

МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМЫЕ ПРОТЕИНКИАЗНЫЕ КАСКАДЫ И УЧАСТИЕ В НИХ Ste20-ПОДОБНЫХ ПРОТЕИНКИАЗ

© 2002 г. Е. С. ПОТЕХИНА, Е. С. НАДЕЖДИНА

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва и*

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Митоген-активируемые протеинкиназные (МАРК) каскады. III. Ste20-подобные протеинкиназы. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фосфорилирование является одной из самых распространенных посттрансляционных модификаций белков, влияющей на их третичную структуру и функции. Фосфорилирование катализируется протеинкиназами (ПК), т.е. фосфотрансферазами, использующими в качестве субстратов γ -фосфатную группу АТФ (или ГТФ) и спиртовые группы серина/треонина (или фенольную группу тирозина) в белках. для образования фосфомоноэфиров. Протеинкиназы – самое обширное белковое суперсемейство эукариот, насчитывающее, вероятно, до тысячи представителей. Большинство протеинкиназ – минорные клеточные белки, которые удается идентифицировать только молекулярно-биологическими методами. Однако экспериментально вызванная дисфункция той или иной ПК нередко ведет к фатальным последствиям для клеток. Протеинкиназы регулируют клеточный цикл, дифференцировку, метаболические пути, участвуют в цепях передачи внутриклеточного сигнала, и аномальное протекание этих процессов может вызывать развитие программируемой смерти клетки – апоптоза. Изучение клеточных функций и регуляции протеинкиназ является одним из основных направлений современной молекулярной и клеточной биологии. В настоящем обзоре особое внимание уделяется

Работа поддержана грантом РФФИ № 99-04-48204 и грантом по программе «Геном человека».

Адрес для корреспонденции: e-mail: skel@genebee.msu.su

протеинкиназам, входящим в митоген-активируемые каскады, через которые происходит передача сигнала от рецепторов ростовых факторов к факторам транскрипции и другим эффекторным клеточным белкам. Недавно охарактеризованное семейство Ste20-подобных протеинкиназ вероятно также принимает участие в этих каскадах.

II. МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗНЫЕ (МАРК) КАСКАДЫ

ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ МАРК ПРОТЕИНКИНАЗ

В клетках эукариот, в ответ на воздействующий на клетку сигнал (факторы роста, гормоны, цитокины, стресс), могут запускаться системы передачи и усиления этого сигнала, работающие по каскадному принципу активации определенных белков в определенной последовательности [19]. Этими белками обычно являются ПК, каскадно фосфорилирующие и активирующие друг друга (рис. 1). Наиболее изучены митоген-активируемые протеинкиназные (МАРК) каскады, когда в результате цепи последовательных фосфорилирований нескольких различных ПК активируется одна из МАР (от митоген-активируемый протеин) протеинкиназ (часто их называют МАРК протеинкиназы). МАРК протеинкиназы – сборная группа белков, включающая три небольших семейства протеинкиназ – p38, JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase) и ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (см. рис. 1). Практически во всех случаях активация ПК семейства ERK связана с клеточным выживанием и стимуляцией пролиферации, а активация протеинкиназ семейств p38 и JNK - с индукцией апоптоза (см. рис. 1) [62].

Поскольку в ответ на различные клеточные стимулы в клетках должна меняться экспрессия тех или иных генов, основными мишенями МАРК протеинкиназ являются транскрипционные факторы. Протеинкиназы семейства JNK/SAPK фосфорилируют факторы семейства Jun [29]. Большинство МАРК протеинкиназ фосфорилируют транскрипционные факторы семейства Ets, которые вовлечены в индукцию генов *fos*. Белковые продукты генов *fos*, в свою очередь, гетеродимеризуются с факторами Jun и образуют активационные белковые комплексы AP-1, регулирующие транскрипцию многих генов [54], в том числе циклина D1 и аутокринных ростовых факторов, приводящих к активации других сигнальных путей. Кроме того, МАРК p38 фосфорилирует и усиливает активность транскрипционного фактора MEK2C и других белков этого семейства [23]. Известны и другие транскрипционные факторы, активируемые

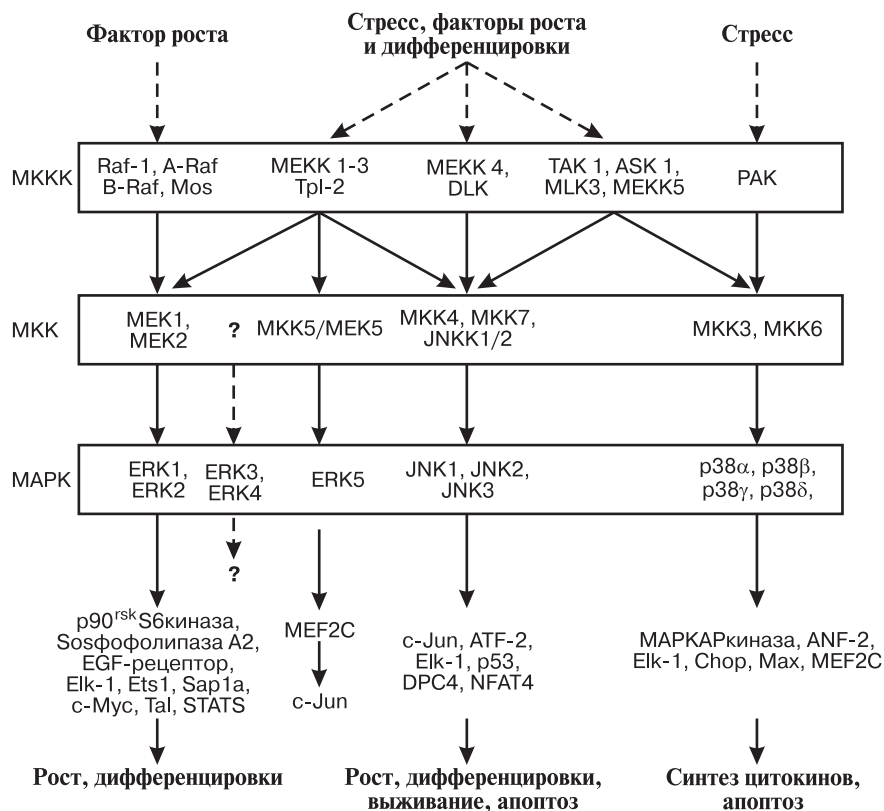


Рис. 1. Схема митоген-активируемых протеинкиназных каскадов (модифицировано из [19]).

МАРК (см. рис. 1). При фосфорилировании транскрипционных факторов МАРК функционируют внутри ядра и фосфорилируют белки, уже связанные с ДНК. Большинство транскрипционных факторов, регулируемых МАРК, являются димерами. Методом структурного анализа было показано, что некоторые МАРК протеинкиназы также димеризуются при активации, и что димеризация МАРК может усиливать фосфорилирование димерных транскрипционных факторов [14].

Хотя транскрипционные факторы, локализованные в ядре, являются важными субстратами МАРК, только часть активированных в цитоплазме МАРК транслируется в ядро. Немалая часть МАРК

остаётся в цитоплазме и других субклеточных компартментах, где роль этих ПК изучена гораздо меньше. Известно, что МАРК могут регулировать экспрессию генов и на посттранскрипционном уровне, используя в качестве субстратов цитоплазматические белки. Так, в активированных Т-клетках JNK вовлечена в стабилизацию мРНК интерлейкина 2 (IL-2) [4]. В этом случае субстратом JNK является цитоплазматический белок, который опосредованно, через два других белка, связывается с 5' нетранслируемой областью мРНК IL-2. Таким образом, активация JNK в Т-клетках через повышение экспрессии IL-2 стимулирует пролиферацию, хотя в других типах клеток, как уже говорилось, она в основном индуцирует апоптоз. Некоторые виды мРНК могут стабилизироваться в ответ на активацию p38 [34, 59]. МАРК протеинкиназы вовлечены также в контроль процесса трансляции, правда, в этих случаях каскад как бы продлен еще на одну протеинкиназу, часто называемую МАРКАР (mitogen activated protein kinase activated protein). Например, ПК MNK1, активируемая МАРК, фосфорилирует фактор инициации трансляции 4е (eIF-4е), усиливая взаимодействие кэп-связывающего комплекса с кэпированной мРНК, что приводит к улучшению сборки полисом [31, 45]. Известными субстратами ERK – МАРКАР - являются p70/p90^{rsk}S6 киназы [20, 38]. Существуют и другие эффекторы МАРК. Так, ERK 1/2 стимулируют синтез ДНК, фосфорилируя карбамилфосфат синтетазу II, фермент, лимитирующий скорость в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов [22]. ERK протеинкиназы способствуют прохождению клеточного цикла, инактивируя один из его ингибиторов, протеинкиназу MYT1 [41]. Субстратами МАРК являются также некоторые цитоскелетные белки, в частности, белки нейрофиламентов NF-N и NF-M [58], белок микротрубочек нейронов SCG10 [39]. Возможно, что МАРК вовлечены также в зависимую от фосфорилирования регуляцию основных белков, ассоциированных с микротрубочками – MAP2 и MAP4 [25].

СТРУКТУРА МАРК КАСКАДОВ

Основным элементом всех митоген-активируемых протеинкиназных внутриклеточных путей принято считать трехкомпонентный протеинкиназный каскад. Внутри этого корового компонента сигнальных путей МАРК протеинкиназы фосфорилируются и активируются протеинкиназами МКК (МАРК Kinase)/МАРКК, которые имеют двойную специфичность и могут фосфорилировать как тирозиновые, так и треониновые остатки. А МКК, в свою очередь, автофосфорилируются и активируются серин-треониновыми протеинкиназами МККК (МАРК Kinase Kinase)/МАРККК. Подобные трех-

компонентные каскады ПК являются эволюционно консервативными у всех эукариот – от дрожжей до человека (см. рис. 1). Помимо этих ступеней, в последнее время выделяют еще один уровень в цепи передачи внутриклеточных сигналов. К нему относятся малые ГТФазы (Ras, Rac, Rho, Cdc42) и ПК, которые участвуют в регуляции активности МККК и осуществлении специфичности передачи сигнала на трехкомпонентный протеинкиназный каскад. Можно называть эти протеинкиназы МКККК (МАРК Kinase Kinase Kinase)/МАРКККК. К МКККК/МАРКККК относятся, в частности, рассматриваемые ниже ПК семейства GSK.

В клетках млекопитающих экспрессируется по крайней мере 4 группы по-разному регулируемых МАРК: ERK1/2, p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$), JNK1/2/3 и ERK5. МКК протеинкиназы высокоспецифичны в отношении своих МАРК субстратов, что позволяет свести к минимуму количество возможных МАРК—МКК взаимодействий. Так MEK1/2 активирует ERK1/2; MKK3/6 активирует p38; MKK4/7, она же JNKK1/2, активирует JNK протеинкиназы [9]; а MEK5 – ERK5 (см. рис. 1). МКК, в свою очередь, как правило, активируется более, чем одной МККК ПК, что увеличивает разнообразие возможных путей передачи внутриклеточного сигнала и одновременно ставит вопрос о специфичности его передачи от МККК к МКК. На самом же деле передача сигнала от МККК к МКК специфична для конкретного действующего стимула. У МККК протеинкиназ обнаружены различные регуляторные мотивы, такие как РН домен (Pleckstrin Homology), пролин-богатая последовательность для связывания SH3 (Src Homology-3) домена, сайт связывания для малых ГТФаз, лейциновая молния – последовательность, позволяющая белкам димеризоваться, сайты фосфорилирования Thr и Ser/Thr протеинкиназами. Данные мотивы, не обнаруженные у МКК и МАРК, позволяют МККК по-разному регулироваться широким набором сигнальных молекул, в зависимости от характера воздействующего на клетку сигнала, в том случае, если МККК участвует более, чем в одном сигнальном пути. За счет многочисленных сайтов для белок-белковых взаимодействий, имеющихся у МККК, возможно также специфическое взаимодействие и активация ПК, расположенных на ступень ниже в протеинкиназном сигнальном каскаде. Например, известно, что MEKK1 необходима для активации JNK в эмбриональных стволовых клетках и фибробластах при воздействии на клетку веществ, разрушающих микротрубочки, лизотидилфосфатной кислоты, двуцепочечной РНК, сыворотки и при вирусной инфекции. В то же время, в эмбриональных стволовых клетках, но не в фибробластах, MEKK1 участвует в активации JNK при воздействии TNF и IL-1 [61, 65]. Показано, также, что MEKK1 не

нужна для активации JNK при воздействии на клетки ультрафиолета и ингибиторов белкового синтеза. Данные результаты говорят о значительной специфичности MAPK активации даже на уровне MKKK.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АКТИВАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ MAPK ПРИ ПЕРЕДАЧЕ РАЗЛИЧНЫХ СИГНАЛОВ

Формирование мультиферментных комплексов в клетках дрожжей

Известно, что в клетках одни и те же ПК могут участвовать в различных MAPK каскадах, в зависимости от стимула, воздействующего на клетку извне. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* известно пять MAPK протеинкиназных каскадов. Один каскад регулирует формирование спор [17]. Два других запускаются в ответ на повышенную и пониженную осмолярность (Hog и MPK пути, соответственно) [24]. Еще один каскад активируется при конъюгации (Fus3 путь), и последний – при образовании мицелиоподобных структур (Kss1 путь). При подготовке к конъюгации в ответ на связывание с гаплоидной клеткой пептидного феромона активируются гетеротримерные G-белки, которые в свою очередь запускают каскад последовательного фосфорилирования и активации в следующем ряду ПК: STE20 (MAPKKKK), STE11 (MAPKKK), STE7 (MAPKK), Fus3 (MAPK). В случае Kss1-сигнального пути иницирующий сигнал не известен, но известно, что аналогичный каскад протеинкиназ STE20/STE11/STE7 ведет к активации Kss1 и образованию мицелиоподобных структур. Было показано, что несмотря на участие в этих двух каскадах одних и тех же трех ПК, каждый сигнал передается специфично и приводит к строго определенному клеточному ответу. Для предотвращения пересечения протеинкиназных сигнальных путей в дрожжевых клетках существуют специальные адапторные белки, которые формируют мультиферментные комплексы с ПК, участвующими в определенном сигнальном пути и таким образом отделяют один каскад от другого [36] (рис. 2).

Так, белок Ste5 регулирует специфичность пути, приводящего к спариванию гаплоидной дрожжевой клетки в ответ на связывание феромона, одновременно связываясь с Ste11, Ste7 и MAPK – Fus3, усиливая активность Fus3 (см. рис. 2). Более того, Ste5 взаимодействует с ГТФазами, связанными с рецептором, и это взаимодействие направляет феромонный сигнал через Ste11 к Fus3. Другая MAPKK – PBS2 – может выполнять ту же функцию, что и Ste5, при воздействии на клетку повышенного осмотического давления, ассоциируясь с Ste11, MAPK – Hog1 и Sho1 – возможным сенсором сигнала [44].

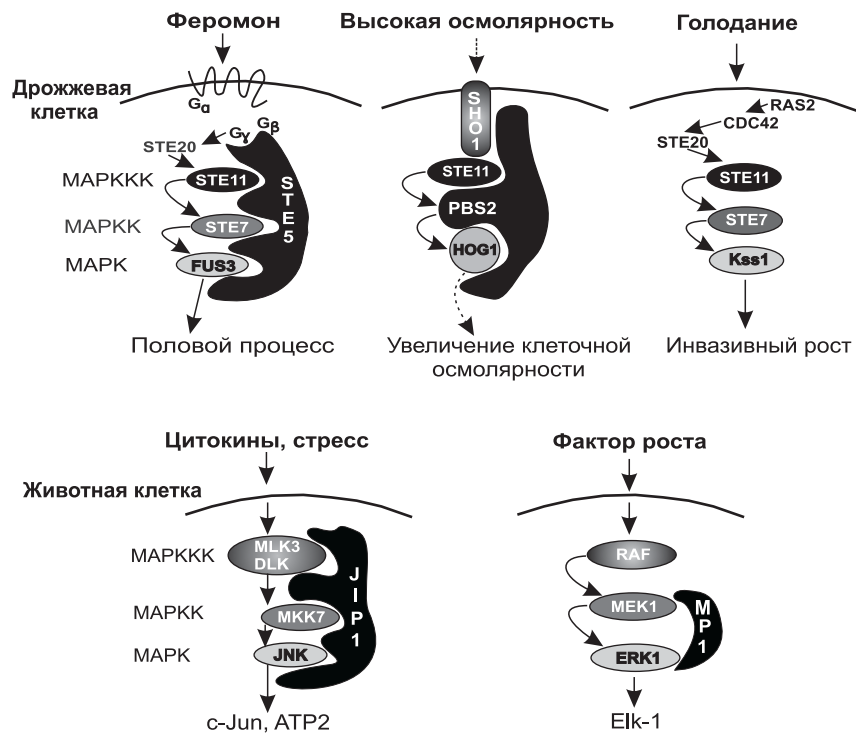


Рис. 2. Участие структурных белков («скэффолда») в MAP-киназных каскадах [12].

Формирование мультиферментных комплексов в клетках млекопитающих

Витмарш с коллегами [57, 58] и Шеффер [49] с соавт. выявили подобный механизм формирования мультиферментных комплексов и у клеток млекопитающих. В клетках млекопитающих два белка JIP-1 (JNK interacting protein 1) и MP1 (MEK partner 1) помогают направлять два различных протеинкиназных каскада, образуя с их участниками мультиферментные комплексы (см. рис. 2). Обнаружение таких белков у млекопитающих говорит об универсальной функции адапторных белков в сборке внутриклеточных сигнальных путей. Анализ первичных структур показал, что JIP1 похож на Ste5, в то время как MP1 был выделен в отдельный класс адапторных белков. При гиперэкспрессии JIP1 ингибирует JNK путь. JIP1 связывается с JNK1 и JNK2, удерживая их, таким образом, в цитоплазме и предотвращая

их транспортировку в ядро. Кроме JNK1/2, JIP1 связывается с MAPKK – MKK7 и MAPKKK – MLK3/DLK, усиливая активацию JNK1 при его гиперэкспрессии (см. рис. 2) [12]. Так же как и Ste5, JIP1 может направлять сигнал от НРК1 – гомолога Ste20, протеинкиназы, активирующей MLK киназы [12]. НРК1 также может взаимодействовать с JIP1.

Адапторный белок MP1 *in vitro* усиливает активацию MEK1 через B-Raf, и ERK1 через MEK1. *In vivo*, MP1 специфично связывается с MEK1 и ERK1, но не с MEK2 и ERK2. При гиперэкспрессии MP1 увеличивает число образующихся комплексов MEK1-ERK1 и уровень MEK1-ERK1-зависимой активации транскрипционного фактора Elk-1 [49] (см. рис. 2).

Изучение Ste5, MP1 и JIP1 адапторных белков продемонстрировало важность их стехиометрии в регуляции клеточного ответа. Так, например, удаление Ste5 из дрожжевой клетки освобождает Ste7 и дает ему участвовать в альтернативных каскадах, в то время как гиперэкспрессия JIP1 ингибирует JNK путь, изолируя JNK от ядерных мишеней [12].

Внутриклеточная локализация мультиферментного комплекса, образуемого белком JIP1, в частности, внутри нейронов осуществляется за счет связывания JIP1 и кинезина. TRP (tetratricopeptide repeat) мотив легкой цепи кинезина связывается с С-концевой последовательностью JIP1. Большой белковый комплекс, включающий в себя весь JNK-сигнальный протеинкиназный путь (DLK/MLK3, MKK7, JNK) и трансмембранный рецепторный белок AroER2, связанный одним концом с JIP1, а другим с мембранной везикулой [51], движется за счет кинезина к дистальному концу микротрубочек в аксоне [56]. Можно предположить, что такой транспорт возможен и по актиновым филаментам, так как известно, что кинезин млекопитающих KIF5B связывается с актин-зависимым моторным белком MyoVA, участвующим в транспорте по актиновым филаментам [20, 27]. Таким образом, сходные с JIP1 белковые молекулы могут не только участвовать в сборке и стабилизации ферментных комплексов, но и осуществлять связь между передачей сигнала и мембранным движением внутри клетки, а так же регулировать транспортировку рецепторов к мембране. Связь с моторными белками позволяет и самим протеинкиназным каскадам быть локализованными в необходимом месте внутри клетки. Не исключается участие киназных ферментных комплексов в регуляции активности молекул кинезина. Возможно также, что локализуемые на микротрубочках и актиновых филаментах ПК участвуют в регуляции динамики этих цитоскелетных структур, важной для нормального прохождения клеточного цикла и дифференцировки.

На сегодняшний день известны и другие гигантские мультивалентные белки, осуществляющие пространственную ко-локализацию ферментов сигнальных путей внутри клетки. Так, белок CG-NAP (Centrosome and Golgi localized PKN-associated protein) размером 450 кДа, имеющий вторичную структуру типа скрученная спираль, осуществляет локализацию протеинкиназы PKN на центросоме, остаточном тельце во время телофазы и в аппарате Гольджи. Серин/треониновая протеинкиназа PKN имеет каталитический домен, гомологичный ПК С и уникальный регуляторный участок на N-конце. PKN активируется малой ГТФазой Rho, ненасыщенными жирными кислотами и отщеплением регуляторного N-конца. PKN взаимодействует с актинсвязывающим белком АЛЬФА-актенином и фосфорилирует некоторые белки промежуточных филаментов *in vitro*. Кроме того, CG-NAP имеет два RII мотива, необходимых для связывания с регуляторной субъединицей протеинкиназы А. CG-NAP также связывает каталитическую субъединицу протеинфосфатазы 2А (PP2A) и протеинфосфатазы 1 (P1) [53]. Показано, что PP2A может дефосфорилировать PKN, тем самым вызывая уменьшение каталитической активности последней. Таким образом, CG-NAP может служить «скэффолдом», в котором происходит регуляция активности связанных с ним ферментов. Можно предположить, что PKN через связывание с CG-NAP имеет возможность принимать участие в регуляции взаимоотношений между компонентами цитоскелета на протяжении клеточного цикла: сетью промежуточных филаментов, актиновым цитоскелетом и сетью микротрубочек, организуемой центросомой [53].

III. STE20-ПОДОБНЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ

КЛАССИФИКАЦИЯ И ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

Путь передачи сигнала от клеточных рецепторов на MAP-киназные каскады изучен еще недостаточно. В этом пути обычно участвуют малые ГТФазы и непосредственно активируемые ими ПК. Семейство Ste20-подобных (Sterile-20) серин/треониновых ПК было впервые открыто и описано как компонент сигнального пути *S. cerevisiae*, запускаемого в ответ на воздействие феромонов (см. выше). За последние несколько лет было открыто большое число Ste20-подобных ПК у млекопитающих [8]. В отдельное семейство Ste20-подобные протеинкиназы были выделены из-за высокой степени гомологии их каталитического домена со Ste20. В остальной части молекулы ПК данного семейства могут сильно различаться по последовательности аминокислот и структуре молекул. Исходя из структурных особенностей,

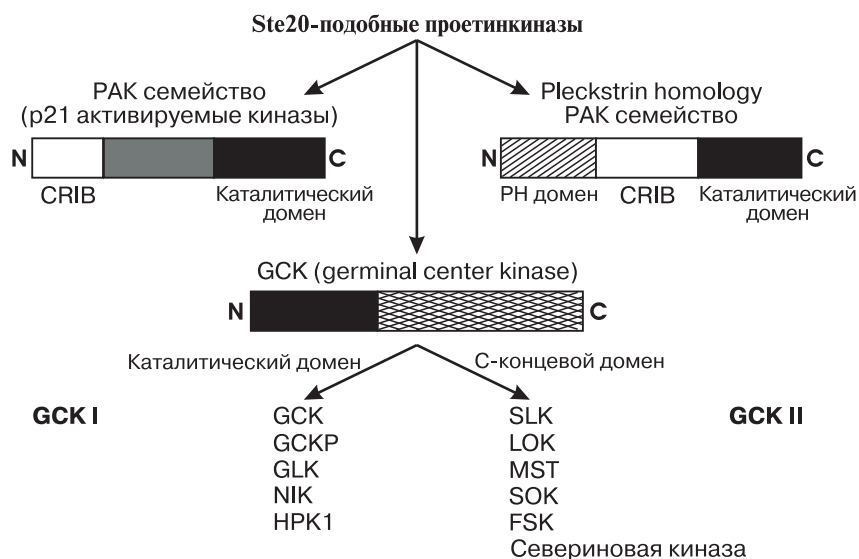


Рис. 3. Классификация Ste20-подобных протеинкиназ.

Ste20-подобные протеинкиназы обычно делят на 3 подсемейства: ПАК (p21-activated kinase), PH-ПАК (plecstrin-homology domain p21-activated kinase) и GCK (germinal center kinase) (рис. 3).

Р21-АКТИВИРУЕМЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ (ПАК)

Подсемейство ПАК включает в себя ПК, у которых каталитический домен расположен на С-конце молекулы, а N-конец представляет из себя регуляторный домен. У таких протеинкиназ на С-конце имеется сайт для связывания с малыми ГТФазами, которые активируют ферменты этого подсемейства, так называемый CRIB домен (cell division cycle (cdc) 42/Rac-interactive binding domain). ПАК-протеинкиназы могут фосфорилировать протеинкиназу Raf-1 (МККК) [30], что приводит к активации ERK. ПАК активируют через соответствующий каскад также протеинкиназы JNK/SAPK и p38 (см. рис. 1) [15].

Кроме того, ПАК-протеинкиназы фосфорилируют и регулируют активность ряда цитоскелетных белков. В частности, это тяжелая цепь миозина I [60], легкая цепь миозина II [5], актин-связывающий белок мерлин [63], белок промежуточных филаментов десмин [40], миозин-связывающий белок кальдесмон [16]. Помимо цитоскелетных белков, ПАК фосфорилирует анти-апоптотический фактор Bad и вызывает супрессию апоптоза [28, 50]. В какой-то степени фосфорилирование

Vad протеинкиназой PAK ограничивает индукцию апоптоза этой же киназой через активацию JNK/SAPK пути.

Одной из важных мишеней PAK является протеинкиназа LIM, которую она активирует [7]. Протеинкиназа LIM фосфорилирует актин-связывающий белок кофилин, играющий одну из ключевых ролей в регуляции зависимого от актина движения клеток [11].

Протеинкиназы подсемейства PH-PAK [37] имеют схожую с PAK-протеинкиназами схему строения, но за небольшим дополнением: наличие PH домена, расположенного перед CRIB доменом. PH-домены обнаружены у многих белков. Структурно домен формируется 100 аминокислотами, уложенными в 7 β -слоев и одну N-концевую α -спираль. N- и C-концы в домене сближены. Карман, образованный β -слоями, связывается с мембранными фосфолипидами, давая возможность белкам, имеющим домен такого типа, локализоваться на мембране. Участок PH-домена, имеющий структуру α -спирали, участвует во взаимодействии с белками. На сегодняшний день протеинкиназы PH-PAK-подсемейства не найдены у высших эукариот.

ГСК-ПОДОБНЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ

Классификация по структуре молекулы

У ПК подсемейства GCK (Germinal Center Kinase) каталитический домен расположен на N-конце молекулы, а длинный C-конец является регуляторным, и не несет CRIB и других известных структурных доменов [33]. По структурным и функциональным свойствам GCK семейство можно разбить на две большие группы. К первой группе относятся ПК, наиболее близкие протеинкиназе GCK: сама GCK, GCK-related kinase (GCKR), GCK-like kinase (GLK), Hematopoietic Progenitor kinase-1 (HPK1), Nck-interacting kinase (NIK). C-концевой участок GCK протеинкиназ содержит как минимум два PEST мотива — последовательности, обогащенные Pro, Glu, Ser и Thr. Белковые последовательности, богатые такими аминокислотами, как правило, имеют внутриклеточное время жизни менее 2 часов [46]. В GCK-протеинкиназах имеются также минимум два полипролин-консенсусных сайта для связывания с белками, содержащими SH3-подобный домен, т.е. SH3-связывающий домен. Все GCK протеинкиназы I группы имеют высококонсервативные примерно 350 аминокислот на C-конце. Этот участок делится на два домена: гидрофобный лейцин-богатый домен и самый C-конец белка длиной 140–150 а. к. (СТ-домен или STD). Лейциновые остатки в лейцин-богатом домене не организуются в структуру типа лейциновой молнии, и этот домен не является достаточно гидрофобным для связывания с мембраной, т.е. его функции непонятны. GCK, GCKR и GLK активируются *in*

in vivo при воздействии на клетку фактора некроза опухолей (TNF) и активируют через каскад JNK/SAPK протеинкиназы. Для GCK I группы показано отсутствие активации ими p38 и ERK. Исследования GCK и GCKR показали, что СТ домены этих ферментов участвуют в связывании TRAF (TNF receptor-associated factor) белков, т.е., вероятно, нужны для их активации при действии TNF на клетки (подробнее см. ниже). Протеинкиназа GCK экспрессируется почти во всех тканях позвоночных, однако в лимфоцитарных фолликулах экспрессия ограничивается герминальными центрами (центрами размножения) и полностью отсутствует в периферической зоне. Герминальные центры – это области лимфоцитарного фолликула ткани, в которых происходит селекция и дифференцировка В-лимфоцитов, включающая переключение классов экспрессируемых иммуноглобулинов. Эти процессы направляются лигандами семейства TNF.

Ко второй группе GCK-подобных протеинкиназ обычно относят следующие ПК: Ste-20 Oxidant stress-activated Kinase 1 (SOK1), Kinase Responsive to Stress (Krs)-1, Mammalian Sterile Twenty-like-1 (MST 1/Krs 2), Mammalian Sterile Twenty-like-3 (MST 3), Lymphocyte-Oriented Kinase (LOK), Severin Kinase, Sps 1p, Cdc15p, SLK/LOS (STE20 like kinase/Long ste20-related kinase). Общих структурных особенностей у С-концевых регуляторных доменов протеинкиназ второй подгруппы GCK не выявлено.

Функциональные особенности и регуляция активности GCK протеинкиназ I группы

Протеинкиназы семейства GCK (Germinal Center Kinase) по расположению во внутриклеточных протеинкиназных сигнальных каскадах, вероятно, можно отнести к слабо изученному уровню MAPKKKK/МКККК.

При гиперэкспрессии в клетках GCK-подобные ПК I группы получают энзиматически активными, в частности, они активируют JNK/SAPK протеинкиназу без участия дополнительно привнесенных лигандов. Этим они отличаются от PAK-протеинкиназ, которые должны для активации ко-экспрессироваться с активными формами Rac1 или Cdc42. Такие данные дают возможность предположить, что GCK протеинкиназы I группы инактивируются путем ассоциации с ингибитором, присутствующим в клетках в лимитированных количествах, и активируются при отсоединении этого ингибитора. Возможно также их активация при олигомеризации. Вполне вероятно, что консервативные СТ участки GCK-протеинкиназ I группы нужны для регуляции их активности. Так, при экспрессии СТ доменов GCK

и NIK [52], (но не НРК1 и GSKR) в клетках происходила активация JNK/SAPK, что поддерживает предположение о возможном стехиометрическом замещении ингибитора протеинкиназ СТ доменом при его избытке, и не исключает возможности участия СТ доменов в образовании агрегатов активной GSK.

Для некоторых GSK-подобных протеинкиназ I группы *in vivo* показана возможность связывания с MAPKKK/МККК протеинкиназами. Вероятно, непосредственное связывание необходимо для фосфорилирования MAPKKK, возможно, оно активирует MAPKKK/МКККК. Так, известно, что протеинкиназа НРК1 может связываться с MEKK1 и MLK3 [26]. В НРК1-MLK3 взаимодействии участвуют 2 из 4 С-концевых SH3-связывающих мотивов протеинкиназы НРК1, которые взаимодействуют с SH3 доменом MLK3. Поскольку ферментативно неактивные мутанты MEKK1 и MLK3 могут блокировать НРК1-опосредованную активацию JNK/SAPK, можно считать, что MEKK1 и MLK3 располагаются ниже НРК1 в протеинкиназном каскаде.

Протеинкиназа NIK была обнаружена как белок, взаимодействующий с SH2/SH3 адапторным белком Nck [52]. СТ домен этой протеинкиназы содержит два SH3-связывающих домена, оба из которых могут связываться с SH3 доменом Nck. Внутриклеточный активатор NIK пока не известен, но вполне вероятно, что Nck-NIK взаимодействие необходимо для связывания NIK с рецепторами, или с нерцепторными тирозиновыми ПК. *In vivo* NIK может взаимодействовать с MEKK1. В этом взаимодействии участвуют Leu-богатый домен протеинкиназы NIK (948–1233) и N-концевой участок MEKK1 размером 719 а.к.. Неактивный протеинкиназный мутант MEKK1 ингибирует NIK-опосредованную активацию SAPK, что говорит о том, что MEKK1 является физиологической мишенью NIK.

GSK также может взаимодействовать *in vivo* с MEKK1, однако в этом связывании, по сравнению с NIK—MEKK1 взаимодействием, участвует другой домен протеинкиназы MEKK1 (817–1222 а.к.). GSK—MEKK1 связывание происходит через СТ домен протеинкиназы GSK. Делеция СТ домена GSK предотвращает связывание с MEKK1. Дальнейшее удаление лейцин-богатой области его восстанавливает, а при удалении С-концевого PEST домена связывание не происходит [33]. В отличие от NIK, во взаимодействии GSK с MEKK1, по-видимому, не участвует лейцин-богатый домен, и возможно он даже негативно регулирует взаимодействие ПК, ухудшая его. GSK, так же, как НРК1, связывается с MLK3, но не связывается с MLK2, которая структурно очень похожа на MLK3. Таким образом,

во взаимодействии протеинкиназ I группы с MEKK1 участвуют различные участки СТ-домена. Экспрессия GSK-связывающего фрагмента MEKK1 в клетках блокирует GSK-опосредованную активацию JNK/SAPK, что является доказательством того, что MEKK1 является мишенью GSK. Интересно, что СТ-домен GSK образует с MEKK1 гораздо более стабильный комплекс по сравнению с полноразмерной GSK, чего не наблюдается в случае взаимодействия NIK и HPK1.

Помимо MLK3, HPK1 *in vivo* может связываться с SH2/SH3 домен содержащим белком Grb2. Grb2 известен своей способностью взаимодействовать с белком SOS, который является фактором обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) для белка Ras, малой ГТФазы, участвующей во многих сигнальных путях клетки. При действии на клетки митогенов происходит активация рецепторных тирозиновых ПК путем автофосфорилирования и Grb2-SOS комплекс связывается с остатком фосфорилированного тирозина активированного рецептора. Таким образом SOS располагается у клеточной мембраны, где он может активировать Ras. С-концевой SH3 домен Grb2 также взаимодействует с двумя N-концевыми SH3-связывающими сайтами протеинкиназы HPK1 [3]. Как и в случае Grb2-SOS взаимодействия, Grb2-HPK1 связь не нарушается при стимуляции клетки митогеном. Однако обработка клетки эпидермальным фактором роста приводит к транслокации Grb2-HPK1 комплекса на мембрану, из-за взаимодействия с автофосфорилированным рецептором. Исходя из этого, не исключена возможность участия тирозиновых ПК в мембранной транслокации GSK-подобных протеинкиназ I группы.

Белок Rab8 также относится к белкам, связывающимся с GSK. В этом взаимодействии участвует СТ-домен протеинкиназы. Rab8 является мономерной ГТФазой. Белки семейства Rab участвуют в везикулярном транспорте. Rab8 регулирует транспорт между транс-Гольджи и плазматической мембраной. Связывание GSK и Rab8 является ГТФ-зависимым. Так, мутант Rab8, не способный связывать нуклеотид или обменивать ГДФ на ГТФ, не взаимодействует *in vivo* с GSK. Исходя из этих данных, можно предположить, что GSK играет роль эффектора в Rab8-регулируемом везикулярном транспорте, или Rab8 может направлять GSK к белковым субстратам, ассоциированным с везикулярными мембранами, предназначенными для слияния с плазматической мембраной.

Показано, что некоторые GSK-подобные протеинкиназы, принадлежащие к первой группе, способны участвовать в регуляции динамики актинового цитоскелета. Так, протеинкиназа TNIK при гиперэкспрессии в культивируемых клетках приводит к разрушению

F-актиновых структур. Помимо этого, TNIK может фосфорилировать актинсвязывающий белок гельзолин *in vitro* [18].

Участие протеинкиназ семейства GCK в передаче сигнала от TNF

In vivo GCK, GCKR и GLK активируются TNF и, по-видимому, являются элементами TNF-сигнальных путей, активирующих JNK/SAPK [10, 43]. TNF связывается с одним из двух клеточных рецепторов, TNFR1/CD120a, мол. массы 55 кДа или TNFR2/CD120b, мол. массы 75 кДа. Ни один из рецепторов не имеет ферментативной активности. В ответ на связывание лиганда рецептор TNF гомомеризуется, что приводит к его взаимодействию с эффекторами, расположенными далее в цепи передачи сигнала. Внутриклеточная часть TNFR1 содержит так называемый домен смерти (death domain), который при активации рецептора TNF связывается с TRADD (TNFR associated death domain protein) белком, который в свою очередь после этого связывает TRAF2 белок. TRAF белки содержат С-концевой консервативный TRAF домен, состоящий из повторов цинковых пальцев в центральной области, и, за исключением TRAF1, на N-конце несут RING палец, который важен для передачи сигнала от TRAF2 ниже по сигнальной цепи (рис. 4). TRAF домен участвует в связывании с белками-мишенями. Известно, что транзистентная гипер-

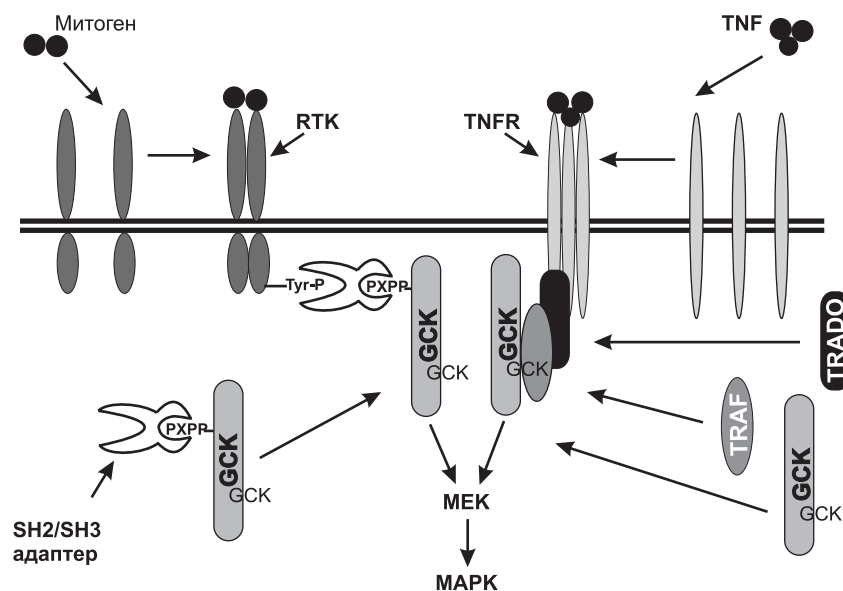


Рис. 4. Участие протеинкиназы GCK в MAPK каскадах [33].

экспрессия TRAF2, -5, -6 может активировать JNK/SAPK протеинкиназы. GSK и GSKR являются важными эффекторами для TRAF2 [64]. Антисмысловая мРНК GSKR блокирует активацию JNK/SAPK, но не блокирует активацию транскрипционного фактора NF- κ B в ответ на TNF. В дополнение к этому, экспрессия TRAF2, но не TRAF2 мутанта без RING домена, активирует и GSKR, и JNK/SAPK *in vivo*. Для взаимодействия GSK и GSKR с TRAF2 важно наличие удлиненного СТ-домена у GSK белков. В случае GSK N-концевой PEST-мотив также необходим для связывания с TRAF2. Наличие высокой гомологии между СТ-доменами GSK, GSKR, HPK1 и GLK говорит о возможности взаимодействия всех этих и других подобных GSK белков I группы с TRAF белками. Таким образом, одна из функций TRAF белков, возможно, состоит в регуляции взаимодействия между TNF/цитокин-активируемыми рецепторами и GSK-подобными протеинкиназами.

GSK-протеинкиназы II группы

О физиологической и клеточной роли GSK протеинкиназ второй группы на сегодняшний день почти ничего не известно, несмотря на довольно большое число клонированных ПК данной группы. Для протеинкиназы из куриных эмбриональных фибробластов KFC (Kinase From Chicken) недавно впервые для данного класса протеинкиназ были показаны митогенные свойства [66]. При клонировании KFC были обнаружены две формы протеинкиназы (два транскрипта). Длинная форма протеинкиназы (KFCL) содержала N-концевой протеинкиназный домен, центральный участок, обогащенный серином, и C-концевой домен с предполагаемой вторичной структурой типа скрученной спирали. У сплайсированного варианта (KFCS) имелась делеция размером 69 аминокислот в области, обогащенной серином, где из 69 делетированных аминокислот 22 являлись серином. Анализ первичной структуры KFC выявил высокий процент гомологии с ранее описанной протеинкиназой TAO1 (Thousand And One). При исследовании скорости роста линии иммортализованных клеток куриных фибробластов DF-1 было установлено, что стабильная экспрессия в этих клетках KFCL увеличивает скорость роста клеток в 2,5 раза по сравнению со скоростями роста родительской линии DF-1 и линии с постоянной экспрессией KFCS. На основе этого было сделано заключение о том, что для стимуляции роста клеток протеинкиназой KFC важен участок в центральном домене, обогащенный серином.

KFCL наиболее сильно экспрессировалась в селезенке и семенниках, и в меньшем количестве в мозге, тимусе и печени. Интересно,

что KFCS во всех исследуемых тканях экспрессировалась в меньшей степени, чем KFCL. Обе изоформы (KFCL и KFCS), иммунопреципитированные из клеток COS1, где велась их транзientная экспрессия, проявляли автофосфорилирующую активность. Так как для некоторых ПК данного класса было известно, что С-концевая часть молекулы может регулировать протеинкиназную активность, исследователи получили мутант с делетированной С-концевой частью (практически полностью удалили участок скрученной спирали) – KFCLDC-1-464. Полученный мутант проявлял сходный с KFCL и KFCS уровень автофосфорилирования, но уровень фосфорилирования экзогенного субстрата гистона 2В сильно увеличился, что подтвердило предположение об ингибирующей активности С-концевой области ПК. Транзientно экспрессированные KFCL и KFCS были локализованы в цитоплазме, отсутствовали в ядре и не имели ярко выраженной компарментализации в клетке. Коэкспрессия KFC-изоформ и GST-слитых MAPK протеинкиназ в COS1 клетках с последующей проверкой активации MAPK протеинкиназ дала возможность определить сигнальный путь в котором участвует KFC. Это оказался JNK/SAPK-путь. KFCL и KFCS слабо активировали SAPK, в то время как мутант с делетированным С-концом (KFCLDC-1-464) активировал SAPK сильно, сравнимо с MEKK-позитивным контролем [66].

Протеинкиназа LOK (lymphocyte-oriented kinase) экспрессируется в основном в лимфоидных органах. LOK имеет размер 966 а.к.. Показано, что LOK не участвует в известных MAPK киназных каскадах (ERK, JNK, p38). LOK способна автофосфорилироваться и использовать в качестве субстратов MBP и гистон IIА [32]. На сегодняшний день имеются данные, указывающие на участие протеинкиназы LOK в LFA-1 (leukocyte-function-associated antigen) регуляции адгезии лимфоцитов [13].

Гомологичная LOK протеинкиназа SLK/LOSK экспрессируется во всех тканях животных [1, 67]. Гиперэкспрессия кДНК этой ПК в клетках приводит к апоптозу [47, 48]. При апоптозе происходит удаление структурного домена LOSK каспазой-3, что сопровождается повышением активности фермента. *In vitro* активность полноразмерной киназы вполне сопоставима с активностью киназы с делетированным структурным доменом, хотя в последнем случае фермент становится менее зависимым от условий проведения киназной реакции [2]. Это заставляет предположить, что SLK/LOSK в клетках находится под действием некоего ингибитора, для проявления активности которого нужен структурный домен. Интересно, что гиперпродукция

в клетках как полноразмерной киназы, так и ее С-концевого структурного домена вызывает разрушение актиновых филаментов [48].

Протеинкиназа SOK1 специфично активируется при окислительном стрессе, но при этом не активируется факторами роста, цитокинами, алкилирующими агентами, температурным шоком и осмотическим стрессом. Известно, что SOK1 активируется автофосфорилированием. С-концевой домен заметно ингибирует каталитическую активность фермента. SOK1 не активирует SAPK и p38 протеинкиназные каскады [42].

Протеинкиназы Mst1 и Mst2 также относятся к GSK киназам II группы. Для протеинкиназы Mst1 показано, что она несет в центральном участке автоингибирующую последовательность, удаление которой активировало фермент в 9 раз. На основе опытов по ко-иммунопреципитации, анализа взаимодействия белков с помощью дигибридной дрожжевой системы и *in vitro* анализа белковых сшивок, было показано, что протеинкиназа Mst1 гомодимеризуется с 57 С-концевых аминокислот. Хроматографическими методами установлено, что в клетке Mst1 существует в виде высокомолекулярного белкового комплекса. В отсутствие димеризации ферментативная активность Mst1 не ингибировалась [6]. Показано, что Mst протеинкиназы подвержены протеолитическому расщеплению в ходе апоптоза, что приводит к активации киназы. Mst1 и Mst2 являются непосредственными субстратами каспазы 3 *in vivo* и *in vitro*. Стауроспорин активирует Mst, как зависимым от каспаз механизмом (также, как и в случае Fas-активируемого апоптоза), так и с помощью каспаз-независимого. В случае Fas-индуцируемого апоптоза, расщепленная, активированная Mst транслоцируется в ядро до начала его фрагментации. Стабильно экспрессирующаяся в клетках HeLa Mst сильно увеличивает чувствительность клеток к апоптозу, запускаемому через рецепторы смерти. При этом Mst усиливает активацию каспазы 3 [35].

Таким образом, у всех исследованных GSK-киназ II группы С-концевой структурный домен является регуляторным/ингибирующим.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, видно, что активация протеинкиназ, участвующих в MAP-киназных каскадах, может происходить самыми различными путями — через фосфорилирование, связывание со структурными белками, связывание с ГТФазами, а также через частичный протеолиз (отщепление структурного домена). Разнообразие участников этих каскадов и связей между ними обуславливает разнообразие клеточных

реакций в ответ на различные воздействия, создает положительные и отрицательные обратные связи, а существующие в клетках большие мультиферментные белковые «скеффолды», включающие и протеинкиназы, участвующие в различных МАРК киназных каскадах, позволяют сигнальным каскадам не пересекаться и однозначно определяют передачу сигнала в конкретной цепи: внеклеточный сигнал – рецептор – МАРК киназный каскад. Очевидно, что даже при полном знании путей активации и эффекторов различных протеинкиназ необходимо наличие общей количественной модели их каскадов, чтобы клеточные ответы на те или иные стимулы могли бы быть спрогнозированы.

Авторы благодарны Л.А. Зиновкиной за ценные замечания при обсуждении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиновкина Л. А., Полтараус А. Б., Соловьянова О. Б., Надеждина Е. С. // Мол. биол. 1998. Т. 32. С. 341–348.
2. Потехина Е. С., Зиновкина Л. А., Надеждина Е. С. // Биохимия. 2002 (в печати).
3. Anafi M., Kiefer F., Gish G., Mbamalu G., Iscove N., Pawson T. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 27804–27811.
4. Chen C., Gherzi R., Andersen J., Gaietta G., Jurchott K., Royer H., Mann M., Karin M. // Genes. Dev. 2000. Vol. 14. P. 1236–1248.
5. Chew T., Masaracchia R., Goekeler Z., Wysolmerski R. // J. Muscle. Res. Cell. Motil. 1998. Vol. 19 P. 839–854.
6. Creasy C., Ambrose D., Chernoff J. // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 21049–21053.
7. Dan C., Kelly A., Bernard O., Minden A. // J. Biol. Chem. 2001a. Vol. 276. P. 32115–32121.
8. Dan I., Watanabe N., Kusumi A. // Trends. Cell. Biol. 2001b. Vol. 11. P. 220–230.
9. Davis R. // Biochem. Soc. Symp. 1999. Vol. 64 P. 1–12.
10. Diener K., Wang X., Chen C., Meyer C., Keesler G., Zukowski M., Tan T., Yao Z. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 9687–9692.
11. Edwards D., Sanders L., Bokoch G., Gill G. // Nat. Cell. Biol. 1999. Vol. 1. P. 253–259.
12. Elion E. // Science. 1998. Vol. 281. P. 1625–1626.
13. Endo J., Toyama-Sorimachi N., Taya C., Kuramochi-Miyagawa S., Nagata K., Kuida K., Takashi T., Yonekawa H., Yoshizawa Y., Miyasaka N., Kasuyama H. // FEBS Lett. 2000. Vol. 468. P. 234–238.
14. English J., Pearson G., Wilsbacher J., Swantek J., Karandikar M., Xu S., Cobb M. // Exp. Cell. Res. 1999. Vol. 253. P. 255–270.

15. Fanger G., Johnson N., Johnson G. // *Embo. J.* 1997. Vol. 16. P. 4961–4972.
16. Foster D., Shen L., Kelly J., Thibault P., Van Eyk J., Mak A. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 1959–1965.
17. Friesen H., Lunz R., Doyle S., Segall J. // *Genes Dev.* 1994. Vol. 8. P. 2162–2175.
18. Fu C., Shen M., Huang B., Lasaga J., Payan D., Luo Y. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 30729–30737.
19. Garrington T., Johnson G. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999. Vol. 11. P. 211–218.
20. Gavin A., Nebreda A. // *Curr. Biol.* 1999. Vol. 9. P. 281–284.
21. Goode B., Drubin D., Barnes G. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000. Vol. 12. P. 63–71.
22. Graves L., Guy H., Kozlowski P., Huang M., Lazarowski E., Pope R., Collins M., Dahlstrand E., Earp H., Evans D. // *Nature.* 2000. Vol. 403. P. 328–332.
23. Han J., Jiang Y., Li Z., Kravchenko V., Ulevitch R. // *Nature.* 1997. Vol. 386. P. 296–299.
24. Herskowitz I. // *Cell.* 1995. Vol. 80. P. 187–197.
25. Hoshi M., Ohta K., Gotoh Y., Mori A., Murofushi H., Sakai H., Nishida E. // *Eur. J. Biochem.* 1992. Vol. 203. P. 43–52.
26. Hu M., Qiu W., Wang X., Meyer C., Tan T. // *Genes Dev.* 1996. Vol. 10. P. 2251–2264.
27. Huang J., Brady S., Richards B., Stenolen D., Resau J., Copeland N., Jenkins N. // *Nature.* 1999. Vol. 397. P. 267–270.
28. Jakobi R., Moertl E., Koepfel M. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 16624–16634.
29. Kallunki T., Deng T., Hibi M., Karin M. // *Cell.* 1996. Vol. 87. P. 929–939.
30. King A., Sun H., Diaz B., Barnard D., Miao W., Bagrodia S., Marshall M. // *Nature.* 1998. Vol. 396. P. 180–183.
31. Kotlyarov A., Neininger A., Schubert C., Eckert R., Birchmeier C., Volk H., Gaestel M. // *Nat. Cell. Biol.* 1999. Vol. 1. P. 94–97.
32. Kuramochi S., Moriguchi T., Kuida K., Endo J., Semba K., Nishida E., Karasuyama H. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 22679–22684.
33. Kyriakis J. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 5259–5262.
34. Lasa M., Mahtani K., Finch A., Brewer G., Saklatvala J., Clark A. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. P. 4265–4274.
35. Lee K., Ohshima T., Yajima N., Tsubuki S., Yonehara S. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 19276–19285.
36. Marcus S., Polverino A., Barr M., Wigler M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 7762–7766.
37. Martin H., Mendoza A., Rodriguez-Pachon J., Molina M., Nombela C. // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 23. P. 431–444.
38. Mukhopadhyay N., Price D., Kyriakis J., Pelech S., Sanghera J., Avruch J. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 3325–3335.
39. Neidhart S., Antonsson B., Gillieron C., Vilbois F., Grenningloh G., Arkinstall S. // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 508. P. 259–264.
40. Ohtakara K., Inada H., Goto H., Taki W., Manser E., Lim L., Izawa I.,

- Inagaki M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 272. P. 712–716.
41. *Palmer A., Gavin A., Nebreda A.* // *Embo. J.* 1998. Vol. 17. P. 5037–5047.
42. *Pombo C., Bonventre J., Molnar A., Kyriakis J., Force T.* // *Embo. J.* 1996. Vol. 15. P. 4537–4546.
43. *Pombo C., Kehrl J., Sanchez I., Katz P., Avruch J., Zon L., Woodgett J., Force T., Kyriakis J.* // *Nature.* 1995. Vol. 377. P. 750–754.
44. *Posas F., Saito H.* // *Science.* 1997. Vol. 276. P. 1702–1705.
45. *Pyronnet S., Imataka H., Gingras A., Fukunaga R., Hunter T., Sonenberg N.* // *Embo. J.* 1999. Vol. 18. P. 270–279.
46. *Rogers S., Wells R., Rechsteiner M.* // *Science.* 1986. Vol. 234. P. 364–368.
47. *Sabourin L., Rudnicki M.* // *Oncogene.* 1999. Vol. 18. P. 7566–7575.
48. *Sabourin L., Tamai K., Seale P., Wagner J., Rudnicki M.* // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. P. 684–696.
49. *Schaeffer H., Catling A., Eblen S., Collier L., Krauss A., Weber M.* // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1668–1671.
50. *Schurmann A., Mooney A., Sanders L., Sells M., Wang H., Reed J., Bokoch G.* // *Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. P. 453–461.
51. *Stockinger W., Brandes C., Fasching D., Hermann M., Gotthardt M., Herz J., Schneider W., Nimpf J.* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 25625–25632.
52. *Su Y., Han J., Xu S., Cobb M., Skolnik E.* // *Embo. J.* 1997. Vol. 16. P. 1279–1290.
53. *Takahashi M., Shibata H., Shimakawa M., Miyamoto M., Mukai H., Ono Y.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 17267–17274.
54. *Treisman R.* // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1996. Vol. 8. P. 205–215.
55. *Veeranna N., Ahn N., Jaffe H., Winters C., Grant P., Pant H.* // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18. P. 4008–4021.
56. *Verhey K., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B., Rapoport T., Margolis B.* // *J. Cell. Biol.* 2001. Vol. 152. P. 959–970.
57. *Whitmarsh A., Cavanagh J., Tournier C., Yasuda J., Davis R.* // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1671–1674.
58. *Whitmarsh A., Kuan C., Kennedy N., Kelkar N., Haydar T., Mordes J., Appel M., Rossini A., Jones S., Flavell R., Rakic P., Davis R.* // *Genes. Dev.* 2001. Vol. 15. P. 2421–2432.
59. *Winzen R., Kracht M., Ritter B., Wilhelm A., Chen C., Shyu A., Muller M., Gaestel M., Resch K., Holtmann H.* // *Embo. J.* 1999. Vol. 18. P. 4969–80.
60. *Wu C., Lee S., Furmaniak-Kazmierczak E., Cote G., Thomas D., Leberer E.* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 31787–31790.
61. *Xia Y., Makris C., Su B., Li E., Yang J., Nemerow G., Karin M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 5243–5248.
62. *Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R., Greenberg M.* // *Science.* 1995. Vol. 270. P. 1326–1331.
63. *Xiao G., Beeser A., Chernoff J., Testa J.* // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 883–886.
64. *Yuasa T., Ohno S., Kehrl J., Kyriakis J.* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 22681–22692.

65. *Yujiri T., Sather S., Fanger G., Johnson G.* // *Science*. 1998. Vol. 282. P. 1911–1914.
66. *Yustein J., Li D., Robinson D., Kung H.* // *Oncogene*. 2000. Vol. 19. P. 710–718.
67. *Zinovkina L., Poltarau A., Solovyaynova O., Nadezhkina E.* // *FEBS Lett*. 1997. Vol. 414. P. 135–139.