

БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА 14-3-3 И РЕГУЛЯЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА

©2010 г.

Н. Н. СЛУЧАНКО, Н. Б. ГУСЕВ

*Кафедра биохимии биологического факультета Московского
государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Структура и свойства 14-3-3. III. Участие белков
семейства 14-3-3 в регуляции цитоскелета и клеточной подвиж-
ности. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Одним из широко распространенных видов посттрансляционных модификаций, влияющих на структуру и свойства белка, является фосфорилирование остатков серина, треонина и тирозина, катализируемое протеинкиназами. Перенос остатка фосфорной кислоты сопровождается изменением заряда, что зачастую приводит к существенным конформационным перестройкам, которые влияют на структуру, свойства и функциональную активность фосфорилируемых белков. В клетке есть несколько семейств белков, узнающих и специфически взаимодействующих с определенными участками фосфорилированных белков. Одно из таких семейств представлено белками 14-3-3, которые были обнаружены более 40 лет назад при систематической классификации белков нервной ткани, где их содержание превышает 1% протеома [1, 2]. К настоящему времени описано более 300 различных белков-мишеней, способных взаимодействовать с 14-3-3

Принятые сокращения: AANAT (ArylAlkylamine N-AcetylTransferase) – арилалкиламин-N-ацетилтрансфераза; GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) – киназа гликогенсинтазы 3; MAPKAP – киназа, активируемая MAP-киназой; NES (Nuclear Export Sequence) – сигнальная последовательность, способствующая экспорту из ядра; NLS (Nuclear Localization Sequence) – сигнальная последовательность, способствующая проникновению белка в ядро; PKA – cAMP-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа А, ПКА); PKB – протеинкиназа В (PKB/Akt); PKC – протеинкиназа С; TPR-домен (Tetratricopeptide Repeat Domain) – 34-членный домен, участвующий в белок-белковых взаимодействиях; PK (ПК) – протеинкиназа; PCA – рентгеноструктурный анализ.

Адрес для корреспонденции: NBGusev@mail.ru

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-00026.

[3]. Представители семейства 14-3-3 практически повсюду и выступают в роли регуляторов апоптоза, клеточного цикла, деления, транскрипции, репликации, функционирования ионных каналов и переносчиков, а также организации цитоскелета. Кроме того, в последнее время возросло число сообщений об участии 14-3-3 в развитии целого ряда нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Все это вызвало повышенный интерес к белкам этого семейства.

Данный обзор посвящен описанию структуры, свойств и механизмов регуляции активности белков семейства 14-3-3, а также анализу их взаимодействия с белками-субстратами и возможному участию в регуляции цитоскелета.

II. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА 14-3-3

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И НОМЕНКЛАТУРА

Белки семейства 14-3-3 были впервые обнаружены в 1967 году при систематической классификации белков нервной ткани [4]. Свое несколько странное название эти белки получили по номеру фракции при ионообменной хроматографии экстракта мозга крупного рогатого скота, наиболее обогащенной исследуемыми белками, и по положению этих белков при последующем электрофореze в крахмальном геле. Было установлено, что белки семейства 14-3-3 обладают низкой изоэлектрической точкой (4,0–4,5), что молекулярная масса мономера 14-3-3 составляет около 30 кДа и что эти белки в большом количестве экспрессируются в мозге [5].

Изначально считалось, что 14-3-3 в основном участвуют в регуляции синтеза нейротрансмиттеров. В 1987 году было установлено, что 14-3-3 активируют ключевые ферменты синтеза серотонина и катехоламинов – триптофан- и тирозинмонооксигеназы [6]. Анализируя белковый состав грубого препарата 14-3-3, гетерогенный образец белка, выделенного из мозга, подвергали фракционированию с помощью метода обратнофазной жидкостной хроматографии, и полученные изоформы обозначили греческими буквами (от α до σ) в соответствии с положением пиков на профиле элюции [7]. При таком разделении было выявлено 9 изоформ 14-3-3 – α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , τ (или θ), σ . Позднее было установлено, что α представляет собой фосфорилированную по Ser184 β изоформу, а δ не отличима от фосфорилированной по Ser184 ζ изоформы белка (в данной работе использована нумерация остатков аминокислот, соответствующая нумерация ζ изоформы 14-3-3 человека) [8].

Следует заметить, что помимо ставшего классическим обозначения «14-3-3» и соответствующей греческой буквы, обозначающей изоформу, представители этого семейства получали и дополнительные названия, отражавшие особенности их открытия. Например, Leonardo (14-3-3ε дрозофилы), Bilardo (14-3-3ζ дрозофилы), Stratifin (14-3-3σ), BAP-1 (14-3-3τ/θ), CBP (Cruciform-Binding Protein), KCIP-1 (protein kinase C inhibitor-1), Eho1 (стимулятор Ca²⁺-зависимого экзоцитоза), GF14 (G-box binding factor растений) и т.п. [5].

В начале 90-х годов XX века было установлено, что 14-3-3 могут подвергаться фосфорилированию [9], участвуют в регуляции активности некоторых протеинкиназ [10] и экспрессируются во многих тканях различных эукариот [11–13]. После этого белки 14-3-3 оказались в центре внимания многих лабораторий, и начался период их интенсивного изучения.

В 1995 году была установлена трехмерная структура ζ и τ изоформ 14-3-3 млекопитающих [14, 15]. Оказалось, что 14-3-3 существуют в виде димеров, причем мономеры 14-3-3 могут легко обмениваться, что приводит к образованию как гомо-, так и гетеродимеров указанного белка [16]. Позднее выяснилось, что димерная структура необходима для нормального функционирования 14-3-3, и дестабилизация димеров ослабляет их взаимодействие с белками-мишенями (Raf киназа и белок p53) [17, 18].

Успехи в исследовании структуры и свойств 14-3-3 привели к повышенному интересу к представителям этого семейства и к лавинообразному накоплению данных о белках-субстратах и процессах, в регуляции которых могут участвовать белки 14-3-3. В небольшом по объему обзоре невозможно перечислить все белки-субстраты или сколько-нибудь подробно обсудить возможное участие 14-3-3 в различных процессах, протекающих в клетке. По этой причине мы ограничимся только кратким описанием структуры и свойств белков семейства 14-3-3 и обсуждением некоторых аспектов регуляции цитоскелета и сократительного аппарата белками 14-3-3.

ИЗОФОРМЫ И ФИЛОГЕНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА 14-3-3

Белки 14-3-3 обнаружены практически во всех эукариотических организмах, причем почти у каждого представителя найдено не менее двух изоформ 14-3-3. Вероятно, только в двух случаях – у гриба *Candida albicans* и простейшего *Dictyostelium discoideum*, обнаружено по одной изоформе. Интересно отметить, что у *Drosophila* изначально была обнаружена только одна изоформа 14-3-3 [19], однако позже выяснилось, что и у *Drosophila* имеется как минимум две изоформы – ε и ζ [20].

Представители семейства 14-3-3 в высокой степени консервативны. Так, например, гомология 14-3-3 ζ шпорцевой лягушки *Xenopus tropicalis* и человека по данным выравнивания первичных структур с помощью программы *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) составляет около 90%. 14-3-3 ζ человека на 82% совпадает по последовательности со своим гомологом из тутового шелкопряда *Bombyx mori* и на 81% с аналогичной изоформой 14-3-3 дрозофилы [21]. 14-3-3 ω из растения *Arabidopsis thaliana* и его ближайший гомолог 14-3-3 человека идентичны на 75%. Следует отметить, что гомология изоформ 14-3-3, выделенных из тканей одного вида, еще более высока, и это создает значительные трудности при получении антител, специфичных к конкретным изоформам [19].

Как уже упоминалось, в тканях человека обнаружено 7 изоформ 14-3-3: бета (β), гамма (γ), эпсилон (ϵ), эта (η), сигма (σ), тау/тета (τ/θ) и дзета (ζ) [7]. Описанные ранее альфа (α) и дельта (δ) изоформы являются фосфорилированными производными бета (β) и дзета (ζ) изоформ, соответственно [8]. Изоформы 14-3-3 отличаются по структуре коротких варибельных участков, хотя они не являются продуктами альтернативного сплайсинга, и каждая изоформа кодируется отдельным геном [19].

Гены различных изоформ 14-3-3, как правило, расположены на разных хромосомах. Так, например, ген 14-3-3 η располагается на 22-ой, а 14-3-3 β – на 20-ой хромосоме человека [22]. С этим хорошо согласуются данные, полученные Айткеном при анализе базы данных генома человека (*Human Genome Database*), согласно которым изоформы β и η кодируются генами, расположенными на 20-ой и 22-ой хромосомах, соответственно, а гены σ расположены на 1-ой, τ/θ – на 2-ой, γ – на 7-ой, и ϵ – на 17-ой хромосомах. Основной ген, дающий полноценный продукт 14-3-3 ζ , локализован на 8-ой хромосоме [19]. Кроме «рабочих» генов в структуре хромосом человека обнаружено большое число псевдогенов, не участвующих в экспрессии функциональных белков [5]. Так, для ϵ изоформы обнаружены псевдогены, расположенные на 2-ой и 7-ой, а для ζ – на 5-ой, 6-ой, 9-ой, 11-ой и 15-ой хромосомах. Последовательность, соответствующая σ изоформе 14-3-3, также встречается в геноме человека более одного раза [19]. Проведенный нами с помощью программы *BLAT* интернет-ресурса *Human Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) поиск основных «рабочих» генов для разных изоформ 14-3-3 подтверждает наличие в геноме человека нескольких псевдогенов. Вероятно, такие формы последовательностей образовались при встраивании в хромосомы участков

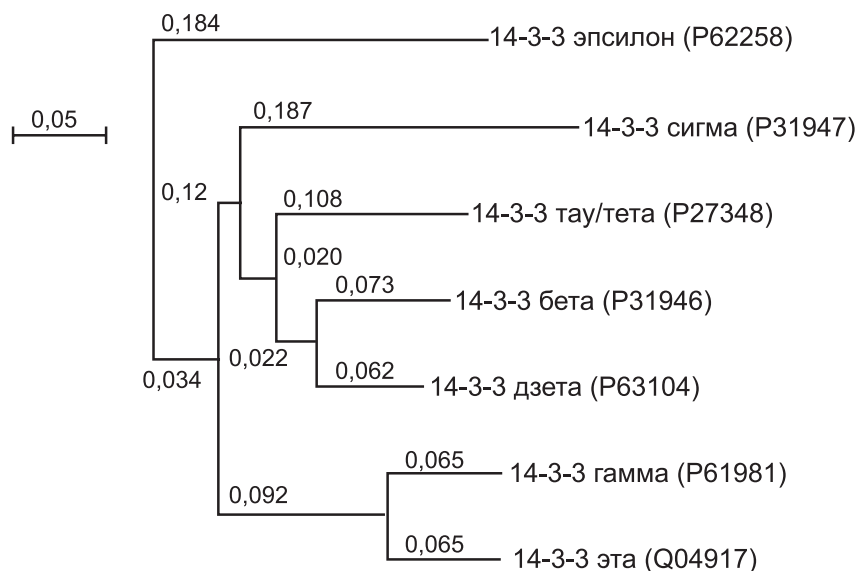


Рис. 1. Филогенетическое дерево семи изоформ 14-3-3 человека, построенное с помощью алгоритма *ClustalW*.

В скобках указаны идентификационные номера соответствующих изоформ в базе данных *UniprotKB*. Масштаб 0,05 обозначает число замен в эволюции последовательности предкового полипептида, приходящееся на один аминокислотный остаток.

ДНК, получаемых с помощью обратной транскриптазы ретровирусов из мРНК 14-3-3, имеющейся в клетке.

На рис. 1 представлено филогенетическое дерево, отражающее степень гомологии первичных структур различных изоформ 14-3-3 человека. Дерево построено на основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей с помощью программы *ClustalW v.1.83*, доступной в интернет (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). Выравнивание было проведено на базе матриц *gonnet* и *blosum* при параметрах *gap open* = 10 и *extension gap* = 0,05 и дало одинаковые для обеих матриц результаты, которые представлены в виде дерева в программе *NJplot* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>). Как видно из схемы, наиболее сходны между собой первичные структуры η и γ , β и ζ , а также σ и τ/θ изоформ. Представленные данные, по всей видимости, говорят о наличии общего предка, давшего начало шести изоформам 14-3-3. В то же время, ϵ изоформа принадлежит ветви эволюции, сильно обособленной от общего ствола $\eta/\gamma/\beta/\zeta/\sigma/\tau$. Считается, что последовательность 14-3-3 ϵ испытала

наибольшие изменения в ходе эволюции и в наибольшей степени отличается от остальных изоформ 14-3-3 человека [23].

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ 14-3-3 В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

Белки семейства 14-3-3 экспрессируются в организме человека повсеместно. Радиоиммунохимический метод позволил установить высокий уровень их экспрессии в экстрактах мозга, семенников и кишечника, где концентрация 14-3-3 превышает 0,5% растворимых белков и в мозге может достигать 1,3% от растворимых белков (т.е. около 40 мкМ в расчете на мономер) [1]. В то же время, в почках и гемолизате содержание 14-3-3 оказалась минимальным и составило всего около 0,008% от растворимых белков [1]. Методом иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга было установлено наличие всех 7 изоформ 14-3-3 в роговице и слизистой оболочке глаза, а также ζ и γ изоформ в слезной жидкости человека [24].

В настоящее время 14-3-3 рассматривается в качестве перспективного маркера различных нейродегенеративных и онкологических заболеваний [25, 26]. Действительно, оказалось, что концентрация 14-3-3 в спинномозговой жидкости сильно повышается при различных видах деменций, энцефалопатий и опухолях центральной нервной системы. Повышение концентрации 14-3-3 в ликворе отмечено также при болезни Крейтцфельда-Якоба [23, 27]. При туберкулезном менингите и множественном склерозе концентрация 14-3-3 в ликворе может достигать 100–130 нг/мл [1]. Концентрация 14-3-3 увеличивается также при некоторых формах рака [28–30]. Все это позволяет рассматривать 14-3-3 как перспективный белок-маркер различных заболеваний человека.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ 14-3-3

К настоящему времени определена структура всех семи изоформ 14-3-3 человека [31, 32]. Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) установлено, что субъединицы 14-3-3 образуют димер, по форме напоминающий несколько сплюснутую подкову с внутренним каналом глубиной около 20 Å и шириной около 35 Å (рис. 2) [14, 15]. Линейные размеры такой димерной структуры, вычисленные в программе *RuMOL v.1.1*. на основе данных РСА 14-3-3 ζ (идентификационный номер PDB *1QJB*), составляют около 55–60 Å в ширину, около 75–80 Å в длину и около 35–40 Å в высоту. Основным элементом структуры 14-3-3 являются α -спирали. По теоретическим предсказаниям, выполненным с помощью программ *Psipred* и *Sable2*, на долю α -спиралей приходится до 65–75% структуры 14-3-3. С этим

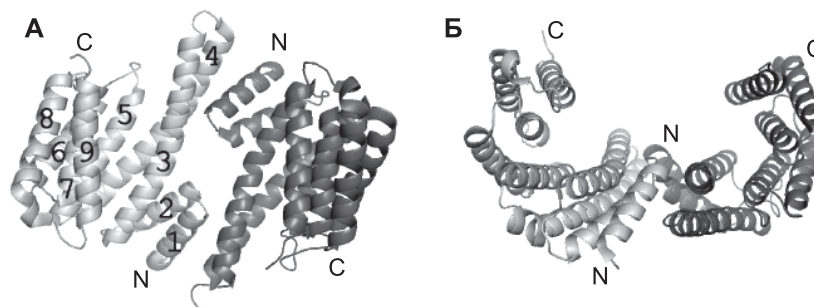


Рис. 2. α -Спиральная структура димера 14-3-3.

Построено в программе *PyMOL* на основе рентгеноструктурных данных 14-3-3 ζ (PDB *1QJB*). А – вид на димер «сверху», Б – вид на димер «сбоку». Две субъединицы отмечены темно- и светло-серым цветом. Цифрами обозначены номера α -спиралей в составе мономера 14-3-3.

заключением хорошо согласуются экспериментальные данные, полученные методом кругового дихроизма [33, 34], а также данные рентгеноструктурного анализа (PDB *1QJB*), свидетельствующие о том, что около 70% структуры 14-3-3 представлено α -спиралями.

Каждый мономер 14-3-3 построен из 9 α -спиралей, пронумерованных арабскими цифрами от N-концевой $\alpha 1$ до C-концевой $\alpha 9$ (рис. 2). Спирали $\alpha 5$ – $\alpha 9$ формируют боковые стенки чашеобразного димера. Аминокислотные остатки $\alpha 1$ – $\alpha 4$ спиралей образуют «дно» димера и область контакта субъединиц, при этом $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спирали одной полипептидной цепи контактируют с $\alpha 3$ и $\alpha 4$ спиралями другой цепи, таким образом, что субъединицы в димере 14-3-3 оказываются расположенными антипараллельно. Спирали $\alpha 3$ и $\alpha 4$ являются самыми протяженными, их длина составляет около 55 Å, в то время как $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спирали – самые короткие и не превышают 25 Å в длину (рис. 2).

Как уже отмечалось, для нормального функционирования 14-3-3 необходима димерная структура. Стабилизация димерного состояния 14-3-3 ζ , по всей вероятности, осуществляется тремя солевыми «мостиками» – Arg18-Glu89, Glu5-Lys74, Asp21-Lys85 (в димере 6 таких «мостов») и несколькими слабополярными или гидрофобными взаимодействиями, в которых участвуют остатки Leu12, Ala16, Ser58, Val62, Ile65 и Tyr82 (рис. 3) [32]. Первый солевой «мостик» Arg18-Glu89 и все слабые контакты, указанные выше, присутствуют в структуре гомодимеров всех изоформ 14-3-3 человека, второй «мостик» Glu5-Lys74 отсутствует у σ , η , ϵ и γ изоформ. Третий «мостик» Asp21-Lys85 участвует в формировании димеров всех изоформ, за исключением ϵ . Для σ изоформы отмечено образование

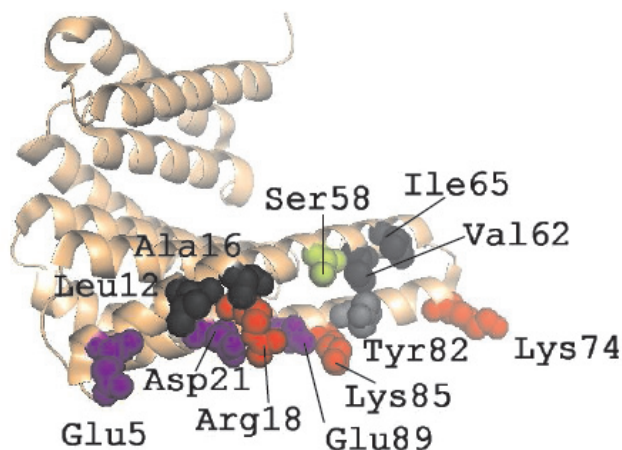


Рис. 3. Область контакта субъединиц 14-3-3 ζ .

Построено в программе *Pymol* на основе рентгеноструктурных данных 14-3-3 ζ (PDB *1QJB*). Мономер 14-3-3 показан бежевыми спиралями, незаряженные аминокислотные остатки, участвующие в димеризации, отмечены черным и серым, остаток серина-58, вовлеченный в регуляцию димерного состояния 14-3-3, отмечен зеленым цветом. Остатки, образующие солевые «мостики» между мономерами 14-3-3, отмечены красным (положительно заряженные) и фиолетовым (отрицательно заряженные) цветом.

альтернативного солевого «мостика» Lys9-Glu83 [32]. Данные ПСА были подтверждены результатами, полученными с использованием точечного мутагенеза. Так, было установлено, что мутации остатков 5 и 12 в $\alpha 1$ -, а также остатков 82, 85 и 87 в $\alpha 4$ -спиралях 14-3-3 ζ приводят к нарушению межсубъединичных контактов в этом белке [35]. Сходные результаты были получены и при анализе структуры σ изоформы. Оказалось, что мутирование остатков 5 в $\alpha 1$ -, 20 в $\alpha 2$ -, а также 55 в $\alpha 3$ - и 80 в $\alpha 4$ -спиралях приводит к изменению межсубъединичных контактов для этой изоформы 14-3-3 и изменению взаимодействия σ изоформы с другими изоформами этого белка [35]. По мнению многих исследователей, важную роль в формировании димеров 14-3-3 играет остаток Ser58 (рис. 3), расположенный на $\alpha 3$ -спирали каждого мономера ζ , β , ϵ , γ и η изоформ (изоформы σ и τ в данном положении имеют аланин). В разных лабораториях было показано, что фосфорилирование этого остатка может сильно сказываться на состоянии димера 14-3-3 [18, 36, 37].

Высказано предположение о том, что одним из факторов, влияющих на специфичность изоформ 14-3-3 при взаимодействии с определенными субстратами, является способность белков 14-3-3

к образованию гомо- и гетеродимеров различного состава [16, 35]. При этом оказалось, что лишь определенные изоформы 14-3-3 способны образовывать гетеродимеры. Например, в области димеризации молекулы 14-3-3 σ были выявлены неконсервативные остатки Ser5, Glu20, Phe25, Gln55 и Glu80, обеспечивающие формирование гомодимеров, но препятствующие образованию гетеродимеров. Эта структурная особенность приводит к уникальности свойств 14-3-3 σ [35, 38].

Существует гипотеза, согласно которой способность 14-3-3 образовывать гетеродимеры из мономеров различных изоформ значительно расширяет круг потенциальных белков-партнеров 14-3-3. Возможно, что образование гетеродимеров из ϵ и ζ или из τ и ζ изоформ необходимо для связывания определенных субстратов или открывает возможность для взаимодействия таких белков-партнеров, которые сами по себе не взаимодействуют друг с другом. Так, например, Лианг и соавт. показали, что для связывания белка Nedd4-2, имеющего несколько участков связывания 14-3-3 и принимающего участие в альдостерон-опосредованной регуляции натриевых каналов, необходимо образование именно гетеродимеров β и ϵ изоформ 14-3-3 [39]. Формирование гетеродимеров 14-3-3 также необходимо для связывания крестообразных структур ДНК, часто расположенных вблизи точек начала репликации, и, частично определяющих уровень репликации [40].

Анализ первичных структур с целью поиска сходных доменов, проведенный нами с помощью программы *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>), не выявил сколько-нибудь существенного сходства белков семейства 14-3-3 с доменами других белков, имеющих в обширной составной базе данных InterPro. Тем не менее, Остреровой и соавт. было показано, что представители семейства 14-3-3 обладают некоторой гомологией с белком синуклеином, в большом количестве присутствующим в мозге. Анализ первичной структуры 14-3-3 и синуклеинов позволил выявить два коротких участка, имеющих гомологию около 40% [41]. Кроме того, было обнаружено, что синуклеин и 14-3-3 взаимодействуют между собой и способны связывать одни и те же белки-мишени, такие как протеинкиназа C и Bad. Исходя из этих данных, было высказано предположение о том, что 14-3-3 и синуклеины обладают сходными функциями [41].

В определенном противоречии с этим находятся результаты корейских исследователей [42], обнаруживших сходство в структуре совершенно других участков синуклеина и 14-3-3. Выявленные в этой работе последовательности 14-3-3 и синуклеина имеют определенное

сходство с α -кристаллиновым доменом малых белков теплового шока. Вероятно, именно по этой причине и синуклеин, и 14-3-3 могут обладать шапероноподобной активностью [42].

Недавно было показано, что в структуре 14-3-3 GF14 ω (general factor 14-omega) растений, гомологичного 14-3-3 ζ человека, имеется последовательность, напоминающая каноническую «EF-руку», эффективно связывающую ионы двухвалентных металлов (Ca^{2+} и Mg^{2+}) [43]. При сравнении первичных структур указанных белков с помощью программы *BLAST* в 14-3-3 ζ нами также была обнаружена последовательность –ELDTLSEESYKD–, совпадающая с последовательностью в GF14 ω и отдаленно напоминающая «EF-руку». Тем не менее, экспериментальные данные, полученные в группе Аиткена, свидетельствуют о том, что белки 14-3-3 не способны связывать ионы кальция [33].

При сравнении структур 14-3-3, p53 и I κ B α было обнаружено, что в α 9-спирали, расположенной на С-конце молекул всех изоформ 14-3-3, человека имеется 13-членный пептид, первичная структура которого соответствует канонической NES (Nuclear Export Sequence) последовательности, являющейся сигналом экспорта из ядра [44]. Было высказано предположение о том, что наличие данного сигнала обуславливает способность 14-3-3 связывать другие белки в цитоплазме [44, 45]. Однако позднее выяснилось, что представители семейства 14-3-3 не содержат функциональной последовательности NES, а регуляция транспорта белков между ядром и цитоплазмой, опосредованная 14-3-3, осуществляется только за счет экранирования или экспонирования соответствующих сигналов на поверхности белков-субстратов [32, 46]. Поиски в структуре 14-3-3 характерной последовательности NLS (Nuclear Localization Sequence), которая определяет перемещение белков в ядро, не увенчались успехом [47]. Некоторые авторы полагают, что способность 14-3-3 проникать в ядро обусловлена образованием прочных комплексов 14-3-3 с белками-субстратами, обладающими NLS-последовательностью и легко переносимыми белок-импортирующей системой ядра. С другой стороны, нельзя исключить вероятность того, что в структуре 14-3-3 имеется некая нестандартная последовательность, ответственная за перемещение из цитоплазмы в клеточное ядро, которую пока не удалось обнаружить [48].

Поиск доменов, сходных с определенными участками 14-3-3 по третичной структуре выявил в С-концевой области 14-3-3 так называемый TPR-домен (Tetratricopeptide Repeat Domain) [49]. Такие модули в составе разных белков выделяются как на основании сходства

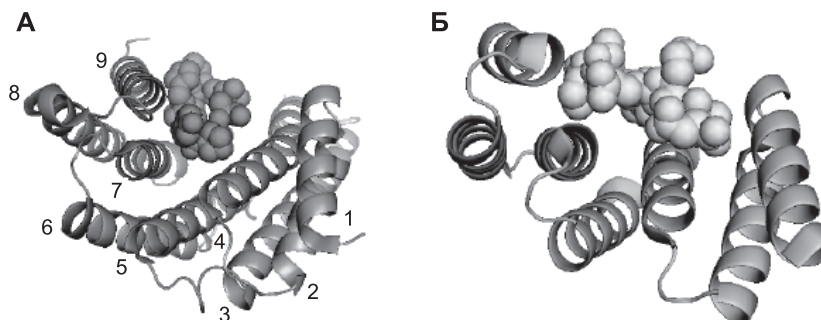


Рис. 4. Сравнение третичных структур мономера 14-3-3, связывающего фосфопептид (А), с TPR-доменом Нор-белка, взаимодействующего с фрагментом Hsp70 (Б).

Для построения использована программа *RyMOL* и рентгеноструктурные данные 14-3-3 (PDB *1QJB*) и Нор (PDB *1ELW*). α -Спирали 14-3-3 (пронумерованные от 1 до 9), а также белок Нор, изображены в виде ленточной модели, сферами отмечены связываемые лиганды.

первичной, так и вторичной и третичной структур. Элементарной единицей TPR-доменов, как правило, являются 34-аминокислотные повторы, которые образуют пары антипараллельных α -спиралей, разделенных поворотом. Наличие большого числа таких повторов может приводить к формированию нескольких α -спиралей, которые оказываются повернутыми друг относительно друга на определенный угол. На рис. 4 в качестве примера представлено сравнение структуры мономера 14-3-3 с фрагментом TPR-домена белка p60, или Нор, связывающего между собой шапероны Hsp70 и Hsp90.

Подобные элементы третичной структуры идеально подходят для связывания самых разнообразных лигандов и обнаружены более чем у 800 белков, выполняющих различные функции (http://pawsonlab.mshri.on.ca/index.php?option=com_content&task=view&Itemid=64&id=183). По всей видимости, TPR-домены 14-3-3, построенные за счет С-концевых α -спиралей взаимодействующих субъединиц, принимают участие в позиционировании белков-мишеней при связывании их во внутреннем канале 14-3-3 (см. ниже).

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ РЕГУЛЯЦИИ 14-3-3

Функционирование белков 14-3-3 может регулироваться различными способами. Во-первых, регуляция может осуществляться путем изменения содержания 14-3-3 в клетке. На клеточных моделях было обнаружено, что оверэкспрессия 14-3-3 может повышать сум-

марную активность Raf-1 и снижать активность протеинкиназы С [50]. Как уже упоминалось, подавление экспрессии 14-3-3, по крайней мере, σ изоформы, приводит к развитию целого ряда онкологических заболеваний, однако иногда серьезные повреждения ДНК могут, наоборот, вызывать p53-опосредованную индукцию синтеза 14-3-3 σ [50]. Во-вторых, некоторые изоформы 14-3-3 могут выступать в качестве субстратов каспаз. Ограниченный протеолиз этих изоформ 14-3-3 ведет к освобождению связанных с ними проапоптотических белков (Bad и Bax), в результате чего могут инициироваться процессы апоптоза [51, 52]. В-третьих, 14-3-3 могут подвергаться различным видам посттрансляционных модификаций. Например, ацетилирование остатков лизина 14-3-3, вовлеченных во взаимодействие с белками-субстратами, может существенно влиять на белок-белковые взаимодействия [53]. Кроме того, установлено, что белки семейства 14-3-3 содержат в своем составе несколько участков, фосфорилируемых различными протеинкиназами. Протеинкиназы SDK1 (продукт каспазного расщепления δ изоформы протеинкиназы С) [54], протеинкиназа А (РКА), активированная сфингозином (но не cAMP) [55], некоторые изоформы протеинкиназы С [5], протеинкиназа В (PKB/Akt) [56], а также протеинкиназы JNK [57], Bcr (продукт онкогена Breakpoint cluster region protein) [58] и α изоформа кazeинкиназы I (CKI) [59] могут фосфорилировать остатки Ser58, Ser63, Ser184 и Thr232 в составе 14-3-3. По всей вероятности, фосфорилирование влияет на структуру и свойства белков семейства 14-3-3. Однако, несмотря на то, что за последнее время в этой области было накоплено большое количество экспериментальных данных, ясной картины регуляции функционирования 14-3-3 путем фосфорилирования до сих пор не существует.

Проанализируем влияние фосфорилирования различных участков на структуру и свойства 14-3-3. Установлено, что степень фосфорилирования Ser63 достаточно мала, и изучение фосфорилирования по этому участку не представляет большого интереса [60]. В то же время, остатки Ser58, Ser184 и Thr232 эффективно фосфорилируются *in vivo* [8, 54, 59], поэтому исследование роли фосфорилирования именно этих остатков в структуре 14-3-3 представляет особый интерес. Следует отметить, что перечисленные остатки не абсолютно консервативны, и поэтому не все изоформы 14-3-3 содержат Ser/Thr в указанных положениях, и, следовательно, не все изоформы могут фосфорилироваться по гомологичным центрам. Кроме того, известны случаи, когда из-за различий в первичной структуре изоформ 14-3-3

один и тот же фермент (SDK1) фосфорилирует Ser58 в 14-3-3 ζ и не способен фосфорилировать аналогичные остатки в ϵ и γ изоформах 14-3-3 [54].

Рассмотрим более подробно фосфорилирование 14-3-3 по каждому из упомянутых участков. Нет сомнения в том, что Ser58 14-3-3 может фосфорилироваться под действием нескольких протеинкиназ как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*. В то же время, в литературе нет единой точки зрения на то, каким образом фосфорилирование Ser58 влияет на структуру и свойства 14-3-3. По данным Пауэлла и соавт. [56], протеинкиназа В (PKB/Akt) фосфорилирует Ser58 14-3-3 ζ , и такая модификация не влияет на стабильность димеров 14-3-3. Эти результаты находятся в определенном противоречии с более поздними данными. Так, например, Гу с соавт. [18] и Пауэлл с соавт. [36] обнаружили, что фосфорилирование Ser58 в 14-3-3 ζ , катализируемое PKA или MAPKAP2, или введение мутации S58E/D, имитирующей фосфорилирование, приводит к диссоциации димеров и накоплению мономеров 14-3-3. Таким образом, было постулировано, что остаток Ser58, находящийся в области контакта субъединиц 14-3-3 (рис. 3), играет важную роль в обеспечении димерного состояния 14-3-3. Исследование точечного мутанта S58E, имитирующего фосфорилирование ζ изоформы 14-3-3, проведенное в нашей лаборатории [34], также показало, что замена остатка серина на остаток глутаминовой кислоты приводит к диссоциации димеров 14-3-3, снижает термостабильность 14-3-3 и понижает его устойчивость к протеолитическому расщеплению. Указанные изменения особенно заметны при низкой концентрации белка и могут свидетельствовать о том, что фосфорилирование Ser58, действительно, провоцирует диссоциацию димеров 14-3-3 и, вероятно, приводит к дестабилизации образующихся мономеров. Параллельно было установлено, что фосфорилирование Ser58 не только приводит к диссоциации 14-3-3, но и значительно ослабляет взаимодействие 14-3-3 с транскрипционным фактором p53 [18]. Мутация S58D, имитирующая фосфорилирование 14-3-3, также сильно ослабляла связывание 14-3-3 ζ с Raf-1 [36] и циклином D1 [61]. По всей видимости, ослабление связывания белков-субстратов обусловлено тем, что только димеры 14-3-3 способны образовывать прочные комплексы с белками-мишенями. Вероятно, потребуются дополнительные усилия для того, чтобы подробно выяснить роль фосфорилирования Ser58 в регуляции активности 14-3-3.

Изучение физико-химических свойств точечного мутанта S184E, имитирующего фосфорилирование 14-3-3 ζ , показало, что указанная

мутация повышает термостабильность и незначительно увеличивает радиус Стокса 14-3-3, не влияя при этом на димерную структуру белка и его устойчивость к протеолизу [34]. Фосфорилирование Ser184, по-видимому, не сопровождается большими изменениями структуры белка. Тем не менее, фосфорилирование 14-3-3 ζ по Ser184 под действием c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), активируемой в клетке при сильных повреждениях ДНК, вызывает диссоциацию проапоптотического белка Вах из его комплекса с 14-3-3. Свободный Вах мигрирует к мембране митохондрий, резко увеличивает ее проницаемость и вызывает апоптоз [57]. Помимо этого, фосфорилирование 14-3-3 ζ под действием JNK вызывает диссоциацию связанных с ним белков Bad, c-Abl и FOXO3a, что также делает клетки более подверженными апоптозу. При этом Bad, также как и Вах, перемещается к митохондриальной мембране, а транскрипционный фактор FOXO3a и тирозинкиназа c-Abl мигрируют в клеточное ядро, где в ответ на повреждения ДНК запускают транскрипцию других проапоптотических белков, что, в конечном счете, приводит к апоптозу [62]. С другой стороны, известны случаи, когда модификация Ser184, наоборот, приводит к увеличению сродства 14-3-3 к белкам-субстратам. Например, установлено, что фосфорилирование Ser184 увеличивает прочность комплексов 14-3-3 с протеинкиназой С, что может существенно влиять на ее активность [63].

Исследование физико-химических свойств точечного мутанта T232E, имитирующего фосфорилирование 14-3-3 ζ , показало, что замена фосфорилируемого остатка треонина на остаток глутаминовой кислоты вызывает лишь небольшое увеличение радиуса Стокса и коэффициента седиментации и не сопровождается значительными изменениями вторичной, третичной или четвертичной структуры, термостабильности или устойчивости к протеолизу [34]. Тем не менее, фосфорилирование Thr232, расположенного в С-концевой области, приводит к ослаблению взаимодействия 14-3-3 с различными субстратами. Возможно это связано с тем, что С-концевые участки мономеров 14-3-3 могут «свешиваться» во внутренний канал 14-3-3 и взаимодействовать с участками, в которых обычно происходит связывание белков-субстратов (см. ниже) [15, 64]. Высказывается предположение, что такой эффект «автоингибирования» может модулироваться путем фосфорилирования Thr232, приводящего к переориентации С-концевой части 14-3-3 [65]. В ходе циркадных ритмов может происходить циклическое фосфорилирование Thr232, вследствие которого 14-3-3 частично теряет способность активировать AANAT (ArylAlkylamine N-AcetylTransferase), и превращение

серотонина в мелатонин замедляется [65]. Установлено также, что фосфорилирование Thr232 препятствует нормальному связыванию 14-3-3 с cRaf [59]. Изменение взаимодействия 14-3-3 с cRaf может играть важную роль в регуляции Ras/Raf сигнального пути.

Подводя итог, можно заключить, что фосфорилирование влияет на физико-химические свойства 14-3-3 и может регулировать взаимодействие 14-3-3 с белками-мишенями. В то же время, стоит подчеркнуть, что основным способом регуляции взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами является фосфорилирование белков-партнеров, формирующее в их составе специфические участки, которые «узнаются» и прочно связываются с белками 14-3-3.

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 14-3-3 С БЕЛКАМИ-МИШЕНЯМИ. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, УЗНАВАЕМЫЕ 14-3-3

Многочисленные исследования показали, что фосфорилирование различных белков по остаткам Ser и Thr приводит к усилению их связывания с 14-3-3. К настоящему времени благодаря протеомным исследованиям выявлено более 300 белков-партнеров 14-3-3 [3]. Оказалось, что взаимодействие 14-3-3 с другими белками происходит на основе узнавания определенных консенсусных последовательностей в составе молекул-лигандов. Представители семейства 14-3-3 прочно связываются с самыми разнообразными белками, в структуре которых встречается хотя бы один из двух мотивов, содержащих фосфосерин (pS), – RSXpSXP (мотив I) или RX(Y/F)XpSXP (мотив II). Остаток серина в указанных мотивах может быть заменен на фосфорилируемый остаток треонина [66]. Помимо этого, описан так называемый мотив III, узнаваемый белками 14-3-3. Структура этого мотива может быть представлена в виде $\text{pSX}_{1-2}\text{-COOH}$, где X – любая аминокислота, кроме пролина, расположенная на С-конце некоторых молекул-партнеров 14-3-3 [67]. Высказывается предположение о том, что если участок связывания 14-3-3 находится в середине молекулы субстрата, то в положении +2 относительно фосфорилированного остатка серина/треонина должен находиться остаток пролина (или глицина) (мотивы I и II). Наличие остатков пролина (или глицина) в указанных положениях обеспечивает излом (или достаточную подвижность) полипептидной цепи, необходимые для того, чтобы фосфорилированный участок смог поместиться в канале 14-3-3. В случае мотива III участок связывания располагается на С-конце белка-мишени и поэтому не требует наличия пролина (или глицина) в положении +2 от фосфорилируемых остатков серина или треонина и значительно расширяет репертуар белков, взаимодействующих с 14-3-3 [67].

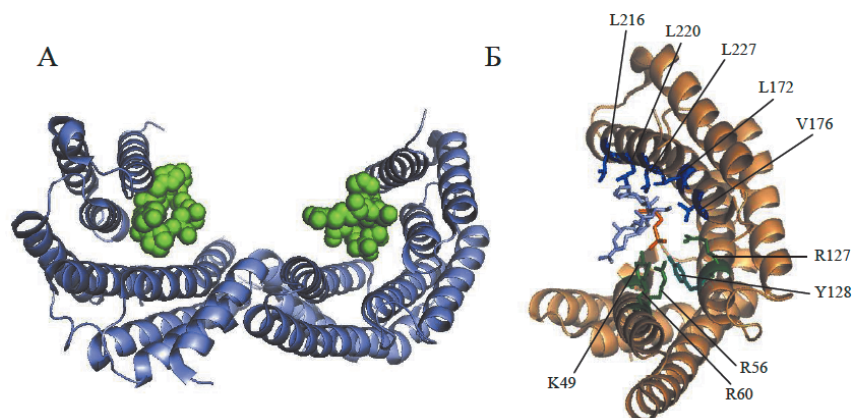


Рис. 5. Образование комплекса между 14-3-3 и фосфопептидами.

Построено в программе *PuMOL* на основе рентгеноструктурных данных 14-3-3 ζ (PDB *1QJB*). А – спиральная модель комплекса димера 14-3-3 ζ (серые спирали) с двумя связанными фосфопептидами (отмечены зеленым). Б – устройство амфипатического желобка мономера 14-3-3 (бежевые спирали), внутри которого происходит связывание лигандов. Аминокислотные остатки гидрофобной поверхности желобка отмечены синим цветом, остатки положительно заряженного «кармана» – зеленым. Нумерация остатков соответствует ζ изоформе 14-3-3. Фосфорилированный остаток в составе лиганда показан оранжевым, остальная часть фосфопептида отмечена серым.

Интересно отметить, что помимо остатка Ser/Thr, занимающего центральное положение в мотивах I и II, остаток серина в положении -2 также может фосфорилироваться. Такой достаточно экзотический способ регуляции был описан при изучении взаимодействия 14-3-3 с p53 и CDC25C, при этом фосфорилирование остатка в положении -2 приводило к ослаблению связывания 14-3-3 [68].

Благодаря использованию модельных фосфопептидов и точечного мутагенеза были не только установлены сами консенсусные последовательности, с которыми предпочтительно взаимодействуют 14-3-3, но также были определены те аминокислотные остатки 14-3-3, которые участвуют в их связывании (рис. 5) [44, 69].

Оказалось, что в связывании фосфопептида участвуют аминокислотные остатки амфипатического желобка (рис. 5А), который имеется в структуре каждого L-образного мономера 14-3-3. Главную роль в удерживании фосфопептида субстратного белка играет специальный «карман», построенный с участием положительно заряженных аминокислот K49, R56, R60 и R127, а также остатка Y128. Эти остатки участвуют в координации фосфосерина -pS- в составе связываемого

пептида (рис. 5Б) [15, 32]. Жанг и соавт. продемонстрировали необходимость указанных остатков для взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами на примере белков Raf-1 и ExoS [69]. За позиционирование молекулы субстрата и за стабилизацию образованного комплекса отвечают гидрофобные остатки спиралей α -5, 7 и 9, расположенные на внутренней поверхности стенок димеров 14-3-3 (рис. 5Б) [15]. Мутирование остатков Leu172, Val176 и Leu220, принадлежащих α 9-спирали, приводит к сильному ослаблению взаимодействия 14-3-3 с Raf-1 [70]. Замены Leu216 и Leu227 также приводят к ослаблению связывания Raf-1 с 14-3-3, но в меньшей степени [70]. Аминокислотные остатки, «выстилающие» внутреннюю поверхность димеров 14-3-3, в высокой степени консервативны [15, 19]. По-видимому, это говорит об общем принципе узнавания лигандов белками семейства 14-3-3 [5].

Как уже отмечалось, 14-3-3 образует устойчивый димер, содержащий в своей структуре два потенциальных участка связывания белков-субстратов. Это позволяет 14-3-3 одновременно связывать два разных белка-субстрата или кооперативно связывать один белок-субстрат, имеющий два центра связывания с 14-3-3. Яффе и соавт. установили, что наличие в структуре связываемого лиганда сразу двух участков, содержащих фосфосерин и способных взаимодействовать с 14-3-3, увеличивает прочность комплексов более чем в 30 раз [66]. Аналогичные результаты были получены Обзилем и соавт., которые показали, что фосфорилированный по остаткам Thr28 и Ser193 фрагмент фактора транскрипции FOXO4₁₁₋₂₁₃ связывается с димером 14-3-3 с очень высоким сродством (K_d около 30 нМ), в то время как сродство фосфорилированного только по одному из указанных остатков FOXO4₁₁₋₂₁₃ к 14-3-3 как минимум на порядок ниже (K_d 290–650 нМ) [71]. Фосфорилирование сразу двух остатков Ser346 и Ser368 в составе протеинкиназы C (PKC ϵ) приводит к значительному усилению связывания с 14-3-3, по сравнению со связыванием фермента, фосфорилированного только по одному из указанных центров [72].

Белки-партнеры могут содержать один или несколько участков, узнаваемых 14-3-3. Высказывается предположение, что наличие в структуре белка-мишени одного из центров, имеющих структуру, сходную с упомянутыми выше консенсусными последовательностями, обеспечивает «рекрутирование» 14-3-3 (т.н. «gatekeeper phosphorylation site»). При этом образуется не очень прочный комплекс, в котором 14-3-3 не оказывает достаточно сильного влияния на структуру и свойства белка-партнера. Если же в структуре белка-партнера

есть второй центр связывания 14-3-3, то прочность комплекса резко возрастает и параллельно с этим увеличивается влияние 14-3-3 на структуру и свойства белка-партнера [73].

Большинство белков, взаимодействующих с 14-3-3, имеют указанные выше (или хотя бы сходные с ними по первичной структуре) мотивы, содержащие фосфосерин. В то же время в литературе описано довольно много белков, не содержащих в своей структуре описанных выше мотивов, и даже не имеющих в своем составе фосфорилируемых остатков Ser или Thr, и тем не менее образующих прочные комплексы с 14-3-3. В качестве примера такого взаимодействия можно упомянуть токсичный экзонзим S (ExoS) (ADP-рибозилтрансфераза) из *Pseudomonas aeruginosa*, который связывается с 14-3-3 за счет последовательности ⁴²⁴DALDL⁴²⁸ [74], не похожей на консенсусный участок связывания. Другими примерами могут быть фосфатаза CDC25B [75] и протеинкиназа SGK1, активируемая сывороткой и глюкокортикоидами [48], связывание которых с 14-3-3 не зависит от фосфорилирования.

В структуре 14-3-3, по-видимому, есть несколько центров, принимающих участие в связывании белков-мишеней. Например, оказалось, что молекула 14-3-3 обладает дополнительным участком, расположенным в 7-ой α -спирали (остатки 163–187), который вовлечен во взаимодействие с Raf-киназой [76]. Связывание фосфорилированной триптофангидроксилазы обеспечивается в основном за счет контактов, образуемых остатками 171–213 η изоформы 14-3-3 [77], т.е. за счет остатков, удаленных от описанного выше традиционного центра связывания фосфопептидов. Наконец, взаимодействие 14-3-3 с тромбоцитарным рецептором фактора фон Виллебранда (GPIb-IX комплексом и цитоплазматическим доменом GPIb α) происходит в участке α 9-спирали 14-3-3 (остатки 202–231), существенно отличающемся от того, который определяет связывание консенсусных последовательностей, содержащих фосфосерин/фосфотreonин [76].

Таким образом, в структуре 14-3-3 имеется несколько разных участков связывания белков-субстратов, причем принципы связывания в этих участках могут довольно заметно отличаться друг от друга. Все это может быть обусловлено многоточечным характером белок-белковых взаимодействий и существенной разницей в структуре и свойствах белков-субстратов, взаимодействующих с 14-3-3.

III. УЧАСТИЕ 14-3-3 В РЕГУЛЯЦИИ БЕЛКОВ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА И ЦИТОСКЕЛЕТА

Как уже отмечалось ранее, белки семейства 14-3-3 способны взаимодействовать с более чем 300 белками-мишенями, отвечающими за выполнение многочисленных и разнообразных функций внутри клетки [3]. Мы ограничимся только рассмотрением взаимодействия 14-3-3 с различными белками, формирующими цитоскелет или участвующими в прикреплении цитоскелета к мембране или внеклеточному матриксу. Следует особо подчеркнуть, что имеющиеся в литературе данные не только очень обширны, но и довольно противоречивы. Это зачастую объясняется различием методов, используемых для исследования взаимодействия 14-3-3 с белками-мишенями, которые достаточно разнообразны и не всегда сопоставимы между собой. Например, существует набор методов протеомики, которые позволяют просто констатировать возможность взаимодействия 14-3-3 с тем или иным белком. При этом остается открытым вопрос о том, реализуется ли подобное взаимодействие в клетке и каков результат такого взаимодействия. С другой стороны, разработаны и широко используются биохимические и иммунохимические методы, которые зачастую используются в условиях *in vitro*. Такие методы позволяют детально исследовать белок-белковые взаимодействия и подробно проанализировать полученные результаты. Однако подобные подходы не могут гарантировать, что исследуемые процессы, действительно, протекают в клетке и играют существенную роль в ее жизнедеятельности.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 14-3-3 С БЕЛКАМИ, СВЯЗАННЫМИ С АКТИНОВЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ

Исследования, выполненные с помощью современных протеомных методов, свидетельствуют о том, что 14-3-3 может взаимодействовать с актином [78, 79]. Кроме того, данные, полученные с использованием флуоресцентной и конфокальной микроскопии, свидетельствуют о том, что в астроцитах 14-3-3γ локализуется в непосредственной близости от актиновых филаментов, и ишемия или апоптоз сопровождаются изменениями в связывании 14-3-3 с фибриллярным актином [80]. Хотя эти морфологические данные зачастую интерпретируются как прямое доказательство взаимодействия 14-3-3 с актином, нам кажется, что такого рода заключение преждевременно. Совпадение локализации может быть обусловлено не с тем, что 14-3-3 напрямую взаимодействует с актином, а с тем, что 14-3-3 связывается с какими-то актин-связывающими белками, расположенными вдоль актинового

филамента. С этим заключением согласуются данные Биркенфельд и соавт. [81], которые подтверждают, что в клетке 14-3-3 и фибриллярный актин располагаются в непосредственной близости, однако все попытки выявить прямое взаимодействие 14-3-3 с актином путем соосаждения фибриллярного актина и рекомбинантного 14-3-3 не увенчались успехом. По мнению авторов [81] это свидетельствует в пользу того, что 14-3-3 связывается не только и не столько непосредственно с актином, сколько с определенными актин-связывающими белками.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 14-3-3 С БЕЛКАМИ, УЧАСТВУЮЩИМИ
В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ
И ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ АКТИНА

Наиболее подробно исследовано взаимодействие 14-3-3 с белками, относящимися к группе ADF (Actin-Depolymerizing Factor), и, в частности, с кофилином. Кофилин, небольшой белок с молекулярной массой 21 кДа, может связываться с фибриллярным актином, изменять структуру мономеров актина, входящих в состав F-актина, и тем самым дестабилизировать актиновый филамент [82]. Таким образом, кофилин с одной стороны способствует фрагментации актиновых филаментов, а с другой – способствует накоплению коротких филаментов, которые могут использоваться в качестве «затравки» для сборки новых актиновых филаментов. Кофилин может фосфорилироваться LIM-киназами I и II (LIMK I, LIMK II) и тестикулярной протеинкиназой (TESK) по Ser3 [82, 83]. Эффективность фосфорилирования кофилина достаточно высока и около 30% белка в клетках мозга может находиться в фосфорилированном состоянии [82].

Фосфорилированный кофилин не связывается с фибриллярным актином и не способен вызывать фрагментацию F-актина. Исследования последних лет показали, что 14-3-3 связывает фосфорилированный кофилин и препятствует его дефосфорилированию под действием протеинфосфатаз [81, 84]. Таким образом, 14-3-3 как бы консервирует кофилин в фосфорилированном состоянии, способствуя тем самым стабилизации актиновых филаментов. Связывание фосфорилированного кофилина 14-3-3 может оказывать существенное влияние на перестройку актинового цитоскелета в неммышечных клетках и, возможно, играет важную роль в зависимой от цитоскелета кластеризации рецепторов ацетилхолина при формировании синапсов [85]. В то же время, вопрос о том, участвует ли 14-3-3 в кофилин-зависимой перестройке актинового цитоскелета гладких или поперечно-полосатых мышц, остается, как нам кажется, до конца не выясненным. Поскольку в мышечных клетках концентрация F-актина очень высока,

довольно трудно предсказать, насколько ощутимым будет эффект кофилина (только часть которого находится в фосфорилированном состоянии) на сборку и/или разборку сократительного аппарата и цитоскелета.

Регуляция актинового цитоскелета кофилином еще более осложняется при анализе влияния фосфатаз, вовлеченных в дефосфорилирование кофилина. Семейство слингшот (slingshot) протеинфосфатаз и протеинфосфатаза хронофин (chronophin) участвуют в дефосфорилировании фосфорилированного кофилина [83]. Протеинфосфатазы слингшот связаны с F-актином и за счет этого они могут эффективно дефосфорилировать кофилин, что приводит к фрагментации актиновых филаментов [86]. Кроме того, слингшот фосфорилируется под действием p21-активируемой протеинкиназы (РАК4) [86], а также под действием протеинкиназы D1 [87]. Это фосфорилирование делает возможным взаимодействие фосфорилированной слингшот с 14-3-3, который препятствует прикреплению слингшот к актиновому филаменту [86–88] (см. рис. 6). Создается впечатление, что 14-3-3 способен ингибировать фосфатазную активность слингшот как за счет удаления фосфорилированного слингшот с актинового филамента, так и за счет прямого подавления активности данной фосфатазы [86, 89].

p21-активируемая протеинкиназа РАК4, а также МАРКАР-киназа 2 способны фосфорилировать и активировать LIM-киназу [86, 90]. LIM-киназа взаимодействует с 14-3-3, при этом образование комплекса между этими белками может приводить к изменению локализации LIM-киназы внутри клетки [81]. Любопытно отметить, что TES киназа также подвергается фосфорилированию (вероятно, под действием МАР-киназ) [91]. Фосфорилирование способствует взаимодействию TES киназы с 14-3-3 [91], что может влиять на внутриклеточное распределение TES киназы [92]. Наконец, протеинфосфатазы (в частности, слингшот) способны дефосфорилировать и таким образом ингибировать ферментативную активность протеинкиназ (в частности, LIM-киназы), обеспечивающих фосфорилирование кофилина (рис. 6).

Данные последних лет свидетельствуют о том, что фосфорилированный кофилин (считавшийся ранее пассивным) способен активировать фосфолипазу D1, что приводит к накоплению фосфатидной кислоты, которая через цепочку посредников также может влиять на сборку и разборку актинового цитоскелета [93] (см. рис. 6). Роль 14-3-3 во влиянии фосфорилированного кофилина на активность фосфолипазы D1 пока остается не исследованной. Суммируя представленные данные, можно заключить, что 14-3-3 определенным образом может влиять на локализацию и активность ферментов, обеспечивающих

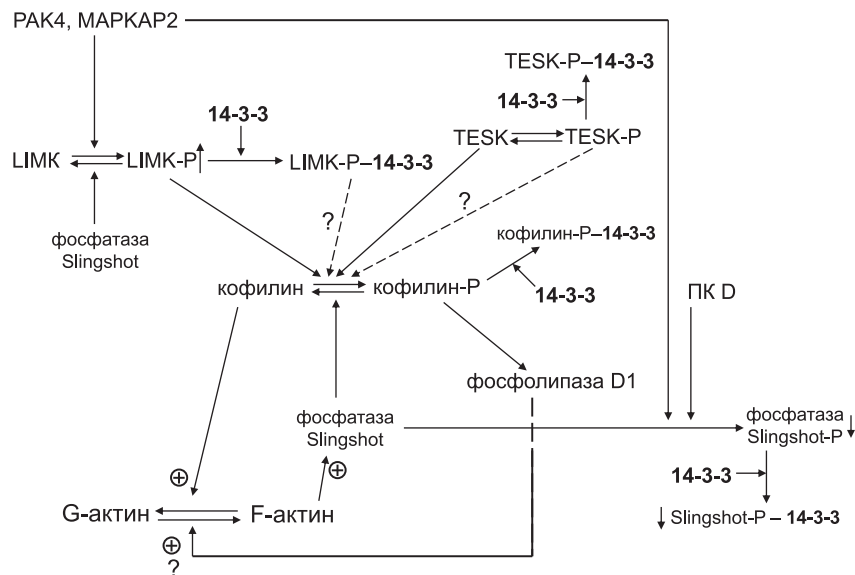


Рис. 6. Схема возможного участия 14-3-3 в кофилин-зависимой регуляции актинового цитоскелета.

В центре схемы показан кофилин, который в дефосфорилированном состоянии способен способствует деполимеризации актина (переход от F-актина в G-актин). Кофилин может фосфорилироваться под действием LIM- и TES-киназ (LIMK и TESK), при этом фосфорилированный кофилин не способен влиять на деполимеризацию актина. Фосфорилированный кофилин (кофилин-Р) взаимодействует с 14-3-3 и это предотвращает дефосфорилирование кофилина под действием фосфатазы Slingshot. Протеинкиназы, фосфорилирующие кофилин (LIM- и TES-киназы), фосфорилируются под действием других протеинкиназ (PAK4, MAPKAP2) и после фосфорилирования связываются с 14-3-3. Фосфатаза Slingshot также подвергается фосфорилированию, после чего взаимодействует с 14-3-3 и ингибируется. (Подробности – в тексте).

фосфорилирование и дефосфорилирование кофилина, а также способен напрямую связываться с фосфорилированным кофилином. Учитывая, что фосфорилирование влияет на способность кофилина регулировать процессы полимеризации и деполимеризации актина, можно заключить, что 14-3-3 может опосредованно (через кофилин) влиять на структуру актинового цитоскелета.

Белки-мишени, способные прочно связываться с 14-3-3 и присутствующие в клетке в высоких концентрациях оказываются в определенных условиях способными вытеснять фосфорилированный кофилин из его комплекса с 14-3-3 и, таким образом, могут опосредованно влиять на процессы сборки и разборки актинового цитоскелета. Предполагается,

что одним из таких регуляторов может быть малый белок теплового шока Hsp20 (HspB6). В работах Дрейца и соавт. [94, 95] было показано, что короткий N-концевой пептид Hsp20, содержащий участок, фосфорилируемый циклонуклеотид-зависимыми протеинкиназами, прочно связывается с 14-3-3 и может вытеснять фосфорилированный кофилин из его комплекса с 14-3-3. Свободный фосфорилированный кофилин быстро подвергается дефосфорилированию под действием фосфатазы слингшот, что приводит к перестройке актинового цитоскелета. Последующие исследования показали, что не только короткий N-концевой пептид, но и интактный Hsp20 (HspB6) образует прочный комплекс с 14-3-3, причем только фосфорилированный Hsp20 способен взаимодействовать с 14-3-3 [96]. Все это делает привлекательной гипотезу, согласно которой гормон-индуцируемое фосфорилирование Hsp20 будет сопровождаться вытеснением фосфорилированного кофилина из его комплекса с 14-3-3, что может приводить к реорганизации актинового цитоскелета и расслаблению гладких мышц [95]. Однако, учитывая всю сложность взаимодействий в системе кофилин–14-3-3 (см. рис. 6) [97], такая трактовка представляется крайне упрощенной, и нам кажется, что для того, чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу потребуется еще очень много усилий.

В литературе бытует мнение, что фосфорилированный малый белок теплового шока Hsp27 (HspB1) способен каким-то образом индуцировать полимеризацию актина и формирование стресс-фибрилл [98, 99]. Как нам кажется, это точка зрения достаточно спорная (см., например, [100]), к тому же в условиях *in vitro* не удается выявить существенного влияния Hsp25 (гомолога Hsp27) на полимеризацию актина [101]. Тем не менее, если фосфорилированный Hsp27, действительно, каким-то образом может влиять на процессы полимеризации актина, то, вероятно, стоит проанализировать процесс фосфорилирования Hsp27 и возможное участие 14-3-3 в этом процессе. Установлено, что Hsp27 может фосфорилироваться под действием большого количества различных протеинкиназ [102], при этом в его фосфорилировании важную роль играют MARKAP2 и, возможно, MARKAP5 [99]. В одной из работ показано, что 14-3-3ε взаимодействует с MARKAP5 и, ингибируя ее, препятствует фосфорилированию Hsp27, что может приводить к блокированию сборки актиновых филаментов [103]. Как бы то ни было, и в данном случае 14-3-3 может опосредованно регулировать сборку актиновых филаментов, изменяя прежде всего активность протеинкиназ, фосфорилирующих белки, которые влияют на процесс полимеризации актина.

УЧАСТИЕ 14-3-3 В РЕГУЛЯЦИИ БЕЛКОВ-МОТОРОВ, СВЯЗАННЫХ С АКТИНОВЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ

Регуляция сократительной активности гладких мышц и многих немышечных клеток осуществляется путем фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина [104, 105]. В гладких мышцах и немышечных клетках продуктивное взаимодействие миозина с актином и процесс сокращения становятся возможными только после фосфорилирования регуляторной легкой цепи миозина под действием специфической киназы легких цепей миозина (КЛЦМ). Для расслабления необходимо дефосфорилирование легких цепей миозина, которое обеспечивается специфической фосфатазой легких цепей миозина (ФЛЦМ). Таким образом, сократительная активность гладких мышц и немышечных клеток находится под координированным контролем двух ферментов-антагонистов – киназы и фосфатазы легких цепей миозина.

Фосфатаза легких цепей миозина состоит из 3 субъединиц. Субъединица с молекулярной массой 105–120 кДа обеспечивает прикрепление фермента к миозиновым филаментам; каталитическая субъединица (молекулярная масса около 36–37 кДа) обеспечивает собственно дефосфорилирование легких цепей миозина; субъединица с молекулярной массой 20–21 кДа выполняет какую-то не вполне понятную регуляторную функцию [105, 106]. Оказалось, что самая крупная субъединица фосфатазы легких цепей миозина может фосфорилироваться несколькими протеинкиназами (в частности, Rho-киназой) и это приводит к ингибированию активности фермента [105]. Подробное исследование позволило установить, что фосфорилирование самой крупной субъединицы фосфатазы легких цепей миозина по остатку Ser472, катализируемое Rho-киназой, обеспечивает прочное связывание этой субъединицы с 14-3-3 β , следствием чего является диссоциация фосфатазы от миозинового филамента и ингибирование фосфатазной активности [107]. Таким образом, 14-3-3 обеспечивает не только удаление фосфатазы от миозиновых филаментов, но и ингибирование ее активности. Оба эти процесса приводят к увеличению степени фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина и усилению сокращения или замедлению (или предотвращению) расслабления.

Как уже отмечалось ранее, 14-3-3 эффективно взаимодействует и регулирует активность большого количества различных протеинкиназ [78, 108]. В частности, давно известно, что 14-3-3 способен влиять на активность протеинкиназы C [19, 72, 109]. Одна из изоформ протеинкиназы C способна фосфорилировать тяжелые цепи миозина

Dictyostelium discoideum и таким образом регулировать способность миозина формировать упорядоченные филаменты. Установлено, что 14-3-3 образует прочный комплекс с указанной изоформой протеинкиназы С и таким образом может опосредованно участвовать в регуляции сократительной активности *Dictyostelium* [110].

Суммируя этот раздел, можно заключить, что, хотя белки семейства 14-3-3, по всей вероятности, напрямую не взаимодействуют с миозином, однако они способны эффективно регулировать активность этого белка-мотора, контролируя активность протеинкиназ и/или фосфатаз, обеспечивающих регулирование сборки миозиновых филаментов и ферментативную активность миозина.

14-3-3 И БЕЛКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПРИКРЕПЛЕНИИ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ К МЕМБРАНЕ КЛЕТОК И В ФОРМИРОВАНИИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ

Различные элементы цитоскелета играют важную роль в прикреплении клеток к межклеточному матриксу и в межклеточных взаимодействиях. Взаимодействие клеток с межклеточным матриксом зачастую обеспечивается за счет гетеродимерных интегральных белков интегринов. Интегрины имеют довольно крупный внеклеточный домен, короткую трансмембранную последовательность, которая пронизывает мембрану один раз, и короткую С-концевую цитоплазматическую последовательность. В настоящее время описано 18 изоформ α -цепей и 8 изоформ β -цепей интегринов, которые могут объединяться в 24 различных гетеродимера, обеспечивающих взаимодействие клеток с различными видами внеклеточного матрикса [111, 112]. В состоянии покоя цитоплазматические домены α - и β -цепей интегринов взаимодействуют между собой. Фосфорилирование и взаимодействие с белками-партнерами могут ослаблять взаимодействия между α - и β -цепями интегринов и приводить к сборке сложных фокальных контактов, в состав которых входит много различных протеинкиназ, белков-адаптеров, а также белков, обеспечивающих прикрепление актиновых филаментов и кластеризацию активированных гетеродимеров интегринов [112].

В настоящее время довольно подробно исследованы белок-белковые взаимодействия, обеспечиваемые короткими (70–90 остатков) внутриклеточными доменами β -цепей интегринов. Описано 42 потенциальных белка-партнера, способных взаимодействовать с цитоплазматическим доменом β -цепей интегринов [111]. Очевидно, что все эти белки одновременно не могут связываться с коротким С-концевым доменом β -цепей интегринов и очень часто разные белки-партнеры

конкурируют за связывание с одними и теми же участками в β -цепи интегринов. В коротком С-концевом домене β -цепей интегринов располагаются два участка с первичной структурой NXXY, которые разделены короткой последовательностью, богатой остатками Ser/Thr и подвергающейся фосфорилированию под действием нескольких Ser/Thr-протеинкиназ [111]. Большинство белков-партнеров интегринов взаимодействует либо с первым, либо со вторым тирозин-содержащим фрагментом, либо с короткой богатой Ser/Thr последовательностью, разделяющей эти участки. Так, например, талин взаимодействует с первым тирозин-содержащим участком и обеспечивает прикрепление интегрин к актиновым филаментам. Фосфорилирование Tug, расположенного в первом, приближенном к мембране участке, ослабляет прикрепление талина, вследствие чего с этим участком β -цепи интегрин начинает взаимодействовать тензин, который не только обеспечивает прикрепление интегрин к актину, но и приводит к привлечению в фокальный контакт протеинкиназ PDK1 и Akt [111]. Нечто аналогичное происходит с богатой Ser/Thr областью, соединяющей тирозин-содержащие участки. В нефосфорилированном состоянии богатый Ser/Thr участок β -цепи интегрин за счет гидрофобных контактов взаимодействует с 21-м иммуноглобулин-подобным доменом филамина, что приводит к прикреплению актиновых филаментов к интегрину и ингибированию миграции клеток [113]. После фосфорилирования богатого Ser/Thr участка контакты β -цепи интегрин с филамином ослабевают, и, наоборот, усиливаются контакты интегрин с различными изоформами 14-3-3 [111]. Этот пока недостаточно изученный путь ведет к активации малых G-белков Rac1 и cdc42, реорганизации цитоскелета и усилению клеточной подвижности [111]. Любопытно отметить, что фосфорилирование богатого Ser/Thr участка β -цепи интегрин не оказывает прямого влияния на взаимодействие интегрин с талином. В то же время, индуцированное фосфорилированием интегрин прочное связывание 14-3-3 приводит к вытеснению талина из комплекса с интегрином [114], что опосредованно влияет на цитоскелет и подвижность клеток.

Хотя белок-белковые взаимодействия цитоплазматического домена α -цепей интегрин детально не изучены, в последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что $\alpha 4$ субъединица интегрин может фосфорилироваться по Ser978, что способствует связыванию 14-3-3 [115]. Кроме того, связывание 14-3-3 способствует прикреплению универсального белка-адаптера паксиллина к α -цепи интегрин и формированию тройного комплекса –

«интегрин–14-3-3–паксиллин». Формирование такого комплекса может влиять на взаимное расположение α - и β -цепей интегрина, на их взаимодействие с белками-партнерами и на регуляцию активности малых G-белков (Rac1, cdc42), обеспечивающих упорядоченную полимеризацию актина и формирование ламеллоподий [115].

Ранее отмечалось, что в состав фокальных контактов входит много белков и, в частности, белки-адаптеры и протеинкиназы. Одним из таких белков-адаптеров является белок p130Cas (Cas). Судя по всему, он способен взаимодействовать с пролин-богатыми участками белков, входящих в область фокальных контактов, содержит остатки фосфотирозина и может взаимодействовать с белками-партнерами, обладающими так называемыми SH2-домейнами, узнающими фосфотирозин. Все это приводит к тому, что Cas взаимодействует и способствует закреплению в области фокального контакта протеинкиназы фокальных контактов (Focal Adhesion Kinase, FAK), а также тирозиновых протеинфосфатаз [116]. Оказалось, что активация интегриновых рецепторов сопровождается фосфорилированием Cas по остаткам серина и усиливающим его взаимодействие с 14-3-3 [116]. Предполагается, что 14-3-3 может влиять на процесс передачи сигнала от интегрин-цитоскелет путем обратимого связывания с фосфорилированным Cas, который, в свою очередь, участвует в перераспределении протеинфосфатаз и протеинкиназ в клетке и влияет на реорганизацию цитоскелета [112].

Межклеточные взаимодействия часто обеспечиваются за счет контактов между интегральными мембранными белками, такими как кадгерины различных типов, а также десмоглеины и десмоколины. Внеклеточные домены этих белков способны взаимодействовать между собой и тем самым как бы «склеивать» соседние клетки. Цитоплазматические домены этих же белков участвуют в формировании сложного белкового комплекса, обеспечивающего прикрепление различных элементов цитоскелета (актиновых микрофиламентов или промежуточных филаментов) к областям межклеточных контактов или участкам взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом [117]. Семейство белков armadillo (броненосцы) обеспечивает прикрепление кадгеринов, десмоглеинов и десмоколинов к нитям актина. В состав этого семейства входят различные катенины, плакоглобины и плакофилины, причем все эти белки содержат в своем составе консервативные Arm повторы и различные по длине и структуре переменные N- и C-концевые участки [117]. Несколько представителей семейства armadillo (β - и δ -катенины) после фосфорилирования способны взаимодействовать с различными изоформами 14-3-3 [118, 119].

Остановимся более подробно на взаимодействии β -катенина с 14-3-3. β -Катенин взаимодействует с цитоплазматическим доменом E-кадгерина и обеспечивает его прикрепление к α -катенину, который непосредственно участвует в прикреплении актинового филамента к областям межклеточного контакта (рис. 7) [120]. Часть β -катенина прочно связана в области межклеточных контактов, в то время как другая часть остается свободной и может распределяться между ядром и цитозолем. В состоянии покоя доля пребывающего в свободном состоянии β -катенина достаточно мала, поскольку он подвергается фосфорилированию под действием киназы I типа и киназы гликогенсинтазы, что приводит к его взаимодействию с определенными белками-партнерами, убиквитинилированию и быстрой деградации в протеасомах [119, 120]. Под действием определенных гормонов происходит активация протеинкиназы Akt (протеинкиназы B), которая фосфорилирует Ser552 β -катенина, что делает возможным его переход из области межклеточных контактов в цитозоль [120]. Фосфорилированный β -катенин взаимодействует с 14-3-3, что приводит к перемещению β -катенина в ядро, где он образует комплекс с некоторыми транскрипционными факторами и активирует определенные гены (рис. 7) [119–121]. Следствием этих процессов может быть неуправляемое деление и злокачественное перерождение клеток.

Представленные данные свидетельствуют о том, что в определенных условиях 14-3-3 предотвращает преждевременный протеолиз β -катенина и способствует его перемещению в ядро. Картина еще более усложняется из-за присутствия в клетке специфического белка-антагониста шибби (chibby), который взаимодействует с β -катенином, блокируя его транскрипционную активность [121]. Помимо этого, шибби после фосфорилирования под действием протеинкиназы Akt образует тройной комплекс – «фосфорилированный шибби–14-3-3–фосфорилированный β -катенин». Формирование такого тройного комплекса способствует экспорту β -катенина из ядра и понижению его транскрипционной активности (рис. 7) [119, 121]. Таким образом, 14-3-3 может влиять на распределение β -катенина между ядром, цитозолем и областью межклеточных контактов, а также в зависимости от изоформы, концентрации и наличия фосфорилированного шибби, регулировать транскрипционную активность β -катенина и участие этого белка в формировании цитоскелета.

Некоторые клетки имеют высоко специализированный цитоскелет и особый набор белков, обеспечивающих прикрепление цитоскелета к интегральным белкам мембран. В то же время, основные принципы

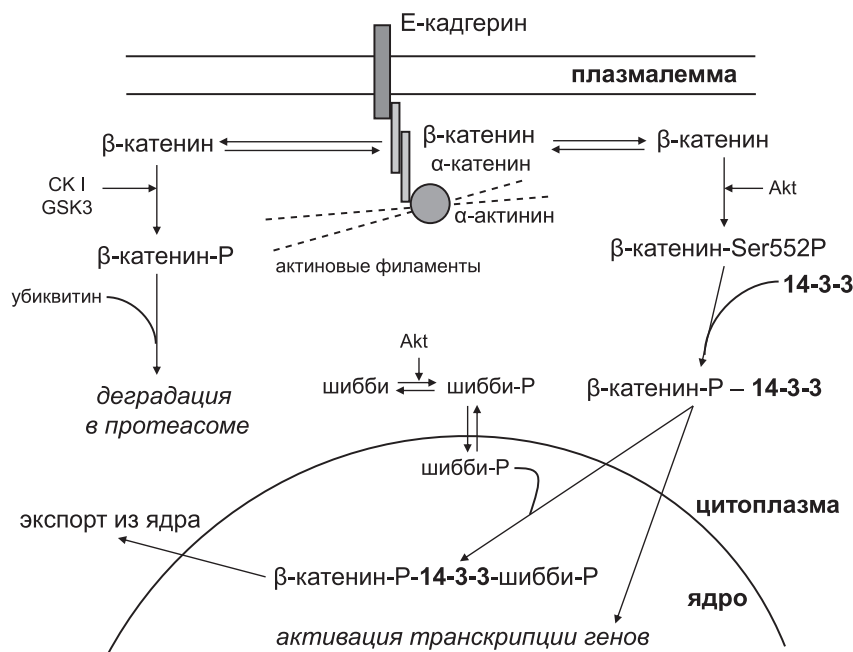


Рис. 7. Участие β -катенина в формировании межклеточных контактов и регуляции транскрипции генов.

Взаимодействуя с Е-кадгерин и α -катенином, β -катенин обеспечивает прикрепление внутриклеточных актиновых филаментов в области межклеточных контактов. β -Катенин может находиться как в составе межклеточных контактов, так и в свободном состоянии, при этом он может фосфорилироваться под действием различных протеинкиназ. Фосфорилирование под действием киназы I типа (CKI) и киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) способствует убикуитинированию β -катенина и его последующей деградации в протеасомах. Фосфорилирование под действием протеинкиназы B (Akt) по Ser552 способствует взаимодействию β -катенина с 14-3-3, переходу этого комплекса в ядро и активации определенных генов. Белок шибби может фосфорилироваться под действием протеинкиназы B (Akt) и способен формировать тройной комплекс с фосфорилированным β -катенином и 14-3-3. Формирование такого тройного комплекса способствует экспорту β -катенина из ядра и предотвращает активацию транскрипции генов. (Подробности – в тексте).

межбелковых взаимодействий остаются неизменными. Примером могут служить подоциты почек. Эти клетки обладают сложно построенным актиновым цитоскелетом, повреждение или неправильное функционирование которого приводит к протеинурии (т.е. потере белка с выводимой мочой). В подоцитах есть специализированные интегральные белки, такие как Р-кадгерины, нефрин, подоцины и др., специальные адаптерные белки, такие как упоминавшиеся ранее катенины, а также синаптоподин. Синаптоподин непосредственно или через α -актинин прикрепляет актиновые филаменты к интегральным белкам мембран [122, 123]. Синаптоподин может фосфорилироваться под действием сАМР-зависимой протеинкиназы и Са-кальмодулин-зависимой протеинкиназы и после фосфорилирования образует прочный комплекс с 14-3-3. Такой комплекс обеспечивает нормальное прикрепление актинового цитоскелета к интегральным белкам мембран и нормальное функционирование подоцитов. Дефосфорилирование под действием кальцинеурина делает невозможным взаимодействие с 14-3-3 и приводит к резкому увеличению доступности синаптоподина для действия протеаз, при этом протеолиз синаптоподина нарушает актиновый цитоскелет, следствием чего становится протеинурия [123].

Межклеточные контакты могут образовываться с участием и других интегральных белков, например, молекул клеточной адгезии CD44, а также с участием белков, обеспечивающих обмен ионов натрия и протонов (Na^+/H^+ Exchanger, NHE). Белки клеточной адгезии также соединены с внутриклеточным цитоскелетом, и такая связь зачастую обеспечивается группой белков, относящихся к семейству FERM. Обозначение FERM обусловлено использованием первых букв в названии нескольких белков, входящих в это семейство, а именно: белка полосы 4.1 (Four), эзрина (Ezrin), радиксина (Radixin) и моезина (Moesin). Белки этого семейства содержат в своем составе консервативный FERM-домен, а также специализированные участки связывания актина и спектрина [124]. В последнее время к этому семейству относят белок мерлин (Merlin), а также белок DAL-1 (Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung), принадлежащий к группе белков семейства 4.1B [125, 126]. Оба эти белка участвуют в регуляции пролиферации и злокачественного перерождения. Любопытно отметить, что упомянутый выше талин, обеспечивающий прикрепление актинового цитоскелета к интегринам, также содержит в своем составе FERM-домен [127]. Белки семейства FERM могут находиться как в цитоплазме, так и в примембранном пространстве, обеспечивая прикрепление нитей актина к интегральным белкам мембран. Переход из цитоплазмы к мембране регулируется путем фосфорилирования определенных участков белков семейства FERM,

а также изменением уровня фосфатидилинозитидов в клеточной мембране [127, 128]. Установлено, что белок DAL-1, а также белки группы 4.1 способны взаимодействовать с различными изоформами 14-3-3 [124, 125]. Это взаимодействие обеспечивается за счет определенных участков, расположенных в FERM домене указанных белков, и не зависит от фосфорилирования белков семейства FERM. Как нам кажется, до сих пор не вполне понятно, что же является следствием взаимодействия 14-3-3 с белками семейства FERM. Высказываются предположения, что связывание 14-3-3 может влиять как на перераспределение белков семейства FERM внутри клетки, так и на их взаимодействие с другими белками-партнерами. Следствием этих событий может быть изменение межклеточных взаимодействий и клеточной подвижности.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 14-3-3 С МАЛЫМИ G-БЕЛКАМИ И ПРОТЕИНАЗАМИ, УЧАСТВУЮЩИМИ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА

Малые G-белки участвуют в передаче гормонального сигнала от рецепторов внутрь клетки. Среди малых G-белков, относящихся к семейству Ras, выделяют небольшую группу белков, объединенных в семейство RGK, названное по первым буквам названий четырех белков, входящих в это семейство – Rem (также обозначаемый как Rem1 или Ges), Rem2, Rad и Gem/Kir [129, 130]. Белки, относящиеся к группе RGK, достаточно сильно отличаются от других белков семейства Ras, и в отличие от других белков семейства Ras не содержат остатков жирных кислот, обеспечивающих стабильное прикрепление к мембране, обладают низкой GTP-азной активностью и уникальными N- и C-концевыми участками [129, 130]. Белки группы RGK полифункциональны и способны взаимодействовать с большим количеством белков-партнеров [131]. Так, белки группы RGK взаимодействуют с β -субъединицей потенциал-зависимых кальциевых каналов и ингибируют функционирование этих каналов. Участки связывания GTP и участки, вовлеченные в связывание β -субъединицы кальциевого канала, перекрываются, и полнота ингибирования зависит от наличия гуанилового нуклеотида в активном центре RGK, а также от связывания насыщенного кальцием кальмодулина в участке, расположенном в C-концевой части молекулы RGK (рис. 8) [129, 130]. Кроме того, белки группы RGK могут фосфорилироваться по нескольким участкам, при этом два остатка серина, расположенные на самом N- и на самом C-конце, узнаются белками 14-3-3 [131]. Таким образом, после фосфорилирования становится возможным прочное бидентантное взаимодействие между

14-3-3 и белками группы RGK [132]. Взаимодействие с 14-3-3 может приводить к перераспределению белков семейства RGK между ядром и цитозолем, увеличению их стабильности и конформационным изменениям в GTP-связывающем участке этих белков [129, 130]. RGK белки (находящиеся как в свободном виде, так и в комплексе с 14-3-3) взаимодействуют и влияют на активность Rho-зависимых протеинкиназ [129]. β -изоформа Rho-киназы фосфорилирует и активирует киназу легких цепей миозина, а также LIM-киназу, участвующую в фосфорилировании кофилина. Помимо этого, Rho-киназа фосфорилирует и ингибирует активность фосфатазы легких цепей миозина (рис. 8) [129]. По-видимому, α -изоформа Rho-киназы также участвует в регуляции указанных ферментов. Если представленная на рис. 8 схема справедлива, то белки группы RGK оказываются способными влиять на формирование стресс-фибрилл, фокальных контактов и изменение формы клетки. Учитывая тот факт, что 14-3-3 влияет на стабильность белков семейства RGK и их внутриклеточное распределение, можно заключить, что 14-3-3 может оказывать многостороннее опосредованное влияние как на формирование цитоскелета, так и на различные формы клеточной подвижности.

Ранее мы подробно анализировали взаимодействие 14-3-3 с различными изоформами интегринов и роль 14-3-3 в передаче сигнала от интегринов на белки-адаптеры, такие как филамин, талин или тензин. По всей вероятности, картина в еще большей степени усложняется тем фактом, что фокальные контакты содержат не только белки-адаптеры, но также и малые G-белки и определенные протеинкиназы. Нам кажется, что к настоящему времени многие вопросы, касающиеся роли 14-3-3 в передаче сигнала в области фокальных контактов, остаются недостаточно ясными. Тем не менее, мы попытаемся обсудить некоторые из существующих гипотез.

Инсулин и многие факторы роста, связываясь со своими рецепторами, приводят к активации фосфоинозитид-3-киназы, которая обеспечивает синтез фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфатов (PIP_3). Образование PIP_3 способствует переходу на мембрану и активации протеинкиназы Akt, которая может фосфорилировать большое количество разнообразных белков-субстратов, в том числе субъединицы интегринов, фактор обмена нуклеотидов (GEF, Guanine nucleotide Exchange Factor) малого G-белка Rac-1, а также протеинкиназу Pak [133, 134]. Участки, фосфорилируемые Akt и имеющие первичную структуру RXXRXX(S/T) [135], часто являются центрами связывания различных изоформ 14-3-3. Таким образом, вблизи фокальных контактов происходит накопление фосфорилированных белков, многие из которых

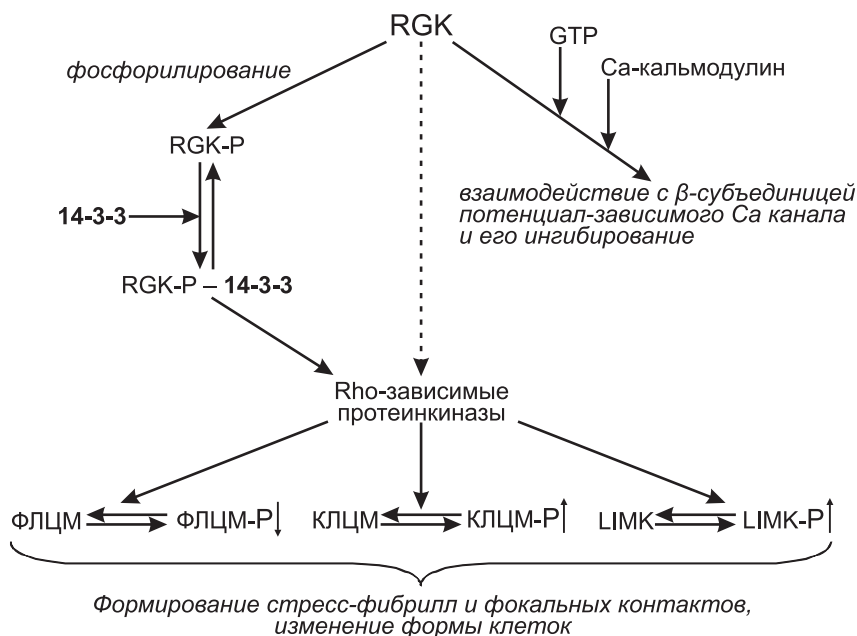


Рис. 8. Схема возможного влияния 14-3-3 на функционирование белков группы RGK.

Белки RGK могут взаимодействовать с кальций-кальмодулином и связывать GTP, и это может приводить к изменению внутриклеточного распределения RGK и ингибированию потенциал-зависимого кальциевого канала. Помимо этого, белки RGK могут подвергаться фосфорилированию, и это приводит к их прочному взаимодействию с 14-3-3. Белки семейства RGK влияют на активность Rho-киназ, которые способны фосфорилировать и повышать активность киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), фосфорилировать и ингибировать активность фосфатазы легких цепей миозина (ФЛЦМ), а также фосфорилировать и повышать активность LIM-киназы (LIMK), участвующей в фосфорилировании кофилина. Управляя активностью Rho-киназ, комплекс RGK-14-3-3 влияет на формирование стресс-фибрилл и фокальных контактов, а также на форму и подвижность клеток.

способны взаимодействовать с 14-3-3. В частности, в области фокальных контактов оказывается связанным малый G-белок Ras1 [136], который находится в активированном состоянии, поскольку в этом же месте присутствует его активирующий фактор GEF. Активированный Ras1 каким-то не вполне понятным способом может активировать протеинфосфатазы, которые, дефосфорилируя кофилин, способствуют разборке актиновых филаментов, за счет чего повышается клеточная подвижность. С другой стороны, Ras1 в комплексе с 14-3-3 β повышает активность p21 активируемой протеин-

киназы (РАК), что также может приводить к перестройке цитоскелета [133]. Кроме того, недавно опубликованные данные свидетельствуют о том, что в области фокальных контактов может располагаться белок Kank [134]. Этот белок может ингибировать полимеризацию актина и может фосфорилироваться под действием протеинкиназы Akt. Фосфорилированный Kank, взаимодействуя с 14-3-3, конкурирует с другими белками мишенями 14-3-3 в области фокальных контактов, что также может приводить к перестройке актинового цитоскелета [134].

Завершая этот раздел, можно заключить, что 14-3-3 способен взаимодействовать со многими G-белками и протеинкиназами, участвующими в той или иной мере в перестройке цитоскелета и оказывать, таким образом, опосредованное влияние на межклеточные взаимодействия, прикрепление клетки к внеклеточному матриксу и на клеточную подвижность.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 14-3-3 С БЕЛКАМИ МИКРОТРУБОЧЕК

Микротрубочки формируются путем упорядоченной полимеризации димеров тубулина. Недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что 14-3-3 может взаимодействовать как с α -, так и с β -тубулином [78]. В то же время, детали этого процесса и его физиологическая значимость остаются не вполне понятной.

Сборка микротрубочек регулируется большим количеством различных белков, обозначаемых MAP (Microtubule-Associated Proteins). Одним из белков, обеспечивающих регуляцию сборки микротрубочек, является так называемый тау белок. Этот белок, не имеющий жесткой хорошо упорядоченной структуры [137–139], экспрессируется преимущественно в нервной ткани в виде шести изоформ, образующихся благодаря альтернативному сплайсингу и отличающихся по своей длине (от 352 до 441 аминокислотных остатков). Все изоформы тау белка имеют в своем составе кислую N-концевую область, богатый пролином участок в центральной части белка и три или четыре участка со сходной первичной структурой, расположенные в C-концевой области [140]. Считается, что своими тремя или четырьмя C-концевыми повторяющимися участками тау взаимодействует с мономерами тубулина. Пролин-богатый участок тау лежит вдоль микротрубочки, а кислый N-концевой участок свободно «свисает» с нее [141], влияя на перемещение белков-моторов по микротрубочке [142] или на взаимодействие между соседними микротрубочками [143]. Таким образом, тау белки, оказывая влияние на скорость сборки микротрубочек [144], на взаимодействие микротрубочек между собой и на перемещение

кинезинов и динеинов по микротрубочкам, играют важную роль в нормальном функционировании цитоскелета.

В структуре тау белков обнаружено более 19 участков, которые могут фосфорилироваться под действием различных протеинкиназ (сАМР-зависимая протеинкиназа (РКА), нейрональная *sdc2*-подобная протеинкиназа (NCLK), митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК), киназа гликогенсинтазы 3 (GSK3), протеинкиназа С (РКС), киназа фосфоорилазы, кальмодулин-зависимая протеинкиназа (CaCMK), казеинкиназы первого и второго типа (СК I и II), киназы семейства MARK/Pag-1 и др.) [145–148]. Поскольку участки фосфорилирования разбросаны по всей длине полипептидной цепи тау [146, 149], фосфорилирование может оказывать влияние на различные свойства тау белков. В частности, установлено, что фосфорилирование влияет на связывание тау с микротрубочками [150] и устойчивость тау к протеолизу [151, 152]. Особенно важно, что фосфорилирование влияет на способность тау белков к формированию различных по форме и размерам агрегатов, известных под названиями «парные спиральные филаменты» (Paired Helical Filaments, PHFs) и «нейрофибриллярные сплетения» (NeuroFibrillary Tangles, NFTs) [153, 154].

В ранних работах было сформулировано представление о том, что некоторые изоформы 14-3-3 могут выступать в качестве своеобразного адаптера, обеспечивающего формирование тройного комплекса, состоящего из тау белка, 14-3-3 и различных протеинкиназ. Предполагалось, что формирование такого комплекса обеспечивает эффективное фосфорилирование тау сАМР-зависимой протеинкиназой [146], киназой гликоген синтазы 3 [155, 156], и индуцируемой глюкокортикоидами протеинкиназой 1 [48]. В более поздних работах не всегда удавалось подтвердить вывод о формировании тройного комплекса «тау белок-14-3-3-протеинкиназа» [157], тем не менее постулировалось, что 14-3-3 тем или иным способом может влиять на фосфорилирование тау.

Долгое время считалось, что фосфорилирование тау не является необходимым условием для его взаимодействия с 14-3-3 и что участок связывания 14-3-3 располагается в районе центров связывания тау с тубулином (область консервативных повторов), вследствие чего 14-3-3 может конкурировать с тубулином за связывание тау [146]. В двух работах 2009 года [158, 159] было показано, что фосфорилирование Ser214 самой крупной изоформы тау (или гомологичного ему остатка Ser156 короткой изоформы тау) приводит к значительному усилению взаимодействия тау с 14-3-3. Первичная

структура вблизи этого участка фосфорилирования, расположенного в богатой пролином области тау, хорошо согласуется с консенсусной последовательностью, узнаваемой 14-3-3 в структуре других белков-мишеней [158, 159], и поэтому взаимодействие тау с 14-3-3 по этому участку не вызывает удивления. В то же время оказалось, что фосфорилированный сАМР-зависимой протеинкиназой мутантный тау белок с заменой Ser156 на аланин (S156A) взаимодействует с 14-3-3 сильнее, чем нефосфорилированный S156A [160]. Эти данные послужили основой для предположения о том, что фосфорилирование не только Ser156, но и каких-то других участков тау будет влиять на его взаимодействие с 14-3-3. Методом точечного мутагенеза удалось установить, что как минимум два других участка (Ser235 и Ser267 самой короткой изоформы тау), фосфорилируемые сАМР-зависимой протеинкиназой и расположенные в консервативных повторах, обеспечивающих взаимодействие тау с тубулином, играют важную роль в формировании прочного комплекса тау с 14-3-3. Таким образом, несколько участков тау вовлечены во взаимодействие с 14-3-3, и прочность образуемого комплекса зависит от фосфорилирования тау по нескольким центрам, расположенным как в богатом пролином участке белка, так и в консервативных повторах, обеспечивающих взаимодействие тау с микротрубочками [160].

Как уже отмечалось, в определенных условиях тау белки оказываются склонными к агрегации и образуют различные по размеру и форме агрегаты, накапливающиеся внутри клетки. Заболевания, сопровождающиеся накоплением агрегатов тау белков, обозначаются как «таупатии». К этой группе заболеваний относят болезнь Альцгеймера, болезнь Пика, фронтотемпоральную деменцию и некоторые другие виды нейрологических расстройств [154, 161, 162]. Хотя детальный механизм, вызывающий агрегацию тау белков, не вполне ясен, тем не менее считается, что гиперфосфорилирование, окисление SH-групп, гликозилирование или частичный протеолиз могут способствовать повышенной агрегации тау белков, аналогичный эффект наблюдается также в присутствии полианионов и жирных кислот [154, 163]. Исследования последних лет показали, что нейрофибриллярные сплетения, образуемые агрегированными тау белками, содержат в своем составе 14-3-3 [164, 165]. В связи с этим возник вопрос, влияет ли 14-3-3 на агрегацию тау и какое воздействие оказывает фосфорилирование на это процесс. Было обнаружено, что добавление 14-3-3 способствует агрегации интактного тау и его фрагментов [166]. При этом постулировалось, что, конкурируя с тубулином, 14-3-3 может вызывать диссоциацию тау из структуры микротрубочек и

способствовать агрегации освободившегося тау с образованием парных спиральных филаментов или нейрофибриллярных сплетений. Одновременно с этим полагали, что образование комплекса 14-3-3-тау будет способствовать фосфорилированию тау под действием сАМР-зависимой протеинкиназы, которое, наоборот, будет предотвращать формирование нерастворимых агрегатов тау [166]. Дальнейшие исследования японских авторов [159, 167] в определенной степени согласуются с обоими предположениями. Было установлено, что 14-3-3 способствует агрегации нефосфорилированного тау и одновременно с этим препятствует агрегации тау, фосфорилированного сАМР-зависимой протеинкиназой или протеинкиназой В [159, 167]. К сожалению, молекулярные механизмы действия 14-3-3 на агрегацию тау до сих пор изучены не достаточно полно. Тем не менее, на основании имеющихся данных можно утверждать, что 14-3-3 может регулировать встраивание тау белков в структуру микротрубочек, влияя тем самым на сборку микротрубочек и перемещение белков-моторов. Помимо этого 14-3-3, по-видимому, участвует в регуляции процессов агрегации тау, приводящих к развитию различных таупатий. Поскольку тау является компонентом не только микротрубочек, но способен взаимодействовать и влиять на структуру актиновых филаментов [168], можно прийти к заключению о том, что 14-3-3 оказывает очень разностороннее воздействие на цитоскелет нейронов, следствием чего может быть возникновение и развитие различных нейродегенеративных заболеваний.

Микротрубочки формируют своеобразные подложки – «рельсы», по которым перемещаются белки-моторы, транспортирующие от ядра к периферии или от периферии к ядру различные везикулы и органеллы. Установлено, что один из видов кинезина, так называемый KIF1C (Kinesin Family protein), представленный в клетке как в виде мономера, так и в виде гомодимера и участвующий в транспорте везикул от аппарата Гольджи к эндоплазматическому ретикулуму, может взаимодействовать с 14-3-3 [169]. Участок взаимодействия располагается в С-концевой части KIF1C и прочность образующегося комплекса зависит от фосфорилирования Ser1092 KIF1C, который фосфорилируется киназой II [169]. Белки, связанные с С-концевой областью кинезинов, могут влиять на эффективность функционирования моторной части этого белка, расположенной, как правило, в N-концевой части белков этого семейства. Помимо этого, белки, связанные с С-концевой частью кинезина, располагаются в непосредственной близости от участков связывания «грузов» и могут участвовать в выборе органелл (или везикулярных структур),

которые связываются и транспортируются кинезинами. Связывание 14-3-3 может способствовать димеризации KIF1C [169], что также может сказаться на свойствах кинезина. Дальнейшие исследования показали, что 14-3-3 способен взаимодействовать с легкой цепью кинезина 2 (Kinesin Light Chain, KLC2), являющейся частью гетеротетрамерной изоформы обычного кинезина KIF5B [170]. Любопытно отметить, что легкие цепи располагаются в С-концевой части этой изоформы кинезина и участвуют в прикреплении груза, транспортируемого кинезином. Связывание 14-3-3 зависит от фосфорилирования остатка серина (Ser575), находящегося в пептиде, первичная структура которого (RARSS⁵⁷⁵LNFLN) довольно сильно отличается от первичной структуры участков, традиционно узнаваемых 14-3-3 (см. выше). Представленные данные свидетельствуют о том, что 14-3-3 может связываться с различными представителями семейства кинезинов, при этом участки связывания 14-3-3, как правило, располагаются вблизи от центров прикрепления грузов, транспортируемых кинезинами. Исследования последних лет согласуются с этим предположением и свидетельствуют о том, что 14-3-3 может выступать либо в качестве адаптера, либо являться составной частью сложных белковых комплексов, транспортируемых кинезинами [171, 172]. Детали участия 14-3-3 в прикреплении грузов к кинезинам еще мало исследованы.

Таким образом, можно заключить, что 14-3-3 способен тем или иным способом влиять на сборку и разборку микротрубочек, на перемещение белков-моторов, а также, вероятно, на взаимодействие микротрубочек и микрофиламентов, а также на процессы, связанные с агрегацией некоторых компонентов микротрубочек.

14-3-3 И БЕЛКИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ

Принято считать, что цитоскелет клетки формируется тремя системами нитей – микрофиламентами (актиновыми филаментами диаметром около 8 нм), микротрубочками, собранными из гетеродимеров тубулина (диаметр около 25 нм), и так называемыми промежуточными филаментами, имеющими диаметр около 10–12 нм [173, 174]. Различают шесть классов белков промежуточных филаментов. В том числе, два класса цитокератинов (так называемые кислые и щелочные кератины); белки мышечных, мезенхимальных и глиальных промежуточных филаментов (десмин, виментин); белки нейрофиламентов; ламины, формирующие оболочку ядра, и белки так называемых «сиротских» промежуточных филаментов хрусталика глаза [173, 174].

Белки промежуточных филаментов имеют сходную структуру, состоящую из высоко консервативной центральной части, склонной к образованию суперспиралей (структур типа coiled-coil) и различных по длине и структуре N- и C-концевых доменов [175]. Димеры белков промежуточных филаментов (стабилизированные за счет формирования структур типа coiled-coil), собираются в зрелые промежуточные филаменты, в которых контакты между соседними димерами обеспечиваются за счет переменных N- и C-концевых последовательностей. Несмотря на то, что промежуточные филаменты обладают очень высокой стабильностью и механической прочностью, для этих элементов цитоскелета характерен постоянный и динамичный процесс обмена субъединиц [174]. Обмен субъединиц, также как и процессы сборки и разборки промежуточных филаментов зависят от фосфорилирования остатков, расположенных в N- и C-концевых переменных участках белков промежуточных филаментов [176], при этом, как правило, фосфорилирование дестабилизирует белок-белковые взаимодействия и способствует разборке филаментов.

В ранних работах было обнаружено, что в фазах S/G2/M некоторые цитокератины (цитокератины K8/K18) подвергаются гиперфосфорилированию (возможно, важная роль в этом принадлежит протеинкиназе cdc2) [177]. Фосфорилированный цитокератин K8/K18 взаимодействует с 14-3-3 и формирование такого комплекса препятствует встраиванию цитокератина в промежуточные филаменты. Дальнейшие исследования показали, что необходимым условием для связывания 14-3-3 является фосфорилирование Ser33 цитокератина K18 [178]. При этом следует отметить, что последовательность вблизи Ser33 (RPVSSAAS³³VY) довольно сильно отличается от консенсусной последовательности, узнаваемой 14-3-3 в других белках-субстратах. Было высказано предположение, что связывание 14-3-3 может влиять как на внутриклеточное распределение цитокератинов, так и на их способность формировать промежуточные филаменты [177–179]. Одновременно с этим появились данные, свидетельствующие о том, что обработка клеток ингибитором протеинфосфатаз, каликулином А, сопровождается увеличением доли фосфорилированного виментина. После фосфорилирования участков, расположенных в N-концевой части белка (остатки 1–96), виментин оказывается способным взаимодействовать с 14-3-3 [180]. Из-за того, что образуемый комплекс очень прочен, фосфорилированный виментин эффективно конкурирует с другими белками-субстратами 14-3-3, и, вследствие этого, становится возможным перераспределение 14-3-3 в клетке и изменение интенсивности различных процессов, регулируемых 14-3-3 [180].

В последнее время появились дополнительные сведения о взаимодействии 14-3-3 с белками промежуточных филаментов. Глиальный фибриллярный кислый белок (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) вместе с виментином образует промежуточные филаменты и играет важную роль в формировании цитоскелета астроцитов. Оказалось, что как находящийся в цитоплазме, так и входящий в состав промежуточных филаментов глиальный фибриллярный белок способен взаимодействовать с 14-3-3. Формирование комплекса зависит от фосфорилирования Ser8 в GFAP [181]. Интересно отметить, что первичная структура вблизи Ser8 (RRITS⁸AR) довольно сильно отличается от первичной структуры консенсусных участков, узнаваемых 14-3-3 в других белках-субстратах, и от участка, узнаваемого 14-3-3 в случае цитокератинов. Как и в случае с цитокератинами, связывание 14-3-3 затрудняет встраивание глиального фибриллярного белка в состав промежуточных филаментов и таким образом существенно влияет на динамику сборки и разборки этих филаментов и их целостность [181]. Особо следует подчеркнуть, что на долю белков промежуточных филаментов приходится не менее 1% клеточных белков [180]. Учитывая этот факт, можно предположить, что фосфорилирование белков промежуточных филаментов может приводить к связыванию больших количеств 14-3-3 и изменению активности протеинфосфатаз (cdc25 протеинфосфатаза) и протеинкиназ (Raf, Akt), которые тем или иным образом зависят от белков семейства 14-3-3 и регулируются ими [173, 174]. Таким образом, взаимодействуя с белками промежуточных филаментов, 14-3-3 способен регулировать как процессы сборки и разборки важных элементов цитоскелета, так и многочисленные процессы, зависящие от фосфорилирования и дефосфорилирования различных внутриклеточных белков.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая обзор, можно заключить, что белки семейства 14-3-3 являются универсальными адаптерами, способными взаимодействовать с многочисленными и разнообразными белками клетки. Активность 14-3-3 внутри клетки может регулироваться несколькими способами. Во-первых, возможна регуляция как синтеза, так и протеолитической деградации 14-3-3. Во-вторых, клетка способна синтезировать несколько изоформ 14-3-3, которые отличаются по своей способности формировать гомо- и гетеродимеры, а также по взаимодействию с белками-мишенями. В-третьих, белки семейства 14-3-3 могут

подвергаться различным посттрансляционным модификациям (таким как фосфорилирование или ацетилирование), существенно влияющим на их структуру и свойства. В-четвертых, как гомо-, так и гетеродимеры 14-3-3 содержат в своем составе как минимум два участка, обеспечивающих связывание фосфорилированных лигандов, имеющих определенную первичную структуру. Это позволяет белкам 14-3-3 с особо высоким сродством связывать белки-мишени, имеющие в своей структуре два участка фосфорилирования, а также связывать и сближать два разных белка-мишени, каждый из которых имеет в своем составе по одному участку фосфорилирования.

Белки семейства 14-3-3 способны связывать не только белки-мишени, обладающие специфическими участками фосфорилирования, но и другие белки с необычными участками фосфорилирования или белки, вообще не подвергающиеся фосфорилированию. Изучение механизмов узнавания белков-мишеней, было и до сих пор остается предметом подробных исследований. Образование комплексов с белками-мишенями может иметь своим результатом несколько последствий. Связанные с 14-3-3 белки-мишени оказываются защищенными от действия протеаз и/или фосфатаз. Благодаря образованию прочных комплексов может изменяться внутриклеточная локализация белка-мишени и может произойти сближение двух разных белков-мишеней. Последнее обстоятельство может оказаться особенно важным в том случае, если один из белков-мишеней является ферментом (например, протеинкиназой), а другой – его субстратом. И, наконец, учитывая тот факт, что 14-3-3 взаимодействует с различными белками-мишенями, можно предположить, что изменение концентрации одного белка-мишени при определенных условиях способно приводить к вытеснению другого белка-мишени из его комплекса с 14-3-3. Это обстоятельство играет особенно важную роль в случае белков-мишеней, находящихся в клетке в особенно высоких концентрациях. Все сказанное позволяет заключить, что белки семейства 14-3-3 являются высокоэффективными регуляторами многочисленных процессов, протекающих в клетке, и поэтому дальнейшее исследование их свойств представляется исключительно важным.

В сравнительно небольшом по объему обзоре невозможно детально рассмотреть структуру, свойства и функции белков семейства 14-3-3. Заинтересованный читатель может почерпнуть важные сведения, касающиеся истории открытия и изучения 14-3-3 [5], механизмов функционирования и регуляции активности 14-3-3 [182, 183], специфических функций, выполняемых 14-3-3 в нервной системе [23], роли 14-3-3 в процессах апоптоза [184] и онкогенеза [185, 186] в превосходных ранее опубликованных обзорах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boston, P.F., Jackson, P., Kynoch, P.A., Thompson, R.J. (1982) *J. Neurochem.*, **38**, 1466–1474.
2. Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. (1996) *Cell*, **84**, 889–897.
3. Mackintosh, C. (2004) *Biochem. J.*, **381**, 329–342.
4. Moore, B.W., Perez, V.J., Gehring, M. (1968) *J. Neurochem.*, **15**, 265–272.
5. Aitken, A. (2006) *Sem. Canc. Biol.*, **16**, 162–172.
6. Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T., Fujisawa, H. (1987) *FEBS Lett.*, **219**, 79–82.
7. Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 7084–7088.
8. Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Patel, Y. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5706–5709.
9. Toker, A., Sellers, L.A., Amess, B., Patel, Y., Harris, A., Aitken, A. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **206**, 453–461.
10. Aitken, A., Ellis, C.A., Harris, A., Sellers, L.A., Toker, A. (1990) *Nature*, **344**, 594.
11. Martens, G.J., Piosik, P.A., Danen, E.H. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1456–1459.
12. Hirsch, S., Aitken, A., Bertsch, U., Soll, J. (1992) *FEBS Lett.*, **296**, 222–224.
13. van Heusden, G.P., Wenzel, T.J., Lagendijk, E.L., de Steensma, H.Y., van den Berg, J.A. (1992) *FEBS Lett.*, **302**, 145–150.
14. Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., Gamblin, S.J. (1995) *Nature*, **376**, 188–191.
15. Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H., Liddington, R. (1995) *Nature*, **376**, 191–194.
16. Jones, D.H., Ley, S., Aitken, A. (1995) *FEBS Lett.*, **368**, 55–58.
17. Shen, Y., Godlewski, J., Bronisz, A., Zhu, J., Comb, M., Avruch, J., Tzivion, G. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4721–4733.
18. Gu, Y.-M., Jin, Y.-H., Choi, J.-K., Baek, K.-H., Yeo, C.-Y., Lee, K.-Y. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 305–310.
19. Aitken, A. (2002) *Plant Mol. Biol.*, **50**, 993–1010.
20. Yano, M., Nakamuta, S., Wu, X., Okumura, Y., Kido, H. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4769–4779.
21. Kockel, L., Vorbruggen, G., Jackle, H., Mlodzik, M., Bohmann, D. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 1140–1147.
22. Tommerup, N., Leffers, H. (1996) *Genomics*, **33**, 149–150.
23. Berg, D., Holzmänn, C., Riess, O. (2003) *Nat. Neurosci.*, **4**, 752–762.
24. Shankardas, J., Senchyna, M., Dimitrijevic, S. (2008) *Mol. Vis.*, **14**, 2604–2615.
25. Pennington, C., Chohan, G., Mackenzie, J., Andrews, M., Will, R., Knight, R., Green, A. (2009) *Neurosci. Lett.*, **455**, 56–59.
26. Xiao, T., Ying, W., Li, L., Hu, Z., Ma, Y., Jiao, L., Ma, J., Cai, Y., Lin, D., Guo, S., Han, N., Di, X., Li, M., Zhang, D., Su, K., Yuan, J., Zheng, H., Gao, M., He, J., Shi, S., Li, W., Xu, N., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, K., Gao, Y., Qian, X., Cheng, S. (2005) *Mol. Cell Proteomics*, **4**, 1480–1486.
27. Green, A.J., Thompson, E.J., Stewart, G.E., Zeidler, M., McKenzie, J.M., MacLeod, M.A., Ironside, J.W., Will, R.G., Knight, R.S. (2001) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **70**, 744–748.
28. Qi, W., Liu, X., Chen, W., Li, Q., Martinez, J.D. (2007) *Mol. Carcinog.*, **46**, 847–856.

29. Jang, J.S., Cho, H.Y., Lee, Y.J., Ha, W.S., Kim, H.W. (2004) *Oncol. Res.*, **14**, 491–499.
30. Nakanishi, K., Hashizume, S., Kato, M., Honjoh, T., Setoguchi, Y., Yasumoto, K. (1997) *Hum. Antibodies*, **8**, 189–194.
31. Benzinger, A., Popowicz, G., Joy, J., Majumdar, S., Holak, T., Hermeking, H. (2005) *Cell Res.*, **15**, 219–227.
32. Gardino, A., Smerdon, S., Yaffe, M. (2006) *Sem. Cancer Biol.*, **16**, 173–182.
33. Robinson, K., Jones, D., Patel, Y., Martin, H., Madrazo, J., Martin, S., Howell, S., Elmore, M., Finnen, M.J., Aitken, A. (1994) *Biochem. J.*, **299**, 853–861.
34. Sluchanko, N., Chernik, I., Seit-Nebi, A., Pivovarov, A., Levitsky, D., Gusev, N. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**, 305–312.
35. Verdoodt, B., Benzinger, A., Popowicz, G.M., Holak, T.A., Hermeking, H. (2006) *Cell Cycle*, **5**, 2920–2926.
36. Powell, D., Rane, M., Joughin, B., Kalmukova, R., Hong, J.-H., Tidor, B., Dean, W., Pierce, W., Klein, J., Yaffe, M., McLeish, K. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5376–5387.
37. Woodcock, J.M., Murphy, J., Stomski, F.C., Berndt, M.C., Lopez, A.F. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36323–36327.
38. Wilker, E., Grant, R., Artim, S., Yaffe, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 18891–18898.
39. Liang, X., Butterworth, M., Peters, K., Walker, W., Frizzell, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 27418–27425.
40. Alvarez, D., Callejo, M., Shoucri, R., Boyer, L., Price, G., Zannis-Hadjopoulos, M. (2003) *Biochemistry*, **42**, 7205–7215.
41. Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B. (1999) *J. Neurosci.*, **19**, 5782–5791.
42. Kim, T.D., Choi, E., Rhim, H., Paik, S.R., Yang, C.H. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 1352–1359.
43. Athwal, G., Huber, S. (2002) *Plant J.*, **29**, 119–129.
44. Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 153–166.
45. Kumagai, A., Dunphy, W.G. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1067–1072.
46. Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J., Dalal, S., DeCaprio, J., Greenberg, M., Yaffe, M. (2002) *J. Cell Biol.*, **156**, 817–828.
47. Muslin, A.J., Xing, H. (2000) *Cell Signal.*, **12**, 703–709.
48. Chun, J., Kwon, T., Lee, E.J., Kim, C.H., Han, Y.S., Hong, S.K., Hyun, S., Kang, S.S. (2004) *Mol. Cells*, **18**, 360–368.
49. Das, A.K., Cohen, P.W., Barford, D. (1998) *EMBO J.*, **17**, 1192–1199.
50. Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C. (2000) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 617–647.
51. Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 2058–2065.
52. Won, J., Kim, D.Y., La, M., Kim, D., Meadows, G.G., Joe, C.O. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19347–19351.
53. Choudhary, C., Kumar, C., Gnäd, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., Mann, M. (2009) *Science*, **325**, 834–840.
54. Megidish, T., Cooper, J., Zhang, L., Fu, H., Hakomori, S. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 21834–21845.
55. Ma, Y., Pitson, S., Hercus, T., Murphy, J., Lopez, A., Woodcock, J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 26011–26017.
56. Powell, D., Rane, M., Chen, Q., Singh, S., McLeish, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 21639–21642.

57. Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2004) *EMBO J.*, **23**, 1889–1899.
58. Clokie, S., Cheung, K., Mackie, S., Marquez, R., Peden, A., Aitken, A. (2005) *FEBS J.*, **272**, 3767–3776.
59. Dubois, T., Rommel, C., Howell, S., Steinhussen, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moelling, K., Aitken, A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28882–28888.
60. Dubois, T., Howell, S., Amess, B., Kerai, P., Learmonth, M., Madrazo, J., Chaudhri, M., Rittinger, K., Scarsabel, M., Soneji, Y., Aitken, A. (1997) *J. Protein Chem.*, **16**, 513–522.
61. Ahmed, K.M., Fan, M., Nantajit, D., Cao, N., Li, J.J. (2008) *Oncogene*, **27**, 6738–6748.
62. Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2005) *J Cell Biol*, **170**, 295–304.
63. Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Martin, H., Patel, Y., Robinson, K. (1995) *Mol. Cell. Biochem.*, **149–150**, 41–49.
64. Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 49113–49119.
65. Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 4531–4540.
66. Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C. (1997) *Cell*, **91**, 961–971.
67. Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S., Li, M. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 1531–1535.
68. Dougherty, M., Morrison, D. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 1875–1884.
69. Zhang, L., Wang, H., Liu, D., Liddington, R., Fu, H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13717–13724.
70. Wang, H., Zhang, L., Liddington, R., Fu, H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 16297–16304.
71. Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D.E., Hickman, A.B., Dyda, F. (2003) *Biochemistry*, **42**, 15264–15272.
72. Kosteletzky, B., Saurin, A., Purkiss, A., Parker, P., McDonald, N. (2009) *EMBO reports*, **10**, 983–989.
73. Yaffe, M. (2002) *FEBS Lett.*, **513**, 53–57.
74. Yasmin, L., Jansson, A., Panahandeh, T., Palmer, R., Francis, M., Hallberg, B. (2006) *FEBS J.*, **273**, 638–646.
75. Mils, V., Baldin, V., Goubin, F., Pinta, I., Papin, C., Waye, M., Eychene, A., Ducommun, B. (2000) *Oncogene*, **19**, 1257–1265.
76. Gu, M., Du, X. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 33465–33471.
77. Ichimura, T., Uchiyama, J., Kunihiro, O., Ito, M., Horigome, T., Omata, S., Shinkai, F., Kaji, H., Isobe, T. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 28515–28518.
78. Pozuelo Rubio, M., Geraghty, K.M., Wong, B.H., Wood, N.T., Campbell, D.G., Morrice, N., Mackintosh, C. (2004) *Biochem J*, **379**, 395–408.
79. Liang, S., Yu, Y., Yang, P., Gu, S., Xue, Y., Chen, X. (2009) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877**, 627–634.
80. Chen, X.Q., Yu, A.C. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 657–663.
81. Birkenfeld, J., Betz, H., Roth, D. (2003) *Biochem. J.*, **369**, 45–54.
82. Bamburg, J.R. (1999) *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 185–230.
83. Huang, T.Y., DerMardirossian, C., Bokoch, G.M. (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 26–31.
84. Gohla, A., Bokoch, G.M. (2002) *Curr. Biol.*, **12**, 1704–1710.
85. Lee, C.W., Han, J., Bamburg, J.R., Han, L., Lynn, R., Zheng, J.Q. (2009) *Nature Neurosci.*, **12**, 848–856.
86. Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B.,

- Sampath, R., Bamburg, J., Bernard, O.* (2005) *EMBO J.*, **24**, 473–486.
87. *Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I.K., Kitatani, K., Mizuno, K., Storz, P.* (2009) *Nature Cell Biol.*, **11**, 545–556.
 88. *Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K.* (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 465–471.
 89. *Kligys, K., Yao, J., Yu, D., Jones, J.* (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**, 450–454.
 90. *Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., Mizuno, K.* (2006) *EMBO J.*, **25**, 713–726.
 91. *Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R.* (2004) *J. Neurobiol.*, **58**, 103–117.
 92. *Toshima, J.Y., Toshima, J., Watanabe, T., Mizuno, K.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 43471–43481.
 93. *Han, L., Stope, M.B., de Jesus, M.L., Oude Weernink, P.A., Urban, M., Wieland, T., Roskopf, D., Mizuno, K., Jakobs, K.H., Schmidt, M.* (2007) *EMBO J.*, **26**, 4189–41202.
 94. *Dreiza, C.M., Brophy, C.M., Komalavilas, P., Furnish, E.J., Joshi, L., Pallero, M.A., Murphy-Ullrich, J.E., von Rechenberg, M., Ho, Y.S., Richardson, B., Xu, N., Zhen, Y., Peltier, J.M., Panitch, A.* (2005) *FASEB J.*, **19**, 261–263.
 95. *Dreiza, C.M., Komalavilas, P., Furnish, E.J., Flynn, C.R., Sheller, M.R., Smoke, C.C., Lopes, L.B., Brophy, C.M.* (2009) *Cell Stress Chaperones*, **15**, 1–11.
 96. *Chernik, I., Seit-Nebi, A., Marston, S., Gusev, N.* (2007) *Mol. Cell. Biochem.*, **295**, 9–17.
 97. *Seit-Nebi, A.S., Gusev, N.B.* (2010) *Cell Stress Chaperones*. in the press.
 98. *Damarla, M., Hasan, E., Boueiz, A., Le, A., Pae, H.H., Montouchet, C., Kolb, T., Simms, T., Myers, A., Kayyali, U.S., Gaestel, M., Peng, X., Reddy, S.P., Damico, R., Hassoun, P.M.* (2009) *PLoS One*, **4**, e4600.
 99. *Kostenko, S., Johannessen, M., Moens, U.* (2009) *Cell Signal.*, **21**, 712–718.
 100. *Gusev, N.B., Bogatcheva, N.V., Marston, S.B.* (2002) *Biochemistry (Mosc.)*, **67**, 511–519.
 101. *Panasenko, O.O., Seit Nebi, A., Bukach, O.V., Marston, S.B., Gusev, N.B.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1601**, 64–74.
 102. *Kostenko, S., Moens, U.* (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3289–307.
 103. *Tak, H., Jang, E., Kim, S.B., Park, J., Suk, J., Yoon, Y.S., Ahn, J.K., Lee, J.-H., Joe, C.* (2007) *Cell Signal.*, **19**, 2379–2387.
 104. *Ханчаев, А.Ю., Ширинский, В.П., Воротников, А.В.* (2003) *Успехи биологической химии*, **43**, 365–420.
 105. *Kim, H.R., Appel, S., Vetterkind, S., Gangopadhyay, S.S., Morgan, K.G.* (2008) *J Cell Mol Med*, **12**, 2165–2180.
 106. *Erdodi, F., Ito, M., Hartshorne, D.J.*, ed. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. ed. M. Barany. 1996, Academic Press: San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 131–142.
 107. *Koga, Y., Ikebe, M.* (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1062–1071.
 108. *Jin, J., Smith, D., Stark, C., Wells, C., Fawcett, J., Kulkarni, S., Metl'nikov, P., O'Donnell, P., Taylor, P., Taylor, L., Zougman, A., Woodgett, J., Langeberg, L., Scott, J., Pawson, T.* (2004) *Cur. Biol.*, **14**, 1436–1450.
 109. *Van Der Hoeven, P.C., Van Der Wal, J.C., Ruurs, P., Van Blitterswijk, W.J.* (2000) *Biochem. J.*, **347**, 781–785.
 110. *Matto-Yelin, M., Aitken, A., Raviv, S.* (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1889–1899.
 111. *Legate, K.R., Fassler, R.* (2009) *J. Cell. Sci.*, **122**, 187–198.
 112. *Harburger, D.S., Calderwood, D.A.* (2009) *J Cell Sci*, **122**, 159–163.

113. Campbell, I.D. (2008) *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 263–266.
114. Takala, H., Nurminen, E., Nurmi, S.M., Aatonen, M., Strandin, T., Takatalo, M., Kiema, T., Gahmberg, C.G., Ylänne, J., Fagerholm, S.C. (2008) *Blood*, **112**, 1853–1862.
115. Deakin, N.O., Bass, M.D., Warwood, S., Schoelermann, J., Mostafavi-Pour, Z., Knight, D., Ballestrem, C., Humphries, M.J. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 1654–1664.
116. Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Russell, M., Vuori, K. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 5762–5768.
117. Bass-Zubek, A.E., Godsel, L.M., Delmar, M., Green, K.J. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 708–716.
118. Mackie, S., Aitken, A. (2005) *FEBS J.*, **272**, 4202–4210.
119. Takemaru, K., Fischer, V., Li, F.Q. (2009) *Cell Cycle*, **8**, 210–213.
120. Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., Lu, Z. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 11221–11229.
121. Li, F.Q., Mofunanya, A., Harris, K., Takemaru, K. (2008) *J. Cell Biol.*, **181**, 1141–1154.
122. Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., Mundel, P. (2007) *Trends Cell Biol.*, **17**, 428–437.
123. Faul, C., Donnelly, M., Merscher-Gomez, S., Chang, Y.H., Franz, S., Delfgaauw, J., Chang, J.M., Choi, H.Y., Campbell, K.N., Kim, K., Reiser, J., Mundel, P. (2008) *Nature Med.*, **14**, 931–938.
124. Calinisan, V., Gravem, D., Chen, R.P., Brittin, S., Mohandas, N., Lecomte, M.C., Gascard, P. (2006) *Front. Biosci.*, **11**, 1646–1666.
125. Yu, T., Robb, V., Singh, V., Gutmann, D., Newsham, I. (2002) *Biochem. J.*, **365**, 783–789.
126. Sun, C.X., Robb, V.A., Gutmann, D.H. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 3991–4000.
127. Bretscher, A., Edwards, K., Fehon, R.G. (2002) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 586–99.
128. Polesello, C., Payre, F. (2004) *Trends Cell Biol.*, **14**, 294–302.
129. Correll, R.N., Pang, C., Niedowicz, D.M., Finlin, B.S., Andres, D.A. (2008) *Cell Signal.*, **20**, 292–300.
130. Beguin, P., Mahalakshmi, R.N., Nagashima, K., Cher, D.H., Takahashi, A., Yamada, Y., Seino, Y., Hunziker, W. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 1923–1934.
131. Ward, Y., Spinelli, B., Quon, M.J., Chen, H., Ikeda, S.R., Kelly, K. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 651–661.
132. Kelly, K. (2005) *Trends Cell Biol.*, **15**, 640–643.
133. Somanath, P., Byzova, T. (2009) *J. Cell. Physiol.*, **218**, 394–404.
134. Kakinuma, N., Roy, B.C., Zhu, Y., Wang, Y., Kiyama, R. (2008) *J. Cell Biol.*, **181**, 537–549.
135. Yaffe, M.B., Lepar, G.G., Lai, J., Obata, T., Volinia, S., Cantley, L.C. (2001) *Nature Biotechnol.*, **19**, 348–53.
136. Kligys, K., Claiborne, J., DeBiase, P., Hopkinson, S., Wu, Y., Mizuno, K., Jones, J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 32520–32528.
137. Mylonas, E., Hascher, A., Bernado, P., Blackledge, M., Mandelkow, E., Svergun, D.I. (2008) *Biochemistry*, **47**, 10345–10353.
138. Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. (2009) *PLoS Biol.*, **7**, e34.
139. Jeganathan, S., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (2008) *Biochemistry*, **47**, 10526–10539.
140. Johnson, G.V., Stoothoff, W.H. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 5721–5729.

141. Amos, L.A., Schlieper, D. (2005) *Adv. Protein Chem.*, **71**, 257–298.
142. Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., Holzbaur, E.L. (2008) *Science*, **319**, 1086–1089.
143. Rosenberg, K.J., Ross, J.L., Feinstein, H.E., Feinstein, S.C., Israelachvili, J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7445–7450.
144. Scott, C.W., Blowers, D.P., Barth, P.T., Lo, M.M., Salama, A.I., Caputo, C.B. (1991) *J. Neurosci. Res.*, **30**, 154–162.
145. Timm, T., Marx, A., Panneerselvam, S., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (2008) *BMC Neurosci.*, **9 Suppl.**, 2, S9.
146. Hashiguchi, M., Sobue, K., Paudel, H.K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 25247–25254.
147. Scott, C.W., Spreen, R.C., Herman, J.L., Chow, F.P., Davison, M.D., Young, J., Caputo, C.B. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 1166–1173.
148. Landrieu, I., Lacosse, L., Leroy, A., Wieruszeski, J.M., Trivelli, X., Sillen, A., Sibille, N., Schwalbe, H., Saxena, K., Langer, T., Lippens, G. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3575–3583.
149. Haase, C., Stieler, J.T., Arendt, T., Holzer, M. (2004) *J. Neurochem.*, **88**, 1509–1520.
150. Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (1999) *Biochemistry*, **38**, 3549–3558.
151. Litersky, J.M., Johnson, G.V. (1995) *J. Neurochem.*, **65**, 903–911.
152. Johnson, G.V., Foley, V.G. (1993) *J. Neurosci. Res.*, **34**, 642–647.
153. Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2007) *Nature Rev. Neurosci.*, **8**, 663–672.
154. Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C.X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1739**, 198–210.
155. Agarwal-Mawal, A., Qureshi, H.Y., Cafferty, P.W., Yuan, Z., Han, D., Lin, R., Paudel, H.K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12722–12728.
156. Yuan, Z., Agarwal-Mawal, A., Paudel, H.K. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 26105–26114.
157. Matthews, T.A., Johnson, G.V. (2005) *Neurosci. Lett.*, **384**, 211–216.
158. Sluchanko, N., Seit-Nebi, A., Gusev, N. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 990–994.
159. Sadik, G., Tanaka, T., Kato, K., Yamamori, H., Nessa, B.N., Morihara, T., Takeda, M. (2009) *J. Neurochem.*, **108**, 33–43.
160. Sluchanko, N., Seit-Nebi, A., Gusev, N. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 2739–2742.
161. Avila, J. (2000) *FEBS Lett.*, **476**, 89–92.
162. Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., de Calignon, A., Jones, P.B., Hyman, B.T. (2009) *Trends Neurosci.*, **32**, 150–159.
163. Barghorn, S., Mandelkow, E. (2002) *Biochemistry*, **41**, 14885–14896.
164. Sugimori, K., Kobayashi, K., Kitamura, T., Sudo, S., Koshino, Y. (2007) *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **61**, 159–167.
165. Layfield, R., Fergusson, J., Aitken, A., Lowe, J., Landon, M., Mayer, R.J. (1996) *Neurosci. Lett.*, **209**, 57–60.
166. Hernandez, F., Cuadros, R., Avila, J. (2004) *Neurosci. Lett.*, **357**, 143–146.
167. Sadik, G., Tanaka, T., Kato, K., Yanagi, K., Kudo, T., Takeda, M. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **383**, 37–41.
168. Fulga, T.A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M.L., Spires, T.L., Hyman, B.T., Feany, M.B. (2007) *Nature Cell Biol.*, **9**, 139–148.

169. *Dorner, C., Ullrich, A., Haring, H.U., Lammers, R.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 33654–33660.
170. *Ichimura, T., Wakamiya-Tsuruta, A., Itagaki, C., Taoka, M., Hayano, T., Natsume, T., Isobe, T.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 5566–5572.
171. *Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., Kuroda, S., Kuroda, K., Shimizu, M., Hirotsune, S., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K.* (2007) *J Neurosci.*, **27**, 15–26.
172. *Molla-Herman, A., Boularan, C., Ghossoub, R., Scott, M.G., Burtay, A., Zarka, M., Saunier, S., Concorde, J.P., Marullo, S., Benmerah, A.* (2008) *PLoS One*, **3**, e3728.
173. *Coulombe, P.A., Wong, P.* (2004) *Nature Cell Biol.*, **6**, 699–706.
174. *Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.M., Goldman, R.D.* (2009) *J. Clin. Invest.*, **119**, 1763–1771.
175. *Herrmann, H., Aebi, U.* (2004) *Annu Rev. Biochem.*, **73**, 749–89.
176. *Hyder, C.L., Pallari, H.M., Kochin, V., Eriksson, J.E.* (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 2140–2148.
177. *Liao, J., Omary, M.B.* (1996) *J. Cell Biol.*, **133**, 345–357.
178. *Ku, N.O., Liao, J., Omary, M.B.* (1998) *EMBO J.*, **17**, 1892–1906.
179. *Ku, N.O., Michie, S., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L., Omary, M.B.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4373–4378.
180. *Tzivion, G., Luo, Z.J., Avruch, J.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 29772–29778.
181. *Li, H., Guo, Y., Teng, J., Ding, M., Yu, A.C., Chen, J.* (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 4452–4461.
182. *Yaffe, M.B.* (2002) *FEBS Lett.*, **513**, 53–57.
183. *van Heusden, G.P.H.* (2005) *IUBMB Life*, **57**, 623–629.
184. *Porter, G.W., Khuri, F.R., Fu, H.* (2006) *Sem. Cancer Biol.*, **16**, 193–202.
185. *Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L., Balan, V.* (2006) *Sem. Cancer Biol.*, **16**, 203–213.
186. *Morrison, D.K.* (2009) *Trends Cell Biol.*, **19**, 16–23.