависимые ферментативные пути	122
Аргинин-зависимые пути синтеза	124
Нитрит-зависимые неферментативные пути	126
NO-сигналинг	126
Нитрозилирование металлов	127
S-нитрозилирование цистеина	129
Нитрирование тирозина	131
Связь NO и Ca^{2+} -сигналов	131
3.2.3. Нуклеотидциклазные сигнальные системы	132
Аденилатциклазная система	133
Ферменты аденилатциклазной системы	133
Роль cAMP в регуляция активности протеинкиназы A животных	137
Значение cAMP в регуляции активности катаболических генов у бактерий	138
cAMP-регулируемые белки растений	140
Гуанилатциклазы и cGMP	141
3.3. Ионы кальция в системе передачи сигнала	143
3.3.1. Структура Ca^{2+} -связывающих белков	145
3.3.2. Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал	149
Экстраклеточный транспорт кальция	149
Ca^{2+} -АТРазы	149
Ca^{2+}/H^+ -антипортеры	151
Индукционное поступление кальция в цитоплазму	151
Потенциал-управляемые каналы	152

Лиганд-управляемые каналы	152
3.3.3. Декодирование Ca^{2+} -сигнала	154
Активация кальмодулин-зависимых белков	155
Модуляция активности транскрипции кальмодулинами	156
Модуляция активности белков кальций-зависимыми киназами	157
3.4. Ковалентная модификация сигнальных посредников	160
3.4.1. Значение обратимой ковалентной модификации	160
3.4.2. Растительные протеиновые киназы	162
Кальций-зависимые протеиновые киназы	164
SnRK — SNF1-подобные киназы	167
Рецептор-подобные киназы	169
MAP киназы	171
Циклин-зависимые киназы (CDK)	172
Казеиновые киназы CK1 и CK2	174
Семейство GSK3/Shaggy	175
CTR1/Raf-подобное семейство	176
3.4.3. Протеиновые фосфатазы	176
Классификация фосфатаз	177
Серин/треониновые фосфатазы	177
Тирозиновые фосфатазы	179
Растительные фосфатазы	181
Разнообразие растительных фосфатаз	181
Значение растительных фосфатаз	182

4. МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ

4.1. Регуляция транскрипции ауксин-регулируемых генов	185
4.1.1. Регуляторы транскрипции ауксин-регулируемых генов и их доменная структура	185
4.1.2. Участие Aux/IAA и ARF в регуляции экспрессии ауксин-регулируемых генов	186
4.2. Передача цитокининового сигнала	189
4.3. Трансдукция гиббереллинового сигнала	192
4.4. Передача сигнала АБК через START-домен рецепторы	194
4.5. Восприятие и трансдукция этиленового сигнала	195
4.6. Рецепция и трансдукция брассиностероидного сигнала	198

ЛИТЕРАТУРА	204
----------------------	-----

УКАЗАТЕЛЬ ТЕРМИНОВ	212
------------------------------	-----

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	219
-------------------------------	-----

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования физиологических функций организмов тесно сопряжены с изучением механизмов восприятия и внутриклеточной передачи сигналов. Знание механизмов формирования ответной реакции клеток на воздействие экстраклеточных сигналов принципиально важно для развития представлений о регуляции функциональной и метаболической активности клеток. Это, в свою очередь, необходимо для более глубокого понимания сущности онтогенеза, особенностей взаимодействия организмов с окружающей средой, и природы разнообразных биологических функций живых объектов.

Интенсивное накопление сведений в области клеточного сигналинга привело к появлению значительного количества тематических обзорных статей и монографий. Однако большинство из них можно рекомендовать студентам только в качестве дополнительной литературы, потому что такие источники содержат огромный массив специфических данных, который затрудняет восприятие студентами материала о собственно механизмах внутриклеточной передачи сигналов. Настоящее учебное пособие является попыткой автора систематизировать основные сведения о внутриклеточной сигнализации растений. В книге описаны структура, свойства и особенности функционирования компонентов внутриклеточных сигнальных систем растений, механизмы рецепции и трансдукции внешних сигналов. Учитывая полифункциональность большинства сигнальных посредников, их участие в физиологических процессах детально не рассматриваются.

Книга не является всеобъемлющим источником сведений о механизмах рецепции и сигналинга у растений, и, возможно, не даст абсолютно всех ответов на вопросы наиболее любознательных читателей. Тем не менее, это учебное пособие может послужить базовой стартовой площадкой для начала освоения все еще мало изученной области биологии — механизмов рецепции и сигналинга у растений.

1. ЗНАЧЕНИЕ, СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК

1.1. ЗНАЧЕНИЕ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Живые организмы представляют собой открытые термодинамические системы, которые в значительной степени зависят от внешнего окружения. С одной стороны, среда является источником энергии и строительного материала. Организму необходимо адекватно реагировать на эти источники, чтобы оптимально их использовать. С другой стороны, среда не является стабильной и постоянно изменяется, поэтому может быть фактором дестабилизации. Такие изменения могут иметь как периодический (сезонные, суточные ритмы), так и произвольный характер. Флуктуации внешних условий наблюдаются не только в рамках нормы реакции организма. Экстремальные условия могут нарушить структурную целостность и функциональную активность организма, ставя под угрозу его существование. В любом случае, чтобы минимизировать негативное влияние неблагоприятных условий, организм должен уметь распознавать изменения в окружающей среде и, соответственно, отвечать на них изменением функциональной активности. Такая способность позволяет организму адаптироваться к изменяющимся условиям, а также эффективно регенерировать повреждения, спровоцированные экстремальными условиями.

Способностью распознавать изменения в среде существования обладает не только организм в целом, но и каждая его клетка. При этом внешней (экстраклеточной) по отношению к отдельной клетке является не только окружающая среда как таковая, но и внутренняя среда организма. Пространственно

удаленные друг от друга части многоклеточного организма являются взаимозависимыми и должны функционировать согласовано. Согласованность работы всех частей организма обеспечивается благодаря функционированию сложной системы передачи межклеточных сигналов (химических, электрических). Биологические функции клетки, связанные с онтогенетическим развитием организма и реакцией на изменяющиеся внешние условия, реализуются посредством распознавания экстраклеточного стимула рецептором и дальнейшей активации механизмов передачи внутриклеточных сигналов, которые приводят к формированию ответной реакции клетки на внешние воздействия.

Быстрые и медленные реакции. Восприятие экстраклеточного сигнала осуществляется клеточными рецепторами, а затем передается в соответствующие клеточные компартменты к конечным мишеням, от которых зависит функциональная активность клетки. Ответные реакции клетки принято делить на быстрые и медленные (рис. 1). **Быстрые реакции** проявляются практически сразу после восприятия сигнала, поскольку они связаны с изменением активности систем и их компонентов, которые присутствуют в клетке на момент восприятия сигнала. Примером быстрых реакций могут служить изменения интенсивности и направления трансмембранных ионных потоков

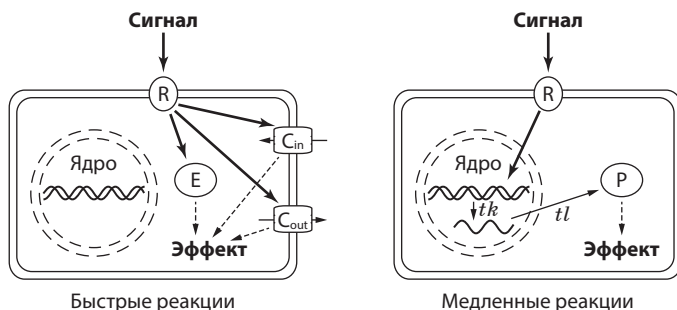


Рис. 1. Быстрые и медленные реакции:

R — рецептор;

E — фермент;

C_{in} — поглощающий канал;

C_{out} — выводящий канал;

P — белок, синтезированный de novo;

tk — транскрипция;

tl — трансляция

и связанных с этим процессов модуляции активности ферментов. **Медленные реакции** зависят от белков, синтезированных *de novo*, то есть они сопряжены с изменением экспрессии генов, поэтому развиваются в течение более длительного времени по сравнению с быстрыми. Изменение набора экспрессирующихся генов осуществляется как за счет модуляции активности предсуществующих транскрипционных факторов, так и синтеза новых транскрипционных регуляторов.

1.2. КОМПОНЕНТЫ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Системы внутриклеточной трансдукции сигналов состоят из разнообразных компонентов, различающихся по назначению и выполняемым функциям. Основными компонентами сигнальных систем являются рецепторы, эффекторы, вторичные мессенджеры, G-белки, модифицирующие сигнальные ферменты, адаптерные молекулы и конечные мишени.

Рецепторы воспринимают экстраклеточные сигналы и запускают каскадный сигнальный механизм внутри клетки. Клетки обладают разными типами специализированных рецепторов, распознающих определенный вид сигнала.

G-белки — особые сигнальные молекулы, обладающие GTPазной активностью. Способность передавать сигнал зависит от того, какой из нуклеотидов (GDP или GTP) находится в гуаниннуклеотид-связывающем центре.

Эффекторы (или эффекторные молекулы) — это ферменты, катализирующие синтез вторичных мессенджеров. К эффекторам также следует отнести кальциевые каналы и переносчики, от которых непосредственно зависит концентрация ионов кальция в цитоплазме.

Вторичные мессенджеры — это низкомолекулярные органические соединения или ионы, способные обеспечивать передачу сигнала путем аллостерической регуляции сигнальных посредников. Модуляция активности компонентов сигнальной цепи вторичными мессенджерами осуществляется при достижении ими определенной концентрации. На уровне эффекторов обеспечивается усиление сигнала, так как они синтезируют боль-

шое количество вторичных посредников, которые могут активировать множество последующих сигнальных посредников или конечных мишеней.

Адаптерные молекулы — белки, как правило, не обладающие специфической активностью, помимо способности в определенных условиях взаимодействовать одновременно с двумя или более сигнальными посредниками. Взаимодействие осуществляется за счет комплементарных поверхностей. Например, рецептор может воздействовать на эффектор или иную сигнальную молекулу только через адаптерный белок.

Сигнальные молекулы-ферменты обеспечивают посттрансляционную модификацию посредников передачи сигнала. (Следует отличать от эффекторов, которые тоже являются ферментами, но специализируются на синтезе вторичных мессенджеров.) Большинство посттрансляционных модификаций, используемых в сигналинге, имеет обратимый характер. Ведущую роль среди таких сигнальных посредников выполняют протеинкиназы и протеинфосфатазы, обеспечивающие киназно-фосфатазный цикл.

Конечные мишени обеспечивают необходимое функциональное состояние клетки для конкретных условий. В качестве конечных мишеней выступают, например, ферменты или транскрипционные факторы.

Запуск трансдукции сигнала в клетке начинается с рецептора и заканчивается модуляцией активности конечных мишеней. Однако промежуточные компоненты сигнальной системы могут быть представлены широким спектром разнообразных функциональных молекул. Количество и тип компонентов каждой конкретной сигнальной системы в определенной мере специфичны. Например, в некоторых системах могут отсутствовать эффекторы и вторичные мессенджеры, а в других в передаче сигнала могут быть задействованы несколько типов эффекторных молекул, а соответственно, и вторичных посредников, действующих последовательно или параллельно. Наиболее короткая сигнальная цепочка наблюдается в том случае, если рецептор является одновременно конечной мишенью. Например, существуют рецепторы липофильных лигандов, которые одновременно являются транскрипционными факторами.

1.3. СУЩНОСТЬ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Избирательность взаимодействия. Между двумя любыми макромолекулами или микромолекулами возможно взаимодействие. Однако при наличии огромного разнообразия веществ в клетке наблюдается строгая упорядоченность взаимодействий, некая их «осмысленность». Например, каталитическая активность ферментов направлена на специфический субстрат, структурные молекулы укладываются в агрегаты, образуя клеточные структуры, гормоны взаимодействуют с определенными рецепторами и т. д. Подобным образом специфично взаимодействуют друг с другом сигнальные молекулы.

Межмолекулярные взаимодействия осуществляются за счет слабых сил. Чтобы эти силы были эффективными и позволили избирательность взаимодействия, необходимо образование множества связей. Слабые силы, как известно, приобретают максимальные значения, если взаимодействующие группы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга. Поверхности взаимодействующих молекул, позволяющие образовывать оптимальное количество слабых связей, называются **комплементарными** (рис. 2).

При формировании структурных агрегатов, представляющих собой статичные комплексы, часто является важным наличие максимального количества слабых связей. Однако при образовании динамичных систем, для функционирования которых принципиальным является не только ассоциация, но и диссоциация молекулярного комплекса, необходимо установить оп-

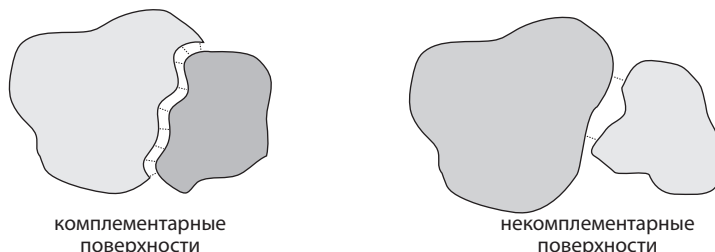


Рис. 2. Комплементарные и некомплементарные поверхности молекул.

тимальное число слабых связей, которое, с одной стороны, позволит специфичность взаимодействия, а с другой, не затруднит диссоциацию.

При специфическом взаимодействии макромолекул наблюдается взаимное влияние их электронных плотностей друг на друга. В результате это приводит к изменению конформации молекул, что непосредственно отражается на их активности.

Механизмы передачи сигнала. В основе передачи сигнала лежит молекулярный механизм, посредством которого изменяется активность сигнальных посредников. Модуляция активности посредников осуществляется разными способами, среди которых наиболее важными являются:

- 1) **взаимное связывание**, определяемое наличием комплементарных поверхностей (например, узнавание гормона рецептором);
- 2) **ковалентная модификация** (введение или отщепление групп; образование или разрыв связей в макромолекулах-компонентах сигнальной цепи);
- 3) **изменение микроокружения** (изменение концентрации ионов, в том числе протонов (рН), и низкомолекулярных органических регуляторов).

Любое из этих воздействий провоцирует изменение конформации макромолекулы-посредника, от которой зависит ее активность. Модуляция активности сигнального посредника определяет его способность воздействовать на последующие компоненты сигнальной цепи (рис. 3). В целом, акт передачи сигнала в рамках одного посредника можно представить в таком виде:

воздействие → изменение конформации →
→ изменение активности

Необходимо заметить, что при восприятии сигнала активность посредника может изменяться в различных направлениях и с различной силой. Это зависит от конкретной сигнальной пары и особенностей их взаимодействия. Активность посредника может градиентно уменьшаться или увеличиваться, а также активироваться из репрессированного состояния (включаться) или, наоборот, ингибироваться (выключаться). (Для описания функционирования гипотетических сигнальных систем и посредников мы будем говорить о модуляции или изменении

активности макромолекул-посредников, так как активация сигнальной системы может быть сопряжена как с активацией, так и с репрессией отдельных компонентов и модулей системы.)

Для низкомолекулярных регуляторов (вторичных мессенджеров), которые опосредуют передачу сигнала между двумя макромолекулами, существенным признаком участия в сигнальном механизме является изменение концентрации.

Макромолекулярные посредники	Низкомолекулярные посредники
<ul style="list-style-type: none"> • воздействие (принятие сигнала); • изменение конформации; • изменение активности (готовность к передаче сигнала) 	<ul style="list-style-type: none"> • модуляция активности эффекторов или ионных каналов; • изменение концентрации вторичных мессенджеров; • модуляция активности сигнальных посредников

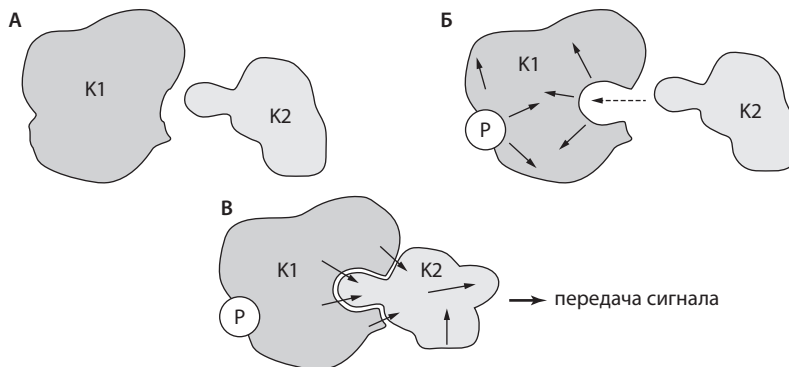


Рис. 3. Передача сигнала:

А — компоненты K1 и K2 не взаимодействуют друг с другом;

Б — ковалентная модификация компонента K1 (фосфорилирование) провоцирует изменение конформации молекулы, в результате чего образуется поверхность, комплементарная поверхности молекулы компонента K2;

В — компоненты K1 и K2 взаимодействуют: K2 приобретает конформацию, позволяющую взаимодействовать с последующим компонентом сигнальной системы

Трансдукция сигнала от рецептора до конечных мишеней, в которой может быть задействовано множество компонентов, является, по существу, поочередным изменением активности переносчиков сигнала, а в случае вторичных мессенджеров — их концентрации.

Например, рецептор в результате активации приобретает способность взаимодействовать с адаптерным белком, через который он стимулирует эффектор. Эффектор катализирует синтез вторичных мессенджеров, модулирующих активность протеиновых киназ и т. д. Таким образом, каждый сигнальный переносчик влияет на очередной компонент системы трансдукции сигнала, изменяя его функциональное состояние. Причем модуляция активности одного компонента предопределяет изменение активности другого. Последовательное изменение состояния переносчиков сигнала представляет собой каскад реакций, поэтому такой способ передачи внутриклеточных сигналов часто называют **каскадным механизмом** (рис. 4).

При описании сигнальных систем для обозначения относительного положения компонентов часто используется термин **апстрим** (upstream — вверх по течению) и **даунстрим** (downstream — вниз по течению). Все регуляторы, от которых стекается сигнал на конкретный компонент, являются по отношению к нему апстрим сигнальными компонентами. Тогда как регуляторы, на которые передается сигнал, называют даунстрим сигнальными компонентами. Предположим, в сигнальной системе функционируют 5 компонентов и передача сигнала

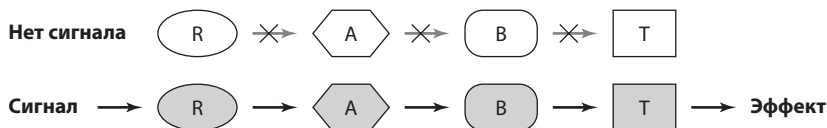


Рис. 4. Каскадный механизм.

Сигнальная система, состоящая из рецептора R, конечной мишени T и промежуточных компонентов A и B, в отсутствии сигнала пребывает в неактивном состоянии. Стимулирование рецептора соответствующим сигналом приводит к последовательной модуляции активности всех компонентов системы, что в результате приводит к развитию ответной реакции на сигнал (эффект)

осуществляется в направлении $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5$. Тогда относительно компонента 3 регуляторы 1 и 2 являются апстрим, а 4 и 5 — даунстрим сигнальными партнерами.

В упрощенном варианте каскадный механизм может быть представлен в виде линейной последовательной передачи сигнала. Однако, на самом деле, чаще всего распространение сигнала в клетке имеет веерный характер, то есть стимуляция одного рецептора модулирует активность, как правило, множества конечных мишеней. Например, под воздействием конкретного гормона в клетке активируется экспрессия целого набора генов.

Кроме того, многие из интраклеточных сигнальных систем тесно взаимосвязаны друг с другом. Взаимодействуя, они могут способствовать взаимному усилению, ослаблению, а также проявлению качественно иного эффекта по сравнению с тем, который проявляется при функционировании этих систем по отдельности. Каскадные механизмы можно представить в виде сигнальной сети, пронизывающей клетку. Сигнальные пути могут быть настолько переплетены и взаимозависимы, что порой трудно идентифицировать причинно-следственные связи при изучении механизмов трансдукции сигнала.

1.4. ЭФФЕКТ УСИЛЕНИЯ В СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Важной характеристикой механизма внутриклеточной передачи сигнала является **эффект усиления**. Благодаря этому свойству клетки способны формировать существенные ответные реакции на воздействие слабых внешних сигналов. **Общий принцип усиливающего эффекта — увеличение количества сигнальных посредников в процессе распространения сигнала.** Усиление сигнала осуществляется только на конкретных участках сигнальной цепи. Если посредники участвуют в передаче сигнала в эквимоллярных количествах, то усиления не происходит. Например, при передаче сигнала путем взаимного связывания одна макромолекула модулирует активность только одной молекулы. Однако если в сигнальном механизме участвуют ферменты, наблюдается усиливающий эффект. Так, эффекторная молекула в результате активации синтезирует мно-

жество вторичных мессенджеров, которые будут регулировать активность значительного количества сигнальных посредников, в том числе конечных мишеней (рис. 5).

На участке усиления сигнала помимо увеличения количества однотипных регуляторных молекул, в сигнальный механизм могут вовлекаться посредники разных типов. Например, такие вторичные мессенджеры, как ионы Ca^{2+} способны модулировать активность нескольких типов сигнальных посредников — ферментов, транскрипционных факторов, ионных каналов и др.

Эффект усиления обеспечивается в результате функционирования следующих процессов:

- синтез вторичных мессенджеров эффекторами;
- посттрансляционная модификация сигнальных макромолекул (киназы, фосфатазы и др.);
- трансляция и транскрипция;
- изменение скорости потока ионов Ca^{2+} через мембрану (Ca^{2+} -каналы и переносчики).

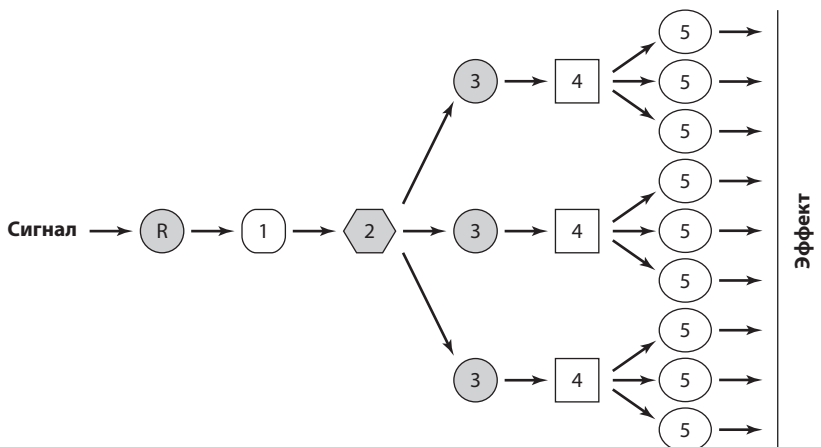


Рис. 5. Эффект усиления в сигнальных системах.

Эффект усиления наблюдается на этапе 2–3 и 4–5. Компоненты 2 и 4 модулируют активность множества мишеней. Компоненты 1 и 3 взаимодействуют с компонентами 2 и 4, соответственно, в эквимоларных количествах

1.5. ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ КАСКАД

Развитие ответной реакции на внешние воздействия часто сопровождается активацией генов, кодирующих транскрипционные регуляторы. Вновь синтезированные факторы транскрипции участвуют в регуляции экспрессии второй группы генов. Таким образом, сигнальный механизм может включать в себя не только активацию транскрипционных факторов, но и их синтез. Механизм, включающий несколько последовательных транскрипций, называют **транскрипционным каскадом** (рис. 6).

Транскрипционный каскад представляет собой широко распространенное явление. Группа генов, активность которых изменяется под действием внешнего сигнала в первую очередь, называется **ранними**. Гены, активность которых модулируется вновь синтезированными транскрипционными регуляторами,

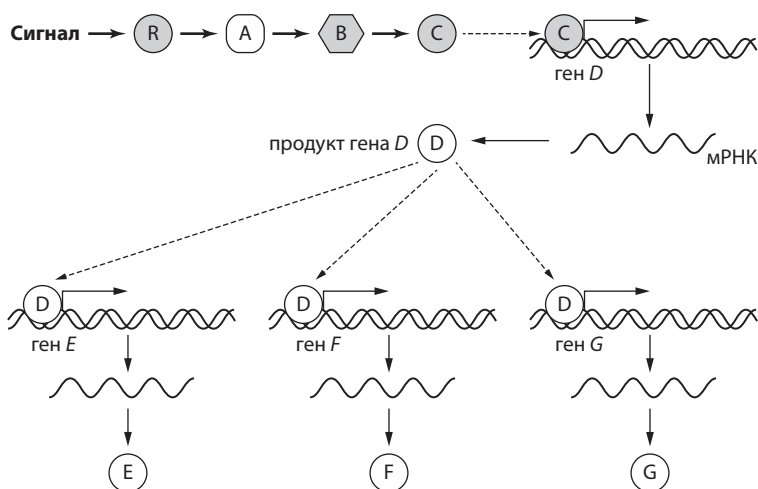


Рис. 6. Транскрипционный каскад.

Внешний сигнал, воспринимаемый клеточным рецептором R через компоненты A и B передается на транскрипционный фактор C, который активирует экспрессию гена D, кодирующего транскрипционный фактор D. Транскрипционный фактор D стимулирует транскрипцию генов E, F и G, которые кодируют белки E, F и G

называются **поздними**. Большинство ранних генов являются регуляторными. Они кодируют транскрипционные регуляторы, компоненты убиквитинирующей системы и другие регуляторные белки. Продукты ранних генов во многом определяют образец экспрессии поздних генов, от которых непосредственно зависит функциональная активность клетки.

Регуляторный механизм, задействующий последовательный синтез нескольких групп транскрипт-факторов, на первый взгляд, может показаться медленнodelствующим и громоздким. Тем не менее, это необходимо для осуществления регуляции генной экспрессии с позиции максимальной экономичности процессов. При изменении условий, как правило, активируются и репрессируются множественные гены. Обеспечить моментальную модуляцию сразу всех необходимых генов достаточно сложно, так как для этого нужно значительное количество транскрипционных факторов и компонентов сигнальных систем, активирующих эти транскрипт-факторы. Причем синтез и тех, и других молекул необходимо поддерживать на определенном уровне в неиндуктивных условиях. Поддержание в рабочем состоянии многочисленных сигнальных систем, обеспечивающих прямую активацию большого количества генов, невыгодно для клетки. Система регуляции путем последовательной активации синтеза нескольких транскрипционных факторов требует минимальных затрат на постоянное поддержание сравнительно небольшого количества сигнальных систем. Кроме того, синтез факторов регуляции транскрипции в результате активации каскадных механизмов оказывает усиливающий эффект. Активация экспрессии одного гена приводит к неоднократной транскрипции, причем каждый образованный транскрипт после сплайсинга может служить матрицей для синтеза множества молекул белка. Существенное повышение количества регуляторных белков оказывает значительный эффект на развитие ответной реакции клетки. Таким образом, каскадная система регуляции, включающая последовательную активацию экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, дает незначительную задержку во времени, однако является экономичной и способствует усилению сигнала.

1.6. ТИПЫ СИГНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ

Передача сигнала в клетке сопровождается изменением активности посредников сигнальной системы и конечных мишеней. Эти изменения в отдельно взятом каскадном механизме могут иметь разнонаправленный характер. Кроме того, один и тот же внешний сигнал, с одной стороны, стимулирует активацию (или повышение активности) одних конечных мишеней, но в то же время приводит к репрессии других. Поэтому описать однозначно направление изменения активности, происходящие в каскадном механизме, вряд ли возможно. Скорее, следует говорить о том, как работают ключевые модули регуляторной сигнальной системы. В этом плане можно различать **активаторные**, **репрессорные** и **дерепрессорные** сигнальные механизмы.

Активаторные механизмы связаны с усилением или включением активности сигнальных посредников или конечных мишеней, а **репрессорные** — с ослаблением или выключением.

Дерепрессорные сигнальные системы характеризуются тем, что один из компонентов системы активно репрессируется в отсутствие стимула, в результате чего система находится в репрессированном состоянии. Активация системы приводит к ингибированию репрессора и активации сигнальной системы. Таким образом, репрессия репрессора обеспечивает активацию (дерепрессию) системы.

1.7. ДЕРЕПРЕССОРНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Снятие действия репрессоров может осуществляться за счет механизмов двух основных типов (рис. 7):

- 1) инактивация репрессора путем модуляции его активности;
- 2) разрушение репрессора через направленный протеолиз.

В первом случае репрессор остается физически присутствовать в клетке, но в репрессированном состоянии (рис. 7-Б). Ингибирование репрессора достигается любым из способов модуля-

ции активности, характерных для сигнальных систем (см. выше раздел «Сущность передачи сигнала»). Это может быть связывание репрессора регуляторным белком-ингибитором, ковалентная модификация молекулы репрессора или ее взаимодействие с низкомолекулярными регуляторами. Наиболее распространенный способ «выключения» репрессора является его ковалентная модификация киназами или фосфатазами (фосфорилирование/дефосфорилирование).

Второй механизм связан с функционированием убиквитин-зависимого селективного протеолиза (рис. 7-В). Принцип этого механизма заключается в том, что под действием специфического внешнего сигнала репрессоры определенного типа узнаются убиквитиновой протеиновой лигазой, которая присоединяет к белковому субстрату полиубиквитиновые метки. Меченные таким способом репрессоры в дальнейшем подвергаются деградации в протеасомной системе.

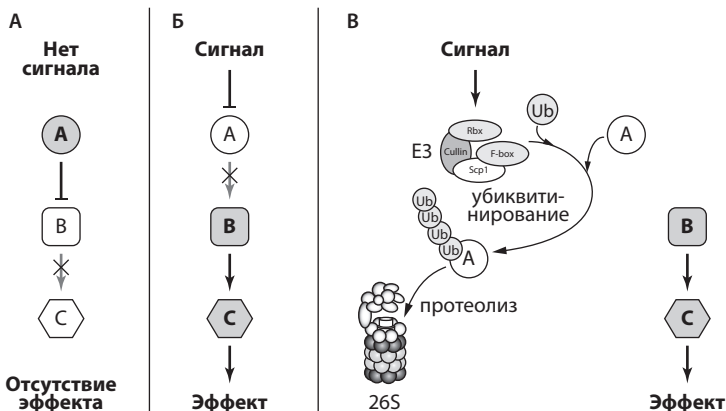


Рис. 7. Дерепрессионная регуляторная система.

А — компонент А (негативный регулятор) в отсутствие сигнала активно ингибирует компонент В и поддерживает систему в репрессированном состоянии;

Б — под действием внешнего сигнала компонент А инактивируется, что способствует дерепрессии системы;

В — негативный регулятор А под влиянием сигнала вовлекается в убиквитин-опосредованный селективный протеолиз

1.8. СИСТЕМА УБИКВИТИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ

Во всех живых клетках происходит постоянное обновление структурных блоков и функциональных систем клетки. Белки, пришедшие в негодность в результате необратимой денатурации, и по этой причине не способные выполнять свои функции, разрушаются протеазами, а образованные в результате протеолиза свободные аминокислоты используются для синтеза новых белков. Протеазы узнают белки с нарушенной структурой по ряду характерных признаков, например, по наличию на поверхности молекул гидрофобных аминокислот.

Существует также механизм, который отличается от обычного протеолиза тем, что он приводит к разрушению белков, не обладающих признаками нарушения структуры и функциональной активности, и при этом протеолизу подвергаются не все белки, а только лишь белки определенного типа. Такой механизм называют **селективным** или **направленным протеолизом**.

Селективный протеолиз осуществляется в два этапа (рис. 7-В). Сначала белки, предназначенные для разрушения, распознаются особым мультиполипептидным комплексом, который присоединяет к особым участкам этих белков полиубиквитиновые цепочки. Этот комплекс называют **убиквитинирующей протеиновой лигазой** и в общей системе убиквитинирования обозначают E3. Затем убиквитинированные белки привлекаются к 26S протеасоме и разрушаются. Поскольку в описываемом механизме разрушению белков предшествует их убиквитинирование, его называют также **убиквитин-опосредованным протеолизом белков**.

1.8.1. Этап первый — выбор субстрата

Убиквитин и убиквитинирование

Убиквитин — это низкомолекулярный высококонсервативный белок с молекулярной массой 8,5 кД. Он состоит из 76 аминокислотных остатков и обладает кислыми свойствами, так

как содержит значительное количество остатков дикарбоновых аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой кислот (рис. 8). Полипептидную цепь убиквитина с карбокситерминальной стороны молекулы замыкает остаток глицина, через карбоксильную группу которого осуществляется конъюгирование убиквитина с белками-мишенями или друг с другом посредством образования изопептидной связи. В состав убиквитина входят 7 остатков лизина, занимающие положения 6, 11, 27, 29, 33, 48 и 63. Через эти лизиновые остатки возможна конъюгация убиквитинов друг с другом. Убиквитин у эукариот кодируется несколькими генами, а синтез осуществляется в виде неактивного полиубиквитинового предшественника или отдельной копии, сшитой с рибосомными белками. Процесинг убиквитина протекает с участием деубиквитирующих ферментов.

Убиквитин-подобные белки. В природе были обнаружены белки, близкие по структуре убиквитину. Низкомолекулярные белки, обладающие высокой степенью сходства с убиквитином, подразделяют в две группы: 1) **белки с убиквитин-подобным доменом** (UDP — ubiquitin-domain proteins) и 2) **убиквитин-подобные модификаторы** (Ubl — ubiquitin-like modifiers). Белки с убиквитин-подобным доменом (UDP) не образуют конъюгатов с белками. Взаимодействуя за счет слабых связей с убиквитином или убиквитин-подобными модификаторами, они выполняют роль адаптеров. Убиквитин-подобные модификаторы (Ubl), также как и убиквитин, способны конъюгировать с белками через карбокситерминальный глицин. К убиквитинподобным модификаторам относятся SUMO (Small ubiquitin-like modifier), NEDD8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8), ISG15 (IFN-stimulated gene 15), FAT10 (F-adjacent transcript 10) и другие.

Убиквитинированием называют образование изопептидной связи между ϵ -аминогруппой остатка лизина белка-мишени

1 5 6 10 11 15 20 25 27 29 30 33 35 40
 M Q I F V K T L T G K T I T L E V E P S D T I E N V K A K I Q D K E G I P P D Q
 41 45 48 50 55 60 63 65 70 75 76
 Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N I Q K E S T L H L V L R L R G G

Рис. 8. Аминокислотная последовательность молекулы убиквитина

и карбоксильной группой С-концевого глицина убиквитина. Убиквитинирование является одной из возможных посттрансляционных модификаций белков наряду с фосфорилированием, гликозилированием и др.

Процесс убиквитинирования в большинстве случаев не ограничивается присоединением одной молекулы убиквитина. Белок может нести одну или несколько убиквитиновых молекул, а также полиубиквитиновые цепочки разной формы и длины. Большая часть убиквитинированных белков несут полиубиквитиновые группы. Конъюгация двух молекул убиквитина осуществляется путем образования изопептидной связи между С-концевым глицином и ε -аминогруппой одного из семи остатков лизина убиквитина. Первоначально были обнаружены полиубиквитиновые цепочки, в которых убиквитины соединены друг с другом через лизин-48. Однако позже было показано, что все семь лизинов убиквитина могут участвовать в образовании полиубиквитиновых групп. Если в процессе полиубиквитинирования используются лизиновые остатки в одном положении, то образуются линейные цепочки. При использовании нескольких сайтов самоконъюгации возможно образование разветвленных полиубиквитиновых структур. Особенности полиубиквитиновой цепочки, то есть ее длина и сайты самоконъюгации, имеют решающее значение в определении судьбы убиквитинированного белка.

Ковалентная модификация белков путем убиквитинирования имеет чрезвычайно разнообразное значение для функциональной активности клеток. Можно выделить три основные группы функций, для которых имеет значение убиквитинирование.

Дегградация белков. Впервые значение убиквитинирования было показано для взаимодействия белков с протеасомами, которое приводило к разрушению убиквитинированных белков. Наиболее распространенным сигналом для протеолиза является полиубиквитиновая линейная цепочка, состоящая из четырех и более убиквитиновых мономеров, которые соединены друг с другом через лизин-48. Считается, что все полиубиквитиновые цепочки, за исключением тех, которые образованы через лизин-63, могут быть использованы в качестве меток для дегградации.

Активность хроматина. Убиквитинированию подвергаются гистоновые белки H2a и H2b. В одной нуклеосоме с убиквитином конъюгируется обычно одна из этих молекул. Наличие убиквитиновой метки характерно для эухроматиновой области генома. Известно, что посттрансляционные модификации нуклеосомных гистонов важны для трехмерной структуры и функциональной активности хроматина, а также клеточной памяти. Убиквитинирование является динамическим процессом, который имеет большее значение для собственно ремоделирования хроматина, а не для поддержания его структуры.

Модуляция активности функциональных белков. Убиквитинирование негистоновых белков не всегда приводит к деградации, а может только изменять их активность. Как правило, это связано с моноубиквитиновыми или полиубиквитиновыми модификациями с незначительным количеством убиквитиновых мономеров в цепочке. Например, моноубиквитинированные белки участвуют в регуляции трансмембранного переноса, эндоцитоза, экспрессии генов и репарации ДНК. Полиубиквитиновые линейные цепочки, образованные через лизин-63, важны для генерации сигналов, которые играют ключевую роль в регуляции репарации ДНК, трансмембранного переноса, эндоцитоза, активации протеинкиназ, трансляции и транскрипции.

Убиквитинирующий комплекс

Центральное место в системе убиквитин-опосредованной деградации белков занимает убиквитинирующая лигаза (E3), которая распознает соответствующие белки-мишени и обеспечивает их убиквитинирование. В системе убиквитинирования участвуют еще два фермента (E1 и E2), контролирующие предварительную активацию убиквитина (рис. 9).

Минимальный убиквитинирующий комплекс состоит из трех ферментов:

- 1) E1 — убиквитин-активирующий фермент;
- 2) E2 — убиквитин-конъюгирующий фермент;
- 3) E3 — убиквитинирующая протеиновая лигаза.

На первом этапе происходит активация убиквитина. **Убиквитин-активирующий фермент (E1)** образует тиоэфирную связь

между консервативным остатком цистеина и карбокситерминальным остатком глицина убиквитина. Этот процесс требует затраты метаболической энергии в виде АТФ. Затем убиквитин переносится от E1 на **убиквитин-конъюгирующий фермент (E2)**. В этом случае для удержания убиквитина также используется

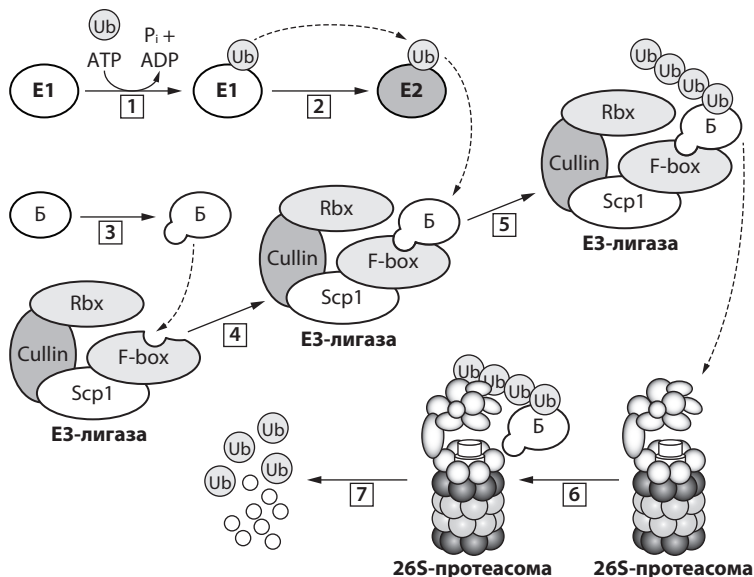


Рис. 9. Система убиквитин-опосредованной деградации белков.

Условные обозначения:

- E1 — убиквитин-активирующий фермент;
- E2 — убиквитин-конъюгирующий фермент;
- E3 — убиквитирующая протеиновая лигаза;
- Ub — убиквитин;
- Б — белок-мишень.

Этапы механизма селективного протеолиза:

- 1 — убиквитин-активирующий фермент (E1) связывает убиквитин;
- 2 — убиквитин переносится на убиквитин-конъюгирующий фермент (E2);
- 3 — белок-мишень под действием сигнала приобретает поверхность, комплементарную F-box субъединице убиквитирующей лигазы;
- 4 — белок-мишень связывается с F-box субъединицей E3;
- 5 — лигаза E3 присоединяет к мишени полиубиквитиновую группу;
- 6 — полиубиквитиновая мишень связывается 26S протеасомой;
- 7 — 26S протеасома отщепляет убиквитины и разрушает белок-мишень

консервативный остаток цистеина фермента. При взаимодействии E2 с третьим компонентом — **убиквитинирующей протеиновой лигазой (E3)** — убиквитин переносится на специфический остаток лизина белка-мишени. В зависимости от типа убиквитин-протеиновой лигазы убиквитин может быть перенесен на молекулу субстрата напрямую от E2, или же убиквитин предварительно ковалентно связывается с реакционным центром E3, а затем присоединяется к субстрату.

Известные убиквитин-протеиновые лигазы по структуре каталитических доменов можно разделить на три группы:

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

HECT-домены ковалентно связывают убиквитин, принимая его от конъюгирующего фермента E2, а затем переносят на субстрат. RING- и U-box-содержащие лигазы не образуют тиюэфирной связи с убиквитином, а осуществляют его прямой перенос от E2 на субстрат. В растительных организмах преимущественно функционируют RING-содержащие SCF-подобные убиквитиновые лигазы.

В ряде случаев полиубиквитинирование контролируется дополнительными U-box-домен-содержащими E3-лигазами, которые в системе убиквитинирования также называют **E4-лигазы**.

В геноме эукариотических организмов кодируются сотни E3-лигаз различных классов, что говорит о чрезвычайной важности этих ферментов.

Структура SCF-подобной убиквитинирующей лигазы

SCF-лигаза является мультимерным комплексом, который состоит из четырех основных субъединиц: RBX, Cullin, F-box, и SKP1 (рис. 9).

RBX — каталитическая субъединица. Выполняет собственно лигазную функцию, катализирует перенос убиквитина от убиквитин-конъюгирующего фермента на белок-мишень. Реакционный центр субъединицы содержит домен RING-H2 пальцы. RING-finger-домены E3-энзимов включают мотив из восьми цистеиновых и гистидиновых остатков, содержащий два иона цинка.

Cullin — регуляторная субъединица. Через эту субъединицу осуществляется регуляция активности E3-лигазы. Cullin образует с RBX прочно связанный функционально активный димер, способный катализировать формирование мультиубиквитиновой цепочки.

F-box — обеспечивает выбор субстрата для убиквитинирования. Субъединица имеет лейцин-обогащенный домен F-box, по которому названа субъединица. Через F-box домен осуществляется взаимодействие убиквитинирующей лигазы с белками-мишенями.

SKP1 — структурно-регуляторная субъединица. Объединяет RBX–Cullin димер и F-box субъединицу в единый функциональный комплекс.

Регуляция активности SCF-лигазы

Регуляция активности SCF-лигазы осуществляется в процессе обратимой посттрансляционной модификации субъединицы Cullin путем присоединения/отщепления убиквитин-подобного белка RUB1. Присоединение RUB1 к Cullin во многом напоминает процесс убиквитинирования. Вначале RUB1 активируется гетеродимерным RUB1-активирующим комплексом путем образования тиоэфирной связи между карбокситерминальным аминокислотным остатком RUB1 и цистеином одной из субъединиц RUB1-активирующего фермента. Примечательно, что одна из субъединиц этого фермента гомологична аминотерминальному домену убиквитин-активирующего фермента E1, а вторая — карбокситерминальному домену E1. Затем RUB1 переносится на RUB1-конъюгирующий фермент (RCE1), который присоединяет этот белок на субъединицу Cullin. Удаляется RUB1 от Cullin с помощью сигнасомы COP9.

Как показывают исследования, для развития нормального функционирования E3-лигазы очень важно поддержание циклического конъюгирования/удаления RUB1. Точная роль данного регуляторного цикла еще не выяснена. Существует несколько предположений на этот счет. Согласно одному из них, присоединение RUB1 к Cullin и его удаление может быть связано с изменением компарментации SCF-подобной убиквитиновой

лигазы. Другая гипотеза предполагает, что RUB1-конъюгационный цикл имеет значение в опосредовании взаимодействия SCF-подобной убиквитиновой лигазы с 26S протеасомой.

Связывание субстрата с убиквитинирующей лигазой

Одним из ответственных этапов убиквитин-опосредованного протеолиза белков является выбор белка-мишени убиквитинирующей лигазой. Общий принцип механизма узнавания связан с формированием комплементарных поверхностей, позволяющих специфическое взаимодействие протеиновой лигазы и субстрата. Под действием внешних сигналов активируются процессы, стимулирующие изменение структуры белка-мишени или F-box субъединицы лигазы. Как правило, достаточно изменения конформации одного из этих компонентов. При этом поверхность одной молекулы подстраивается под поверхность другой. Если для обеспечения взаимодействия белка-мишени и лигазы E3 необходимо участие третьего компонента, выполняющего роль адаптерного белка, то связывание субстрата лигазой может стимулироваться в результате изменения структуры адаптерного белка.

Таким образом, специфическое взаимодействие лигазы E3 и субстрата обеспечивается процессами, в результате которых стимулируется изменение структуры, по крайней мере, одного из компонентов:

- 1) белка-мишени;
- 2) F-box субъединицы убиквитинирующей лигазы;
- 3) адаптерного белка, через который осуществляется взаимодействие субстрата и лигазы.

При этом не существует универсального механизма — взаимное узнавание белка-мишени и F-box субъединицы лигазы E3 достигается различными способами.

Особенности белков-мишеней убиквитинирующей лигазы

Белки, которые вовлекаются в убиквитин-опосредованный протеолиз, имеют особый участок, необходимый для взаимодействия с F-box доменом убиквитинирующей лигазы. Этот уча-

сток молекулы называют **дегроном**, так как он функционально связан с деградацией молекулы. Мутации в области данного домена приводят к увеличению стабильности белка и нарушению процессов, в которых они участвуют.

Белки-мишени, подвергающиеся деградации при воздействии различных сигналов, выполняют разнообразные функции, преимущественно регуляторные. Значительная часть таких белков являются транскрипционными регуляторами. Например, репрессоры транскрипции ауксин-регулируемых генов семейства Aux/IAA убиквитинируются под действием ауксина и впоследствии разрушаются 26S протеасомой. Особый участок молекулы, состоящий из 13 аминокислотных остатков (дегрон) определяет уровень стабильности белка. Он необходим для взаимодействия белка-мишени с F-box субъединицей убиквитинирующей лигазы. F-box белки, связывающие репрессоры Aux/IAA (TIR1, AFB1, AFB2, AFB3), одновременно выполняют функции рецепторов ауксина (см. раздел «F-box рецепторы»).

1.8.2. Этап второй — деградация субстрата

26S протеасома

Протеолитическая активность в клетках эукариот локализована в лизосомах и 26S протеасомах. В лизосомах деградируют только мембранные, а также инородные белки, попавшие в клетку путем эндоцитоза. Большая часть клеточных белков (до 90%) разрушается 26S протеасомами. 26S протеасома (рис. 10) имеет особую структуру, которая позволяет локализовать протеолитическую активность во внутренней полости комплекса, вход в которую строго регулируется и для большинства белков закрыт. Благодаря этому, присутствие 26S протеасомы в цитоплазме, нуклеоплазме и иных компартментах клетки является абсолютно безопасным для нативных белков. Чтобы попасть в полость 26S протеасомы, белок должен быть помечен особым образом. В качестве метки используется полиубиквитиновая цепочка, состоящая не менее чем из четырех убиквитинов, последовательно соединенных друг с другом через лизин-48. Меченые (убиквитинированные) белки распозна-

ются и связываются 26S протеасомой, разворачиваются с помощью АТФ-зависимых компонентов протеасомы, а затем проникают в ее полость, где подвергаются разрушению. Убиквитиновая метка перед проникновением белка в протеолитическую полость, снимается изопептидазами и разбирается на отдельные убиквитины, которые впоследствии вторично используются для процесса убиквитинирования.

Структура 26S протеасомы

Протеасома состоит из двух основных модулей:

- коровая (каталитическая) 20S протеасома;
- регуляторная 19S частица.

Регуляторные частицы присоединяются к 20S протеасоме с одной или с двух сторон, формируя соответственно структуры с коэффициентами седиментации 26S и 30S (рис. 10-В). Для обозначения обеих структур обычно используют термин «26S протеасома», вкладывая в него функциональный смысл. Термин «30S протеасома» используется в том случае, если необходимо акцентировать внимание на структуру и физические свойства данного комплекса.

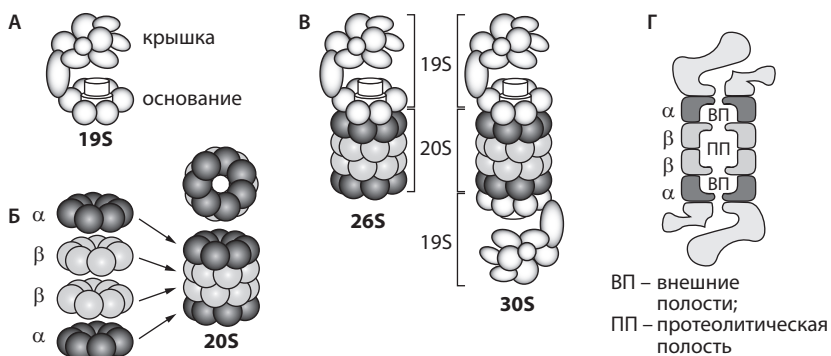


Рис. 10. Структура 26S протеасомы.

А — 19S частица;

Б — 20S частица (расположение гептамерных колец в частице, вид сверху и сбоку);

В — 26S и 30S протеасомы;

Г — схематическое изображение 30S протеасомы в разрезе

Коровая 20S протеасома

20S протеасома состоит из 28 субъединиц, которые формируют четыре гептамерных кольца, сложенных в виде стопки друг на друга (рис. 10-Б). У эукариот внешние кольца собраны из семи различных α -субъединиц (обозначаются соответственно α_1 – α_7), а внутренние — из семи β -субъединиц (β_1 – β_7). У прокариот все α - и β -субъединицы идентичные. Внутренняя полость протеасомы разделена на три отдела (рис. 10-Г). Две внешние полости предваряют вход в центральную протеолитическую полость, которая сформирована β -субъединицами. В клетках эукариот протеолитической активностью обладают β -субъединицы трех типов: β_1 проявляют каспазоподобную активность, β_2 — трипсиноподобную и β_5 — хемотрипсиноподобную активность. В прокариотической 20S протеасоме все 14 идентичных β -субъединиц каталитически активны.

Все частицы, из которых собрана 20S протеасома, обладают высокой гомологией и имеют сходную пространственную структуру. Однако α -субъединицы, в отличие от β -субъединиц, имеют дополнительную N-концевую α -спираль. Этот участок молекулы α -субъединицы принципиально важен для ограничения доступа во внутреннюю полость протеасомы. У прокариот все α -субъединицы в равной степени вносят вклад в открывание поры, а у эукариот основная роль принадлежит субъединице α_3 . У этой субъединицы N-концевая α -спираль больше всего выступает в канал и взаимодействует с остальными шестью α -субъединицами. Свободная 20S протеасома не участвует в протеолизе, так как каналы доступа в протеолитическую полость у нее закрыты. Для открывания канала и активации протеолиза необходимо взаимодействие 20S протеасомы с одной или двумя регуляторными 19S частицами.

Регуляторная 19S частица

19S частица состоит как минимум из 17 субъединиц. Кроме основных субъединиц в состав 19S частицы могут входить дополнительные белки, принимающие участие в сборке и регуляции активности протеолитического комплекса.

В структуре 19S частицы принято различать основание и крышку (рис. 10-А). Девять субъединиц формируют основание частицы, которое крепится на полюсах 20S протеасомы. Шесть из девяти субъединиц основания обладают АТФ-азной активностью. Остальные субъединицы 19S частицы образуют крышку.

Присоединение 19S частицы к 20S протеасоме сопровождается конформационными перестройками в аминотерминальных областях α -субъединиц внешних гептамерных колец. В результате этого пора протеасомы переходит в открытую конформацию. Однако доступ в протеолитическую полость строго контролируется регуляторной частицей, наиболее важной функцией которой является избирательное связывание субстрата.

Особенности функционирования 26S протеасомы

Субстрат узнается по наличию полиубиквитинированных групп и связывается несколькими субъединицами. В узнавании и связывании субстрата, помимо субъединиц 19S частицы, могут принимать участие лабильно ассоциированные с ней вспомогательные белки. Субъединицы, принимающие участие в узнавании субстрата, не только распознают пространственную структуру полиубиквитиновой цепи, но и способствуют правильной ориентации убиквитинированного субстрата на протеасоме. Корректное расположение субстрата позволяет его дальнейшее разворачивание и транслокацию в протеолитическую полость за счет АТФ-азной активности субчастиц основания 19S частицы. Разворачивание полипептидной цепи является необходимым условием, так как размер поры 20S протеасомы не позволяет белку с развитой пространственной структурой проникать в канал протеасомы.

В процессе взаимодействия субстрата с протеасомой стимулируется изопептидазная (деубиквитинирующая) активность одной из субъединиц крышки 19S частицы. Полиубиквитиновые цепочки снимаются с субстрата и расщепляются изопептидазами на отдельные убиквитины, которые вторично могут быть использованы в убиквитинировании.

Попадая в протеолитическую полость 26S протеасомы, полипептидные цепи белков-субстратов гидролизуются до корот-

ких полипептидов, включающих от 3 до 25 аминокислотных остатков.

В эукариотических клетках 26S протеасомы могут диссоциировать на 20S и 19S частицы, которые способны вновь объединяться в функционально активные 26S протеасомы. Кроме 19S частицы, существует множество белков, которые способны взаимодействовать с 20S протеасомой и формировать альтернативные формы протеасомы. Основным отличием таких протеасом является их неспособность связывать убиквитинированный субстрат и отсутствие АТФ-азной активности. Данные протеасомы используются клеткой для убиквитин-независимого протеолиза. Убиквитин-независимый протеолиз может быть связан с такими функциями:

- гидролиз коротких пептидов до аминокислот;
- участие в репарации ДНК (разрушение хроматиновых белков для обеспечения доступа к ДНК ферментам репарации);
- разрушение денатурированных белков (белки с нарушенной структурой часто имеют на поверхности молекулы обширные гидрофобные участки развернутой цепи, которые узнаются протеасомой; гидролиз белков с нарушенной структурой часто не требует затраты АТФ на разворачивание цепи);
- процессинг белков (как правило, эндопротеолиз — разрыв в полипептидную цепь вносится на значительном удалении от концов молекулы белка; в полость протеасомы проникает полипептидная цепь, сложенная в виде шпильки).

2. РЕЦЕПЦИЯ ВНЕШНЕГО СИГНАЛА

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

2.1.1. Что такое рецептор?

Рецепторы являются частью сигнальной системы клеток, обеспечивающей восприятие внешних стимулов. Во избежание путаницы следует заметить, что в физиологии животных термин «рецептор» используется также для обозначения части сенсорной системы организма (анализатора). В данном случае рецептором называют сложное многоклеточное образование, которое состоит не только из чувствительных клеток, специализированных на восприятии внешних раздражителей, но включает также нервные окончания дендритов чувствительных нейронов, глии, специализированные образования, сформированные из межклеточного вещества и клеток других тканей. Функция таких рецепторов заключается в преобразовании воздействия раздражителя в нервный импульс. Таким образом, рецептор, который является частью анализатора и представляет собой **многоклеточную** структуру, необходимо отличать от клеточного рецептора, являющегося **молекулярным** образованием.

Клеточный рецептор — это макромолекула или олигомерный белковый комплекс, способный специфически реагировать на определенное внешнее воздействие и запускать внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий к формированию специфического ответа на это воздействие посредством изменения функциональной активности клетки.

Далее для обозначения клеточного рецептора мы будем использовать термин «рецептор».

В клетках рецепторы присутствуют в значительном количестве и разнообразии. Их различают по многим критериям, и главным образом, по:

- типу воспринимаемого сигнала;
- локализации;
- структурным особенностям;
- механизму активации.

Растительные клетки способны реагировать на разные стимулы: химические соединения, свет, температуру, прикосновение, механическое воздействие, гравитацию и др. В рамках учебного курса мы будем рассматривать две наиболее изученные группы рецепторов: **химические (лиганд-связывающие)** и **световые**.

Клеточные рецепторы могут располагаться в различных частях клетки. В зависимости от их расположения, различают **внешние** и **внутренние** рецепторы. Внешние рецепторы локализованы на плазматической мембране, а внутренние — внутри клетки. Внешние химические рецепторы являются преимущественно трансмембранными белками, у которых лиганд-связывающие домены расположены на экстраклеточной поверхности плазмалеммы, а регуляторные — с цитоплазматической стороны. Внутренние рецепторы могут быть связаны с эндомembrанами, находиться в растворимом состоянии, а также входить в состав мультимерных белковых комплексов.

2.1.2. Структурно-функциональные особенности рецепторов

Субъединичная и доменная структура

Рецепторы могут быть мономерными молекулами и состоять из нескольких субъединиц. В ряде случаев субъединичный состав молекулы рецепторов изменяется в процессе активации. Так, рецепторные киназы в неактивном состоянии могут находиться в мономерном состоянии, но при активации димеризуются.

Среди основных структурных модулей следует выделить три домена:

- **рецепторный** — обеспечивает восприятие сигнала, например, связывание лиганда;
- **регуляторный** — необходим для взаимодействия с сигнальными партнерами, через него осуществляется передача сигнала;
- **домен локализации** — участок, определяющий локализацию рецептора.

Остальные функциональные домены характерны для определенных групп рецепторов.

Например, рецепторы могут иметь участки регуляции собственной активности. Эти участки или содержат сайты посттрансляционной модификации или служат для связывания с аллостерическими регуляторами разной природы (белками, низкомолекулярными веществами, ионами). В зависимости от статуса клетки, активность рецептора через данные участки может усиливаться, ослабляться или полностью ингибироваться.

Для рецепторных киназ характерно наличие **киназного** домена, в который входят реакционный центр, а также множественные сайты автофосфорилирования. Процесс автофосфорилирования является необходимой частью механизма активации этого типа рецепторов.

Основные механизмы активации рецепторов

Механизмы активации рецепторов имеют различный характер, однако в большинстве случаев они сводятся к формированию связывающей поверхности, через которую осуществляется взаимодействие рецептора с даунстрим сигнальными посредниками, что необходимо для передачи сигнала. Только в случае рецепторов-каналоформеров, которые совмещают функцию рецепторов и ионных каналов, сигнал передается посредством изменения концентрации ионов, выполняющих роль вторичных мессенджеров.

1. **Изменение конформации.** Изменения конформации молекулы рецептора, стимулированные в результате восприятия сигнала, приводят к формированию связывающей

поверхности, необходимой для взаимодействия рецептора с даунстрим сигнальным партнером. Для некоторых рецепторов это событие является достаточным для передачи сигнала.

2. **Ковалентная модификация.** Изменение пространственной структуры ряда рецепторов является первым этапом активации, тогда как поверхность взаимодействия формируется в результате последующей посттрансляционной ковалентной модификации. Этот механизм характерен для рецепторных киназ. Он сводится к тому, что в результате рецепции и изменения конформации у рецепторов повышается сродство друг к другу — они образуют гомодимерные конструкции и взаимно фосфорилируют друг друга. Фосфорилирование приводит к формированию связывающей поверхности. Ковалентная модификация рецепторов может также осуществляться вспомогательными регуляторными компонентами, обладающими каталитической активностью. Посредством такого механизма регулируется способность рецептора не только взаимодействовать с даунстрим сигнальным партнером, но и воспринимать внешний сигнал.
3. **Высвобождение рецептора из связанного состояния.** Существует группа рецепторов, которые в неактивном состоянии связаны с белком (часто шапероном), закрывающим доступ к определенным участкам поверхности молекулы рецептора, необходимым для проявления или регуляции его функциональной активности. В результате рецепции неактивный комплекс распадается, рецептор высвобождается и приобретает возможность передавать сигнал. Наиболее важными участками рецепторных молекул, которые могут экранироваться регуляторами, являются:
 - **участки взаимодействия с мишенями:** открывание участка позволяет рецептору связываться с мишенями и модулировать их активность;
 - **домены локализации:** изменение локализации рецепторов необходимо для пространственного разобщения или сближения рецептора и мишени;
 - **регуляторные домены:** участки взаимодействия с аллостерическими регуляторами или сайты посттрансляционной мо-

дификации, через которые осуществляется регуляция активности рецептора.

4. Перераспределение рецептора между плазмалеммой и эндосомной фракциями. Этот механизм актуален только для мембраносвязанных рецепторов. Посредством этого механизма часть плазматической мембраны, содержащей рецепторы определенного типа, путем эндоцитоза переходит в эндосомы. Возможен обратный процесс — слияние эндосом с плазмалеммой. Таким образом, рецепторы изымаются из мембраны или возвращаются в нее. Переход рецептора из плазмалеммы в эндосомы имеет как минимум два значения, противоположных по значению:

- удаление рецептора из плазмалеммы делает невозможным его взаимодействие с лигандами, что приводит к прерыванию сигнала;
- переход в эндосомы является своеобразным механизмом доставки активированного рецептора к внутриклеточным мишеням, что в ряде случаев является необходимым условием для передачи сигнала.

Активация рецепторов и передача сигнала часто представляют собой достаточно сложные процессы, которые включает в себя несколько разнообразных механизмов. Например, рецепторы брассиностероидов, которые являются рецепторными киназами, в процессе активации фосфорилируют друг друга, а также подвергаются фосфорилированию корецепторными молекулами и другими регуляторами. Кроме этого, каталитическая активность брассиностероидного рецептора направлена на даунстрим сигнальный посредник, а в некоторых случаях механизм передачи сигнала предполагает образование и транслокацию эндосомных везикул.

Функциональная активность

По функциональной активности рецепторы можно разделить на две условные категории: классические и рецепторы с двойной функцией.

Классические рецепторы не выполняют никаких иных функций кроме собственно рецепции и передачи сигнала.

Рецепторы с двойной функцией помимо рецепции выполняют иные функции. К данной группе можно отнести рецепторы-каналоформеры — трансмембранные белковые комплексы, которые совмещают функцию рецепторов и ионных каналов. Существуют также внутриклеточные рецепторы с двойной функцией. Например, рецептор ауксина TIR1 является частью убиквитинирующей протеиновой лигазы. TIR1 — это F-box белок, функцией которого является выбор и связывание субстрата для убиквитинирования. Рецептор TIR1 приобретает сродство к белку-субстрату только в результате рецепции ауксина.

2.2. ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ

Существует огромное количество клеточных рецепторов, которые специфически связывают химические соединения (лиганды) определенного типа. Такими веществами могут быть гормоны, другие биологически активные вещества с гормоноподобным действием, элиситоры, трофические соединения (сахара, аминокислоты), ионы (например, нитраты) и др. Экстраклеточные лиганды, которые специфически взаимодействуют с рецепторами, называют **первичными мессенджерами**. Специфическое связывание с первичными мессенджерами провоцирует конформационные изменения рецептора, необходимое для запуска трансдукции внутриклеточного сигнала. Следует заметить, что с конкретным химическим рецептором могут связаться соединения разной природы, однако далеко не все способны активировать сигнальную систему. Специфичность взаимодействия, позволяющая стимулировать процесс передачи сигнала, возможна только при взаимодействии рецептора с определенным типом лиганда, который называют также активным агонистом.

Химический рецептор обладает определенной степенью **аффинности** (сродства) к лиганду. Значение аффинности во многом зависит от концентрации лиганда в тканях организма. Любой рецептор настроен на определенный уровень концентрации агониста, при котором возможно эффективное связывание. Например, трофические соединения присутствуют в значительно больших концентрациях, чем регуляторы гормональной при-

роды. Соответственно, рецепторы, специфичные к трофическим соединениям, обладают более низким сродством к агонистам, чем рецепторы гормонов и гормоноподобных регуляторов.

Прочность связывания рецептора с лигандом (аффинность) является важной кинетической характеристикой и выражается константой диссоциации (K_D), значение которой равно концентрации лиганда, при которой половина рецепторов связана с лигандом. Чем ниже константа диссоциации, тем более низкие концентрации лиганда требуются для связывания с рецептором. Низкие значения K_D также являются признаком более прочно связанного комплекса **рецептор–лиганд** и более продолжительного время его существования. Взаимодействие рецептора и лиганда может иметь различный временной характер. Однако для эффективной работы сигнальной системы клетки важное значение имеет не только прочность связывания рецептора с лигандом, но также и скорость диссоциации рецептора и лиганда. Изменение условий может привести к необходимости быстрого прекращения стимуляции рецептора лигандом, а этого легче достичь при сравнительно низкой аффинности. По этой причине константа диссоциации большинства рецепторов с лигандами чаще имеет промежуточные значения и оценивается в среднем 10^{-9} – 10^{-7} М, но у различных рецепторов может варьировать в значительных пределах.

Один и тот же лиганд может связываться различными типами специализированных рецепторов, которые обладают разным сродством к лиганду. Например, у растений обнаружено множество этиленовых рецепторов (гистидиновых киназ), которые связывают этилен в диапазоне концентраций $0,1 \cdot 10^{-9}$ М – $5 \cdot 10^{-9}$ М. По степени сродства с этиленом их разделяют на две группы: высокоаффинные и низкоаффинные рецепторы. Период полураспада комплекса высокоаффинных этиленовых рецепторов с лигандом *in vitro* достигает 6 часов и более, тогда как для второй группы, низкоаффинных рецепторов, эта величина не превышает 30 минут. По-видимому, наличие рецепторов с различной аффинностью к лиганду необходимо для того, чтобы отличать концентрации, в которых присутствует лиганд в ткани. Это имеет принципиальное значение в регуляторном отношении, поскольку разные типы рецепторов (в ответ

на различные концентрации лиганда) могут стимулировать неоднозначные сигнальные механизмы. Кроме того, важным может быть продолжительность поддержания сигнала. Например, в стрессовых условиях воздействие этилена на рецепторы актуально только лишь при влиянии неблагоприятного фактора, то есть эта реакция обратима при изменении условий. В то же время, процессы созревания сочных плодов или старения органов представляют собой своего рода векторные механизмы, которые можно ускорить или замедлить, но невозможно отменить. Хотя данных об аффинности рецепторов этилена, участвующих в описанных механизмах, нет, можно предположить, что для обратимых процессов используются рецепторы с меньшим сродством, по сравнению с процессами необратимыми. Косвенно это подтверждается тем, что в ювенильных и зрелых тканях растений поддерживается экспрессия генов, кодирующих различные наборы этиленовых рецепторов.

На плазматической мембране или внутри клетки находится огромное количество различных рецепторов. Рецепторы определенного типа могут присутствовать в разной копияности, причем в некоторых случаях их количество может достигать несколько тысяч в расчете на одну клетку. Так, на плазматической мембране типичной животной клетки насчитывается 10 000 – 20 000 рецепторов одного типа. Причем для активации специфического ответа достаточно стимуляции не более 2% гормон-специфических рецепторов. Такая большая концентрация рецепторов, вероятно, необходима для ответа на низкие концентрации лиганда.

2.2.1. Локализация лиганд-связывающих рецепторов

Расположение лиганд-связывающих рецепторов во многом определяется природой лиганда, который они воспринимают в качестве сигнала. Липорастворимые лиганды легко проникают через плазмалемму внутрь клетки путем обычной диффузии сквозь билипидный слой или через специализированные переносчики посредством облученной диффузии. Такие сигнальные молекулы могут связываться и с внешними, и с вну-

тренними рецепторами. Например, стероидные гормоны животных легко проникают в клетку вследствие липофильных свойств и связываются с рецепторами, локализующимися в цитоплазме или в нуклеоплазме. Вместе с тем, наличие внутриклеточных рецепторов для липофильных регуляторов, по-видимому, не является обязательным. Растительные стероидные гормоны, брассиностероиды, близки по своей природе животным аналогам, хотя растительные и животные стероидные регуляторы и имеют существенные различия в кольце В. Известные рецепторы брассиностероидов локализуются на плазмалемме, а существуют ли их внутриклеточные рецепторы, не известно. С другой стороны, рецепторы растительного гормона этилена, идентифицированные до настоящего времени, располагаются исключительно на плазмалемме, хотя этилен достаточно легко диффундирует через мембраны.

Такие растительные гормоны, как ИУК, АБК и гиббереллины являются слабыми кислотами, вследствие чего имеют переходные свойства растворимости. В кислых условиях их молекулы протонируются и приобретают электронейтральное состояние, при котором данные вещества хорошо растворяются в липидной фазе и поэтому легко проникают в клетку. Однако в щелочных условиях эти гормоны теряют протон и переходят в ионное состояние (ИУК^- , АБК^- , ГК^-), которое обеспечивает им гидрофильные свойства. Межклеточное пространство у растений (апопласт) имеет низкие значения рН, при которых слабые кислоты не заряжены. Поэтому диффузия ИУК, АБК и гиббереллинов через плазматическую мембрану из апопласта внутрь клетки происходит достаточно легко. Обратный выход гормонов из клетки затруднен и требует затраты дополнительной энергии. Таким образом, слабокислотные свойства данных гормонов, а также распределение заряда относительно плазмалеммы позволяют внутриклеточную локализацию их рецепторов. Предполагается, что рецепторы этих гормонов локализуются на плазмалемме и внутри клетки. Однако для всех трех групп гормонов в настоящее время обнаружены внутриклеточные рецепторы, а внешний рецептор идентифицирован только для ИУК. Внешний рецептор ауксина ABR1 (auxin binding proteins 1) является поверхностным белком, который

расположен на внешней поверхности плазмалеммы. Предполагается, что АВР1 взаимодействует с трансмембранным белком, через который осуществляется передача сигнала внутрь клетки.

Многие гормоны совсем не проникают в клетку, или этот процесс осуществляется с трудом. Препятствует этому полярность молекулы (в том числе наличие заряда) или ее большие размеры. Примером гормонов с большой молекулярной массой являются полипептидные гормоны. Все они, включая даже относительно низкомолекулярные растительные гормоны, такие как фитосульфокнины (группа сульфатированных по тирозину тетра- и пентапептидов), связываются со специфическими рецепторами на внешней поверхности плазмалеммы.

2.2.2. Внешние рецепторы

Рецептор-подобные киназы

Рецептор-подобные киназы являются мономерными интегральными белками, пересекающими мембрану один раз. Они локализуются на плазматической мембране, но обнаруживаются также в микросомной фракции.

К рецептор-подобным киназам относятся рецепторы брасиностероидов, многих элиситоров, а также все идентифицированные до нынешнего времени рецепторы пептидных гормонов.

Молекула рецептор-подобных киназ состоит из трех основных структурных элементов (рис. 11).

1. **Экстраклеточный (рецепторный) домен** формируется N-терминальным районом молекулы. Согласно строению этого домена различают четыре основные группы рецептор-подобных киназ: LRR-группа (лейцин-обогащенные повторы — leucine riched repeat); S-домен группа; лектин-подобный домен; EGF.
2. **Трансмембранный домен** представлен α -спиральным участком, который пронизывает мембрану один раз, соединяя внешнюю и внутриклеточную части рецепторной молекулы.
3. **Цитоплазматический домен** — внутриклеточная часть рецептора, сформированная С-терминальным участком.

Включает **регуляторный** фрагмент, который содержит каталитический киназный центр, множественные сайты фосфорилирования и участки взаимодействия с сигнальными молекулами. Киназная активность рецептор-подобных киназ может быть направлена на рецепторы (себе подобные молекулы), корецепторы и другие мишени, в качестве которых могут выступать различные регуляторы, а также даунстрим сигнальные белки, на которые передается сигнал.

Механизм передачи сигнала. Восприятие сигнала (связывание агониста) осуществляется экстраклеточным доменом рецептора. Связывание лиганда способствует изменению конформации рецепторной области молекулы, но мало отражается на структуре цитоплазматического домена. Вместе с тем, изменение конформации внешнего домена способствует повышению сродства рецепторных молекул друг к другу. Поскольку молекулы рецептор-подобных киназ могут латерально диффундировать по мембране, они способны образовывать димерные комплексы (рецептор–рецептор). В механизме активации рецепторных киназ могут участвовать также **корецепторы**.

За счет сближения двух рецепторов активируются киназные центры, и рецепторные молекулы фосфорилируют друг друга по остаткам серинов и треонинов в разных участках цитоплазматического домена. Этот процесс называют **автофосфорилированием**

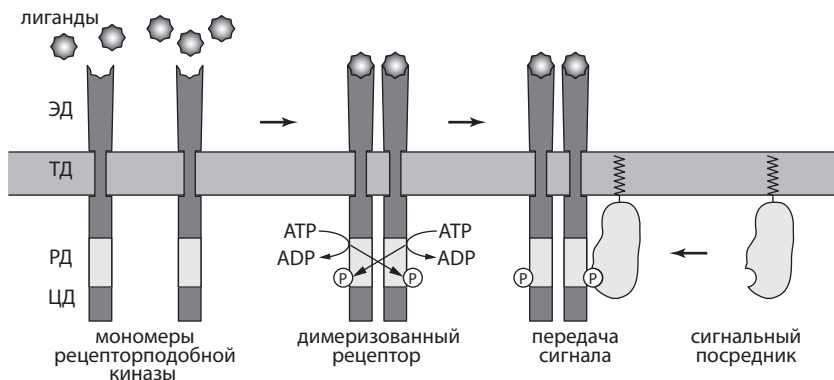


Рис. 11. Структура рецептор-подобной киназы и механизм активации

или точнее **трансмoleкулярным автофосфорилированием**, так как рецепторные молекулы фосфорилируют не самих себя, а себе подобные молекулы. Источником фосфорных групп выступает АТФ. Некоторые рецептор-подобные киназы обладают двойной специфичностью и способны помимо остатков серина и треонина фосфорилировать также остатки тирозина.

Автофосфорилирование рецепторов является необходимым начальным этапом их активации, но, как правило, недостаточным для передачи сигнала. В процессе автофосфорилирования подготавливается поверхность для взаимодействия с корецепторами. Например, автофосфорилирование рецепторов брассинолида **BKI1** (**BRI1 kinase inhibitor 1**) необходимо для последующего связывания с корецептором **BAK1** (**BRI1-associated kinase 1**), без участия которого невозможна окончательная активация рецептора.

Корецептор рецептор-подобных киназ обладает сходной с рецептором структурой, но не имеет лиганд-связывающего домена. Корецептор в процессе активации образует гетеродимеры с рецептором и участвует во взаимном фосфорилировании. В некоторых случаях образуются гетеротетрамеры, состоящие из двух молекул рецептора и двух молекул корецептора. Многие корецепторы могут взаимодействовать с различными рецептор-подобными киназами. Так, корецептор **BAK1** участвует в активации рецептора брассинолида **BRI1**, а также флагеллин-связывающего рецептора **FLS2** (**flagellin sensitive 2**). Исследователи часто называют **BAK1** универсальным корецептором.

Взаимное фосфорилирование рецептора и корецептора (**трансфосфорилирование**) направлено на подготовку рецептора к передаче сигнала. В результате рецептор приобретает способность воздействовать на следующий компонент сигнальной системы.

Передача сигнала рецептор-подобными киназами возможна двумя способами:

- 1) путем межмолекулярного взаимодействия с даунстрим сигнальным посредником (ассоциация или диссоциация);
- 2) посредством ковалентной модификации сигнального посредника (активация киназной активности рецептор-подобной киназы в отношении даунстрим посредника).

В обоих случаях воздействие рецептора способствует модуляции активности сигнального посредника, а следовательно, передаче сигнала.

Таким образом, трансдукция сигнала через рецептор-подобные киназы не требует проникновения лиганда внутрь клетки, а механизм передачи сигнала можно представить в такой последовательности:

- 1) связывание лиганда с рецептором;
- 2) образование димеров рецепторных молекул;
- 3) трансмолекулярное автофосфорилирование рецепторов;
- 4) образование гетерополимерных комплексов с корецепторами;
- 5) трансфосфорилирование между рецепторами и корецепторами;
- 6) воздействие рецептора на даунстрим сигнальный посредник и модуляция его активности (передача сигнала).

Механизмы передачи сигнала в каждом конкретном случае могут отличаться. Например, рецептор при активации может связываться с даунстрим сигнальным посредником через поверхность, которая формируется в результате авто- и трансфосфорилирования. В других случаях рецептор связан с посредником в неактивном состоянии, а при активации происходит их диссоциация. Кроме этого, рецепторы, корецепторы и сигнальные посредники могут взаимодействовать с различными регуляторами, модулирующими их активность. Разнообразные взаимоотношения между сигнальными партнерами определяют особенности активационного цикла и механизма передачи сигнала.

Гистидиновые рецепторные киназы

Гистидиновые рецепторные киназы первоначально были обнаружены у бактерий. Для эукариотических клеток существование гистидиновых киназ было показано в начале 1990-х годов после открытия у растения *Arabidopsis* этиленового рецептора ETR1, а у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — осмосенсора SLN1. Гистидиновые киназы в изобилии встречаются у растений и бактерий, но у животных они не обнаружены.

У растений гистидиновые рецепторные киназы представлены двумя типами:

- гибридные гистидиновые киназы;
- этиленовые рецепторы.

Рецепторы обеих групп имеют гомологичные участки и в целом обладают сходной структурой. Однако между ними есть принципиальные структурно-функциональные различия. Главное различие заключается в механизме передачи сигнала.

Гибридные гистидиновые киназы

Гистидиновые рецепторные киназы являются частью **двухкомпонентных сигнальных систем**, функционирующих у растений и бактерий. В профессиональном сленге молекулярных биологов эти рецепторы называют часто «двухкомпонентными гистидиновыми киназами» или «двухкомпонентными рецепторами». В данном случае термин «двухкомпонентный» имеет отношение к типу сигнальной системы и не связан с особенностями структуры рецептора. Гистидиновые рецепторные киназы растений и бактерий имеют гомологичные участки, но отличаются доменным составом. Более сложные по структуре гистидиновые киназы растений называют **гибридными**.

Прокариотические двухкомпонентные сигнальные системы

Двухкомпонентные сигнальные системы бактерий (рис. 12-А, Б) состоят из двух типов молекул:

- 1) гистидиновые рецепторные киназы (His-киназы);
- 2) регуляторы ответа (**RR** — response regulator).

По этой причине данные сигнальные системы называют **двухкомпонентными**.

Бактериальные гистидиновые рецепторные киназы являются интегральными мономерными белками, которые локализованы на плазмалемме. Молекула рецептора два раза пересекает мембрану N-концевым участком. Обе терминальные области расположены с цитоплазматической стороны. Внешний участок гистидиновой киназы, расположенный между двумя трансмембранными доменами, формирует **рецепторный (input) домен**, или **CHASE-домен** (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular). Карбокситерминальная часть молекулы

рецептора формирует **transmitter** домен, который содержит каталитический киназный центр и консервативный остаток гистидина, который фосфорилируется при трансмолекулярном автофосфорилировании.

Регуляторы ответа состоят из двух основных функциональных структур. Аминотерминальная область молекулы формирует **receiver** домен, содержащий консервативный остаток аспарагиновой кислоты. В карбокситерминальной части регулятора

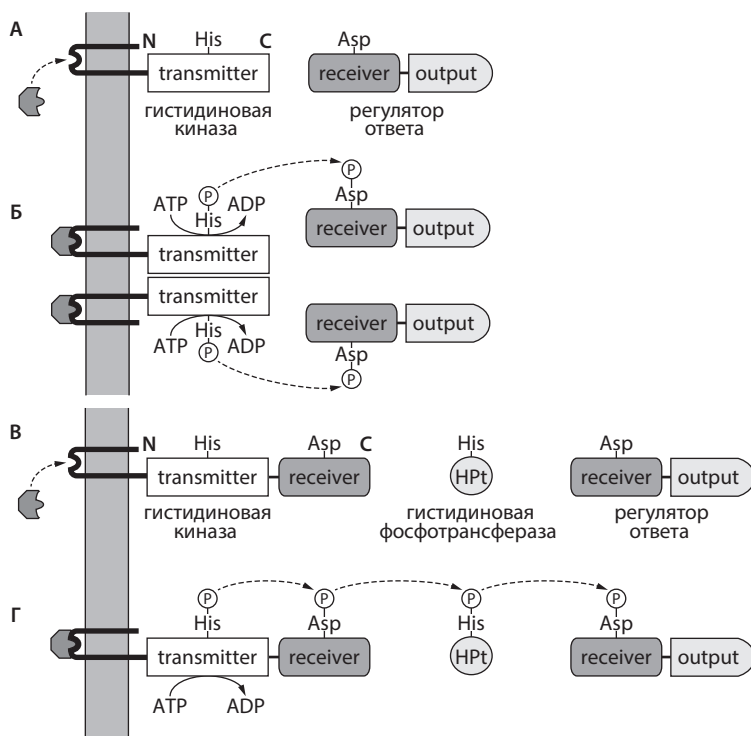


Рис. 12. Двухкомпонентные сигнальные системы прокариот (А, Б) и растений (В, Г).

А, В — неактивное состояние;

Б, Г — активное состояние (автофосфорилирование и фосфорелейный механизм).

Димеризация рецепторов в растительной системе не показана

ответа расположен **регуляторный (output)** домен, через который осуществляется модуляция активности мишеней.

Различают регуляторы ответа двух типов:

- 1) **RR-A** — регуляторы ответа А-типа модулируют активность функциональных белков.
- 2) **RR-B** — регуляторы ответа В-типа являются транскрипционными факторами. У регуляторов ответа В-типа в отличие от RR-A в регуляторном домене имеется дополнительная область (**GARP**-домен — **Glutamic Acid-Rich Protein**), необходимый для сайт-специфичного связывания с промоторами генов.

Механизм активации и передачи сигнала. Связывание лиганда His-киназой повышает сродство рецепторов друг к другу, которые проявляют выраженную тенденцию к образованию гомодимерных структур. Сближение гистидиновые киназ стимулирует взаимное фосфорилирование остатков гистидина в transmitter доменах. Затем фосфатная группа переносится с остатка гистидина рецептора на консервативный остаток аспарагиновой кислоты **receiver** домена регуляторов ответа. Следовательно, гистидиновые рецепторные киназы проявляют не только свойства гистидиновой киназы, но и фосфотрансферазы. Регуляторы ответа в фосфорилированном состоянии приобретают способность модулировать активность своих мишеней. Таким образом, передача сигнала в двухкомпонентных сигнальных системах представляет собой **фосфорелейный механизм** (перенос фосфорной группы), который инициируется в результате автофосфорилирования рецептора после рецепции экстраклеточного сигнала.

Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений

У растений, как и у бактерий, функционируют аналогичные сигнальные системы с участием гистидиновых рецепторных киназ и регуляторов ответа. Эти системы у обеих групп организмов имеют общий принцип активации и передачи сигнала, поэтому растительную систему традиционно называют **двухкомпонентной**. Однако у растений двухкомпонентные системы включают дополнительный белковый модуль — **гистидиновую фосфотрансферазу**. Поэтому такие растительные системы называют также **двухкомпонентными многошаговыми**

сигнальными системами. Примером подобной системы у растений служит цитокининовая сигнальная система.

Таким образом, двухкомпонентные многошаговыми регуляторные системы растений (рис. 12-В, Г) представлены тремя компонентами:

- 1) гистидиновые гибридные киназы;
- 2) гистидиновые фосфотрансферазы;
- 3) регуляторы ответа.

Гибридные гистидиновые киназы растений близки по структуре бактериальным, но имеют более сложное строение. Они также локализуются на плазматической мембране, имеют два трансмембранных домена, внешний рецепторный домен и цитоплазматический **transmitter** домен, который обладает свойствами гистидиновой киназы и содержит консервативный остаток гистидина. Однако в карбокситерминальной области молекулы рецептора находится дополнительный **receiver** домен, гомологичный **receiver** домену регулятора ответа. Он также содержит консервативный остаток аспарагиновой кислоты, на который переносится фосфатная группа.

Гистидиновые фосфотрансферазы имеют низкую молекулярную массу и содержат консервативный остаток гистидина, который используется для переноса фосфатной группы. В двухкомпонентной сигнальной системе гистидиновую фосфотрансферазу часто называют **HPt доменом**, а функционально активный остаток гистидина — **вторичным гистидином**. Вторичный гистидин принимает фосфатную группу от остатка аспарагиновой кислоты **receiver** домена гибридной гистидиновой киназы и переносит его на остаток аспарагиновой кислоты **receiver** домена регулятора ответа (рис. 12-Г).

Регуляторы ответа растений сходны с бактериальными. Их молекулы состоят из аминотерминального **receiver** домена, содержащего консервативный остаток аспартата, и карбокситерминального **регуляторного** домена. В механизмах регуляции участвуют два типа регуляторов ответа: модуляторы активности белков (RR-A) и транскрипционные факторы (RR-B).

Механизм функционирования. Рецепция внешнего сигнала гистидиновой гибридной киназой способствует димеризации рецепторных молекул. В составе гомодимерной группы

рецепторные киназы фосфорилируют друг друга по остатку гистидина. После этого инициируется трехтактный фосфорелейный механизм. Первый этап осуществляется внутри молекулы рецептора: фосфатная группа переносится от остатка гистидина transmitter домена на остаток аспартата receiver домена. Затем фосфатную группу принимает гистидиновая фосфотрансфераза (фосфат присоединяется к остатку вторичного гистидина) и переносит ее на остаток аспартата регулятора ответа. Фосфорилированные регуляторы ответа связываются со своими мишенями и модулируют их активность.

Причины усложнения эукариотических двухкомпонентных систем. Усложнение двухкомпонентных систем у растений связано с усложнением строения эукариотической клетки, по сравнению с прокариотической. У бактерий передача сигнала путем фосфорелейного механизма осуществляется беспрепятственно, так как все компоненты сигнальной системы локализуются в одном компартменте — цитоплазме. Все регуляторы ответа могут контактировать одновременно с цитоплазматическим доменом рецептора и со своими мишенями, в том числе с ДНК. У растений, как и у всех эукариот, ДНК отделена от цитоплазмы ядерной мембраной. Регуляторы ответа В-типа локализуются преимущественно в ядре и не могут непосредственно взаимодействовать с рецепторными гистидиновыми киназами. Этим определяется необходимость участия в фосфорелейном механизме мобильного компонента, обладающего фосфотрансферазной активностью. Функцию такого компонента выполняет гистидиновая фосфотрансфераза (HPt домен). Она принимает на себя фосфатную группу от рецепторной киназы, затем транслоцируется в ядро и передает фосфат на регулятор ответа. Таким образом, компартментация эукариотической клетки является причиной усложнения двухкомпонентных регуляторных систем растений.

Этиленовые рецепторы

Структура. Рецепторы этилена обладают существенным сходством с гистидиновыми рецепторными киназами, функционирующими в двухкомпонентных сигнальных системах растений и бактерий. Этиленовые рецепторы растений являются инте-

гральными белками, локализованными в плазмалемме (рис. 13). В N-терминальной области они имеют три гидрофобных транс-мембранных домена, которыми пересекают мембрану. Аминоконцевой участок молекулы расположен снаружи клетки, а карбокситерминальный — в цитоплазме. Экстраклеточные участки рецепторной молекулы формируют этилен-связывающий домен и участвуют в димеризации молекул. В отличие от двухкомпонентных рецепторов, этиленовые рецепторы всегда существуют в виде гомодимеров, в которых мономеры ковалентно связаны друг с другом. Связь обеспечивается двумя цистеиновыми мостиками, образованными между остатками цистеинов, занимающих положения 4 и 6 в полипептидных цепях рецепторов (cys-4–cys-4', cys-6–cys-6').

Все обнаруженные этиленовые рецепторы растений кодируются одним семейством генов. Однако по структуре цитоплазматической области молекулы их можно разделить на две группы. Рецепторы первой группы имеют значительное сходство с гибридными гистидиновыми киназами растений, а рецепторы второй — с двухкомпонентными рецепторами бактерий.

В цитоплазматической части этиленовых рецепторов обеих групп находится гистидинкиназный каталитический домен и консервативный остаток гистидина, который фосфорилируется при автофосфорилировании. Этот участок молекулы гомологичен transmitter-домену двухкомпонентных рецепторов.

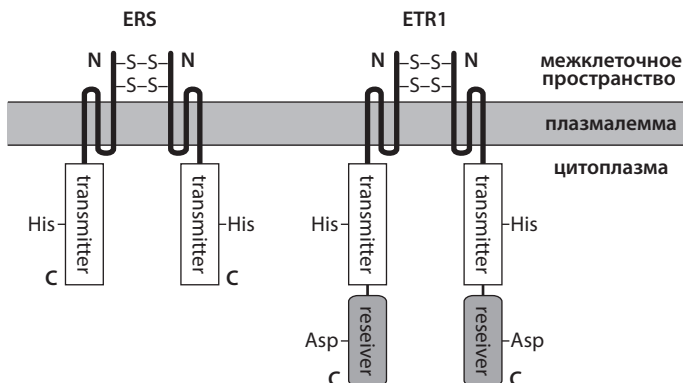


Рис. 13. Этиленовые рецепторы

Но только рецепторы первой группы в карбокситерминальном районе имеют домены, гомологичные receiver-доменам гибридных гистидиновых киназ и регуляторов ответа. Эти участки содержат консервативные остатки аспарагиновой кислоты.

Примером рецептора, близкого по структуре гибридным гистидиновым киназам растений, является рецептор ETR1 (ethylene triple response 1) арабидопсиса. К рецепторам второй группы относится ERS (ethylene response sensor). Несмотря на структурные различия, ETR1 и ERS обладают 67% гомологией аминокислотной последовательности и выполняют идентичные функции.

Механизм передачи сигнала. Этиленовые рецепторы в составе гомодимера в отсутствии лиганда (этилена) находятся в конститутивно активном состоянии, при котором консервативный остаток гистидина transmitter-домена несет фосфатную группу. В отличие от гистидиновых рецепторных киназ двухкомпонентных регуляторных систем этиленовые рецепторы не участвуют в фосфорелейном механизме. Активные этиленовые рецепторы поддерживают в активном состоянии даунстрим сигнальный компонент — серин/треониновую киназу CTR1 (constitutive triple response 1). Взаимодействие осуществляется между киназным доменом рецептора и аминотерминальной областью киназы. Киназа CTR1 является негативным регулятором этиленового сигнала, и в отсутствие гормона она активно ингибируется.

Рецепция этилена стимулирует изменение конформации рецептора и его инактивацию. Это приводит к последующей инактивации киназы CTR1 и дерепрессии системы этиленового сигнала.

Таким образом, этиленовые рецепторы принципиально отличаются от всех других рецепторных киназ механизмом рецепции и передачи сигнала. Основными отличительными характеристиками этиленовых рецепторов являются:

- 1) постоянное пребывание в гомодимерном состоянии;
- 2) конститутивная активность в отсутствии лиганда;
- 3) инактивации в результате рецепции;
- 4) передача сигнала осуществляется за счет изменения конформации;

- 5) киназная активность в отношении даунстрим сигнальных партнеров не проявляется;
- 6) фосфорелейный механизм не инициируется.

2.2.3. G-белок сопряженные рецепторы (GPCR)

G-белок сопряженные рецепторы животных

У животных в плазматической мембране клеток в значительном количестве и разнообразии присутствуют рецепторы, имеющие 7 трансмембранных доменов. Эти рецепторы функционально связаны с гетеротримерными G-белками и составляют с ними устойчивую сигнальную пару. Структурные и функциональные особенности данного семейства рецепторов определяют их названия: **7ТМ** (семитрансмембранные) или **GPCR (G-Protein Coupled Receptor)** — G-белок сопряженные рецепторы. Ранее их называли также серпентиновыми или змееподобными рецепторами, однако в современной литературе эти термины постепенно выходят из употребления.

GPCR — это большой класс мономерных рецепторов, которые выполняют самые разнообразные сигнальные функции у животных. К данному типу относятся вкусовые, обонятельные, адренергические, мускариновые ацетилхолиновые и другие рецепторы. Все они имеют общий принцип строения и функционирования, а различаются лиганд-специфичностью, то есть способностью воспринимать разные внешние сигналы.

Полипептидная цепь GPC-рецепторов семь раз пронизывают мембрану (рис. 14). N-терминальный участок полипептида располагается на экстраклеточной стороне плазматической мем-

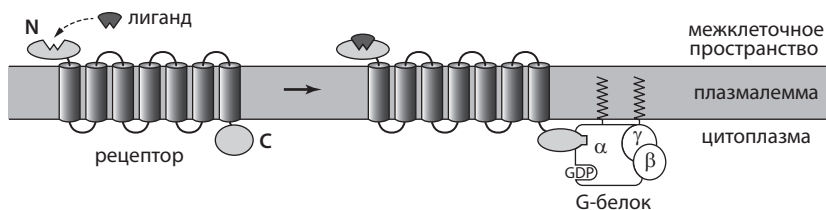


Рис. 14. G-белок сопряженные (семитрансмембранные) рецепторы

браны, а С-концевая область — на цитоплазматической. Некоторые аминокислотные остатки внешнечлеточных областей полипептидной цепи (N-концевой и межтрансмембранные участки) рецепторной молекулы гликозилированы. Олигосахаридные группы играют существенную роль в формировании лиганд-связывающего участка рецептора. Цитоплазматическая С-терминальная область GPCR формирует участок связывания G-белка, через который опосредуется передача сигнала на G-белок. Гетеротримерный мембраносвязанный G-белок является обязательным компонентом сигнальных механизмов, которые стимулируются через G-белок сопряженные рецепторы.

Существует множество типов GPC-рецепторов, специфичных к лигандам различной химической природы. Они связывают пептидные и гликопротеиновые гормоны, амины, нуклеотиды, эйкозаноиды, аминокислоты, ионы кальция и т. д. Кроме того, есть рецепторы, активация которых осуществляется протеазами, отрезающими экстраклеточный участок рецепторной молекулы. Трансдукция сигнала от рецептора на G-белок осуществляется при рецепции, в результате которой изменяется конформация рецепторной молекулы. Активированный G-белок диссоциирует на α -субъединицу и $\beta\gamma$ -димер, которые взаимодействуют с последующими сигнальными белками (см. раздел «Гетеротримерные G-белки»).

G-белки GPCR-типа (GTG)

Секвенирование генома *Arabidopsis* позволило постулировать существование GPCR у растений. Однако применение жестких критериев идентификации не позволило подтвердить наличия семи трансмембранных доменов у продуктов генов, кодирующих гипотетические GPCR, а также их мембранную локализацию и способность взаимодействовать с α -субъединицей гетеротримерного G-белка. Таким образом, еще не известно, существуют ли у растений типичные GPCR животного типа. Не исключено, что у растений подобные мембранные рецепторы имеют особую «растительную» структуру и способ функционирования. Примером таких особых рецепторов являются белки GTG, которые являются предположительными рецепторами АБК.

У растений *Arabidopsis* были обнаружены два белка (GTG1 и GTG2), обладающих существенной гомологией с одним из GPCR человека и имеющих рецептор-подобную топологию. В отличие от GPCR, в структуре белков GTG присутствуют:

- 1) девять трансмембранных доменов;
- 2) АТФ/ГТФ-связывающий домен;
- 3) домен, ответственный за усиление ГТФазной активности.

Очищенные GTG1 и GTG2 связывают ГТФ и проявляют ГТФазную активность. Поскольку эти белки гидролизуют ГТФ и обладают сходством с GPCR, их назвали **G-белками GPCR-типа** (GPCR-Type G Protein — GTG).

Помимо структурных особенностей, GTG обладают свойствами, которые существенно отличают их от известных G-белок-сопряженных рецепторов животных.

Наличие ГДФ или ГТФ в гуаниннуклеотид-связывающем домене (ГДФ- и ГТФ-связанная конформация) определяет сродство GTG к АБК. ГДФ-связанная форма GTG связывает АБК и инициирует передачу сигнала АБК, а ГТФ-связанная форма GTG теряет сродство к гормону.

Считается, что переход между двумя основными конформациями обеспечивает механизм регуляции распространения сигнала АБК. Следует отметить, что цикл активации GTG отличается от циклов активации гетеротримерных и мономерных G-белков. Все известные G-белки активируют сигнальную систему в ГТФ-связанной форме, тогда как GTG в этой форме пребывает в неактивном состоянии.

2.2.4. Рецепторы-каналоформеры

Изменение направления и интенсивности транспорта ионов способствует осцилляциям их внутриклеточной концентрации. Этот феномен используется в механизмах трансдукции сигнала. Ионные каналы могут быть как промежуточными компонентами сигнальной цепи, так и рецепторами, воспринимающими экстраклеточные сигналы. Рецепторы, которые одновременно являются ионными каналами, называют **рецепторами-каналоформерами** ионотропными рецепторами.

Примером рецептора этого класса является ацетилхолиновый рецептор никотинового типа у животных (название обусловлено сродством рецептора к никотину). В отличие от мускаринового ацетилхолинового рецептора, относящегося к GPCR, никотиновый рецептор формирует неспецифический ионный канал, который проводит ионы Na^+ и K^+ .

Ацетилхолиновые никотиновые рецепторы состоят из различных комбинаций пяти типов субъединиц (α , β , γ , δ , ϵ), причем в структуру любого ацетилхолинового рецептора входят две α -субъединицы, на которых находятся участки связывания ацетилхолина (рис. 15). Полипептидные цепи всех субъединиц четыре раза пронизывают плазмалемму. N- и C-концевые домены находятся снаружи клетки и гликозилированы. Цитоплазматические области рецепторной молекулы взаимодействуют с компонентами цитоскелета — тубулиновыми и актиновыми белками.

Ацетилхолиновые рецепторы-каналоформеры, располагаются на постсинаптических участках мембран возбудимых клеток (нервных, мышечных, секреторных) и участвуют в преобразовании сигнала. Молекулы нейротрансмиттера ацетилхолина высвобождаются через пресинаптические мембраны нервных окончаний путем экзоцитоза, диффундируют через синаптическую щель и связываются с двумя α -субъединицами ацетилхолиновых рецепторов.

Связывание нейротрансмиттера с холинергическим рецептором вызывает конформационные изменения в олигомерном комплексе, которые приводят к формированию ионного канала. Это позволяет ионам Na^+ входить в клетку, что вызывает ло-

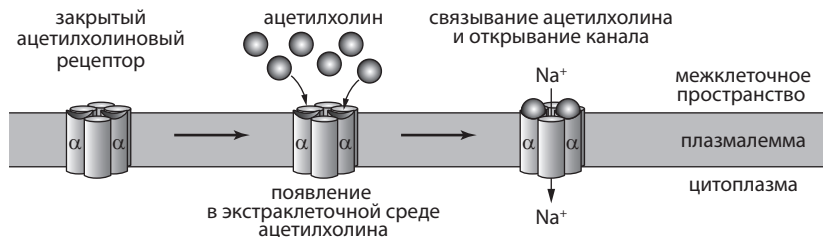


Рис. 15. Ацетилхолиновый рецептор-каналоформер

кальную деполяризацию мембраны и стимулирует специфический ответ. В нейромышечной системе, например, действие ацетилхолина на холинергические рецепторы вызывает сокращение мускулатуры.

У растений подобные рецепторы-каналоформеры не обнаружены. Растительные ионные каналы, активность которых регулируется лигандами, связывают вторичные мессенджеры. Например, семейство CNGC (cyclic nucleotide-gated channels) ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами cAMP и cGMP (см. раздел «cAMP-регулируемые белки растений»), и рецепторы фосфорилированных форм инозитола (см. раздел «Индucedированное поступление кальция в цитоплазму»).

2.2.5. Внутриклеточные рецепторы

Внутриклеточные рецепторы растений представлены разнообразными группами. Они имеют различную локализацию, структуру и функции. Среди них есть классические рецепторы и рецепторы, обладающие двойной функцией, которые, помимо рецепции внешеклеточных лигандов, выполняют иные специфические функции. Для большинства внутриклеточных рецепторов растений характерна их «растительная» специфичность. Как правило, внутриклеточные рецепторы, обнаруженные у растений, нетипичны для животных, и наоборот, типично животные внутриклеточные рецепторы не найдены у растений.

Ядерные рецепторы животных

Наиболее характерной группой внутриклеточных рецепторов животных являются **ядерные рецепторы**. Они являются транскрипционными факторами, которые активируются липофильными лигандами — стероидными, ретиноидными и тироидными гормонами. Эти рецепторы подразделяются на четыре класса.

Рецепторы класса I преимущественно связывают лиганд в цитоплазме. Многие рецепторы этого класса при отсутствии соответствующего лиганда образуют неактивные комплексы с шаперонами, которые экранируют домен ядерной локализации и участки взаимодействия с ДНК и/или другими коактиваторами

транскрипции. Различные виды стероидных рецепторов специфически связываются с шаперонами определенного типа. Например, у животных рецепторы стероидных гормонов GR, MR, PR и AR взаимодействуют с белком теплового шока Hsp90. При взаимодействии с гормональным лигандом комплекс рецептор-шаперон диссоциирует, а рецептор диффундирует в ядро, где выполняет роль транскрипционного регулятора (рис. 16).

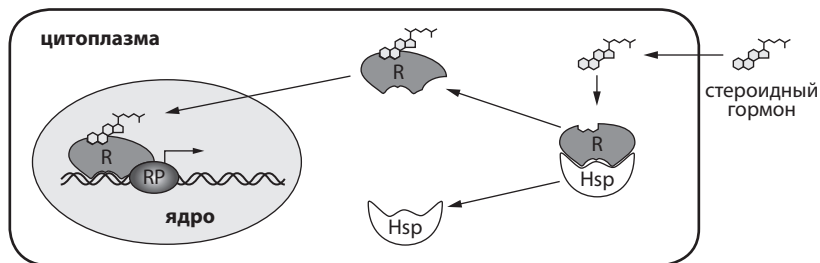


Рис. 16. Ядерные рецепторы животных класса I.

Условные обозначения:

R — рецептор; Hsp — шаперон (белок теплового шока);

RP — РНК-полимераза

Рецепторы класса II локализуются в ядре и в отсутствии лиганда связаны с корепрессорами, принимая участие в ингибировании транскрипции. Связывание с лигандом приводит к замене корепрессоров на коактиваторы, в результате чего индуцируется транскрипция лиганд-активируемых генов (рис. 17).

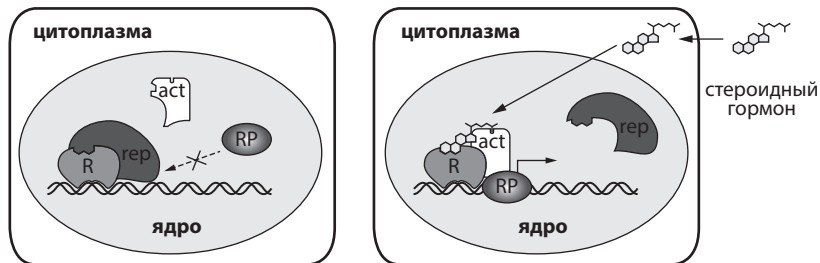


Рис. 17. Ядерные рецепторы животных класса II.

Условные обозначения:

R — рецептор;

RP — РНК-полимераза;

act — коактиватор;

rep — корепрессор

Рецепторы классов III и IV немногочисленны и механизм их работы еще недостаточно понятен.

Активность многих ядерных рецепторов контролируется также и разными регуляторными белками. Эти рецепторы могут находиться в разных состояниях, которые характеризуются определенной способностью рецептора связывать лиганд и инициировать транскрипцию.

Внутриклеточные рецепторы растений

В растительных клетках не присутствуют ядерные рецепторы, характерные для животных. Этот факт для многих исследователей был несколько удивительным, так как растительные регуляторы АБК и брассиностероиды близки по структуре, соответственно, ретиноидным и стероидным гормонам животных. Тем не менее, у растений механизм восприятия липофильных молекул внутриклеточными рецепторами совершенно иной, чем у животных.

Известные в настоящее время внутриклеточные рецепторы растений можно разделить на три группы. Не исключено, что будут обнаружены рецепторы, обладающие структурно-функциональными особенностями принципиально отличными от известных рецепторов. Номенклатура внутриклеточных рецепторов растений только начинает разрабатываться. На данный момент принято называть группы по семействам белков, к которым они относятся:

- 1) F-box рецепторы;
- 2) гормон-чувствительные липазы;
- 3) START-домен рецепторы.

F-box рецепторы

F-box рецепторы являются частью убиквитинирующей протеиновой лигазы (см. раздел «Убиквитин-опосредованная деградация белков»). Известно, что F-box субъединицы SCF-подобных лигаз выполняют функцию связывания субстрата — белков-мишеней, предназначенных для убиквитинирования и последующей деградации. Специфическое узнавание и связывание белков-мишеней с F-box белками контролируется

различными механизмами. Один из таких механизмов представляет собой гормональную модуляцию аффинности F-box белка к мишени (рис. 18).

На поверхности F-box рецепторов находится лейцин-обогащенный участок (LRR-мотив), который формирует специфический гидрофобный карман с высокой аффинностью к гормону определенного типа. Связывание гормона с F-box белком приводит к образованию связывающей поверхности, необходимой для специфического узнавания белков-мишеней. В этом случае говорят, что гормон выступает в качестве «молекулярного клея», который обеспечивает гидрофобные взаимодействия между F-box рецептором и мишенью. В результате белки-мишени убиквитинируются и разрушаются 26S протеасомным комплексом. Как правило, данный механизм связан с дерепрессорным регуляторным механизмом, который обеспечивает в ответ на стимул (гормон) удаление определенной группы репрессоров.

F-box рецепторы были обнаружены для двух растительных гормонов: индолил-3-уксусной кислоты и изолейцин-жасмоната (JA-Ile).

У растений арабидопсиса обнаружено 6 F-box рецепторов ауксина: **TIR1** (transport inhibitor response 1) и **AFB1–5** (auxin

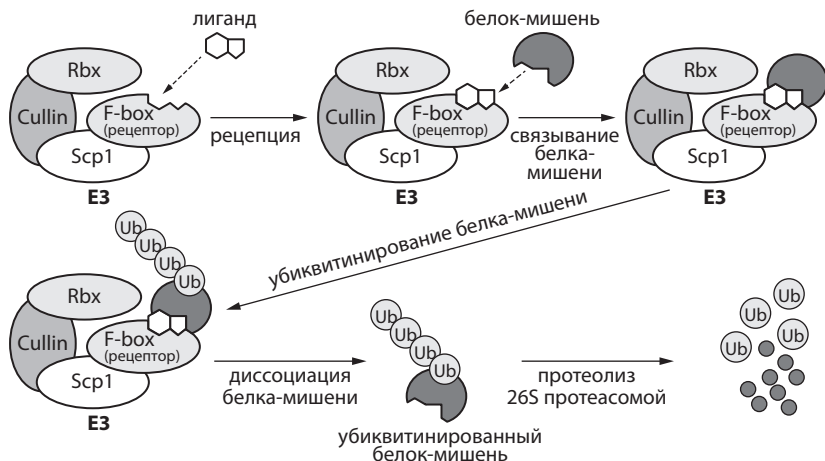


Рис. 18. Дерепрессионный механизм с участием F-box рецептора

signaling F-box). Белок TIR1 был идентифицирован у мутантов, устойчивых к ингибиторам полярного транспорта ауксина, в середине 1990-х и описан как белок, участвующий в транспорте ИУК. Мутация *tir1* является достаточно слабой, поэтому рассматривалась возможность существования генов с перекрывающимися функциями. Действительно, TIR1 является одним из шести близкородственных F-box белков. У растений, имеющих нарушения сразу в четырех генах *tir1 afb1 afb2 afb3*, в значительной степени снижена чувствительность к ауксину.

Последующие исследования показали, что TIR1 имеет отношение к восприятию клеткой ауксина. Этот белок содержит F-box домен и является компонентом убиквитинирующей протеиновой лигазы. Мишенями TIR1 являются белки из семейства негативных транскрипционных регуляторов Aux/IAA, которые репрессируют гены ауксинового ответа. Активировать экспрессию ауксин-чувствительных генов возможно, если удалить определенные виды Aux/IAA. Под действием ауксина у TIR1 значительно повышается сродство к белкам Aux/IAA, в результате чего они привлекаются к лигазе E3, убиквитинируются, а затем разрушаются 26S протеасомой.

Восприятие жасмонатов растительными клетками осуществляется сходным механизмом. Активная форма жасмонатов — изолейцин-жасмонат (JA-Ile) — специфически взаимодействует с белком COI1 (coronatine insensitive 1), который является F-box белком. Связывание изолейцин-жасмоната с особым гидрофобным участком COI1 приводит к формированию поверхности, необходимой для специфического связывания белков семейства JAZ (JASMONATE ZIM-domain). JAZ-белки, которые являются негативными регуляторами жасмонат-зависимых реакций, в ответ на воздействие JA-Ile убиквитинируются и деградируют. Если сравнить систему восприятия ауксина и жасмонатов, то следует отметить, что F-box рецептор COI1 является функциональным аналогом TIR1, а репрессоры JAZ-белки — аналогами Aux/IAA.

Гормон-чувствительные липазы

В системе регуляции гиббереллина был выявлен растворимый гиббереллин-связывающий белок **GID1** (GA insensitive dwarf 1), идентифицированный как рецептор гиббереллина.

Молекула GID1 имеет в структуре консервативный липазный каталитический домен. По этому признаку данный рецептор был отнесен к семейству гормон-чувствительных липаз. Однако в каталитическом домене из трех существенных для липазной активности аминокислотных остатков присутствует только два. По этой причине GID1 не обладает каталитической активностью. Вместе с тем, нефункциональный каталитический домен формирует гиббереллин-связывающий участок (кор), обладающий высокой аффинностью к активным формам гиббереллина, с существенным предпочтением GA_1 и GA_4 . Аминотерминальный домен GID1 образует над участком связывания гиббереллина крышкоподобную структуру, которая также взаимодействует с молекулой гормона. Гиббереллин полярной стороной молекулы взаимодействует с кором, а гидрофобная сторона — с липофильным N-терминальным участком, который как «крышкой» прикрывает молекулу гиббереллина. Гиббереллин оказывается в гормон-связывающем коре как в кармане. Связывание гиббереллина приводит к изменению конформации ре-

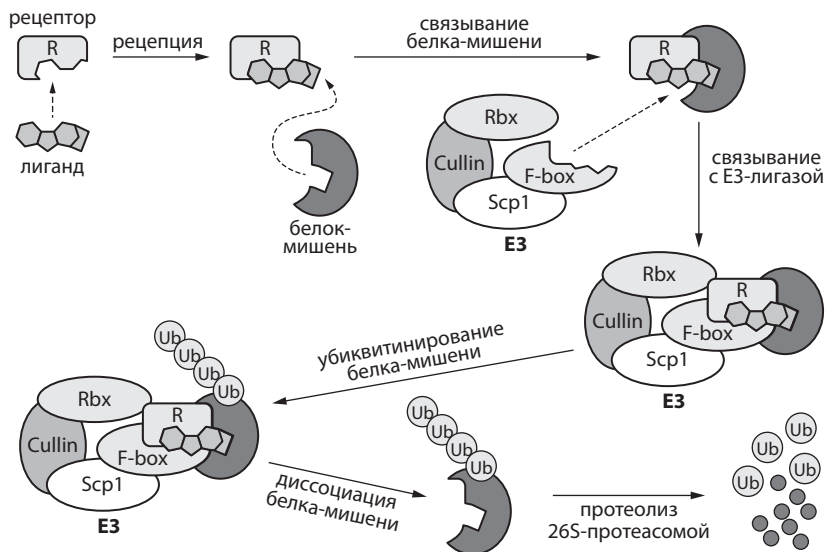


Рис. 19. Дерепрессионный механизм с участием рецептора из семейства гормон-чувствительных липаз

цептора и стабилизации его структуры. Поверхность молекулы **GID1** в области «крышки» становится приспособленной для связывания белков, имеющих **DELLA**-домен. К **DELLA**-белкам относятся репрессоры гиббереллинового сигнала. Образование комплекса **GID1(GA)**–**DELLA** приводит к существенным конформационным изменениям в карбокситерминальной части **DELLA**-белка, в результате чего они приобретают способность специфического взаимодействия с **F-box** субъединицей **SCF**-подобной убиквитинирующей лигазы (рис. 19). Далее **DELLA**-белок убиквитинируется и подвергается протеолизу.

Гиббереллиновый сигнал, следовательно, тоже задействует направленный протеолиз белков, однако рецептор **GID1**, в отличие от **F-box** рецепторов не является частью убиквитинирующей лигазы, а участвует в подготовке белков-мишеней (**DELLA**-белков) к связыванию с **F-box** субъединицей лигазы.

START-домен рецепторы

Рецепторы этой группы были обнаружены при изучении **АБК**-сигнала. При использовании искусственного функционального аналога **АБК** пирабактина был выявлен пирабактин-устойчивый мутант *Arabidopsis pyr1* (**pyrabactin resistance 1**). Как оказалось, локус *PYR1* кодирует белок **PYR1**, высокоаффинный к **АБК**, который был идентифицирован как рецептор **АБК**. Позже было показано наличие других **PYR1**-подобных белков со сходной функцией и структурой (**PYR1-LIKE** — **PYL**). Другая исследовательская группа обнаружила белок, напрямую взаимодействующий с продуктом гена **ABI2** — протеиновой фосфатазой **2C (PP2C)**, которая давно была известна как негативный регулятор **АБК**-сигнала. Этот белок получил название **регуляторный компонент АБК-сигнала 1** — **RCAR1 (REGULATORY COMPONENT OF ABA RESPONSE 1)**. Белок **RCAR1**, как было выяснено впоследствии, соответствует белку **PYR9**. Одновременное появление сообщений о сигнальных белках **PYR1/PYL** и **RCAR** привело к возникновению двух номенклатур для одной группы белков. По этой причине рецепторы **АБК** этой группы обозначают **PYR/PYL/RCAR**. Белки **PYR/PYL/RCAR** относят к большому суперсемейству **START**-белков, имеющих в своей структуре особый домен **START (steroidogenic acute regulatory related lipid transfer)**.

START-домен формирует АБК-связывающий карман, который фланкируется двумя петлями, называемыми ворота и замок. Связывание АБК с рецептором приводит к закрыванию петель, и молекула АБК оказывается запертой внутри кармана. Это провоцирует изменение конформации, в результате чего рецептор приобретает способность выступать в качестве конкурентного ингибитора фосфатазы 2С. Он связывается с реакционным центром фермента и ингибирует его активность.

Рецепторы АБК в отсутствии гормона находятся в клетке преимущественно в виде гомодимеров (рис. 20). Мишень рецептора — протеиновая фосфатаза 2С — находится в активном состоянии и ингибирует протеинкиназу SnRK2. Эта SNF1-подобная киназа является позитивным регулятором АБК-регулируемых генов. Связывание рецептора с АБК приводит к изменению его конформации, в результате чего гомодимеры диссоциируют, а каждый рецептор приобретает способность взаимодействовать с реакционным центром PP2C, конкурентно ингибируя его активность. Репрессия фосфатазы 2С приводит к активации протеинкиназы SnRK2, которая фосфорилирует группу транскрипционных факторов — активаторов АБК-регулируемых генов.

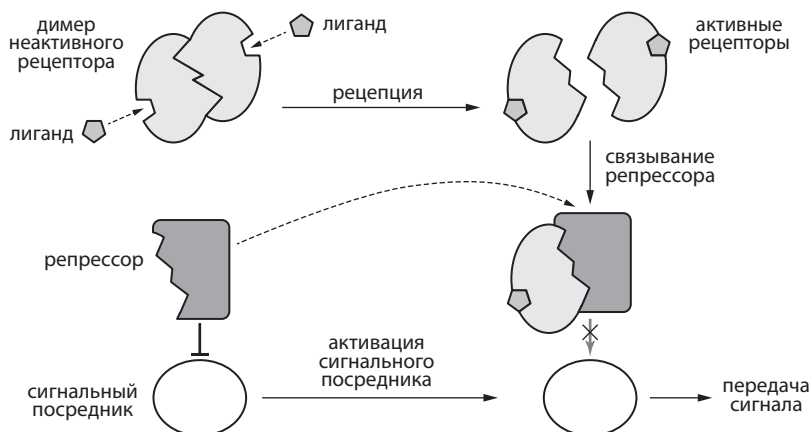


Рис. 20. Механизм активации START-домен рецептора

2.3. СВЕТОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Свет, как источник тепла и энергии, имеет существенное значение для живых существ и, главным образом, для фотосинтезирующих организмов, в том числе для растений. Действие солнечного света на поверхность Земли не является постоянным: интенсивность инсоляции в течение светового дня может изменяться в зависимости от погодных условий, от положения солнца относительно уровня горизонта (иными словами, от времени суток) зависит спектральный состав солнечных лучей. Кроме того, световые периоды чередуются с темновыми, причем на большей части земной поверхности соотношение продолжительности этих периодов изменяется в течение года. Это обусловило эволюционное развитие у большинства наземных организмов сенсорных светозависимых систем, через которые осуществляется тонкая настройка физиологической активности, а также процессов роста и развития.

Светорегулируемые механизмы растений преимущественно зависят от двух диапазонов световых волн, соответствующих синему и красному спектрам. В настоящий момент у растений обнаружено три семейства фоторецепторов. **Фитохромы** поглощают красный свет, **фототропины** — синий, а спектр поглощения **криптохромов** охватывает синий и длинноволновую область ультрафиолета (UV-A). Также рассматривается возможность существования рецепторов ультрафиолета диапазона В (UV-B).

Все фоторецепторы растений являются белками, которые имеют **хромофор** — простетическую светопоглощающую часть. Хромофор удерживается полипептидной частью рецептора слабыми или ковалентными связями. Основной принцип функционирования фоторецепторов заключается в том, что поглощение лучей определенного спектра хромофором запускает молекулярный механизм, приводящий к значительным изменениям конформации рецептора. Это отражается на активности фоторецепторов, то есть на их способности взаимодействовать с сигнальными партнерами и стимулировать внутриклеточный сигнальный механизм.

Основные характеристики растительных фоторецепторов приведены в таблице.

Группа	Диапазоны	Хромофор
Рецепторы UV-B	UV-B	неизвестно
Фототропины	синий, max 450 нм	FMN
Криптохромы	UV-A/синий	FAD
Фитохромы	красный, дальний красный	фитохромобилин

2.3.1. UV-B рецепторы

Существует множество косвенных доказательств функционирования у растений механизмов, регулируемых UV-B диапазоном, действие которого связывают с ингибированием удлинения гипокотыля и транскрипции ряда генов. В настоящее время UV-B рецепторы не идентифицированы, однако показано, что специфические ответы на UV-B не опосредуются известными световыми рецепторами. Кроме того, выявлены несколько сигнальных компонентов, вовлеченных в ответ на действие UV-B. Среди них ULI3 и HY5. Конкретная функция ULI3 не известна. Предположительно этот белок содержит гем, имеет сайт связывания с диацилглицеролом и локализуется в цитоплазме и плазмалемме. HY5 — это bZIP транскрипционный фактор.

2.3.2. Фототропины

Открытие и функции

Первый фототропин был идентифицирован в 1997 году. В результате скрининга мутаций у растений *Arabidopsis* был обнаружен мутант *nph1* (non phototropic hypocotyl), у которого гипокотиль не проявлял фототропической реакции. Исследования продукта гена *NPH1* у растений дикого типа показали, что белок NPH1 ассоциирован с плазматической мембраной и устойчиво автофосфорилируется в ответ на облучение си-

ним светом. Было предположено, что NPH1 участвует в рецепции синего света и опосредует каскадный механизм, который приводит к развитию фототропической реакции. Наибольшая чувствительность растений наблюдается при облучении синим светом с максимумом около 450 нм. После того, как функции NPH1 были точно установлены, этот белок был переименован в фототропин 1 — **phot1**. Позже у растений *Arabidopsis* был выделен второй фототропин **phot2**. Оба рецептора крайне важны для регуляции трех основных функций, которые направлены на оптимизацию процесса фотосинтеза:

- 1) фототропизм;
- 2) движение хлоропластов;
- 3) открывание устьиц.

Два фототропина *Arabidopsis* специализированы на разных интенсивностях светового излучения: phot1 важен для восприятия света низкой интенсивности, а phot2 — высокой. Функции, которые регулируются двумя фототропинами, частично перекрываются. Ряд функций стимулируется только одним из фототропинов, а некоторые обоими, причем phot1- и phot2-зависимые реакции могут иметь противоположную направленность. Различия светозависимых реакций, регулируемых двумя фототропинами, непосредственно связаны с интенсивностью воспринимаемого света. Оба рецептора регулируют **фототропизм** в ответ на латеральное действие синего света высокой интенсивности, а при низкой интенсивности света фототропическая реакция опосредуется только phot1. В первом случае развивается отрицательный фототропизм (избегание света), во втором — положительный. **Открывание устьиц** контролируется обоими фототропинами в равной степени при различных интенсивностях света.

Регуляция **движения хлоропластов** фототропинами осуществляется разнонаправленно. При освещенности низкой интенсивности, при которой активируется phot1, хлоропласты располагаются на освещенной стороне клеток. В таком положении хлоропласты в наименьшей степени затевают друг друга, и поэтому поглощение световой энергии становится максимальным. При высокой степени солнечной иррадиации активируется phot2, через который развивается реакция избегания света — хлоропласты релокализуются к сторонам клеток, расположенных

вдоль направления световых лучей. Это способствует минимизации поглощения световой энергии и снижению фотоповреждения хлоропластов.

К уникальным свойствам phot1 относится **торможение роста растяжением гипокотилия** этиолированных проростков при действии света любой интенсивности и участие в **дестабилизации специфических ядерных и хлоропластных транскриптов** в ответ на высокую степень иррадиации синего света.

Структура

Фототропины принадлежат к подсемейству ACG-VIIIb семейства киназ ACG, которое включает cAMP-зависимые киназы, cGMP-зависимые киназы G и фосфолипид-зависимые киназы. В молекуле фототропинов выделяют аминотерминальный фотосенсорный и карбокситерминальный серин-треониновый киназный домен (рис. 21). В состав фотосенсорной части фототропинов входят два похожих LOV (Light, Oxygen, Voltage) домена — LOV1 и LOV2. Домены семейства LOV активируются внешними воздействиями, такими как свет, кислород и напряжение (отсюда аббревиатура), и обнаруживаются у многих регуляторных белков, выполняющих рецепторные функции. LOV1 и LOV2 связывают FMN (флавинмоноклеотид) и функционируют в качестве сенсоров синего света. Несмотря на значительное сходство, домены LOV1 и LOV2 выполняют различные функции. Для регуляции биологической активности фототропина принципиально важным является домен LOV2. Именно он служит световым переключателем, контролирующим актив-

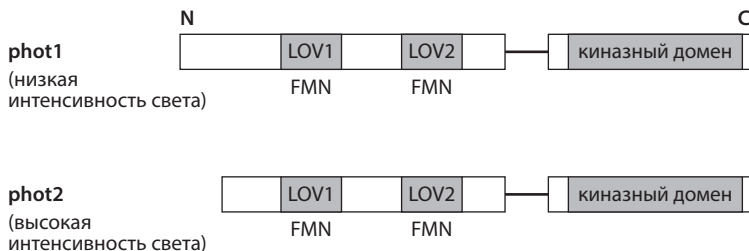


Рис. 21. Структура фототропинов (по Chen et al., 2004)

ность С-терминального домена. Значение LOV1-домена окончательно не выяснено, но предполагается, что он участвует в димеризации фототропинов и способствует поддержанию функционально активной структуры фоторецептора.

В темноте LOV-домены нековалентно связывают FMN. При этом хромофоры прочно удерживаются в структуре LOV-доменов за счет водородных связей и ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, образуемых с одиннадцатью консервативными аминокислотными остатками. В этом состоянии киназный домен ассоциирован с фотосенсорным, то есть молекула фототропина находится в сложенном состоянии, и киназный домен не может проявлять свои свойства, так как не имеет доступа к субстрату. Такую конформацию называют закрытой. В неактивном состоянии молекулы фототропина связаны с плазматической мембраной.

Световая активация

Отделенный от рецептора LOV-домен в темноте имеет максимум поглощения 447 нм (LOV_{447}). Облучение синим светом стимулирует фотохимическую реакцию, в результате которой возбужденная хромофорная группа образует ковалентную связь с консервативным остатком цистеина. Образуется LOV_{390} с максимумом поглощения 390 нм. Фотоконверсия осуществляется в течение нескольких микросекунд. Предполагается, что первоначальное возбужденное синглетное состояние хромофора кратковременно преобразуется в триплетную форму LOV_{660} с максимумом поглощения в красной области ($\text{LOV}_{447} \rightarrow \text{LOV}_{660} \rightarrow \text{LOV}_{390}$). Обратный переход в неактивное состояние ($\text{LOV}_{390} \rightarrow \text{LOV}_{447}$) происходит спонтанно в темноте на протяжении от нескольких десятков до нескольких сотен секунд. Реверсия в исходное неактивное состояние может стимулироваться при облучении LOV_{390} ультрафиолетом. Имеет ли этот процесс UV-стимулированной конверсии биологическое значение, в настоящее время неизвестно.

В интактных молекулах фототропина поглощение синего света также приводит к первоначальному возбужденному состоянию и кратковременному образованию ковалентной связи

между FMN и инвариантным остатком цистеина LOV-домена. Эти события провоцируют существенные структурные перестройки фототропина: молекула раскрывается — киназный и фотосенсорный домены диссоциируют, что позволяет рецептору выполнять киназные функции (рис. 22). Одновременно с этим фототропин теряет связь с мембраной и высвобождается в цитоплазму. Возвращение фототропина в неактивное состояние является относительно медленным процессом. То есть, активное состояние достаточно стабильное и имеет продолжительное время существования.

В обоих фототропинах LOV2-домены более эффективно подвергаются светозависимой конверсии, по сравнению с LOV1.

Фосфорилирование. Подобно лиганд-связывающим рецепторным киназам, фототропины интермолекулярно автофосфорилируются. Активация фототропинов стимулирует образование гомодимеров, в составе которых рецепторы попарно фосфорилируют друг друга по специфическим остаткам серина. Фототропины имеют множественные сайты фосфорилирования, и только часть их используется для трансдукции светового сигнала. Другие сайты необходимы для регуляции активности и чувствительности рецептора к свету.

Выявлено восемь сериновых остатков в аминокотерминальной части фототропина phot1, которые являются сайтами фосфори-

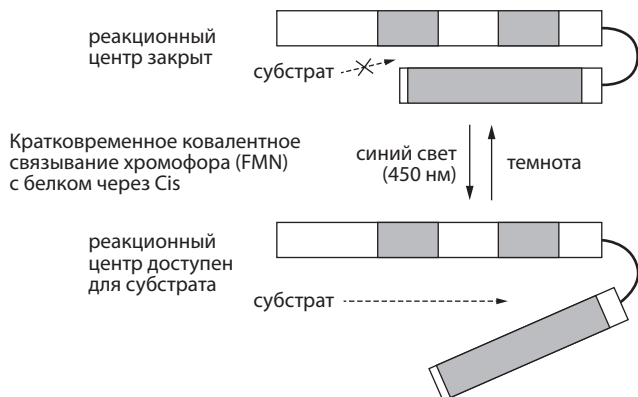


Рис. 22. Механизм активации фототропина (по Chen et al., 2004)

лирования. Два из них находятся возле LOV1-домена со стороны N-конца (серин-27, серин-30), а остальные между доменами LOV1 и LOV2 (серин-274, серин-300, серин-317, серин-325, серин-332, серин-349). Автофосфорилирование фототропинов по конкретным сайтам происходит в зависимости от интенсивности освещения. Например, серины в положениях 27, 30, 274 и 300 фосфорилируются при низкой интенсивности синего света, тогда как остальные четыре — при средней и высокой интенсивности. Дифференциальное фосфорилирование связано с особенностями регуляции фототропинов и фототропин-зависимых ответов. Так, фосфорилирование phot1 в условиях слабой и средней освещенности способствует формированию поверхности молекулы, необходимой для взаимодействия с даунстрим партнерами. Фосфорилирование, стимулируемое синим светом высокой интенсивности, наоборот, прерывает возможность передачи сигнала от гиперфосфорилированной формы phot1. Это достаточно важно для регуляции тех процессов, в которых phot1 и phot2 выступают антагонистами, например движение хлоропластов в условиях различной освещенности. Кроме того, особенности фосфорилирования фоторецепторов могут определять специфический набор сигнальных белков, с которыми будут взаимодействовать фототропины.

Локализация. Фототропины phot1 и phot2 являются гидрофильными белками, однако в неактивном состоянии они связаны с плазматической мембраной через плазмалеммные белки. Под действием синего света локализация фототропинов быстро изменяется: phot1 высвобождается в цитоплазму, а phot2 перераспределяется к аппарату Гольджи. Функциональная значимость этого процесса еще не выяснена. Однако известно, что для локализации phot2 на мембранах аппарата Гольджи существенную важность имеет киназная активность.

Передача сигнала. Светозависимое фосфорилирование необходимо для формирования связывающей поверхности, через которую фототропины взаимодействуют с сигнальными посредниками. Активный фототропин способен связываться с различными регуляторными компонентами, через которые осуществляется регуляция конкретных фототропин-зависимых реакций. Каталитическая (киназная) активность фототропинов

обеспечивает не только трансмолекулярное автофосфорилирование, но может быть направлена также на молекулы сигнальных партнеров. Например, в реакции открывания устьиц осуществляется фосфорилирование плазмалеммой H^+ -АТФазы фототропинами. Взаимодействие фоторецепторов с протонными помпами в значительной степени облегчается регуляторными 14-3-3-белками.

2.3.3. Криптохромы

Функции

Первоначально криптохромы были обнаружены у *Arabidopsis*, но впоследствии были найдены у других растений, а также у животных и бактерий. Криптохромы являются широко распространенными фоторецепторами в природе. У представителей различных таксономических групп, эволюционно удаленных друг от друга, криптохромы выполняют сходные функции. Наиболее универсальной функцией этих рецепторов является регуляция циркадных ритмов. Этот механизм имеет очень древнее происхождение и в общих чертах сходен у разных царств живого мира.

Помимо контроля циркадных осцилляций, криптохромы выполняют также функции, характерные только для растений. Они опосредуют процессы деэтиоляции и участвуют в регуляции фотопериодически зависимых флоральных механизмов. Многие процессы регулируются криптохромами совместно с фитохромами.

В растениях *Arabidopsis* обнаружено 3 криптохрома (**cryptochrome** — *cry1*, *cry2* и *cry3*). Два из них, *cry1* и *cry2*, обладают высокой степенью гомологии и выполняют сходные функции, однако *cry1* отвечает за восприятие синего света высокой интенсивности, а *cry2* — низкой. Функции этих рецепторов частично перекрываются в регуляции деэтиоляции. Существенное ремодулирование экспрессии большой группы генов при выходе проростков на свет контролируется преимущественно криптохромами *cry1* и *cry2*, со значительно меньшим вкладом фитохрома А. Важным регуляторным моментом в замедлении

роста гипокотилия при деэтиоляции является снижение уровня гиббереллинов и ауксинов, а также снижение чувствительности тканей к этим гормонам.

В регуляции цветения *cry2* имеет намного большее значение, чем *cry1*. Было показано, что криптохромы непосредственно вовлекаются в свето-зависимую стабилизацию транскрипционного активатора флоральных генов CO (**CONSTANCE**).

Криптохром *cry3* значительно отличается по структуре от *cry1* и *cry2*. Функции его еще не выяснены.

Структура и механизм активации

Структура. По особенностям молекулярного строения и ряду свойств криптохромы очень близки к ДНК-фотолиазам, но не проявляют ДНК-фотолиазной активности. ДНК-фотолиазы — это ферменты, которые участвуют в восстановлении ДНК, поврежденной UV-B излучением. Криптохромы и ДНК-фотолиазы поглощают синий свет и ультрафиолет диапазона UV-A. Помимо улавливания света криптохромы обладают свойствами серин/треониновых киназ, способных к автофосфорилированию.

Аминотерминальная область молекулы криптохромов *cry1* и *cry2*, фотолиаза-гомологичный район — **PHR** (**photolyase homology region**) — связывает нековалентно **FAD**, который выполняет функции основного светоулавливающего хромофора, а также **птерин** (или **деазафлавин**) — вторичный светособирающий хромофор. Благодаря наличию двух хромофорных групп диапазон поглощения криптохромов охватывает области синего и UV-A света. Карбокситерминальная часть криптохромов *cry1* и *cry2* в большей степени вариабельна, чем PHR-домен и содержит DAS-мотивы. Основу молекулы криптохрома *cry3* также составляет PHR-домен, однако *cry3* не имеет карбокситерминального расширения, характерного для *cry1* и *cry2*, а с N-стороны молекулы находится короткий сигнальный пептид (**TP** — **transient peptide**), определяющий хлоропластную и митохондриальную локализацию рецептора.

Механизм активации. На основе ДНК-фотолиазной реакции был предложен механизм активации криптохрома, который в целом был подтвержден. В результате поглощения света

хромофорными группами молекула FAD переходит в возбужденное состояние — снижается ее окислительно-восстановительный потенциал (FAD непосредственно поглощает квант света или принимает энергию от возбужденного птерина). В результате снижения ОВП FAD теряет электрон, который переносится на белковую часть фоторецептора через остаток триптофана на тирозин. Это событие сопровождается смещением электронной плотности, вызывающей конформационные изменения молекулы криптохрома. Изменение конформации способствует стимуляции киназной активности, которая приводит к автофосфорилированию множественных сайтов криптохрома. Фосфорилированный криптохром ингибирует активность убиквитинирующей протеиновой лигазы COP1 (рис. 23). Следует заметить, что регуляторные механизмы криптохромов и фитохромов частично перекрываются. Убиквитинирующая лигаза COP1 является мишенью обеих групп фоторецепторов, поэтому многие светозависимые гены находятся под совместным контролем рецепторов красного и синего света. Светозависимая деграда-

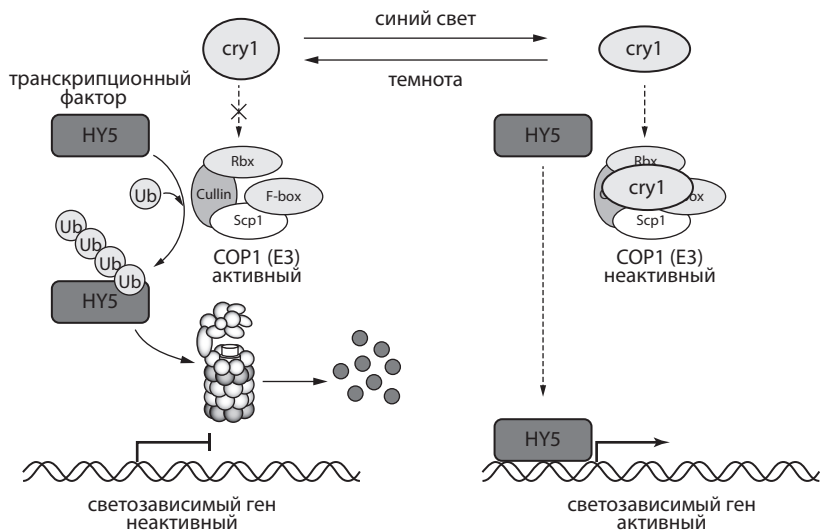


Рис. 23. Участие криптохромов в механизме активации светорегулируемых генов

ция белков лежит в основе регуляторных механизмов контролируемых криптохромами и фитохромами.

В темноте лигаза COP1 убиквитинирует транскрипционные активаторы светорегулируемых генов. Многие из этих генов участвуют в процессах деэтиоляции, например, bZIP-белок HY5 и его гомолог HYN (HY5 Homologue). К положительным регуляторам светового сигнала, которые разрушаются в темноте убиквитин-зависимым способом, относится также bHLH-белок HFR1 (long Hypocotyl in Far-Red 1). На свету в результате светозависимого фосфорилирования криптохрома активность COP1 репрессируется, а экспрессия светорегулируемых генов, наоборот, стимулируется.

2.3.4. Фитохромы

Разнообразие и значение фитохромов

Фитохромы являются рецепторами красного/дальнего красного света. Это димерные белки, состоящие, как правило, из двух идентичных апопротеинов. Каждый из мономеров ковалентно связан с фитохромобилином — линейным тетрапирролом, выполняющим функции хромофора. Синтетическим предшественником фитохромобилина является гем (замкнутый тетрапиррол), кольцо которого размыкается при встраивании хромофора в апопротеин рецептора. При абсорбции красного (660 нм) и дальнего красного (730 нм) света хромофор подвергается обратимой фотоизомеризации, при которой кольцо D разворачивается на 180° относительно двойной связи у C-15 (рис. 24). Исходная форма фитохрома содержит хромофор в C15-*Z,anti* конформации, которая способна поглощать красный свет. Такая форма фитохрома считается физиологически неактивной. Под действием кванта красного света хромофор переходит в C15-*E,anti* конформацию. Данная фотоконверсия приводит к образованию активной формы фитохрома, которая способна поглощать дальний красный свет, под действием которого хромофор вновь приобретает C15-*Z,anti* конформацию, а фитохром, соответственно, переходит в неактивную форму.

Фитохромы обозначают буквой **P** (от англ. **phytochrome**), в нижнем индексе указывают спектр поглощения в цифровом или буквенном виде. Неактивную форму фитохрома обозначают P_r или P_{660} , потому что она поглощает красный (red) свет с максимумом 660 нм, а активную — P_{fr} или P_{730} (соответственно far red и 730 нм). В русскоязычной литературе также приняты обозначения Φ_k или Φ_{660} для неактивной формы фитохрома и Φ_{dk} или Φ_{730} для активной.

Фитохромы синтезируются *de novo* в неактивной форме P_r . Фотоинверсионный переход $P_r \rightarrow P_{fr}$ возможен только под действием света. Обратный переход $P_{fr} \rightarrow P_r$ может осуществляться не только под действием дальнего красного света, но и спонтанно в темноте.

Фотоконверсия хромофорной группы приводит к существенному изменению конформации фитохрома, что отражается на киназной активности рецептора. Фитохромы способны к трансмолекулярному автофосфорилированию и фосфорилированию иных субстратов. Путем фосфорилирования регулируется также стабильность фитохромов. Изменение уровня фос-

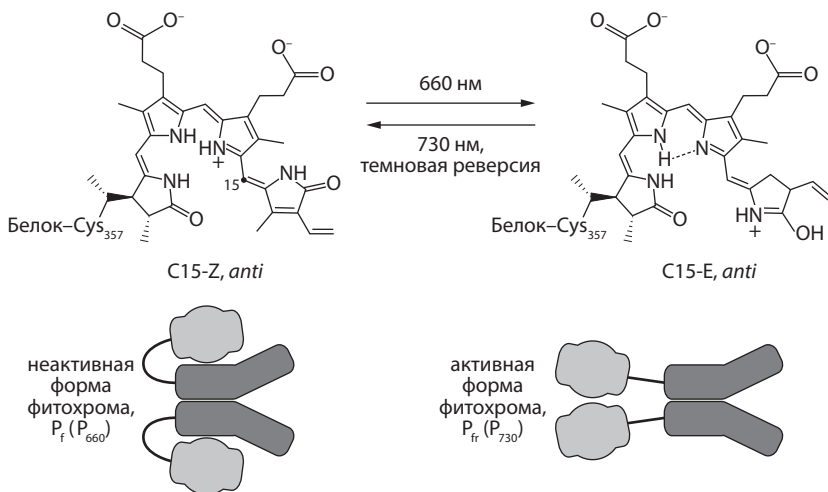


Рис. 24. Изомеризация фитохромобилина и изменение конформации фитохрома под действием света (по Bae, Choi, 2008, с изменениями)

форилирования фитохромов делает возможным их взаимодействие с другими регуляторными и функциональными молекулами. Модуляция активности сигнальных партнеров фитохромом следует рассматривать как первый шаг декодирования светового сигнала, поглощенного этим рецептором.

Фитохромы кодируются небольшим семейством генов *PHY*. В геноме растений кодируются несколько различных фитохромов, как правило, в количестве не меньше трех. У модельного вида *Arabidopsis*, например, их пять: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*. У сосны четыре фитохрома, у риса и гинкго — три, а у томата — семь. Разные формы фитохромов у одного вида растения имеют различные молекулярные свойства и функции, хотя и частично перекрывающиеся. Наибольшие структурно-функциональные отличия обнаруживаются между фотолабильными и фотостабильными фитохромами. Фотостабильные фитохромы способны к обратимой фотоконверсии, то есть под влиянием красного и дальнего красного света переходят соответственно в активную и неактивную форму. Для фотолабильных фитохромов обратимая фотоконверсия не характерна. Активная форма фотолабильных фитохромов имеет непродолжительный период существования и под действием света быстро разрушается. Независимо от количества видов фитохромов, как правило, один из них является фотолабильным, а остальные фотостабильными. Так у *Arabidopsis* фотолабильным фитохромом является *PHYA*, а остальные фоторецепторы (*PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*) — фотостабильные фитохромы.

Различают три группы фитохром-зависимых ответов согласно воспринимаемой интенсивности иррадиации, вызывающей специфическую реакцию растения.

- 1) **VLFR** (very low fluence response) — ответ на очень низкий уровень иррадиации;
- 2) **LFR** (low fluence response) — ответ на низкий уровень иррадиации;
- 3) **HIR** (high irradiance response) — ответ на высокий уровень иррадиации.

Фотолабильный фитохром А (*PHYA*) отвечает на очень низкий уровень иррадиации (VLFR) и на высокий уровень интенсивности дальнего красного света (FR-HIR). Фотостабильные

фитохромы (PHYB, PHYC, PHYD, PHYE) опосредуют специфические ответы при влиянии света низкого уровня иррадиации (LFR) и высокого уровня интенсивности красного (R-HIR).

Фитохром-зависимые реакции растений весьма разнообразные и сложные, но при этом можно выделить три основные группы реакций, которые развиваются под воздействием света определенного спектра и интенсивности:

- 1) поиск света — обеспечивается фотолabileм фитохромом (VLFR и FR-HIR);
- 2) оптимальное использование света — фотостабильные фитохромы (LFR);
- 3) избегание света — фотостабильные фитохромы (R-HIR).

Фитохромы участвуют в фотопериодических реакциях, посредством которых регулируется множество морфогенетических механизмов растений (прорастание семян, переход к цветению, созревание плодов, подготовка к сезонным изменениям и др.). Важной функцией фитохромов являются регуляция деэтиоляции, причем у многих растений в этом процессе участвуют все виды фитохромов. У *Arabidopsis* в механизме деэтиоляции ведущую регуляторную роль выполняют PHYA и PHYB. Многие реакции регулируются фитохромами совместно с криптохромами.

Структура фитохромов

В молекулах фитохромов различают два основных структурно-функциональных района: фотосенсорный N-концевой домен и димеризационный C-концевой домен. Фотосенсорный домен подразделяют на P1, P2/PAS, P3/GAF и P4/PHY, а димеризационный — на PAS-A, PAS-B и HKRD (**histidine kinase-related domain**). Среди этих субдоменов P1, PAS-A и PAS-B являются уникальными растительными структурами, тогда как остальные входят в состав фитохром-подобных белков не растительных организмов (рис. 25).

Фотосенсорный район

P1-домен имеет различное значение для отдельных форм фитохромов. У *Arabidopsis* уровень фосфорилирования P1-домена определяет стабильность PHYA. Фосфорилированный

по P1 фитохром А вовлекается в убиквитин-зависимый протеолиз, тогда как дефосфорилирование P1 увеличивает стабильность молекулы. В этом домене находятся аминокислотные остатки, предназначенные для автофосфорилирования (например, серин-17), а также участки, которые фосфорилируются другими киназами (например, серин-7). Для активности фото-стабильного РНУВ P1-домен не играет существенной роли.

Домены P2/PAS и P3/GAF являются высоко консервативными структурами. Они формируют кор фотосенсорного домена и выполняют решающую роль в рецепции света и передаче светового сигнала. Эти домены обладают билин-лиазной активностью, необходимой для лигирования хромофора к цистеиновому остатку P3/GAF-домена. В отличие от растительных фитохромов, у бактериофитохрома хромофор присоединен к домену P2/PAS.

Домен P4/PHY является консервативным и выполняет регуляторную функцию. Он необходим для тонкой настройки активности фитохрома. Через этот домен регулируется скорость темновой конверсии фитохрома (спонтанный переход в неактивную форму), спектральные свойства, ядерная локализация и киназная активность.

Фотосенсорный район обладает также серин/треонин-киназной активностью, которая необходима для автофосфорилирования рецептора и фосфорилирования белков — сигнальных партнеров.

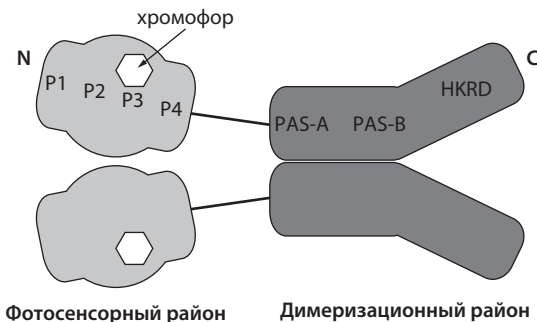


Рис. 25. Структура молекулы фитохрома (по Вае, Choi, 2008, с изменениями)

Димеризационный район

Домены PAS-A и PAS-B у PHYB формируют два важных функциональных участка, необходимых для димеризации, ядерной локализации и формирования ядерных телец. У фотолабильного фитохрома PHYA домены PAS-A и PAS-B участвуют только в образовании димерных структур, но не имеют сигналов ядерной локализации.

HKRD. Точная роль HKRD домена не определена. У некоторых фитохромов HKRD, вероятно, участвует в образовании димеров фоторецепторов.

Димеризация фотолабильных и фотостабильных фитохромов имеет некоторые особенности. Фотолабильный фитохром PHYA образует только гомодимерные структуры. Фотостабильные чаще образуют гомодимеры, но также способны и к гетеродимеризации. Существует ли особый смысл в функциональном и регуляторном отношении в формировании гомодимерных структур, пока не известно.

Активация фитохромов и передача светового сигнала

Светозависимые изменения структуры фитохромов

В молекуле неактивного фитохрома N- и C-концевые части молекулы тесно контактируют друг с другом (рис. 24). Взаимодействие осуществляется за счет N-концевого домена P3/GAF и C-концевых PAS-A и PAS-B. При активации в результате фотоконверсии $P_r \rightarrow P_{fr}$ в молекуле фитохрома происходят значительные структурные изменения. В активной форме P_{fr} увеличивается доля α -спиральных структур (на 5% больше по сравнению с P_r). Это сопровождается диссоциацией N- и C-концевых частей, в результате чего молекула приобретает открытую структуру. За счет этого значительно увеличивается площадь, предназначенная для межмолекулярных взаимодействий. Раскрытие молекулы фитохрома индуцирует последующие сигнальные события, которые направлены на регуляцию процессов и в цитоплазме (например, движение хлоропластов), и в ядре (модуляция генной экспрессии). Транслокация фитохрома в ядро представляет собой один из важных этапов световой регуляции.

Перенос фитохромов в ядро

Молекулярная масса димера фитохрома (240 кД) намного превышает массу белков (не более 40 кД), способных спонтанно диффундировать через ядерные поры. Поэтому транслокация фитохромов в ядро является энергозависимым процессом и осуществляется при взаимодействии с другими белками. К белкам, которые обеспечивают перенос белков через ядерные поры, относятся, например, импортины и группа общих компонентов, участвующих в переносе: малые G-белки класса Ran, RanGTPаза активирующие белки, нуклеопорин 50 и др. Помимо общих компонентов, необходимо участие специфических факторов, взаимодействующих с определенными видами белков (рис. 26).

Фитохром В (PHYB) содержит функциональный домен ядерной локализации NLS. При активации PHYB светом этот участок открывается и через него рецептор может взаимодействовать с импортинами — факторами, обеспечивающими перенос в ядро.

Молекулы PHYA, в отличие от PHYB, не имеют доменов ядерной локализации и неспособны непосредственно взаимодействовать с факторами транслокации, такими как импортины. Ядерная локализация фитохрома PHYA обеспечивается белками FHY1 (Far-red elongated Hypocotyl 1) и FHL (FHY1-Like). Белки FHY1 (202 а/о) и FHL (181 а/о) содержат сигнал ядерной локализации (NLS) и сигнал, исключающий ядерную локализацию (NES). Благодаря этим сигналам данные белки могут циклически транслоцироваться в обе стороны через ядерные поры. Еще один участок SRD (septin-related domain) предназначен для взаимодействия с фитохромом PHYA в области N-терминального домена, который открывается в результате фотоизомеризации.

В ядре фитохромы связываются со своими мишенями и модулируют их активность. Функционирование фитохромов в ядре часто ассоциировано с образованием ядерных частиц, в которые вовлекаются сплайсосомы, транскрипционные комплексы и иные функциональные молекулы и мультимерные образования.

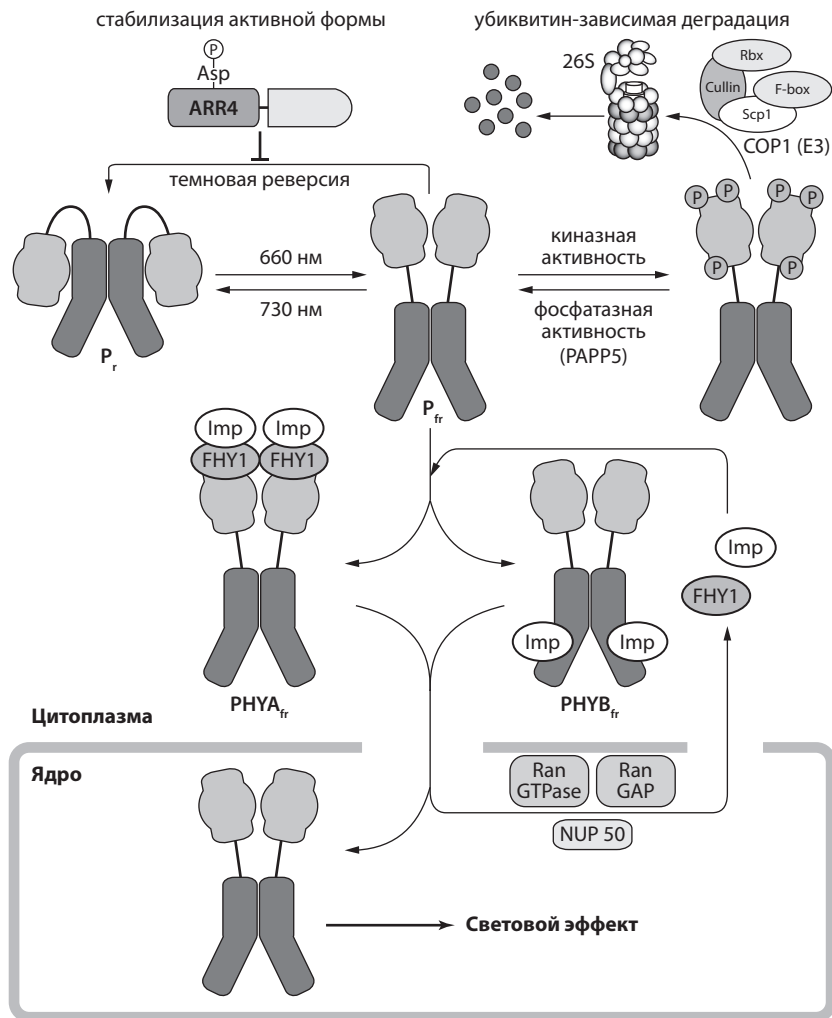


Рис. 26. Активация, транслокация и регуляция активности фитохро-
мов (по Baе, Choі, 2008, с изменениями).

Условные обозначения:

imp — импортин;

ARR4 — регулятор ответа А-типа;

FHY1 — фактор транслокации;

PAPP5— фитохром-ассоциированная фосфатаза

Регуляция активности фитохрома

Активные фитохромы подвергаются разнообразным регуляторным эффектам, которые направлены на изменение двух основных свойств фоторецепторов:

- 1) стабильность активного состояния (скорость спонтанного перехода в неактивную форму при отсутствии света);
- 2) продолжительность существования белка (интенсивность вовлечения молекул фитохромов в убиквитин-опосредованный протеолиз).

Первым белком, для которого была показана способность взаимодействия с фитохромом В был регулятор ответа А-типа **ARR4**, который синтезируется под действием гормона цитокинина и функционирует как негативный фактор цитокининового сигнала. **ARR4** активируется в двукомпонентной регуляторной системе, в результате переноса фосфорной группы на консервативный остаток аспарагиновой кислоты в молекуле регулятора. В активном фосфорилированном состоянии **ARR4(P)** связывается с N-терминальным участком **PHYB**. **ARR4(P)** стабилизирует активное состояние **PHYB**, значительно задерживая темновую реверсию фитохрома.

Фитохром А (**PHYA**) с фосфорилированным P1-доменом связывается с белком **COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1)**. Белок **COP1** содержит **RING finger** домен и обладает свойствами убиквитинирующей протеиновой лигазы. **COP1** убиквитинирует активную форму **PHYA** и вовлекает ее в 26S-зависимый протеолиз. Связывание с **COP1** приводит к снижению активности сигнала **PHYA** путем снижения его общей концентрации.

Фитохром-ассоциированная фосфатаза **PAPP5 (Phytochrome Associated Protein Phosphatase 5)** связывает P_{fr} формы **PHYA** и **PHYB** и дефосфорилирует специфические сайты, стабилизируя их активную форму и повышая аффинность фитохромов к их мишеням.

Модуляция активности мишеней фитохрома

Фитохромы могут непосредственно взаимодействовать с мишенями или опосредованно через регуляторные белки. К светорегулируемым белкам, которые напрямую взаимодействуют с фитохромами относятся транскрипционные факторы **PIF3**

(Phytochrome Interacting Factor 3) и PIF3-подобные факторы PIL (PIF3-Like), убиквитинирующую протеиновую лигазу COP1 и цитоплазматический белок PKS1 (Phytochrome Kinase Substrate 1).

PIF3/PIL. Транскрипционные факторы HLH-типа PIF3 и PIL являются негативными регуляторами световых реакций. Фитохромы связывают PIF3/PIL в разных участках N-концевой части молекул факторов регуляции транскрипции. Например, в молекуле PIF3 обнаружены два участка связывания с индивидуальными фитохромами: **APB** (active phytochrome binding motif; а/к 27–39) связывается фитохромом В, а **APA** (active PHYA binding motif; а/к 193–210) — фитохромом А. Наличие различных участков связывания с отдельными видами фитохромов, вероятно, необходимо для тонкой настройки светозависимых реакций. Фитохромы при связывании стимулируют убиквитинирование транскрипционных факторов PIF3/PIL с последующим их протеолизом 26S протеасомой. Предполагается что фитохромы фосфорилируют PIF3/PIL, а затем убиквитинирующая лигаза распознает PIF3/PIL в фосфорилированном состоянии в качестве субстрата (рис. 27).

COP1. Убиквитинирующая протеиновая лигаза COP1 является одним из важных негативных регуляторов световых реакций. Действие COP1 направлено на вовлечение в убиквитин-зависимый протеолиз целой группы транскрипционных активаторов — положительных регуляторов светового сигнала, например, HY5 (Long Hypocotyl 5), LAF1 (Long after Far-red light 1) и HFR1 (long Hypocotyl in Far-Red 1). В темноте эти активаторы транскрипции подвергаются направленному разрушению 26S протеасомой. На свету активные формы фитохрома репрессируют COP1, в результате чего проявляется активность активаторов и развиваются светозависимые реакции (рис. 27).

Краткое описание механизма световой активации фитохрома

1. Абсорбция света.
2. Фотоизомеризация хромофора.
3. Изменение конформации молекулы фитохрома.
- 4а. Связывание с цитоплазматическими мишенями и модуляция их активности.

46. Связывание с белками, обеспечивающими перенос в ядро.
5. Транслокация фитохрома в ядро.
6. Связывание с ядерными мишенями и модуляция их активности.

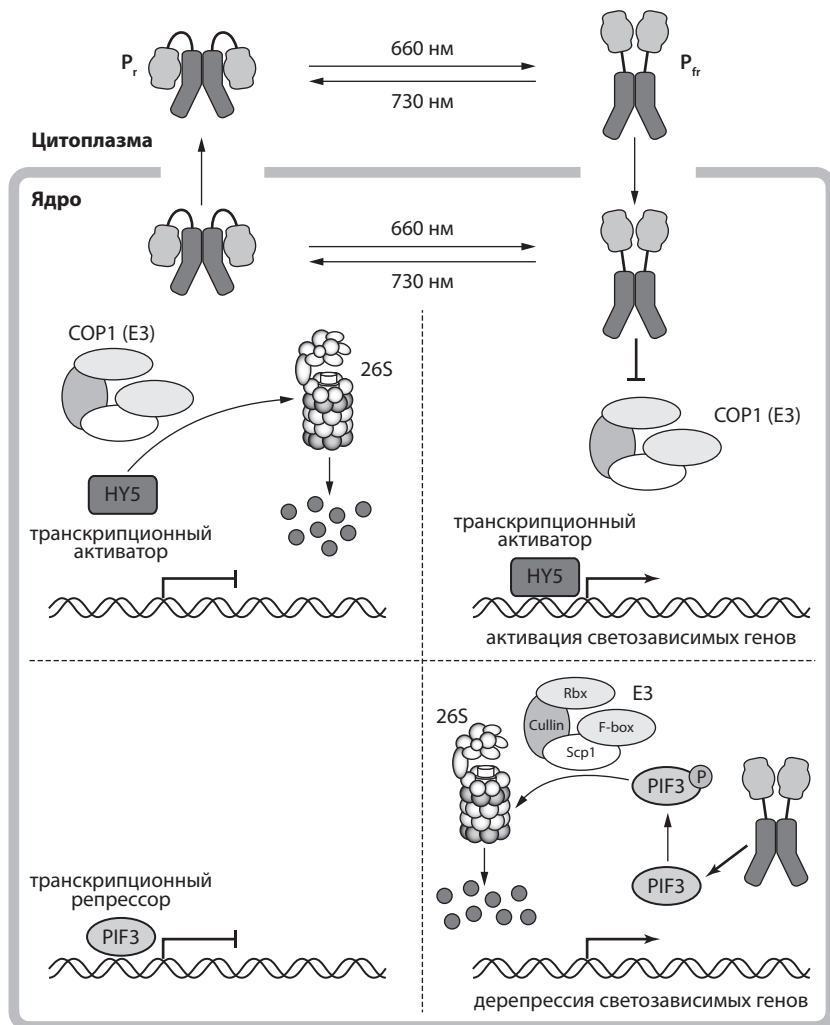


Рис. 27. Регуляция активности светорегулируемых генов фитохромами

3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРИ КЛЕТКИ

Передача сигнала от рецепторов, в зависимости от их типа, может осуществляться непосредственно на промотор гена или на эффекторные молекулы, а также на многочисленные промежуточные компоненты внутриклеточных сигнальных систем. Компоненты, участвующие в передаче сигнала от рецепторов к конечным мишеням чрезвычайно разнообразны по структуре, свойствам и механизмам трансдукции сигнала. Краткие сведения об их назначении и принципах функционирования были изложены в разделах «Компоненты сигнальных систем» и «Сущность передачи сигнала». В этой части будут описаны основные группы сигнальных молекул, их структура, способы взаимодействия с апстрим и даунстрим сигнальными партнерами и регуляторами, механизмы активации и передачи сигнала.

3.1. G-БЕЛКИ

Одними из компонентов, опосредующими внутриклеточный сигнал, являются регуляторные GТРазы, которые также называют G-белками. В совокупности G-белки — это гуанин-нуклеотидсвязывающие белки, обладающие GТРазной активностью и выполняющие в клетках разнообразные функции, не ограничивающиеся регуляторными. Они принимают участие в транспорте макромолекул, организации цитоскелета, синтезе белков, образовании и транслокации везикул. Среди множества G-белков можно выделить также группу сигнальных молекул, которые принимают участие в трансдукции внутриклеточных сигналов.

Сигнальные G-белки, согласно их субъединичному составу, подразделяются на два типа: **гетеротримерные** и **мономерные**. В ранней литературе, посвященной G-белкам, часто гетеротримерные белки называли собственно G-белками без соответствующей субъединичной характеристики «гетеротримерные», тогда как мономерные первоначально получили назва-

ние Ras-белков. Данная терминология была достаточно «экономной» и вместе с тем, понятной. Однако после того как выяснилось, что Ras-белки — это всего лишь одно из семейств огромной группы мономерных G-белков (в настоящее время выделяют пять семейств малых G-белков), во избежание путаницы появилась необходимость использовать термины гетеротримерные и мономерные (или малые) G-белки.

Гуанин-нуклеотидсвязывающие белки широко распространены в живом мире, но при этом неравномерно представлены у животных и растений. Причем наибольшие различия характерны для сигнальных G-белков. Так, гетеротримерные GTPазы в изобилии обнаруживаются в животных клетках, а у растений они присутствуют в минорных количествах. У животных около 80% первичных мессенджеров взаимодействуют со специфическими рецепторами, сопряженными с гетеротримерными G-белками. Для растений многие аспекты участия этих молекул в сигнальных механизмах до сих пор непонятны. Во всяком случае, гетеротримерные GTPазы у растений, если и принимают участие в трансдукции сигнала, вряд ли имеют механизм активации, аналогичный механизму у животных. Значимость гетеротримерных G-белков для животных подтверждается обилием идентифицированных в геноме млекопитающих генов, кодирующих субъединицы GTPаз: 23 α -субъединицы, 5 β -субъединиц, 12 γ -субъединиц. У растений набор подобных генов значительно меньше. Например, в геноме у *Arabidopsis* обнаружен всего лишь 1 ген, кодирующий α -субъединицу, 1 — β -субъединицу, 2 — γ -субъединицы. На фоне такого незначительного количества гетеротримерных GTPаз гены малых G-белков в геномах растений обнаруживаются в изобилии. Например, в геноме *Arabidopsis* идентифицировано 93 гена. В регуляторных и сигнальных механизмах у растений ведущая роль принадлежит мономерным G-белкам.

3.1.1. Гетеротримерные G-белки

Впервые G-белки были обнаружены при изучении механизмов функционирования 7ТМ рецепторов (или GPCR) у животных. Рецепторы этого класса непосредственно взаимодействуют с G-белками и передают через них сигнал на эффекторы. GPCR

и G-белки у животных всегда функционируют вместе и являются стандартными сигнальными партнерами. По этой причине 7ТМ-рецепторы называют также **G-белок сопряженными рецепторами (GPCR)**.

G-белки состоят из трех различных субъединиц. Наибольшая по размеру α -субъединица (40–50 кД) непрочно связана с димером $\beta\gamma$. Субъединицы β и γ имеют меньшие молекулярные массы — соответственно 35 кД и 8 кД. Связь между ними поддерживается также за счет слабых сил, однако при различных функциональных состояниях молекулы G-белка димер $\beta\gamma$ всегда находится в ассоциированном виде. Субъединицы α и γ имеют посттрансляционные модификации в виде жирнокислотных или изопреноидных групп. За счет этих липофильных групп α -субъединица и $\beta\gamma$ -димер независимо друг от друга удерживаются на внутриклеточной стороне плазмалеммы и могут отдельно или в составе G-белка латерально диффундировать по мембране (рис. 28).

В структуре α -субъединицы есть гуаниннуклеотид связывающий центр, в котором может находиться GTP или GDP. Этот участок также обладает GTPазными свойствами. При связывании GTP G-белок переходит в активное состояние (способен передавать сигнал), а GDP-связанная форма является неактивной.

Структура различных G-белков уникальна. В состав индивидуального G-белка входит конкретный набор изоформ субъединиц. Это позволяет им специфически взаимодействовать с соответствующими рецепторными и эффекторными молекулами.

Взаимодействие G-белка с G-белок сопряженными рецепторами осуществляется через α -субъединицу. С эффекторами могут взаимодействовать как α -субъединица, так и $\beta\gamma$ -димер.

Цикл активации. При отсутствии соответствующего внешнего сигнала G-белок находится в тримерном неактивном состоянии, причем в гуаниннуклеотид-связывающем сайте α -субъединицы располагается GDP. В результате рецепции экстраклеточного сигнала изменяется конформация рецепторного белка, а это, в свою очередь, вызывает ряд изменений в состоянии G-белка. Теряется сродство α -субъединицы с GDP, место которого занимает GTP. В большинстве случаев (но не всегда) активированный G-белок диссоциирует на две части: α -субъеди-

ница отделяется от $\beta\gamma$ -димера. В любом случае G-белок находится в активном состоянии, если α -субъединица связана с GTP. Однако это состояние сравнительно недолговременное, так как α -субъединица гидролизует GTP и переходит в неактивное тримерное состояние. Если рецептор продолжает воспринимать внешний сигнал, то G-белки активируются снова.

GТРазная активность α -субъединицы зависит от ряда внутриклеточных факторов. Во-первых, активность усиливается, как правило, при взаимодействии α -субъединицы с эффекторными молекулами, например, с фосфолипазой C. Во-вторых,

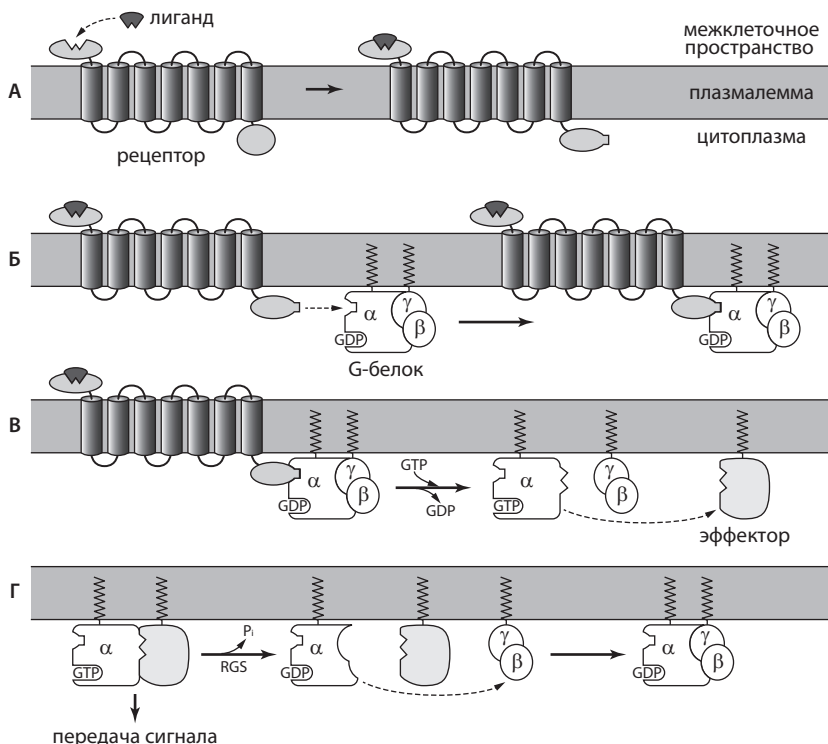


Рис. 28. Цикл активации гетеротримерных G-белков.

Условные обозначения:

RGS — регулятор сигнализации G-белка

существует большое количество регуляторных белков, способных модулировать GTPазную активность α -субъединицы. Эти белки относятся к семейству **RGS** (regulators of G-protein signaling) белков — регуляторов сигнализации G-белка. В основном, это небольшие белки, состоящие из 220 и менее аминокислотных остатков, но также обнаружены высокомолекулярные RGS белки (до 1400 аминокислотных остатков). Эти белки не только модулируют GTPазную активность α -субъединицы. Некоторые из них участвуют в передаче сигнала, поскольку обладают структурой, позволяющей им взаимодействовать с другими компонентами системы передачи сигнала.

Трансдукция сигнала на эффектор осуществляется α -субъединицей или $\beta\gamma$ -димером, а в некоторых случаях — целым тримером, связанным с GTP. Поскольку ни G-белок, ни его составные части не отделяются от плазматической мембраны, эффекторные молекулы, активируемые G-белком, также имеют мембранную локализацию или привлекаются к мембране в процессе активации. Взаимодействие G-белков с эффекторами приводит к изменению конформации и активности последних.

Димеры $\beta\gamma$ не только регулируют активность эффекторных молекул, например, таких как фосфолипазы (PLA_2 , некоторые изоформы фосфолипазы C), ионные каналы (K^+ , Ca^{2+}), но также выполняют другие функции. Они обеспечивают локализацию, связывание и деактивацию α -субъединиц, стабилизируют их инактивированное состояние путем понижения уровня диссоциации GDP от α -субъединицы, регулируют сродство рецепторов к активирующим их лигандам.

У животных $\beta\gamma$ -субъединицы гетеротримерных G-белков способны активировать специфические протеинкиназы — киназы G-белок сопряженных рецепторов — **GRK** (G protein-coupled receptor kinases), которые фосфорилируют молекулы 7TM рецепторов. К активации GRK приводит, как правило, низкая концентрация агониста, то есть слабый внешний сигнал. Ковалентная модификация рецептора путем фосфорилирования предотвращает передачу сигнала на эффектор по двум возможным причинам:

- 1) удаление рецептора с поверхности клетки путем эндоцитоза;
- 2) связывание с молекулами аррестина, которые репрессируют способность рецептора взаимодействовать с лигандом.

3.1.2. Мономерные (малые) G-белки

Разнообразие мономерных G-белков

Мономерные G-белки, первоначально были открыты как продукты Ras-протоонкогенов, ассоциированных с саркомой крыс (отсюда аббревиатура **Ras** — **rat sarcoma**). Впоследствии были выявлены многочисленные мономерные белки с GTPазной активностью, близкие по структуре и молекулярной массе к Ras-белкам. Все эти белки обладают ограниченной гомологией (до 30%) и имеют консервативные последовательности аминокислот, ответственные за связывание гуанозинфосфатов, GTPазную активность и взаимодействие с эффекторами. Молекулярная масса большинства мономерных G-белков варьирует в пределах 20–30 кД. В настоящее время считают, что малые G-белки являются обязательными компонентами эукариотических клеток и участвуют в важных регуляторных механизмах. Известные малые GTPазы, согласно их аминокислотной последовательности и функциям, разделяют на пять семейств: Ras, Rho, Rab, Arf и Ran.

Активность двух семейств G-белков — Ras и Rho — ассоциирована с трансдукцией сигнала. Остальные выполняют специфические клеточные функции.

Белки семейства **Ras** не обнаружены у растений и найдены только у животных.

Ras-белки в животных клетках участвуют в стимуляции клеточного деления, передавая сигнал, полученный при связывании факторов роста соответствующими рецепторами. Ras обычно располагается в центре сети взаимодействующих сигнальных путей, то есть может воспринимать сигналы от нескольких рецепторов и, в то же время, влиять на большое количество последующих событий. Характерным для Ras является активация различных киназ, например, таких как протеинкиназа Raf или фосфатидилинозитол-3-киназа.

В геноме *Arabidopsis* выявлено 11 генов, кодирующих **Rho** белки. Эти белки несколько отличаются по структуре от Rho белков животных и составляют обособленное подсемейство **Rho-подобных белков растений** — **ROP** (Rho of plants).

Малые G-белки, не несущие сигнальной нагрузки, в меньшей степени отличаются у растений и животных. Функционирование таких G-белков связывают с участием в специфических фундаментальных механизмах:

Arf — образование везикул, в растениях Arf белки важны для полярного транспорта ауксина, так как принимают участие в перераспределении переносчика ауксина PIN1 между цитоплазмой и плазмалеммой;

Rab — транспорт и докирование везикул;

Ran — трафик РНК и белков через ядерные поры.

Сигнальные мономерные G-белки

Ras и Rho белки являются мембранными поверхностными белками, которые удерживаются на мембране, подобно гетеротримерным G-белкам, за счет липофильной группы небелковой природы. Малые G-белки подвергаются посттрансляционным ковалентным модификациям. Один из способов модификации не характерен для гетеротримерных G-белков: по завершению синтеза удаляется три С-концевых аминокислоты, а образовавшийся новый С-конец полипептидной цепи метилируется. Затем к цистеину гипервариабельной С-терминальной области присоединяется жирнокислотный или полипреновый остаток, который обеспечивает связь белка с мембраной.

Исследование структуры Ras белка показало наличие двух высокоподвижных участков, названных «switch I» и «switch II», которые окружают γ -фосфат GTP. Положение этих последовательностей существенно изменяется в зависимости от того, какой из нуклеотидов (GTP или GDP) находится в гуаниннуклеотидсвязывающем центре. Изменение конформации молекулы вследствие смещения switch-последовательностей способствует переключению неактивного состояния молекулы в активное, и наоборот. В аминотерминальной части G-белка расположен участок взаимодействия с эффекторами.

Цикл активации мономерных G-белков. Мономерные G-белки, в отличие от гетеротримерных, не взаимодействуют непосредственно с рецепторами. Передача сигнала между ними осуществляется посредством адаптерных молекул. В неактивном состоянии в гуаниннуклеотидсвязывающем центре G-белка

связана молекула GDP. Стимуляция G-белка путем взаимодействия с адаптерами способствует замене GDP на GTP (рис. 29). Адаптерные молекулы, непосредственно взаимодействующие с малыми G-белками, называют **гуанин-нуклеотид обменивающие факторы** (GEF — guanine nucleotide exchanging factor). После замены гуанозинфосфатов малые G-белки изменяют конформацию и переходят в активное состояние, то есть приобретают способность регулировать активность своих мишеней. Помимо GEF в цикле активации G-белков могут участвовать иные регуляторы, причем не только активаторы, но и ингибиторы передачи сигнала. Предполагается участие **гуанин-нуклеотид диссоциирующего ингибитора** — GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). Этот регулятор был обнаружен при изучении механизма активации Rab-белков. Суть его действия заключается в том, что он связывает липофильную группу неактивного GDP-связанного G-белка, в результате чего последний диссоции-

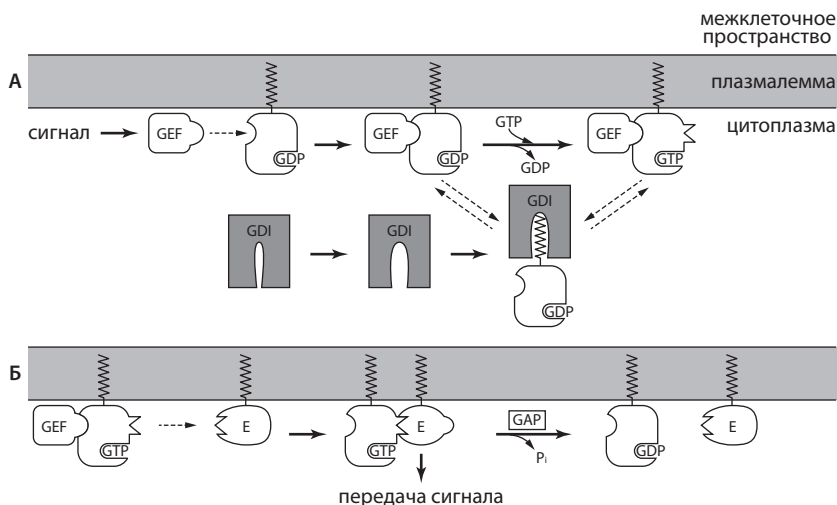


Рис. 29. Цикл активации мономерных G-белков.

Условные обозначения:

GEF — гуанин-нуклеотид обменивающий фактор;

GDI — гуанин-нуклеотид диссоциирующий ингибитор;

GAP — белки, активирующие GTPазу;

E — мишень G-белка

ирует от мембраны. Этим способом GDI изолирует неактивный G-белок. Ассоциированный с GDI G-белок не имеет возможности взаимодействовать с GEF (рис. 29).

Инактивация GTP-связанной формы G-белка осуществляется в результате GTPазной реакции. Отщепление γ -фосфата приводит к образованию GDP, и G-белок, таким образом, переходит в неактивную GDP-связанную форму.

GTPазная активность, а соответственно, и скорость инактивации G-белка не являются постоянными. Так, активность повышается при взаимодействии GTP-связанной формы G-белка со своей мишенью. Помимо этого, существуют специализированные регуляторы активности. Они называются **белки, активирующие GTPазу** или **GAP** (GTPase activating protein). GTPазная активность G-белков, связанных с GAP, увеличивается пятикратно.

3.2. ЭФФЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ВТОРИЧНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ

Эффе́кторные молекулы являются компонентами сигнальных систем, которые участвуют в образовании внутриклеточных низкомолекулярных посредников — **вторичных мессенджеров**. Эффе́кторы — это ферменты, которые преимущественно располагаются на плазматической мембране, но могут иметь цитоплазматическую локализацию. В качестве эффе́кторов можно также рассматривать кальциевые ионные каналы.

Важным свойством эффе́кторов является их способность усиливать сигнал, поскольку их функционирование приводит к образованию значительного количества вторичных мессенджеров, передающих сигнал на дальнейшие компоненты сигнальных цепей. Таким образом, одна эффе́кторная молекула посредством вторичных мессенджеров может влиять на активность множества сигнальных посредников.

Состояние эффе́кторов зависит от внешних сигналов, но активность каждого из них модулируется различными способами, в зависимости от конкретного типа эффе́кторной молекулы. Они могут получать сигнал:

- 1) непосредственно от рецепторов;
- 2) опосредованно через белковые компоненты сигнальных систем;
- 3) при связывании первичного мессенджера (рецепторы-каналоформеры);
- 4) под влиянием вторичных мессенджеров.

Эффекторы-ферменты ковалентно модифицируют субстрат, образуя низкомолекулярные соединения, выполняющие роль вторичных мессенджеров. **Вторичные мессенджеры** обладают несколькими важными свойствами. Во-первых, они хорошо диффундируют внутри клетки, а некоторые соединения (например, NO) легко проникают в соседние клетки. Во-вторых, это коротко живущие соединения: они разрушаются ферментативным путем или спонтанно. В случае ионов существуют механизмы, способствующие быстрому снижению их концентрации.

Эффектор, синтезирующий молекулы вторичных посредников, и фермент, способный разрушать их, составляют в клетке своеобразную антагонистическую пару. Примером такой пары могут служить аденилатциклаза (АЦ) и фосфодиэстераза (ФЭ). Каталитическая активность ФЭ направлена на разрушение циклического АМР (сАМР) — вторичного мессенджера, который синтезируется АЦ. Эти ферменты не только обладают противоположными свойствами, но имеют также противоположные способы регуляции. Если аденилатциклаза активируется при получении определенного сигнала, то фосфодиэстераза в этих условиях теряет активность. Однако когда данный сигнал отсутствует, то АЦ ингибируется, а ФЭ, наоборот, переходит в активное состояние. Противоположно направленная регуляция активности этих ферментов позволяет клетке быстро реагировать на внешние условия, так как способствует эффективному синтезу или разрушению вторичных мессенджеров при соответствующих условиях.

3.2.1. Фосфолипазы

Фосфолипазы — это ферменты, катализирующие гидролиз определенных эфирных связей в молекулах фосфолипидов. Согласно расположению гидролизуемой связи различают пять

классов фосфолипаз (PLD, PLC, PLA₁, PLA₂ и PLB). В качестве отдельной группы выделяют ферменты, катализирующие расщепление лизофосфолипидов — лизофосфолипазы.

Сайты и продукты расщепления (рис. 30):

- фосфолипазы D (PLD) — терминальная фосфоэфирная связь; продукты: фосфатидная кислота и головная спиртовая группа;
- фосфолипазы C (PLC) — глицерофосфатная эфирная связь; продукты: диацилглицерол и фосфорилированный спирт;
- фосфолипазы A₁ (PLA₁) — *sn*-1 ацилэфирная связь; продукты: свободная жирная кислота и 1-лизо-2-ацилфосфолипид;

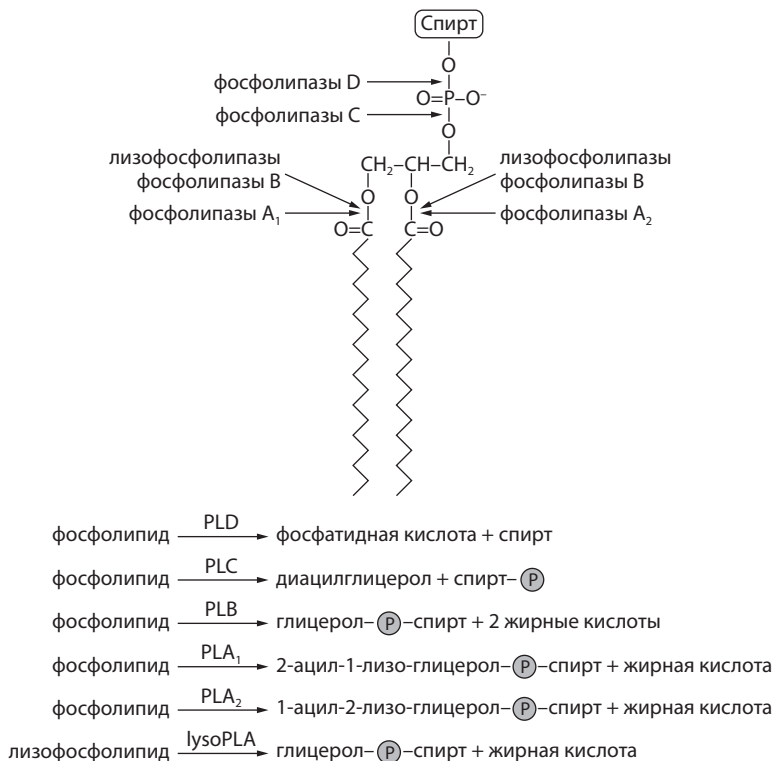


Рис. 30. Сайты действия фосфолипаз на фосфолипиды и продукты реакций

- фосфолипазы A_2 (PLA_2) — *sn*-2 ацилэфирная связь; продукты: свободная жирная кислота и 1-ацил-2-лизофосфолипид;
- фосфолипазы В (PLB) — *sn*-1 и *sn*-2 ацилэфирные связи; продукты: свободные жирные кислоты и 3-фосфоглицерол;
- лизофосфолипазы А ($lysoPLA$) — *sn*-1 или *sn*-2 ацилэфирная связь в молекулах лизофосфолипидов; продукты: свободная жирная кислота и 3-фосфоглицерол.

В сигнальных механизмах наиболее важными являются фосфолипазы С, D и A_2 . Активность всех этих фосфолипаз приводит к образованию целого ряда вторичных мессенджеров, участвующих в модуляции активности компонентов каскадных сигнальных систем.

Фосфолипазы D

Каталитическая активность фосфолипаз D (PLD) наблюдается на разных этапах онтогенеза растений и имеет важное значение при воздействии широкого спектра абиотических и биотических стрессовых факторов. PLD выполняют центральную роль в стрессовых реакциях растений, в которых опосредуют действие стрессовых гормонов (АБК, жасмоната, этилена), а также продукцию этих регуляторов.

Фосфолипазы D расщепляют терминальную фосфоэфирную связь фосфолипида. Продуктами расщепления являются фосфатидная кислота ($PtdOH$) и водорастворимая головная группа (спирт) (рис. 31). Эти ферменты обладают уникальным свойством: в присутствии первичных спиртовых групп они могут переносить фосфатидил на спирты с образованием соответствующих фосфатидилалкоголей. Подобная обратимость катализируемой реакции для других фосфолипаз не характерна.

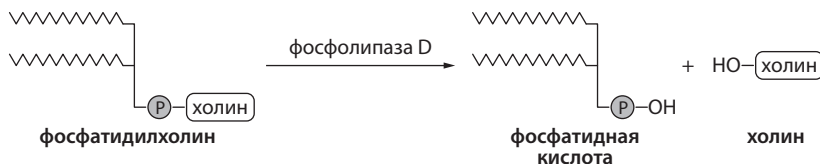


Рис. 31. Реакция, катализируемая фосфолипазой D

Согласно субстратной специфичности и требованиям двухвалентных ионов фосфолипазы D подразделяют на три группы:

- 1) **обычные** PLD имеют максимальную активность при миллимолярной концентрации Ca^{2+} (20–100 мМ);
- 2) **полифосфоинозитид-зависимые** PLD наиболее активны при микромолярном уровне Ca^{2+} и специфичны к фосфатидилинозитолполифосфатам;
- 3) **фосфатидилинозитол-специфичные** фосфолипазы D являются Ca^{2+} -независимыми.

В растениях преобладают обычные PLD. Помимо главных трех классов, основанных преимущественно на требовании, ионов Ca^{2+} , PLD разделяют на группы согласно аминокислотной последовательности, архитектуре генов и биохимических свойств. Так, у *Arabidopsis* выделено пять классов: PLD α , β , γ , δ и ϵ . Большинство PLD, идентифицированных у *Arabidopsis* и у других видов растений принадлежат к классу PLD α .

Полифосфоинозитид-зависимые PLD были охарактеризованы в *Arabidopsis*, а фосфатидилинозитол-специфичные PLD — в *Catharanthus roseus* (катарантус розовый, в цветоводстве известный больше как барвинок розовый).

Катализ. Ферменты суперсемейства PLD гидролизуют Р–О связи путем двухшаговой пинг-понг реакции, в процессе которой фосфатидил сначала присоединяется к ферменту (то есть вовлекается фосфатидил-ферментный посредник). Для нуклеофильной атаки фосфорной группы субстрата фосфолипазы D используют консервативный остаток гистидина.

Субстратная специфичность. Большинство растительных PLD имеют широкую субстратную специфичность, проявляя при этом предпочтение определенному типу субстрата. Например, PLD α , β и γ утилизируют фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерол. Однако PLD α сильно отличается от PLD β и γ по требуемому уровню Ca^{2+} . Кроме того, PLD β и γ , в отличие от PLD α , гидролизуют также фосфатидилсерин и N-ацилфосфатидилэтаноламин. Ни одна из Ca^{2+} -зависимых PLD не расщепляет фосфатидилинозитол, фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат и кардиолипин. Тогда как Ca^{2+} -независимые PLD, наоборот, гидролизуют фосфатидилинозитол, но не действуют на фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин.

Активация. Активность PLD зависит от многих факторов — концентрации Ca^{2+} , липидного состава, pH, инозитолфосфатов и др. Наиболее важным фактором для обычных PLD, главным образом для $\text{PLD}\alpha$, являются ионы Ca^{2+} . На N-терминальном участке молекул растительных Ca^{2+} -зависимых PLD расположен Ca^{2+} /фосфолипид-связывающий участок, называемый C2-доменом. Этот домен типичен только для растительных PLD. Связывание Ca^{2+} способствует изменению конформации молекулы, которое необходимо для повышения сродства фермента к мембранным липидам.

Механизм активации PLD предполагает связывание молекулы фермента с мембраной. Растворимая фракция PLD является неактивной. Важным фактором активации PLD являются осцилляции Ca^{2+} . Ионы Ca^{2+} повышают аффинность C2-домена к мембранным фосфолипидам. Считается, что именно C2-домен является ответственным за внутриклеточную транслокацию PLD. Усиление связывания PLD с мембранами может представлять собой быстрый и ранний этап активации фермента в условиях стресса.

Исследование уровня экспрессии генов показало, что различные изоформы PLD имеют неодинаковое значение в стрессовом ответе. В условиях недостаточного водоснабжения стимулируется экспрессия $\text{PLD}\alpha$. Экспрессия и активность других видов PLD при водном стрессе не изменяется. При механическом повреждении листьев *Arabidopsis* возрастает экспрессия генов $\text{PLD}\beta$, $\text{PLD}\gamma 1$ и $\text{PLD}\gamma 2$, тогда как активность $\text{PLD}\alpha$ возрастает за счет повышения аффинности предсуществующего фермента к мембране. Относительный уровень экспрессии различных PLD отличается у *Arabidopsis* при воздействии пониженной температуры, тяжелых металлов, соли, засухи, а также стрессовых гормонов АБК и жасмоновой кислоты. Кроме того, одни PLD всегда присутствуют в клетках, а другие являются индуцируемыми.

Передача сигнала. Продукт каталитической активности PLD — фосфатидная кислота — модулирует активность множества мишеней. Фосфатидная кислота взаимодействует не только с мембранными мишенями, но и способствует связыванию с мембранами многих цитоплазматических белков (рис. 32).

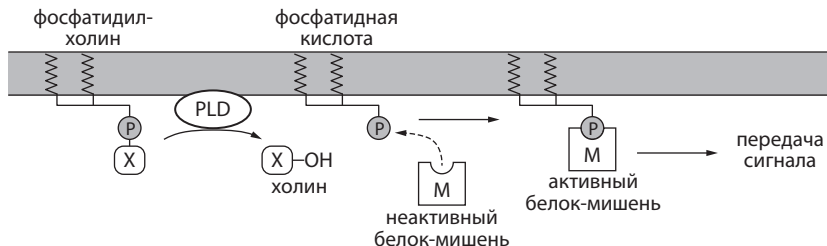


Рис. 32. Передача сигнала через фосфолипазу D

К мишеням фосфатидной кислоты относятся протеиновые и липидные киназы, фосфатазы, фосфолипазы, ионные каналы и активные трансмембранные переносчики, например, аутоингибируемые Ca^{2+} -АТФазы. Фосфатидной кислотой активируется **фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа** — фермент, катализирующий образование фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Данное соединение является субстратом и при этом главным фактором активации полифосфоинозитид-специфичных фосфолипаз C. Также считают, что фосфатидная кислота способна непосредственно взаимодействовать с фосфолипазами C и A_2 и модулировать их активность, влияя на интенсивность синтеза низкомолекулярных регуляторов. Таким образом, активация PLD и последующее образование фосфатидной кислоты приводят к стимулированию сигнальных систем, опосредованных фосфолипазами C и A_2 , в том числе октадеканойдного пути (см. далее).

PLD α имеет решающее значение в регуляции закрывания устьиц, индуцируемого АБК при водном стрессе. В замыкающих клетках АБК активирует PLD α , а образующаяся при этом фосфатидная кислота регулирует дальнейшие события, которые приводят к ингибированию поглощающих K^+ -каналов и закрыванию устьиц.

Фосфолипазы C

Фосфолипазы C (PLC) гидролизуют глицерофосфатную эфирную связь фосфолипидов в процессе чего образуются диацилглицерол (ДАГ) и свободная фосфорилированная головная группа (рис. 33).

Фосфолипазы С являются цитоплазматическими мономерными белками. Молекулярные структуры различных изоформ имеют сходные и уникальные черты. На N-концах полипептидных цепей всех фосфолипаз С локализованы участки, необходимые для присоединения фермента к мембране. С-концевая область обеспечивает дополнительные участки связывания молекулы с мембраной и выполняет регуляторные функции — через нее осуществляется взаимодействие с регуляторными белками. Два консервативных домена формируют в молекулах PLC каталитический центр. Причем эти домены могут быть расположены близко друг к другу или разделены большой аминокислотной последовательностью, которая включает участки, необходимые для связывания с регуляторными белками.

Согласно субстратной специфичности и функции PLC можно подразделить на три группы:

- 1) **полифосфоинозитид-специфичные PLC** гидролизуют фосфатидилинозитолполифосфаты;
- 2) **неспецифичные PLC** действуют на фосфатидилхолин и ряд других фосфолипидов (так как ферменты этой группы преимущественно расщепляют фосфатидилхолин, их также называют фосфатидилхолин-специфичные PLC);
- 3) **гликозилфосфатидилинозитол-специфичные PLC (GPI-PLC)** отщепляют белки (гликопротеины), заякоренные на мембранах с помощью гликозидных связей через фосфатидилинозитол. GPI-заякоренные белки являются экстраклеточными и функционируют в качестве ферментов (фосфатазы, нитратредуктазы), рецепторов, взаимодействующих с экстраклеточными лигандами, или матричных белков клеточной стенки (арабиногалактанпротеин).

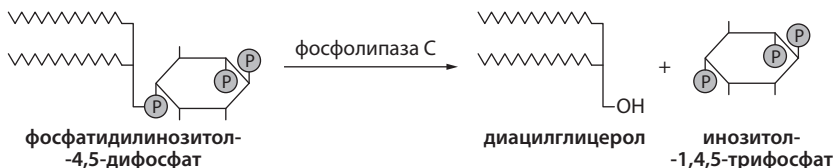


Рис. 33. Реакция, катализируемая фосфолипазой С

Среди фосфолипаз С полифосфоинозитид-специфичные PLC (PI-PLC) занимают центральное положение в сигнальных механизмах.

Полифосфоинозитид-зависимые фосфолипазы С

Регуляция активности. Все растительные PI-PLC содержат домены X (≈ 170 а/к) и Y (≈ 260 а/к), необходимые для фосфоэстеразной активности, а также С2-домен на С-терминальном участке молекулы, через который осуществляется Ca^{2+} -зависимое связывание фосфорилированных форм фосфатидилинозитола. В молекуле растительных PI-PLC помимо каталитического центра нет иных специализированных участков для связывания с мембраной. Дополнительными участками взаимодействия PI-PLC с мембранами могут служить мембраносвязанные сигнальные молекулы, через которые осуществляется активация и регуляция активности фосфолипаз.

Растительные PI-PLC — Ca^{2+} -зависимые ферменты. Ионы Ca^{2+} необходимы не только для эффективного связывания фермента с мембраной, они также влияют на катализ. В клетках растений обнаружена активность PI-PLC, ассоциированная с мембранами и в растворимой фракции. Для первой характерна активность при микромолярных концентрациях Ca^{2+} , а для второй — при миллимолярных. Эта особенность является доказательством того, что активность PI-PLC модулируется, помимо всего, субклеточной локализацией фосфолипаз С.

В механизме регуляции активности PI-PLC важным является поддержание определенного уровня различных изоформ этих ферментов в тканях. В разных тканях наблюдается соответствующие образцы экспрессии генов PI-PLC. Кроме того, гены, кодирующие PI-PLC, дифференциально экспрессируются при соответствующих внешних условиях. Например, при засухе в листьях картофеля уровень транскриптов PLC1 понижается, PLC2 повышается, а PLC3 остается неизменным.

Фосфатидилинозитол и его производные

Полифосфоинозитид-зависимые фосфолипазы С расщепляют разные виды фосфатидилинозитидов. Не все эти субстраты имеют сигнальное значение. Ряд ферментов, которые контроли-

руют синтез и фосфорилирование фосфатидилинозитолов, следует рассматривать в качестве сигнальных энзимов, поскольку от их активности зависит концентрация предшественников вторичных мессенджеров, а следовательно, эффективность сигнальных механизмов.

Синтез инозитола и фосфатидилинозитола. В растениях обнаружено девять стереоизомеров шестиатомного циклического спирта инозитола. Самый распространенный из них — *мио-инозитол*. Этот изомер входит в состав мембранных липидов и является основой сигнальных инозитолфосфатов. Синтез *мио-инозитола* осуществляется из глюкозо-6-фосфата. Сначала *мио-инозитол-1-фосфат-синтаза* (глюкозо-6-фосфат-циклоальдолаза) катализирует образование *мио-инозитол-1-фосфата*, который затем дефосфорилируется *инозитол-1-фосфатазой* до *мио-инозитола* (рис. 34). Под действием фосфатидилинозитол-синтазы *мио-инозитол* включается в состав **фосфатидилинозитола (PI)** — полярного мембранного липида. В этой реакции фосфатидная кислота переносится от диацилглицерол-цитидилдифосфата на *мио-инозитол*. Затем фосфатидилинозитол подвергается ковалентным модификациям путем фосфорилирования и дефосфорилирования. Фосфорилированные формы PI расщепляются сигнальными полифосфоинозитид-зависимыми фосфолипазами C.

Модификация фосфатидилинозитола. Инозитольное кольцо фосфатидилинозитола фосфорилируется по положениям 3, 4 и 5 специфическими киназами. Субстратная специфичность этих киназ и наборы продуктов фосфорилирования у растений и животных в некотором отношении сходны, однако не являются абсолютно идентичными. Например, у растений фосфатидилинозитол может быть одновременно фосфорилирован только по двум положениям (преимущественно 4 и 5 или 3 и 5), тогда как в клетках животных присутствуют трижды фосфорилированный PI по положениям 3, 4 и 5. Второе различие заключается в том, что у растений инозитол по положению 3 фосфорилируется только в составе фосфатидилинозитола, но не его фосфорилированных производных — фосфатидилинозитолфосфатов (фосфатидилинозитидов).

В образовании определенных форм фосфатидилинозитолфосфатов принимают участие также специфические фосфатазы,

лируя уровень АФК в клетках, опосредует механизм АБК-индуцируемого открывания устьиц.

Фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI-4-P) является преобладающей формой полифосфоинозитидов у растений. PI-4-P участвует во внутриклеточной ротации мембранного материала. Синтезируется из фосфатидилинозитола **фосфатидилинозитол-4-киназой (PI4K)** (рис. 34). О важности роли этого соединения свидетельствует тот факт, что «нок-аут» мутация по одному из генов PI4K у *Arabidopsis AtPI4Kb* приводит к ингибированию везикулярного транспорта на 50%. Известны две группы ферментов фосфатидилинозитол-4-киназ: мембраносвязанные (45–55 кД) и более высокомолекулярные, преимущественно растворимые (110–210 кД). У растений найдены только мембраносвязанные PI4K.

Фосфатидилинозитол-5-фосфат (PI-5-P). Функции этого соединения у растений окончательно не выяснены. Образуется PI-5-P путем дефосфорилирования фосфатидилинозитол-3,5-дифосфата

Рис. 34. Синтез инозитола и фосфатидилинозитол-фосфатов у растений. Условные обозначения:

DAG-CDP — диацилглицерол-цитидилдифосфат;

CMP — цитидинмонофосфат;

DAG — диацилглицерол;

PI — фосфатидилинозитол;

PI-3-P — фосфатидилинозитол-3-фосфат;

PI-4-P — фосфатидилинозитол-4-фосфат;

PI-5-P — фосфатидилинозитол-5-фосфат;

PI-4,5-P₂ — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат;

PI-3,5-P₂ — фосфатидилинозитол-3,5-дифосфат;

I-1,4,5-P₃ — инозитол-1,4,5-трифосфат;

IP₅ — инозитол-пентакисфосфат (инозитол-1,2,4,5,6-пентафосфат);

IP₆ — инозитол-гексакисфосфат (инозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфат);

MIPS — мио-инозитол-1-фосфат-синтаза;

Ptase — фосфатаза;

3-Ptase — инозитоллипид-3-фосфатаза;

4-Ptase — инозитоллипид-4-фосфатаза;

Kinases — киназы;

PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа;

PI4K — фосфатидилинозитол-4-киназа;

PI3P5K — фосфатидилинозитол-3-фосфат-5-киназа;

PI4P5K — фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа;

PIS — фосфатидилинозитол-синтаза;

PLC — фосфолипаза C

(PI-3,5-P₂) или фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PI-4,5-P₂) (рис. 34). Содержание PI-5-P у растений намного выше, чем у животных. Если в животных системах концентрация PI-5-P, как правило, не превышает 2% от общего содержания фосфатидилинозитолфосфатов, то у растений может варьировать в пределах от 3 до 18%.

Фосфатидилинозитол-3,5-дифосфат (PI-3,5-P₂) синтезируется из фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI-3-P) **фосфатидилинозитол-3-фосфат-5-киназой** (рис. 34). PI-3,5-P₂ принимает участие в функционировании вакуоли. Это соединение используется для привлечения и слияния везикул с тонопластом. При осмотическом стрессе, уменьшается объем вакуоли и, соответственно, площадь поверхности тонопласта. Это отражается на эффективности работы трансмембранных переносчиков и поддержании трансмембранного градиента протонов на тонопласте. В качестве компенсаторного механизма у дрожжей наблюдается фрагментация вакуоли на несколько частей — так увеличивается суммарная площадь вакуолярной мембраны. У мутантов, не синтезирующих PI-3,5-P₂, данный механизм нарушен. Кроме того, этот липид стимулирует активность вакуолярной H⁺-АТФазы. Таким образом, с участием PI-3,5-P₂ контролируется целостность/фрагментарность вакуоли и поддерживается тонопластный градиент протонов на соответствующем уровне. Считается, что подобный механизм функционирует у растений.

Фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PI-4,5-P₂) является источником инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), который образуется при расщеплении этого липида фосфолипазой C. Синтез PI-4,5-P₂ катализируется **фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназой** из фосфатидилинозитол-4-фосфата (PI-4-P) (рис. 34). Предположительно в геноме *Arabidopsis* кодируется 9 генов PI-4-P-5-киназы. Уровень активности этих ферментов является существенным для функционирования фосфолипаза C-зависимого сигналинга. Активность PI-4-P-5-киназы значительно возрастает при изменении внешних условий. Содержание PI-4,5-P₂ в клетках высших растений на порядок ниже, чем у животных. Однако это вовсе не означает меньшую значимость данного соединения для растений. Низкое содержание PI-4,5-P₂ поддерживается исключительно за счет высокой активности фосфо-

липазы С в условиях, при которых стимулируется данная сигнальная система. Концентрация субстрата является основным фактором регуляции активности многих изоформ растительных фосфолипаз С, и в ряде случаев помимо повышения концентрации PI-4,5-P₂ и оптимальной концентрации ионов Ca²⁺ не требуется иных механизмов активации этих ферментов. Эти особенности регуляции обеспечивают высокую чувствительность фосфолипаза С-зависимой сигнальной системы.

Сигнальная роль PI-4,5-P₂ определяется не только тем, что он является предшественником вторичного мессенджера IP₃. Некоторые факторы транскрипции докируются к плазматической мембране через PI-4,5-P₂. Активация фосфолипазы С приводит к высвобождению регуляторов генной активности, после чего они мигрируют в ядро и модулируют активность генов.

Помимо сигнальной роли, предполагается участие PI-4,5-P₂ в транспорте везикул. Это соединение, по-видимому, регулирует динамическое состояние актина через профилин (G-актин связывающий белок). Локальное накопление PI-4,5-P₂ на плазмалемме способствует направленному экзоцитозу, в результате которого клетка будет расти в определенном направлении. Подобный механизм с участием PI-4,5-P₂ осуществляется при формировании корневых волосков и прорастании пыльцы.

PI-PLC-опосредованный сигналинг

Сигнальный механизм с участием PI-PLC является важным для ответа растений на различные стимулы, включая осмотический стресс, АБК, свет, гравитацию, воздействие патогенов и загрязнение. Под действием этих факторов стимулируется активность полифосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С и фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы (PI4P5K) ключевого фермента синтеза фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата — субстрата PI-фосфолипазы С. На функционирование этого сигнального пути в значительной степени влияет фосфолипаза D. Продукт катализа PLD — фосфатидная кислота — непосредственно взаимодействует с фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназой (PI4P5K) и активирует ее (рис. 35). Увеличение концентрации фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата является основным фактором активации PI-PLC.

PI-PLC расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) на инозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) и диацилглицерол (DAG) (рис. 35). У животных IP_3 связывается с IP_3 -стимулируемыми Ca^{2+} -каналами (IP_3 -рецепторами), локализованными на мембранах ЭПР и стимулирует высвобождение ионов Ca^{2+} , а DAG участвует в активации протеинкиназы C. В растениях не обнаружены гомологи мишеней IP_3 животных (IP_3 -рецепторы) и протеинкиназы C. Вместе с тем, существуют доказательства того, что мобилизация ионов Ca^{2+} и кальциевые осцилляции играют

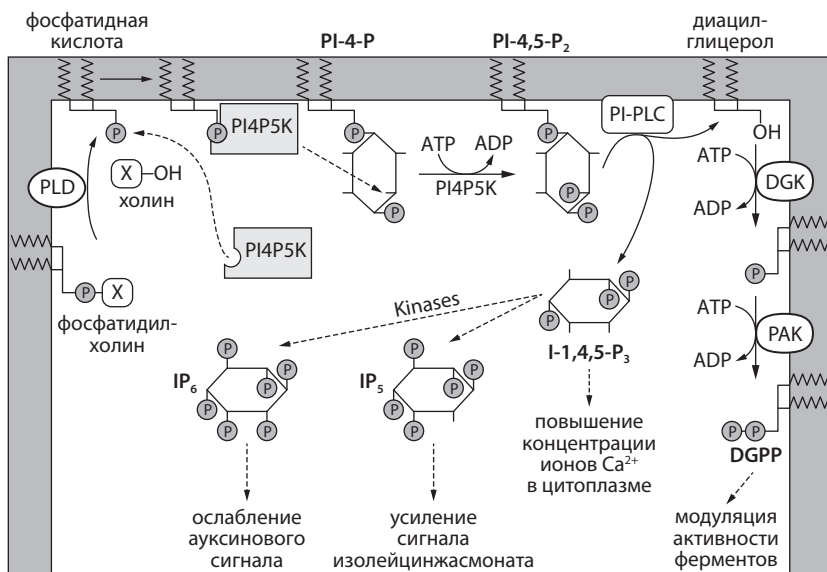


Рис. 35. Сигнальный механизм, опосредованный фосфолипазами D и C. Условные обозначения:

PI4P5K — фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа;

PI-4-P — фосфатидилинозитол-4-фосфат;

PI-4,5-P₂ — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат;

I-1,4,5-P₃ — инозитол-1,4,5-трифосфат;

IP₅ — инозитол-пентакисфосфат (инозитол-1,2,4,5,6-пентафосфат);

IP₆ — инозитол-гексакисфосфат (инозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфат);

PI-PLC — полифосфоинозитид-специфичная фосфолипаза C;

DGK — диацилглицеролкиназа;

PAK — фосфатидаткиназа;

DGPP — диацилглицерол-пирофосфат

важную роль в PI-PLC-опосредованном сигнальном пути. В настоящее время не известен точный механизм кальциевых осцилляций в PI-PLC-опосредованном каскаде растений. Если IP_3 -чувствительные Ca^{2+} -каналы присутствуют в растительных клетках, то они принципиально отличаются по структуре от подобных молекул животных. Не исключается возможность того, что IP_3 не имеет непосредственного отношения к активации Ca^{2+} -каналов.

Повышение уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме под влиянием PI-PLC, в свою очередь, способствует стимулированию PLD. Ионы Ca^{2+} способствуют связыванию PLD с мембранами, в результате чего этот фермент активируется. Таким образом, ферменты PI-PLC, PLD и PI4P5K создают позитивную регуляторную петлю.

Помимо того, что расщепление фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата приводит к синтезу различных регуляторов (вторичных мессенджеров), снижение уровня фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата под действием PI-PLC оказывает регуляторное действие иного плана. Во-первых, PI-4,5- P_2 является регулятором ряда мембраносвязанных ферментов, во-вторых, это соединение может служить сайтом для прикрепления к мембране некоторых функциональных белков, в том числе, белков цитоскелета, ферментов, регуляторов транскрипции. Расщепление PI-4,5- P_2 приводит к высвобождению таких белков, что способствует изменению их локализации и отражается на активности. Например, через PI-4,5- P_2 к мембране присоединяется регулятор генной активности Tubby. Высвобождение этого регулятора в результате активации фосфолипазы C позволяет белку мигрировать в ядро и участвовать в модуляции экспрессии специфических генов.

Производные инозитол-1,4,5-трифосфата. Увеличение концентрации IP_3 в растительных клетках вследствие активации PI-PLC стимулирует появление различных высокофосфорилированных форм инозитола (IP_x) (рис. 34, 35). У растений, в отличие от животных, функционируют многочисленные киназы и фосфатазы, которые принимают участие в метаболизации IP_3 . Согласованная работа этих ферментов направлена на поддержание пула IP_x в определенном соотношении. Для некоторых

из этих соединений установлены мишени. **Инозитол-гексакисфосфат** (IP_6) связывается с F-box рецепторами ауксина, снижая чувствительность клеток к этому гормону. **Инозитол-пентакисфосфат** (инозитол-1,2,4,5,6-пентафосфат — IP_5) связывается с F-box рецепторами изолейцин-жасмоната, облегчая их взаимодействие с гормоном.

Среди высокофосфорилированных инозитолов обнаружены формы, содержащие пирогосфатные группы. В настоящее время обсуждается потенциальная роль IP_7 и IP_8 в качестве сигнальных молекул и источников фосфата для биосинтеза АТФ.

Судя по обилию разнообразных фосфорилированных инозитолов, возможно, что некоторые из них связаны с регуляцией Ca^{2+} -каналов.

Производные диацилглицерола. Мишени диацилглицерола (DAG) в PI-PLC-зависимом механизме у растений не найдены. Образующийся в результате гидролиза PI-4,5- P_2 диацилглицерол фосфорилируется **диацилглицеролкиназой** (DGK) до фосфатидной кислоты (PA) (рис. 35). Механизм регенерации фосфатидной кислоты из DAG широко распространен в природе и функционирует, в том числе, у животных. Однако у растений фосфатидная кислота тоже фосфорилируется при активации фосфолипаз C и D. **Фосфатидаткиназа** (PAK) катализирует образование **диацилглицерол-пирогосфата** (DGPP). Значение DGPP заключается, прежде всего, в ослаблении сигнала, который передается через PA. Однако в настоящее время также не исключается возможность существования мишеней, на которые бы влиял DGPP. У высших животных фосфатидаткиназная активность и присутствие DGPP в клетках не обнаружены.

Поскольку не диацилглицерол, а фосфатидная кислота и, возможно, диацилглицерол-пирогосфат взаимодействуют с даунстрим сигнальными молекулами, то ферменты диацилглицеролкиназа и фосфатидаткиназа, последовательно катализирующие превращения $DAG \rightarrow PA \rightarrow DGPP$, рассматриваются важными сигнальными ферментами в рамках растительных сигнальных систем. Количество DGPP и PA строго регулируется и зависит от активности диацилглицеролкиназы, фосфатидаткиназы и их антагонистов — специфических фосфатаз, дефосфорилирующих DGPP и PA.

Краткая схема PI-PLC опосредованного сигнального механизма.

1. Активация полифосфоинозитид-специфичной фосфолипазы C и фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназы.
2. Расщепление фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата на инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола.
3. Синтез низкомолекулярных регуляторов (вторичных мессенджеров) из продуктов распада PI-4,5-P₂: высокофосфорилированных форм инозитола, фосфатидной кислоты и диацилглицерол-пирофосфата.
4. Модуляция активности мишеней вторичными мессенджерами.

Фосфолипазы A₂

Фосфолипазы A₂ отщепляют *sn*-2 ацилэфирные связи фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот и 1-ацил-2-лизофосфолипидов (рис. 36). В растениях присутствуют фосфолипазы A₂ двух основных типов:

- 1) **секреторные** (secretory) низкомолекулярные фосфолипазы A₂ (sPLA₂);
- 2) **внутриклеточные** (intracellular) Ca²⁺-независимые фосфолипазы A₂ (iPLA₂).

У животных обнаружены также **цитозольные** (cytosolic) Ca²⁺-зависимые фосфолипазы A₂ (cPLA₂).

Секреторные фосфолипазы A₂ обладают низкой молекулярной массой (14 кД) и проявляют оптимальную активность при миллимолярных концентрациях Ca²⁺. Из тканей нескольких видов растений (рис, гвоздика, вяз) были выделены и клонированы кДНК, соответствующие генам секреторных фосфолипаз A₂.

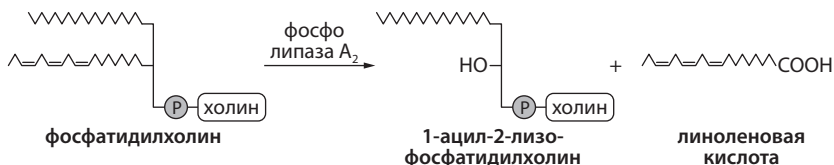


Рис. 36. Реакция, катализируемая фосфолипазой A₂

Анализ последовательности этих ДНК показал наличие нескольких дисульфидных связей и сигнального пептида, определяющего секреторные свойства молекулы фермента.

Внутриклеточные фосфолипазы A_2 (iPLA₂) представляют группу, включающую мембраносвязанные и цитозольные ферменты с молекулярной массой 40–48 кД. Все известные растительные iPLA₂ предпочтительно отщепляют линолевую и линоленовую группы, находящиеся в *sn*-2 положении фосфатидилхолина. Эти ферменты стимулируются кальмодулином, в отсутствии которого не реагируют на изменение концентрации Ca^{2+} .

Катализ. Внутриклеточные и секреторные фосфолипазы A_2 имеют разный механизм действия.

Внутриклеточные фосфолипазы A_2 гидролизуют ацилэфирную связь через образование ацил-ферментного посредника. Ацил присоединяется к остатку серина, который находится в консенсусной последовательности GXSXG. Ионы Ca^{2+} не принимают непосредственного участия в катализе, однако Ca^{2+} необходим для кальцинирования кальмодулина — активатора фермента.

Секреторные фосфолипазы A_2 непосредственно используют ионы Ca^{2+} в активации. В молекуле фермента есть консервативные Ca^{2+} -связывающие центры (EF-руки). Связывание кальция стабилизирует переходное состояние молекулы, необходимое для проявления активности. Секреторные фосфолипазы A_2 не имеют GXSXG последовательности и не образуют ацил-ферментного посредника. В механизм катализа sPLA₂ вовлекается остаток гистидина и аспартата, которые поляризуют молекулу воды, а затем поляризованная H_2O атакует карбонильную группу.

Октадеканойдный путь

Растительные PLA₂ регулируют, главным образом, октадеканойдный путь, в котором из линоленовой кислоты образуются жасмонаты и другие оксипиены (рис. 37). В отличие от других эффекторов, главная сигнальная функция PLA₂ заключается в катализе синтеза не собственно вторичных мессенджеров, а предшественников для синтеза других регуляторов. Иными словами, PLA₂ поставляют субстрат для октадеканойдного пути.

Механизм октадеканоидного пути. Синтез жасмоновой кислоты стимулируется различными внешними сигналами через активацию фосфолипазы A_2 и липоксигеназы. Фосфолипаза A_2 отщепляет жирнокислотный остаток в положении *sn*-2 от молекулы мембранного фосфолипида. В этом положении, как правило, локализуются жирные кислоты с высокой степенью ненасыщенности, а чаще всего — линоленовая. Липоксигеназа вводит в молекулы свободных высоконенасыщенных жирных кислот пероксидную группу, специфически узнавая пентадиеновую систему (пять атомов углерода и две двойных связи). В структуре линоленовой кислоты можно выделить две пентадиеновые системы, включающих атомы углерода с номерами 9–13 и 12–16. Пентадиеновая система, распознаваемая 13-липоксигеназой, сформирована атомами от C-9 до C-13. Липоксигеназа отщепляет 11-про-S-атом водорода (H_S) от C-11 и присоединяет молекулу кислорода к C-13 в виде пероксидной группы (рис. 37). В результате образуется двойная 11-*транс*-связь (между атомами C-11 и C-12). Далее фермент аллен-оксид синтаза (гидропероксид-дегидраза) отщепляет от 13-гидроксипероксилиноленовой кислоты гидроксил с образованием эпоксидной группы у атомов C-12–C-13. 12-13-эпоксилиноленовая кислота за счет каталитической активности фермента аллен-оксид циклазы формирует пентациклическую структуру, образуя связь между C-9 и C-13. В результате циклизации эпоксидный кислород сохраняет связь только с C-12 и становится кислородом кето-группы в молекуле 12-оксофитодиеновой кислоты. Двойная связь в цикле (C-10–C-11) насыщается NADPH-зависимой редуктазой. При этом образуется 12-оксофитомоноеновая кислота, из которой в результате трех этапов β -окисления (молекула теряет при этом 6 атомов углерода) синтезируется жасмоновая кислота.

Октадеканоидный путь может инициироваться не только в результате фосфолипазной реакции, но и путем липоксигенирования липид-связанных жирнокислотных остатков линоленовой кислоты. Фосфолипазы A_2 при выборе субстрата отдают предпочтение переоксиленным мембранным липидам. Поэтому переоксиленный остаток линоленовой кислоты избирательно отщепляется от липида и подвергается дальнейшим изменениям с образованием жасмоновой кислоты.

Жасмоновая кислота является физиологически слабоактивным соединением и преимущественно используется растениями как транспортная форма, которая передвигается по флоэме. Обработка растений жасмоновой кислотой оказывает специфиче-

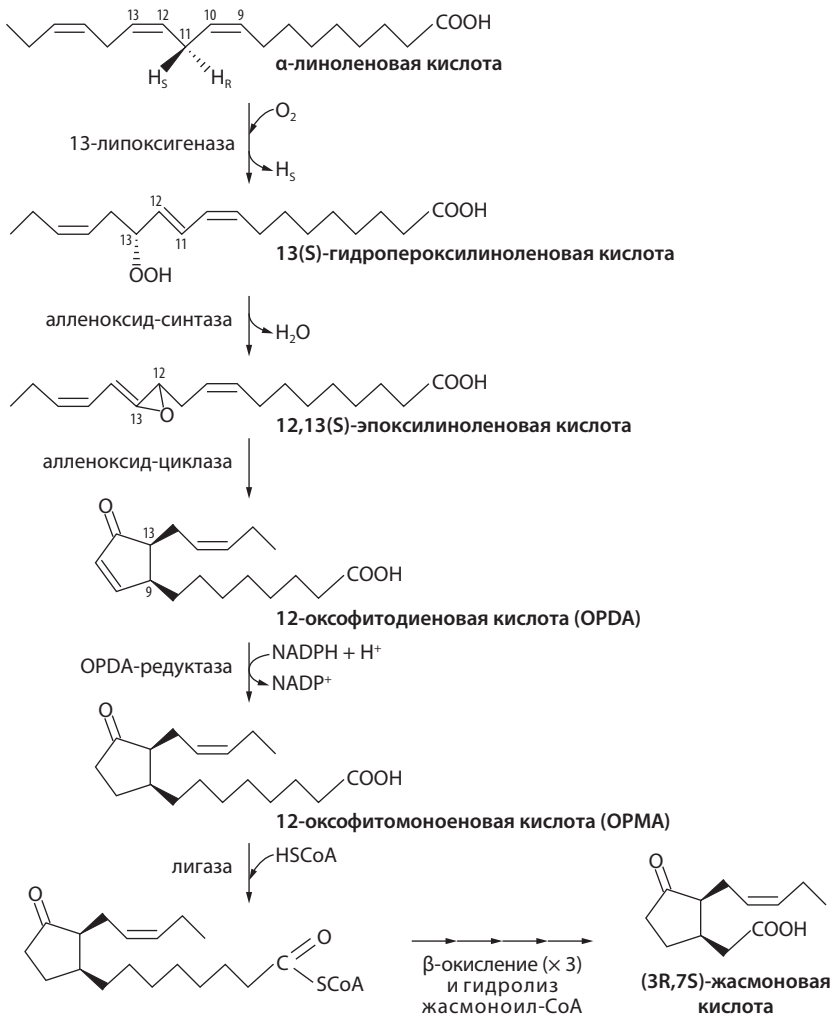


Рис. 37. Синтез жасмоновой кислоты — октадеканоидный путь

ское действие, так как при попадании в ткани это вещество метаболизируется до активной формы. Существует ли у растений сигнальный механизм, регулируемый собственно жасмоновой кислотой, пока неизвестно.

Жасмоновая кислота в растительных тканях подвергается ковалентной модификации путем конъюгирования с различными соединениями (спиртами, аминокислотами). Изолейцин-жасмонат, продукт конъюгации жасмоновой кислоты с изолейцином, считается физиологически активной формой (рис. 38). Другой известный конъюгат — метиловый эфир жасмоновой кислоты является летучим соединением. Метилжасмонат, как и жасмоновая кислота, выполняет транспортные функции, но распространяется не по флоэме, а по воздуху. Причем, коммуникация с помощью метилжасмоната осуществляется не только между пространственно отдаленными органами одного растения, но и между отдельными растениями. Проникая в ткани, метилжасмонат расщепляется эстеразами до свободной жасмоновой кислоты, которая в дальнейшем преобразуется в активную форму.

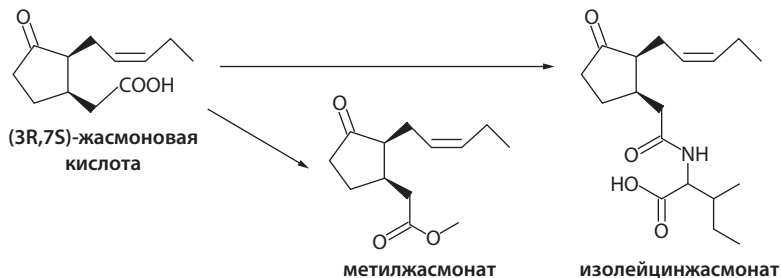


Рис. 38. Производные жасмоновой кислоты

Функции фосфолипазы A_2

Продукты октадеканойдного пути участвуют в регуляции ответных реакций на механические повреждения и воздействия патогенов. В результате действия этих стрессоров в растениях наблюдается возрастание активности PLA_2 и, как результат, системное накопление лизофосфолипидов и высвобождение

полиненасыщенных жирных кислот (преимущественно линоленовой), которые подвергаются действию липоксигеназ и вовлекаются в октадеканойдный путь. В стрессированных клетках PLA_2 могут опосредовать механизмы генерации активных форм кислорода и синтеза алкалоидов. Активацию PLA_2 можно продемонстрировать в отсутствии стресса, но под действием системина или олигосахаридов.

Помимо стрессовых реакций фосфолипазы A_2 участвуют в других клеточных процессах: метаболизме липидов и ауксин-стимулируемом росте. PLA_2 -подобная активность преимущественно направлена на отщепление не только высоконенасыщенных жирных кислот, но и второстепенных или редких. Такие жирные кислоты перераспределяются из мембранных фосфолипидов в запасные триацилглицеролы. Таким образом, фосфолипазы A_2 участвуют в накоплении запасных липидов. На семенах огурца было показано, что PLA_2 локализуются в сферосомах семядолей и участвуют в катаболизме и утилизации запасных липидов в процессах прорастания семян и роста проростков.

Различные сигнальные пути (стресс- или ауксин-индуцируемые), по-видимому, вовлекают разные типы PLA_2 . Так, ингибитор внутриклеточных фосфолипаз A_2 HELSS тормозит ауксин-индуцируемое удлинение гипокотилей цукини и колектелей кукурузы, а ингибитор системин-индуцируемых PLA_2 AACOCF3 оказался не эффективным в отношении ростовых реакций.

Фосфолипазы A_1 и B , лизофосфолипазы A

Фосфолипазы A_1 гидролизуют *sn*-1 ацилэфирные связи фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот и 2-ацил-1-лизофосфолипидов. Фосфолипазы B последовательно удаляют два остатка жирных кислот из молекул фосфолипидов, то есть обладают активностью PLA и $lysoPLA$. Лизофосфолипазы A расщепляют ацилэфирную связь в молекулах лизофосфолипидов, образуя при этом жирную кислоту и глицерол-3-фосфоалкоголь.

Лизофосфолипиды присутствуют в биологических мембранах в незначительных количествах, но вместе с тем, выполняют важные регуляторные функции: трансдукция внутриклеточных

сигналов и транспорт везикул. У животных формирование лизофосфатидной и фосфатидной кислот происходит специфически в шейке формирующихся синаптических везикул, то есть переход лизофосфатидная кислота \leftrightarrow фосфатидная кислота необходим для почкования мембран.

В растениях лизофосфолипиды формируются в ответ на стрессовые воздействия и модулируют активность ряда ферментов. Лизофосфатидилхолин, например, может непосредственно взаимодействовать с H^+ -АТФазой плазматической мембраны, стимулируя ее активность. Лизофосфатидилэтаноламин задерживает старение, возможно, путем ингибирования PLD.

Лизофосфолипазы, следовательно, являются важными компонентами, необходимыми в регуляции уровня лизофосфолипидов, липидном сигнальном каскаде и метаболизме.

Взаимодействие фосфолипаз

Изучение накопления продуктов липидного обмена в стрессовых условиях показало, что повышение количества фосфатидной кислоты предшествует возрастанию уровня диацилглицерола, свободных жирных кислот, пероксидированных жирных кислот и лизофосфолипидов, тогда как репрессия PLD α приводила к снижению стресс-индуцируемого накопления линоленовой кислоты и жасмонатов. На основании этого наблюдения было предположено, что фосфолипазы D, продуцирующие фосфатидную кислоту, могут стимулировать активацию других ферментов катаболизма липидов.

Ферменты липидного сигнального каскада часто формируют сложные сети, которые опосредуют специфический клеточный ответ. Примером такого взаимодействия является участие фосфолипаз C, D и A₂ в регуляции устьичной транспирации. PLD и фосфатидилинозитид-зависимые PLC (PI-PLC) опосредуют закрытие устьиц, тогда как PLA₂ стимулируют их открывание. Под влиянием PI-PLC запускается каскад реакций (синтез инозитол-1,4,5-трифосфат и его производных), который приводит к повышению уровня ионов Ca²⁺ в цитоплазме. Ионы Ca²⁺ способствуют связыванию PLD с мембранами, в результате чего этот фермент активируется. Продукт катализа PLD —

фосфатидная кислота активирует фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназу (PI4P5K), которая принимает участие в продукции фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата — субстрата для PI-PLC (рис. 35). Таким образом, PI-PLC, PLD и PI4P5K создают позитивную регуляторную петлю. С другой стороны, фосфолипазы A_2 могут выступать антагонистами PLD и PI-PLC, так как помимо высоконенасыщенной линоленовой кислоты, из которой генерируются жасмонаты и другие оксипиены, продуктами каталитической активности PLA_2 являются лизофосфолипиды, которые ингибируют PLD.

3.2.2. Оксид азота (II) и NO-сигналинг

Оксид азота

Оксид азота (NO) является повсеместно распространенной биоактивной молекулой. NO и его производные способны модулировать активность своих мишеней, связывая металлы редоксцентров металлопротеинов, или путем ковалентной модификации остатков цистеина и тирозина.

Ранее предполагалось, что присутствие оксидов азота в живых тканях является результатом повреждений или загрязнения, поэтому первоначальные исследования еще 1980-е годы были сфокусированы на фитотоксичных свойствах различных форм оксидов азота и их неблагоприятное действие на металлосодержащие ферменты и на развитие растений в целом. Однако в скором времени было выяснено, что значительные количества NO и N_2O продуцируются незагрязненными почвенными и водными экосистемами, которые вносят основной вклад в процесс естественной деструкции озонового слоя. В 1990 году появилось первое сообщение о стимулирующем действии оксида азота на растительный организм: NO ускорял прорастание семян павловнии войлочной (*Paulownia tormentosa*). В настоящее время достоверно установлено, что оксид азота (II) широко используется в живой природе в качестве вторичного мессенджера — это соединение является компонентом сигнальных механизмов, контролирующих защитные реакции, процессы развития, пролиферацию клеток и многое другое.

Химические и антиоксидантные свойства NO

Оксид азота представляет собой свободно-радикальную липофильную двухатомную молекулу. Маленький радиус и электронейтральность позволяют молекуле NO эффективно диффундировать в клетке, а также проникать через мембраны.

Молекула NO имеет неспаренный электрон на π -разрыхляющей орбитали, что определяет ее свободно-радикальные свойства и реакционную способность. Удаление этого электрона приводит к образованию иона нитрозония (NO^+), а добавление одного электрона — к образованию нитроксиланиона (NO^-) (рис. 39). Наличие неспаренного электрона обеспечивает высокую скорость взаимодействия NO с молекулярным кислородом и супероксидом (O_2^-), производными азота и металлами с переходной валентностью $\text{Me}^{+/2+}$. В биологических системах при взаимодействии NO с молекулярным кислородом образуются другие оксиды с общей формулой NO_x . Взаимодействие NO с супероксидом (O_2^-) приводит к образованию пероксинитрита (ONOO^-), а при взаимодействии с металлами ($\text{Me}^{+/2+}$) — металл-NO производные. Стабильность или распад NO зависит от его концентрации, окислительно-восстановительного статуса системы и концентрации молекул-мишеней и металлов.

Реакционная способность NO лежит в основе NO-зависимых регуляторных механизмов, но вместе с тем, NO может влиять на окислительно-восстановительный гомеостаз клетки независимо от сигнальных механизмов. В зависимости от условий оксид азота NO может проявлять как антиоксидантные, так и токсичные свойства.

Реакция между перекисью водорода (H_2O_2) и ионами редокс-активных металлов часто приводит к образованию гидроксил-радикала (OH^\bullet). Это сильный окислитель, который способен окислять многие биомолекулы. Присутствие NO может ослабить окислительное повреждение, предотвращая формирование оксидантов, связывая железо и супероксиды, ограничивая, таким образом, формирование гидроксил-радикала. Было продемонстрировано, что NO задерживает также переокисление липидов. Цитозащитные свойства NO у растений наблюдаются при биотических и абиотических стрессах, в том числе

при фотоокислении. В ряде случаев, например, при фотоокислении листьев картофеля, или при гиббереллин-опосредованном повышении АФК в клетках алейронового слоя семян ячменя при прорастании, защитные свойства NO проявляются без активации антиоксидантных ферментов и кодирующих их генов. Однако в условиях окислительного стресса, при котором в клетке накапливается существенное количество АФК, активируются NO-опосредованные защитные системы.

NO может оказывать и токсичное действие. Главным образом это наблюдается при реакции NO с супероксид анионом (O_2^-), которая приводит к образованию сильного окислителя пероксинитрита ($ONOO^-$). Пероксинитрит может окислять тиольные группы до сульфоновых и сульфеновых кислот. Кроме того, пероксинитрит может нитрировать фенильную группу тирозиновых остатков. Это предотвращает фосфорилирование тирозина и нарушает функциональные свойства белков. Тем не менее, нитрирование тирозина широко используется для модуляции активности посредников в сигнальных системах.

Пути образования NO

В растительных клетках синтез NO осуществляется различными способами. К регулируемым процессам относятся ферментативные пути образования. Оксид азота NO образуется в тканях живых организмов из органических и неорганических субстратов. К субстратам NO-синтезирующих ферментов относятся нитраты, нитриты, аргинин и полиамины.

Нитрат/нитрит-зависимые ферментативные пути

Нитрат-редуктаза. Ферментативное образование NO у растений главным образом связано с активностью нитрат-редуктазы (NR). NR — растворимый цитозольный фермент, который играет ключевую роль в утилизации неорганического азота в форме нитратов. Нитрат-редуктаза участвует в восстановлении нитрат-анионов до нитритов:

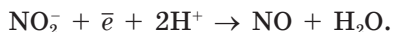


Нитриты не накапливаются в растительных тканях, а восстанавливаются в дальнейшем нитрит-редуктазой до аммоний-

ной формы, которая далее включается в состав органических соединений.

Нитрат-редуктаза является сложной редокс-системой с внутренней короткой цепью переноса электронов. Активная нитрат-редуктаза является гомодимером с массой около 200 кД. Каждая из субъединиц содержит три простетические группы: FAD, цитохром b и Мо-молибдоптерин. Катализ сопряжен с переносом пары электронов от NAD(P)H через FAD, гемовое железо и молибден на NO_3^- .

В 1979 году Л. Клеппером (L. Klepper) была обнаружена способность нитрат-редуктазы продуцировать NO. Однако выяснение особенностей катализа синтеза NO и значение этого процесса стало возможным значительно позже. Оказалось, что NR может восстановить NO_2^- (продукт нитрат-редуктазной реакции) до оксида азота (II). Реакция представляет собой одно-электронное восстановление нитрит-аниона (в качестве восстановителя выступает NAD(P)H):

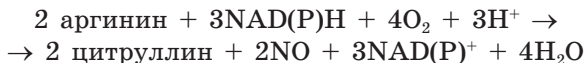


Эта активность фермента является контролируемым процессом и регулируется путем фосфорилирования. Нитрат-редуктаза обеспечивает базальный уровень NO во всех тканях растения и имеет важное значение для развития стрессовых реакций. Было показано, что у мутантных растений, не проявляющих нитрат-редуктазной активности, нарушен АБК-зависимый механизм закрывания устьиц. Из этого был сделан вывод, что NR-опосредованный синтез NO является важным этапом АБК-зависимой регуляции состояния замыкающих клеток устьиц.

Нитрит-NO редуктаза. В начале 2000-х годов у растений табака был обнаружен плазмалеммный фермент, который катализирует восстановление NO_2^- до NO исключительно в корневых тканях — нитрит-NO редуктаза (Ni-NOR). Активность этого фермента координируется с плазмалеммосвязанной нитрат-редуктазой: Ni-NOR восстанавливает нитрит-анионы, образованные нитрат-редуктазой. Этот путь синтеза может вовлекаться в механизмы развития, а также в ответ на недостаток кислорода и симбиотические взаимодействия.

Аргинин-зависимые пути синтеза

NO-синтаза. У млекопитающих образование NO катализируется, главным образом, NO-синтазой (NOS). Этот фермент является гем-содержащим белком, который содержит четыре простетические группы: железо-протопорфирин IX, тетрагидробиоптерин, FAD и FMN. Активный фермент NOS представляет собой гомодимер с молекулярной массой около 260 кД. Он катализирует пятиэлектронное окисление терминальной аминокислотной группы L-аргинина с участием молекулярного кислорода и образованием цитруллина и NO.



Активность некоторых изоформ NO-синтазы зависит от кальмодулина, связывание которого осуществляется через специфический сайт. В тканях человека NO-синтаза была обнаружена в трех основных изоформах: двух конститутивных и индуцибельной. Конститутивная форма NOS присутствует постоянно в нервной ткани (нейрональная NOS — nNOS) и эндотелии (эндотелиальная NOS — eNOS). Индуцибельная форма (iNOS) синтезируется при активации иммунной системы и играет центральную роль в развитии иммунного ответа. Конститутивные формы nNOS и eNOS являются Ca^{2+} -зависимыми, а индуцибельная форма iNOS — Ca^{2+} -независимая.

Анализ последовательности ДНК показал, что у растений нет белков, близких по структуре NO-синтазе млекопитающих. Хотя использование антител к NOS и специфических ингибиторов этого фермента позволяет предполагать наличие NOS-подобной активности в растительных тканях, утверждать о существовании NOS-подобного фермента у растений с полной уверенностью нельзя. Иммуноферментный и ингибиторный анализы, направленные на идентификацию NOS у растений могут дать положительные ответы в том случае, если антитела и ингибиторы связываются с ферментами, которые используют L-аргинин в качестве субстрата, и их активность косвенно связана с продукцией NO.

Поиск ферментов с NO-синтазной активностью был осуществлен среди белков, не гомологичных NOS млекопитающих,

но похожих на белки, вовлеченные в синтез NO у животных и организмов других таксономических групп. У *Arabidopsis* был клонирован ген *AtNOS1*, который кодирует митохондриальный фермент, сходный с белком, имеющим отношение к синтезу NO у брюхоногого моллюска *Helix pomatia*. Хотя генетический подход показал, что белок AtNOS1 является главным источником NO, это предположение не подтвердилось, и в настоящее время AtNOS1 рассматривается как митохондриальная GTPаза, которая участвует в биогенезе рибосом и/или синтезе белков и не имеет прямого отношения к синтезу NO.

Полиамин-зависимый путь образования. У растений есть ферменты, которые катализируют превращение L-аргинина и косвенным образом связаны с синтезом оксида азота. Например, у растений *Arabidopsis* полиамины спермин и спермидин вызывают значительное усиление продукции оксида азота, тогда как нарушение синтеза полиаминов отражается на снижении синтеза NO. Предполагают, что существует фермент, конвертирующий полиамины в NO. В то же время сами полиамины образуются из аргинина с участием аргинин-связывающих ферментов, таких как аргиназа или аргинин-декарбоксилаза. Поскольку аргиназа, аргинин-декарбоксилаза и NO-синтаза используют аргинин в качестве субстрата, они имеют частично сходные свойства. В частности, активность всех этих ферментов репрессируется структурными аналогами L-аргинина. Кроме того, они имеют определенное сходство в области реакционных центров, поэтому могут давать положительный ответ на применение одинаковых антител. Таким образом, попытка воздействовать в эксперименте на NOS-подобную активность растений приводит к модуляции активности ферментов полиамин-зависимого пути синтеза NO. Если у животных NO-синтаза обеспечивает прямую конвертацию аргинина в NO, то в полиамин-зависимом механизме из аргинина синтезируются полиамины, которые далее преобразуются в NO:



Считают, что полиамин-зависимый путь у растений обеспечивает существенную часть синтезируемого в растительных тканях NO.

Нитрит-зависимые неферментативные пути

В биологических системах NO может генерироваться неферментативным путем из нитритов. В растениях обнаружено несколько возможных способов химического восстановления NO_2^- до NO без участия ферментов:

- 1) в апопласте при низких значениях pH (эта реакция *in vitro* может катализироваться аскорбиновой кислотой);
- 2) при светозависимой конверсии каротиноидов в хлоропластах;
- 3) в митохондриях восстановление NO_2^- до NO может происходить при использовании электронов из электрон-транспортной цепи.

Неферментативные пути восстановления нитритов вносят определенный вклад в общее содержание NO, однако ведущими путями являются ферментативные механизмы образования.

NO-сигналинг

Оксид азота NO — уникальное низкомолекулярное соединение, обладающее свойствами классического вторичного мессенджера. NO является короткоживущей молекулой с низкой молекулярной массой, которая способна легко диффундировать в тканях, проникая в клетки через мембраны без участия специализированных переносчиков. Реакционная способность позволяет NO связываться со своими мишенями — сигнальными посредниками — и модулировать их активность. Важными посредниками передачи сигнала, наряду с NO, являются ион нитрозония (NO^+) и продукт взаимодействия NO с супероксидом (O_2^-) — пероксинитрит (ONOO^-).

Известно три основных механизма, посредством которых NO и его производные модулируют активность внутриклеточных мишеней (рис. 39).

1. **Нитрозилирование металлов.** NO комплексуется с металл-содержащими белками, непосредственно модулируя их активность;
2. **S-нитрозилирование цистеина.** Ион нитрозония (NO^+) формирует с тиоловыми группами цистеина S-нитрозо-тиол (RS-NO).

3. **Нитрирование тирозина.** Взаимодействие пероксинитрита (ONOO^-) с остатком тирозина приводит к нитрированию его ароматического кольца.

Нитрозилирование металлов

Впервые способность NO модулировать активность ферментов была показана в клетках гладкой мускулатуры млекопитающих на примере гуанилатциклазы. Цитоплазматическая гуанилатциклаза катализирует синтез циклического GMP (сGMP), который регулирует активность сGMP-зависимых мишеней, в том числе, киназ. Модуляция активности растворимой гуанилатциклазы млекопитающих осуществляется путем связывания NO с гемом. В результате образуется ферро-нитрозил-гемовый комплекс, который необходим для активации фермента. Гуанилатциклаза животных является гетеродимером, состоящим из субъединиц α и β . Обе субъединицы необходимы для проявления каталитической активности и имеют N-концевые регуляторные и C-концевые каталитические домены. В состав

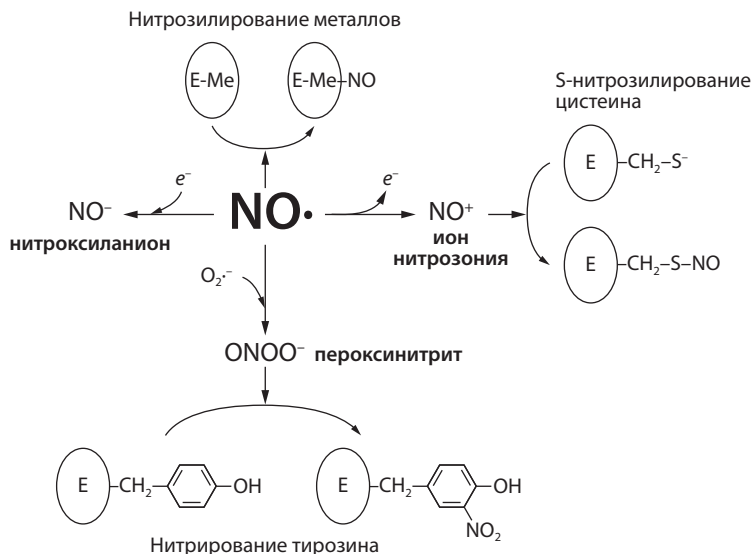


Рис. 39. Механизмы NO -сигналикации (по Besson-Bard et al., 2008 с изменениями)

регуляторных доменов субъединиц входит гемовая группа, нековалентно связанная с белком.

У растений не было обнаружено гомологов гуанилатциклаз, регулируемых оксидом азота, однако существует множество металлсодержащих, в том числе гем-содержащих, растительных ферментов, активность которых потенциально может регулироваться NO. Обнаружено, что оксид азота взаимодействует с липоксигеназами, митохондриальной и цитозольной аконитазами, каталазой, аскорбат-пероксидазой, цитохром с-оксидазой путем нитрозилирования металлов. Образование нитрозил-металл-ферментного комплекса приводит к инактивации указанных ферментов.

Инактивация цитохром с-оксидазы снижает интенсивность потока электронов через дыхательную цепь и, соответственно, ингибирует синтез АТФ в митохондриях. В данных условиях поток электронов может перераспределяться к альтернативным терминальным оксидазам. Функционирование альтернативных переносов электронов значительно снижает продукцию АТФ, но в то же время, существенно уменьшает риск образования активных форм кислорода.

Среди мишеней NO есть неферментативные белки. Например, в корневых клубеньках бобовых с оксидом азота взаимодействует симбиотический белок леггемоглобин (Lb) с образованием нитрозил-леггемоглобинового комплекса ($\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{NO}$). Леггемоглобин участвует в транспорте кислорода в бактериоиды, формируя обратимую форму оксилеггемоглобина ($\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$). При взаимодействии с кислородом может также образоваться ферриллеггемоглобин (LbFe^{IV}). Эти формы ($\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ и LbFe^{IV}) способны эффективно очищать цитозоль от NO и пероксинитрита (ONOO^-), формируя нитраты и LbFe^{III} . Форма LbFe^{III} эффективно преобразуется в $\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$. Считают, что эти реакции оказывают защитное действие на функционально активные клубеньки и участвуют в циклическом обращении $\text{Lb-Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$.

Некоторые несимбиотические гем-содержащие (Hb) белки способны конвертировать NO в нитрат NAD(P)H-зависимым способом. Снижение внутриклеточного уровня NO при различных стрессах является основной защитной функцией Hb-белки в адаптивных реакциях растений.

S-нитрозилирование цистеина

У растений идентифицировано значительное количество белков, которые подвергаются обратимому S-нитрозилированию. Эти белки вовлечены во множественные функции клеток: метаболизм, фотосинтез, регуляцию окислительно-восстановительного баланса, адаптивные реакции и др. Процесс S-нитрозилирования цистеина происходит спонтанно неферментативным путем, но не все остатки цистеина нитрозилируются в одинаковой степени. Для эффективного протекания реакции необходимо соответствующее аминокислотное окружение цистеина. Определенное расположение кислотных и основных мотивов может облегчать или, наоборот, затруднять нитрозилирование. Существует три возможных варианта:

- 1) S-нитрозилирование происходит конститутивно при фоновых концентрациях NO;
- 2) S-нитрозилирование происходит при повышенных концентрациях NO, то есть в результате индукции синтеза оксида азота;
- 3) S-нитрозилирование не происходит ни при каких условиях.

В зависимости от положения цистеина его нитрозилирование может по-разному отражаться на состоянии и активности белка.

Нитрозилирование является преимущественно обратимой модификацией, что позволяет использовать ее в механизмах передачи внутриклеточных сигналов. Денитрозилирование происходит в восстановительных условиях с участием глутатиона (GSH). При этом образуется нитрозоглутатион (GSNO), который затем окисляется нитрозоглутатион-редуктазой (GSNOR) до глутатион-дисульфида и иона аммония. Следует заметить, что при определенных условиях нитрозоглутатион может быть получен при взаимодействии NO с глутатионом, а потом использоваться как донор NO для нитрозилирования белков. Таким образом, нитрозилирование и денитрозилирование осуществляются спонтанно неферментативным путем, при этом смещение равновесия в сторону денитрозилирования в восстановительных условиях обеспечивается нитрозоглутатион-редуктазой, которая играет ключевую роль в выключении S-нитрозиол-опосредованного сигнала.

Существенность S-нитрозилирования в механизме регуляции активности была показана для ряда растительных белков.

Одним из объектов нитрозилирования является **метионин-аденозилтрансфераза (МАТ)** — фермент который катализирует синтез S-аденозилметионина. Это соединение используется как источник метильной группы в реакциях трансметилирования и является предшественником в биосинтезе этилена и полиаминов. У *Arabidopsis* обнаружено три изоформы метионин-аденозилтрансферазы (МАТ1–МАТ3). Активность МАТ1 в результате S-нитрозилирования снижается на 30%, а МАТ2 и МАТ3 практически не реагируют на NO. Показано, что у МАТ1 нитрозилируется цистеин-114, который располагается в непосредственной близости к субстрат-связывающему центру. Аналогичный остаток цистеина у МАТ2 и МАТ3 отсутствует. S-нитрозилирование МАТ1, по-видимому, является механизмом через который осуществляется взаимодействие между этиленовым и NO-сигналами.

Белок **метакаспаса 9** (*Arabidopsis thaliana* metacaspase 9 — AtMC9), принимающий участие в механизмах апоптоза, конститутивно нитрозилируется преимущественно по цистеину-147, расположенному в каталитическом домене. Эта ковалентная модификация поддерживает AtMC9 в неактивном состоянии. При активации апоптозного пути AtMC9 подвергается действию регуляторной протеазы. В результате частичного протеолиза конформация AtMC9 изменяется так, что другой цистеин-29 пространственно заменяет цистеин-147 в каталитическом центре. Цистеин-29 участвует в протеолитической реакции, катализируемой AtMC9, и при этом не подвергается нитрозилированию, которое не происходит в виду отсутствия соответствующих последовательностей, облегчающих нитрозилирование. Активация AtMC9 происходит однократно и необратимо, так как белок не может вернуться в исходное состояние.

Гликолитический фермент **3-фосфоглицеральдегид-дегидрогеназа (3ФГА-ДГ)** также подвергается S-нитрозилированию. Эта модификация провоцирует структурные изменения молекулы, которые приводят к инактивации фермента, а также повышают его способность к взаимодействию с другими белками. Мишени, с которыми взаимодействует S-нитрозилирован-

ная 3ФГА-ДГ, и значение этого механизма у растений не выяснено. Однако известно, что у млекопитающих нитрозилирование 3ФГА-ДГ, помимо инактивации этого фермента, стимулирует его связывание с убиквитинирующей лигазой Siah1. Это взаимодействие способствует переносу лигазы Siah1 в ядро, где она убиквитинирует ядерные мишени и стимулирует их деградацию, включая таким образом механизм апоптоза — программируемой гибели клеток.

Нитрирование тирозина

До недавнего времени нитрирование тирозина расценивали как признак окислительного стресса, который выражается в потере нитрированными белками своих функций. Кроме того, существуют данные о том, что нитрированные белки обладают повышенной чувствительностью к протеолизу. Мишени нитрирования и функциональное значение этой модификации у растений еще не выяснены. Однако сейчас продолжают накапливаться данные о том, что этот процесс имеет важное регуляторное значение. Помимо этого есть сведения об обратимости данной модификации. Все это позволяет со значительной долей уверенности предположить, что нитрирование остатков тирозина используется в природе как полноценный сигнальный механизм.

Связь NO и Ca^{2+} -сигналов

NO и Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути тесно взаимосвязаны между собой. Стимуляция синтеза NO приводит к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме за счет активации мембранных кальциевых каналов, локализованных в плазмалемме и внутренних мембранах, главным образом, в тонопласте и ЭПР. Существуют два основных механизма воздействия NO на кальциевые каналы:

- 1) прямой — путем нитрозилирования каналов;
- 2) косвенный — опосредованный вторичными мессенджерами циклическим гуанозинмонофосфатом (сGMP) и циклической аденозиндифосфатрибозой (сADPR).

Существует также обратная связь между NO и Ca^{2+} . Например, повышение цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} , вызванное активацией плазмалемного Ca^{2+} -канала CNGC2 под

действием элиситоров, приводит к усилению продукции NO. Способность ионов кальция стимулировать синтез NO представляет собой регуляторную положительную петлю, посредством которой NO контролирует свой собственный синтез.

3.2.3. Нуклеотидциклазные сигнальные системы

Сигнальные механизмы с участием циклических нуклеотидов функционируют у всех основных царств живых организмов. Однако формирование данной концепции заняло около полувека. О том, что циклический аденозинмонофосфат (сАМР) выполняет функции вторичного мессенджера в животных клетках, известно с конца 50-х годов двадцатого века после открытия Сазерленда 1957 года. Еще через десятилетие аналогичный вывод был сделан для прокариотов. Однако для растений длительное время не существовало никаких экспериментальных доказательств не только о функционировании нуклеотидциклазных сигнальных систем, но даже о присутствии в их тканях циклических нуклеотидов. По этой причине в 1970-х годах сложилось мнение, что у растений не синтезируются циклические нуклеотидмонофосфаты, в том числе сАМР, и не работают сигнальные системы с их участием. Основная причина этого — чрезвычайно низкие концентрации этих веществ у растений. Концентрация сАМР в растительных тканях составляет менее 20 пМ на 1 г сырой массы, тогда как у животных — более 250 пМ. Количество сGMP у растений, как правило, меньше в 20–30 раз, по сравнению с сАМР. Содержание циклических нуклеотидов существенно различается в разных тканях и органах растений. Кроме того, их концентрация может значительно варьировать под влиянием внешних воздействий. Например, в листьях *Arabidopsis thaliana* концентрация сGMP под действием авирулентного штамма *Pseudomonas syringae* повышалась с 0,4 до 1 пМ на 1 г сырой массы.

Обнаружить циклические нуклеотиды у растений стало возможным только благодаря усовершенствованию методов идентификации химических соединений. Исследования последних двух десятилетий позволяют заключить, что, несмотря

на низкие концентрации циклических нуклеотидмонофосфатов, у растений, как и у животных, функционируют нуклеотид-циклазные сигнальные системы. Показано, что с участием сАМР и сGMP осуществляется регуляция многих реакций растений, в том числе модуляция устьичной транспирации, ростовые реакции, защитные механизмы и др. Однако до настоящего момента сигнальные механизмы с участием циклических нуклеотидов у растений являются наименее изученными.

Аденилатциклазная система

Ферменты аденилатциклазной системы

Аденилатциклазы (АЦ) — это ферменты, катализирующие образование циклического АМР из АТР в присутствии ионов Mg^{2+} . В результате реакции отщепляется пиродифосфатная группа, а между α -фосфатом и гидроксилом 3-го атома углерода остатка рибозы образуется эфирная связь. Таким образом, продуктом реакции является 3'-5'-сАМР (рис. 40) и пиродифосфат.

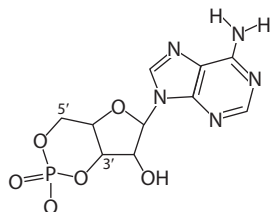


Рис. 40. Циклический аденозинмонофосфат (3'-5'-сАМР)



Образующийся вторичный мессенджер 3'-5'-сАМР чаще называют циклическим аденозинмонофосфатом или сАМР без указания положения гидроксильных групп, участвующих в образовании циклической фосфодиэфирной связи.

Расщепление сАМР осуществляется **фосфодиэстеразой (ФЭ)**. Этот фермент гидролизует циклическую фосфодиэфирную связь, в результате чего образуется АМР. В зависимости от того, какие изоформы ФЭ проявляют активность, могут образоваться две формы АМР с разным положением фосфорной группы: 5'-АМР или 3'-АМР.

Несмотря на то, что аденилатциклазы разных видов живых организмов катализируют одну и ту же реакцию, они имеют существенные различия в структуре и механизме регуляции. Причем значительные расхождения обнаруживаются даже по аминокислотной последовательности каталитических

доменов. Существует несколько классификаций АЦ на основе первичной структуры различных функциональных доменов этих ферментов и, главным образом, каталитических. Однако ни в одну из этих классификаций пока еще не включены растительные АЦ, поскольку сведения о них крайне ограничены.

Мембраносвязанные аденилатциклазы (мАЦ) млекопитающих представляют собой сложные интегральные белки гликопротеины с молекулярной массой 180–200 кД (1064–1248 аминокислотных остатков). Полипептидная цепь всех мембранных АЦ 12 раз пересекает мембрану, формируя два модуля, каждая из которых состоит из 6 трансмембранных доменов. На внешней стороне плазмалеммы находятся только небольшие междоменные полипептидные участки, которые частично гликозилированы олигосахаридными группами. С цитоплазматической стороны находятся короткий N-конец и значительно больший С-конец молекулы, а также большой фрагмент, расположенный между двумя 6-доменными трансмембранными структурами. Средний цитоплазматический фрагмент и С-терминальный участок полипептидной цепи АЦ формируют активный центр, включающий участок связывания АТР, а также регуляторный сайт, через который осуществляется взаимодействие фермента с α -субъединицей гетеротримерного G-белка. Предполагают, что каталитическая активность АЦ проявляется только у гомодимерной формы фермента.

Модуляция активности мАЦ млекопитающих осуществляется двумя типами G-белков: G_s и G_i . Эти белки различаются только α -субъединицами, способными ассоциировать с димером $\beta\gamma$ одного типа. G_s и G_i активируются разными сигналами и оказывают на АЦ противоположное воздействие. При наличии соответствующего стимула β -адренергические рецепторы активируют G_s -белок, а α_2 -адренергические — G_i -белок. В обоих случаях G-белки диссоциируют, а высвобожденные α -субъединицы взаимодействуют с мАЦ. Активация аденилатциклазы происходит вследствие образования комплекса с α -субъединицей G_s -белка, тогда как α -субъединица G_i -белка угнетает активность фермента.

В процессе модулирования активности мАЦ определенное значение приобретают $\beta\gamma$ -димеры, которые высвобождаются от соответствующих α -субъединиц. Считают, что свобод-

ные $\beta\gamma$ -комплексы связывают α -субъединицы G-белков другого типа, предотвращая их влияние на мАЦ.

В настоящее время у млекопитающих идентифицировано 9 изоформ АЦ. Они отличаются по чувствительности к ионам кальция и регулируются различными типами G-белков. В модуляции активности мАЦ могут участвовать α -субъединицы, $\beta\gamma$ -димеры, ионы Ca^{2+} , кальмодулин. Причем взаимодействие этих сигналов часто происходит с высокой степенью синергичности. В ряде случаев аденилатциклаза может работать как датчик совпадения, получая и интегрируя сигналы от двух разных рецепторов через G-белки или другие внутриклеточные сигнальные молекулы. При этом заметная активация (или репрессия) происходит в случае, если два рецептора различного класса активированы одновременно.

Активность мАЦ возбудимых клеток животных, например нейронов, может изменяться при флуктуации мембранного потенциала. Изменение заряда на мембране способствует смещению трансмембранных доменов относительно друг друга, что в конечном итоге отражается на активности фермента. В этом случае АЦ способна самостоятельно модулировать внутриклеточные сигналы в ответ на стимул без участия рецептора.

Значительное влияние на активность мАЦ оказывает ковалентная модификация путем фосфорилирования специфическими киназами. Фосфорилирование изменяет состояние АЦ таким образом, что она становится в большей (или меньшей) степени восприимчива к активации различными стимулами.

Растворимые аденилатциклазы (рАЦ) млекопитающих синтезируются в неактивной полноразмерной форме (около 190 кД), тогда как активный фермент представляет собой аминоконцевой фрагмент предшественника (менее 50 кД). В N-концевой части полноразмерной молекулы фермента локализуются два каталитических домена, а в карбокситерминальной области расположен автоингибиторный домен. Таким образом, в основе созревания рАЦ лежит протеолитический механизм. В отличие от мембранных АЦ, активация растворимых форм осуществляется без участия G-белков. Активность рАЦ существенно зависит от концентрации ионов Mn^{2+} и бикарбоната (HCO_3^-). Считают, что чувствительность к ионам HCO_3^- позволяет рАЦ

выполнять роль сенсора метаболической активности клетки, так как концентрация бикарбоната напрямую зависит от интенсивности энергетических окислительных процессов: конечным продуктом окисления является CO_2 , который конвертируется карбоангидразами в ионы бикарбоната.

Аденилатциклазы растений. Изоферментный состав аденилатциклаз растений не изучен, причем большинство данных об этих ферментах имеют косвенный характер. Некоторые ионы двухвалентных металлов оказывают различный, а иногда и противоположный эффект на аденилатциклазную активность, ассоциированную с мембранами в растительных тканях. Это указывает на присутствие у растений нескольких изоформ мембраносвязанной аденилатциклазы (мАЦ). Наличие растворимой формы (рАЦ) этого фермента многими исследователями ставится под сомнение. Вместе с тем, предполагается, что у растений функционирует аденилатциклаза слабо ассоциированная с клеточными органеллами и элементами цитоскелета. Эта форма, по-видимому, является поверхностным мембранным белком, который не имеет трансмембранных доменов.

Фосфодиэстеразы. Фосфодиэстеразы представляют большую группу ферментов, которые расщепляют циклические фосфодиэфиры. Отдельные изоформы ФЭ животных проявляют субстратную специфичность в отношении 3'5'-циклических нуклеотидмонофосфатов (сАМР, сГМР) или 2'3'-циклических нуклеотидов. Фосфодиэстеразы, расщепляющие сАМР и сГМР, функционируют в нуклеотидциклазных сигнальных системах, а ФЭ, специфичные к 2'3'-циклическим нуклеотидам, участвуют в деградации РНК.

Большинство растительных ФЭ обладают меньшей субстратной специфичностью, по сравнению с животными ферментами, и могут расщеплять не только 3'5'-циклофосфаты, но и 2'3'-циклические нуклеотиды. Кроме того, фосфодиэстеразы растений воздействуют на фосфодиэфирную связь с разных сторон относительно фосфорной группы, в результате чего образуется не один, а смесь продуктов реакции. Например, при расщеплении сАМР образуется смесь 5'-АМР и 3'-АМР. Соотношение этих продуктов зависит от изоформы ФЭ и условий, однако в большинстве случаев из двух возможных продуктов

преобладает 3'-АМР. При каталитическом действии животных фосфодиэстераз на сАМР или сGMP преимущественно образуются соответствующие 5'-моонуклеотиды.

Роль сАМР в регуляция активности протеинкиназы А животных

Протеинкиназы А — это серин/треониновые протеинкиназы, активность которых регулируется сАМР. В неактивном состоянии протеинкиназы А существуют в виде тетрамеров C_2R_2 , которые состоят из двух каталитических (С) и двух регуляторных (R) субъединиц (рис. 41). Регуляторные субъединицы образуют прочно связанный димер (R_2), который сохраняется при диссоциации тетрамера. Стабильность структуры тетрамера поддерживается за счет слабых взаимодействий между активным центром каталитических частиц и псевдосубстратными последовательностями регуляторных субъединиц. Псевдосубстратная последовательность (–RRGAI–) отличается от последовательности субстрата (–RRGSI–), в которой остаток серина подвергается фосфорилированию, наличием аланина (А) вместо серина (S). Каждая R-частица имеет два участка связывания сАМР. В результате присоединения 4-х молекул сАМР к двум регуляторным субъединицам, изменяется конформация последних, что приводит к высвобождению двух отдельных каталитических субъединиц.

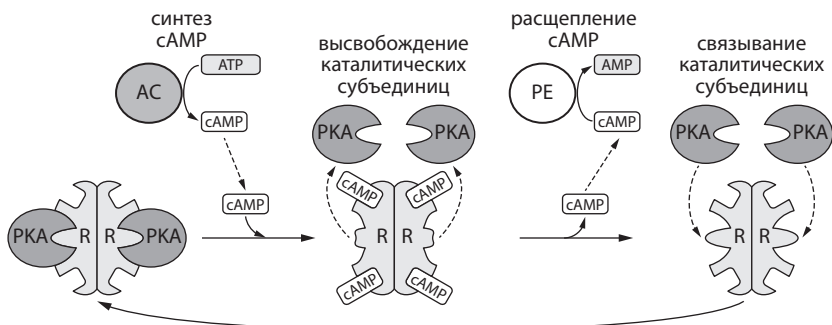


Рис. 41. Регуляция активности протеинкиназы А животных.

Условные обозначения:

PKA — каталитические субъединицы протеинкиназы А; R — регуляторные субъединицы протеинкиназы А; AC — аденилатциклаза; PE — фосфодиэстераза

Каталитически активные субъединицы С фосфорилируют белки, имеющие характерные последовательности, модулируя их активность. После диссоциации тетрамерного неактивного комплекса связь сАМР с регуляторными субъединицами ослабевает. Активность протеинкиназы А зависит от концентрации сАМР, а соответственно, и от соотношения активностей аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. При устранении внешнего стимула, который активирует синтез сАМР, содержание вторичного мессенджера снижается. Регуляторный димер при низкой концентрации сАМР связывает и инактивирует каталитические субъединицы.

Протеинкиназа А была выявлена у всех животных. Этот фермент выполняет важнейшие регуляторные функции, поскольку фосфорилирует многие цитоплазматические и ядерные белки, в том числе гистоны. Активация протеинкиназ А приводит к модуляции активности ферментов, транскрипционных и хроматиновых факторов. Таким образом, протеинкиназы А участвуют в регуляторных механизмах, контролирующих не только метаболическую активность клетки, но также экспрессию генов и процессы ремоделирования хроматина. Белки, гомологичные протеинкиназам А, у растений обнаружены не были.

Значение сАМР в регуляции активности катаболитных генов у бактерий

У гетеротрофных бактерий сАМР участвует в активации катаболитных генов, кодирующих белки, необходимые бактериям для утилизации альтернативных источников питания в условиях недостатка глюкозы. Экспрессия большинства оперонов, несущих катаболитные гены, контролируется посредством нескольких механизмов, одним из которых является позитивная индуцибельная регуляция с участием сАМР. В области промотора таких оперонов находится участок связывания особого регуляторного белка, который называют **белок, активирующий катаболитный ген** или **САР** (catabolite activator protein). САР обеспечивает дополнительные сайты связывания РНК-полимеразы с промотором оперона и является усиливающим фактором индукции экспрессии. Сродство САР с промотором зависит от концентрации сАМР в клетке. Повышение количества

сАМР способствует усилению взаимодействия CAP с промотором и, соответственно, активации экспрессии, и наоборот. Концентрация сАМР зависит от активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. Активность обоих ферментов аллостерически регулируется глюкозой (рис. 42). Аденилатциклаза ингибируется глюкозой, а фосфодиэстераза, наоборот, — активируется. Таким образом, если концентрация глюкозы достаточна для питания клетки, то активность аденилатциклазы низкая, а фосфодиэстеразы — высокая. Поэтому при наличии глюкозы в клетке поддерживается низкая концентрация сАМР. Снижение количества глюкозы приводит к противоположному эффекту: аденилатциклаза активируется, а фосфодиэстераза, наоборот, угнетается. В результате увеличивается концентрация сАМР, в присутствии которого CAP связывается с промотором и усиливает транскрипцию. Контроль активности катаболитных оперонов через CAP зависит от концентрации глюкозы в среде и в клетке. Так как у бактерий синтез сАМР активируется в условиях недостатка глюкозы в среде, эту регуляторную молекулу также называют «сигналом голода» бактерий.

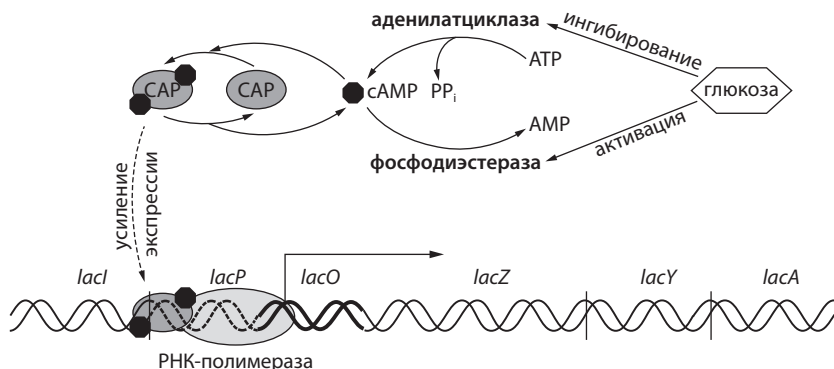


Рис. 42. Механизм позитивной индуцибельной регуляции катаболитных генов у бактерий с участием сАМР (на примере лактозного оперона). Условные обозначения:

CAP — белок, активирующий катаболитный ген; *lacI* — регуляторный ген, кодирующий ингибитор *lac*-оперона; *lacP* — промотор; *lacO* — оператор; *lacZ*, *lacY*, *lacA* — структурные гены, кодирующие соответственно β -галактозидазу, пермеазу и β -галактозилтранс ацетилазу

сАМР-регулируемые белки растений

В животных клетках основными мишенями сАМР являются протеинкиназы А и ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (cyclic nucleotide-gated channels — CNGCs), поэтому была предпринята попытка поиска подобных белков у растений. Протеинкиназа А-подобные ферменты, активность которых регулируется циклическими нуклеотидами, у растений не были обнаружены. Поиск таких киназ проводился биоинформационными методами (по наличию последовательностей, гомологичных последовательностям протеинкиназы А животных), и биохимическими с использованием субстратов, характерных для киназ млекопитающих. Нельзя исключать возможность, что у растений сАМР-регулируемые протеинкиназы обладают низкой гомологией к аналогичным ферментам животных и проявляют специфичность к иному субстрату. Таким образом, несмотря на отсутствие у растений протеинкиназы А, вопрос о том, участвуют ли сАМР-регулируемые протеинкиназы в сигнальных механизмах растений, остается открытым.

Ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGCs), у растений были обнаружены, причем доказано их участие и в трансдукционных механизмах.

CNGC растений. Первый ионный канал, который был охарактеризован у растений как канал, открываемый циклическими нуклеотидами, был AtCNGC2. Это K^+ -канал, который способен проводить ионы K^+ и другие моновалентные катионы, за исключением Na^+ . Интенсивность трансмембранного потока ионов через этот канал прямо зависит от сАМР. Однако на активность AtCNGC2 влияют не только сАМР, но и ионы кальция: микромолярные концентрации Ca^{2+} блокируют AtCNGC2.

В настоящее время у *Arabidopsis* более 20 белков рассматриваются как представители семейства CNGC. Среди них есть каналы, специализирующиеся на транспорте моновалентных или двухвалентных катионов. Предположительно, молекулы CNGC шесть раз пересекают мембрану (домены S1–S6), причем концевые участки локализуются с цитоплазматической стороны мембраны. Между трансмембранными доменами S5 и S6 находится поровый домен (P-loop). На карбокситерминальном участке молекулы располагаются циклический нуклеотид-свя-

зывающий (CNB) и Ca^{2+} -кальмодулин-связывающий (CaMB) домены, которые частично перекрываются. Вероятно, присоединение Ca^{2+} -кальмодулина к CNGC предотвращает его активацию циклическим AMP. CNG-каналы растений и животных имеют высокую степень гомологии. Однако в молекуле CNGC животных CaMB-домен находится в аминотерминальной области молекулы. Функциональные CNGC животных являются гетеротетрамерами. Структура функционально активных CNG-каналов у растений неизвестна, однако наличие в геноме растений большого семейства генов, кодирующих различные CNGC, позволяет предположить, что растительные CNGC также формируют гетеромеры.

CNGC принимают участие в защитных механизмах, работе транспирационного аппарата, росте пыльцевой трубки, светочувствительности и других реакциях растений. Окончательно физиологическая роль CNGC растений не установлена, однако предполагается, что общая функция этих каналов заключается в повышении уровня ионов кальция в клетке.

Среди CNGC растений особый интерес вызывают Ca^{2+} -специфичные каналы. Эти каналы участвуют в преобразовании сигнала cAMP (концентрационного) в кальциевый сигнал в виде осцилляций цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , поэтому cAMP-зависимый сигнальный механизм растений может полноценно работать без участия киназ. Модуляция активности K^{+} -проводящих CNGC циклическими нуклеотидами чрезвычайно важна для регуляции осмотических механизмов, в том числе, устьичной транспирации.

Гуанилатциклазы и cGMP

Циклический гуанозинмонофосфат (рис. 43) — вторичный мессенджер, который регулирует значительное количество разнообразных функций в клетках растительного организма. С участием cGMP осуществляется трансдукция сигналов внутри клетки в ответ на воздействие гор-

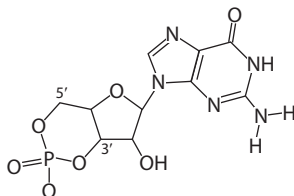


Рис. 43. Циклический гуанозинмонофосфат (3'-5'-cAMP)

монов и внешних стимулов, развиваются стрессовые реакции, контролируется активность ионных каналов, а также регулируется уровень транскрипции. Показано, что cGMP имеет существенное значение в механизмах патогенеза. Например, при воздействии патогенных микроорганизмов cGMP является критически важным для стимуляции экспрессии генов, кодирующих фенилаланин-аммоний лиазу и PR-белки (pathogenesis-related proteins).

Синтез cGMP из GTP катализируется гуанилатциклазами. У животных известно два класса этих ферментов: мембраносвязанные и растворимые (цитоплазматические). **Мембраносвязанные гуанилатциклазы** один раз пересекают мембрану и включают один циклазный домен с цитоплазматической стороны молекулы. Мембраносвязанные формы гуанилатциклаза обладают свойствами рецепторов, то есть их каталитическая активность модулируется при связывании лиганда (экстраклеточный домен связывает пептидные регуляторы). Как большинство рецепторных молекул, имеющих один трансмембранный домен, мембраносвязанные гуанилатциклазы приобретают функциональную активность в димерном состоянии. В состав димера входят две одинаковые субъединицы. **Растворимые гуанилатциклазы** — это гетеродимеры, состоящие из двух различных субъединиц. Гем-содержащие редокс-центры растворимых гуанилатциклаза связывают NO, который является специфическим активатором этого фермента. Молекулярными мишенями cGMP у животных являются cGMP-зависимые протеинкиназы (протеинкиназы G) и ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGCs).

У высших растений экспериментально доказано существование двух белков с гуанилатциклазной активностью, принадлежащих к разным классам. Оба белка были идентифицированы у *Arabidopsis*. **Растворимая гуанилатциклаза растений**, в отличие от животного фермента, не чувствительна к NO. В аминотерминальной области молекулы расположен каталитический гуанилилциклазный домен, а в карбокситерминальной — цистеин протеаза-подобный домен. Сочетание этих двух доменов является уникальным для растительной растворимой гуанилатциклазы, и ранее не было обнаружено у других бел-

ков. **Мембраносвязанная гуанилатциклаза** *Arabidopsis* является рецептором брассинолида AtBRI1 и имеет в цитоплазматической области молекулы гуанилатциклазный домен. Растительные ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGCs), регулируются циклическим GMP. Другие молекулярные мишени cGMP не идентифицированы.

3.3. ИОНЫ КАЛЬЦИЯ В СИСТЕМЕ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Ионы Ca^{2+} выполняют важнейшую регуляторную роль в клетках: они контролируют модуляцию активности ферментов, стабилизируют клеточные структуры, активируют сборку элементов цитоскелета и т. д. Вместе с этим, ионы Ca^{2+} являются одними из ключевых внутриклеточных сигнальных посредников, выполняющих функции вторичных мессенджеров.

Клетки всех известных организмов способны поддерживать мембранный градиент концентраций ионов Ca^{2+} . Уровень концентрации свободного кальция в цитоплазме нестимулированных клеток обычно составляет 10^{-7} – 10^{-6} М. В двумембранных органеллах (митохондриях, пластидах) и люмене эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток поддерживается более высокая концентрация этого иона. В растительных клетках значительные его количества накапливаются в вакуолях. Содержание кальция в межклеточном пространстве превышает его концентрацию в цитоплазме на несколько порядков и может достигать 10^{-3} М, как, например, в апопласте растений. Поддержание градиента концентраций ионов Ca^{2+} чрезвычайно важно для функционирования клетки, поскольку длительное повышение уровня кальция в цитозоле приводит к ее гибели.

Эволюционный выбор ионов кальция для выполнения сигнальной функции связывают с тем, что первоначально живые клетки научились избавляться от них, поскольку кальций как щелочноземельный металл способен взаимодействовать с фосфатами с образованием нерастворимых солей. Фосфаты необходимы клетке для синтеза нуклеиновых кислот, фосфолипидов, макроэргических соединений и др. Соответственно, высокие

концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме могут привести к значительному снижению концентрации растворимых фосфатов, что, в свою очередь, привело бы к нарушению как энергетического обмена клетки, так и ее деятельности в целом.

В определенных условиях под воздействием внешних факторов провоцируется деполяризация мембраны, которая сопровождается кратковременным повышением концентрации ионов кальция. Это событие является своеобразным сигналом тревоги для клетки, поэтому в процессе эволюции возникли регуляторные системы, функционирование которых непосредственно зависит от флуктуации внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Макромолекулы, способные специфически связывать ионы Ca^{2+} , были приспособлены для выполнения функций внутриклеточных кальциевых рецепторов. Большинство Ca^{2+} -регулируемых процессов в клетках происходит при кратковременных изменениях цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} в диапазоне 10^{-7} – 10^{-5} М.

Таким образом, эволюционно первыми возникли системы, удаляющие ионы кальция из цитоплазмы, а следующим этапом было возникновение сигнальных клеточных систем, использующих ионы Ca^{2+} в качестве вторичных мессенджеров. В процессе формирования кальциевой сигнальной системы, совершенствовались также способы индуцированного поступления кальция в цитоплазму.

Эффективная работа Ca^{2+} -зависимого сигнального механизма возможна в том случае, если в клетке работают три основных функциональных модуля.

- 1) Системы активного транспорта Ca^{2+} , направленного из цитоплазмы в экстраклеточное пространство, ЭПР, митохондрии и вакуоль. Энергозависимые переносчики Ca^{2+} располагаются в мембранах, отделяющих цитоплазму от данных компартментов.
- 2) Системы индуцированного поступления кальция в цитоплазму: кальциевые каналы, через которые ионы Ca^{2+} в определенных условиях проникают в цитоплазму по градиенту концентраций.
- 3) Цитоплазматические компоненты сигнальных цепей (ферменты, ионные каналы, каталитически неактивные сигналь-

ные посредники, транскрипционные регуляторы и другие функциональные молекулы), активность которых модулируется при изменении концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме.

Модуляция активности Ca^{2+} -транспортеров под влиянием конкретных стимулов приводит к изменениям цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , которые следует рассматривать не как односторонне направленные изменения концентрации, а как **осцилляции** — повторяющиеся флуктуации, имеющие определенную регулярность, которая характеризуется частотой, амплитудой и формой (рис. 44). Форма осцилляционной кривой зависит от скорости изменений, которые могут быть плавными и скачкообразными. Кривая может приобретать форму синусоиды с плавными или заостренными экстремумами или квадратной волны. Специфическое воздействие определенной силы кодируется в виде кальциевых осцилляций, которые затем декодируются цитоплазматическими сигнальными компонентами, что в конечном итоге выражается в изменении функциональной активности клетки.

3.3.1. Структура Ca^{2+} -связывающих белков

Для эффективного связывания и удержания ионов Ca^{2+} необходимо наличие в структуре белка системы, которая позволяет образовать с ионом от 6 до 8 координационных связей определенной длины. Кроме того, данная структура должна обладать высокой подвижностью, чтобы иметь возможность

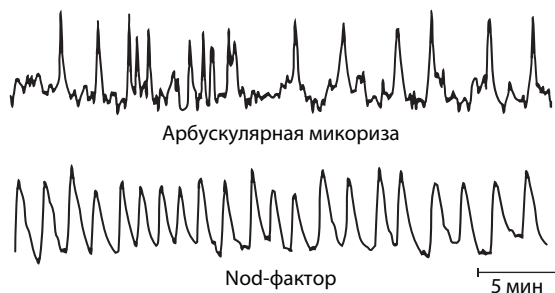


Рис. 44. Кривые кальциевых осцилляций, наблюдаемые при действии арбускулярной микоризы и NOD-фактора (по Kosuta S. et al., 2008)

захватывать ион Ca^{2+} , окружая его со всех сторон, полностью изолируя от молекул воды. Такой структурой обладают Ca^{2+} -связывающие центры белков, которые также называют ЕF-руками.

ЕF-рука является обязательным модулем Ca^{2+} -связывающих белков. Этот участок имеет вид спираль–петля–спираль (рис. 45-А). Полипептидная цепочка петли ЕF-руки состоит из 12 аминокислотных остатков. Она оборачивается вокруг иона кальция, образуя практически правильный октаэдр, на шести вершинах которого находятся аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании ионов кальция через кислородсодержащие группы (рис. 45-Б). Таким образом, устанавливается 6 координационных связей. Сродство каждого индивидуального Ca^{2+} -связывающего сайта составляет 10^{-6} – 10^{-5} М.

Высокая подвижность ЕF-руки позволяет не только эффективно связывать ионы Ca^{2+} , но и избавляться от них при снижении цитоплазматического уровня кальция. Лабильность структуры — это важное свойство, необходимое для выполнения белком регуляторных функций, но с другой стороны, яв-

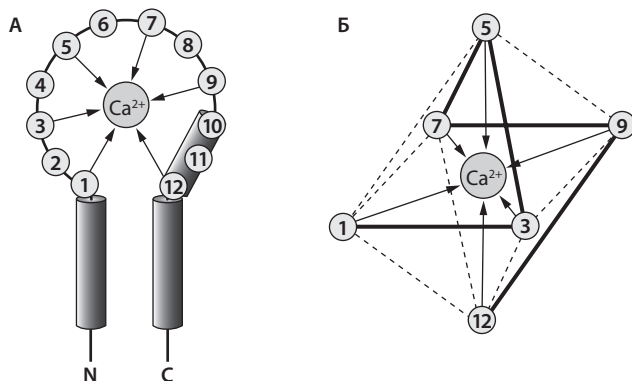


Рис. 45. Схема строения ЕF-руки (по Гусев Н. Б., 1998 с изменениями). А — двухмерная схема. Номерами (1–12) обозначены аминокислоты, формирующие петлю. Стрелки указаны у аминокислотных остатков, участвующих в образовании координационных связей с ионом Ca^{2+} . Б — пространственное расположение аминокислот, взаимодействующих с ионом Ca^{2+} . Сплошной линией показан ход полипептидной цепи, прерывистыми линиями дорисован тетраэдр, форму которого приобретает Ca^{2+} -связывающая петля

ляется фактором его нестабильности. Эта проблема частично решается за счет особенности структуры Ca^{2+} -связывающих участков молекулы: ЕF-руки формируются попарно на одном участке полипептидной цепи (рис. 46). Парные Ca^{2+} -связывающие центры взаимодействуют друг с другом и, не теряя подвижности, способствуют взаимной стабилизации. По этой причине большинство Ca^{2+} -связывающих белков содержат парное количество ЕF-рук (от 2 до 6). При этом существуют также Ca^{2+} -связывающие белки с нечетным количеством ЕF-рук. Однако следует уточнить, что у таких белков нечетное количество функционально активных Ca^{2+} -связывающих центров, однако физически присутствует четное количество ЕF-рук. Одна из ЕF-рук может нести мутацию, которая не позволяет ей выполнять Ca^{2+} -связывающие функции, но при этом она стабилизирует структуру парной функционально активной ЕF-руки.

Наиболее простым Ca^{2+} -связывающим белком является низкомолекулярный белок кишечника млекопитающих — **кальбиндин** (рис. 47-А). Полипептидная цепь молекулы кальбин-

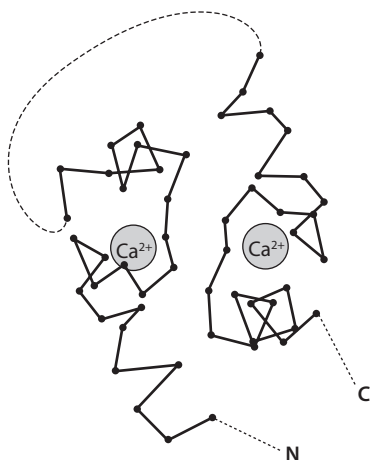


Рис. 46. Взаимное расположение парных Ca^{2+} -связывающих центров в молекуле Ca^{2+} -связывающего белка (по Пермяков Е. А., 1993 с изменениями)

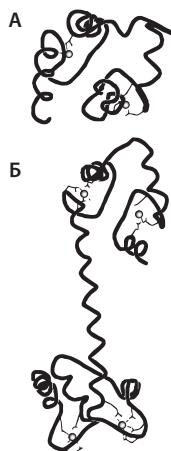


Рис. 47. Структура Ca^{2+} -связывающих белков (по Kawasaki H., Kretsinger R., 1994).
А — кальбиндин;
Б — кальмодулин

дина формирует лишь две EF-руки, то есть является, по сути, минимальным Ca^{2+} -связывающим модулем. Кальбиндин имеет значение в связывании и удержании кальция. Регуляторной функцией он не обладает. При связывании кальция существенных изменений в пространственной структуре молекулы кальбиндина не наблюдается.

Самый распространенный в природе Ca^{2+} -связывающий регуляторный белок — это **кальмодулин (CAM)** — низкомолекулярный белок с молекулярной массой 18 кД. Содержание белка кальмодулина в клетке достаточно высокое. В типичной животной клетке оно составляет около 1% от общей массы клеточного белка (более 10^7 молекул). Кальмодулин представляет собой консервативный одиночный полипептид, состоящий примерно из 150 аминокислотных остатков. Его структура сформирована преимущественно α -спиральными участками. Пространственная структура белка по форме напоминает гантель (рис. 47-Б). На N- и C-концевых участках молекулы находятся по два Ca^{2+} -связывающих центра, представленных EF-руками. Срединная часть молекулы сформирована центральной α -спиралью, имеющей отрицательно заряженные аминокислотные остатки. Кальмодулин присутствует практически во всех клетках животных, растений и грибов, функционируя в них как многоцелевой внутриклеточный рецептор ионов Ca^{2+} . Комплекс Ca^{2+} –кальмодулин (Ca^{2+} /CAM) не обладает ферментативной активностью, он выполняет роль аллостерического регулятора, который участвует в большинстве процессов, регулируемых ионами Ca^{2+} . Этот белок модулирует активность множества различных ферментов, например протеинкиназ, ферментов, участвующих в образовании и разрушении циклических нуклеотидов (нуклеотидциклаз, фосфодиэстераз) и других энзимов, а также транскрипционных факторов. В некоторых случаях кальмодулин всегда связан со своей мишенью, являясь постоянной регуляторной субъединицей ряда ферментных комплексов, например, киназы фосфоорилазы млекопитающих. С кальмодулином связана регуляция активности белков цитоскелета, а следовательно, процессы экзо- и эндоцитоза. Внутриклеточное движение также зависит от уровня кальцинирования кальмодулина.

3.3.2. Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал

Экстраклеточный транспорт кальция

Ионы кальция выводятся из цитозоля против градиента концентраций, поэтому этот процесс требует затраты энергии. Существуют транспортеры кальция, активность которых зависит от энергии гидролиза АТФ, — Ca^{2+} -АТРазы. Другие транспортеры используют протон-движущую силу — энергию электрохимического градиента концентраций ионов H^+ .

Ca^{2+} -АТРазы

АТФ-зависимый транспорт Ca^{2+} через мембраны осуществляется АТФазами Р-типа класса Р2. Ca^{2+} -АТРазы называют также кальциевыми помпами или насосами. По структуре и механизму активации они делятся на 2 группы:

- 1) группа **P2A** — Ca^{2+} -АТРазы ER-типа (endoplasmic reticulum-type Ca^{2+} -ATPases — **ECA**);
- 2) группа **P2B** — автоингибируемые Ca^{2+} -АТРазы (autoinhibited Ca^{2+} -ATPases — **ACA**).

Между двумя группами Ca^{2+} -АТРАЗ обнаруживаются два основных отличия.

Первое отличие связано с особенностями регуляции переносчиков. Активность Ca^{2+} -АТРАЗ ECA-типа не зависит от кальмодулина, тогда как АТРАЗы ACA-типа являются кальмодулин-зависимыми. В аминотерминальном цитоплазматическом районе молекулы ACA транспортера находится участок связывания кальцинированного кальмодулина (Ca^{2+} /CAM).

Второе отличие — функциональное. ER-АТРазы обеспечивают доставку ионов Ca^{2+} во внутриклеточные компарменты, главным образом, в эндоплазматический ретикулум. Попадая в эндомембранную систему, ионы Ca^{2+} в дальнейшем включаются в состав секрета и выводятся в межклеточное пространство, например, в виде пектинатов кальция — компонентов матрикса клеточной стенки. Кроме того, в люмене различных эндомембранных образований ионы кальция используются также

в качестве кофактора, необходимого для регуляции активности ферментов. Автоингибируемые Ca^{2+} -АТРАЗы выполняют в клетках ключевую сигнальную роль. Это связано с тем, что их активность в значительно большей степени изменяется под воздействием внешних факторов, по сравнению с переносчиками ER-типа. Соответственно, автоингибируемые Ca^{2+} -АТРАЗы вносят более существенный вклад в формирование внутрицитоплазматических кальциевых осцилляций.

В геноме *Arabidopsis* кодируется 10 автоингибируемых Ca^{2+} -АТРАЗ. Отдельные изоформы АСА селективно экспрессируются в различных условиях. Например, синтез АСА12 и АСА13 стимулируется патогенами, АСА8 и АСА10 — холодным воздействием, а АСА8 и АСА9 появляются в ответ на обработку АБК.

Автоингибируемые Ca^{2+} -АТРАЗы обнаруживаются в различных клеточных мембранах, но каждая изоформа, как правило, тяготеет к определенному типу мембраны. Так, АСА8, АСА9 и АСА10 локализуются в плазмалемме, АСА2 — в ЭПР, а АСА4 и АСА11 — в тонопласте.

Активность Ca^{2+} -АТРАЗ группы P2B модулируется различными способами. Помимо кальмодулина, многие АСА регулируются кислыми фосфолипидами, например, фосфатидной кислотой, которая образуется в результате гидролиза мембранных фосфолипидов фосфолипазой D, а локализованная в ЭПР АСА2 регулируется путем фосфорилирования.

Механизм переноса. В процессе переноса ионов Ca^{2+} -АТРАЗы претерпевают ряд структурных изменений, влияющих на сродство с ионами Ca^{2+} и АТР. Изменения происходят последовательно и повторяются циклически.

- 1) Ca^{2+} -АТРАза связывает два иона кальция (все Ca^{2+} -АТРАЗы имеют один типичный Ca^{2+} -связывающий домен, включающий две ЕF-руки).
- 2) Связывание ионов кальция способствует повышению сродства АТРАЗы к АТР. Молекулы АТР связываются в виде комплекса с ионами Mg^{2+} .
- 3) Осуществляется автофосфорилирование переносчика — γ -фосфатная группа АТР переносится на остаток аспарагиновой кислоты.

- 4) Фосфорилирование стимулирует конформационные изменения молекулы АТРаза, в результате которых связанные ионы Ca^{2+} переносятся с цитоплазматической стороны на экстраклеточную сторону мембраны.
- 5) В результате изменения конформации молекулы снижается сродство АТРаза к ионам Ca^{2+} , которые высвобождаются во внеклеточное пространство.
- 6) Фосфатная группа отщепляется от остатка аспарагиновой кислоты.
- 7) Дефосфорилированная и декальцинированная молекула Ca^{2+} -АТРаза принимает исходную конформацию.

$\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортеры

На всех мембранах растительных клеток поддерживается электрохимический градиент протонов. Этот градиент создается H^{+} -АТРазами Р-типа и может использоваться для энергетического обеспечения трансмембранных процессов. Транспорт ионов Ca^{2+} осуществляется $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортерами, которые называют катионными обменниками (cation exchanger — САХ). У *Arabidopsis* выявлено 6 таких транспортеров.

Молекулы САХ имеют предположительно 11 трансмембранных доменов. Из шести САХ, обнаруженных у *Arabidopsis*, наиболее значимую роль в поддержании кальциевого гомеостаза выполняют САХ1 и САХ3.

Антипортеры САХ регулируются подобно кальциевым насосам через автоингибиторный аминотерминальный домен.

Индукцированное поступление кальция в цитоплазму

Ионы Ca^{2+} проникают в цитоплазму по градиенту концентраций через селективные Ca^{2+} -каналы. В нестимулированных условиях каналы находятся в неактивном состоянии и не пропускают ионы Ca^{2+} . В структуре ионных каналов выделяют автоингибиторный участок, который запирает канал. При получении соответствующего сигнала конформация молекулы переносчика изменяется, в результате чего формируются мгновенные ионоселективные поры, через которые ионы Ca^{2+} проникают через мембрану по градиенту концентраций.

Существует значительное количество Ca^{2+} -каналов, различающихся по структуре, способу активации и локализации. Многие из них являются функционально неоднозначными и активируются разными стимулами. Например, при холодовой обработке активируются тонопластные Ca^{2+} -каналы, активные формы кислорода задействуют плазмалеммные каналы, а в корневых волосках бобовых растений Nod-факторы провоцируют мобилизацию кальция из перинуклеарного района эндоплазматического ретикулума.

Потенциал-управляемые каналы

Потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы (Voltage-Gated Ca^{2+} -Channel — VGCC) активируются при изменении мембранного потенциала. В структуру каналов этого типа включены один или несколько сенсорных доменов, которые несут заряженные аминокислотные остатки, благодаря чему способны реагировать на изменение мембранного потенциала. Количество и расположение зарядов на сенсорных доменах определяют «настройку» канала, то есть его чувствительность на определенные изменения трансмембранного потенциала. Изменения потенциала вызывают сдвиг сенсорных доменов, что приводит к модификации пространственной структуры молекулы и открытию (или закрытию) канала. Потенциал-управляемые каналы делят на две основные группы: каналы одной группы активируются при деполяризации мембраны, а второй — при гиперполяризации.

Лиганд-управляемые каналы

Лиганд-управляемые Ca^{2+} -каналы (Ligand-Gated Ca^{2+} -Channel — LGCC) обладают свойствами рецепторов-каналоформеров. Они связывают лиганд определенного типа и формируют при этом кальциевый канал, по которому ионы кальция устремляются в цитоплазму. В растительных клетках предполагается наличие в тонопласте и эндоплазматических мембранах Ca^{2+} -каналов, регулируемых инозитол-1,4,5-трифосфатом (IP_3) и циклической аденозиндифосфат-рибозой (cADPR). Однако физически эти каналы не выделены. Данные структуры идентифицированы и изучены у животных. Как показал геномный анализ, у растений нет гомологов рецепторов IP_3 и cADPR животных.

Вместе с тем, существование принципиально различных структур, выполняющих сходные функции у разных групп организмов, отрицать нельзя.

Рецептор IP_3 животных. У животных IP_3 -рецептор локализуется на мембранах эндоплазматического ретикулума в виде гомотетрамера. Вторичный посредник инозитолтрифосфат (IP_3) образуется в результате расщепления фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата фосфолипазой C. Связываясь с IP_3 -рецептором, IP_3 стимулирует открывание Ca^{2+} -проводящего канала и способствует мобилизации Ca^{2+} из ЭПР. С-концевая часть молекулы образует шесть трансмембранных доменов, которые участвуют в образовании канала. N-концевая область молекулы обращена в сторону цитоплазмы. В них расположены сайты связывания IP_3 , Ca^{2+} и АТР, а также два сериновых остатка, которые фосфорилируются протеинкиназами PKA и PKG. Карбокси-терминальный участок молекулы ориентирован в сторону цитозоля и вовлекается в контроль открывания канала. Повышение концентрации IP_3 в цитоплазме приводит к его связыванию с рецептором. В большинстве клеток млекопитающих IP_3 -рецептор активируется при концентрации IP_3 порядка 0,1–2 мкМ. Выход Ca^{2+} через ионные каналы сопровождается противотоком ионов K^+ из цитоплазмы. Благодаря этому компенсируется вынос заряда в цитоплазму, то есть снимается электрогенный эффект.

Точный механизм мобилизации кальция с участием инозитолфосфатов у растений невыяснен. Известно, что у растений, помимо IP_3 , во внутриклеточной передаче сигнала используются и другие формы фосфорилированного инозитола — инозитол-пентакисфосфат (IP_5) и инозитол-гексакисфосфат (IP_6) (см. выше раздел «PI-PLC-опосредованный сигналинг»). При этом IP_3 также стимулирует мобилизацию внутриклеточных запасов кальция, однако IP_6 оказывает более сильное действие. Также неизвестно, используется ли какая-либо форма инозитолфосфата в качестве непосредственного регулятора активности кальциевых каналов или регуляция осуществляется опосредовано через иные регуляторы.

Ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами (Cyclic Nucleotide-Gated Channels — CNGC) представляют группу каналоформеров, связывающих циклические нуклеотид-

монофосфаты (сAMP и сGMP). В геноме *Arabidopsis* кодируется 20 подобных каналов. Они имеют шесть трансмембранных доменов и поровый домен. В мембранах они образуют тетрамерные структуры, которые необходимы для формирования канала. Ряд растительных CNGC представляют собой Ca^{2+} -каналы, но некоторые из них проницаемы также для моновалентных ионов.

Кроме циклических нуклеотидмонофосфатов растительные CNGC связывают также кальмодулин. Все известные CNGC локализируются в плазматической мембране.

Глутамат-рецептор-подобные Ca^{2+} -каналы растений являются гомологами ионотропных рецепторов глутамата (Glutamate Receptor — GLR). В *Arabidopsis* семейство генов *GLR* включает 20 членов. Продукты генов предположительно имеют три трансмембранных домена и объединяются в мембранах в тетра- и пентамерные структуры.

Двупоровые Ca^{2+} -каналы. У *Arabidopsis* обнаружен ген *TPC1*, кодирующий единственный представитель семейства двупоровых каналов (Two-Pore Channel — TPC). Предположительно молекула TPC1 имеет 12 трансмембранных доменов (TMD) и включает два поровых домена. TPC1 локализуется в тонопласте, в котором, по-видимому, присутствует в виде гомодимера. Цитозольная петля между TMD6 и TMD7 формирует кальций-связывающий центр (EF-рука) и домен связывания регуляторного белка 14-3-3. TMD4 и TMD10, имеющие положительно заряженные аминокислотные остатки, функционируют в качестве сенсорных доменов, реагирующих на изменения мембранного потенциала. Таким образом, TPC1 является не только Ca^{2+} -индуцируемым каналом, но и потенциал-управляемым.

3.3.3. Декодирование Ca^{2+} -сигнала

Изменение концентрации кальция в клетке отслеживается Ca^{2+} -сенсорными белками. В клетках присутствует значительное количество Ca^{2+} -связывающих белков, обладающих разной способностью связывать ионы Ca^{2+} , имеющих различную клеточную локализацию, и взаимодействующих с определенными даунстрим сигнальными партнерами. Это позволяет клетке диф-

ференцированно реагировать на специфические внешние воздействия разной интенсивности.

Активация кальмодулин-зависимых белков

При низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме в молекуле кальмодулина α -спирали, фланкирующие петли EF-руки, располагаются практически параллельно центральной α -спирали. В таком состоянии гидрофобные участки терминальных доменов молекулы кальмодулина оказываются закрытыми, поскольку они прижаты к центральной α -спирали (рис. 48-А). Это делает невозможным взаимодействие этого белка с его мишенями.

Когда клетка получает внешний сигнал, стимулирующий повышение концентрации кальция в цитоплазме, кальмодулин связывает 4 иона Ca^{2+} . Это сопровождается конформационными изменениями: α -спирали EF-рук отдаляются от центральной α -спирали, принимая относительно нее перпендикулярное положение. Таким образом, молекула кальмодулина разворачивается (рис. 48-Б). В результате этого высвобождается центральная α -спираль и гидрофобные районы терминальных доменов, необходимых для взаимодействия кальмодулина с белками-мишенями.

Белки-мишени кальмодулина имеют особый участок, представленный амфифильной α -спиралью, обогащенной положи-

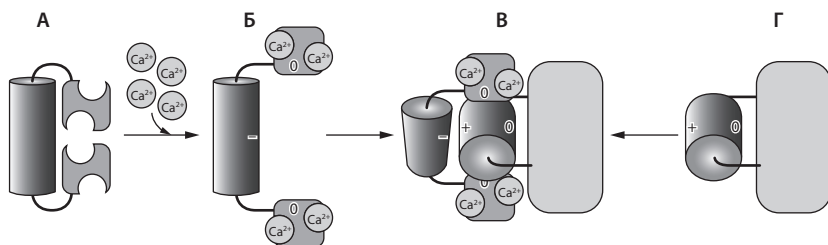


Рис. 48. Механизм регуляции активности белков кальмодулином.

А — неактивная форма кальмодулина;

Б — активная форма кальмодулина;

В — взаимодействие кальмодулина с белком-мишенью;

Г — белок-мишень с кальмодулин-связывающим доменом

тельно заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками. Причем заряженные и гидрофобные группы располагаются на противоположных поверхностях α -спирали (рис. 48-Г). Раскрытая молекула кальмодулина взаимодействует отрицательно заряженным участком центральной α -спирали с положительно заряженной поверхностью амфифильной α -спирали белка-мишени, а гидрофобными участками терминальных доменов — с гидрофобной поверхностью α -спирали белка-мишени. Кальмодулин, таким образом, обхватывает амфифильную спираль белка-мишени и стимулирует изменение его пространственной структуры и активности.

Снижение концентрации ионов кальция приводит к обратному эффекту — ионы Ca^{2+} диссоциируют от САМ, а декальцинированный кальмодулин теряет сродство с мишенями.

У *Arabidopsis* выявлено семь генов, кодирующих четыре изоформы кальмодулина (САМ1/САМ4, САМ2/САМ3/САМ5, САМ6, САМ7). Эти изоформы незначительно отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности. Так САМ1/САМ4 и САМ7 отличаются между собой четырьмя аминокислотными остатками, а кальмодулины САМ2/САМ3/САМ5 и САМ6 отличаются от САМ7 всего одной аминокислотой. Несмотря на минимальные различия, кальмодулин САМ7 существенно отличается от трех других изоформ по функциям. САМ7 является транскрипционным регулятором. Как было показано, САМ7 способен непосредственно взаимодействовать с промоторами ряда свето-индуцируемых генов и модулировать активность их экспрессии.

Модуляция активности транскрипции кальмодулинами

В регуляцию транскрипционной активности клетки вовлечено множество Ca^{2+} -связывающих белков. Считают, что экспрессия 3,3% генов *Arabidopsis* находится под контролем Ca^{2+} -зависимых механизмов. Транскрипция многих АБК-регулируемых генов, продукты которых участвуют в ранних стрессовых реакциях, зависит от повышения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле. Среди них гены транскрипционных факторов C-repeat/DRE Binding Factor (CBF) — ключевых регуляторов реакции на абиотические стрессовые воздействия.

В механизме активации экспрессии генов участвует группа транскрипционных факторов САМТА (Ca^{2+} /calmodulin-binding transcription activator). У *Arabidopsis* обнаружено шесть таких факторов. Карбокситерминальная часть молекулы САМТА формирует Ca^{2+} /кальмодулин-связывающий домен, а в аминотерминальной части находится СG1-домен, который опосредует взаимодействие с промотором гена через *cis*-элемент, который называют САМТА-связывающий сайт (рис. 49). Показано, что транскрипционные факторы САМТА1 и САМТА3 опосредуют кальциевый сигнал и транскрипцию генов устойчивости к холодовому стрессу. Это опосредование осуществляется следующим образом:

- 1) при повышении концентрации кальция в цитоплазме молекула кальмодулина (САМ — calmodulin) связывает четыре иона Ca^{2+} ;
- 2) кальцинированный кальмодулин Ca^{2+} /САМ связывается с С-терминальным Ca^{2+} /кальмодулин-связывающим доменом транскрипционного фактора САМТА;
- 3) активированный САМТА в комплексе Ca^{2+} /САМ/САМТА взаимодействует с САМТА-связывающим элементом промотора и участвует в инициации экспрессии гена.

Кальмодулин САМ7, как указывалось выше, является транскрипционным регулятором и способен непосредственно взаимодействовать с промоторами некоторых генов.

Модуляция активности белков кальций-зависимыми киназами

В кальциевом сигнальном механизме задействовано большое количество киназ, активность которых зависит от флуктуаций ионов кальция в цитозоле (подробнее см. раздел «Кальций-зависимые протеиновые киназы»).

Кальций-зависимые протеиновые киназы растений (CDPK — Calcium-Dependent Protein Kinases) в С-терминальной части молекулы имеют кальмодулин-подобный домен, который содержит четыре консервативных ЕF-руки и позволяет непосредственно связывать ионы Ca^{2+} . Связывание четырех ионов Ca^{2+} приводит к высвобождению киназного активного центра от автоингибиторного домена и последующему автофосфорилированию CDPK, которое необходимо для полной активации фермента.

В ответ на действие гиббереллина киназа CDPK1 регулирует активность транскрипционного фактора RSG (Repression of Shoot Growth). Многие кальций-зависимые киназы функционируют в сигнальной системе АБК. Например, кальций-зависимые киназы CPK3 (Calcium Dependent Protein Kinase 3) и CPK6 модулируют активность анионных каналов S-типа, участвуя в АБК-регуляции устьичной транспирации. CPK4 и CPK11 фосфорилируют транскрипционные факторы ABF1 (ABRE-Binding Factor 1) и ABF4, имеющие важное значение в функционировании замыкающих клеток устьиц.

CBL/CPK. В растительных клетках присутствует регуляторный Ca^{2+} -связывающий белок CBL (Calcineurin B-Like — кальцинейрин В подобный белок), который функционирует в качестве кальциевого сенсора. Он имеет, как и кальмодулин, четыре Ca^{2+} -связывающих EF-руки и модулирует активность CBL-взаимодействующих протеиновых киназ (CPK — CBL-interacting protein kinase). Белки CBL имеют ацильную группу, которая удерживает их на мембране. CBL были идентифицированы в плазмалемме и тонопласте. Киназы CPK являются растворимыми белками и локализуются в цитоплазме и нуклеоплазме. При взаимодействии с кальцинированными CBL киназы CPK привлекаются к мембранам (рис. 49). В растительных геномах кодируются множество индивидуальных видов CBL и CPK. Оба семейства белков являются многофункциональными сигнальными компонентами, которые способны образовывать множество альтернативных комплексов CBL/CPK. Совокупность комплексов CBL/CPK находится в центре системы декодирования Ca^{2+} -сигналов.

Схема функционирования системы CBL/CPK:

- 1) Увеличение цитоплазматической концентрации кальция приводит к связыванию четырех ионов Ca^{2+} EF-доменами регуляторного белка CBL.
- 2) Кальцинированный CBL соединяется с CPK через NAF-домен, расположенный в карбокситерминальной части киназы.
- 3) Изменение конформации, вызванное взаимодействием белков, приводит к смещению автоингибиторного домена CPK, который высвобождает активный киназный центр.
- 4) Активированная киназа CPK взаимодействует со своими мишенями и фосфорилирует их.

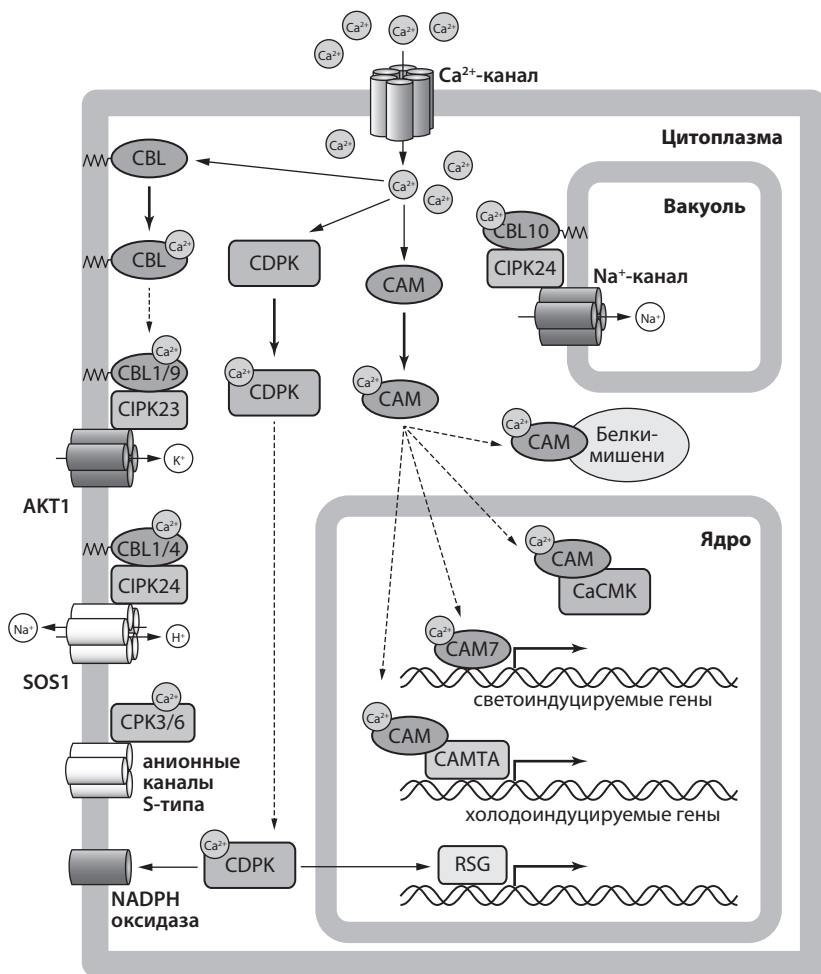


Рис. 49. Механизм регуляции активности белков кальмодулином (по Besson-Bard Bae, Choi, 2008, с изменениями).

Условные обозначения:

CDPK — кальций-зависимые киназы; CBL — кальцинейрин В подобные белки; CIPK — CBL взаимодействующие протеиновые киназы; RSG (Repression of Shoot Growth) — транскрипционный фактор; CAM — кальмодулин; CaMKK — кальций-кальмодулин-зависимые киназы; AKT1 — шейкер-подобный K^+ канал; SOS1 — Na^+/H^+ антипортер

Через CBL/CIPK регуляторную систему регулируется множество ионных каналов, модуляция активности которых важна в развитии разнообразных стрессовых реакций.

Киназа CIPK24 является важным регуляторным компонентом в механизме солевой устойчивости. В комплексе с плазмалеммным белком CBL4 эта киназа регулирует активность Na^+/H^+ -антипортера SOS1 (Salt Overly Sensitive 1). Кроме этого, CIPK24 может связываться с CBL10, который локализуется в вакуолярной мембране. Комплекс CBL10/CIPK24 модулирует активность тонопластного Na^+/H^+ -антипортера (рис. 49).

Сенсоры CBL1 и CBL9 взаимодействуют с CIPK23, образуя комплексы CBL1/CIPK23 и CBL9/CIPK23, которые специфически регулируют активность только одного шейкер-подобного K^+ -канала AKT1 (Arabidopsis K^+ Transporter 1). На другие K^+ -каналы эти комплексы не влияют.

CIPK1 совместно с CBL1 и CBL9 регулирует АБК-зависимые и АБК-независимые реакции на стрессовые воздействия. Многие АБК-зависимые ответы контролируются комплексом CBL9/CIPK3.

3.4. КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

3.4.1. Значение обратимой ковалентной модификации

Модуляция активности функциональных белков вследствие изменения их конформации осуществляется не только при взаимодействии с аллостерическими регуляторами, но и путем ковалентной модификации. Третичная или четвертичная структура белков может быть изменена в результате различных посттрансляционных механизмов. Это может быть достигнуто путем:

- присоединения или отщепления простетических групп (фосфатов, сульфатов, моно- и олигосахаридов и т. д.);
- модификации первичной структуры (ограниченный протеолиз, отщепление концевых аминокислотных остатков и др.).

Подобные изменения белков происходят посттрансляционно в процессе их созревания, но многие из модификаций могут быть обратимыми и используются клетками в регуляторных механизмах.

Наиболее значимыми в регуляторном отношении и повсеместно распространенными в природе являются модификации белков посредством фосфорилирования и дефосфорилирования. Фосфорилирование белков (присоединение фосфатных групп) осуществляется **протеиновыми киназами** — ферментами, которые катализируют перенос γ -фосфата АТФ на специфический аминокислотный остаток белка-мишени. Фосфатные группы в белковых молекулах могут быть связаны с различными аминокислотными остатками: серинов, треонинов, тирозинов, гистидинов и др. Дефосфорилирование фосфопротеинов осуществляется **протеиновыми фосфатазами**.

Посттрансляционная обратимая модификация белков путем фосфорилирования/дефосфорилирования, или **киназно-фосфатный цикл**, является важным регуляторным механизмом. Введение или удаление фосфатной группы способствует существенному перераспределению зарядов в белковых молекулах, что в значительной степени отражается на их пространственной структуре и активности.

Косвенным подтверждением важности фосфорилирования белков является наличие у эукариот большого количества генов, кодирующих протеиновые киназы и фосфатазы. Например, в геноме дрожжей обнаружено более 120 генов различных протеинкиназ, а геном человека, по некоторым оценкам, кодирует более 1000 этих ферментов. В растениях *Arabidopsis thaliana* идентифицировано 175 серин/треониновых киназ и около 100 фосфатаз. Кроме того, значительное количество цитоплазматических белков эукариотических клеток (примерно третья часть) имеют ковалентно связанный фосфат.

Фосфорилирование и дефосфорилирование оказывают противоположное действие на субстрат. Эти процессы являются своеобразными переключателями активности функциональных белков. При этом общей зависимости между наличием фосфатной группы (или нескольких групп) и состоянием белка не существует. Одни белки в фосфорилированном состоянии переходят

дят в активную форму, а другие, наоборот, — ингибируются. (Напомним, что под активностью следует понимать не только лишь каталитическую активность ферментов, но и способность белков взаимодействовать с иными сигнальными партнерами, то есть способность передавать сигнал).

Значительное количество белков имеют множественные сайты фосфорилирования, которые могут иметь различное назначение. Например, в молекулах рецептор-подобных киназ одна часть сайтов фосфорилирования необходима для модулирования каталитической активности, а другая участвует в формировании связывающей поверхности, необходимой для взаимодействия с другими белками. Переключение активности может осуществляться по принципу «все или ничего» или иметь градиентный характер, то есть введение фосфорных групп не просто «включает» или «выключает» белок, а усиливает или ослабляет его активность.

Присоединение остатков фосфорной кислоты к молекулам белков осуществляется не только протеинкиназами, но и ферментами другого типа — **фосфотрансферазами**, которые переносят фосфат от одного фосфорилированного белка на другой без использования АТФ. Примером такой трансферазы является гистидиновая фосфотрансфераза HPt , которая функционирует в двухкомпонентной многошаговой регуляторной системе растений (см. раздел «Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений»). HPt принимает фосфат на остаток гистидина от остатка аспарагиновой кислоты *receiver*-домена гистидиновой рецепторной киназы и переносит его на аспарагиновую кислоту *receiver*-домена регулятора ответа. Помимо источника фосфорной группы киназные и фосфотрансферазные реакции отличаются тем, что в сигнальных механизмах на уровне киназ происходит усиление сигнала, а на уровне фосфотрансфераз — нет.

3.4.2. Растительные протеиновые киназы

В растительных тканях протеинкиназы содержатся в значительном количестве и разнообразии. Протеиновые киназы разделяют, главным образом, по субстратной специфичности —

они фосфорилируют конкретные аминокислотные остатки, локализованные в определенных последовательностях. Эти ферменты различаются также по аминокислотной последовательности, пространственной структуре, субъединичному составу, локализации, способу активации и другим характеристикам.

В растительных организмах **серин/треониновые киназы** представляют собой наиболее важную и разнообразную группу. **Гистидиновые киназы** представлены рецепторными киназами двухкомпонентных систем (см. раздел «Гистидиновые киназы и двухкомпонентные сигнальные системы»). Типичные **тирозиновые киназы** у растений (а также у грибов) не обнаружены. Фосфорилирование тирозиновых остатков у растений, тем не менее, осуществляется, однако в значительно меньшем масштабе, чем у животных. Катализируются эти реакции серин/треониновыми киназами, которые обладают широкой специфичностью. Было обнаружено, что такими свойствами обладают:

- киназы семейства МАРКК, участвующие в киназных каскадах;
- киназы, фосфорилирующие циклин В-зависимые киназы;
- некоторые рецептор-подобные киназы (например, рецептор брассиностероида BRI1).

Среди белковых киназ самыми распространенными в живом мире являются серин/треониновые киназы. Если, например, тирозиновые (рецепторные) киназы характерны для животных, а гистидиновые (рецепторные) киназы — для растений и бактерий, то серин/треониновые киназы обнаружены у всех групп организмов и присутствуют у каждого отдельного вида в большом разнообразии.

К наиболее важным серин-треониновым протеиновым киназам растений относятся:

- кальций-зависимые киназы (CDPK);
- SNF1-подобные киназы;
- рецептор-подобные киназы;
- МАР-киназы (МАРК), МАРКК, МАРККК;
- циклин-зависимые киназы;
- казеин киназы I (СК1), казеин киназы II (СК2);
- GSK3;
- CTR1.

Кальций-зависимые протеиновые киназы

Кальций является универсальным внутриклеточным мессенджером, который принимает участие в регуляции жизнедеятельности клетки. Ионы Ca^{2+} могут прямо воздействовать на функциональные белки, связываясь с ними через Ca^{2+} -связывающие центры (ЕF-руки), или опосредованно через низкомолекулярные регуляторные Ca^{2+} -связывающие белки, например кальмодулин.

Существует три семейства Ca^{2+} -зависимых протеиновых киназ:

- 1) кальций-кальмодулин-зависимые протеиновые киназы;
- 2) кальций-зависимые киназы (кальмодулин-подобный домен протеин-киназы);
- 3) СBL-взаимодействующие протеиновые киназы.

Кальций-кальмодулин-зависимые киназы (CaCMK — calcium-calmodulin-dependent kinases), являются типичными для животных ферментами, но как оказалось, не имеют широкого распространения у растений. Например, в геноме *Arabidopsis* не было обнаружено генов, кодирующих киназы этого семейства.

Многие серин/треониновые киназы животных регулируются Ca^{2+} -кальмодулином (Ca^{2+} /CAM). В отсутствие кальцинированного кальмодулина CaCMK поддерживаются в неактивном состоянии, при котором автоингибиторный район (псевдосубстратный мотив) закрывает доступ субстрата к киназному домену. Присоединение Ca^{2+} /CAM к Ca^{2+} /CAM-связывающему участку стимулирует изменение конформации киназы, что приводит к ее активации.

Кальций-зависимые протеиновые киназы (CDPK — calcium-dependent protein kinases). Активация этих киназ ионами Ca^{2+} не требует присутствия кальмодулина. В С-терминальном районе растительных кальций-зависимых протеин-киназ находится домен, который содержит четыре консервативных ЕF-руки и на 39% идентичен кальмодулину. Этот участок называют кальмодулин-подобным доменом (CLD — CaM-like domain). Растительные кальций-зависимые киназы, в виду особенности их структуры, называют также **кальмодулин-подобный домен протеин-киназы** (аббревиатура CDPK при этом сохраняется: CaM-like domain protein kinase).

Наличие EF-рук в молекуле определяет способность киназ непосредственно связывать ионы Ca^{2+} и реагировать на изменение их концентрации в клетке. Связывание четырех ионов Ca^{2+} кальмодулин-подобным доменом вызывают конформационные изменения молекулы киназы, что приводит к высвобождению киназного активного центра от автоингибиторного домена. Эти изменения сопровождаются автофосфорилированием CDPK, которое необходимо для полной активации фермента.

В геноме растений идентифицированы множественные гены CDPK. У *Arabidopsis thaliana* обнаружено 34 киназы семейства CDPK и 8 близких им по структуре CDPK-подобных киназ (CDPK-related kinases). Большое количество изоформ, вероятно, обеспечивает специфичность и пластичность ответа на различные стимулы, влияющие на повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Многие изоформы CDPK у растений экспрессируются специфично в зависимости от типа клеток и стадии развития организма и отдельных органов. Кроме того, отдельные формы CDPK взаимодействуют с определенными белковым мишенями. Мишенями CDPK являются многие функциональные белки с различными функциями. Например, аквапорины (нодулин 26 — аквапорин симбиотической мембраны, окружающей азотфиксирующие бактерии в клубеньках бобовых растений; α -TIP — тонопластный существенный белок- α , обнаружен в семенах фасоли в мембране вакуолей с запасным белком), нитрат-редуктаза, Cl^- -каналы, сахарозо-синтаза, NADPH-оксидаза, транскрипционные регуляторы и др.

CBL-взаимодействующие протеиновые киназы (CIPK — CBL-interacting protein kinase) не имеют кальций-связывающих доменов, но их активность зависит от концентрации ионов Ca^{2+} опосредовано через кальций-сенсорные **кальцинейрин В-подобные белки** (CBL — Calcineurin B-Like). Белок CBL имеет значительное сходство с регуляторной В-субъединицей кальцинейрина и нейрональным кальциевым сенсором животных и дрожжей. Подобно кальмодулину, CBL имеет четыре Ca^{2+} -связывающих EF-руки и взаимодействует со своими мишенями в кальцинированном состоянии, модулируя их активность. Однако в отличие от кальмодулина, CBL связаны с мембранами и регулируют активность ферментов только одного семейства —

CBL-взаимодействующих протеиновых киназ. Мембранная локализация CBL определяется наличием у этого белка посттрансляционной модификации в виде ацильной группы. Обнаружены CBL в плазматической и вакуолярной мембранах. Киназы CIPK имеют цитоплазматическую и ядерную локализацию и привлекаются к мембранам при взаимодействии с кальцинированной формой CBL.

Молекула CIPK состоит из аминотерминального киназного домена и карбокситерминального регуляторного домена, между которыми находится вариабельный соединительный участок. В карбокситерминальном регуляторном районе находится консервативный NAF-домен, необходимый для взаимодействия с CBL, и PPI (protein-phosphatase interaction) домен, опосредующий взаимодействие с фосфатазой PP2C.

Увеличение цитоплазматической концентрации кальция приводит к связыванию четырех ионов Ca^{2+} EF-доменами регуляторного белка CBL. Кальцинированный CBL соединяется с CIPK через NAF-домен. Взаимодействие белков стимулирует изменение конформации киназы, в результате чего автоингибиторный и киназный домены диссоциируют. Активированная киназа CIPK взаимодействует со своими мишенями и фосфорилирует их.

В геноме растения *Arabidopsis* кодируется 10 CBL и 26 CIPK а у риса — 10 CBL и 30 CIPK. Конкретные виды CBL и CIPK специфически взаимодействуют друг с другом, а образованные комплексы CBL/CIPK модулируют активность мембраносвязанных мишеней путем фосфорилирования. Между индивидуальными CBL и CIPK возможно образование альтернативных комплексов. Это увеличивает количество возможных комбинаций и обеспечивает тонкую настройку активности мембранных компонентов под влиянием различных внешних воздействий разной интенсивности. Совокупность комплексов CBL/CIPK представляет собой своеобразный центральный «процессор» системы декодирования Ca^{2+} -сигналов, которые формируются при широком диапазоне стимулов. Через CBL/CIPK регуляторную систему регулируется множество ионных каналов, модуляция активности которых важна в развитии разнообразных стрессовых реакций.

SnRK — SNF1-подобные киназы

Растительные киназы семейства SnRK являются гомологами дрожжевых киназ SNF1. Отсюда SnRK — SNF1-подобные киназы (SNF1 related kinase). К этому же типу киназ относятся AMP-активируемые киназы (AMPK) млекопитающих. У *Arabidopsis thaliana* идентифицированы два подсемейства: SnRK1 и SnRK2.

Все киназы, гомологичные SNF1, активируется предпочтительно в стрессовых условиях, при которых снижается уровень глюкозы и аденозотрифосфатов, а концентрация AMP повышается. Основная стратегия механизмов, регулируемых этими киназами, направлена на снижение уровня биосинтетических процессов и активацию альтернативных катаболических путей. Это способствует повышению продукции АТФ, и перераспределению энергетических ресурсов на адаптационные процессы.

Киназы SNF1, AMPK и SnRK близки по структуре и свойствам, но каждое семейство имеет специфические особенности. Киназы дрожжей и животных имеют гетеротримерную структуру: α -субъединица каталитическая, а β и γ выполняют регуляторные функции и участвуют в связывании субстрата. Растительные SnRK различаются между собой по структуре. SnRK1 существует в виде мультимерного комплекса, подобно животным и дрожжевым гомологам, а SnRK2 является одиночным полипептидом.

Каталитические субъединицы киназ SNF1, AMPK и подсемейства SnRK1 имеют высокую степень гомологии (60–70%) в области киназного домена. У SnRK2 выявлена 43% гомология с киназным доменом SNF1. Кроме этого, для SnRK2 характерен очень короткий С-терминальный домен, который включает кислый участок, состоящий из полиглутаматных и полиаспаратных последовательностей. Различия в карбокситерминальной области, по-видимому, определяют субъединичный состав SnRK1 и SnRK2.

Активация. SNF1 киназа активируется при глюкозном голодании. Механизм активации включает фосфорилирование SNF1 специфической киназой. Активность AMPK находится под двойным контролем: регуляция осуществляется через

аллостерические АМР-связывающие центры и путем фосфорилирования специфической киназой АМРК (АМРКК). Активация АМРК и последующее фосфорилирование мишеней приводит к снижению потребления метаболической энергии в виде АТФ за счет инактивации ряда анаболических процессов. Одновременно с этим происходит переключение метаболизма на использование альтернативных энергетических субстратов для усиления синтеза АТФ. При наличии множества сходных черт между SNF1-подобными киназами животных и дрожжей, тем не менее, SNF1 не активируется АМР.

Растительные киназы семейства SnRK по большому числу признаков очень сходны с АМРК млекопитающих, но они не активируются аденозин-5'-монофосфатом и регулируются только фосфорилированием. SnRK1 имеет специфический остаток треонина-172, фланкированный консервативной последовательностью. Подобная последовательность, включающая треонин-172, есть у АМРК, причем АМРКК фосфорилирует АМРК по данному треонину. Предполагается, что SnRK1 также фосфорилируется по этому сайту. Активация SnRK1 происходит в условиях стресса при истощении источника легкоутилизируемого углерода. Как было показано *in vitro*, растительные SnRK1 фосфорилируют гидроксиметил-глутарил-CoA-редуктазу, сахарозофосфат-синтазу и нитрат-редуктазу. Фосфорилируя эти ферменты, SnRK1 ингибирует синтез изопреноидов и сахарозы, а также восстановление неорганического азота и включение его в состав органических соединений. Активация SnRK1 влияет также на изменение генной экспрессии. SnRK1 дерепрессирует гены катаболических путей. Например, гены сахарозосинтазы и ферментов глиоксислатного цикла репрессируются глюкозой, но активируются SnRK1.

Протеинкиназы семейства SnRK2 в физиологически оптимальных условиях ингибируются специфическими фосфатазами 2С. Под воздействием различных абиотических стрессов репрессия снимается путем инактивации фосфатаз. Мишенями SnRK2 являются, например, транскрипционные факторы, регулирующие активность АБК-зависимых генов. Примером SnRK2 киназы является 42 кД белок NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase), обнаруженный в клетках табака.

Рецептор-подобные киназы

Рецептор-подобные киназы (receptor-like kinase — RLK) у растений представлены в большом разнообразии. Все они имеют сходную структуру и механизм активации. Рецептор-подобные киназы преимущественно являются мономерными трансмембранными белками, которые пересекают мембрану один раз. Значительные отличия обнаруживаются в экстраклеточном рецепторном домене киназ. Различают 4 основные группы рецептор-подобных киназ:

- 1) LRR-группа;
- 2) S-домен группа;
- 3) лектин-подобный домен группа;
- 4) EGF-группа.

У растений *Arabidopsis* также обнаружено несколько рецептор-подобных киназ, обладающих специфическими структурными особенностями, которые не позволяют отнести эти молекулы к одной из указанных групп.

LRR-группа. Экстраклеточный лиганд-связывающий домен рецептор-подобных киназ этой группы включает тандемы множества лейцин-обогащенных повторов. Например, рецептор брассиностероидов BRI1 содержит 24 лейцин-обогащенных повтора (LRR). LRR расположены последовательно друг за другом, и только между 20 и 21 LRR расположен участок, который называют островной домен — ID (island domain). Один из лейциновых повторов — LRR21 — отличается от других LRR необычным метионин-обогащенным повтором. Участок, состоящий из 94 аминокислотных остатков, включающий островной домен и LRR21 (ID–LRR21), идентифицирован как брассиностероид-связывающий сайт. Механизм активации BRI1 описан в разделе «Рецептор-подобные киназы».

Кроме рецептора BRI1, к серин/треониновым LRR-рецептор-подобным киназам относятся рецепторы пептидных регуляторов.

CLV1 (CLAVATA1) — рецептор пептидного регулятора CLV3. CLV1 участвует в механизме, посредством которого устанавливается и поддерживается баланс процессов пролиферации и дифференциации клеток апикальных меристем стебля. Связывание CLV3 с CLV1 приводит к ингибированию воспроизводящего деления клеток и стимулирует процесс дифференциации.

SR160 — рецептор системина томата TomSys. Системин выполняет ключевую роль в реакции растения на воздействие стрессового фактора, активируя продукцию мобильного фактора, который обеспечивает развитие системной устойчивости.

S-домен группа. Внешнеклеточный домен рецептор-подобных киназ S-домен группы близок по структуре гликопротеину S-локуса (S-locus glycoprotein — SLG) растений рода *Brassica*. Для S-домена характерно наличие консервативных цистеин-обогащенных мотивов. Пространственная структура этих доменов стабилизируется путем образования дисульфидных связей между остатками консервативных цистеинов.

Одним из представителей этой группы является рецептор SRK (S-locus receptor-like kinase) *Brassica*, участвующий в механизме самонесовместимости. Система самонесовместимости растений обеспечивает распознавание и отторжение пыльцы близкородственных индивидов (в том числе и своей собственной) при попадании ее на рыльце пестика. Это свойство способствует предотвращению близкородственного скрещивания и поддержанию внутривидового генетического разнообразия. Лигандом SRK является пептидный регулятор SCR/SP11 (S-locus cysteine-rich protein/S-locus protein 11). Самонесовместимость контролируется единичным мультиаллельным локусом, названным локусом стерильности (S-локус). В систему самонесовместимости *Brassica* входит также гликопротеин SLG, однако значение этого белка в механизме несовместимости невыяснена. У растений *Arabidopsis thaliana* обнаружено три рецептороподобные киназы S-домен группы, однако к системе самонесовместимости они не имеют никакого отношения.

Лектин-подобный домен группа. Экстраклеточный домен этих рецептор-подобных киназ по структуре относится к лектинам бобовых и лектин-подобному белку *Arabidopsis thaliana* Lec2. Предполагается, что рецепторы этой группы связывают олигосахариды — продукты разрушения компонентов клеточной стенки, вызванного действием патогенных грибов.

EGF-группа. Экстраклеточная часть молекул EGF-группы содержат повторы, характерные для эпидермального ростового фактора (EGF) млекопитающих. Значение рецептор-подобных киназ EGF-группы у растений неизвестно.

МАР киназы

В клетках животных и грибов выявлены и охарактеризованы киназы, формирующие каскадные регуляторные системы (или модули). Их называют **митоген-активируемыми протеиновыми киназами** и обозначают МАРК (mitogen-activated protein kinase) или МРК. Киназные каскады включают три (реже четыре) киназы, которые последовательно фосфорилируют друг друга. Модули работают в направлении МАРККК → МАРКК → МАРК. Киназу, замыкающую каскад (МАРК), фосфорилирует киназа МАР киназы (МАРКК), которая в свою очередь фосфорилируется киназой киназы МАР киназы (МАРККК).

Все киназы киназного каскада имеют альтернативные обозначения:

МАРК (МАР киназа) — МРК;

МАРКК (киназа МАР киназы) — МАР2К, МЕК или МКК;

МАРККК (киназа киназы МАР киназы) — МАР3К, МЕКК.

Если в каскаде участвует четвертая киназа, фосфорилирующая МАРККК, ее называют **киназой киназы киназы МАР киназы — МАРКККК** или МАР4К.

Большинство киназных каскадов у животных активируются через малые G-белки, которые в GTP-связанной (активной) форме непосредственно взаимодействуют с МАРККК (или МАРКККК).

В растительных клетках идентифицированы киназы всех трех подсемейств стандартного модуля. В геноме арабидопсиса, например, обнаружено 20 МАРК, 10 МАРКК и 60 МАРККК. Многие из этих генов были клонированы. Посредством киназных каскадов регулируется активность множества функциональных белков, в том числе ферментов и транскрипционных факторов.

Растительные киназы обладают консервативными структурами, характерными для аналогичных киназ животных и грибов. МАРК содержат мотив Thr-X-Tyr в «Т-петле», которую также называют **сегментом активации**. Для активации МАРК необходимо фосфорилирование треонина и тирозина в сегменте активации, которое катализирует МАРКК — киназа широкой специфичности. МАРККК фосфорилирует в молекуле МАРКК

остатки серинов или треонинов, которые являются консервативными для растений.

Киназные каскады активируются многими внешними стимулами и гормонами. При добавлении ауксина в культуру клеток табака МАРК активировалась через пять минут. В листьях табака через минуту после поранения была активирована одна из МАРК — WIPK (wound-induced MАРK). Показано также, что WIPK вовлекается в активацию ферментов октадеканойдного пути (синтеза жасмоновой кислоты).

В протопластах клеток алейронового слоя ячменя МАРК активировалась абсцизовой кислотой через минуту. В листьях клевера активация этого фермента происходила под влиянием различных стрессовых воздействий (холодовой шок, обезвоживание, повреждение) без участия АБК.

Важной особенностью большинства известных МАРК является то, что активация этих ферментов кратковременна. Это связано с тем, что при активации МАРК стимулируется транскрипция специфических МАРК фосфатаз двойной специфичности, которые дефосфорилируют МАР киназы всех уровней.

Циклин-зависимые киназы (CDK)

Циклин-зависимые киназы (CDK — cyclin-dependent kinases) и циклины были первоначально открыты как ключевые регуляторы клеточного цикла, откуда и получили свое название. Совместно эти белки контролируют переход к синтетической фазе или митозу. Однако не все циклин-зависимые киназы имеют отношение к регуляции клеточного деления.

Циклин-зависимые киназы дрожжей и млекопитающих являются небольшими белками (около 34 кД) и представляют собой минимальный киназный домен. В свободном состоянии эти белки каталитически неактивны и приобретают киназные свойства после связывания с циклинами. Важный для взаимодействия с циклинами участок содержит консервативную последовательность PSTAIRE. Большинство циклин-зависимых киназ выполняют множественные роли, и их функциональная активность зависит от того, с какими циклинами они будут ассоциироваться.

Циклины и циклин-зависимые киназы синтезируются и деградируют в определенные периоды клеточного цикла. Образованный гетеродимер циклин-CDK еще не активен и требует дальнейшей активации путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Циклин-зависимые киназы имеют два основных участка фосфорилирования:

- 1) остаток треонина в активационной Т-петле фосфорилируется циклин-активирующей киназой (CAK — *cyclin activating kinase*);
- 2) остаток тирозина в последовательности GXGXYX фосфорилируется другой киназой (например, у делящихся дрожжей подобный фермент называется Wee1).

Если фосфорилирование треонина необходимо для активации CDK, то фосфорилирование тирозина, наоборот, ингибирует фермент. Для окончательной активации циклин-зависимой киназы необходима активность фосфатазы, отщепляющей фосфорную группу от тирозина (у делящихся дрожжей — CDC25).

Таким образом, циклин-зависимые киназы активируются в несколько этапов:

- 1) ассоциация с циклинами (этот этап контролируется на уровне транскрипции);
- 2) фосфорилирование участков активации (треонин) и ингибирования (тирозин);
- 3) дефосфорилирование фосфотирозина.

У растений *Arabidopsis thaliana* обнаружены 2 гена, кодирующих циклин-зависимые киназы — CDC2a и CDC2b. Одна из них, CDC2a, содержит мотив PSTAIRE, который полностью соответствует аналогичной последовательности у киназы CDC2 дрожжей. В молекуле CDC2b этот мотив отличается двумя аминокислотами: PPTALRE. Первая киназа с последовательностью PSTAIRE экспрессируется на протяжении всего клеточного цикла, тогда как вторая (с вариантом PPTALRE) — в течение ограниченного временного периода между синтетической фазой и митозом.

В растениях *Arabidopsis thaliana* обнаружены и клонированы также CDK-активирующая киназа, 10 циклинов А/В типа, участвующих в регуляции перехода $G2 \rightarrow S$, и три циклина D типа (регуляция перехода $G1 \rightarrow M$).

Казеиновые киназы СК1 и СК2

Два подсемейства казеиновых киназ (casein kinase — СК) были выявлены по их способности фосфорилировать молочный белок казеин. СК1 и СК2 значительно отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности и пространственной структуре, но, тем не менее, имеют некоторые близкие свойства. Киназы обеих подсемейств фосфорилируют остатки треонинов и серинов возле кислых участков аминокислотной цепи. Разница заключается в том, что СК1 предпочитает участки, в которых кислые аминокислоты находятся относительно серина/треонина с N-концевой стороны в положении P-3, а СК2 с карбоксиконцевой — в положении P+3.

Предполагается, что активность СК1 и СК2 не находятся под тонким контролем. По-видимому, эти киназы обеспечивают конститутивный базальный уровень фосфорилирования, а регуляция осуществляется за счет активности протеиновых фосфатаз.

Киназы СК1 являются мономерными белками. У них достаточно широкий спектр субстратов *in vitro*, но в большинстве случаев фосфорилирование не приводит к изменению активности субстрата.

Функции СК1 не выяснены, но как показывает мутационный анализ, эти киназы имеют чрезвычайно важное значение в деятельности клеток. На дрожжах показано, что делеции двух генов СК1 (*YCK1* и *YCK2*) являются летальными, а нарушение гена *HRR25* приводит к гиперчувствительности к действию ДНК-повреждающих агентов. То есть, продукт гена *HRR25* участвует в механизмах репарации ДНК. В геноме *Arabidopsis thaliana* выявлено пять генов, кодирующих изоформы СК1. Структура СК1 растений сходна с СК1 млекопитающих.

Киназы СК2 млекопитающих существуют преимущественно в форме тетрамера a_2b_2 и обладают необычной для киназ особенностью: наряду с АТФ они используют также ГТФ. Субъединицы *a* являются каталитическими, а *b* выполняют регуляторную роль — модулируют активность по отношению к определенным типам субстрата. Среди мишеней СК2 у млекопитающих есть ДНК-связывающие белки, например, р53, и топои-

зомераза II. Активность СК2 связывают с установлением клеточной полярности и функционированием клеточного цикла. Нарушение двух генов СК2 у *Saccharomyces cerevisiae* (СКА1 и СКА2) имеют летальный характер.

У *Arabidopsis thaliana* выявлены две изоформы каталитической субъединицы *a* и две — регуляторной *b*. В клетках СК2 присутствует в мономерной форме (*a*) и в виде тетрамера (a_2b_2). Как и у млекопитающих СК2 растений фосфорилирует серин, фланкированный кислыми аминокислотными остатками, и использует АТФ и GTP.

Семейство GSK3/Shaggy

GSK3-подобные киназы представляют группу высококонсервативных конститутивно активных серин-треониновых киназ, которые принимают участие в многочисленных сигнальных путях, посредством которых регулируется метаболизм и развитие клеток и тканей. Один из ферментов млекопитающих, участвующих в инсулин-зависимом механизме синтеза гликогена, киназа гликогенсинтазы-3 (glycogen synthase kinase-3 — GSK3), является главным представителем этого семейства киназ и дает ему название. Активность животных GSK3 регулируется фосфорилированием. Протеинкиназа В инактивирует GSK3, фосфорилируя сериновый остаток в аминотерминальном домене. Гомологичная киназа *Drosophila melanogaster*, продукт гена *shaggy/zeste-white 3*, необходима для контроля процессов развития.

К данному семейству относится растительная киназа BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), участвующая в брассиностероидном сигнале. BIN2 имеет 70% гомологию с GSK3. Наибольшее сходство обнаруживается в области каталитического домена. В *Arabidopsis* BIN2 принадлежит к 10-членному семейству, включающему четыре филогенетических подгруппы. Все они имеют высококонсервативные серин-треониновые киназные домены, но различаются N- и C-терминальными участками. GSK3-подобные киназы у *Arabidopsis* называют также AtSK (*Arabidopsis thaliana* Shaggy-like Kinases). Показано, что в регуляции брассиностероидного сигнала избыточно функционируют три AtSK подгруппы II: AtSK21, AtSK22 и AtSK23/BIN2.

Киназа AtSK23/BIN2 является негативным регулятором brassinостероидного сигнального пути. Она фосфорилирует транскрипционные регуляторы BZR1 и BES1 — активаторы brassinостероид-регулируемых генов. Фосфорилирование факторов BZR приводит к их 26S-зависимому протеолизу. Дефосфорилирование фосфатазой BSU1 ингибирует активность BIN2 и дерепрессирует brassinостероидный сигнал.

CTR1/Raf-подобное семейство

Киназа CTR1 (constitutive triple response 1) была обнаружена у растений как существенный сигнальный компонент этиленового сигнала. Нарушение гена *CTR1* с потерей функции приводит к конститутивной тройной реакции, которая проявляется даже в отсутствии гормона. По структуре CTR1 является гомологом киназ семейства Raf-1 млекопитающих. Активность киназы Raf-1 в животных клетках модулируется Ras G-белком, а ее мишенью является MAPKKK — первая киназа MAP-киназного каскада. Сигнальный механизм, в котором участвует CTR1, значительно отличается от Raf-1. Было показано, что аминотерминальная область CTR1 непосредственно взаимодействует с киназным доменом этиленовых рецепторов (гистидиновых рецепторных киназ), а мономерные G-белки совсем не участвуют в этиленовом сигнале. Мишень CTR1 не идентифицирована. Показано, что после CTR1 в этиленовом сигнале активируется 12-трансмембранный белок EIN2, гомологичный переносчикам двухвалентных металлов, но функционирует ли киназный каскад между CTR1 и EIN2, не известно.

3.4.3. Протеиновые фосфатазы

Протеиновые фосфатазы (PP — protein phosphatase) или фосфопротеинфосфатазы — ферменты, дефосфорилирующие фосфопротеины, являются функциональными антагонистами протеиновых киназ, совместно с которыми участвуют в регуляции функциональной активности клеток. Механизмы регуляции активности фосфатаз и их антагонистов протеиновых киназ имеют, как правило, противоположную направленность.

Классификация фосфатаз

Фосфопротеинфосфатазы принято делить на три основных семейства, различающиеся по субстратной специфичности, биохимическим характеристикам, аминокислотной последовательности и архитектуре генов: два семейства серин/треониновых фосфатаз (**PPP** и **PPM**) и семейство **РТР**, включающее тирозиновые фосфатазы и фосфатазы двойной специфичности.

Таблица. Классификация основных групп растительных серин/треониновых протеиновых фосфатаз.

Принцип классификации	Группы			
• аминокислотная последовательность каталитических субъединиц	PPP		PPM	
• субстратная специфичность, чувствительность к пептидным ингибиторам	PP1	PP2		KAPP
• требование ионов двухвалентных металлов, субъединичный состав		PP2A	PP2B	

Серин/треониновые фосфатазы

Принцип разделения серин/треониновых фосфатаз по группам был разработан в начале 1970-х годов и до нынешнего времени используется в качестве основы в современной классификации данных ферментов.

Первоначально серин/треониновые фосфатазы у животных были разделены на два основных класса (**PP1** и **PP2**) согласно их субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам. В качестве субстратного «эталона» использовали субъеди-

ницы киназы фосфорилазы млекопитающих. Фосфопротеинфосфатазы PP1 предпочтительно дефосфорилируют β -субъединицу, фосфопротеинфосфатазы PP2 — α -субъединицу. Кроме того, PP1 чувствительны к пептидным ингибиторам, известными как ингибитор-1 (I-1) и ингибитор-2 (I-2), а PP2 устойчивы к ним.

Фосфатазы PP1 являются гетеродимерами, состоящими из каталитической субъединицы PP1c и регуляторной субъединицы R.

Фосфатазы PP2 представляют собой разнообразную группу, поэтому было предложено разделить их на три подкласса, согласно отношению ферментов к ионам двухвалентных металлов (Ca^{2+} и Mg^{2+}). Кроме того, для каждого подкласса является характерным определенный субъединичный состав.

PP2A — это тримеры, состоящие из двух регуляторных субъединиц (A и B) и одной каталитической — PP2Ac. Для проявления активности ферменты не требуют присутствия двухвалентных ионов.

PP2B — гетеродимеры, состоят из каталитической субъединицы A и регуляторной B. Активируются ионами кальция через регуляторную B-частицу, которая имеет Ca^{2+} -связывающие центры EF-руки. Полная активация фосфатаз PP2B животных достигается при связывании кальцинированного кальмодулина.

PP2C — мономерные фосфатазы. Активируются ионами Mg^{2+} .

Семейство PPP. Изучение аминокислотной последовательности каталитических субъединиц показало, что каталитические домены фосфатаз PP1, PP2A и PP2B представлены консервативными последовательностями (около 280 аминокислотных остатков), имеющими высокую степень сходства — 40–60%. Наличие высококонсервативного каталитического домена было основанием для объединения фосфатаз PP1, PP2A и PP2B в одно семейство PPP. Все фосфатазы PPP являются гетерополимерными молекулами. Аминотерминальные и карбокситерминальные домены каталитических субъединиц необходимы для их ассоциации с регуляторными субъединицами. Каждая индивидуальная каталитическая субъединица может объединяться с разными изоформами регуляторных субъединиц. В результате образуется целый ряд холоферментов с разнообразными свойствами и локализацией. В реакционном цен-

тре всех PPP находятся металлы с переменной валентностью, которые являются существенно важными для каталитической активности. Для каталитического центра PP1с, например, характерно наличие ионов Mn^{2+} и Fe^{2+}/Fe^{3+} , а для PP2В — Zn^{2+} и Fe^{2+}/Fe^{3+} . Эти металлы используются ферментами для активации молекулы воды или гидроксил-иона. Благодаря этой особенности фосфатазы семейства PPP осуществляют одноступенчатую реакцию дефосфорилирования без формирования фосфат-ферментного посредника.

Семейство PPM. Все мономерные Mg^{2+} -зависимые серин/треониновые фосфатазы были отнесены к семейству PPM. Основу этой группы составляют липазы PP2С. Мономерные PP2С фосфатазы не имеют гомологии с ферментами группы PPP. Несмотря на это, пространственные структуры PPP и PPM фосфатаз в целом сходны. Последовательности каталитических доменов фосфатаз внутри группы PPM обладают ограниченной гомологией (20–35%). Аминотерминальные области выполняют регуляторную роль и служат для взаимодействия с другими молекулами. В каталитическом районе PP2С находится бинуклеарный центр, содержащий два иона Mn^{2+} . Дефосфорилирование субстрата, как и у PPP, осуществляется посредством активации молекулы воды в одноступенчатой реакции без формирования фосфат-ферментного посредника.

Новые группы фосфатаз. Терминальные области молекулы растительных фосфатаз часто представлены уникальными последовательностями, которые могут быть характерными для узкой группы ферментов, а некоторые мотивы типичными для фосфатаз растений, принадлежащих к определенным таксономическим группам. Идентификация этих последовательностей позволила расширить стандартную классификацию фосфатаз. Помимо групп PP1, PP2А и PP2В к семейству PPP сейчас относят сравнительно недавно обнаруженные фосфатазы PP4, PP5, PP6, PP7.

Тирозиновые фосфатазы

У животных организмов тирозиновые фосфатазы присутствуют в значительном количестве и выполняют существенную регуляторную роль, участвуя в контроле таких важных про-

цессов, как рост и пролиферация клеток. В геноме человека насчитывается более 100 генов, кодирующих РТР. В отношении субстрата, на который направлена каталитическая активность ферментов, тирозиновые фосфатазы подразделяют на **тирозин-специфичные (РТР)** и **фосфатазы двойной специфичности (DsРТР)**, которые дефосфорилируют не только фосфотирозины, но и фосфосерины/фосфотреонины.

Семейства тирозиновых фосфатаз РТР и DsРТР обладают незначительной гомологией, но при этом у них есть ряд принципиально сходных структурных характеристик.

Во-первых, молекулы фосфатаз, несмотря на низкую степень сходства аминокислотных последовательностей, формируют пространственно сходные каталитические домены.

Во-вторых, в каталитическом центре ферментов находится мотив (V/I)HCXAGXGR(S/T)G, который содержит остаток цистеина, необходимый для образования фосфат-ферментного посредника. Этот цистеин занимает положение, оптимальное для нуклеофильной атаки фосфорной группы. Он находится в расщелине, в которую проникает фосфорилированный аминокислотный остаток при взаимодействии фермента с субстратом.

В-третьих, последовательность внешней области каталитического домена, которая определяет субстратную специфичность ферментов, является характерной для всех тирозиновых фосфатаз. Примечательно, что в данной области молекулы DsРТР не имеют никакой гомологии с серин/треониновыми фосфатазами.

Специфичность фосфатаз зависит от двух особенностей субстрата:

- наличие фосфорилированного аминокислотного остатка;
- положение, которое занимает этот остаток, или иными словами — фланкирующие последовательности.

Последовательности внешней области каталитического домена фосфатаз узнают поверхность субстрата (последовательности, фланкирующие фосфорилированный остаток). Глубина расщелины, в которой находится мотив с существенным остатком цистеина, соответствует длине фосфорилированного остатка субстрата. У тирозин-специфичных фосфатаз глубина щели в каталитическом центре соответствует длине остатка фосфотиро-

зина, тогда как остатки фосфосеринов и фосфотреонинов слишком короткие, чтобы взаимодействовать с цистеином. По этой причине тирозин-специфичные фосфатазы дефосфорилируют только остатки фосфотирозина. Фосфатазы двойной специфичности формируют каталитическую щель меньшей глубины, поэтому при наличии соответствующих последовательностей, окружающих фосфорилированный остаток, эти ферменты могут осуществлять дефосфорилирование не только остатков фосфотирозина, но также фосфосеринов и фосфотреонинов. Считают, что фосфатазы двойной специфичности являются усеченной версией тирозин-специфичных фосфатаз.

Растительные фосфатазы

Разнообразие растительных фосфатаз

У растений выявлено большинство основных групп фосфатаз. Причем набор и соотношение фосфатаз у растений и животных значительно отличается. Для растений характерно существенное преобладание мономерных фосфатаз. Например, в геноме *Arabidopsis* идентифицировано 7 генов, кодирующих каталитические субъединицы PP1, 6 генов каталитических субъединиц PP2A и 70 генов PP2C.

Из главных семейства PPP у растений были идентифицированы фосфатазы PP1 и PP2A. Каталитические субъединицы PP1с были клонированы, а регуляторные субъединицы, несмотря на то, что активность фосфатаз PP1 ассоциируется с большими белковыми комплексами, пока не обнаружены. Гены каталитических и обеих регуляторных субъединиц фосфатазы PP2A были идентифицированы и клонированы. Регуляторные субъединицы A и B растительных PP2A имеют 70% сходство с животными гомологами.

Активность Ca^{2+} -зависимых PP2B-подобных фосфатаз в растительных тканях также были зарегистрированы, но генов, близких к генам субъединиц фосфолипаз PP2B животных, в растительных геномах не обнаружено. Предполагается, что Ca^{2+} -зависимые фосфатазы растений имеют уникальные растительно-специфичные последовательности и взаимодействуют

не с кальмодулином, а с кальцинейрин В-подобными белками (см. раздел «Кальций-зависимые протеиновые киназы»). Анализ генома *Arabidopsis* показывает также наличие других фосфатаз семейства PPP: PP4, PP5, PP6 и PP7.

Фосфатазы PP2C у растений представлены в значительно большем разнообразии, чем у других эукариотов. Эти ферменты имеют незначительное сходство с PP2C животных и грибов (20–35%). Аминоконцевые некаталитические области молекул растительных PP2C чрезвычайно разнообразны и представлены растительно-специфичными последовательностями, которые не встречаются за пределами царства растений.

Тирозиновые фосфатазы у растений представлены в значительно меньшем разнообразии, чем серин/треониновые. В геноме *Arabidopsis* идентифицировано около 20 генов, кодирующих тирозиновые фосфатазы, из которых только одна является тирозин-специфичной, а остальные обладают двойной специфичностью.

Значение растительных фосфатаз

Растительные фосфатазы вместе с киназами поддерживают определенный уровень фосфорилирования функциональных и регуляторных белков, который зависит от конкретных условий. Изменение статуса фосфорилирования белков отражается на их активности. Под контролем киназно-фосфатазной системы находится активность ферментов, ионных каналов, трансмембранных переносчиков, транскрипционных факторов и других клеточных компонентов.

Семейство PPP. Субстратом фосфатаз PP1 и PP2A являются ферменты гидроксиметил-глутарил-СоА-редуктаза, сахарозо-фосфат-синтаза и нитрат-редуктаза. Эти ферменты фосфорилируются киназой SnRK1 под действием различных стрессовых факторов и АБК. Фосфорилируя эти ферменты, SnRK1 ингибирует синтез изопреноидов и сахарозы, а также восстановление неорганического азота и включение его в состав органических соединений. Фосфатазы PP1 и PP2A выступают антагонистами киназы SnRK1 в данном механизме. PP1 и PP2A снижают уровень фосфорилирования указанных ферментов, стимулируя их активность и пути, в которых они участвуют. Фос-

фатази PP2A участвуют в механизме brassinостероидного сигнала — активируют транскрипционные факторы BES1 и BZR1 путем дефосфорилирования.

Семейство PPM. Протеиновые фосфатазы PP2C участвуют в контроле АБК-регулируемых генов. У *Arabidopsis* были идентифицированы две гомологичные мономерные серин/треонин фосфатазы, которые выполняют роль негативных регуляторов сигнала АБК: ABI1 и ABI2. В отсутствие АБК эти фосфатазы конститутивно ингибируют активность протеинкиназы SnRK2, от активности которой зависит уровень экспрессии АБК-регулируемых генов. Появление гормона в клетке приводит к его связыванию с внутриклеточным START-домен рецептором АБК семейства PYR/PYL. Комплекс PYR/PYL–АБК специфически связывает фосфатазу PP2C в области реакционного центра, ингибируя ее активность. Ингибирование фосфатазы 2C приводит к дерепрессии протеинкиназы SnRK2, которая фосфорилирует группу транскрипционных факторов активаторов АБК-регулируемых генов и стимулирует активность соответствующих генов.

Вторая группа мономерных фосфатаз, механизм действия которых у растений изучен — это KAPP (Kinase-Associated Protein Phosphatase). Фосфатазы KAPP имеют плазмалеммную локализацию и ассоциируются с рецептор-подобными киназами и/или их корецепторами и дефосфорилируют эти молекулы, что приводит к репрессии соответствующего сигнала. Связывание KAPP с мишенями в некоторых случаях осуществляется только на мембранах везикул. Это зависит от конкретного механизма активации/репрессии рецептор-подобной киназы. У различных растений были идентифицированы фосфатазы KAPP, которые контролируют активность рецепторов brassинолида и CLV1 (CLAVATA1) — рецептор пептидного регулятора CLV3, который участвует в механизме контроля процессов пролиферации и дифференциации клеток апикальных меристем стебля.

Семейство РТР. Тирозиновые фосфатазы двойной специфичности участвуют в регуляции MAP-киназного каскада (см. раздел «MAP киназы»). Последний компонент каскада, MAPK, фосфорилируется киназой MAPKK по специфическим остаткам

треонина и тирозина. Активация МАРК кратковременна, так как сопровождается стимуляцией специфических МАРК фосфатаз двойной специфичности. В растениях *Arabidopsis* показано, что фосфатаза двойной специфичности AtPTP1 дефосфорилирует AtMPK4 (аналог МАРК).

Фосфатазы DsPTP участвуют также в контроле клеточного цикла. Активность циклин-зависимых киназ подсемейства CDC2 (у *Arabidopsis* обнаружено две киназы CDC2a и CDC2b), взаимодействующих с циклинами В типа и участвующих в регуляции перехода G2→S, контролируется двумя типами киназ: циклин-активирующая киназа (CAK) фосфорилирует остатки треонина в активационной Т-петле CDC2, а вторая (например, у деющих дрожжей подобный фермент называется Wee1) — остатки тирозина. Фосфорилирование по тирозину ингибирует CDC2, тогда как окончательная активация этой киназы достигается действием фосфатазы двойной специфичности (у дрожжей — CDC25), которая дефосфорилирует фосфотирозины CDC2. У растений гомологи Wee1 и CDC25 не обнаружены, однако существуют косвенные доказательства, что описанный механизм активации перехода G2→S у растений функционирует: CDC25 дрожжей активирует клеточный цикл у растений. Предполагают, что фосфатаза, функционально аналогичная CDC25, у растений обладает структурой специфичной для растений.

4. МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ

4.1. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ АУКСИН-РЕГУЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ

4.1.1. Регуляторы транскрипции ауксин-регулируемых генов и их доменная структура

Активация ауксин-регулируемых генов имеет преимущественно дерепрессивный характер и представляет собой механизм, в процессе которого под действием гормона осуществляется убиквитин-зависимое разрушение репрессоров транскрипции.

Значительное количество ауксин-регулируемых генов находятся под контролем транскрипционных факторов двух семейств:

- 1) активаторы транскрипции **ARF** (auxin response factors);
- 2) репрессоры транскрипции **Aux/IAA** (auxin/indole-3-acetic acid).

В молекуле Aux/IAA выделяют четыре основных домена, которые обозначают римскими цифрами I, II, III и IV, а в молекулах ARF — три: DBD (ДНК-связывающий домен), домены III и IV (рис. 50).

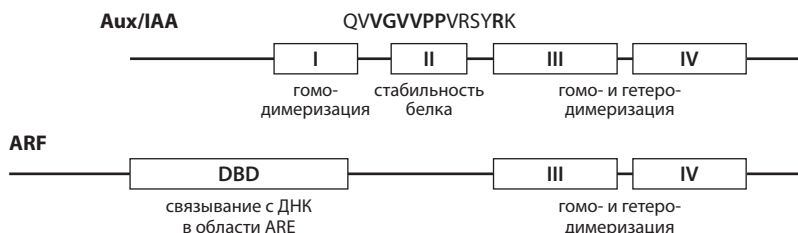


Рис. 50. Структура транскрипционных регуляторов Aux/IAA и ARF

Карбокситерминальные домены III и IV неслучайно имеют одинаковые обозначения, так как в области этих доменов молекулы Aux/IAA и ARF обладают высокой степенью гомологии. Домены III и IV не только гомологичны по структуре, но и выполняют сходные функции — они необходимы для образования димеров. Причем возможно образование не только гомодимеров с участием белков одного семейства (2 Aux/IAA; 2 ARF), но и гетеродимеров Aux/IAA–ARF. Вероятность образования тех или иных димеров зависит от концентрации ARF и Aux/IAA определенного типа в клетке.

Аминотерминальные домены у этих белков различны по структуре и функциям.

Белки ARF через ДНК-связывающий домен (DBD) способны специфически связываться с промоторами ауксин-регулируемых генов в области *cis*-элемента ARE (auxin response elements), которые включают консервативные шестинуклеотидные последовательности TGTCTC.

Домен I репрессора Aux/IAA, как считают, выполняет вспомогательную функцию при образовании гомодимеров. Домен II определяет уровень стабильности белка. В области этого домена находится **дегрон** — 13-аминокислотный участок, необходимый для взаимодействия с F-box белком (TIR1) убиквитирующего комплекса.

4.1.2. Участие Aux/IAA и ARF в регуляции экспрессии ауксин-регулируемых генов

Модель молекулярного механизма регуляции ауксин-регулируемых генов предполагает, что одна молекула транскрипционного регулятора ARF постоянно связана с промотором ауксин-регулируемых генов в области ARE, однако активация таких генов зависит от того, какие димеры будут образовывать связанные с ДНК ARF. Активной структурой является гомодимер ARF–ARF. Он обеспечивает посадку на промотор РНК-полимеразы II и способствует инициации транскрипции. Наличие на промоторе гетеродимерной структуры Aux/IAA–ARF, наоборот, предотвращает экспрессию гена (рис. 51).

В отсутствии ауксинового сигнала в растительных клетках молекулы Aux/IAA присутствуют в высоких концентрациях, и поскольку они конкурируют с ARF за образование димеров, то происходит замещение одной молекулы ARF в гомодимере на Aux/IAA. По этой причине подавляющее большинство ARE-содержащих промоторов связаны с гетеродимерами Aux/IAA–ARF и пребывают в неактивном состоянии. Стимуляция клеток ауксином приводит к дестабилизации молекул Aux/IAA, которые убиквитинируются и вовлекаются в протеолиз.

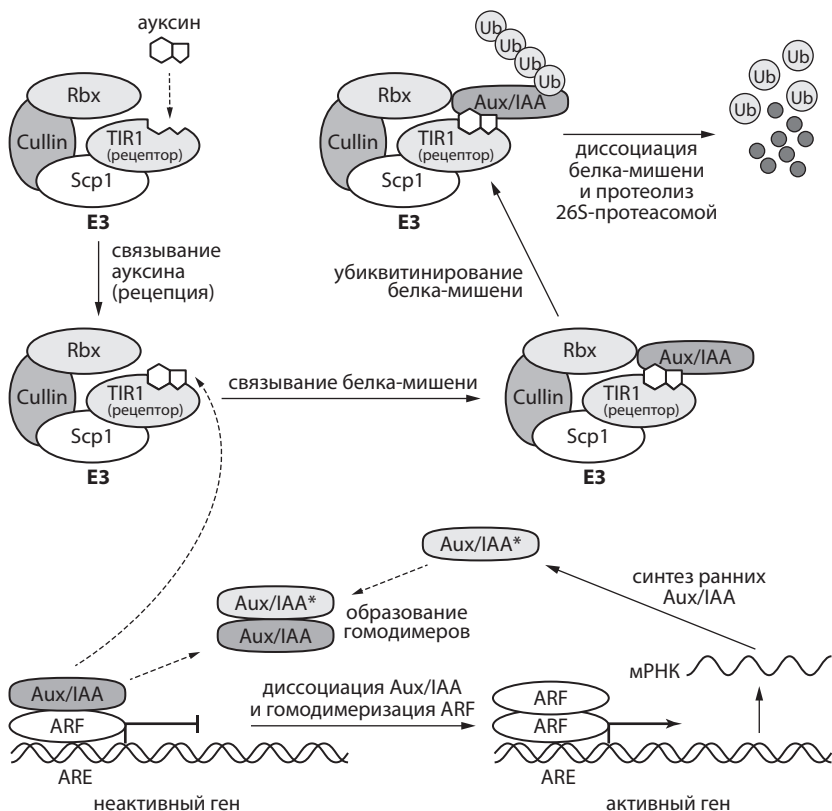


Рис. 51. Механизм регуляции активности ауксин-регулируемых генов

Внутриклеточные рецепторы ауксина F-box типа (TIR1, AFB1–AFB5) являются частью SCF-подобной убиквитинирующей протеиновой лигазы (см. раздел «F-box рецепторы»). Эти лигазы убиквитинируют транскрипционные репрессоры семейства Aux/IAA. Специфическое узнавание и связывание Aux/IAA лигазой находится под контролем гормональной модуляции аффинности F-box белка к мишени. В отсутствии ауксина F-box белок не имеет сродства к Aux/IAA. Связывание гормона с F-box рецептором приводит к образованию поверхности, необходимой для специфического узнавания Aux/IAA. При этом гормон выступает в качестве «молекулярного клея», который обеспечивает гидрофобные взаимодействия между F-box рецептором и мишенью. Таким образом, в результате рецепции ауксина стимулируется убиквитинирование белков Aux/IAA, которые затем разрушаются 26S протеасомным комплексом.

Уровень Aux/IAA под действием ауксина существенно снижается, что способствует образованию гомодимеров ARF–ARF, связанных с ARE-содержащими промоторами генов. Наличие димера ARF на промоторе способствует формированию преинициаторного комплекса и активации транскрипции ауксин-регулируемых генов.

К ауксин-регулируемым генам, экспрессия которых стимулируется на ранних этапах действия гормона, относятся гены, кодирующие белки семейства Aux/IAA (на рис. 51 обозначены Aux/IAA*). В отличие от транскрипционных ингибиторов, ранние Aux/IAA* обладают выраженной способностью к димеризации с репрессорами транскрипции Aux/IAA и при этом они имеют низкое сродство к активаторам ARF. Вновь синтезированные Aux/IAA* связываются с репрессорами, способствуя снижению уровня концентрации репрессоров и, таким образом, повышают вероятность димеризации ARF и последующей активации ауксин-регулируемых генов.

Следовательно, конкурентное ингибирование экспрессии ауксин-регулируемых генов устраняется двумя способами:

- 1) разрушением репрессоров транскрипции Aux/IAA через убиквитин-опосредованный протеолиз;
- 2) путем связывания репрессоров Aux/IAA с Aux/IAA* — белками раннего ответа на воздействие ауксина.

Краткая схема активации

1. В отсутствии ауксина в клетке поддерживается высокая концентрация Aux/IAA. ARF находится преимущественно в составе гетеродимеров Aux/IAA-ARF, ауксин-чувствительные гены репрессированы.
3. В результате рецепции ауксина у F-box рецептора (TIR1) повышается сродство к негативным регуляторам Aux/IAA.
4. Комплекс рецептора с гормоном (TIR1-ИУК) связывает Aux/IAA.
5. Aux/IAA убиквитинируется протеиновой лигазой и затем разрушается 26S протеасомой.
6. В результате снижения концентрации Aux/IAA происходит димеризация ARF на промоторах ауксин-зависимых генов.
7. Иницируется транскрипция.
8. Синтез ранних Aux/IAA* приводит к связыванию репрессоров Aux/IAA и, соответственно, к усилению экспрессии ауксин-регулируемых генов.

4.2. ПЕРЕДАЧА ЦИТОКИНИНОВОГО СИГНАЛА

Рецепция цитокинина растительными клетками осуществляется гистидиновыми рецепторными киназами, которые расположены на плазматической мембране (рис. 52). Передача сигнала происходит в рамках двухкомпонентной многошаговой сигнальной системы, частью которой являются рецепторные His-киназы (см. раздел «Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений»). Связывание экстраклеточного рецепторного CHASE-домена с цитокинином стимулирует димеризацию рецепторов и трансмолекулярное автофосфорилирование гистидинового остатка transmitter домена. Фосфорилирование провоцирует фосфорелейный механизм — последовательный перенос фосфатной группы. Сначала фосфатная группа переносится в рамках рецепторной молекулы с остатка гистидина на остаток аспарагиновой кислоты receiver домена, а затем на остаток гистидина низкомолекулярной фосфотрансферазы

ции, различные регуляторные белки, в том числе обладающие киназной и фосфатазной активностью, а также участвующие в механизме направленного протеолиза белков (убиквитин-конъюгирующий фермент, F-box белок, АТФ-зависимая субъединица протеазы, структурный белок убиквитинирующей лигазы SKP1). Среди ранних генов цитокининового ответа важное место занимают гены, кодирующие регуляторы ответа А-типа. Эти белки также как и RR В-типа участвуют в функционировании двухкомпонентной системы. Существенное повышение концентрации RR-A приводит к тому, что они составляют ощутимую конкуренцию регуляторам ответа В-типа, перехватывая на себя значительную часть фосфатов от гистидиновой фосфотрансферазы. В результате этого снижается уровень транскрипции цитокинин-активируемых генов. Следовательно, RR А-типа можно рассматривать как негативные регуляторы цитокининового ответа.

В активированном состоянии регуляторы ответа А-типа связываются с различными функциональными белками, модулируя их активность. Эти белки могут быть ферментами или регуляторами, через которые возможна дальнейшая передача сигнала.

В растениях *Arabidopsis* под воздействием цитокинина через двухкомпонентную многошаговую сигнальную систему стимулируется экспрессия гена, кодирующего регулятор ответа А-типа ARR4. После трансляции вновь синтезированный ARR4 активируется гистидиновой фосфотрансферазой HPt. Одной из мишеней ARR4 является фитохром В. При связывании PHYB_{fr} с ARR4 стабилизируется активная форма светового рецептора — конверсия PHYB_{fr} в неактивное состояние (PHYB_i) затруднена, что способствует усилению фитохромного эффекта при влиянии цитокининового сигнала.

Воздействие цитокинина на растительные клетки является полифункциональным и приводит к разнообразным эффектам. В целом влияние этого гормона активизирует отдельные звенья метаболизма, а также рост и пролиферацию клеток. Под влиянием цитокинина усиливается синтез белков и нуклеиновых кислот, повышается аттрагирующая способность тканей. Цитокинин обеспечивает подготовку клетки к делению, причем не только за счет повышения общей интенсивности син-

теза. Цитокининовый сигнал обеспечивает активацию экспрессии генов, кодирующих белки, появление которых предваряет митоз. Во-первых, это циклин D-типа — CysD3 — активатор циклин-зависимой киназы, которая необходима для перехода клетки к синтетической фазе клеточного цикла. Во-вторых, гистон H4, образование которого принципиально важно для формирования нуклеосомной структуры хроматина в процессе репликации ДНК.

4.3. ТРАНСДУКЦИЯ ГИББЕРЕЛЛИНОВОГО СИГНАЛА

Активные формы гиббереллина (GA_1 и GA_4) связываются с внутриклеточным цитоплазматическим рецептором GID1 (см. раздел «Гормон-чувствительные липазы»). Взаимодействие с гиббереллином приводит к изменению конформации рецептора и стабилизации его активной структуры. Молекулы рецептора GID1 приобретает способность связываться с DELLA-белками, к которым относятся репрессоры гиббереллинового сигнала. Во взаимодействии GID1 с DELLA-белками молекула гиббереллина выступает в роли «молекулярного клея». В результате присоединения к рецептору в карбокситерминальной части молекулы DELLA-белка происходят существенные конформационные изменения, приводящие к возможности специфического взаимодействия с F-box субъединицей SCF-подобной убиквитинирующей лигазы (рис. 53). DELLA-белок убиквитинируется лигазой и далее подвергается протеолизу.

Разрушение репрессоров гиббереллинового сигнала приводит к активации экспрессии генов MYB-подобных транскрипционных регуляторов (GAMYB), представляющих важную группу транскрипционных активаторов гиббереллин-регулируемых генов, к которым относится группа генов, кодирующих комплекс гидролитических ферментов. Факторы GAMYB специфически связываются с промоторами генов в области *cis*-элемента GARE (GA-Response Elements) и участвуют в сборке преинициаторного комплекса. Функциональная активность GAMYB-белков контролируется не только на уровне транскрипции, но и посттрансляционно. Предполагается возможность регуляции актив-

ности GAMYB-факторов путем их ковалентной модификации посредством фосфорилирования.

Предположительная модель гиббереллинового сигнала

- 1) Гиббереллин (GA) связывается с рецептором GID1.
- 2) Изменение конформации рецептора приводит к связыванию DELLA-белков (негативных регуляторов гиббереллинового сигнала).

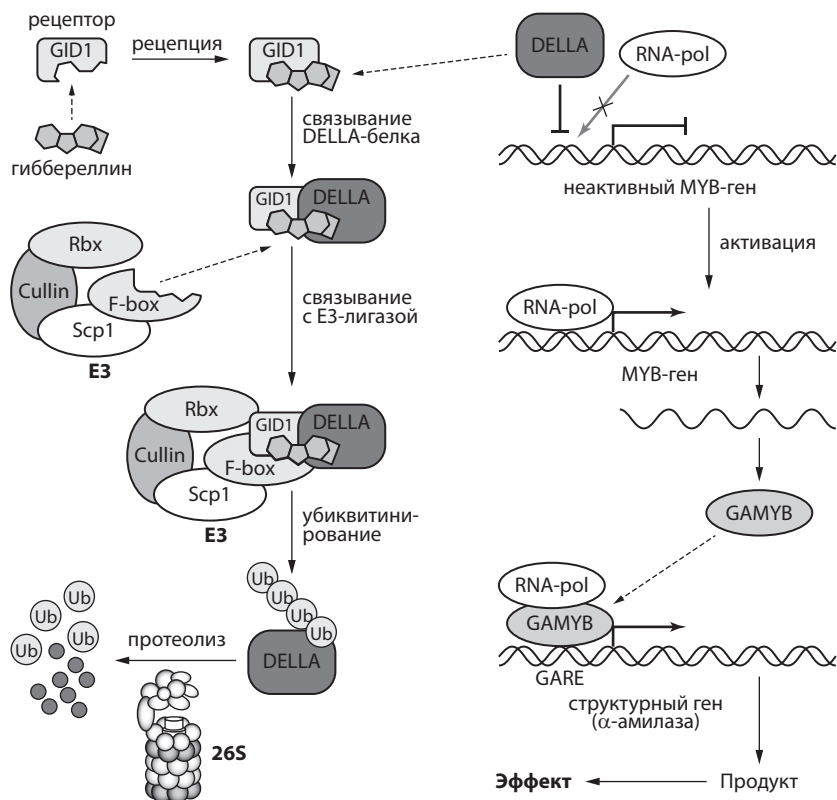


Рис. 53. Механизм трансдукции гиббереллинового сигнала.

Условные обозначения:

GID1 — рецептор гиббереллина;

DELLA — DELLA-белок, репрессор гиббереллинового сигнала;

RNA-pol — РНК-полимераза II;

GAMYB — активатор транскрипции

- 3) Образование комплекса GID1(GA)–DELLA приводит к существенным конформационным изменениям в карбокситерминальной части DELLA-белков.
- 4) DELLA-белки специфически взаимодействуют с F-box субъединицей убиквитинирующей лигазы.
- 5) DELLA-белки убиквитинируются и подвергается протеолизу.
- 6) Разрушение DELLA-белков приводит к дерепрессии гиббереллинового сигнала.
- 7) Активируются гены, кодирующие транскрипционные активаторы GAMYB.
- 8) Транскрипционные активаторы GAMYB связываются с GARE-мотивом гиббереллин-регулируемых генов и совместно с другими активаторами инициируют их экспрессию.

4.4. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА АБК ЧЕРЕЗ START-ДОМЕН РЕЦЕПТОРЫ

Внутриклеточные рецепторы АБК PYR/PYL/RCAR (START-домен рецепторы) в отсутствии гормона находятся преимущественно в виде гомодимеров (рис. 54). В таком состоянии рецепторы не способны взаимодействовать со своими мишенями. Протеиновая фосфатаза PP2C, которая является мишенью рецептора, находится в конститутивно активном состоянии и путем дефосфорилирования ингибирует протеинкиназу SnRK2 — позитивный регулятор АБК-зависимых генов. Так как SnRK2 не проявляет каталитическую активность и не фосфорилирует субстрат, АБК-сигнал поддерживается в репрессированном состоянии.

Связывание АБК с рецептором, сопровождающееся изменением его конформации, приводит к диссоциации рецепторного димера. Мономеры рецептора, связанные с гормоном, взаимодействуют с реакционным центром PP2C и конкурентно ингибируют его активность. Репрессия фосфатазы PP2C приводит к дерепрессии АБК-сигнала. Протеинкиназа SnRK2 активируется, автофосфорилируется по специфическим сайтам и приобретает способность взаимодействовать со своими мишенями. SnRK2 фосфорилирует группу транскрипционных факторов

активаторов АБК-регулируемых генов, например ABF2 (ABA-Responsive Element Binding Factor 2).

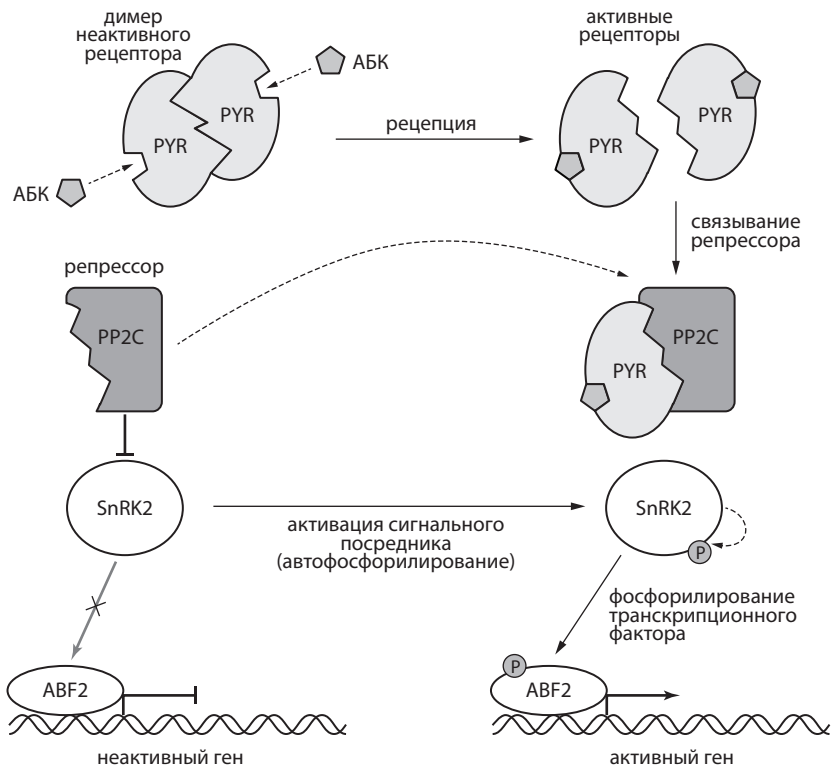


Рис. 54. Механизм трансдукции сигнала абсцизовой кислоты

4.5. ВОСПРИЯТИЕ И ТРАНСДУКЦИЯ ЭТИЛЕНОВОГО СИГНАЛА

Рецепция этилена растительными клетками осуществляется на плазматической мембране рецепторными гистидиновыми киназами, обладающими выраженной гомологией с двухкомпонентными рецепторами бактерий и растений (см. раздел «Этиленовые рецепторы»). Рецепторы этилена формируют стабильные

димерные группы за счет дисульфидных связей в области экстраклеточного N-терминального участка. В отсутствие гормона рецепторы находятся в конститутивно активном состоянии.

Активный рецептор поддерживает следующий компонент сигнальной системы — серин/треониновую киназу *CTR1* — в активном состоянии (рис. 55). Считается, что в этиленовом сигнальном механизме не функционирует фосфотрансферазный механизм. Киназа *CTR1* непосредственно взаимодействует с transmitter-доменом рецептора (на рис. 55 — *ETR1*), поэтому состояние рецептора непосредственно влияет на функциональную активность *CTR1*.

CTR1 является негативным регулятором этиленового сигнала. По этой причине в отсутствии гормона, сигнальная система находится в репрессированном состоянии, несмотря на активный рецептор. Связывание этилена рецептором приводит к ингибированию рецептора и киназы *CTR1*. В результате дерепрессируется сигнальная система этилена. Мишени *CTR1* не установлены, однако известно, что после репрессии этой киназы одним из первых активируется мембранный белок *EIN2* (*ethylene insensitive 2*). *EIN2* относится к семейству трансмембранных эукариотических белков, которые 12 раз пересекают мембрану. По своей структуре *EIN2* близок к трансмембранным переносчикам двухвалентных ионов металлов у животных и обладает характерными свойствами переносчика ионов металлов. Передача сигнала от *EIN2* к следующему компоненту, регулятору транскрипции *EIN3*, на данный момент не выяснена. Непосредственно эти компоненты не могут взаимодействовать друг с другом, поскольку первый локализуется в плазматической мембране, а второй является ядерным белком. Существует предположение, что *EIN2* влияет опосредованно на *EIN3* (*ethylene insensitive 3*) через изменение равновесия ионов металлов. Таким образом, между *EIN2* и *EIN3*, по-видимому, функционируют вторичные мессенджеры.

Транскрипционный фактор *EIN3*, а также родственные ему белки *EIL1* и *EIL2* (*EIN3-like 1* и *2*), активируют гены факторов этиленового ответа *ERF* (*ethylene response factor*), кодирующие транскрипционные факторы, которые принято называть *EREBP* (*ERE-binding proteins*), то есть белки, связывающие эти-

лен-чувствительные *cis*-активные элементы (ERE — ethylene response element). Наличие этих элементов является характерной чертой промоторов генов, которые индуцируются этиленовым сигналом. Транскрипционные факторы EREBP активируют

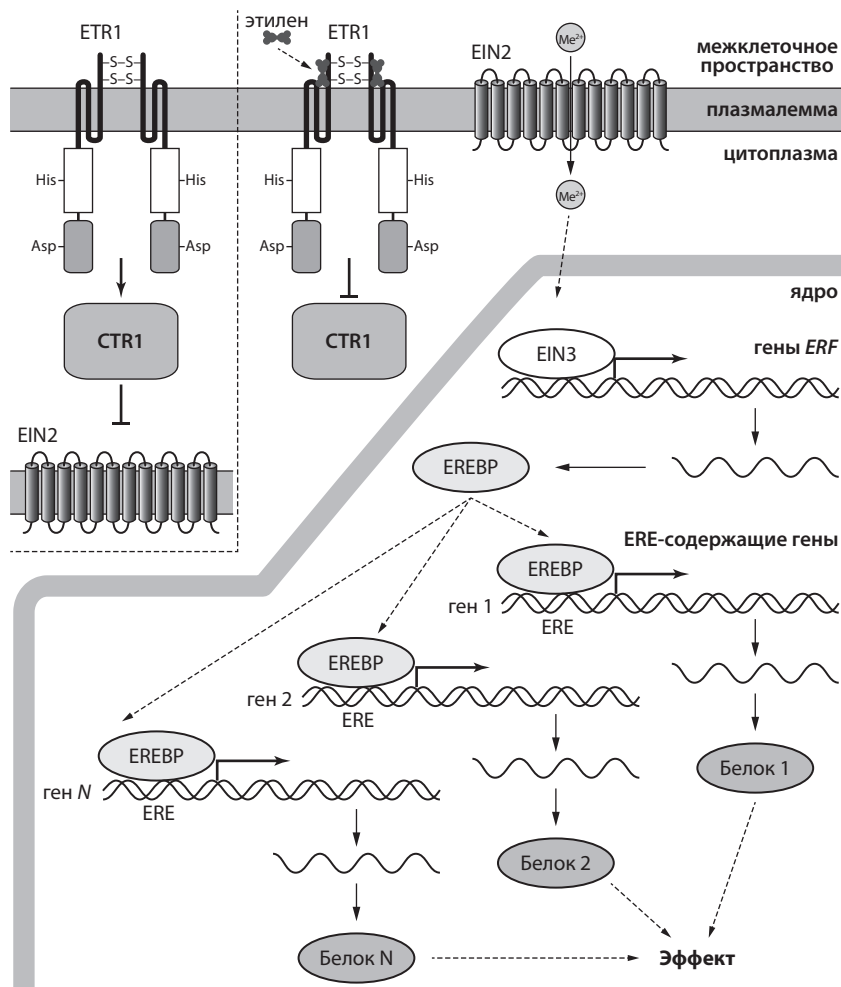


Рис. 55. Механизм трансдукции этиленового сигнала

группу этилен-регулируемых генов, кодирующих функциональные белки, от которых зависит развитие соответствующей реакции. В зависимости от совокупности поступающих в ядро сигналов проявляется широкий диапазон ответа на этилен. Это может выражаться в скорости индукции ERE-содержащих генов, а также в разной активности экспрессии. Активация определенных генов имеет фазо-специфичный характер, то есть зависит от периода развития организма.

Краткая схема сигнальной системы этилена

1. В отсутствии гормона рецептор находится в конститутивно активном состоянии и активирует серин/треониновую киназу CTR1.
2. Активный CTR1 репрессирует сигнальную систему этилена.
3. В результате рецепции этилена рецептор и киназа CTR1 инактивируются.
4. Дерепрессированный мембранный белок EIN2 способствует изменению концентрации ионов металлов в цитоплазме и нуклеоплазме.
5. Активируются транскрипционные факторы EIN3 и EIL1/2, стимулирующие экспрессию генов *ERF*, кодирующих факторы этиленового ответа.
6. Продукты генов *ERF*, транскрипционные факторы EREBP, связываются с ERE-содержащими промоторами генов.
7. Экспрессия ERE-содержащих генов приводит к синтезу комплекса функциональных белков, принимающих участие в развитии соответствующей реакции.

4.6. РЕЦЕПЦИЯ И ТРАНСДУКЦИЯ БРАССИНОСТЕРОИДНОГО СИГНАЛА

Рецепция brassinosterоидов у растений осуществляется рецепторными киназами, локализованными в плазмалемме. У *Arabidopsis* brassinosterоидный рецептор BRI1 принадлежит большому семейству растительно-специфичных серин/треониновых LRR-рецептор-подобных киназ (S/T LRR-RLK). Хотя рецептор BRI1 имеет строение типичной серин/треониновой рецептор-подобной киназы, он проявляет свойства киназы двойной

специфичности: помимо остатков серинов и треонинов, BRI1 фосфорилирует также остатки тирозинов.

В отсутствие лиганда неактивный рецептор BRI1 тесно контактирует с молекулами двух типов: ингибитором киназной активности BKI1 и рецептор-подобной цитоплазматической киназой BSK (рис. 56).

1. BKI1 (**BRI1 kinase inhibitor 1**) — негативный регулятор BRI1. Ингибитор BKI1 имеет повышенное сродство к неактивной форме рецептора и, связываясь с ним, поддерживает его в неактивном состоянии.
2. BSK (**BR-Signaling Kinase**) — рецептор-подобная цитоплазматическая киназа (**RLCK — Receptor-Like Cytoplasmic Kinases**), через которую осуществляется передача сигнала от BRI1. Связанная с рецептором BRI1, BSK находится в неактивном состоянии.

Стимуляция рецептора BRI1 лигандом повышает аффинность рецепторов друг к другу. Брассинолид индуцирует конформационные изменения, которые приводят к стабилизации димерных форм BRI1₂. При сближении рецепторов BRI1 стимулируется их киназная активность, которая первоначально направлена на молекулу ингибитора BKI1. Фосфорилированный BKI1 диссоциирует от рецептора и перераспределяется в цитозольную фракцию. Высвобожденные от ингибитора рецепторы формируют гомодимеры (возможно образование олигомерных структур) и взаимно фосфорилируют друг друга. Автофосфорилирование недостаточно для полной активации BRI1 киназы. Необходима ассоциация с корецептором BAK1 (**BRI1-associated kinase 1**), с которым BRI1 вступает во взаимное трансфосфорилирование.

Корецептор BAK1 не может взаимодействовать с неактивным рецептором, так как этому мешает ингибитор BKI1. Кроме того, для эффективного связывания необходима соответствующая подготовка поверхности рецептора, которая достигается путем трансмолекулярного автофосфорилирования BRI1. После диссоциации ингибитора и начального фосфорилирования рецептора BAK1 связывается с BRI1. В образованных гетероолигомерах BAK1 и BRI1 трансфосфорилируют друг друга по специфическим аминокислотным остаткам.

Активированный BRI1 фосфорилирует рецептор-подобную цитоплазматическую киназу BSK1. В фосфорилированном состоянии BSK1 диссоциирует от рецептора и в цитоплазме специфически взаимодействует с неактивной формой фосфатазы BSU1 (Bri1 Suppressor 1), активируя ее путем фосфорилирования. Фосфорилированная BSU1 проявляет свою активность в цитоплазме и ядре, куда частично транспортируется после активации. В цитоплазме и нуклеоплазме BSU1 дефосфорилирует свою мишень — киназу BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), обращая в неактивное состояние (рис. 57).

Киназа BIN2 является негативным регулятором brassино-стероидного сигнального пути. В отсутствие brassिनостероида

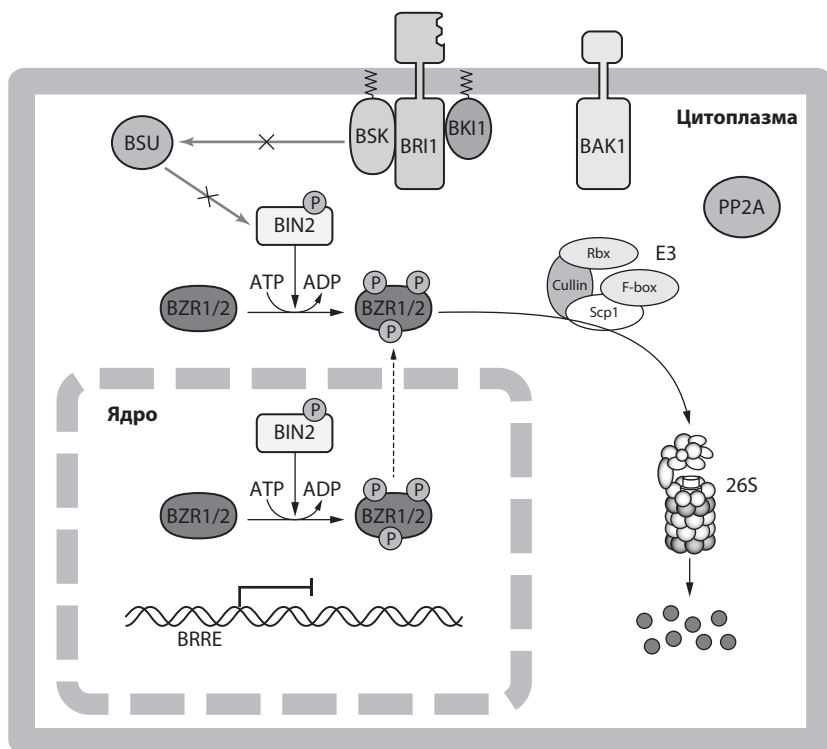


Рис. 56. Сигнальная система brassиностероида в отсутствие лиганда

BIN2 конститутивно фосфорилирует транскрипционные регуляторы BZR1 (Brassinazole Resistant 1) и BES1 (BRI1-EMS-Suppressor 1) — модуляторы активности brassиностероид-регулируемых генов. BES1 также обозначают BZR2.

Фосфорилирование факторов BES1 и BZR1 оказывает различные эффекты на их функции:

- 1) ингибируется ДНК-связывающая активность;
- 2) стимулируется экспорт BES1 и BZR1 из ядра в цитоплазму (снижается их уровень в нуклеоплазме);
- 3) гиперфосфорилированные белки BES1 и BZR1 вовлекаются в убиквитин-опосредованный протеолиз (разрушаются 26S протеасомой).

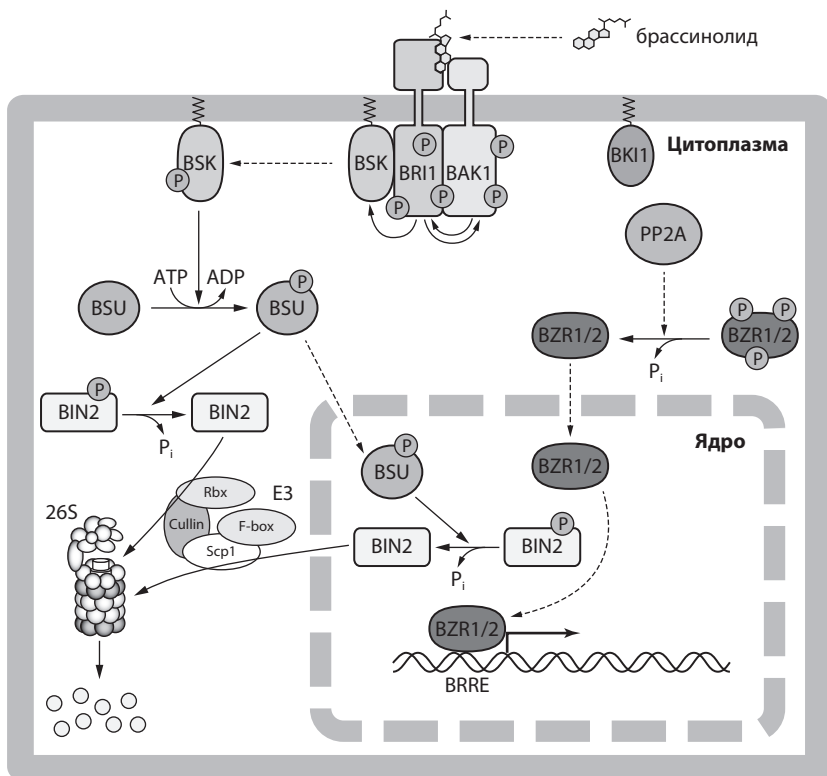


Рис. 57. Механизм трансдукции brassиностероидного сигнала

Фосфорилирование само по себе является необходимым, но недостаточным для деградации BES1 и BZR1. Только гиперфосфорилированная форма этих белков является существенной для их деградации.

Инактивация киназы BIN2 фосфатазой BSU1 приводит к снижению уровня фосфорилирования BES1 и BZR1. Дефосфорилирование BES1 и BZR1 катализируется фосфатазой PP2A. Дефосфорилированные (гипофосфорилированные) BES1 и BZR1 связываются с промоторами brassinosteroid-регулируемых генов и совместно с другими регуляторами модулируют их экспрессию.

Транскрипционный регулятор BZR1 связывается с промоторами генов в области BRRE (**BR**-response element) — элемента brassinosteroidного ответа, для которого характерна консервативная последовательность CGTGT/CG. Многие гены, имеющие BRRE, активны в отсутствие brassinоида и ингибируются под действием этого гормона. Например, к BRRE-содержащим генам относятся ключевые гены биосинтеза brassinостероидов. Brassinостероиды контролируют собственный гомеостаз по принципу обратной негативной связи посредством репрессии таких генов. Фактор BZR1 участвует также в активации генов, экспрессия которых важна для стимуляции ростовых процессов. Активирующее действие BZR1 проявляется при его взаимодействии с другими регуляторами транскрипции.

Краткое описание предполагаемого механизма brassinостероидного сигнала

- 1) В отсутствие brassinостероида рецептор BRI1, локализованный в плазмалемме, связан с ингибитором BKI1 и рецептор-подобной цитоплазматической киназой BSK. Киназа BIN2 проявляет конститутивную активность и фосфорилирует транскрипционные факторы BES1 и BZR1. Гиперфосфорилированные формы этих белков подвергаются убиквитин-зависимому протеолизу.
- 2) Связывание brassinостероида с рецептором BRI1 стабилизирует димерные формы рецептора и стимулирует киназную активность.
- 3) BRI1 фосфорилирует ингибитор BKI1, который диссоциирует от рецептора.

- 4) Высвобожденные от ингибитора рецепторы димеризуются и автофосфорилируют друг друга. В результате формируется поверхность для связывания с корецептором BAK1.
- 5) Ассоциированные BRI1 и BAK1 трансфосфорилируют друг друга. Это приводит к полной активации BRI1.
- 6) Рецептор BRI1 активирует киназу BSK путем фосфорилирования.
- 7) Киназа BSK диссоциирует от рецептора и фосфорилирует фосфатазу BSU1, переводя в активное состояние.
- 8) Фосфатаза BSU1 дефосфорилирует киназу BIN2, инактивируя ее.
- 9) Транскрипционные регуляторы BES1 и BZR1 в отсутствии активности BIN2 дефосфорилируются фосфатазой PP2A и приобретают стабильное гипофосфорилированное состояние.
- 10) Факторы BES1 и BZR1 связываются со специфическими элементами промоторов brassinosteroid-регулируемых генов и совместно с другими регуляторами транскрипции модулируют экспрессию генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васюкова Н. И. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений / Н. И. Васюкова, О. Л. Озерецковская // Физиология растений. — 2009. — Т. 56, № 5. — С. 643–653.
2. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Часть 1. Классификация и структура / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 2–9.
3. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Часть 2. Структура и механизм функционирования / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 10–16.
4. Колупаев Ю. Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец. — К. : Основа, 2010. — 352 с.
5. Крутецкая З. И. Механизмы внутриклеточной сигнализации : монография / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова. — СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2003. — 208 с.
6. Кулаева О. Н. Восприятие и преобразование гормонального сигнала у растений / О. Н. Кулаева // Физиология растений. — 1995. — Т. 42, №5. — С. 661–671.
7. Ломоватская Л. А. Аденилатциклазная сигнальная система растений / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Филинова, О. В. Рыкун // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер.: Біологія. — 2011. — Вип. 2 (23). — С. 6–24.
8. Лыло В. В. Убиквитинирование протеинов и его функции в клетке / В. В. Лыло // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 6. — С. 5–13.
9. Льюин Б. Гены : пер. с англ. / под ред. Г. П. Георгиева. — М. : Мир, 1987. — 544 с.
10. Новикова Г. В. В начале пути: восприятие АБК и передача ее сигнала у растений / Г. В. Новикова, Н. С. Сте-

- панченко, А. В. Носов, И. Е. Мошков // Физиологии растений. — Т. 56, № 6. — 2009. — С. 806–823.
11. Пермяков Е. А. Кальций-связывающие белки / Е. А. Пермяков. — М. : Наука, 1993. — 192 с.
 12. Сорокин А. В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А. В. Сорокин, Е. Р. Ким, Л. П. Овчинников // Успехи биологической химии. — 2009. — Т. 49. — С. 3–76.
 13. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. — М. : Наука, 2002. — 294 с.
 14. Alberts B. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. — 4-th edition. — Garland Science Publishing, 2002.
 15. Apel K. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — V. 55. — P. 373–399.
 16. Bae G. Decoding of Light Signals by Plant Phytochromes and Their Interacting Proteins / G. Bae, G. Choi // Annu. Rev. Plant Biol. — 2008. — V. 59. — P. 281–311.
 17. Benveniste P. Biosynthesis and accumulation of sterols / P. Benveniste // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — V. 55. — P. 429–457.
 18. Besson-Bard A. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants / A. Besson-Bard, A. Pugin, D. Wendehenne // Annu. Rev. Plant Biol. — 2008. — V. 59. — P. 21–39.
 19. Bleecker A. B. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants / A. B. Bleecker, H. Kende // Annu. Rev. Cell and Dev. Biol. — 2000. — V. 16. — P. 1–18.
 20. Boss W. F. Phosphoinositide Signaling / W. F. Boss, Im Yang Ju // Annu. Rev. Plant Biol. — 2012. — V. 63. — P. 409–429.
 21. Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone / J. Browse // Annu. Rev. Plant Biol. — 2009. — V. 60. — P. 183–205.
 22. Bush D. S. Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling / D. S. Bush // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1995. — V. 46. — P. 95–122.
 23. Campbell W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiol-

- ogy / W. H. Campbell // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1999. — V. 50. — P. 277–303.
24. Chapman E. J. Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants / E. J. Chapman, M. Estelle // *Annu. Rev. Genet.* — 2009. — V. 43. — P. 265–285.
25. Chen M. Light signal transduction in higher plants / M. Chen, J. Chory, C. Fankhauser // *Annu. Rev. Genet.* — 2004. — 38. — P. 87–117.
26. Christie J. M. Phototropin Blue-Light Receptors / J. M. Christie // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2007. — V. 58. — P. 21–45.
27. Clouse S. D., Sasse J. M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development / S. D. Clouse, J. M. Sasse // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1998. — V. 49. — P. 427–451.
28. Creelman R. A. Biosynthesis and action of jasmonates in plants / R. A. Creelman, J. E. Mullet // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1997. — 48. — P. 355–381.
29. Cutler S. R. Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network / S. R. Cutler, P. L. Rodriguez, R. R. Finkelstein, S. R. Abrams // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 651–679.
30. D'Agostino I. V. Molecular mechanisms of cytokinin action / I. V. D'Agostino, J. J. Rieber // *Current Opinion in Plant Biology.* — 1999. — No 2. — P. 359–364.
31. Dodd A. N. The Language of Calcium Signaling / A. N. Dodd, J. Kudla, D. Sanders // *Annu. Rev. Plant Biol.* — V. 61. — P. 593–620.
32. Feussner I. Lipxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2002. — V. 53. — C. 275–297.
33. Fruman D. A. Phosphoinositide kinases / D. A. Fruman, R. E. Meyers, L. C. Cantley // *Annu. Rev. Biochem.* — 1998. — V. 67. — P. 481–507.
34. Gehring C. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling — past and present / C. Gehring // *Cell Communication and Signaling.* — 2010. — V. 8. — P. 15.
35. Grün S. Nitric oxide and gene regulation in plants / S. Grün, C. Lindermayr, S. Sell, J. Durner // *Journal of Experimental Botany.* — 2006. — V. 57. — No. 3. — P. 507–516.

36. Haberer G. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone / G. Haberer, J. J. Kieber // *Plant Physiol*, February 2002. — V. 128. — P. 354–362.
37. Hardie D. G. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions / D. G. Hardie // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1999. — V. 50. — P. 97–131.
38. Hare P. D. Molecular basis of cytokinin action / P. D. Hare, van J. Staden // *Plant Growth Regulation*. — 1997. — V. 23. — P. 41–78.
39. Harper J. F. Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases / J. F. Harper, G. Breton, A. Harmon // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2004. — V. 55. — P. 263–288.
40. Jenkins G. I. Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation / G. I. Jenkins // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2009. — V. 60. — P. 407–431.
41. Johnson P. R. The ethylene gas signal transduction pathway: A Molecular Perspective / P. R. Johnson, J. R. Ecker // *Annu. Rev. Genet.* — 1998. — V. 32. — P. 227–254.
42. Kachroo A. Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense / A. Kachroo, P. Kachroo // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2009. — V. 47. — P. 153–176.
43. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins / T. Kakimoto // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 605–627.
44. Kawasaki H. Calcium-binding proteins / H. Kawasaki, R. Kretsinger // *Protein Profile*. — 1994. — V. 1(4). — 343–390.
45. Kieber J. J. The ethylene response pathway in Arabidopsis / J. J. Kieber // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1997. — V. 48. — P. 277–296.
46. Kim J.-M. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis / J.-M. Kim, H. Liu, M. Tazaki et al. // *J. Cell Biol.* — 2003. — V. 162. — P. 37–46.
47. Kim T.-W. Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors / T.-W. Kim, Z.-Y. Wang // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 681–704.
48. Klee H. J. Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis / H. J. Klee // *Plant Physiology* — 2004 — V. 135. — P. 660–667.

49. Klingler J. P. ABA receptors the START of a new paradigm in phytohormone signaling / J. P. Klingler, G. Batelli, J.-K. Zhu // *Journal of Experimental Botany*. — 2010. — V. 61, No. 12 — P. 3199–3210.
50. Kosuta S. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes / S. Kosuta, S. Hazledine, J. Sun, H. Miwa, R. J. Morris et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — V. 105. — P. 9823–9828.
51. Lamattina L. Nitric Oxide: The versatility of an extensive signal molecule annual review of plant biology / L. Lamattina, Garscha-C. Mata, M. Graziano, G. Pagnussat // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 109–136.
52. Lau O. S. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later / O. S. Lau, X. W. Deng // *Trends Plant Sci.* — 2012. — V. 17(10). — 584–593.
53. Leung J. Absciscic acid signal transduction / J. Leung, J. Giraudat // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1998. — V. 49. — P. 199–222.
54. Leyser O. Molecular genetics of auxin signaling / O. Leyser // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2002. — V. 53. — P. 377–398.
55. Lohrmann J. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators / J. Lohrmann, K. Harter // *Plant Physiol*, 2002 — V. 128 — P. 363–369.
56. Luan S. Protein phosphatases in plants / S. Luan // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 63–92.
57. Lumba S. Plant Nuclear Hormone Receptors: A Role for Small Molecules in Protein-Protein Interactions / S. Lumba, S. Cutler, P. McCourt // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2010. — V. 26. — P. 445–469.
58. Maathuis F. J. cGMP modulates gene transcription and cation transport in Arabidopsis roots / F. J. Maathuis // *Plant J.* — 2006. — V. 45 — P. 700–711.
59. Marion-Poll A. Absciscic acid synthesis, metabolism and signal transduction / A. Marion-Poll, J. Leung // *Plant Hormone Signaling*. — Blackwell Publishing Ltd, 2006. — P. 1–35.
60. Martin T. F. J. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: Common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking / T. F. J. Martin // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 1998. — V. 14. — P. 231–64.

61. Martinez-Atienza J. Plant cyclic nucleotide signalling: facts and fiction / J. Martinez-Atienza, C. van Ingelgem, L. Roef, F. J. M. Maathuis // *Plant Signaling & Behavior*. — 2007. — V. 2. — P. 540–543.
62. Matsubayashi Y. Peptide Hormones in Plants / Y. Matsubayashi, Y. Sakagami // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2006. — V. 57. — P. 649–74.
63. McCourt P. Genetic analysis of hormone signaling / P. McCourt // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1999. — V. 50. — P. 219–243.
64. Meier S. Emerging roles in plant biotechnology for the second messenger cGMP — guanosine 3',5'-cyclic monophosphate / S. Meier, C. Gehring // *African Journal of Biotechnology*. — 2006. — V. 5 (19). — P. 1687–1692.
65. Meier S. Deciphering cGMP signatures and cGMP-dependent pathways in plant defence / S. Meier, L. Madeo, L. Ederli, L. Donaldson, S. Pasqualini, C. Gehring // *Plant Signaling & Behavior*. — 2009. — V. 4, No. 4. — P. 307–309.
66. Meijer H. J. G. Phospholipid-Based Signaling In Plants / H. J. G. Meijer, T. Munnik // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 265–306.
67. Mockaitis K. Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm / K. Mockaitis, M. Estelle // *Annu. Rev. Cell and Dev. Biol.* — 2008. — V. 24. — P. 55–80.
68. Mok D. W. S. Cytokinin metabolism and action / D. W. S. Mok, M. C. Mok // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 2001. — V. 52. — P. 89–118.
69. Müller S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin / S. Müller, C. Hoege, G. Pyrowolakis, S. Jentsch // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. — 2001. — V. 2, No 3. — P. 202–213.
70. Pandey S. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in arabidopsis / S. Pandey, D. C. Nelson, S. M. Asmann // *Cell*. — 2009. — V. 136. — P. 136–148.
71. Park K.-Y. A Role for Phosphatidylinositol 3-Phosphate in Abscisic Acid-Induced Reactive Oxygen Species Generation in Guard Cells / K.-Y. Park, J.-Y. Jung, J. Park et al. // *Plant Physiology*. — 2003. — V. 132. — P. 92–98.

72. Pitcher J. A. G Protein-coupled receptor kinases / J. A. Pitcher, N. J. Freedman, R. J. Lefkowitz // *Annu. Rev. Biochem.* — 1998. — V. 67. — P. 653–92.
73. Ribeiro R. C. J. The nuclear hormone receptor gene superfamily / R. C. J. Ribeiro, P. J. Kushner, J. D. Baxter // *Annual Review of Medicine.* — 1995. — V. 46. — P. 443–453.
74. Richards D. E. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling / D. E. Richards, K. E. King, T. Ait-ali, N. P. Harberd // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 2001. — V. 52. — P. 67–88.
75. Rober-Kleber N. Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development / N. Rober-Kleber, J. T. P. Albrechtová, S. Fleig et al. // *Plant Physiol.* — 2003. — V. 131. — P. 1302–1312.
76. Rodriguez M. C. S. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants / M. C. S. Rodriguez, M. Petersen, J. Mundy // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 621–649.
77. Ryan C. A. Polypeptide Hormones / C. A. Ryan, G. Pearce // *Plant Physiol.* — 2001 — V. 125. — P. 65–68.
78. Sakakibara H. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation / H. Sakakibara // *Annu. Rev. Plant Biol.* — V. 57. — P. 431–449.
79. Schafer B. W. The S-100 Family of EF-hand Calcium-binding Proteins: Functions and Pathology / B. W. Schafer, C. W. Heizmann // *Trends Biochem. Sci.* — 1996. — V. 21. — P. 134–140.
80. Smalle J. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway / J. Smalle, R. D. Vierstra // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2004. — V. 55. — P. 555–590.
81. Smith R. D. Plant Protein Phosphatases / R. D. Smith, J. C. Walker // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1996. — V. 47. — P. 101–125.
82. Sun T. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants / T. Sun, F. Gubler // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2004. — V. 55. — P. 197–223.
83. Thomas S. G. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short / S. G. Thomas, T. Sun // *Plant Physiology.* — 2004. — V. 135. — P. 668–676.

84. Turner B. M. Cellular memory and the histone code / B. M. Turner // Cell. — 2002. — V. 111. — P. 285–291.
85. Ueguchi-Tanaka M. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants / M. Ueguchi-Tanaka, M. Nakajima, A. Motoyuki, M. Matsuoka // Annu. Rev. Plant Biol. — 2007. — V. 58. — P. 183–198.
86. Urao T. Two-component systems in plant signal transduction / T. Urao, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki // Trends in plant science. — 2000. — V. 5, No. 2. — 67–74.
87. Vert G. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants / G. Vert, J. L. Nemhauser, N. Geldner, F. Hong, J. Chory // Annu. Rev. Cell and Dev. Biol. — V. 21. — P. 177–201.
88. Wang X. Plant Phospholipases / X. Wang // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 211–231.
89. Wang Z.-Y. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis / Z.-Y. Wang, M.-Y. Bai, E. Oh, J.-Y. Zhu // Annu. Rev. Genet. — 2012. — V. 46. — P. 699–722.
90. Yang Z. Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants / Z. Yang // The Plant Cell. — 2002. — V. 14. — P. S375–S388.
91. Zielinski R. E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants / R. E. Zielinski // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1998. — V. 49. — P. 697–725.

УКАЗАТЕЛЬ ТЕРМИНОВ

А

абсцизовая кислота (АБК) 43, 56, 57, 61, 65, 66, 99, 101, 102, 109, 123, 150, 156, 158, 160, 168, 172, 183, 194, 195
адаптерные молекулы 9, 11, 15–17, 20, 23, 29, 94
аденилатциклаза 97, 133–136, 138
аллен-оксид синтаза 115, 116
аллен-оксид циклаза 115, 116
аргинин 122, 124, 125
ауксин 30, 40, 43, 187–189 см. также индолил-3-уксусная кислота (ИУК)

Б

белки, активирующие GTPазу 95, 96
белок, активирующий катаболитный ген (CAP) 138, 139
брасиностероид 39, 43, 44, 61, 169, 198, 202

В

вторичные мессенджеры 10, 11, 14, 15, 17, 37

Г

гиббереллин 43, 63, 64, 75, 158, 192, 193
гибридные гистидиновые киназы 48–52, 189
13-гидроксипероксилиноленовая кислота 115, 116
гистидиновая фосфотрансфераза 51, 52, 162, 190, 191
гистидиновые рецепторные киназы 47–52
гликозилфосфатидилинозитол-специфичные PLC 103
глутамат-рецептор-подобные Ca^{2+} -каналы 154
глутатион 129
гормон-чувствительные липазы 63–64
гуанилатциклаза 127, 142, 143
гуанин-нуклеотид диссоциирующий ингибитор 95, 96

Д

двупоровые Ca^{2+} -каналы 154
двухкомпонентные сигнальные системы

- двухкомпонентные сигнальные системы бактерий 48–50
- двухкомпонентные сигнальные системы растений 50–52

дерепрессорные сигнальные механизмы 20
диацилглицерол 110, 112, 113, 119
диацилглицеролкиназа 112

диацилглицерол-пирофосфат 112, 113

Ж

жасмоновая кислота 101, 115–117, 172

И

изолейцин-жасмонат 62, 63, 112, 117

импортин 83

индолил-3-уксусная кислота (ИУК) 43, 63, 189 см. также ауксин

инозитол-1,4,5-трифосфат 107–111, 119, 152, 153

инозитол-гексакисфосфат 112, 153

инозитол-пентакисфосфат 107, 110, 112, 153

ион нитрозония 121, 126

ионные каналы, открываемые циклическими нуклеотидами (CNGC) 59, 140, 141, 153, 154

ионы Ca^{2+} 100, 101, 104, 109–111, 113, 114, 119, 131, 135, 140, 141, 143–159, 164–167, 178

К

казеиновые киназы

- СК1 174

- СК2 174, 175

кальбиндин 147

кальмодулин 114, 124, 135, 141, 147–149, 154–159, 164, 178

кальций-зависимые протеиновые киназы (CDPK) 157, 164, 165

кальцинейрин В подобные белки 158–160, 166

каскадный механизм 15–20, 69, 99

киназа CTR1 54, 176, 196, 198

конечные мишени 11

корцептор 45–47, 183, 199, 203

криптохром 74–77

- cry1 74, 75

- cry2 74, 75

- cry3 74, 75

Л

легемоглобин 128

лизофосфолипаза А 99, 118

линоленовая кислота 115–117, 120

липоксигеназа 115, 116

М

метакаспаза 9 130

метилжасмонат 117

метионин-аденозилтрансфераза 130

мио-инозитол 105, 107

Н

нитрат-редуктаза 122, 123
нитрирование тирозина 127, 131
нитрит-NO редуктаза 123
нитрозилирование металлов 126, 127
нитрозоглутатион 129
нитроксиланион 121
нуклеопорин 50 83

О

оксид азота (II) 120–132
оксигемоглобин 128
12-оксофитодиеновая кислота 115, 116
12-оксофитомоноеновая кислота 115, 116
октадеканойдный путь 102, 114–117
ответные реакции 9

- быстрые реакции 9
- медленные реакции 10

П

пентадиеновая система 115
первичные мессенджеры 40, 89
пероксинитрит 121, 122, 126–128
полифосфоинозитид-специфичные PLC 103, 104, 109–113
потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы (VGCC) 152
протеинкиназа А 137, 138, 153
протеиновые фосфатазы 177–184

- DsPTP 180, 184
- KAPP 177, 183
- PP1 177–183
- PP2 177, 178
- PP2A 177–183
- PP2B 177–179
- PP2C 177–183, 194
- PPM 177, 183
 - ABI1 183
 - ABI2 65, 183
- PPP 177
- PTP 177, 180, 183, 184

протеасома

- 19S частица (регуляторная) 31–34
- 20S частица (каталитическая) 31–34
- 26S протеасома 22, 30–34, 189
- 30S протеасома 31

Р

регуляторы ответа 48–52, 190, 191
• RR-A (регуляторы ответа А-типа) 50, 51, 85, 191
• RR-B (регуляторы ответа В-типа) 50, 51, 190
рецептор 9, 10, 30, 35–87
рецептор-подобные киназы 44–47, 169–171, 198
рецепторы UV-B 68
рецепторы-каналоформеры 57–59

С

световые рецепторы (фоторецепторы) 67–87
серин 46, 72, 73, 81, 114, 137, 174, 175
серин/треониновые протеиновые киназы 163–176
супероксид 121, 126

Т

тирозин 46, 120, 122, 127, 131, 171, 173, 184
транскрипционные факторы 10, 11, 17–19, 50, 59, 60, 63, 86, 157, 158, 165, 176, 185, 192, 195, 196, 201
• ABF1 158
• ABF2 195
• ARF 185–189
• Aux/IAA 30, 63, 185–189
• BES1 176, 201–203
• BZR1 176, 201–203
• CAMTA 157
• CBF 156
• CO (CONSTANCE) 75
• EIN3 196, 198
• EIN3-like 196
• EREBP 197, 198
• GAMYB 192–194
• HFR1 86
• HY5 68, 77, 86
• HYH (HY5 Homologue) 77
• LAF1 86
• PIF3 85, 86
• PIL 86
• RR-B см. регуляторы ответа: RR-B (регуляторы ответа В-типа)
• RSG 158
транскрипционный каскад 18
треонин 46, 168, 171, 173, 174, 184

У

убиквитин 22, 23
убиквитин-активирующий фермент (E1) 25

- убиквитинирующая протеиновая лигаза (E3) 21, 22, 25–30, 40, 61, 63, 65, 76, 85, 86, 131, 188, 192
- COP1 76, 77, 85, 86
 - SCF-лигаза 27–29, 61, 65, 188, 192
 - Cullin субъединица 28
 - F-box субъединица 28, 29, 40, 63, 112
 - RBX субъединица 27
 - SKP1 субъединица 28
 - Siah1 131
- убиквитин-конъюгирующий фермент (E2) 26, 27
- убиквитин-опосредованный (селективный) протеолиз белков 21–34, 62, 65, 81, 85, 86, 187, 188, 192, 201
- убиквитин-подобные белки 23
- белки с убиквитин-подобным доменом (UDP) 23
 - убиквитин-подобные модификаторы (Ubl) 23

Ф

- ферриллегемоглобин 128
- фитохром-ассоциированная фосфатаза (PAPP5) 85
- фитохромы 77–87
- PHYA 79–86
 - PHYB 79–86
 - PHYC 79, 80
 - PHYD 79, 80
 - PHYE 79, 80
- фосфатидаткиназа 112
- фосфатидилинозитол 104–107
- фосфатидилинозитол-3,5-дифосфат 106–108
- фосфатидилинозитол-3-киназа 106
- фосфатидилинозитол-3-фосфат 106, 108
- фосфатидилинозитол-3-фосфат-5-киназа 108
- фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат 108–114, 153
- фосфатидилинозитол-4-киназа 107
- фосфатидилинозитол-4-фосфат 107, 108
- фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа 102, 107–110, 120
- фосфатидилинозитол-5-фосфат 107, 108
- фосфатидная кислота 98, 99, 101, 102, 105, 109, 112, 119
- 3-фосфоглицеральдегид-дегидрогеназа 130, 131
- фосфодиэстераза 97, 133, 136, 138, 139
- фосфолипаза A1 98, 118
- фосфолипаза A2 113–120
- фосфолипаза B 99, 118
- фосфолипаза C 98, 99, 102–113, 119
- фосфолипаза D 98–102, 109, 111, 119, 120
- фосфорилирование
- автофосфорилирование 46, 47, 74, 150, 189

- трансмолекулярное автофосфорилирование 47, 74, 189
 - трансфосфорилирование 46, 47, 199
- фототропин 68–74
- phot1 69, 70, 73
 - phot2 69, 73

Ц

- циклин-активирующая киназа 173, 184
- циклин-зависимые киназы 172, 173
- циклины 173, 192
- циклический аденозинмонофосфат 59, 97, 132, 133, 136–141, 154
- циклический гуанозинмонофосфат 59, 127, 131, 132, 136, 137, 141–143, 154
- цистеин 130, 142, 170, 180
- цитокинин 85, 189–191
- цитруллин 124

Э

- этилен 41–43, 52, 54, 99, 130, 195–198
- этиленовые рецепторы 52–54, 195
- эфекторы (эффекторные молекулы) 10, 15–17, 90–92, 96–143
- эффект усиления 16, 17

Я

- ядерные рецепторы животных 59–61

С

- Ca²⁺-АТРаза 149–151
- ER-типа (ЕСА) 149
 - автоингибируемые (АСА) 149, 150
- Ca²⁺/H⁺-антипортер (СAХ) 151
- СВL-взаимодействующие протеиновые киназы 158–160, 164–167
- CDK-активирующая киназа 173

D

- DELLA-белки 65, 192–194

E

- EF-рука 114, 146–148, 150, 154–156, 158, 164–166, 178

F

- F-box рецепторы 61–63

G

- GAP см. белки, активирующие GTPазу
- GDI см. гуанин-нуклеотид диссоциирующий ингибитор

GSK3-подобные киназы 175

- BIN2 175, 176, 200–202

G-белки 10, 56, 57, 83, 88–96, 134, 135, 171, 176

- гетеротримерные 56, 57, 88–92, 134, 167

- мономерные 88, 89, 93–96, 176

- Arf 93, 94

- Rab 93, 94, 95

- Ran 83, 93, 94

- Ras 89, 93, 94, 176

- Rho 93, 94

- ROP (Rho of plants) 93

G-белки GPCR-типа (GTG) 56–57

G-белок сопряженные рецепторы (GPCR) 55, 56, 90

Н

H⁺-АТФаза 151

HPr^t домен см. гистидиновая фосфотрансфераза

М

MAP киназы

- MAPK 171, 172, 183, 184

- MAPKK 171, 172, 183

- MAPKKK 171, 176

Н

NO-синтаза 124, 125

Р

PLA₁ см. фосфолипаза A₁

PLA₂ см. фосфолипаза A₂

PLB см. фосфолипаза B

PLC см. фосфолипаза C

PLD см. фосфолипаза D

С

SNF1-подобные киназы (SnRK) 167–169

- SnRK1 167, 168, 182

- SnRK2 66, 167–169, 183, 194, 195

START-домен рецепторы 65, 66

S-нитрозилирование цистеина 126, 129, 130

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Значение, структура и принципы функционирования сигнальных систем клеток

1. Значение сигнальных систем в биологических объектах.
2. Быстрые и медленные реакции.
3. Компоненты сигнальных систем.
4. Молекулярные основы передачи внутриклеточных сигналов.
5. Каскадные механизмы.
6. Апстрим и даунстрим компоненты сигнальных систем.
7. Эффект усиления в сигнальных системах.
8. Значение процессов транскрипции и трансляции в трансдукции сигнала.
9. Транскрипционный каскад.
10. Типы сигнальных механизмов.
11. Дерепрессорные сигнальные механизмы.
12. Система убиквитин-опосредованной деградации белков.
13. Убиквитин и убиквитин-подобные белки.
14. Значение убиквитинирования белков.
15. Убиквитинирующий комплекс.
16. Структура SCF-подобной убиквитинирующей лигазы.
17. Регуляция активности SCF-лигазы.
18. Связывание субстрата с убиквитинирующей лигазой.
19. Особенности белков-мишеней убиквитинирующей лигазы.
20. Структура 26S протеасомы.
21. Коровая 20S протеасома.
22. Регуляторная 19S частица.
23. Особенности функционирования 26S протеасомы.

Рецепция сигнала

1. Клеточные рецепторы.
2. Разнообразие типов рецепторов.
3. Структурно-функциональные особенности рецепторов.
4. Субъединичная и доменная структура рецепторов.

5. Основные механизмы активации рецепторов.
6. Функциональная активность рецепторов.
7. Основные свойства лиганд-связывающих рецепторов.
8. Локализация лиганд-связывающих рецепторов.
9. Внешние рецепторы.
10. Рецептор-подобные киназы.
11. Гистидиновые рецепторные киназы.
12. Бактериальные гистидиновые рецепторные киназы.
13. Гибридные гистидиновые киназы.
14. Регуляторы ответа А и В-типа.
15. Гистидиновые фосфотрансферазы.
16. Прокариотические двухкомпонентные сигнальные системы.
17. Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы растений.
18. Причины усложнения эукариотических двухкомпонентных систем.
19. Структура и механизм функционирования этиленовых рецепторов.
20. G-белок сопряженные рецепторы (GPCR).
21. G-белок сопряженные рецепторы животных.
22. G-белки GPCR-типа (GTG).
23. Рецепторы-каналоформеры.
24. Внутриклеточные рецепторы.
25. Ядерные рецепторы животных I и II классов.
26. Внутриклеточные рецепторы растений.
27. F-box рецепторы.
28. Гормон-чувствительные липазы.
29. START-домен рецепторы.
30. Разнообразие и особенности световых рецепторов.
31. Хромофory фоторецепторов и спектры поглощения.
32. Фототропины.
33. Функции, контролируемые фототропинами.
34. Структура фототропинов.
35. Механизм световой активации фототропинов.
36. Криптохромы.
37. Функции и формы криптохромов.
38. Структура и механизм активации криптохромов.
39. Фитохромы.

40. Разнообразие и значение фитохромов.
41. Фотоконверсия фитохромов.
42. Группы фитохром-зависимых ответов.
43. Фотолabile и фотостабильные фитохромы.
44. Структура фитохромов. Доменный состав фотосенсорного и димеризационного районов.
45. Активация фитохромов и передача светового сигнала.
46. Светозависимые изменения структуры фитохромов.
47. Перенос фитохромов в ядро.
48. Регуляция активности фитохрома.
49. Модуляция активности мишеней фитохрома.

Передача сигнала внутри клетки

1. G-белки. Разнообразие и функции.
2. Гетеротримерные G-белки. Структура и цикл активации.
3. Мономерные (малые) G-белки.
4. Разнообразие мономерных G-белков.
5. Сигнальные мономерные G-белки.
6. Цикл активации мономерных G-белков.
7. Эффекторные молекулы и вторичные мессенджеры.
8. Фосфолипазы, их типы и сайты расщепления субстрата.
9. Фосфолипазы D, особенности катализа.
10. Механизм активации фосфолипазы D и передача сигнала.
11. Фосфолипазы C. Классификация и характеристика групп.
12. Полифосфоинозитид-зависимые фосфолипазы C.
13. Фосфатидилинозитол и его производные.
14. PI-PLC-опосредованный сигналинг.
15. Инозитолфосфаты, диацилглицерол и их роль в сигналинге.
16. Фосфолипазы A₂, их типы и функции.
17. Октадеканойдный путь.
18. Значение оксипинов в передаче сигналов. Жасмонаты.
19. Функции фосфолипазы A₂.
20. Фосфолипазы A₁ и B, лизофосфолипазы A.
21. Взаимодействие фосфолипаз.
22. Оксид азота (II) и NO-сигналинг.
23. Химические и антиоксидантные свойства NO.
24. Пути образования NO.

25. Нитрат/нитрит-зависимые ферментативные пути синтеза NO.
26. Аргинин-зависимые пути синтеза NO.
27. Нитрит-зависимые неферментативные пути образования NO.
28. NO-сигналинг.
29. Нитрозилирование металлов.
30. S-нитрозилирование цистеина.
31. Нитрирование тирозина.
32. Связь NO и Ca^{2+} -сигналов.
33. Нуклеотидциклазные сигнальные системы.
34. Аденилатциклазная регуляторная система.
35. Ферменты аденилатциклазной системы.
36. Роль cAMP в регуляции активности протеинкиназы A животных.
37. Значение cAMP в регуляции активности катаболитных генов у бактерий.
38. cAMP-регулируемые белки растений.
39. Гуанилатциклазы и cGMP
40. Ионы кальция в системе передачи сигнала.
41. Функциональные модули кальций-зависимого сигнального механизма.
42. Структура Ca^{2+} -связывающих белков.
43. Особенности структуры Ca^{2+} -связывающего центра.
44. Кальбиндин и кальмодулин.
45. Транспортные системы, кодирующие кальциевый сигнал.
46. Экстраклеточный транспорт кальция.
47. Ca^{2+} -АТФазы ER-типа и аутоингибируемые.
48. Механизм переноса ионов кальция Ca^{2+} -АТФазами.
49. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортеры.
50. Индуцированное поступление кальция в цитоплазму.
51. Потенциал-управляемые каналы.
52. Лиганд-управляемые каналы.
53. Декодирование Ca^{2+} -сигнала.
54. Активация кальмодулин-зависимых белков.
55. Модуляция активности транскрипции кальмодулинами.
56. Модуляция активности белков кальций-зависимыми киназами.
57. Ковалентная модификация сигнальных посредников.

58. Киназно-фосфатазный цикл.
59. Растительные протеиновые киназы.
60. Кальций-зависимые протеиновые киназы.
61. Кальций-кальмодулин-зависимые киназы.
62. Кальций-зависимые киназы (кальмодулин-подобный домен протеин-киназы).
63. CBL-взаимодействующие протеиновые киназы.
64. Кальцинейрин В подобные белки.
65. SnRK — SNF1-подобные киназы.
66. Рецептор-подобные киназы. Группы RLK.
67. MAP киназы (MAPKKK, MAPKK, MAPK).
68. Циклин-зависимые киназы (CDK).
69. Казеиновые киназы CK1 и CK2.
70. Семейство GSK3/Shaggy.
71. CTR1/Raf-подобное семейство.
72. Протеиновые фосфатазы.
73. Классификация фосфатаз.
74. Серин/треониновые фосфатазы.
75. Тирозиновые фосфатазы.
76. Растительные фосфатазы.
77. Разнообразие растительных фосфатаз.
78. Значение растительных фосфатаз.

Механизмы передачи сигнала растительных гормонов

1. Регуляция транскрипции ауксин-регулируемых генов.
2. Регуляторы транскрипции ауксин-регулируемых генов и их доменная структура.
3. Участие Aux/IAA и ARF в регуляции экспрессии ауксин-регулируемых генов.
4. Передача цитокининового сигнала.
5. Трансдукция гиббереллинового сигнала.
6. Передача сигнала АБК через START-домен рецепторы.
7. Восприятие и трансдукция этилена.
8. Рецепция и трансдукция брассиностероидного сигнала.