

## РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗНЫХ КАСКАДОВ В ПЕРЕДАЧЕ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ НИЗШИХ ЭУКАРИОТ

© И. В. Шемарова

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: irina@lis.mail.iephb.ru*

В обзоре суммированы данные о механизмах передачи стрессовых сигналов при участии протеинкиназных каскадов в клетках низших эукариот. Рассматривается роль в передаче стрессовых сигналов сенсорных гистидинкиназ, тирозинкиназ, РКС и киназ, зависимых от циклических нуклеотидов. Особое внимание уделяется сравнительному анализу способов передачи стрессовых сигналов в клетках низших и высших эукариот.

**Ключевые слова:** одноклеточные эукариоты, внутриклеточная сигнализация, стресс, сенсорные белки, гистидинкиназа, РКС, сАМФ, РКА, МАР-киназный каскад.

**Принятые сокращения:** АДФ — аденозиндифосфат; а. о. — аминокислотные остатки; АТФ — аденозинтрифосфат; ГДФ — гуанозиндифосфат; ГТФ — гуанозинтрифосфат; АС — аденилатциклаза; сАМФ — циклический аденозинмонофосфат; сGMP — циклический гуанозинмонофосфат; с-Src — клеточная Src-тирозинкиназа; DAG — диацилглицерин; G-белок — гуанилнуклеотидсвязывающий белок; GC — гуанилатциклаза; HPt — гистидинфосфотрансфераза; МАР-киназы — митогенактивируемые протеинкиназы; МАР-киназный каскад — каскад митогенактивируемых протеинкиназ; NO — оксид азота; PDE — фосфодиэстераза циклических нуклеотидов; РКА — протеинкиназа А; РКС, РКС $\eta$ , РКС1 — изоформы протеинкиназы С; PKG — протеинкиназа G, зависимая от сGMP; SAPK — стрессактивируемые киназы МАР-киназного каскада; sGC — цитозольная (растворимая) гуанилатциклаза; TNF- $\alpha$  — фактор некроза опухоли- $\alpha$ .

Внутриклеточные сигнальные системы, обеспечивающие свою функцию путем фосфорилирования белков при участии протеинкиназ, считаются наиболее специализированными и характерными для клеток высших эукариот. Фосфорилирование по остаткам серина, треонина и тирозина является основной посттрансляционной модификацией, участвующей в регуляции практически всех программированных клеточных процессов. Работы последних лет показали, что протеинкиназы играют важную роль и в передаче стрессовых сигналов. Они активируют сигнальные каскады, которые в свою очередь регулируют экспрессию генов, метаболизм и адаптивное поведение клеток (Kyriakis, Avruch, 2001; Vrana, Grant, 2001; Li et al., 2003; Abid et al., 2004; Zvalova et al., 2004). Особо важное значение в передаче стрессовых сигналов в геноме у высших эукариот выполняют SAPK — стрессактивируемые киназы МАР-киназного пути, а именно Jun-N-терминальные киназы (JNKs) и киназа p38. SAPK млекопитающих активируются с помощью широкого круга стимулов (УФ-облучения, осмотического стресса, сфингомиелиназы, TNF- $\alpha$  и др.), которые приводят к фосфорилированию и активации транскрипционных факторов и экспрессии многочисленных генов, кодирующих белки адаптивного ответа (Su, Karin, 1996; Kyriakis, Avruch, 2001; Pantos et al., 2003; Corre et al., 2004).

В клетках низших эукариот стрессы, обусловленные факторами внешней среды (гиперосмотичностью, тепловым и окислительным шоком, пищевым голоданием),

вызывают временное фосфорилирование белков, обеспечивающих как быстрые, так и значительно более медленные программированные ответы клетки. Фосфорилирование белков, участвующих в передаче стрессовых сигналов, у протистов осуществляется либо по остаткам серина, треонина и тирозина (как в клетках высших эукариот), либо по остаткам гистидина и аспартата (как у прокариот), что указывает на преемственность механизмов сигнальной трансдукции в эволюции сенсорных систем (Loomis et al., 1998; Gamper et al., 1999; Koretke et al., 2000; Oehme, Schuster, 2001).

Последние направления исследований недавно открытых стрессактивируемых сигнальных путей у низших эукариот сфокусированы преимущественно на выяснении роли протеинкиназных каскадных реакций в регуляции ответа клеток на стресс. К настоящему времени участие протеинкиназ в передаче стрессовых сигналов установлено в отношении миксомицетов, дрожжевых грибов и простейших. Механизмы, с помощью которых клетки эукариотических микроорганизмов распознают стрессовый сигнал, точно не определены. У низших грибов в плазматической мембране выявлены осмо- и термосенсорные белки, изменяющие свою активность под действием стрессора. У простейших стрессовые сигналы могут восприниматься через изменение текучести мембран. В любом случае к активации стрессактивируемых протеинкиназных каскадов у низших эукариот приводят конформационные изменения в мембранных белках, а

целенаправленная передача сигнала в геном осуществляется через активацию транскрипционных факторов, контролирующих транскрипцию стрессрегулируемых генов.

Следует подчеркнуть, что, несмотря на функциональное сходство протеинкиназ, обеспечивающих передачу стрессовых сигналов в клетках разного уровня организации, киназы одноклеточных микроорганизмов структурно отличны от таковых у высших животных, что не позволяет проводить четкие параллели в отношении биохимических механизмов передачи стрессовых сигналов в клетках высших и низших эукариот.

Цель настоящего обзора ограничивается рассмотрением лишь некоторых наиболее актуальных вопросов, связанных с ролью протеинкиназ в регуляции стрессактивируемых сигнальных путей в клетках низших эукариот.

### Сигнальные пути, активируемые при участии рецепторных гистидинкиназ

Не так давно у ряда протистов были обнаружены гистидинкиназы — ферменты, широко участвующие во внут-

риклеточных сигнальных процессах в доядерных клетках. Выявленные находки навели исследователей на мысль о возможном сходстве в механизмах передачи сигналов у одноклеточных эукариот и бактерий и тем самым послужили мощным стимулом для дальнейшего развития эволюционных представлений о происхождении внутриклеточной сигнализации эукариот из информационных систем доядерных организмов (Ota, Varshavsky, 1993; Santos, Shiozaki, 2001; Stephenson, Hoch, 2002; Wolanin et al., 2002).

Гистидинкиназы у прокариотических микроорганизмов выполняют функции, сходные с функциями рецепторных тирозинкиназ позвоночных. Эти ферменты обеспечивают распознавание пускового сигнала и его трансмембранную передачу (Saier, 1993). Особенностью передачи сигналов с помощью типичных сенсорных (рецепторных) гистидинкиназ (рис. 1, А) является то, что эти ферменты участвуют в фосфорилировании белков, которые служат прямыми регуляторами генной транскрипции. Сигнальные системы, представленные этими элементами, названы двухкомпонентными, хотя у протистов правильнее считать их трехкомпонентными, поскольку в их структуру входит дополнительный компо-

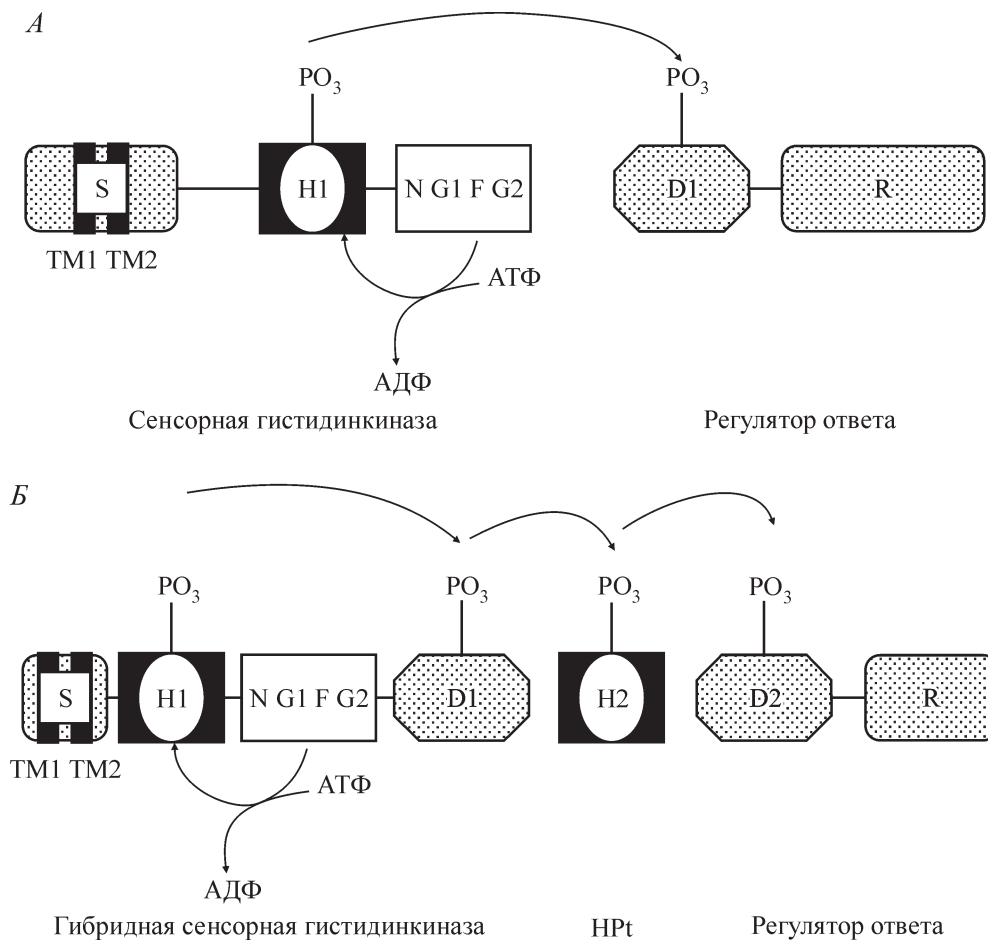


Рис. 1. Схема передачи сигналов при участии рецепторных гистидинкиназ.

А — одноступенчатая передача при участии типичных сенсорных гистидинкиназ; Б — многоступенчатая передача при участии гибридных гистидинкиназ. S — сенсорный домен гистидинкиназы; TM1 и TM2 — трансмембранные участки сенсорного домена. H1 — киназный домен собственно гистидинкиназы; N, G1, F, G2 — консервативные остатки аминокислот в составе цитоплазматического домена; D1 — акцепторный домен в составе гибридной гистидинкиназы; H2 — сайт фосфорилирования по гистидину в составе гистидинфосфотрансферазы; D2 — акцепторный домен в составе белка-регулятора ответа; R — регуляторный домен белка-регулятора ответа; PO<sub>3</sub> — фосфатная группа. Остальные обозначения см. в разделе «Принятые обозначения».

Характеристика рецепторных гистидинкиназ из клеток низших эукариот

Вид микроорганизма	Общепринятое название гистидинкиназы	Функция	Литературный источник
<i>D. discoideum</i>	DokA	Осмосенсор	Shuster et al., 1996
	DhkA	Рецептор аутокринного фактора SDF2 — стимулятора терминальной дифференцировки	Wang et al., 1996, 1999
	DhkB	Рецептор дискаденита — ингибитора спорового развития	Zinda, Singleton, 1998
	DhkC	Сенсор аммония	Singleton et al., 1998
	DhkD	Неизвестна	Aubry, Firtel, 1999
<i>S. cerevisiae</i>	Sln1	Осмосенсор	Ota, Varshavsky, 1993; Maeda et al., 1994; Li et al., 1998, 2002
<i>Sch. pombe</i>	Mak2p/Mak3p	Редокс-чувствительные сенсоры	Buck et al., 2001
<i>C. albicans</i>	Chk1p	Участвуют в регуляции морфогенеза и вирулентности	Calera, Calderone, 1999
<i>N. crassa</i>	os-1	Осмосенсор и регулятор морфогенеза	Alex et al., 1996; Schumacher et al., 1997
<i>C. heterostrophus</i>	Dic1	Осмосенсор и регулятор резистентности к ксенобиотикам	Yoshimi et al., 2004

нент, выполняющий функцию переносчика фосфатной группы (рис. 1, Б; см. ниже).

Гистидинкиназы микроорганизмов имеют лишь отдаленное сходство первичной структуры с сигналу управляемыми киназами многоклеточных организмов. Структурно эти киназы ближе ДНК-топоизомеразе II и шаперону Hsp90 (Bilwes et al., 1999; Stock, 1999; Matsumoto et al., 2002).

Стрессактивируемый сигнальный путь, представленный в клетках низших эукариот гистидин-аспарагиновой фосфотрансферной системой, содержит два, как у большинства бактерий, или три типа сигнальных элементов. В последнем случае входящие в эту систему гистидинкиназы получили название гибридных, так как представляют собой комплекс сенсорной гистидинкиназы и гистидинфосфотрансферазы. Важно подчеркнуть, что в данном случае первоначальный перенос фосфатной группы с гистидина (H1) на аспарагин (D1) происходит в пределах одного белка (рис. 1, Б), а не с белка на белок, как у типичных сенсорных гистидинкиназ (рис. 1, А). Гистидин-аспарагиновая фосфотрансферная система протистов состоит из следующих элементов. Во-первых, это сенсорная гистидинкиназа, которая имеет сайты аутофосфорилирования гистидина (H1) и выполняет одновременно функцию сенсора и трансмиттера. Во-вторых, это взаимодействующая с сенсорной гистидинкиназой гистидинфосфотрансфераза с сайтом фосфорилирования по гистидину (H2). В-третьих, это регулятор ответа, обладающий акцепторным доменом (D2). Домен содержит консервативный сайт фосфорилирования по аспартату и выполняет роль молекулярного переключателя в процессе биохимической трансляции сигнала. Центральным компонентом в этой системе является гистидинфосфотрансфераза — фермент, биологическая роль которого состоит в переносе фосфатной группы

от гистидина (H2) к акцепторному домену (D2) эффекторного белка (регулятора ответа; рис. 1, Б). Следует отметить, что помимо вышеназванных функций многие гистидинкиназы эукариотических микроорганизмов выполняют и функцию модулятора сигнала. Эту роль ферменты осуществляют, выступая в качестве фосфатаз для своих субстратов. Дефосфорилирование регуляторов ответа приводит к изменению общего баланса киназной и фосфатазной активностей фермента и соответственно к модуляции нисходящего сигнала (Hoch, 2000).

В клетках низших эукариот (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum*, *Neurospora crassa* и др.) из обширного семейства гистидинкиназ, включающего в себя 11 подсемейств, было обнаружено лишь несколько гибридных рецепторных гистидинкиназ (Wolanin et al., 2002; Janiak-Spens, West, 2004, и др.; см. таблицу). Эти гистидинкиназы, как и типичные сенсорные гистидинкиназы прокариот, активируются внеклеточными стимулами и запускают механизм сигнальной трансдукции путем передачи фосфатной группы с киназного домена (H1) гистидинкиназы на аспартат. В клетках низших эукариот гистидинкиназы стимулируются при резком изменении условий внешней среды и активируют сигнальные пути, конечными звеньями которых являются гены адаптивного ответа. Интересно отметить, что в клетках протистов большинство выявленных гистидин-аспарагиновых фосфотрансферных систем является лишь частью многокаскадных стрессактивируемых сигнальных путей и обеспечивает рецепторное звено сигнальной передачи. Таким образом, теперь уже не подлежит сомнению, что у низших эукариот имеются рецепторные гистидинкиназы, роль которых состоит в активации сигнальных путей, запускаемых стрессом.

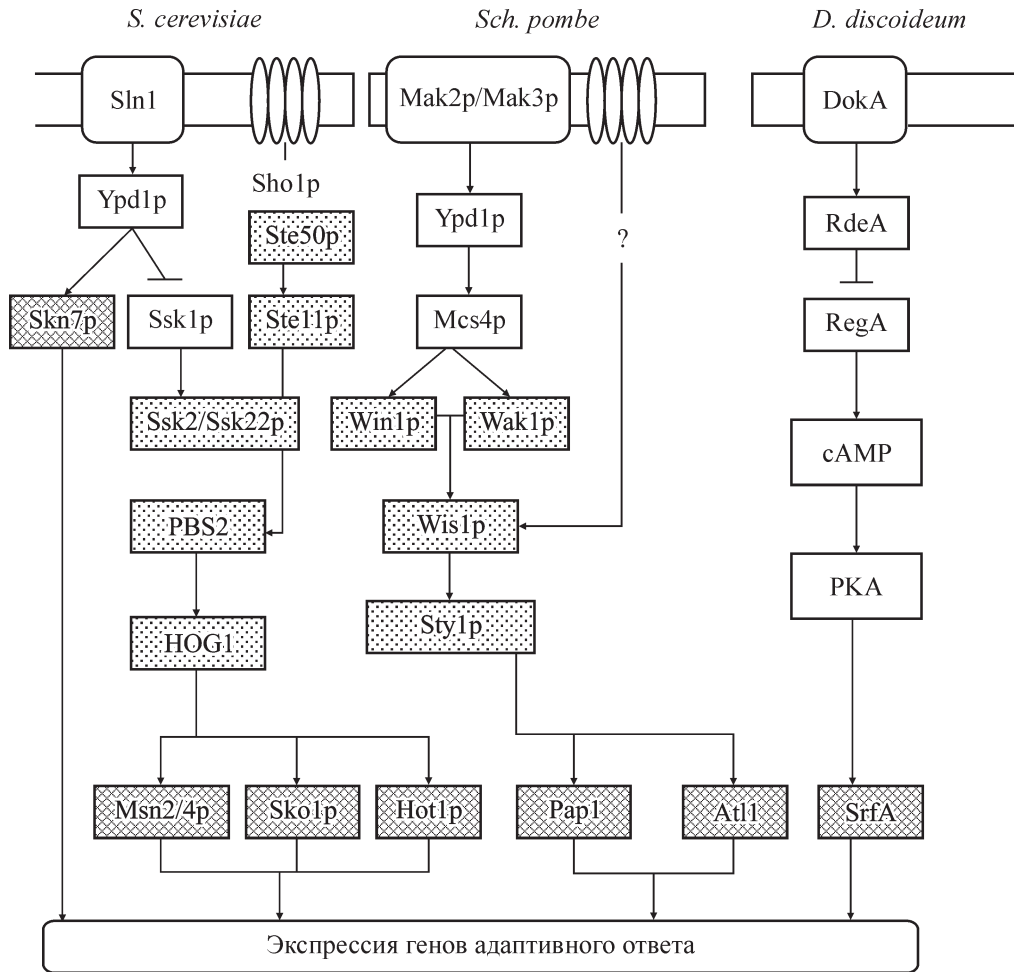


Рис. 2. Сигнальные пути, активируемые при участии гистидинкиназ.

Sln1, Mak2p/Mak3p, DokA — сенсорные гистидинкиназы; Ypd1p, RdeA — гистидинфосфотрансферазы; Ssk1p, Mcs4p, RegA — регуляторы ответа; Sho1p и «?» — идентифицированный и неидентифицированный мембранные сенсоры; Ste50p, Ste11p, Ssk2/Ssk22p, PBS2, Wis1p, Wak1p — регуляторные MAP-киназы; HOG1, Sty1p — интегрирующие MAP-киназы; Skn7p, Msn2/4p, Sko1p, Hot1p, Pap1, At1, SrfA — факторы транскрипции. Точками выделены киназы MAP-киназного каскада, штриховкой — факторы транскрипции. Остальные обозначения см. в разделе «Принятые обозначения».

В клетках дрожжей *S. cerevisiae* сигнальный путь, индуцируемый осмотическим шоком и опосредуемый гибридной гистидинкиназой, изучен наиболее подробно (Thomason, Kay, 2000; Li et al., 2002). К настоящему времени определены компоненты этого сигнального пути и клонирован ген, кодирующий сенсорную гистидинкиназу (Ota, Varshavsky, 1993).

Как и у бактерий, у которых в осморегуляцию вовлекается двухкомпонентная фосфотрансферазная сигнальная система, представленная сенсорной гистидинкиназой EnvZ и регулятором ответа OmpR, у дрожжей *S. cerevisiae* осмотичность среды воспринимается трансмембранной сенсорной гистидинкиназой Sln1 (Sln1) (Maeda et al., 1994). В обычных условиях культивирования при низкой осмотичности среды Sln1 проявляет высокую активность, аутофосфорилируется и передает фосфатную группу с консервативного остатка гистидина 576 киназного домена (H1) на аспарат 1144 акцепторного домена (D1), локализованного в С-терминальной части молекулы Sln1, а затем через остаток гистидина 64 (H2), расположенный в Нрт-домене гистидинфосфотрансферазы Ypd1p, на консервативный аспарат 554 (D2) акцепторного домена белка Ssk1p, выполняющего функцию регу-

лятора ответа (RR; Posas et al., 1996; Wungler-Murphy, Saito, 1997). При этом фосфорилированный Ssk1p неактивен, и его функциональная роль состоит в предотвращении активации регуляторных киназ MAP-киназного каскада. В условиях повышенной осмотичности гистидинкиназа Sln1 временно инактивируется (механизм инактивации неизвестен), что приводит к понижению уровня фосфорилированного Ssk1p. Дефосфорилированный белок Ssk1p может взаимодействовать с N-терминальным регуляторным доменом MAPKK-киназы Ssk2p или Ssk22p. Ssk2p/Ssk22p фосфорилируют по остаткам серина 514 и треонина 518 нисходящую MAPK-киназу PBS2 (Pbs2p), которая в свою очередь фосфорилирует MAP-киназу HOG1 (Hog1p) (Posas, Saito, 1998). Последнее событие служит сигналом к транслокации HOG1 в ядро, где MAP-киназа инициирует экспрессию генов адаптивного ответа (рис. 2). Точный механизм, с помощью которого Sln1 детектирует изменения осмотического давления, неизвестен, но, по-видимому, в его основе лежат конформационные изменения клеточной мембраны (Tao et al., 1999). В условиях гипоосмотического стресса сигнал с Sln1 передается на акцепторный домен другого регулятора ответа — белка Skn7p, являющегося одно-

временно фактором транскрипции (Li et al., 2002). В неактивном (дефосфорилированном) состоянии Skn7p находится в цитоплазме. В условиях гипосмотического стресса Skn7p фосфорилируется и транслоцируется в ядро, где через ДНК-связывающий домен взаимодействует со своими ядерными мишенями. Отмечена интегрирующая роль этого белка и при передаче сигналов, запускаемых окислительным стрессом (Li et al., 1998).

Недавно было обнаружено, что в клетках дрожжей *Sch. pombe* функционирует очень похожий на описанный у *S. cerevisiae* сигнальный путь, активируемый окислительным стрессом. В данном случае регуляторный белок Mcs4p, являющийся гомологом белка Ssk1p (Shieh et al., 1997; Shiozaki et al., 1997), активирует каскад MAP-киназ Wak1p, Win1p, Wis1p и Sty1p (рис. 2). Этот сигнальный путь инициируется двумя гистидинкиназами Mak2p и Mak3p, образующими гетеродимер (см. таблицу). Каждая из них содержит по одному PAS- или PAC-мотиву, а также GAF-домен, которые участвуют в детектировании стрессового сигнала (Buck et al., 2001). Нисходящей мишенью действия этих киназ является гистидинфосфотрансфераза Ypd1p (у шизомицетов называемая также Mpr1p), которая в свою очередь фосфорилирует белок Mcs4p (Nguyen et al., 2000). Интересно отметить, что экспрессия гена *Mcs4* + требуется для активации MAP-киназы Sty1p в ответ и на другие виды стресса, а именно на температурный шок, гиперосмотичность и УФ-облучение, однако при этом в передаче сигнала не вовлекается процесс фосфорилирования аспарагина в акцепторном домене Mcs4p (Shieh et al., 1997; Shiozaki et al., 1997). Возможно, в данном случае при передаче стрессового сигнала используется механизм активации регулятора ответа по остаткам серина, треонина и тирозина — по аналогии с таковым в клетках *S. cerevisiae*, запускаемым окислительным стрессом (Morgan et al., 1997; Bouquin et al., 1999; Li et al., 1998, 2002).

У *Sch. pombe* обнаружен еще один регулятор ответа — белок Prr1p, имеющий высокую гомологию с белком Skn7p *S. cerevisiae* (Ohmiya et al., 1999). Этот регулятор ответа вовлекается в адаптацию, индуцированную окислительным стрессом, но в отличие от Mcs4p не регулируется гистидинкиназами Mak2p и Mak3p. Механизм его активации не совсем ясен. В отличие от регулятора ответа Mcs4p, стимулируемого гистидинкиназами через реакцию трансфосфорилирования по остаткам аспарагина, предполагается, что фосфорилирование Prr1p обеспечивается механизмом, который не зависит от активации гистидинфосфотрансферазы Ypd1p (Thomason, Kay, 2000).

Таким образом, рецепторные гистидинкиназы в клетках дрожжей, так же как и тирозинкиназы млекопитающих, активируют два пути передачи стрессового сигнала. Первый путь, подобно STAT-пути в клетках млекопитающих, однокаскадный, при котором активация рецептора приводит к последующей непосредственной активации транскрипционных факторов, локализованных в цитоплазме. Второй путь — многокаскадный. В данном случае активация рецептора стимулирует SAPK — каскад MAP-киназ, интегрирующую роль в котором играют стрессактивируемые киназы (p38 и JNKs — у млекопитающих, HOG1 — у *S. cerevisiae* и Sty1p — у *Sch. pombe*). Фосфорилированные MAP-киназы перемещаются в ядро и активируют ядерные факторы транскрипции (подробнее эти события рассмотрены в следующем разделе обзора).

Сенсорные гистидинкиназы обнаружены и в клетках низших слизистых грибов *Dictyostelium discoideum* (Schuster et al., 1996; Zinda, Singleton, 1998; Wang et al., 1999). Сигнальные пути, активируемые при участии этих киназ, вовлекаются в осморегуляцию, прорастание спор и терминальную дифференцировку (Schuster et al., 1996; Wang et al., 1996; Ott et al., 2000; Tekinay et al., 2003; Katon et al., 2004). Кроме гистидинкиназ в клетках *D. discoideum* обнаружены гистидинфосфотрансфераза RdeA и регулятор ответа RegA, выполняющий функцию фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (рис. 2; Chang et al., 1998; Shaulsky et al., 1998; Thomason et al., 1998).

Наиболее изученная у *D. discoideum* осморегулируемая гистидинкиназа DokA содержит N-терминальный сенсорный домен, два PAS-домена, также участвующих в детектировании стрессового сигнала, киназный домен, включающий в себя сайт фосфорилирования по гистидину (H1053), и C-акцепторный домен с сайтом фосфорилирования по аспарагину (D1567). В передаче сигнала с киназного домена гистидинкиназы на акцепторный домен регулятора ответа в клетках миксомицетов и дрожжей много общего. У обоих сравниваемых ферментов пусковой сигнал с гистидинкиназ передается на регулятор ответа в процессе реакций трансфосфорилирования при участии гистидинфосфотрансфераз. У *D. discoideum* эту функцию выполняет белок RdeA, взаимодействующий с фосфодиэстеразой RegA, имеющей в своей структуре консервативный акцепторный домен RR (Thomason et al., 1998). Начиная с этого звена пути многокаскадной передачи сигнала у миксомицетов и дрожжей расходятся. Если у дрожжей сигнал с регулятора ответа передается на каскад стрессуправляемых MAP-киназ, то у миксомицетов он инициирует негативную регуляцию PDE, что приводит к активации cAMP-РКА-сигнального пути. Интересно отметить, что при всей внешней несхожести заключительных этапов передачи сигнала по стрессактивируемым путям у дрожжей и миксомицетов суть открытых процессов одна и та же. Она состоит в том, что при такой передаче сигнала в ядро индуцируются гены, обеспечивающие морфофункциональную перестройку клеток в условиях стресса. Следует напомнить, что именно процессы ремоделирования белков лежат в основе молекулярных механизмов защиты клеток от стресса.

К изучению молекулярных механизмов передачи стрессовых сигналов в клетках простейших приступили лишь в последнее время. В результате таких исследований были выявлены стрессактивируемые сигнальные пути у инфузорий *Tetrahymena thermophila* и *T. pyriformis* (Nakashima et al., 1999). Установлено, что эти пути активируются низкой температурой или повышением осмомолярности среды и связаны со стимуляцией MAP-киназ (Nakashima et al., 1999). Начальная звенья стрессактивируемых путей у инфузорий неизвестны, отсутствуют сведения и о существовании у простейших рецепторных гистидинкиназ. Можно предположить, что у этих микроорганизмов, имеющих множество черт сходства в молекулярной организации с клетками низших растений и грибов, также имеются рецепторные гистидинкиназы. В таком случае их выявление и идентификация — задача ближайшего будущего. В свете же фактов, обсуждаемых в данном разделе обзора, особого внимания заслуживает сравнительный анализ первичной структуры MAP-киназ млекопитающих и тетрахимен. Оказывается, в отличие от типичных MAP-киназ млекопитающих у MAP-киназ инфузорий (MRK-киназ) тиро-

зин в высококонсервативном киназном субдомене VIII замещен на гистидин (тр226-гли-гис228). Замена гистидина в активном сайте фермента на тирозин в ходе эволюции может носить как случайный, так и закономерный характер. В последнем случае выявленный факт может служить важным аргументом в пользу взглядов о прогрессивной молекулярной эволюции ферментов, обладающих киназной активностью, и дает основание предполагать, что на ранних этапах эволюции роль интегрирующих MAP-киназ выполняли ферменты, совмещающие функции гистидин- и тирозинкиназ. Прояснить этот вопрос помогут дальнейшие молекулярно-филогенетические исследования сигналу управляемых протеинкиназ.

### Роль тирозинкиназ и SH2- и SH3-мультидоменных белков в передаче стрессовых сигналов у низших эукариот

Большинство протистов существуют в среде, далекой от постоянства, поэтому у них имеются сигнальные механизмы, быстро и адекватно реагирующие на любое изменение условий внешней среды. Один из таких механизмов, распространенный у дрожжей и миксомицетов и эволюционно сближающий стрессактивируемые сигнальные системы протистов и прокариот, мы описали в предыдущем разделе обзора. Здесь мы остановимся на описании другого способа передачи стрессового сигнала. Он связан с процессами фосфорилирования по тирозину и модульными взаимодействиями сигнальных белков и характерен для клеток высших эукариот.

Суть модульной передачи сигнала состоит в следующем. Сигнал от активированных рецепторов клеточной поверхности передается на ферменты, содержащие специфические SH2- и SH3-домены, характерные для мультидоменных сигнальных белков. С этими ферментами, преимущественно Src-тирозинкиназами, взаимодействуют цитозольные белки, обладающие сайтами связывания с SH2- или SH3-доменами (src-homology). Сопряжение Src-тирозинкиназ с белками-мишенями приводит к фосфорилированию последних, в результате чего белки становятся активными и способными к дальнейшей передаче сигнала. Подробнее о Src-тирозинкиназах и SH2- и SH3-доменных белках можно прочитать в обзоре Посона (Pawson, 1995). Субстратами SH2-содержащих белков являются активированные факторы роста или цитоплазматические фосфопротеины. Они содержат сайты фосфорилирования по тирозину, которые и являются местом связывания с SH2-доменом сигнального белка. Молекулярными мишенями SH3-содержащих белков служат белки, обогащенные пролинами и обладающие SH3-связывающими сайтами. Такие белки в качестве составляющих элементов протеинкиназных каскадов часто входят в сигнальную сеть белков, зависимых от процессов фосфорилирования по тирозину (Pawson, 1995).

Благодаря исследованиям, проведенным в середине 1990-х годов, было установлено, что Src-тирозинкиназы активируют сигнальные пути, ключевыми компонентами которых являются MAP-киназы. Последние образуют обширное семейство регуляторных белков, в состав которого входят и стрессактивируемые киназы p38 и JNK (Davis, 1994; Derijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1995; Zhu et al., 1999; Pantos et al., 2003). Для большинства из них

индукторами стрессового сигнала являются лиганды, активирующие сигнальный путь через взаимодействие с рецепторами клеточной поверхности, для других — физико-химические факторы внешней среды, модифицирующие плазматическую мембрану (Lazou et al., 1998; Kyriakis, Avruch, 2001; Nishina et al., 2003; Puig et al., 2004).

В клетках протистов большинство стрессактивируемых сигнальных путей активируется изменением условий окружающей среды. Поэтому представляется интересным сравнить способы передачи сигналов, запускаемых физико-химическими факторами стресса, в клетках высших и низших эукариот и выяснить, используют ли одноклеточные эукариоты для передачи стрессовых сигналов мультидоменные SH2-, SH3-белки и процессы фосфорилирования по тирозину.

Ранее было установлено, что у протистов имеются отдельные компоненты сигнальных путей, в структуру которых входят тирозинкиназы и активируемые ими фосфопротеины. Функции этих белков интенсивно изучаются. К настоящему времени накопилось уже много данных, указывающих на вовлечение тирозинкиназ в регуляцию клеточной дифференцировки и роста эукариотических микроорганизмов (Шемарова, 2003). Неожиданно оказалось, что у отдельных представителей протистов белки, содержащие SH2- и SH3-домены, участвуют в передаче сигналов об изменении условий внешней среды (Kong, Pollard, 2002; Souldard et al., 2002; Araki et al., 2003; Sharma et al., 2003). К группе белков, обладающих некаталитическими SH-доменами Src-тирозинкиназ, относится мембранный сенсор Sho1p дрожжей (Posas, Saito, 1997; Posas et al., 1998; Siderius et al., 2000; Nelson et al., 2004), а также ряд цитоплазматических регуляторных и моторных белков миксомицетов, дрожжей и простейших (Drubin et al., 1990; Araki et al., 2003; Remmert et al., 2004). Все SH2- и SH3-доменные белки протистов связаны с передачей внеклеточных стрессовых сигналов, но одни из них (STATa, миозины I) входят в структуру путей, ответственных за реорганизацию цитоскелета и клеточную дифференцировку, а другие (Sho1p, STATc) являются компонентами сигнальных систем, обеспечивающих выживаемость клеток в условиях осмотического, температурного и окислительного стрессов.

Сигнальный путь, запускаемый активацией осмосенсорного SH3-доменного белка Sho1p, подробно изучен в клетках *S. cerevisiae*. На первый взгляд этот путь представляется функционально избыточным, так как по нему передаются те же сигналы, что и по пути, берущему начало от осморегулируемой гистидинкиназы Sln1. Однако анализ последних работ показал, что эти сигнальные пути не являются взаимозаменяемыми (Van Wuytswinkel et al., 2000). Из представленной на рис. 2 условной схемы, показывающей последовательность активации киназ, видно, что начальные этапы передачи сигнала по данному бифуркационному пути не совпадают. В одном случае они регулируются белками, входящими в структуру гистидин-аспарагиновой фосфотрансферазной системы (см. выше), в другом — киназами, образующими MAP-киназный каскад.

Участие Sho1p в протеинкиназных модульных взаимодействиях, получивших широкое распространение в клетках Metazoa, обусловлено его молекулярной организацией. Sho1p содержит 4 трансмембранных домена, выполняющих одновременно сенсорную и закоривающую функции (Raitt et al., 2000), а также SH3-домен (Maeda et

al., 1995). Последний входит в состав СООН-терминальной части молекулы и участвует в присоединении к Sho1p обогащенного пролинами участка MAPK-киназы PBS2. Взаимодействие PBS2 с SH3-доменом белка Sho1p играет центральную роль в трансмембранной передаче сигнала, так как необходимо для активации каскада MAP-киназ и трансляции сигнала в геном (Posas, Saito, 1997). Прямой нисходящей мишенью действия Sho1p служит белок Ste50, являющийся субъединицей MAPK-киназы Ste11. Киназа Ste20, с которой также взаимодействует Sho1p (на рис. 2 не показана) в данном модуле, выполняет функцию каркасного белка, ответственного у *S. cerevisiae* за сборку сигнальных белков в супрамолекулярный комплекс. Мишенью Ste11 является регуляторная MAPK-киназа PBS2. Интересно, что Ste11 фосфорилирует PBS2 по тем же остаткам серина и треонина, что и Ssk2p/22p. Это говорит о том, что PBS2 является белком, интегрирующим сигналы, поступающие от двух ветвей единого сигнального пути.

Далее путь сигнала связан с фосфорилированием MAP-киназы HOG1, имеющей высокую степень гомологии с последовательностями в киназном домене MAP-киназ из клеток высших позвоночных. Как и классические MAP-киназы, HOG1 из клеток *S. cerevisiae* имеет сайты фосфорилирования по треонину 174 и тирозину 176 в киназном субдомене VIII (Brewster et al., 1993). Активированная HOG1 транскрибируется в ядро, где вовлекается в транскрипцию более 150 генов (Posas et al., 2000; Rep et al., 2000). Основным ядерным субстратом киназы HOG1 является транскрипционный фактор Sko1p (Proft, Serrano, 1999; Voorsma et al., 2004). Sko1p известен как CRE-связывающий белок (сAMP-response element binding protein) и выполняет в клетках преимущественно функцию репрессора транскрипции (Proft, Serrano, 1999; Pascual-Ahuir et al., 2001; Rep et al., 2001). В антистрессовую программу Sko1p включается через контроль экспрессии группы генов, кодирующих осмопротекторные белки (Gaxiola et al., 1992; Banuelos et al., 1998; Proft, Serrano, 1999; Rep et al., 2001). Hot1p — другой транскрипционный фактор в клетках *S. cerevisiae*, который взаимодействует с HOG1. Hot1p контролирует экспрессию генов *GPD1* и *GPP2*. Эти гены кодируют глицерол-3-фосфатдегидрогеназы — ферменты, участвующие в синтезе глицерина (Rep et al., 1999; Thome, 2004). Особо важную роль в передаче стрессовых сигналов, поступающих в геном через MAP-киназный каскад, играют транскрипционные факторы Msn2p и Msn4p. Эти белки, активируясь при участии HOG1-киназы, присоединяются к так называемым стрессуправляемым элементам (stress response elements — STRE) промоторов многих генов и стимулируют их экспрессию (Schuller et al., 1994; Martinez-Pastor et al., 1996; Moskvina et al., 1998). В частности, было установлено, что Msn2p и Msn4p *S. cerevisiae* участвуют в экспрессии более 50 генов, активируемых осмотическим шоком (Rep et al., 2000; Hohmann, 2002).

В конце XX столетия в клетках млекопитающих был выявлен особый JAK-STAT-сигнальный путь, активируемый в условиях осмотического и окислительного стрессов. От других известных трансдукционных систем в клетках позвоночных его отличает однокаскадный характер передачи сигнала, когда активация рецептора приводит к последующей непосредственной активации транскрипционных факторов. Установлено, что он инициируется стрессактивируемыми Janus-тирозинкиназами (JAK) и так называемыми сигнальными трансдукторами

и активаторами транскрипции — белками STAT (Gatsios et al., 1998; Bode et al., 1999; Carballo et al., 1999). Важно подчеркнуть, что оба эти компонента содержат сайты фосфорилирования по тирозину, имеющие первостепенное значение в модульной системе передачи сигнала (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Horvath, 2000; Bromberg, Chen, 2001). Белки STAT помимо сайта фосфорилирования по тирозину содержат ДНК-связывающие сайты и SH2-домен, функция которого состоит в образовании комплексов с другими белками, содержащими фосфорилированный тирозин.

Из цитоплазматических компонентов этого стрессактивируемого пути, обнаруженного у высших эукариот, в клетках *D. discoideum* полностью идентифицированы только белки STAT (Araki et al., 2003). У миксомицетов к настоящему времени определены две изоформы белка STAT — Dd-STATa и Dd-STATc. Первый из них активируется в процессе многоклеточного развития организмов; второй — в условиях осмотического, температурного и окислительного стрессов и сопряжен с сигнальной системой, регулируемой циклическими нуклеотидами (Kawata et al., 1997; Araki et al., 1998, 2003).

Пока еще мало известно о том, как передается стрессовый сигнал по этому пути у микроорганизмов. Не установлены начальные этапы STAT-пути, не идентифицирована тирозинкиназа и неизвестен механизм активации Dd-STATc. Возможно, что в основе этого механизма у *D. discoideum* лежит способность Dd-STATc, так же как и STAT5 млекопитающих, связываться с JAK-тирозинкиназой (Araki et al., 2003). По-видимому, именно ассоциация Dd-STATc с тирозинкиназой приводит к активации STAT-белка и последующему его перемещению в ядро. Пока совершенно неясно, каким образом осуществляется процесс взаимодействия Dd-STATc с генами. Имеются лишь данные о том, что STAT-белок у миксомицетов вызывает транскрипцию двух генов — *gapA* и *rtoA* (Araki et al., 2003). Кодированный геном *gapA* одноименный белок представляет собой RasGAP-подобный протеин, необходимый для нормального цитокинеза (Adachi et al., 1997; Lee et al., 1997; Sakurai et al., 2001). GAPa имеет гомологию первичной структуры с белками IQGAP млекопитающих и подобно своим гомологам из клеток высших эукариот является эффектором для белков Ras и Cdc42, участвующих в регуляции актинового цитоскелета (Epp, Chant, 1997; Osman, Cerione, 1998; Kuroda et al., 2003). Белок RtoA, кодируемый геном *rtoA*, принимает участие в регуляции клеточного цикла. Оба белка играют существенную роль в реструктурировании клеток после стрессового воздействия и тем самым участвуют в системном ответе клеток на стресс.

Таким образом, на примере распространенных протистологических объектов — клеток *S. cerevisiae* и *D. discoideum* — была доказана общность механизмов модульной передачи стрессовых сигналов при участии SH2- и SH3-мультидоменных белков в клетках высших и низших эукариот.

### Роль РКС в передаче стрессовых сигналов в клетках низших эукариот

В последнее время в литературе появляется все больше данных, свидетельствующих об участии РКС в сигнальных путях, активируемых стрессом. Отмечено, что в клетках млекопитающих активность фермента повыша-

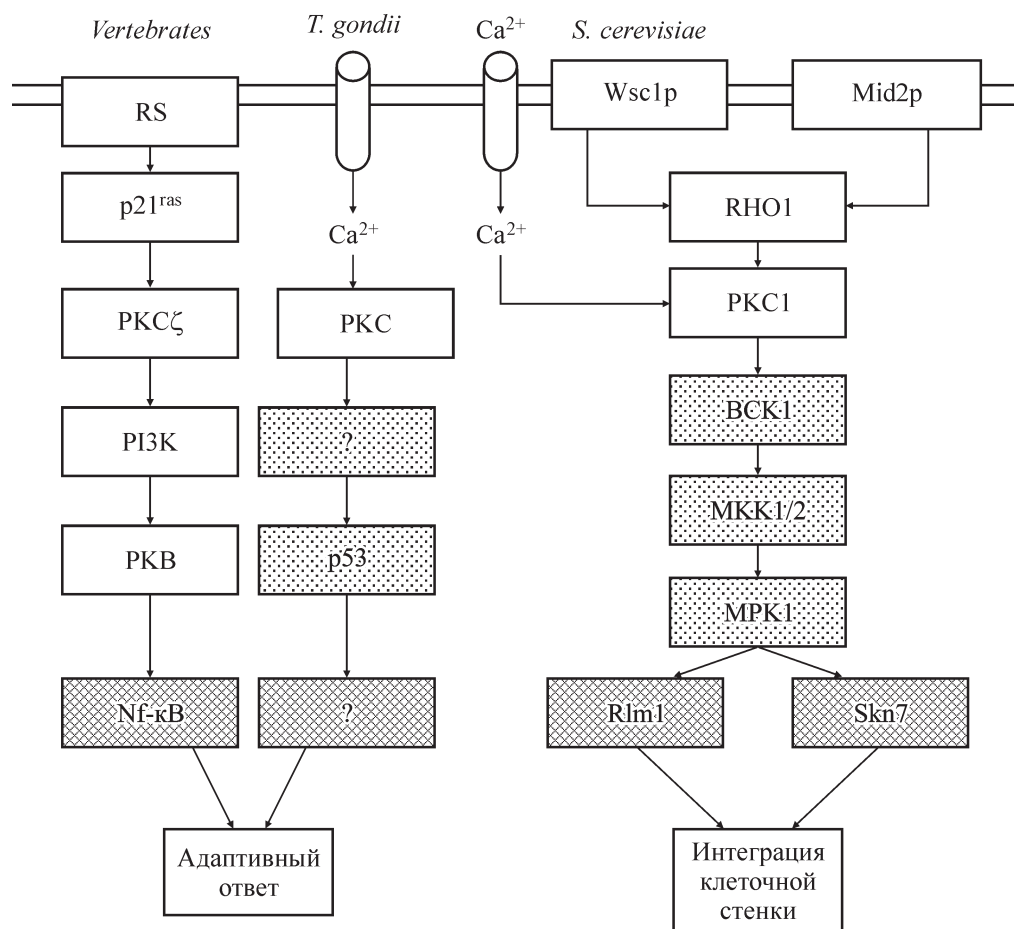


Рис. 3. Схема передачи стрессовых сигналов при участии PKC.

RS — редокс-чувствительный сенсор; Wsc1p, Mid2p — осмосенсорные белки; «?» — неидентифицированные мишени;  $Ca^{2+}$  — ионы кальция; PI3K — фосфоинозитид-3-киназа; p21<sup>ras</sup>, RHO1 — малые G-белки; PKB — протеинкиназа B; PKC $\zeta$  и PKC1 — изоформы протеинкиназы C; BCK1, MKK1/2, Skn7, p53 — киназы стрессуправляемых MAP-киназных каскадов; Nf- $\kappa$ B, Rlm1 — факторы транскрипции. Точками выделены MAP-киназы, штриховкой — факторы транскрипции. Подробности см. в тексте.

ется в ответ на действие механического (Li et al., 2003), окислительного (Abid et al., 2004; Li et al., 2004; Otani, 2004), температурного (Arnaud et al., 2004) и токсического (Stadheim, Kucera, 1998; Yuan, 2002) стресса. Экспериментальные данные, полученные на клетках Metazoa, говорят о том, что передача данных стрессовых сигналов осуществляется в результате стимуляции фосфоинозитидного пути или сопряженных с ним сигнальных каскадов (Zhuang et al., 2000; Amin et al., 2003; Abid et al., 2003, 2004; Je et al., 2004). На сегодняшний день многие стрессактивируемые сигнальные каскады, в структуру которых входит PKC, изучены еще недостаточно. Большинство из них содержит неизвестные промежуточные и конечные элементы. Расшифровку механизмов передачи сигналов по этим путям затрудняет и множественность форм PKC, каждая из которых специфична в отношении эффекторов.

Один из наиболее изученных PKC-зависимых путей передачи сигналов у позвоночных — это путь передачи сигналов, инициируемых окислительным стрессом. Мы приведем его краткое описание в качестве эталона для сравнения с аналогичными путями у одноклеточных эукариот. Этот путь основан на редоксзависимой активации G-белка p21<sup>ras</sup> и последующей активации PKC, мембранной фосфатидилинозитол-3-киназы и зависимой от фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата протеинкиназы

PKB (Janssen-Heininger et al., 2000). Конечным звеном этого пути является транскрипционный фактор Nf- $\kappa$ B (рис. 3). В регуляции Nf- $\kappa$ B при окислительном стрессе участвуют также протеинкиназы MEK1, TAK1 и MKK6, входящие в MAP-киназные каскады JNK и p38, а также Src-тирозинкиназа (на рис. 3 не показаны).

При других стрессовых воздействиях на клетку сигнал, по-видимому, распознается при участии иных молекулярных механизмов, в частности в результате ассоциации Src-тирозинкиназ с рецепторами факторов роста либо с PKC $\epsilon$  (Yoshida et al., 1998; Zhuang et al., 2000; Abid et al., 2004; Otani, 2004). При этом активируются киназы, входящие в структуру как фосфоинозитидного, так и MAP-киназного каскадов. С другой стороны, накапливается все больше данных, указывающих на возможность стрессовой стимуляции обоих протеинкиназных каскадов раздельно — через воздействие на механочувствительные мембранные рецепторы (Correa-Meyer et al., 2002; Lodyga et al., 2002; Li et al., 2003; Hofmann et al., 2004).

Таким образом, в клетках высших эукариот существуют по крайней мере три варианта проведения стрессового сигнала при участии протеинкиназ. Один из них связан с активацией MAP-киназного каскада, другой — с активацией фосфоинозитидного каскада и PKC, а третий — с активацией комплексного PKC-MAP-киназного



каскада. Очевидно, что наиболее велико значение комплексного РКС-МАР-киназного пути проведения стрессового сигнала, так как он обеспечивает не только передачу сигнала в геном, но и прямую регуляцию белков цитоскелета клетки.

Интересно, что в клетках низших эукариот (у дрожжей *S. cerevisiae*) также имеется комплексный РКС1-МАР-киназный путь передачи стрессовых сигналов. Этот сигнальный путь (в отличие от Sln1-МАР-киназного пути, описанного ранее) активируется гипоосмотическим шоком, повышенной температурой, а также некоторыми антигрибковыми препаратами (Davenport et al., 1995; Kamada et al., 1995; Heinisch et al., 1999; Reinoso-Martin et al., 2003). В данном случае функцию термомеханосенсоров наряду со специализированными ионными каналами могут выполнять белки Mid2p, Wsc1p и некоторые другие (Verna et al., 1997; Ketela et al., 1999; Lodder et al., 1999; Rabou et al., 1999), с которыми взаимодействуют факторы обмена ГДФ на ГТФ Rom1p и Rom2p и ГТФ-связывающий G-белок Rho1p (Qadota et al., 1992; Nonaka et al., 1995; Ozaki et al., 1996). Этот блок ферментов, расположенных в мембране, обеспечивает фосфорилирование и тем самым активацию нисходящих белков фосфоинозитидного сигнального каскада, ключевым ферментом которого является РКС1.

Важное значение РКС1 в передаче стрессовых сигналов была установлена при последовательном анализе мутантов *S. cerevisiae*, негативных по ряду сигнальных белков, входящих в структуру комплексного РКС1-МАР-киназного пути (Levin, Bartlett-Neubusch, 1992). Оказалось, РКС1 играет приоритетную роль в регуляции процессов синтеза и сборки белковых компонентов клеточной стенки и тем самым обеспечивает жизнеспособность клеток в условиях гипоосмотического стресса (De Nobel et al., 2000; Cabib et al., 2001; Smits et al., 2001). К настоящему времени накопилось уже много доказательств того, что у мутантов *S. cerevisiae*, негативных по РКС1, повышенная осмочувствительность обусловлена изменением состава клеточной стенки, а именно ее ослаблением (Roemer et al., 1994; Shimizu et al., 1994; Karteyn et al., 2001; Voorsma et al., 2004).

Когда клетка находится в состоянии физиологического покоя, РКС неактивна. Функционально активной РКС1 становится в результате конформационной модификации, которую приобретает в результате сопряжения с активирующими агентами, такими как ионы  $Ca^{2+}$ , DAG или РКС-связывающие белки. Определяющим фактором в механизме активации той или иной изоформы этого фермента являются особенности его доменной организации. Так, РКС1 *S. cerevisiae* по структуре и биохимическим свойствам наиболее близка к pPKC $\eta$  млекопитающих, которая активируется адаптерными РКС-связывающими белками (Nomoto et al., 1997). Точный механизм активации этого фермента у дрожжей пока неясен. С одной стороны, у РКС1 (Pkc1p) выявлены сайты связывания  $Ca^{2+}$ , что указывает на возможную роль ионов  $Ca^{2+}$  в активации фермента, как у классических изоформ РКС млекопитающих (Antonsson et al., 1994; Schmitz, Heinisch, 2003). С другой стороны, установлено, что РКС1 взаимодействует с ГТФ-связывающим белком Rho1p (Nonaka et al., 1995), что может указывать на вовлечение в активацию фермента адапторных белков, как у атипичных изоформ РКС ( $\iota$ ,  $\lambda$ ,  $\zeta$ ; Nishimura et al., 2005). Предполагается возможность прямой регуляции активности фермента через ассоциацию ГТФ-связывающего белка

Rho1p с C1-доменом РКС1 (Schmitz et al., 2002). На важную роль Rho1p в активации РКС1 указывает и его возрастающее значение для клетки в периоды функциональной активности РКС1-МАР-киназного пути. Показано, например, что Rho1p требуется для обеспечения быстрого перемещения РКС1 к местам полярного роста и деструктивно измененным элементам клеточной стенки *S. cerevisiae* (Andrews, Stark, 2000). Интересно отметить, что у многоклеточных PAR-аPKC-сигнальные комплексы, сопрягающим компонентом которых является ГТФ-связывающий белок Cdc42, также участвуют в регуляции процессов полярного роста клеток (Ohno, 2001).

Поскольку не все элементы РКС1-зависимых сигнальных путей у *S. cerevisiae* идентифицированы, пока неясно, один или несколько РКС1-МАР-киназных каскадов участвуют в передаче разнотипных стрессовых сигналов. Так, например, известные промежуточные компоненты РКС1-МАР-киназного пути, активируемого гипоосмотическим шоком и тепловым шоком, одни и те же. Ими являются киназы MAP-киназного каскада Bck1p, Mkk1p/Mkk2p и Slf2p (рис. 3; Lee, Levin, 1992; Irie et al., 1993; Lee et al., 1993; Levin et al., 1994; Kawada et al., 1995; Soler et al., 1995; Martin et al., 2000). По-видимому, сходен и способ активации этих путей через повышение текучести мембран, которое приводит к открыванию  $Ca^{2+}$ -каналов либо к активации термочувствительных сенсорных белков, расположенных в плазматической мембране (Parsell, Lindquist, 1994; Ketela et al., 1999; Lodder et al., 1999).

Выявленные на сегодняшний день различия между РКС1-МАР-киназными путями, инициируемыми температурным и гипоосмотическим стрессом, пока связаны только с механизмами активации РКС. Механизм активации РКС1 под действием гипоосмотического стресса мы уже рассмотрели. В случае стимуляции РКС1-МАР-киназного пути у *S. cerevisiae* тепловым шоком предполагается, что РКС1 (возможно, ее изоформа) активируется повышением внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Согласно предложенной модели (Kamada et al., 1995), температурный стресс у *S. cerevisiae* вызывает растяжение клеточной стенки, которое приводит к открыванию термочувствительных  $Ca^{2+}$ -каналов. В результате поступления в клетку внеклеточного  $Ca^{2+}$  повышается его цитоплазматический уровень и происходит активация РКС1 и зависимых от  $Ca^{2+}$  MAP-киназ (Kamada et al., 1995). Как уже отмечалось выше, передача сигнала в геном по этому пути реализуется при участии тех же киназ, что и при активации гипоосмотического пути. Ядерной мишенью интегральной MAP-киназы Slf2p является фактор транскрипции Rlm1p (Martin-Yken et al., 2003). Через взаимодействие с этим транскрипционным фактором Slf2p регулирует экспрессию генов, кодирующих ферменты, обеспечивающие метаболизм в клеточной стенке (Jung, Levin, 1999). Другой ядерной мишенью Slf2p служит комплексный транскрипционный фактор SBF, который требуется для экспрессии генов, участвующих в инициации ранних событий клеточного цикла (Martin-Yken et al., 2003). Участие этого транскрипционного фактора в передаче сигналов, индуцируемых тепловым шоком, объясняет причину задержки клеточного роста *S. cerevisiae* в условиях температурного стресса. Обнаружено также, что тепловой шок через стимуляцию РКС1-МАР-киназного пути индуцирует HSE- и STRE-управляемые элементы промоторов многих генов (Kamada et al., 1995). Связь РКС1-МАР-пути с генами, ответственными за синтез белков теплового шока, указывает на его важную роль в индукции термотолерантности, в основе

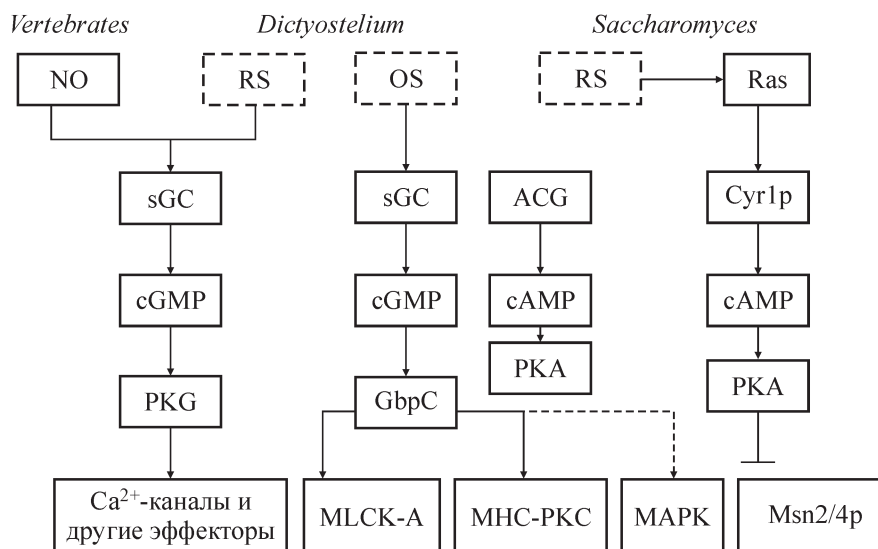


Рис. 4. Передача стрессовых сигналов при участии протеинкиназ, зависимых от циклических нуклеотидов.

NO — оксид азота; RS и OS — мембранные редокс- и осмочувствительный сенсоры соответственно; Ras — малый G-белок из семейства Ras; ACG, Cyr1p — аденилатциклазы; GbpC — сигнальный мультидоменный белок; MLCK-A — киназа легкой цепи миозина; МНС-РКС — гибридная киназа тяжелой цепи миозина; Msn2/4p — факторы транскрипции. Остальные обозначения см. в разделе «Принятые обозначения». Штриховыми линиями отмечены предполагаемые участники описываемых сигнальных путей. Подробности см. в тексте.

которой лежат механизмы восстановления структуры и свойств поврежденных мембран (Parsell, Lindquist, 1994).

Если ядерные мишени белков, участвующих в передаче стрессовых сигналов по РКС1-МАР-киназному пути, достаточно хорошо описаны, то их цитоплазматические субстраты остаются еще малоизученными. Требуется расшифровка и механизмы регуляторного действия сигнальных белков стрессактивируемого РКС1-МАР-пути на эффекторы. Так, например, полной неожиданностью оказалось выявление прямого взаимодействия малого G-белка Rho1p с глюкансинтазным комплексом (Qadota et al., 1992; Valdivia, Schekman, 2003).

В клетках другого эукариотического микроорганизма — миксомицеты *D. discoideum* — РКС входит в структуру сигнальных путей, зависимых от циклических нуклеотидов (рис. 4). По этим путям передаются разнообразные внеклеточные сигналы, в том числе и стрессовые (об изменении осмотичности среды). Биологическая роль РКС при передаче осмострессорных сигналов состоит в коактивации тяжелых цепей миозина II, что приводит к перестройке кортикального цитоскелета и уменьшению размеров клетки. В условиях стресса реорганизация кортикального цитоскелета является одной из важнейших защитных реакций клетки. К ремоделированию цитоскелета у низших грибов приводит активация нескольких сигнальных путей, в том числе и ответственного за моторную активность миозинов I и II (Goodson, Spudich, 1995; Novak, Titus, 1997; De la Roche, Cote, 2001; Remmert et al., 2004). Сигнальной молекулой, обеспечивающей передачу пускового сигнала по этому пути, является сGMP. Вторичный мессенджер взаимодействует с сGMP-активируемой киназой GbpC, субстратами которой служат две киназы — киназа легкой цепи миозина (MLCK-A) и уникальная РКС тяжелой цепи миозина (МНС-РКС). Первая фосфорилирует миозин II по серину 13, вторая — по треонину 1823.

МНС-РКС *D. discoideum* представляет собой низкомолекулярный белок с мол. массой 89 кДа, который со-

держит два Zn-связывающих участка, богатых цистеиновыми остатками, каталитические домены, имеющие структурное сходство как с диацилглицеринкиназным доменом, так и с каталитическим доменом РКС, и обогащенный остатками серина и треонина регуляторный домен. Данные филогенетического анализа, а также структурно-функциональных исследований показали, что строение МНС-РКС обеспечивает ферменту каталитические свойства как липидкиназы, так и протеинкиназы (Thanos, Bowie, 1996). На основании полученных результатов авторами было сделано предположение о том, что этот белок является продуктом слившихся генов *DGK* и *PKC*. Белка, гомологичного МНС-РКС в клетках млекопитающих, не обнаружено.

Осморегулируемый сGMP-зависимый сигнальный путь, в котором участвует МНС-РКС в клетках миксомицетов, охарактеризован еще недостаточно (Kuwayama, Van Naastert, 1998). Если начальные этапы этого пути относительно изучены (см. следующий раздел обзора), то этапы передачи стрессового сигнала на эффекторные мишени исследованы в значительно меньшей степени. Наиболее подробно изучен механизм передачи стрессового сигнала при участии МНС-РКС на тяжелую цепь миозина II. Как уже отмечалось ранее, МНС-РКС фосфорилирует треонин 1823, расположенный в хвостовой части миозина II. Фосфорилирование этого остатка треонина, а также двух других близкорасположенных треонинов (т-1833 и т-2029), фосфорилируемых киназами тяжелых цепей миозина А и В соответственно, приводит к повышению уровня фосфорилирования тяжелых цепей миозина и разборке его биполярных филаментов (Abu-Elneel et al., 1996; De la Roche, Cote, 2001; Rubin, Ravid, 2002). Функциональное значение фосфорилирования этого белка в условиях осмотического стресса состоит в поддержании оптимальной формы и подвижности клеток, что является важной составляющей в комплексном механизме осмоадаптивного поведения клеток.

PKC обнаружена и в клетках простейших (*Entamoeba histolytica*, *E. invadens*, *Tetrahymena piriformis* и *Toxoplasma gondii*). У этих микроорганизмов PKC, так же как и в других типах клеток, обеспечивает связь между сигнальной и эффекторными системами. Структура, свойства и механизмы активации фермента у простейших практически не изучены. Имеются лишь единичные работы, в которых отмечено стимулирующее влияние  $Ca^{2+}$  на активность PKC и MAP-киназы из клеток простейших (De Meester et al., 1990; Hegyesi, Csaba, 1994; Roisin et al., 2003; рис. 3). «Черным ящиком» остается и путь передачи сигнала в геном. Только в последнее время на примере *Entamoeba histolytica* стало известно, что у простейших PKC реализует свое действие через передачу сигналов на транскрипционные факторы, ответственные за индукцию генов, кодирующих актины (Onyia et al., 1994; Meza, 2000; Ortiz et al., 2000). Актины входят в состав кортикального цитоскелета и наряду с другими структурными белками обеспечивают изменение размера и формы клетки.

Таким образом, PKC в клетках низших эукариот принимает участие в регуляции адаптивных процессов, связанных с клеточным ответом на стресс. Эти процессы могут быть как быстрыми и не зависящими от экспрессии генов адаптивного ответа, так и медленными, являясь частью запрограммированного ответа клетки на стресс.

### Роль протеинкиназ, зависимых от циклических нуклеотидов, в передаче стрессовых сигналов

Известно, что в клетках одноклеточных микроорганизмов, так же как и в клетках высших эукариот, циклические нуклеотиды (сАМР и сGMP) выступают в качестве вторичных мессенджеров и активируют сигнальные системы, контролирующие дифференцировку и хемотаксисное поведение клеток. В последнее время в литературе появились данные о том, что в клетках протистов имеются стрессактивируемые сигнальные пути, регулируемые при участии циклонуклеотидзависимых протеинкиназ.

В середине 1990-х годов было установлено, что изменение формы клеток *D. discoideum* в условиях осмотического стресса коррелирует с повышением уровня сGMP в цитоплазме клеток (Ouyama, 1996; Kuwayama, Van Haastert, 1998). Это наблюдение навело исследователей на мысль о том, что осмотический стресс является внеклеточным стимулом, активирующим сигнальный путь, управляемый сGMP. Действительно, в скором времени появились доказательства вовлечения в трансмембранную передачу стрессового сигнала GC (изоформы, локализованной в цитоплазме) и сигнальных белков, регулируемых этим циклонуклеотидным мессенджером (Abu-Elneel et al., 1996; Kuwayama et al., 1998). Выяснилось, что в передачу сигнала по сGMP-зависимому пути в клетках *D. dictyostelium* включены 4 сигнальных мультидоменных белка (GbpA—GbpD), один из которых (GbpC) имеет структурное сходство с PKC млекопитающих (Goldberg et al., 2002). Примечательно, что механизмы передачи сигнала при участии зависимых от сGMP протеинкиназ у протистов и у Metazoa в корне различны. Различия начинаются уже с начальных этапов проведения сигнала. У млекопитающих стрессактивируемый сGMP-зависимый сигнальный путь стимулируется окисью азота (Torreilles, 2001). При этом специфическим

рецептором NO является цитозольная GC, и это не случайно. В состав циклазы входит гемовая простетическая группа, имеющая высокое сродство к NO [ $K_s < 250$  нМ] (Stone, Marletta, 1996). В присутствии этой сигнальной молекулы синтез сGMP гуанилатциклазой возрастает примерно в 400 раз. Молекулярной мишенью действия сGMP у позвоночных является киназа PKG, функция которой состоит в фосфорилировании и активации белков-эффекторов. Основная мишень PKG — ионные каналы (D'Ascenzo et al., 2002; Gragasin et al., 2004; Grassi et al., 2004). Именно этим объясняется быстрый ответ клетки на влияние NO.

В клетках низших эукариот (на примере *D. dictyostelium*) сGMP-GbpC-путь активирует не сигнальная молекула, а пусковой осмострессорный сигнал. Сенсор этого пути у миксомицетов пока не идентифицирован. Его мишенью, как и в рассмотренном сGMP-зависимом пути у млекопитающих, служит sGC, имеющая структурное сходство не со своим аналогом из клеток позвоночных, а с растворимой AC млекопитающих (Roelofs, Van Haastert, 2002). Активация фермента приводит к синтезу и аккумуляции сGMP (Kuwayama et al., 1996; Ouyama, 1996), который требуется в первую очередь для фосфорилирования миозина II (Kuwayama et al., 1996). Считается, что повышение внутриклеточной концентрации сGMP первоначально инициирует активацию киназы GbpC, субстратами которой служат киназы легкой и тяжелой цепей миозина. Таким образом, биологическая роль GbpC у миксомицетов состоит в фосфорилировании киназ MLCK-A и МНС-PKC. Их активация приводит к изменению моторной активности миозина II и в результате — к изменению формы клеток (подробнее см. в предыдущем разделе обзора).

Киназа GbpC (2631 аминокислотных остатка) представляет собой крупный мультидоменный белок. Первые три домена, а именно LRRs-домен, содержащий повторы, обогащенные лейцинами, Ras- и MEK-киназный домены, уникальны для GbpC, в то время как RasGEF- и сGMP-связывающие домены, расположенные в С-терминальной части молекулы GbpC, мало отличаются от гомологичных доменов в близкородственном белке GbpD (Bosgraaf et al., 2002; Goldberg et al., 2002).

Домен, содержащий повторы, обогащенные лейцинами, обнаружен во многих сигнальных белках эукариотических организмов и служит для образования белок-белковых комплексов (Kobe, Deisenhofer, 1994; Andrade et al., 2001). Ras-домен GbpC по структуре сходен с таковым всех белков Ras, но в наибольшей степени — с продуктом гена CG5483 дрозофилы. В этом домене GbpC находится консервативная последовательность аминокислот, ответственная за базальную ГТФазную активность Ras, из чего можно предположить, что этот домен выполняет функцию ГТФазы.

Киназный домен GbpC высококонсервативен. Наибольшая гомология первичной структуры (31—34 % идентичности) обнаружена между этим доменом и аналогичным доменом киназы CTR1 *Arabidopsis*, несколько меньшая — между ним и киназным доменом киназы 1, активируемой  $\beta$ -трансформирующим фактором роста млекопитающих, а также киназным доменом, имеющимся во всех сигналуемых киназах MEKK млекопитающих. Сравнительный анализ первичной структуры киназных доменов MAP-киназы и соответствующего домена белка GbpC показал, что последний представляет собой гибрид между тирозин- и серин(треонин)киназами, хотя в функциональном отношении GbpC миксоми-

цетов ближе к серин(треонин)киназам MEKK (Goldberg et al., 2002).

DEP-домен расположен непосредственно перед Ras-GEF-доменом и из сGMP-связывающих белков *D. dictyostelium* имеется только в белке GbpC. Этот домен ранее был выявлен в трех белках Metazoa: *disheveled*, *Egl-10* и *pleckstrin*, по первым буквам которых и получил свое название (Ponting, Bork, 1996). Высказывается предположение о том, что с помощью DEP-домена GbpC закрепляется на плазматической мембране, но последовательности аминокислот, которые обеспечивают эту функцию, пока не определены (Goldberg et al., 2002). Кроме того, DEP-домены GbpC опосредуют белок-белковые взаимодействия и тем самым участвуют в дальнейшей передаче стрессового сигнала (Wong et al., 2000).

Мультидоменные белки GbpA -В и -D также являются мишенями сGMP. Первые два белка являются сGMP-стимулируемыми фосфодиэстеразами и обеспечивают гидролиз сGMP, а белок GbpD наряду с GbpC выполняет функцию коактиватора МНС-РКС (Goldberg et al., 2002).

Таким образом, все 4 белка GbpA—GbpD участвуют в передаче сигналов по сGMP-зависимому сигнальному пути. GbpA и GbpB модулируют входящий сигнал через гидролиз сGMP, а GbpC и GbpD отвечают за дальнейшую передачу сигналов на нисходящие мишени, в том числе и на МНС-РКС. Следует напомнить, что в структуре вышеназванных мультидоменных белков миксомицетов входят домены специфических сигнальных белков млекопитающих, участвующих в передаче сигнала по Ras-пути. Именно эти белки (GEF, Ras и MEKK) образуют сигнальный модуль для передачи сигналов на интегральную MAP-киназу, активность которой зависит от внеклеточных сигналов, в том числе и от стрессовых. По-видимому, наличие этих доменов в белках GbpC и GbpD *D. dictyostelium* позволяет передавать сигнал в геном для запуска программированного адаптивного ответа клетки на стресс.

Механизм быстрого ответа клетки на осмотический стресс (через регуляцию активности миозина II с помощью МНС-РКС), опосредованный белками GbpC и GbpD, рассмотрен нами ранее. Важно подчеркнуть, что результатом повышения степени фосфорилирования миозина II являются разборка составляющих его филаментов и понижение актомиозинового взаимодействия. Именно эти структурные изменения в кортикальном цитоскелете клетки играют ключевую роль в процессе клеточной адаптации и существенны для выживания миксомицетов в условиях гиперосмотического стресса (Kuwayama et al., 1996).

Менее ясной представляется передача стрессового сигнала у протистов по сАМР-зависимому пути. К настоящему времени появились первые указания на то, что сАМР и ряд компонентов классического сАМР-РКА-сигнального пути, например у низших грибов (*S. cerevisiae* и *D. dictyostelium*), участвуют в передаче сигналов, инициируемых осмотическим, окислительным, пищевым и температурным стрессом (Hasan et al., 2002; Taminato et al., 2002). Отдельные участники этих путей выявлены и в клетках простейших (Kirkman et al., 2001; Franco et al., 2002).

Рецепторные механизмы активации стрессактивируемых путей, зависящих от сАМР, в клетках протистов изучены недостаточно. Один из механизмов рассмотрен в разделе обзора, посвященном рецепторным гистидин-

киназам (рис. 2). Логично допустить, что начальным звеном путей, берущих начало от плазматической мембраны, у микроорганизмов являются либо пищевые сенсоры, реагирующие на понижение внеклеточной концентрации глюкозы и других питательных веществ, либо сенсоры, воспринимающие изменение физико-химических свойств окружающей среды. Однако, несмотря на исключительный интерес к этой проблеме, к настоящему моменту у одноклеточных эукариот (на примере *D. dictyostelium*) обнаружен и описан лишь один мембранный сенсор, непосредственно связанный с передачей сигнала по сАМР-РКА-сигнальному пути. Он участвует в трансдукции стрессовых сигналов, приводящих к развитию спор. Речь идет о мембраноассоциированной аденилатциклазе АСГ, которая экспрессируется в клетках *D. discoideum* в ответ на гиперосмотический стресс (Van Es et al., 1996). Предполагается, что начальным звеном этого пути у эукариотических микроорганизмов могут быть и механочувствительные ионные каналы, активируемые растяжением плазматической мембраны (Gustin et al., 1988; Vieira et al., 1997).

В клетках протистов описано несколько каскадных, разветвляющихся путей передачи стрессового сигнала при участии компонентов классического сАМР-РКА-пути. Один из них, выявленный у *D. discoideum*, связан с передачей осмострессорного сигнала в геном через активацию АС-сигнального механизма, РКА и генов адаптивного ответа, регулируемых каталитической субъединицей РКА (АСГ → сАМР → РКА; рис. 4). Еще один путь, обнаруженный у этого же микроорганизма, активируется в ответ на понижение концентрации питательных веществ в среде, окислительный и осмотический стресс (на рис. 4 не показан). В данном случае стимуляция гипотетического рецептора, а возможно, и рецептора сАМР (Van Es et al., 2001) приводит к повышению активности киназы YakA, которая является негативным регулятором активности белка PufA, синтезируемого в процессе вегетативного роста миксомицетов (Taminato et al., 2002). В результате передачи сигнала в геном по этому пути происходит понижение экспрессии гена *pufA* и, напротив, индукция гена *pkaC*, что в итоге также приводит к активации РКА и инициации внутриклеточных событий, зависящих от активности этого фермента. РКА играет ключевую роль в передаче сигналов по классическому сАМР-РКА-пути. Ее важное значение в сигнальных процессах обусловлено влиянием на широкий спектр генов, ответственных за синтез белков, которые обеспечивают механизмы структурной и биохимической адаптации. Активность РКА миксомицетов находится под контролем регуляторной киназы YakA (Souza et al., 1998; Van Es et al., 2001). При использовании направленного мутагеза было установлено, что в штаммах *D. discoideum* с повышенной экспрессией YakA наблюдается задержка клеточного роста, в то время как в клетках, негативных по YakA, напротив, отмечается прогрессия в прохождении клеточного цикла. Такие клетки не вступают в фазу многоклеточного спорного развития (Souza et al., 1998). YakA принадлежит к семейству киназ, которое включает в себя Yak1 дрожжей, Dyrk/MNB-родственные киназы и несколько киназ, выделенных из клеток *Arabidopsis*, *Caenorhabditis elegans*, дрозофилы и человека (Garrett, Broach, 1989; Garrett et al., 1991; Souza et al., 1998; Guimera et al., 1999; Mao et al., 2002; Branchi et al., 2004). Установлена роль этих киназ в регуляции клеточного цикла.

В клетках дрожжей *S. cerevisiae* (протистологического объекта, геном которого полностью охарактеризован) под контролем РКА находится экспрессия четвертой части всех белков (Boy-Marcotte et al., 1996; Norbeck, Blomberg, 2000). Исследование молекулярной структуры сигнальных белков, в том числе РКА, является наиболее изученным аспектом проблемы внутриклеточной сигнализации. Структурно-функциональный анализ РКА *S. cerevisiae* показал, что этот фермент подобно своему аналогу из клеток высших эукариот состоит из каталитической и регуляторной субъединиц, причем каталитическая субъединица белка способна к ядерной транслокации (Toda et al., 1987, 1988). С помощью направленного мутагенеза установлено участие РКА дрожжей в регуляции клеточного роста, метаболизма и адаптации (Thevelein, 1991; Thevelein, de Winde, 1999). Высокая активность фермента как в быстро растущих клетках, так и в мутантах, негативных по гену *BCY1*, кодирующему регуляторную, сАМР-связывающую субъединицу РКА, ассоциируется с общей чувствительностью к стрессу, в то время как низкая активность РКА в медленно растущих или покоящихся клетках, а также в мутантах, негативных по гену *TPK*, кодирующему каталитическую субъединицу РКА, по-видимому, напротив, связана с общей устойчивостью к стрессу (Thevelein, 1994; Thevelein et al., 2000; Hohmann, 2002). Пути, обеспечивающие передачу стрессовых сигналов и толерантность к стрессу в клетках дрожжей, изучены еще недостаточно. Известно, что по крайней мере один из стрессактивируемых сигнальных механизмов, в котором участвует РКА, регулируется транскрипционными факторами *Msn2p* и *Msn4p* (Martinez-Pastor et al., 1996; Estruch, 2000; Garreau et al., 2000; Hasan et al., 2002). Эти два  $Zn^{2+}$ -содержащих белка, как уже отмечалось выше, имеют 32 % идентичности в первичной структуре и, вероятно, связанную с этим структурным сходством некоторую функциональную гомологию (Estruch, 2000; Hohmann, 2002). Функция РКА в этом сигнальном пути, по-видимому, состоит в фосфорилировании данных транскрипционных факторов, что служит сигналом к их перемещению из цитоплазмы в ядро. В ядре *Msn2p* и *Msn4p* активируют экспрессию так называемых стрессрегулируемых генов (STRE-controlled genes; Gorner et al., 1998; Estruch, 2000). Промоторы этих генов содержат несколько STRE-элементов, которые имеют канонические последовательности CCCCT или AGGGG (Kobayashi, McEntee, 1993; Marchler et al., 1993; Schuller et al., 1994; Martinez-Pastor et al., 1996; Schmitt, McEntee, 1996). Предполагается, что сигнальный путь, компонентами которого являются РКА, транскрипционные факторы *Msn2p/Msn4p* и STRE-элементы, активируется различными факторами стресса, включая голодание, тепловой шок, окислительный, кислотный и осмотический стрессы (т. е. условиями, которые приводят к понижению активности РКА).

STRE-регулируемые гены кодируют белки, которые вовлекаются в общий адаптивный ответ клетки и включают в себя белки теплового шока, каталазу, трегалозу и другие белки (Moskvina et al., 1998; Hasan et al., 2002). Как указывалось выше, экспрессия этих генов связана с понижением активности РКА и активацией транскрипционных факторов *Msn2p/Msn4p* (Rep et al., 2000). При повышении активности РКА индуцибельность этих генов понижается, что, по всей вероятности, связано с уменьшением скорости перемещения вышеназванных транскрипционных факторов в ядро (Norbeck, Blomberg,

2000). Однако, как показали исследования последних лет, транслокация *Msn2p/Msn4p* в ядро не является единственным условием для нормальной индукции STRE-контролируемых генов при стрессе. Оказывается, что для стимуляции генной экспрессии требуется дополнительная активация MAP-киназного каскада (Schuller et al., 1994; Rep et al., 2000). Механизмы сопряжения этих сигнальных путей еще предстоит выяснить.

При использовании направленного мутагенеза было установлено, что РКА отвечает за понижение чувствительности клеток к действию стрессовых факторов. Важной функцией РКА, обеспечивающей выживаемость клеток дрожжей при стрессе, является ее ингибирующее влияние на клеточный цикл (Thevelein, de Winde, 1999).

Таким образом, передача стрессовых сигналов по сАМР-РКА-сигнальному пути в клетках низших эукариот тесно связана с механизмами регуляции клеточного цикла. Толерантность к стрессу коррелирует с низкой пролиферативной активностью клеток, которую модулирует определенный уровень РКА. Резкое повышение активности РКА служит сигналом к росту клеток, но в то же время приводит к понижению общей резистентности клеток в условиях стресса.

Приведенные примеры указывают на то, что значение стрессактивируемого сАМР-РКА-сигнального пути у низших эукариот состоит в индукции генетической программы адаптивного ответа через активацию соответствующих транскрипционных факторов и экспрессию подчиненных им генов. В заключение этого раздела следует подчеркнуть разницу в механизмах сигнальной передачи по сGMP- и сАМР-зависимому пути. В первом случае клетка реагирует на стрессовые сигналы преимущественно в результате прямой активации эффекторных белков, во втором — через индукцию генов адаптивного ответа.

## Заключение

В последние годы отмечается повышенный интерес к проблемам передачи стрессовых сигналов в клетку. Это связано с обнаружением специализированных сигнальных путей, в структуру которых входят стрессактивируемые протеинкиназы. В клетках позвоночных животных и человека интегрирующую роль в передаче внешних стрессовых сигналов в геном выполняют SAPK/JNK- и p38-киназы. Они активируются с помощью широкого спектра стимулов (УФ-облучения, осмотического стресса, сфингомиелиназы, TNF- $\alpha$  и др.), которые приводят к фосфорилированию и активации транскрипционных факторов и экспрессии генов, кодирующих белки адаптивного ответа.

К настоящему времени уже достигнут существенный прогресс в понимании структурных и молекулярных основ функционирования стрессактивируемых протеинкиназ каскадов в клетках млекопитающих. Достаточно полно исследованы механизмы регуляции активности этих путей. Выявлены домены рецепторов и сигнальных белков, ответственные за этот процесс. Также установлены протеинкиназы, участвующие в передаче сигналов на эффекторные цитоплазматические и ядерные мишени. Однако многие аспекты проблемы передачи стрессовых сигналов остаются неясными. Так, практически не изучен механизм распознавания стрессовых сигналов, инициируемых изменением химического состава и физиче-

ских свойств тканевой среды, в которой функционируют клетки многоклеточного организма. Прояснить этот вопрос может помочь анализ способов первичной рецепции сигнала в клетках свободноживущих и паразитических одноклеточных микроорганизмов. Именно у этих эукариотических организмов изменения параметров окружающей среды воспринимаются в качестве физиологических активаторов специализированных стрессактивируемых сигнальных путей. Анализ имеющейся литературы обнаружил высокую консервативность в организации внутриклеточных стрессактивируемых сигнальных систем, что открывает широкое поле деятельности для подобных исследований.

В структуре сигнальных белков ряда протистов выявлены SH2- и SH3-домены с-Src-тирозинкиназ, серин-треониновые протеинкиназы, гомологичные РКА и РКС млекопитающих, а также стрессактивируемые MAP-киназы, участвующие в приеме стрессового сигнала и передаче его в геном. Эти важные находки позволяют рассматривать стрессактивируемые сигнальные системы протистов в качестве прототипов аналогичных систем, функционирующих в клетках современных видов высших эукариот. Возможно, наиболее простые и быстрые механизмы передачи стрессовых сигналов, когда не требуется запуска большого числа каскадных реакций, сохранились в клетках высших эукариот в неизменном виде. В таком случае протисты могут служить удобными экспериментальными объектами для изучения сигнальных процессов, общих для всех типов эукариотических клеток.

### Список литературы

- Шемарова И. В. 2003. Роль фосфорилирования по тирозину в регуляции пролиферации и клеточной дифференцировки у низших эукариот. Цитология. 45 (2) : 196—215.
- Abid M. R., Guo S., Minami T., Spokes K. C., Ueki K., Skurk C., Walsh K., Aird W. C. 2004. Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 : 294—300.
- Abid M. R., Schoots I. G., Spokes K. C., Wu S. Q., Mawhinney C., Aird W. C. 2004. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox-dependent regulation of forkhead and I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 279 : 44 030—44 038.
- Abu-Elneel K., Karchi M., Ravid S. 1996. *Dictyostelium* myosin II is regulated during chemotaxis by a novel protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271 : 977—984.
- Adachi H., Takahashi Y., Hasebe T., Shirouzu M., Yokoyama S., Sutoh K. 1997. *Dictyostelium* IQGAP-related protein specifically involved in the completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 137 : 891—998.
- Alex L. A., Borkovich K. A., Simon M. I. 1996. Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 3416—3421.
- Amin A. R., Ichigotani Y., Oo M. L., Biswas M. H., Yuan H., Huang P., Mon N. N., Hamaguchi M. 2003. The PLC-PKC cascade is required for IL-1 beta-dependent Erk and Akt activation: their role in proliferation. *Int. J. Oncol.* 23 : 1727—1731.
- Andrade M. A., Perez-Iratxeta C., Ponting C. P. 2001. Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* 134 : 117—131.
- Andrews P. D., Stark M. J. 2000. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* 113 : 2685—2693.
- Antonsson B., Montessuit S., Friedli L., Payton M. A., Paravicini G. 1994. Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J. Biol. Chem.* 269 : 16 821—16 828.
- Araki T., Gamper M., Early A., Fukuzawa M., Abe T., Kawata T., Kim E., Firtel R. A., Williams J. G. 1998. Developmentally and spatially regulated activation of a *Dictyostelium* STAT protein by a serpentine receptor. *EMBO J.* 17 : 4018—4028.
- Araki T., Tsujioka M., Abe T., Fukuzawa M., Meima M., Schap P., Morio T., Urushihara H., Katoh M., Maeda M., Tanaka Y., Takeuchi I., Williams J. G. 2003. A STAT-regulated, stress-induced signalling pathway in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 116 : 2907—2915.
- Arnaud C., Joyeux-Faure M., Bottari S., Godin-Ribuot D., Ribuot C. 2004. New insight into the signalling pathways of heat stress-induced myocardial preconditioning: protein kinase C epsilon translocation and heat shock protein 27 phosphorylation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31 : 129—133.
- Aubry L., Firtel R. 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 15 : 469—517.
- Banuelos M. A., Sychrova H., Bleykasten-Grosshans C., Souciet J. L., Potier S. 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology.* 144 : 2749—2758.
- Bilwes A. M., Alex L. A., Crane B. R., Simon M. I. 1999. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell.* 96 : 131—141.
- Bode J. G., Schweigart J., Kehrman J., Ehling C., Schaper F., Heinrich P. C., Haussinger D. 2003. TNF-alpha induces tyrosine phosphorylation and recruitment of the Src homology protein-tyrosine phosphatase 2 to the gp130 signal-transducing subunit of the IL-6 receptor complex. *J. Immunol.* 171 : 257—266.
- Boorsma A., de Nobel H., ter Riet B., Bargmann B., Brul S., Hellingwerf K. J., Klis F. M. 2004. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 21 : 413—427.
- Bosgraaf L., Russcher H., Smith J. L., Wessels D., Soll D. R., Van Haastert P. J. 2002. A novel cGMP signalling pathway mediating myosin phosphorylation and chemotaxis in *Dictyostelium*. *EMBO J.* 21 : 4560—4570.
- Bouquin N., Johnson A. L., Morgan B. A., Johnston L. H. 1999. Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 3389—3400.
- Boy-Marcotte E., Tadi D., Perrot M., Boucherie H., Jacquet M. 1996. High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 142 : 459—467.
- Branchi I., Bichler Z., Minghetti L., Delabar J. M., Malchioldi-Albedi F., Gonzalez M. C., Chettouh Z., Nicolini A., Chabert C., Smith D. J., Rubin E. M., Migliore-Samour D., Alleva E. 2004. Transgenic mouse *in vivo* library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 : 429—440.
- Brewster J. L., de Valoir T., Dwyer N. D., Winter E., Gustin M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* 259 : 1760—1763.
- Bromberg J., Chen X. 2001. STAT proteins: signal transducers and activation of transcription. *Methods Enzymol.* 333 : 138—151.
- Buck V., Quinn J., Soto Pino T., Martin H., Saldanha J., Maki-no K., Morgan B. A., Millar J. B. 2001. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 407—419.
- Cabib E., Roh D. H., Schmidt M., Crotti L. B., Varma A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 276 : 19 679—19 682.
- Calera J. A., Calderone R. 1999. Histidine kinase, two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis. *Mycoses.* 42 : 49—53.
- Carballo M., Conde M., El Bekay R., Martin-Nieto J., Camacho M. J., Monteseirin J., Conde J., Bedoya F. J., Sobrino F. 1999. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274 : 17 580—17 586.

- Chang W. T., Thomason P. A., Gross J. D., Neweil P. C. 1998. Evidence that the RdeA protein is a component of a multistep phosphorelay modulating rate of development in *Dictyostelium*. *EMBO J.* 17 : 2809—2816.
- Chatterjee-Kishore M., Van den Akker F., Stark G. R. 2000. Association of STATs with relatives and friends. *Trends Cell Biol.* 10 : 106—111.
- Corre S., Primot A., Sviderskaya E., Bennett D. C., Vaulont S., Goding C. R., Galibert M. D. 2004. UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p38 activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J. Biol. Chem.* 279 : 51 226—51 233.
- Correa-Meyer E., Pesce L., Guerrero C., Sznajder J. I. 2002. Cyclic stretch activates ERK1/2 via G protein and EGFR in alveolar epithelial cells. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282 : L883—L891.
- D'Ascenzo M., Martinotti G., Azzena G. B., Grassi C. 2002. cGMP/protein kinase G-dependent inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels induced by nitric oxide in human neuroblastoma IMR32 cells. *J. Neurosci.* 22 : 7485—7492.
- Davenport K. R., Sohaskey M., Kamada Y., Levin D. E., Gustin M. C. 1995. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 270 : 30 157—30 161.
- Davis R. J. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 19 : 470—473.
- De la Roche M. A., Cote G. P. 2001. Regulation of *Dictyostelium* myosin I and II. *Biochim. biophys. acta.* 1525 : 245—261.
- De Meester F., Mirelman D., Stolarsky T., Lester D. S. 1990. Identification of protein kinase C and its potential substrate in *Entamoeba histolytica*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 97 : 707—711.
- De Nobel H., Ruiz C., Martin H., Morris W., Brul S., Molina M., Klis F. M. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 146 : 2121—2132.
- Derijard B., Hibi M., Wu I. H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R. J. 1994. Jnk 1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the *c-Jun* activation domain. *Cell.* 76 : 1025—1037.
- Drubin D. G., Mulholland J., Zhu Z. M., Botstein D. 1990. Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature.* 343 : 288—290.
- Epp J. A., Chant J. 1997. An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. *Curr. Biol.* 7 : 921—929.
- Estruch F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 : 469—486.
- Franco E., Manning-Cela R., Meza I. 2002. Signal transduction in *Entamoeba histolytica* induced by interaction with fibronectin: presence and activation of phosphokinase A and its possible relation to invasiveness. *Arch. Med. Res.* 33 : 389—397.
- Gamper M., Kim E., Howard P. K., Ma H., Hunter T. 1999. Regulation of *Dictyostelium* protein-tyrosine phosphatase-3 (PTP3) through osmotic shock and stress stimulation and identification of pp130 as a PTP3 substrate. *J. Biol. Chem.* 274 : 12 129—12 138.
- Garreau H., Hasan R. N., Renault G., Estruch F., Boy-Marcotte E., Jacquet M. 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 146 : 2113—2120.
- Garrett S., Broach J. 1989. Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Develop.* 3 : 1336—1348.
- Garrett S., Menold M. M., Broach J. R. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 4045—4052.
- Gatsios P., Terstegen L., Schliess F., Haussinger D., Kerr I. M., Heinrich P. C., Graeve L. 1998. Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock. *J. Biol. Chem.* 273 : 22 962—22 968.
- Gaxiola R., de Larrinoa I. F., Villalba J. M., Serrano R. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11 : 3157—3164.
- Goldberg J. M., Bosgraaf L., Van Haastert P. J., Smith J. L. 2002. Identification of four candidate cGMP targets in *Dictyostelium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 6749—6754.
- Goodson H. V., Spudich J. A. 1995. Identification and molecular characterization of a yeast myosin I. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 30 : 73—84.
- Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor M. T., Esterlich F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H., Schuller C. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Develop.* 12 : 586—597.
- Gragasin F. S., Michelakis E. D., Hogan A., Moudgil R., Hashimoto K., Wu X., Bonnet S., Haromy A., Archer S. 2004. The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels. *FASEB J.* 18 : 1382—1391.
- Grassi C., D'Ascenzo M., Azzena G. B. 2004. Modulation of Ca(v)1 and Ca(v)2.2 channels induced by nitric oxide via cGMP-dependent protein kinase. *Neurochem. Int.* 45 : 885—893.
- Guimera J., Casas C., Estivill X., Pritchard M. 1999. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics.* 57 : 407—418.
- Gustin M. C., Zhou X. L., Martinac B., Kung C. 1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science.* 242 : 762—765.
- Hasan R., Leroy C., Isnard A. D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M. B. 2002. The control of the yeast H202 response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol. Microbiol.* 45 : 233—241.
- Hegyesi H., Csaba G. 1994. A calcium-dependent protein kinase is present in *Tetrahymena*. *Cell Biochem. Funct.* 12 : 221—226.
- Heinisch J. J., Lorberg A., Schmitz H. P., Jacoby J. J. 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32 : 671—680.
- Hoch J. A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3 : 165—170.
- Hofmann M., Zaper J., Bernd A., Bereiter-Hahn J., Kaufmann R., Kippenberger S. 2004. Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 : 673—679.
- Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 : 300—372.
- Horvath C. M. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends. Biochem. Sci.* 25 : 496—502.
- Irie K., Takase M., Lee K. S., Levin D. E., Araki H., Matsumoto K., Oshima Y. 1993. MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 3076—3083.
- Janiak-Spens F., West A. H. 2004. Histidine kinases. In: *Handbook of cell signaling.* 1 : 563—566.
- Janssen-Heininger Y. M., Poynter M. E., Baeuerle P. A. 2000. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* 28 : 1317—1327.
- Je J. H., Lee J. Y., Jung K. J., Sung B., Go E. K., Yu B. P., Chung H. Y. 2004. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett.* 566 : 183—189.
- Jung U. S., Levin D. E. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 34 : 1049—1057.

- Kamada Y., Jung U. S., Piotrowski J., Levin D. E. 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Develop.* 9 : 1559—1571.
- Kapteyn J. C., ter Riet B., Vink E., Blad S., De Nobel H., Van Den Ende H., Klis F. M. 2001. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* 39 : 469—479.
- Katoh M., Shaw C., Xu Q., Van Driessche N., Morio T., Kuwayama H., Obara S., Urushihara H., Tanaka Y., Shaulsky G. 2004. An orderly retreat: dedifferentiation is a regulated process. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 7005—7010.
- Kawata T., Shevchenko A., Fukuzawa M., Jermyn K. A., Totty N. F., Zhukovskaya N. V., Sterling A. E., Mann M., Williams J. G. 1997. SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Cell.* 89 : 909—916.
- Ketela T., Green R., Bussey H. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* 18 : 3330—3340.
- Kirkman L. A., Weiss L. M., Kim K. 2001. Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infect. Immun.* 69 : 148—153.
- Kobayashi N., McEntee K. 1993. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 248—256.
- Kobe B., Deisenhofer J. 1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 : 409—416.
- Kong H. H., Pollard T. D. 2002. Intracellular localization and dynamics of myosin-II and myosin-IC in live *Acanthamoeba* by transient transfection of EGFP fusion proteins. *J. Cell Sci.* 115 : 4993—5002.
- Koretke K. K., Lupas A. N., Warren P. V., Rosenberg M., Brown J. R. 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* 17 : 1956—1970.
- Kuroda T. S., Ariga H., Fukuda M. 2003. The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 5245—5255.
- Kuwayama H., Van Haastert P. J. 1998. Chemotactic and osmotic signals share a cGMP transduction pathway in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 424 : 248—252.
- Kyriakis J. M., Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81 : 807—869.
- Kyriakis J. M., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E. A., Ahmad M. F., Avruch J., Woodgett J. R. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 369 : 156—160.
- Lazou A., Sugden P. H., Clerk A. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem. J.* 332 : 459—465.
- Lee K. S., Irie K., Gotoh Y., Watanabe Y., Araki H., Nishida E., Matsumoto K., Levin D. E. 1993. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 3067—3075.
- Lee K. S., Levin D. E. 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 172—182.
- Lee S., Escalante R., Firtel R. A. 1997. A Ras GAP is essential for cytokinesis and spatial patterning in *Dictyostelium*. *Development.* 124 : 983—996.
- Levin D. E., Bartlett-Heubusch E. 1992. Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116 : 1221—1229.
- Levin D. E., Bowers B., Chen C. Y., Kamada Y., Watanabe M. 1994. Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40 : 229—239.
- Li B., Wang X., Rasheed N., Hu Y., Boast S., Ishii T., Nakayama K., Nakayama K. I., Goff S. P. 2004. Distinct roles of c-ABI and Atm in oxidative stress response are mediated by protein kinase C delta. *Genes Develop.* 18 : 1824—1837.
- Li C., Wernig F., Leitges M., Hu Y., Xu Q. 2003. Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration. *FASEB J.* 17 : 2106—2108.
- Li S., Ault A., Malone C. L., Raitt D., Dean S., Johnston L. H., Deschenes R. J., Fassler J. S. 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17 : 6952—6962.
- Li S., Dean S., Li Z., Horecka J., Deschenes R. J., Fassler J. S. 2002. The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 412—424.
- Lodder A. L., Lee T. K., Ballester R. 1999. Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 152 : 1487—1499.
- Lodyga M., Bai X. H., Mourgeon E., Han B., Keshavjee S., Liu M. 2002. Molecular cloning of actin filament-associated protein: a putative adaptor in stretch-induced Src activation. *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283 : L265—L274.
- Loomis W. F., Kuspa A., Shaulsky G. 1998. Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 1 : 643—648.
- Maeda T., Takekawa M., Saito H. 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science.* 269 : 554—558.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S. M., Saito H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 369 : 242—245.
- Mao J., Maye P., Kogerman P., Tejedor F. J., Toftgard R., Xie W., Wu G., Wu D. 2002. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.* 277 : 35 156—35 161.
- Marchler G., Schuller C., Adam G., Ruis H. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12 : 1997—2003.
- Martin H., Rodriguez-Pachon J. M., Ruiz C., Nombela C., Molina M. 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275 : 1511—1519.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger protein Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15 : 2227—2235.
- Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., Basmaji F., Lagorce A., Francois J. 2003. The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 49 : 23—35.
- Matsumoto S., Tanaka E., Nemoto T. K., Ono T., Takagi T., Imai J., Kimura Y., Yahara I., Kobayakawa T., Ayuse T., Oikawa A. 2002. Interaction between the N-terminal and middle regions is essential for the *in vivo* function of HSP90 molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 277 : 34 959—34 966.
- Meza I. 2000. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol. Today.* 16 : 23—28.
- Morgan B. A., Banks G. R., Toone W. M., Raitt D., Kuge S., Johnston L. H. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16 : 1035—1044.
- Moskvina E., Schuller C., Maurer C. T., Mager W. H., Ruis H. 1998. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast.* 14 : 1041—1050.
- Nakashima S., Wang S., Hisamoto N., Sakai H., Andoh M., Matsumoto K., Nozawa Y. 1999. Molecular cloning and expression of a stressresponsive mitogen-activated protein kinase-related kinase from *Tetrahymena* cells. *J. Biol. Chem.* 274 : 9976—9983.
- Nelson B., Parsons A. B., Evangelista M., Schaefer K., Kennedy K., Ritchie S., Petryshen T. L., Boone C. 2004. Fus1p interacts with components of the HOG1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating. *Genetics.* 166 : 67—77.



- Nguyen A. N., Lee A., Place W., Shiozaki K. 2000. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell.* 11: 1169—1181.
- Nishimura T., Yamaguchi T., Kato K., Yoshizawa M., Nabeshima Y., Ohno S., Hoshino M., Kaibuchi K. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat. Cell Biol.* 7: 270—277.
- Nishina H., Nakagawa K., Azuma N., Katada T. 2003. Activation mechanism and physiological roles of stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase in mammalian cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 17: 295—302.
- Nomoto S., Watanabe Y., Ninomiya-Tsuji J., Yang L. X., Nakai Y., Kiuchi K., Hagiwara M., Hidaka H., Matsumoto K., Irie K. 1997. Functional analyses of mammalian protein kinase C isozymes in budding yeast and mammalian fibroblasts. *Genes Cells.* 2: 601—614.
- Nonaka H., Tanaka K., Hirano H., Fujiwara T., Kohno H., Umikawa M., Mino A., Takai Y. 1995. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 5931—5938.
- Norbeck J., Blomberg A. 2000. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16: 121—137.
- Novak K. D., Titus M. A. 1997. Myosin I overexpression impairs cell migration. *J. Cell Biol.* 136: 633—647.
- Oehme F., Schuster S. C. 2001. Osmotic stress-dependent serine phosphorylation of the histidine kinase homologue DokA. *BMC Biochem.* 2: 2.
- Ohmiya R., Kato C., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. 1999. A fission yeast gene (*prl1(+)*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J. Biochem.* 125: 1061—1066.
- Ohno S. 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 641—648.
- Onyia J. E., Halladay D. L., Massina J. L. 1994. Identification of beta-actin sequences necessary for induction by phorbol esters and calcium ionophores. *Oncogene.* 9: 1713—1722.
- Ortiz D., del Carmen Dominguez-Robles M., Villegas-Sepulveda N., Meza I. 2000. Actin induction during PMA and cAMP-dependent signal pathway activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol.* 2: 391—400.
- Osman M. A., Konopka J. B., Cerione R. A. 2002. Iqg1p links spatial and secretion landmarks to polarity and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 159: 601—611.
- Ota I., Varshavsky A. 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* 262: 566—560.
- Otani H. 2004. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid. Redox Signal.* 6: 449—469.
- Ott A., Oehme F., Keller H., Schuster S. C. 2000. Osmotic stress response in *Dictyostelium* is mediated by cAMP. *EMBO J.* 19: 5782—5792.
- Oyama M. 1996. cGMP accumulation induced by hypertonic stress in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 271: 5574—5579.
- Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y., Takai Y. 1996. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15: 2196—2207.
- Pantos C., Malliopoulou V., Mourouzis I., Moraitis P., Tzeis S., Thempeyioti A., Paizis I., Cokkinos A., Carageorgiou H., Varonos D. D., Cokkinos D. V. 2003. Involvement of p38 MAPK and JNK in heat stress-induced cardioprotection. *Basic Res. Cardiol.* 98: 158—164.
- Parsell D. A., Kowal A. S., Lindquist S. 1994. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J. Biol. Chem.* 269: 4480—4487.
- Pascual-Ahuir A., Serrano R., Proft M. 2001. The Sko1p repressor and Gcn4p activation antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21: 16—25.
- Pawson T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 373: 573—579.
- Ponting C. P., Bork P. 1996. Pleckstrin's repeat performance: a novel domain in G-protein signaling? *Trends Biochem. Sci.* 21: 245—246.
- Posas F., Saito H. 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK-Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* 276: 1702—1705.
- Posas F., Takekawa M., Saito H. 1998. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 175—182.
- Posas F., Wurgler-Murphy S. M., Maeda T., Witten E. A., Thai T. C., Saito H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 «two-component» osmosensor. *Cell.* 86: 865—875.
- Proft M., Serrano R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 537—546.
- Puig B., Gomez-Isla T., Ribe E., Cuadrado M., Torrejon-Escribano B., Dalfo E., Ferrer I. 2004. Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding betaA plaques in APP Tg2576 mice. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30: 491—502.
- Qadota H., Ishii I., Fujiyama A., Ohya Y., Anraku Y. 1992. RHO gene products, putative small GTP-binding proteins, are important for activation of the CAL1/CDC43 gene product, a protein geranylgeranyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 8: 735—741.
- Raboy B., Marom A., Dor Y., Kulka R. G. 1999. Heat-induced cell cycle arrest of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the RAD6/UBC2 and WSC2 genes in its reversal. *Mol. Microbiol.* 32: 729—739.
- Raitt D. C., Johnson A. L., Erkine A. M., Makino K., Morgan B., Gross D. S., Johnston L. H. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell.* 11: 2335—2347.
- Reinoso-Martin C., Schuller C., Schuetzer-Muehlbauer M., Kuchler K. 2003. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot. Cell.* 2: 1200—1210.
- Remmert K., Olszewski T. E., Bowers M. B., Dimitrova M., Ginsburg A., Hammer J. A., 3rd. 2004. CARMIL is a bona fide capping protein interactant. *J. Biol. Chem.* 279: 3068—3077.
- Rep M., Krantz M., Thevelein J. M., Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275: 8290—8300.
- Rep M., Proft M., Remize F., Tamas M., Serrano R., Thevelein J. M., Hohmann S. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol. Microbiol.* 40: 1067—1083.
- Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein J. M., Hohmann S., Ammerer G., Ruis H. 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.* 19: 5474—5485.
- Roelofs J., Van Haastert P. J. 2002. Characterization of two unusual guanylyl cyclases from *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 277: 9167—9174.
- Roemer T., Paravicini G., Payton M. A., Bussey H. 1994. Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell Biol.* 127: 567—579.

- Roisin M. P., Robert-Gangneux F., Creuzet C., Dupouy-Camel J. 2000. Biochemical characterization of mitogen-activated protein (MAP) kinase activity in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 86 : 588—598.
- Rubin H., Ravid S. 2002. Polarization of myosin II heavy chain-protein kinase C in chemotaxing *Dictyostelium* cells. J. Biol. Chem. 277 : 36 005—36 008.
- Saier M. 1993. Protein phosphorylation and signal transduction in bacteria. J. Cell. Biochem. 51 : 1—6.
- Sakurai M., Adachi H., Suton K. 2001. Mutational analyses of *Dictyostelium* IQGAP-related protein GAPA: possible interaction with small GTPases in cytokinesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65 : 1912—1916.
- Santos J. L., Shiozaki K. 2001. Fungal histidine kinases. Sci. STKE. 98 : RE1.
- Schmitt A. P., McEntee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 5777—5782.
- Schmitz H. P., Heinisch J. J. 2003. Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi. Curr. Genet. 43 : 245—254.
- Schmitz H. P., Lorberg A., Heinisch J. J. 2002. Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. Mol. Microbiol. 44 : 829—840.
- Schuller C., Brewster J. L., Alexander M. R., Gustin M. C., Ruis H. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. EMBO J. 13 : 4282—4389.
- Schumacher M. M., Enderlin C. S., Selitrennikoff C. P. 1997. The osmotic-1 locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast. Curr. Microbiol. 34 : 340—347.
- Schuster S. C., Noegel A. A., Oehme F., Gerisch G., Simon M. I. 1996. The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. EMBO J. 15 : 3880—3889.
- Sharma A., Sharma I., Kogkasuriyachai D., Kumar N. 2003. Structure of a gametocyte protein essential for sexual development in *Plasmodium falciparum*. Nat. Struct. Biol. 10 : 197—203.
- Shaulsky G., Escalante R., Fuller D., Loomis W. F. 1998. A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. Development. 125 : 691—699.
- Shieh J.-C., Wilkinson M. G., Buck V., Morgan B. A., Maki-no K., Millar J. B. 1997. The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. Genes Develop. 10 : 2276—2288.
- Shimizu J., Yoda K., Yamasaki M. 1994. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* hpo2 mutant is due to a mutation in PKC1, which regulates expression of beta-glucanase. Mol. Gen. Genet. 242 : 641—648.
- Shiozaki K., Shiozaki M., Russell P. 1997. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. Mol. Biol. Cell. 8 : 409—419.
- Siderius M., Kolen C. P., van Heerikhuizen H., Mager W. N. 2000. Candidate osmosensors from *Candida utilis* and *Kluyveromyces lactis*: structural and functional homology to the Sho1p putative osmosensor from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. biophys. acta. 1517 : 143—147.
- Singleton C. K., Zinda M. J., Mykytko B., Yang P. 1998. The histidine kinase dnkC regulates the choice between migrating slugs and terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum*. Biol. Bull. 102 : 273—277.
- Smits G. J., Van den Ende H., Klis F. M. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbiology. 147 : 781—794.
- Soler M., Plovins A., Martin H., Molina M., Nombela C. 1995. Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and *in vivo* interaction with protein kinase Mkk1 and Mkk2. Mol. Microbiol. 17 : 833—842.
- Soulard A., Lechler T., Spiridonov V., Shevchenko A., Li R., Winsor B. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery *in vitro*. Mol. Cell. Biol. 22 : 7889—7906.
- Souza G. M., Lu S., Kuspa A. 1998. YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. Development. 125 : 2291—2302.
- Stadheim T. A., Kucera G. L. 1998. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 245 : 266—271.
- Stephenson K., Hoch J. A. 2002. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. Mol. Microbiol. 46 : 297—304.
- Stock J. 1999. Signal transduction: gyrating protein kinases. Curr. Biol. 9 : R364—R367.
- Stone J. R., Marletta M. A. 1996. Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. Biochemistry. 35 : 1093—1099.
- Su B., Karin M. 1996. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. Curr. Opin. Immunol. 8 : 402—411.
- Taminato A., Bagattini R., Gorjao R., Chen G., Kuspa A., Souza G. M. 2002. Role for YakA, cAMP, and protein kinase A in regulation of stress responses of *Dictyostelium discoideum* cells. Mol. Biol. Cell. 13 : 2266—2275.
- Tao W., Deschenes R. J., Fassler J. S. 1999. Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. J. Biol. Chem. 274 : 360—367.
- Tekinay T., Ennis H. L., Wu M. Y., Nelson M., Kessin R. H., Ratner D. I. 2003. Genetic interactions of the E3 ubiquitin ligase component FbxA with cyclic AMP metabolism and a histidine kinase signaling pathway during *Dictyostelium discoideum* development. Eukaryot. Cell. 2 : 618—626.
- Thanos C. D., Bowie J. U. 1996. Developmentally expressed myosin heavy-chain kinase possesses a diacylglycerol kinase domain. Protein Sci. 5 : 782—785.
- Thevelein J. M. 1994. Signal transduction in yeast. Yeast. 10 : 1753—1757.
- Thevelein J. M., Cauwenberg L., Colombo S., De Winde J. H., Donaton M., Dumortier F., Kraakman L., Lemaire K., Ma P., Nauwelaers D., Rolland F., Teunissen A., Van Dijk P., Versele M., Wera S., Winderickx J. 2000. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. Enzyme Microb. Technol. 26 : 819—825.
- Thevelein J. M., De Winde J. H. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 33 : 904—918.
- Thomason P., Kay R. 2000. Eukaryotic signal transduction via histidine—aspartate phosphorylation. J. Cell Sci. 113 : 3141—3150.
- Thomason P. A., Traynor D., Cavet G., Chang W. T., Harwood A. J., Kay R. R. 1998. An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. EMBO J. 17 : 2838—2845.
- Thome P. E. 2004. Isolation of a GPD gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). Yeast. 21 : 119—126.
- Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M., Wigler M. 1987. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. Cell. 50 : 277—287.
- Toda T., Sass P. 1988. The cAMP-dependent protein kinase genes in yeast. Oxf. Surv. Eukaryot. Genes. 5 : 133—161.
- Torrelles J. 2001. Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. Front Biosci. 6 : D1161—D1172.
- Valdivia R. H., Schekman R. 2003. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 10 287—10 292.
- Van Es S., Viridy K. J., Pitt G. S., Meima M., Sands T. W., Devreotes P. N., Cotter D. A., Schaap P. 1996. Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. J. Biol. Chem. 271 : 23 623—23 625.

- Van Es S., Weening K. E., Devreotes P. N. 2001. The protein kinase YakA regulates G-protein-linked signaling responses during growth and development of *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 276 : 30 761—30 765.
- Van Wuytswinkel O., Reiser V., Siderius M., Kelders M. C., Ammerer G., Ruis H., Mager W. H. 2000. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol. Microbiol.* 37 : 382—397.
- Verna J., Lodder A., Lee K., Vagts A., Ballester R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 13 804—13 809.
- Vieira L. L., Lafuente E., Blum J., Cabantchik Z. I. 1997. Modulation of the swelling-activated amino acid channel of *Leshmania major* promastigotes by protein kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90 : 449—461.
- Vrana J. A., Grant S. 2001. Synergistic induction of apoptosis in human leukemia cells (U937) exposed to bryostatin 1 and the proteasome inhibitor lactacystin involves dysregulation of the PKC/MAPK cascade. *Blood.* 97 : 2105—2114.
- Wang N., Shaulsky G., Escalante R., Loomis W. F. 1996. A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *EMBO J.* 15 : 3890—3898.
- Wang N., Soderbom F., Anjard C., Shaulsky G., Loomis W. F. 1999. SDF-2 induction of terminal differentiation in *Dictyostelium discoideum* is mediated by the membrane-spanning sensor kinase DhkA. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 4750—4756.
- Wolanin P. M., Thomason P. A., Stock J. B. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 3 : S3013.
- Wong H. C., Mao J., Nguyen J. T., Srinivas S., Zhang W., Liu B., Li L., Wu D., Zheng J. 2000. Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 1178—1184.
- Wu G. S. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 3 : 156—161.
- Wurgler-Murphy S. M., Saito H. 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends. Biochem. Sci.* 22 : 172—176.
- Yoshimi A., Tsuda M., Tanaka C. 2004. Cloning and characterization of the histidine kinase gene Dic1 from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Mol. Genet. Genomics.* 271 : 228—236.
- Yuan S. Y. 2002. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul. Pharmacol.* 39 : 213—223.
- Zhu W., Zou Y., Aikawa R., Harada K., Kudoh S., Uozumi H., Hayashi D., Gu Y., Yamazaki T., Nagai R., Yazaki Y., Komuro I. 1999. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation.* 100 : 2100—2107.
- Zhuang S., Hirai S. I., Ohno S. 2000. Hyperosmolality induces activation of cPKC and nPKC, a requirement for ERK1/2 activation in NIH/3T3 cells. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 278 : C102—C109.
- Zinda M. J., Singleton C. K. 1998. The hybrid histidine kinase dhkB regulates spore germination in *Dictyostelium discoideum*. *Develop. Biol.* 196 : 171—183.
- Zvalova D., Cordier J., Mesnil M., Junier M. P., Chneiweiss H. 2004. p38/SAPK2 control gap junction closure in astrocytes. *Glia.* 46 : 323—333.

Поступила 14 IV 2005

#### THE ROLE OF PROTEIN KINASE CASCADES IN STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN UNICELLULAR EUKARYOTES

I. V. Shemarova

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg; e-mail: irina@lis.mail.iephb.ru

The review summarizes current data on transduction mechanisms of stress signals by protein kinase cascades in unicellular eukaryotes. The role of sensor histidine kinases, tyrosine kinases, PKC, and cyclic nucleotide-dependent kinases are reviewed. Special attention is paid to a comparative analysis of transduction mechanisms of stress signals in vertebrates and unicellular eukaryotes.

**Key words:** unicellular eukaryotes, intracellular signaling, stress, sensor proteins, cAMP, histidine kinase, PKC, PKA, MAP-kinase cascade.