

ЗНАЧЕНИЕ, СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК

Восприятие любого экстраклеточного сигнала осуществляется клеточными рецепторами, а затем передается в соответствующие клеточные компартменты к конечным мишеням. Ответные реакции клетки можно разделить на быстрые и медленные. Быстрые реакции протекают практически без задержек после восприятия сигнала. Примером быстрых реакций могут служить изменения интенсивности и направления трансмембранных ионных потоков и связанных с этим процессов модуляции активности существующих ферментов. Медленные реакции связаны с изменением экспрессии генов, то есть они задействуют процессы транскрипции и трансляции, поэтому проявляются с некоторой задержкой, по сравнению с быстрыми реакциями.

Для изменения экспрессии генов в клетке необходимо осуществить синтез новых транскрипционных факторов или модулировать активность существующих, так как наличие в клетке регуляторов транскрипции, соответствующих генам эухроматина, еще не обеспечивает необходимого уровня транскрипции. Модуляция активности транскрипционных факторов может осуществляться различными способами: например, в результате ковалентной модификации (присоединения или удаления групп, частичного протеолиза), или путем связывания *транс*-факторов с аллостерическими регуляторами (ионами, белками или веществами гормональной природы) посредством слабых взаимодействий.

Поскольку модуляция генной экспрессии стимулируется под влиянием экстраклеточных стимулов, клетка должна распознавать эти сигналы и адекватно на них реагировать. В многоклеточных организмах функционирует сложная система передачи межклеточных сигналов (химических, электрических). Эти сигналы поставляют в клетки информацию об изменениях в окружающей среде и внутри организма. Достигнув отдельной клетки, межклеточный сигнал запускает внутриклеточную сигнальную систему, которая приводит к стимуляции или ингибированию различных процессов.

Трансдукция сигнала от рецептора до генома может осуществляться только при наличии соответствующих компонентов системы передачи сигнала. По своему механизму сигнальная трансдукция является, по существу, поочередным изменением свойств переносчиков сигнала. Например, рецептор в результате активации приобретает способность воздействовать на последующий переносчик сигнала, изменяя его свойства. Далее этот переносчик будет влиять и изменять функциональное состояние очередного компонента системы трансдукции сигнала и т. д. Последовательная активация/ингибирование переносчиков представляет собой каскад реакций, поэтому такой способ передачи внутриклеточных сигналов часто называют **каскадным механизмом** (слайд 5, презентация).

Последовательная активация переносчиков может осуществляться разными способами. Однако основной причиной изменения свойств переносчиков сигнала является изменение его конформации. В целом акт передачи сигнала можно представить в таком виде:



В качестве примеров возможных механизмов воздействия можно выделить следующие:

- 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 рН и концентрации ионов.

Основными компонентами гипотетической сигнальной системы являются рецептор, эффектор, вторичные мессенджеры, **G-белки**, модифицирующие сигнальные ферменты и конечные мишени.

Рецептор воспринимает экстраклеточный сигнал и запускает каскадный сигнальный механизм внутри клетки. Клетки обладают разными типами специализированных рецепторов, распознающих определенный вид сигнала.

G-белки — особые сигнальные молекулы, обладающие GTPазной активностью.

Эффектор (или эффекторная молекула) получает сигнал от рецептора, причем сопряжение эффектора и рецептора может быть как прямое, так и косвенное, то есть через молекулы-посредники (адаптеры). Основная функция эффекторов — производство вторичных мессенджеров.

Вторичные мессенджеры — это низкомолекулярные органические соединения или ионы, способные обеспечивать дальнейшую передачу сигнала путем аллостерической регуляции. Активация последующих компонентов сигнальной цепи вторичными мессенджерами осуществляется при достижении ими определенной концентрации. На уровне эффекторов обеспечивается усиление сигнала, так как они синтезируют большое количество вторичных посредников, которые могут активировать множество последующих сигнальных посредников или конечных мишеней.

Адаптерные молекулы — белки, обеспечивающие взаимодействие двух сигнальных посредников. Например, рецептор может воздействовать на эффектор или иную сигнальную молекулу только через адаптерный белок.

Сигнальные молекулы-ферменты, обеспечивающие посттрансляционную модификацию посредников передачи сигнала. (Следует отличать от эффекторов, которые тоже являются ферментами, но имеют иную функцию.) Ведущую роль среди таких сигнальных посредников выполняют протеинкиназы и протеинфосфатазы.

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 всегда начинается с рецептора и заканчивается модулированием активности конечных мишеней. В ряде случаев это выражается активацией или ингибированием, а в некоторых — изменением активности. Однако промежуточные компоненты сигнальной системы могут быть представлены широким спектром разнообразных функциональных молекул. Количество и тип компонентов каждой конкретной сигнальной системы строго специфичны, причем в некоторых системах могут отсутствовать эффекторы и вторичные мессенджеры. В другом случае 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. В качестве примера таких молекул можно привести ядерные рецепторы, связывающие стероидные гормоны.

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, множество 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 результата, то есть две сигнальные системы совместно могут привести к событию, отличному от тех, к которым приводят эти же системы по отдельности (слайд 6, презентация). По этой причине каскадные механизмы можно, скорее, представить наподобие сигнальной сети, пронизывающей клетку. Сигнальные пути могут быть настолько переплетены и взаимозависимы, что порой трудно идентифицировать причинно-следственные связи при изучении механизмов трансдукции сигнала.

Многие каскадные механизмы, индуцирующие изменение генной экспрессии, приводят к активации генов, кодирующих транскрипционные факторы. Вновь синтезированные *транс*-факторы провоцируют вторую волну экспрессии (слайд 14, презентация). Причем вторично активируемые гены могут тоже кодировать транскрипционные факторы. Конечные гены-мишени активируются в последнюю очередь. Таким образом, каскадный механизм может включать в себя не только активацию транскрипционных факторов, но и их синтез путем экспрессии регуляторных генов.

Объяснение схемы на слайде 14. Модель каскадного механизма, в котором активируется экспрессия гена, кодирующего транскрипционный фактор.

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. *Транс*-фактор D стимулирует транскрипцию генов *e, f* и *g*, которые кодируют белки E, F и G.

Регуляторный механизм, задействующий последовательный синтез нескольких типов *транс*-факторов, на первый взгляд, может показаться медленнодействующим и громоздким. Тем не менее, это необходимо для осуществления регуляции генной экспрессии с точки зрения 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 большое количество транскрипционных факторов и компонентов сигнальных систем, активирующих эти 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 *транс*-факторов в результате активации каскадных механизмов оказывает **усиливающий эффект**. Активация экспрессии одного гена, как правило, приводит к неоднократной транскрипции, причем каждый образованный транскрипт после сплайсинга может служить матрицей для синтеза не одной молекулы белка, а нескольких или даже нескольких десятков. Резкое повышение количества регуляторных белков оказывает значительный эффект на дальнейшие события. Таким образом, **каскадная система регуляции, включающая последовательную активацию экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, дает небольшую задержку во времени, однако является экономичной и способствует усилению сигнала.**

РЕЦЕПЦИЯ СИГНАЛА

Каскадный механизм начинается с активации рецептора, воспринимающего сигнал. Сигналом могут быть разные стимулы: химические вещества, свет, температура. В любом

случае специализированный рецептор должен обладать способностью изменять свои свойства (то есть переходить в активное состояние или, наоборот, инактивироваться) под влиянием воспринимаемого стимула и передавать сигнал на следующий компонент цепи.

Любая клетка, в зависимости от ее специализации, содержит ограниченный набор рецепторов. Не каждая клетка способна отвечать на специфические сигналы.

В живом мире существует бесконечное разнообразие возможных пар лиганд–рецептор. Высокая степень специфичности их взаимодействия достигается благодаря формированию связывающей поверхности рецептора, комплементарной специфическому лиганду. Это обеспечивает образование оптимального количества слабых связей между ними.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ

Существует огромное количество клеточных рецепторов, которые специфически связывают химические вещества (лиганды) определенного типа. Такими веществами могут быть гормоны, другие биологически активные вещества с гормоноподобным действием, элиситоры, трофические вещества (сахара, аминокислоты), ионы (например, нитраты) и др. Экстраклеточные лиганды, которые специфически взаимодействуют с рецепторами, называют **первичными мессенджерами**.

Первичные мессенджеры гормональной природы присутствуют в очень низких концентрациях, поэтому рецепторы должны обладать высокой **аффинностью** (сродством) к ним. Чем выше константа связывания, тем продолжительнее время существования комплекса **рецептор–лиганд**. Вместе с тем, в ряде случаев взаимодействие рецептора и лиганда носит кратковременный характер — до нескольких миллисекунд. Как правило, это достаточно для достижения максимальной реакции в ответ на стимул, вследствие эффекта усиления каскадного механизма. С другой стороны, изменение условий может привести к необходимости быстрого прекращения стимуляции рецептора лигандом, а этого легче достичь при сравнительно низкой аффинности. По этой причине константа связывания 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 $0,1 \times 10^{-9}$ М – 5×10^{-9} М. По степени сродства с этиленом их разделяют на две группы. 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

средством, 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 стимуляции специфического ответа нет необходимости связывать все рецепторы, поскольку внешний сигнал внутри клетки многократно усиливается. В некоторых случаях задействуется не более 2 % гормон-специфических рецепторов. Такая большая концентрация рецепторов, вероятно, необходима для ответа на низкие концентрации лиганда.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Клеточные рецепторы могут располагаться в различных частях клетки. В зависимости от их расположения, различают **внешние** и **внутренние** рецепторы. Внешние рецепторы локализуются в плазматической мембране, а внутренние — внутри клетки. Внешние рецепторы являются преимущественно трансмембранными белками, у которых лиганд-связывающие домены расположены на экстраклеточной поверхности плазмалеммы, а регуляторные — с цитоплазматической стороны. В некоторых случаях внешние рецепторы не пересекают мембрану и представляют собой поверхностные белки, расположенные на внешней поверхности плазмалеммы (например, рецептор ауксина АВР1). Внутренние рецепторы могут быть связаны с эндомембранами или находиться в растворимом состоянии.

Расположение рецепторов, как правило, 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 внутренними рецепторами. Большинство стероидных гормонов животных и растений легко проникают в клетку вследствие липофильных свойств и связываются с рецепторами, локализующимися в цитоплазме, на эндомембранах, или даже в нуклеоплазме. Однако рецепторы растительного гормона этилена, идентифицированные до настоящего времени, располагаются исключительно на плазматической мембране, хотя этилен достаточно легко диффундирует через мембрану.

Два других растительных гормона, ИУК и АБК, 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⁻), которое обеспечивает им гидрофильные свойства. Межклеточное пространство у растений (апопласт) имеет низкие значения рН, что эквивалентно кислой среде, в которой слабые кислоты не заряжены. Поэтому диффузия ИУК и АБК через плазматическую мембрану из апопласта внутрь клетки происходит 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 рецепторов ИУК и АБК. Рецепторы обоих этих гормонов обнаруживаются на внешней и внутренних мембранах.

Многие гормоны совсем не проникают в клетку, или этот процесс осуществляется с трудом. Препятствует этому полярность молекулы (в том числе наличие заряда) или

большие размеры. Например, гормон животных адреналин, а также группа растительных гормонов цитокининов представляют собой незаряженные молекулы, обладающие, тем не менее, выраженной полярностью. Их рецепторы располагаются на плазматической мембране.

Примером гормонов с большой молекулярной массой являются полипептидные гормоны. Все они, включая даже относительно низкомолекулярные, такие как сравнительно недавно открытые растительные гормоны фитосульфокины (группа сульфатированных по тирозину тетра- и пентапептидов), связываются со специфическими рецепторами на внешней поверхности плазмалеммы.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕЦЕПТОРОВ

Существует большое количество разнообразных клеточных хеморецепторов. Причем они различаются не только по специфичности в отношении к связываемому лиганду. Все существующие рецепторы можно разделить на группы, отличающиеся друг от друга целым спектром структурно-функциональных особенностей, среди которых можно выделить субъединичную и доменную структуру, механизмы активации и передачи сигнала.

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, как правило, находятся в мономерном состоянии, но при активации димеризуются.

Среди основных структурных модулей следует выделить три домена:

— *рецепторный* — обеспечивает 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, который включает реакционный центр, а также множественные сайты автофосфорилирования. Процесс автофосфорилирования является необходимой частью механизма активации этого типа рецепторов.

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ И ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Связывание специфического лиганда провоцирует изменение конформации молекулы рецептора любого типа, однако дальнейшие события активации и передачи сигнала отличаются у разных групп рецепторов.

Передача сигнала от рецептора на даунстрим сигнальный посредник осуществляется двумя способами:

- 1) при взаимодействии с посредником через **связывающую поверхность**, которая формируется в результате рецепции;
- 2) при изменении концентрации ионов, выполняющих роль вторичных мессенджеров (только в случае рецепторов-каналоформеров, которые совмещают функцию рецепторов и ионных каналов).

Механизмы формирования связывающей поверхности.

1) Первый механизм связан только лишь с **изменением конформации рецептора**. Изменение конформации молекулы рецептора в результате связывания лиганда приводит к формированию связывающей поверхности, необходимой для взаимодействия с даунстрим сигнальным партнером.

2) Во втором механизме изменение конформации рецептора недостаточно для активации, но необходимо для стимуляции его **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.

3) Третий механизм — **фосфорелейный** — функционирует в двухкомпонентных сигнальных системах. Фосфорная группа, присоединенная в результате автофосфорилирования переносится на даунстрим посредник.

4) Четвертый механизм представляет собой **высвобождение рецептора из связанного состояния**. Такие рецепторы в неактивном состоянии связаны с белком (обычно шапероном), закрывающим доступ к связывающей поверхности. В результате рецепции неактивный комплекс распадается, и рецептор приобретает возможность передавать сигнал. Часто высвобождение рецептора приводит также к изменению его локализации. Данный механизм описан для стероидных гормонов животных.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

По этому признаку все рецепторы можно разделить на две 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. Выше уже упоминались 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.

ВНЕШНИЕ РЕЦЕПТОРЫ

Существует большое количество разнообразных клеточных рецепторов, обладающих различными свойствами — способом восприятия и механизмом передачи сигнала. Наиболее типичные из них будут рассмотрены.

РЕЦЕПТОР-ПОДОБНЫЕ КИНАЗЫ

Рецептор-подобные киназы представлены многочисленными рецепторами в растительных организмах. К такому типу относятся рецепторы brassinosterоидов и все идентифицированные до нынешнего времени рецепторы пептидных гормонов.

Рецептор-подобные киназы локализуются на плазматической мембране. Они являются мономерными интегральными белками, пересекающими мембрану один раз. Молекула рецептор-подобных киназ состоит из трех основных структурных элементов (слайд 19, презентация).

- 1) Экстраклеточный (рецепторный) домен** формируется N-терминальным районом молекулы. Согласно строению этого домена различают четыре основных 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 только один раз и соединяет внешний и внутриклеточный фрагменты рецепторной молекулы.
- 3) Цитоплазматический домен** — внутриклеточная часть рецептора, сформированная C-терминальным участком. Участвует в процессах активации. Включает **регуляторный** (или киназный) фрагмент, который содержит каталитический центр и множественные участки автофосфорилирования.

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 достаточно быстро и легко образуют димерные комплексы (рецептор–рецептор) (слайд 20, презентация). В некоторых случаях при активации рецепторных киназ образуются димеры рецептора с корецептором. Коррецептор рецептор-подобных киназ — это молекула, которая отличается от рецептора только структурой внешнего домена. Коррецептор не имеет лиганд-связывающего участка, но может образовывать гетеродимеры с рецептором и участвовать во взаимном фосфорилировании.

За счет сближения двух рецепторов активируются киназные центры, и рецепторные молекулы начинают фосфорилировать друг друга по остаткам серинов и треонинов в области киназного центра. Источником фосфорных групп выступает АТФ. В результате фосфорилирования формируется связывающая поверхность, которая служит для взаимодействия с сигнальными белками — следующими компонентами сигнальной цепи.

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) активация тирозинкиназного центра;
- 4) автофосфорилирование остатков тирозина;
- 5) связывание с белками, содержащими SH2-домены.

ГИСТИДИНОВЫЕ КИНАЗЫ И ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

Гистидиновые киназы (His-киназы) являются еще одним типом рецепторов, которые автофосфорилируются при связывании лиганда. Эти рецепторы первоначально были обнаружены у бактерий. В отличие от животных организмов, у бактерий преобладает фосфорилирование аминокислотных остатков гистидина и аспарагиновой кислоты. Для эукариотических клеток существование гистидиновых киназ было показано в начале 1990-х годов после открытия у растения *Arabidopsis* этиленового рецептора ETR1 и фоторецептора фитохрома, а у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — осмосенсора SLN1. Гистидиновые киназы в изобилии встречаются у растений и бактерий, но у животных до настоящего времени не обнаружены.

Прокариотические двухкомпонентные сигнальные системы

Гистидиновые рецепторные киназы у бактерий являются частью **бикомпонентных сигнальных систем**, которые функционируют как фосфорелейный механизм (перенос фосфорной группы), который инициируется в результате автофосфорилирования рецептора в момент рецепции экстраклеточного сигнала (слайды 21-22, презентация).

Двухкомпонентными (или бикомпонентными) данные сигнальные системы называют потому, что в бактериальных клетках они представлены двумя основными компонентами: **гистидиновыми рецепторными киназами** и **регуляторами ответа** (RR — *response regulator*).

Бактериальные His-киназы состоят из двух структурно-функциональных участков. Это: 1) **сигнальный домен (input домен)**, формирующийся внешнеклеточным N-концевым участком молекулы, расположенным между двумя трансмембранными доменами, и 2) цитоплазматический C-терминальный **передающий домен (transmitter домен)**, который обладает свойствами гистидиновой киназы и имеет область фосфорилирования, содержащую консервативный остаток гистидина.

Регуляторы ответа состоят также из двух основных частей. **Домен получатель (receiver домен)** содержит остаток аспарагиновой кислоты, который фосфорилируется при переносе фосфатной группы от transmitter домена His-киназы. **Регуляторный домен (output домен)** при активации (фосфорилировании) RR приобретает способность модулировать активность следующих компонентов сигнальной цепи. Примерно половина всех регуляторов ответа является транскрипционными факторами, способными связываться с промоторами генов и регулировать экспрессию генов. Остальные RR взаимодействуют с другими регуляторными белками или ферментами. Согласно выполняемым функциям, регуляторы ответа делятся на два типа:

- 1) **RR А-типа** моделируют активность функциональных белков;
- 2) **RR В-типа** регулируют экспрессию генов.

Receiver домены всех регуляторов ответа гомологичны и расположены на аминокислотном участке молекул. Карбокситерминальные output домены отличаются у RR разных типов. У регуляторов ответа В-типа в молекуле имеется дополнительная область, ответственная за взаимодействие RR с ДНК. Активированные RR В-типа связываются с промоторными участками генов и регулируют их экспрессию. RR А-типа не имеют ДНК-связывающей области и способны исключительно к белок-белковым взаимодействиям.

Двухкомпонентные многошаговые сигнальные системы

Гистидиновые киназы растительных организмов выполняют различные регуляторные функции, но наиболее известными являются рецепторы двух главных

классов растительных гормонов — цитокининов и этилена. Рецепторные гистидиновые киназы эукариот гомологичны бактериальным, но имеют более сложное строение (слайды 21-22, презентация). Кроме input и transmitter доменов, они имеют дополнительный receiver домен, аналогичный receiver домену RR. По этой причине эукариотические гистидиновые рецепторные киназы называют гибридными. В ряде случаев растительные гибридные His-киназы содержат даже два таких домена. Перенос фосфатной группы, стимулированный связыванием лиганда, осуществляется частично внутри молекулы рецептора от гистидина transmitter домена на аспартат receiver домена. Если в молекуле рецепторной гистидинкиназы растений содержится два receiver домена, то в фосфорелейном механизме принимает участие только один из них. Усложнение строения гистидиновых киназ эукариот сопряжено с усложнением организации сигнальных систем.

Все известные гистидиновые рецепторные киназы принципиально сходны между собой. Во-первых, лиганд-связывающий домен формируется N-концевым участком молекулы. Во-вторых, рецептор имеет несколько трансмембранных доменов. Например, рецепторы цитокининов, подобно бактериальным, включают два трансмембранных домена, а рецепторы этилена — три. В-третьих, все His-киназы имеют transmitter домен, способный к автофосфорилированию. Отличаются между собой бактериальные и гибридные эукариотические гистидиновые киназы наличием transmitter домена.

Интересно отметить, что у растений, так же как и у бактерий, функционируют двухкомпонентные сигнальные системы с участием His-киназ. Однако такие системы включают дополнительный белковый модуль, который содержит остаток гистидина, способный к фосфорилированию. Этот остаток гистидина называют вторичным гистидином. Вторичный гистидин принимает фосфатную группу от остатка аспарагиновой кислоты receiver домена гибридной гистидиновой киназы, затем переносится на остаток аспарагиновой кислоты receiver домена регулятора ответа (рис. 73-Б). Поскольку данный белок, содержащий вторичный гистидин, осуществляет перенос фосфатной группы, его называют **гистидиновой фосфотрансферазой** (HPt). В двухкомпонентных системах гистидиновую фосфотрансферазу часто называют HPt доменом.

Итак, двухкомпонентные системы растений представлены тремя белками:

- 1) гистидиновая гибридная киназа;
- 2) гистидиновая фосфотрансфераза (HPt домен);
- 3) регулятор ответа.

Фосфатная группа после автофосфорилирования рецептора переносится три раза, а не один, как у бактерий. Фактически это многокомпонентные системы, но их традиционно называют двухкомпонентными ввиду общего принципа организации и наличия двух основных компонентов, гомологичных бактериальным, — гистидиновых киназ и регуляторов ответа. Если быть более точным, такие сигнальные системы называют **двухкомпонентными многошаговыми сигнальными системами**. Примером такой системы служит трансдукция цитокининового сигнала у растений. Передача сигнала от рецепторной гистидиновой киназы, воспринимающей этилен, осуществляется посредством иного механизма, который включает каскад киназных реакций.

Причины усложнения эукариотических двухкомпонентных систем

Относительно двухкомпонентных систем возникает закономерный вопрос: в чем заключается причина усложнения растительных систем по сравнению с бактериальными? Вначале предполагали, что это связано с усилением сигнала ввиду его амплификации. Однако, в отличие от большинства существующих в природе интраклеточных сигнальных систем, в двухкомпонентных регуляторных системах сигнал может усиливаться только на уровне гистидиновой киназы. Фосфорелейный механизм, используемый в двухкомпонентных системах, предполагает линейную передачу фосфатной группы от

переносчика к переносчику. А поскольку фосфатная группа эквивалентна сигналу, то он также передается линейно, не амплифицируясь. Иными словами, сколько раз произойдет автофосфорилирование рецептора, столько раз активируются регуляторы ответа. Усиление сигнала возможно лишь после того, как он выйдет за пределы двухкомпонентной системы. Например, индуцируемые через эту систему процессы транскрипции и трансляции обеспечивают усиление сигнала. Для сравнения с двухкомпонентными системами можно привести системы, в которых задействованы протеинкиназы. Эти системы усиливают сигнал на уровне протеинкиназ, так как активация этих ферментов может привести к фосфорилированию множества последующих компонентов сигнальной цепи.

Усложнение двухкомпонентных систем у растений, по-видимому, связано с усложнением строения эукариотической клетки, по сравнению с прокариотической. У бактерий передача сигнала путем фосфорелейного механизма осуществляется беспрепятственно, так как регуляторы ответа В-типа могут непосредственно контактировать и с цитоплазматическим доменом рецептора, и с ДНК. У растений, как и у всех эукариот, ДНК отделена от цитоплазмы ядерной мембраной (слайд 23, презентация). Регуляторы ответа В-типа локализуются преимущественно в ядре и не могут непосредственно взаимодействовать с рецепторными гистидиновыми киназами. Промежуточный компонент фосфорелейного механизма — гистидиновая фосфотрансфераза (HPt домен) — взаимодействует с рецептором, а после фосфорилирования транслоцируется в ядро и участвует в переносе фосфатной группы на регулятор ответа. Таким образом, компартиментация эукариотической клетки является причиной усложнения двухкомпонентных регуляторных систем растений.

Схема работы двухкомпонентных систем на примере цитокининового сигнала в растительных клетках

Рецепция цитокинина растительными клетками осуществляется гистидиновыми рецепторными киназами, которые расположены на плазматической мембране (слайд 23, презентация). Первоначальная передача сигнала происходит в рамках двухкомпонентной многошаговой сигнальной системы, частью которой являются рецепторные His-киназы. Связывание экстраклеточного input домена рецепторной молекулы с цитокинином стимулирует автофосфорилирование гистидинового остатка transmitter домена. Затем фосфатная группа переносится на остаток аспарагиновой кислоты receiver домена, а отсюда — на остаток гистидина мобильного HPt домена. Фосфотрансфераза HPt переносит фосфат на аспарагиновую кислоту receiver домена регулятора ответа. HPt легко диффундирует по клетке и также проникает в ядро, где осуществляет фосфорилирование регуляторов ответа В-типа.

Как уже отмечалось выше, двухкомпонентная сигнальная система (фосфорелейный механизм) не обладает свойством усиления. Один акт фосфорилирования transmitter домена рецептора способствует активации одного регулятора ответа. Однако постоянное присутствие внешнего сигнала (цитокинина) стимулирует автофосфорилирование рецептора, передачу фосфата в двухкомпонентной системе и активирование новых молекул RR.

Усиление цитокининового сигнала возможно только после активации регуляторов ответа. Регуляторы ответа В-типа являются транскрипционными факторами, которые инициируют экспрессию различных генов. Воздействие одного RR В-типа может стимулировать синтез нескольких мРНК, каждая из которых многократно транслируется.

Первыми в ответ на воздействие цитокинина активируются гены, кодирующие регуляторы ответа А-типа. Они синтезируются в неактивном состоянии и активируются через фосфорелейный механизм двухкомпонентной системы, так же как и RR В-типа. В активном состоянии они связываются с различными функциональными белками,

стимулируя проявление их свойств. Эти белки могут быть ферментами или регуляторами, через которые возможна дальнейшая передача сигнала.

Сигнальные пути часто взаимодействуют между собой, и это приводит к некоторым эффектам, которые отличаются от тех, к которым приводят каждый из сигнальных путей по отдельности. Например, цитокининовый сигнал оказывает влияние на функционирование одного из световых рецепторов — фитохрома В (phyB). Как известно, phyB переходит в физиологически активное состояние (phyB_{ДКС}) под действием красного света (КС). Дальний красный свет (ДКС) стимулирует обратную фотоконверсию фитохрома в неактивную форму (phyB_{КС}). В темноте активная форма фитохрома самопроизвольно переходит в неактивную с постоянной скоростью. В растениях *Arabidopsis* под воздействием цитокинина через RR В-типа стимулируется экспрессия гена, кодирующего регулятор ответа А-типа ARR4. После трансляции вновь синтезированный ARR4 активируется гистидиновой фосфотрансферазой HPt. Мишенью для ARR4 является фитохром В. При связывании phyB с ARR4 стабилизируется активная форма рецептора. В этом состоянии (в комплексе phyB_{ДКС}–ARR4) затруднена конверсия phyB_{ДКС} в неактивное состояние, 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 метаболизм, а также рост и пролиферацию клеток. Под влиянием цитокинина усиливается синтез белков, нуклеиновых кислот, повышается аттрагирующая способность тканей. Цитокинин обеспечивает подготовку клетки к делению, причем не только за счет повышения общей интенсивности синтеза. Цитокининовый сигнал обеспечивает активацию экспрессии генов, кодирующих белки, появление которых предваряет митоз. Во-первых, это циклин D типа — *CycD3* — 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 редупликации ДНК.

СЕРПЕНТИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Серпентиновые (или змееподобные) рецепторы представляют собой трансмембранные белки, имеющих 7 трансмембранных доменов. Это большой класс рецепторов, выполняющих самые разнообразные биологические сигнальные функции у животных. К данному типу относятся, например, вкусовые, обонятельные, андренергические, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы и другие. Все эти рецепторы имеют общий принцип строения и функционирования, а различаются они специфичностью, то есть способностью воспринимать разные внешние сигналы. Значение рецепторов этого типа для растений не ясно. Возможно, что у растений существуют подобные или близкие по структуре рецепторы, но механизм их активации может принципиально отличаться от животных.

Молекулы серпентиновых рецепторов семь раз пронизывают мембрану (слайд 24, презентация). При этом N-терминальный участок полипептида располагается на экстраклеточной стороне плазматической мембраны, а С-концевая область — на цитоплазматической стороне. Некоторые аминокислотные остатки на N-концевом участке рецепторной молекулы гликозилированы. Олигосахаридные группы играют существенную роль в формировании лиганд-связывающего участка рецептора. Цитоплазматическая С-терминальная область серпентинового рецептора формирует участок связывания G-белка, через который опосредуется передача сигнала внутрь клетки. Гетеротримерный мембранно-связанный G-белок является обязательным компонентом каскадных механизмов, которые стимулируются через серпентиновые рецепторы.

Существует множество типов серпентиновых рецепторов, специфичных к лигандам, имеющим различную химическую природу. 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 в момент рецепции, в результате которой изменяется конформация рецепторной молекулы. Активированный G-белок передает сигнал дальше.

РЕЦЕПТОРЫ-КАНАЛОФОРМЕРЫ

Изменение транспорта ионов и их внутриклеточной концентрации часто используется в механизмах трансдукции сигнала, поэтому в ряде каскадных сигнальных систем участвуют ионные каналы. Ионные каналы могут быть как промежуточными компонентами сигнальной цепи, так и компонентами, воспринимающими внешклеточные сигналы. Рецепторы, которые одновременно являются ионными каналами, называют рецепторами-каналомемерами.

Одним из рецепторов этого класса является ацетилхолиновый рецептор никотинового типа у животных (название обусловлено сродством рецептора к никотину). В отличие от мускаринового ацетилхолинового рецептора, 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 , и ϵ . Участки связывания ацетилхолина находятся на α -субъединицах. Любой ацетилхолиновый рецептор обязательно содержит две α -субъединицы. Поли-пептидные цепи всех субъединиц четыре раза пронизывают плазмалемму, причем N- и C-концевые домены находятся снаружи клетки и гликозилированы (слайд 25, презентация). Цито-плазматические области рецепторной молекулы взаимодействуют с компонентами цитоскелета — тубулиновыми и актиновыми белками.

Ацетилхолиновые рецепторы-каналомемеры, располагаются на постсинаптических участках мембран возбудимых клеток (нервных, мышечных, секреторных) и участвуют в преобразовании сигнала. Нейротрансмиттер ацетилхолин высвобождается через пресинаптические мембраны нервных окончаний путем экзо-цитоза, диффундирует через синаптическую щель и связывается 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 локальную деполяризацию мембраны и стимулирует специфический ответ. В нейромышечной системе, например, действие ацетилхолина на холинергические рецепторы вызывает сокращение мускулатуры.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

ЯДЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Ядерными рецепторами называют ДНК-связывающие транскрипционные факторы, которые активируются липофильными лигандами. Активность многих из таких рецепторов контролируется также киназами и другими регуляторными белками. То есть,

рецептор может находиться в разных состояниях, которые характеризуются определенной способностью рецептора связывать лиганд и инициировать транскрипцию. Попадая в клетку, специфические лиганды вызывают внутриклеточное перераспределение рецепторов соответствующего типа.

Большинство ядерных рецепторов локализируются непосредственно в ядре. Однако рецепторы стероидов в неактивном состоянии могут находиться в цитоплазме, как правило, в растворимом состоянии. При отсутствии соответствующего лиганда стероидные рецепторы связываются с шаперонами, которые экранируют ДНК-связывающий домен рецепторов. Шапероны, с одной стороны, затрудняют транспорт рецептора через ядерную мембрану, а с другой препятствуют его удержанию в ядре, вследствие того, что они маскируют ДНК-связывающий домен. 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 фактора (слайд 26, презентация).

В клетках яйцевода курицы находится специфический рецептор эстрогена β -эстрадиола, локализующийся в цитоплазме. В неактивной форме он связан с шапероном и имеет название эстрофилин 1. При попадании в клетку β -эстрадиола он взаимодействует с рецептором, который теряет сродство с шапероном и переходит в активную форму, называемую эстрофилин 2. Эстрофилин 2 транслоцируется в ядро, связывается со специфическими участками хроматина и активирует экспрессию ряда генов, кодирующих специфические белки, например, овальбумин и ововителлин, которые необходимы для формирования яиц.

ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ВНУТРИ КЛЕТКИ

G-БЕЛКИ

Передача сигнала от рецепторов, в зависимости от их типа, может осуществляться непосредственно на промотор гена, на эффекторные молекулы, а также на многочисленные промежуточные компоненты внутриклеточных сигнальных систем. Одними из компонентов, опосредующими внутриклеточный сигнал, являются регуляторные GTP-азы, которые также называют G-белками. Это совокупность гуанин-нуклеотидсвязывающих белков, обладающих GTP-азной активностью и выполняющих в клетках разнообразные функции. Они принимают участие в транспорте макромолекул, организации цитоскелета, синтезе белков, образовании и транслокации везикул, а также выполняют сигнальные функции, принимая участие в трансдукции внутриклеточных сигналов.

Все существующие 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 название 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, во избежание путаницы появилась необходимость использовать термин мономерные (или малые) G-белки. В настоящее время выделяют пять семейств малых G-белков.

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 GTP-азы 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 значимость этих молекул в сигнальных механизмах до сих пор находится под сомнением. Во всяком случае, гетеротримерные GTP-азы у растений, если и принимают участие в трансдукции сигнала, вряд ли имеют механизм активации аналогичный у животных. Значимость гетеротримерных G-белков для животных подтверждается обилием идентифицированных в геноме млекопитающих генов, кодирующих субъединицы GTP-аз: 23 α -субъединицы, 5 β -субъединиц, 12 γ -субъединиц. У растений набор подобных генов значительно скромнее. В геноме у *Arabidopsis* обнаружен всего лишь 1 ген, кодирующий α -субъединицу, 1 — β -субъединицу, 2 — γ -субъединицы. На фоне такого незначительного количества гетеротримерных GTP-аз, гены малых G-белков в геномах растений обнаруживаются в избытке. Например, в геноме *Arabidopsis* идентифицировано 93 гена. Действительно, в регуляторных и сигнальных механизмах у растений ведущая роль принадлежит мономерным G-белкам.

ГЕТЕРОТРИМЕРНЫЕ G-БЕЛКИ

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

Структура различных G-белков уникальна. Это позволяет им специфически взаимодействовать с соответствующими рецепторными и эффекторными молекулами.

G-белки состоят из трех различных субъединиц. В молекуле G-белка наибольшая по размеру α -субъединица (40–50 кД) прочно 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 (слайд 35-36, презентация).

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

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 -субъединица 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. GTP-азная 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, существует большое количество регуляторных белков, способных модулировать GTP-азную 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 белки RGS (до 1400 аминокислотных остатков). Эти белки не только модулируют GTP-азную активность α -субъединицы, но и участвуют в передаче сигнала, поскольку обладают структурой, позволяющей им взаимодействовать с другими белками 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 свойств последних.

$\beta\gamma$ -Димеры не только регулируют активность эффекторных молекул, например, таких как фосфолипазы (PLA₂, некоторые изоформы фосфолипазы C), ионные каналы (K⁺, Ca²⁺), 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. $\beta\gamma$ -Субъединицы G-белков способны активировать специфические протеинкиназы (GRK — G-белок сопряженные рецепторные киназы), которые фосфорилируют молекулы серпентиновых рецепторов. К активации GRK приводит, как правило, низкая концентрация агониста, то есть слабый внешний сигнал. Благодаря фосфорилированию предотвращается передача сигнала на эффектор, а кроме того, молекула рецептора подготавливается для удаления с поверхности клетки путем эндоцитоза, поскольку она в результате ковалентной модификации (путем фосфорилирования) становится мишенью для связывания аррестина.

МОНОМЕРНЫЕ (МАЛЫЕ) G-БЕЛКИ

Мономерные G-белки, первоначально были открыты как продукты Ras-протоонкогенов, ассоциированных с саркомой крыс (отсюда название Ras — *rat sarcoma*). Впоследствии были выявлены многочисленные мономерные белки с GTP-азной активностью, близкие по структуре и молекулярной массе к Ras-белкам. Все эти белки обладали ограниченной гомологией (до 30%) и имели консервативные последовательности аминокислот, ответственные за связывание гуанозинфосфатов, GTP-азную активность и взаимодействие с эффекторами. Молекулярная масса 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 GTP-азы, согласно их аминокислотной последовательности и функциям, разделяют на пять семейств: Ras, Rho, Rab, Arf и Rap.

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 часто располагается в центре сети взаимодействующих сигнальных путей, то есть может воспринимать активирующие 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 поверхностью мембраны.

Исследование структуры Ras белка показало наличие двух высоко подвижных 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. Адаптерные молекулы, непосредственно взаимодействующие с малыми G-белками, имеют общее название **гуанин-нуклеотид обменивающие факторы (GEF)**. После замены гуанозинфосфатов мG-белки изменяют конформацию и переходят в активное состояние, то есть приобретают способность взаимодействовать со своими мишенями. 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 (**g**uanine nucleotide **d**isso**ci**ation **i**nhibitor). 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 диссоциирует от мембраны. Этим способом GDI изолирует неактивный G-белок. Ассоциированный с GDI G-белок не имеет возможности взаимодействовать с GEF (слайд 37, презентация).

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

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

ЭФФЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ВТОРИЧНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ

Эффекторные молекулы являются компонентами сигнальных систем, которые участвуют в образовании внутриклеточных низкомолекулярных посредников — вторичных мессенджеров. Эффекторы могут быть ферментами, которые преимущественно располагаются на плазматической мембране, или ионными каналами.

Важным свойством эффекторов является их способность усиливать сигнал, поскольку их функционирование приводит к образованию значительного количества вторичных мессенджеров, передающих сигнал на дальнейшие компоненты сигнальных цепей. При этом одна эффекторная молекула может способствовать стимуляции множества сигнальных посредников.

Состояние эффекторов зависит от внешних сигналов, но активность каждого из них модулируется различными способами, в зависимости от конкретного типа эффекторной 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 аденилат-циклаза (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 взаимоисключающий способ регуляции. Если АЦ активируется при получении определенного сигнала, то ФЭ 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.

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА И САМР

Аденилатциклазы (АЦ) катализируют образование циклического АМР из АТФ в присутствии ионов Mg^{2+} . В результате отщепляется пирогосфатная группа, а между α -

фосфатом и гидроксилем 3-го атома С остатка рибозы образуется эфирная связь (слайд 40, презентация).



Расщепление сАМР осуществляется ферментом фосфодиэстеразой (ФЭ). Этот фермент гидролизует именно ту фосфо-эфирную связь, образование которой катализирует АЦ. Таким образом, под действием фосфодиэстеразы сАМР преобразуется в АМР.

Влияние сАМР оказывает разнообразные физиолого-биохимические эффекты. Основными молекулярными мишенями сАМР являются различные протеинкиназы, фосфорилирующие белки, многие из которых, в свою очередь, также являются ферментами-киназами. Следовательно, сАМР может запускать каскады киназных реакций, приводящих к проявлению быстрых и медленных реакций.

У животных аденилатциклазы присутствуют в разных типах клеток, где они локализованы, преимущественно, в плазматической мембране. Активность таких АЦ регулируется гормонами, главным образом, через G-белки. Существуют также растворимые формы фермента. К ним относятся АЦ спермы млекопитающих и бактерий. Бактериальные АЦ участвуют в регуляции активности катаболических генов. При низких концентрациях или полном отсутствии глюкозы в среде у бактерий активируются АЦ, продуцирующие сАМР. Циклический АМР связывается с CAP-белком, который присоединяется к промоторам ряда оперонов, усиливая их экспрессию (слайд 41, презентация). В растительных клетках наличие АЦ и участие сАМР в регуляторных процессах остается под вопросом.

Аденилатциклазы млекопитающих представляют собой сложные интегральные белки гликопротеины с молекулярной массой 110–180 кД (1064–1248 аминокислотных остатков). Полипептидная цепь всех мембранных АЦ 12 раз пересекает мембрану, формируя две отдельные структуры, каждая из которых состоит из 6 трансмембранных доменов (слайд 42, презентация). 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 фермента и участки связывания α -субъединиц G-белков.

Модуляция активности АЦ 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 АЦ. 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 АЦ определенное значение приобретают $\beta\gamma$ -димеры, которые отделяются от соответствующих α -субъединиц. Считается, что свободные $\beta\gamma$ -комплексы связывают α -субъединицы G-белков другого типа, предотвращая их влияние на АЦ.

В настоящее время у млекопитающих идентифицировано 9 изоформ АЦ. В регуляции их активности 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.

Значительное влияние на активность АЦ 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.

Регуляция циклическим АМФ протеинкиназы А у 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 каталитически активных (С) и двух регуляторных (R) субъединиц. Стабильность структуры тетрамера поддерживается за счет слабых взаимодействий между активным центром частиц С и псевдосубстратными последовательностями регуляторных субъединиц. Эта последовательность (–RRGAI–) похожа на последовательность субстрата, которая подвергается фосфорилированию (–RRGSI–), в которой вместо аланина (А) находится серин (S). Каждая R-частица имеет два участка связывания сАМР. В результате присоединения 4-х молекул сАМР к двум регуляторным субъединицам, изменяется конформация последних, что способствует диссоциации тетрамера. Это приводит к высвобождению двух отдельных каталитически активных субъединиц и димера R_2 (слайд 43, презентация).

Свободные субъединицы С приобретают способность фосфорилировать белки, имеющие характерные последовательности. После диссоциации тетрамерного неактивного комплекса ослабевают связи сАМР с регуляторными субъединицами, сАМР диссоциирует и разрушается фосфодиэстеразой. Таким образом, регуляторный димер может снова инактивировать каталитические субъединицы путем связывания. Если клетка продолжает стимулироваться внешним сигналом, благодаря которому поддерживается синтез вторичного мессенджера сАМР, активные субъединицы С будут снова отделяться от регуляторных частиц. Прекращение рецепции сигнала приведет к быстрому затуханию протеинкиназной активности.

Протеинкиназа А была выявлена во всех животных клетках. 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.

ФОСФОЛИПАЗЫ

Фосфолипазы — это ферменты, катализирующие гидролиз определенных эфирных связей в молекулах фосфолипидов (слайд 44, презентация). В сигнальных путях участвуют разные фосфолипазы, наиболее важными из которых являются фосфолипазы С, D и A_2 (соответственно, они имеют обозначения PLC, PLD и PLA_2). Активность всех этих фосфолипаз приводит к образованию целого ряда вторичных мессенджеров, участвующих в модуляции активности компонентов каскадных сигнальных систем.

Фосфолипазы D

Фосфолипазы D (PLD) отщепляют терминальную фосфоэфирную связь фосфолипида до фосфатидной кислоты (PtdOH) и водорастворимой головной группы. 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.

Фосфолипазы D согласно их субстратной специфичности и требованиям двухвалентных ионов подразделяют на три группы:

- а) обычные PLD имеют максимальную активность при миллимолярной концентрации Ca^{2+} (20–100 мМ);
- б) полифосфоинозитид-зависимые PLD (PI-PLD) наиболее активны при микромолярном уровне Ca^{2+} и специфичны к фосфатидилинозитолполифосфатам;
- в) фосфатидилинозитол-специфичные PLD (PtdIn-PLD) являются Ca^{2+} -независимыми.

В растениях преобладают обычные PLD, они же лучше всего исследованы. Выделенные из различных источников обычные PLD показывают значительную гомологию.

PI-PLD были охарактеризованы в *Arabidopsis*, а PtdIn-PLD — в *Catharantus roseus* (катарантус розовый, в садоводстве известный больше как барвинок розовый).

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

Катализ и субстратная специфичность

Клонированные из эукариотических организмов PLD содержат два мотива HxKxxxxD, которые используются в качестве маркеров для идентификации PLD. Однако такие же последовательности встречаются и в молекулах фосфолипид-синтезирующих ферментов, которые относят к суперсемейству PLD.

Ферменты PLD суперсемейства используют консервативный гистидин для нуклеофильной атаки фосфорной группы субстрата. Гидролиз P–O связи осуществляется путем двухшаговой пинг-понг реакции, в процессе которой фосфатидил сначала присоединяется к ферменту (то есть вовлекается фосфатидил-ферментный посредник).

Большинство растительных PLD имеют широкую субстратную специфичность, но отдельные группы показывают различную способность гидролизовать определенный субстрат. 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 один из данных PLD не расщепляет фосфатидилинозитол, фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат и кардиолипин.

Ca^{2+} -независимые PLD, наоборот, гидролизуют фосфатидилинозитол, но не действуют на фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин.

Регуляция и активация

Активность PLD зависит от многих факторов. Среди них Ca^{2+} , липидный состав, pH, инозитолфосфаты и др. На N-терминальном участке молекул растительных Ca^{2+} -зависимых PLD обнаружен 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.

PLD α приобретает активность при физиологических (микромолярных) концентрациях Ca^{2+} и кислых значениях pH (4,5–5,0) в присутствии липидных везикул. PLD β и γ максимальную активность имеют при нейтральных значениях pH, при этом их требование Ca^{2+} не зависит от pH.

Механизм активации PLD предполагает связывание молекулы фермента с мембраной. Растворимая фракция PLD является неактивной. Перераспределение PLD

между цитоплазматической и мембранной фракциями происходит во время развития и стрессовых воздействий. 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.

Клеточная функция

Каталитическая активность PLD наблюдается на разных этапах онтогенеза растений и имеет важное значение при широком спектре абиотических и биотических стрессовых воздействий.

PLD выполняют центральную роль в стрессовых реакциях растений, в которых опосредуют действие стрессовых гормонов (АБК, жасмоната, этилена) и их продукцию. Одним из доказательств участия PLD в стрессовых реакциях является то, что продукт каталитической активности PLD — фосфатидная кислота (PtdOH) — вызывает эффект действия АБК. Это было продемонстрировано на протопластах алейроновых клеток ячменя и замыкающих клеток устьиц *Vicia faba*.

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. В условиях недостаточного водоснабжения стимулируется экспрессия PLD α . Экспрессия и активность других видов PLD при водном стрессе не изменяется. Показано, что репрессия PLD α оказывает негативное влияние на развитие нормальной стрессовой реакции, причем другие типы PLD не могут компенсировать недостаток активности PLD α .

Исследование уровня экспрессии генов показало, что различные изоформы PLD имеют неодинаковое значение в стрессовом ответе. При механическом повреждении листьев *Arabidopsis* возрастает экспрессия генов PLD β , PLD γ 1 и PLD γ 2, тогда как активность PLD α 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. Например, из двух PLD α у *C. plantagineum* одна — CrPLD1 — является конститутивной, а другая — CrPLD2 — стимулируется дегидратацией.

Известно, что в животных и дрожжевых клетках фосфолипазы D участвуют во внутриклеточном транспорте везикул, секреции, перестройке цитоскелета и др. Продукт каталитической активности PLD стимулируют протеиновые киназы, липидные киназы, фосфатазы и фосфолипазы. Так, фосфатидная кислота стимулирует многие протеиновые Ca^{2+} -зависимые и Ca^{2+} -независимые киназы, в том числе, протеинкиназу C, MAPK (митоген-активируемую протеиновую киназу), Raf-киназу. Также у животных фосфатидная кислота опосредует активность NADPH-оксидазы, что доказывает участие PLD в контроле окислительной вспышки.

Многие подобные функции PLD и продуктов ее катализа показаны и для растений. Например, протеиновые киназы активируются у растений фосфатидной кислотой в ответ на раневое воздействие. Также PtdOH активирует ферменты, вовлекаемые в сигнальный каскад: фосфоинозитол-5-киназу, PLC и PLA $_2$. Однако роль PLD в элиситор-индуцируемой продукции активных форм кислорода остается неясной.

В большинстве случаев активация PLD сопровождается повышением активности PLC. Однако на клетках хламидомонады было показано, что при влиянии KCl в относительно низких концентрациях (50–75 мМ) и других солей, не обладающих осмотически активными свойствами, специфически активируется PLD без повышения

активации PLC и фосфатидаткиназы. Этот эффект был связан со снижением внеклеточного pH благодаря активации H⁺-АТФазы.

Фосфолипазы C

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

Фосфолипазы C — цитоплазматические мономерные белки. Молекулярные структуры различных изоформ имеют сходные и уникальные черты. На N-концах полипептидных цепей всех фосфолипаз C локализованы участки, необходимые для присоединения фермента к мембране. C-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-зависимые PLC (PI-PLC) гидролизуют фосфатидилинозитолполифосфаты;
- 2) неспецифичные PLC (также относят к PtdCho-PLC) действуют на фосфатидилхолин и ряд других фосфолипидов;
- 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 матриксных белков клеточной стенки (арабиногалактанпротеин).

Среди перечисленных групп наиболее изученными являются полифосфоинозитид-зависимые PLC. У животных известные PI-PLC подразделены на три класса β , γ и δ . Растительные PI-PLC наиболее близки по размеру и доменной структуре к PI-PLC δ животных. Все растительные PI-PLC содержат домены X (≈ 170 а/к) и Y (≈ 260 а/к), необходимые для фосфоэстеразной активности, а также C2-домен на C-терминальном участке молекулы, через который осуществляется Ca²⁺-зависимое связывание фосфатидилинозитола.

Катализ и регуляция

Фосфолипаза C млекопитающих PI-PLC $\delta 1$ связывается с мембранами через PH-домен, который специфически связывает фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат. Затем в присутствии ионов Ca²⁺ C2-домен фиксирует каталитический домен в корректной для активности ориентации. Два остатка гистидина активного центра совместно с ионами Ca²⁺ опосредуют катализ.

Механизм катализа растительных и животных фосфолипаз C, как считают, во многом сходен. Это связано с тем, что в структуре растительных PLC обнаружены консервативные участки, необходимые для каталитической активности: C2-домен и два остатка гистидина. Вместе с тем, PH-домен у растительных PI-PLC не выявлен, поэтому предполагается иной механизм взаимодействия фермента с мембранами. Рассматривается возможность некаталитического связывания фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата участком молекулы PI-PLC в районе активного центра. Таким образом, в отличие от PI-PLC млекопитающих, для которых характерны множественные сайты взаимодействия с

мембранами, растительные PI-PLC связываются с мембраной одним участком. Кроме того, дополнительными участками взаимодействия PLC с мембранами и у животных, и у растений могут служить мембранно-связанные сигнальные молекулы, через которые осуществляется активация фосфолипаз (G-белки, рецепторные киназы и др.).

Ионы Ca^{2+} могут регулировать активность PI-PLC двумя способами: они влияют на катализ и на эффективность связывания фермента с мембраной. Клонированные растительные PI-PLC при физиологических (микромольных) концентрациях Ca^{2+} предпочитают в качестве субстрата фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат, при миллимольных концентрациях Ca^{2+} — фосфатидилинозитол. То есть при повышенных концентрациях ионов Ca^{2+} снижается специфичность PI-PLC по отношению к фосфатидилинозитол-4,5-дифосфату. В клетках растений обнаружена активность PI-PLC, ассоциированная с мембранами и в растворимой фракции. Для первой характерна активность при микромольных концентрациях Ca^{2+} , а для второй — при миллимольных. Эта особенность является доказательством того, что активность PI-PLC модулируется помимо всего субклеточной локализацией фосфолипаз С.

Модуляция активности PI-PLC у млекопитающих осуществляется различными способами. Так, PI-PLC β активируется α -субъединицей G_q -белка, PI-PLC γ — рецепторными и нерцепторными тирозин-киназами, а PI-PLC $\delta 1$ может активироваться α -субъединицей гетеротримерного G_{12} -белка и малым G-белком RhoA. Для растительных PI-PLC показано, что в их регуляции принимают участие мономерные G-белки, однако подробно данный вопрос не исследован.

В механизме регуляции активности PI-PLC важным является поддержание определенного уровня различных изоформ этих ферментов в тканях. Обнаружено, что 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.

Продукты и ферменты модификации фосфатидилинозитола

Полифосфоинозитид-зависимые фосфолипазы С расщепляют разные виды фосфатидилинозитидов. Не все эти субстраты имеют сигнальное значение. Ряд ферментов, которые контролируют фосфорилирование фосфатидилинозитолов, следует рассматривать в качестве сигнальных энзимов, поскольку от их активности зависит концентрация предшественников вторичных мессенджеров.

Полярный мембранный липид фосфатидилинозитол (PI) синтезируется первоначально в нефосфорилированном виде, а затем подвергается ковалентным модификациям путем фосфорилирования и дефосфорилирования (слайд 50, презентация).

Инозитольное кольцо фосфатидилинозитола (PI) фосфорилируется по положениям 3, 4 и 5 специфическими киназами. Субстратная специфичность этих киназ и наборы продуктов фосфорилирования у растений и животных не является абсолютно идентичными. Например, у растений фосфатидилинозитол может быть одновременно фосфорилирован только по двум положениям: 3 и 4; 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 по третьему положению инозитола у растений фосфорилируется только фосфатидилинозитол, но не его фосфорилированные производные — фосфатидилинозитолфосфаты (фосфатидилинозитиды).

Кроме киназ обнаружены также специфические фосфатазы, удаляющие фосфорные группы из молекул фосфатидилинозитидов. Согласованная работа киназ, фосфатаз, а также фосфолипаз способствует поддержанию в клетках определенных количеств соединений, необходимых для многих клеточных процессов, таких как формирование,

транспорт и докирование везикул, привлечение к мембране и модуляция активности ферментов и регуляторных белков, а также передача внутриклеточного сигнала и многих других.

Фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI-3-P) важен для трафика везикул к вакуоли, пролиферацию клеток и организацию цитоскелета. Кроме того, PI-3-P является промежуточным продуктом синтеза фосфатидилинозитол-3,5-дифосфата (PI-3,5-P₂). Образование PI-3-P у растений катализируется **фосфатидилинозитол-3-киназой**, которая фосфорилирует PI до фосфатидилинозитол-3-фосфата.

Фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI-4-P) участвует во внутриклеточной ротации мембранного материала. О важности роли этого соединения свидетельствует тот факт, что «нок-аут» мутация по одному из генов PI-4-киназы у *Arabidopsis AtPI4Kβ* 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 гомологи.

Фосфатидилинозитол-5-фосфат (PI-5-P) рассматривается как важный предшественник фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PI-4,5-P₂). Иной специфической функции этого соединения не выявлено. 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%. Механизм образования PI-5-P окончательно невыяснен. Не исключается, что его синтез может катализироваться **фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназой**, что было продемонстрировано *in vitro*. Хотя следует заметить, что большинство ферментов, участвующих в образовании фосфорилированных форм фосфатидилинозитола, имеют более широкую субстратную специфичность *in vitro*, по сравнению с *in vivo*. Вторая, и более вероятная, возможность: продукция PI-5-P из PI-3,5-P₂. В начале 2000-х гг. у животных был идентифицирован фермент **инозитоллипид-3-фосфатаза** (MTMR3), который специфически дефосфорилировал PI-3,5-P₂ до PI-5-P.

Фосфатидилинозитол-3,5-дифосфат (PI-3,5-P₂) синтезируется из фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI-4-P) **фосфатидилинозитол-3-фосфат-5-киназой**. 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 тонопласта. 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 наиболее важным среди фосфатидилинозитидов соединением для функционирования сигнальных механизмов с участием фосфолипазы C. Образование PI-4,5-P₂ катализируется **фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназой** из фосфатидилинозитол-4-фосфата (PI-4-P). Предположительно в геноме *Arabidopsis* кодируется 9 генов PI-4-P-5-киназы. 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 фосфолипазы C в условиях, при которых стимулируется данная сигнальная система. У вольвоксовой водоросли

Chlamydomonas при гиперосмотическом стрессе повышение активности фосфолипазы С и снижение уровня PI-4,5-P₂ наблюдается через 30 секунд после стимуляции синтеза этого фосфолипида. На *Arabidopsis* было показано, что в клеточной суспензии и интактных растениях осмотический стресс приводит к 8–25-кратному повышению концентрации PI-4,5-P₂ через 10–20 минут и это сопровождается значительным повышением уровня инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃). На основании этих данных делается вывод, что активность фосфолипазы С стимулируется повышением уровня субстрата (PI-4,5-P₂) и в ряде случаев не требует иных механизмов активации.

Сигнальная роль PI-4,5-P₂ определяется не только тем, что он является предшественником вторичного мессенджера IP₃. Обнаружено, что PI-4,5-P₂ является сайтом связывания регулятора генной активности — белка Tubby. Этот транскрипционный фактор присоединяется к мембране через PI-4,5-P₂ посредством карбокситерминального домена Tubby (по наименованию этого домена называют белок). В момент активации фосфолипаза С высвобождает Tubby-белок, который мигрирует в ядро и модулирует активность экспрессии специфических генов.

Помимо сигнальной роли, предполагается участие PI-4,5-P₂ в транспорте везикул. PI-4,5-P₂, 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.

Клеточная функция PLC

Сигналинг, опосредованный PI-PLC, является важным для ответа растений на различные стимулы, включая осмотический стресс, АБК, свет, гравитацию, воздействие патогенов и загрязнение. Показано, например, что PI-PLC принимают участие в сигнальном каскаде, который приводит к светозависимому фосфорилированию ФЭП-карбоксилазы.

В животных системах хорошо изучен механизм, в котором PI-PLC расщепляют фосфатидинозитол-4,5-дифосфат (PtdIP₂) на инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG). Вторичный мессенджер IP₃ связывается с IP₃-рецепторами и стимулирует высвобождение ионов Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума, а DAG активирует протеинкиназу С (слайд 51, презентация).

Многие из компонентов PI-PLC каскада животных обнаружены в растительных клетках. Во-первых, в мембранах растительных клеток присутствует PtdIP₂, который гидролизуется фосфолипазой С с образованием IP₃ и DAG. Во-вторых, IP₃ стимулирует высвобождение ионов из внутренних резервов в цитоплазму. В растениях, тем не менее, уровень фосфатидинозитол-4,5-дифосфата в зависимости от типа клеток составляет 0,05–0,50% от общего содержания фосфолипидов, что значительно ниже, чем у животных. Кроме того, на данный момент очень немного известно о мишенях IP₃ и DAG у растений.

Существуют неопровержимые доказательства того, что мобилизация ионов Ca²⁺ и их осцилляции играют важную роль в опосредованном PI-PLC сигнальном пути. Известно, что в замыкающих клетках устьиц IP₃ стимулирует повышение уровня цитоплазматического Ca²⁺, который ослабляет активность поглощающих K⁺-каналов, а ингибирование PI-PLC ингибирует АБК-стимулируемое закрывание устьиц. Значение PI-PLC и осцилляции IP₃ и Ca²⁺ в цитоплазме продемонстрировано также для гравитропической реакции растений.

Помимо существенной роли вторичных мессенджеров IP₃ и Ca²⁺, снижение уровня фосфатидинозитол-4,5-дифосфата (PtdIP₂) под действием PI-PLC также оказывает регуляторный эффект. PtdIP₂ является активатором PLD и субстратом PI-3-киназы. Также PtdIP₂ может служить сайтом для прикрепления к мембране ряда белков и участвовать во внутриклеточном переносе везикул. Взаимодействуя с актин-связывающими белками,

такими как профилин, гелсолин, кофилин, актинин, PtdIP₂ участвует в модуляции динамических изменений цитоскелета. Таким образом, уровень и локализация PtdIP₂ в клетках регулируется динамически, а активность PI-PLC может играть важную роль в регуляции этого процесса.

Отличие PLC-сигналинга растений и животных

У растений и грибов сигнальный механизм с участием фосфолипазы C отличается от такового у животных. Основным отличием является набор вторичных мессенджеров. У животных вторичными мессенджерами выступают продукты гидролиза фосфоинозитол-4,5-дифосфата: инозитол-трифосфат (IP₃) и диацилглицерол (DAG), а у растений и грибов — продукты последующей метаболизации этих соединений: инозитол-гексакисфосфат (IP₆), фосфатидная кислота и диацилглицерол-пирофосфат (DGPP) (слайд 52, презентация).

Инозитол-гексакисфосфат

Инозитол-трифосфат (IP₃) стимулирует у растений высвобождение кальция из внутриклеточных запасов, но в ЭПР растительных клеток IP₃-стимулируемые Ca²⁺-каналы (или IP₃-рецепторы — IP₃-R) не были обнаружены. Также следует заметить, что основным источником внутриклеточного кальция является вакуоль. Но в тонопласте IP₃-R тоже не присутствуют. Секвенирование ДНК показало, что белки близкие по структуре к IP₃-стимулируемым Ca²⁺-каналам не кодируются геномом *Arabidopsis*. Тем не менее, IP₃-чувствительные Ca²⁺-каналы во внутриклеточных мембранах присутствуют, но принципиально отличаются от подобных молекул животных.

В замыкающих клетках устьиц картофеля и конских бобов под влиянием АБК отмечено накопление **инозитол-гексакисфосфата** (IP₆), который также стимулирует высвобождение внутриклеточного Ca²⁺. К тому же для растений и грибов это соединение является более эффективным, чем IP₃. По некоторым оценкам IP₆ в 100 раз более активный метаболит, по сравнению с IP₃. Предполагается, что после гидролиза PI-4,5-P₂ продукт IP₃ не накапливается, а быстро метаболизируется в IP₆. Такой механизм был обнаружен у делящихся дрожжей.

Второе существенное отличие от сигнальной системы животных: диацилглицерол (DAG) у растений не выполняет функций вторичного мессенджера. DAG фосфорилируется диацилглицеролкиназой (DGK) до фосфатидной кислоты (PA). Поскольку не DAG, а PA взаимодействует с сигнальными молекулами, то фермент диацилглицеролкиназа, катализирующая превращение DAG → PA, рассматривается важным сигнальным ферментом в рамках растительных сигнальных систем.

Фосфатидная кислота тоже фосфорилируется в растительных клетках при активации фосфолипаз C и D. **Фосфатидаткиназа** (PAK) катализирует образование диацилглицерол-пирофосфата (DGPP). Значение DGPP заключается, прежде всего, в ослаблении сигнала, который передается через PA. Хотя в настоящее время не известны мишени, на которые бы влиял DGPP, тем не менее их существование не исключается. У высших животных фосфатидаткиназная активность и присутствие DGPP в клетках не обнаружены.

У растения *Catharanthus roseus* и *Arabidopsis* были обнаружены специфические фосфатазы, дефосфорилирующие DGPP и PA.

Фосфолипазы A₂

Фосфолипазы A₂ отщепляют *sn*-2 ацилэфирные связи фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот и 1-ацил-2-лизофосфолипидов. Фосфолипазы A₂ животных классифицируются в 10 групп, которые распределяют в три главных типа согласно их биологическим свойствам:

- 1) секреторные (secretory) низкомолекулярные фосфолипазы A₂ (sPLA₂);
- 2) цитозольные (cytosolic) Ca²⁺-зависимые фосфолипазы A₂ (cPLA₂);

3) внутриклеточные (intracellular) Ca^{2+} -независимые фосфолипазы A_2 (iPLA₂).

Растительные фосфолипазы A_2 во многом сходны с животными, однако у растений к настоящему времени выделено, очищено и клонировано только два типа: секреторные (sPLA₂) и внутриклеточные (iPLA₂).

Впервые sPLA₂-подобная фосфолипаза A_2 была выделена из эндосперма семян вяза. Фермент имеет низкую молекулярную массу — 14 кД, требует миллимолярные концентрации Ca^{2+} для оптимальной активности и показывает специфичность в отношении *sn*-2 ацильной группы. Из тканей нескольких видов растений (рис, гвоздика) были выделены и клонированы кДНК соответствующие секреторным фосфолипазам A_2 . Анализ последовательности этих ДНК показал наличие нескольких дисульфидных связей и сигнального пептида, определяющего секреторные свойства.

Внутриклеточные фосфолипазы A_2 (iPLA₂) представляют группу, включающую мембранно-связанные и цитозольные ферменты с молекулярной массой 40–48 кД. Очищенные ферменты растений ингибируются специфическими ингибиторами животных iPLA₂, но не ингибиторами sPLA₂. Все известные растительные iPLA₂ предпочтительно отщепляют линолевую и линоленовую группы, находящиеся в *sn*-2 положении фосфатидилхолина и обладают также лизофосфолипазной активностью (но не активностью фосфолипазы A_1). Эти ферменты стимулируются кальмодулином, в отсутствие которого не реагируют на изменение концентрации Ca^{2+} .

Основные типы фосфолипаз A_2 имеют разный механизм действия. Основная информация об этом известна преимущественно из исследований животных PLA₂. Фосфолипазы iPLA₂ и sPLA₂ 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 sPLA₂, однако Ca^{2+} необходим для связывания этого фермента с мембраной.

Секреторные фосфолипазы A_2 , в отличие от других групп непосредственно используют ионы Ca^{2+} в активации. В молекуле фермента есть консервативные Ca^{2+} -связывающие петли (EF-руки). Связывание кальция стабилизирует переходное состояние молекулы, необходимое для проявления активности. Кроме того, 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.

Растительные PLA₂ регулируют, главным образом, октадеканойдный путь, в котором из линоленовой кислоты образуются жасмонаты и другие оксипиены (слайд 55-56, презентация). Продукты октадеканойдного пути участвуют в регуляции ответных реакций на механические повреждения и воздействия патогенов. В результате действия этих стрессоров в растениях наблюдается возрастание активности PLA₂ и, как результат, системное накопление лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтаноламина, а также высвобождение полиненасыщенных жирных кислот (прежде всего линоленовой), которые подвергаются действию липоксигеназ и вовлекаются в октадеканойдный путь. В стрессированных клетках PLA₂ могут участвовать также в генерации активных форм кислорода и синтезе алкалоидов. Активация PLA₂ можно продемонстрировать в отсутствие стресса, но под действием системина или олигосахаринов.

Помимо стрессовых реакций фосфолипазы A_2 участвуют в других клеточных процессах: метаболизме липидов и ауксин-стимулируемом росте. PLA₂-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, PLA₂ участвуют в накоплении запасных липидов. На семенах огурца показано, что PLA₂ локализируются в сферосомах семядолей и участвуют в катаболизме и утилизации

запасных липидов в процессах прорастания семян и роста проростков. В ауксин-стимулируемом росте высвобожденные жирные кислоты могут служить в качестве вторичных мессенджеров, посредством которых частично регулируется рост клеток растяжением.

Различные сигнальные пути (стресс- или ауксин-индуцируемые), по-видимому, вовлекают разные типы PLA₂. Так ингибитор внутриклеточных фосфолипаз A₂ HELSS тормозит ауксин-индуцируемое удлинение гипокотилей цуккини и колептилей кукурузы, а ингибитор системин-индуцируемых PLA₂ AACOCF₃ оказался не эффективным в отношении ростовых реакций.

Структура фосфолипаз A₂. Фосфолипазы A₂ являются одиночными полипептидами, однако некоторые из них в ряде случаев могут образовывать полимерные группы. Мономеры фосфолипаз состоят из 125–130 аминокислот и имеют молекулярную массу 14 кДа. Для первичной структуры этих ферментов характерно наличие около 20 высококонсервативных аминокислот, большую часть которых составляют остатки цистеина. Консервативные остатки цистеина образуют множество дисульфидных мостиков, что, вероятно, имеет решающее значение для формирования третичной структуры и поддержания активности ферментов. По характерным особенностям первичной структуры фосфолипазы A₂ разделяются на две группы. У ферментов первой группы два остатка цистеина (Цис-11 и Цис-77) образуют дисульфидную связь. Ферменты второй группы вместо этих цистеинов содержат полярные заряженные аминокислотные остатки — Лиз-11 и Глу-77, которые формируют солевой мостик. Таким образом, несмотря на присутствие разных пар аминокислот, в обоих случаях они взаимодействуют между собой, обеспечивая поддержание аналогичных третичных структур, что имеет важное значение для функционирования ферментов. Консервативные аминокислотные остатки Гис-48, Тир-52, Тир-73 и Асп-99 определяют каталитическую активность фосфолипаз A₂. N-концевые области молекулы ферментов выполняют функции распознавания границы раздела липид–вода, то есть обеспечивают связывание полипептида с мембраной. Аминокислотные остатки 25–35 формируют Ca²⁺-связывающий участок фермента.

Некоторые фосфолипазы A₂, входящие в состав ядов, имеют выраженное пресинаптическое нейротоксическое действие. Характерно, что первичная структура токсичных фосфолипаз имеет некоторые отличия от структуры нетоксичных. Например, фосфолипазы ядов гремучих змей содержат положительно заряженные аминокислоты (Арг-65 и Лиз-69), а в молекулах нетоксичных фосфолипаз в аналогичных участка полипептидной цепи расположены отрицательно заряженные аминокислоты. Также токсичные и нетоксичные фосфолипазы различаются по четвертичной структуре. Как правило, токсичные фосфолипазы, в отличие от нетоксичных, образованы несколькими субъединицами, причем токсичностью обладает одна из субъединиц. Например, тайпоксин — один из наиболее эффективных токсинов змей — имеет гетеротримерное строение, но токсичной является только α-субъединица, а две другие выполняют вспомогательную роль.

Фосфолипазы A₁ и B, лизофосфолипазы A

Фосфолипазы A₁ гидролизуют *sn*-1 ацилэфирные связи фосфолипидов с образованием свободных жирных кислот и 2-ацил-1-лизофосфолипидов. Фосфолипазы B (лизофосфолипазы A) удаляют две жирные кислоты из молекул фосфолипидов, то есть обладают PLA и лизоPLA активностью.

В тонопласте клеток тополя *Acer pseudoplatanus* была обнаружена PLA₁ активность. О фосфолипазах B растений известно очень мало.

В животных клетках выделяют группу больших лизофосфолипаз и два типа малых (I и II) с молекулярной массой около 25 кД. К большим лизофосфолипазам относят

фосфолипазы B, PLA₁ cPLA₂ iPLA₂, а также некоторые трансацилазы и ацилтрансферазы. О наличии лизофосфолипаз в растениях есть ряд сообщений. Активность кислых и основных лизофосфолипаз обнаружена в прорастающих семенах ячменя. Считают, что они вовлекаются в процессы мобилизации запасных липидов.

Лизофосфолипиды присутствуют в биологических мембранах в незначительных количествах, но вместе с тем, выполняют важные регуляторные функции: трансдукция внутриклеточных сигналов и транспорт везикул. В животных клетках лизофосфатидилхолин модулирует экспрессию большого количества генов, способствует секреции ростовых факторов и индуцирует адгезию клеток. Рецепторы специфичные к лизофосфатидной кислоте у животных являются G-белок сопряженными рецепторами. Формирование лизофосфатидной и фосфатидной кислот происходит специфически в шейке формирующихся синаптических везикул, то есть переход лизофосфатидная кислота ⇌ фосфатидная кислота необходим для почкования мембран.

В растения 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

Ферменты липидном сигнального каскада часто формируют сложные сети, которые опосредуют специфический клеточный ответ. Примером такого взаимодействия является участие фосфолипаз C, D и A в регуляции устьичной транспирации. PLD и фосфатидилинозитид-зависимые PLC (PI-PLC) опосредуют закрывание устьиц, тогда как PLA стимулируют их открывание. Под влиянием PI-PLC высвобождается инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃), который стимулирует повышение ионов Ca²⁺ в цитоплазме. Ионы Ca²⁺ способствуют связыванию PLD с мембранами, в результате чего эти ферменты активируются. Продукт катализа PLD — фосфатидная кислота активирует фосфатидилинозитол-5-киназу (PtdInP-5 киназа), продуцирующую фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PtdInP₂) — субстрат для PI-PLC. Таким образом, PI-PLC, PLD и PtdInP-5 киназа создают позитивную регуляторную петлю.

С другой стороны, лизофосфолипиды ингибируют PLD, а ферменты, продуцирующие их — фосфолипазы A, — могут выступать антагонистами PLD и PI-PLC, стимулируя закрывание устьиц. Однако экспериментально это взаимодействие не было проверено.

Известно, что при раневом стрессе в клетках растений наблюдается активация фосфолипаз A, высвобождающих линоленовую кислоту, из которой генерируются жасмонаты и другие оксипиены. Изучение накопления продуктов липидного обмена показало, что повышение количества фосфатидной кислоты предшествует возрастанию уровня диацилглицерола, свободных жирных кислот, пероксидированных жирных кислот и лизофосфолипидов. Следовательно, PLD, продуцирующие фосфатидную кислоту, могут стимулировать активацию других ферментов катаболизма липидов. На растениях *Arabidopsis* было продемонстрировано, что репрессия PLDα приводит к снижению стресс-индуцируемого накопления линоленовой кислоты и жасмонатов.

NO-СИНТАЗА И ОКСИД АЗОТА

В начале 1990-х годов было сделано значительное открытие. Было показано, что оксид азота NO, который часто обнаруживается в мембранах и редокс-центрах белков, выполняет важную регуляторную функцию. В 1992 году журнал «Science» назвал NO «Молекулой года».

Первоначально предполагалось, что присутствие этого вещества в живых тканях является результатом повреждений или загрязнения, но затем была доказана его физиологическая роль. Поскольку воздействие NO на эндотелий кишечника млекопитающих вызывало расслабление клеток гладкой мускулатуры, это вещество было идентифицировано как релаксирующий фактор. Однако физиологическое значение NO оказалось значительно шире. Сейчас установлено, что NO является вторичным мессенджером, компонентом сигнальных механизмов, контролирующихся у животных тонус гладкой мускулатуры, нейротрансмиссию, пролиферацию клеток, апоптоз и защитные реакции в ответ на воздействие инфекционных агентов. Разработка этого вопроса позволила идентифицировать механизмы образования NO в тканях животных и его место в сигнальных путях.

Синтез NO катализируется ферментом **NO-синтазой** (NOS), выполняющей в системе трансдукции сигнала роль эффекторной молекулы. NOS — это большой ферментативный комплекс, который осуществляет синтез NO и цитруллина из аргинина и O₂. NOS присутствует в тканях в двух основных изоформах: конститутивной и индуцибельной. Конститутивная форма NOS присутствует постоянно в определенных типах клеток, например, нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS). Индуцибельная форма, iNOS, синтезируется при активации иммунной системы животных и играет центральную роль в развитии иммунного ответа.

Растительные ткани также реагируют на оксид азота и способны самостоятельно продуцировать его в больших количествах. У растений значение NO связывают с увеличением площади листовой пластинки, ростом корней и синтезом фитоалексинов. У растительных организмов, так же как и у животных, NO имеет важнейшее значение для защитных реакций. NO стимулирует экспрессию генов, кодирующих белки, обладающие бактерицидными и антигрибковыми свойствами, а также ферменты биосинтеза фенольных соединений, необходимых для развития системной приобретенной устойчивости (SAR) и реакции сверхчувствительности. Вместе с тем было обнаружено, что этот посредник участвует также в процессах заражения корней бобовых растений симбиотическими азотфиксирующими бактериями *Rhizobium*. Так же у бобовых NO опосредует фиксацию азота в клубеньках, связывая гемовую группу леггемоглобина.

Синтез NO в растениях осуществляется тремя разными способами. Во-первых, он может быть образован из NO₂ неферментативным путем при светозависимой конверсии каротиноидов. Из этого же субстрата возможен ферментативный путь синтеза: NADPH-зависимая мембранно-связанная нитрат-редуктаза катализирует образование NO из NO₂. А в 1996 году было показано, что в растениях функционирует также NO-синтаза.

Образование NO у растений и животных стимулируется различными внешними сигналами, но, как правило, непосредственная активация NOS происходит при повышении концентрации свободного Ca²⁺ в цитоплазме. То есть, любой сигнал, стимулирующий открывание Ca²⁺-каналов, опосредовано влияет на активирование NOS.

Оксид азота NO — уникальное низкомолекулярное соединение, обладающее свойствами классического вторичного мессенджера. NO является короткоживущей молекулой, которая способна легко диффундировать в тканях, проникая в клетки через мембраны без участия специализированных переносчиков и рецепторов. Характерной чертой воздействия NO на мишени является способность этого посредника связываться с редокс-центрами белковых молекул, то есть с сайтами, обладающими переменной степенью окисления. В качестве таких сайтов могут выступать, например, остатки

цистеинов или гемовое железо. Связывая мишени, NO активирует в клетке соответствующие процессы.

Одной из универсальных мишеней NO (для растений и животных) является гуанилатциклаза. Существует два основных класса этих ферментов: мембранно-связанные (трансмембранные) и растворимые (цитоплазматические). NO активирует **гуанилатциклазы, относящиеся к классу растворимых ферментов**. Гуанилатциклазы продуцируют циклический GMP (сGMP) из GTP. Молекулярные мишени сGMP пока еще недостаточно хорошо изучены, но предполагают, что к ним относятся два главных типа: сGMP-зависимые протеинкиназы (протеинкиназы G) и ионные каналы.

ИОНЫ Ca^{2+} 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+} способствуют передаче сигнала внутри клетки, то есть являются вторичными мессенджерами.

Клетки всех известных организмов способны поддерживать мембранный градиент концентраций ионов Ca^{2+} . Уровень концентрации свободного кальция в цитоплазме неактивированных клеток обычно составляет 10^{-7} – 10^{-6} М. В митохондриях 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 долговременное 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, а также 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. Таким образом, первыми возникли системы, удаляющие ионы кальция из цитоплазмы.

Следующим эволюционным этапом было возникновение сигнальных клеточных систем, использующих ионы Ca^{2+} в качестве вторичных мессенджеров. Это стало возможным потому, что концентрация этого иона кратковременно повышается в определенных условиях. Это событие сопровождается деполяризацией мембраны и является своеобразным сигналом тревоги. В клетках существуют разнообразные функциональные белки (ферменты, ионные каналы и каталитические неактивные регуляторные посредники), которые активируются при относительно высоких концентрациях кальция (10^{-5} М), что позволяет клеткам включать регуляторные механизмы. Большинство Ca^{2+} -регулируемых процессов в клетках происходит при кратковременных изменениях цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} в диапазоне 10^{-7} – 10^{-5} М.

Эффективная работа Ca^{2+} -зависимого сигнального механизма возможна в том случае, если в клетке работают три основные функциональные системы.

- 1) Системы активного транспорта Ca^{2+} , направленного из цитоплазмы в экстраклеточное пространство, ЭПР, митохондрии, а у растений — также в вакуоль.

Переносчики Ca^{2+} располагаются в мембранах, отделяющих цитоплазму от данных компартментов.

- 2) Кальциевые каналы, которые открываются при получении определенных сигналов, а ионы Ca^{2+} поступают через них в цитоплазму по градиенту концентраций.
- 3) Цитоплазматические компоненты сигнальных цепей (в том числе и конечные мишени), активирующиеся при повышении концентрации ионов Ca^{2+} .

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ КАЛЬЦИЯ

Ионы кальция выводятся из цитозоля против градиента концентраций, поэтому этот процесс требует затраты энергии. Различают первичный активный и вторичный активный транспорт. Первичный активный транспорт осуществляется при использовании энергии гидролиза АТФ, а для вторичного активного транспорта движущей силой является градиент концентраций ионов (обычно Na^+ или H^+).

Ca^{2+} -АТФазы принято разделять на два типа: РМ (плазмалемный) и ER (эндоплазматический). В животных клетках их принято называть соответственно РМСА и SERСА, а в растительных они относятся к типам ПВ и ПА. Эти переносчики представляют собой мономерные белковые молекулы, которые имеют гомологичную структуру. Полипептидная цепь Ca^{2+} -АТФазы образует 10 трансмембранных доменов, N- и C-концевые домены находятся на цитоплазматической стороне мембраны (слайд 59, презентация). Участки молекулы, расположенные между трансмембранными доменами 2–3 и 4–5 формируют большие цитоплазматические домены. Трансмембранные домены 4, 5, 6 и 8 образуют сайт, связывающий два иона Ca^{2+} . Главное отличие между переносчиками заключается в том, что Ca^{2+} -АТФазы РМ-типа (РМСА, ПВ) активируются комплексом Ca^{2+} -кальмодулином (СаКМ), а АТФазы ER-типа (SERСА, ПА) не имеют СаКМ-связывающего домена. У животных Ca^{2+} -АТФазы двух типов имеют строгое внутриклеточное распределение, отчего данные типы переносчиков и получили названия. Ca^{2+} -АТФазы РМ-типа локализуются на плазмалемме, ER-типа — на эндомембранах. В растительных клетках такого жесткого распределения Ca^{2+} -АТФаз разного типа не наблюдается. Так, АТФаза ER-типа (ПА) обнаруживается на вакуолярной мембране, внутренних мембранах хлоропластов, а также на плазмалемме.

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

- 1) Ca^{2+} -АТФаза связывает два иона кальция (все Ca^{2+} -связывающие белки имеют типичные Ca^{2+} -связывающие центры, которые называют EF-руками).
- 2) Ионы кальция способствуют повышению сродства АТФазы к АТФ. Молекулы АТФ связывается в виде комплекса с ионами Mg^{2+} .
- 3) Осуществляется автофосфорилирование переносчика — γ -фосфатная группа АТФ переносится на остаток аспарагиновой кислоты.
- 4) Фосфорилирование стимулирует конформационные изменения молекулы АТФазы, в результате которых связанные ионы Ca^{2+} переносятся с цитоплазматической стороны на экстраклеточную сторону мембраны.
- 5) В результате изменения конформации молекулы снижается сродство АТФазы к ионам Ca^{2+} , которые высвобождаются во вне-клеточное пространство.
- 6) Фосфатная группа отщепляется от остатка аспарагиновой кислоты.
- 7) Дефосфорилированная и декальцинированная молекула Ca^{2+} -АТФазы принимает исходную конформацию.

Вторичный активный транспорт ионов Ca^{2+} осуществляется антипортерами $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ и $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. У животных больше распространен $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник, но есть также и $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. В растительных клетках вторично активные транспортные системы используют преимущественно градиент концентраций протонов. Натриевые антипортеры у растительных организмов встречаются крайне редко, и обнаруживаются, как правило, только у натриефильных растений.

ИНДУЦИРОВАННОЕ ПОСТУПЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОПЛАЗМУ

Ионы Ca^{2+} проникают в цитоплазму по градиенту концентраций через селективные Ca^{2+} -каналы. Каналы в неактивных клетках находятся в закрытом состоянии и не пропускают ионы Ca^{2+} . Как правило, в структуре ионных каналов можно обнаружить 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 направлению градиента концентраций.

Существуют разные типы кальциевых каналов, которые различаются по способу регуляции.

Потенциал-управляемые каналы (*voltage-operated channels* — VOC или *Voltage-gated Ca^{2+} -channel* — VGCC) активируются при изменении мембранного потенциала. Каналы этого типа образованы мультибелковым комплексом. Кальциевый канал в клетках скелетных мышц млекопитающих состоит из пяти субъединиц: α_1 , α_2 , β , γ и δ . Наибольшая из них, α_1 , непосредственно формирует проводящий канал. Эта субъединица имеет четыре повторяющихся мотива с шестью трансмембранными доменами. Один из шести трансмембранных доменов каждой из четырех повторяющихся структур выполняет сенсорную роль. Деполяризация мембраны вызывает сдвиг сенсорного домена, что приводит к изменению конформации молекулы и открытию канала.

Рецептор-управляемые каналы (*receptor-operated channels* — ROC) активируются исключительно по рецептор-опосредованному пути и не реагируют на изменение потенциала плазматической мембраны. Различают четыре подгруппы рецептор-управляемых ионных каналов, участвующих в транспорте Ca^{2+} . К этой подгруппе относятся:

- 1) истинные рецептор-управляемые каналы, которые сами являются рецепторами (ионоформеры) или непосредственно с ними взаимодействуют;
- 2) каналы, активируемые G-белком (сигнал от рецептора передается на канал через G-белок);
- 3) каналы-рецепторы, управляемые вторичными мессенджерами, активируются инозитол-1,4,5-трифосфатом, инозитол-1,3,4,5-тетрафосфатом, ионами Ca^{2+} , циклическими нуклеотидфосфатами (сАТФ, сGMP);
- 4) каналы, регулируемые высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

В качестве примера рецептор-управляемого канала рассмотрим **рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата** (IP_3 -рецептор), который локализуется на мембранах эндоплазматического ретикулума. Вторичный посредник инозитолтрифосфат (IP_3) образуется в результате расщепления фосфатидинозитолдифосфата фосфолипазой С. Связываясь с IP_3 -рецептором IP_3 , стимулирует открывание Ca^{2+} проводящего канала и способствует мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных пулов.

Рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата представляет собой мономер (слайд 60, презентация). С-концевая сторона молекулы образует шесть трансмембранных доменов, которые формируют собственно канал. Два другие домена (N-концевые) обращены в

сторону цитоплазмы. В области этих доменов 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 цитозоль и вовлекается в контроль открывания канала. Несмотря на то, что IP_3 -рецептор является мономерной молекулой, способной активироваться инозитолтрифосфатом и проводить ионы Ca^{2+} , в мембранах ЭПР его мономеры формируют гомотетрамерную структуру.

Повышение концентрации IP_3 в цитоплазме приводит к его связыванию с рецептором. В большинстве клеток млекопитающих IP_3 -рецептор активируется при концентрациях IP_3 порядка 0,1–2 мкМ.

Выход Ca^{2+} через ионные каналы сопровождается противотоком ионов K^+ из цитоплазмы внутрь везикул. Благодаря этому компенсируется вынос заряда в цитоплазму, то есть снимается электрогенный эффект.

Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

Все известные Ca^{2+} -связывающие белки имеют характерные структуры — Ca^{2+} -связывающие центры, называемые EF-руками. Этот структурный участок имеет вид спираль–петля–спираль (слайд 61-А, презентация). Каждый из трех структурных элементов содержит примерно по 12 аминокислотных остатков. Петля необходима для связывания иона кальция. Координационное число иона кальция составляет 6–8, поэтому для его эффективного удержания в структуре белка необходимо наличие системы, которая позволяет образовать с ионом от 6 до 8 координационных связей определенной длины. Именно такой структурой является петля EF-руки. Полипептидная цепочка петли EF-руки оборачивается вокруг иона кальция, образуя почти правильный октаэдр (слайд 61-Б, презентация), на вершинах которого находятся аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании ионов кальция через кислородсодержащие группы. При этом устанавливается 6 координационных связей. Сродство каждого индивидуального Ca^{2+} -связывающего сайта составляет 10^{-6} – 10^{-5} М.

Большинство Ca^{2+} -связывающих белков содержат парное количество EF-рук (слайд 62, презентация). Парные Ca^{2+} -связывающие центры формируются на одном участке полипептидной цепи, причем оба они способствуют взаимной стабилизации. Данные структуры обладают значительной подвижностью, которая необходима для выполнения регуляторных функций, поэтому возможность взаимной стабилизации двух Ca^{2+} -связывающих центров является важным фактором стабильности всей молекулы белка.

Существуют белки, имеющие различное количество EF-рук: 2, 3, 4, 6. Наиболее простым является подробно изученный низкомолекулярный белок кишечника — **кальбиндин** (слайд 62, презентация). Полипептидная цепь молекулы кальбиндина формирует лишь две EF-руки. Кальбиндин выполняет роль в связывании и удержании кальция. Регуляторной функцией он не обладает. При связывании кальция существенных изменений в пространственной структуре молекулы кальбиндина не наблюдается.

Самым известным и широко распространенным Ca^{2+} -связывающим регуляторным белком является **кальмодулин** — низкомолекулярный белок с молекулярной массой 18 кД (слайд 62, презентация). Кальмодулин присутствует практически во всех клетках животных, растений и грибов, функционируя в них как многоцелевой внутриклеточный рецептор для ионов Ca^{2+} . Комплекс Ca^{2+} –кальмодулин (CaKM) не обладает ферментативной активностью, он выполняет роль аллостерического регулятора, который участвует в большинстве процессов, регулируемых ионами Ca^{2+} . Этот белок модулирует активность ферментов, участвующих в образовании и разрушении циклических нуклеотидов, NO-синтазы, различных протеинкиназ, фосфодиэстеразы и других ферментов. В некоторых случаях кальмодулин всегда связан со своей мишенью, являясь постоянной регуляторной субъединицей ряда ферментных комплексов, например, киназы фосфоорилазы. С

кальмодулином связана регуляция активности структурных белков цитоскелета, а следовательно, процессы экзо- и эндоцитоза, а также внутриклеточное движение. 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. 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.

В отсутствие ионов Ca^{2+} 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 (слайд 63-А, презентация). 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 перпендикулярное ей положение. Таким образом, молекула кальмодулина разворачивается (слайд 63-Б, презентация). 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 положительно заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками. Причем заряженные и гидрофобные группы располагаются на противоположных поверхностях α -спирали (слайд 63-Г, презентация). Раскрытая молекула кальмодулина взаимодействует отрицательно заряженными группами центральной α -спирали с положительно заряженной поверхностью α -спирали белка-мишени, а гидрофобными участками терминальных доменов — с гидрофобной поверхностью α -спирали белка-мишени (слайд 63-В, презентация). Кальмодулин, таким образом, обхватывает амфифильную спираль белка-мишени и стимулирует изменение его пространственной структуры и свойств.

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

КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

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

- 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 для регуляторных механизмов.

Регуляторный контроль путем ковалентной модификации имеет один недостаток: он не может обеспечить высокую скорость изменения активности, необходимую, например, при освобождении трансмиттера или сокращении мышц. Регуляция этих процессов осуществляется через быстрое изменение концентрации ионов Ca^{2+} . Но и в данном случае ковалентная модификация имеет определенное значение, поскольку может повысить компетентность фермента. В мышечной ткани, например, фосфорилирование фермента киназы фосфоорилазы способствует увеличению его сродства к Ca^{2+} .

Наиболее значимыми в регуляторном отношении и повсеместно распространенными в природе являются модификации белков посредством фосфорилирования и дефосфорилирования. Это неудивительно, так как введение или удаление фосфатной группы способствует значительному перераспределению зарядов в белковых молекулах, что в значительной степени отражается на их структуре и свойствах.

Косвенным подтверждением важности фосфорилирования белков является наличие у эукариот большого количества генов, кодирующих **протеинкиназы** — ферменты, катализирующие перенос фосфата от АТФ на специфический аминокислотный остаток. Так, в геноме дрожжей обнаружено более 120 генов различных протеинкиназ, а геном человека, по некоторым оценкам, кодирует более 1000 этих ферментов. Кроме того, более 30 % цитоплазматических белков имеют ковалентно связанный фосфат.

Фосфорилирование существенно изменяет пространственную структуру и, соответственно, свойства белков. Однако не существует общей зависимости между наличием фосфатной группы и активным состоянием белка. Если один вид белка в фосфорилированном состоянии переходит в активную форму, то другой, наоборот, ингибируется. Например, киназа гликогенфосфоорилазы активируется в результате фосфорилирования, а активность киназы гликогенсинтазы угнетается. Дефосфорилирование белков осуществляется соответствующими фосфопротеинфосфатазами и оказывает эффект обратный фосфорилированию.

Фосфатные группы в белковых молекулах могут быть связаны с различными аминокислотными остатками. Более обычным является фосфорилирование серинов, треонинов, но также фосфаты могут присоединяться к остаткам тирозинов и гистидинов. Присоединение фосфата осуществляется не только протеинкиназами, но и ферментами **фосфотрансферазами**, которые переносят фосфат от одного белка к другому, не используя АТФ. Примером такой трансферазы является гистидиновая фосфотрансфераза НРt, которая функционирует в двухкомпонентной многоступенчатой регуляторной системе растений. НРt принимает фосфат на остаток гистидина от остатка аспарагиновой кислоты geseiver-домена гистидиновой киназы и переносит его на аспарагиновую кислоту geseiver-домена регулятора ответа. Функциональное различие между киназными и фосфотрансферазными реакциями заключается в том, что на уровне киназ происходит усиление сигнала, а на уровне фосфотрансфераз — нет.

Протеинкиназы, катализирующие перенос γ -фосфата АТФ на молекулы белка, различаются по субстратной специфичности — они фосфорилируют конкретные аминокислотные остатки, локализованные в определенных последовательностях. Протеинкиназы различаются также по структуре и способу активации.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫЕ ПРОТЕИНОВЫЕ КИНАЗЫ

Посттрансляционная обратимая модификация белков путем фосфорилирования/дефосфорилирования (киназно-фосфатазный цикл) является важным регуляторным механизмом. Хантер (Hunter, 1987), используя электротехническую терминологию, сравнивает киназно-фосфатазную систему с транзистором, который может действовать как переключатель, включая или выключая белки-мишени, или как

усилитель, увеличивая амплитуду сигнала. Харди (Hardie, 1999), продолжая эту же аналогию, называет систему белковых киназ и фосфатаз в клетке центральной процессорной единицей (CPU). Клеточная CPU получает информацию о внешней среде через сенсорные и рецепторные белки, обрабатывает ее, а затем посылает соответствующие управляющие сигналы, регулируя метаболизм, трансмембранные ионные потоки, экспрессию генов, рост и деление клеток.

Среди всех белковых киназ серин/треониновые киназы являются самыми распространенными в живом мире. 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. Анализ последовательности ДНК позволил выявить только у *Arabidopsis thaliana* 175 различных серин/треониновых киназ.

Многие из серин/треониновых киназ растений были обнаружены путем поиска последовательностей, характерных для киназ животных и грибов. Однако, не смотря на мощность этого метода, он не позволит выявить полный спектр растительных серин/треониновых киназ. Во-первых, в растениях могут быть идентифицированы нетипичные для эукариот «прокариотические» киназы (например, гистидиновые киназы двухкомпонентных систем). Во-вторых, не исключена возможность существования киназ, характерных исключительно для растительных организмов. В настоящее время наиболее прогрессивным методом идентификации функциональных белков, в том числе киназ, является клонирование мутантных генов, выявленных у мутантов дефектных по соответствующим физиологическим функциям.

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИН-КИНАЗЫ (CDPK)

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 (EF-руки), или опосредованно через низкомолекулярный белок кальмодулин. Известные серин/треониновые киназы животных регулируются Ca^{2+} -кальмодулином (CaM). Их называют **кальмодулин-зависимые киназы** (CaMK). В отсутствие кальмодулина CaMK поддерживаются в неактивном состоянии, так как автоингибиторный район (псевдосубстратный мотив) закрывает доступ субстрата к киназному домену. Присоединение CaM к CaM-связывающему участку стимулирует изменение конформации киназы, что приводит к ее активации.

Исследование растительных киназ показало, что их активация ионами Ca^{2+} не требует присутствия кальмодулина. Оказалось, что в С-терминальном районе растительных кальций-зависимых протеин-киназ находится домен, который содержит четыре консервативных EF-руки и на 39% идентичен кальмодулину. Этот участок называют кальмодулин-подобным доменом (CLD — CaM-like domain). Наличие EF-рук определяет способность киназ непосредственно связывать ионы Ca^{2+} и реагировать на изменение их концентрации в клетке. Особенности структуры растительных кальций-зависимых протеин-киназ определили их название «кальмодулин-подобный домен протеин-киназы» (CaM-like domain protein kinase — CDPK).

В геноме растений идентифицированы множественные гены CDPK. У *Arabidopsis thaliana* обнаружено 13 киназ семейства CDPK. Эти киназы экспрессируются специфично относительно типа ткани и стадии развития растения. Вероятно, большое количество изоформ обеспечивает специфичность и пластичность ответа на различные стимулы, влияющие на повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Обилие CDPK в геноме растений, как считают, связано со специфичностью и пластичностью ответной

реакции на различные стимулы. Это выражается в том, что в растениях специфичные изоформы CDPK экспрессируются в зависимости от типа клеток и стадии развития. Кроме того, отдельные формы CDPK специфичны к определенным белковым мишеням.

Предполагаемыми 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, СГ-каналы, сахарозо-синтаза и др.

SNRK — SNF-1 ПОДОБНЫЕ КИНАЗЫ

Растительные киназы семейства SnRK являются гомологами дрожжевых киназ SNF-1. Отсюда **SnRK** — SNF-1 подобные киназы (SNF-1 related kinase). К этому же типу киназ относятся АМР-активируемые киназы (АМПК) млекопитающих. У *Arabidopsis thaliana* идентифицированы два подсемейства: SnRK1 и SnRK2.

Все киназы, гомологичные SNF-1, активируются предпочтительно в стрессовых условиях, при которых снижается уровень глюкозы и аденозинтрифосфатов, а концентрация АМР 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 SNF-1, АМПК 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 SNF-1, АМПК и подсемейства SnRK1 имеют высокую степень гомологии (60–70%) в области киназного домена. У SnRK2 выявлена 43% гомология с киназным доменом SNF-1. Кроме этого для SnRK2 характерен очень короткий С-терминальный домен, который включает кислый участок, состоящий из полиглутаматных и полиаспарататных последовательностей. Различия в карбокситерминальной области, по-видимому, определяют субъединичный состав SnRK1 и SnRK2.

Активация. SNF-1 киназа активируется при глюкозном голодании. Механизм активации включает фосфорилирование SNF-1 специфической киназой. Активность АМПК находится под двойным контролем: регуляция осуществляется через аллостерические АМР-связывающие центры и путем фосфорилирования специфической киназой АМПК (АМПКК). Активация АМПК 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 SNF-1 подобными киназами животных и дрожжей, SNF-1, тем не менее, не активируется АМР.

Семейство растительных киназ SnRK по большинству признаков очень сходны с АМПК 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 АМПК, причем АМПКК фосфорилирует АМПК 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 глиоксилатного цикла репрессируются глюкозой, но активируются SnRK1.

РЕЦЕПТОР-ПОДОБНЫЕ КИНАЗЫ

Рецептор-подобные киназы у растений представлены в большом разнообразии. Все они имеют сходную структуру и механизм активации (см. раздел «Рецепторные киназы»). Значительные отличия обнаруживаются в экстраклеточном рецепторном домене киназ. Различают 4 группы.

- 1) LRR-группа
- 2) S-домен группа
- 3) Лектин-подобный домен
- 4) EGF

МАР КИНАЗЫ

В клетках животных и грибов выявлены и охарактеризованы киназы, формирующие каскадные регуляторные системы (или модули). Киназные каскады включают три (реже четыре) киназы, которые последовательно фосфорилируют друг друга. Модули работают в направлении МАРККК → МАРКК → МАРК. Большинство киназных каскадов активируются через малые G-белки, которые в GTP-связанной (активной) форме непосредственно взаимодействуют с МАРККК. Посредством киназных каскадов регулируется активность множества функциональных белков, в том числе транскрипционных факторов.

В растениях киназные каскады изучены меньше и механизм активации не ясен. Однако установлено, что в растительных клетках функционируют каскады и идентифицированы киназы всех трех подсемейств стандартного модуля. В геноме арабидопсиса обнаружено семь МАРК, пять МАРКК и пять МАРККК.

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**. Фосфорилирование треонина и тирозина, которое катализирует МАРКК, необходимо для активации МАРК. МАРККК фосфорилирует в молекуле МАРКК остатки серинов или треонинов, которые являются консервативными для растений.

Для оценки скорости активации МАРК в качестве мишени использовали искусственный субстрат — миелиновый основной белок (myelin basic protein, МВР). Исследования показали, что киназные каскады активируются многими внешними стимулами и гормонами. При добавлении ауксина в культуру клеток табака МАРК активировалась через пять минут. В протопластах клеток алейронового слоя ячменя МАРК активировалась абсцизовой кислотой через минуту. В листьях клевера активация МАРК происходила под влиянием различных стрессовых воздействий (холодовой шок, обезвоживание, повреждение) без участия АБК.

В листьях табака через минуту после поранения была активирована одна из МАРК — WIPK (wound-induced МАРК). Показано также, что WIPK вовлекается в активацию ферментов октадеканоеидного пути (синтеза жасмоновой кислоты).

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.

ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫЕ КИНАЗЫ (CDK)

Циклин-зависимые киназы 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 CDK с циклинами участок содержит консервативный мотив 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 CDK-активирующей киназой (CAK);

2) остаток тирозина в последовательности GXGX_YX 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 (у делящихся дрожжей — CDC25) отщепляющей фосфорную группу от тирозина.

Таким образом, циклин-зависимые киназы активируются минимум в три этапа:

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

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 последовательность PSTAIRE экспрессируется на протяжении всего клеточного цикла, тогда как вторая (с вариантом PPTALRE) в течение узкого 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→S, и три циклина D типа (переход G1→M).

КАЗЕИНОВЫЕ КИНАЗЫ СК1 И СК2

Два подсемейства казеиновых киназ 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 стороны 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.

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 $\alpha_2\beta_2$ и обладают необычной для киназ особенностью: наряду с АТФ они используют также ГТФ. Субъединицы α являются каталитической, а β выполняют регуляторную роль: модулируют активность по отношению к определенным типам субстрата. Среди мишеней СК2 у млекопитающих являются ДНК-связывающие белки, например, р53, и топоизомераза II. Активность СК2 связывают с установлением клеточной полярности и функционированием клеточного цикла. Нарушение двух генов СК2 у *S. cerevisiae* (СКА1 и СКА2) имеют летальный характер.

У *Arabidopsis thaliana* выявлены две изоформы каталитической субъединицы α и две — регуляторной β . В клетках СК2 присутствует и мономерной форме и в виде тетрамера $\alpha_2\beta_2$. Как и у млекопитающих СК2 растений фосфорилирует серин, фланкированный кислыми аминокислотными остатками, и использует АТФ и ГТФ.

ПОДСЕМЕЙСТВО GSK3/SHAGGY

Киназа гликогенсинтазы-3 (GSK3) млекопитающих участвует в инсулиновом сигнале, ингибируя гликогенсинтазу фосфорилированием. В свою очередь, активность также регулируется фосфорилированием. Протеинкиназа В инактивирует GSK3, фосфорилируя сериновый остаток в аминотерминальном конце. Гомологичная киназа из *Drosophila melanogaster*, продукт гена *shaggy/zeste-white 3*, необходима для контроля процессов развития.

Функции растительных гомологов GSK3 неизвестны, однако гены, кодирующие их, обнаруживаются у растений в значительном количестве. Например, в геноме *Arabidopsis thaliana* идентифицировано, по меньшей мере, десять GSK3-подобных киназ. Предполагается, что растительные играют важную роль в развитии, но экспериментальных доказательств пока нет.

CTR1/RAF-ПОДОБНОЕ СЕМЕЙСТВО

Киназа CTR1 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 между CTR1 и EIN2 киназный каскад, не известно.

ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ

Ферменты, дефосфорилирующие фосфопротеины, являются компонентами сигнальных систем, в которых участвуют протеинкиназы. Дефосфорилирование в функциональном отношении противоположно фосфорилированию, но имеет такое же важное регуляторное значение. Как и протеинкиназы, фосфопротеинфосфатазы, с одной стороны, могут вернуть активированные белки в состояние покоя, а с другой — наоборот, активировать их.

Все известные фосфопротеинфосфатазы подразделяются на два основных класса: PP1 и PP2. Данная классификация основана на субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам. В качестве субстратного «эталоны» используют субъединицы киназы фосфорилазы млекопитающих. Фосфопротеинфосфатазы PP1 предпочтительно дефосфорилируют β -субъединицу, фосфо-протеинфосфатазы PP2 — α -субъединицу. Кроме того, PP1 ингибируются эндогенными белками ингибитор-1 (I-1) и ингибитор-2 (I-2), а PP2 устойчивы к этим ингибиторам.

Фосфопротеинфосфатазы PP2 подразделяются на три подкласса:

PP2A — это тримеры, состоящие из двух регуляторных субъединиц A и B и каталитической — C. Для проявления активности 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;

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

Большинство фосфопротеинфосфатаз специфичны к фосфосерину и фосфотреонину, но существуют фосфотирозин-специфичные фосфатазы и фосфатазы двойной специфичности, способные дефосфорилировать фосфосодержащие остатки тирозина, серина и треонина.

Одной из хорошо изученных является серин/треониновая фосфопротеинфосфатаза PP1G. Этот фермент представляет собой димер, состоящий из каталитической и регуляторной субъединиц. Регуляторную субъединицу обозначают буквой G, поскольку она имеет сродство к гликогену, а каталитическую — буквой C (слайд 69, презентация). Активность PP1G зависит от состояния регуляторной частицы. G-субъединица имеет два сайта фосфорилирования, которые локализованы на N-терминальном регуляторном домене полипептида. Инсулин-стимулируемая протеинкиназа (ISPK) фосфорилирует

сайт 1 G-субъединицы, а протеинкиназа А фосфорилирует *сайт 2*. Фосфорилирование *сайта 1* под влиянием инсулина способствует стабилизации димера фосфатазы PP1G и ее активации. Фосфорилирование *сайта 2* под действием адреналина, наоборот, понижает стабильность димера PP1G в 10^4 раз. Это приводит к высвобождению каталитической субъединицы и инактивации путем ее связывания с ингибиторной частицей Inh1. Регуляторная G-субъединица остается связанной с гликогеном. Реактивация PP1G через дефосфорилирование сайта 2 осуществляется фосфатазами PP2A и Ca²⁺-зависимой PP2B.

В активированном состоянии PP1G дефосфорилирует киназу гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазу. Это приводит к активации синтеза гликогена и замедлению его распада.