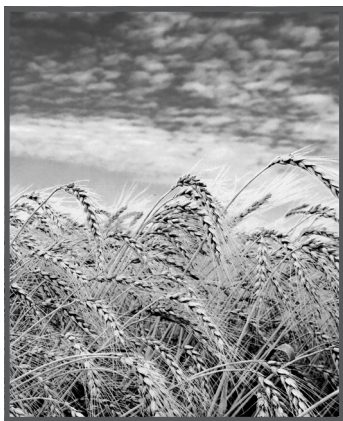


Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

**В. Джамєєв**

# **МЕХАНІЗМИ РЕЦЕПЦІЇ ТА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО СИГНАЛІНГУ У РОСЛИН**



**Навчальний посібник**

- Призначення, структура і принципи функціонування сигнальних систем клітин
- Рецепція зовнішнього сигналу
- Передача сигналу всередині клітини
- Механізми передачі сигналу рослинних гормонів

**Харків — 2016**

УДК 577.2  
ББК 28.070  
Д 40

**Рецензенти:**

**Колупаєв Ю. Є.** — доктор біологічних наук, професор, зав. кафедрою ботаніки та фізіології рослин Харківського національного аграрного університету імені В. В. Докучаєва;

**Перський Є. Е.** — доктор біологічних наук, професор, зав. кафедрою біохімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Рекомендовано до друку рішенням Вченої ради  
Харківського національного університету  
імені В. Н. Каразіна  
(протокол № 5 от 3.11.14 р.)

**Джамєєв В. Ю.**  
Д 40      **Механізми рецепції та внутрішньоклітинного сигналінгу у рослин : навчальний посібник / В. Ю. Джамєєв. — Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2016. — 208 с.**

ISBN 978-966-285-280-6

У навчальному посібнику викладаються основні відомості про внутрішньоклітинну сигналізацію рослин. Описані структура, властивості та особливості функціонування компонентів внутрішньоклітинних сигнальних систем, механізми рецепції та трансдукції зовнішніх сигналів у рослинних клітинах. Книга написана на основі лекційного матеріалу до спеціального курсу «Внутрішньоклітинні сигнальні системи рослин» і призначена для студентів, які навчаються на біологічних факультетах класичних університетів, а також у вищих навчальних закладах аграрного та педагогічного профілів. Посібник може бути також цікавим для аспірантів, викладачів, науковців та всіх, хто захоплюється біологією.

УДК 577.2  
ББК 28.070

ISBN 978-966-285-280-6

- © Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2016
- © Джамєєв В. Ю., 2016
- © Джамєєв В. Ю., макет, 2016
- © Джамєєв В. Ю., макет обкладинки, 2016

# ЗМІСТ

---

---

<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>1. ЗНАЧЕННЯ, СТРУКТУРА ТА ПРИНЦИПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ КЛІТИН</b>	
1.1. Значення сигнальних систем у біологічних об'єктах .....	8
1.2. Компоненти сигнальних систем .....	10
1.3. Сутність передачі сигналу .....	11
1.4. Ефект посилення в сигнальних системах .....	16
1.5. Транскрипційний каскад .....	17
1.6. Типи сигнальних механізмів .....	19
1.7. Дерепресорні сигнальні механізми .....	20
1.8. Система убіквітин-опосередкованої деградації білків .....	21
1.8.1. Етап перший — вибір субстрату .....	22
Убіквітин і убіквітування .....	22
Убіквітинуючий комплекс .....	25
Структура SCF-подібної убіквітинуючої лігази .....	27
Регуляція активності SCF-лігази .....	27
Зв'язування субстрату з убіквітинуючою лігазою .....	28
Особливості білків-мішеней убіквітинуючої лігази .....	29
1.8.2. Етап другий — деградація субстрату .....	29
26S протеасома .....	29
Структура 26S протеасоми .....	30
Кірова 20S протеасома .....	31
Регуляторна 19S частинка .....	32
Особливості функціонування 26S протеасоми .....	32
<b>2. РЕЦЕПЦІЯ ЗОВНІШНЬОГО СИГНАЛУ</b>	
2.1. Загальна характеристика клітинних рецепторів .....	34
2.1.1. Що таке рецептор? .....	34
2.1.2. Структурно-функціональні особливості рецепторів .....	35
Субодична та доменна структура .....	35
Основні механізми активації рецепторів .....	36
Функціональна активність .....	38
2.2. Ліганд-зв'язуючі рецептори .....	39
2.2.1. Локалізація ліганд-зв'язуючих рецепторів .....	41

2.2.2. Зовнішні рецептори . . . . .	42
Рецептор-подібні кінази . . . . .	42
Гістидинові рецепторні кінази . . . . .	46
Гібридні гістидинові кінази . . . . .	46
Прокаріотичні двокомпонентні сигнальні системи . . . . .	46
Двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин . . . . .	48
Етиленові рецептори . . . . .	51
2.2.3. G-білок сполучені рецептори (GPCR) . . . . .	53
G-білок сполучені рецептори тварин . . . . .	53
G-білки GPCR-типу (GTG) . . . . .	54
2.2.4. Рецептори-каналоформери . . . . .	55
2.2.5. Внутрішньоклітинні рецептори . . . . .	57
Ядерні рецептори тварин . . . . .	57
Внутрішньоклітинні рецептори рослин . . . . .	59
F-box рецептори . . . . .	59
Гормон-чутливі ліпази . . . . .	61
START-домен рецептори . . . . .	63
2.3. Світлові рецептори . . . . .	64
2.3.1. UV-B рецептори . . . . .	65
2.3.2. Фототропіни . . . . .	66
Відкриття та функції . . . . .	66
Структура . . . . .	67
Світлова активація . . . . .	68
2.3.3. Криптохроми . . . . .	71
Функції . . . . .	71
Структура та механізм активації . . . . .	72
2.3.4. Фітохроми . . . . .	74
Різноманітність і значення фітохромів . . . . .	74
Структура фітохромів . . . . .	77
Фотосенсорний район . . . . .	78
Димеризаційний район . . . . .	78
Активація фітохромів і передача світлового сигналу . . . . .	79
Світлозалежні зміни структури фітохромів . . . . .	79
Перенесення фітохромів у ядро . . . . .	79
Регуляція активності фітохрому . . . . .	81
Модуляція активності мішеней фітохрому . . . . .	82
Короткий опис механізму світлового активації фітохрому. . . . .	84
<b>3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛУ ВСЕРЕДИНІ КЛІТИНИ</b>	
3.1. G-білки . . . . .	85
3.1.1. Гетеротримерні G-білки . . . . .	86
3.1.2. Мономерні (малі) G-білки . . . . .	90
Різноманітність мономерних G-білків . . . . .	90
Сигнальні мономерні G-білки . . . . .	91

3.2. Ефекторні молекули та вторинні месенджери . . . . .	93
3.2.1. Фосфоліпази . . . . .	94
Фосфоліпази D . . . . .	96
Фосфоліпази C . . . . .	99
Поліфосфоінозитид-залежні фосфоліпази C . . . . .	100
Фосфатидилінозитол і його похідні . . . . .	101
PI-PLC-опосередкований сигналінг . . . . .	106
Фосфоліпази A <sub>2</sub> . . . . .	109
Октадеканоїдний шлях . . . . .	111
Функції фосфоліпази A <sub>2</sub> . . . . .	114
Фосфоліпази A <sub>1</sub> і B, лізофосфоліпази A . . . . .	114
Взаємодія фосфоліпаз . . . . .	115
3.2.2. Оксид азоту (NO) та NO-сигналінг . . . . .	116
Оксид азоту . . . . .	116
Хімічні та антиоксидантні властивості NO . . . . .	117
Шляхи утворення NO . . . . .	118
Нітрат/нітрит-залежні ферментативні шляхи . . . . .	118
Аргінін-залежні шляхи синтезу . . . . .	119
Нітрит-залежні неферментативні шляхи . . . . .	121
NO-сигналінг . . . . .	122
Нітрозилювання металів . . . . .	122
S-нітрозилювання цистеїну . . . . .	124
Нітрування тирозину . . . . .	126
Зв'язок NO і Ca <sup>2+</sup> -сигналів . . . . .	126
3.2.3. Нуклеотидциклазні сигнальні системи . . . . .	127
Аденілатциклазна система . . . . .	128
Ферменти аденілатциклазної системи . . . . .	128
Роль cAMP у регуляції активності протеїнкінази A тварин . . . . .	132
Значення cAMP у регуляції активності катаболітних генів у бактерій . . . . .	133
cAMP-регульовані білки рослин . . . . .	134
Гуанілатциклази та cGMP . . . . .	136
3.3. Іони кальцію в системі передачі сигналу . . . . .	138
3.3.1. Структура Ca <sup>2+</sup> -зв'язуючих білків . . . . .	140
3.3.2. Транспортні системи, що кодуєть кальцієвий сигнал . . . . .	143
Екстраклітинний транспорт кальцію . . . . .	143
Ca <sup>2+</sup> -АТРази . . . . .	143
Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> -антипортери . . . . .	145
Індуковане надходження кальцію в цитоплазму . . . . .	146
Потенціал-керовані канали . . . . .	146
Ліганд-керовані канали . . . . .	147

3.3.3. Декодування $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу . . . . .	149
Активація кальмодулін-залежних білків . . . . .	149
Модуляція активності транскрипції кальмодуліном . . . . .	150
Модуляція активності білків кальцій-залежними кінзаами . . . . .	151
3.4. Ковалентна модифікація сигнальних посередників . . . . .	154
3.4.1. Значення оборотної ковалентної модифікації . . . . .	154
3.4.2. Рослинні протеїнові кінзи . . . . .	156
Кальцій-залежні протеїнові кінзи . . . . .	157
SnRK — SNF1-подібні кінзи . . . . .	160
Рецептор-подібні кінзи . . . . .	162
MAP кінзи . . . . .	164
Циклін-залежні кінзи (CDK) . . . . .	165
Казеїнові кінзи CK1 і CK2 . . . . .	167
Родина GSK3/Shaggy . . . . .	168
CTR1/Raf-подібна родина . . . . .	169
3.4.3. Протеїнові фосфатази . . . . .	169
Класифікація фосфатаз . . . . .	170
Серин/треонінові фосфатази . . . . .	170
Тирозинові фосфатази . . . . .	172
Рослинні фосфатази . . . . .	174
Різноманітність рослинних фосфатаз . . . . .	174
Значення рослинних фосфатаз . . . . .	175

## **4. МЕХАНІЗМИ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ РОСЛИННИХ ГОРМОНІВ**

4.1. Регуляція транскрипції ауксин-регульованих генів . . . . .	177
4.1.1. Регулятори транскрипції ауксин-регульованих генів та їхня доменна структура . . . . .	177
4.1.2. Участь Aux/IAA і ARF у регуляції експресії ауксин-регульованих генів . . . . .	178
4.2. Передача цитокінінового сигналу . . . . .	181
4.3. Трансдукція гіберелінового сигналу . . . . .	184
4.4. Передача сигналу АБК через START-домен рецептори . . . . .	186
4.5. Сприйняття та трансдукція етиленового сигналу . . . . .	187
4.6. Рецепція та трансдукція брасиностероїдного сигналу . . . . .	190

**ЛІТЕРАТУРА . . . . .**195

**КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ . . . . .**201

**ПОКАЖЧИК ТЕРМІНІВ . . . . .**204

# ВСТУП

---

---

Сучасні дослідження фізіологічних функцій організмів тісно пов'язані з вивченням механізмів сприйняття та внутрішньоклітинної передачі сигналів. Знання механізмів формування реакції-відповіді клітин на вплив екстраклітинних сигналів є принципово важливим для розвитку уявлень про регуляцію функціональної та метаболічної активності клітин. Це, в свою чергу, необхідно для глибшого розуміння сутності онтогенезу, особливостей взаємодії організмів із навколишнім середовищем і природи різноманітних біологічних функцій живих об'єктів.

Інтенсивне накопичення відомостей в галузі клітинного сигналіngu привело до появи значної кількості тематичних оглядових статей і монографій. Однак більшість з них можна рекомендувати студентам тільки як додаткову літературу, оскільки такі джерела містять величезний масив специфічних даних, який ускладнює сприйняття студентами матеріалу про власне механізми внутрішньоклітинної передачі сигналів. Цей навчальний посібник є спробою автора систематизувати основні відомості про внутрішньоклітинну сигналізацію рослин. У книзі описані структура, властивості та особливості функціонування компонентів внутрішньоклітинних сигнальних систем рослин, механізми рецепції і трансдукції зовнішніх сигналів. У зв'язку з поліфункціональністю більшості сигнальних посередників їх участь у фізіологічних процесах детально не розглядається.

Книга не є всеосяжним джерелом відомостей про механізми рецепції і сигналіngu у рослин, і можливо, не дасть абсолютно всіх відповідей на питання найбільш допитливих читачів. Однак цей навчальний посібник може послужити стартовим майданчиком для початку освоєння поки що маловивченої галузі біології — механізмів рецепції і сигналіngu у рослин.

# 1. ЗНАЧЕННЯ, СТРУКТУРА ТА ПРИНЦИПИ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ КЛІТИН

---

---

## 1.1. ЗНАЧЕННЯ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ У БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

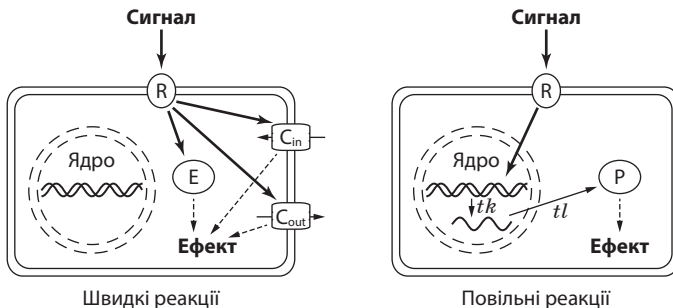
Живі організми є відкритими термодинамічними системами, які значною мірою залежать від зовнішнього оточення. З одного боку, середовище існування є джерелом енергії та будівельного матеріалу. Організму необхідно адекватно реагувати на ці джерела, щоб оптимально їх використовувати. З іншого боку, середовище не є стабільним і постійно змінюється, тому може бути фактором дестабілізації. Такі зміни можуть мати як періодичний (сезонні, добові ритми), так і довільний характер. Флуктуації зовнішніх умов спостерігаються не тільки в межах норми реакції організму. Екстремальні умови можуть порушити структурну цілісність та функціональну активність організму, ставлячи під загрозу його існування. У будь-якому випадку, щоб мінімізувати негативний вплив несприятливих умов, організм повинен вміти розпізнавати зміни в навколишньому середовищі і, відповідно, реагувати на них зміною функціональної активності. Така здатність дозволяє організму адаптуватися до мінливих умов, а також ефективно регенерувати пошкодження, спричинені екстремальними умовами.

Здатність розпізнавати зміни в середовищі існування має не тільки організм у цілому, але і кожна його клітина. При цьому зовнішнім (екстраклітинним) щодо окремої клітини є не тільки суто навколишнє середовище, але і внутрішнє середовище організму. Просторово віддалені частини багатоклітинного організму є взаємозалежними та повинні функціонувати



узгоджено. Узгодженість роботи всіх частин організму забезпечується завдяки функціонуванню складної системи передачі міжклітинних сигналів (хімічних, електричних). Біологічні функції клітини, пов'язані з онтогенетичним розвитком організму та реакцією на мінливі зовнішні умови, реалізуються за допомогою розпізнавання екстраклітинного стимулу рецептором і подальшої активації механізмів передачі внутрішньоклітинних сигналів, які приводять до формування реакції-відповіді клітини на зовнішні впливи.

**Швидкі та повільні реакції.** Сприйняття екстраклітинного сигналу здійснюється клітинними рецепторами, а потім передається у відповідні клітинні компартменти до кінцевих мішеней, від яких залежить функціональна активність клітини. Реакції-відповіді клітини прийнято ділити на швидкі та повільні (рис. 1). **Швидкі реакції** проявляються практично відразу після сприйняття сигналу, оскільки вони пов'язані зі зміною активності систем та їх компонентів, які є у клітині на момент сприйняття сигналу. Прикладом швидких реакцій можуть служити зміни інтенсивності та напрямки трансмембранних іонних потоків і пов'язаних з цим процесів модуляції активності ферментів. **Повільні реакції** залежать від білків, які синтезовані *de novo*, тобто вони пов'язані зі зміною експресії



**Рис. 1.** Швидкі і повільні реакції:

R — рецептор;

E — фермент;

C<sub>in</sub> — поглинаючий канал;

C<sub>out</sub> — вивідний канал;

P — білок, синтезований *de novo*;

tk — транскрипція;

tl — трансляція

генів, тому розвиваються протягом більш тривалого часу порівняно зі швидкими. Зміна набору генів, що експресуються, здійснюється за рахунок як модуляції активності вже існуючих транскрипційних факторів, так і синтезу нових транскрипційних регуляторів.

## 1.2. КОМПОНЕНТИ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ

Системи внутрішньоклітинної трансдукції сигналів складаються з різноманітних компонентів, що розрізняються за призначенням і функціями. Основними компонентами сигнальних систем є рецептори, ефектори, вторинні месенджери, G-білки, модифікуючі сигнальні ферменти, адаптерні молекули та кінцеві мішені.

**Рецептори** сприймають екстраклітинні сигнали та запускають каскадний сигнальний механізм всередині клітини. Клітини мають різні типи спеціалізованих рецепторів, які розпізнають певний вид сигналу.

**G-білки** — особливі сигнальні молекули, що мають GTPазну активність. Здатність передавати сигнал залежить від того, який із нуклеотидів (GDP або GTP) міститься в гуаніннуклеотидз'язувальному центрі.

**Ефектори** (або ефекторні молекули) — це ферменти, що каталізують синтез вторинних месенджерів. До ефекторів також слід віднести кальцієві канали та переносники, від яких безпосередньо залежить концентрація іонів кальцію в цитоплазмі.

**Вторинні месенджери** — це низькомолекулярні органічні сполуки або іони, здатні забезпечувати передачу сигналу шляхом аллостеричної регуляції сигнальних посередників. Модуляція активності компонентів сигнального ланцюга вторинними месенджером здійснюється при досягненні ними певної концентрації. На рівні ефекторів забезпечується посилення сигналу, оскільки вони синтезують велику кількість вторинних посередників, які здатні активувати велику кількість сигнальних посередників або кінцевих мішеней.

**Адаптерні молекули** — білки, які, зазвичай, не виявляють специфічну активність, крім здатності за певних умов взаємо-

діяти одночасно з двома або більше сигнальними посередниками. Взаємодія здійснюється за рахунок комплементарних поверхонь. Наприклад, рецептор може впливати на ефектор чи іншу сигнальну молекулу тільки через адаптерний білок.

**Сигнальні молекули-ферменти** забезпечують посттрансляційну модифікацію посередників передачі сигналу. (Слід відрізнити від ефекторів, які теж є ферментами, але спеціалізуються на синтезі вторинних месенджерів). Більшість посттрансляційних модифікацій, які використовуються у сигналінгу, має оборотний характер, наприклад приєднання або відщеплення певних груп. Провідну роль серед таких сигнальних посередників виконують протеїнкінази та протеїнфосфатази, що забезпечують функціонування кіназно-фосфатазного циклу.

**Кінцеві мішені** забезпечують необхідний функціональний стан клітини для конкретних умов. Ними частіше є ферменти або транскрипційні фактори.

Запуск трансдукції сигналу у клітині починається з рецептора і закінчується модуляцією активності кінцевих мішеней. Однак проміжні компоненти сигнальної системи можуть бути представлені широким спектром різноманітних функціональних молекул. Кількість і тип компонентів кожної конкретної сигнальної системи певною мірою специфічні. Наприклад, в одних системах можуть бути відсутні ефектори і вторинні месенджери, а в інших — у передачі сигналу можуть бути залучені кілька типів ефекторних молекул, а відповідно, і вторинних посередників, що діють послідовно або паралельно. Найбільш короткий сигнальний ланцюг спостерігається в тому випадку, коли рецептор є одночасно кінцевою мішенню. Наприклад, існують рецептори ліпофільних лігандів, які одночасно є транскрипційними факторами.

### 1.3. СУТНІСТЬ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ

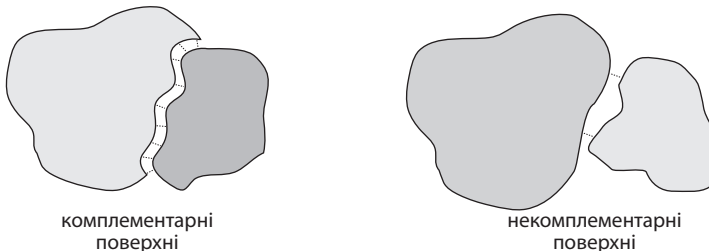
**Вибірковість взаємодії.** Між двома будь-якими макромолекулами або мікромолекулами можлива взаємодія. Однак при наявності величезного розмаїття речовин у клітині спостерігається сувора впорядкованість взаємодій, так би мовити,

їх «усвідомленість». Наприклад, каталітична активність ферментів спрямована на специфічний субстрат, структурні молекули укладаються в агломерати, утворюючи клітинні структури, гормони взаємодіють з певними рецепторами тощо. Подібно до цього специфічно взаємодіють один з одним сигнальні молекули.

Міжмолекулярні взаємодії здійснюються за рахунок слабких сил. Але для того щоб ці сили були досить ефективними та забезпечили вибірковість взаємодії, необхідно утворення багатьох зв'язків. Слабкі сили, як відомо, набувають максимальних значень, якщо взаємодіючі групи містяться на відповідних відстанях одна від одної. Поверхні молекул, які дозволяють утворювати оптимальну кількість слабких зв'язків, називаються **комплементарними** (рис. 2).

При формуванні структурних агломератів, що являють собою статичні комплекси, часто є важливим наявність максимальної кількості слабких зв'язків. Однак при утворенні динамічних систем, для функціонування яких принциповим є не тільки асоціація, але й дисоціація молекулярного комплексу, є необхідним встановлення оптимальної кількості слабких зв'язків, які, з одного боку, забезпечать специфічність взаємодії, а з іншого, не перешкоджатимуть дисоціації.

При специфічній взаємодії макромолекул спостерігається взаємний вплив їхніх електронних густин одна на одну. В результаті це приводить до зміни конформації молекул, що безпосередньо відбивається на їхній активності.



**Рис. 2.** Комплементарні та некомплементарні поверхні молекул

**Механізми передачі сигналу.** В основі передачі сигналу лежить молекулярний механізм, за допомогою якого змінюється активність сигнальних посередників. Модуляція активності посередників здійснюється різними способами, серед яких найбільш важливими є:

- 1) **взаємне зв'язування**, яке визначається наявністю комплементарних поверхонь (наприклад, впізнавання гормону рецептором);
- 2) **ковалентна модифікація** (введення або відщеплення груп; утворення або розрив зв'язків у макромолекулах-компонентах сигнального ланцюга);
- 3) **зміна мікрооточення** (зміна концентрації іонів, у тому числі протонів (рН), і низькомолекулярних органічних регуляторів).

Будь-який з цих впливів провокує зміну конформації макромолекули-посередника, від якої залежить її активність. Модуляція активності сигнального посередника визначає його здатність впливати на подальші компоненти сигнального ланцюга (рис. 3). В цілому, акт передачі сигналу в рамках одного посередника можна представити у такому вигляді:

вплив → зміна конформації → зміна активності.

Слід зауважити, що при сприйнятті сигналу активність посередника може змінюватися в різних напрямках і з різною силою. Це залежить від конкретної сигнальної пари та особливостей їх взаємодії. Активність посередника може градієнтно зменшуватися або збільшуватися, а також активуватися з репресованого стану (включатися) або, навпаки, інгібуватися (вимикатися). (Для опису функціонування гіпотетичних сигнальних систем і посередників ми будемо говорити про модуляції, або зміни активності макромолекул-посередників, оскільки активація сигнальної системи може бути пов'язана як з активацією, так і з репресією окремих компонентів і модулів системи).

Для низькомолекулярних регуляторів (вторинних месенджерів), які опосередковують передачу сигналу між двома макромолекулами, суттєвою ознакою участі в сигнальному механізмі є зміна концентрації.

### Макромолекулярні посередники

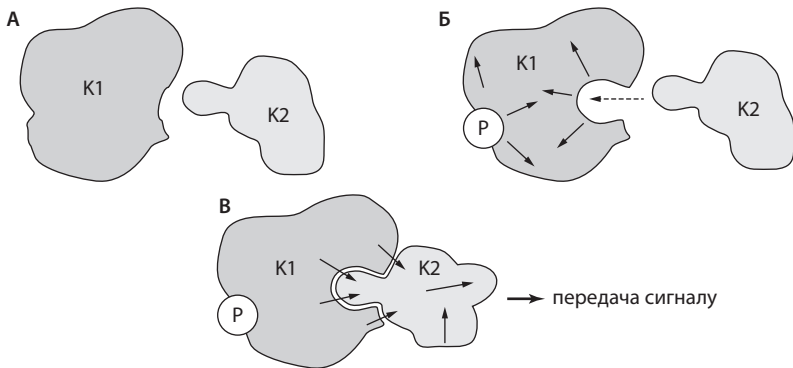
- вплив (прийняття сигналу);
- зміна конформації;
- зміна активності (готовність до передачі сигналу)

### Низькомолекулярні посередники

- модуляція активності ефекторів або іонних каналів;
- зміна концентрації вторинних месенджерів;
- модуляція активності сигнальних посередників

Трансдукція сигналу від рецептора до кінцевих мішеней, у якій може бути задіяно багато компонентів, є, власне, почерговою зміною активності переносників сигналу, а в разі вторинних месенджерів — їхньої концентрації.

Наприклад, рецептор у результаті активації набуває здатності взаємодіяти з адаптерним білком, через який він стимулює ефектор. Ефектор каталізує синтез вторинних месенджерів, які модулюють активність протеїнових кіназ тощо.



**Рис. 3.** Передача сигналу:

А — компоненти K1 і K2 не взаємодіють один з одним;

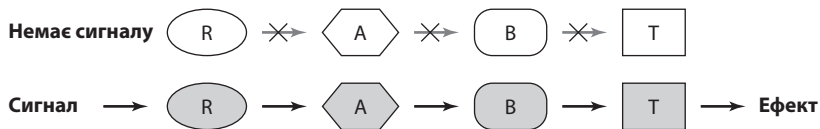
Б — ковалентна модифікація компонента K1 (фосфорилування) проковує зміну конформації молекули, в результаті чого утворюється поверхня, комплементарна поверхні молекули компонента K2;

В — компоненти K1 і K2 взаємодіють: K2 набуває конформацію, що дозволяє взаємодіяти з наступним компонентом сигнальної системи

Таким чином, кожен сигнальний переносник впливає на черговий компонент системи трансдукції сигналу, змінюючи його функціональний стан. Причому модуляція активності одного компонента зумовлює зміну активності іншого. Послідовна зміна стану переносників сигналу являє собою каскад реакцій, тому такий спосіб передачі внутрішньоклітинних сигналів часто називають **каскадним механізмом** (рис. 4).

Описуючи сигнальні системи, для позначення відносного розташування компонентів часто використовують терміни **апстрим** (*англ.* upstream — вгору за течією) і **даунстрим** (*англ.* downstream — униз за течією). Всі регулятори, від яких стікається сигнал на конкретний компонент, є щодо нього апстрим сигнальними компонентами. Тоді як регулятори, на які передається сигнал, називають даунстрим сигнальними компонентами. Припустимо, що в сигнальній системі функціонують 5 компонентів і передача сигналу здійснюється в напрямку  $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5$ . Тоді відносно компонента 3 регулятори 1 і 2 є апстрим, а 4 і 5 — даунстрим сигнальними партнерами.

У спрощеному варіанті каскадний механізм може бути представлений у вигляді лінійної послідовної передачі сигналу. Однак насправді найчастіше поширення сигналу в клітині має віяловий характер, тобто стимуляція одного рецептора модулює активність, зазвичай, багатьох кінцевих мішеней. Наприклад, під впливом конкретного гормону в клітині активується експресія цілого набору генів.



**Рис. 4.** Каскадний механізм.

Сигнальна система, що складається з рецептора R, кінцевої мішені T і проміжних компонентів A і B, за відсутності сигналу перебуває в неактивному стані. Стимулювання рецептора відповідним сигналом приводить до послідовної модуляції активності всіх компонентів системи, що в результаті приводить до розвитку реакції-відповіді на сигнал (ефект)

Крім того, чимало інтраклітинних сигнальних систем тісно пов'язані одна з одною. Взаємодіючи, вони можуть сприяти взаємному посиленню, послабленню, а також прояву якісно іншого ефекту порівняно з тим, який проявляється за функціонування цих систем окремо. Каскадні механізми можна представити у вигляді сигнальної мережі, що пронизує клітину. Сигнальні шляхи можуть бути настільки переплетені та взаємозалежні, що часом важко ідентифікувати причинно-наслідкові зв'язки при вивченні механізмів трансдукції сигналу.

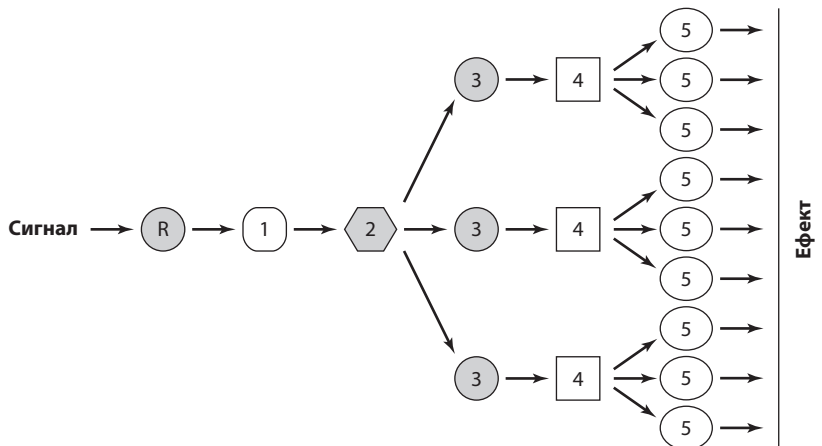
## 1.4. ЕФЕКТ ПОСИЛЕННЯ В СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМАХ

Важливою характеристикою механізму внутрішньоклітинної передачі сигналу є **ефект посилення**. Завдяки цій властивості клітини здатні формувати відповідні реакції значної сили на вплив слабких зовнішніх сигналів. **Загальний принцип ефекту посилення — збільшення кількості сигнальних посередників у процесі поширення сигналу.** Посилення сигналу здійснюється тільки на конкретних ділянках сигнального ланцюга. Якщо посередники беруть участь у передачі сигналу в еквімолярних кількостях, то посилення не відбувається. Наприклад, при передачі сигналу шляхом взаємного зв'язування одна макромолекула модулює активність тільки однієї молекули. Однак якщо в сигнальному механізмі беруть участь ферменти, спостерігається підсилюючий ефект. Так, ефекторна молекула внаслідок активації синтезує велику кількість вторинних месенджерів, які регулюватимуть активність значної кількості сигнальних посередників, у тому числі кінцевих мішеней (рис. 5).

На ділянці посилення сигналу, крім збільшення кількості однотипних регуляторних молекул, у сигнальний механізм можуть залучатися посередники різних типів. Наприклад, такі вторинні месенджери, як іони  $\text{Ca}^{2+}$ , здатні модулювати активність декількох типів сигнальних посередників — ферментів, транскрипційних факторів, іонних каналів та ін.

Ефект посилення забезпечується в результаті функціонування таких процесів:





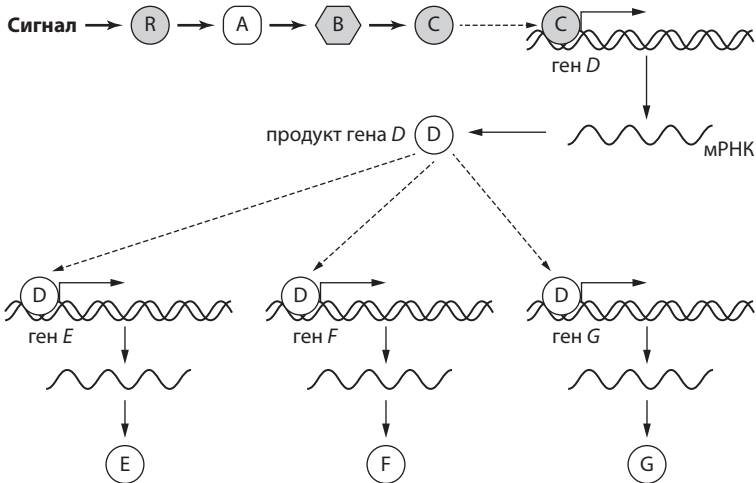
**Рис. 5.** Ефект посилення в сигнальних системах.

Ефект посилення спостерігається на етапі 2–3 і 4–5. Компоненти 2 і 4 модулюють активність багатьох мішеней. Компоненти 1 і 3 взаємодіють з компонентами 2 і 4, відповідно, в еквімолярних кількостях

- синтез вторинних месенджерів ефекторами;
- посттрансляційна модифікація сигнальних макромолекул (кінази, фосфатази та ін.);
- трансляція і транскрипція;
- зміна швидкості потоку іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану ( $\text{Ca}^{2+}$ -канали і переносники).

## 1.5. ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ КАСКАД

Розвиток реакції-відповіді на зовнішні впливи часто супроводжується активацією генів, що кодують транскрипційні регулятори. Новосинтезовані фактори транскрипції беруть участь у регуляції експресії другої групи генів. Таким чином, сигнальний механізм може включати в себе не тільки активацію транскрипційних факторів, але і їх синтез. Механізм, що включає кілька послідовних транскрипцій, називають **транскрипційним каскадом** (рис. 6).



**Рис. 6.** Транскрипційний каскад.

Зовнішній сигнал, що сприймається клітинним рецептором R через компоненти A і B передається на транскрипційний фактор C, який активує експресію гена D, що кодує транскрипційний фактор D. Транскрипційний фактор D стимулює транскрипцію генів E, F і G, які кодують білки E, F і G

Транскрипційний каскад являє собою досить поширене явище. Група генів, активність яких змінюється під дією зовнішнього сигналу в першу чергу, називається **ранніми**. Гени, активність яких модулюється новосинтезованими транскрипційними регуляторами, називаються **пізніми**. Більшість ранніх генів є регуляторними. Вони кодують транскрипційні регулятори, компоненти убіквітинуючої системи та інші регуляторні білки. Продукти ранніх генів багато в чому визначають зразок експресії пізніх генів, від яких безпосередньо залежить функціональна активність клітини.

Регуляторний механізм, який включає в себе послідовний синтез кількох груп транскрипт-факторів, на перший погляд, може здаватися повільнодіючим і громіздким. Проте це необхідно для здійснення регуляції генної експресії з позиції максимальної економічності процесів. За зміни умов, зазвичай, активується та репресується велика кількість генів. Забезпечується

чити миттєву модуляцію відразу всіх необхідних генів досить складно, оскільки для цього потрібна значна кількість транскрипційних факторів і компонентів сигнальних систем, які активують ці транскрипт-фактори. Причому синтез і тих, й інших молекул необхідно підтримувати на певному рівні в неіндуктивних умовах. Підтримання в робочому стані численних сигнальних систем, що забезпечують пряму активацію великої кількості генів, не вигідно для клітини. Система регуляції шляхом послідовної активації синтезу кількох транскрипційних факторів потребує мінімальних витрат на постійне підтримання порівняно невеликої кількості сигнальних систем. Крім того, синтез факторів регуляції транскрипції внаслідок активації каскадних механізмів створює ефект посилення. Активація експресії одного гена приводить до неодноразової транскрипції, причому кожен утворений транскрипт після сплайсингу може служити матрицею для синтезу багатьох молекул білка. Істотне підвищення кількості регуляторних білків дає значний ефект для розвитку реакції-відповіді клітини. Таким чином, каскадна система регуляції, що включає послідовну активацію експресії генів, які кодують транскрипційні фактори, дає незначну затримку в часі, однак є економічною і сприяє посиленню сигналу.

## 1.6. ТИПИ СИГНАЛЬНИХ МЕХАНІЗМІВ

Сигнальні системи клітин супроводжується зміною активності посередників сигнальної системи та кінцевих мішеней. Ці зміни в окремо взятому каскадному механізмі можуть мати різноспрямований характер. Крім того, один і той самий зовнішній сигнал, з одного боку, стимулює активацію (або підвищення активності) одних кінцевих мішеней, але в той же час приводить до репресії інших. Тому описати однозначно напрям зміни активності, що відбуваються в каскадному механізмі, напевно чи можливо. Швидше, варто говорити про те, як працюють ключові модулі регуляторної сигнальної системи. У цьому плані можна розрізняти **активаторні**, **репресорні** та **дерепресорні** сигнальні механізми.

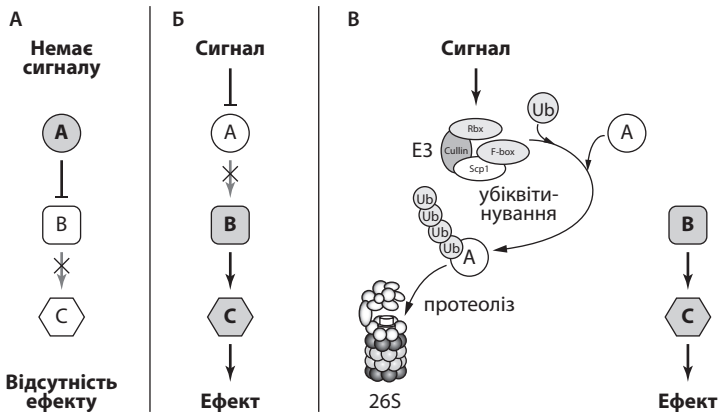
**Активаторні** механізми пов'язані із посиленням або включенням активності сигнальних посередників або кінцевих мішеней, а **репресорні** — з ослабленням або вимиканням.

**Дерепресорні** сигнальні системи характеризуються тим, що один із компонентів системи активно репресується у відсутності стимулу, в результаті чого система перебуває в репресованому стані. Активація системи приводить до інгібування репресора й активації сигнальної системи. Таким чином, репресія репресора забезпечує активацію (дерепресію) системи.

## 1.7. ДЕРЕПРЕСОРНІ СИГНАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ

Зняття дії репресорів може здійснюватися за рахунок механізмів двох основних типів (рис. 7):

- 1) інактивації репресора шляхом модуляції його активності;
- 2) руйнування репресора через спрямований протеоліз.



**Рис. 7.** Дерепресійна регуляторна система.

A — компонент A (негативний регулятор) у відсутності сигналу активно інгібує компонент B і підтримує систему в репресованому стані; B — під дією зовнішнього сигналу компонент A інактивується, що сприяє дерепресії системи;

B — негативний регулятор A під впливом сигналу залучається в убіквітин-опосередкований селективний протеоліз

У першому випадку репресор залишається фізично присутнім у клітині, але в репресованому стані (рис. 7-Б). Інгібування репресора досягається будь-яким зі способів модуляції активності, характерних для сигнальних систем (див. вище розділ 1.3 «Сутність передачі сигналу»). Це може бути зв'язування репресора регуляторним білком-інгібітором, ковалентна модифікація молекули репресора або її взаємодія з низькомолекулярними регуляторами. Найбільш поширений спосіб «вимикання» репресора — його ковалентна модифікація кіназами або фосфатазами (фосфорилування/дефосфорилування).

Другий механізм пов'язаний з функціонуванням убіквітин-залежного селективного протеолізу (рис. 7-В). Принцип цього механізму полягає в тому, що під дією специфічного зовнішнього сигналу репресори певного типу впізнаються убіквітинуючою протеїновою лігазою, яка приєднує до білкового субстрату полубіквітинові мітки. Мічені таким способом репресори в подальшому піддаються деградації у протеасомній системі.

## 1.8. СИСТЕМА УБІКВІТИН-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ БІЛКІВ

В усіх живих клітинах відбувається постійне оновлення структурних блоків і функціональних систем клітини. Білки, що втратили нативну структуру в результаті необоротної денатурації і з цієї причини не здатні виконувати свої функції, руйнуються протеазами, а утворені внаслідок протеолізу вільні амінокислоти використовуються для синтезу нових білків. Протеази впізнають білки із порушеною структурою за рядом характерних ознак, наприклад, за наявності на поверхні молекул гідрофобних амінокислот.

Існує також механізм, який відрізняється від звичайного протеолізу тим, що він приводить до руйнування білків, що не мають ознак порушення структури та функціональної активності і при цьому протеолізу піддаються не всі білки, а лише білки певного типу. Такий механізм називають **селективним**, або **спрямованим протеолізом**.

Селективний протеоліз здійснюється у два етапи (рис. 7-В). Спочатку білки, призначені для руйнування, розпізнаються особливим мультиполіпептидним комплексом, який приєднує до особливих ділянок цих білків поліубіквітинові ланцюжки. Цей комплекс називають убіквітинуючою протеїновою лігазою і в загальній системі убіквітинування позначають ЕЗ. Потім убіквітиновані білки притягаються до 26S протеасоми та руйнуються. Оскільки в механізмі, який описується, руйнуванню білків передують їх убіквітинування, його називають також **убіквітин-опосередкованим протеолізом білків**.

### 1.8.1. Етап перший — вибір субстрату

#### Убіквітин і убіквітинування

**Убіквітин** — це низькомолекулярний висококонсервативний білок з молекулярною масою 8,5 кД. Він складається з 76 амінокислотних залишків і має кислі властивості, оскільки містить значну кількість залишків дикарбонових амінокислот: аспарагінової та глутамінової кислот (рис. 8). Поліпептидний ланцюг убіквітину з карбокситермінального боку молекули замикає залишок гліцину, через карбоксильну групу якого здійснюється кон'югування убіквітину з білками-мішенями або один з одним за допомогою утворення ізопептидного зв'язку. До складу убіквітину входять 7 залишків лізину, які займають положення 6, 11, 27, 29, 33, 48 і 63. Через ці лізінові залишки можлива кон'югація убіквітинів один з одним. Убіквітин в еукаріот кодується кількома генами, а синтез здійснюється у вигляді неактивного поліубіквітинового попередника або окремої копії, зшитой із рибосомними білками. Процесинг убіквітину відбувається за участю деубіквітинуючих ферментів.

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

Рис. 8. Амінокислотна послідовність молекули убіквітину

**Убіквітин-подібні білки.** У природі були виявлені білки, близькі за структурою до убіквітину. Низькомолекулярні білки, що мають високий ступінь схожості з убіквітином, поділяють на дві групи:

- білки з убіквітин-подібним доменом (**UDP** — **ubiquitin-domain proteins**);
- убіквітин-подібні модифікатори (**Ubl** — **ubiquitin-like modifiers**).

Білки з убіквітин-подібним доменом (**UDP**) не утворюють кон'югатів з білками. Взаємодіючи за рахунок слабких зв'язків з убіквітином або убіквітин-подібними модифікаторами, вони виконують роль адаптерів. Убіквітин-подібні модифікатори (**Ubl**), так само як і убіквітин, здатні кон'югувати з білками через карбокситермінальний гліцин. До убіквітинподібних модифікаторів належать **SUMO** (**S**mall **u**biquitin-**l**ike **m**odifier), **NEDD8** (**N**eural-precursor cell-expressed **d**evelopmentally **d**ownregulated protein **8**), **ISG15** (**I**FN-stimulated gene **15**), **FAT10** (**F**-adjacent transcript **10**) та інші.

**Убіквітинуванням** називають процес утворення ізопептидного зв'язку між  $\epsilon$ -аміногрупою залишку лізину білка-мішені та карбоксильною групою С-кінцевого гліцину убіквітину. Убіквітинування є однією з можливих посттрансляційних модифікацій білків поряд з фосфорилуванням, глікозилюванням та ін.

Процес убіквітинування в більшості випадків не обмежується приєднанням однієї молекули убіквітину. Білок може нести одну або кілька убіквітинових молекул, а також поліубіквітинові ланцюжки різної форми та довжини. Значна частина убіквітинованих білків несе поліубіквітинові групи. Кон'югація двох молекул убіквітину здійснюється шляхом утворення ізопептидного зв'язку між С-кінцевим гліцином і  $\epsilon$ -аміногрупою одного із семи залишків лізину убіквітину. Спочатку були виявлені поліубіквітинові ланцюжки, в яких убіквітини з'єднані один з одним через лізин-48. Проте пізніше було показано, що всі сім лізинів убіквітину можуть брати участь в утворенні поліубіквітинових груп. Якщо в процесі поліубіквітинування використовуються лізинові залишки в одному положенні, то утворюються лінійні ланцюжки. При використанні кількох сайтів самокон'югації можливе утворення розгалуже-

них поліубіквітинових структур. Особливості поліубіквітинового ланцюжка, тобто його довжина та сайти самокон'югації, мають вирішальне значення у визначенні долі убіквітинового білка.

Ковалентна модифікація білків шляхом убіквітинування має надзвичайно різноманітне значення для функціональної активності клітин. Можна виділити три основні групи функцій, для яких має значення убіквітинування.

**Деградація білків.** Вперше значення убіквітинування було показано для взаємодії білків з протеасомами, яка приводила до руйнування убіквітинованих білків. Найбільш поширеним сигналом для протеолізу є поліубіквітиновий лінійний ланцюжок, що складається з чотирьох і більше убіквітинових мономерів, які з'єднані один з одним через лізин-48. Вважається, що всі поліубіквітинові ланцюжки, за винятком тих, які утворені через лізин-63, можуть бути використані як мітки для деградації.

**Активність хроматину.** Убіквітинуванню піддаються гістонові білки H2A та H2b. В одній нуклеосомі з убіквітином кон'югується зазвичай одна з цих молекул. Наявність убіквітинової мітки характерна для еухроматинової ділянки геному. Відомо, що посттрансляційні модифікації нуклеосомних гістонів важливі для тривимірної структури та функціональної активності хроматину, а також клітинної пам'яті. Убіквітинування є динамічним процесом, який має більше значення для власне ремоделювання хроматину, а не для підтримки його структури.

**Модуляція активності функціональних білків.** Убіквітинування негістонових білків не завжди приводить до деградації, а може тільки змінювати їх активність. Зазвичай це пов'язано з моноубіквітиновими або поліубіквітиновими модифікаціями з незначною кількістю убіквітинових мономерів у ланцюжку. Наприклад, моноубіквітиновані білки беруть участь у регуляції трансмембранного переносу, ендоцитозу, експресії генів і репарації ДНК. Поліубіквітинові лінійні ланцюжки, що утворені через лізин-63, важливі для генерації сигналів, які відіграють ключову роль у регуляції репарації ДНК, трансмембранного переносу, ендоцитозу, активації протеїнкіназ, трансляції та транскрипції.



## Убіквітинуючий комплекс

Центральне місце в системі убіквітин-опосередкованої деградації білків посідає убіквітинуюча лігаза (E3), яка розпізнає відповідні білки-мішені та забезпечує їх убіквітинування. В системі убіквітинування беруть участь ще два ферменти (E1 і E2), які контролюють попередню активацію убіквітину (рис. 9).

Мінімальний убіквітинуючий комплекс складається з трьох ферментів:

- 1) E1 — убіквітин-активуючий фермент;
- 2) E2 — убіквітин-кон'югуючий фермент;
- 3) E3 — убіквітинуюча протеїнова лігаза.

На першому етапі відбувається активація убіквітину. **Убіквітин-активуючий фермент (E1)** утворює тіоефірний зв'язок між консервативним залишком цистеїну та карбокситермінальним залишком гліцину убіквітину. Цей процес потребує витрати метаболічної енергії у вигляді АТР. Потім убіквітин переноситься від E1 на **убіквітин-кон'югуючий фермент (E2)**. У цьому випадку для утримання убіквітину також використовується консервативний залишок цистеїну ферменту. За взаємодії E2 з третім компонентом — **убіквітинуючою протеїною лігазою (E3)** — убіквітин переноситься на специфічний залишок лізину білка-мішені. Залежно від типу убіквітин-протеїнової лігази убіквітин може бути перенесений на молекулу субстрату безпосередньо від E2, або ж убіквітин попередньо ковалентно зв'язується з реакційним центром E3, а потім приєднується до субстрату.

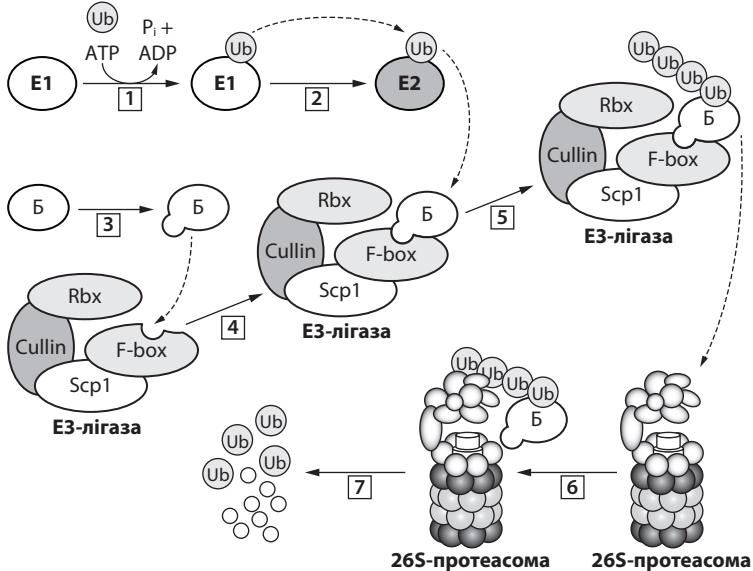
Відомі убіквітин-протеїнові лігази за структурою каталітичних доменів можна поділити на три групи:

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

HECT-домени ковалентно зв'язують убіквітин, приймаючи його від кон'югуючого ферменту E2, а потім переносять на субстрат. Лігази, які містять RING і U-box, не утворюють тіоефірного зв'язку з убіквітином, а здійснюють його пряме перенесення від E2 на субстрат. У рослинних організмах переважно функціонують RING-вмісні SCF-подібні убіквітинові лігази.

У ряді випадків поліубіквітинування контролюється додатковими ЕЗ-лігазами, які містять U-box-домен, які в системі убіквітинування також називають Е4-лігазами.

У геномі еукаріотичних організмів кодуються сотні ЕЗ-лігаз різних класів, що свідчить про надзвичайну важливість цих ферментів.



**Рис. 9.** Система убіквітин-опосередкованої деградації білків.

Умовні позначення:

E1 — убіквітин-активуєючий фермент;

E2 — убіквітин-кон'югуючий фермент;

E3 — убіквітинуюча протеїнова лігаза;

Ub — убіквітин;

B — білок-мішень.

Етапи механізму селективного протеолізу:

1 — убіквітин-активуєючий фермент (E1) зв'яже убіквітин;

2 — убіквітин переноситься на убіквітин-кон'югуючий фермент (E2);

3 — білок-мішень під дією сигналу набуває поверхню, комплементарну F-box субодиниці убіквітинуючої лігази;

4 — білок-мішень зв'язується з F-box субодиницею E3;

5 — лігаза E3 приєднує до мішені поліубіквітинову групу;

6 — поліубіквітинова мішень зв'язується 26S протеасомою;

7 — 26S протеасома відщеплює убіквітин і руйнує білок-мішень

## Структура SCF-подібної убіквітинууючої лігази

SCF-лігаза є мультимерним комплексом, який складається з чотирьох основних субодиниць: RBX, Cullin, F-box, і SKP1 (рис. 9).

**RBX** — каталітична субодиниця. Виконує власне лігазну функцію, каталізує перенесення убіквітину від убіквітин-кон'югуючого ферменту на білок-мішень. Реакційний центр субодиниці містить домен RING-H2 пальці. RING-finger-домени E3-ензимів включають мотив з восьми цистеїнових і гістидинових залишків, що містить два іони цинку.

**Cullin** — регуляторна субодиниця. Через цю субодиницю здійснюється модуляція активності E3-лігази різними регуляторами. Cullin утворює з RBX міцно зв'язаний функціонально активний димер, здатний каталізувати формування мультиубіквітинового ланцюжка.

**F-box** — забезпечує вибір субстрату для убіквітування. Субодиниця має лейцин-збагачений домен F-box, за яким названа субодиниця. Через F-box домен здійснюється взаємодія убіквітинууючої лігази з білками-мішенями.

**SKP1** — структурно-регуляторна субодиниця. Об'єднує RBX-Cullin димер і F-box субодиницю в єдиний функціональний комплекс.

## Регуляція активності SCF-лігази

Регуляція активності SCF-лігази здійснюється в процесі оборотної посттрансляційної модифікації субодиниці Cullin шляхом приєднання/відщеплення убіквітин-подібного білка RUB1. Приєднання RUB1 до Cullin багато в чому нагадує процес убіквітування. Спочатку RUB1 активується гетеродимерним RUB1-активуючим комплексом шляхом утворення тіоефірного зв'язку між карбокситермінальним амінокислотним залишком RUB1 і цистеїном однієї із субодиниць RUB1-активуючого ферменту. Доречі, одна із субодиниць цього ферменту гомологічна амінотермінальному домену убіквітин-активуючого ферменту E1, а друга — карбокситермінальному домену E1. Потім RUB1 переноситься на RUB1-кон'югуючий фермент (RCE1), який при-

єднує цей білок до субодиниці Cullin. Видаляється RUB1 від Cullin за допомогою сигналосоми COP9.

Як показують дослідження, для розвитку нормального функціонування E3-лігази дуже важливою є підтримка циклічного кон'югування/видалення RUB1. Точна роль даного регуляторного циклу ще не з'ясована. Існує кілька припущень з цього приводу. Відповідно до одного з них, приєднання RUB1 до Cullin і його видалення може бути пов'язано зі зміною компарментації SCF-подібної убіквітинової лігази. Інша гіпотеза припускає, що RUB1-кон'югаційний цикл має значення в опосередкуванні взаємодії SCF-подібної убіквітинової лігази з 26S протеасоми.

### **Зв'язування субстрату з убіквітинуючою лігазою**

Одним з відповідальних етапів убіквітин-опосередкованого протеолізу білків є вибір білка-мішені убіквітинуючою лігазою. Загальний принцип механізму впізнавання пов'язаний з формуванням комплементарних поверхонь, які дозволяють специфічну взаємодію протеїнової лігази та субстрату. За дією зовнішніх сигналів активуються процеси, які стимулюють зміни структури білка-мішені або F-box субодиниці лігази. Зазвичай достатньо зміни конформації одного з цих компонентів. При цьому поверхня однієї молекули підлаштовується під поверхню іншої. Якщо для забезпечення взаємодії білка-мішені та лігази E3 необхідна участь третього компонента, що виконує роль адаптерного білка, то зв'язування субстрату лігази може стимулюватися внаслідок зміни структури адаптерного білка.

Таким чином, специфічна взаємодія лігази E3 і субстрату забезпечується процесами, в результаті яких стимулюється зміна структури, принаймні, одного з компонентів:

- 1) білка-мішені;
- 2) F-box субодиниці убіквітинуючої лігази;
- 3) адаптерного білка, через який здійснюється взаємодія субстрату та лігази.

При цьому не існує універсального механізму — взаємопізнавання білка-мішені і F-box субодиниці лігази E3 досягається різними способами.

## Особливості білків-мішеней убіквітинуючої лігази

Білки, які залучаються до убіквітин-опосередкованого протеолізу, мають особливу ділянку, необхідну для взаємодії з F-box доменом убіквітинуючої лігази. Дану ділянку молекули називають **дегроном**, оскільки він функціонально пов'язаний з деградацією молекули. Мутації у межах дегрону приводять до збільшення стабільності білка та порушення процесів, в яких вони беруть участь.

Білки-мішені, що зазнають деградації під впливом різних сигналів, виконують різноманітні функції, переважно регуляторні. Значна частина таких білків є транскрипційними регуляторами. Наприклад, репресори транскрипції ауксин-регульованих генів родини Aux/IAA убіквітинуються під дією ауксину та згодом руйнуються 26S протеасомою. Особлива ділянка молекули, що складається з 13 амінокислотних залишків (дегрон), визначає рівень стабільності білка. Дегрон є необхідним для взаємодії білка-мішені з F-box субодиницею убіквітинуючої лігази. F-box білки, що зв'язують репресори Aux/IAA (TIR1, AFB1, AFB2, AFB3), одночасно виконують функції рецепторів ауксину (див. розділ «F-box рецептори»).

### 1.8.2. Етап другий — деградація субстрату

#### 26S протеасома

Протеолітична активність у клітинах еукаріот локалізована в лізосомах і 26S протеасомах. У лізосомах деградують тільки мембранні, а також чужорідні білки, що потрапили у клітину шляхом ендоцитозу. Значна частина клітинних білків (до 90 %) руйнується 26S протеасомами. 26S протеасома (рис. 10) має особливу структуру, яка дозволяє локалізувати протеолітичну активність у внутрішній порожнині комплексу, вхід до якої строго регулюється та для більшості білків є закритим. Завдяки цьому, присутність 26S протеасоми в цитоплазмі, нуклеоплазмі та інших компартментах клітини є абсолютно безпечним для нативних білків. Щоб потрапити в порожнину 26S протеасоми,

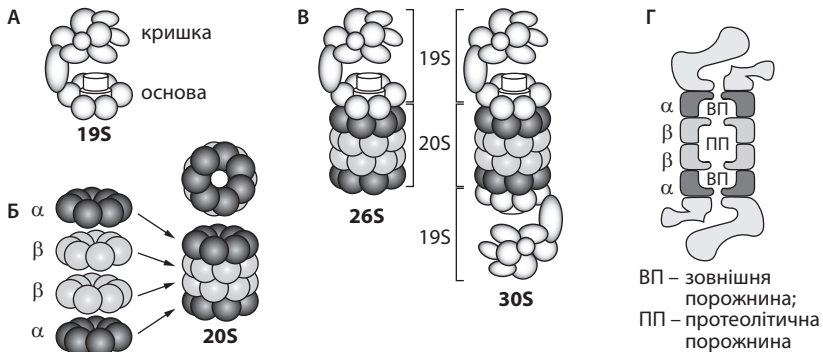
білок має бути позначений особливим чином. Міткою слугує поліубіквітиновий ланцюжок, що складається не менше ніж із чотирьох убіквітинів, послідовно з'єднаних один з одним через лізин-48. Мічені (убіквітиновані) білки розпізнаються та зв'язуються 26S протеасомою, розгортаються за допомогою АТФ-залежних компонентів протеасоми, а потім проникають в її порожнину, де піддаються руйнуванню. Убіквітинова мітка перед проникненням білка в протеолітичну порожнину, знімається ізопептидазами та розбирається на окремі убіквітини, які згодом вдруге використовуються для процесу убіквітинування.

### Структура 26S протеасоми

Протеасома складається з двох основних модулів:

- кірва (каталітична) 20S протеасома;
- регуляторна 19S частинка.

Регуляторні частинки приєднуються до 20S протеасоми з однієї або з двох сторін, формуючи відповідно структури



**Рис. 10.** Структура 26S протеасоми.

А — 19S частинка;

Б — 20S частинка (розташування гептамерних кілець у частинці, вид зверху та збоку);

В — 26S і 30S протеасоми;

Г — схематичне зображення 30S протеасоми в розрізі

з коефіцієнтами седиментації 26S і 30S (рис. 10-В). Для позначення обох структур зазвичай використовують термін «26S протеасома», вкладаючи в нього функціональний сенс. Термін «30S протеасома» використовується в тому випадку, якщо необхідно акцентувати увагу на структуру та фізичні властивості даного комплексу.

### Кірова 20S протеасома

20S протеасома складається з 28 субодиноць, що формують чотири гептамерних кільця, які складені одне на одне у вигляді стопки (рис. 10-В). В еукаріот зовнішні кільця зібрані із семи різних  $\alpha$ -субодиноць (позначаються відповідно  $\alpha_1$ – $\alpha_7$ ), а внутрішні — із семи  $\beta$ -субодиноць ( $\beta_1$ – $\beta_7$ ). У прокаріотів як  $\alpha$ -, так і  $\beta$ -субодиноці не розрізняються за структурою. Внутрішня порожнина протеасоми поділена на три відділи (рис. 10-Г). Дві зовнішні порожнини, у формуванні якої залучені  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиноці, передують вхід у центральну протеолітичну порожнину, сформовану лише  $\beta$ -субодиноцями. У клітинах еукаріот протеолітичну активність мають  $\beta$ -субодиноці лише трьох типів:  $\beta_1$  виявляють каспазоподібну активність,  $\beta_2$  — трипсиноподібну і  $\beta_3$  — хемотрипсиноподібну активність. У прокаріот усі 14 ідентичних  $\beta$ -субодиноць 20S протеасоми виявляють каталітичну активність.

Усі частинки, з яких зібрана 20S протеасома, мають високу гомологію та схожу просторову структуру. Однак  $\alpha$ -субодиноці, на відміну від  $\beta$ -субодиноць, мають додаткову N-кінцеву  $\alpha$ -спіраль. Ця ділянка молекули  $\alpha$ -субодиноці є принципово важливою для обмеження доступу у внутрішню порожнину протеасоми. У прокаріотів усі  $\alpha$ -субодиноці рівною мірою роблять внесок у відкривання пори, а в еукаріот основна роль належить субодиноці  $\alpha_3$ . У цієї субодиноці N-кінцева  $\alpha$ -спіраль найбільше виступає у канал і взаємодіє з іншими шістьма  $\alpha$ -субодиноцями. Вільна 20S протеасома не бере участі в протеолізі, оскільки канали доступу в протеолітичну порожнину у неї закриті. Для відкривання каналу й активації протеолізу необхідна взаємодія 20S протеасоми з однією або двома регуляторними 19S частинками.

## Регуляторна 19S частинка

19S частинка складається щонайменше із 17 субодиниць. Крім основних субодиниць, до складу 19S частинки можуть входити додаткові білки, які беруть участь у збірці та регуляції активності протеолітичного комплексу.

У структурі 19S частинки прийнято розрізняти основу та кришку (рис. 10-А). Дев'ять субодиниць формують основу частинки, яка кріпитися на полюсах 20S протеасоми. Шість із дев'яти субодиниць основи виявляють АТФ-азну активність. Решта субодиниць 19S частинки утворюють кришку.

Приєднання 19S частинки до 20S протеасоми супроводжується конформаційними перебудовами в амінотермінальних ділянках  $\alpha$ -субодиниць зовнішніх гептамерних кілець. У результаті цього поря протеасоми переходить у відкриту конформацію. Однак доступ у протеолітичну порожнину суворо контролюється регуляторною часткою, найбільш важливою функцією якої є вибіркоче зв'язування субстрату.

## Особливості функціонування 26S протеасоми

Субстрат впізнається за наявністю поліубіквітинованих груп і зв'язується кількома субодиницями. У впізнаванні та зв'язуванні субстрату, крім субодиниць 19S частинки, можуть брати участь лабільно асоційовані з нею допоміжні білки. Субодиниці, які беруть участь у впізнаванні субстрату, не тільки розпізнають просторову структуру поліубіквітинового ланцюга, але й сприяють правильній орієнтації убіквітинованого субстрату на протеасомі. Коректне розташування субстрату дозволяє його подальше розгортання та транслокацію в протеолітичну порожнину за рахунок АТФ-азної активності субодиниць основи 19S частинки. Розгортання поліпептидного ланцюга є необхідною умовою, оскільки розмір пори 20S протеасоми не дозволяє білку з розвиненою просторовою структурою проникати в канал протеасоми.

У процесі взаємодії субстрату з протеасомою стимулюється ізопептидазна (деубіквітинуюча) активність однієї із субодиниць кришки 19S частинки. Поліубіквітинові ланцюжки знімаються



із субстрату та розщеплюються ізопептидазами на окремі убіквітини, які вдруге можуть бути використані в убіквітинуванні.

Потрапляючи в протеолітичну порожнину 26S протеасоми, поліпептидні ланцюги білків-субстратів гідролізуються до коротких поліпептидів, що включають від 3 до 25 амінокислотних залишків.

В еукаріотичних клітинах 26S протеасоми можуть дисоціювати на 20S і 19S частинки, які здатні знову об'єднуватися у функціонально активні 26S протеасоми. Крім 19S частинки, існує багато білків, які здатні взаємодіяти з 20S протеасомою і формувати альтернативні форми протеасоми. Основною відмінністю таких протеасом є їхня нездатність зв'язувати убіквітинований субстрат і відсутність АТФ-азної активності. Дані протеасоми використовуються клітиною для убіквітин-незалежного протеолізу. Убіквітин-незалежний протеоліз може бути пов'язаний з такими функціями:

- гідроліз коротких пептидів до амінокислот;
- участь у репарації ДНК (руйнування хроматинових білків для забезпечення доступу до ДНК ферментам репарації);
- руйнування денатурованих білків (білки з порушеною структурою часто мають на поверхні молекули великі гідрофобні ділянки розгорнутих ланцюгів, які впізнаються протеасомою; гідроліз білків з порушеною структурою часто не потребує витрати АТФ на розгортання ланцюга);
- процесинг білків (зазвичай, ендопроотеоліз — розрив у поліпептидний ланцюг вноситься на значній відстані від кінців молекули білка; в порожнину протеасоми проникає поліпептидний ланцюг, складений у вигляді шпильки).

## 2. РЕЦЕПЦІЯ ЗОВНІШНЬОГО СИГНАЛУ

---

---

### 2.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИННИХ РЕЦЕПТОРІВ

#### 2.1.1. Що таке рецептор?

Рецептори є частиною сигнальної системи клітин, що забезпечує сприйняття зовнішніх стимулів. Щоб уникнути плутанини, слід зауважити, що у фізіології тварин термін «рецептор» використовується також для позначення частини сенсорної системи організму (аналізатора). У даному разі рецептором називають складне багатоклітинне утворення, яке складається не тільки з чутливих клітин, спеціалізованих на сприйнятті зовнішніх подразників, але включає також нервові закінчення дендритів чутливих нейронів, глії, спеціалізовані утворення, сформовані з міжклітинної речовини та клітин інших тканин. Функція таких рецепторів полягає в перетворенні впливу подразника в нервовий імпульс. Таким чином, рецептор, який є частиною аналізатора і являє собою **багатоклітинну** структуру, необхідно відрізнити від **клітинного** рецептора, що є молекулярним утворенням.

**Клітинний рецептор** — це макромолекула або олігомерний білковий комплекс, здатний специфічно реагувати на певний зовнішній вплив і запускати внутрішньоклітинний сигнальний каскад, що приводить до формування специфічної відповіді на цей вплив за допомогою зміни функціональної активності клітини.

Далі для позначення клітинного рецептора ми будемо використовувати термін «рецептор».

У клітинах рецептори присутні у значній кількості та різноманітності. Їх розрізняють за багатьма критеріями, зокрема:

- за типом сигналу, що сприймається;
- за локалізацією;
- за структурними особливостями;
- за механізмом активації.

Рослинні клітини здатні реагувати на різні стимули: хімічні сполуки, світло, температуру, дотик, механічний вплив, гравітацію та ін. В рамках навчального курсу ми будемо розглядати дві найбільш вивчені групи рецепторів: **хімічні (ліганд-зв'язуючі)** і **світлові**.

Клітинні рецептори можуть локалізуватися в різних частинах клітини. Залежно від їх розташування, розрізняють зовнішні та внутрішні рецептори. Зовнішні рецептори локалізуються на плазматичній мембрані, а внутрішні — всередині клітини. Зовнішні хімічні рецептори є переважно трансмембранними білками, у яких ліганд-зв'язуючі домени розташовані на екстраклітинній поверхні плазмалемі, а регуляторні — із цитоплазматичного боку. Внутрішні рецептори можуть бути зв'язані з ендомембранами, перебувати в розчинному стані, а також входити до складу мультимерних білкових комплексів.

## 2.1.2. Структурно-функціональні особливості рецепторів

### Субодинична та доменна структура

Рецептори можуть бути мономерними молекулами та складатися з кількох субодиниць. У ряді випадків субодиничний склад молекули рецепторів змінюється в процесі активації. Так, рецепторні кінази в неактивному стані можуть перебувати в мономерному стані, але при активації димеризуються.

Серед основних структурних модулів слід виділити три домени:

- **рецепторний** — забезпечує сприйняття сигналу, наприклад, зв'язування ліганду;

- **регуляторний** — необхідний для взаємодії із сигнальними партнерами, через нього здійснюється передача сигналу;
- **домен локалізації** — ділянка, що визначає локалізацію рецептора.

Інші функціональні домени характерні для певних груп рецепторів.

Наприклад, рецептори можуть мати ділянки регуляції власної активності. Ці ділянки або містять сайти посттрансляційної модифікації або служать для зв'язування з алостеричними регуляторами різної природи (білками, низькомолекулярними речовинами, іонами). Залежно від статусу клітини активність рецептора через дані ділянки може посилюватися, послаблюватися або повністю інгібуватися.

Для рецепторних кіназ характерною є наявність кіназного домену, до якого входять реакційний центр, а також численні сайти автофосфорилування. Процес автофосфорилування є необхідною частиною механізму активації цього типу рецепторів.

## Основні механізми активації рецепторів

Механізми активації рецепторів мають різний характер, проте в більшості випадків вони зводяться до формування поверхні зв'язування, через яку здійснюється взаємодія рецептора з даунстрим сигнальними посередниками, що необхідно для передачі сигналу. Тільки у випадку рецепторів-каналоформерів, які поєднують функцію рецепторів та іонних каналів, сигнал передається за допомогою зміни концентрації іонів, що виконують роль вторинних месенджерів.

1. **Зміна конформації.** Зміни конформації молекули рецептора, стимульовані в результаті сприйняття сигналу, приводять до формування поверхні зв'язування, необхідної для взаємодії рецептора з даунстрим сигнальним партнером. Для деяких рецепторів ця подія є достатньою для передачі сигналу.
2. **Ковалентна модифікація.** Зміна просторової структури ряду рецепторів є першим етапом активації, тоді як поверхня взаємодії формується внаслідок подальшої посттрансляційної ковалентної модифікації. Цей механізм характерний для

рецепторних кіназ. Він полягає у тому, що внаслідок рецепції і зміни конформації у рецепторів підвищується спорідненість один до одного — вони утворюють гомодимерні конструкції і взаємно фосфорилують один одного. Фосфорилування приводить до формування поверхні зв'язування. Ковалентна модифікація рецепторів може також здійснюватися допоміжними регуляторними компонентами, які здатні до каталітичної активності. За допомогою такого механізму регулюється здатність рецептора не тільки взаємодіяти з даунстрим сигнальним партнером, але і сприймати зовнішній сигнал.

3. **Вивільнення рецептора зі зв'язаного стану.** Існує група рецепторів, які в неактивному стані зв'язані з білком (часто шапероном), що закриває доступ до певних ділянок поверхні молекули рецептора, необхідних для прояву або регуляції його функціональної активності. В результаті рецепції неактивний комплекс розпадається, рецептор вивільнюється та набуває здатності передавати сигнал. Найбільш важливими ділянками рецепторних молекул, які можуть екрануватися регуляторами, є:
  - **ділянки взаємодії з мішенями:** відкривання ділянки дозволяє рецептору зв'язуватися з мішенями та модулювати їх активність;
  - **домени локалізації:** зміна локалізації рецепторів необхідна для просторового відокремлення або зближення рецептора та мішені;
  - **регуляторні домени:** ділянки взаємодії з аллостерічними регуляторами або сайти посттрансляційної модифікації, через які здійснюється регуляція активності рецептора.
4. **Перерозподіл рецептора між плазмалемною та ендосомною фракціями.** Цей механізм є актуальним тільки для мембранозв'язаних рецепторів. За його допомогою частина плазматичної мембрани, що містить рецептори певного типу, шляхом ендоцитозу переходить в ендосоми. Можливий зворотний процес — злиття ендосом із плазмалею. Таким чином, рецептори вилучаються з мембрани або повертаються до неї. Перехід рецептора з плазмалеми в ендосоми має щонайменше дві функції, протилежні за значенням:

- видалення рецептора з плазмалеми унеможливорює його взаємодію з лігандами, що приводить до переривання сигналу;
- перехід в ендосоми є своєрідним механізмом доставки активованого рецептора до внутрішньоклітинних мішеней, що в ряді випадків є необхідною умовою для передачі сигналу.

Активація рецепторів і передача сигналу часто являють собою досить складні процеси, які включають в себе кілька різноманітних механізмів. Наприклад, рецептори брасиностероїдів, які є рецепторними кіназами, в процесі активації фосфорилують один одного, а також піддаються фосфорилуванню корцепторними молекулами та іншими регуляторами. Крім того, каталітична активність брасиностероїдного рецептора спрямована на даунстрим сигнальний посередник, а в деяких випадках механізм передачі сигналу передбачає утворення та транслокацію ендосомних везикул.

## Функціональна активність

За функціональною активністю рецептори можна поділити на дві умовні категорії: класичні та рецептори з подвійною функцією.

**Класичні рецептори** не виконують ніяких інших функцій крім власне рецепції та передачі сигналу.

**Рецептори з подвійною функцією** крім рецепції виконують інші функції. До даної групи можна віднести рецептори-каналоформери — трансмембранні білкові комплекси, які поєднують функцію рецепторів та іонних каналів. Існують також внутрішньоклітинні рецептори з подвійною функцією. Наприклад, рецептор ауксину TIR1 є частиною убіквітинуючої протеїнової лігази. TIR1 — це F-box білок, функцією якого є вибір і зв'язування субстрату для убіквітинування. Рецептор TIR1 набуває спорідненості до білка-субстрату тільки в результаті рецепції ауксину.

## 2.2. ЛІГАНД-ЗВ'ЯЗУЮЧІ РЕЦЕПТОРИ

Існує величезна кількість клітинних рецепторів, які специфічно зв'язують хімічні сполуки (ліганди) певного типу. Такими речовинами можуть бути гормони, інші біологічно активні речовини з гормоноподібною дією, елісатори, трофічні сполуки (цукри, амінокислоти), іони (наприклад, нітрати) та ін. Екстраклітинні ліганди, які специфічно взаємодіють з рецепторами, називають **первинними месенджерами**. Специфічне зв'язування з первинними месенджерами спричиняє конформаційні зміни рецептора, необхідні для запуску трансдукції внутрішньоклітинного сигналу. Слід зауважити, що з конкретним хімічним рецептором можуть зв'язатися сполуки різної природи, проте далеко не всі здатні активувати сигнальну систему. Специфічність взаємодії, що дозволяє стимулювати процес передачі сигналу, можлива тільки при взаємодії рецептора з певним типом ліганду, який називають також активним агоністом.

Хімічний рецептор виявляє певний ступінь **афінності** (спорідненості) до ліганду. Значення афінності багато в чому залежить від концентрації ліганду у тканинах організму. Будь-який рецептор налаштований на певний рівень концентрації агоніста, за якого можливе ефективне зв'язування. Наприклад, трофічні сполуки присутні в значно більших концентраціях, ніж регулятори гормональної природи. Відповідно, рецептори, специфічні до трофічних сполук, виявляють нижчу спорідненість до агоністів, ніж рецептори гормонів і гормоноподібних регуляторів.

Міцність зв'язування рецептора з лігандом (афінність) є важливою кінетичною характеристикою та виражається константою дисоціації ( $K_D$ ), значення якої дорівнює концентрації ліганду, за якої половина рецепторів зв'язана з лігандом. Чим нижчою є константа дисоціації, тим нижчими є концентрації ліганду, необхідні для зв'язування з рецептором. Низькі значення  $K_D$  також є ознакою більш міцно зв'язаного комплексу **рецептор–ліганд** і більш тривалого часу його існування. Взаємодія рецептора та ліганду може мати різний часовий характер. Однак для ефективної роботи сигнальної системи клітини важливе значення має не тільки міцність зв'язування рецептора

з лігандом, але і швидкість дисоціації рецептора та ліганду. Зміна умов може привести до необхідності швидкого припинення стимуляції рецептора лігандом, а цього легше досягти за порівняно низької афінності. З цієї причини константа дисоціації більшості рецепторів з лігандами частіше має проміжні значення й оцінюється в середньому  $10^{-9}$ – $10^{-7}$  М, але у різних рецепторів може варіювати в значних межах.

Один і той же ліганд може зв'язуватися різними типами спеціалізованих рецепторів, які мають різну спорідненість до ліганду. Наприклад, у рослин виявлено багато етиленових рецепторів (гістидинових кіназ), які зв'язують етилен у діапазоні концентрацій  $0,1 \cdot 10^{-9}$  М –  $5 \cdot 10^{-9}$  М. За ступенем спорідненості з етиленом їх поділяють на дві групи: високоафінні та низькоафінні рецептори. Період напіврозпаду комплексу високоафінних етиленових рецепторів з лігандом *in vitro* досягає понад 6 годин, тоді як для другої групи, низькоафінних рецепторів, ця величина не перевищує 30 хвилин. Ймовірно, наявність рецепторів з різною афінністю до ліганду необхідно для того, щоб відрізнити концентрації, в яких присутній ліганд у тканині. Це має принципове значення для регуляції клітинних механізмів, оскільки різні типи рецепторів (у відповідь на різні концентрації ліганду) можуть стимулювати неоднозначні сигнальні механізми. Крім того, важливим може бути тривалість підтримки сигналу. Наприклад, у стресових умовах вплив етилену на рецептори актуальний тільки лише за дії несприятливого фактора, тобто ця реакція є оборотною при зміні умов. У той же час процеси дозрівання соковитих плодів або старіння органів являють собою свого роду векторні механізми, які можна прискорити або уповільнити, але неможливо скасувати. Хоча даних про афінність рецепторів етилену, які беруть участь в описаних механізмах, немає, можна припустити, що для оборотних процесів використовуються рецептори з меншою спорідненістю, порівняно з необоротними процесами. Побічно це підтверджується тим, що в ювенільних і зрілих тканинах рослин підтримується експресія генів, що кодують різні набори етиленових рецепторів.

На плазматичній мембрані або всередині клітини міститься величезна кількість різних рецепторів. Рецептори певного типу



можуть бути присутніми в різній копійності, причому в деяких випадках їхня кількість може досягати кілька тисяч у розрахунку на одну клітину. Так, на плазматичній мембрані типовою тваринної клітини налічується 10 000–20 000 рецепторів одного типу. Причому для активації специфічної відповіді достатньо стимуляції не більше 2% гормон-специфічних рецепторів. Така велика концентрація рецепторів, ймовірно, необхідна для відповіді на низькі концентрації ліганду.

### 2.2.1. Локалізація ліганд-зв'язуючих рецепторів

Розташування ліганд-зв'язуючих рецепторів багато в чому визначається природою ліганду, який вони сприймають як сигнал. Ліпородчинні ліганди легко проникають через плазмалему всередину клітини шляхом звичайної дифузії крізь біліпідний шар або через спеціалізовані переносники за допомогою полегшеної дифузії. Такі сигнальні молекули можуть зв'язуватися і з зовнішніми, і з внутрішніми рецепторами. Наприклад, стероїдні гормони тварин легко проникають у клітину внаслідок ліпофільних властивостей і зв'язуються з рецепторами, що локалізуються в цитоплазмі або в нуклеоплазмі. Разом з тим наявність внутрішньоклітинних рецепторів для ліпофільних регуляторів, мабуть, не є обов'язковою. Рослинні стероїдні гормони, брасиностероїди, близькі за своєю природою до тваринних аналогів, хоча рослинні та тваринні стероїдні регулятори мають суттєві відмінності в кільці В. Відомі рецептори брасиностероїдів локалізуються на плазмалемі, а чи існують їх внутрішньоклітинні рецептори, не відомо. З іншого боку, рецептори рослинного гормону етилену, ідентифіковані до теперішнього часу, розташовуються виключно на плазмалемі, проте етилен досить легко дифундує через мембрани.

Такі рослинні гормони, як ІОК, АБК і гібереліни є слабкими кислотами, внаслідок чого мають перехідні властивості розчинності. У кислих умовах їх молекули протонуються та набувають електронейтрального стану, за якого дані речовини добре розчиняються в ліпідній фазі, тому легко проникають у клітину. Однак у лужних умовах ці гормони втрачають протон і переходять в іонний стан (ІОК<sup>-</sup>, АБК<sup>-</sup>, ГК<sup>-</sup>), який забезпечує

їм гідрофільні властивості. Міжклітинний простір у рослин (апопласт) має низькі значення рН, за яких слабкі кислоти не заряджені. Тому дифузія ІОК, АБК і гіберелінів через плазматичну мембрану з апопласту всередину клітини відбувається досить легко. Зворотний вихід гормонів з клітини ускладнений і потребує витрати додаткової енергії. Таким чином, слабкокислотні властивості даних гормонів, а також розподіл заряду щодо плазмалемі дозволяють внутрішньоклітинну локалізацію їх рецепторів. Припускають, що рецептори цих гормонів локалізуються на плазмалемі та всередині клітини. Однак для всіх трьох груп гормонів у даний час виявлені внутрішньоклітинні рецептори, а зовнішній рецептор ідентифікований тільки для ІОК. Зовнішній рецептор ауксину АВР1 (**auxin binding proteins 1**) є поверхневим білком, який розташований на зовнішній поверхні плазмалемі. Припускають, що АВР1 взаємодіє з трансмембранним білком, через який здійснюється передача сигналу всередину клітини.

Багато гормонів зовсім не проникають у клітину, або цей процес здійснюється важко. Перешкоджає цьому полярність молекули (в тому числі наявність заряду) або її великі розміри. Прикладом гормонів з великою молекулярною масою є поліпептидні гормони. Всі вони, включаючи навіть відносно низькомолекулярні рослинні гормони, такі як фітоссульфокіні (група сульфатованих за тирозином тетра- і пентапептидів), зв'язуються зі специфічними рецепторами на зовнішній поверхні плазмалемі.

## 2.2.2. Зовнішні рецептори

### Рецептор-подібні кінази

Рецептор-подібні кінази є мономерними інтегральними білками, що перетинають мембрану один раз. Вони локалізуються на плазматичній мембрані, але виявляються також у мікросомній фракції.

До рецептор-подібних кіназ належать рецептори брасиностероїдів, багатьох еліситорів, а також усі ідентифіковані дотепер рецептори пептидних гормонів.

Молекула рецептор-подібних кіназ складається з трьох основних структурних елементів (рис. 11).

1. **Екстраклітинний (рецепторний) домен (ЕД)** формується N-термінальною ділянкою молекули. Відповідно до будови цього домену розрізняють чотири основні групи рецептор-подібних кіназ: LRR-група (лейцин-збагачені повтори — leucine riched repeat); S-домен група; лектин-подібний домен; EGF.
2. **Трансмембранний домен (ТД)** представлений  $\alpha$ -спіральною ділянкою, яка пронизує мембрану один раз, поєднуючи зовнішню та внутрішньоклітинну частини рецепторної молекули.
3. **Цитоплазматичний домен (ЦД)** — внутрішньоклітинна частина рецептора, сформована С-термінальною ділянкою. Включає регуляторний фрагмент (РД), який містить каталітичний кіназний центр, багато сайтів фосфорилування та ділянки взаємодії із сигнальними молекулами. Кіназна активність рецептор-подібних кіназ може бути спрямована на рецептори (подібні до себе молекули), корецептор та інші мішені, якими можуть бути різні регулятори, а також даун-стрим сигнальні білки, на які передається сигнал.

**Механізм передачі сигналу.** Сприйняття сигналу (зв'язування агоніста) здійснюється екстраклітинним доменом рецептора. Зв'язування ліганду сприяє зміні конформації рецепторної

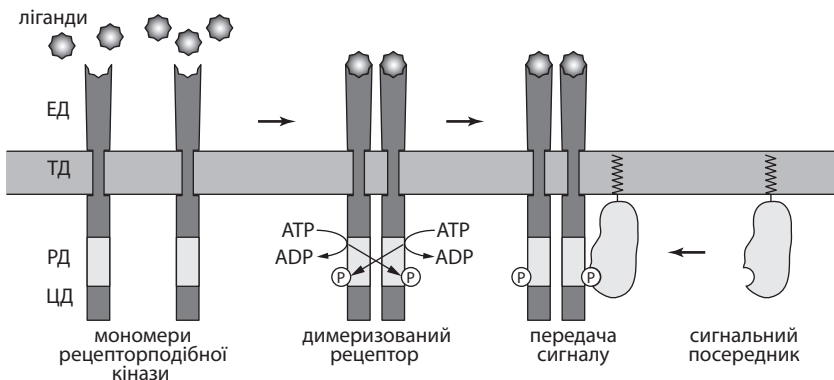


Рис. 11. Структура рецептор-подібної кінази та механізм активації

ділянки молекули, але мало відбивається на структурі цитоплазматичного домену. Разом з тим, зміна конформації зовнішнього домену сприяє підвищенню спорідненості рецепторних молекул один до одного. Оскільки молекули рецептор-подібних кіназ можуть латерально дифундувати по мембрані, вони здатні утворювати димерні комплекси (рецептор–рецептор). У механізмі активації рецепторних кіназ можуть брати участь також корецептори.

За рахунок зближення двох рецепторів активуються кіназні центри, і рецепторні молекули фосфорилують один одного за залишками серину та треоніну в різних ділянках цитоплазматичного домену. Цей процес називають **автофосфорилуванням**, або точніше **трансмолекулярним автофосфорилуванням**, оскільки рецепторні молекули фосфорилують не самих себе, а подібні до себе молекули. Джерелом фосфатних груп виступає АТФ. Деякі рецептор-подібні кінази мають подвійну специфічність та здатні, крім залишків серину та треоніну, фосфорилувати також залишки тирозину.

Автофосфорилування рецепторів є необхідним початковим етапом їх активації, але, зазвичай, недостатнім для передачі сигналу. У процесі автофосфорилування готується поверхня для взаємодії із корецепторами. Наприклад, автофосфорилування рецепторів брасиноліду **ВКІ1 (BRI1 kinase inhibitor 1)** необхідно для подальшого зв'язування з корецептором **ВАК1 (BRI1-associated kinase 1)**, без участі якого неможлива остаточна активація рецептора.

Корецептор рецептор-подібних кіназ має подібну рецептору структуру, але ліганд-зв'язуючий домен у них відсутній, тому корецептор не здатен зв'язуватися з лігандом. Корецептор у процесі активації утворює гетеродимери з рецептором і бере участь у взаємному фосфорилуванні. У деяких випадках утворюються гетеротетрамери, що складаються з двох молекул рецептора та двох молекул корецептора. Багато корецепторів можуть взаємодіяти із різними рецептор-подібними кіназами. Так, корецептор **ВАК1** бере участь в активації рецептора брасиноліда **BRI1**, а також флагеллін-зв'язуючого рецептора **FLS2 (flagellin sensitive 2)**. Дослідники часто називають **ВАК1** універсальним корецептором.

Взаємне фосфорилування рецептора та корецептора (трансфосфорилування) спрямовано на підготовку рецептора до передачі сигналу. В результаті рецептор набуває здатності впливати на наступний компонент сигнальної системи.

Передача сигналу рецептор-подібними кіназами можлива двома способами:

- 1) шляхом міжмолекулярної взаємодії з даунстрим сигнальним посередником (асоціація або дисоціація);
- 2) за допомогою ковалентної модифікації сигнального посередника (активація кіназної активності рецептор-подібної кінази щодо даунстрим посередника).

В обох випадках вплив рецептора сприяє модуляції активності сигнального посередника, а отже, передачі сигналу.

Таким чином, трансдукція сигналу через рецептор-подібні кінази не потребує проникнення ліганду всередину клітини, а механізм передачі сигналу можна представити у такій послідовності:

- 1) зв'язування ліганду з рецептором;
- 2) утворення димерів рецепторних молекул;
- 3) трансмолекулярне автофосфорилування рецепторів;
- 4) утворення гетерополімерних комплексів з корецептором;
- 5) трансфосфорилування між рецепторами та корецепторами;
- 6) вплив рецептора на даунстрим сигнальний посередник і модуляція його активності (передача сигналу).

Механізми передачі сигналу в кожному конкретному випадку можуть відрізнятися. Наприклад, рецептор при активації може зв'язуватися з даунстрим сигнальним посередником через поверхню, яка формується внаслідок авто- і трансфосфорилування. В інших випадках рецептор зв'язаний з посередником у неактивному стані, а при активації відбувається їх дисоціація. Крім цього, рецептори, корецептор і сигнальні посередники можуть взаємодіяти з різними регуляторами, що модулюють їх активність. Різноманітні взаємини між сигнальними партнерами визначають особливості активаційного циклу та механізму передачі сигналу.

## Гістидинові рецепторні кінази

Гістидинові рецепторні кінази спочатку були виявлені у бактерій. Для еукаріотів існування гістидинових кіназ було показано на початку 1990-х років після відкриття у рослини *Arabidopsis* етиленового рецептора ETR1, а у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* — осмосенсора SLN1. Гістидинові кінази у великій кількості зустрічаються у рослин і бактерій, але у тварин вони не виявлені.

У рослин гістидинові рецепторні кінази представлені двома типами:

- гібридні гістидинові кінази;
- етиленові рецептори.

Рецептори обох груп містять гомологічні ділянки та в цілому мають подібну структуру. Однак між ними є принципові структурно-функціональні відмінності. Головна відмінність полягає в механізмі передачі сигналу.

## Гібридні гістидинові кінази

Гістидинові рецепторні кінази є частиною **двокомпонентних сигнальних систем**, що функціонують у рослин і бактерій. У професійному сленгу молекулярних біологів ці рецептори називають часто «двокомпонентними гістидиновими кіназами», або «двокомпонентними рецепторами». У даному випадку термін «двокомпонентний» стосується типу сигнальної системи та не пов'язаний з особливостями структури рецептора. Гістидинові рецепторні кінази рослин і бактерій мають гомологічні ділянки, але відрізняються доменним складом. Складніші за структурою гістидинові кінази рослин називають **гібридними**.

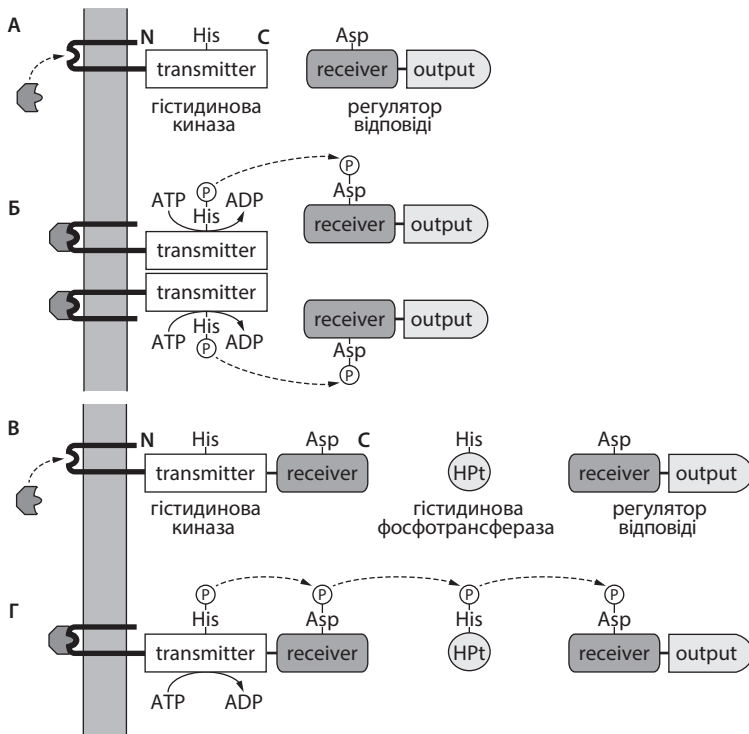
## Прокаріотичні двокомпонентні сигнальні системи

Двокомпонентні сигнальні системи бактерій (рис. 12-А, Б) складаються з двох типів молекул:

- 1) гістидинові рецепторні кінази (His-кінази);
- 2) регулятори відповіді (**RR** — response regulator).

З цієї причини дані сигнальні системи називають **двокомпонентними**.

**Бактеріальні гістидинові рецепторні кінрази** є інтегральними мономерними білками, які локалізуються на плазмалемі. Молекула рецептора двічі перетинає мембрану N-кінцевою ділянкою. Обидві термінальні області розташовані з цитоплазматичного боку. Зовнішня ділянка гістидинової кінрази, яка локалізована між двома трансмембранними доменами, формує **рецепторний (input) домен**, або **CHASE-домен** (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular). Карбокситермінальна частина молекули рецептора формує **transmitter** домен, який



**Рис. 12.** Двокомпонентні сигнальні системи прокариот (А, Б) і рослин (В, Г).

А, В — неактивний стан;

Б, Г — активний стан (автофосфорилювання та фосфорелейний механізм).

Димеризація рецепторів у рослинній системі не відображена

містить каталітичний кіназний центр і консервативний залишок гістидину, що фосфорилується за трансмолекулярного автофосфорилування.

**Регулятори відповіді** складаються з двох основних функціональних структур. Амінотермінальна ділянка молекули формує **receiver** домен, який містить консервативний залишок аспарагінової кислоти. У карбокситермінальній частині регулятора відповіді розташований **регуляторний (output)** домен, через який здійснюється модуляція активності мішеней.

Розрізняють регулятори відповіді двох типів:

- 1) **RR-A** — регулятори відповіді А-типу модулюють активність функціональних білків.
- 2) **RR-B** — регулятори відповіді В-типу є транскрипційними факторами. У регуляторів відповіді В-типу, на відміну від RR-A, в регуляторному домені є додаткова ділянка (**GARP-домен** — **Glutamic Acid-Rich Protein**), необхідна для сайт-специфічного зв'язування із промоторами генів.

**Механізм активації та передачі сигналу.** Зв'язування ліганду His-кінази підвищує спорідненість рецепторів один до одного, які виявляють виражену тенденцію до утворення гомодимерних структур. Зближення гістидинових кіназ стимулює взаємне фосфорилування залишків гістидину в transmitter доменах. Потім фосфатна група переноситься із залишку гістидину рецептора на консервативний залишок аспарагінової кислоти receiver домену регуляторів відповіді. Отже, гістидинові рецепторні кінази виявляють не тільки властивості гістидинової кінази, але й фосфотрансферази. Регулятори відповіді у фосфорильованому стані набувають здатність модулювати активність своїх мішеней. Таким чином, передача сигналу в двокомпонентних сигнальних системах є **фосфорелейним механізмом** (перенесенням фосфатної групи), який ініціюється внаслідок автофосфорилування рецептора після рецепції екстраклітинного сигналу.

### **Двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин**

У рослин, як і у бактерій, функціонують аналогічні сигнальні системи за участю гістидинових рецепторних кіназ і регуляторів відповіді. Ці системи в обох групах організмів ма-



ють загальний принцип активації і передачі сигналу, тому рослинну систему традиційно називають **двокомпонентною**. Однак у рослин двокомпонентні системи включають додатковий білковий модуль — **гістидинову фосфотрансферазу**. Тому такі рослинні системи називають також **двокомпонентними багатокроковими сигнальними системами**. Прикладом подібної системи у рослин служить цитокінінова сигнальна система.

Таким чином, двокомпонентні багатокрокові регуляторні системи рослин (рис. 12-В, Г) представлені трьома компонентами:

- 1) гістидинові гібридні кінази;
- 2) гістидинові фосфотрансферази;
- 3) регулятори відповіді.

**Гібридні гістидинові кінази** рослин близькі за структурою до бактеріальних, але мають складнішу будову. Вони також локалізуються на плазматичній мембрані, мають два трансмембранні домени, зовнішній рецепторний домен і цитоплазматичний **transmitter** домен, який має властивості гістидинової кінази та містить консервативний залишок гістидину. Однак у карбокситермінальній частині молекули рецептора знаходиться додатковий **receiver** домен, гомологічний **receiver** домену регулятора відповіді. Він також містить консервативний залишок аспарагінової кислоти, на який переноситься фосфатна група.

**Гістидинові фосфотрансферази** мають низьку молекулярну масу та містять консервативний залишок гістидину, який використовується для перенесення фосфатної групи. У двокомпонентній сигнальній системі гістидинові фосфотрансферази часто називають **HPt доменом**, а функціонально активний залишок гістидину — **вторинним гістидином**. Вторинний гістидин приймає фосфатну групу від залишку аспарагінової кислоти **receiver** домену гібридної гістидинової кінази та переносить його на залишок аспарагінової кислоти **receiver** домену регулятора відповіді (рис. 12-Г).

**Регулятори відповіді** рослин подібні до бактеріальних. Їхні молекули складаються з амінотермінального **receiver** домену, що містить консервативний залишок аспартату, і карбокситермінального **регуляторного** домену. У механізмах регуляції бе-

руть участь два типи регуляторів відповіді: модулятори активності білків (RR-A) і транскрипційні фактори (RR-B).

**Механізм функціонування.** Рецепція зовнішнього сигналу гістидиновою гібридною кіназою сприяє димеризації рецепторних молекул. У складі гомодимерної групи рецепторні кінази фосфорилують одна одну за залишком гістидину. Після цього ініціюється тритактовий фосфорелейний механізм. Перший етап здійснюється всередині молекули рецептора: фосфатна група переноситься від залишку гістидину transmitter домену на залишок аспартату receiver домену. Потім фосфатну групу приймає мобільна гістидинова фосфотрансфераза (фосфат приєднується до залишку вторинного гістидину) і переносить її на залишок аспартату регулятора відповіді. Фосфорильовані регулятори відповіді зв'язуються зі своїми мішенями та модулюють їхню активність.

**Причини ускладнення еукаріотичних двокомпонентних систем.** Ускладнення двокомпонентних систем у рослин пов'язано з ускладненням будови еукаріотичної клітини, порівняно з прокаріотичною. У бактерій передача сигналу шляхом фосфорелейного механізму здійснюється безперешкодно, оскільки всі компоненти сигнальної системи локалізуються в одному компартменті — цитоплазмі. Всі регулятори відповіді можуть контактувати одночасно з цитоплазматичним доменом рецептора та зі своїми мішенями, в тому числі з ДНК. У рослин, як і в усіх еукаріот, ДНК відокремлена від цитоплазми ядерною мембраною. Регулятори відповіді В-типу локалізуються переважно в ядрі та не можуть безпосередньо взаємодіяти з рецепторними гістидиновими кіназами. Цим визначається необхідність участі у фосфорелейному механізмі мобільного компонента, що виявляє фосфотрансферазну активність. Функцію такого компонента виконує гістидинова фосфотрансфераза (HPt домен). Вона приймає на себе фосфатну групу від рецепторної кінази, потім транслокується до ядра та передає фосфат на регулятор відповіді. Таким чином, компартментація еукаріотичної клітини є причиною ускладнення двокомпонентних регуляторних систем рослин.

## Етиленові рецептори

**Структура.** Рецептори етилену мають істотну схожість з гістидиновими рецепторними кіназами, які функціонують у двокомпонентних сигнальних системах рослин і бактерій. Етиленові рецептори рослин є інтегральними білками, що локалізовані у плазмалемі (рис. 13). В N-термінальній ділянці вони мають три гідрофобні трансмембранні домени, які перетинають мембрану. Амінокінцева ділянка молекули розташована зовні клітини, а карбокситермінальна — у цитоплазмі. Екстраклітинні ділянки рецепторної молекули формують етилен-зв'язуючий домен і беруть участь у димеризації молекул. На відміну від двокомпонентних рецепторів, етиленові рецептори завжди існують у вигляді гомодимерів, у яких мономери ковалентно зв'язані один з одним. Зв'язок забезпечується двома цистеїновими містками, які утворені між залишками цистеїну, що займають положення 4 та 6 у поліпептидних ланцюгах рецепторів (cys-4–cys-4', cys-6–cys-6').

Усі виявлені етиленові рецептори рослин кодуються однією родиною генів. Однак за структурою цитоплазматичної частини молекули їх можна розділити на дві групи. Рецептори першої групи мають значну схожість із гібридними гістидиновими кіназами рослин, а рецептори другої — з двокомпонентними рецепторами бактерій.

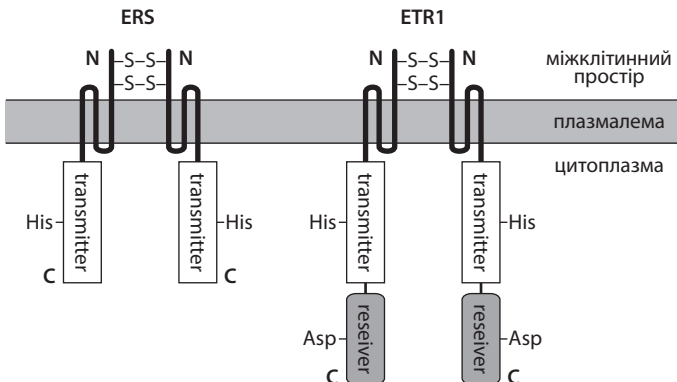


Рис. 13. Етиленові рецептори

У цитоплазматичної частини етиленових рецепторів обох груп міститься гістидинкіназний каталітичний домен і консервативний залишок гістидину, який фосфорилується при автофосфорилуванні. Ця ділянка молекули гомологічна transmitter-домену двокомпонентних рецепторів. Але тільки рецептори першої групи у карбокситермінальному районі мають домени, гомологічні receiver-домену гібридних гістидинових кіназ і регуляторів відповіді. Ці ділянки містять консервативні залишки аспарагінової кислоти.

Прикладом рецептора, близького за структурою до гібридних гістидинових кіназ рослин, є рецептор ETR1 (ethylene triple response 1) арабидопсиса. До рецепторів другої групи належить ERS (ethylene response sensor). Незважаючи на структурні відмінності, ETR1 і ERS мають 67% гомологію амінокислотної послідовності та виконують ідентичні функції.

**Механізм передачі сигналу.** Етиленові рецептори в складі гомодимеру у відсутності ліганду (етилену) перебувають в конститутивно активному стані, за якого консервативний залишок гістидину transmitter-домену несе фосфатну групу. На відміну від гістидинових рецепторних кіназ двокомпонентних регуляторних систем, етиленові рецептори не беруть участі у фосфорелейному механізмі. Активні етиленові рецептори підтримують в активному стані даунстрим сигнальний компонент — серин/треонінову кіназу CTR1 (constitutive triple response 1). Взаємодія здійснюється між кіназним доменом рецептора й амінотермінальною частиною кінази. Кіназа CTR1 є негативним регулятором етиленового сигналу, і за відсутності гормону вона активно інгібується.

Рецепція етилену стимулює зміну конформації рецептора та його інактивацію. Це приводить до подальшої інактивації кінази CTR1 і дерепресії системи етиленового сигналу.

Таким чином, етиленові рецептори принципово відрізняються від усіх інших рецепторних кіназ механізмом рецепції і передачі сигналу. Основними відмінними характеристиками етиленових рецепторів є:

- 1) постійне перебування в гомодимерному стані;
- 2) конститутивна активність у відсутності ліганду;
- 3) інактивації внаслідок рецепції;

- 4) передача сигналу здійснюється за рахунок зміни конформації;
- 5) кіназна активність щодо даунстрим сигнальних партнерів не виявляється;
- 6) фосфорелейний механізм не ініціюється.

### 2.2.3. G-білок сполучені рецептори (GPCR)

#### G-білок сполучені рецептори тварин

У тварин у плазматичній мембрані клітин у значній кількості та різноманітності присутні рецептори, які мають сім трансмембранних доменів. Ці рецептори функціонально пов'язані з гетеротримерними G-білками та складають з ними стійку сигнальну пару. Структурні та функціональні особливості даної родини рецепторів визначають їх назви: **7TM** (семитранс-мембранні) або **GPCR** (**G-Protein Coupled Receptor**) — G-білок сполучені рецептори. Раніше їх називали також серпентиновими, або змієподібними, рецепторами, однак у сучасній літературі ці терміни поступово виходять з ужитку.

GPCR — це великий клас мономерних рецепторів, які виконують найрізноманітніші сигнальні функції у тварин. До цього типу належать смакові, нюхові, андренергічні, мускаринові ацетилхолінові та інші рецептори. Всі вони мають загальний принцип будови та функціонування, а розрізняються ліганд-специфічністю, тобто здатністю сприймати різні зовнішні сигнали.

Поліпептидний ланцюг GPC-рецепторів сім разів пронизує мембрану (рис. 14). N-термінальна ділянка поліпептиду розта-

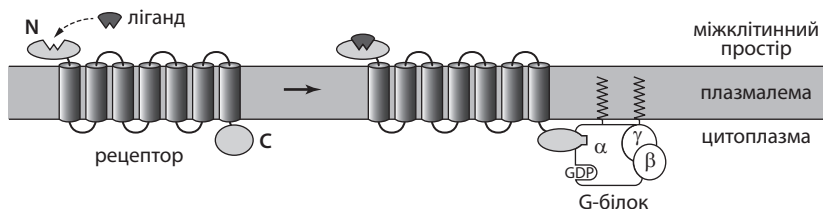


Рис. 14. G-білок сполучені (семитранс-мембранні) рецептори

шовується на екстраклітинному боці плазматичної мембрани, а С-кінцева ділянка — на цитоплазматичному. Деякі амінокислотні залишки зовнішньоклітинних частин поліпептидного ланцюга (N-кінцевий та міжтрансмембранні ділянки) рецепторної молекули глікозовані. Олігосахаридні групи відіграють істотну роль у формуванні ліганд-зв'язуючої ділянки рецептора. Цитоплазматична С-термінальна область GPCR формує ділянку зв'язування G-білка, через який опосередковується передача сигналу на G-білок. Гетеротримерний мембранозв'язаний G-білок є обов'язковим компонентом сигнальних механізмів, які стимулюються через G-білок сполучені рецептори.

Існує багато типів GPC-рецепторів, специфічних до лігандів різної хімічної природи. Вони зв'язують пептидні та глікопротеїнові гормони, аміни, нуклеотиди, ейкозаноїди, амінокислоти, іони кальцію тощо. Крім того, є рецептори, активація яких здійснюється протеазами, які відрізають екстраклітинну ділянку рецепторної молекули. Трансдукція сигналу від рецептора на G-білок здійснюється у процесі рецепції, внаслідок якої змінюється конформація рецепторної молекули. Активованій G-білок дисоціює на  $\alpha$ -субодиницю і  $\beta\gamma$ -димер, які взаємодіють з подальшими сигнальними білками (див. розділ 3.1.1 «Гетеротримерні G-білки»).

## G-білки GPCR-типу (GTG)

Секвенування геному *Arabidopsis* дозволило постулювати існування GPCR у рослин. Однак застосування жорстких критеріїв ідентифікації не дозволило підтвердити наявність семи трансмембранних доменів у продуктів генів, що кодують гіпотетичні GPCR, а також їх мембранну локалізацію та здатність взаємодіяти з  $\alpha$ -субодиницею гетеротримерного G-білка. Таким чином, досі не відомо, чи існують у рослин типові GPCR тваринного типу. Не виключено, що у рослин подібні мембранні рецептори мають особливу «рослинну» структуру та спосіб функціонування. Прикладом таких особливих рецепторів є білки GTG, які є гіпотетичними рецепторами АБК.

У рослин *Arabidopsis* було виявлено два білки (GTG1 і GTG2), що мають істотну гомологію з одним із GPCR людини та ма-

ють рецептор-подібну топологію. На відміну від GPCR, у структурі білків GTG присутні:

- 1) дев'ять трансмембранних доменів;
- 2) АТФ/ГТФ-зв'язуючий домен;
- 3) домен, що відповідає за посилення ГТФазної активності.

Очищені GTG1 і GTG2 зв'язують ГТФ і виявляють ГТФазну активність. Оскільки ці білки гідролізують ГТФ і мають схожість до GPCR, їх назвали **G-білками GPCR-типу** (GPCR-Type G Protein — GTG).

Крім структурних особливостей, GTG мають властивості, які істотно відрізняють їх від відомих G-білок-сполучених рецепторів тварин.

Наявність ГДФ або ГТФ у гуаніннуклеотид-зв'язувальному домені (ГДФ- і ГТФ-зв'язана конформація) визначає спорідненість GTG до АБК. ГДФ-зв'язана форма GTG зв'язує АБК та ініціює передачу сигналу АБК, а ГТФ-зв'язана форма GTG втрачає спорідненість до гормону.

Вважається, що перехід між двома основними конформаціями забезпечує механізм регуляції поширення сигналу АБК. Слід зазначити, що цикл активації GTG відрізняється від циклів активації гетеротримерних і мономерних G-білків. Усі відомі G-білки активують сигнальну систему в ГТФ-зв'язаній формі, тоді як GTG у цій формі перебуває в неактивному стані.

## 2.2.4. Рецептори-каналоформери

Зміна напрямку та інтенсивності транспорту іонів сприяє осциляціям їхньої внутрішньоклітинної концентрації. Цей феномен використовується в механізмах трансдукції сигналу. Іонні канали можуть бути як проміжними компонентами сигнального ланцюга, так і рецепторами, що сприймають екстраклітинні сигнали. Рецептори, які одночасно є іонними каналами, називають **рецепторами-каналоформерами**. Такий тип рецепторів називають також іонотропними.

Прикладом рецептора цього класу є ацетілхоліновий рецептор нікотинового типу у тварин (назва зумовлена спорідненістю рецептора до нікотину). На відміну від мускаринового ацетилхолінового рецептора, що належить до GPCR, нікотиновий

рецептор формує неспецифічний іонний канал, який проводить іони  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ .

Ацетилхолінові нікотинові рецептори складаються з різних комбінацій п'яти типів субодиниць ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), причому до структури будь-якого ацетилхолінового рецептора входять дві  $\alpha$ -субодиниці, на яких містяться ділянки зв'язування ацетилхоліну (рис. 15).

Поліпептидні ланцюги всіх субодиниць чотири рази пронизують плазмалему. N- і C-кінцеві домени містяться зовні клітини та глікозовані. Цитоплазматичні ділянки рецепторної молекули взаємодіють з компонентами цитоскелету — тубуліновими та актиновими білками.

Ацетилхолінові рецептори-каналоформери, розташовуються на постсинаптичних ділянках мембран збудливих клітин (нервових, м'язових, секреторних) і беруть участь у перетворенні сигналу. Молекули нейротрансмітера ацетилхоліну вивільняються крізь пресинаптичні мембрани нервових закінчень шляхом екзоцитозу, дифундують через синаптичну щілину та зв'язуються з двома  $\alpha$ -субодиницями ацетилхолінових рецепторів.

Зв'язування нейротрансмітера з холинергічним рецептором спричиняє конформаційні зміни в олігомерному комплексі, які приводять до формування іонного каналу. Це дозволяє іонам  $\text{Na}^+$  входити у клітину, що спричиняє локальну деполяризацію мембрани та стимулює специфічну відповідь. У нейром'язовій системі, наприклад, дія ацетилхоліну на холинергічні рецептори спричиняє скорочення мускулатури.

У рослин подібні рецептори-каналоформери не виявлені. Рослинні іонні канали, активність яких регулюється лігандами,

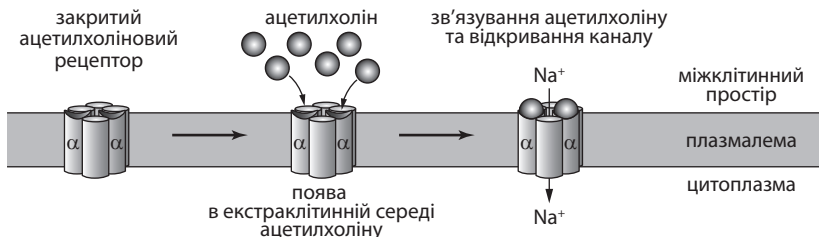


Рис. 15. Ацетилхоліновий рецептор-каналоформер



зв'язують вторинні месенджери. Наприклад, це родина іонних каналів CNGC (cyclic nucleotide-gated channels), що відкриваються циклічними нуклеотидами cAMP і cGMP (див. розділ «cAMP-регульовані білки рослин»), і рецептори фосфорильованих форм інозитулу (див. розділ «Індуковане надходження кальцію в цитоплазму»).

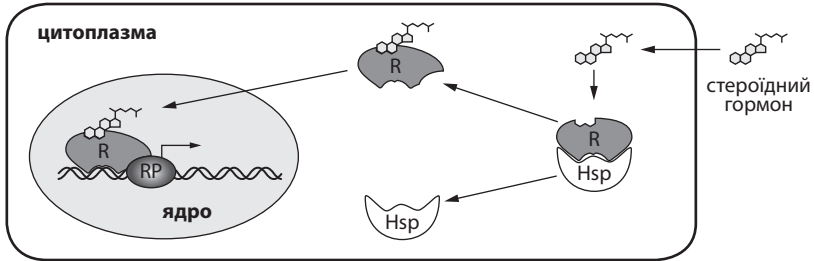
### 2.2.5. Внутрішньоклітинні рецептори

Внутрішньоклітинні рецептори рослин представлені різноманітними групами. Вони мають різну локалізацію, структуру та функції. Серед них є класичні рецептори та рецептори, що мають подвійну функцію, які, крім рецепції зовнішньоклітинних лігандів, виконують інші специфічні функції. Для більшості внутрішньоклітинних рецепторів рослин характерна їхня «рослинна» специфічність. Зазвичай, внутрішньоклітинні рецептори, які виявлені у рослин, є нетиповими для тварин, і навпаки, типові для тварини внутрішньоклітинні рецептори не знайдені у рослин.

#### Ядерні рецептори тварин

Найбільш характерною групою внутрішньоклітинних рецепторів тварин є **ядерні рецептори**. Вони є транскрипційними факторами, які активуються ліпофільними лігандами — стероїдними, ретиноїдними та тироїдними гормонами. Ці рецептори поділяються на чотири класи.

**Рецептори класу I** переважно зв'язують ліганд у цитоплазмі. Багато рецепторів цього класу за відсутності відповідного ліганду утворюють неактивні комплекси з шаперонами, які екранують домен ядерної локалізації та ділянки взаємодії з ДНК та/або іншими коактиваторами транскрипції. Різні види стероїдних рецепторів специфічно зв'язуються з шаперонами певного типу. Наприклад, у тварин рецептори стероїдних гормонів GR, MR, PR та AR взаємодіють з білком теплового шоку Hsp90. При взаємодії з гормональним лігандом комплекс рецептор-шаперон дисоціює, а рецептор дифундує у ядро, де виконує роль транскрипційного регулятора (рис. 16).



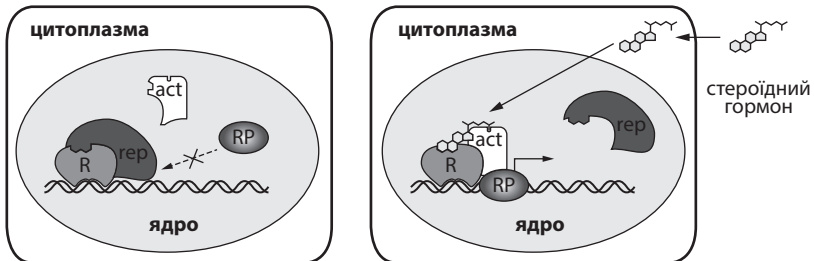
**Рис. 16.** Ядерні рецептори тварин класу I.

Умовні позначення:

R — рецептор; Hsp — шаперон (білок теплового шоку);

RP — РНК-полімераза

**Рецептори класу II** локалізуються у ядрі та за відсутності ліганду зв'язані з корепресором, беручи участь в інгібуванні транскрипції. Зв'язування з лігандом приводить до заміни корепресорів на коактиватори, у результаті чого індукується транскрипція ліганд-активованих генів (рис. 17).



**Рис. 17.** Ядерні рецептори тварин класу II.

Умовні позначення:

R — рецептор;

act — коактиватор;

RP — РНК-полімераза;

rep — корепресор

**Рецептори класів III та IV** нечисленні, і механізм їх роботи ще недостатньо зрозумілий.

Активність багатьох ядерних рецепторів контролюється також різними регуляторними білками. Ці рецептори можуть перебувати в різних станах, які характеризуються певною здатністю рецептора зв'язувати ліганд та ініціювати транскрипцію.

## Внутрішньоклітинні рецептори рослин

У рослинних клітинах не присутні ядерні рецептори, характерні для тварин. Цей факт для багатьох дослідників був дещо дивним, оскільки рослинні регулятори АБК і брасиностероїди близькі за структурою, відповідно, ретиноїдних та стероїдних гормонів тварин. Проте, у рослин механізм сприйняття ліпофільних молекул внутрішньоклітинними рецепторами зовсім інший, ніж у тварин.

Відомі в даний час внутрішньоклітинні рецептори рослин можна поділити на три групи. Не виключено, що будуть виявлені рецептори, що мають структурно-функціональні особливості принципово відмінні від відомих рецепторів. Номенклатура внутрішньоклітинних рецепторів рослин є далеко не досконалою. На сьогодні прийнято називати групи за родинами білків, до яких вони належать:

- 1) F-box рецептори;
- 2) гормон-чутливі ліпази;
- 3) START-домен рецептори.

### F-box рецептори

F-box рецептори є частиною убіквітинуючої протеїнової лігази (див. розділ «Убіквітин-опосередкована деградація білків»). Відомо, що F-box субодиниці SCF-подібних лигаз виконують функцію зв'язування субстрату — білків-мішеней, які призначені для убіквітинування та подальшої деградації. Специфічне впізнавання та зв'язування білків-мішеней із F-box білками контролюється різними механізмами. Одним із таких механізмів є гормональна модуляція афінності F-box білка до мішені (рис. 18).

На поверхні F-box рецепторів знаходиться лейцин-збагачена ділянка (LRR-мотив), яка формує специфічну гідрофобну кишеню із високою афінністю до гормону певного типу. Зв'язування гормону з F-box білком приводить до утворення зв'язувальної поверхні, необхідної для специфічного впізнавання білків-мішеней. У цьому випадку кажуть, що гормон виконує роль «молекулярного клею», який забезпечує гідрофобні взаємодії між F-box рецептором і мішенню. В результаті білки-мі-

шені убіквітинуються та руйнуються 26S протеасомним комплексом. Зазвичай, даний механізм пов'язаний з дерепресорним регуляторним механізмом, який забезпечує у відповідь на стимул (гормон) видалення певної групи репресорів.

F-box рецептори були виявлені для двох рослинних гормонів: індоліл-3-оцтової кислоти та ізолейцин-жасмонату (JA-Пе).

У рослин арабидопсиса виявлено 6 F-box рецепторів ауксину: **TIR1** (transport inhibitor response 1) і **AFB1–5** (auxin signaling F-box). Білок TIR1 був ідентифікований у мутантів, стійких до інгібіторів полярного транспорту ауксину, в середині 1990-х і описаний як білок, який бере участь у транспорті ІОК. Мутація *tir1* є досить слабкою, тому розглядалася можливість існування генів з функціями, що перекриваються. Дійсно, TIR1 є одним із шести близькоспоріднених F-box білків. У рослин, що мають порушення відразу в чотирьох генах *tir1 afb1 afb2 afb3*, значною мірою знижена чутливість до ауксину.

Подальші дослідження показали, що TIR1 має відношення до сприйняття клітиною ауксину. Цей білок містить F-box домен і є компонентом убіквітинуючої протеїнової лігази. Мішенями TIR1 є білки з родини негативних транскрипційних ре-

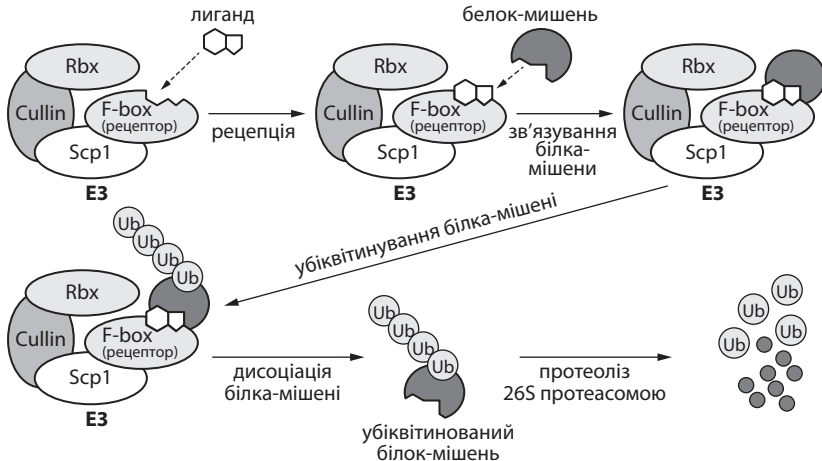


Рис. 18. Дерепресійний механізм за участю F-бокс рецептора

гуляторів Аух/ІАА, які репресують гени ауксинової відповіді. Активувати експресію ауксин-чутливих генів можливо, якщо видалити певні види Аух/ІАА. Під дією ауксину у TIR1 значно підвищується спорідненість до білків Аух/ІАА, внаслідок чого вони зв'язуються з лігазою ЕЗ, убіквітинуються, а потім руйнуються 26S протеасомою.

Сприйняття жасмонатів рослинними клітинами має подібний механізм. Активна форма жасмонату — ізолейцин-жасмонат (JA-Пе) — специфічно взаємодіє з білком COI1 (coronatine insensitive 1), який є F-box білком. Зв'язування ізолейцин-жасмонату з особливою гідрофобною ділянкою COI1 приводить до формування поверхні, необхідної для специфічного зв'язування білків родини JAZ (JASMONATE ZIM-domain). JAZ-білки, що є негативними регуляторами жасмонат-залежних реакцій, у відповідь на вплив JA-Пе убіквітинуються та деградують. Якщо порівняти систему сприйняття ауксину та жасмонату, то слід зазначити, що F-box рецептор COI1 є функціональним аналогом TIR1, а репресори JAZ-білки — аналогами Аух/ІАА.

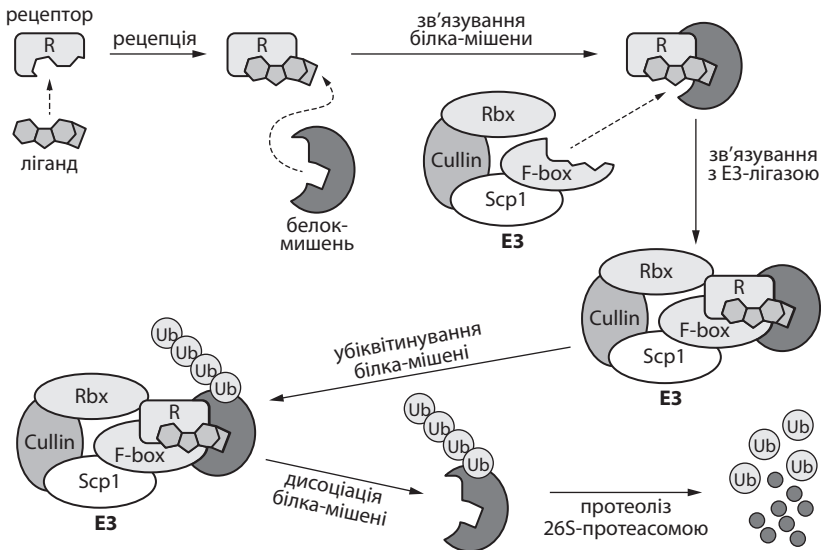
## Гормон-чутливі ліпази

У системі регуляції гібереліну був виявлений розчинний гіберелін-зв'язуючий білок GID1 (GA insensitive dwarf 1), який ідентифікували як рецептор гібереліну. Молекула GID1 має в структурі консервативний ліпазний каталітичний домен. За цією ознакою даний рецептор був віднесений до родини гормон-чутливих ліпаз.

Однак у каталітичному домені з трьох істотних для ліпазної активності амінокислотних залишків присутні тільки два. З цієї причини GID1 не виявляє каталітичної активності. Разом з тим, нефункціональний каталітичний домен формує гіберелін-зв'язуючу ділянку (кор), що має високу афінність до активних форм гібереліну, з істотною перевагою GA<sub>1</sub> та GA<sub>4</sub>. Аміно-термінальний домен GID1 утворює над ділянкою зв'язування гібереліну кришкоподібну структуру, яка також взаємодіє з молекулою гормону. Гіберелін полярним боком молекули взаємодіє із кором, а гідрофобний бік — з ліпофільною N-термінальною ділянкою, яка наче «кришка» прикриває молекулу гібереліну.

Гіберелін опиняється у гормон-зв'язуючому корі, як у кишні. Зв'язування гібереліну приводить до зміни конформації рецептора та стабілізації його структури. Поверхня молекули GID1 в області «кришки» робиться пристосованою для зв'язування білків, що мають DELLA-домен. До DELLA-білків належать репресори гіберелінового сигналу. Утворення комплексу GID1(GA)–DELLA приводить до суттєвих конформаційних змін у карбокситермінальній частині DELLA-білка, в результаті чого вони набувають здатності специфічно взаємодіяти із F-box субодиницею SCF-подібної убіквітинуючої лігازی (рис. 19). Далі DELLA-білок убіквітується та піддається протеолізу.

Гібереліновий сигнал, отже, теж задіє спрямований протеоліз білків, однак рецептор GID1, на відміну від F-box рецепторів, не є частиною убіквітинуючої лігازی, а бере участь у підготовці білків-мішеней (DELLA-білків) до зв'язування з F-box субодиницею лігازی.



**Рис. 19.** Дерепресійний механізм за участю рецептора з родини гормон-чутливих ліпаз

## START-домен рецептори

Рецептори цієї групи були виявлені при вивченні АБК-сигналу. Використовуючи штучний функціональний аналог АБК пірабактин, вдалося виявити пірабактин-стійкий мутант *Arabidopsis pyr1* (**pyrabactin resistance 1**). Виявилось, що локус **PYR1** кодує високоафінний до АБК білок **PYR1**, який був ідентифікований як рецептор АБК. Пізніше було показано наявність інших **PYR1**-подібних білків з подібною функцією та структурою (**PYR1-LIKE** — **PYL**). Інша дослідницька група виявила білок, що безпосередньо взаємодіє із продуктом гена **ABI2** — протеїновою фосфатазою **2C** (**PP2C**), яка давно була відома як негативний регулятор АБК-сигналу. Цей білок отримав назву **регуляторний компонент АБК-сигналу 1** — **RCAR1** (**REGULATORY COMPONENT OF ABA RESPONSE 1**). Білок **RCAR1**, як було з'ясовано згодом, відповідає білку **PYR9** за іншою номенклатурою. Одночасна поява повідомлень про сигнальні білки **PYR1/PYL** і **RCAR** привела до виникнення двох номенклатур для однієї групи білків. З цієї причини рецептори АБК цієї групи позначають **PYR/PYL/RCAR**. Білки **PYR/PYL/RCAR** відносять до великого суперродина **START**-білків, що мають у своїй структурі особливий домен **START** (**steroidogenic acute regulatory related lipid transfer**).

**START**-домен формує АБК-зв'язуючу кишеню, яка фланкується двома петлями, які називають ворота та замок. Зв'язування АБК з рецептором приводить до закривання петель, і молекула АБК опиняється замкненою всередині кишені. Це провокує зміну конформації, внаслідок чого рецептор набуває здатності виступати в якості конкурентного інгібітора фосфатази **2C**. Він зв'язується з реакційним центром ферменту та інгібує його активність.

Рецептори АБК у відсутності гормону містяться у клітині переважно у вигляді гомодимера (рис. 20). Мішень рецептора — протеїнова фосфатаза **2C** — знаходиться в активному стані та інгібує протеїнкіназу **SnRK2**. Ця **SNF1**-подібна кіназа є позитивним регулятором АБК-регульованих генів. Зв'язування рецептора з АБК приводить до зміни його конформації, в результаті чого гомодимери дисоціюють, а кожен рецептор

набуває здатності взаємодіяти з реакційним центром РР2С, конкурентно пригнічуючи його активність. Репресія фосфатази 2С приводить до активації протеїнкінази SnRK2, яка фосфорилює групу транскрипційних факторів — активаторів АБК-регульованих генів.

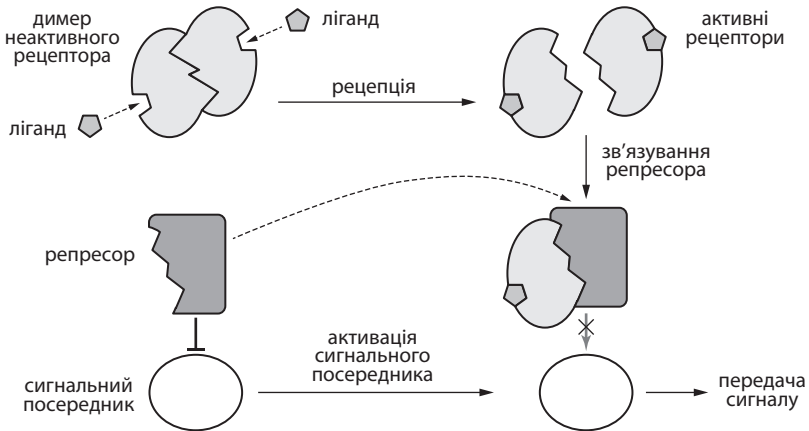


Рис. 20. Механізм активації START-домен рецептора

## 2.3. СВІТЛОВІ РЕЦЕПТОРИ

Світло, як джерело тепла й енергії, має істотне значення для живих істот і, головним чином, для фотосинтезуючих організмів, у тому числі для рослин. Дія сонячного світла на поверхню Землі не є постійною: інтенсивність інсоляції протягом світлового дня може змінюватися залежно від погодних умов; від положення сонця щодо рівня горизонту (іншими словами, від часу доби) залежить спектральний склад сонячних променів. Крім того, світлові періоди чергуються з темновими, причому на більшій частині земної поверхні співвідношення тривалості цих періодів змінюється протягом року. Це зумовило еволюційний розвиток у більшості наземних організмів сенсорних світлозалежних систем, через які здійснюється тонка настройка фізіологічної активності, а також процесів росту та розвитку.



Світлорегульовані механізми рослин переважно залежать від двох діапазонів світлових хвиль, які відповідають синьому та червоному спектрам. Нині у рослин виявлено три родини фоторецепторів. **Фітохроми** поглинають червоне світло, **фототропіни** — синє, а спектр поглинання **криптохромів** охоплює синє і довгохвильову область ультрафіолету (UV-A). Також розглядається можливість існування рецепторів ультрафіолету діапазону В (UV-B).

Всі фоторецептори рослин є білками, які мають **хромофор** — простетичну світлопоглинальну частину. Хромофор утримується поліпептидною частиною рецептора слабкими або ковалентними зв'язками. Основний принцип функціонування фоторецепторів полягає в тому, що у процесі поглинання променів певного спектру хромофором стимулює молекулярний механізм, який приводить до значних змін конформації рецептора. Це відбивається на активності фоторецепторів, тобто на їх здатності взаємодіяти із сигнальними партнерами та стимулювати внутрішньоклітинний сигнальний механізм.

**Таблиця 1.** Основні характеристики рослинних фоторецепторів

Група	Діапазони	Хромофор
Рецептори UV-B	UV-B	невідомо
Фототропіни	синій, max 450 нм	FMN
Криптохроми	UV-A/синій	FAD
Фітохроми	червоний, дальній червоний	фітохромобілін

### 2.3.1. UV-B рецептори

Існує багато непрямих доказів функціонування у рослин механізмів, які регулюються UV-B діапазоном, дію якого пов'язують із пригніченням подовження гіпокотила та транскрипції ряду генів. Наразі UV-B рецептори не ідентифіковані, однак

показано, що специфічні відповіді на UV-B не опосередковуються відомими світловими рецепторами. Крім того, виявлено кілька сигнальних компонентів, залучених у відповідь на дію UV-B. Серед них ULI3 і HY5. Конкретна функція ULI3 не відома. Імовірно, цей білок містить гем, має сайт зв'язування з діацилгліцеролом і локалізується в цитоплазмі та плазмалемі. HY5 — це bZIP транскрипційний фактор.

### 2.3.2. Фототропіни

#### Відкриття та функції

Перший фототропін було ідентифіковано у 1997 році. У результаті скринінгу мутацій у рослин *Arabidopsis* був виявлений мутант *nph1* (non phototropic hypocotyl), у якого гіпокотиль не виявляв фототропічної реакції. Дослідження продукту гена *NPH1* у рослин дикого типу показали, що білок *NPH1* асоційований з плазматичною мембраною та стійко автофосфорилується у відповідь на опромінення синім світлом. Було зроблено припущення, що *NPH1* бере участь у рецепції синього світла й опосередкує каскадний механізм, який приводить до розвитку фототропічної реакції. Найбільша чутливість рослин спостерігається при опроміненні синім світлом з максимумом близько 450 нм. Після того, як функції *NPH1* були точно встановлені, цей білок був перейменований на фототропін 1 — **phot1**. Пізніше у рослин *Arabidopsis* був виділений другий фототропін **phot2**. Обидва рецептори є вкрай важливими для регуляції трьох основних функцій, які спрямовані на оптимізацію процесу фотосинтезу:

- 1) фототропізм;
- 2) рух хлоропластів;
- 3) відкривання продихів.

Два фототропіни *Arabidopsis* спеціалізовані на різних інтенсивностях світлового випромінювання: **phot1** важливий для сприйняття світла низької інтенсивності, а **phot2** — високої. Функції, які регулюються двома фототропінами, частково перекриваються. Ряд функцій стимулюється тільки одним з фототропінів, а деякі — обома, причому **phot1**- і **phot2**-залежні

реакції можуть мати протилежну спрямованість. Відмінності світлозалежних реакцій, регульованих двома фототропінами, безпосередньо пов'язані з інтенсивністю світла, що сприймається. Обидва рецептори регулюють **фототропізм** у відповідь на латеральну дію синього світла високої інтенсивності, а при низькій інтенсивності світла фототропічна реакція опосередковується тільки phot1. У першому випадку розвивається негативний фототропізм (уникнення світла), у другому — позитивний. **Відкривання продихів** контролюється обома фототропінами рівною мірою при різних інтенсивностях світла.

Регуляція **руху хлоропластів** фототропінами здійснюється різноспрямовано. За низької інтенсивності світла, за якої активується phot1, хлоропласти розташовуються на освітленому боці клітин. У такому положенні хлоропласти найменшою мірою затіняють один одного, і тому поглинання світлової енергії стає максимальним. При високому ступені сонячної іррадіації активується phot2, через який розвивається реакція уникнення світла — хлоропласти релокалізуються до боків клітин, що розташовані вздовж напрямку світлових променів. Це сприяє мінімізації поглинання світлової енергії і зниженню фотоушкодження хлоропластів.

До унікальних властивостей phot1 належать **гальмування росту розтягуванням гіпокотила** етіолованих проростків при дії світла будь-якої інтенсивності та участь у **дестабілізації специфічних ядерних і хлоропластних транскриптів** у відповідь на високий ступінь іррадіації синього світла.

## Структура

Фототропіни належать до підродини ACG-VIIIb родини кіназ ACG, яка обіймає сАМР-залежні кінази, сGMP-залежні кінази G і фосфоліпід-залежні кінази. У молекулі фототропінів виділяють амінотермінальний фотосенсорний і карбокситермінальний серин-треоніновий кіназний домен (рис. 21). До складу фотосенсорної частини фототропінів входять два схожі LOV (Light, Oxygen, Voltage) домени — LOV1 і LOV2. Домени родини LOV активуються зовнішніми впливами, такими як світло, кисень і напруга (звідси аббревіатура), і виявляються у багатьох

регуляторних білків, що виконують рецепторні функції. LOV1 і LOV2 зв'язують FMN (флавінмононуклеотид) і функціонують як сенсори синього світла. Незважаючи на значну схожість, домени LOV1 і LOV2 виконують різні функції. Для регуляції біологічної активності фототропіну принципово важливим є домен LOV2. Саме він служить світловим перемикачем, який контролює активність С-термінального домену. Значення LOV1-домену остаточно не з'ясовано, але передбачається, що він бере участь у димеризації фототропінів і сприяє підтримці функціонально активної структури фоторецептора.

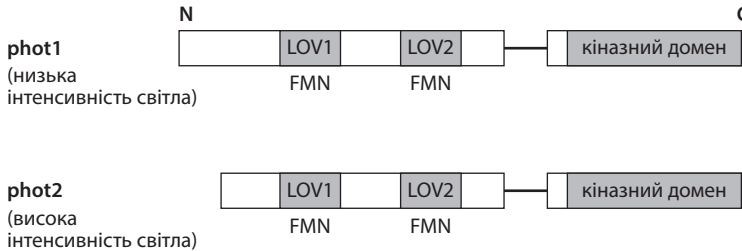


Рис. 21. Структура фототропінів (за Chen et al., 2004)

У темряві LOV-домени нековалентно зв'язують FMN. При цьому хромофори міцно утримуються у структурі LOV-домінів за рахунок водневих зв'язків і ван-дер-ваальсових взаємодій, які утворюються з одинадцятьма консервативними амінокислотними залишками. У цьому стані кіназний домен асоційований з фотосенсорним, тобто молекула фототропіну знаходиться у складеному стані, і кіназний домен не може виявляти свої властивості, оскільки не має доступу до субстрату. Таку конформацію називають закритою. У неактивному стані молекули фототропіну зв'язані з плазматичною мембраною.

## Світлова активація

Відокремлений від рецептора LOV-домен у темряві має максимум поглинання 447 нм ( $LOV_{447}$ ). Опромінення синім світлом стимулює фотохімічну реакцію, в результаті якої збуджена хромофорна група утворює ковалентний зв'язок з консервативним

залишком цистеїну. Утворюється  $LOV_{390}$  з максимумом поглинання 390 нм. Фотоконверсія здійснюється протягом кількох мікросекунд. Передбачається, що початковий збуджений синглетний стан хромофора короткочасно перетворюється у триплетну форму  $LOV_{660}$  із максимумом поглинання в червондму діапазоні ( $LOV_{447} \rightarrow LOV_{660} \rightarrow LOV_{390}$ ). Зворотний перехід у неактивний стан ( $LOV_{390} \rightarrow LOV_{447}$ ) відбувається спонтанно в темряві протягом від декількох десятків до декількох сотень секунд. Реверсія у вихідний неактивний стан може стимулюватися при опроміненні  $LOV_{390}$  ультрафіолетом. Чи має цей процес UV-стимульованої конверсії біологічне значення, зараз невідомо.

В інтактних молекулах фототропіну поглинання синього світла також приводить до первісного збудженого стану та короткочасного утворення ковалентного зв'язку між FMN та інваріантним залишком цистеїну LOV-домени. Ці події провокують істотні структурні перебудови фототропіну: молекула розкривається — кіназний та фотосенсорних домени дисоціюють, що дозволяє рецептору виконувати кіназні функції (рис. 22). Одночасно з цим фототропін втрачає зв'язок з мембраною та вивільняється у цитоплазму. Повернення фототропіну в неактивний стан є відносно повільним процесом. Тобто, активний стан є досить стабільним і має тривалий час існування.

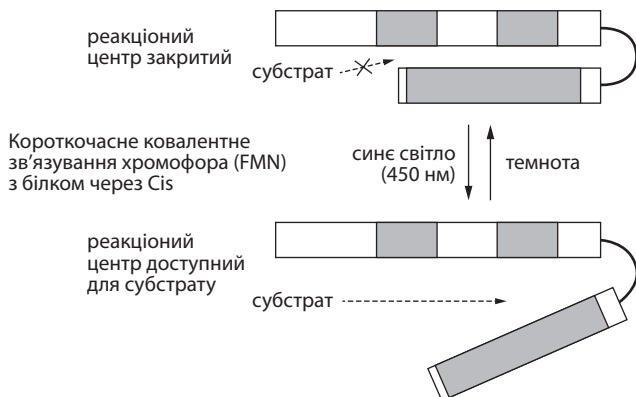


Рис. 22. Механізм активації фототропіну (за Chen et al., 2004)

В обох фототропінах LOV2-домени більш ефективно піддаються світлозалежній конверсії, порівняно з LOV1.

**Фосфорилування.** Подібно до ліганд-зв'язуючих рецепторних кіназ, фототропіни інтермолекулярно автофосфорилуються. Активація фототропінів стимулює утворення гомодимерів, у складі яких рецептори попарно фосфорилують один одного за специфічними залишками серину. Фототропіни мають багато сайтів фосфорилування, і лише частина їх використовується для трансдукції світлового сигналу. Інші сайти необхідні для регуляції активності та чутливості рецептора до світла.

Виявлено вісім серинових залишків в амінотермінальній частині фототропіну phot1, які є сайтами фосфорилування. Два з них знаходяться біля LOV1-домену з боку N-кінця (серин-27, серин-30), а решта — між доменами LOV1 і LOV2 (серин-274, серин-300, серин-317, серин-325, серин-332, серин-349). Автофосфорилування фототропінів за конкретними сайтами відбувається залежно від інтенсивності освітлення. Наприклад, серини у положеннях 27, 30, 274 і 300 фосфорилуються за низької інтенсивності синього світла, тоді як інші чотири — за середньої і високої інтенсивності. Диференційне фосфорилування пов'язано з особливостями регуляції фототропінів і фототропін-залежних відповідей. Так, фосфорилування phot1 в умовах слабкої та середньої освітленості сприяє формуванню поверхні молекули, яка необхідна для взаємодії з даунстрим партнерами. Фосфорилування, стимульоване синім світлом високої інтенсивності, навпаки, перериває можливість передачі сигналу від гіперфосфорильованої форми phot1. Це досить важливо для регуляції тих процесів, в яких phot1 і phot2 виступають антагоністами, наприклад рух хлоропластів в умовах різної освітленості. Крім того, особливості фосфорилування фоторецепторів можуть визначати специфічний набір сигнальних білків, з якими будуть взаємодіяти фототропіни.

**Локалізація.** Фототропіни phot1 і phot2 є гідрофільними білками, проте в неактивному стані вони пов'язані з плазматичною мембраною через плазмалемні білки. Під дією синього світла локалізація фототропінів швидко змінюється: phot1 вивільняється у цитоплазму, а phot2 перерозподіляється до апарату Гольджі. Функціональна значимість цього процесу ще не

з'ясована. Однак відомо, що для локалізації phot2 на мембранах апарата Гольджі істотну важливість має кіназна активність.

**Передача сигналу.** Світлозалежне фосфорилування є необхідним для формування поверхні зв'язування, через яку фототропіни взаємодіють із сигнальними посередниками. Активний фототропін здатен зв'язуватися з різними регуляторними компонентами, через які здійснюється регуляція конкретних фототропін-залежних реакцій. Каталітична (кіназна) активність фототропінів забезпечує не тільки трансмолекулярне автофосфорилування, але може бути спрямована також на молекули сигнальних партнерів. Наприклад, у реакції відкриття продохів здійснюється фосфорилування плазмалемної  $H^+$ -АТФази фототропінами. Взаємодія фоторецепторів з протонними помпами значною мірою полегшується регуляторними 14-3-3-білками.

### 2.3.3. Криптохроми

#### Функції

Криптохроми спочатку були виявлені у *Arabidopsis*, але згодом були знайдені в інших рослин, а також у тварин і бактерій. Криптохроми є широко поширеними фоторецепторами в природі. У представників різних таксономічних груп, еволюційно віддалених один від одного, криптохроми виконують подібні функції. Найбільш універсальною функцією цих рецепторів є регуляція циркадних ритмів. Цей механізм має дуже давнє походження та в загальних рисах подібний у різних царств до світу живої природи.

Крім контролю циркадних осциляцій, криптохроми виконують також функції, характерні тільки для рослин. Вони опосередковують процеси деетиоляції та беруть участь у регуляції фотоперіодично залежних флоральних механізмів. Багато процесів регулюються криптохромами разом з фітохромами.

У рослинах *Arabidopsis* виявлено три криптохроми (cryptochrome — cry1, cry2 і cry3). Два з них (cry1 і cry2) мають високий ступінь гомології і виконують подібні функції, однак cry1 відповідає за сприйняття синього світла високої інтенсивності, а cry2 — низької. Функції цих рецепторів частково

перекриваються в регуляції деетиоляції. Істотне ремодулювання експресії великої групи генів при виході проростків на світло контролюється переважно криптохромами *cry1* і *cry2* зі значно меншим внеском фітохрому А. Важливим регуляторним моментом в уповільненні зростання гіпокотила при деетиоляції є зниження рівня гіберелінів й ауксинів, а також зниження чутливості тканин до цих гормонів.

У регуляції цвітіння *cry2* має набагато більше значення, ніж *cry1*. Було показано, що криптохром безпосередньо залучається до світлозалежної стабілізації транскрипційного активатора флоральних генів *CO* (*CONSTANCE*).

Криптохром *cry3* значно відрізняється за структурою від *cry1* і *cry2*. Функції його досі не з'ясовані.

## Структура та механізм активації

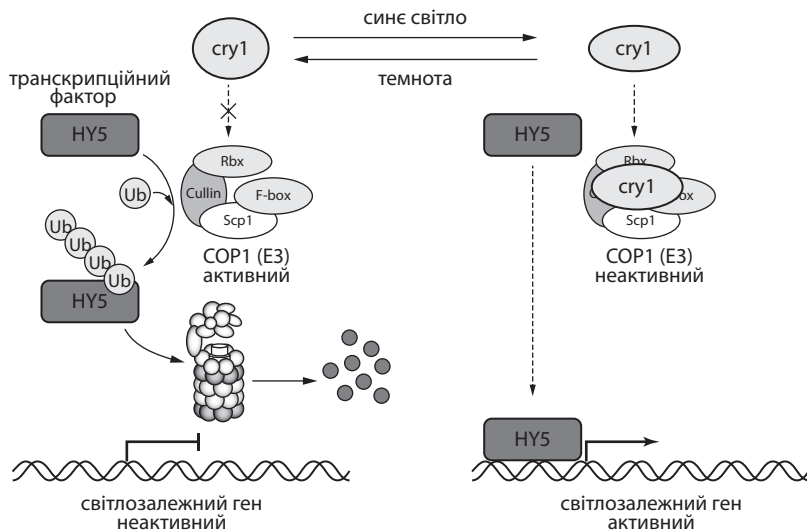
**Структура.** За особливостями молекулярної будови та ряду властивостей криптохром дуже близькі до ДНК-фотоліаз, але не виявляють ДНК-фотоліазної активності. ДНК-фотоліази — це ферменти, які беруть участь у відновленні ДНК, пошкодженої UV-B випромінюванням. Криптохром та ДНК-фотоліази поглинають синє світло й ультрафіолет діапазону UV-A. Крім уловлювання світла, криптохром мають властивості серин/треонінових кіназ, які здатні до автофосфорилування.

Амінотермінальна частина молекули криптохромів *cry1* і *cry2*, фотоліаза-гомологічний район — **PHR** (**photolyase homology region**) — пов'язує нековалентно **FAD**, який виконує функції основного світловловлюючого хромофора, а також **птерин** (або **деазафлавін**) — вторинний світлозбиральний хромофор. Завдяки наявності двох хромофорних груп діапазон поглинання криптохромів охоплює області синього і UV-A світла. Карбокситермінальна частина криптохромів *cry1* і *cry2* більшою мірою варіабельна, ніж PHR-домен, і містить DAS-мотиви. Основу молекули криптохрома *cry3* також становить PHR-домен, проте *cry3* не має карбокситермінального розширення, характерного для *cry1* і *cry2*, а з N-сторони молекули знаходиться короткий сигнальний пептид (**TP** — **transient peptide**), що вказує на хлоропластну і мітохондріальну локалізацію рецептора.



**Механізм активації.** На основі ДНК-фотоліазної реакції був запропонований механізм активації криптохрому, який загалом був підтверджений. У результаті поглинання світла хромофорними групами молекула FAD переходить у збуджений стан — знижується її окислювально-відновний потенціал (FAD безпосередньо поглинає квант світла або приймає енергію від збудженого птерину). У результаті зниження ОВП FAD втрачає електрон, який переноситься на білкову частину фоторецептора через залишок триптофану на тирозин. Ця подія супроводжується зміщенням електронної щільності, що спричиняє конформаційні зміни молекули криптохрому. Зміна конформації сприяє стимуляції кіназної активності, яка приводить до автофосфорилування багатьох сайтів криптохрому. Фосфорильований криптохром інгібує активність убіквітинуючої протеїнової лігази COP1 (рис. 23).

Слід зауважити, що регуляторні механізми криптохромів та фітохромів частково перекриваються. Убіквітинуюча лігаза COP1 є мішенню обох груп фоторецепторів, тому багато



**Рис. 23.** Участь криптохромів у механізмі активації світлорегульованих генів

світлозалежних генів знаходяться під спільним контролем рецепторів червоного та синього світла. Світлозалежна деградація білків лежить в основі регуляторних механізмів, контрольованих криптохромами та фітохромами.

У темряві лігаза COP1 убіквітинуює транскрипційні активатори світлорегульованих генів. Багато з цих генів беруть участь у процесах деетиоляції, наприклад bZIP-білок HY5 і його гомолог НУН (HY5 Homologue). До позитивних регуляторів світлового сигналу, які руйнуються в темряві убіквітин-залежним способом, належить також bHLH-білок HFR1 (long Hypocotyl in Far-Red 1). В умовах освітлення внаслідок світлозалежного фосфорилування криптохрома активність COP1 репресується, а експресія світлорегульованих генів, навпаки, стимулюється.

### 2.3.4. Фітохроми

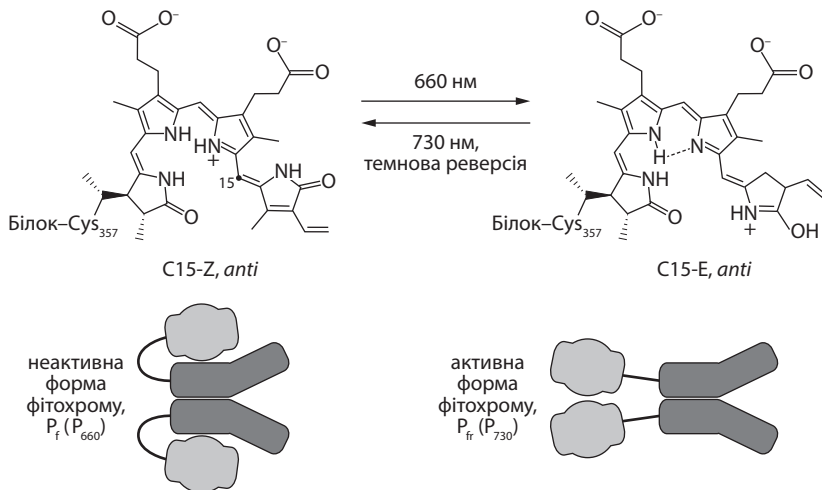
#### Різноманітність і значення фітохромів

Фітохроми є рецепторами червоного/далекого червоного світла. Це димерні білки, що складаються, зазвичай, з двох ідентичних апопротеїнів. Кожен з мономерів ковалентно зв'язаний з фітохромобіліном — лінійним тетрапірролом, який виконує функції хромофора. Синтетичним попередником фітохромобіліна є гем (замкнений тетрапіррол), кільце якого розмикається при вбудовуванні хромофора в апопротеїн рецептора. При абсорбції червоного (660 нм) і далекого червоного (730 нм) світла хромофор піддається оборотній фотоізомеризації, за якої кільце D розгортається на 180° щодо подвійного зв'язку у C-15 (рис. 24). Вихідна форма фітохрому містить хромофор у C15-Z,*anti* конформації, яка здатна поглинати червоне світло. Така форма фітохрому вважається фізіологічно неактивною. Під дією кванта червоного світла хромофор переходить у C15-E,*anti* конформацію. Дана фотоконверсія приводить до утворення активної форми фітохрому, яка здатна поглинати дальнє червоне світло, під дією якого хромофор знову набуває C15-Z,*anti* конформації, а фітохром, відповідно, переходить у неактивну форму. Фітохроми позначають буквою Р (від англ. phytochrome), а в нижньому індексі вказують спектр погли-

нання в цифровому або буквенному вигляді. Неактивну форму фітохрому позначають  $P_r$  або  $P_{660}$ , тому що вона поглинає червоний (red) світло з максимумом 660 нм, а активну —  $P_{fr}$  або  $P_{730}$  (відповідно, far red і 730 нм). У російськомовній літературі також прийняті позначення  $\Phi_k$  або  $\Phi_{660}$  для неактивної форми фітохрому та  $\Phi_{dk}$  або  $\Phi_{730}$  для активної.

Фітохроми синтезуються *de novo* в неактивній формі  $P_r$ . Фотоінверсійний перехід  $P_r \rightarrow P_{fr}$  можливий тільки під дією світла. Зворотний перехід  $P_{fr} \rightarrow P_r$  може здійснюватися не тільки під дією далекого червоного світла, але й спонтанно в темряві.

Фотоконверсія хромофорної групи приводить до істотної зміни конформації фітохрому, що відбивається на кіназній активності рецептора. Фітохроми здатні до трансмолекулярного автофосфорилування та фосфорилування інших субстратів. Шляхом фосфорилування регулюється також стабільність фітохромів. Зміна рівня фосфорилування фітохромів робить можливою їхню взаємодію з іншими регуляторними та функціональними молекулами. Модуляція активності сигнальних партнерів фітохромом слід розглядати як перший крок декодування світлового сигналу, поглиненого цим рецептором.



**Рис. 24.** Ізомеризація фітохромобіліну та зміна конформації фітохрому під дією світла (за Ває, Choi, 2008, зі змінами)

Фітохромни кодуються невеликою родиною генів P<sub>HY</sub>. У гені рослин кодуються декілька різних фітохромів (зазвичай, у кількості не менше трьох). У модельного виду *Arabidopsis*, наприклад, їх п'ять: P<sub>HYA</sub>, P<sub>HYB</sub>, P<sub>HYC</sub>, P<sub>HYD</sub>, P<sub>HYE</sub>. У сосни чотири фітохромни, у рису та гінкго — три, а у томату — сім. Різні форми фітохромів у одного виду рослини мають різні молекулярні властивості та функції, які частково перекриваються. Найбільші структурно-функціональні відмінності виявляються між фоточлабільними та фоточлабільними фітохромни. Фоточлабільні фітохромни здатні до оборотної фоточлаверсії, тобто під впливом червоного та далекого червоного світла переходять відповідно в активну та неактивну форму. Для фоточлабільних фітохромів оборотна фоточлаверсія не характерна. Активна форма фоточлабільних фітохромів має нетривалий період існування та під дією світла швидко руйнується. Незалежно від кількості видів фітохромів, зазвичай, один з них є фоточлабільним, а решта фоточлабільними. Так у *Arabidopsis* фоточлабільним фітохромом є P<sub>HYA</sub>, а решта фоточлаверсоров (P<sub>HYB</sub>, P<sub>HYC</sub>, P<sub>HYD</sub>, P<sub>HYE</sub>) — фоточлабільні фітохромни.

Розрізняють три групи фітохром-залежних відповідей відповідно до інтенсивності іррадіації, яка сприймається і спричиняє специфічну реакцію рослини:

- 1) **VLFR** (very low fluence response) — відповідь на дуже низький рівень іррадіації;
- 2) **LFR** (low fluence response) — відповідь на низький рівень іррадіації;
- 3) **HIR** (high irradiance response) — відповідь на високий рівень іррадіації.

Фоточлабільний фітохром А (P<sub>HYA</sub>) відповідає на дуже низький рівень іррадіації (VLFR) і на високий рівень інтенсивності далекого червоного світла (FR-HIR). Фоточлабільні фітохромни (P<sub>HYB</sub>, P<sub>HYC</sub>, P<sub>HYD</sub>, P<sub>HYE</sub>) опосередковують специфічні відповіді при впливі світла низького рівня іррадіації (LFR) і високого рівня інтенсивності червоного (R-HIR).

Фітохром-залежні реакції рослин вельми різноманітні та складні, але при цьому можна виділити три основні групи реакцій, які розвиваються під впливом світла певного спектру та інтенсивності:

- 1) пошук світла — забезпечується фотолабільним фітохромом (VLFR і FR-HIR);
- 2) оптимальне використання світла — фотостабільні фітохроми (LFR);
- 3) уникнення світла — фотостабільні фітохроми (R-HIR).

Фітохроми беруть участь у фотоперіодичних реакціях, за допомогою яких регулюється безліч морфогенетичних механізмів рослин (проростання насіння, перехід до цвітіння, дозрівання плодів, підготовка до сезонних змін тощо). Важливою функцією фітохромів є регуляція деетиоляції, причому у багатьох рослин у цьому процесі беруть участь всі види фітохромів. У *Arabidopsis* в механізмі деетиоляції провідну регуляторну роль відіграють PHYA і PHYB. Багато реакцій регулюються фітохромами спільно з криптохромами.

### Структура фітохромів

У молекулах фітохромів розрізняють два основні структурно-функціональні райони: фотосенсорний N-кінцевий домен і димеризаційний C-кінцевий домен. Фотосенсорний домен підрозділяють на P1, P2/PAS, P3/GAF і P4/PHY, а димеризаційний — на PAS-A, PAS-B і HKRD (histidine kinase-related domain). Серед цих субдоменів P1, PAS-A і PAS-B є унікальними рослинними структурами, тоді як інші входять до складу фітохром-подібних білків нерослинних організмів (рис. 25).

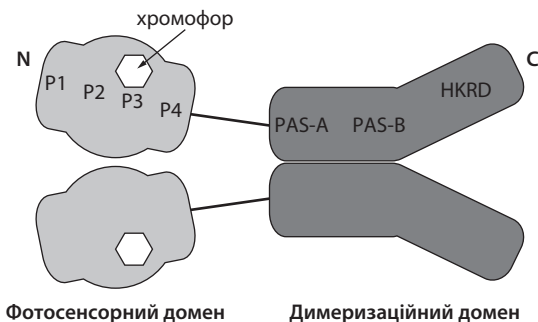


Рис. 25. Структура молекули фітохрому (за Вае, Choi, 2008, зі змінами)

### Фотосенсорний район

**P1-домен** має різне значення для окремих форм фітохромів. У *Arabidopsis* рівень фосфорилування P1-домену визначає стабільність PHVA. Фосфорильований по P1 фітохром A залучається до убіквітин-залежного протеолізу, тоді як дефосфорилування P1 збільшує стабільність молекули. У цьому домені знаходяться амінокислотні залишки, призначені для автофосфорилування (наприклад, серин-17), а також ділянки, які фосфорилуються іншими кіназами (наприклад, серин-7). Для активності PHVB P1-домен не відіграє суттєвої ролі.

**Домени P2/PAS і P3/GAF** є висококонсервативними структурами. Вони формують кор фотосенсорних доменів і виконують вирішальну роль у рецепції світла та передачі світлового сигналу. Ці домени здатні до білін-ліазної активності, необхідної для лігування хромофора до цистеїнового залишку P3/GAF-домену. На відміну від рослинних фітохромів, у бактеріофітохрома хромофор приєднаний до домену P2/PAS.

**Домен P4/PHY** є консервативним і виконує регуляторну функцію. Він необхідний для тонкої настройки активності фітохрому. Через цей домен регулюється швидкість темної конверсії фітохрому (спонтанний перехід у неактивну форму), спектральні властивості, ядерна локалізація а також кіназна активність.

Фотосенсорний район виявляє також серин/треонін-кіназну активність, яка необхідна для автофосфорилування рецептора та фосфорилування білків — сигнальних партнерів.

### Димеризаційний район

**Домени PAS-A і PAS-B** у PHVB формують дві важливі функціональні ділянки, необхідні для димеризації, ядерної локалізації та формування ядерних тілець. У фотолабільного фітохрому PHVA домени PAS-A і PAS-B беруть участь тільки в утворенні димеризованих структур, але не мають сигналів ядерної локалізації.

**HKRD.** Точна роль HKRD домену не визначена. У деяких фітохромів HKRD, ймовірно, бере участь в утворенні димерів фоторецепторів.

Димеризація фотолабільних і фотостабільних фітохромів має певні особливості. Фотолабільний фітохром РНУА утворює тільки гомодимерні структури. Фотостабільні частіше утворюють гомодимери, але також здатні і до гетеродимеризації. Чи існує особливий сенс у функціональному та регуляторному відношенні у формуванні гомодимерних структур, поки не відомо.

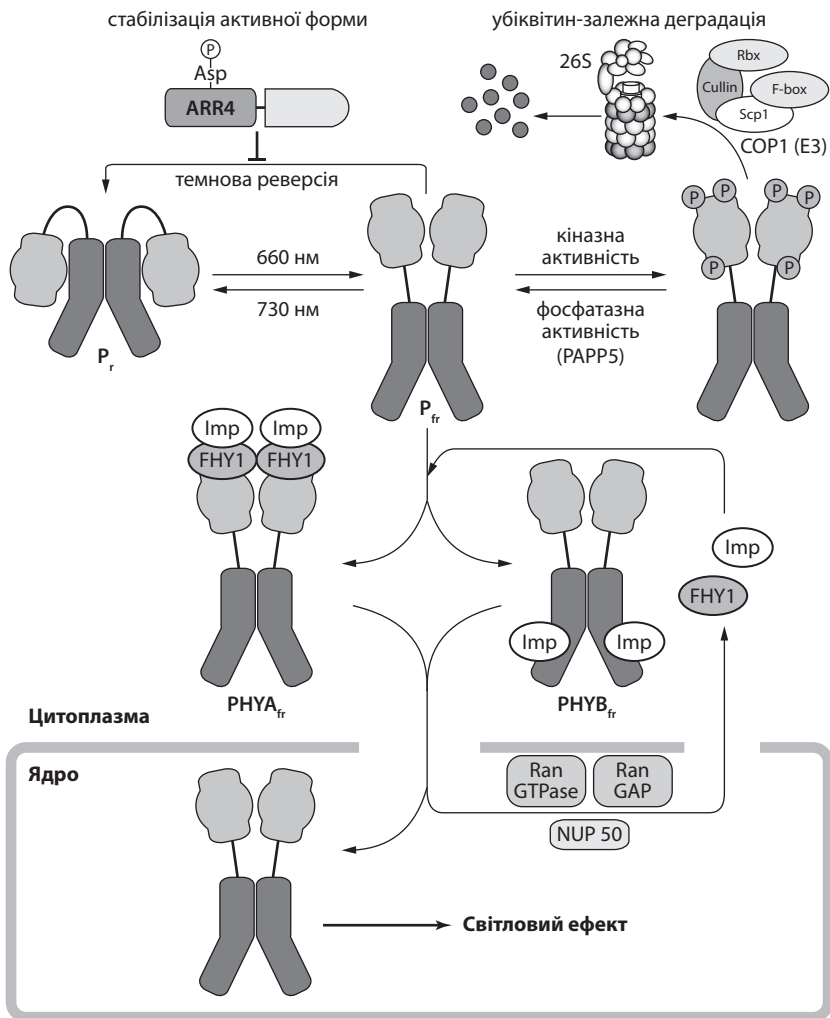
## Активація фітохромів і передача світлового сигналу

### Світлозалежні зміни структури фітохромів

У молекулі неактивного фітохрому N- і C-кінцеві частини молекули тісно контактують один з одним (рис. 24). Взаємодія здійснюється за рахунок N-кінцевого домену P3/GAF і C-кінцевих PAS-A і PAS-B. При активації внаслідок фотоконверсії  $P_r \rightarrow P_{fr}$  у молекулі фітохрому відбуваються значні структурні зміни. В активній формі  $P_{fr}$  збільшується частка  $\alpha$ -спіральных структур (на 5% більше порівняно з  $P_r$ ). Це супроводжується дисоціацією N- і C-кінцевих частин, у результаті чого молекула набуває відкриту структуру. За рахунок цього значно збільшується площа, призначена для міжмолекулярних взаємодій. Розкриття молекули фітохрому індукує наступні сигнальні події, які спрямовані на регуляцію процесів і в цитоплазмі (наприклад, рух хлоропластів), і в ядрі (модуляція генної експресії). Транслокація фітохрому в ядро являє собою один з важливих етапів світлової регуляції.

### Перенесення фітохромів у ядро

Молекулярна маса димеру фітохрому (240 кБ) набагато перевищує масу білків (не більше 40 кД), які здатні спонтанно дифундувати крізь ядерні пори. Тому транслокація фітохромів у ядро є енергозалежним процесом і здійснюється при взаємодії з іншими білками. До білків, які забезпечують перенесення білків через ядерні пори, належать, наприклад, імпортини та група загальних компонентів, що беруть участь у перенесенні: малі G-білки класу Ran, RanGTPаза активуючі білки, нуклеопорин 50 та ін. Крім загальних компонентів, необхідна участь специфічних факторів, що взаємодіють з певними видами білків (рис. 26).



**Рис. 26.** Активація, транслокація та регуляція активності фітохромів (за Ває, Choi, 2008, із змінами).

Умовні позначення:

imp — імпортин;

ARR4 — регулятор відповіді А-типу;

FHY1 — фактор транслокації;

PAPP5 — фітохром-асоційована фосфатаза



Фітохром В (PHYB) містить функціональний домен ядерної локалізації NLS. При активації PHYB світлом ця ділянка відкривається та через неї рецептор може взаємодіяти з імпортинами — факторами, що забезпечують перенесення у ядро.

Молекули PHYA, на відміну від PHYB, не мають доменів ядерної локалізації і нездатні безпосередньо взаємодіяти з факторами транслокації, такими як імпортини. Ядерна локалізація фітохрому PHYA забезпечується білками FHY1 (Far-red elongated Phyocotyl 1) і FHL (FHY1-Like). Білки FHY1 (202 а/о) і FHL (181 а/о) містять сигнал ядерної локалізації (NLS) і сигнал, що виключає ядерну локалізацію (NES). Завдяки цим сигналам дані білки можуть циклічно транслокуватися в обидві сторони крізь ядерні пори. Ще одна ділянка SRD (septin-related domain) призначена для взаємодії з фітохромом PHYA в області N-термінального домену, який відкривається внаслідок фотоізомеризації.

У ядрі фітохроми зв'язуються зі своїми мішенями та модулюють їх активність. Функціонування фітохромів у ядрі часто асоційоване з утворенням ядерних частинок, в які залучаються сплайсосоми, транскрипційні комплекси та інші функціональні молекули та мультимерні утворення.

### Регуляція активності фітохрому

Активні фітохроми піддаються різноманітним регуляторним ефектам, спрямованим на зміну двох основних властивостей фоторецепторів:

- 1) стабільності активного стану (швидкості спонтанного переходу в неактивну форму при відсутності світла);
- 2) тривалості існування білка (інтенсивності залучення молекул фітохромів до убіквітин-опосередкованого протеолізу).

Першим білком, для якого була показана здатність взаємодії з фітохромом В був регулятор відповіді А-типу ARR4, який синтезується під дією гормону цитокініну та функціонує як негативний фактор цитокінінового сигналу. ARR4 активується у двукомпонентній регуляторній системі в результаті перенесення фосфатної групи на консервативний залишок аспарагінової кислоти в молекулі регулятора. В активному фосфорильованому стані ARR4(P) зв'язується з N-термінальною ділянкою

РНУВ. ARR4(P) стабілізує активний стан РНУВ, значно затримуючи темнову реверсію фітохрому.

Фітохром А (РНУА) із фосфорильованим Р1-доменом зв'язується з білком **COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1)**. Білок COP1 містить RING finger домен і має властивості убіквітинуючої протеїнової лігази. COP1 убіквітинуює активну форму РНУА і залучає її до 26S-залежного протеолізу. Зв'язування з COP1 приводить до зниження активності сигналу РНУА шляхом зниження його загальної концентрації.

Фітохром-асоційована фосфатаза **PAPP5 (Phytochrome Associated Protein Phosphatase 5)** зв'язує активні ( $P_{tr}$ ) форми РНУА і РНУВ і дефосфорильовує специфічні сайти, стабілізуючи їхню активну форму та підвищуючи афінність фітохромів до їхніх мішеней.

### Модуляція активності мішеней фітохромів

Фітохромів можуть безпосередньо взаємодіяти з мішенями або опосередковано через регуляторні білки. До світлорегульованих білків, які безпосередньо взаємодіють з фітохромами належать транскрипційні фактори **PIF3 (Phytochrome Interacting Factor 3)** і PIF3-подібні фактори **PI-L (PIF3-Like)**, убіквітинуюча протеїнова лігаза COP1 і цитоплазматичний білок **PKS1 (Phytochrome Kinase Substrate 1)**.

**PIF3/PI-L.** Транскрипційні фактори HLH-типу PIF3 і PI-L є негативними регуляторами світлових реакцій. Фітохромів зв'язують PIF3/PI-L у різних ділянках N-кінцевої частини молекул факторів регуляції транскрипції. Наприклад, у молекулі PIF3 виявлено дві ділянки зв'язування з індивідуальними фітохромами: **APB (active phytochrome binding motif; а/к 27–39)** зв'язується фітохромом В, а **APA (active РНУА binding motif; а/к 193–210)** — фітохромом А. Наявність різних ділянок зв'язування з окремими видами фітохромів, ймовірно, необхідно для тонкої настройки світлозалежних реакцій. Фітохромів при зв'язуванні стимулюють убіквітинувати транскрипційних факторів PIF3/PI-L з подальшим їх протеолізом 26S протеасомою. Передбачається, що фітохромів фосфорильовують PIF3/PI-L, а потім убіквітинуюча лігаза розпізнає PIF3/PI-L у фосфорильованому стані як субстрат (рис. 27).

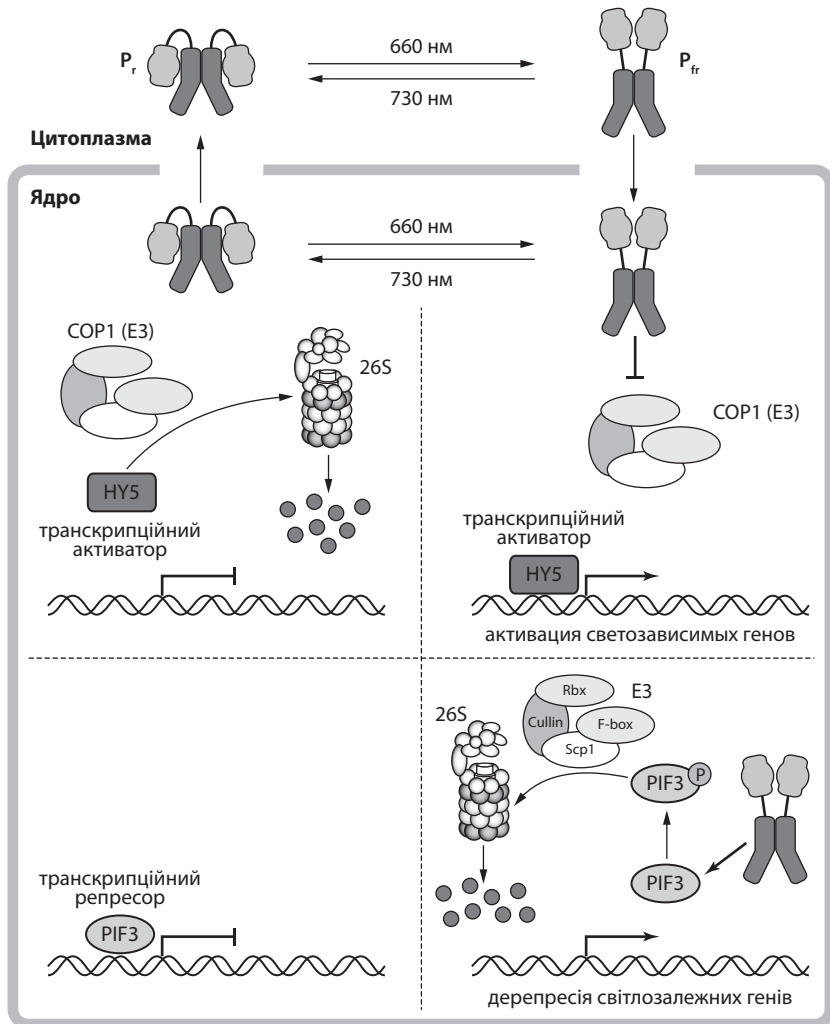


Рис. 27. Регуляція активності світлорегульованих генів фітохромами

**COP1.** Убіквітинуюча протеїнова лігаза COP1 є одним із важливих негативних регуляторів світлових реакцій. Дія COP1 спрямована на залучення до убіквітин-залежного про-

теолізу цілої групи транскрипційних активаторів — позитивних регуляторів світлового сигналу, наприклад HY5 (Long Hypocotyl 5), LAF1 (Long after Far-red light 1) і HFR1 (long Hypocotyl in Far-Red 1). У темряві ці активатори транскрипції піддаються спрямованому руйнуванню 26S протеасомою. На світлі активні форми фітохрому репресують COP1, внаслідок чого проявляється активність активаторів і розвиваються світлозалежні реакції (рис. 27).

### Короткий опис механізму світлової активації фітохрому

1. Абсорбція світла.
2. Фотоізомеризація хромофора.
3. Зміна конформації молекули фітохрому.
- 4а. Зв'язування із цитоплазматичними мішенями та модуляція їхньої активності.
- 4б. Зв'язування із білками, що забезпечують перенесення у ядро.
5. Транслокація фітохрому в ядро.
6. Зв'язування з ядерними мішенями та модуляція їхньої активності.

## 3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛУ ВСЕРЕДИНІ КЛІТИНИ

---

---

Передача сигналу від рецепторів, залежно від їх типу, може здійснюватися безпосередньо на промотор гену або на ефекторні молекули, а також на численні проміжні компоненти внутрішньоклітинних сигнальних систем. Компоненти, що беруть участь у передачі сигналу від рецепторів до кінцевих мішеней, надзвичайно різноманітні за структурою, властивостями та механізмами трансдукції сигналу. Короткі відомості про їх призначення та принципи функціонування були викладені в розділах «Компоненти сигнальних систем» і «Сутність передачі сигналу». У цій частині будуть описані основні групи сигнальних молекул, їх структура, способи взаємодії з апстрим і даунстрим сигнальними партнерами та регуляторами, механізми активації і передачі сигналу.

### 3.1. G-БІЛКИ

Одними з компонентів, які опосередковують внутрішньоклітинний сигнал, є регуляторні GTPази, які також називають G-білками. У сукупності G-білки — це гуанін-нуклеотидзв'язуючі білки, що мають GTPазну активність та виконують у клітинах різноманітні функції, які не обмежуються регуляторними. Вони беруть участь у транспорті макромолекул, організації цитоскелету, синтезі білків, утворенні та транслокації везикул. Серед багатьох G-білків можна виділити також групу сигнальних молекул, що беруть участь у трансдукції внутрішньоклітинних сигналів.

Сигнальні G-білки, відповідно до їхнього субодиничного складу, поділяють на два типи: **гетеротримерні** та **мономерні**. У ранній літературі, присвяченій G-білкам, гетеротримерні

білки часто називали власне G-білками (без відповідної субодиночної характеристики «гетеротримерні»), тоді як мономерні спочатку отримали назву Ras-білків. Дана термінологія була досить «економною» і, разом з тим, зрозумілою. Однак після того як з'ясувалося, що Ras-білки — це лише одна з родин величезної групи мономерних G-білків (в даний час виділяють п'ять родин малих G-білків), щоб уникнути плутанини, з'явилася необхідність використовувати терміни гетеротримерні та мономерні (або малі) G-білки.

Гуанін-нуклеотидзв'язуючі білки значно поширені в живій природі, але при цьому нерівномірно представлені у тварин і рослин. Причому найбільші відмінності характерні для сигнальних G-білків. Так, гетеротримерні GTPази у великій кількості виявляються в тваринних клітинах, а у рослин вони присутні в мінорних кількостях. У тварин близько 80 % первинних месенджерів взаємодіють зі специфічними рецепторами, сполученими з гетеротримерними G-білками. Для рослин багато аспектів участі цих молекул у сигнальних механізмах досі незрозумілі. Принаймні, гетеротримерні GTPази у рослин, якщо і беруть участь у трансдукції сигналу, навряд чи мають механізм активації, аналогічний до механізму у тварин. Значущість гетеротримерних G-білків для тварин підтверджується великою кількістю ідентифікованих у геномі ссавців генів, що кодують субодиноці GTPаз: 23  $\alpha$ -субодиноці, 5  $\beta$ -субодиноць, 12  $\gamma$ -субодиноць. У рослин набір подібних генів є значно меншим. Наприклад, у геномі *Arabidopsis* виявлений лише 1 ген, що кодує  $\alpha$ -субодиноцю, 1 —  $\beta$ -субодиноцю, 2 —  $\gamma$ -субодиноці. На тлі такої незначної кількості гетеротримерних GTPаз гени малих G-білків у геномах рослин виявляються достатньо. Наприклад, у геномі *Arabidopsis* ідентифіковано 93 гени. В регуляторних і сигнальних механізмах у рослин провідна роль належить мономерним G-білкам.

### 3.1.1. Гетеротримерні G-білки

Вперше G-білки були виявлені при вивченні механізмів функціонування 7ТМ рецепторів (або GPCR) у тварин. Рецептори цього класу безпосередньо взаємодіють з G-білками та передають через них сигнал на ефектори. GPCR і G-білки у тва-

рин завжди функціонують разом і є стандартними сигнальними партнерами. З цієї причини 7ТМ-рецептори називають також **G-білок сполученими рецепторами (GPCR)**.

G-білки складаються з трьох різних субодиниць. Найбільша за розміром  $\alpha$ -субодиниця (40–50 кД) німічно зв'язана з димером  $\beta\gamma$ . Субодиниці  $\beta$  і  $\gamma$  мають менші молекулярні маси — відповідно 35 кД і 8 кД. Структура  $\beta\gamma$ -димеру підтримується за рахунок слабких сил, які, тим не менш, утворюють досить міцний зв'язок, тому при різних функціональних станах молекули G-білка димер  $\beta\gamma$  завжди знаходиться в асоційованому вигляді. Субодиниці  $\alpha$  і  $\gamma$  мають посттрансляційні модифікації у вигляді жирнокислотних або ізопреноїдних груп. За рахунок цих ліпофільних груп  $\alpha$ -субодиниця і  $\beta\gamma$ -димер незалежно один від одного утримуються на внутрішньоклітинному боці плазмалеми та можуть окремо або в складі G-білка латерально дифундувати по мембрані (рис. 28).

У структурі  $\alpha$ -субодиниці є гуаніннуклеотид зв'язуючий центр, у якому може перебувати GTP або GDP. Ця ділянка також має GTPазні властивості. При зв'язуванні GTP G-білок переходить в активний стан (здатний передавати сигнал), а GDP-зв'язана форма є неактивною.

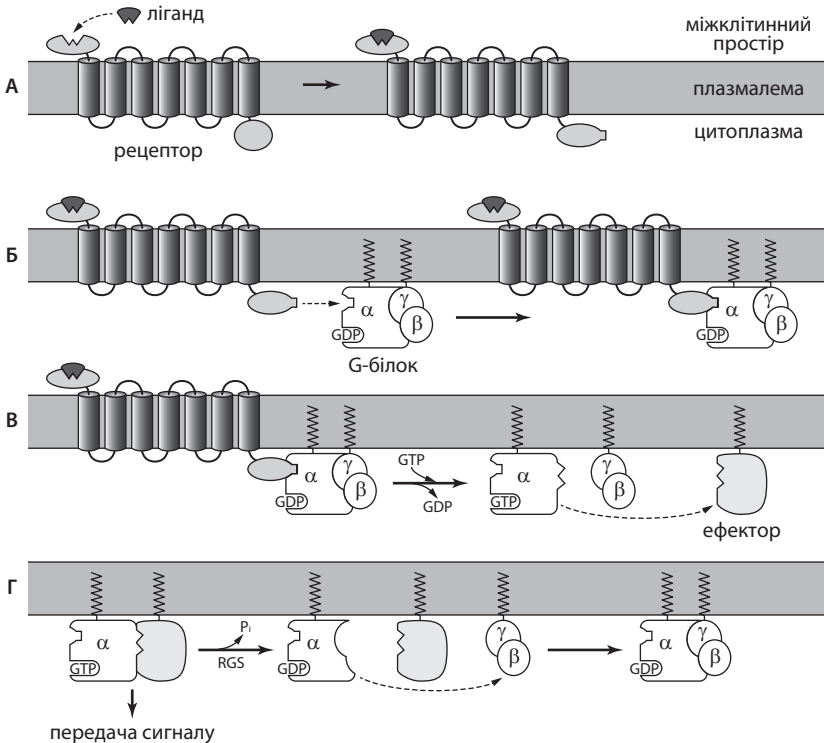
Структура різних G-білків є унікальною. До складу індивідуального G-білка входить конкретний набір ізоформ субодиниць. Це дозволяє їм специфічно взаємодіяти з відповідними рецепторними й ефекторними молекулами.

Взаємодія G-білка із G-білок сполученими рецепторами здійснюється через  $\alpha$ -субодиницю. З ефекторами можуть взаємодіяти як  $\alpha$ -субодиниця, так і  $\beta\gamma$ -димер.

**Цикл активації.** При відсутності відповідного зовнішнього сигналу G-білок знаходиться в тримерному неактивному стані, причому в гуаніннуклеотид-зв'язувальному сайті  $\alpha$ -субодиниці знаходиться GDP. У результаті рецепції екстраклітинного сигналу змінюється конформація рецепторного білка, а це, у свою чергу, спричиняє низку змін у стані G-білка. Втрачається спорідненість  $\alpha$ -субодиниці з GDP, місце якого займає GTP. У більшості випадків (але не завжди) активований G-білок дисоціює на дві частини:  $\alpha$ -субодиниця відділяється від  $\beta\gamma$ -димеру. У кожному випадку G-білок знаходиться в активному

стані, якщо  $\alpha$ -субодиниця зв'язана з ГТР. Однак цей стан порівняно нетривалий, оскільки  $\alpha$ -субодиниця гідролізує молекулу ГТР і переходить у неактивний тримерний стан, оскільки в гуаніннуклеотид-зв'язувальному сайті  $\alpha$ -субодиниці залишається GDP. Якщо рецептор продовжує сприймати зовнішній сигнал, то G-білки активуються знову.

ГТРазна активність  $\alpha$ -субодиниці залежить від ряду внутрішньоклітинних факторів. По-перше, активність посилюється, зазвичай, при взаємодії  $\alpha$ -субодиниці з ефекторними молекулами, наприклад з фосфоліпазою С. По-друге, існує велика



**Рис. 28.** Цикл активації гетеротримерних G-білків (пояснення у тексті). Умовні позначення:

RGS — регулятор сигналізації G-білка



кількість регуляторних білків, що здатні модулювати GTPазну активність  $\alpha$ -субодиниці. Ці білки належать до родини **RGS** (**regulators of G-protein signaling**) білків — регуляторів сигналізації G-білка. В основному, це невеликі білки, що складаються з 220 і менше амінокислотних залишків, проте також виявлені високомолекулярні RGS білки (до 1400 амінокислотних залишків). Ці білки не тільки модулюють GTPазну активність  $\alpha$ -субодиниці. Деякі з них здатні брати участь у передачі сигналу, оскільки мають у структурі специфічні ділянки, які дозволяють їм взаємодіяти з деякими компонентами системи передачі сигналу.

Трансдукція сигналу на ефектор здійснюється  $\alpha$ -субодиницею або  $\beta\gamma$ -димером, а в деяких випадках — цілим тримером, зв'язаним з GTP. Оскільки ні G-білок, ні його складові частини не відокремлюються від плазматичної мембрани, ефекторні молекули, що активуються G-білком, також мають мембранну локалізацію або залучаються до мембрани в процесі активації. Взаємодія G-білків з ефекторами приводить до зміни конформації та активності останніх.

Димери  $\beta\gamma$  не тільки регулюють активність ефекторних молекул, наприклад, таких як фосфоліпази (PLA<sub>2</sub>, деякі ізоформи фосфоліпази C), іонні канали (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), але також виконують інші функції. Вони забезпечують локалізацію, зв'язування та деактивацію  $\alpha$ -субодиниць, стабілізують їх інактивованій стан шляхом зниження рівня дисоціації GDP від  $\alpha$ -субодиниці, регулюють спорідненість рецепторів до лігандів, які їх активують.

У тварин  $\beta\gamma$ -субодиниці гетеротримерних G-білків здатні активувати специфічні протеїнкінази — кінази G-білок сполучених рецепторів — **GRK** (**G protein-coupled receptor kinases**), які фосфорилують молекули 7TM рецепторів. До активації GRK приводить, зазвичай, низька концентрація агоніста, тобто слабкий зовнішній сигнал. Ковалентна модифікація рецептора шляхом фосфорилування запобігає передачі сигналу на ефектор за двома можливими причинами:

- 1) видалення рецептора з поверхні клітини шляхом ендцитозу;
- 2) зв'язування з молекулами аррестину, які репресують здатність рецептора взаємодіяти з лігандом.

### 3.1.2. Мономерні (малі) G-білки

#### Різноманітність мономерних G-білків

Мономерні G-білки, спочатку були відкриті як продукти Ras-протоонкогенів, що асоційовані із саркомою щурів (звідси аббревіатура **Ras** — **rat sarcoma**). Згодом були виявлені численні мономерні білки з GTPазною активністю, близькі за структурою та молекулярною масою до Ras-білків. Усі ці білки мають обмежену гомологію (до 30 %) і консервативні послідовності амінокислот, відповідальні за зв'язування гуанозинфосфатів, GTPазну активність і взаємодію з ефекторами. Молекулярна маса більшості мономерних G-білків варіює в межах 20–30 кД. Сьогодні вважають, що малі G-білки є обов'язковими компонентами еукаріотичних клітин і беруть участь у важливих регуляторних механізмах. Відомі малі GTPази, відповідно до їх амінокислотної послідовності та функцій, поділяють на п'ять родин: Ras, Rho, Rab, Arf і Ran.

Активність двох сімейств G-білків — Ras і Rho — асоційована з трансдукцією сигналу. Решта виконує специфічні клітинні функції.

Білки родини **Ras** не виявлені у рослин і знайдені тільки у тварин.

Ras-білки у тваринних клітинах беруть участь у стимуляції клітинного поділу, передаючи сигнал, отриманий при зв'язуванні факторів росту відповідними рецепторами. Ras зазвичай розташовується в центрі мережі сигнальних шляхів, які взаємодіють, тобто цей білок здатний сприймати сигнали від декількох рецепторів і, в той же час, впливати на велику кількість наступних подій. Характерним для Ras є активація різних кіназ, наприклад, таких, як протеїнкіназа Raf або фосфатидилінозитол-3-кіназа.

У геномі *Arabidopsis* виявлено 11 генів, що кодують **Rho** білки. Ці білки дещо відрізняються за структурою від Rho білків тварин і складають окрему підродину **Rho-подібних білків рослин** — **ROP (Rho of plants)**.

Малі G-білки, що не несуть сигнального навантаження, меншою мірою відрізняються у рослин і тварин. Функціонування

таких G-білків пов'язують з участю в специфічних фундаментальних механізмах:

**Arf** — утворення везикул, в рослинах Arf білки важливі для полярного транспорту ауксину, оскільки беруть участь у перерозподілі переносника ауксину PIN1 між цитоплазмою та плазмалемою;

**Rab** — транспорт і докування везикул;

**Ran** — трафік РНК і білків крізь ядерні пори.

### Сигнальні мономерні G-білки

Ras і Rho білки є мембранними поверхневими білками, які утримуються на мембрані, як і гетеротримерні G-білки, за рахунок ліпофільної групи небілкової природи. Малі G-білки піддаються посттрансляційним нековалентним модифікаціям. Один зі способів модифікації не характерний для гетеротримерних G-білків: після завершення синтезу видаляється три С-кінцевих амінокислоти, а новий С-кінець поліпептидного ланцюга, що утворився, метилюється. Потім до цистеїну гіперваріабельної С-термінальної області приєднується жирнокислотний або поліпреновий залишок, який забезпечує зв'язок білка з мембраною.

Дослідження структури Ras білка показало наявність двох високорухливих ділянок, що названі «switch I» і «switch II», які оточують  $\gamma$ -фосфат GTP. Положення цих послідовностей істотно змінюється залежно від того, який з нуклеотидів (GTP або GDP) знаходиться в гуаніннуклеотидзв'язуючому центрі. Зміна конформації молекули внаслідок зсуву switch-послідовностей сприяє переключенню неактивного стану молекули в активний, і навпаки. В амінотермінальній частині G-білка розташована ділянка взаємодії з ефекторами.

**Цикл активації мономерних G-білків.** Мономерні G-білки, на відміну від гетеротримерних, не взаємодіють безпосередньо з рецепторами. Передача сигналу між ними здійснюється за допомогою адаптерних молекул. У неактивному стані в гуаніннуклеотидзв'язуючому центрі G-білка зв'язаною є молекула GDP. Стимуляція G-білка шляхом взаємодії з адаптерами сприяє заміні GDP на GTP (рис. 29). Адаптерні молекули, що безпосередньо взаємодіють з малими G-білками, називають

гуанін-нуклеотид обмінюючими факторами (GEF — guanine nucleotide exchanging factor).

Після заміни гуанозинфосфатів малі G-білки змінюють конформацію та переходять в активний стан, тобто набувають здатність регулювати активність своїх мішеней. Крім GEF, у циклі активації G-білків можуть брати участь інші регулятори, причому не тільки активатори, але й інгібітори передачі сигналу. Передбачається участь **гуанін-нуклеотид дисоціюючого інгібітора** — GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). Цей регулятор був виявлений при вивченні механізму активації Rab-білків. Сутність його дії полягає в тому, що він зв'язує ліпофільну групу неактивного GDP-зв'язаного G-білка, внаслідок чого останній дисоціює від мембрани. Цим способом GDI ізолює неактивний G-білок. Асоційований з GDI G-білок не має можливості взаємодіяти з GEF (рис. 29).

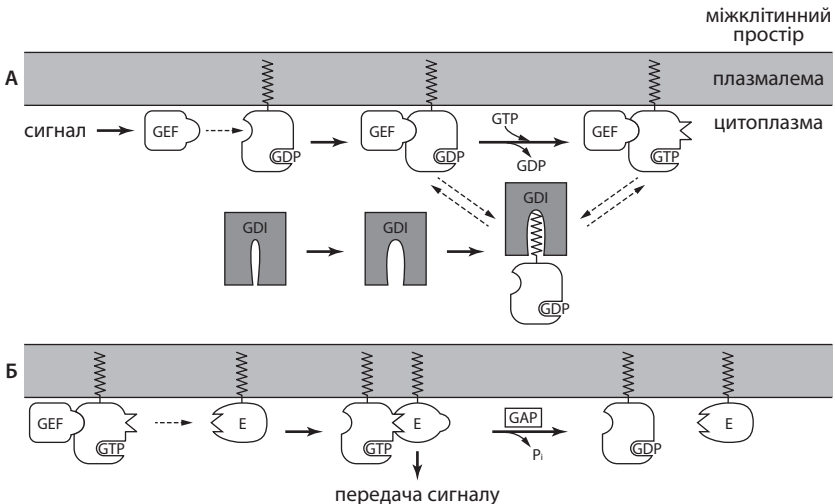


Рис. 29. Цикл активації мономерних G-білків.

Умовні позначення:

GEF — гуанін-нуклеотид обмінюючий фактор;

GDI — гуанін-нуклеотид дисоціюючий інгібітор;

GAP — білки, що активують GTPазу;

E — мішень G-білка

Інактивація GTP-зв'язаної форми G-білка здійснюється в результаті GTPазної реакції. Відщеплення  $\gamma$ -фосфату приводить до утворення GDP, і G-білок, таким чином, переходить у неактивну GDP-зв'язану форму.

GTPазна активність, а відповідно, і швидкість інактивації G-білка не є сталими. Так, активність підвищується при взаємодії GTP-зв'язаної форми G-білка зі своєю мішенню. Крім цього, існують спеціалізовані регулятори активності. Вони називаються **білками, що активують GTPазу**, або **GAP** (GTPase activating protein). GTPазна активність G-білків, які зв'язані з GAP, збільшується п'ятикратно.

## 3.2. ЕФЕКТОРНІ МОЛЕКУЛИ ТА ВТОРИННІ МЕСЕНДЖЕРИ

**Ефекторні молекули** є компонентами сигнальних систем, які беруть участь в утворенні внутрішньоклітинних низькомолекулярних посередників — **вторинних месенджерів**. Ефектори — це ферменти, які переважно розташовуються на плазматичній мембрані, але можуть мати цитоплазматичну локалізацію. Як ефектори (але досить умовно) можна також розглядати кальцієві іонні канали.

Важливою властивістю ефекторів є їхня здатність підсилювати сигнал, оскільки їхнє функціонування приводить до утворення значної кількості вторинних месенджерів, що передають сигнал на подальші компоненти сигнальних ланцюгів. Таким чином, одна ефекторна молекула за допомогою вторинних месенджерів може впливати на активність багатьох сигнальних посередників.

Стан ефекторів залежить від зовнішніх сигналів, але активність кожного з них модулюється різними способами залежно від конкретного типу ефекторних молекули. Вони можуть отримувати сигнал:

- 1) безпосередньо від рецепторів;
- 2) опосередковано через білкові компоненти сигнальних систем;

- 3) при зв'язуванні первинного месенджера (рецептори-каналіформери);
- 4) під впливом вторинних месенджерів.

Ефектори-ферменти ковалентно модифікують субстрат, утворюючи низькомолекулярні сполуки, які виконують роль вторинних месенджерів. **Вторинні месенджери** мають декілька важливих властивостей. По-перше, вони добре дифундують всередині клітини, а деякі сполуки (наприклад, NO) легко проникають до сусідніх клітин. По-друге, це сполучення, які існують дуже короткий час: вони руйнуються ферментативним шляхом або спонтанно. Тривалість існування деяких вторинних месенджерів, що здатні до спонтанного руйнування, може також регулюватися ферментативно. Щодо іонів, існують механізми, що сприяють швидкому зниженню їх концентрації.

Ефектор, що синтезує молекули вторинних посередників, і фермент, здатний руйнувати їх, складають у клітині своєрідну антагоністичну пару. Прикладом такої пари можуть служити аденілатциклаза (АЦ) і фосфодіестераза (ФЕ). Каталітична активність ФЕ спрямована на руйнування циклічного АМР (сАМР) — вторинного месенджера, який синтезується АЦ. Ці ферменти не тільки мають протилежні властивості, але й протилежні способи регуляції. Якщо аденілатциклаза активується при отриманні певного сигналу, то фосфодіестераза за цих умов втрачає активність. Однак коли даний сигнал відсутній, то АЦ інгібується, а ФЕ, навпаки, переходить в активний стан. Протилежно спрямована регуляція активності цих ферментів дозволяє клітині швидко реагувати на зовнішні умови, оскільки сприяє ефективному синтезу або руйнуванню вторинних месенджерів у відповідних умовах.

### 3.2.1. Фосфоліпази

Фосфоліпази — це ферменти, що каталізують гідроліз певних ефірних зв'язків у молекулах фосфоліпідів. Відповідно до розташування гідролізованого зв'язку розрізняють п'ять класів фосфоліпаз (PLD, PLC, PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> і PLB). Як окремі групи виділяють ферменти, що каталізують розщеплення лізофосфоліпідів — лізофосфоліпази.

Сайти та продукти розщеплення (рис. 30):

- фосфоліпази D (PLD) — термінальний фосфоєфірний зв'язок; продукти: фосфатидна кислота та головна спиртова група;
- фосфоліпази C (PLC) — гліцерофосфатний ефірний зв'язок; продукти: діацилгліцерол і фосфорильований спирт;
- фосфоліпази A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) — *sn*-1 ацилефірний зв'язок; продукти: вільна жирна кислота і 1-лізо-2-ацилфосфоліпід;
- фосфоліпази A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) — *sn*-2 ацилефірний зв'язок; продукти: вільна жирна кислота і 1-ацил-2-лізофосфоліпід;
- фосфоліпази B (PLB) — *sn*-1 і *sn*-2 ацилефірні зв'язки; продукти: вільні жирні кислоти і 3-фосфогліцерол;

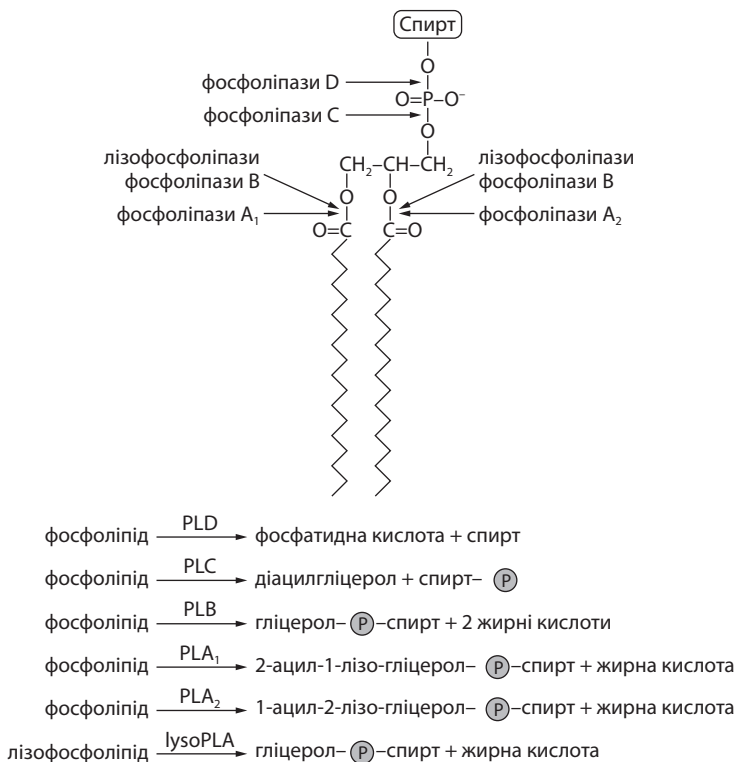


Рис. 30. Сайти дії фосфоліпаз на фосфоліпіди та продукти реакцій

- лізофосфоліпази A (lysoPLA) — *sn*-1 або *sn*-2 ацилефірний зв'язок у молекулах лізофосфоліпідів; продукти: вільна жирна кислота і 3-фосфогліцерол.

У сигнальних механізмах найбільш важливими є фосфоліпази C, D і A<sub>2</sub>. Активність усіх цих фосфоліпаз приводить до утворення цілого ряду вторинних месенджерів, що беруть участь у модуляції активності компонентів каскадних сигнальних систем.

## Фосфоліпази D

Каталітична активність фосфоліпаз D (PLD) спостерігається на різних етапах онтогенезу рослин і має важливе значення при впливі широкого спектру абіотичних і біотичних стресових чинників. PLD виконують центральну роль у стресових реакціях рослин, в яких опосередковують дію стресових гормонів (АБК, жасмонату, етилену), а також продукцію цих регуляторів.

Фосфоліпази D розщеплюють термінальний фосфоефірний зв'язок фосфоліпіда. Продуктами розщеплення є фосфатидна кислота (PtdOH) та водорозчинна головна група (спирт) (рис. 31). Ці ферменти мають унікальну властивість: у присутності первинних спиртових груп вони можуть переносити фосфатидил на спирти з утворенням відповідних фосфатидилалкоголей. Подібна оборотність такої реакції для інших фосфоліпаз не є характерною.

Відповідно до субстратної специфічності та вимог двовалентних іонів фосфоліпази D поділяють на три групи:

- 1) звичайні PLD мають максимальну активність при мілімолярній концентрації Ca<sup>2+</sup> (20–100 мМ);

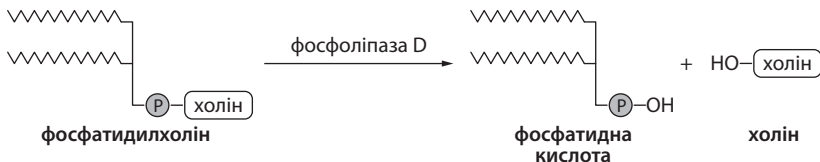


Рис. 31. Реакція, що каталізується фосфоліпазою D



- 2) **поліфосфоінозитид-залежні** PLD найбільш активні при мікромолярному рівні  $\text{Ca}^{2+}$  і специфічні до фосфатидилінозитол-поліфосфатів;
- 3) **фосфатидилінозитол-специфічні** фосфоліпази D є  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежними.

У рослинах переважають звичайні PLD. Крім головних трьох класів, які засновані переважно на вимозі, іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , PLD поділяють на групи відповідно до амінокислотної послідовності, архітектурі генів і біохімічних властивостей. Так, в *Arabidopsis* виділено п'ять класів: PLD $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  й  $\epsilon$ . Більшість PLD, що ідентифіковані у *Arabidopsis* і в інших видах рослин, належать до класу PLD $\alpha$ .

Поліфосфоінозитид-залежні PLD були охарактеризовані в *Arabidopsis*, а фосфатидилінозитол-специфічні PLD — в *Catharantus roseus* (катарантус рожевий, у квітникарстві відомий більше як барвінок рожевий).

**Каталіз.** Ферменти суперродини PLD гідролізують фосфоефірні (P–O) зв'язки шляхом двокрокової пінг-понг реакції, в процесі якої фосфатидил спочатку приєднується до ферменту (тобто залучається фосфатидил-ферментний посередник). Для нуклеофільної атаки фосфатної групи субстрату фосфоліпази D використовують консервативний залишок гістидину.

**Субстратна специфічність.** Більшість рослинних PLD мають широку субстратну специфічність, віддаючи при цьому перевагу певному типу субстрату. Наприклад, PLD $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$  утилізують фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін і фосфатидилгліцерол. Однак PLD $\alpha$  сильно відрізняється від PLD $\beta$  і  $\gamma$  за необхідного рівня  $\text{Ca}^{2+}$ . Крім того, PLD $\beta$  і  $\gamma$ , на відміну від PLD $\alpha$ , гідролізують також фосфатидилсерін і N-ацилфосфатидилетаноламін. Жодна з  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних PLD не розщеплює фосфатидилінозитол, фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат і кардіоліпін. Тоді як  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежні PLD, навпаки, гідролізують фосфатидилінозитол, але не діють на фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін.

**Активація.** Активність PLD залежить від багатьох факторів — концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , ліпідного складу, рН, інозитолфосфатів та ін. Найбільш важливим фактором для звичайних PLD, головним чином для PLD $\alpha$ , є іони  $\text{Ca}^{2+}$ . На N-термінальній ділянці молекул рослинних  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних PLD розташована

$\text{Ca}^{2+}$ /фосфоліпід-зв'язуюча ділянка, яку називають С2-доменом. Цей домен є типовим тільки для рослинних PLD. Зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  сприяє зміні конформації молекули, яка необхідна для підвищення спорідненості ферменту до мембранних ліпідів.

Механізм активації PLD передбачає зв'язування молекули ферменту із мембраною. Розчинна фракція PLD є неактивною. Важливим фактором активації PLD є осциляції  $\text{Ca}^{2+}$ . Іони  $\text{Ca}^{2+}$  підвищують афінність С2-домену до мембранних фосфоліпідів. Вважається, що саме С2-домен є відповідальним за внутрішньоклітинну транслокацію PLD. Посилення зв'язування PLD з мембранами може являти собою швидкий і ранній етап активації ферменту в умовах стресу.

Дослідження рівня експресії генів показало, що різні ізоформи PLD мають неоднакове значення у стресовій відповіді. В умовах недостатнього водопостачання стимулюється експресія PLD $\alpha$ . Експресія й активність інших видів PLD при водному стресі не змінюється. При механічному пошкодженні листя *Arabidopsis* зростає експресія генів PLD $\beta$ , PLD $\gamma$ 1 і PLD $\gamma$ 2, тоді як активність PLD $\alpha$  зростає за рахунок підвищення афінності ферменту, що присутній в клітині, до мембрани. Відносний рівень експресії різних PLD відрізняється у *Arabidopsis* при впливі низької температури, важких металів, солі, посухи, а також стресових гормонів АБК і жасмонової кислоти. Крім того, одні PLD завжди присутні в клітинах, а інші є індукованими.

**Передача сигналу.** Продукт каталітичної активності PLD — фосфатидна кислота — модулює активність багатьох мішеней. Фосфатидна кислота взаємодіє не тільки з мембранними мішенями, але і сприяє зв'язуванню з мембранами багатьох цитоплазматичних білків (рис. 32).

До мішеней фосфатидної кислоти належать протеїнові та ліпідні кінази, фосфатази, фосфоліпази, іонні канали й активні трансмембранні переносники, наприклад  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази, що автоінгібуються. Фосфатидною кислотою активується фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназа — фермент, що каталізує утворення фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату. Дана сполука є субстратом і до того ж головним фактором активації поліфосфозид-специфічних фосфоліпаз С. Також вважають, що фосфатидна кислота здатна безпосередньо взаємодіяти з фосфоліпа-

зами  $C$  і  $A_2$  та модулювати їхню активність, впливаючи на інтенсивність синтезу низькомолекулярних регуляторів. Таким чином, активація PLD і подальше утворення фосфатидної кислоти приводять до стимулювання сигнальних систем, опосередкованих фосфоліпазами  $C$  і  $A_2$ , в тому числі октадеканойдного шляху (див. далі).

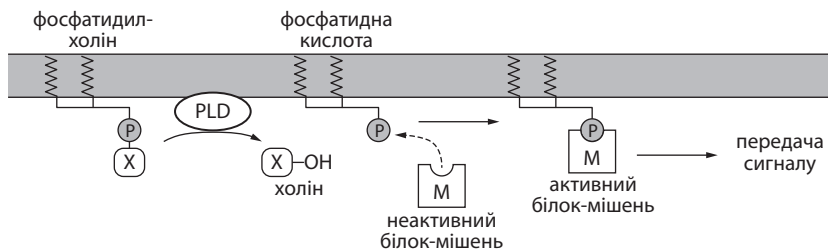


Рис. 32. Передача сигналу через фосфоліпазу D

$PLD\alpha$  має вирішальне значення в регуляції закривання продихів, що індукується АБК за умов водного стресу. У замикаючих клітинах АБК активує  $PLD\alpha$ , а фосфатидна кислота, яка утворюється, регулює подальші події, які приводять до інгібування поглинаючих  $K^+$ -каналів і закривання продихів.

## Фосфоліпази C

Фосфоліпази C (PLC) гідролізують гліцерофосфатний ефірний зв'язок фосфоліпідів у процесі чого утворюються діацилгліцерол (ДАГ) і вільна фосфорильована головна група (рис. 33).

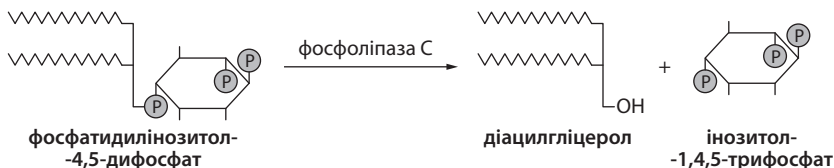


Рис. 33. Реакція, що каталізується фосфоліпазою C

Фосфоліпази С є цитоплазматичними мономерними білками. Молекулярні структури різних ізоформ мають подібні та унікальні риси. На N-кінцях поліпептидних ланцюгів усіх фосфоліпаз С локалізовані ділянки, необхідні для приєднання ферменту до мембрани. С-кінцева область забезпечує додаткові ділянки зв'язування молекули з мембраною та виконує регуляторні функції — через неї здійснюється взаємодія з регуляторними білками. Два консервативних домени формують у молекулах PLC каталітичний центр. Причому ці домени можуть бути розташовані близько один до одного або розділені великою амінокислотною послідовністю, яка включає ділянки, необхідні для зв'язування з регуляторними білками.

Відповідно до субстратної специфічності та функції PLC можна поділити на три групи:

- 1) **поліфосфоінозитид-специфічні PLC** гідролізують фосфатидилінозитолполіфосфати;
- 2) **неспецифічні PLC** діють на фосфатидилхолін і ряд інших фосфоліпідів (оскільки ферменти цієї групи переважно розщеплюють фосфатидилхолін, їх також називають фосфатидилхолін-специфічні PLC);
- 3) **глікозлфосфатидилінозитол-специфічні PLC (GPI-PLC)** відщеплюють білки (глікопротеїни), заякорені на мембранах за допомогою глікозидних зв'язків через фосфатидилінозитол. GPI-заякорені білки є екстраклітинними і функціонують як ферменти (фосфатази, нітратредуктази), рецептори, що взаємодіють з екстраклітинними лігандами, або матриксні білки клітинної стінки (арабіногалактанпротеїн).

Серед фосфоліпаз С поліфосфоінозитид-специфічні PLC (PI-PLC) займають центральне положення в сигнальних механізмах.

### **Поліфосфоінозитид-залежні фосфоліпази С**

**Регуляція активності.** Всі рослинні PI-PLC містять домени X ( $\approx 170$ а/к) і Y ( $\approx 260$ а/к), які необхідні для фосфоестеразної активності, а також С2-домен на С-термінальній ділянці молекули, через який здійснюється  $\text{Ca}^{2+}$ -залежне зв'язування фосфорильованих форм фосфатидилінозитолу. В молекулі рослинних PI-PLC, крім каталітичного центру, немає інших спеціа-

лізованих ділянок для зв'язування з мембраною. Додатковими ділянками взаємодії PI-PLC з мембранами можуть служити мембранозв'язані сигнальні молекули, через які здійснюється активація та регуляція активності фосфоліпаз.

Рослинні PI-PLC —  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ферменти. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  необхідні не тільки для ефективного зв'язування ферменту з мембраною, вони також впливають на каталіз. У клітинах рослин виявлена активність PI-PLC, що асоційована з мембранами та в розчинній фракції. Для першої характерна активність при мікромолярних концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$ , а для другої — при мілімолярних. Ця особливість є доказом того, що активність PI-PLC модулюється, крім усього, субклітинною локалізацією фосфоліпаз C.

У механізмі регуляції активності PI-PLC важливим є підтримання певного рівня різних ізоформ цих ферментів у тканинах. У різних тканинах спостерігаються відповідні зразки експресії генів PI-PLC. Крім того, гени, що кодують PI-PLC, диференційно експресуються за відповідних зовнішніх умов. Наприклад, під час посухи в листках картоплі рівень транскриптів PLC1 знижується, PLC2 підвищується, а PLC3 залишається незмінним.

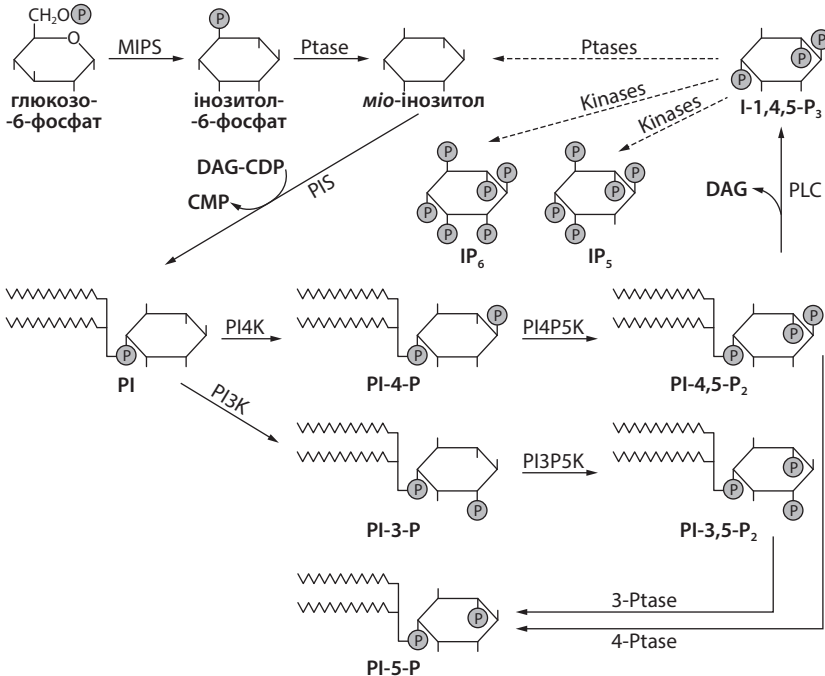
### Фосфатидилінозитол і його похідні

Поліфосфоінозитид-залежні фосфоліпази C розщеплюють різні види фосфатидилінозитидів. Не всі ці субстрати мають сигнальне значення. Ряд ферментів, які контролюють синтез і фосфорилування фосфатидилінозитолу, слід розглядати як сигнальні ензими, оскільки від їх активності залежить концентрація попередників вторинних месенджерів, а отже, ефективність сигнальних механізмів.

**Синтез інозитолу та фосфатидилінозитолу.** У рослин виявлено дев'ять стереоізомерів шестиатомного циклічного спирту інозитолу. Найпоширеніший з них — *міо*-інозитол. Цей ізомер входить до складу мембранних ліпідів і є основою сигнальних інозитолфосфатів. Синтез *міо*-інозитолу здійснюється з глюкозо-6-фосфату. Спочатку *міо*-інозитол-1-фосфат-синтаза (глюкозо-6-фосфат-циклоальдолаза) каталізує утворення *міо*-інозитол-1-фосфату, який потім дефосфорилується інозитол-1-фосфатазою

до *mio*-інозитулу (рис. 34). Під дією фосфатидилінозитол-синтази *mio*-інозитол включається до складу **фосфатидилінозитулу** (PI) — полярного мембранного ліпиду. У цій реакції фосфатидна кислота переноситься від діацилгліцерол-цитидилдифосфату до *mio*-інозитулу. Потім фосфатидилінозитол піддається нековалентним модифікаціям шляхом фосфорилування та дефосфорилування. Фосфорильовані форми PI розщеплюються сигнальними поліфосфоінозитид-залежними фосфоліпазами С.

**Модифікація фосфатидилінозитулу.** Інозитольне кільце фосфатидилінозитулу фосфорилується специфічними кіназами у положеннях 3, 4 і 5. Субстратна специфічність цих кіназ і набори продуктів фосфорилування у рослин і тварин певним чином подібні, проте не є абсолютно ідентичними. Наприклад, у рослин фосфатидилінозитол може бути одночасно фосфорильований тільки у двох положеннях (переважно 4 і 5 або 3 і 5), тоді як у клітинах тварин присутній тричі фосфорильова-



ний PI у положеннях 3, 4 і 5. Друга відмінність полягає в тому, що у рослин інозитол у положенні 3 фосфорилюється тільки у складі фосфатидилінозиту, але не його фосфорильованих похідних — фосфатидилінозитолфосфатів (фосфатидилінозитидів).

В утворенні певних форм фосфатидилінозитолфосфатів беруть участь також специфічні фосфатази, що видаляють фосфатні групи з молекул фосфатидилінозитидів. Узгоджена робота кіназ, фосфатаз, а також фосфоліпаз сприяє підтримці в клітинах певних кількостей сполук, необхідних для функціонування багатьох клітинних процесів, таких як формування, транспорт і докування везикул, залучення до мембрани та модуляція активності ферментів і регуляторних білків, а також передача внутрішньоклітинного сигналу та багатьох інших.

**Фосфатидилінозитол-3-фосфат (PI-3-P)** важливий для трафіку везикул до вакуолі, проліферації клітин та організації ци-

---

**Рис. 34.** Синтез інозиту та фосфатидилінозитол-фосфатів у рослин. Умовні позначення:

DAG-CDP — діацилгліцерол-цитидилдифосфат;

CMP — цитидинмонофосфат;

DAG — діацилгліцерол;

PI — фосфатидилінозитол;

PI-3-P — фосфатидилінозитол-3-фосфат;

PI-4-P — фосфатидилінозитол-4-фосфат;

PI-5-P — фосфатидилінозитол-5-фосфат;

PI-4,5-P<sub>2</sub> — фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат;

PI-3,5-P<sub>2</sub> — фосфатидилінозитол-3,5-дифосфат;

I-1,4,5-P<sub>3</sub> — інозитол-1,4,5-трифосфат;

IP<sub>5</sub> — інозитол-пентаксісфосфат (інозитол-1,2,4,5,6-пентафосфат);

IP<sub>6</sub> — інозитол-гексаксісфосфат (інозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфат);

MIPS — *mio*-інозитол-1-фосфат-синтаза;

Ptase — фосфатаза;

3-Ptase — інозитолліпід-3-фосфатаза;

4-Ptase — інозитолліпід-4-фосфатаза;

Kinases — кінази;

PI3K — фосфатидилінозитол-3-кіназа;

PI4K — фосфатидилінозитол-4-кіназа;

PI3P5K — фосфатидилінозитол-3-фосфат-5-кіназа;

PI4P5K — фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназа;

PIS — фосфатидилінозитол-синтаза;

PLC — фосфоліпаза C

тоскелету. Крім того, PI-3-P є важливим проміжним продуктом синтезу фосфатидилінозитол-3,5-дифосфату (PI-3,5-P<sub>2</sub>). Утворення PI-3-P у рослин каталізується **фосфатидилінозитол-3-кіназою**, яка фосфорилує PI до фосфатидилінозитол-3-фосфату (рис. 34). Розглядається також сигнальна роль PI-3-P. Вважається, що ця сполука, регулюючи рівень АФК у клітинах, опосередковує механізм відкривання продихів, який індукується АБК.

**Фосфатидилінозитол-4-фосфат** (PI-4-P) є переважаючою формою поліфосфоінозитидів у рослин. PI-4-P бере участь у внутрішньоклітинній ротації мембранного матеріалу. Синтезується з фосфатидилінозитулу **фосфатидилінозитол-4-кіназою** (PI4K) (рис. 34). Про важливість ролі цієї сполуки свідчить той факт, що «нок-аут» мутація одного з генів PI4K у *Arabidopsis AtPI4Kb* приводить до інгібування везикулярного транспорту на 50 %. Відомі дві групи ферментів фосфатидилінозитол-4-кіназ: мембранозв'язані (45–55 кД) і більш високомолекулярні, переважно розчинні (110–210 кД). У рослин знайдені тільки мембранозв'язані PI4K.

**Фосфатидилінозитол-5-фосфат** (PI-5-P). Функції цієї сполуки у рослин остаточно не з'ясовані. Утворюється PI-5-P шляхом дефосфорилування фосфатидилінозитол-3,5-дифосфату (PI-3,5-P<sub>2</sub>) або фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату (PI-4,5-P<sub>2</sub>) (рис. 34). Вміст PI-5-P у рослин набагато вище, ніж у тварин. Якщо у тваринних системах концентрація PI-5-P, зазвичай, не перевищує 2 % від загального вмісту фосфатидилінозитол-фосфатів, то у рослин може варіювати в межах від 3 до 18 %.

**Фосфатидилінозитол-3,5-дифосфат** (PI-3,5-P<sub>2</sub>) синтезується з фосфатидилінозитол-3-фосфату (PI-3-P) **фосфатидилінозитол-3-фосфат-5-кіназою** (рис. 34). PI-3,5-P<sub>2</sub> бере участь у функціонуванні вакуолі. Ця сполука використовується для залучення та злиття везикул із тонопластом. За умов осмотичного стресу, зменшується обсяг вакуолі і, відповідно, площа поверхні тонопласта. Це відбивається на ефективності роботи трансмембранних переносників і підтримці трансмембранного градієнта протонів на тонопласті. Як компенсаторний механізм у дріжджів спостерігається фрагментація вакуолі на кілька частин — так збільшується сумарна площа вакуолярної мембрани.



У мутантів, які не синтезують  $PI-3,5-P_2$ , даний механізм порушений. Крім того, цей ліпід стимулює активність вакуолярної  $H^+$ -АТРази. Таким чином, за участю  $PI-3,5-P_2$  контролюється цілісність/фрагментарність вакуолі та підтримується тонопластний градієнт протонів на відповідному рівні. Вважається, що подібний механізм функціонує у рослин.

**Фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат ( $PI-4,5-P_2$ )** є джерелом інозитол-1,4,5-трифосфату ( $IP_3$ ), який утворюється при розщепленні цього ліпиду фосфоліпазою С. Синтез  $PI-4,5-P_2$  каталізується **фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназою** з фосфатидилінозитол-4-фосфату ( $PI-4-P$ ) (рис. 34). Імовірно в геномі *Arabidopsis* кодується 9 генів  $PI-4-P$ -5-кінази. Рівень активності цих ферментів є суттєвим для функціонування фосфоліпаза С-залежного сигналіngu. Активність  $PI-4-P$ -5-кінази значно зростає при зміні зовнішніх умов. Вміст  $PI-4,5-P_2$  у клітинах вищих рослин на порядок нижче, ніж у тварин. Однак це зовсім не означає меншу значущість цієї сполуки для рослин. Низький вміст  $PI-4,5-P_2$  підтримується виключно за рахунок високої активності фосфоліпази С в умовах, за яких стимулюється дана сигнальна система. Концентрація субстрату є основним фактором регуляції активності багатьох ізоформ рослинних фосфоліпаз С, і в ряді випадків, окрім підвищення концентрації  $PI-4,5-P_2$  та оптимальної концентрації іонів  $Ca^{2+}$ , не потрібно інших механізмів активації цих ферментів. Ці особливості регуляції забезпечують високу чутливість фосфоліпаза С-залежної сигнальної системи.

Сигнальна роль  $PI-4,5-P_2$  визначається не тільки тим, що він є попередником вторинного месенджера  $IP_3$ . Деякі фактори транскрипції докуються до плазматичної мембрани через  $PI-4,5-P_2$ . Активація фосфоліпази С приводить до вивільнення регуляторів генної активності, після чого вони мігрують у ядро та модулюють активність генів.

Крім сигнальної ролі, передбачається участь  $PI-4,5-P_2$  у транспорті везикул. Ця сполука, мабуть, регулює динамічний стан актину через профілін (G-актин зв'язуючий білок). Локальне накопичення  $PI-4,5-P_2$  на плазмалемі сприяє сряваному екзоцитозу, внаслідок якого клітина буде рости у певному напрямку. Подібний механізм за участю  $PI-4,5-P_2$  здійснюється при формуванні кореневих волосків і проростанні пилку.

### PI-PLC-опосередкований сигналінг

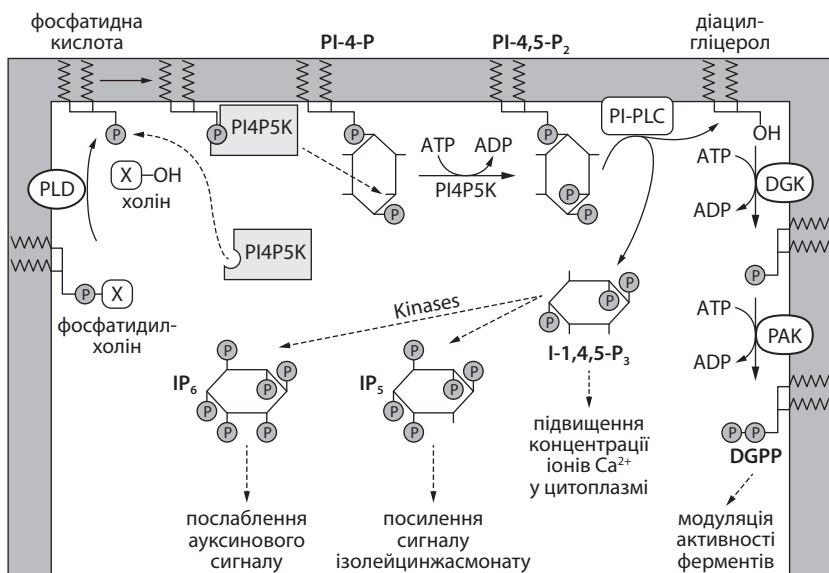
Сигнальний механізм за участю PI-PLC є важливим для відповіді рослин на різні стимули, включаючи осмотичний стрес, АБК, світло, гравітацію, вплив патогенів та забруднення. Під дією цих факторів стимулюється активність поліфосфоінзитид-специфічної фосфоліпази C і фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кінази (PI4P5K) — ключового ферменту синтезу фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату, який є субстратом PI-фосфоліпази C. На функціонування цього сигнального шляху значною мірою впливає фосфоліпаза D. Продукт каталізу PLD — фосфатидна кислота — безпосередньо взаємодіє з фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназою (PI4P5K) і активує її (рис. 35). Збільшення концентрації фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату є основним фактором активації PI-PLC.

PI-PLC розщеплює фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат ( $PIP_2$ ) на інозитол-1,4,5-трифосфат ( $IP_3$ ) і діацилгліцерол (DAG) (рис. 35). У тварин  $IP_3$  зв'язується з  $Ca^{2+}$ -каналами, що стимулюються  $IP_3$  ( $IP_3$ -рецепторами), локалізованими на мембранах ЕПР, і стимулює вивільнення іонів  $Ca^{2+}$ , а DAG бере участь в активації протеїнкінази C. У рослинах не виявлені гомологи мішеней  $IP_3$  тварин ( $IP_3$ -рецептори) та протеїнкінази C. Разом з тим, існують докази того, що мобілізація іонів  $Ca^{2+}$  та кальцієві осциляції відіграють важливу роль у PI-PLC-опосередкованому сигнальному шляху. Сьогодні точний механізм кальцієвих осциляцій в PI-PLC-опосередкованому каскаді рослин не відомий. Якщо  $IP_3$ -чутливі  $Ca^{2+}$ -канали присутні в рослинних клітинах, то вони принципово відрізняються за структурою від подібних молекул тварин. Не виключається можливість того, що  $IP_3$  не має безпосереднього відношення до активації  $Ca^{2+}$ -каналів.

Підвищення рівня іонів  $Ca^{2+}$  в цитоплазмі під впливом PI-PLC, в свою чергу, сприяє стимулюванню PLD. Іони  $Ca^{2+}$  сприяють зв'язуванню PLD з мембранами, внаслідок чого цей фермент активується. Таким чином, ферменти PI-PLC, PLD і PI4P5K створюють позитивну регуляторну петлю.

Крім того, що розщеплення фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату приводить до синтезу різних регуляторів (вторинних мессенджерів), зниження рівня фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату

під дією PI-PLC чинить регуляторну дію іншого плану. По-перше, PI-4,5-P<sub>2</sub> є регулятором низки мембранозв'язаних ферментів, по-друге, ця сполука може служити сайтом для прикріплення до мембрани деяких функціональних білків, у тому числі, білків цитоскелету, ферментів, регуляторів транскрипції. Розщеплення PI-4,5-P<sub>2</sub> приводить до вивільнення таких білків, що сприяє зміні їх локалізації і відбивається на активності. Наприклад, через PI-4,5-P<sub>2</sub> до мембрани приєднується



**Рис. 35.** Сигнальний механізм, опосередкований фосфоліпазами D і C.

Умовні позначення:

PI4P5K — фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназа;

PI-4-P — фосфатидилінозитол-4-фосфат;

PI-4,5-P<sub>2</sub> — фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат;

I-1,4,5-P<sub>3</sub> — інозитол-1,4,5-трифосфат;

IP<sub>5</sub> — інозитол-пентакісфосфат (інозитол-1,2,4,5,6-пентафосфат);

IP<sub>6</sub> — інозитол-гексакісфосфат (інозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфат);

PI-PLC — поліфосфоінозитид-специфічна фосфоліпаза C;

DGK — діацилгліцеролкіназа;

PAK — фосфатідаткіназа;

DGPP — діацилгліцерол-пірофосфат

регулятор генної активності Tubby. Вивільнення цього регулятора внаслідок активації фосфоліпази C дозволяє білку мігрувати у ядро та брати участь у модуляції експресії специфічних генів.

**Похідні інозитол-1,4,5-трифосфату.** Збільшення концентрації  $IP_3$  у рослинних клітинах внаслідок активації PI-PLC стимулює появу різних високофосфорильованих форм інозитулу ( $IP_x$ ) (рис. 34, 35). У рослин, на відміну від тварин, функціонують численні кінази та фосфатази, які беруть участь у метаболизмі  $IP_3$ . Узгоджена робота цих ферментів спрямована на підтримку пулу  $IP_x$  в певному співвідношенні. Для деяких з цих сполук встановлені мішені. **Інозитол-гексакісфосфат** ( $IP_6$ ) зв'язується з F-box рецепторами ауксину, знижуючи чутливість клітин до цього гормону. **Інозитол-пентакісфосфат** (інозитол-1,2,4,5,6-пентафосфат —  $IP_5$ ) зв'язується з F-box рецепторами ізолейцин-жасмонату, полегшуючи їхню взаємодію з гормоном.

Серед високофосфорильованих інозитолів виявлено форми, що містять пірофосфатні групи. Нині обговорюється потенційна роль  $IP_7$  і  $IP_8$  як сигнальних молекул і джерел фосфату для біосинтезу АТФ.

Беручи до уваги кількість різноманітних фосфорильованих інозитолів, можна припустити, що деякі з них пов'язані з регуляцією  $Ca^{2+}$ -каналів.

**Похідні діацилгліцеролу.** Мішені діацилгліцеролу (DAG) в PI-PLC-залежному механізмі у рослин не знайдені. Діацилгліцерол, який утворюється в результаті гідролізу PI-4,5- $P_2$ , фосфорилується **діацилгліцеролкіназою** (DGK) до фосфатидної кислоти (PA) (рис. 35). Механізм регенерації фосфатидної кислоти з DAG дуже поширений у природі та функціонує, зокрема, у тварин. Однак у рослин фосфатидна кислота теж фосфорилується при активації фосфоліпаз C і D. **Фосфатидаткіназа** (PAK) каталізує утворення **діацилгліцерол-пірофосфату** (DGPP). Значення DGPP полягає, насамперед, у послабленні сигналу, який передається через PA. Проте в даний час також не виключається можливість існування мішеней, на які би впливав DGPP. У вищих тварин фосфатидаткіназна активність і присутність DGPP у клітинах не виявлено.

Оскільки не діацилгліцерол, а фосфатидна кислота і, можливо, діацилгліцерол-пірофосфат взаємодіють з даунстрим сигнальними молекулами, то ферменти діацилгліцеролкіназа та фосфатидаткіназа, які послідовно каталізують перетворення  $DAG \rightarrow PA \rightarrow DGPP$ , вважаються важливими сигнальними ферментами в рамках рослинних сигнальних систем. Кількість  $DGPP$  і  $PA$  суворо регулюється та залежить від активності діацилгліцеролкінази, фосфатидаткінази та їх антагоністів — специфічних фосфатаз, які дефосфорилують  $DGPP$  і  $PA$ .

### Коротка схема сигнального механізму, опосередкованого PI-PLC.

1. Активація поліфосфоінозитид-специфічної фосфоліпази C і фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кінази.
2. Розщеплення фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату на інозитол-1,4,5-трифосфат та діацилгліцерол.
3. Синтез низькомолекулярних регуляторів (вторинних месенджерів) із продуктів розпаду  $PI-4,5-P_2$ : високофосфорильованих форм інозитолу, фосфатидної кислоти та діацилгліцерол-пірофосфату.
4. Модуляція активності мішеней вторинними месенджерями.

### Фосфоліпази $A_2$

Фосфоліпази  $A_2$  відщеплюють *sn*-2 ацилефірні зв'язки фосфоліпідів із утворенням вільних жирних кислот і 1-ацил-2-лізофосфоліпідів (рис. 36).

У рослині присутні фосфоліпази  $A_2$  двох основних типів:

- 1) секреторні (secretory) низькомолекулярні фосфоліпази  $A_2$  ( $sPLA_2$ );

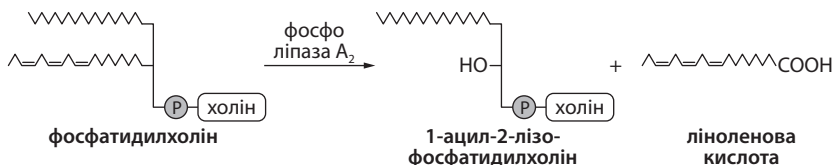


Рис. 36. Реакція, що каталізується фосфоліпазою  $A_2$

2) внутрішньоклітинні (intracellular)  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежні фосфоліпази  $\text{A}_2$  (iPLA<sub>2</sub>).

У тварин виявлені також цитозольні (cytosolic)  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні фосфоліпази  $\text{A}_2$  (cPLA<sub>2</sub>).

Секреторні фосфоліпази  $\text{A}_2$  мають низьку молекулярну масу (14 кД) і виявляють оптимальну активність за мілімолярних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ . Із тканин декількох видів рослин (рис, гвоздика, в'яз) були виділені та клоновані кДНК, які відповідали генам секреторних фосфоліпаз  $\text{A}_2$ . Аналіз послідовності цих ДНК показав наявність декількох дисульфідних зв'язків та сигнального пептиду, що визначає секреторні властивості молекули ферменту.

Внутрішньоклітинні фосфоліпази  $\text{A}_2$  (iPLA<sub>2</sub>) становлять групу, що включає мембранозв'язані та цитозольні ферменти з молекулярною масою 40–48 кД. Усі відомі рослинні iPLA<sub>2</sub> переважно відщеплюють лінолеву та ліноленову групи, що знаходяться в *sn*-2 положенні фосфатидилхоліну. Ці ферменти стимулюються кальмодуліном, у відсутності якого не реагують на зміну концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Каталіз.** Внутрішньоклітинні та секреторні фосфоліпази  $\text{A}_2$  мають різний механізм дії.

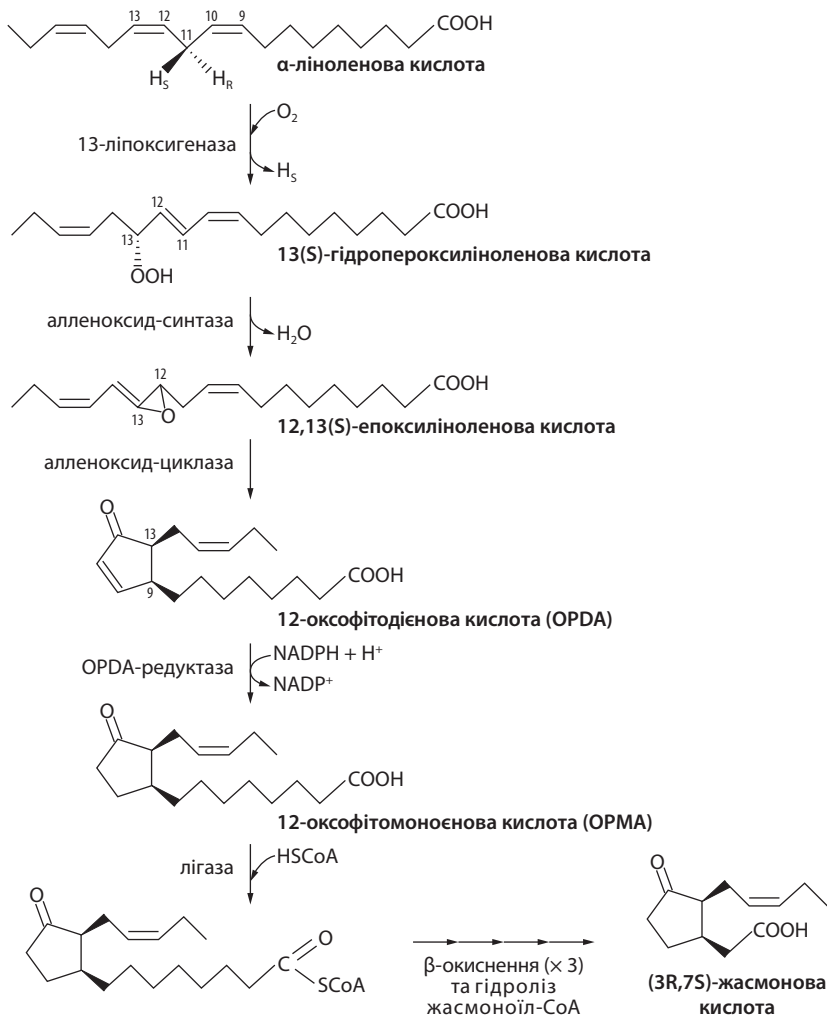
Внутрішньоклітинні фосфоліпази  $\text{A}_2$  гідролізують ацил-ефірний зв'язок у двофазовій реакції через утворення ацил-ферментного посередника. Ацил приєднується до залишку серину, який знаходиться в консенсусній послідовності GXSXG. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  не беруть безпосередньої участі у каталізі, проте вони необхідні для кальцинування кальмодуліну — активатора ферменту.

Секреторні фосфоліпази  $\text{A}_2$  безпосередньо використовують іони  $\text{Ca}^{2+}$  в активації. У молекулі ферменту є консервативні  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі центри (EF-руки). Зв'язування кальцію стабілізує перехідний стан молекули, необхідний для прояву активності. Секреторні фосфоліпази  $\text{A}_2$  не мають GXSXG послідовності та не утворюють ацил-ферментного посередника. В механізм каталізу sPLA<sub>2</sub> залучається залишок гістидину й аспартату, які поляризують молекулу води, а потім поляризована  $\text{H}_2\text{O}$  атакує карбонільну групу.

### Октадеканоїдний шлях

Рослинні PLA<sub>2</sub> регулюють, головним чином, октадеканоїдний шлях, в якому з ліноленової кислоти утворюються жасмонат та інші оксиліпіни (рис. 37). На відміну від інших ефекторів, головна сигнальна функція PLA<sub>2</sub> полягає в каталізі синтезу не власне вторинних месенджерів, а попередників для синтезу інших регуляторів. Іншими словами, PLA<sub>2</sub> поставляють субстрат для октадеканоїдного шляху.

**Механізм октадеканоїдного шляху.** Синтез жасмонової кислоти стимулюється різними зовнішніми сигналами через активацію фосфоліпази A<sub>2</sub> та ліпоксигенази. A<sub>2</sub> відщеплює жирнокислотний залишок у положенні *sn*-2 від молекули мембранного фосфоліпіду. У цьому положенні, зазвичай, локалізуються жирні кислоти з високим ступенем ненасиченості, а найчастіше — ліноленова. Ліпоксигеназа вводить у молекули вільних високоненасичених жирних кислот пероксидну групу, специфічно впізнаючи пентадієнову систему (п'ять атомів і два подвійні зв'язки). У структурі ліноленової кислоти можна виділити дві пентадієнові системи, що включають атоми вуглецю з номерами 9–13 та 12–16. Пентадієнова система, що розпізнається 13-ліпоксигеназою, сформована атомами від C-9 до C-13. Ліпоксигеназа відщеплює 11-про-S-атом водню (H<sub>S</sub>) від C-11 і приєднує молекулу кисню до C-13 у вигляді пероксидної групи (рис. 37). У результаті утворюється подвійний 11-транс-зв'язок (між атомами C-11 і C-12). Далі фермент аллен-оксид синтаза (гідропероксид-дегідратаза) відщеплює від 13-гідроксипероксиліноленової кислоти гідроксил з утворенням епоксидної групи із залученням атомів C-12–C-13. 12-13-епоксиліноленова кислота за рахунок каталітичної активності ферменту аллен-оксид циклази формує пентациклічну структуру, утворюючи зв'язок між C-9 і C-13. У результаті циклізації епоксидний кисень зберігає зв'язок тільки з C-12 і стає киснем кето-групи в молекулі 12-оксофітодієнової кислоти. Подвійний зв'язок у циклі (C-10–C-11) насичується NADPH-залежною редуктазою. При цьому утворюється 12-оксофітомоноєнова кислота, з якої у результаті трьох етапів β-окиснення (молекула втрачає при цьому 6 атомів Карбону) синтезується жасмонова кислота.



**Рис. 37.** Синтез жасмоної кислоти — октадеканоїдний шлях

Октадеканоїдний шлях може ініціюватися не тільки в результаті фосфоліпазної реакції, але й шляхом ліпоксигенування ліпід-зв'язаних жирнокислотних залишків ліноленової кис-



лоти. Фосфоліпази  $A_2$  при виборі субстрату віддають перевагу мембранним ліпідам, які у *sn*-2 положенні мають не тільки залишки ліноленової кислоти, але й незвичайних жирних кислот, принаймні переокислених. Тому переокислений залишок ліноленової кислоти вибірково відщеплюється від ліпіда та піддається подальшим змінам з утворенням жасмонової кислоти.

Жасмонова кислота є фізіологічно слабоактивною сполукою і переважно використовується рослинами як транспортна форма, що пересувається флоемою. Обробка рослин жасмоновою кислотою чинить специфічну дію, оскільки, потрапляючи в тканини, ця речовина метаболізується до активної форми. Чи існує у рослин сигнальний механізм, який регулюється власне жасмоновою кислотою, досі невідомо.

Жасмонова кислота в рослинних тканинах піддається ковалентній модифікації шляхом кон'югування з різними сполуками (спиртами, амінокислотами). Ізолейцин-жасмонат, продукт кон'югації жасмонової кислоти з ізолейцином, вважається фізіологічно активною формою (рис. 38). Інший відомий кон'югат — метиловий ефір жасмонової кислоти є летючою сполукою. Метилжасмонат, як і жасмонова кислота, виконує транспортні функції, але поширюється не флоемою, а через повітря. До того ж, комунікація за допомогою метилжасмоната здійснюється не тільки між просторово віддаленими органами однієї рослини, але й між окремими рослинами. Проникаючи в тканини, метилжасмонат розщеплюється естеразами до вільної жасмонової кислоти, яка в подальшому перетворюється на активну форму.

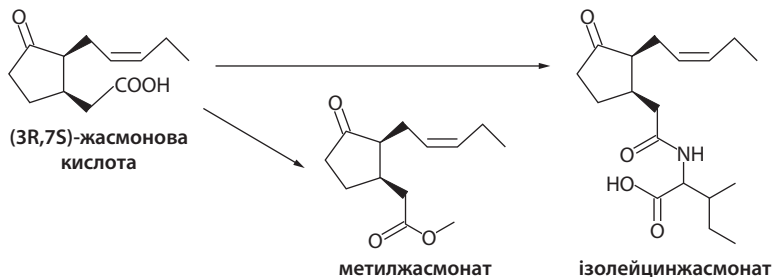


Рис. 38. Похідні жасмонової кислоти

### Функції фосфоліпази $A_2$

Продукти октадеканоїдного шляху беруть участь у регуляції відповідних реакцій на механічні пошкодження та вплив патогенів. У результаті дії цих стресорів у рослинах спостерігається зростання активності  $PLA_2$  і, як результат, системне накопичення лізофосфоліпідів і вивільнення поліненасичених жирних кислот (переважно ліноленової), які піддаються дії ліпоксигеназ і залучаються до октадеканоїдного шляху. У стресованих клітинах  $PLA_2$  можуть опосередковувати механізми генерації активних форм кисню та синтезу алкалоїдів. Активацію  $PLA_2$  можна продемонструвати у відсутності стресу, але під дією системіну або олігосахаринів.

Крім стресових реакцій, фосфоліпази  $A_2$  беруть участь в інших клітинних процесах: метаболізмі ліпідів і ауксин-стимульованому рості.  $PLA_2$ -подібна активність переважно спрямована на відщеплення не тільки високоненасичених жирних кислот, але і другорядних або рідкісних. Такі жирні кислоти перерозподіляються із мембранних фосфоліпідів до запасних триацилгліцеролів. Таким чином,  $PLA_2$  беруть участь у накопиченні запасних ліпідів. На насінні огірка показано, що  $PLA_2$  локалізуються у сферосомах сім'ядолей і беруть участь у катаболізмі та утилізації запасних ліпідів у процесах проростання насіння та росту проростків.

Різні сигнальні шляхи (стрес- або ауксин-індуковані), вірогідно, залучють різні типи  $PLA_2$ . Так, інгібітор внутрішньоклітинних фосфоліпаз  $A_2$  HELSS гальмує ауксин-індуковане подовження гіпокотила цукіні та колептилів кукурудзи, а інгібітор системін-індукованих  $PLA_2$  AACOCF3 виявився неефективним щодо ростових реакцій.

### Фосфоліпази $A_1$ і В, лізофосфоліпази А

Фосфоліпази  $A_1$  гідролізують *sn*-1 ацилефірні зв'язки фосфоліпідів з утворенням вільних жирних кислот і 2-ацил-1-лізофосфоліпідів. Фосфоліпази В послідовно видаляють два залишки жирних кислот з молекул фосфоліпідів, тобто мають активність  $PLA$  і  $lysoPLA$ . Лізофосфоліпази А розщеплюють ацилефірний зв'язок у молекулах лізофосфоліпідів, утворюючи при цьому жирну кислоту та гліцерин-3-фосфоалкоголь.

Лізофосфоліпіди присутні в біологічних мембранах у незначних кількостях, але разом з тим, виконують важливі регуляторні функції: трансдукцію внутрішньоклітинних сигналів і транспорт везикул. У тварин формування лізофосфатидної та фосфатидної кислот відбувається специфічно в шийці синаптичних везикул, що формуються, тобто перехід *лізофосфатидна кислота*  $\Leftrightarrow$  *фосфатидна кислота* є необхідним для брунькування мембран.

У рослинах лізофосфоліпіди формуються у відповідь на стресові впливи та модулюють активність ряду ферментів. Лізофосфатидилхолін, наприклад, може безпосередньо взаємодіяти з  $H^+$ -АТРазою плазматичної мембрани, стимулюючи її активність. Лізофосфатидилетаноламін затримує старіння, можливо, шляхом інгібування PLD.

Лізофосфоліпази, отже, є важливими компонентами, які необхідні в регуляції рівня лізофосфоліпідів, ліпідному сигнальному каскаді та метаболізмі.

## Взаємодія фосфоліпаз

Вивчення накопичення продуктів ліпідного обміну в стресових умовах показало, що підвищення кількості фосфатидної кислоти передуює зростанню рівня діацилгліцеролу, вільних жирних кислот, пероксидованих жирних кислот і лізофосфоліпідів, тоді як репресія PLD $\alpha$  приводила до зниження стрес-індукованого накопичення ліноленової кислоти та жасмонатів. Отже, фосфоліпази D, які продукують фосфатидну кислоту, можуть стимулювати активацію інших ферментів катаболізму ліпідів.

Ферменти ліпідного сигнального каскаду часто формують складні мережі, які опосередковують специфічну клітинну відповідь. Прикладом такої взаємодії є участь фосфоліпаз C, D і A<sub>2</sub> в регуляції продихової транспірації. PLD і фосфатидилінозитид-залежні PLC (PI-PLC) опосередковують закривання продихів, тоді як PLA<sub>2</sub> стимулюють їхнє відкривання. Під впливом PI-PLC запускається каскад реакцій (синтез інозитол-1,4,5-трифосфат і його похідних), який приводить до підвищення рівня іонів Ca<sup>2+</sup> в цитоплазмі. Іони Ca<sup>2+</sup> сприяють

зв'язуванню PLD з мембранами, внаслідок чого цей фермент активується. Продукт каталізу PLD — фосфатидна кислота — активує фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназу (PI4P5K), яка бере участь у продукції фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату — субстрату для PI-PLC (рис. 35). Таким чином, PI-PLC, PLD і PI4P5K створюють позитивну регуляторну петлю. З іншого боку, фосфоліпази  $A_2$  можуть виступати антагоністами PLD і PI-PLC, тому що, крім високоненасиченої ліноленової кислоти, з якої генеруються жасмонат та інші оксиліпіни, продуктами каталітичної активності PLA<sub>2</sub> є лізофосфоліпіди, які інгібують PLD.

### 3.2.2. Оксид азоту (II) та NO-сигналінг

#### Оксид азоту

Оксид азоту (NO) є повсюдно поширеною біоактивною молекулою. NO і його похідні здатні модулювати активність своїх мішеней, зв'язуючи метали редоксцентрів металопротейнів, або шляхом ковалентної модифікації залишків цистеїну та тирозину.

Раніше передбачалося, що присутність оксидів азоту в живих тканинах є результатом пошкоджень або забруднення, тому початкові дослідження ще 1980-і роки були сфокусовані на фітотоксичних властивостях різних форм оксидів азоту та їх несприятливу дію на металовмісні ферменти та на розвиток рослин у цілому. Проте невдовзі було з'ясовано, що значні кількості NO і N<sub>2</sub>O продукуються незабрудненими ґрунтовими та водними екосистемами, які вносять основний внесок у процес природної деструкції озонного шару. У 1990 році з'явилося перше повідомлення про стимулюючу дію оксиду азоту на рослинний організм: NO прискорював проростання насіння павлонії повстяної (*Paulownia tormentosa*). Наразі достовірно встановлено, що оксид азоту (II) широко використовується в живій природі як вторинний месенджер — ця сполука є компонентом сигнальних механізмів, які контролюють захисні реакції, процеси розвитку, проліферацію клітин та багато іншого.

## Хімічні та антиоксидантні властивості NO

Оксид азоту є вільно-радикальною ліпофільною двоатомною молекулою. Невеликий радіус і електронейтральність дозволяють молекулі NO ефективно дифундувати у клітині, а також проникати через мембрани.

Молекула NO має неспарений електрон на  $\pi$ -розрихлюючій орбіталі, що визначає її вільно-радикальні властивості та реакційну здатність. Видалення цього електрона приводить до утворення іона нітрозонія ( $\text{NO}^+$ ), а додавання одного електрона — до утворення нітроксиланіона ( $\text{NO}^-$ ) (рис. 39, с. 123). Наявність неспареного електрона забезпечує високу швидкість взаємодії NO з молекулярним киснем і супероксидом ( $\text{O}_2^-$ ), похідними азоту та металами з перехідною валентністю  $\text{Me}^{+/2+}$ . У біологічних системах за взаємодії NO із молекулярним киснем утворюються інші оксиди із загальною формулою  $\text{NO}_x$ . Взаємодія NO із супероксидом ( $\text{O}_2^-$ ) приводить до утворення пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ), а при взаємодії з металами ( $\text{Me}^{+/2+}$ ) — метал-NO похідних. Стабільність або розпад NO залежить від його концентрації, окислювально-відновного статусу системи та концентрації молекул-мішеней і металів.

Реакційна здатність NO лежить в основі NO-залежних регуляторних механізмів, але разом з тим NO може впливати на окислювально-відновний гомеостаз клітини незалежно від сигнальних механізмів. Залежно від умов оксид азоту NO може виявляти як антиоксидантні, так і токсичні властивості.

Реакція між перекисом водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) та іонами редокс-активних металів часто приводить до утворення гідроксил-радикала ( $\text{OH}^\bullet$ ). Це сильний окислювач, який здатний окислювати чимало біомолекул. Присутність NO може послабити окисне пошкодження, запобігаючи формуванню оксидантів, зв'язуючи залізо та супероксиди, обмежуючи таким чином формування гідроксил-радикала. Було продемонстровано, що NO затримує також переокиснення ліпідів. Цитозахисні властивості NO у рослин спостерігаються при біотичних й абіотичних стресах, у тому числі при фотоокисненні. У ряді випадків, наприклад при фотоокисненні листя картоплі, або за гіберелін-опосередкованому підвищенні АФК у клітинах алейронового шару

насіння ячменю при проростанні, захисні властивості NO виявляються без активації антиоксидантних ферментів і генів, які їх кодують. Однак в умовах окислювального стресу, за якого в клітині накопичується значна кількість АФК, активуються NO-опосередковані захисні системи.

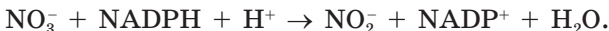
NO може чинити також і токсичну дію. Головним чином це спостерігається при реакції NO із супероксид аніоном ( $O_2^-$ ), яка приводить до утворення сильного окислювача пероксинітри (ONOO<sup>-</sup>). Пероксинітри може окислювати тіольні групи до сульфонових і сульфенових кислот. Окрім того, пероксинітри може нітрувати фенільну групу тирозинових залишків. Це запобігає фосфорилуванню тирозину та порушує функціональні властивості білків. Тим не менш, нітрування тирозину широко використовується для модуляції активності посередників у сигнальних системах.

## Шляхи утворення NO

У рослинних клітинах синтез NO здійснюється різними способами. До регульованих процесів належать ферментативні шляхи утворення. Оксид азоту NO утворюється в тканинах живих організмів з органічних і неорганічних субстратів. До субстратів ферментів, які синтезують NO, належать нітрати, нітри, аргінін і поліаміни.

### Нітрат/нітри-залежні ферментативні шляхи

**Нітрат-редуктаза.** Ферментативне утворення NO у рослин головним чином пов'язане з активністю нітрат-редуктази (NR). NR — розчинний цитозольний фермент, який відіграє ключову роль в утилізації неорганічного азоту у формі нітратів. Нітрат-редуктаза бере участь у відновленні нітрат-аніонів до нітритів:

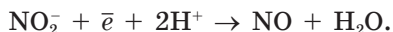


Нітри не накопичуються в рослинних тканинах, а відновлюються надалі нітри-редуктазою до амонійної форми, яка далі включається до складу органічних сполук.

Нітрат-редуктаза є складною редокс-системою із внутрішнім коротким ланцюгом переносу електронів. Активна нітрат-

редуктаза є гомодимером із масою близько 200 кД. Кожна із субодиниць містить три простетичні групи: FAD, цитохром b і Мо-молібдоптерін. Каталіз пов'язаний з переносом пари електронів від NAD(P)H через FAD, гемове залізо та молібден на NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

У 1979 році Л. Клеппером (L. Klepper) була виявлена здатність нітрат-редуктази продукувати NO. Однак з'ясування особливостей каталізу синтезу NO і значення цього процесу стало можливим значно пізніше. Виявилось, що NR може відновити NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (продукт нітрат-редуктазної реакції) до оксиду азоту (II). Реакція являє собою одноелектронне відновлення нітрит-аніону (відновлювачем виступає NAD(P)H):



Ця активність ферменту є контрольованим процесом і регулюється шляхом фосфорилювання. Нітрат-редуктаза забезпечує базальний рівень NO в усіх тканинах рослини та має важливе значення для розвитку стресових реакцій. Було показано, що у мутантних рослин, які не проявляють нітрат-редуктазної активності, порушений АБК-залежний механізм закривання продихів. З цього був зроблений висновок, що NR-опосередкований синтез NO є важливим етапом АБК-залежної регуляції стану замикаючих клітин продихів.

**Нітрит-NO редуктаза.** На початку 2000-х років у рослин тютюну був виявлений плазмалемний фермент, який каталізує відновлення NO<sub>2</sub><sup>-</sup> до NO виключно в корневих тканинах — нітрит-NO редуктаза (Ni-NOR). Активність цього ферменту координується із плазмалемоз'язаною нітрат-редуктазою: Ni-NOR відновлює нітрит-аніони, утворені нітрат-редуктазою. Цей шлях синтезу може залучатися в механізми розвитку, а також у відповідь на недолік кисню та симбіотичні взаємодії.

### Аргінін-залежні шляхи синтезу

**NO-синтаза.** У ссавців утворення NO каталізується, головним чином, NO-синтазою (NOS). Цей фермент є гем-вмісним білком, який містить чотири простетичні групи: залізо-протопорфірин IX, тетрагідробіоптерин, FAD і FMN. Активний фермент NOS являє собою гомодимер із молекулярною масою близько

260 кД. Він каталізує п'ятиелектронне окиснення термінальної аміногрупи L-аргініну за участю молекулярного кисню та з утворенням цитруліну і NO.



Активність деяких ізоформ NO-синтази залежить від кальмодуліну, зв'язування якого здійснюється через специфічний сайт. У тканинах людини NO-синтаза була виявлена у трьох основних ізоформах: двох конститутивних та індукцйбельній. Конститутивна форма NOS присутня постійно в нервовій тканині (нейрональна NOS — nNOS) та ендотелії (ендотеліальна NOS — eNOS). Індукцйбельна форма (iNOS) синтезується при активації імунної системи та відіграє центральну роль у розвитку імунної відповіді. Конститутивні форми nNOS і eNOS є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними, а індукцйбельна форма iNOS —  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежна.

Аналіз послідовності ДНК показав, що в рослин немає білків, близьких за структурою до NO-синтази ссавців. Хоча використання антитіл до NOS і специфічних інгібіторів цього ферменту дозволяє припускати наявність NOS-подібної активності в рослинних тканинах, стверджувати про існування NOS-подібного ферменту у рослин з повною впевненістю не можна. Імуноферментний та інгібіторний аналізи, спрямовані на ідентифікацію NOS у рослин, можуть давати позитивні відповіді в тому випадку, якщо антитіла та інгібітори зв'язуються з ферментами, які використовують L-аргінін як субстрат, і їх активність побічно пов'язана з продукцією NO.

Пошук ферментів з NO-синтазною активністю був здійснений серед білків, не гомологічних до NOS ссавців, але схожих на білки, залучені в синтез NO у тварин і організмів інших таксономічних груп. У *Arabidopsis* був клонований ген AtNOS1, який кодує мітохондріальний фермент, який схожий з білком, що має відношення до синтезу NO у червоногого м'яса *Helix pomatia*. Хоча генетичний підхід показав, що білок AtNOS1 є головним джерелом NO, це припущення не підтвердилося, і наразі AtNOS1 розглядається як мітохондріальна GTPаза, яка бере участь у біогенезі рибосом і/або синтезі білків і не має прямого відношення до синтезу NO.



**Поліамін-залежний шлях утворення.** У рослин є ферменти, які каталізують перетворення L-аргініну і непрямим чином пов'язані із синтезом оксиду азоту. Наприклад, у рослин *Agrobidopsis* поліаміни спермін і спермідін викликають значне посилення продукції оксиду азоту, тоді як порушення синтезу поліамінів відбивається на зниженні синтезу NO. Припускають, що існує фермент, який конвертує поліаміни в NO. У той же час власне поліаміни утворюються з аргініну за участю аргінін-зв'язуючих ферментів, таких як аргіназа або аргінін-декарбоксилаза. Оскільки аргіназа, аргінін-декарбоксилаза і NO-синтаза використовують аргінін як субстрат, вони мають частково подібні властивості. Зокрема, активність всіх цих ферментів репресується структурними аналогами L-аргініну. Крім того, вони мають певну схожість в області реакційних центрів, тому можуть давати позитивну відповідь на застосування однакових антитіл. Спроба впливати в експерименті на NOS-подібну активність рослин, наприклад, використовуючи структурні аналоги L-аргініну, приводить до модуляції активності ферментів поліамін-залежного шляху синтезу NO. Якщо у тварин NO-синтаза забезпечує пряму конвертацію аргініну в NO, то в поліамін-залежному механізмі з аргініну синтезуються поліаміни, які далі перетворюються в NO:



Вважають, що поліамін-залежний шлях у рослин забезпечує істотну частину синтезованого в рослинних тканинах NO.

### **Нітрит-залежні неферментативні шляхи**

У біологічних системах NO може генеруватися неферментативним шляхом із нітритів. У рослинах виявлено кілька можливих способів хімічного відновлення  $\text{NO}_2^-$  до NO без участі ферментів:

- 1) в апопласті при низьких значеннях рН (ця реакція *in vitro* може каталізуватися аскорбіною кислотою);
- 2) за світлозалежної конверсії каротиноїдів у хлоропластах;
- 3) у мітохондріях відновлення  $\text{NO}_2^-$  до NO може відбуватися при використанні електронів з електрон-транспортного ланцюга.

Неферментативні шляхи відновлення нітритів роблять певний внесок у загальний вміст NO, проте основними шляхами є ферментативні механізми утворення.

## NO-сигналінг

Оксид азоту NO — унікальна низькомолекулярна сполука, що має властивості класичного вторинного месенджера. NO є короткоіснуючою молекулою з низькою молекулярною масою, яка здатна легко дифундувати у тканинах, проникаючи в клітини через мембрани без участі спеціалізованих переносників. Реакційна здатність дозволяє NO зв'язуватися зі своїми мішенями — сигнальними посередниками — і модулювати їх активність. Важливими посередниками передачі сигналу, поряд з NO, є іон нітронія ( $\text{NO}^+$ ) і продукт взаємодії NO із супероксидом ( $\text{O}_2^-$ ) — пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ).

Відомі три основних механізми, за допомогою яких NO і його похідні модулюють активність внутрішньоклітинних мішеней (рис. 39).

1. **Нітрозилування металів.** NO комплексується з металовмісними білками, безпосередньо модулюючи їх активність.
2. **S-нітрозилування цистеїну.** Іон нітронія ( $\text{NO}^+$ ) формує з тіоловими групами цистеїну S-нітрозотіол ( $\text{RS-NO}$ ).
3. **Нітрування тирозину.** Взаємодія пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ) із залишком тирозину приводить до нітрування його ароматичного кільця.

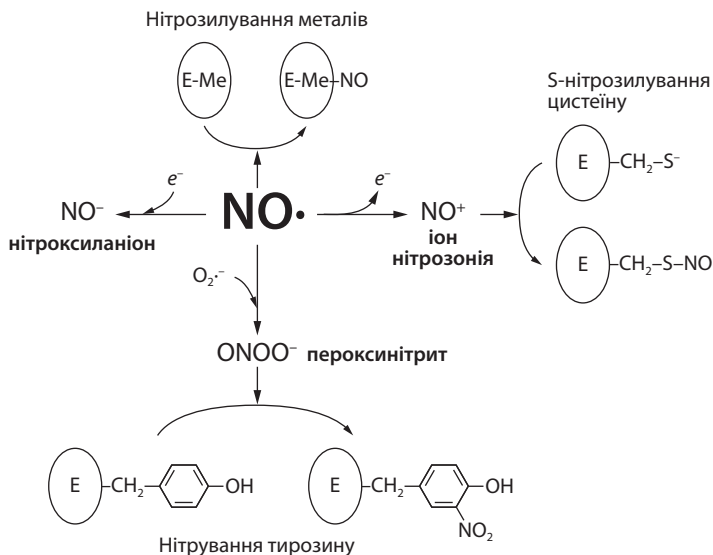
## Нітрозилування металів

Вперше здатність NO модулювати активність ферментів була показана у клітинах гладкої мускулатури ссавців на прикладі гуанілатциклази. Цитоплазматична гуанілатциклаза каталізує синтез циклічного GMP (сGMP), який регулює активність сGMP-залежних мішеней, у тому числі кіназ. Модуляція активності розчинної гуанілатциклази ссавців здійснюється шляхом зв'язування NO з гемом. У результаті утворюється феро-нітрозил-гемовий комплекс, необхідний для активації ферменту. Гуанілатциклаза тварин є гетеродимером, що складається із суб-

одиниць  $\alpha$  і  $\beta$ . Обидві субодиниці необхідні для прояву каталітичної активності та мають N-кінцеві регуляторні та C-кінцеві каталітичні домени. До складу регуляторних доменів субодиниць входить гемова група, нековалентно зв'язана з білком.

У рослин не було виявлено гомологів гуанілатциклази, які регулюються оксидом азоту, проте існує чимало металовмісних, у тому числі гемовмісних, рослинних ферментів, активність яких потенційно може регулюватися NO. Виявлено, що оксид азоту взаємодіє з ліпоксигеназами, мітохондріальною та цитозольною аконітазами, каталазою, аскорбат-пероксидазою, цитохром с-оксидазою шляхом нітрозилювання металів. Утворення нітрозил-метал-ферментного комплексу приводить до інактивації зазначених ферментів.

Інактивація цитохром с-оксидази знижує інтенсивність потоку електронів через дихальний ланцюг і, відповідно, пригнічує синтез АТФ у мітохондріях. За цих умов потік електронів може перерозподілятися до альтернативних термінальних оксидаз. Функціонування альтернативних переносів електронів



**Рис. 39.** Механізми NO-сигналізації (за Besson-Bard et al., 2008 зі змінами)

значно знижує продукцію АТФ, але водночас істотно зменшує ризик утворення активних форм кисню.

Серед мішеней NO є неферментативні білки. Наприклад, у корневих бульбочках бобових з оксидом азоту взаємодіє симбіотичний білок легемоглобін (Lb) з утворенням нітрозил-легемоглобінового комплексу (Lb-Fe<sup>II</sup>NO). Легемоглобін бере участь у транспорті кисню в бактеріоїди, формуючи оборотну форму оксилегемоглобіну (Lb-Fe<sup>II</sup>O<sub>2</sub>). При взаємодії з киснем може також утворитися ферілегемоглобін (LbFe<sup>IV</sup>). Ці форми (Lb-Fe<sup>II</sup>O<sub>2</sub> і LbFe<sup>IV</sup>) здатні ефективно очищати цитозоль від NO та пероксинітриту (ONOO<sup>-</sup>), формуючи нітрати і LbFe<sup>III</sup>. Форма LbFe<sup>III</sup> ефективно перетворюється на Lb-Fe<sup>II</sup>O<sub>2</sub>. Вважають, що ці реакції мають захисну дію на функціонально активні бульбочки та беруть участь у циклічному обертанню Lb-Fe<sup>II</sup>O<sub>2</sub>.

Деякі несимбіотичні гем-вмісні (Hb) білки здатні конвертувати NO в нітрат NAD(P)H-залежним способом. Зниження внутрішньоклітинного рівня NO при різних стресах є основною захисною функцією Hb-білків в адаптивних реакціях рослин.

### S-нітрозилування цистеїну

У рослин ідентифіковано значну кількість білків, які піддаються оборотному S-нітрозилуванню. Ці білки залучені до різних функцій клітин, таких як метаболізм, фотосинтез, регуляція окисно-відновного балансу, адаптивні реакції та ін. Процес S-нітрозилування цистеїну відбувається спонтанно неферментативним шляхом, але для ефективного нітрозилування залишків цистеїну необхідне відповідне амінокислотне оточення цистеїну. Певне розташування кислотних та основних мотивів може полегшити або, навпаки, ускладнити нітрозилування. Існує три можливих варіанти:

- 1) S-нітрозилування відбувається конститутивно за фонових концентрацій NO;
- 2) S-нітрозилування відбувається за підвищених концентрацій NO, тобто внаслідок індукції синтезу оксиду азоту;
- 3) S-нітрозилування не відбувається за жодих умов.

Залежно від положення цистеїну у поліпептидному ланцюгу його нітрозилування може по-різному відбиватися на стані та активності білка.

Нітрозилування є переважно оборотною модифікацією, що дозволяє використовувати її в механізмах передачі внутрішньоклітинних сигналів. Денітрозилування відбувається у відновних умовах за участю глутатіону (GSH). При цьому утворюється нітрозоглутатіон (GSNO), який потім окислюється нітрозоглутатіон-редуктазою (GSNOR) до глутатіон-дисульфіді та іону амонію. Слід зауважити, що за певних умов нітрозоглутатіон може бути отриманий при взаємодії NO з глутатіоном, а потім використовуватися як донор NO для нітрозилування білків. Таким чином, нітрозилування та денітрозилування здійснюються спонтанно неферментативних шляхом, при цьому зміщення рівноваги у бік денітрозилування за відновних умов забезпечується нітрозоглутатіон-редуктазою, яка відіграє ключову роль у виключенні S-нітрозотіол-опосередкованого сигналу.

Істотність S-нітрозилування в механізмі регуляції активності була показана для деяких рослинних білків.

Одним з об'єктів нітрозилування є **метіонін-аденозилтрансфераза (MAT)** — фермент який каталізує синтез S-аденозилметіоніну. Ця сполука використовується як джерело метильної групи в реакціях трансметилування і є попередником у біосинтезі етилену та поліамінів. У *Arabidopsis* виявлено три ізоформи метіонін-аденозилтрансферази (MAT1-MAT3). Активність MAT1 в результаті S-нітрозилування знижується на 30 %, а MAT2 і MAT3 практично не реагують на NO. Показано, що у MAT1 нітрозилується цистеїн-114, який розташовується безпосередньо біля субстрат-зв'язуючого центру. Аналогічний залишок цистеїну у MAT2 і MAT3 відсутній. S-нітрозилування MAT1, мабуть, є механізмом через який здійснюється взаємодія між етиленовим і NO-сигналами.

Блок **метакаспаза 9** (*Arabidopsis thaliana* metacaspase 9 — AtMC9), який бере участь у механізмах апоптозу, конститутивно нітрозилується переважно по цистеїну-147, розташованого в каталітичному домені. Ця ковалентна модифікація підтримує AtMC9 у неактивному стані. За активації апоптозного шляху AtMC9 піддається дії регуляторної протеази. У результаті часткового протеолізу конформація AtMC9 змінюється так, що інший цистеїн-29 просторово замінює цистеїн-147 у каталітичному центрі. Цистеїн-29 бере участь у протеолітичній

реакції, що каталізується AtMS9, і при цьому не піддається нітрозилуванню, яке не відбувається через відсутність відповідних послідовностей, що полегшують нітрозилування. Активация AtMS9 відбувається одноразово та необоротно, оскільки білок не може повернутися у початковий стан.

Гліколітичний фермент **3-фосфогліцеральдегід-дегідрогеназа (ЗФГА-ДГ)** також піддається S-нітрозилуванню. Ця модифікація провокує структурні зміни молекули, які приводять до інактивації ферменту, а також підвищують його здатність до взаємодії з іншими білками. Мішені, з якими взаємодіє S-нітрозильована ЗФГА-ДГ, і значення цього механізму у рослин не з'ясовано. Однак відомо, що у ссавців нітрозилування ЗФГА-ДГ, крім інактивації цього ферменту, стимулює його зв'язування з убіквітинуючою лігазою Siah1. Ця взаємодія сприяє переносу лігази Siah1 у ядро, де вона убіквітинуює ядерні мішені та стимулює їх деградацію, включаючи таким чином механізм апоптозу — запрограмованої загибелі клітин.

### Нітрування тирозину

Донедавна нітрування тирозину розцінювали як ознаку окислювального стресу, який спричинює втрату нітрованими білками своїх функцій. До того ж відомо, що деякі нітровані білки мають підвищену чутливість до протеолізу. Мішені нітрування та функціональне значення цієї модифікації у рослин досі не з'ясовані. Проте наразі продовжують накопичуватися дані про те, що нітрування тирозину має важливе регуляторне значення. З'явилися також дані про оборотність цієї модифікації. Усе це дозволяє зі значною долею впевненості припустити, що процес нітрування залишків тирозину використовується в природі як повноцінний сигнальний механізм.

### Зв'язок NO і Ca<sup>2+</sup>-сигналів

NO і Ca<sup>2+</sup>-залежні сигнальні шляхи тісно взаємопов'язані між собою. Стимуляція синтезу NO приводить до підвищення концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> в цитоплазмі за рахунок активації мембранних кальцієвих каналів, які локалізовані у плазмалемі та внутрішніх мембранах, головним чином у тонопласті та ЕПР.

Існують два основні механізми впливу NO на кальцієві канали:

- 1) прямий — шляхом нітрозилування каналів;
- 2) непрямий — опосередкований вторинними месенджерами циклічним гуанозинмонофосфатом (сGMP) і циклічною аденозиндифосфатрибозою (сADPR).

Існує також оборотний зв'язок між NO і  $\text{Ca}^{2+}$ . Наприклад, підвищення цитозольної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , спричинене активацією плазмалемного  $\text{Ca}^{2+}$ -каналу CNGC2 під дією еліситорів, приводить до посилення продукції NO. Здатність іонів кальцію стимулювати синтез NO являє собою регуляторну позитивну петлю, за допомогою якої NO контролює свій власний синтез.

### 3.2.3. Нуклеотидциклазні сигнальні системи

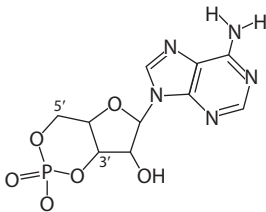
Сигнальні механізми з участю циклічних нуклеотидів функціонують у всіх основних царств живих організмів. Однак формування даної концепції тривало близько півстоліття. Про те, що циклічний аденозинмонофосфат (сAMP) виконує функції вторинного месенджера у тваринних клітинах, відомо з кінця 50-х років двадцятого століття після відкриття Сазерленда 1957 року. Ще через десятиліття аналогічний висновок був зроблений для прокариотів. Однак для рослин тривалий час не існувало жодних експериментальних доказів не тільки про функціонування нуклеотидциклазних сигнальних систем, але навіть про присутність в їхніх тканинах циклічних нуклеотидів. З цієї причини в 1970-х роках склалася думка, що у рослин не синтезуються циклічні нуклеотидмонофосфати, в тому числі сAMP, і не працюють сигнальні системи за їхньою участю. Основна причина цього — надзвичайно низькі концентрації цих речовин у рослин. Концентрація сAMP в рослинних тканинах становить менше 20 пМ на 1 г сирої маси, тоді як у тварин — більше 250 пМ. Кількість сGMP у рослин, зазвичай, менше в 20–30 разів, порівняно з сAMP. Вміст циклічних нуклеотидів істотно розрізняється в різних тканинах і органах рослин. Крім того, їх концентрація може значно варіювати під впливом зовнішніх чинників. Наприклад, у листі *Arabidopsis thaliana*

концентрація cGMP під дією авірулентного штаму *Pseudomonas syringae* підвищувалася з 0,4 до 1 пМ на 1 г сирої маси.

Виявити циклічні нуклеотиди у рослин стало можливим тільки завдяки удосконаленню методів ідентифікації хімічних сполук. Дослідження останніх двох десятиліть дозволяють зробити висновок, що, незважаючи на низькі концентрації циклічних нуклеотидмонофосфатів, у рослин, як і у тварин, функціонують нуклеотидциклазні сигнальні системи. Показано, що за участю cAMP і cGMP здійснюється регуляція багатьох реакцій рослин, у тому числі модуляція продихової транспірації, ростові реакції, захисні механізми тощо. Однак досьгодні сигнальні механізми за участю циклічних нуклеотидів у рослин є найменш вивченими.

## Аденілатциклазна система

### Ферменти аденілатциклазної системи



**Рис. 40.** Циклічний аденозинмонофосфат (3'-5'-сАМР)

Аденілатциклази (АЦ) — це ферменти, що каталізують утворення циклічного АМР з АТР у присутності іонів  $Mg^{2+}$ . У результаті реакції відщеплюється пірофосфатна група, а між  $\alpha$ -фосфатом і гідроксилом 3-го атома Карбону залишку рибози утворюється ефірний зв'язок. Таким чином, продуктом реакції є 3'-5'-сАМР (рис. 40) і пірофосфат.



Утворений вторинний месенджер 3'-5'-сАМР частіше називають циклічним аденозинмонофосфатом або сАМР без вказівки положення гідроксилів, які беруть участь в утворенні циклічного фосфодіестерного зв'язку.

Розщеплення сАМР здійснюється **фосфодіестеразою (ФЕ)**. Цей фермент гідролізує циклічний фосфоефірний зв'язок, у результаті чого утворюється АМР. Залежно від того, які ізоформи ФЕ проявляють активність, можуть утворитися дві форми АМР з різним положенням фосфатної групи: 5'-АМР або 3'-АМР.



Незважаючи на те що аденілатциклази різних видів живих організмів каталізують одну й ту ж реакцію, вони мають суттєві відмінності в структурі та механізмі регулювання. До того ж значні розбіжності виявляються навіть за амінокислотної послідовності каталітичних доменів. Існує кілька класифікацій АЦ на основі первинної структури різних функціональних доменів цих ферментів, головним чином, каталітичних. Проте ні в одну з цих класифікацій поки ще не включені рослинні АЦ, оскільки відомості про них вкрай обмежені.

Мембранозв'язані аденілатциклази (мАЦ) ссавців являють собою складні інтегральні білки глікопротеїни з молекулярною масою 180–200 кД (1064–1248 амінокислотних залишків). Поліпептидний ланцюг усіх мембранних АЦ 12 разів перетинає мембрану, формуючи два модулі, кожна з яких складається з 6 трансмембранних доменів. На зовнішній стороні плазмалеми знаходяться тільки невеликі міждоменні поліпептидні ділянки, які частково глікозовані олігосахаридними групами. Із цитоплазматичної сторони знаходяться короткий N-кінець і значно більший C-кінець молекули, а також великий фрагмент, розташований між двома 6-доменними трансмембранними структурами. Середній цитоплазматичний фрагмент і C-термінальна ділянка поліпептидного ланцюга АЦ формують активний центр, що включає ділянку зв'язування АТР, а також регуляторний сайт, через який здійснюється взаємодія ферменту з  $\alpha$ -субодиницею гетеротримерного G-білка. Припускають, що каталітична активність АЦ виявляється тільки у гомодимерної форми ферменту.

Модуляція активності мАЦ ссавців здійснюється двома типами G-білків:  $G_s$  і  $G_i$ . Ці білки різняться тільки  $\alpha$ -субодиницями, які здатні асоціювати з димером  $\beta\gamma$  одного типу.  $G_s$  і  $G_i$  активуються різними сигналами та чинять протилежний вплив на АЦ. При наявності відповідного стимулу  $\beta$ -адренергічні рецептори активують  $G_s$ -білок, а  $\alpha 2$ -адренергічні —  $G_i$ -білок. В обох випадках G-білки дисоціюють, а  $\alpha$ -субодиниці, які вивільняються, взаємодіють з мАЦ. Активація аденілатциклази відбувається внаслідок утворення комплексу з  $\alpha$ -субодиницею  $G_s$ -білка, тоді як  $\alpha$ -субодиниця  $G_i$ -білка пригнічує активність ферменту.

У процесі модулювання активності мАЦ певне значення набувають  $\beta\gamma$ -димери, які вивільняються від  $\alpha$ -субодиниць. Вважають, що вільні  $\beta\gamma$ -комплекси зв'язують  $\alpha$ -субодиниці G-білків іншого типу, запобігаючи їхньому впливу на мАЦ.

Наразі у ссавців ідентифіковано 9 ізоформ АЦ. Вони відрізняються за чутливістю до іонів кальцію та регулюються різними типами G-білків. У модуляції активності мАЦ можуть брати участь  $\alpha$ -субодиниці,  $\beta\gamma$ -димери, іони  $\text{Ca}^{2+}$ , кальмодулін. Причому взаємодія цих сигналів часто відбувається з високим ступенем синергічність. У ряді випадків аденілатциклаза може працювати як датчик збігу, отримуючи й інтегруючи сигнали від двох різних рецепторів через G-білки або інші внутрішньоклітинні сигнальні молекули. При цьому помітна активація (або репресія) відбувається у випадку, якщо два рецептори різного класу активовані одночасно.

Активність мАЦ збудливих клітин тварин, наприклад нейронів, може змінюватися при флуктуації мембранного потенціалу. Зміна заряду на мембрані сприяє зсуванню трансмембранних доменів один відносно одного, що зрештою відбивається на активності ферменту. У цьому випадку АЦ здатна самостійно модулювати внутрішньоклітинні сигнали у відповідь на стимул без участі рецептора.

Значний вплив на активність мАЦ має ковалентна модифікація шляхом фосфорилування специфічними кіназами. Фосфорилування змінює стан АЦ таким чином, що вона стає більшою (або меншою) мірою сприйнятлива до активації різними стимулами.

Розчинні аденілатциклази (рАЦ) ссавців синтезуються в неактивній повнорозмірній формі (близько 190 кД), тоді як активний фермент являє собою амінокінцевий фрагмент попередника (менше 50 кД). У N-кінцевій частині повнорозмірної молекули ферменту локалізуються два каталітичні домени, а в карбокситермінальній області розташований автоінгібіторний домен. Таким чином, процесінг рАЦ відбувається із залученням протеолітичного механізму. На відміну від мембранних АЦ, активація розчинних форм здійснюється без участі G-білків. Активність рАЦ істотно залежить від концентрації іонів  $\text{Mn}^{2+}$  і бікарбонату ( $\text{HCO}_3^-$ ).

Вважають, що чутливість до іонів  $\text{HCO}_3^-$  дозволяє рАЦ виконувати роль сенсора метаболічної активності клітини, оскільки концентрація бікарбонату безпосередньо залежить від інтенсивності енергетичних процесів: кінцевим продуктом окиснення є  $\text{CO}_2$ , що конвертується карбоангідразами на іони бікарбонату.

**Аденілатциклази рослин.** Ізоферментний склад аденілатциклази рослин не вивчений, причому більшість даних про ці ферменти мають непрямий характер. Деякі іони двовалентних металів мають різний, а іноді й протилежний вплив на аденілатциклазну активність, асоційовану з мембранами в рослинних тканинах. Це вказує на присутність у рослин декількох ізоформ мембранозв'язаної аденілатциклази (мАЦ). Наявність розчинної форми (рАЦ) цього ферменту багатьма дослідниками ставиться під сумнів. Разом з тим, передбачається, що у рослин функціонує аденілатциклаза, слабо асоційована з клітинними органелами та елементами цитоскелету. Ця форма, мабуть, є поверхневим мембранним білком, який не має трансмембранних доменів.

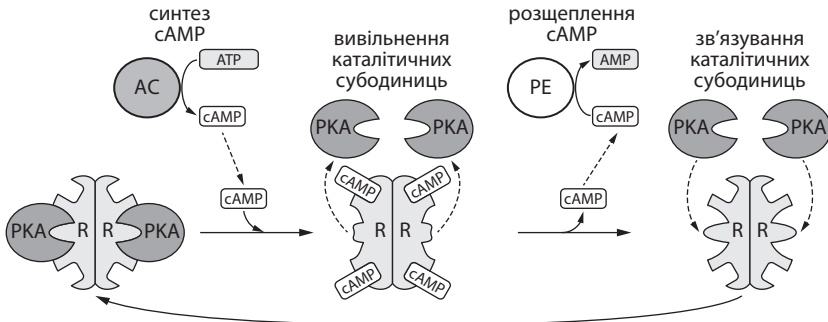
**Фосфодіестерази.** Фосфодіестерази являють велику групу ферментів, які розщеплюють циклічні фосфодиефіри. Окремі ізоформи ФЕ тварин виявляють субстратну специфічність відносно 3'5'-циклічних нуклеотидмонофосфатів (сАМР, сГМР) або 2'3'-циклічних нуклеотидів. Фосфодіестерази, що розщеплюють сАМР і сГМР, функціонують у нуклеотидциклазних сигнальних системах, а ФЕ, специфічні до 2'3'-циклічних нуклеотидів, беруть участь у деградації РНК.

Більшість рослинних ФЕ мають меншу субстратну специфічність, порівняно з тваринними ферментами, і можуть розщеплювати не тільки 3'5'-ціклофосфати, але й 2'3'-циклічні нуклеотиди. Крім того, фосфодіестерази рослин впливають на фосфодиефірний зв'язок з різних сторін щодо фосфатної групи, внаслідок чого утворюється не один, а суміш продуктів реакції. Наприклад, при розщепленні сАМР утворюється суміш 5'-АМР і 3'-АМР. Співвідношення цих продуктів залежить від ізоформи ФЕ й умов, однак у більшості випадків з двох можливих продуктів переважає 3'-АМР. При каталітичній дії тваринних фосфодіестераз на сАМР або сГМР переважно утворюються відповідні 5'-мононуклеотиди.

### Роль сАМР у регуляції активності протеїнкінази А тварин

Протеїнкінази А — це серин/треонінові протеїнкінази, активність яких регулюється сАМР. У неактивному стані протеїнкінази А існують у вигляді тетрамерів  $C_2R_2$ , які складаються з двох каталітичних (С) і двох регуляторних (R) субодиноць (рис. 41). Регуляторні субодиноці утворюють міцно зв'язаний димер ( $R_2$ ), який зберігається при дисоціації тетрамера. Стабільність структури тетрамера підтримується за рахунок слабких взаємодій між активним центром каталітичних частинок і псевдосубстратними послідовностями регуляторних субодиноць. Псевдосубстратна послідовність (–RRGAI–) відрізняється від послідовності субстрату (–RRGSI–), у якій залишок серину піддається фосфорилуванню, наявністю аланіну (А) замість серину (S). Кожна R-частка має дві ділянки зв'язування сАМР. У результаті приєднання 4-х молекул сАМР до двох регуляторних субодиноць змінюється конформація останніх, що приводить до вивільнення двох окремих каталітичних субодиноць.

Каталітичні активні субодиноці С фосфорилують білки, які мають характерні послідовності, модулюючи їхню активність. Після дисоціації тетрамерного неактивного комплексу зв'язок сАМР з регуляторними субодиноцями слабшає. Активність про-



**Рис. 41.** Регуляція активності протеїнкінази А тварин.

Умовні позначення:

PKA — каталітичні субодиноці протеїнкінази А;

R — регуляторні субодиноці протеїнкінази А;

AC — аденілатциклаза;

PE — фосфодіестерази

теїнкінази А залежить від концентрації сАМР, а відповідно, і від співвідношення активностей аденілатциклази та фосфодіестерази. При усуненні зовнішнього стимулу, який активує синтез сАМР, вміст вторинного месенджера знижується. Регуляторний димер за низької концентрації сАМР зв'яже й інактивує каталітичні субодиниці.

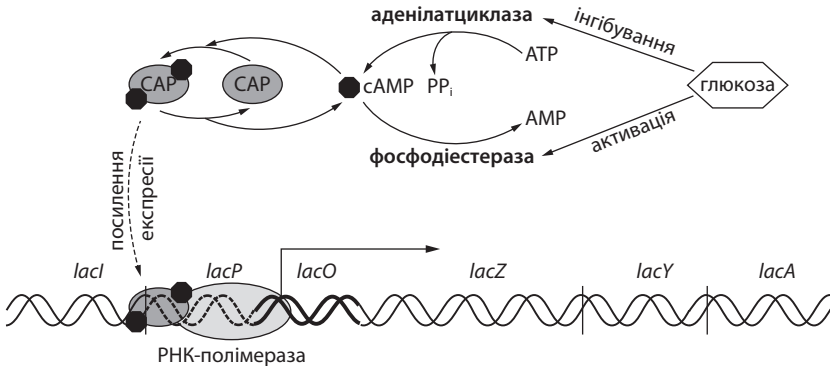
Протеїнкіназа А була виявлена в усіх тварин. Цей фермент виконує найважливіші регуляторні функції, оскільки фосфорилює велику кількість цитоплазматичних і ядерних білків, зокрема гістони. Активація протеїнкінази А приводить до модуляції активності ферментів, транскрипційних і хроматинових факторів. Таким чином, протеїнкінази А беруть участь у регуляторних механізмах, які контролюють не тільки метаболічну активність клітини, але також експресію генів і процеси ремоделювання хроматину. Білки, гомологічні протеїнкіназам А, у рослин виявлені не були.

### **Значення сАМР у регуляції активності катаболітних генів у бактерій**

У гетеротрофних бактерій сАМР бере участь в активації катаболітної генів, що кодують білки, необхідні бактеріям для утилізації альтернативних джерел живлення в умовах нестачі глюкози. Експресія більшості оперонів, які несуть катаболітні гени, контролюється за допомогою декількох механізмів, одним з яких є позитивна індукцйбельна регуляція за участю сАМР. В області промотора таких оперонів знаходиться ділянка зв'язування особливого регуляторного білка, який називають **білок, який активує катаболітний ген, або САР (catabolite activator protein)**.

САР забезпечує додаткові сайти зв'язування РНК-полімерази з промотором оперону і є фактором, який підсилює індукцію експресії. Спорідненість САР із промотором залежить від концентрації сАМР у клітині. Підвищення кількості сАМР сприяє посиленню взаємодії САР із промотором і, відповідно, активації експресії, і навпаки. Концентрація сАМР залежить від активності аденілатциклази та фосфодіестерази. Активність обох ферментів алостерично регулюється глюкозою (рис. 42). Аденілатциклаза інгібується глюкозою, а фосфодіестераза, навпаки, — активується. Таким чином, якщо концентрація

глюкози достатня для харчування клітини, то активність аденілатциклази є низькою, а фосфодіестерази — високою. Тому за наявності глюкози у клітині підтримується низька концентрація сАМР. Зниження кількості глюкози приводить до протилежного ефекту: аденілатциклаза активується, а фосфодіестераза, навпаки, пригнічується. У результаті збільшується концентрація сАМР, у присутності якого CAP зв'язується із промотором і підсилює транскрипцію. Контроль активності катаболітних оперонів через CAP залежить від концентрації глюкози в середовищі та в клітині. Оскільки у бактерій синтез сАМР активується в умовах нестачі глюкози в середовищі, цю регуляторну молекулу також називають «сигналом голоду» бактерій.



**Рис. 42.** Механізм позитивної індукційної регуляції катаболітних генів у бактерій за участю сАМР (на прикладі лактозного оперону).

Умовні позначення:

CAP — білок, який активує катаболітний ген;

*lacI* — регуляторний ген, що кодує інгібітор *lac*-оперону;

*lacP* — промотор;

*lacO* — оператор;

*lacZ*, *lacY*, *lacA* — структурні гени, що кодують, відповідно,  $\beta$ -галактозидазу, пермеаз і  $\beta$ -галактозилтрансациетілазу

### сАМР-регульовані білки рослин

У тваринних клітинах основними мішенями сАМР є протеїнкінази А та іонні канали, що відкриваються циклічними нуклеотидами (cyclic nucleotide-gated channels — CNGCs), тому

було зроблено спробу пошуку подібних білків у рослин. Протеїнкіназа А-подібні ферменти, активність яких регулюється циклічними нуклеотидами, у рослин не були виявлені. Пошук таких кіназ проводився біоінформаційними методами (за наявністю послідовностей, гомологічних послідовностей протеїнкінази А тварин), і біохімічними з використанням субстратів, що характерні для кіназ ссавців. Не можна виключати можливість, що у рослин сАМР-регульовані протеїнкінази мають низьку гомологію до аналогічних ферментів тварин і проявляють специфічність до іншого субстрату. Таким чином, незважаючи на відсутність у рослин протеїнкінази А, питання про те, чи беруть участь сАМР-регульовані протеїнкінази в сигнальних механізмах рослин, залишається відкритим.

Іонні канали, що відкриваються циклічними нуклеотидами (CNGCs), у рослин були виявлені, до того ж доведена їхня участь у трансдукційних механізмах.

**CNGC рослин.** Перший іонний канал, який був охарактеризований у рослин як канал, що відкривається циклічними нуклеотидами, був AtCNGC2. Це  $K^+$ -канал, який здатен проводити іони  $K^+$  та інші моновалентні катіони, за винятком  $Na^+$ . Інтенсивність трансмембранного потоку іонів через цей канал залежить безпосередньо від сАМР. Проте на активність AtCNGC2 впливають не тільки сАМР, але й іони кальцію: мікромольні концентрації  $Ca^{2+}$  блокують AtCNGC2.

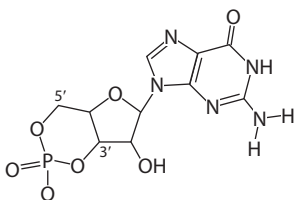
Наразі в *Arabidopsis* понад 20 білків розглядаються як представники родини CNGC. Серед них є канали, які спеціалізуються на транспорті моновалентних або двовалентних катіонів. Імовірно, молекули CNGC шість разів перетинають мембрану (домени S1–S6), причому кінцеві ділянки локалізуються із цитоплазматичного боку мембрани. Між трансмембранними доменами S5 і S6 знаходиться поровий домен (P-loop). На карбокситермінальній ділянці молекули розташовуються циклічний нуклеотид-зв'язувальний (CNB) і  $Ca^{2+}$ -кальмодулін-зв'язуючий (CaMB) домени, які частково перекриваються. Імовірно, приєднання  $Ca^{2+}$ -кальмодуліну до CNGC запобігає його активації циклічним АМР. CNG-канали рослин і тварин мають високий ступінь гомології. Однак у молекулі CNGC тварин CaMB-домен знаходиться в амінотермінальній області молекули.

Функціональні CNGC тварин є гетеротетрамерами. Структура функціонально активних CNG-каналів у рослин невідома, однак наявність у геномі рослин великої родини генів, що кодують різні CNGC, дозволяє припустити, що рослинні CNGC також формують гетеромери.

CNGC беруть участь у захисних механізмах, роботі транспіраційного апарату, зростанні пилкової трубки, світлочутливості та інших реакціях рослин. Остаточна фізіологічна роль CNGC рослин не встановлена, проте вважається, що загальна функція цих каналів полягає у підвищенні рівня іонів кальцію у клітині.

Серед CNGC рослин особливий інтерес викликають  $\text{Ca}^{2+}$ -специфічні канали. Ці канали беруть участь у перетворенні сигналу cAMP (концентраційного) на кальцієвий сигнал у вигляді осциляцій цитоплазматичної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , тому cAMP-залежний сигнальний механізм рослин може повноцінно працювати без участі кіназ. Модуляція активності  $\text{K}^+$ -провідних CNGC циклічними нуклеотидами є надзвичайно важливою для регуляції осмотичних механізмів, зокрема продихової транспірації.

## Гуанілатциклази та cGMP



**Рис. 43.** Циклічний гуанозинмонофосфат (3'-5'-cAMP)

Циклічний гуанозинмонофосфат (рис. 43) — вторинний месенджер, який регулює значну кількість різноманітних функцій у клітинах рослинного організму. За участю cGMP здійснюється трансдукція сигналів усередині клітини у відповідь на вплив гормонів і зовнішніх стимулів, розвиваються стресові реакції, контролюється активність іонних каналів, а також регулюється рівень транскрипції. Показано, що cGMP має істотне значення в механізмах патогенезу. Наприклад, за умов впливу патогенних мікроорганізмів cGMP є критично важливим для стимуляції експресії генів, що кодують фенілаланін-амоній ліазу і PR-білки (pathogenesis-related proteins).

Показано, що cGMP має істотне значення в механізмах патогенезу. Наприклад, за умов впливу патогенних мікроорганізмів cGMP є критично важливим для стимуляції експресії генів, що кодують фенілаланін-амоній ліазу і PR-білки (pathogenesis-related proteins).



Синтез cGMP із GTP каталізується гуанілатциклазами. У тварин відомо два класи цих ферментів: мембранозв'язані та розчинні (цитоплазматичні). **Мембранозв'язані гуанілатциклази** один раз перетинають мембрану та включають один циклазний домен із цитоплазматичного боку молекули. Мембранозв'язані форми гуанілатциклази мають властивості рецепторів, тобто їх каталітична активність модулюється при зв'язуванні ліганду (екстраклітинний домен зв'язує пептидні регулятори). Як більшість рецепторних молекул, що мають один трансмембранний домен, мембранозв'язані гуанілатциклази набувають функціональну активність у димерному стані. До складу димеру входять дві однакові субодиниці. **Розчинні гуанілатциклази** — це гетеродимери, що складаються з двох різних субодиниць. Гем-вмісні редокс-центри розчинних гуанілатциклаз зв'язують NO, який є специфічним активатором цього ферменту. Молекулярними мішенями cGMP у тварин є cGMP-залежні протеїнкінази (протеїнкінази G) та йонні канали, що відкриваються циклічними нуклеотидами (CNGCs).

У вищих рослин експериментально доведено існування двох білків з гуанілатциклазною активністю, що належать до різних класів. Обидва білка були ідентифіковані у *Arabidopsis*. **Розчинна гуанілатциклаза рослин**, на відміну від тваринного ферменту, не є чутливою до NO. В амінотермінальній області молекули розташований каталітичний гуанілілциклазний домен, а в карбокситермінальній — цистеїн протеаза-подібний домен. Поєднання цих двох доменів є унікальним для рослинної розчинної гуанілатциклази і раніше не було виявлено в жодному з інших білків. **Мембранозв'язана гуанілатциклаза *Arabidopsis*** є рецептором брасіноліда AtBRI1 і має в цитоплазматичній області молекули гуанілатциклазний домен. Рослинні йонні канали, що відкриваються циклічними нуклеотидами (CNGCs), регулюються циклічним GMP. Інші молекулярні мішені cGMP не ідентифіковано.

### 3.3. ІОНИ КАЛЬЦІУ В СИСТЕМІ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  виконують найважливішу регуляторну роль у клітинах: вони контролюють модуляцію активності ферментів, стабілізують клітинні структури, активують збірку елементів цитоскелета тощо. Разом з цим, іони  $\text{Ca}^{2+}$  є одними з ключових внутрішньоклітинних сигнальних посередників, що виконують функції вторинних месенджерів.

Клітини всіх відомих організмів здатні підтримувати мембранний градієнт концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Рівень концентрації вільного кальцію в цитоплазмі нестимульованих клітин зазвичай становить  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М. У двомембранних органелах (мітохондріях, пластидах) і люмені ендоплазматичного ретикулума еукаріотичних клітин підтримується більш висока концентрація цього іона. У рослинних клітинах значні його кількості накопичуються у вакуолях. Вміст кальцію в міжклітинному просторі перевищує його цитоплазматичну концентрацію на кілька порядків і може досягати  $10^{-3}$  М, як, наприклад, в апопласті рослин. Підтримка градієнта концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є надзвичайно важливою для функціонування клітини, оскільки довготривале підвищення рівня кальцію в цитозолі приводить до її загибелі.

Еволюційний вибір іонів кальцію для виконання сигнальної функції пов'язують з тим, що спочатку живі клітини навчилися позбуватися їх, оскільки кальцій як лужноземельний метал здатний взаємодіяти із фосфатами з утворенням нерозчинних солей. Фосфати необхідні клітині для синтезу нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, макроергічних сполук тощо. Відповідно, високі концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі можуть привести до значного зниження концентрації розчинних фосфатів, що, в свою чергу, привело б до порушення як енергетичного обміну клітини, так і її діяльності взагалі.

За певних умов під впливом зовнішніх факторів провокується деполяризація мембрани, яка супроводжується короткочасним підвищенням концентрації іонів кальцію. Ця подія є своєрідним сигналом небезпеки для клітини, тому в процесі еволюції виникли регуляторні системи, функціонування яких безпосередньо залежить від флуктуації внутрішньоклітинної

концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Макромолекули, що здатні специфічно зв'язувати іони  $\text{Ca}^{2+}$ , були пристосовані для виконання функцій внутрішньоклітинних кальцієвих рецепторів. Більшість  $\text{Ca}^{2+}$ -регульованих процесів у клітинах відбувається за короткочасних змін цитозольної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в діапазоні  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  М.

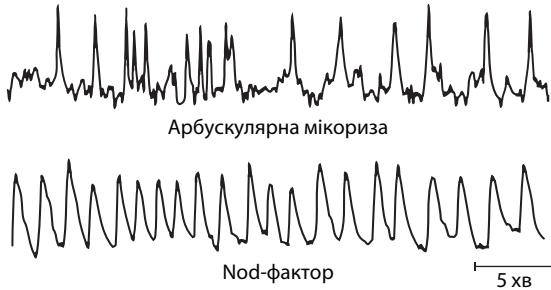
Таким чином, еволюційно першими виникли системи, які видаляють іони кальцію із цитоплазми, а наступним етапом було виникнення сигнальних клітинних систем, що використовують іони  $\text{Ca}^{2+}$  як вторинні месенджери. У процесі формування кальцієвої сигнальної системи, удосконалювалися також способи індукованого надходження кальцію в цитоплазму.

Ефективна робота  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного сигнального механізму можлива в тому випадку, якщо в клітині працюють три основні функціональні модулі.

1. Системи активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , який спрямований із цитоплазми в екстраклітинний простір, ЕПР, мітохондрії та вакуоль. Енергозалежні переносники  $\text{Ca}^{2+}$  розташовуються в мембранах, що відокремлюють цитоплазму від даних компартментів.
2. Системи індукованого надходження кальцію в цитоплазму: кальцієві канали, через які іони  $\text{Ca}^{2+}$  за певних умов проникають у цитоплазму за градієнтом концентрацій.
3. Цитоплазматичні компоненти сигнальних ланцюгів (ферменти, іонні канали, каталітичні неактивні сигнальні посередники, транскрипційні регулятори та інші функціональні молекули), активність яких модулюється при зміні концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі.

Модуляція активності  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортерів під впливом конкретних стимулів приводить до змін цитоплазматичної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , які слід розглядати не як однобічно спрямовані зміни концентрації, а як **осциляції** — флуктуації, що повторюються і мають певну регулярність, яка характеризується частотою, амплітудою та формою. Форма осциляційної кривої залежить від швидкості змін, які можуть бути плавними та стрибкоподібними. Крива може набувати форму синусоїди із плавними чи загостреними екстремумами або квадратної хвилі. Специфічний вплив певної сили кодується як кальцієві

осциляції, які потім декодуються цитоплазматичними сигнальними компонентами, що наразі виражається у зміні функціональної активності клітини (рис. 44).



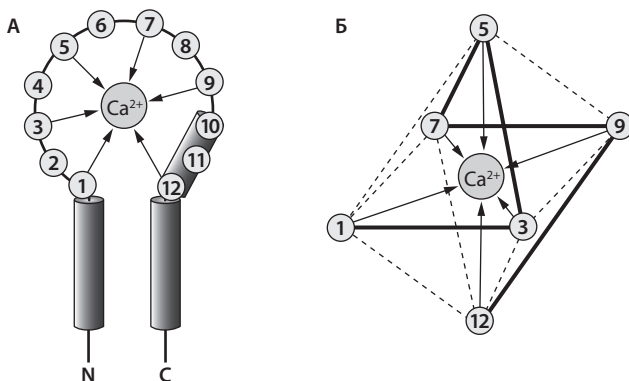
**Рис. 44.** Криві кальцієвих осциляцій, що спостерігаються за дії арбускулярної мікоризи та NOD-фактора (за Kosuta S. et al., 2008)

### 3.3.1. Структура $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків

Для ефективного зв'язування й утримання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  необхідною є наявність у структурі білка системи, яка дозволяє утворити з іоном від 6 до 8 координаційних зв'язків певної довжини. До того ж, ця структура має бути досить рухливою, щоб мати спроможність захоплювати іон  $\text{Ca}^{2+}$ , оточуючи його з усіх боків, повністю ізолюючи від молекул води. Таку структуру мають  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі центри білків, які також називають EF-руками.

**EF-рука** є обов'язковим модулем  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків. Ця ділянка має будову спіраль-петля-спіраль (рис. 45-А). Поліпептидний ланцюжок петлі EF-руки складається з 12 амінокислотних залишків. Петля обертається навколо іона кальцію, утворюючи практично правильний октаедр, на шести вершинах якого знаходяться амінокислотні залишки, які беруть участь у зв'язуванні іонів кальцію через киснев-вмісні групи (рис. 45-Б). Таким чином, встановлюються 6 координаційних зв'язків. Спорідненість кожного індивідуального  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого сайту становить  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М.

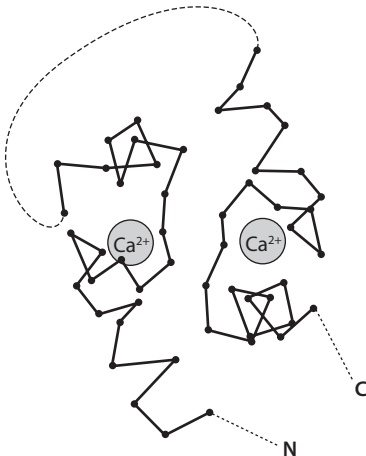
Висока рухливість EF-руки дозволяє не тільки ефективно зв'язувати іони  $\text{Ca}^{2+}$ , але й позбуватися від них при зниженні цитоплазматичного рівня кальцію. Лабільність структури — це важлива властивість, необхідне для виконання білком регуляторних функцій, але з іншого боку, є фактором його нестабільності. Ця проблема частково вирішується за рахунок особливості структури  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих ділянок молекули: EF-руки формуються попарно на одній ділянці поліпептидного ланцюга (рис. 46). Парні  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі центри взаємодіють один з одним і, не втрачаючи рухливості, сприяють взаємній стабілізації. З цієї причини більшість  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків містять парну кількість EF-рук (від 2 до 6). При цьому існують також  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі білки з непарною кількістю EF-рук. Однак слід уточнити, що у таких білків непарна кількість функціонально активних  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих центрів, однак фізично присутня парна кількість EF-рук. Одна з EF-рук може нести мутацію, яка не дозволяє їй виконувати  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі функції, але при цьому вона стабілізує структуру парної функціонально активної EF-руки.



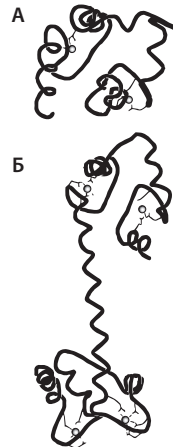
**Рис. 45.** Схема будови EF-руки (за Гусев Н. Б., 1998 зі змінами). А — двомірна схема. Номерами (1–12) позначені амінокислоти, що формують петлю. Стрілки вказані в амінокислотних залишках, що беруть участь в утворенні координаційних зв'язків з іоном  $\text{Ca}^{2+}$ ; Б — просторове розташування амінокислот, що взаємодіють з іоном  $\text{Ca}^{2+}$ . Суцільною лінією показано хід поліпептидного ланцюга, переривчастими лініями домальовано тетраедр, форму якого набуває  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуюча петля

Найбільш простим  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючим білком є низькомолекулярний білок кишечника ссавців — кальбіндін (рис. 47-А). Поліпептидний ланцюг молекули кальбіндіну формує лише дві EF-руки, тобто є, власне, мінімальним  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючим модулем. Кальбіндін має значення у зв'язуванні й утриманні кальцію. Регуляторну функцію він не виконує. При зв'язуванні кальцію істотних змін у просторовій структурі молекули кальбіндіну не спостерігається.

Найпоширеніший у природі  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючий регуляторний білок — це кальмодулін (САМ) — низькомолекулярний білок з молекулярною масою 18 кД. Вміст білка кальмодуліну в клітині досить високе. У типовій тваринній клітині воно становить близько 1% від загальної маси клітинного білка (більше  $10^7$  молекул). Кальмодулін являє собою консервативний одиничний поліпептид, що складається приблизно з 150 амінокислотних залишків. Його структура сформована переважно  $\alpha$ -спіральними ділянками. Просторова структура білка за формою нагадує гантель (рис. 47-В). На N- і С-кінцевих ділянках мо-



**Рис. 46.** Взаємне розташування парних  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих центрів у молекулі  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого білка (за Пермяков Е. А., 1993 зі змінами)



**Рис. 47.** Структура  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків (за Kawasaki H., Kretsinger R., 1994). А — кальбіндін; Б — кальмодулін

лекули знаходяться по два  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих центри, представлені EF-руками. Середня частина молекули сформована центральною  $\alpha$ -спіраллю, що має негативно заряджені амінокислотні залишки. Кальмодулін присутній практично в усіх клітинах тварин, рослин і грибів, функціонуючи в них як багатоцільовий внутрішньоклітинний рецептор іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CAM}$ ) не має ферментативної активності, він виконує роль алостеричного регулятора, який бере участь у більшості процесів, що регулюються іонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Цей білок модулює активність багатьох різних ферментів, наприклад протеїнкіназ, ферментів, що беруть участь в утворенні та руйнуванні циклічних нуклеотидів (нуклеотидциклаз, фосфодіестераз) та інших ензимів, а також транскрипційних факторів. У деяких випадках кальмодулін завжди зв'язаний зі своєю мішенню, будучи постійною регуляторною субодиницею деяких ферментних комплексів, наприклад кінази фосфорилази савців. Із кальмодуліном пов'язана регуляція активності білків цитоскелету, а отже, процеси екзо- й ендоцитозу. Внутрішньоклітинний рух також залежить від рівня кальціювання кальмодуліну.

### 3.3.2. Транспортні системи, що кодують кальцієвий сигнал

#### Екстраклітинний транспорт кальцію

Іони кальцію виводяться із цитозолу проти градієнта концентрацій, тому цей процес вимагає витрати енергії. Існують транспортери кальцію, активність яких залежить від енергії гідролізу АТР, —  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази. Інші транспортери використовують протон-рушійну силу — енергію електрохімічного градієнта концентрацій іонів  $\text{H}^+$ .

#### $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази

АТФ-залежний транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  крізь мембрани здійснюється АТФазами Р-типу класу Р2.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази називають також кальцієвими помпами або насосами. За структурою та механізмом активації їх поділяють на 2 групи:

- 1) група **P2A** —  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази ER-типу (endoplasmic reticulum-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases — **ECA**);
- 2) група **P2B** —  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази, що автоінгібуються (autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases — **ACA**).

Між двома групами  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаз виявляються дві основні відмінності.

Перша відмінність пов'язана з особливостями регуляції переносників. Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаз ECA-типу не залежить від кальмодуліну, проте АТРази ACA-типу є кальмодулін-залежними. В амінотермінальному цитоплазматичному районі молекули ACA транспортера знаходиться ділянка зв'язування кальцінованого кальмодуліну ( $\text{Ca}^{2+}$ /CAM).

Друга відмінність — функціональна. ER-АТРази забезпечують доставку іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинні компарменти, головним чином в ендоплазматичний ретикулум. Потрапляючи в ендомембранну систему, іони  $\text{Ca}^{2+}$  надалі включаються до складу секрету та виводяться у міжклітинний простір, наприклад, у вигляді пектинатів кальцію — компонентів матриксу клітинної стінки. Крім того, в люмен різних ендомембранних утворень іони кальцію використовуються також як кофактори, необхідні для регуляції активності ферментів.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази, що автоінгібуються, виконують у клітинах ключову сигнальну роль. Це пов'язано з тим, що їхня активність значно більшою мірою змінюється під впливом зовнішніх факторів, порівняно з переносниками ER-типу. Відповідно,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази, що автоінгібуються, вносять більш істотний внесок у формування внутрішньоцитоплазматичних кальцієвих осциляцій.

У геномі *Arabidopsis* кодується 10  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаз, що автоінгібуються. Окремі ізоформи ACA селективно експресуються в різних умовах. Наприклад, синтез ACA12 і ACA13 стимулюється патогенами, ACA8 і ACA10 — холодним впливом, а ACA8 і ACA9 з'являються у відповідь на обробку АБК.

$\text{Ca}^{2+}$ -АТРази, що автоінгібуються, виявляються в різних клітинних мембранах, але кожна ізоформа, зазвичай, тяжіє до певного типу мембрани. Так, ACA8, ACA9 і ACA10 локалізуються у плазмалемі, ACA2 — в ЕПР, а ACA4 і ACA11 — у тонопласті.

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаз групи P2B модулюється різними способами. Крім кальмодуліну, багато ACA регулюються кислими



фосфоліпідами, наприклад, фосфатидною кислотою, яка утворюється внаслідок гідролізу мембранних фосфоліпідів фосфоліпазою D, а локалізована в ЕПР АСА2 регулюється шляхом фосфорилування.

**Механізм переносу.** У процесі переносу іонів  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази зазнають ряд структурних змін, що впливають на спорідненість з іонами  $\text{Ca}^{2+}$  і АТР. Зміни відбуваються послідовно та повторюються циклічно.

1.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза зв'язує два іона кальцію (всі  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази мають один типовий  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючий домен, що включає дві EF-руки).
2. Зв'язування іонів кальцію сприяє підвищенню спорідненості АТРази до АТР. Молекули АТР зв'язуються у вигляді комплексу з іонами  $\text{Mg}^{2+}$ .
3. Здійснюється автофосфорилування переносника —  $\gamma$ -фосфатна група АТР переноситься на залишок аспарагінової кислоти.
4. Фосфорилування стимулює конформаційні зміни молекули АТРази, внаслідок яких іони  $\text{Ca}^{2+}$ , що зв'язані, переносяться з цитоплазматичного боку на екстраклітинний бік мембрани.
5. У результаті зміни конформації молекули знижується спорідненість АТРази до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , які вивільняються в позаклітинний простір.
6. Фосфатна група відщеплюється від залишку аспарагінової кислоти.
7. Дефосфорильована і декальцинована молекула  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРази приймає вихідну конформацію.

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

На всіх мембранах рослинних клітин, як зовнішніх, так і внутрішніх, підтримується електрохімічний градієнт протонів. Цей градієнт створюється  $\text{H}^{+}$ -АТРазами Р-типу та може використовуватися для енергетичного забезпечення трансмембранних процесів. Транспорт іонів  $\text{Ca}^{2+}$  здійснюється  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортерами, які називають катіонними обмінниками (cation exchanger — САХ). У *Arabidopsis* виявлено 6 таких транспортерів.

Молекули САХ мають, імовірно, 11 трансмембранних доменів. Із шести САХ, що виявлені в *Arabidopsis*, найбільш значущу роль у підтримці кальцієвого гомеостазу виконують САХ1 і САХ3.

Антіпортери САХ регулюються подібно до кальцієвих насосів через автоінгібіторний амінотермінальний домен.

### Індуковане надходження кальцію в цитоплазму

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  проникають у цитоплазму за градієнтом концентрацій через селективні  $\text{Ca}^{2+}$ -канали. У відсутності стимула канали перебувають у неактивному стані та не пропускають іони  $\text{Ca}^{2+}$ . У структурі іонних каналів виділяють автоінгібіторну ділянку, яка замикає канал. При отриманні відповідного сигналу конформація молекули переносника змінюється, в результаті чого формуються миттєві іоноселективні пори, через які іони  $\text{Ca}^{2+}$  проникають крізь мембрану за градієнтом концентрацій.

Існує значна кількість  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, що розрізняються за структурою, способом активації та локалізації. Багато з них є функціонально неоднозначними й активуються різними стимулами. Наприклад, за холодової обробки активуються тонопластні  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, активні форми кисню задіюють плазмалемні канали, а в корневих волосках бобових рослин Nod-фактори провокують мобілізацію кальцію з перинуклеарного району ЕПР.

### Потенціал-керовані канали

Потенціал-керовані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (VGCC — Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$ -Channel) активуються при зміні мембранного потенціалу. У структуру каналів цього типу включені один або кілька сенсорних доменів, які несуть заряджені амінокислотні залишки, завдяки чому здатні реагувати на зміну мембранного потенціалу. Кількість і розташування зарядів на сенсорних доменах визначають «настройку» каналу, тобто його чутливість на певні зміни трансмембранного потенціалу. Зміни потенціалу викликають зрушення сенсорних доменів, що приводить до модифікації просторової структури молекули та відкриття (або закриття) каналу. Потенціал-керовані канали ділять на дві ос-

новні групи: канали однієї групи активуються при деполяризації мембрани, а другий — при гіперполяризації.

### Ліганд-керовані канали

Ліганд-керовані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (Ligand-Gated  $\text{Ca}^{2+}$ -Channel — LGCC) мають властивості рецепторів-каналоформерів. Вони пов'язують ліганд певного типу та формують при цьому кальцієвий канал, яким іони кальцію прямують до цитоплазми. У рослинних клітинах передбачається наявність у тонопласті та ендоплазматичних мембранах  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, регульованих інозитол-1,4,5-трифосфатом ( $\text{IP}_3$ ) і циклічною аденозиндифосфат-рибозою (сADPR). Однак фізично ці канали не виділені. Дані структури ідентифіковані та вивчені у тварин. Як показав геномний аналіз, у рослин немає гомологів рецепторів  $\text{IP}_3$  і сADPR тварин. Разом з тим, існування принципово різних структур, що виконують подібні функції у різних груп організмів, заперечувати не можна.

**Рецептор  $\text{IP}_3$  тварин.** У тварин  $\text{IP}_3$ -рецептор локалізується на мембранах ЕПР у вигляді гомотетрамера. Вторинний посередник інозитолтрифосфат ( $\text{IP}_3$ ) утворюється в результаті розщеплення фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату фосфоліпазою С. Зв'язуючись з  $\text{IP}_3$ -рецептором,  $\text{IP}_3$  стимулює відкриття  $\text{Ca}^{2+}$ -провідного каналу та сприяє мобілізації  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕПР. С-кінцева частина молекули утворює шість трансмембранних доменів, які беруть участь в утворенні каналу. N-кінцева область молекули звернена в бік цитоплазми. У них розташовані сайти зв'язування  $\text{IP}_3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  і АТР, а також два серинових залишки, які фосфорилюються протеїнкіназами РКА і РКГ. Карбокси-термінальна ділянка молекули орієнтована у бік цитозоля та залучається у контроль відкриття каналу. Підвищення концентрації  $\text{IP}_3$  в цитоплазмі приводить до його зв'язування з рецептором. У більшості клітин ссавців  $\text{IP}_3$ -рецептор активується при концентрації  $\text{IP}_3$  порядку 0,1–2 мкМ. Вихід  $\text{Ca}^{2+}$  через іонні канали супроводжується протипотоком іонів  $\text{K}^+$  з цитоплазми. Завдяки цьому компенсується винос заряду в цитоплазму, тобто знімається електрогенний ефект.

Точний механізм мобілізації кальцію за участю інозитолфосфатів у рослин нез'ясований. Відомо, що в рослин, крім  $\text{IP}_3$ ,

у внутрішньоклітинній передачі сигналу використовуються й інші форми фосфорильованого інозитулу — інозитол-пентакісфосфат ( $IP_5$ ) та інозитол-гексакісфосфат ( $IP_6$ ) (див. вище розділ «PI-PLC-опосередкований сигналінг»).  $IP_3$  стимулює мобілізацію внутрішньоклітинних запасів кальцію, як і у рослин, однак  $IP_6$  надає більший ефект. Також невідомо, чи використовується яка-небудь форма інозитолфосфату як безпосередній регулятор активності кальцієвих каналів або регуляція здійснюється опосередковано через інші регулятори.

**Іонні канали, що відкриваються циклічними нуклеотидами** (Cyclic Nucleotide-Gated Channels — CNGC), становлять групу каналоформерів, що пов'язують циклічні нуклеотидмонофосфати (cAMP і cGMP). У геномі *Arabidopsis* кодується 20 подібних каналів. Вони мають шість трансмембранних доменів і поровий домен. У мембранах вони утворюють тетрамерні структури, необхідні для формування каналу. Ряд рослинних CNGC являють собою  $Ca^{2+}$ -канали, але деякі з них прониклі також для моновалентних іонів.

Крім циклічних нуклеотидмонофосфатів, рослинні CNGC пов'язують також кальмодулін. Усі відомі CNGC локалізуються в плазматичній мембрані.

**Глутамат-рецептор-подібні  $Ca^{2+}$ -канали** рослин є гомологами іонотропних рецепторів глутамату (Glutamate Receptor — GLR). У *Arabidopsis* родина генів GLR включає 20 членів. Продукти генів, імовірно, мають три трансмембранні домени й об'єднуються в мембранах у тетра- і пентамерні структури.

**Двопорові  $Ca^{2+}$ -канали.** У *Arabidopsis* виявлений ген TPC1, що кодує єдиний представник родини двопорових каналів (Two-Pore Channel — TPC). Імовірно, молекула TPC1 має 12 трансмембранних доменів (TMD) і включає два порових домени. TPC1 локалізується в тонопласті, в якому, мабуть, присутній у вигляді гомодимеру. Цитозольна петля між TMD6 і TMD7 формує кальцій-зв'язуючий центр (EF-рука) і домен зв'язування регуляторного білка 14-3-3. TMD4 і TMD10, що мають позитивно заряджені амінокислотні залишки, функціонують як сенсорні домени, які реагують на зміни мембранного потенціалу. Таким чином, TPC1 є не тільки  $Ca^{2+}$ -індукованим, але й потенціал-керованим каналом.

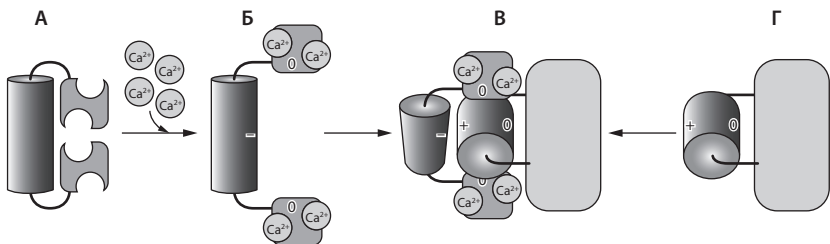
### 3.3.3. Декодування $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу

Зміна концентрації іонів кальцію в клітині відстежується  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорними білками. У клітинах присутня значна кількість  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків, здатних зв'язувати іони  $\text{Ca}^{2+}$  з різною силою, які мають різну клітинну локалізацію, та взаємодіють з певними даунстрим сигнальними партнерами. Це дозволяє клітині диференційовано реагувати на специфічні зовнішні впливи різної інтенсивності.

#### Активация кальмодулін-залежних білків

При низькій концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі в молекулі кальмодуліну  $\alpha$ -спіралі, що фланкують петлі EF-руки, розташовуються практично паралельно центральній  $\alpha$ -спіралі. У такому стані гідрофобні ділянки термінальних доменів молекули кальмодуліну виявляються закритими, оскільки вони притиснуті до центральної  $\alpha$ -спіралі (рис. 48-А). Це унеможливує взаємодію цього білка з його мішенями.

Коли клітина отримує сигнал, що стимулює підвищення концентрації кальцію в цитоплазмі, кальмодулін пов'язує 4 іона  $\text{Ca}^{2+}$ . Це супроводжується конформаційними змінами:  $\alpha$ -спіралі EF-рук віддаляються від центральної  $\alpha$ -спіралі, приймаючи щодо неї перпендикулярне положення. Таким чином, молекула кальмодуліну розгортається (рис. 48-В). У результаті цього вивільняється центральна  $\alpha$ -спіраль і гідрофобні райони



**Рис. 48.** Механізм регуляції активності білків кальмодуліном.

А — неактивна форма кальмодуліну;

Б — активна форма кальмодуліну;

В — взаємодія кальмодуліну з білком-мішенню;

Г — білок-мішень з кальмодулін-зв'язуючим доменом

термінальних доменів, необхідні для взаємодії кальмодуліну з білками-мішенями.

Білки-мішені кальмодуліну мають особливу ділянку, що представлена амфифільною  $\alpha$ -спіраллю, збагаченою позитивно зарядженими та гідрофобними амінокислотними залишками. Причому заряджені та гідрофобні групи розташовуються на протилежних поверхнях  $\alpha$ -спіралі (рис. 48-Г). Розкрита молекула кальмодуліну взаємодіє негативно зарядженою ділянкою центральної  $\alpha$ -спіралі з позитивно зарядженою поверхнею амфифільної  $\alpha$ -спіралі білка-мішені, а гідрофобні ділянки термінальних доменів — з гідрофобною поверхнею  $\alpha$ -спіралі білка-мішені. Кальмодулін, таким чином, охоплює амфифільну спіраль білка-мішені та стимулює зміну його просторової структури та активності.

Зниження концентрації іонів кальцію приводить до зворотного ефекту — іони  $\text{Ca}^{2+}$  дисоціюють від CAM, а декальцинований кальмодулін втрачає спорідненість з мішенями.

У *Arabidopsis* виявлено сім генів, що кодують чотири ізоформи кальмодуліну (CAM1/CAM4, CAM2/CAM3/CAM5, CAM6, CAM7). Ці ізоформи незначно відрізняються один від одного за амінокислотною послідовністю. Так CAM1/CAM4 і CAM7 відрізняються між собою чотирма амінокислотними залишками, а кальмодуліни CAM2/CAM3/CAM5 і CAM6 відрізняються від CAM7 всього однієї амінокислотою. Незважаючи на мінімальні відмінності, кальмодулін CAM7 істотно відрізняється від трьох інших ізоформ за функціями. CAM7 є транскрипційним регулятором. Як було показано, CAM7 здатний безпосередньо взаємодіяти з промоторами ряду світло-індукованих генів і модулювати активність їх експресії.

## Модуляція активності транскрипції кальмодуліном

У регуляцію транскрипційної активності клітини залучено безліч  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків. Вважають, що експресія 3,3 % генів *Arabidopsis* перебуває під контролем  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних механізмів. Транскрипція багатьох АБК-регульованих генів, продукти яких беруть участь у ранніх стресових реакціях, залежить від підвищення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі. Серед них гени

транскрипційних факторів **C-repeat/DRE Binding Factor (CBF)** — ключових регуляторів реакції на абіотичні стресові впливи.

У механізмі активації експресії генів бере участь група транскрипційних факторів **SAMTA (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-binding transcription activator)**. У *Arabidopsis* виявлено шість таких факторів. Карбокситермінальна частина молекули SAMTA формує Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін-зв'язуючий домен, а в амінотермінальній частині знаходиться CG1-домен, який опосередковує взаємодію з промотором гена через *cis*-елемент, який називають SAMTA-зв'язуючий сайт (рис. 49). Показано, що транскрипційні фактори SAMTA1 і SAMTA3 опосередковують кальцієвий сигнал і транскрипцію генів стійкості до холодowego стресу. Це опосередкування здійснюється таким чином:

- 1) при підвищенні концентрації кальцію в цитоплазмі молекула кальмодуліну (CAM — **calmodulin**) пов'язує чотири іони Ca<sup>2+</sup>;
- 2) кальцинований кальмодулін Ca<sup>2+</sup>/CAM зв'язується із С-термінальним Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін-зв'язуючим доменом транскрипційного фактора SAMTA;
- 3) активований SAMTA у складі комплексу Ca<sup>2+</sup>/CAM/SAMTA взаємодіє з SAMTA-зв'язуючим елементом промотора та бере участь в ініціації експресії гена.

Кальмодулін SAM7, як зазначалося вище, є транскрипційним регулятором і здатний безпосередньо взаємодіяти з промоторами деяких генів.

## Модуляція активності білків кальцій-залежними кіназами

У кальцієвому сигнальному механізмі задіяна велика кількість кіназ, активність яких залежить від флуктуацій іонів кальцію в цитозолі (докладніше див. розділ «Кальцій-залежні протеїнові кінази»).

**Кальцій-залежні протеїнові кінази рослин (CDPK — Calcium-Dependent Protein Kinases)** у С-термінальній частини молекули мають кальмодулін-подібний домен, який містить чотири консервативні ЕФ-руки та дозволяє безпосередньо зв'язувати іони Ca<sup>2+</sup>. Зв'язування чотирьох іонів Ca<sup>2+</sup> приводить до вивільнення кіназного активного центру від автоінгібітор-

ного домену та подальшого автофосфорилування CDPK, необхідного для повної активації ферменту.

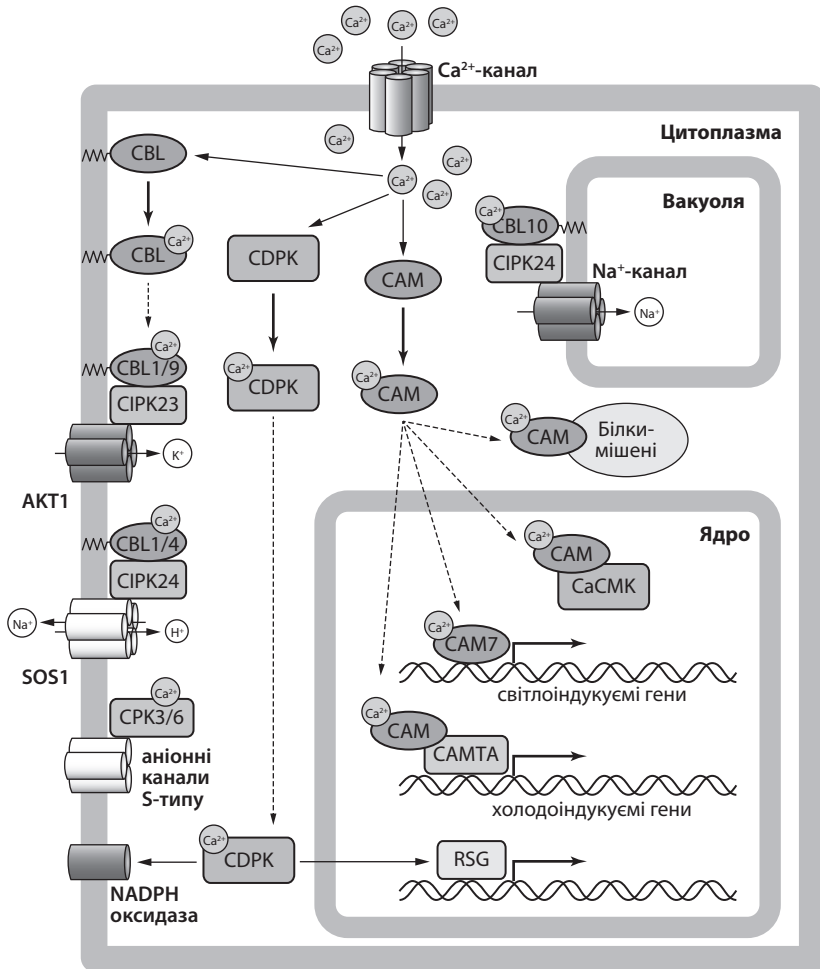
У відповідь на дію гібереліну кіназа CDPK1 регулює активність транскрипційного фактора RSG (**R**epression of **S**hoot **G**rowth). Багато кальцій-залежних кіназ функціонують у сигнальній системі АБК. Наприклад, кальцій-залежні кінази СРК3 (**C**alcium **D**ependent **P**rotein **K**inase **3**) і СРК6 модулюють активність аніонних каналів S-типу, беручи участь у АБК-регуляції продигової транспірації. СРК4 і СРК11 фосфорилують транскрипційні фактори АВФ1 (**A**BRE-**B**inding **F**actor **1**) і АВФ4, які мають важливе значення у функціонуванні замикаючих клітин продихів.

**СВЛ/СІРК.** У рослинних клітинах присутній регуляторний  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючий білок СВЛ (**C**alcineurin **B**-**L**ike — кальцинейрин В подібний білок), який функціонує як кальцієвий сенсор. Він має, як і кальмодулін, чотири  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі ЕФ-руки та модулює активність СВЛ-взаємодіючих протеїнових кіназ (СІРК — СВЛ-interacting protein kinase). Білки СВЛ мають ацильну групу, яка утримує їх на мембрані. СВЛ були ідентифіковані у плазмалемі та тонопласті. Кінази СІРК є розчинними білками та локалізуються в цитоплазмі та нуклеоплазмі. При взаємодії з кальцинованими СВЛ кінази СІРК залучаються до мембран (рис. 49). У рослинних геномах кодується багато індивідуальних видів СВЛ і СІРК. Обидві родини білків є багатофункціональними сигнальними компонентами, здатними утворювати багато альтернативних комплексів СВЛ/СІРК. Сукупність комплексів СВЛ/СІРК знаходиться в центрі системи декодування  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів.

Схема функціонування системи СВЛ/СІРК.

1. Збільшення цитоплазматичної концентрації кальцію приводить до зв'язування чотирьох іонів  $\text{Ca}^{2+}$  ЕФ-доменами регуляторного білка СВЛ.
2. Кальцинований СВЛ з'єднується з СІРК через NAF-домен, розташований у карбокситермінальній частині кінази.
3. Зміна конформації, спричинена взаємодією білків, приводить до зміщення автоінгібіторного домену СІРК, який вивільняє активний кіназний центр.
4. Активована кіназа СІРК взаємодіє зі своїми мішенями та фосфорилує їх.





**Рис. 49.** Механізм регуляції активності білків кальмодуліном (за Besson-Bard Bae, Choi, 2008, із змінами).

Умовні позначення:

CDPK — кальцій-залежні кінрази; CBL — кальцинейрин В подібні білки; CIPK — CBL взаємодіючі протеїнові кінрази; RSG (Repression of Shoot Growth) — транскрипційний фактор; CAM — кальмодулін; CaMKK — кальцій-кальмодулін-залежні кінрази; AKT1 — шейкер-подібний  $K^+$  канал; SOS1 —  $Na^+/H^+$  антипортер

Через CBL/CIPK регуляторну систему регулюється багато іонних каналів, модуляція активності яких є важливою в розвитку різноманітних стресових реакцій.

Кіназа CIPK24 є важливим регуляторним компонентом у механізмі сольової стійкості. У комплексі з плазмалемним білком CBL4 ця кіназа регулює активність  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортера SOS1 (Salt Overly Sensitive 1). Крім цього, CIPK24 може зв'язуватися з CBL10, який локалізується у вакуолярній мембрані. Комплекс CBL10/CIPK24 модулює активність тонопластного  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортера (рис. 49).

Сенсори CBL1 і CBL9 взаємодіють з CIPK23, утворюючи комплекси CBL1/CIPK23 і CBL9/CIPK23, які специфічно регулюють активність тільки одного шейкер-подібного  $\text{K}^+$ -каналу АКТ1 (Arabidopsis  $\text{K}^+$  Transporter 1). На інші  $\text{K}^+$ -канали ці комплекси не впливають.

CIPK1 спільно з CBL1 і CBL9 регулює АБК-залежні й АБК-незалежні реакції на стресові впливи. Багато АБК-залежних відповідей контролюються комплексом CBL9/CIPK3.

## 3.4. КОВАЛЕНТНА МОДИФІКАЦІЯ СИГНАЛЬНИХ ПОСЕРЕДНИКІВ

### 3.4.1. Значення оборотної ковалентної модифікації

Модуляція активності функціональних білків внаслідок зміни їх конформації здійснюється не тільки через взаємодію з алостеричними регуляторами, але і шляхом ковалентної модифікації. Третинна або четвертична структура білків може бути змінена в результаті різних посттрансляційних механізмів. Це може бути досягнуто шляхом:

- приєднання або відщеплення простетичних груп (фосфатів, сульфатів, моно- і олігосахаридів тощо);
- модифікації первинної структури (обмежений протеоліз, відщеплення кінцевих амінокислотних залишків тощо).

Подібні зміни білків відбуваються посттрансляційно у процесі їхнього дозрівання, але велика кількість модифікацій може

бути оборотними та використовуються клітинами в регуляторних механізмах.

Найбільш значущими у регуляторному відношенні та повсюдно поширеними у природі є модифікації білків за допомогою фосфорилування та дефосфорилування. Фосфорилування білків (приєднання фосфатних груп, тобто залишків фосфатної кислоти) здійснюється **протеїновими кіназами** — ферментами, які каталізують перенос  $\gamma$ -фосфату АТР на специфічний амінокислотний залишок білка-мішені. Фосфатні групи в білкових молекулах можуть бути зв'язані з різними амінокислотними залишками: серинів, треонінів, тирозинів, гістидинів та ін. Дефосфорилування фосфопротеїнів здійснюється **протеїновими фосфатазами**.

Посттрансляційна оборотна модифікація білків шляхом фосфорилування/дефосфорилування, або **кіназно-фосфатазний цикл**, є важливим регуляторним механізмом. Введення або видалення фосфатної групи сприяє істотному перерозподілу зарядів у білкових молекулах, що значно впливає на їх просторову структуру й активність.

Непрямим підтвердженням важливості фосфорилування білків є наявність у еукаріот значної кількості генів, що кодують протеїнові кінази та фосфатази. Наприклад, у геномі дріжджів виявлено понад 120 генів різних протеїнкіназ, а геном людини, за деякими оцінками, кодує понад 1000 цих ферментів. У рослинах *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано 175 серин/треонінових кіназ і близько 100 фосфатаз. Крім того, значна кількість цитоплазматичних білків еукаріотичних клітин (приблизно третя частина) мають ковалентно зв'язаний фосфат.

Фосфорилування та дефосфорилування чинять протилежну дію на субстрат. Ці процеси є своєрідними перемикачами активності функціональних білків. При цьому загальної залежності між наявністю фосфатної групи (або декількох груп) і станом білка не існує. Одні білки у фосфорильованому стані переходять в активну форму, а інші, навпаки, — інгібуються. (Нагадаємо, що під активністю слід розуміти не тільки каталітичну активність ферментів, але і здатність білків взаємодіяти з іншими сигнальними партнерами, тобто здатність передавати сигнал).

Значна кількість білків мають численні сайти фосфорилування, які можуть мати різне призначення. Наприклад, у молекулах рецептор-подібних кіназ одна частина сайтів фосфорилування необхідна для модулювання каталітичної активності, а інша бере участь у формуванні зв'язуючої поверхні, необхідної для взаємодії з іншими білками. Перемикання активності може здійснюватися за принципом «усе або нічого» або мати градієнтний характер, тобто введення фосфатних груп не просто «включає» або «вимикає» білок, а підсилює або послаблює його активність.

Приєднання залишків фосфатної кислоти до молекул білків здійснюється не тільки протеїнкіназами, але і ферментами іншого типу — **фосфотрансферазами**, які переносять фосфат від одного фосфорильованого білка на інший без використання АТФ. Прикладом такої трансферази є гістидинова фосфотрансфераза НРt, яка функціонує у двокомпонентній багатокроковій регуляторній системі рослин (див. розділ «Двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин»). НРt приймає фосфат на залишок гістидину від залишку аспарагінової кислоти *receiver*-домену гістидинової рецепторної кінази та переносить його на аспарагінову кислоту *receiver*-домену регулятора відповіді. Крім джерела фосфатної групи, кіназні та фосфотрансферазні реакції відрізняються тим, що в сигнальних механізмах на рівні кіназ відбувається посилення сигналу, а на рівні фосфотрансферази — ні.

### 3.4.2. Рослинні протеїнові кінази

У рослинних тканинах протеїнкінази містяться у значній кількості та різноманітті. Протеїнові кінази поділяють, головним чином, за субстратною специфічністю — вони фосфорилують конкретні амінокислотні залишки, локалізовані у певних послідовностях. Ці ферменти розрізняються також за амінокислотною послідовністю, просторовою структурою, субдициним складом, локалізацією, способом активації та іншими характеристиками.

У рослинних організмах серин/треонінові кінази становлять найбільш важливу та різноманітну групу. Гістидинові кінази

представлені рецепторними кіназами двокомпонентних систем (див. розділ «гістидинові кінази та двокомпонентні сигнальні системи»). Типові тирозинові кінази у рослин (а також у грибів) не виявлені. Фосфорилування тирозинових залишків у рослин, тим не менш, здійснюється, проте в значно меншому масштабі, ніж у тварин. Катализуються ці реакції серин/треоніновими кіназами, які мають широку специфічність. Було виявлено, що такі властивостями мають:

- кінази родини MAPKK, які беруть участь у кіназних каскадах;
- кінази, що фосфорилують циклін В-залежні кінази;
- деякі рецептор-подібні кінази (наприклад, рецептор брасиностероїдів BRI1).

Серед білкових кіназ найпоширенішими в живому світі є серин/треонінові кінази. Якщо, наприклад, тирозинові (рецепторні) кінази характерні для тварин, а гістидинові (рецепторні) кінази — для рослин і бактерій, то серин/треонінові кінази виявлені в усіх груп організмів і присутні у кожного окремого виду у великому різноманітті.

До найважливіших серин-треонінових протеїнових кіназ рослин належать:

- кальцій-залежні кінази (CDPK);
- SNF1-подібні кінази;
- рецептор-подібні кінази;
- MAP-кінази (MAPK), MAPKK, MAPKKK;
- циклін-залежні кінази;
- казеїн кінази I (CK1), казеїн кінази II (CK2);
- GSK3;
- CTR1.

### Кальцій-залежні протеїнові кінази

Кальцій є універсальним внутрішньоклітинним месенджером, який бере участь у регуляції життєдіяльності клітини. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  можуть прямо впливати на функціональні білки, зв'язуючись з ними через  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі центри (EF-руки), або опосередковано через низькомолекулярні регуляторні  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі білки, наприклад кальмодулін.

Існує три родини  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеїнових кіназ:

- 1) кальцій-кальмодулін-залежні протеїнові кінази;
- 2) кальцій-залежні кінази (кальмодулін-подібний домен протеїн-кінази);
- 3) СBL-взаємодіючі протеїнові кінази.

**Кальцій-кальмодулін-залежні кінази** (CaCMK — calcium-calmodulin-dependent kinases) є типовими для тварин ферментами, але, як виявилось, не мають широкого розповсюдження у рослин. Наприклад, у геномі *Arabidopsis* не було виявлено генів, що кодуєть кінази цієї родини.

Багато серин/треонінових кіназ тварин регулюються  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодуліном ( $\text{Ca}^{2+}$ /CAM). У відсутності кальцинованого кальмодуліну CaCMK підтримуються в неактивному стані, при якому автоінгібіторний район (псевдосубстратний мотив) закриває доступ субстрату до кіназного домену. Приєднання  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM до  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM-зв'язуючої ділянки стимулює зміна конформації кінази, що приводить до її активації.

**Кальцій-залежні протеїнові кінази** (CDPK — calcium-dependent protein kinases). Активація цих кіназ іонами  $\text{Ca}^{2+}$  не вимагає присутності кальмодуліну. У С-термінальному районі рослинних кальцій-залежних протеїн-кіназ знаходиться домен, який містить чотири консервативні ЕF-руки та на 39% є ідентичним кальмодуліну. Цю ділянку називають кальмодулін-подібним доменом (CLD — CaM-like domain). Рослинні кальцій-залежні кінази, зважаючи на особливості їхньої структури, називають також **кальмодулін-подібним доменом протеїн-кінази** (аббревіатура CDPK при цьому зберігається: CaM-like domain protein kinase).

Наявність ЕF-рук у молекулі визначає здатність кіназ безпосередньо зв'язувати іони  $\text{Ca}^{2+}$  і реагувати на зміну їхньої концентрації в клітині. Зв'язування чотирьох іонів  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулін-подібним доменом спричиняють конформаційні зміни молекули кінази, що приводить до вивільнення кіназного активного центру від автоінгібіторного домену. Ці зміни супроводжуються автофосфорилуванням CDPK, яке необхідно для повної активації ферменту.

У геномі рослин ідентифіковано багато генів CDPK. У *Arabidopsis thaliana* виявлено 34 кінази родини CDPK і 8 близьких

їм за структурою CDPK-подібних кіназ (CDPK-related kinases). Значна кількість ізоформ, імовірно, забезпечує специфічність і пластичність відповіді на різні стимули, що впливають на підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Багато ізоформ CDPK у рослин експресуються специфічно залежно від типу клітин і стадії розвитку організму й окремих органів. Крім того, окремі форми CDPK взаємодіють з певними білковими мішенями. Мішенями CDPK є багато функціональних білків з різними функціями. Наприклад, аквапорини (нодулін 26 — аквапорини симбіосомної мембрани, що оточує азотфіксуючі бактерії у бульбочках бобових рослин;  $\alpha$ -TIP — тонопластний істотний білок- $\alpha$ , виявлений у насінні квасолі в мембрані вакуолей, що містять запасний білок), нітрат-редуктаза,  $\text{Cl}^-$ -канали, сахарозо-синтаза, NADPH-оксидаза, транскрипційні регулятори тощо.

**СВЛ-взаємодіючі протеїнові кінази (CIPK — CBL-interacting protein kinase)** не мають кальцій-зв'язуючих доменів, але їхня активність залежить від концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  опосередковано через кальцій-сенсорні кальцинейрин В подібні білки (CBL — Calcineurin B-Like). Білок CBL має значну схожість з регуляторною В-субодиницею кальцинейрина та нейрональним кальцієвим сенсором тварин і дріжджів. Як і кальмодулін, CBL має чотири  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих EF-руки та взаємодіє зі своїми мішенями у кальцинованому стані, модулюючи їх активність. Однак, на відміну від кальмодуліну, CBL зв'язані з мембранами та регулюють активність ферментів тільки однієї родини — СВЛ-взаємодіючих протеїнових кіназ. Мембранна локалізація CBL визначається наявністю цього білка посттрансляційної модифікації у вигляді ацильної групи. Виявлено CBL у плазматичній і вакуолярній мембранах. Кінази CIPK мають цитоплазматичну та ядерну локалізацію та залучаються до мембран при взаємодії з кальцинованою формою CBL.

Молекула CIPK складається з амінотермінального кіназного домену та карбокситермінального регуляторного домену, між якими знаходиться варіабельна з'єднувальна ділянка. У карбокситермінальному регуляторному районі знаходиться консервативний NAF-домен, необхідний для взаємодії із CBL, і PPI (protein-phosphatase interaction) домен, що опосередковує взаємодію із фосфатазою PP2C.

Збільшення цитоплазматичної концентрації кальцію приводить до зв'язування чотирьох іонів  $\text{Ca}^{2+}$  EF-доменами регуляторного білка CBL. Кальцинований CBL з'єднується з СІРК через NAF-домен. Взаємодія білків стимулює зміну конформації кінази, в результаті чого автоінгібіторний і кіназний домен дисоціюють. Активована кіназа СІРК взаємодіє зі своїми мішенями та фосфорилує їх.

У геномі рослини *Arabidopsis* кодується 10 CBL і 26 СІРК а у геномі рису — 10 CBL і 30 СІРК. Конкретні види CBL і СІРК специфічно взаємодіють один з одним, а утворені комплекси CBL/СІРК модулюють активність мембранозв'язаних мішеней шляхом фосфорилування. Між індивідуальними CBL і СІРК можливе утворення альтернативних комплексів. Це збільшує кількість можливих комбінацій і забезпечує тонке налаштування активності мембранних компонентів за дії різних зовнішніх впливів різної інтенсивності. Сукупність комплексів CBL/СІРК являє собою своєрідний центральний «процесор» системи декодування  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів, які формуються при широкому діапазоні стимулів. Через CBL/СІРК регуляторну систему регулюється багато іонних каналів, модуляція активності яких є важливою в розвитку різноманітних стресових реакцій.

### SnRK — SNF1-подібні кінази

Рослинні кінази родини SnRK є гомологами дріжджових кіназ SNF1. Звідси SnRK — SNF1-подібні кінази (SNF1 related kinase). До цього ж типу кіназ належать АМР-активовані кінази (АМПК) ссавців. У *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано дві підродина: SnRK1 і SnRK2.

Усі кінази, гомологічні SNF1, активуються переважно у стресових умовах, за яких знижується рівень глюкози й аденозітрифосфатів, а концентрація АМР підвищується. Основна стратегія механізмів, що регулюються цими кіназами, спрямована на зниження рівня біосинтетичних процесів і активацію альтернативних катаболічних шляхів. Це сприяє підвищенню продукції АТР, і перерозподілу енергетичних ресурсів на адаптаційні процеси.

Кінази SNF1, АМПК і SnRK близькі за структурою та властивостями, але кожна родина має специфічні особливості. Кінази



дріжджів і тварин мають гетеротримерну структуру:  $\alpha$ -субодиниця каталітична, а  $\beta$  і  $\gamma$  виконують регуляторні функції та беруть участь у зв'язуванні субстрату. Рослинні SnRK різняться між собою за структурою. SnRK1 існує як мультимерний комплекс, подібно до тваринних і дріжджових гомологів, а SnRK2 є поодиноким поліпептидом.

Каталітичні субодиниці кіназ SNF1, AMPK і підродини SnRK1 мають високий ступінь гомології (60–70 %) в області кіназного домену. У SnRK2 виявлено 43 % гомологію з кіназним доменом SNF1. Крім цього, для SnRK2 є характерним дуже короткий С-термінальний домен, який включає кислу ділянку, що складається з поліглутаматних і поліаспартатних послідовностей. Відмінності у карбокситермінальній області, вірогідно, визначають субодиничний склад SnRK1 і SnRK2.

**Активация.** SNF1 кіназа активується за умов глюкозного голодування. Механізм активації включає фосфорилування SNF1 специфічної кінази. Активність AMPK знаходиться під подвійним контролем: регуляція здійснюється через алостеричні АМР-зв'язуючі центри та шляхом фосфорилування специфічної кінази АМРК (АМРКК). Активация АМРК і подальше фосфорилування мішеней приводить до зниження споживання метаболічної енергії у вигляді АТФ за рахунок інактивації ряду анаболічних процесів. Одночасно з цим відбувається перемикавання метаболізму на використання альтернативних енергетичних субстратів для посилення синтезу АТФ. При наявності багатьох схожих рис між SNF1-подібними кіназами тварин і дріжджів, тим не менш, SNF1 не активується АМР.

Рослинні кінази родини SnRK за більшістю ознак дуже схожі з АМРК ссавців, але вони не активуються аденозин-5'-монофосфатом та регулюються тільки фосфорилуванням. SnRK1 має специфічний залишок треоніну-172, який фланковано консервативною послідовністю. Подібна послідовність, що включає треонін-172, є у АМРК, причому АМРКК фосфорилує АМРК по даному треоніну. Передбачається, що SnRK1 також фосфорилується по цьому сайту. Активация SnRK1 відбувається в умовах стресу при виснаженні джерела Карбону, що легко утилізується. Як було показано *in vitro*, рослинні SnRK1 фосфорилують гідроксиметил-глутарил-СоА-редуктазу,

сахарозофосфат-синтазу та нітрат-редуктазу. Фосфорилюючи ці ферменти, SnRK1 пригнічує синтез ізопреноїдів і сахарози, а також відновлення неорганічного азоту та включення його до складу органічних сполук. Активація SnRK1 впливає також на зміну генної експресії. SnRK1 дерепресує гени катаболічних шляхів. Наприклад, гени сахарозосинтази та ферментів гліоксилатного циклу репресуються глюкозою, але активуються SnRK1.

Протеїнкінази родини SnRK2 у фізіологічно оптимальних умовах інгібуються специфічними фосфатазами 2C. Під впливом різних абіотичних стресів репресія знімається шляхом інактивації фосфатаз. Мішенями SnRK2 є, наприклад, транскрипційні фактори, що регулюють активність АБК-залежних генів. Прикладом SnRK2 кінази є 42 кД білок NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase), виявлений у клітинах тютюну.

## Рецептор-подібні кінази

Рецептор-подібні кінази (receptor-like kinase — RLK) у рослин представлені у великій різноманітності. Всі вони мають схожу структуру та механізм активації. Рецептор-подібні кінази переважно є мономерними трансмембранними білками, які перетинають мембрану один раз. Значні відмінності виявляються в екстраклітинному рецепторному домені кіназ. Розрізняють 4 основні групи рецептор-подібних кіназ:

- 1) LRR-група;
- 2) S-домен група;
- 3) лектин-подібний домен група;
- 4) EGF-група.

У рослин *Arabidopsis* також виявлено декілька рецептор-подібних кіназ, що мають специфічні структурні особливості, які не дозволяють віднести ці молекули до однієї із вказаних груп.

**LRR-група.** Екстраклітинний ліганд-зв'язуючий домен рецептор-подібних кіназ цієї групи включає тандем багатьох лейцин-збагачених повторів. Наприклад, рецептор брасиностероїдів BRI1 містить 24 лейцин-збагачені повтори (LRR). LRR розташовані послідовно один за одним, і тільки між 20 і 21 LRR

розташована ділянка, яку називають острівний домен — ID (*island domain*). Один із лейцінових повторів — LRR21 — відрізняється від інших LRR незвичайним метіонін-збагаченим повтором. Ділянка, що складається з 94 амінокислотних залишків, що включає острівний домен і LRR21 (ID–LRR21), ідентифікований як брасиностероїд-зв'язуючий сайт. Механізм активації BRI1 описано в розділі «Рецептор-подібні кінази».

Крім рецептора BRI1, до серин/треонінових LRR-рецептор-подібних кіназ належать рецептори пептидних регуляторів.

CLV1 (*CLAVATA1*) — рецептор пептидного регулятора CLV3. CLV1 бере участь у механізмі, за допомогою якого встановлюється та підтримується баланс процесів проліферації та диференціації клітин апікальних меристем стебла. Зв'язування CLV3 із CLV1 приводить до інгібування відтворюючого поділу клітин і стимулює процес диференціації.

SR160 — рецептор системіну томата TomSys. Системін виконує ключову роль у реакції рослини на вплив стресового чинника, активуючи продукцію мобільного фактора, який забезпечує розвиток системної стійкості.

**S-домен група.** Зовнішньоклітинний домен рецептор-подібних кіназ S-домен групи близький за структурою глікопротеїну S-локусу (*S-locus glycoprotein* — SLG) рослин роду *Brassica*. Для S-домену є характерною наявність консервативних цистеїн-збагачених мотивів. Просторова структура цих доменів стабілізується шляхом утворення дисульфідних зв'язків між залишками консервативних цистеїнів.

Одним із представників цієї групи є рецептор SRK (*S-locus receptor-like kinase*) *Brassica*, що бере участь у механізмі самонесумісності. Система самонесумісності рослин забезпечує розпізнавання та відторгнення пилку близькоспоріднених індивідів (у тому числі і своєї власної) при попаданні її на рильце маточки. Ця властивість сприяє запобіганню близькоспоріднього схрещування та підтримці внутрішньовидового генетичного різноманіття. Лігандом SRK є пептидний регулятор SCR/SP11 (*S-locus cysteine-rich protein* / *S-locus protein 11*). Самонесумісність контролюється одиничним мультиалельним локусом, який називається локусом стерильності (S-локус). У систему самонесумісності *Brassica* входить також глікопротеїн SLG, однак

значення цього білка в механізмі несумісності нез'ясовано. У рослин *Arabidopsis thaliana* виявлено три рецепторподібні кінази S-домен групи, проте до системи самонесумісності вони не мають ніякого відношення.

**Лектин-подібний домен група.** Екстраклітинний домен цих рецептор-подібних кіназ за структурою належить до лектинів бобових і лектин-подібного білка *Arabidopsis thaliana* Lec2. Передбачається, що рецептори цієї групи пов'язують олігосахариди — продукти руйнування компонентів клітинної стінки, спричиненого дією патогенних грибів.

**EGF-група.** Екстраклітинна частина молекул EGF-групи містить повтори, які є характерними для епідермального ростового фактора (EGF) ссавців. Значення рецептор-подібних кіназ EGF-групи у рослин не відомо.

## MAP кінази

У клітинах тварин і грибів виявлено та охарактеризовано кінази, що формують каскадні регуляторні системи (або модулі). Їх називають **мітоген-активованими протеїновими кіназами** та позначають **МАРК (mitogen-activated protein kinase)** або **МРК**. Кіназні каскади включають три (рідше чотири) кінази, які послідовно фосфорилюють одна одну. Модулі працюють у напрямку **МАРККК → МАРКК → МАРК**. Кіназу, яка замикає каскад (МАРК), фосфорилює кіназа **МАР кінази (МАРКК)**, яка, в свою чергу, фосфорилюється кіназою **кінази МАР кінази (МАРККК)**.

Усі кінази кіназного каскаду мають альтернативні позначення:

**МАРК (МАР кіназа) — МРК;**

**МАРКК (кіназа МАР кінази) — МАР2К, МЕК або МКК;**

**МАРККК (кіназа кінази МАР кінази) — МАР3К, МЕКК.**

Якщо в каскаді бере участь четверта кіназа, яка фосфорилює **МАРККК**, її називають **кіназою кінази кінази МАР кінази — МАРКККК**, або **МАР4К**.

Більшість кіназних каскадів у тварин активуються через малі G-білки, які в GTP-зв'язаній (активній) формі безпосередньо взаємодіють з **МАРККК (або МАРКККК)**.

У рослинних клітинах ідентифіковано кінази всіх трьох під-родин стандартного модуля. У геномі арабидопсиса, наприклад, виявлено 20 МАРК, 10 МАРКК і 60 МАРККК. Багато з цих генів були клоновані. За допомогою кіназних каскадів регулюється активність багатьох функціональних білків, у тому числі ферментів і транскрипційних факторів.

Рослинні кінази мають консервативні структури, характерні для аналогічних кіназ тварин і грибів. МАРК містять мотив Thr-X-Tyr у «Т-петлі», яку також називають сегментом активації. Для активації МАРК необхідне фосфорилування треоніну та тирозину в сегменті активації. Цю реакцію каталізує МАРКК — кіназа широкої специфічності. МАРККК фосфорилує у молекулі МАРКК залишки серину або треоніну, які є консервативними для рослин.

Кіназні каскади активуються багатьма зовнішніми стимулами та гормонами. При додаванні ауксину в культуру клітин тютюну МАРК активувалася через п'ять хвилин. У листі тютюну через хвилину після поранення була активована одна з МАРК — WIPK (wound-induced МАРК). Показано також, що WIPK залучається до активації ферментів октадеканоїдного шляху (синтезу жасмонової кислоти).

У протопластах клітин алейронового шару ячменю МАРК активувалася абсцизовою кислотою через хвилину. У листі конюшини активація цього ферменту відбувалася під впливом різних стресових впливів (холодовий шок, зневоднення, пошкодження) без участі АБК.

Важливою особливістю більшості відомих МАРК є те, що активація цих ферментів є короткочасною. Це пов'язано з тим, що при активації МАРК стимулюється транскрипція специфічних МАРК фосфатаз подвійної специфічності, які дефосфорилюють МАР кінази всіх рівнів.

### Циклін-залежні кінази (CDK)

Циклін-залежні кінази (CDK — cyclin-dependent kinases) і цикліни були спочатку відкриті як ключові регулятори клітинного циклу, звідки й отримали свою назву. Разом ці білки контролюють перехід до синтетичної фази або митозу. Однак

не всі циклін-залежні кінази мають відношення до регуляції клітинного поділу.

Циклін-залежні кінази дріжджів і ссавців є невеликими білками (близько 34 кД) і являють собою мінімальний кіназний домен. У вільному стані ці білки є каталітично неактивними та набувають кіназної властивості після зв'язування з циклінами. Важлива для взаємодії з циклінами ділянка містить консервативну послідовність PSTAIRE. Більшість циклін-залежних кіназ виконують численні ролі, та їхня функціональна активність залежить від того, з якими циклінами вони будуть асоціюватися.

Цикліни та циклін-залежні кінази синтезуються та деградують у певні періоди клітинного циклу. Утворений гетеродимер циклін-CDK ще не є активним і вимагає подальшої активації шляхом фосфорилування/дефосфорилування. Циклін-залежні кінази мають дві основних ділянки фосфорилування:

- 1) залишок треоніну в активаційній Т-петлі фосфорилується циклін-активуючою кіназою (CAK — cyclin activating kinase);
- 2) залишок тирозину в послідовності GXGX<sub>Y</sub>X фосфорилується іншою кіназою (наприклад, у дріжджів, що діляться, подібний фермент називається Wee1).

Якщо фосфорилування треоніну є необхідним для активації CDK, то фосфорилування тирозину, навпаки, інгібує фермент. Для остаточної активації циклін-залежної кінази є необхідною активність фосфатази, яка відщеплює фосфатну групу від тирозину (у дріжджів, що діляться, — це CDC25).

Таким чином, циклін-залежні кінази активуються у декілька етапів:

- 1) асоціація з циклінами (цей етап контролюється на рівні транскрипції);
- 2) фосфорилування ділянок активації (треонін) та інгібування (тирозин);
- 3) дефосфорилування фосфотирозину.

У рослин *Arabidopsis thaliana* виявлено 2 гени, що кодують циклін-залежні кінази — CDC2a і CDC2b. Одна з них, CDC2a, містить мотив PSTAIRE, який повністю відповідає аналогічній послідовності у кінази CDC2 дріжджів. У молекулі CDC2b цей мотив відрізняється двома амінокислотами: PPTALRE. Перша кіназа з послідовністю PSTAIRE експресується протягом усього

клітинного циклу, тоді як інша (з варіантом PPTALRE) — протягом обмеженого терміну між синтетичною фазою та митозом.

У рослинах *Arabidopsis thaliana* виявлено та клоновано також CDK-активуючу кіназу, 10 циклінів A/B типу, що беруть участь у регуляції переходу G2→S, і три цикліну D типу (регуляція переходу G1→M).

### Казеїнові кінази СК1 і СК2

Дві підродини казеїнових кіназ (casein kinase — СК) були виявлені за їхньою здатністю фосфорилувати молочний білок казеїн. СК1 і СК2 значно відрізняються одна від одної за амінокислотною послідовністю та просторовою структурою, але, тим не менше, мають деякі схожі властивості. Кінази обох підродин фосфорилують залишки треонінів і серинів біля кислих ділянок амінокислотного ланцюга. Різниця полягає в тому, що СК1 віддає перевагу ділянкам, у яких кислі амінокислоти знаходяться відносно серину/треоніну з N-кінцевого боку в положенні P-3, а СК2 із карбоксикінцевого — у положенні P+3.

Вважається, що активність СК1 і СК2 не перебуває під ретельним контролем. Мабуть, ці кінази забезпечують конститутивний базальний рівень фосфорилування, а регуляція здійснюється за рахунок активності протеїнових фосфатаз.

Кінази СК1 є мономерними білками. У них достатньо широкий спектр субстратів *in vitro*, але в більшості випадків фосфорилування не приводить до зміни активності субстрату.

Функції СК1 не з'ясовані, але, як показує мутаційний аналіз, ці кінази мають надзвичайно важливе значення в діяльності клітин. На дріжджах показано, що делеції двох генів СК1 (YCK1 і YCK2) є летальними, а порушення гена HRR25 приводить до гіперчутливості до дії ДНК-пошкоджуючих агентів. Тобто, продукт гена HRR25 бере участь у механізмах репарації ДНК. У геномі *Arabidopsis thaliana* виявлено п'ять генів, що кодують ізоформи СК1. Структура СК1 рослин є подібною до СК1 ссавців.

Кінази СК2 ссавців існують переважно у формі тетрамеру  $a_2b_2$  і мають незвичайну для кіназ особливість: разом з АТФ вони використовують також GTP. Субодиниці *a* є каталітичними,

*a* і *b* виконують регуляторну роль — модулюють активність відносно певних типів субстрату. Серед мішеней СК2 у ссавців є ДНК-зв'язуючі білки, наприклад p53, і топоізомераза II. Активність СК2 пов'язують із встановленням клітинної полярності та функціонуванням клітинного циклу. Порушення двох генів СК2 у *Saccharomyces cerevisiae* (СКА1 і СКА2) мають летальний характер.

У *Arabidopsis thaliana* виявлено дві ізоформи каталітичної субодиниці *a* і дві — регуляторної *b*. У клітинах СК2 присутній у мономерній формі (*a*) і у вигляді тетрамера ( $a_2b_2$ ). Як і у ссавців, СК2 рослин фосфорилує серин, фланкований кислими амінокислотними залишками, і використовує АТФ і GTP.

## Родина GSK3/Shaggy

GSK3-подібні кінази становлять групу висококонсервативних конститутивно активних серин-треонінових кіназ, які беруть участь у численних сигнальних шляхах, за допомогою яких регулюється метаболізм і розвиток клітин і тканин. Один із ферментів ссавців, які беруть участь в інсулін-залежному механізмі синтезу глікогену, кіназа глікогенсинтази-3 (glycogen synthase kinase-3 — GSK3) є головним представником цієї родини кіназ і дає йому назву. Активність тваринної GSK3 регулюється фосфорилуванням. Протеїнкіназа В інактивує GSK3, фосфорилуючи сериновий залишок в амінотермінальному домені. Гомологічна кіназа *Drosophila melanogaster*, продукт гена shaggy/zeste-white 3, є необхідною для контролю процесів розвитку.

До цієї родини належить рослинна кіназа BIN2 (Brassinosteroid Insensitive 2), що бере участь у брасиностероїдному сигналі. BIN2 має 70% гомологію із GSK3. Найбільша схожість виявляється в області каталітичного домену. У *Arabidopsis* BIN2 належить до 10-членної родини, що включає чотири філогенетичні підгрупи. Всі вони мають висококонсервативні серин-треонінові кіназні домени, але розрізняються N- і C-термінальними ділянками. GSK3-подібні кінази в *Arabidopsis* називають також AtSK (*Arabidopsis thaliana* Shaggy-like Kinases). Показано, що в регуляції брасиностероїдного сигналу надлишково функціонують три AtSK підгрупи II: AtSK21, AtSK22 і AtSK23/BIN2.



Кіназа AtSK23/BIN2 є негативним регулятором брасиностероїдного сигнального шляху. Вона фосфорилує транскрипційні регулятори BZR1 і BES1 — активатори брасиностероїд-регульованих генів. Фосфорилування факторів BZR приводить до їхнього 26S-залежному протеолізу. Дефосфорилування фосфатазою BSU1 інгібує активність BIN2 і дерепресує брасиностероїдний сигнал.

### CTR1/Raf-подібна родина

Кіназу CTR1 (constitutive triple response 1) було ідентифіковано у рослин як суттєвий сигнальний компонент етиленового сигналу. Порушення гена CTR1 із втратою функції приводить до конститувної потрійної реакції проростків (гальмування росту розтягненням, ріст у товщину та діагеотропічний ріст), яка проявляється навіть у відсутності гормону. За структурою CTR1 є гомологом кіназ родини Raf-1 ссавців. Активність кінази Raf-1 у тваринних клітинах модулюється Ras G-білком, а її мішенню є MAPKKK — перша кіназа MAP-кіназного каскаду. Сигнальний механізм, в якому бере участь CTR1, значно відрізняється від Raf-1. Було показано, що амінотермінальна область CTR1 безпосередньо взаємодіє з кіназним доменом етиленових рецепторів (гістидинових рецепторних кіназ), а мономерні G-білки зовсім не беруть участі в етиленовому сигналі. Мішень CTR1 не ідентифікована. Показано, що після CTR1 в етиленовому сигналі активується 12-трансмембранний білок EIN2, гомологічний переносникам двовалентних металів, але чи функціонує кіназний каскад між CTR1 і EIN2, не відомо.

### 3.4.3. Протеїнові фосфатази

Протеїнові фосфатази (PP — protein phosphatase), або фосфопротеїнфосфатази — ферменти, які дефосфорилують фосфопротеїни, є функціональними антагоністами протеїнових кіназ, спільно з якими беруть участь у регуляції функціональної активності клітин. Механізми регуляції активності фосфатаз та їхніх антагоністів протеїнових кіназ мають, зазвичай, протилежну спрямованість.

## Класифікація фосфатаз

Фосфопротеїнфосфатази прийнято ділити на три основні родини, що розрізняються за субстратною специфічністю, біохімічними характеристиками, амінокислотною послідовністю та архітектурою генів: дві родини серин/треонінових фосфатаз (**PPP** і **PPM**) і родина **PTP**, що включає тирозинові фосфатази та фосфатази подвійної специфічності.

**Таблиця 2.** Класифікація основних груп рослинних серин/треонінових протеїнових фосфатаз

Принцип класифікації	Групи				
• амінокислотна послідовність каталітичних субодиниць	PPP			PPM	
• субстратна специфічність, чутливість до пептидних інгібіторів	PP1	PP2			KAPP
• вимога іонів дво-валентних металів, субодиничний склад		PP2A	PP2B	PP2C	

## Серин/треонінові фосфатази

Принцип поділу серин/треонінових фосфатаз за групами був розроблений на початку 1970-х років і до сьогодні використовується як основа сучасної класифікації даних ферментів.

Спочатку серин/треонінові фосфатази у тварин були розділені на два основні класи (**PP1** і **PP2**) згідно з їхньою субстратною специфічністю та чутливістю до інгібіторів. Як субстратний «еталон» використовували субодиниці кінази фосфорилази ссавців. Фосфопротеїнфосфатази **PP1** переважно де-

фосфорилують  $\beta$ -субодиницю, фосфопротеїнфосфатази PP2 —  $\alpha$ -субодиницю. Крім того, PP1 є чутливими до пептидних інгібіторів, відомих як інгібітор-1 (I-1) та інгібітор-2 (I-2), а PP2 є стійкими до них.

**Фосфатази PP1** є гетеродимерами, що складаються з каталітичної субодиниці PP1c і регуляторної субодиниці R.

**Фосфатази PP2** становлять різноманітну групу, тому було запропоновано поділити їх на три підкласи, відповідно до відношення ферментів до іонів двовалентних металів ( $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ ). Крім того, для кожного підкласу є характерним певний субодиничний склад.

**PP2A** — це тримери, які складаються з двох регуляторних субодиниць (A і B) і однієї каталітичної — PP2Ac. Для прояву активності ферменти не вимагають присутності двовалентних іонів.

**PP2B** — гетеродимери, складаються з каталітичної субодиниці A і регуляторної B. Активуються іонами кальцію через регуляторну B-частинку, яка має  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі центри EF-руки. Повна активація фосфатаз PP2B тварин досягається при зв'язуванні кальцинованого кальмодуліну.

**PP2C** — мономерні фосфатази. Активуються іонами  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Родина PPP.** Вивчення амінокислотної послідовності каталітичних субодиниць показало, що каталітичні домени фосфатаз PP1, PP2A та PP2B представлені консервативними послідовностями (близько 280 амінокислотних залишків), які мають високу ступінь подібності — 40–60%. Наявність висококонсервативного каталітичного домену було підставою для об'єднання фосфатаз PP1, PP2A та PP2B в одну родину PPP. Усі фосфатази PPP є гетерополімерними молекулами. Амінотермінальні та карбокситермінальні домени каталітичних субодиниць необхідні для їх асоціації з регуляторними субодиницями. Кожна індивідуальна каталітична субодиниця може об'єднуватися з різними ізоформами регуляторних субодиниць. У результаті утворюється цілий ряд холоферментів із різноманітними властивостями та локалізацією. У реакційному центрі всіх PPP знаходяться метали зі змінною валентністю, які є суттєво важливими для каталітичної активності. Для каталітичного центру PP1c, наприклад, є характерною наявність іонів

$Mn^{2+}$  і  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , а для PP2B —  $Zn^{2+}$  і  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ . Ці метали використовуються ферментами для активації молекули води або гідроксил-іона. Завдяки цій особливості фосфатази родини PPP здійснюють одноступінчасту реакцію дефосфорилування без формування фосфат-ферментного посередника.

**Родина PPM.** Усі мономерні  $Mg^{2+}$ -залежні серин/треонінові фосфатази були віднесені до родини PPM. Основу цієї групи складають ліпази PP2C. Мономерні PP2C фосфатази не мають гомології з ферментами групи PPP. Незважаючи на це, просторові структури PPP і PPM фосфатаз у цілому є схожими. Послідовності каталітичних доменів фосфатаз всередині групи PPM мають обмежену гомологію (20–35 %). Амінотермінальні області виконують регуляторну роль і служать для взаємодії з іншими молекулами. У каталітичному районі PP2C знаходиться бінклеарний центр, що містить два іона  $Mn^{2+}$ . Дефосфорилування субстрату, як і у PPP, здійснюється за допомогою активації молекули води в одноступінчастій реакції без формування фосфат-ферментного посередника.

**Нові групи фосфатаз.** Термінальні області молекули рослинних фосфатаз часто представлені унікальними послідовностями, які можуть бути характерними для вузької групи ферментів, а деякі мотиви — типовими для фосфатаз рослин, що належать до певних таксономічних груп. Ідентифікація цих послідовностей дозволила розширити стандартну класифікацію фосфатаз. Крім груп PP1, PP2A та PP2B, до родини PPP зараз відносять порівняно недавно виявлені фосфатази PP4, PP5, PP6, PP7.

## Тирозинові фосфатази

У тваринних організмів тирозинові фосфатази присутні у значній кількості та виконують істотну регуляторну роль, беручи участь у контролі таких важливих процесів, як зростання та проліферація клітин. У геномі людини налічується більше 100 генів, що кодують РТР. Відносно субстрату, на який спрямована каталітична активність ферментів, тирозинові фосфатази поділяють на тирозин-специфічні (РТР) і фосфатази подвійної специфічності (DsРТР), які дефосфорилують не тільки фосфотирозини, але й фосфосерин/фосфотреонін.

Родини тирозинових фосфатаз РТР і DsPTR мають незначну гомологію, проте у них є ряд принципово східних структурних характеристик.

По-перше, молекули фосфатаз, незважаючи на низьку ступінь схожості амінокислотних послідовностей, формують просторово подібні каталітичні домени.

По-друге, в каталітичному центрі ферментів знаходиться мотив (V/I)HCXAGXGR(S/T)G, який містить залишок цистеїну, необхідний для утворення фосфат-ферментного посередника. Цей цистеїн займає положення, оптимальне для нуклеофільної атаки фосфатної групи. Він знаходиться в ущелині, в яку проникає фосфорильований амінокислотний залишок при взаємодії ферменту з субстратом.

По-третє, послідовність зовнішньої області каталітичного домену, яка визначає субстратну специфічність ферментів, є характерною для всіх тирозинових фосфатаз. Примітно, що у даній області молекули DsPTR не мають ніякої гомології із серин/треоніновими фосфатазами.

Специфічність фосфатаз залежить від двох особливостей субстрату:

- наявність фосфорильованого амінокислотного залишку;
- положення, яке займає цей залишок, або, іншими словами, — фланкуючі послідовності.

Послідовності зовнішньої області каталітичного домену фосфатаз упізнають поверхню субстрату (послідовності, що фланкують фосфорильований залишок). Глибина ущелини, у якій знаходиться мотив з істотним залишком цистеїну, відповідає довжині фосфорильованого залишку субстрату. У тирозин-специфічних фосфатаз глибина щілини в каталітичному центрі відповідає довжині залишку фосфотирозину, тоді як залишки фосфосерину і фосфотреоніну є занадто короткими, щоб взаємодіяти з цистеїном. З цієї причини тирозин-специфічні фосфатази дефосфорилують тільки залишки фосфотирозину. Фосфатази подвійної специфічності формують каталітичну щілину меншої глибини, тому при наявності відповідних послідовностей, що оточують фосфорильований залишок, ці ферменти можуть здійснювати дефосфорилування не тільки залишків фосфотирозину, але також фосфосерин і фосфотреонін. Вважають,

що фосфатази подвійної специфічності є усіченою версією тирозин-специфічних фосфатаз.

## Рослинні фосфатази

### Різноманітність рослинних фосфатаз

У рослин виявлено більшість основних груп фосфатаз. Причому набір і співвідношення фосфатаз у рослин і тварин значно відрізняється. Для рослин є характерним істотне переважання мономерних фосфатаз. Наприклад, у геномі *Arabidopsis* ідентифіковано 7 генів, що кодують каталітичні субодиниці PP1, 6 генів каталітичних субодиниць PP2A і 70 генів PP2C.

Із головних родин PPP у рослин були ідентифіковані фосфатази PP1 і PP2A. Каталітичні субодиниці PP1с були клоновані, а регуляторні субодиниці, незважаючи на те що активність фосфатаз PP1 асоціюється з великими білковими комплексами, поки не виявлені. Гени каталітичних і обох регуляторних субодиниць фосфатази PP2A були ідентифіковані та клоновані. Регуляторні субодиниці A і B рослинних PP2A мають 70 % схожість з тваринними гомологами.

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних PP2B-подібних фосфатаз у рослинних тканинах також було зареєстровано, але генів, близьких до генів субодиниць фосфоліпаз PP2B тварин, у рослинних геномах не виявлено. Передбачається, що  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні фосфатази рослин мають унікальні рослинно-специфічні послідовності та взаємодіють не з кальмодуліном, а з кальцинейрин B-подібними білками (див. розділ «Кальцій-залежні протеїнові кінази»). Аналіз геному *Arabidopsis* показує також наявність інших фосфатаз родини PPP: PP4, PP5, PP6 і PP7.

Фосфатази PP2C у рослин представлені в значно більшому розмаїтті, ніж в інших еукаріотів. Ці ферменти мають незначну схожість з PP2C тварин і грибів (20–35 %). Амінокінцеві некаталітичні області молекул рослинних PP2C надзвичайно різноманітні та представлені рослинно-специфічними послідовностями, які не зустрічаються за межами царства рослин.

Тирозинові фосфатази у рослин представлені в значно меншому розмаїтті, ніж серин/треонінові. У геномі *Arabidopsis* ідентифіковано близько 20 генів, що кодують тирозинові фос-

фатази, з яких тільки одна є тирозин-специфічною, а решта має подвійну специфічність.

### Значення рослинних фосфатаз

Рослинні фосфатази разом з кіназами підтримують певний рівень фосфорилування функціональних та регуляторних білків, який залежить від певних умов. Зміна статусу фосфорилування білків відбивається на їхній активності. Під контролем кіназно-фосфатазної системи знаходиться активність ферментів, іонних каналів, трансмембранних переносників, транскрипційних факторів та інших клітинних компонентів.

**Родина PPP.** Субстратом фосфатаз PP1 і PP2A є ферменти гідроксиметил-глутарил-CoA-редуктаза, сахарозофосфат-синтаза та нітрат-редуктаза. Ці ферменти фосфорилуються кіназою SnRK1 під дією різних стресових факторів і АБК. Фосфорилуючи ці ферменти, SnRK1 пригнічує синтез ізопреноїдів і сахарози, а також відновлення неорганічного азоту та включення його до складу органічних сполук. Фосфатази PP1 і PP2A виступають антагоністами кінази SnRK1 в даному механізмі. PP1 і PP2A знижують рівень фосфорилування зазначених ферментів, стимулюючи їх активність і шляхи, в яких вони беруть участь. Фосфатази PP2A беруть участь у механізмі брасиностероїдного сигналу — активують транскрипційні фактори BES1 і BZR1 шляхом дефосфорилування.

**Родина PPM.** Протеїнові фосфатази PP2C беруть участь у контролі АБК-регульованих генів. У *Arabidopsis* було ідентифіковано дві гомологічні мономерні серин/треонін фосфатази, які виконують роль негативних регуляторів сигналу АБК: ABI1 і ABI2. У відсутності АБК ці фосфатази конститутивно інгібують активність протеїнкінази SnRK2, від активності якої залежить рівень експресії АБК-регульованих генів. Поява гормону в клітині приводить до його зв'язування з внутрішньоклітинним START-домен рецептором АБК родини PYR/PYL. Комплекс PYR/PYL-АБК специфічно зв'язує фосфатазу PP2C в області реакційного центру, інгібуючи її активність. Інгібування фосфатази 2C приводить до дерепресії протеїнкінази SnRK2, яка фосфорилує групу транскрипційних факторів активаторів АБК-регульованих генів і стимулює активність відповідних генів.

Друга група мономерних фосфатаз, механізм дії яких у рослин вивчено, — це **КАРР (Kinase-Associated Protein Phosphatase)**. Фосфатази КАРР мають плазмалемну локалізацію й асоціюються з рецептор-подібними кіназами та/або їх корецепторами і дефосфорилують ці молекули, що приводить до репресії відповідного сигналу. Зв'язування КАРР з мішенями у деяких випадках здійснюється тільки на мембранах везикул. Це залежить від конкретного механізму активації/репресії рецептор-подібної кінази. У різних рослин було ідентифіковано фосфатази КАРР, які контролюють активність рецепторів брасноліда і **CLV1 (CLAVATA1)** — рецептор пептидного регулятора **CLV3**, який бере участь у механізмі контролю процесів проліферації та диференціації клітин апікальних меристем стебла.

**Родина РТР.** Тирозинові фосфатази подвійної специфічності беруть участь у регуляції **МАР-кіназного каскаду** (див. розділ «МАР кінази»). Останній компонент каскаду, **МАРК**, фосфорилується кіназою **МАРКК** по залишках треоніну та тирозину. Активація **МАРК** є короточасною, оскільки супроводжується стимуляцією специфічних **МАРК** фосфатаз подвійної специфічності. У рослинах *Arabidopsis* показано, що фосфатаза подвійної специфічності **AtPTR1** дефосфорилує **AtMPK4** (аналог **МАРК**).

Фосфатази **DsPTR** беруть участь також у контролі клітинного циклу. Активність циклін-залежних кіназ підроддини **CDC2** (у *Arabidopsis* виявлено дві кінази **CDC2a** і **CDC2b**), що взаємодіють з циклінами **В** типу та беруть участь у регуляції переходу **G2→S**, контролюється двома типами кіназ: циклін-активуюча кіназа (**САК**) фосфорилує залишки треоніну в активаційній **T**-петлі **CDC2**, а друга (наприклад, у дріжджів, що діляться, подібний фермент називається **Wee1**) — залишки тирозину. Фосфорилування по тирозину інгібує **CDC2**, тоді як остаточна активація цієї кінази досягається дією фосфатази подвійної специфічності (у дріжджів — **CDC25**), яка дефосфорилує фосфотирозини **CDC2**. У рослин гомологи **Wee1** і **CDC25** не виявлені, однак існують непрямі докази, що описаний механізм активації переходу **G2→S** у рослин функціонує: **CDC25** дріжджів активує клітинний цикл у рослин. Припускають, що фосфатаза, функціонально аналогічна **CDC25**, у рослин має структуру, специфічну для рослин.



## 4. МЕХАНІЗМИ ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ РОСЛИННИХ ГОРМОНІВ

### 4.1. РЕГУЛЯЦІЯ ТРАНСКРИПЦІЇ АУКСИН-РЕГУЛЬОВАНИХ ГЕНІВ

#### 4.1.1. Регулятори транскрипції ауксин-регульованих генів та їхня доменна структура

Активація ауксин-регульованих генів має переважно депресійний характер і є механізмом, у процесі якого під дією гормону здійснюється убіквітин-залежне руйнування репресорів транскрипції.

Значна кількість ауксин-регульованих генів знаходиться під контролем транскрипційних факторів двох сімейств:

- 1) активатори транскрипції **ARF** (auxin response factors);
- 2) репресори транскрипції **Aux/IAA** (auxin/indole-3-acetic acid).

У молекулі Aux/IAA виділяють чотири основні домени, які позначають римськими цифрами I, II, III і IV, а в молекулах ARF — три: DBD (ДНК-зв'язуючий домен), домени III і IV (рис. 50).

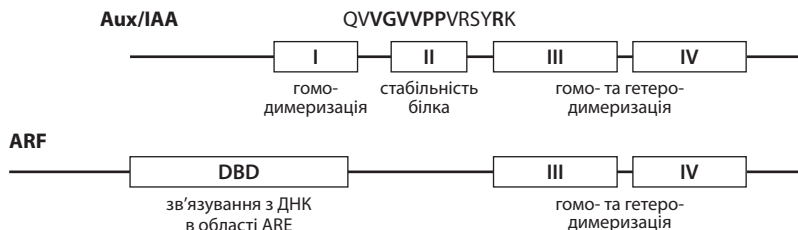


Рис. 50. Структура транскрипційних регуляторів Aux/IAA і ARF

Карбокситермінальні домени III і IV не випадково мають однакові позначення, оскільки в області цих доменів молекули Aux/IAA і ARF мають високий ступінь гомології. Домени III і IV не тільки гомологічні за структурою, але і виконують схожі функції — вони необхідні для утворення димерів. Причому можливе утворення не тільки гомодимерів за участю білків однієї родини (2 Aux/IAA; 2 ARF), але і гетеродимерів Aux/IAA-ARF. Імовірність утворення тих чи інших димерів залежить від концентрації ARF і Aux/IAA певного типу в клітині.

Амінотермінальні домени у цих білків різні за структурою та функціями.

Білки ARF через ДНК-зв'язуючий домен (DBD) здатні специфічно зв'язуватися із промоторами ауксин-регульованих генів в області *cis*-елементу ARE (auxin response elements), які включають консервативні шестинуклеотидні послідовності TGTCTC.

Домен I репресора Aux/IAA, як вважають, виконує допоміжну функцію при утворенні гомодимерів. Домен II визначає рівень стабільності білка. В області цього домену знаходиться дегрон — 13-амінокислотна ділянка, необхідна для взаємодії з F-box білком (TR1) убіквітинуючого комплексу.

### 4.1.2. Участь Aux/IAA і ARF у регуляції експресії ауксин-регульованих генів

Модель молекулярного механізму регуляції ауксин-регульованих генів припускає, що одна молекула транскрипційного регулятора ARF постійно зв'язана з промотором ауксин-регульованих генів в області ARE, проте активація таких генів залежить від того, які димери будуть утворювати зв'язані з ДНК ARF. Активною структурою є гомодимер ARF-ARF. Він забезпечує посадку на промотор РНК-полімерази II і сприяє ініціації транскрипції. Наявність на промоторі гетеродимерної структури Aux/IAA-ARF, навпаки, запобігає експресії гена (рис. 51).

У відсутності ауксинового сигналу в рослинних клітинах молекули Aux/IAA присутні у високих концентраціях, і оскільки вони конкурують з ARF за утворення димерів, то відбувається заміщення однієї молекули ARF в гомодимер на Aux/IAA.

З цієї причини переважна більшість ARE-вмісних промоторів зв'язані з гетеродимерами Aux/IAA-ARF і перебувають у неактивному стані. Стимуляція клітин ауксином приводить до дестабілізації молекул Aux/IAA, які убіквітинуються та залучаються до протеолізу.

Внутрішньоклітинні рецептори ауксину F-box типу (TIR1, AFB1–AFB5) є частиною SCF-подібної убіквітинуючої протеїнової лігази (див. розділ «F-box рецептори»). Ці лігази убіквітинують транскрипційні репресори родини Aux/IAA. Специфічне впізнавання та зв'язування Aux/IAA лігазою перебуває

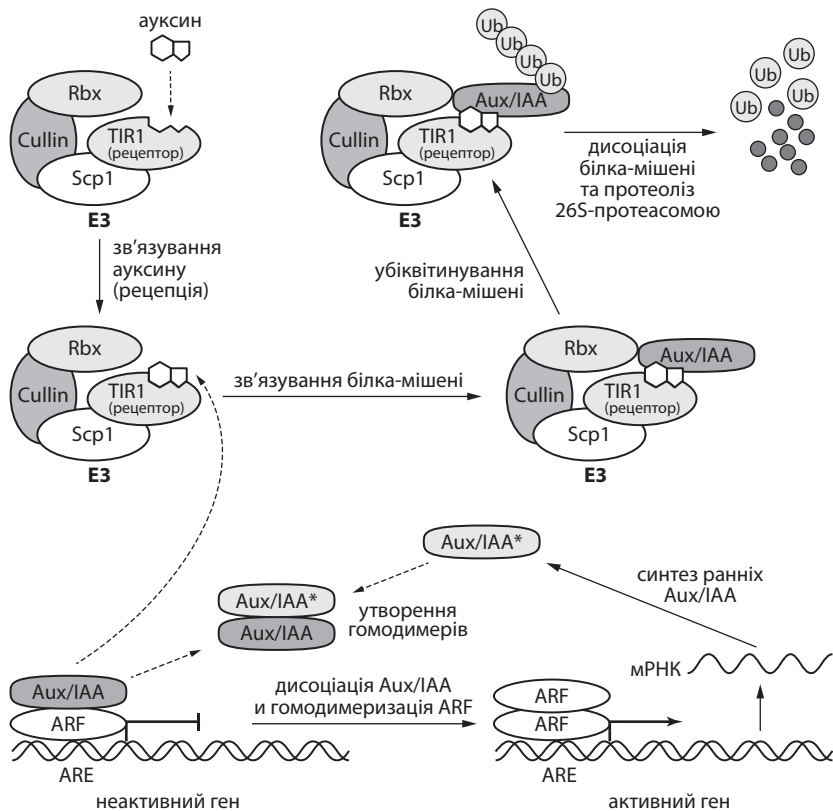


Рис. 51. Механізм регуляції активності ауксин-регульованих генів

під контролем гормональної модуляції афінності F-box білка до мішені. У відсутності ауксину F-box білок не має спорідненості до Aux/IAA. Зв'язування гормону з F-box рецептором приводить до утворення поверхні, необхідної для специфічного впізнавання Aux/IAA. При цьому гормон виступає як «молекулярний клей», який забезпечує гідрофобні взаємодії між F-box рецептором і мішенню. Таким чином, у результаті рецепції ауксину стимулюється убіквітинування білків Aux/IAA, які потім руйнуються 26S протеасомним комплексом.

Рівень Aux/IAA під дією ауксину істотно знижується, що сприяє утворенню гомодимерів ARF-ARF, зв'язаних з ARE-вмісними промоторами генів. Наявність димеру ARF на промоторі сприяє формуванню преініціаторного комплексу та активації транскрипції ауксин-регульованих генів.

До ауксин-регульованих генів, експресія яких стимулюється на ранніх етапах дії гормону, належать гени, що кодуєть білки родини Aux/IAA (на рис. 51 позначені Aux/IAA\*). На відміну від транскрипційних інгібіторів, ранні Aux/IAA\* мають виражену здатність до димеризації з репресором транскрипції Aux/IAA і при цьому вони мають низьку спорідненість до активаторів ARF. Наново синтезовані Aux/IAA\* зв'язуються з репресорами, сприяючи зниженню рівня концентрації репресорів і, таким чином, підвищують імовірність димеризації ARF і подальшої активації ауксин-регульованих генів.

Отже, конкурентне інгібування експресії ауксин-регульованих генів усувається двома способами:

- 1) руйнуванням репресорів транскрипції Aux/IAA через убіквітин-опосередкований протеоліз;
- 2) шляхом зв'язування репресорів Aux/IAA з Aux/IAA\* — білками ранньої відповіді на вплив ауксину.

#### **Коротка схема активації**

1. У відсутності ауксину в клітині підтримується висока концентрація Aux/IAA. ARF знаходиться переважно у складі гетеродимерів Aux/IAA-ARF, ауксин-чутливі гени репресовані.
3. У результаті рецепції ауксину у F-box рецептора (TIR1) підвищується спорідненість до негативних регуляторів Aux/IAA.

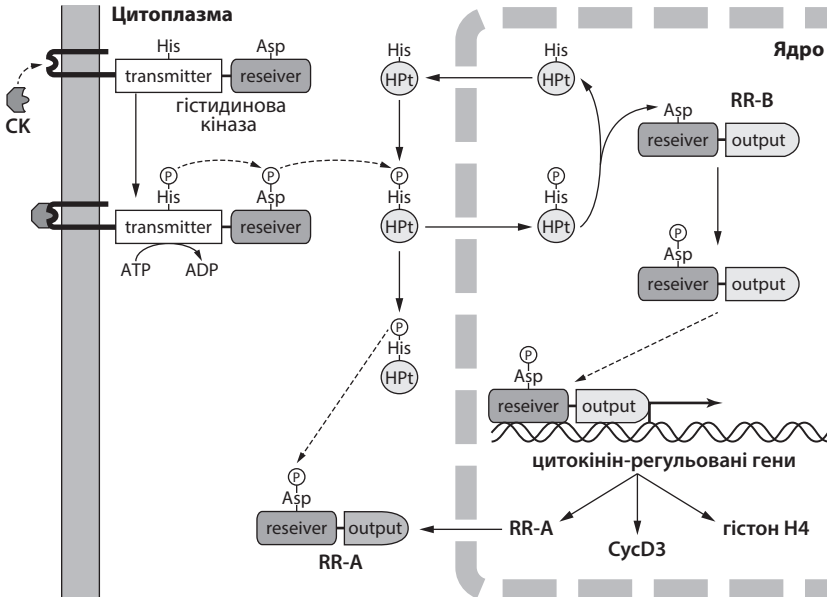
4. Комплекс рецептора з гормоном (TIR1–ІОК) зв'язує репресор Aux/IAA.
5. Aux/IAA убіквітинується протеїною лігазою, а потім руйнується 26S протеасомою.
6. У результаті зниження концентрації Aux/IAA відбувається димеризація ARF на промоторах ауксин-залежних генів.
7. Ініціюється транскрипція.
8. Синтез ранніх Aux/IAA\* приводить до зв'язування репресорів Aux/IAA і, відповідно, до посилення експресії ауксин-регульованих генів.

## 4.2. ПЕРЕДАЧА ЦИТОКІНІНОВОГО СИГНАЛУ

Рецепція цитокініну рослинними клітинами здійснюється гістидиновими рецепторними кіназами, які розташовані на плазматичній мембрані (рис. 52). Передача сигналу відбувається у рамках двокомпонентної багатокрокової сигнальної системи, частиною якої є рецепторні His-кінази (див. розділ «Двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин»). Зв'язування екстраклітинного рецепторного CHASE-домену із цитокініном стимулює димеризацію рецепторів і трансмолекулярне автофосфорилування гістидинового залишку transmitter домену. Фосфорилування провокує фосфорелейний механізм — послідовний перенос фосфатної групи по компонентах сигнальної системи. Спочатку фосфатна група переноситься в межах рецепторної молекули із залишку гістидину на залишок аспарагінової кислоти geseiver домену, а потім на залишок гістидину низькомолекулярної фосфотрансферази HPt. Цей компонент є високомобільним і легко дифундує цитоплазмою та проникає у ядро. У відсутності цитокініну в клітині присутня незначна кількість регуляторів відповіді А-типу, тому на перших етапах активації цитокінінового сигналу у фосфорелейному механізмі беруть участь переважно регулятори відповіді В-типу — транскрипційні регулятори. Фосфотрансфераза HPt переносить фосфат на аспарагінову кислоту geseiver домену регулятора відповіді. У фосфорильованому стані регулятори відповіді В-типу

модулюють активність декількох десятків цитокінін-чутливих генів раннього відповіді.

До раних генів, активність яких модулюється цитокініном, належать гени, що кодують фактори транскрипції, численні регуляторні білки, в тому числі ферменти, які мають кіназну або фосфатазну активність, а також білки, що беруть участь у механізмі спрямованого протеолізу білків (убіквітин-кон'югуючий фермент, F-box білок, АТФ-залежна субодиниця протеази, структурний білок убіквітинуючої лігази SKP1). Серед раних генів цитокінінової відповіді важливе місце займають гени, що кодують регулятори відповіді А-типу. Ці білки також, як і RR В-типу, беруть участь у функціонуванні двоком-



**Рис. 52.** Механізм трансдукції цитокінінового сигналу.

Умовні позначення:

RR-A — регулятори відповіді А-типу;

RR-B — регулятори відповіді В-типу;

HPt — гістидинова фосфотрансфераза;

CysD3 — циклін D типу

понентної системи. Істотне підвищення концентрації RR-A приводить до того, що вони чинять відчутну конкуренцію регуляторам відповіді В-типу, перехоплюючи на себе значну частину фосфатів від гістидинової фосфотрансферази. У результаті цього знижується рівень транскрипції цитокінін-активованих генів. Отже, RR А-типу можна розглядати як негативні регулятори цитокінінової відповіді.

В активованому стані регулятори відповіді А-типу зв'язуються з різними функціональними білками, модулюючи їх активність. Ці білки можуть бути ферментами або регуляторами, через які можлива подальша передача сигналу.

У рослинах *Arabidopsis* під впливом цитокініну через двокомпонентну багатокрокову сигнальну систему стимулюється експресія гена, що кодує регулятор відповіді А-типу ARR4. Після трансляції наново синтезований ARR4 активується гістидиновою фосфотрансферазою HPt. Однією з мішеней ARR4 є фітохром В. При зв'язуванні РНУВ<sub>fr</sub> з ARR4 стабілізується активна форма світлового рецептора — конверсія РНУВ<sub>fr</sub> в неактивний стан (РНУВ<sub>r</sub>) ускладнена, що сприяє посиленню фітохромного ефекту під впливом цитокінінового сигналу.

Вплив цитокініну на рослинні клітини є поліфункціональним і приводить до різноманітних ефектів. У цілому вплив цього гормону активізує окремі ланки метаболізму, а також ріст і проліферацію клітин. Під впливом цитокініну посилюється синтез білків і нуклеїнових кислот, підвищується аттрагуюча здатність тканин. Цитокінін забезпечує підготовку клітини до поділу, причому не тільки за рахунок підвищення загальної інтенсивності синтезу. Цитокініновий сигнал забезпечує активацію експресії генів, що кодують білки, поява яких передують мітозу. По-перше, це циклін D-типу — CusD3 — активатор циклін-залежної кінази, необхідної для переходу клітини до синтетичної фази клітинного циклу (G2 → S). По-друге, гістон H4, утворення якого є принципово важливим для формування нуклеосомної структури хроматину у процесі редуплікації ДНК.

### 4.3. ТРАНСДУКЦІЯ ГІБЕРЕЛІНОВОГО СИГНАЛУ

Активні форми гібереліну (переважно  $GA_1$  і  $GA_4$ ) зв'язуються із внутрішньоклітинним цитоплазматичним рецептором  $GID1$  (див. розділ «Гормон-чутливі ліпази»). Взаємодія з гібереліном приводить до зміни конформації рецептора та стабілізації його активної структури. Молекули рецептора  $GID1$  набувають здатності зв'язуватися з  $DELLA$ -білками, до яких належать репресори гіберелінового сигналу. У взаємодії  $GID1$  з  $DELLA$ -білками молекула гібереліну виступає в ролі «молекулярного клею». У результаті приєднання до рецептора в карбокситермінальній частині молекули  $DELLA$ -білка відбуваються істотні конформаційні зміни, що приводять до можливості специфічної взаємодії з  $F$ -box субодиницею  $SCF$ -подібної убіквітинуючої лігази (рис. 53).  $DELLA$ -білок убіквітинується лігазою і далі піддається протеолізу.

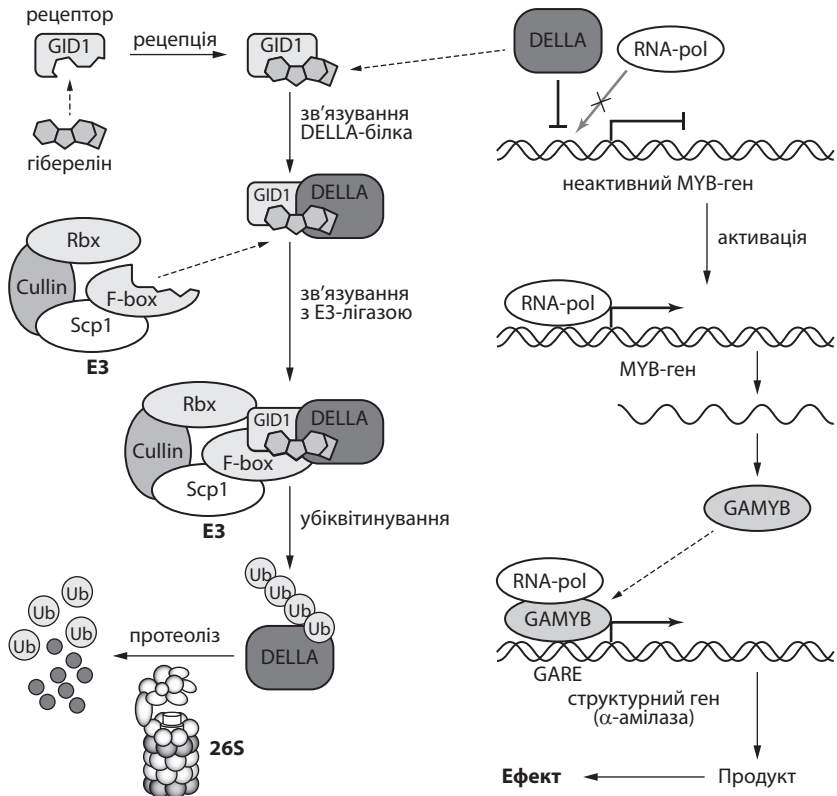
Руйнування репресорів гіберелінового сигналу приводить до активації експресії генів  $MYB$ -подібних транскрипційних регуляторів ( $GAMYB$ ), що становлять важливу групу транскрипційних активаторів гіберелін-регульованих генів, до яких належить група генів, що кодують комплекс гідролітичних ферментів. Фактори  $GAMYB$  специфічно зв'язуються з промоторами генів в області *cis*-елемента  $GARE$  ( $GA$ -Response Elements) і беруть участь у складанні преініціаторного комплексу. Функціональна активність  $GAMYB$ -білків контролюється не тільки на рівні транскрипції, але й посттрансляційно. Передбачається можливість регуляції активності  $GAMYB$ -факторів шляхом їх ковалентної модифікації за допомогою фосфорилювання.

#### Можлива модель гіберелінового сигналу

1. Гіберелін ( $GA$ ) зв'язується з рецептором  $GID1$ .
2. Зміна конформації рецептора приводить до зв'язування  $DELLA$ -білків (негативних регуляторів гіберелінового сигналу).
3. Утворення комплексу  $GID1(GA)$ - $DELLA$  приводить до суттєвих конформаційних змін у карбокситермінальній частині  $DELLA$ -білків.
4.  $DELLA$ -білки специфічно взаємодіють з  $F$ -box субодиницею убіквітинуючої лігази.
5.  $DELLA$ -білки убіквітинуються та піддаються протеолізу.



6. Руйнування DELLA-білків приводить до дерепресії гіберелінового сигналу.
7. Активуються гени, що кодують транскрипційні активатори GAMYB.
8. Транскрипційні активатори GAMYB зв'язуються з GARE-мотивом гіберелін-регульованих генів і спільно з іншими активаторами ініціюють їхню експресію.



**Рис. 53.** Механізм трансдукції гіберелінового сигналу.

Умовні позначення:

GID1 — рецептор гібереліну;

DELLA — DELLA-білок, репресор гіберелінового сигналу;

RNA-pol — РНК-полімераза II;

GAMYB — активатор транскрипції

#### 4.4. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛУ АБК ЧЕРЕЗ START-ДОМЕН РЕЦЕПТОРИ

Внутрішньоклітинні рецептори АБК — PYR/PYL/RCAR (START-домен рецептори) — у відсутності гормону перебувають переважно у вигляді гомодимерів (рис. 54). У такому стані рецептори не здатні взаємодіяти зі своїми мішенями. Протеїнова фосфатаза PP2C, яка є мішенню рецептора, знаходиться у конститутивно активному стані та шляхом дефосфорилювання інгібує протеїнкіназу SnRK2 — позитивний регулятор АБК-залежних генів. Оскільки SnRK2 не виявляє каталітичної актив-

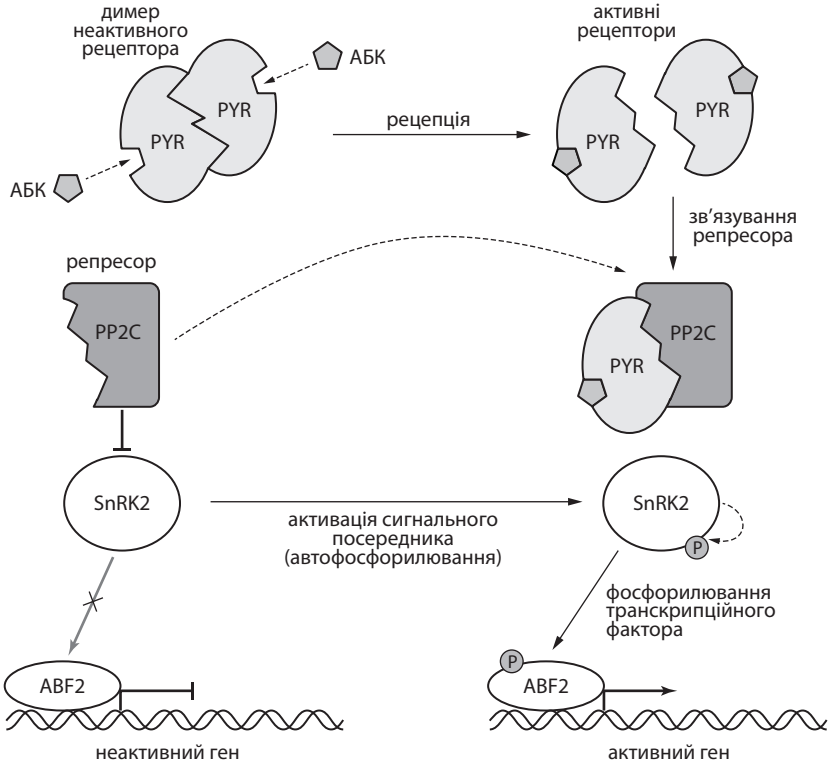


Рис. 54. Механізм трансдукції сигналу абсцизової кислоти

ності та не фосфорилує субстрат, АБК-сигнал підтримується у репресованому стані.

Зв'язування АБК з рецептором, що супроводжується зміною його конформації, приводить до дисоціації рецепторного димеру (рис. 54). Мономери рецептора, зв'язані з гормоном, взаємодіють з реакційним центром PP2C і конкурентно інгібують його активність. Репресія фосфатази PP2C приводить до дерепресії АБК-сигналу. Протеїнкіназа SnRK2 активується, автофосфорилується за специфічними сайтами і набуває здатності взаємодіяти зі своїми мішенями. SnRK2 фосфорилує групу трансскрипційних факторів активаторів АБК-регульованих генів, наприклад ABF2 (ABA-Responsive Element Binding Factor 2).

## 4.5. СПРИЙНЯТТЯ ТА ТРАНСДУКЦІЯ ЕТИЛЕНОВОГО СИГНАЛУ

Рецепція етилену рослинними клітинами здійснюється на плазматичній мембрані рецепторними гістидиновими кіназами, що мають виражену гомологію із двокомпонентними рецепторами бактерій і рослин (див. розділ «Етиленові рецептори»). Рецептори етилену формують стабільні димерні групи за рахунок дисульфідних зв'язків в області екстраклітинної N-термінальної ділянки. У відсутності гормону рецептори знаходяться у конститутивно активному стані.

Активний рецептор підтримує наступний компонент сигнальної системи — серин/треонінову кіназу CTR1 — в активному стані (рис. 55). Вважається, що в етиленовому сигнальному механізмі не функціонує фосфотрансферазний механізм. Кіназа CTR1 безпосередньо взаємодіє з transmitter-доменом рецептора (на рис. 55 — ETR1), тому стан рецептора безпосередньо впливає на функціональну активність CTR1.

CTR1 є негативним регулятором етиленового сигналу. З цієї причини у відсутності гормону сигнальна система знаходиться в репресованому стані, незважаючи на активний рецептор. Зв'язування етилену рецептором приводить до інгібування рецептора та кінази CTR1. Внаслідок дерепресується сигнальна система етилену. Мішені CTR1 не встановлені, проте відомо,

що після репресії цієї кінрази одним із перших активується мембранний білок EIN2 (ethylene insensitive 2). EIN2 належить до родини трансмембранних еукаріотичних білків, які 12 разів перетинають мембрану. За своєю структурою EIN2 близький до трансмембранних переносників двовалентних іонів ме-

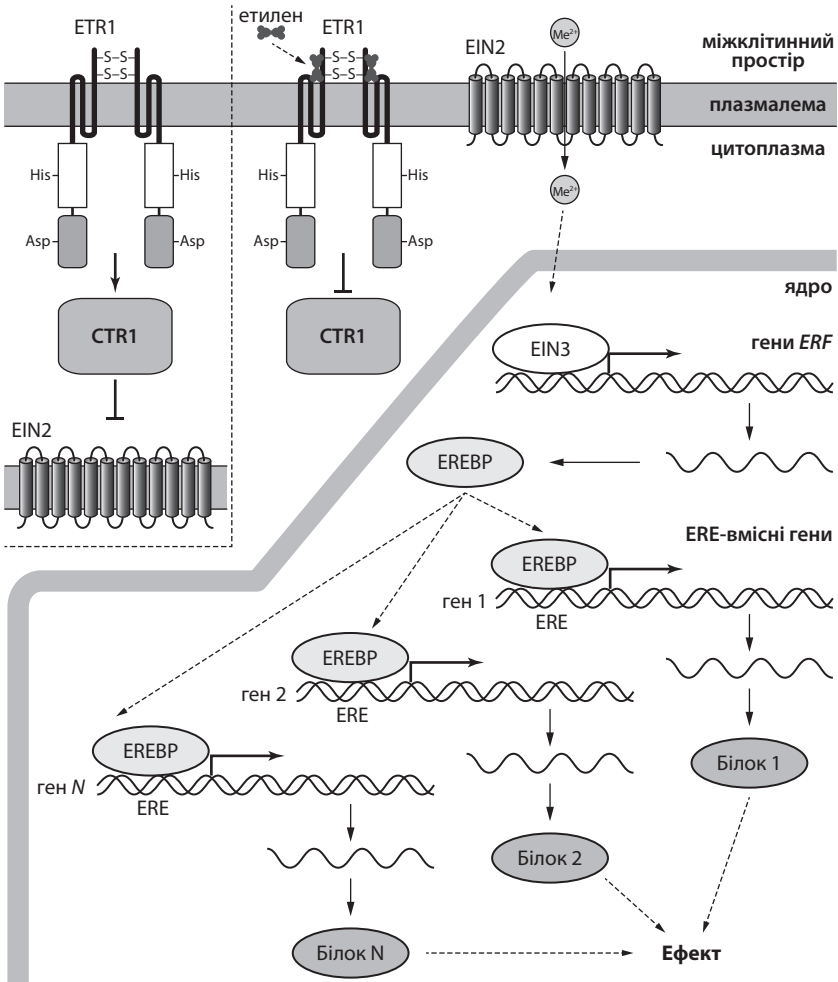


Рис. 55. Механізм трансдукції етиленового сигналу

талів у тварин і володіє характерними властивостями переносника іонів металів. Передача сигналу від EIN2 до наступного компоненту, регулятора транскрипції EIN3, на даний момент не з'ясована. Безпосередньо ці компоненти не можуть взаємодіяти один з одним, оскільки перший локалізується в плазматичній мембрані, а другий є ядерним білком. Існує припущення, що EIN2 впливає опосередковано на EIN3 (ethylene insensitive 3) через зміну рівноваги іонів металів. Отже, між EIN2 і EIN3, вірогідно, функціонують вторинні месенджери.

Транскрипційні фактор EIN3, а також близькі йому білки EIL1 і EIL2 (EIN3-like 1 и 2), активують гени факторів етиленової відповіді *ERF* (ethylene response factor), що кодують транскрипційні фактори, які прийнято називати EREBP (ERE-binding proteins), тобто білки, що зв'язують етилен-чутливі *cis*-активні елементи (ERE — ethylene response element). Наявність цих елементів є характерною рисою промоторів генів, які індукуються етиленовим сигналом.

Транскрипційні фактори EREBP активують групу етилен-регульованих генів, що кодують функціональні білки, від яких залежить розвиток реакції-відповіді. Залежно від сукупності сигналів, що надходять в ядро, виявляється широкий діапазон відповіді на етилен. Це може виражатися у швидкості індукції ERE-вмісних генів, а також у різній активності експресії. Активація певних генів має фазо-специфічний характер, тобто залежить від періоду розвитку організму.

#### **Коротка схема сигнальної системи етилену**

1. У відсутності гормону рецептор знаходиться в конститутивно активному стані й активує серин/треонінову кіназу CTR1.
2. Активний CTR1 репресує сигнальну систему етилену.
3. У результаті рецепції етилену рецептор і кіназа CTR1 інактивуються.
4. Дерепресований мембранний білок EIN2 сприяє зміні концентрації іонів металів у цитоплазмі та нуклеоплазмі.
5. Активуються транскрипційні фактори EIN3 і EIL1/2, які стимулюють експресію генів *ERF*, що кодують фактори етиленової відповіді.

6. Продукти генів *ERF*, транскрипційні фактори EREBP, зв'язуються з ERE-вмісними промоторами генів.
7. Експресія ERE-вмісних генів приводить до синтезу комплексу функціональних білків, які беруть участь у розвитку реакції-відповіді.

## 4.6. РЕЦЕПЦІЯ ТА ТРАНСДУКЦІЯ БРАСИНОСТЕРОЇДНОГО СИГНАЛУ

Рецепція брасиностероїдів у рослин здійснюється рецепторними кіназами, локалізованими у плазмалемі. У *Arabidopsis* брасиностероїдний рецептор BRI1 належить великому сімейству рослинно-специфічних серин/треонінових LRR-рецептор-подібних кіназ (S/T LRR-RLK). Хоча рецептор BRI1 має будову типової серин/треонінової рецептор-подібної кінази, він проявляє властивості кінази подвійної специфічності: крім залишків серину та треоніну, BRI1 фосфорилує також залишки тирозину.

У відсутності ліганду неактивний рецептор BRI1 тісно контактує з молекулами двох типів: інгібітором кіназної активності BKI1 і рецептор-подібною цитоплазматичною кіназою BSK (рис. 56).

1. BKI1 (BRI1 kinase inhibitor 1) — негативний регулятор BRI1. Інгібітор BKI1 має підвищену спорідненість до неактивної форми рецептора і, зв'язуючись з ним, підтримує його в неактивному стані.
2. BSK (BR-Signaling Kinase) — рецептор-подібна цитоплазматична кіназа (RLCK — Receptor-Like Cytoplasmic Kinases), через яку здійснюється передача сигналу від BRI1. Пов'язана з рецептором BRI1, BSK знаходиться в неактивному стані.

Стимуляція рецептора BRI1 лігандом підвищує афінність рецепторів один до одного. Брасінолід індукуює конформаційні зміни, які приводять до стабілізації димеризованих форм BRI1<sub>2</sub>. При зближенні рецепторів BRI1 стимулюється їхня кіназна активність, яка спочатку спрямована на молекулу інгібітора BKI1. Фосфорильований BKI1 дисоціює від рецептора та перерозподіляється у цитозольну фракцію. Вивільнені від інгібітора

рецептори формують гомодимери (також можливе утворення олігомерних структур) і взаємно фосфорилують один одного. Автофосфорилування недостатньо для повної активації BRI1 кінази. Необхідною є асоціація з корецептором BAK1 (**BR1-associated kinase 1**), з яким BRI1 вступає у взаємне трансфосфорилування.

Корецептор BAK1 не може взаємодіяти з неактивним рецептором, тому що цьому заважає інгібітор BKI1. Крім того, для ефективного зв'язування є необхідною відповідна підготовка поверхні рецептора, яка досягається шляхом трансмолекулярного автофосфорилування BRI1. Після дисоціації інгібітора та початкового фосфорилування рецептора BAK1 зв'язується з BRI1. В утворених гетероолігомерах BAK1 і BRI1 трансфосфорилують один одного за специфічними амінокислотними залишками.

Активованій BRI1 фосфорилує рецептор-подібну цитоплазматичну кіназу BSK1. У фосфорильованому стані BSK1 дисоціює від рецептора та в цитоплазмі специфічно взаємодіє з неактивною формою фосфатази BSU1 (**Bri1 Suppressor 1**) і активує її шляхом фосфорилування. Фосфорильована BSU1 виявляє свою активність у цитоплазмі і ядрі, куди частково транспортується після активації. У цитоплазмі та нуклеоплазмі BSU1 дефосфорилує свою мішень — кіназу BIN2 (**Brassinosteroid Insensitive 2**), — звертаючи в неактивний стан (рис. 57).

Кіназа BIN2 є негативним регулятором брасиностероїдного сигнального шляху. У відсутності брасиностероїдів BIN2 конститутивно фосфорилує транскрипційні регулятори BZR1 (**Brassinazole Resistant 1**) і BES1 (**BR1-EMS-Suppressor 1**) — модулятори активності брасиностероїд-регульованих генів. BES1 також позначають BZR2.

Фосфорилування факторів BES1 і BZR1 надає різні ефекти на їхні функції:

- 1) інгібується ДНК-зв'язуюча активність;
- 2) стимулюється експорт BES1 і BZR1 із ядра в цитоплазму (знижується їх рівень у нуклеоплазмі);
- 3) гіперфосфорильовані білки BES1 і BZR1 залучаються до убіквітин-опосередкованого протеолізу (руйнуються 26S протеасомою).

Фосфорилування саме по собі є необхідною, але недостатньою для деградації BES1 і BZR1. Тільки гіперфосфорильована форма цих білків є суттєвою для їхньої деградації.

Інактивація кінази BIN2 фосфатазою BSU1 приводить до зниження рівня фосфорилування BES1 і BZR1. Дефосфорилування BES1 і BZR1 каталізується фосфатазою PP2A. Дефосфорильовані (гіпофосфорильовані) BES1 і BZR1 зв'язуються із промоторами брасиностероїд-регульованих генів і спільно з іншими регуляторами модулюють їхню експресію.

Транскрипційний регулятор BZR1 зв'язується з промоторами генів в області BRRE (BR-response element) — *cis*-еле-

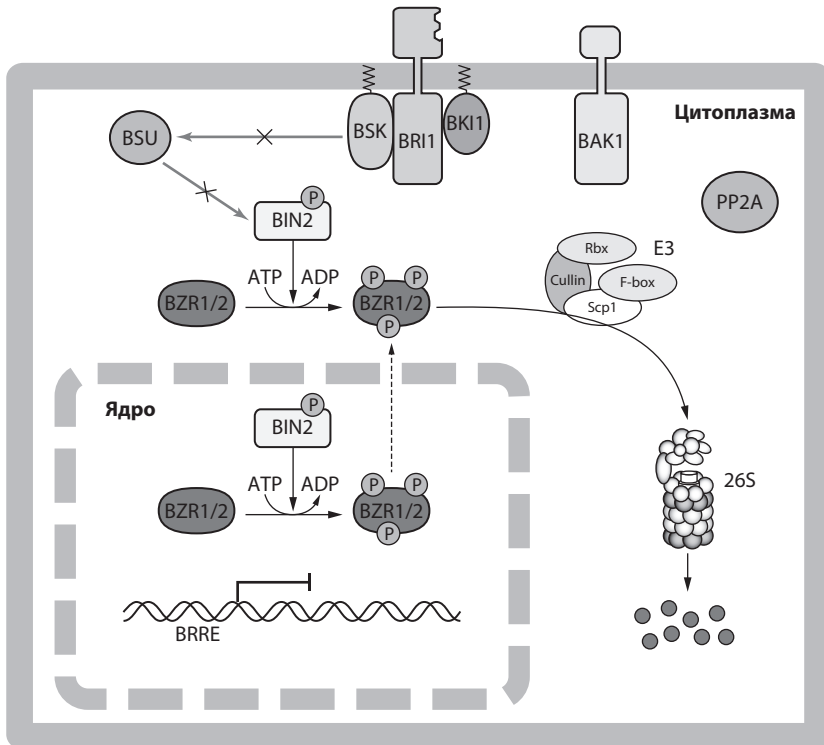


Рис. 56. Сигнальна система брасиностероїдів у відсутності ліганду



менту брасиностероїдної відповіді, для якого є характерною консервативна послідовність CGTGT/CG. Багато генів, що мають у промоторі елемент BRRE, є активними у відсутності брасиноліда й інгібуються під дією цього гормону. Наприклад, до BRRE-вмісних генів належать ключові гени біосинтезу брасиностероїдів. Брасиностероїди контролюють власний гомеостаз за принципом оберненого негативного зв'язку за допомогою репресії таких генів. Фактор BZR1 бере участь також в активації генів, експресія яких є важливою для стимуляції ростових процесів. Активуюча дія BZR1 виявляється при його взаємодії з іншими регуляторами транскрипції.

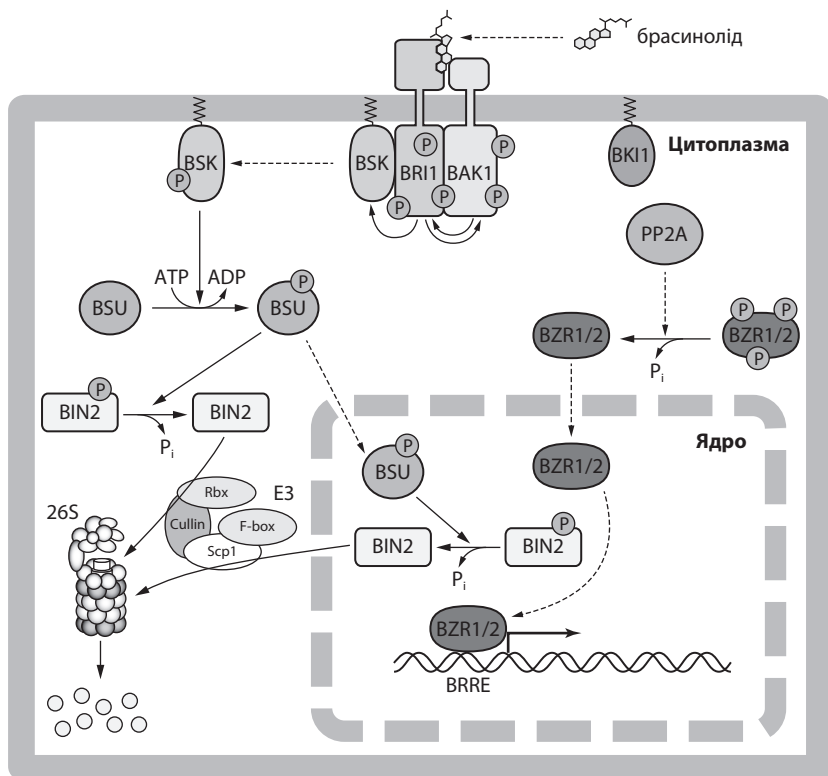


Рис. 57. Механізм трансдукції брасиностероїдного сигналу

### **Короткий опис імовірного механізму брасиностероїдного сигналу**

1. У відсутності брасиностероїдів рецептор BRI1 локалізований у плазмалемі та зв'язаний з інгібітором BKI1 і рецептор-подібною цитоплазматичною кіназою BSK. Кіназа BIN2 проявляє конститутивну активність і фосфорилує траскрипційні фактори BES1 і BZR1. Гіперфосфорильовані форми цих білків піддаються убіквітин-залежному протеолізу.
2. Зв'язування брасиностероїдів з рецептором BRI1 стабілізує димерні форми рецептора та стимулює їхню кіназну активність.
3. BRI1 фосфорилує інгібітор BKI1, який дисоціює від рецептора.
4. Вивільнені від інгібітора рецептори димеризуються та автофосфорилують один одного. У результаті формується поверхня для зв'язування з корецептором BAK1.
5. Асоційовані BRI1 і BAK1 трансфосфорилують один одного. Це приводить до повної активації BRI1.
6. Рецептор BRI1 активує кіназу BSK шляхом фосфорилування.
7. Кіназа BSK дисоціює від рецептора та фосфорилує фосфатазу BSU1, переводячи її в активний стан.
8. Фосфатаза BSU1 дефосфорилує кіназу BIN2 та інактивує її.
9. Транскрипційні регулятори BES1 і BZR1 у відсутності активності BIN2 дефосфорилуються фосфатазою PP2A і перебувають стабільного гіпофосфорильованого стану.
10. Фактори BES1 і BZR1 зв'язуються зі специфічними елементами промоторів брасиностероїд-регульованих генів і спільно з іншими регуляторами транскрипції модулюють експресію генів.

# ЛІТЕРАТУРА

---

---

1. Васюкова Н. И. Жасмонат-зависимая защитная сигнализация в тканях растений / Н. И. Васюкова, О. Л. Озерецковская // Физиология растений. — 2009. — Т. 56, № 5. — С. 643–653.
2. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Ч. 1. Классификация и структура / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 2–9.
3. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Ч. 2. Структура и механизм функционирования / Н. Б. Гусев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 10–16.
4. Колупаев Ю. Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец. — К. : Основа, 2010. — 352 с.
5. Крутецкая З. И. Механизмы внутриклеточной сигнализации : монография / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова. — СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2003. — 208 с.
6. Кулаева О. Н. Восприятие и преобразование гормонального сигнала у растений / О. Н. Кулаева // Физиология растений. — 1995. — Т. 42, № 5. — С. 661–671.
7. Ломоватская Л. А. Аденилатциклазная сигнальная система растений / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Филинова, О. В. Рыкун // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер. : Біологія. — 2011. — Вип. 2 (23). — С. 6–24.
8. Лыло В. В. Убиквитинирование протеинов и его функции в клетке / В. В. Лыло // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 6. — С. 5–13.
9. Льюин Б. Гены : пер. с англ. / под ред. Г. П. Георгиева. — М. : Мир, 1987. — 544 с.
10. Новикова Г. В. В начале пути: восприятие АБК и передача ее сигнала у растений / Г. В. Новикова, Н. С. Степанченко, А. В. Носов, И. Е. Мошков // Физиологии растений. — Т. 56, № 6. — 2009. — С. 806–823.
11. Пермяков Е. А. Кальций-связывающие белки / Е. А. Пермяков. — М. : Наука, 1993. — 192 с.
12. Сорокин А. В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А. В. Сорокин, Е. Р. Ким, Л. П. Овчинников // Успехи биологической химии. — 2009. — Т. 49. — С. 3–76.
13. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. — М. : Наука, 2002. — 294 с.

14. Alberts B. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. — 4-th edition. — Garland Science Publishing, 2002.
15. Apel K. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2004. — V. 55. — P. 373–399.
16. Bae G. Decoding of Light Signals by Plant Phytochromes and Their Interacting Proteins / G. Bae, G. Choi // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2008. — V. 59. — P. 281–311.
17. Benveniste P. Biosynthesis and accumulation of sterols / P. Benveniste // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2004. — V. 55. — P. 429–457.
18. Besson-Bard A. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants / A. Besson-Bard, A. Pugin, D. Wendehenne // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2008. — V. 59. — P. 21–39.
19. Bleecker A. B. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants / A. B. Bleecker, H. Kende // *Annu. Rev. Cell and Dev. Biol.* — 2000. — V. 16. — P. 1–18.
20. Boss W. F. Phosphoinositide Signaling / W. F. Boss, Im Yang Ju // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2012. — V. 63. — P. 409–429.
21. Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone / J. Browse // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2009. — V. 60. — P. 183–205.
22. Bush D. S. Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling / D. S. Bush // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1995. — V. 46. — P. 95–122.
23. Campbell W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology / W. H. Campbell // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1999. — V. 50. — P. 277–303.
24. Chapman E. J. Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants / E. J. Chapman, M. Estelle // *Annu. Rev. Genet.* — 2009. — V. 43. — P. 265–285.
25. Chen M. Light signal transduction in higher plants / M. Chen, J. Chory, C. Fankhauser // *Annu. Rev. Genet.* — 2004. — V. 38. — P. 87–117.
26. Christie J. M. Phototropin Blue-Light Receptors / J. M. Christie // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2007. — V. 58. — P. 21–45.
27. Clouse S. D., Sasse J. M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development / S. D. Clouse, J. M. Sasse // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1998. — V. 49. — P. 427–451.
28. Creelman R. A. Biosynthesis and action of jasmonates in plants / R. A. Creelman, J. E. Mullet // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1997. — V. 48. — P. 355–381.
29. Cutler S. R. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network / S. R. Cutler, P. L. Rodriguez, R. R. Finkelstein, S. R. Abrams // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 651–679.

30. D'Agostino I. V. Molecular mechanisms of cytokinin action / I. V. D'Agostino, J. J. Rieber // *Current Opinion in Plant Biology*. — 1999. — No 2. — P. 359–364.
31. Dodd A. N. The Language of Calcium Signaling / A. N. Dodd, J. Kudla, D. Sanders // *Annu. Rev. Plant Biol.* — V. 61. — P. 593–620.
32. Feussner I. Lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2002. — V. 53. — C. 275–297.
33. Fruman D. A. Phosphoinositide kinases / D. A. Fruman, R. E. Meyers, L. C. Cantley // *Annu. Rev. Biochem.* — 1998. — V. 67. — P. 481–507.
34. Gehring C. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling — past and present / C. Gehring // *Cell Communication and Signaling*. — 2010. — V. 8. — P. 15.
35. Grün S. Nitric oxide and gene regulation in plants / S. Grün, C. Lindermayr, S. Sell, J. Durner // *Journal of Experimental Botany*. — 2006. — V. 57. — No. 3. — P. 507–516.
36. Haberer G. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone / G. Haberer, J. J. Kieber // *Plant Physiol*, February 2002. — V. 128. — P. 354–362.
37. Hardie D. G. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and Functions / D. G. Hardie // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1999. — V. 50. — P. 97–131.
38. Hare P. D. Molecular basis of cytokinin action / P. D. Hare, van J. Staden // *Plant Growth Regulation*. — 1997. — V. 23. — P. 41–78.
39. Harper J. F. Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinases / J. F. Harper, G. Breton, A. Harmon // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2004. — V. 55. — P. 263–288.
40. Jenkins G. I. Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation / G. I. Jenkins // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2009. — V. 60. — P. 407–431.
41. Johnson P. R. The ethylene gas signal transduction pathway: A Molecular Perspective / P. R. Johnson, J. R. Ecker // *Annu. Rev. Genet.* — 1998. — V. 32. — P. 227–254.
42. Kachroo A. Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense / A. Kachroo, P. Kachroo // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2009. — V. 47. — P. 153–176.
43. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins / T. Kakimoto // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 605–627.
44. Kawasaki H. Calcium-binding proteins / H. Kawasaki, R. Kretsinger // *Protein Profile*. — 1994. — V. 1(4). — 343–390.
45. Kieber J. J. The ethylene response pathway in Arabidopsis / J. J. Kieber // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1997. — V. 48. — P. 277–296.
46. Kim J.-M. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis / J.-M. Kim, H. Liu, M. Tazaki et al. // *J. Cell Biol.* — 2003. — V. 162. — P. 37–46.
47. Kim T.-W. Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors / T.-W. Kim, Z.-Y. Wang // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2010. — V. 61. — P. 681–704.

48. Klee H. J. Ethylene signal transduction. Moving beyond Arabidopsis / H. J. Klee // *Plant Physiology* — 2004 — V. 135. — P. 660–667.
49. Klingler J. P. ABA receptors the START of a new paradigm in phytohormone signaling / J. P. Klingler, G. Batelli, J.-K. Zhu // *Journal of Experimental Botany*. — 2010. — V. 61, No. 12. — P. 3199–3210.
50. Kosuta S. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes / S. Kosuta, S. Hazledine, J. Sun, H. Miwa, R. J. Morris et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — V. 105. — P. 9823–9828.
51. Lamattina L. Nitric Oxide: The versatility of an extensive signal molecule annual review of plant biology / L. Lamattina, Garsna-C. Mata, M. Graziano, G. Pagnussat // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 109–136.
52. Lau O. S. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later / O. S. Lau, X. W. Deng // *Trends Plant Sci.* — 2012. — V. 17(10). — 584–593.
53. Leung J. Abscisic acid signal transduction / J. Leung, J. Giraudat // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1998. — V. 49. — P. 199–222.
54. Leyser O. Molecular genetics of auxin signaling / O. Leyser // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2002. — V. 53. — P. 377–398.
55. Lohrmann J. Plant two-component signaling systems and the role of response regulators / J. Lohrmann, K. Harter // *Plant Physiol*, 2002 — V. 128 — P. 363–369.
56. Luan S. Protein phosphatases in plants / S. Luan // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 63–92.
57. Lumba S. Plant Nuclear Hormone Receptors: A Role for Small Molecules in Protein-Protein Interactions / S. Lumba, S. Cutler, P. McCourt // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2010. — V. 26. — P. 445–469.
58. Maathuis F. J. cGMP modulates gene transcription and cation transport in Arabidopsis roots / F. J. Maathuis // *Plant J.* — 2006. — V. 45 — P. 700–711.
59. Marion-Poll A. Abscisic acid synthesis, metabolism and signal transduction / A. Marion-Poll, J. Leung // *Plant Hormone Signaling*. — Blackwell Publishing Ltd, 2006. — P. 1–35.
60. Martin T. F. J. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: Common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking / T. F. J. Martin // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 1998. — V. 14. — P. 231–64.
61. Martinez-Atienza J. Plant cyclic nucleotide signalling: facts and fiction / J. Martinez-Atienza, C. van Ingelgem, L. Roef, F. J. M. Maathuis // *Plant Signaling & Behavior*. — 2007. — V. 2. — P. 540–543.
62. Matsubayashi Y. Peptide Hormones in Plants / Y. Matsubayashi, Y. Sakagami // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2006. — V. 57. — P. 649–74.
63. McCourt P. Genetic analysis of hormone signaling / P. McCourt // *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* — 1999. — V. 50. — P. 219–243.

64. Meier S. Emerging roles in plant biotechnology for the second messenger cGMP — guanosine 3',5'-cyclic monophosphate / S. Meier, C. Gehring // African Journal of Biotechnology. — 2006. — V. 5 (19). — P. 1687–1692.
65. Meier S. Deciphering cGMP signatures and cGMP-dependent pathways in plant defence / S. Meier, L. Madeo, L. Ederli, L. Donaldson, S. Pasqualini, C. Gehring // Plant Signaling & Behavior. — 2009. — V. 4, No. 4. — P. 307–309.
66. Meijer H. J. G. Phospholipid-Based Signaling In Plants / H. J. G. Meijer, T. Munnik // Annu. Rev. Plant Biol. — 2003. — V. 54. — P. 265–306.
67. Mockaitis K. Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm / K. Mockaitis, M. Estelle // Annu. Rev. Cell and Dev. Biol. — 2008. — V. 24. — P. 55–80.
68. Mok D. W. S. Cytokinin metabolism and action / D. W. S. Mok, M. C. Mok // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 89–118.
69. Müller S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin / S. Müller, C. Hoegel, G. Pyrowolakis, S. Jentsch // Nature Reviews. Molecular Cell Biology. — 2001. — V. 2, No 3. — P. 202–213.
70. Pandey S. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in arabidopsis / S. Pandey, D. C. Nelson, S. M. Assmann // Cell. — 2009. — V. 136. — P. 136–148.
71. Park K.-Y. A Role for Phosphatidylinositol 3-Phosphate in Abscisic Acid-Induced Reactive Oxygen Species Generation in Guard Cells / K.-Y. Park, J.-Y. Jung, J. Park et al. // Plant Physiology. — 2003. — V. 132. — P. 92–98.
72. Pitcher J. A. G Protein-coupled receptor kinases / J. A. Pitcher, N. J. Freedman, R. J. Lefkowitz // Annu. Rev. Biochem. — 1998. — V. 67. — P. 653–92.
73. Ribeiro R. C. J. The nuclear hormone receptor gene superfamily / R. C. J. Ribeiro, P. J. Kushner, J. D. Baxter // Annual Review of Medicine. — 1995. — V. 46. — P. 443–453.
74. Richards D. E. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling / D. E. Richards, K. E. King, T. Ait-ali, N. P. Harberd // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 67–88.
75. Rober-Kleber N. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development / N. Rober-Kleber, J. T. P. Albrechtová, S. Fleig et al. // Plant Physiol. — 2003. — V. 131. — P. 1302–1312.
76. Rodriguez M. C. S. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants / M. C. S. Rodriguez, M. Petersen, J. Mundy // Annu. Rev. Plant Biol. — 2010. — V. 61. — P. 621–649.
77. Ryan C. A. Polypeptide Hormones / C. A. Ryan, G. Pearce // Plant Physiol. — 2001 — V. 125. — P. 65–68.
78. Sakakibara H. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation / H. Sakakibara // Annu. Rev. Plant Biol. — V. 57. — P. 431–449.

79. Schafer B. W. The S-100 Family of EF-hand Calcium-binding Proteins: Functions and Pathology / B. W. Schafer, C. W. Heizmann // Trends Biochem. Sci. — 1996. — V. 21. — P. 134–140.
80. Smalle J. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway / J. Smalle, R. D. Vierstra // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — V. 55. — P. 555–590.
81. Smith R. D. Plant Protein Phosphatases / R. D. Smith, J. C. Walker // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1996. — V. 47. — P. 101–125.
82. Sun T. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants / T. Sun, F. Gubler // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — V. 55. — P. 197–223.
83. Thomas S. G. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short / S. G. Thomas, T. Sun // Plant Physiology. — 2004. — V. 135. — P. 668–676.
84. Turner B. M. Cellular memory and the histone code / B. M. Turner // Cell. — 2002. — V. 111. — P. 285–291.
85. Ueguchi-Tanaka M. Gibberellin Receptor and Its Role in Gibberellin Signaling in Plants / M. Ueguchi-Tanaka, M. Nakajima, A. Motoyuki, M. Matsuoka // Annu. Rev. Plant Biol. — 2007. — V. 58. — P. 183–198.
86. Urao T. Two-component systems in plant signal transduction / T. Urao, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki // Trends in plant science. — 2000. — V. 5, No. 2. — P. 67–74.
87. Vert G. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants / G. Vert, J. L. Nemhauser, N. Geldner, F. Hong, J. Chory // Annu. Rev. Cell and Dev. Biol. — V. 21. — P. 177–201.
88. Wang X. Plant Phospholipases / X. Wang // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 211–231.
89. Wang Z.-Y. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis / Z.-Y. Wang, M.-Y. Bai, E. Oh, J.-Y. Zhu // Annu. Rev. Genet. — 2012. — V. 46. — P. 699–722.
90. Yang Z. Small GTPases: Versatile Signaling Switches in Plants / Z. Yang // The Plant Cell. — 2002. — V. 14. — P. S375–S388.
91. Zielinski R. E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants / R. E. Zielinski // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1998. — V. 49. — P. 697–725.



# КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

---

---

## Значення, структура та принципи функціонування сигнальних систем клітин

1. Значення сигнальних систем у біологічних об'єктах.
2. Швидкі та повільні реакції.
3. Компоненти сигнальних систем.
4. Молекулярні основи передачі внутрішньоклітинних сигналів.
5. Каскадні механізми.
6. Апстрим і даунстрим компоненти сигнальних систем.
7. Ефект посилення в сигнальних системах.
8. Значення процесів транскрипції і трансляції у трансдукції сигналу.
9. Транскрипційний каскад.
10. Типи сигнальних механізмів.
11. Дерепресорні сигнальні механізми.
12. Система убіквітин-опосередкованої деградації білків.
13. Убіквітин і убіквітин-подібні білки.
14. Значення убіквітинуювання білків.
15. Убіквітинуючий комплекс.
16. Структура SCF-подібної убіквітинуючої лігази.
17. Регуляція активності SCF-лігази.
18. Зв'язування субстрату з убіквітинуючою лігазою.
19. Особливості білків-мішеней убіквітинуючої лігази.
20. Структура 26S протеасоми.
21. Кірова 20S протеасома.
22. Регуляторна 19S частинка.
23. Особливості функціонування 26S протеасоми.

## Рецепція сигналу

1. Клітинні рецептори.
2. Різноманітність типів рецепторів.
3. Структурно-функціональні особливості рецепторів.
4. Субодична та доменна структура рецепторів.
5. Основні механізми активації рецепторів.
6. Функціональна активність рецепторів.
7. Основні властивості ліганд-зв'язуючих рецепторів.
8. Локалізація ліганд-зв'язуючих рецепторів.
9. Зовнішні рецептори.
10. Рецептор-подібні кінази.
11. Гістидинові рецепторні кінази.
12. Бактеріальні гістидинові рецепторні кінази.
13. Гібридні гістидинові кінази.
14. Регулятори відповіді А і В-типу.
15. Гістидинові фосфотрансферази.
16. Прокаріотичні двокомпонентні сигнальні системи.
17. Двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин.
18. Причини ускладнення еукаріотичних двокомпонентних систем.
19. Структура та механізм функціонування етиленових рецепторів.
20. G-білок сполучені рецептори (GPCR).
21. G-білок сполучені рецептори тварин.
22. G-білки GPCR-типу (GTG).
23. Рецептори-каналоформери.
24. Внутрішньоклітинні рецептори.
25. Ядерні рецептори тварин I і II класів.

- |   |   |
|---|---|
| 26. Внутрішньоклітинні рецептори рослин.                | 39. Фітохроми.  |
| 27. F-box рецептори.                                    | 40. Різноманітність і значення фітохроми.   |
| 28. Гормон-чутливі ліпази.                              | 41. Фотоконверсія фітохроми.  |
| 29. START-домен рецептори.                              | 42. Групи фітохром-залежних відповідей.   |
| 30. Різноманітність і особливості світлових рецепторів. | 43. Фотолабільні та фотостабільні фітохроми.                                      |
| 31. Хромофори фоторецепторів і спектри поглинання.      | 44. Структура фітохроми. Доменний склад фотосенсорного і димеризаційного районів. |
| 32. Фототропіни.  | 45. Активація фітохроми і передача світлового сигналу.                            |
| 33. Функції, які контролюють фототропіни.               | 46. Світлозалежні зміни структури фітохроми.                                      |
| 34. Структура фототропінів.                             | 47. Перенесення фітохроми у ядро.   |
| 35. Механізм світлової активації фототропінів.          | 48. Регуляція активності фітохрому.   |
| 36. Криптохроми.  | 49. Модуляція активності мішеней фітохрому.                                       |
| 37. Функції та форми криптохроми.                       |   |
| 38. Структура та механізм активації криптохроми.        |   |

#### Передача сигналу всередині клітини

- |   |   |
|---|---|
| 1. G-білки. Різноманітність і функції.                      | 16. Фосфоліпази $A_2$ , їхні типи та функції.             |
| 2. Гетеротримерні G-білки. Структура та цикл активації.     | 17. Октадеканойдний шлях.                                 |
| 3. Мономерні (малі) G-білки.                                | 18. Значення оксипінів у передачі сигналів. Жасмонати.    |
| 4. Різноманітність мономерних G-білків.                     | 19. Функції фосфоліпази $A_2$ .                           |
| 5. Сигнальні мономерні G-білки.                             | 20. Фосфоліпази $A_1$ і B, лізофосфоліпази A              |
| 6. Цикл активації мономерних G-білків.                      | 21. Взаємодія фосфоліпаз.                                 |
| 7. Ефекторні молекули та вторинні месенджери.               | 22. Оксид азоту (II) і NO-сигналінг.                      |
| 8. Фосфоліпази, їх типи та сайти розщеплення субстрату.     | 23. Хімічні та антиоксидантні властивості NO.             |
| 9. Фосфоліпази D, особливості каталізу.                     | 24. Шляхи утворення NO.                                   |
| 10. Механізм активації фосфоліпази D і передача сигналу.    | 25. Нітрат/нітрит-залежні ферментативні шляхи синтезу NO. |
| 11. Фосфоліпази C. Класифікація та характеристика груп.     | 26. Аргінін-залежні шляхи синтезу NO.                     |
| 12. Поліфосфоїнозитид-залежні фосфоліпази C.                | 27. Нітрит-залежні неферментативні шляхи утворення NO.    |
| 13. Фосфатидилінозитол і його похідні.                      | 28. NO-сигналінг.   |
| 14. PI-PLC-опосередкований сигналінг.                       | 29. Нітрозилування металів.                               |
| 15. Інозитолфосфати, діацилгліцерол і їх роль у сигналінгу. | 30. S-нітрозилування цистеїну.                            |
|   | 31. Нітрування тирозину.                                  |
|   | 32. Зв'язок NO і $Ca^{2+}$ -сигналів.                     |
|   | 33. Нуклеотидциклазні сигнальні системи.                  |
|   | 34. Аденілатциклазна регуляторна система.                 |

35. Ферменти аденілатциклазної системи.
36. Роль сАМР у регуляції активності протеїнкінази А тварин.
37. Значення сАМР у регуляції активності катаболітних генів у бактерій.
38. сАМР-регульовані білки рослин.
39. Гуанілатциклази і сGMP
40. Іони кальцію в системі передачі сигналу.
41. Функціональні модулі кальцій-залежного сигнального механізму.
42. Структура  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків.
43. Особливості структури  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого центру.
44. Кальбіндин і кальмодулін.
45. Транспортні системи, що кодувають кальцієвий сигнал.
46. Екстраклітинний транспорт кальцію.
47.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТрази ER-типу і ті, що автоінгібуються.
48. Механізм переносу іонів кальцію  $\text{Ca}^{2+}$ -АТразами.
49.  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортери.
50. Індуковане надходження кальцію у цитоплазму.
51. Потенціал-керовані канали.
52. Ліганд-керовані канали.
53. Декодування  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу.
54. Активція кальмодулін-залежних білків.
55. Модуляція активності транскрипції кальмодулінами.
56. Модуляція активності білків кальцій-залежними кіназами.
57. Ковалентна модифікація сигнальних посередників.
58. Кіназно-фосфатазний цикл.
59. Рослинні протеїнові кінази.
60. Кальцій-кальмодулін-залежні кінази.
61. Кальцій-залежні кінази (кальмодулін-подібний домен протеїн-кінази).
62. СBL-взаємодіючі протеїнові кінази.
63. Кальцинейрин В подібні білки.
64. SnRK — SNF1-подібні кінази.
65. Рецептор-подібні кінази. Групи RLK.
66. MAP кінази (MAPKKK, MAPKK, MAPK).
67. Циклін-залежні кінази (CDK).
68. Казеїнові кінази SK1 і SK2.
69. Родина GSK3/Shaggy.
70. CTR1/Raf-подібна родина.
71. Протеїнові фосфатази.
72. Класифікація фосфатаз.
73. Серин/треонінові фосфатази.
74. Тирозинові фосфатази.
75. Рослинні фосфатази.
76. Різноманітність рослинних фосфатаз.
77. Значення рослинних фосфатаз.

#### Механізми передачі сигналу рослинних гормонів

1. Регуляція транскрипції ауксин-регульованих генів.
2. Регулятори транскрипції ауксин-регульованих генів і їх доменна структура.
3. Значення транскрипційних регуляторів Aux/IAA і ARF у регуляції експресії ауксин-регульованих генів.
4. Передача цитокінінового сигналу.
5. Трансдукція гіберелінового сигналу.
6. Передача сигналу АБК через START-домен рецептори.
7. Сприйняття та трансдукція етиленового сигналу.
8. Рецепція та трансдукція брасиностероїдного сигналу.

# ПОКАЖЧИК ТЕРМІНІВ

---

---

## А

абсцизова кислота (АБК) 41, 54, 55, 59, 63, 96, 98, 99, 104, 106, 119, 144, 150, 152, 154, 162, 175, 186, 187  
адаптерні молекули 10, 11, 14, 28, 91  
аденілатциклаза 128–131, 133, 134  
аллен-оксид синтаза 111–112  
аллен-оксид циклаза 111–112  
аргінін 118–121  
ауксин 29, 38, 60, 61, 72, 91, 108, 165, 177–181 див. також індолил-3-оцтова кислота (ІОК)

## Б

білки, що активують GTPазу 93  
блок, який активує катаболітний ген (САР) 133, 134  
брасиностероїд 41, 59, 162, 190–194

## В

вторинні месенджери 10, 11, 13, 14, 16, 36, 56, 93, 94, 101, 105, 106, 109, 111, 116, 122, 127, 128, 133, 136, 138, 139, 147, 189

## Г

гіберелін 41, 61, 62, 72, 117, 152, 184, 185  
гібридні гістидинові кінрази 46–50, 181  
13-гідроксипероксилиноленова кислота 111  
гістидинова фосфотрансфераза 49–50, 156, 183  
гістидинові рецепторні кінрази 46–50, 156, 181, 187  
глікозилфосфатидилінозитол-специфічні PLC 100  
глутатіон 125  
гормон-чутливі ліпази 61–62, 184  
гуанілатциклаза 122, 136, 137  
гуанін-нуклеотид дисоціюючий інгібітор 92

## Д

двокомпонентні сигнальні системи 46  
• двокомпонентні багатокрокові сигнальні системи рослин 48–50, 181–183

• двокомпонентні сигнальні системи бактерій 46–48  
дерепресорні сигнальні механізми 20–21  
діацилгліцерол 66, 95, 99, 106, 108  
діацилгліцеролкіназа 108, 109  
діацилгліцерол-пірофосфат 108, 109  
12-13-епоксилиноленова кислота 111

## Е

етилен 40, 41, 51, 187–189  
етиленові рецептори 46, 51, 52  
ефектори (ефекторні молекули) 10, 11, 14, 16, 17, 85, 87–91, 93, 94, 111–137  
ефект посилення 16, 17, 19

## Ж

жасмонова кислота 96, 98, 111–113, 115, 116, 165

## І

ізолейцин-жасмонат 60, 61, 113  
імпортин 79–81  
індолил-3-оцтова кислота (ІОК) 41, 42 див. також ауксин  
інозитол-1,4,5-трифосфат 105–109, 115, 147, 148  
інозитол-гексакісфосфат 108, 148  
інозитол-пентакісфосфат 108, 137, 148  
іонні канали, що відкриваються циклічними нуклеотидами 57, 134–137, 148

## К

казеїнові кінрази  
• СК1 167  
• СК2 167, 168  
кальбіндін 142  
кальмодулін 110, 120, 130, 135, 142–153, 157–159, 171, 174  
кальцінейрин В подібні білки 152, 159, 160  
кальцій-залежні протеїнові кінрази (CDPK) 151, 152, 158, 159  
кальцій-кальмодулін-залежні кінрази 158

- каскадний сигнальний механізм 10, 15, 16, 19
- кіназа CTR1 52, 169, 187–189
- кінцеві мішені 11, 14–16, 19, 20
- корецептор 43–45, 176, 191, 194
- криптохром 71–74
- cry1 71, 72
  - cry2 71, 72
  - cry3 71, 72
- Л**
- легемоглобін 124
- лізин 22–25, 30
- лізофосфоліпаза А 96, 114, 115
- ліноленова кислота 111–113, 115, 116
- ліпоксигеназа 111–112, 114
- М**
- метакаспаза 9 125
- метилжасмонат 113
- метіонін-аденозилтрансфераза 125
- mio*-інозитол 101, 102
- Н**
- нітрат-редуктаза 118, 119
- нітрит-NO редуктаза 119
- нітрозилування металів 122–124
- нітрозоглутатіон 125
- нітрозоглутатіон-редуктаза 125
- нітрозонія іон 117, 122
- нітроксиланіон 117
- нітрування тирозину 122, 126
- нуклеопорин 50 79
- О**
- оксид азоту 116–127
- оксигемоглобін 124
- 12-оксофідодієнова кислота 111
- 12-оксофідомоноєнова кислота 111
- октадеканоїдний шлях 99, 111–114, 165
- П**
- пентадієнова система 111
- первинні месенджери 39, 86, 94
- пероксинітрит 117, 118, 122, 124
- поліаміни 121
- поліфосфоінозитид-специфічні PLC 100–102, 106–109, 115, 116
- протеїнкіназа А 132, 133, 147
- протеїнові фосфатази 169–176
- DsPTP 172, 173, 176
  - KAPP 170, 176
  - PP1 170–172, 174–175
  - PP2 170, 171
  - PP2A 170–172, 174–175
  - PP2B 170–172
- PP2C 170–172, 174–175, 186–187
  - PPM
    - ABI1 175
    - ABI2 63, 175
  - PPP 170–172, 174, 175
  - PTP 170, 172, 173, 176
- протеасома
- 19S 30–33
  - 20S 30–33
  - 26S 22, 29–31
  - 30S 31
- Р**
- реакції-відповіді 9
- повільні 9
  - швидкі 9
- регулятори відповіді 46–50, 181–183
- RR-A (регулятори відповіді А-типу) 48, 50, 182, 183
  - RR-B (регулятори відповіді В-типу) 48, 50, 181, 183
- рецептор 10, 34–84
- рецептори іонотропні 55, 148
- рецептори-каналоформери 55–57
- рецептори UV-B 65–66
- рецептор-подібні кінази 42–45, 162–164
- С**
- світлові рецептори 64–84
- семитрансмембранні (7TM) рецептори 53 див. також G-білок сполучені рецептори (GPCR)
- серин 44, 70, 78, 110, 132, 147, 155, 165, 167, 168
- серин/треонінові протеїнові кінази 52, 72, 132, 155–169
- супероксид 117, 118, 122
- Т**
- тирозин 44, 73, 116, 118, 122, 126, 155, 165, 166
- транскрипційний каскад 17–19
- транскрипційні фактори 10, 11, 16–19, 50, 64, 66, 82, 143, 151, 152, 162, 165, 175, 177, 187, 189
- ABF1 152
  - ABF2 187
  - ABF4 152
  - ARF 177–180
  - Aux/IAA 29, 61, 177–181
  - BES1 191–194
  - BZR1 191–194
  - CAMTA 151

- CBF 151
  - CO (CONSTANCE) 72
  - EIN3 189
  - EIN3-like 189
  - EREBP 189, 190
  - GAMYB 184, 185
  - HFR1 84
  - HY5 66, 74, 84
  - HYH (HY5 Homologue) 74
  - LAF1 84
  - PIF3 82
  - PIL (PIF3-Like) 82
  - RR-B див. регулятори відповіді: RR-B (регулятори відповіді B-типу)
  - RSG 152
  - треонін 44, 155, 161, 165, 166, 167
- У**
- убіквітин 22, 23
  - убіквітин-активуючий фермент (E1) 25
  - убіквітин-кон'югуючий фермент (E2) 25
  - убіквітин-опосередкований селективний протеоліз 21–33, 62, 78, 81–84, 169, 179, 180, 184, 191, 194
  - убіквітин-подібні білки
    - білки з убіквітин-подібним доменом 23
    - убіквітин-подібні модифікатори 23
  - убіквітинуюча протеїнова лігаза (E3) 21, 22, 25–28, 61, 181
    - COP1 73, 74, 82–84
    - SCF-лігаза 25, 27–29, 59, 62, 179, 184
      - Cullin 27
      - F-box 27–29, 59, 62, 184
      - RBX 27
      - SKP1 27
    - Siah1 126
- Ф**
- ферілегемоглобін 124
  - фітохром-асоційована фосфатаза PAPP5 82
  - фітохроми 74–84
    - PHYA 76–82
    - PHYB 76–78, 81, 82
    - PHYC 76
    - PHYD 76
    - PHYE 76
  - фосфатидаткіназа 108
  - фосфатидилінозитол 97, 100–103
  - фосфатидилінозитол-3,5-дифосфат 104, 105
  - фосфатидилінозитол-3-кіназа 90, 104
  - фосфатидилінозитол-3-фосфат 103, 104
  - фосфатидилінозитол-3-фосфат-5-кіназа 104
  - фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат 97, 98, 104–106, 109, 116, 147
  - фосфатидилінозитол-4-кіназа 104
  - фосфатидилінозитол-4-фосфат 104, 105
  - фосфатидилінозитол-4-фосфат-5-кіназа 105
  - фосфатидилінозитол-5-фосфат 104
  - 3-фосфогліцеральдегід-дегідрогеназа 126
  - фосфодіестераза 94, 128, 131, 133, 134
  - фосфоліпаза B 95, 114
  - фосфоліпаза C 95, 99–109, 115
  - фосфоліпаза D 95–99, 106, 115, 116
  - фосфоліпази A<sub>1</sub> 95
  - фосфоліпази A<sub>2</sub> 95, 109–116
  - фосфорилування
    - автофосфорилування 36, 44, 48, 70–73, 75, 78, 145, 152, 158, 191
      - трансмолекулярне автофосфорилування 44, 45, 48, 71, 75, 181
    - трансфосфорилування 45, 191
  - фосфосерин 172, 173
  - фосфотирозин 166, 172, 173, 176
  - фосфотрансфераза 156
  - фосфотреонін 172, 173
  - фототропін 66–71
    - phot1 66, 67, 70
    - phot2 66, 67, 70, 71
- Х**
- хромосома 65
- Ц**
- циклін-активуюча кіназа 166
  - циклін-залежні кінази 165–167
  - цикліни 166, 167, 176, 183
  - циклічний аденозинмонофосфат 127, 128, 131–136, 132
  - циклічний гуанозинмонофосфат 127, 136, 137
  - цистеїн 25, 27, 69, 116, 122, 124, 125, 137, 163, 173
  - цистеїновий місток 51
  - цитокінін 81, 181–183
  - цитрулін 120

- Я**  
ядерні рецептори тварин 57–58
- В**  
BR11 брасиностероїдний  
рецептор 44, 137, 162, 163, 190–194
- С**  
Ca<sup>2+</sup>-АТРаза 143–145  
• Ca<sup>2+</sup>-АТРаза ER-типу 144  
• Ca<sup>2+</sup>-АТРаза, що  
автоінгібується 144, 145  
Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортер (CAХ) 145, 146  
Ca<sup>2+</sup>-канали 146–148  
• глутамат-рецептор-подібні  
Ca<sup>2+</sup> канали 148  
• двупорові Ca<sup>2+</sup>-канали 148  
• ліганд-керовані Ca<sup>2+</sup>-канали 147  
• потенціал-керовані  
Ca<sup>2+</sup>-канали 146  
СВL-взаємодіючі протеїнові  
кінази 152, 154, 159, 160  
CDK-активуюча кіназа 167
- D**  
DELLA-білки 62, 184, 185
- E**  
EF-рука 110, 140–143, 145, 148, 149, 151,  
152, 157–159
- F**  
F-box рецептори 59–61, 108, 180
- G**  
GAP див. білки, що активують  
GТРаза  
GDI див. гуанін-нуклеотид дисоціюючий  
інгібітор  
GSK3-подібні кінази 168  
• BIN2 168, 169, 191, 192, 194  
G-білки 10, 53–55, 79, 85–93, 129–130
- гетеротримерні 53, 54, 85–89
  - мономерні 85, 86, 90–93
    - Arf 90, 91
    - Rab 90–92
    - Ran 79, 90, 91
    - Ras 86, 90, 91, 169
    - Rho 90, 91
    - ROP (Rho of plants) 90
- G-білки GPCR-типу (GTG) 54, 55  
G-білок сполучені рецептори  
(GPCR) 53, 54, 86, 87
- H**  
H<sup>+</sup>-АТРаза 105, 145  
HPt домен див. гістидинова  
фосфотрансфераза
- M**  
MAP кінази  
• MAPK 164, 165, 176  
• MAPKK 157, 164, 165, 176  
• MAPKKK 164, 165, 169
- N**  
NO-синтаза 119–130, 120–131
- P**  
PLA<sub>1</sub> див. фосфоліпаза A<sub>1</sub>  
PLA<sub>2</sub> див. фосфоліпаза A<sub>2</sub>  
PLB див. фосфоліпаза B  
PLC див. фосфоліпаза C  
PLD див. фосфоліпаза D
- S**  
SNF1-подібні кінази (SnRK) 160–162  
• SnRK1 160–162, 175  
• SnRK2 63, 64, 160–162, 175, 186, 187  
START-домен рецептори 63, 64, 175,  
186  
S-нітросилування цистеїну 122,  
124–126

Навчальне видання

Джамєєв Вадим Юрійович

**Механізми рецепції та внутрішньоклітинного  
сигналіngu у рослин**

Навчальний посібник

Відповідальний за випуск *В. Ю. Джамєєв*

Дизайн, рисунки та комп'ютерне верстання *В. Ю. Джамєєв*

Коректор *С. В. Гончарук*

Макет обкладинки *В. Ю. Джамєєв*

Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Ум. друк. арк. 10,2. Тираж 300 пр.  
Зам. №149/15.

Видавець і виготовлювач

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,  
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи  
ДК № 3367 від 13.01.2009

Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна  
Тел. 705-24-32

Надруковано з готових оригінал-макетів у ФО-П Тітов Є. В.  
61057, м. Харків, Харківська набережна, 9, кв. 23.  
Свідоцтво про реєстрацію ВВО №951823 від 18.01.1999