

## ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЭУКАРИОТ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА

© А. О. Шпаков

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru

Гуанилатциклазы (ГЦ), катализирующие синтез вторичного посредника цГМФ, являются одним из важнейших звеньев в сигнальных системах животных различного филогенетического уровня, включая одноклеточных. В обзоре проанализированы данные литературы, касающиеся уникальных форм ГЦ одноклеточных эукариот, эукариот, которые сходны с мембранно-связанными аденилатциклазами млекопитающих по своей структурно-функциональной организации и топологии. Среди них бифункциональные мембранно-связанные ГЦ инфузорий и плазмодия, которые имеют наряду с С-концевым циклазным доменом, структурно близким аденилатциклазам млекопитающих, N-концевой домен с 10 участками, пронизывающими мембрану, гомологичный АТФазам Р-типа. Проведенный нами сравнительный анализ первичных структур АТФазных доменов ГЦ одноклеточных показал, что эти домены высококонсервативны и в них сохранены мотивы, непосредственно связанные с функциональной активностью АТФазных транспортеров. Предполагается, что АТФазные домены выполняют в молекулах ГЦ рецепторную или регуляторную функцию. Обсуждаются двойная субстратная специфичность циклаз одноклеточных и ее возможная роль в обнаружении активности ГЦ у грибов и трипаносом, не имеющих генов, кодирующих ГЦ. Рассмотрены молекулярные механизмы функционирования ГЦ, регуляция активности ГЦ различными агентами, а также участие этих ферментов в контроле таких процессов, как хемотаксис, агрегация, движение, гаметогенез и фотофобный ответ.

### Введение

У млекопитающих гуанилатциклазы (ГЦ) представляют собой семейство ферментов-циклаз, которые в ответ на различные внешние сигналы, такие как окись азота, пептидные факторы и повышение внутриклеточной концентрации катионов кальция, катализируют реакцию превращения ГТФ в цГМФ. цГМФ выполняет функцию вторичного посредника, который регулирует активность цГМФ-зависимых протеинкиназ, ионных каналов и других эффекторных белков и осуществляет, таким образом, контроль за фундаментальными клеточными процессами — ростом, метаболизмом, апоптозом и дифференцированием. Все известные ГЦ млекопитающих относятся к двум основным их семействам — мембранно-связанным формам фермента, наделенным свойствами рецепторов, и растворимым ГЦ (Lucas et al., 2000). Мембранно-связанные формы ГЦ 1 раз пронизывают плазматическую мембрану и включают в себя один каталитический циклазный домен, но в функционально активном состоянии образуют гомодимер, который регулируется пептидными лигандами — натрийуретическими пептидами (типы ГЦ-А и ГЦ-В), термостабильным энтеротоксином и гуанилинами (тип ГЦ-С). Растворимые, цитозольные, формы ГЦ образуют  $\alpha\beta$ -гетеродимеры и активируются окисью азота и протопорфирином.

Мембранно-связанные формы ГЦ, выявленные у представителей одноклеточных эукариот, по своей структурно-функциональной организации не имеют ни-

чего общего с мембранно-связанными ГЦ млекопитающих. Одни из них, ГЦ амёбы *Dictyostelium discoideum*, пронизывают мембрану 12 раз и имеют два каталитических субдомена с циклазной активностью, что сближает их с мембранно-связанными формами аденилатциклаз (АЦ) млекопитающих — ферментов, катализирующих реакцию образования цАМФ из АТФ. Другие, ГЦ инфузорий и малярийного плазмодия, также пронизывают мембрану 12 раз и в дополнение к этому располагают дополнительным доменом, который гомологичен АТФазным транспортерам Р-типа и включает в себя 10 трансмембранных участков (ТМ). Существенные различия между мембранно-связанными ГЦ одноклеточных и млекопитающих связаны с распределением в каталитических сайтах ферментов функционально важных для связывания ГТФ аминокислотных остатков (АКО) (Linder, Schultz, 2002; Baker, Kelly, 2004a). В ГЦ одноклеточных эти сайты по своей архитектуре ближе к таковым в мембранно-связанных АЦ млекопитающих, чем к каталитическим сайтам ГЦ млекопитающих. Вследствие этого имеются веские основания считать, что мембранно-связанные ГЦ одноклеточных и АЦ млекопитающих произошли из общего анцестрального гена, который кодировал древнюю форму фермента-циклазы с топологией, типичной для мембранно-связанных форм АЦ млекопитающих с 12 ТМ (Linder, Schultz, 2002). Соответственно мембранно-связанные ГЦ одноклеточных и ГЦ млекопитающих произошли из различных анцестральных генов, но в дальнейшем вследствие конвергенции

структуры их каталитических сайтов приобрели способность катализировать одну и ту же химическую реакцию — превращение ГТФ в цГМФ. В свою очередь растворимая форма ГЦ, которая выявлена у амебы *D. discoideum*, по структуре каталитического сайта ближе к растворимым формам АЦ одноклеточных и бактерий, чем к ГЦ млекопитающих, и сильно отличается от мембранно-связанных ГЦ одноклеточных, что может указывать на общие эволюционные корни растворимых форм ГЦ и АЦ одноклеточных. Это дает основание полагать, что все ГЦ берут свое начало от АЦ или от фермента-циклазы с двойной специфичностью, который способен использовать в качестве субстрата как АТФ (с большим сродством), так и ГТФ (с низким сродством).

ГЦ в отличие от АЦ не столь распространены в живом мире. Они не обнаружены у растений, а их присутствие у грибов до сих пор не является строго доказанным (Schaap, 2005). У представителей прокариот, которые располагают большим набором форм АЦ, фермент с ГЦ-активностью выявлен только у цианобактерии *Synechocystis* (Ochoa de Alda et al., 2000). Фермент *Synechocystis* кодируется геном *scy2*, разрушение которого ведет к мутантной бактерии со сниженной способностью к образованию цГМФ. В каталитическом сайте ГЦ бактерии имеются АКО, типичные для ГТФ-связывающего кармана ГЦ млекопитающих.

### Мембранно-связанные гуанилатциклазы инфузорий и малярийного плазмодия

У свободноживущих инфузорий *Paramecium tetraurelia*, *Tetrahymena pyriformis* и *T. thermophila*, а также у относящихся к типу Споровики (*Sporozoa*) плазмодиев *Plasmodium falciparum* и *P. yoelii* (отряд Споровики) и пироплазмиды *Theileria parva* (отряд Пироплазмиды), являющихся кровяными паразитами млекопитающих, выявлены уникальные по своей структурной организации мембранно-связанные формы ГЦ, которые объединяют два функциональных модуля (Linder et al., 1999; Carucci et al., 2000; Linder, Schultz, 2002; Baker, 2004; Baker, Kelly, 2004a, 2004b). Первый из них — домен, гомологичный АТФаза Р-типа, который включает в себя 10 ТМ, второй — циклазный домен, гомологичный мембранно-связанным формам АЦ млекопитающих, который включает в себя 12 ТМ и 2 каталитических субдомена.

С-концевая половина молекул мембранно-связанных форм ГЦ инфузорий и малярийного плазмодия сходна по топологии в мембране и структурно-функциональной организации с молекулами мембранно-связанных АЦ млекопитающих. Она также включает в себя 12 ТМ, которые объединены в два блока (M1 и M2), содержащих по 6 ТМ в каждом, вслед за которыми следуют каталитические С1а- и С2-субдомены с циклазной активностью. Между С1а-субдоменом и M2 располагается гидрофильная петля, обозначаемая как С1b-субдомен и выполняющая функцию спейсера. Имеется, однако, существенное различие, которое заключается в том, что С1а-субдомен ГЦ структурно и функционально сходен с С2-субдоменом АЦ, в то время как С2-субдомен ГЦ — с С1а-субдоменом АЦ (Linder et al., 1999).

Так, расположенный в С1а-субдомене АЦ млекопитающих мотив GDCY, который содержит остаток Asp, связывающий необходимый для каталитической активности фермента катион  $Mg^{2+}$  (Tesmer et al., 1999), в слу-

чае ГЦ *Paramecium*, *Tetrahymena* и *Plasmodium* локализован в С2-субдомене, хотя и в несколько измененном виде. В свою очередь расположенный в С2-субдомене АЦ млекопитающих высококонсервативный мотив ТУМА, включающий в себя остаток Met, связывающий пуриновое кольцо нуклеотида (Tesmer et al., 1997), локализован в С1а-субдомене ГЦ инфузорий и плазмодия. Сходная картина наблюдается и для других мотивов и АКО, определяющих каталитическую функцию циклаз.

При этом в отличие от АЦ млекопитающих мембранно-связанные формы ГЦ инфузорий и плазмодия в качестве субстрата используют ГТФ, а не АТФ. Как известно, в АЦ млекопитающих за специфическое взаимодействие с адениновым кольцом АТФ отвечают остатки Lys и Asp С2-субдомена и остаток Gln С1а-субдомена (Tesmer et al., 1997). В ГЦ *Paramecium*, *Tetrahymena* и *Plasmodium*, принимая во внимание инверсию функций С1а- и С2-субдоменов в их молекулах в сравнении с АЦ, во взаимодействии с гуаниновым кольцом ГТФ участвуют остатки Glu и Ser С1а-субдомена и остаток Arg С2-субдомена (в ГЦ *P. tetraurelia* — Glu<sup>1681</sup>, Ser<sup>1748</sup> и Arg<sup>2347</sup>; в ГЦ *T. pyriformis* — Glu<sup>1808</sup>, Ser<sup>1885</sup> и Arg<sup>2734</sup>, в ГЦ- $\alpha$  *P. falciparum* — Glu<sup>3058</sup> и Arg<sup>4089</sup>). В ГЦ- $\alpha$  и высокогомологичной ей ГЦ- $\beta$  *Plasmodium* остаток Ser заменен остатком Ala (в ГЦ- $\alpha$  — Ala<sup>3257</sup>, в ГЦ- $\beta$  — Ala<sup>1687</sup>), не способным образовывать водородную связь с гуаниновым кольцом, что сближает триаду АКО, взаимодействующих с ГТФ в ГЦ *Plasmodium*, с канонической ГТФ-связывающей триадой Glu-Cys-Arg, расположенной в каталитическом сайте ГЦ млекопитающих (Sunahara et al., 1998).

Для исследования роли отдельных АКО в триаде Glu-Ser-Arg в определении субстратной специфичности ГЦ *Paramecium* к ГТФ в ней одновременно были произведены замены двух АКО, локализованных в С1а-субдомене фермента — E<sup>1681</sup>K/S<sup>1748</sup>D, что сделало эту триаду близкой по структуре триаде Lys-Asp-Gln, которая определяет взаимодействие АЦ млекопитающих с АТФ (Linder et al., 2000). В результате мутантная ГЦ стала связываться с АТФ и работать как АЦ. Замена сегмента LVR<sup>2345–2347</sup>, который включает в себя третий АКО в триаде, локализованный в С2-субдомене ГЦ, на сегмент KWQ приводила к повышению в 10 раз значения  $K_m$  для ГТФ- $Mg^{2+}$ , но не влияла на специфичность взаимодействия мутантного фермента с гуаниновым нуклеотидом. Таким образом, было показано, что в триаде Glu-Ser-Arg за специфичность взаимодействия с ГТФ ответственны первые два АКО, локализованные в С1а-субдомене ГЦ *Paramecium*. Сходная ситуация наблюдается и в случае АЦ млекопитающих, где в триаде Lys-Asp-Gln за специфичность взаимодействия с АТФ ответственны также первые два АКО, с той лишь разницей, что они локализованы в С2-субдомене. Эти данные свидетельствуют о том, что С2-субдомен АЦ млекопитающих функционально гомологичен С1а-субдомену мембранно-связанных ГЦ *Paramecium*, *Tetrahymena* и *Plasmodium*. Еще одним доказательством гомологии между С2-субдоменом АЦ и С1а-субдоменом ГЦ являются результаты, полученные при конструировании химерных циклаз (Linder et al., 2000). Изолированные С2-субдомены АЦ 2-го и 9-го типов млекопитающих, которые не являются активными, при добавлении С2-субдомена ГЦ *Paramecium* приобрели специфичную для них АЦ-активность, подобно тому как это происходит при добавлении к ним С1а-субдоменов АЦ. Это означает, что С2-субдомен ГЦ способен в полной мере заменить С1а-субдомен АЦ и, следо-

вательно, не только по структуре, но и функционально ему гомологичен. Необходимо также отметить, что ассоциация С2-субдоменов АЦ с С2-субдоменом ГЦ *Paramecium* с мутацией, заключающаяся в замене сегмента LVR<sup>2345–2347</sup> на сегмент KWQ, приводит к химерной циклазе, обладающей двойной специфичностью как к ГТФ, так и к АТФ.

Как и в случае АЦ млекопитающих, изолированные С1а- и С2-субдомены ГЦ *Paramecium* лишены ферментативной активности, которая восстанавливается при их ассоциации друг с другом. Экспрессия С1а- и С2-субдоменов, соединенных между собой коротким пептидом, также приводит к химерной молекуле, обладающей специфической ГЦ-активностью. При этом значения  $K_m$  для С1а/С2-комплексов составляют 60–75 мкМ, что близко к значениям  $K_m$  для полноразмерной молекулы фермента. Полученные результаты указывают на то, что блоки ТМ (М1 и М2) и гидрофильный С1b-субдомен несущественны для каталитической активности ГЦ *Paramecium*, как это наблюдается и в случае АЦ млекопитающих. Этот вывод подтверждается также тем, что химерная молекула, которая включает в себя С1а- и С2-субдомены ГЦ *Paramecium*, с одной стороны, и 12 ТМ и С1b-субдомен АЦ 7-го типа млекопитающих — с другой, обладает специфической ГЦ-активностью (Linder et al., 1999). Не активны по отдельности и С1а- и С2-субдомены ГЦ малярийного плазмодия, в то время как при их ассоциации друг с другом выявляется специфическая циклазная активность, которая, однако, в отличие от ГЦ парамеции сравнительно низка (Carucci et al., 2000).

В каталитическом сайте ГЦ одноклеточных высококонсервативный в мембранно-связанных АЦ млекопитающих остаток серина (Ser<sup>900</sup> в АЦ 7-го типа), взаимодействующий с дитерпеном форсколином, одним из самых мощных активаторов каталитической активности АЦ, с учетом инверсии субдоменов заменен лизином. Вследствие этого форсколин не способен стимулировать ГЦ одноклеточных, так же как и растворимые формы ГЦ млекопитающих, что экспериментально показано для ГЦ *Paramecium*, которая не чувствительна к обработке даже 100 мкМ форсколином, и для ГЦ *Plasmodium* (Carucci et al., 2000; Linder, Schultz, 2002).

Как отмечалось выше, значительный по размерам N-концевой домен мембранно-связанных ГЦ инфузорий и плазмодия гомологичен семейству АТФаз Р-типа. Основная функция АТФаз Р-типа, 10 раз пронизывающих плазматическую мембрану, заключается в транспорте катионов (протонов, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), который осуществляется за счет энергии гидролиза АТФ (Fagan, Saier, 1994; Scarborough, 2000). АТФазный домен ГЦ сходен с АТФазами Р-типа не только по своей первичной структуре, но и по топологии в мембране — он также включает в себя 10 ТМ, объединенных в три блока по схеме 2 + 2 + 6. Блоки ТМ разделены значительными по размеру цитоплазматическими петлями (ЦП), вторая из которых, соединяющая ТМ-4 и ТМ-5, имеет длину более 700 АКО.

Нами показано, что протяженный участок 200–357 АТФазного домена ГЦ *Paramecium*, который включает в себя центральную и С-концевую области первой ЦП, соединяющей ТМ-2 и ТМ-3, обладает значительной гомологией не только по отношению к соответствующим по локализации участкам АТФазных доменов ГЦ *Tetrahymena* и *Plasmodium* (идентичность 30–36 %), но и АТФаз млекопитающих, одноклеточных эукариот и растений (рис. 1, А). Так, при сравнении участка 200–350 с

АТФазами млекопитающих, относящихся к классам I, II, V и VI, идентичность первичной структуры составила 25–26 %, а при сравнении того же участка с АТФазами растения *Arabidopsis thaliana* и грибов *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* и *Neurospora crassa* — 26–28 %.

Выявлена гомология и для отдельных участков второй ЦП АТФазного домена ГЦ *Paramecium*. Так, идентичность аминокислотной последовательности (АКП) участка 830–877, расположенного в С-концевой области этой петли, и соответствующих по локализации участков ГЦ *Plasmodium*, *Theileria* и *Tetrahymena* составляет от 23 до 31 % (рис. 1, Б). Значительная гомология выявлена и при сравнении с АТФазами млекопитающих, одноклеточных эукариот, грибов и растений (идентичность 25–31 %). При этом участвующий в связывании АТФ остаток аспарагиновой кислоты (Asp<sup>891</sup> в АТФазе 10А-типа человека) и окружающие его АКО (в том числе функционально важный остаток Trp<sup>886</sup>) консервативны не только в АТФазных транспортерах, но и в АТФазных доменах ГЦ одноклеточных.

При сравнении другого, более протяженного, участка 960–1043, также расположенного в С-концевой области второй ЦП, с участками АТФазных доменов ГЦ одноклеточных выявлено до 40 % идентичных АКО, при сравнении с участками АТФаз — до 35 % идентичных АКО (рис. 1, В). Показано, что остатки аспарагиновой кислоты, соответствующие Asp<sup>1026</sup> и Asp<sup>1030</sup> в ГЦ *Paramecium*, и Asp<sup>1031</sup> и Asp<sup>1035</sup> в АТФазе 10А-типа человека, которые участвуют в связывании катионов магния и формируют каталитический сайт фермента, высококонсервативны во всех избранных для анализа АТФазных доменах ГЦ и АТФазах. Исключение составляет ГЦ *T. pyriformis*, в которой первый из этих двух остатков аспарагиновой кислоты заменен остатком серина. В ГЦ *Plasmodium* сегмент (TLAIGDGANDIAMIQ<sup>2025–2039</sup> в *P. falciparum*), включающий в себя оба остатка Asp, высокогомологичен по отношению к соответствующим сегментам в АТФазах человека и растения *A. thaliana* (87 % идентичности) (рис. 1, В). Столь высокая степень гомологии свидетельствует о сохранении функции связывания катиона магния этим сегментом в АТФазных доменах ГЦ плазмодия. В этой связи следует отметить, что участки 1864–1911 и 1961–2042 ГЦ *P. falciparum* и 1616–1663 и 1713–1799 ГЦ *P. yoelii* более близки по первичной структуре АТФадам, чем соответствующие участки ГЦ инфузорий (рис. 1, Б, В). Последнее указывает на то, что АТФазный домен ГЦ *Plasmodium* ближе по своей структуре, а возможно, и по функциям к АТФазным транспортерам, чем соответствующие домены ГЦ инфузорий.

В N-концевой части второй ЦП АТФазного домена ГЦ *Paramecium* присутствует высококонсервативный сайт для фосфорилирования DKTGTLT<sup>461–467</sup>, включенный в формирование каталитического сайта АТФаз, остаток аспарагиновой кислоты в котором образует 4-аспартилфосфатный интермедиат, ответственный за реализацию АТФазами Р-типа функции трансмембранного транспорта. Этот сайт также сохранен в АТФазных доменах ГЦ *T. thermophila*, *P. falciparum* и *P. yoelii*, исключая только ГЦ *T. pyriformis*, где он сильно видоизменен (SKSGTLM<sup>476–482</sup>) и, вероятно, функционально неактивен.

Сравнительный анализ пронизывающих мембрану участков АТФазных доменов ГЦ одноклеточных пока-



A		
		+ + +++++ + + +++++= + ++ = ++ ++
1	200	RWDQLQVGDIIYLKNEICPADVLIIDMG--QSVSMASNTVMSGNTNEVRKRACP
2	273	KWEQLEVGNIWVLKNGEIPADLLIILDCR--QSFCVTEEDIQNGKTYQIEKYPQ
3	186	EVSSIQIGDIILLKKGDLCPADCLILDMK--ESFCSAKNNNCQGSNQFDIKRPPQ
4	187	RWMLSVGSIIRLIENEQVPADILLSCNNSEGVVYIETSLNGETN-LNKKYCV
5	191	KWMLTVGSIIRLVENEQVPADILLSCNHSDGSVYVETSLVNGETN-LKKKYCV
7	159	FWKEIHVGDVFLRCNEIFPADILLSSSDPDGLCHJETANLDGETN-LKRRQ--
9	196	RWKDIKAGDILLCRRSEFFCADILLCTSHKNGIAFVETSSLDGETNLKVKKEANT
15	156	KWKKLRVGDVVVKEKDQFFPADLLILLSSSYEDGICYVETMNLGDGETNLKVKR-CL
+ + = + + = + +		
1	253	LTTSISKEHKIQ--LLDYRTILNGVIRYDQTDSDQY-YKGMVKLKKDPKPLEINKE
2	326	LTSVSVHSHKLNQMFYRKLKLSGRIEYTKQSRKE-FSGFLKMNKDPKGENLDCR
3	239	VTQILSSSKIKGYHFYRKLKLSGRIEYTKQSRKE-FSGFLKMNKDPKGENLDCR
4	241	NETRNETSIYA--ISNIR----GRIVCEKPNMSEFNGLKLDHAHPRATSLIN
5	245	NETRNESSVYS--VCNIR----GRITCEKPNMSEFNGLKLDHAHPRATSLIN
7	211	VVRGFSE-LVSEF--NPLTFT-SVIECEKPNNDLSRFRGCI-IHDNGKKAGLYKE
9	251	FLFNILGNDRN-SAIDNVKNLKGFILSDKPNKDLSTMYGTIYFEKDKK---IDVE
15	210	DVTLPLERD-----DTFQFSGTIKCEDPNPNLYTFVG--NLEYDGOVYPLDPS
++ + + + +++++ = +++ + + +		
1	305	NIFFREQLLNDLYLFGVILSVGLDCRCYKSF--KHVEKYGYFEKKANLYFLIAI 357
2	380	NIIYRGSKLVFSEWVYGIVLYAGKDTKIYQQSYNKETMKTFFGKKAKLFFLVAY 434
3	294	NMIFRGELMYTEWCVALVLYVGYDCRYFYI--RYPKEKIYFPGKSIINNKIEQY 406
4	290	NVIFKGSYIKNTDYVFGVIIYTGVDTKIMKNI-SNNKHKLGYVNKELNSYTIIGL 343
5	294	NVVFKGSYIKNTDYVFGVIIYTGVDTKIMKNI-SNNKHKLGYVNKELNSYTIIGL 347
7	261	NLLLRGCTLRNTDAVVGIVYAGHETKALLN-SGPRYKRSKLERQMNCDVLWCV 314
9	302	NIGIQE-LLKTT 314
15	257	QILLRDSKLRNTSYVYGVVFTGHDTKVMQNS-TKSPSKRSRIEKRM-DYIYTL 309
B		
		+ + ++ ++ +++ + ++ + + + ++ =++++= +
1	830	LMHEFEKNCDLVSVIGVQEKVNKNVPTLNYIKQLGLPCWVVSVDNVE 877
2	933	LYDDIEKDLQIVTVFGVAENLKKGADIAIKQMLAGLHTWMLTGD SYI 980
3	979	IYSPLLTKLDLLCIVGIQEVIRKDSAEVLNLLNQSFIKTWMLTGDQFQ 1026
4	1864	VAEEFERDLIYLGITGVKNGLQEKVPKTIIDILNQSIRI WMLTGD NVE 1911
5	1616	VANHVEKNLTYLGITGVKDRQLQKKVMNTMEMLNQSGVRI WMLTGD NIE 1663
6	805	LCSREKDVNYLGIIMFRDEIQRNIVKTIIDLLMDSGIRI WMLTGD NKE 852
7	847	SAIRLETNLHLLGATGIEDRLQDGVPETISKLRQAGLQI WMLTGD KQE 894
8	639	LEMEME---LLCLTGVEDQLQADVPTLETLRNAGIKV WMLTGD KLE 682
9	1005	VAEYIENDLILQGITGIEDKLQEGVSTIEDLRMAGIHI WMLTGD KIE 1052
10	819	LMDEIEQNLEIVGATAIEDKLQDDVEGTISCLKEAGILFWILLTGD KKE 869
11	652	LI---ERDMKLGIVTGVDELQDDVTTSLLETLMGGIKV WMLTGD KVE 696
12	650	IQDEMEVDLKLIGATAIEDKLQDGVPETIEFLIRGGIKV WMLTGD KVE 697
13	864	VSEHLERDLELLGVTVGEDRLQRDVKPSLELLRNAGVKI WMLTGD KVE 911
14	732	ITKYLEHDLLELLGLTGVEDKLQKDVKSSEILLRNAGIKI WMLTGD KVE 779
15	716	VSDMMEKELILVGATAVEDKLQKGVPCIDKLAQAGLKI WMLTGD KME 763
B		
		+++ + + = + ++ + ==+ ++
1	960	KPF---QIVISGESLEQILRDAYLKKHFQFLQFTSNFIGYRMTFQQKSILIKLL
2	1116	KPY-LFCIVVSSEALTTIFSDNYLRNHFYFLSYFCTSLIGYDLQTNQKGFVFRMV
3	1106	KRS-IFNIIISGKTFNLRKNQYLNDHFTFLYFTKNLVGYQFDQFQKTEIIQNL
4	1961	KPYENLCLLVNGRNLQTFNLQYTDLQTHFLNMACTCDVV IACRITAKQKAFVQLI
5	1713	KPHEKICLLISGKNLQTFLNHNDLQTYFLNMACTSDAVIACRITAKQKAFIVRLI
7	969	RPS----LVIDGRSLAYAL-EKNLEDKFLFLAKQCRSVLCCRSTPLQKSMVVKLV
8	721	RKHDC-ALVISGDSLEVCLK--YYEYEFMELACQCPAVVCCRCAPTQKAQIVRLL
9	1151	NTLN-YVLVVDGSVIDLLLSEKMERKFF-YLADKCSSVICGRVSPYQKGAIVS-S
11	747	VPW---TLVLDGGRLSMCLTKA-TSKTFVRVARLAYSIVSRCSPTQKAEVVRTM
12	755	KAY-NIGCVFEAGALQVVM--AHAKDLFRQVILKASVVICSRVTPKQKAMIAKTV
15	820	DPHAAFALIIDGKTLTYALEDD-IKYQFLALAVDCASVICCRVSPKQKALVTRLA
+ +++++++ += ++ ++ ++		
1	1012	KDRKLNKFIKLSIGDSFSDINLFNHSDFTFQM 1043
2	1170	KQKYPQNPKTLAIGDSYNDADMMQASADISIQM 1201
3	1160	KICLPNAK-ILGIGSNISDLRMLTASDYSIEI 1190
4	2016	KNRLYPTPNTLAIGDGANDIAMIQEANIGVSI 2047
5	1768	KSRLSPRPNTLAIGDGANDIAMIQEANIGVSI 1799
7	1019	RS-KLK-AMTLAIGDGANDVSMIQVADVGVGI 1048
8	773	QER--TGKLTCAVGDGNDVSMIQESDCGVGV 802
9	1203	ANRLLN-KITLAIGDGANDRNMINANTANIGIGI 1233
11	798	KKFTSRNIRTAIGDGANDVGMILAADVGVGI 829
12	807	KEA--TKKVLTIGDGANDVAMINEGDIGVGL 836
15	874	KEG--TGKTTLAIGDGANDVGMIQEADIGVGI 903

зывает, что их ТМ-4 и ТМ-5, разделенные протяженной второй ЦП, высококонсервативны в ГЦ одноклеточных и гомологичны по отношению к соответствующим ТМ АТФаз Р-типа, что позволяет предположить их участие в обеспечении функциональной активности ГЦ (рис. 2). При этом роль ТМ-4 и ТМ-5, а возможно, и других ТМ АТФазного домена, как мы полагаем, не ограничивается обеспечением оптимальной трансмембранной архитектуры ГЦ, тем более что для этой цели вполне достаточно 12 ТМ, локализованных в С-концевой половине ее молекулы, которая гомологична мембранно-связанным АЦ млекопитающих.

Совокупность данных, полученных нами и другими авторами в результате сравнительного анализа первичных структур ГЦ одноклеточных, свидетельствует о том, что в их АТФазных доменах имеются протяженные участки АКП, а также короткие ее сегменты и отдельные АКО, которые являются важными для функциональной активности АТФазных транспортеров. Это может указывать на сохранение по крайней мере отдельных функций этих транспортеров у АТФазных доменов в составе молекулы ГЦ. Необходимо отметить, что в каждом из геномов инфузорий *P. tetraurelia*, *T. thermophila* и *T. pyriformis* выявлено несколько изоформ мембранно-связанных ГЦ (например, в случае ГЦ *T. thermophila* их более 10). Первичная структура этих изоформ характеризуется значительной степенью гомологии, причем высококонсервативными являются не только циклазные субдомены, что представляется вполне закономерным, но и АТФазные домены, в особенности их вторая ЦП и обрамляющие вторую петлю ТМ. Это является дополнительным доказательством в пользу функциональной активности АТФазных доменов в ГЦ одноклеточных.

Одной из наиболее вероятных функций АТФазного домена ГЦ инфузорий и плазмодия может быть осуществление регуляции активности циклазных субдоменов в ответ на изменение концентрации катионов кальция в цитоплазме одноклеточных, тем более что именно Ca<sup>2+</sup> является основным регулятором функциональной активности ГЦ. Так, еще в 1980-е годы было обнаружено, что удаление катионов кальция при обработке мембран *Paramecium* низкими концентрациями EGTA и помещение их в среду, не содержащую Ca<sup>2+</sup>, приводят к снижению активности ГЦ на 80 % (Klumpp, Schultz, 1982; Klumpp et al., 1984). Это ингибирование снимается добавлением катионов кальция, в то время как катионы других щелочноземельных металлов (Sr<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup>) в этом отношении неэффективны. Зависимость активности ГЦ от присутствия Ca<sup>2+</sup> в условиях *in vitro* согласуется с повышением уровня цГМФ при повышении [Ca<sup>2+</sup>]; в условиях *in vivo* вследствие деполяризации потенциалзависимых кальциевых каналов в ответ на повышение концентрации катионов калия во внеклеточной среде (Schultz et al., 1986). В то же время активация ГЦ *Paramecium* может осуществляться и через другие типы кальциевых каналов, акти-

А						
			+	+=	+++	+
1	380	LEFQLMNYSGLLPLFYFYFLIDLLYFTQMLYNNY				412
2	472	LSF-MVEYLHIMPQLFYSVVDVIEMVNDLYHNK				503
3	388	ATY-FLEYMIFLPCIVPYLDI---MQLIIVYK				415
4	383	IVKYTLLYSNIIPIISILISVDLISILQSI LIEN				415
5	387	IMKYIILYSNIIPIISVLITLTLDSISIMQSI LIEN				419
7	362	FLTMIIIVLQVLIPISLYVSEIEIKACQVYFINQ				394
8	333	IRF-LLFSNIIPIISLRVNLDMGKIVYSWVIRR				364
15	360	LITAVLLYGYLIPISLYVSIELVKVLQATFINQ				392
Б						
			++	+	+	+
1	1110	SRKAALYFERILIFALFRSFGIIYLLCVTQLIRDEIVV				1147
2	1230	SRMAELYEELLYAFYRAFLLGYIILFIEASNC SYGN				1267
3	1220	SKNSYFQKEDLVIMSFYRSFLIGIILFFWNTYQSSYGI				1257
4	2078	SKH-LYTSIILYWNFFKNILILPIFFY-QAYASWSCV				2113
7	1083	SR-LA---NMVLYF-FYKNTMFVGLLEWFQ-FFCGFSA				1114
8	837	KRSAA----LSQFVIHRSLCISTMQAVFSSVYFASV				869

Рис. 2. Сравнительный анализ первичных структур четвертого (А) и пятого (Б) трансмембранных участков АТФазных доменов ГЦ инфузорий и споровиков (1—5) с таковыми АТФаз млекопитающих (7, 8) и растения *Arabidopsis thaliana* (15).

Жирным шрифтом выделены участки, пронизывающие мембрану. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

вируемых вследствие гиперполяризации, которая вызывается, например, амилоридом (Preston et al., 1992; Schultz et al., 1997). Следует, однако, отметить, что природа кальциевых каналов, функционально сопряженных с ГЦ парамеции, практически не изучена.

Попытки выяснить молекулярные механизмы регуляторного влияния катионов кальция на функциональную активность ГЦ *Paramecium* не принесли желаемых результатов. Первоначально предполагалось, что регуляция активности ГЦ этой инфузории осуществляется через посредство кальцийсвязывающего белка кальмодулина (Klumpp et al., 1983, 1984). Так, Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин, выделенный из *Paramecium*, стимулировал ГЦ на 20 % и восстанавливал активность фермента, ингибированную La<sup>3+</sup>. Однако концентрации кальмодулина, необходимые для стимуляции ГЦ, были сравнительно высокими (ED<sub>50</sub> = 200 нМ), а восстановление ингибированной La<sup>3+</sup> активности фермента достигало и в отсутствие кальмодулина, при добавлении смеси Ca<sup>2+</sup>/EDTA и Ca<sup>2+</sup>/EGTA (Schultz, Klumpp, 1994). Таким образом, Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин не может рассматриваться в качестве физиологического регулятора активности ГЦ у парамеции.

Как и в случае *Paramecium*, активность мембранно-связанной ГЦ *Tetrahymena* в условиях *in vitro* стимулируется Ca<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>-кальмодулином и ингибируется La<sup>3+</sup> и EGTA, причем ингибирование снимается при добавлении сравнительно высоких концентраций Ca<sup>2+</sup>-кальмодулина (Nakazawa et al., 1979; Kakiuchi et al., 1981; Schultz et al., 1983). Однако по аналогии с ГЦ парамеции Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин не может рассматриваться как физио-

Рис. 1. Сравнительный анализ первичных структур цитоплазматических петель АТФазных доменов гуанилатциклазы (ГЦ) инфузорий и споровиков (1—6) с таковыми АТФазных транспортеров высших и низших эукариот (7—15).

1 — ГЦ *Paramecium tetraurelia* (САВ44361.1), 2 — ГЦ *Tetrahymena thermophila* (ЕАР93104.1), 3 — ГЦ *T. pyriformis* (САВ52247.1), 4 — ГЦ *Plasmodium falciparum* (NР\_701254.1), 5 — ГЦ *P. yoelii* (ЕАА16324.1), 6 — ГЦ *Theileria parva* (XР\_765416.1), 7 — АТФаза 10А-типа (класса V) человека (О60312), 8 — АТФаза 9А-типа (класса II) мыши (NР\_056546.2), 9 — АТФаза *P. falciparum* (AF206018\_1), 10 — АТФаза *T. thermophila* (XР\_001026419.1), 11 — АТФаза *Trypanosoma brucei* (ААЗ10742.1), 12 — АТФаза *Entamoeba histolytica* (ЕАL51558.1), 13 — АТФаза *Aspergillus fumigatus* (XР\_747682.1), 14 — АТФаза *Saccharomyces cerevisiae* (P40527), 15 — АТФаза *Arabidopsis thaliana* (NР\_188006.1). Важные для функциональной активности аминокислотные остатки (АКО), высококонсервативные в ГЦ и АТФазах, выделены жирным шрифтом. Знаками «=» и «+» отмечены позиции, включающие в себя идентичные или сходные по физико-химическим свойствам АКО.

логический активатор ГЦ *Tetrahymena*. В отношении ГЦ *Plasmodium* этот кальцийсвязывающий белок неактивен даже в высоких концентрациях. Таким образом, молекулярные механизмы влияния катионов кальция на функциональную активность ГЦ инфузорий и плазмодия не включают в себя  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин, что предполагает участие в этом процессе либо других кальцийсвязывающих белков, либо ассоциированных с ГЦ ионных каналов. Нельзя исключить, что роль этих каналов выполняют АТФазные домены ГЦ, которые могут являться чувствительными сенсорами изменений внутри- и внеклеточных концентраций катионов, в первую очередь кальция, и опосредовать их регуляторное влияние на функциональную активность циклазы.

Попытки найти физиологические регуляторы активности ГЦ инфузорий помимо катионов кальция к успеху пока не привели. В случае ГЦ *Plasmodium* предполагается возможность участия в регуляции активности циклазы ксантуреновой кислоты, продукта катаболизма триптофана, которая, являясь фактором, активирующим процесс образования гаметоцитов, усиливает чувствительность ГЦ к катионам кальция в мембранах созревающих гаметоцитов (Billker et al., 1998; Garcia et al., 1998; Muhia et al., 2001). Поскольку ксантуреновая кислота непосредственно не взаимодействует с каталитическими субдоменами ГЦ, возможны два механизма ее действия на ГЦ. Первый заключается в связывании с АТФазным доменом ГЦ, который в этом случае будет функционировать как рецептор, второй — в регуляции фермента опосредованно, вследствие взаимодействия ксантуреновой кислоты с другими регуляторными молекулами.

В настоящее время отсутствуют какие-либо данные о функциональном сопряжении мембранно-связанных ГЦ *Paramecium*, *Tetrahymena* и *Plasmodium* с рецепторами и гетеротримерными ГТФ-связывающими белками (G-белками), которые являются сопрягающим компонентом между рецепторами и ферментами-генераторами вторичных посредников в большинстве сигнальных систем. Вследствие этого на данном этапе исследований можно исключить возможность регуляции ГЦ инфузорий и плазмодия молекулами гормонов и гормоноподобных веществ через сопряженные с G-белками сигнальные каскады, как это имеет место для большинства ферментов-циклов эукариотических организмов и, в частности, мембранно-связанной формы ГЦ амёбы *D. discoideum*, которая через посредство G-белков регулируется внеклеточным цАМФ.

Усилия, направленные на установление роли ГЦ и цГМФ в регуляции жизненно важных функций *Paramecium*, *Tetrahymena* и *Plasmodium*, увенчались успехом в основном только в отношении ГЦ—цГМФ-системы малярийного плазмодия. Эта система, как установлено, вовлечена в регуляцию мужского гаметогенеза — процесса образования микрогаметов, дающих впоследствии мужские гаметы, из внедрившихся в эритроциты мерозоитов (Kawamoto et al., 1990, 1993; Baker, Kelly, 2004b; Billker et al., 2004). В пользу участия этой системы в половом процессе у плазмодия свидетельствует обнаружение стимуляции мужского гаметогенеза у *Plasmodium* ингибиторами цГМФ-фосфодиэстеразы, которые подавляют гидролиз этим ферментом цГМФ и как следствие повышают уровень циклического нуклеотида внутри клетки, что равнозначно стимуляции активности ГЦ (Martin et al., 1978; Kawamoto et al., 1990, 1993). Между ГЦ, генерирующей цГМФ, с одной стороны, и

цГМФ-фосфодиэстеразой, которая активируется цГМФ и в дальнейшем гидролизует этот циклический нуклеотид, — с другой — существует тесная функциональная связь, из-за чего контроль над гаметогенезом у плазмодия осуществляется вследствие координированной регуляции активности обоих ферментов. На вовлечение ГЦ в регуляцию гаметогенеза и жизненного цикла плазмодия указывает и динамика экспрессии генов, кодирующих высокомологичные изоформы ГЦ — ГЦ $\alpha$  и ГЦ $\beta$  *Plasmodium* (Le Roch et al., 2003). ГЦ $\alpha$  наиболее интенсивно экспрессируется на стадиях бесполого размножения паразита, находящегося в кровяном русле, в то время как ГЦ $\beta$  экспрессируется только на стадиях формирования гаметоцитов и одноядерных подвижных спорозоитов. Это свидетельствует в пользу того, что ГЦ $\beta$  функционирует на стадиях полового развития паразита и регулирует протекание процесса гаметогенеза, в то время как ГЦ $\alpha$  обеспечивает жизнедеятельность паразита в процессе шизогонии (бесполого размножения) и его переход к формированию гаметоцитов, выполняя, таким образом, функцию триггера гаметогенеза (Baker, Kelly, 2004b). Недавно было показано, что ГЦ $\beta$  *P. berghei* обеспечивает внедрение продолговатой подвижной зиготы (оокинеты), образовавшейся в результате копуляции мужской и женской гамет, в стенку кишечника комара, что необходимо для ее превращения в ооцисту и в дальнейшем в спорозоиты (Hirai et al., 2006). В пользу того, что цГМФ у *P. berghei* контролирует именно процесс внедрения оокинеты в стенку кишечника, свидетельствует тот факт, что в условиях *in vitro* мутантные линии плазмодия, лишённые гена, кодирующего ГЦ $\beta$ , нормально развиваются в ооцисту и спорозоиты.

В отношении роли ГЦ—цГМФ-системы в обеспечении жизненно важных функций инфузорий сведения весьма ограниченные. Предполагается, что цГМФ-зависимые механизмы вовлечены в процессы выживания инфузорий *T. thermophila*, а также в осуществление перехода культуры инфузорий от стационарной к экспоненциальной стадии роста (Christensen et al., 1996). Получены доказательства в пользу участия цГМФ в реализации фотофобного эффекта инфузорий *Stentor coeruleus* (Fabczak et al., 1993). Так, фотофобный ответ инфузорий на резкое усиление интенсивности видимого света сильно запаздывает при повышении внутриклеточной концентрации цГМФ, которая достигается добавлением негидролизуемых аналогов цГМФ или 3'-изобутилметилксантина, ингибитора цГМФ-зависимых фосфодиэстераз. Реализация эффекта цГМФ может осуществляться через активируемые цГМФ ионные каналы, недавно открытые у *S. coeruleus* (Walerczyk et al., 2006). Обнаружено также, что цГМФ, который синтезируется  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой формой ГЦ, активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу и, таким образом, регулирует процесс экзоцитоза и сопряженного с ним эндоцитоза в клетках *Paramecium* (Plattner, Kissmehl, 2005).

### Гуанилатциклазы *D. discoideum*

У амёбы *D. discoideum* выявлены две формы ГЦ, которые принципиально различаются по топологии в мембране и структурно-функциональной организации молекул — одна из них является интегральным белком, 12 раз пронизывающим мембрану, другая представляет собой цитозольный белок, лишенный ТМ (Roelofs et al.,



2001a, 2001b, 2001c; Roelofs, Van Haastert, 2002). Мембранно-связанная ГЦ-А (1486 АКО) кодируется геном *gsaA*, включает в себя 12 ТМ, объединенных в два блока — М1 и М2 — по 6 ТМ в каждом, и два цитоплазматических субдомена, наделенных циклазной активностью, что сближает ее с мембранно-связанными формами АЦ млекопитающих и АЦ-А *D. discoideum*. Растворимая форма ГЦ (рГЦ) *D. discoideum* кодируется геном *sgcA*, также включает в себя два субдомена с циклазной активностью, которые образуют функционально активный димер. По своей структуре она сходна с растворимыми формами АЦ.

В обеих формах ГЦ каталитические сайты расположены в интерфейсе между С1а- и С2-субдоменами фермента, которые в образуемом ими димерном комплексе направлены антипараллельно (Roelofs, Van Haastert, 2002). При этом каталитические  $\alpha$ - и  $\beta$ -сайты, образованные соответственно С1а- и С2-субдоменами, локализованы не в центральной части интерфейса, а на некотором расстоянии друг от друга и различаются по некоторым функционально важным АКО, ответственным за взаимодействие с молекулой субстрата — ГТФ. Это отличает ГЦ *D. discoideum* от мембранно-связанных ГЦ млекопитающих, 1 раз пронизывающих мембрану и имеющих один циклазный домен, которые в процессе активации образуют димерный комплекс, в котором  $\alpha$ - и  $\beta$ -сайты идентичны.

Связывание и гидролиз ГТФ осуществляются в  $\alpha$ -сайте ГЦ-А и  $\beta$ -сайте рГЦ. В этом процессе участвуют: 1) остатки аспарагиновой кислоты (Asp<sup>1176</sup> и Asp<sup>1220</sup> в ГЦ-А; Asp<sup>1056</sup> и Asp<sup>1106</sup> в рГЦ), взаимодействующие с катионом магния, который образует комплекс с фосфатными группами ГТФ; 2) положительно заряженные АКО (Lys<sup>550</sup> и Arg<sup>1265</sup> в ГЦ-А; Lys<sup>1440</sup> и His<sup>1149</sup> в рГЦ), взаимодействующие с концевой  $\gamma$ -фосфатной группой ГТФ; 3) отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты (Glu<sup>1299</sup> в ГЦ-А; Glu<sup>1185</sup> в рГЦ), который образует солевой мостик с остатком Arg<sup>1265</sup> в ГЦ-А и остатком His<sup>1149</sup> в рГЦ. Специфичность взаимодействия ГЦ *D. discoideum* с ГТФ определяется остатками отрицательно заряженных АКО (Glu<sup>440</sup> в ГЦ-А; Asp<sup>1332</sup> в рГЦ), как это имеет место и в случае ГЦ млекопитающих (Roelofs et al., 2001c; Roelofs, Van Haastert, 2002).

В  $\beta$ -сайте ГЦ-А и  $\alpha$ -сайте рГЦ отсутствуют АКО, ответственные за взаимодействие с фосфатными группами ГТФ и находящимися с ними в комплексе катионами магния, вследствие чего эти сайты лишены каталитической активности. Их основная функция заключается в регуляции функциональной активности  $\alpha$ -сайта ГЦ-А и  $\beta$ -сайта рГЦ и в создании архитектуры этих сайтов, оптимальной для осуществления реакции образования цГМФ. Показано также, что в  $\beta$ -сайте ГЦ-А и  $\alpha$ -сайте рГЦ отсутствуют АКО, которые в родственных им АЦ ответственны за взаимодействие с форсколином, что объясняет неспособность форсколина стимулировать активность ГЦ *D. discoideum*, как это наблюдается и в случае ГЦ инфузорий и плазмодия.

Активность обеих форм ГЦ *D. discoideum* — ГЦ-А и рГЦ — зависит от присутствия катионов магния, которые образуют комплекс с ГТФ, субстратом ферментативной реакции (Roelofs et al., 2001a, 2001b). Различие между ними состоит в том, что катионы марганца более эффективно стимулируют активность рГЦ в сравнении с катионами магния, как это наблюдается и для мембранно-связанных АЦ млекопитающих, в то время как актив-

ность ГЦ-А, напротив, более чувствительна к катионам магния. Чувствительность рГЦ к катионам определяется ее ассоциацией с плазматической мембраной — ассоциированный с мембраной фермент стимулируется Mg<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup> примерно в одинаковой степени, в то время как фермент, локализованный в цитозоле, эффективно стимулируется Mn<sup>2+</sup>, но практически не чувствителен к Mg<sup>2+</sup> (Veltman et al., 2005). Доля рГЦ, ассоциированной с мембраной, повышается в процессе ее стимуляции хемоаттрактантом цАМФ, достигая 23 %, что приводит к повышению ее чувствительности к катионам магния. Однако и в базальном состоянии около 13 % рГЦ ассоциировано с мембраной, что и определяет чувствительность фермента не только к Mn<sup>2+</sup>, но и также и к Mg<sup>2+</sup>.

Активность ГЦ стимулируется хемоаттрактантами — внеклеточным цАМФ и фолиевой кислотой, первый из которых вырабатывается самими амебами вследствие активации АЦ-А, в то время как второй является продуктом жизнедеятельности бактерий, которыми питаются амебы *D. discoideum* (Manahan et al., 2004). Фолиевая кислота в сравнении с цАМФ является более слабым стимулятором ГЦ, но одинаково эффективно действует на обе формы фермента, в то время как цАМФ активирует преимущественно рГЦ. Показано, что у мутантной линии амеб с нокаутированными генами, кодирующими ГЦ-А и рГЦ, хемотаксис по градиенту хемоаттрактанта в значительной степени снижен (Bosgraaf et al., 2002a).

Способность цАМФ и фолиевой кислоты стимулировать ГЦ и вызывать повышение внутриклеточного уровня цГМФ была обнаружена еще 30 лет назад (Mato et al., 1977), но к установлению молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляторного влияния хемоаттрактантов на активность ГЦ, приступили сравнительно недавно. Стимуляция ГЦ внеклеточным цАМФ выявляется уже через 1 с после воздействия хемоаттрактанта на цАМФ-рецепторы, представляющие собой классические рецепторы серпантинного типа, функционально сопряженные с гетеротримерными G-белками. Пик внутриклеточной концентрации цГМФ достигается через 10—15 с, а через 30—45 с после начала воздействия активность ГЦ возвращается к базальному уровню (Van Haastert, 1987). Если цАМФ действует дважды в течение 30 с, то второй пик повышения уровня цГМФ наблюдается только в том случае, если повторное воздействие цАМФ на клетку осуществляется в значительно более высоких концентрациях, чем первое. Если же концентрация цАМФ во внеклеточной среде не меняется, то динамика изменения уровня цГМФ в ответ на этот хемоаттрактант не отличается от той, которая наблюдается при кратковременном воздействии цАМФ и также характеризуется быстрым снижением внутриклеточной концентрации цГМФ до ее базального уровня в течение 30—45 с. Эти данные свидетельствуют о том, что повышение уровня цГМФ вследствие связывания внеклеточного цАМФ с цАМФ-рецепторами приводит к запуску процесса адаптации, который блокирует активность ГЦ и снижает стимулированный хемоаттрактантом уровень цГМФ. Адаптация сменяется дезадаптацией — процессом, который заключается в возвращении ГЦ—цГМФ-системы в функционально активное состояние и делает эту систему вновь восприимчивой к регуляции внеклеточными сигналами. Чередование процессов адаптации и дезадаптации позволяет клетке *D. discoideum* адекватно реагировать на внешние сигналы и сохранять сигнальные систе-

мы, в том числе цГМФ-зависимые, в функционально активном состоянии.

Среди изученных в настоящее время механизмов адаптации, регулирующих цикл активации ГЦ, можно выделить два — ингибирующее влияние катионов кальция на активность фермента и разрушение образовавшегося в ходе ферментативной реакции циклического нуклеотида цГМФ-фосфодиэстеразами (Valkema, Van Haastert, 1994). Третий механизм включает в себя изменение связывающих характеристик рецепторов хемоаттрактантов, но этот механизм относится ко всем сигнальным каскадам, которые запускаются связыванием лиганда с молекулой рецептора, и потому не является специфичным в отношении ГЦ.

Катионы  $Ca^{2+}$  ингибируют активность обеих форм ГЦ *D. discoideum* со значениями 50 (для ГЦ-А) и 200 (для рГЦ) нМ в условиях как *in vivo*, так и *in vitro* (Janssens et al., 1989; Valkema, Van Haastert, 1992; Schoen et al., 1996; Roelofs et al., 2001b, 2001c; Roelofs, Van Haastert, 2002). Одним из механизмов ингибирующего влияния катионов кальция является нарушение ассоциации рГЦ с мембраной, которое необходимо для реализации каталитической функции фермента. Однако до сих пор не выявлены участки в молекулах ГЦ, которые могут связывать  $Ca^{2+}$  и опосредовать его регуляторное влияние на активность фермента (Veltman et al., 2005). Не исключено, что катионы кальция связываются не с самой молекулой ГЦ а с белками, активирующими ГЦ (GCAP-белками), которые выявлены у *D. discoideum* на генетическом уровне. Такой механизм регуляции катионами кальция ГЦ активности реализуется в случае мембранно-связанных форм ГЦ в сетчатке глаза млекопитающих, где катионы  $Ca^{2+}$  связываются с GCAP-белком и препятствует его взаимодействию с ГЦ, что необходимо для проявления ферментом каталитической активности (Gorzycza et al., 1994). Повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , которое необходимо для запуска механизма адаптации, предназначенного для гашения ответа *D. discoideum* на стимуляцию хемоаттрактантами, может осуществляться двумя путями. Первый включает в себя активацию хемоаттрактантами входа внеклеточного  $Ca^{2+}$  внутрь клетки через кальциевые каналы, природа которых неизвестна, второй — высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо в результате стимуляции теми же хемоаттрактантами фосфоинозитидного пути (Bumann et al., 1984; Van Haastert et al., 1989). Таким образом, катионы кальция выполняют функцию негативного регулятора активности ГЦ амебы.

Как отмечалось выше, другим механизмом адаптации является гидролиз цГМФ специфичными цГМФ-фосфодиэстеразами, из которых известны по крайней мере три типа — Pde3, Pde5 и Pde6, причем две последние не имеют структурных аналогов у высших эукариот (Bosgraaf et al., 2002b). Фосфодиэстераза Pde6 активируется как к цГМФ, так и к цАМФ и способна к гидролизу обоих циклических нуклеотидов, что вполне закономерно, учитывая координированное участие цАМФ- и цГМФ-зависимых путей в осуществлении поляризации клеток *D. discoideum* и направленного их движения по возрастающему градиенту хемоаттрактанта — основных этапов процесса агрегации. Мутантные линии *stmF* амебы, лишенные функционально активной Pde5, являются высокополяризованными (Bosgraaf et al., 2002b; Meima et al., 2003), а мутантные линии, лишенные сразу двух цГМФ-фосфодиэстераз, Pde5 и Pde6, содержат очень высокую концентрацию внутриклеточного

цГМФ и демонстрируют повышенный хемотактический ответ (Bosgraaf et al., 2002a). Наряду с цГМФ-фосфодиэстеразами регуляторами цГМФ-зависимых сигнальных путей в клетках *D. discoideum* являются цГМФ-связывающие белки GbpC и GbpD. Отсутствие этих белков приводит к снижению скорости движения амеб в процессе агрегации и ослаблению хемотактического ответа (Bosgraaf et al., 2002a; Goldberg et al., 2002). Мутантные линии амебы, лишенные белков GbpC и GbpD, по своему фенотипу сходны с мутантными линиями, которые лишены функционально активных ГЦ-А и рГЦ, что указывает на важную роль указанных белков в реализации цГМФ-зависимых эффектов.

Показано, что основная роль цГМФ в обеспечении хемотаксиса и агрегации амеб заключается в формировании миозиновых филаментов в тыльной части клетки, а также в подавлении образования псевдоподий на боковых ее поверхностях, что обеспечивает процесс направленного движения по возрастающему градиенту цАМФ или фолиевой кислоты (Postma et al., 2004). В основе этого лежит вызываемое цГМФ фосфорилирование легких и тяжелых цепей миозина II, что приводит к его разборке во фронтальной части клетки (Van Haastert, Kuwayama, 1997; Stites et al., 1998). Вследствие этого у амеб, лишенных ГЦ или других звеньев цГМФ-зависимых сигнальных путей, процесс хемотаксиса нарушен и мутантные клетки *D. discoideum* не способны к агрегации (Liu et al., 1993). В то же время обнаружено, что цГМФ помимо фосфорилирования миозина регулирует и другие эффекторные звенья, вовлеченные в хемотаксис, поскольку лишение амеб функционально активной ГЦ в существенно большей степени нарушает их способность к агрегации в сравнении с лишением амеб гена, кодирующего миозин II (Wessels et al., 1988; Bosgraaf et al., 2002a).

Имеются неоспоримые доказательства в пользу того, что некоторые из путей регуляции активности ГЦ *D. discoideum* внешними сигналами осуществляются через посредство  $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерных G-белков. Во-первых, хемоаттрактанты не способны стимулировать активность ГЦ в клетках амебы, лишенных функционально активной  $\beta$ -субъединицы G-белка (Wu et al., 1995). Во-вторых, негидролизуемый аналог ГТФ, GTP $\gamma$ S, в условиях *in vitro* стимулирует активность ГЦ-А и рГЦ со значениями  $K_a$  11 и 8 мкМ соответственно (Roelofs, Van Haastert, 2002). В-третьих, стимулирующие эффекты GTP $\gamma$ S и хемоаттрактанта цАМФ на активность ГЦ-А сходны по своей величине. В случае рГЦ стимулирующий эффект цАМФ в 2.5 раза более выражен в сравнении с таковым GTP $\gamma$ S. Однако если учесть, что цАМФ вызывает транслокацию рГЦ к мембране и вдвое увеличивает число ассоциированных с ней молекул фермента, наделенных каталитической активностью, то и в этом случае выявляется сходство в эффективности стимулирующего влияния GTP $\gamma$ S и цАМФ на активность рГЦ.

В то же время наряду с сигнальными путями, реализуемыми через посредство гетеротримерных G-белков, регуляция ГЦ может осуществляться и без их участия. Так, показано, что GTP $\gamma$ S сохраняет способность стимулировать рГЦ в клетках амебы, лишенных  $\beta$ -субъединицы G-белка. Наряду с этим инкубация с ГТФ клеток, находящихся в условиях дефицита пищевых ресурсов, в которых преимущественно экспрессируется рГЦ, приводит к подавлению стимулирующего эффекта GTP $\gamma$ S. Это указывает на низкую скорость гидролиза ГТФ, что характерно для мономерных G-белков, которые не способ-



ны гидролизовать ГТФ в отсутствие белка, активирующего ГТФаза. В пользу участия мономерных G-белков в стимуляции ГЦ-активности свидетельствует и то, что для их активации не требуется  $\beta$ -субъединица G-белка. Таким образом, можно предположить, что активность ГЦ *D. discoideum* может регулироваться как через гетеротримерные G-белки, так и через мономерные G-белки, которые, вероятно, относятся к Ras-семейству (Roelofs, Van Haastert, 2002; Veltman et al., 2005).

Наряду с хемоаттрактантами фактором, вызывающим стимуляцию активности ГЦ амебы, является осмотический стресс (Kuwayama et al., 1996; Oyama, 1996). Осмотический стресс, стимулирующий активность ГЦ *D. discoideum*, может быть вызван различными по химической природе веществами — сахарами, аминокислотами, глицерином и неорганическими солями, причем неорганические соли менее эффективны в сравнении с органическими веществами. Этанол и формамид, не являющиеся осмолитами, не влияют на активность ГЦ. Уровень цГМФ повышается через 2.5 мин после добавления осмолита (0.31 М глюкозы) во внеклеточную среду, достигает максимума через 10—15 мин и затем начинает медленно снижаться. При этом даже через 1 ч после начала воздействия он превышает базальный уровень циклического нуклеотида. В пользу того, что осмолиты повышают уровень цГМФ вследствие стимуляции ГЦ, а не ингибирования цГМФ-фосфодиэстеразы, гидролизующей этот циклический нуклеотид, свидетельствует тот факт, что в мутантных линиях *D. discoideum*, лишенных цГМФ-фосфодиэстеразы, также наблюдается накопление цГМФ в ответ на осмотический стресс (Oyama, 1996). Молекулярные механизмы влияния осмотического стресса и хемоаттрактантов на активность ГЦ амебы различаются и реализуются независимо друг от друга, поскольку повышение уровня цГМФ при действии фолиевой кислоты на *D. discoideum* в присутствии осмолита сходно по величине с повышением уровня этого циклического нуклеотида в его отсутствие. Необходимо подчеркнуть, что хемоаттрактанты стимулируют активность ГЦ в течение секунд, а уже через 30—45 с вследствие запуска процесса адаптации активность фермента снижается до базального ее уровня. Осмотический стресс, напротив, приводит к стимуляции ГЦ только через несколько минут и поддерживает фермент в активированном состоянии в течение 1 ч, что свидетельствует об отсутствии влияния осмотического стресса на процесс адаптации.

Стимуляция ГЦ-активности амебы может быть также достигнута добавлением SH-содержащих восстанавливающих агентов, таких как 2,3-димеркапто-1-пропанол (Oyama, 1991; Oyama, 1996). Предполагается, что молекулярные механизмы стимулирующего действия ГЦ действия тиолов и хемоаттрактантов имеют общие звенья, поскольку повышение уровня цГМФ SH-содержащими соединениями блокируется при обработке клеток амебы цАМФ и фолиевой кислоты (Oyama, 1996). В то же время стимуляция цГМФ тиолами и осмотическим стрессом представляют собой независимые процессы.

### Гуанилатциклазы других одноклеточных

Несмотря на то что в настоящее время в геномах жгутиконосцев *Trypanosoma* не выявлено генов, кодирующих молекулы ГЦ, имеются данные об обнаружении у

этих одноклеточных специфической ГЦ-активности, которая сопоставима по величине с активностью фермента у позвоночных (Paveto et al., 1995; Pereira et al., 1997). Так, обнаружено, что у эвмастигот *Trypanosoma cruzi* активность ГЦ эффективно стимулируется N-метил-D-аспаратом и L-глутаматом, агонистами NMDA-рецепторов, и нитропруссидом натрия, который является источником NO, а также в незначительной степени — L-аргинином. Как известно, у млекопитающих активация NMDA-рецепторов приводит к стимуляции NO-синтетазы — фермента, который ответствен за превращение аргинина в цитруллин и окись азота. Образовавшийся NO связывается с гемом растворимой формы ГЦ, следствием чего являются стимуляция активности фермента и повышение внутриклеточного уровня цГМФ (Lucas et al., 2000). Поскольку у *T. cruzi* выявлены и охарактеризованы как NMDA-рецепторы, так и NO-синтетаза, у этого одноклеточного организма может реализовываться сходная последовательность событий, о чем свидетельствует стимуляция ГЦ-активности N-метил-D-аспаратом, L-глутаматом и нитропруссидом (Paveto et al., 1995). На чувствительность трипаносом к действию NO указывают данные о том, что генерируемая макрофагами окись азота обладает высокой цитотоксичностью по отношению к *T. brucei* и *T. cruzi* (Gazzinelli et al., 1992; Vincendeau et al., 1992). В дополнение к этому при заражении мышей трипаносомами *T. cruzi* резко повышается способность клеток селезенки животного вырабатывать NO, который блокирует развитие паразита (Vespa et al., 1994). Установлено, что NO и цГМФ играют важную роль в подвижности жгутиконосцев (Pereira et al., 1997), но, как можно полагать, этим функция ГЦ—цГМФ-системы в обеспечении жизнедеятельности трипаносом не исчерпывается.

Анализ генома зеленой одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* позволил выявить по крайней мере 20 генов, кодирующих различные формы ГЦ, многие из которых обладают значительным сходством с ГЦ высших эукариот и в то же время имеют мало общего по своей структурно-функциональной организации с ГЦ других одноклеточных организмов (Lefebvre, Silflow, 1999; Baker, Kelly, 2004a). Несмотря на то что первичная структура каталитических субдоменов всех форм ГЦ *C. reinhardtii* высокогомологична, по топологии в мембране эти ферменты можно разделить на две группы. Первая группа, включающая в себя большинство ГЦ, представлена растворимыми формами фермента, которые лишены гидрофильных участков, способных пронизывать мембрану (Nioche et al., 2004). Вторая группа, в которую входят только две ГЦ, представлена мембранно-связанными формами фермента. Относящиеся ко второй группе ГЦ имеют четыре ТМ, расположенных в N-концевой половине молекулы, и один циклазный субдомен в ее C-концевой части. В центральной части их молекул расположен GAF-домен (vertebrate cGMP-specific phosphodiesterases, cyanobacterial adenylyl cyclases, and formate hydrogen lyase transcription activator FhlA), который участвует в связывании небольших молекул и не обнаружен ни в одной из известных в настоящее время форм ГЦ (Anantharaman et al., 2001). Поскольку показано, что GAF-домен, локализованный в цГМФ-фосфодиэстеразе человека, способен связывать цГМФ и регулировать фосфодиэстеразную активность фермента (Rybalkin et al., 2003), есть основания полагать, что он играет регуляторную роль и в составе ГЦ *C. reinhardtii*. Следует отметить, что и у другой зеленой одноклеточной водорос-

ли (*Scherffelia dubia*) выявлены гены, кодирующие изоформы ГЦ, обладающие высокой гомологией по отношению к ГЦ *S. reinhardtii*, а также гены, кодирующие цГМФ-зависимую фосфодиэстеразу, что свидетельствует о присутствии у *S. dubia* всех основных компонентов ГЦ—цГМФ-системы (Becker et al., 2001). Большое разнообразие ГЦ у водорослей *S. reinhardtii* и *S. dubia* может указывать на важность цГМФ-зависимых сигнальных путей в обеспечении их жизнедеятельности. Однако информация о роли ГЦ и цГМФ в регуляции функциональной активности эффекторных систем этих водорослей в настоящее время отсутствует.

Достаточно интригующей выглядит ситуация с обнаружением активности ГЦ у дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*, геном которых в отличие, например, от *Trypanosoma* полностью расшифрован и в нем не обнаружено генов, кодирующих ГЦ (Eckstein, 1988; Eckstein, Schlobohm, 1997; Kuo et al., 1998). Показано, что у *S. cerevisiae* присутствуют как мембранно-связанная, так и растворимая формы ГЦ. Мембранно-связанная форма стимулируется катионами  $Mn^{2+}$  и ингибируется катионами  $Ca^{2+}$ , подобно тому как это показано для ГЦ *D. discoideum* (Eckstein, Schlobohm, 1997). Она также стимулируется феромональным  $\alpha$ -фактором, что свидетельствует о функциональном сопряжении мембранно-связанной формы ГЦ с сигнальной системой, которая включает в себя рецептор серпантинного типа Ste2 для  $\alpha$ -фактора и гетеротримерный G-белок, состоящий из  $\alpha$ -субъединицы G $\alpha$ 1,  $\beta$ -субъединицы Ste4 и  $\gamma$ -субъединицы Ste18. Чувствительность ГЦ к феромонам предполагает ее участие в процессе спаривания дрожжевых клеток. Еще одним фермента является нитрит натрия, из которого образуется NO, что функционально сближает мембранно-связанную форму ГЦ дрожжей с растворимыми ГЦ млекопитающих. Растворимая форма ГЦ *S. cerevisiae* представляет собой белок 40 кДа, который детектируется антителами против  $\beta$ -субъединицы растворимой ГЦ млекопитающих (Kuo et al., 1998). Она, так же как и мембранно-связанная форма ГЦ дрожжей, активируется NO, который образуется из нитропруссид натрия или нитроглютамина.

### Заключение

Еще сравнительно недавно считалось, что дивергенция между ГЦ и АЦ, возникших из одного анцестрального гена, произошла на ранних этапах эволюции и в дальнейшем эти два типа циклаз эволюционировали независимо друг от друга. Основываясь на представленных в обзоре данных литературы и результатах сравнительного теоретического анализа первичных структур каталитических сайтов прокариот, низших и высших эукариот (Linder, Schultz, 2002; Baker, Kelly, 2004a), можно прийти к выводу о том, что это представление не соответствует действительности. Так, все циклазы, исходя из архитектуры их каталитических сайтов, могут быть объединены в группы, в которых вместе оказываются как ГЦ, так и АЦ. Следовательно, в процессе эволюции в каталитических сайтах циклаз неоднократно происходили мутации, которые меняли аффинность циклазных доменов к пуриновым нуклеотидам и, таким образом, сдвигали их субстратную специфичность то в сторону ГТФ, то в сторону АТФ. Возможно, это связано с тем, что на уровне низших эукариот еще отсутствует жесткое разграни-

чение функций ГЦ и АЦ и сохранение, пусть даже в скрытом виде, потенциала двойной субстратной специфичности делает систему более гибкой и устойчивой. У позвоночных животных процесс «подгонки» циклаз под определенный тип субстрата завершился формированием ферментов, высокоспецифичных либо к ГТФ, либо к АТФ.

Возможно, именно двойная субстратная специфичность циклаз является причиной того, что у грибов (*S. cerevisiae* и *N. crassa*) и трипаносом, в геноме которых не обнаружено генов, кодирующих ГЦ, но имеются гены, кодирующие АЦ, не только выявлены активность ГЦ и достаточно высокий уровень внутриклеточного цГМФ, но и функционируют цГМФ-зависимые сигнальные каскады, участвующие в регуляции жизненно важных процессов у этих одноклеточных организмов (Shaw et al., 1987; Eckstein, 1988; Paveto et al., 1995; Eckstein, Schlobohm, 1997; Pereira et al., 1997; Kuo et al., 1988). В этой связи необходимо отметить, что классификация АЦ и ГЦ часто проводится на основе ряда структурных мотивов, которые при условии параллельной эволюции нескольких групп циклаз могут по-разному комбинироваться и потому не всегда позволяют отнести фермент к определенному его типу. Другими словами, некоторые циклазы грибов и трипаносом, отнесенные на основе анализа их АКП к АЦ, функционально могут являться ГЦ или циклазами с двойной субстратной специфичностью. Так, в случае *T. brucei* на начальном этапе исследований гены, кодирующие циклазы, относили к генам, кодирующим ферменты со смешанной АЦ/ГЦ-активностью (Alexandre et al., 1990), но в дальнейшем их отнесли к АЦ. При этом как по своей топологии в мембране (интегральные белки, 1 раз пронизывающие мембрану), так и по структурно-функциональной организации АЦ трипаносом ближе к мембранно-связанным формам ГЦ млекопитающих, выполняющих функцию рецепторов натрийуретического пептида и родственных ему факторов, и по крайней мере некоторые из них могут выполнять функцию синтеза цГМФ.

В частично расшифрованном геноме инфузорий *T. pyriformis* пока не выявлено мембранно-связанных форм АЦ. В то же время нами и другими авторами показано, что гормоны и гормоноподобные вещества стимулируют мембранно-связанную форму АЦ, повышают внутриклеточный уровень цАМФ и активируют цАМФ-зависимую протеинкиназу (Csaba, 1985; Деркач и др., 2003; Шпаков и др., 2003; Csaba et al., 2005). Поскольку в геноме *T. pyriformis* идентифицировано более пяти изоформ ГЦ, а в геноме *T. thermophila* таких изоформ обнаружено вдвое больше, нельзя исключить то, что некоторые из них функционируют как АЦ или ферменты с двойной субстратной специфичностью.

Косвенным подтверждением того, что у одноклеточных организмов еще нет жесткого разграничения в специфичности циклаз к пуриновым нуклеотидам, является обнаружение у них зависимых от циклических нуклеотидов эффекторных белков, обладающих двойной специфичностью к цАМФ и цГМФ. Среди них цГМФ/цАМФ-зависимая фосфодиэстераза Pdeб амебы *D. discoideum*, которая стимулируется обоими циклическими нуклеотидами и впоследствии осуществляет их гидролиз, регулируя, таким образом, внутриклеточный уровень цГМФ и цАМФ (Bosgraaf et al., 2002a, 2002b). У амебы также обнаружены факторы обмена гуаниновых нуклеотидов Ras-белка (RasGEF), в которых локали-

зованы мотивы для связывания циклических нуклеотидов, имеющие гибридную структуру и не обладающие высокой специфичностью к какому-либо одному из них (Goldberg et al., 2002). Вследствие этого белки RasGEF *D. discoideum* регулируются как цГМФ (в большей степени), так и цАМФ.

Другой отличительной чертой ГЦ одноклеточных является то, что их мембранно-связанные формы имеют необычную топологию в мембране, сходную с таковой мембранно-связанных форм АЦ млекопитающих, а некоторые из них (ГЦ инфузорий и плазмодия) располагают доменами, которые гомологичны АТФазным транспортерам животных, грибов и растений. Вполне логично предположить, что такие сложно организованные молекулы, как, например, ГЦ инфузорий и плазмодия, которые имеют N-концевой АТФазный домен, включающий в себя две значительные по размерам ЦП и 10 ТМ, а также С-концевую половину, гомологичную мембранно-связанным АЦ млекопитающих с двумя каталитическими субдоменами и 12 ТМ, стали продуктами многочисленных дубликаций и комбинаций генов. В то же время остается открытым вопрос об участии столь сложно организованных трансмембранных структур, как 10 ТМ-система АТФазного домена и 12 ТМ-система собственно циклазной половины молекулы, в функционировании ГЦ, тем более, что целый ряд исследований как в отношении ГЦ, так и в отношении АЦ свидетельствует об отсутствии заметного влияния ТМ на способность циклазных субдоменов при условии их димеризации осуществлять синтез циклических нуклеотидов. Следовательно, образованные ТМ трансмембранные каналы и в первую очередь катионный канал АТФазного домена должны выполнять регуляторную, а возможно, и рецепторную функции.

Здесь необходимо подчеркнуть, что функционально сопряженные с G-белками и ферментами-генераторами вторичных посредников рецепторы серпантинного типа, 7 раз пронизывающие мембрану, могут функционировать как протонный насос, что в настоящее время доказано для бактериальных родопсинов и некоторых рецепторов биогенных аминов позвоночных (Broadley et al., 2000; Brown et al., 2001; Yang, Spudich, 2001). При связывании лиганда с рецептором инициируется протонный ток через трансмембранный канал рецептора, который устремляется от его лигандсвязывающего сайта к гуанин-нуклеотидсвязывающему сайту гетеротримерного G-белка и приводит к активации последнего и передаче сигнального импульса к эффекторным системам клетки. Гидролиз ГТФ, осуществляемый  $\alpha$ -субъединицей G-белка, возвращает сигнальную систему в исходное, неактивное, состояние. У одноклеточных организмов могли сохраниться сигнальные системы, в которых протонный насос объединен с молекулой эффектора в единое целое. Примером таких систем, как мы полагаем, являются молекулы мембранно-связанных форм ГЦ инфузорий и споровиков, в которых функцию протонного насоса могут выполнять домен, гомологичный АТФазам Р-типа, а также молекулы мембранно-связанных форм АЦ *P. falciparum*, которые содержат наряду с циклазным доменом N-концевой домен, представляющий собой калиевый канал с 6 ТМ (Baker, 2004). В калиевом канале АЦ плазмодия сохранены многие важные для его функциональной активности мотивы и АКО, как это показано и для АТФазных доменов мембранно-связанных ГЦ одноклеточных. Тот факт, что активность ГЦ инфузорий и плазмо-

дия, а также АЦ плазмодия регулируется катионами кальция и калия и сильно зависит от кислотности среды, свидетельствует в пользу возможности функционального сопряжения двух модулей — катионного транспортера и циклазы — в молекулах этих ферментов.

#### Список литературы

- Деркач К. В., Шнаков А. О., Кузнецова Л. А., Ирлина И. С., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция аденилатциклазной системы инфузории *Tetrahymena pyriformis* гормональными и негормональными агентами и ее зависимость от уровня базальной активности аденилатциклазы. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 : 332—338.
- Шнаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция биогенными аминами и пептидными гормонами активности аденилатциклазы и протеинкиназы А у инфузорий *Dileptis anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Докл. РАН. 378 : 275—277.
- Alexandre S., Paindavoine P., Tebabi P., Pays A., Haleux S., Steiner M., Pays E. 1990. Differential expression of a family of putative adenylate/guanylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 43 : 279—288.
- Anantharaman V., Koonin E. V., Aravind L. 2001. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. J. Mol. Biol. 307 : 1271—1292.
- Baker D. D. 2004. Adenylyl and guanylyl cyclases from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. IUBMB Life. 56 : 535—540.
- Baker D. A., Kelly J. M. 2004a. Structure, function, and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. Mol. Microbiol. 52 : 1229—1242.
- Baker D. A., Kelly J. M. 2004b. Purine nucleotide cyclases in the malaria parasite. Trends in Parasitol. 20 : 227—232.
- Becker B., Feja N., Melkonian M. 2001. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from the scaly green flagellate *Scherffelia dubia* Pancher emend. Melkonian et Preisig. Protist. 152 : 139—147.
- Billker O., Dechamps S., Tewari R., Wenig G., Franke-Fayard B., Brinkmann V. 2004. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. Cell. 117 : 503—514.
- Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A. E., Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R. E., Morris H. R. 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. Nature. 392 : 289—292.
- Bosgraaf L., Russcher H., Smith J. L., Wessels D., Soll D. R., Van Haastert P. J. M. 2002a. A novel cGMP signaling pathway mediating myosin phosphorylation and chemotaxis in *Dictyostelium* EMBO J. 21 : 4560—4570.
- Bosgraaf L., Russcher H., Snippe H., Bader S., Wind J., Van Haastert P. J. M. 2002b. Identification and characterization of two unusual cGMP-stimulates phosphodiesterases in *Dictyostelium* Mol. Biol. Cell. 13 : 3878—3889.
- Broadley K. J., Nederkoorn P. H., Timmerman H., Timms D., Davies R. H. 2000. The ligand—receptor—G-protein ternary complex as a GTP-synthase. J. Theor. Biol. 205 : 297—320.
- Brown A. J., Dyos S. L., Whiteway M. S., White J. H., Watson M. A., Marzioch M., Clare J. J., Clare J. J., Cousens D. J., Paddon C., Plumpton C., Romanos M. A., Dowell S. J. 2000. Functional coupling of mammalian receptors to the yeast mating pathway using novel yeast/mammalian G protein  $\alpha$ -subunit chimeras. Yeast. 16 : 11—22.
- Bumann J., Wurster B., Malchow D. 1984. Attractant-induced changes and oscillations of the extracellular  $Ca^{2+}$  concentration in suspensions of differentiating *Dictyostelium* cells. J. Cell Biol. 98 : 173—178.
- Carucci D. J., Witney A. A., Muhia D. K., Warhurst D. C., Schaap P., Meima M. 2000. Guanylyl cyclase activity associated with putative bifunctional integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. 275 : 22 147—22 156.



- Christensen S. T., Kemp K., Quie H., Rasmussen L. 1996. Cell death, survival and proliferation in *Tetrahymena thermophila*: effects of insulin, sodium nitroprusside, 8-bromo cyclic GMP, NG-methyl-L-arginine and methylene blue. *Cell Biol. Int.* 20 : 653—666.
- Csaba G. 1985. The unicellular *Tetrahymena* as a model cell for receptor research. *Int. Rev. Cytol.* 95 : 327—377.
- Csaba G., Kovacs P., Pallinger E. 2005. Hormonal interactions in *Tetrahymena*: effect of hormones on levels of epidermal growth factor (EGF). *Cell Biol. Int.* 29 : 301—305.
- Eckstein H. 1988. 3',5'-cyclic GMP in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at different metabolic conditions. *FEBS Lett.* 232 : 121—124.
- Eckstein H., Schlobohm H. 1997. A particulate guanylate cyclase (EC 4.6.1.2) from growing yeast cell (*Saccharomyces cerevisiae*). *Z. Naturforsch.* 52 : 373—379.
- Fabczak H., Park P. B., Fabczak S., Song P. S. 1993. Photosensory transduction in ciliates. II. Possible role of G-protein and cGMP in *Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.* 57 : 702—706.
- Fagan M. J., Saier M. H. 1994. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analysis and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* 38 : 57—99.
- Garcia G. E., Wirtz R. A., Barr J. R., Woolfitt A., Rosenberg R. 1998. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J. Biol. Chem.* 273 : 12 003—12 005.
- Gazzinelli R. T., Oswald I. P., Hieny S., James S. L., Sher A. 1992. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* 22 : 2501—2506.
- Goldberg J. M., Bosgraaf L., Van Haastert P. J. M., Smith J. L. 2002. Identification of four candidate cGMP targets in *Dictyostelium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 6749—6754.
- Gorczyca W. A., Gray-Keller M. P., Detwiler P. B., Palczewski K. 1994. Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 4014—4018.
- Hirai M., Arai M., Kawai S., Matsuoka H. 2006. PbGC $\beta$  is essential for *Plasmodium* ookinete motility to invade midgut cell and for successful completion of parasite life cycle in mosquitoes. *J. Biochem. (Tokyo).* 140 : 747—757.
- Janssens P. M. W., De Jong C. C. C., Vink A. A., Van Haastert P. J. M. 1989. Regulatory properties of magnesium-dependent guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum* membranes. *J. Biol. Chem.* 264 : 4329—4335.
- Kakiuchi S., Sobue K., Yamazaki R., Nagao S., Umeki S., Nozawa Y., Yazawa M., Yagi K. 1981. Ca<sup>2+</sup>-dependent modulator proteins from *Tetrahymena pyriformis*, sea anemone, and scallop and guanylate cyclase activation. *J. Biol. Chem.* 256 : 19—22.
- Kawamoto F., Alejo-Blanco R., Fleck S. L., Kawamoto Y., Sinden R. E. 1990. Possible roles of Ca<sup>2+</sup> and cGMP as mediators of the exflagellation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42 : 101—108.
- Kawamoto F., Fujioka H., Murakami R., Syafruddin D., Hagiwara M., Ishikawa T., Hidaka H. 1993. The roles of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and cGMP-dependent pathways in gametogenesis of a rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Eur. J. Cell Biol.* 60 : 101—107.
- Klumpp S., Gierlich D., Schultz J. E. 1984. Adenylate cyclase and guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane from *Paramecium*: separation and regulation. *FEBS Lett.* 171 : 95—99.
- Klumpp S., Kleefeld G., Schultz J. E. 1983. Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclase of the excitable ciliary membrane from *Paramecium*. Dissociation of calmodulin by La<sup>3+</sup>: calmodulin specificity and properties of the reconstituted guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258 : 12 455—12 459.
- Klumpp S., Schultz J. E. 1982. Characterization of a Ca<sup>2+</sup>-dependent guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane from *Paramecium*. *Eur. J. Biochem.* 124 : 317—324.
- Kuo W. N., Kanadia R. N., McNabb M. 1998. Soluble guanylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45 : 125—131.
- Kuwayama H., Van Haastert P. J. M. 1996. Regulation of guanylyl cyclase by a cGMP-binding protein during chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 271 : 23 718—23 724.
- Lefebvre P. A., Silflow C. D. 1999. *Chlamydomonas*: the cell and its genomes. *Genetics.* 151 : 9—14.
- Le Roch K. G., Zhou Y., Blair P. L., Grainger M., Moch J. K., Haynes J. D., De La Vega P., Holder A. A., Batalov S., Carucci D. J., Winzler E. A. 2003. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science.* 301 : 1503—1508.
- Linder J. U., Engel P., Reimer A., Kruger T., Plattner H., Schultz A., Schultz J. E. 1999. Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases an N-terminal P-type ATP-ase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *EMBO J.* 18 : 4222—4232.
- Linder J. U., Hoffmann T., Kurz U., Schultz J. E. 2000. A guanylyl cyclase from *Paramecium* with 22 transmembrane spans: expression of the catalytic domains and formation of chimeras with the catalytic domains of mammalian adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 275 : 11 235—11 240.
- Linder J. U., Schultz J. E. 2002. Guanylyl cyclases in unicellular organisms. *Mol. Cell. Biochem.* 230 : 149—158.
- Liu G., Kuwayama H., Ishida S., Newel P. C. 1993. The role of cyclic GMP in regulating myosin during chemotaxis of *Dictyostelium*: evidence from a mutant lacking the normal cyclic GMP response to cyclic AMP. *J. Cell Sci.* 106 : 591—595.
- Lucas K. A., Pitari G. M., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K. P., Waldman S. A. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52 : 375—413.
- Manahan C. L., Iglesias P. A., Long Y., Devreotes P. N. 2004. Chemoattractant signaling in *Dictyostelium discoideum*. *Annu. Rev. Cell. Develop. Biol.* 20 : 223—253.
- Martin S. K., Miller L. H., Nijhout M. M., Carter R. 1978. *Plasmodium gallinaceum*: induction of male gametocyte exflagellation by phosphodiesterase inhibitors. *Exp. Parasitol.* 44 : 239—242.
- Mato J. M., Van Haastert P. J. M., Krens F. A., Rhijsburger E. H., Dobbe F. C. P. M. 1977. Cyclic AMP and folic acid mediated cyclic GMP accumulation in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 79 : 331—336.
- Meima M. E., Weening K. E., Schaap P. 2003. Characterization of a cAMP-stimulated cAMP phosphodiesterase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 278 : 14 356—14 362.
- Muhia D. K., Swales C. A., Deng W., Kelly J. M., Baker D. A. 2001. The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 42 : 553—560.
- Nakazawa K., Shimonaka H., Nagao S., Kudo S., Nozawa Y. 1979. Magnesium-sensitive guanylate cyclase and its endogenous activating factor in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biochem. (Tokyo).* 86 : 321—324.
- Nioche P., Berka V., Vipond J., Minton N., Tsai A. L., Raman C. S. 2004. Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. *Science.* 306 : 1550—1553.
- Ochoa de Alda J. A., Ajlani G., Houmard J. 2000. *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. *J. Bacteriol.* 182 : 3839—3842.
- Oyama M. 1991. Reducing reagent-induced activation of guanylate cyclase in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *J. Biochem. (Tokyo).* 110 : 934—938.
- Oyama M. 1996. cGMP accumulation induced by hypertonic stress in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 271 : 5574—5579.
- Paveto C., Pereira C., Espinosa J., Montagna A. E., Farber M., Esteva M., Flawia M. M., Torres H. N. 1995. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 270 : 16 576—16 579.
- Pereira C., Paveto C., Espinosa J., Alonso G., Flawia M. M., Torres H. N. 1997. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44 : 155—156.

- Plattner H., Kissmehl R. 2005. Molecular aspects of rapid, reversible, Ca<sup>2+</sup>-dependent dephosphorylation of pp63/parafusin during stimulated exocytosis in *Paramecium* cells. *Cell. Calcium*. 38 : 319—327.
- Postma M., Bosgraaf L., Loovers H. M., Van Haastert P. J. M. 2004. Chemotaxis: signaling modules join hands at front and tail. *EMBO Rep.* 5 : 35—40.
- Preston R. R., Saimi Y., Kung S. 1992. Calcium current activated upon hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*. *J. Gen. Physiol.* 100 : 233—251.
- Roelofs J., Loovers H. M., Van Haastert P. J. M. 2001a. GTPγS regulation of a 12-transmembrane guanylyl cyclase is retained after mutation to an guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 276 : 40 740—40 745.
- Roelofs J., Meima M., Schaap P., Van Haastert P. J. 2001b. The *Dictyostelium* homologue of mammalian soluble adenylyl cyclase encodes a guanylyl cyclase. *EMBO J.* 20 : 4341—4348.
- Roelofs J., Snippe H., Kleineidam R. G., Van Haastert P. J. 2001c. Guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum* with the topology of mammalian adenylyl cyclase. *Biochem. J.* 354 : 697—706.
- Roelofs J., Van Haastert P. J. M. 2002. Deducing the origin of soluble adenylyl cyclase, a gene lost in multiple lineages. *Mol. Biol. Evol.* 19 : 2239—2246.
- Rybalkin S. D., Rybalkina I. G., Shimizu-Albergine M., Tang X. B., Beavo J. A. 2003. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J.* 22 : 469—478.
- Scarborough G. A. 2000. Crystallization, structure and dynamics of the proton-translocating P-type ATPase. *J. Exp. Biol.* 203 : 147—154.
- Schap P. 2005. Guanylyl cyclases across the tree of life. *Front. Biosci.* 10 : 1485—1498.
- Schoen C. D., Schulkes C. C., Arents J. C., van Driel R. 1996. Guanylate cyclase activity in permeabilized *Dictyostelium discoideum* cells. *J. Cell. Biochem.* 60 : 411—423.
- Schultz J. E., Guo Y., Kleefeld G., Volkel H. 1997. Hyperpolarization- and depolarization-activated Ca<sup>2+</sup> currents in *Paramecium* trigger behavioral changes and cGMP formation independently. *J. Membr. Biol.* 156 : 251—259.
- Schultz J. E., Klumpp S. 1994. Cyclic GMP in lower forms. *Adv. Pharmacol.* 26 : 285—303.
- Schultz J. E., Pohl T., Klumpp S. 1986. Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> entry into *Paramecium* linked to intraciliary increase in cyclic GMP. *Nature.* 322 : 271—273.
- Schultz J. E., Schonefeld U., Klumpp S. 1983. Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclase and calcium-permeability in the ciliary membrane from *Tetrahymena*. *Eur. J. Biochem.* 137 : 89—94.
- Shaw N. M., Harding R. W. 1987. Intracellular and extracellular cyclic nucleotides in wild-type and white collar mutant strains of *Neurospora crassa*: temperature dependent efflux of cyclic AMP from mycelia. *Plant Physiol.* 83 : 377—383.
- Stites J., Wessels D., Uhl A., Egelhoff T., Shutt D., Soll D. R. 1998. Phosphorylation of the *Dictyostelium* myosin II heavy chain is necessary for maintaining cellular polarity and suppressing turning during chemotaxis. *Cell Motil. Cytoskel.* 39 : 31—51.
- Sunahara R. K., Beuve A., Tesmer J. J., Sprang S. R., Garbers D. L., Gilman A. G. 1998. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 273 : 16 332—16 338.
- Tesmer J. J., Sunahara R. K., Gilman A. G., Sprang S. R. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G<sub>s</sub>α-GTPγS. *Science.* 278 : 1907—1916.
- Tesmer J. J., Sunahara R. K., Johnson R. A., Gosselin G., Gilman A. G., Sprang S. R. 1999. Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science.* 285 : 756—760.
- Valkema R., Van Haastert P. J. M. 1992. Inhibition of receptor-stimulated guanylyl cyclase by intracellular calcium ions in *Dictyostelium discoideum* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186 : 263—268.
- Valkema R., Van Haastert P. J. M. 1994. A model for cAMP-mediated cGMP response in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell.* 5 : 575—585.
- Van Haastert P. J. M. 1987. Differential effects of temperature on cAMP-induced excitation, adaptation and deadaptation of adenylyl and guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Biol.* 105 : 2301—2306.
- Van Haastert P. J. M., De Vries M. J., Penning L. C., Roovers E., Van der Kaay J., Erneux C., Van Lookeren Campagne M. M. 1989. Chemoattractant and guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate induce the accumulation of inositol 1,4,5-triphosphate in *Dictyostelium* cells that are labeled with [<sup>3</sup>H]inositol by electroporation. *Biochem. J.* 258 : 577—586.
- Van Haastert P. J. M., Kuwayama H. 1997. cGMP as second messenger during *Dictyostelium* chemotaxis. *FEBS Lett.* 410 : 25—28.
- Veltman D. W., Roelofs J., Engel R., Visser A. J. W. G., Van Haastert P. J. M. 2005. Activation of soluble guanylyl cyclase at the leading edge during *Dictyostelium* chemotaxis. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 976—983.
- Vespa G. N., Cunha F. Q., Silva J. S. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect. Immunol.* 62 : 5177—5182.
- Vincendeau P., Daulouede S., Veyret B., Darle M. L., Boutille B., Lemesre J. L. 1992. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp. Parasitol.* 75 : 353—360.
- Walerczyk M., Fabczak H., Fabczak S. 2006. Detection and localization of a putative cyclic-GMP-activated channel protein in the protozoan ciliate *Stentor coeruleus*. *Protoplasma.* 227 : 139—146.
- Wessels D., Soll D. R., Knecht D., Loomis W. F., De Lozanne A., Spudich J. 1988. Cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium* amoebae lacking myosin heavy chain. *Develop. Biol.* 128 : 164—177.
- Wu L., Valkema R., Van Haastert P. J. M., Devreotes P. N. 1995. The G protein β subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 129 : 1667—1675.
- Yang C. S., Spudich J. L. 2001. Light-induced structural changes occur in the transmembrane helices of the *Natronobacterium pharaonis* Htr-II transducer. *Biochemistry.* 40 : 14 207—14 214.

Поступила 16 I 2007

## GUANYLYL CYCLASES OF UNICELLULAR EUKARYOTES: STRUCTURE, FUNCTION, AND REGULATORY PROPERTIES

A. O. Shpakov

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg; e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Guanylyl cyclases (GCs), catalyzing the synthesis of the second messenger cGMP, are key elements of the signaling systems of animals of different phylogenetic levels including unicellular eukaryotes. In the review the literature data concerning unusual GCs observed in unicellular eukaryotes and having the structural-functional

organization and topology similar to those of mammalian membrane-bound adenylyl cyclases, are analyzed. Among these GCs there are bifunctional membrane-bound GCs of ciliates and *Plasmodium*, which have both C-terminal cyclase domain related to mammalian adenylyl cyclases and N-terminal domain with ten membrane-spanning regions homologous to P-type ATPases. The developed by the author comparative analysis of primary structures of GC ATPase domains showed that the domains are high conservative and the motifs, which are closely linked to functional activity of ATPase transporters, are preserved in the domains. It is suggested that ATPase domains carry out either receptor or regulatory functions in GC molecules. Dual substrate specificity of cyclases of unicellular organisms and its possible role in revealing of GC activity in fungi and trypanosomes, lacking GC encoded genes, are discussed. The molecular mechanisms of the functioning of GCs, the regulation of GC activity by different agents, and the participation of these enzymes in control of the processes, such as chemotaxis, aggregation, movement, gametogenesis and photophobic response, are analyzed.

---