

БОЛЬШОЙ ЗАГАДОЧНЫЙ МИР БЕЛКОВ 14-3-3 РАСТЕНИЙ

© 2025 г.

И. А. СЕДЛОВ^{1,2}, Н. Н. СЛУЧАНКО^{1*}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Кафедра биохимии, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

I. Введение. II. Разнообразие и классификация белков 14-3-3. III. Биохимические особенности 14-3-3 растений. IV. Основные функции 14-3-3 растений. V. Заключение. «Белые пятна» в исследованиях растительных 14-3-3.

I. ВВЕДЕНИЕ

14-3-3 – это небольшие кислые димерные белки, найденные только у эукариот. Они не обладают собственной ферментативной активностью и функционируют за счет регуляции функций других белков. 14-3-3 способны связывать определенные фосфорилированные участки в составе других белков. Это взаимодействие приводит к изменению свойств белков-партнеров 14-3-3.

Около 60 лет назад были впервые описаны 14-3-3 из млекопитающих, а наиболее подробно изучены белки 14-3-3 человека. Десятилетия исследований привели к пониманию того, что 14-3-3 задействованы в регуляции множества фундаментальных процессов в клетках, таких как внутриклеточная передача сигнала, регуляция экспрессии генов, контроль клеточного цикла, регуляция клеточной гибели. Значимая роль 14-3-3 была также продемонстрирована в заболеваниях человека и животных, таких как вирусные инфекции и рак.

Белки 14-3-3 растений были впервые описаны на 30 лет позже, чем их гомологи из млекопитающих. Ввиду неподвижного образа жизни растениям нужно регулировать множество биохимических процессов, чтобы подстраиваться к постоянно меняющимся условиям среды, поэтому важность регуляторных молекул у них особенно велика. Видимо, поэтому была показана значимая роль 14-3-3 в важнейших процессах жизнедеятельности растений, таких как регуляция ответа на фитогормоны, цветение, контроль ростовых процессов, минеральное питание, иммунитет растений.

Несмотря на это, в исследованиях 14-3-3 растений остается множество неизученных вопросов, своего рода «белых пятен». Так, белки 14-3-3 растений со структурной и биохимической точек зрения исследованы меньше, чем их гомологи из млекопитающих. Недостаточное количество структурной информации о комплексах 14-3-3 растений с белками-партнерами приводит к нехватке данных о механизмах влияния 14-3-3 на функции этих белков. В большинстве случаев отсутствуют детали о взаимодействиях 14-3-3 с белками-партнерами и об эффектах связывания на их функции. Из большого

количества генов 14-3-3 для анализа функций *in vivo* и *in vitro* отдельные изоформы выбирают случайно, практически наугад. Полученные результаты складываются в фрагментарную картину с невозможностью делать глобальные обобщения.

Данный обзор призван, с одной стороны, показать разнообразие и широкий охват исследований о функциях растительных 14-3-3, и, с другой стороны, осветить несистемность и фрагментарность, в настоящий момент присущую исследованиям по 14-3-3 растений.

II. РАЗНООБРАЗИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ 14-3-3

Белки семейства 14-3-3 широко распространены среди эукариот. Они были впервые выделены в 1960-х годах из мозга млекопитающих, где составляют значительную долю всех белков (вплоть до 1% [1]), и получили свое название благодаря особенностям процесса очистки: эти белки находились во фракции номер 14 при хроматографии на диэтиламиноэтил-целлюлозе и давали пятно 3.3 при электрофорезе в крахмальном геле [2]. Дальнейшие исследования привели к обнаружению нескольких гомологичных белков 14-3-3 у млекопитающих. Первоначально описали семь таких белков, дав им названия по первым буквам греческого алфавита: α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , однако затем выяснилось, что α и δ – это фосфорилированные варианты β и ζ , соответственно. Белки 14-3-3 получили название «изоформ», и хотя этот термин является не вполне корректным, поскольку каждая «изоформа» 14-3-3 кодируется отдельным геном, он прочно закрепился в литературе, посвященной 14-3-3, и будет использован в настоящем обзоре. Впоследствии обнаружили специфично экспрессирующиеся изоформы 14-3-3 σ и τ (или θ) [3]. Независимые исследовательские группы несколько раз переоткрывали белки 14-3-3 в разных биологических объектах, что привело к возникновению альтернативных названий белков, например, *Leonardo* у плодовой мушки *Drosophila*, VMH1 и VMH2 у дрожжей *S. cerevisiae*, GRF у растения *Arabidopsis* и др. [3]. 14-3-3 растений были впервые описаны почти на три десятилетия позже их гомологов из млекопитающих: в 1992 году вышло сразу несколько работ о растительных 14-3-3 [4–7]. Пожалуй, белки 14-3-3 ни одной группы организмов не имели столько альтернативных названий, сколько было у 14-3-3 растений. В растениях это и фузикоцин-связывающий белок (Fusicocin-Binding Protein, FCBP) [8], и главный регуляторный фактор (General Regulatory Factor, GRF) [9], и фактор, ассоциированный с G-боксом (G-box Factor 14-3-3, GF14) [5, 7], и ингибитор нитратредуктазы (Nitrate Reductase Inhibitor Protein, NIP) [10], и TFT (Tomato Fourteen-Three-three) [11, 12], и RCI (Rare Cold-Inducible) [13]. Все эти названия относятся к представителям одного белкового семейства, описывают важные биологические функции и связаны с историей исследования белков 14-3-3. В настоящее время при классификации белков 14-3-3 различных видов растений используются обозначения GRF и GF14. Также, по аналогии с белками млекопитающих, изоформы модельного объекта *Arabidopsis thaliana* (13 изоформ) были названы греческими буквами, но начиная с конца алфавита: омега (ω), пси (ψ), хи (χ), фи (ϕ), ипсилон (υ), пи (π), омикрон (\omicron), ню (ν), мю (μ), лямбда (λ), каппа (κ), йота (ι), эпсилон (ϵ). Изоформы других видов растений, ортологичные определенным изоформам *A. thaliana*, могут быть также названы греческими буквами, что создает третью используемую систему наименования и классификации изоформ 14-3-3 растений. Взаимоотношения систем наименований для *A. thaliana* приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Системы наименований изоформ 14-3-3 *A. thaliana*.

Идентификатор в базе данных Uniprot	Буквы греческого алфавита		Номенклатура GRF	Номенклатура GF14
P42643	хи	χ	GRF1	GF14χ
Q01525	омега	ω	GRF2	GF14ω
P42644	пси	ψ	GRF3	GF14ψ
P46077	фи	φ	GRF4	GF14φ
P42645	ипсилон	υ	GRF5	GF14υ
P48349	лямбда	λ	GRF6	GF14λ
Q96300	ню	ν	GRF7	GF14ν
P48348	каппа	κ	GRF8	GF14κ
Q96299	мю	μ	GRF9	GF14μ
P48347	эпсилон	ε	GRF10	GF14ε
Q9S9Z8	омикрон	ο	GRF11	GF14ο
Q9C5W6	йота	ι	GRF12	GF14ι
F4IA59	пи	π	GRF13	GF14π

По сравнению с млекопитающими, для которых характерны 7 изоформ 14-3-3, виды растений отличаются существенной вариабельностью числа изоформ в пределах генома. Так, например, у земляники (*Fragaria vesca*) 5 изоформ [14], 8 изоформ у риса (*Oryza sativa*) [15], 8 у какао (*Theobroma cacao*) [16], 13 у томата (*Solanum lycopersicum*) [11], 18 у сои (*Glycine max*) [17], 26 у чайного дерева (*Camellia sinensis*) [16], и 36 у яблони (*Malus domestica*) [18].

Наличие большого числа ортологов и паралогов, а также разнообразие числа изоформ 14-3-3 у растений разных видов связано с несколькими полногеномными и сегментарными дупликациями, происходившими у растений в ходе эволюции [18–22]. Считается, что древнейшая дупликация привела к появлению двух отдельных крупных филогенетических ветвей, получивших названия эпсилон и неэпсилон групп. Множество работ по филогенетическому анализу подтверждают это разделение для изоформ различных видов растений [11, 14, 16, 18, 19, 22]. Относительно времени этой филогенетической дивергенции отсутствует устоявшееся мнение, возможно, она произошла до обособления группы зеленых растений [14]. Это разделение изоформ имеет фундаментальный характер, оно прослеживается у всех исследованных видов семенных растений (Spermatophyta); у каждого вида семенных растений есть и эпсилон-, и неэпсилон-изоформы [14, 19]. Примечательно, что эпсилон- и неэпсилон-изоформы отличаются структурой гена. У *A. thaliana* эпсилон-изоформы характеризуются наличием 6–7 экзонов и 4–6 интронов, в то время как для неэпсилон-изоформ характерны 4 экзона и 3–4 интрона [23, 24]. Несмотря на то, что подразделение паралогов 14-3-3 на эпсилон- и неэпсилон-группы является признанным и классическим, в ряде современных работ по эволюции 14-3-3 авторы не подразделяют изоформы даже на эти две крупные группы [24, 25].

В ходе эволюции крупные филогенетические группы разделялись на подгруппы меньшего размера. На основании анализа последовательностей генов 3 видов однодольных и 9 видов двудольных растений Ren *et al.* выделили 11 подгрупп («подсе-

мейств») 14-3-3, из них 4 – в эpsilon-группе и 7 – в неэpsilon-группе [18]. Некоторые подгруппы в этом анализе были представлены исключительно генами 14-3-3 однодольных. В другом анализе, где исследовали 14-3-3 из 12 видов растений, в составе неэpsilon-группы было выделено 4 подгруппы, а в эpsilon-группе подгруппы выделены не были [19]. В наиболее обширном филогенетическом исследовании семейства 14-3-3 были проанализированы изоформы 46 видов цветковых растений, из них 13 однодольных, 32 настоящих двудольных, и один представитель базальных покрытосеменных [14]. В составе эpsilon-группы было выделено три подгруппы: йота, мю и эpsilon, три подгруппы выделены в составе неэpsilon-группы: омега, пси и каппа. Эта классификация основана на филогенетическом родстве изоформ *A. thaliana*, а подгруппы названы в соответствии с обозначениями наиболее характерных изоформ греческими буквами. У *A. thaliana* изоформы распределены по подгруппам следующим образом: 5 генов в эpsilon-группе (1 в йота- (ι), 1 в мю- (μ) и 3 в эpsilon- (ο, π, ε) подгруппах) и 8 белков в неэpsilon-группе (3 в омега- (χ, φ, ω), 3 в пси- (υ, ν, ψ) и 2 в каппа- (κ, λ) подгруппах) (рис. 1 А). Как видно из рис. 1 А, у *A. thaliana* в каждой подгруппе есть хотя бы одна изоформа, что делает этот модельный объект удобным для системного исследования представителей семейства 14-3-3. Таким образом, классификация, основанная на изоформах 14-3-3 из *A. thaliana*, является полноценной и наиболее репрезентативной. Далее в настоящем обзоре будет использована именно эта классификация.

У ряда растений представленность изоформ в подгруппах, а также представленность самих подгрупп может существенно различаться. Так, например, у Бобовых (Fabaceae) отсутствует эpsilon-подгруппа, а у моркови (*Daucus carota*) отсутствуют йота- и эpsilon-подгруппы (Таблица 2). По распределению изоформ по подгруппам особенно выделяются представители класса Однодольных (Monocotyledoneae). У всех проанализированных представителей этого класса, за исключением банана (*Musa acuminata*), отсутствуют изоформы подгруппы йота. Примечательно, что у семейства Злаков (Poaceae) отсутствуют также подгруппы мю и каппа, однако число изоформ из подгруппы пси сильно увеличено, вплоть до 10 у пшеницы (*Triticum aestivum*) (Таблица 2). Кроме того, из неэpsilon-группы у Злаков присутствуют омега-изоформы. Такая особенность распределения изоформ привела к тому, что пси – самая многочисленная по числу изоформ подгруппа 14-3-3 среди проанализированных растений, а самая широко распространенная подгруппа – это омега [14].

Высокая вариабельность общего числа и филогенетической принадлежности паралогов 14-3-3 среди видов растений, в сочетании с механизмом эволюции этих белков путем множественных дупликаций, создает основания для предположений о вырожденности, перекрывании функций 14-3-3. Высокая степень функционального сходства была продемонстрирована в опыте на 14-3-3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. У этих дрожжей известны только два гена 14-3-3 – VMH1 и VMH2 [29–31]. Одиночные нокауты по этим генам фенотипически незначительно отличаются от организмов дикого типа, в то время как двойные мутанты летальны [29, 31]. Однако при комплементации введение 14-3-3 из растений способно восстанавливать жизнеспособный фенотип на фоне двойного нокаута, что указывает на глобальную взаимозаменяемость 14-3-3 даже из систематически отдаленных групп [32]. С другой стороны, данные эволюционного анализа для различных видов цветковых растений показывают действие стабилизирующего отбора на белки 14-3-3, что может быть связано с приобретением ими специфической функции или функций [18, 24, 33–35].

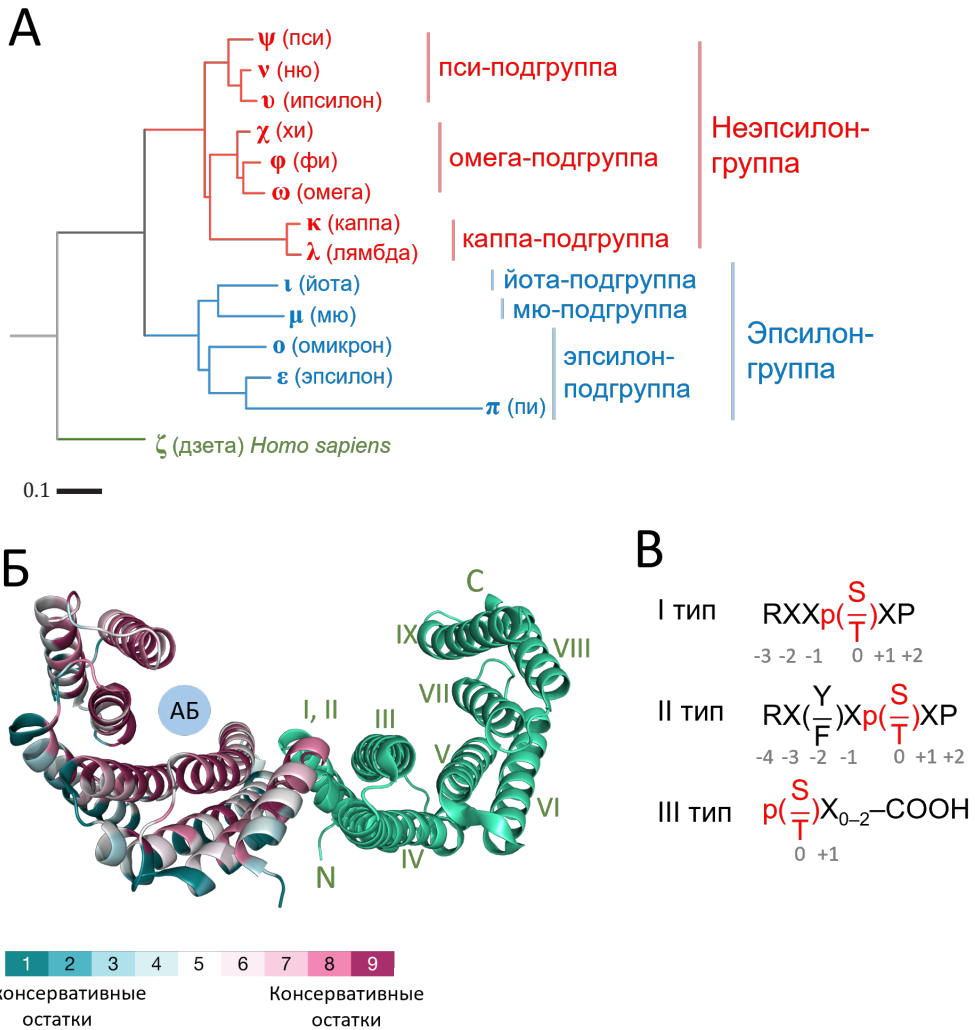


Рис. 1. Филогенетика и структура 14-3-3 растений.

А. Филогенетическое дерево 13 изоформ 14-3-3 из *A. thaliana*, построенное с помощью MEGA11 методом максимального правдоподобия (ML) и укорененное с помощью изоформы 14-3-3 ζ человека. Ниже показана размерная шкала эволюционной дистанции 0,1. На рисунке отмечены филогенетические группы и подгруппы.

Б. Структура димера 14-3-3 λ из *A. thaliana* (PDB код 8QT5 [26]). Левый мономер окрашен в соответствии с анализом консервативности остатков ConSurf [27] (настройкой по умолчанию), пурпурным цветом обозначены консервативные остатки для 14-3-3 различных видов растений, циановым – неконсервативные, ниже приведена соответствующая цветовая шкала. АБ – амфи-патическая бороздка, место связывания фосфорилированного участка белка-партнера. Правый мономер окрашен зеленым, отмечены N- и C-концы, римскими цифрами обозначены номера альфа-спиралей.

В. Аминокислотные последовательности фосфорилированных мотивов белков-партнеров 14-3-3. Красным цветом обозначены фосфорилируемые остатки. Серыми цифрами отмечены номера позиций относительно фосфорилированного остатка (позиция 0).

Таблица 2. Распределение изоформ 14-3-3 растений по филогенетическим группам и подгруппам согласно исследованию Mikhaylova *et al.* [14].

Систематические группы по системе APG IV*	Семейства	Виды растений	Эпсилон-группа			Неэпсилон-группа			Эпсилон-изоформы	Неэпсилон-изоформы	Общее число изоформ**					
			μ	ι	ε	ω	ψ	κ								
Базальные покрытосеменные	Amborellales	Amborellaceae	<i>Amborella trichopoda</i>			–	1	1	–	1	1	2	2	10 (6)		
Однодольные	Zingiberales	Musaceae	<i>Musa acuminata</i> (Банан)			6	1	1	–	1	1	8	2	10		
	Poales	Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i> (Ананас)			2	–	–	3	3	1	2	7	9		
			<i>Panicum virgatum</i> (Просо)			–	–	3	1	9	–	3	10	13		
			<i>Sorghum bicolor</i> (Сорго)			–	–	1	1	4	–	1	5	6		
			<i>Hordeum vulgare</i> (Ячмень)			–	–	1	1	5	–	1	6	7		
<i>Triticum aestivum</i> (Пшеница)			–	–	1	2	10	–	1	12	15 (2)					
Двулодные	Ranunculales	Ranunculaceae	<i>Aquilegia coerulea</i> (Водосбор)			1	2	1	2	1	2	4	5	9		
	Superasterids	Caryophyllales	Amaranthaceae	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>			3	–	–	3	3	2	3	8	11	
		Lamiales	Phrymaceae	<i>Mimulus guttatus</i>			1	2	1	3	2	2	4	7	11	
		Solanales	Solanaaceae	<i>Solanum tuberosum</i> (Картофель)			2	1	1	4	2	2	4	8	12	
				<i>Solanum lycopersicum</i> (Томат)			2	2	1	4	2	2	5	8	13	
				<i>Nicotiana tabacum</i> (Табак)			1	1	2	5	2	2	4	9	13	
	Apiales	Apiaceae	<i>Daucus carota</i> (Морковь)			1	–	–	4	1	3	1	8	9		
	Superrosids	Brassicales	Caricaceae	<i>Carica papaya</i> (Папайя)			2	1	1	1	–	2	4	3	7	
				Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i> (Репя)			1	3	3	7	4	5	7	16	23
					<i>Arabidopsis thaliana</i>			1	1	3	3	3	2	5	8	13
					<i>Arabidopsis lyrata</i>			1	1	1	3	3	2	3	8	11
					<i>Capsella rubella</i>			1	1	1	2	3	2	3	7	10
		Sapindales	Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i> (Апельсин)			2	1	1	2	1	2	4	5	9	
		Malvales	Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i> (Какао)			1	1	1	2	1	1	3	4	7	
				<i>Gossypium raimondii</i> (Хлопок)			1	1	2	8	3	2	4	13	17	
				<i>Cucumis sativus</i> (Огурец)			1	2	2	2	1	2	5	5	10	
				<i>Glycine max</i> (Соя)			6	3	–	4	3	2	9	9	18	
Rosales	Rosaceae	<i>Trifolium pratense</i> (Клевер)			4	1	–	1	–	1	5	2	7			
		<i>Prunus persica</i> (Персик)			2	1	1	2	–	2	4	4	8			
		<i>Fragaria vesca</i> (Земляника)			1	–	–	1	1	2	1	4	5			
Malpighiales	Salicaceae	<i>Populus trichocarpa</i> (Тополь)			3	2	2	2	3	2	7	7	14			
		<i>Salix purpurea</i> (Ива)			2	2	2	2	1	2	6	5	11			
	Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> (Клещевина)			1	1	1	1	–	1	3	2	5		
	Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i> (Лён)			4	3	1	3	2	4	8	9	17			

* APG IV (Angiosperm Phylogeny Group) - современная система ботанической классификации [28].

** В скобках указано число неклассифицированных изоформ

Фенотипический анализ мутантных растений с нокаутированными изоформами мог бы пролить свет на вопрос о специфических функциях изоформ 14-3-3 *in vivo* или о вырожденности их функций, однако данные такого рода исследований часто несистемные и неполные. Даже для модельного объекта *A. thaliana* в литературе отсутствует описание фенотипов одиночных мутантов по всем 13 изоформам, что приводит к нехватке данных по функциям изоформ *in vivo*. В исследованиях часто фокусируются на определенном признаке мутантных растений, не рассматривая другие. В самой масштабной работе по мутированию изоформ 14-3-3 в растениях van Kleeff *et al.* были получены одиночные, двойные, тройные и четверные нокаутные мутанты *A. thaliana* по изоформам 14-3-3 из неэпсилон-группы: λ , κ , ν , υ , ϕ и χ [36]. В результате одиночные и даже двойные мутанты не отличались от дикого типа по длине главного корня, а у шести тройных и трех четверных нокаутов главные корни были короче, чем у растений дикого типа [36]. При нокауте сразу трех изоформ 14-3-3 из эпсилон-группы, 14-3-3 ϵ , μ и \omicron , у мутантных растений были серьезно нарушены ростовые процессы, была сильно снижена длина корня и гипокотыля [37]. Только нокаутная мутация 14-3-3 μ , а не мутация 14-3-3 ν , приводила к уменьшению длины корней *A. thaliana* при постоянном освещении, однако, как у мутантов по 14-3-3 μ , так и по 14-3-3 ν наблюдали уменьшение длины корня при росте на красном свете [38]. При нокаутировании 14-3-3 μ у *A. thaliana* длина боковых корней уменьшается, а при сверхэкспрессии – возрастает [39]. Одиночные нокаутные мутанты по 14-3-3 μ и 14-3-3 ν демонстрировали задержку в цветении в условиях длинного дня [40]. При сверхэкспрессии изоформы 14-3-3 риса *O. sativa* GF14с наблюдалась задержка в цветении, а при нокаутировании GF14с – более ранний переход к цветению по сравнению с диким типом [41]. Сверхэкспрессия изоформы 14-3-3 из маниока (*Manihot esculenta*) Me14-3-3VII в *A. thaliana* приводила к увеличению содержания крахмала и сахаров в листьях [42]. Однако сверхэкспрессия другой изоформы маниока, Me14-3-3II, наоборот, приводила к уменьшению количества крахмала в мутантных растениях [43]. Антисенс-опосредованный нокаунт 14-3-3 ϵ и μ приводил к увеличению количества накопленного крахмала в мутантных растениях в 2–4 раза по сравнению с диким типом [44]. Сверхэкспрессия изоформы 14-3-3 злакового растения *Setaria italica* SiGRF1 у *A. thaliana* вызывала более ранний переход к цветению в условиях солевого стресса [25]. Сверхэкспрессия изоформы 14-3-3 яблони *Malus domestica* MdGRF13 у *A. thaliana* приводила к усилению устойчивости растений к засухе и солевому стрессу [18]. Сверхэкспрессия другой изоформы яблони MdGRF6, наоборот, приводила к повышению чувствительности растений к экзогенной соли, а нокаунт этой изоформы – к устойчивости к солевому стрессу [45].

Видно, что основные эффекты мутаций 14-3-3 на фенотип растений затрагивают характеристики роста (главным образом, корней), время перехода к цветению, устойчивость к солевому стрессу и накопление крахмала. Фенотипы растений мутантных по 14-3-3 обусловлены влиянием этих белков на конкретные физиолого-биохимические реакции, которые будут рассмотрены ниже в настоящем обзоре.

III. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ 14-3-3 РАСТЕНИЙ

СТРУКТУРА БЕЛКОВ 14-3-3

В биохимическом отношении 14-3-3 представляют собой кислые белки (pI около 4–5) с молекулярной массой полипептидной цепи около 30 кДа. Характерная форма 14-3-3 в клетке – это димер, состоящий из субъединиц одинакового (гомодимер) и различного (гетеродимер) типа. Мономеры связываются между собой антипараллельно (центрально-симметрично) через N-концевые области, образуя W-подобную структуру, с двумя фосфопептид-связывающими (амфипатическими) бороздками – по одной в каждом мономере (рис. 1 Б). 14-3-3 животных и растений построены из 9 альфа-спиралей, каждая из которых расположена антипараллельно относительно предыдущей. Первая, вторая, третья и четвертая спирали мономеров (N-концевые области) образуют поверхность молекулы, необходимую для димеризации, спирали 3, 5, 7 и 9 участвуют в формировании лиганд-связывающей бороздки. В бороздку экспонированы наиболее консервативные остатки, в то время как противоположная, наружная поверхность молекулы менее консервативна [46, 47] (рис. 1 Б).

C-концевая область 14-3-3 растений содержит ряд важных функциональных элементов. В первую очередь, стоит отметить консервативную последовательность сигнала ядерного экспорта (nuclear export signal, NES), присущую как 14-3-3 млекопитающих, так и 14-3-3 растений и грибов [48, 49]. Роль последовательности NES для функций 14-3-3 была показана для клеток дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*. При мутации NES в белке Rad24 (принадлежит семейству 14-3-3) не может происходить нормальный процесс экспорта фосфорилированного Cdc25 из ядра, который сигнализирует о повреждениях ДНК [50]. Сходным образом 14-3-3 регулируют путь передачи сигнала о повреждениях ДНК через белок COP1 (constitutive photomorphogenic 1), который служит убиквитин-лигазой для белка p53. При повреждениях ДНК COP1 фосфорилируется, взаимодействует с 14-3-3 σ и экспортируется из ядра [51]. Было показано, что при мутации NES у 14-3-3 σ не может происходить запускаемый повреждениями ДНК экспорт COP1 из ядра [51]. Последовательность NES у 14-3-3 также считают необходимой для регуляции работы транскрипционных факторов за счет их удерживания в цитоплазме (cytoplasmic sequestration) и блокирования их проникновения в ядро. Так, связывание 14-3-3 ϵ с белком-регулятором митоза Cdc25 шпорцевой лягушки *Xenopus* мешало проникновению Cdc25 в ядро и приводило к цитоплазматической локализации белка, в том числе за счет NES в составе 14-3-3 ϵ [52].

C-конец 14-3-3 разупорядочен, неконсервативен, и у разных организмов и изоформ характеризуется различной длиной и аминокислотным составом [53]. В работе Shen *et al.* были получены данные, указывающие на то, что в C-концевой области 14-3-3 растений может располагаться десятая альфа-спираль. Исследователи использовали методы биоинформатического предсказания вторичной структуры и данные кругового дихроизма пептида C-концевого региона для 14-3-3 ω *A. thaliana* [54]. Вопрос о дополнительной C-концевой альфа-спирали остается нерешенным, поскольку эта десятая альфа-спираль отсутствует на какой-либо пространственной структуре 14-3-3 растений.

C-концу изоформ 14-3-3 млекопитающих приписывается автоингибиторная функция. Было показано, что изоформа 14-3-3 ζ , лишенная C-конца, проявляет более высокую аффинность к своим белкам-партнерам Raf-1 и Bad [55]. В исследовании Silhan *et al.* с помощью метода FRET было продемонстрировано, что C-конец располагается в

амфипатической бороздке и что он вытесняется из нее при связывании фосфопептида [56]. Ряд работ указывает на возможную автоингибиторную роль С-конца у 14-3-3 растений. В работе Shen *et al.* при транскрировании 14-3-3 ω с С-конца ингибирующая способность изоформы по отношению к белку-партнеру нитратредуктазе (NR) возрастала, что косвенно указывало на автоингибиторную роль С-конца 14-3-3 [54]. Однако в исследовании Athwal *et al.* была представлена противоположная информация: при транскрировании 14-3-3 ω его ингибирующая способность по отношению к NR значительно уменьшалась по сравнению с 14-3-3 дикого типа [57]. Автоингибиторную роль С-конца обнаруживали также в исследовании активности классического белка-партнера 14-3-3 – H^+ -АТФазы плазматической мембраны (АНА1). Транскрированные по С-концу варианты 14-3-3 ω и ϵ сильнее активировали H^+ -АТФазу, чем изоформы дикого типа [58]. На белках табака (*Nicotiana tabacum*) было показано, что при удалении С-конца у изоформы 14-3-3 T14-3с возрастает аффинность к сахарозофосфатсинтазе (SPS) [59].

Ряд исследований указывал на способность 14-3-3 растений связывать двухзарядные ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} в участке, близком к С-концу молекулы. Различными экспериментальными подходами удалось показать связывание ионов кальция и магния с 14-3-3 и их влияние на структуру белка. В присутствии Ca^{2+} результат триптического расщепления 14-3-3 ω отличен от контроля без кальция, что может указывать на конформационные перестройки при связывании ионов кальция [60]. После инкубации иммобилизованного на мембране 14-3-3 ω с радиоактивным изотопом $^{45}Ca^{2+}$, 14-3-3 ω связал кальций в отличие от бычьего сывороточного альбумина, взятого в качестве контроля [60]. С помощью равновесного диализа было показано, что 14-3-3 ω связывает Ca^{2+} в соотношении 1 ион на 1 мономер 14-3-3 [60]. Связывание многозарядных катионов 14-3-3 ω было продемонстрировано при исследовании индуцированной флуоресценции тербия Tb^{3+} , при котором обнаружено возникновение характерных пиков флуоресценции, свидетельствующих о связывании Tb^{3+} [61]. Связывание Ca^{2+} с изоформами 14-3-3 κ и λ показали с помощью термофореза [62]. Утверждалось, что участок связывания ионов расположен в петле между 8 и 9 спиралями [57, 60]. При сравнении последовательностей 14-3-3 ω *A. thaliana* и кальмодулина вручную Lu *et al.* обнаружили сходство отдельных аминокислотных остатков двух белков в домене EF-руки [60]. Однако в исследовании Day *et al.*, где был проведен биоинформатический поиск белков *A. thaliana*, содержащих домены EF-руки, у 14-3-3 при автоматизированном поиске эти домены не были обнаружены [63]. Методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что при возрастании концентраций ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} происходило усиление связывания 10 протестированных изоформ 14-3-3 из *A. thaliana* (χ , κ , λ , ν , ω , ϕ , ψ , υ , ϵ , μ) с синтетическими фосфопептидами нитратредуктазы (NR2) и H^+ -АТФазы плазматической мембраны (АНА2) – белков-партнёров 14-3-3 – что могло косвенно свидетельствовать об усилении связывания за счет взаимодействия этих двухвалентных ионов с белком 14-3-3 [64]. Также было отмечено, что в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} в среде приводило к усилению ингибирующей активности 14-3-3 ω по отношению к нитратредуктазе [57], а также к возрастанию способности к связыванию фосфопептидов [61]. Описан и обратный пример, когда в присутствии Ca^{2+} снижалась ингибирующая функция 14-3-3 λ и κ по отношению к белковому партнеру SOS2 киназе [62]. Стоит подчеркнуть, что на данный момент отсутствуют прямые экспериментальные подтверждения связывания двухзарядных катионов в областях между 8 и 9 спиралями, которые были бы получены на основе пространственных структур 14-3-3. Также, поскольку 14-3-3 являются «кис-

лыми» белками, нельзя исключить вероятность неспецифического связывания катионов. Таким образом, вопросы о факте специфического связывания Ca^{2+} и Mg^{2+} , так же, как и о типе и локализации связывающего их участка молекулы 14-3-3 остаются нерешенными и дискуссионными.

Свойства димеров 14-3-3 наиболее подробно изучены для изоформ 14-3-3 млекопитающих. Для изоформы 14-3-3 ζ человека получены данные о взаимной аффинности субъединиц; измеренная несколькими методами константа диссоциации (K_d) димера составила порядка 5 нМ [65], что говорит об очень прочном связывании. Изоформы 14-3-3 человека исследованы также на предмет предпочтений мономеров при димеризации. Так, выяснено, что 14-3-3 ϵ склонна образовывать гетеродимеры с другими изоформами [66, 67], в то время как 14-3-3 σ предпочтительно гомодимеризуется [68, 69]. Возможное объяснение заключается в количестве и представленности определенных аминокислотных остатков и химических контактов в области димеризации. Мономеры 14-3-3 σ связаны в гомодимере тремя парами солевых мостов (три симметричных контакта Arg19-Glu91, Asp21-Lys87, Lys9-Glu83), а также несколькими дополнительными контактами, что обеспечивает повышенную стабильность гомодимера. По предположению Yang *et al.*, между субъединицами гомодимера 14-3-3 ϵ формируется только одна пара солевых мостов (два симметричных контакта Arg19 одного мономера и Glu92 другого мономера), а при гетеродимеризации с другими изоформами человека у 14-3-3 ϵ возникает дополнительный солевой мост (в случае 14-3-3 ζ это Glu92(ϵ)-Arg18(ζ)), что делает гетеродимеризацию 14-3-3 ϵ более предпочтительной [67, 69]. Интересно, что в некоторых случаях удается обнаружить связывание с белком-партнером именно гетеродимерного 14-3-3, как было установлено при решении пространственной структуры комплекса псевдокиназы PEAK3 человека с гетеродимером 14-3-3 ϵ/β [70]. Гетеродимеры с участием эpsilon изоформы 14-3-3 человека эффективно образуются *in vitro* в нативных условиях за счет обмена разных гомодимеров субъединицами [71, 72], однако функции гетеродимеров *in vivo* остаются предметом дискуссий.

Судя по всему, 14-3-3 растений также способны к гетеродимеризации. Для изоформ 14-3-3 из *A. thaliana* показано, что гетеродимеры могут образовываться в парах $\chi + \varphi/\omega/\psi$; $\omega + \varphi/\nu/\psi$; $\varphi + \nu/\psi$; $\psi + \nu$ [73]. Для пар изоформ ω и κ , λ также показана способность к гетеродимеризации [74]. Тем не менее эксперименты по гетеродимеризации проводили, подвергая попарно смешанные 14-3-3 денатурации в присутствии гуанидин хлорида [73] или дезоксихолата [74], затем белки ренатурировали и анализировали состав образовавшихся в ходе ренатурации гомо- и гетеродимеров. Таким образом, условия проведения опытов были далеки от нативных и позволяли сделать вывод лишь о потенциальной возможности образования тех или иных димеров в растительных клетках. Однако есть данные о том, что гетеродимеризация 14-3-3 может происходить *in vivo*, хотя и неизвестно, какие именно пары изоформ затрагивает этот процесс [73, 75, 76]. Важно отметить, что биохимические исследования гетеродимеров 14-3-3 проведены на растительных изоформах только из филогенетической группы неэпсилон, в то время как о гетеродимеризации эpsilon-изоформ прямые данные отсутствуют. В то же время, интересные данные были получены с помощью дрожжевого двугибридного метода при исследовании попарной димеризации на шести изоформах 14-3-3 хлопка (*Gossypium hirsutum*), три из которых из эpsilon-группы и три – из неэпсилон-группы. Было продемонстрировано, что данные изоформы образуют только определенные гетеродимеры (Gh14-3-3L и Gh14-3-3e, Gh14-3-3L и Gh14-3-3g, Gh14-3-3a и Gh14-3-3e,

Gh14-3-3a и Gh14-3-3g, Gh14-3-3g и Gh14-3-3h), а гомодимеров не образуют [77]. Проверка таких данных с помощью прямых биохимических методов представляла бы большой интерес.

Белки 14-3-3 могут подвергаться фосфорилированию, и эта модификация может регулировать диссоциацию димеров. Для 14-3-3 человека показано, что фосфорилирование серина в области димерного интерфейса (Ser58 для 14-3-3 ζ) приводит к дестабилизации димера и мономеризации [78]. Для белков растений было описано, что остатки, гомологичные Ser58 млекопитающих, могут подвергаться фосфорилированию *in vivo*. Было продемонстрировано, что фосфоимитирующая модификация эквивалентного остатка серина Ser62 у 14-3-3 ω также способствовала мономеризации [79, 80]. Эффект диссоциации димеров 14-3-3 ω усиливался при внесении одновременно двух фосфоимитирующих замен в положениях Ser62 и Ser67 [79]. Кроме того, было показано, что фосфоимитирующая замена в позиции Ser62 у 14-3-3 ω вызывала нарушения в предпочтениях к гетеродимеризации 14-3-3 растений, а также снижение аффинности к лигандам 14-3-3: пептиду дифопеину и N-концевому фрагменту нитратредуктазы [74]. Интересно, что фосфорилирование 14-3-3 χ по положению Ser72, аналогичному Ser67 у 14-3-3 ω, привело к снижению ингибирующей способности 14-3-3 по отношению к нитратредуктазе [81]. Было показано, что происходящее при клеточной гибели фосфорилирование 14-3-3 растений по положению, гомологичному Ser58, приводит к диссоциации белка СРК3 (calcium-dependent protein kinase 3) от 14-3-3 и деградации СРК3 [82]. Таким образом, регуляция 14-3-3 под действием фосфорилирования в области димерного интерфейса может существенно перестраивать биологические функции этих белков через влияние на димер-мономерное равновесие. В составе белков 14-3-3 растений обнаружены и другие участки [46, 83], подвергающиеся фосфорилированию, однако последствия таких модификаций для структуры и функции белков 14-3-3 изучены в меньшей степени.

ПРИНЦИПЫ СВЯЗЫВАНИЯ 14-3-3 С БЕЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ

Для 14-3-3 характерно связывание белков-партнеров, фосфорилированных по остаткам, расположенным преимущественно в структурно разупорядоченных областях [84]. Годы исследований и накопление достаточно большого количества экспериментальных данных позволили понять, что, как правило, 14-3-3 связывают остатки фосфосерина (pS) или фосфотреонина (pT) в специфическом аминокислотном контексте, консенсусном мотиве, и лишь в очень редких случаях взаимодействуют с нефосфорилированными партнерами [85]. Известны фосфорилируемые 14-3-3-связывающие мотивы трех типов: I тип RXXp(S/T)X(P/G), II тип RX(Y/F)Xp(S/T)X(P/G) и III тип (С-концевой) p(S/T)X₀₋₂-COOH, где p(S/T) – остаток фосфосерина или фосфотреонина, а X – любой аминокислотный остаток [48, 86]. Имеются данные, указывающие на особенности мотива I у белков-партнеров 14-3-3 растений. Согласно работе Johnson *et al.* и проведенному в ней биоинформатическому анализу последовательностей узнавания 14-3-3 у белков-партнеров, преобладающим видом мотива I у растений является удлиненный с N-конца мотив LX(R/K)SX(pS/pT)XP [87]. Авторы связывали данную особенность со светозависимой регуляцией многих процессов у растений специфическими протеинкиназами, для которых важно наличие остатка лейцина в составе мотива I. Однако в данном исследовании выборка сайтов узнавания 14-3-3 растений была относительно небольшой и была сильно меньше, чем для млекопитающих (14 последовательностей для растений

и 201 для млекопитающих) [87]. В этой связи, правомерность экстраполяции данных выводов на все белки-партнеры 14-3-3 растений вызывает сомнения.

В амфипатической бороздке фосфопептид удерживается на всем протяжении полярными контактами и гидрофобными взаимодействиями. Основные остатки 14-3-3, образующие полярные контакты с фосфатной группой и остовом фосфопептида, это Lys53, Arg60, Arg64, Arg133, Tyr134, Asn179, Asn230, Trp234 [88] (нумерация остатков приведена для 14-3-3- ω) (рис. 2 А). У 14-3-3 растений и животных эти остатки высококонсервативны.

Изоформы 14-3-3 обладают различной аффинностью к фосфопептидам белков-партнеров. Для изоформ 14-3-3 человека в ряде исследований были получены данные по аффинностям всех 7 изоформ 14-3-3 к фосфопептидам, полученным от белков СТFR [89], USP8 [90], LRRK2 [91] и др. В этих исследованиях самыми высокоаффинными были γ и η , а самыми низкоаффинными – σ и ϵ , остальные изоформы имели промежуточное сродство к фосфопептидам. Впоследствии для нескольких фосфопептидов белка Е6 папилломавируса, а также белков RSK1 и HSPB6 Gogl *et al.* показали, что для каждого фосфопептида изоформы 14-3-3 имеют определенную, сходную иерархию аффинностей, создавая следующий ряд снижения сродства к абстрактному фосфопептиду: $\gamma > \eta > \zeta > \tau > \beta > \epsilon > \sigma$, что соблюдается также на больших выборках самых разных пептидов от различных белков-партнеров [92]. Вполне вероятно, что от 14-3-3 растений можно ожидать принципиально сходного явления ранжирования изоформ по сродству к фосфорилированным пептидам, или иерархии изоформ по силе связывания.

Исследование аффинности 9 изоформ *A. thaliana* (из 13 известных к настоящему времени) к фосфорилированному мотиву С-концевого пептида протонной АТФазы плазматической мембраны с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса позволило заключить, что изоформы обладают различной аффинностью к этому мотиву [47]. Полученный ряд уменьшения аффинности имел вид: $\phi > \chi > \nu > \psi > \upsilon > \epsilon > \omega > \kappa > \lambda$. Однако такое ранжирование изоформ по сродству не согласуется с данными исследования, где было изучено влияние изоформ 14-3-3 *A. thaliana* (исследовано 7 изоформ из известных 13) на активность того же белка – протонной АТФазы плазматической мембраны [58], где ряд ослабления эффекта имел вид: $\chi > \omega > \kappa > \lambda > \mu > \epsilon > \theta$. Различия в активностях нескольких изоформ 14-3-3 из *A. thaliana* по отношению к белкам-партнерам были продемонстрированы для нитратредуктазы листьев шпината; ряд ослабления эффекта под действием различных изоформ 14-3-3 был следующий: $\omega > \phi > \chi > \nu$ [93]. Согласно проведенному на белках *A. thaliana* исследованию Lambeck *et al.*, где также анализировали эффект изоформ на активность нитратредуктазы, ряд усиления эффекта 14-3-3 выглядел следующим образом: $\omega > \lambda > \kappa > \nu > \psi > \chi > \epsilon$ (в случае 14-3-3 ϵ эффект был столь незначителен, что исследователи не смогли численно определить константу полуингибирования) [94]. В другом недавнем исследовании было изучено 7 изоформ *A. thaliana* (μ , ϵ , θ из эпсилон-группы, λ , ν , ψ , ϕ из неэпсилон-группы). Исследованы аффинности связывания с фосфопептидом, полученным от белка FD – транскрипционного фактора, входящего в состав комплекса флоригена (комплекса активации транскрипции, запускающего цветение). Согласно полученным данным, ряд увеличения аффинности выглядит следующим образом: $\psi > \mu > \lambda > \nu > \phi > \theta > \epsilon$ [95]. Таким образом, данные по аффинностям 14-3-3 к фосфопептидам белков-партнеров немногочисленны и достаточно противоречивы, а корреляция аффинности к белкам-партнерам с принадлежностью к эпсилон- или неэпсилон-группам отсутствует. Очевидно, что для каких-либо уверенных утверждений о наличии и природе иерархии

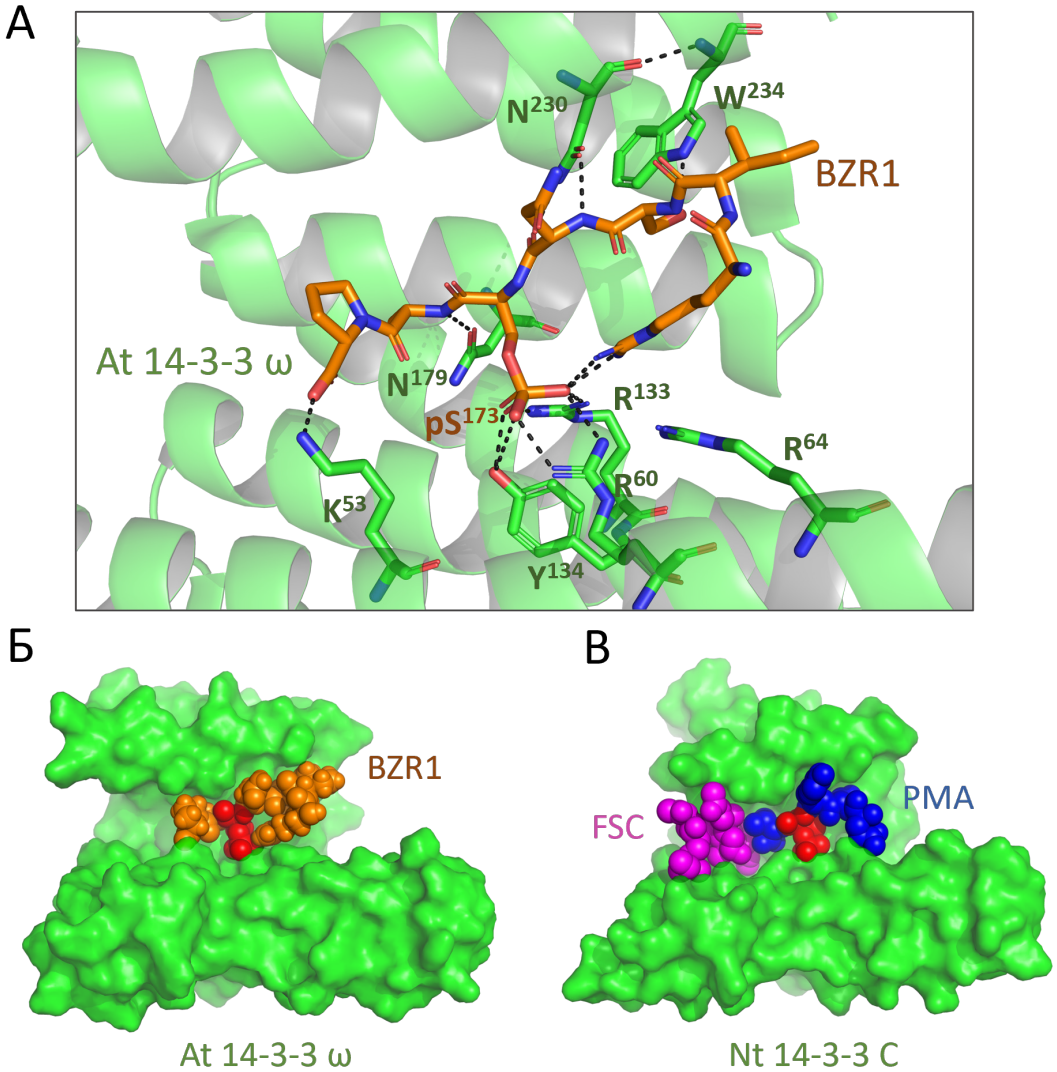


Рис. 2. Взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидами.

А. Принципы связывания фосфопептида транскрипционного фактора BZR1 (мотив II типа) в амфипатической бороздке 14-3-3 ω *A. thaliana* (PDB код 8QTF [26]). Отмечены аминокислотные остатки, образующие полярные контакты (черный пунктир) с фосфатной группой и остовом пептида.

Б. Взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидом без фузикококцина (фосфопептид BZR1, мотив II, PDB код 8QTF [26]). Фосфопептид обозначен оранжевым, остаток фосфосерина отмечен красным.

В. Взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидом с мотивом узнавания III и фузикококцином (фосфопептид PMA2, мотив III, PDB код 1O9F [88]). Фосфопептид обозначен синим, остаток фосфотреонина отмечен красным, молекула фузикококцина обозначена розовым. Изображения сделаны в программе PyMol.

растительных изоформ 14-3-3 по силе связывания требуются новые, более системные исследования с использованием как минимум всех изоформ из одного организма, а не наугад выбранных нескольких изоформ. Ради справедливости стоит заметить, что даже для относительно консервативных 7 изоформ человека, несмотря на доказанное наличие иерархии по отношению к связыванию фосфопептидов [92], природа такой иерархии остается не вполне понятной, особенно с учетом того, что все 7 изоформ без исключения имеют одинаковое строение первичного кармана для связывания фосфорилированного остатка в амфипатической бороздке. Это означает, что на силу связывания могут влиять не известные на данный момент аллостерические эффекты или эффекты дальнего действия.

Помимо взаимодействия в первичном участке связывания, то есть в амфипатической бороздке, белки-партнеры могут контактировать с 14-3-3 за ее пределами, как это наблюдается в структуре комплекса флоригена Nd3a, активирующего цветение [96], что видно на рис. 7, приведённом на стр. 26. Поскольку внешние области димеров 14-3-3 являются наименее консервативными, взаимодействие в них может быть специфично для определенных изоформ.

IV. ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ 14-3-3 РАСТЕНИЙ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ 14-3-3

Белки 14-3-3 растений, так же как их ортологи из животных и грибов, не обладают собственной каталитической активностью, они функционируют за счет непосредственного взаимодействия с белками-партнерами, узнавая их фосфорилированные формы. Как правило, результат данного взаимодействия — это изменения в работе белка-партнера, сказывающиеся на его биологической функции. Механизмы, приводящие к подобным изменениям, можно условно разделить на следующие категории.

Ингибирование фермента. В некоторых случаях связывание 14-3-3 может приводить к ингибированию фермента. Классическим примером служит нитратредуктаза (NR), связывание 14-3-3 с которой, предположительно, вызывает конформационные перестройки, приводящие к прекращению работы фермента [97] (рис. 3 А). Взаимодействие 14-3-3 с сахарозофосфатсинтазой (SPS) также приводит к ингибированию фермента [98]. К сожалению, отсутствие структурных данных затрудняет понимание механизма ингибирующего действия 14-3-3 на подобные ферменты.

Активация фермента. Известен ряд примеров, когда связывание 14-3-3 с ферментом приводит к увеличению его активности. Так, взаимодействие 14-3-3 с H^+ -АТФазой плазматической мембраны растений приводит к удалению автоингибиторного участка из каталитического центра фермента и к его активации [58]. Одной из первых была определена пространственная структура комплекса 14-3-3 с фрагментом АТФазы плазмалеммы, и было показано, что связывание 3 димеров 14-3-3 приводит к образованию гексамеров АТФазы [99] (рис. 3 Б). Было показано, что взаимодействие 14-3-3 с цитозольным ферментом глутаминсинтазой GS1 также способствует активации фермента [100].

Изменение локализации белка. Связываясь с белком-партнером, 14-3-3 могут менять его внутриклеточную локализацию. Примером может послужить внутриклеточный путь передачи сигнала растительных гормонов брассиностероидов, в котором фосфорилированные транскрипционные факторы BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) и BES1 (BRI1 EMS SUPPRESSOR1), связываясь с 14-3-3 в цитоплазме, не способны проникнуть в ядро и осуществлять регуляцию экспрессии генов [101, 102]

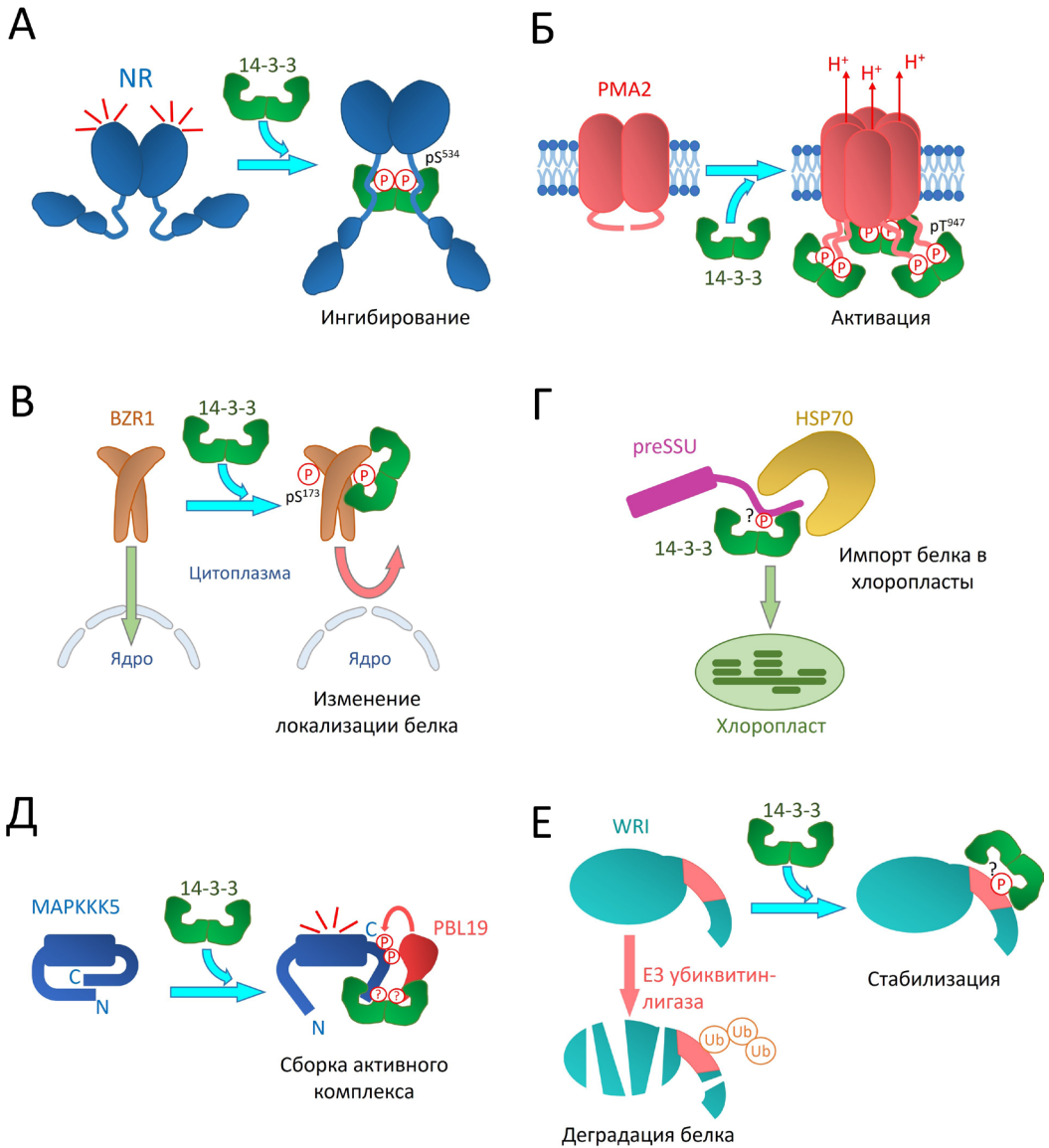


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая механизмы, с помощью которых 14-3-3 могут регулировать функции белков-партнеров у растений.

А. Ингибирование нитратредуктазы (NR) после связывания 14-3-3.

Б. Активация H⁺-АТФазы плазматической мембраны PMA2 после связывания 14-3-3.

В. 14-3-3-опосредованное изменение внутриклеточной локализации (цитоплазматическое удержание) транскрипционного фактора BZR1.

Г. Импорт предшественника малой субъединицы RuБисКО (preSSU) в хлоропласт при содействии 14-3-3 и HSP70.

Д. Фосфорилирование и активация протеинкиназы МАРККК5 с помощью протеинкиназы PBL19 в комплексе с 14-3-3.

Е. Препятствие деградации транскрипционного фактора WRI после связывания с 14-3-3.

(рис. 3 В). Похожим образом, через удерживание в цитоплазме, судя по всему, регулируются и другие транскрипционные факторы – например, RSG (REPRESSION OF SHOOT GROWTH) [103] и PIF7 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 7) [104].

Транспорт белков в хлоропласты и митохондрии. Ряд ранних исследований указывают на роль 14-3-3 в системе транспорта белков в хлоропласты. Было показано, что 14-3-3 в комплексе с HSP70 способствуют импорту малой субъединицы RuBisCO (preSSU) [105] (рис. 3 Г). Известно также, что 14-3-3 взаимодействуют с сигнальной последовательностью импорта N-субъединицы фотосистемы I (PSI-N) в хлоропласты [106]. Впоследствии для 11 хлоропластных белков было продемонстрировано, что 14-3-3 способствуют их импорту в хлоропласт [107]. 14-3-3 также принимают участие в транспорте белков в митохондрии. Было показано, что сигнальные последовательности многих белков, импортируемых в митохондрии, фосфорилируются [108]. При этом, роль связывания 14-3-3 для транспортируемых белков в данном случае была охарактеризована скорее как негативная: взаимодействие комплекса 14-3-3 с цитозольным HSP70 и белка MORF3 (Multiple Organellar RNA editing Factor) с фосфорилированной сигнальной последовательностью замедляло импорт последнего в митохондрии [109]. Детали механизма, за счет которого 14-3-3 влияют на транспорт белков в двумембранные органеллы, остаются неисследованными.

Сборка активного белкового комплекса. 14-3-3 могут участвовать в сборке функционального комплекса из нескольких белков, выполняя роль адаптеров, как было продемонстрировано для транскрипционного комплекса белков 14-3-3, VP1 (Viviparus1) и EmBP1 (*Em promoter binding protein*), активирующего экспрессию гена *EM* [110]. В собранном с участием 14-3-3 комплексе может происходить активация входящих в его состав белков, как было продемонстрировано для активации MAPKKK5 киназой PBL19 в комплексе с 14-3-3 λ [111] (рис. 3 Д). 14-3-3 κ и λ взаимодействуют с транскрипционным фактором PIF3 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR3) и фотоактивированным фитохромом phyB, стабилизируя комплекс этих двух белков в ядре, что в конечном счете приводит к деградации PIF3 и запуску процессов фотоморфогенеза [112].

Влияние на время жизни белка. 14-3-3 могут регулировать стабильность белка-партнера, меняя его подверженность внутриклеточной деградации. Например, было показано, что связывание 14-3-3 с ключевым ферментом биосинтеза этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазой (ACS) увеличивает стабильность данного белка, а связывание 14-3-3 с компонентами E3 убиквитин-лигазы ETO1/EOL, наоборот, приводит к ускоренной деградации этих белков [113]. Связываясь с транскрипционным фактором WR11, 14-3-3 препятствуют деградации этого белка за счет экранирования участка связывания убиквитин-лигазы E3 [114] (рис. 3 Е).

Препятствие дефосфорилированию. Связывание 14-3-3 может препятствовать дефосфорилированию белков-партнеров, экранируя фосфатную группу от действия фосфатаз. Данное явление показано для изоформ 14-3-3 человека. Например, при взаимодействии 14-3-3 τ с фосфатидилинозитол-4-киназой-III β (PI4KIII β) повышается количество фосфорилированной и активной PI4KIII β [115] (рис. 4 А). Было продемонстрировано, что связывание 14-3-3 препятствует дефосфорилированию и деградации транскрипционного фактора FoxO3, контролирующего процессы клеточной пролиферации и апоптоза [116]. Для 14-3-3 растений препятствие дефосфорилированию не было показано, однако ввиду структурного и функционального сходства 14-3-3 у растений и млекопитающих можно ожидать обнаружения этой функции и у растений.

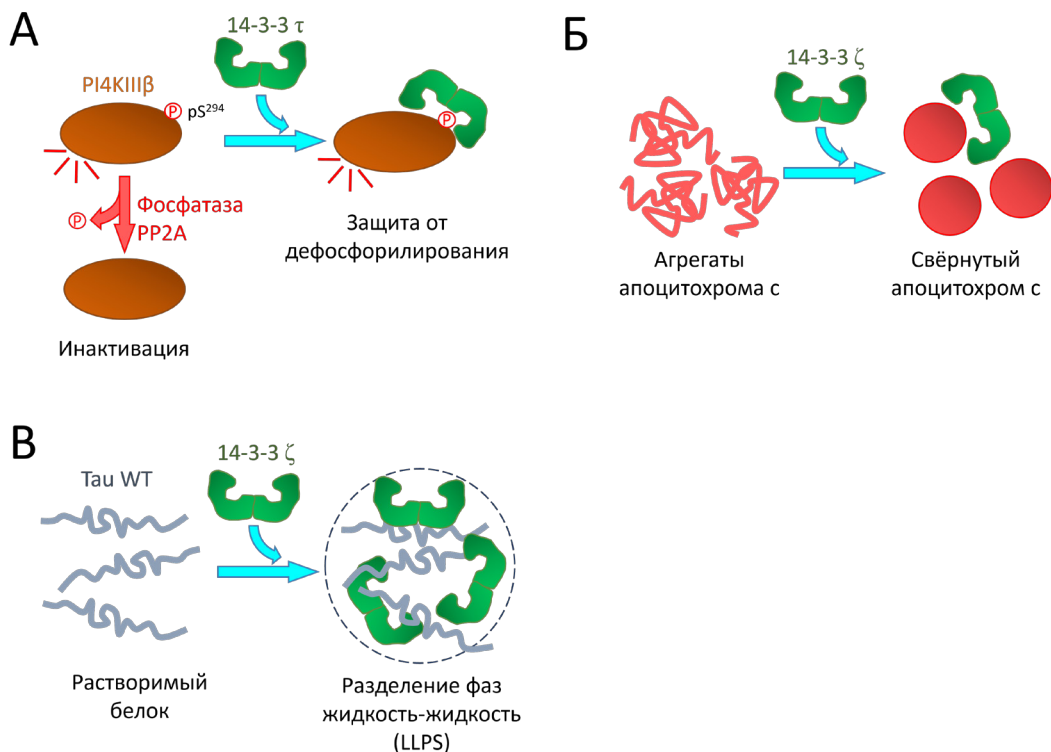


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая механизмы, с помощью которых 14-3-3 могут регулировать функции белков-партнеров, описанные у животных и на настоящий момент не выявленные у растений.

А. Защита от дефосфорилирования фосфатидилинозитол-4-киназы-IIIβ (PI4KIIIβ) при связывании с 14-3-3 τ.

Б. Растворение агрегатов апоцитохрома с за счет шапероно-подобной активности 14-3-3 ζ.

В. Разделение фаз жидкость-жидкость (LLPS), происходящее после взаимодействия 14-3-3 ζ и белка Тау дикого типа.

Шапероно-подобная активность. У белков 14-3-3 млекопитающих была обнаружена так называемая шапероно-подобная активность (АТФ-независимая анти-агрегационная активность по отношению к субстратным белкам). *In vitro* показано, что изоформа млекопитающих 14-3-3 ζ способна препятствовать агрегации модельных белков, таких как инсулин, алкогольдегидрогеназа, киназа фосфорилазы [117], а 14-3-3 ζ из *Drosophila* препятствует агрегации цитрат-синтазы [118]. *In vivo* было показано, что 14-3-3 ζ из *Drosophila* способен препятствовать агрегации и даже растворять агрегаты апоцитохрома с [118] (рис. 4 Б). Эта функция, по всей видимости, не зависит от фосфорилирования белков-партнеров, и ее можно считать дополнительной или функцией «по совместительству» (moonlighting) [53]. Есть основания полагать, что шапероно-подобная активность может быть свойственна и для 14-3-3 растений, особенно с учетом потенциально большей подверженности клеток растений к широкому изменению параметров внешней среды, например, температуры.

Регуляция разделения фаз жидкость-жидкость. Новые данные, полученные на белках млекопитающих, свидетельствуют в пользу того, что, взаимодействуя с некото-

рыми белками-партнерами, 14-3-3 могут влиять на разделение фаз LLPS (liquid-liquid phase separation). Так, показано, что 14-3-3 ζ связывается с немодифицированным белком Tau, способствуя формированию и стабилизируя капли фазы белка Tau при LLPS [119] (рис. 4 В). По аналогии нельзя исключать, что 14-3-3 растений выполняют похожую функцию регуляторов процесса LLPS.

14-3-3 КАК РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ

14-3-3 растений регулируют первичный метаболизм, взаимодействуя с рядом ключевых ферментов и влияя на их активность. Регуляция со стороны 14-3-3 описана для некоторых ферментов метаболизма азота, углеводов и серы.

Регуляция метаболизма азота. В пути ассимиляции азота у растений классическим и наиболее изученным примером белка-партнера 14-3-3 служит нитратредуктаза (NR). Это цитоплазматический фермент, катализирующий первый этап ассимиляции азота у растений: НАДН-зависимое превращение нитрат-иона в нитрит-ион (рис. 5). Нитрит затем восстанавливается в хлоропластах до иона аммония, который далее включается в аминокислоты [120, 121]. NR – крупный белок, молекулярная масса димера составляет около 200 кДа [122]. N-концевой домен содержит молибденовый кофактор, за ним располагается домен димеризации, лишенный кофакторов, далее по полипептидной цепи следует центральный домен, содержащий гем b_5 , а C-концевой домен содержит связанный ФАД, а также участок для связывания НАДН [122] (рис. 5). Ввиду своей важной биологической роли и зависимости от восстановительных эквивалентов (активное поступление которых у растений происходит днем) NR тонко регулируется за счет многих факторов, в том числе с помощью белков 14-3-3 [121]. Известно, что фермент фосфорилируется по остатку серина, расположенному примерно посередине полипептидной цепи (для NR шпината это Ser543), а его аминокислотное окружение соответствует мотиву I узнавания 14-3-3 [61]. Было показано, что этот участок действительно узнается белками 14-3-3 [61] и это взаимодействие приводит к ингибированию NR [93, 94, 123]. Показано, что связывание 14-3-3 приводит к затруднению передачи электрона от гема к молибденовому кофактору [97]. По-видимому, связывание 14-3-3 в области между двумя кофакторами вызывает конформационные перестройки, приводящие к отдалению кофакторов друг от друга и принятию конформации, препятствующей электронному транспорту [97] (рис. 5). В работе Chi *et al.* приводится дополнение данного механизма [124]. Авторы показали, что 14-3-3 связывают не только мотив I в окрестности фосфорилированного серина, но и консервативный кислый N-концевой мотив NR *A. thaliana*, причем для полного ингибирования NR необходимо связывание обоих последовательностей сразу [124]. Интересно, что связывание кислого N-концевого мотива, вероятно, происходит вне фосфопептид-связывающей бороздки 14-3-3 [124]. Фосфорилирование ключевого серина NR в участке узнавания 14-3-3 происходит благодаря активности протеинкиназы SnRK1 (SNF1-related kinase 1) [125]. Известно, что эта протеинкиназа подавляет анаболические процессы и активирует катаболические в случае нехватки энергетических эквивалентов в клетках [126, 127]. Таким образом, фосфорилирование NR с помощью SnRK1 в условиях нехватки энергии в темноте приводит к связыванию 14-3-3 и конформационным перестройкам, приводящим к ингибированию фермента. Несмотря на изящность описанного механизма, его детали остаются не до конца выясненными ввиду отсутствия информации о структуре регуляторного комплекса NR с белками 14-3-3.

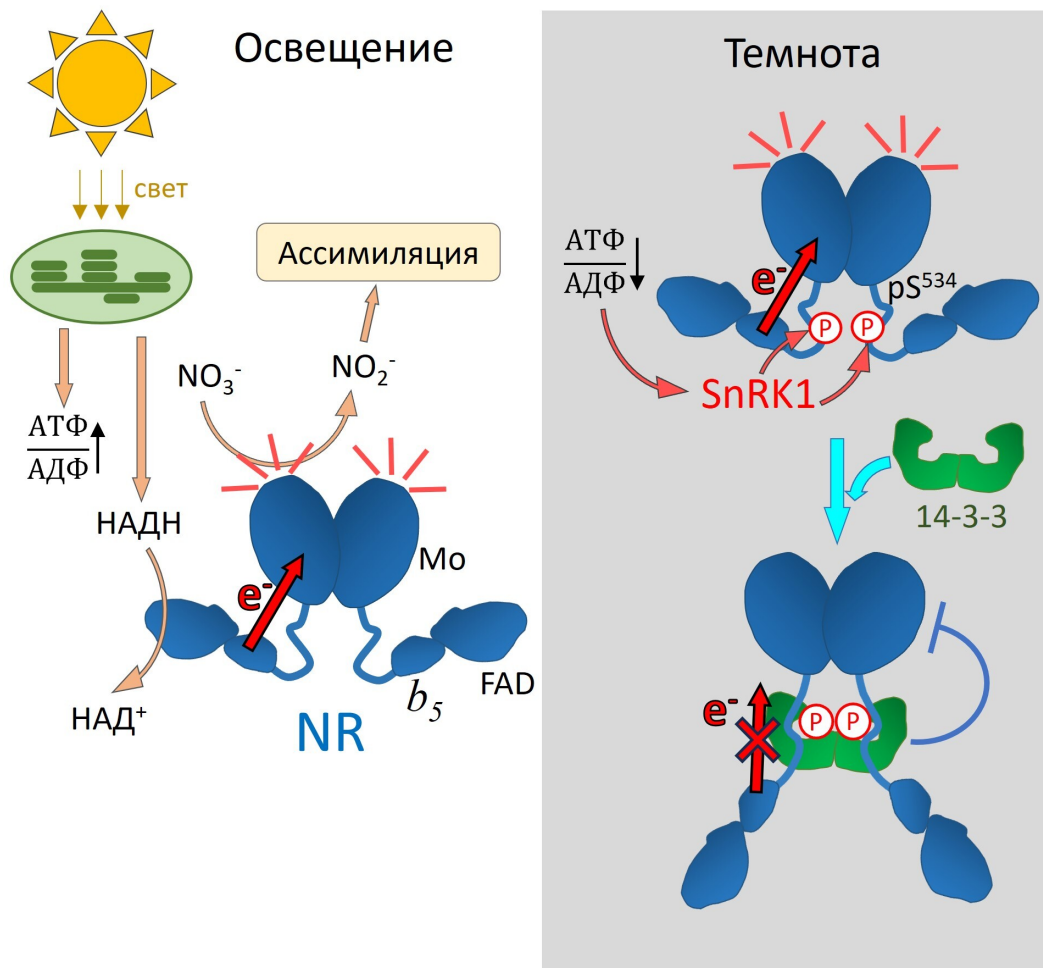


Рис. 5. Схема регуляции активности нитратредуктазы (NR) с помощью 14-3-3.

В освещенном состоянии благодаря активному фотосинтезу доступны восстановительные и энергетические эквиваленты. Активная NR в цитоплазме восстанавливает нитрат-ион до иона нитрита. В процессе катализа возникает поток электронов от НАДН на ФАД-содержащий домен (обозначение FAD), с которого они переходят на гем b_5 -содержащий домен (обозначение b_5), с которого они мигрируют на молибденсодержащий домен (обозначение Mo), в котором происходит восстановление нитрата до нитрита. Нитрит далее восстанавливается до аммония и может быть включен в органические соединения (например, в аминокислоты) в процессе пластического обмена. В условиях темноты количество восстановительных эквивалентов падает, восстановление нитрата прекращается, и NR должна быть ингибирована. От низкого соотношения АТФ/АДФ активируется протеинкиназа SnRK1, которая фосфорилирует NR по мотиву узнавания 14-3-3, расположенному между доменами Mo и b_5 (у NR шпината это Ser543). Связывание 14-3-3 с этим участком вызывает конформационные перестройки фермента, приводящие к отдалению друг от друга доменов Mo и b_5 , что затрудняет перенос электронов между ними и приводит к инактивации NR.

Расположенный далее в метаболическом пути ассимиляции азота цитозольный фермент глутаминсинтетаза GS1 также регулируется белками 14-3-3. Глутаминсинтетаза преобразует глутаминовую кислоту в глутамин, тем самым она включает аммоний в состав органических соединений (рис. 6 А). На модели стареющих листьев рапса *Brassica napus* Finnemann *et al.* показали, что после связывания 14-3-3 с фосфорилированным ферментом GS1 его активность возрастает [100]. Участок фосфорилирования GS1 неизвестен, как и киназа и фосфатаза, участвующие в регуляции фермента. Активация GS1 в стареющих листьях необходима для выведения из тканей азота в форме органических соединений [100]. Было показано также, что 14-3-3 взаимодействуют с фосфорилированной GS1 из *Chlamydomonas reinhardtii* [128]. Фосфорилирует GS1 в этом случае, вероятно, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа, однако ни фосфорилирование, ни связывание 14-3-3 не оказывали влияния на активность GS1 [128]. Глутаминсинтетаза GS2 – изоформа GS1, локализуемая в хлоропластах. С помощью выделения нативных олигомеров GS2 из хлоропластов томата и последующего вестерн-блоттинга было продемонстрировано, что в составе ферментативно-активного октамера GS2 присутствуют 14-3-3 [129]. Предполагается, что диссоциация 14-3-3 из комплекса приводит к потере активности GS2 [129]. Это необычные данные, поскольку для 14-3-3 характерна локализация в цитозоле или в ядре. Вопрос о локализации 14-3-3 в хлоропластах, очевидно, требует дальнейших исследований. Детальное исследование эффекта фосфорилирования глутаминсинтетазы по различным остаткам на взаимодействии с 14-3-3 и ее ферментативную активность *in vitro* позволило бы лучше понять регуляцию этого важного фермента.

Регуляция метаболизма углеводов. 14-3-3 регулируют метаболизм углеводов на различных уровнях. В нескольких интерактомных исследованиях были обнаружены десятки взаимодействующих с 14-3-3 ферментов углеводного метаболизма [130–133].

Сахарозофосфатсинтаза (SPS) – фермент, катализирующий превращение фруктозо-6-фосфата и УДФ-глюкозы в сахарозофосфат – непосредственный предшественник сахарозы (рис. 6 Б). SPS шпината *Spinacia oleracea* регулируется обратимым фосфорилированием остатка Ser158 в зависимости от времени суток и освещенности [134]. В темноте, когда фотосинтез не происходит, и поток ассимилятов снижается, SPS фосфорилируется и переходит в инактивированную форму, а на свету происходит дефосфорилирование и активация фермента [134, 135]. Показано, что SPS, так же как и NR, фосфорилируется протеинкиназой SnRK1 (регулятором метаболизма, ингибирующим анаболические реакции), по остатку Ser158 [125]. Фосфорилированная SPS связывается с 14-3-3 [98, 136]. Согласно данным работы Toroser *et al.*, с помощью поверхностного плазмонного резонанса было показано, что связывание 14-3-3 с SPS из шпината происходит по остатку Ser229 [98]. Однако дальнейший анализ аффинности к фосфопептидам показал, что ни одна из исследованных 7 изоформ 14-3-3 *A. thaliana* не связывала фосфопептид SPS из *A. thaliana*, гомологичный по последовательности Ser229 и его окружению из шпината, в то время как фосфопептид SPS из *A. thaliana*, гомологичный Ser158 и его окружению, взаимодействовал с 14-3-3 [58]. Связывание 14-3-3 с сахарозофосфатсинтазой табака по фосфорилированному участку, гомологичному Ser229 из SPS шпината, не удалось подтвердить при направленном мутагенезе в дрожжевом двугибридном анализе [59]. К тому же, остаток Ser229 менее консервативен у SPS различных видов, чем Ser158 [137]. Эти данные вынуждают сомневаться в достоверности определения участка связывания 14-3-3 в работе Toroser *et al.* Также было

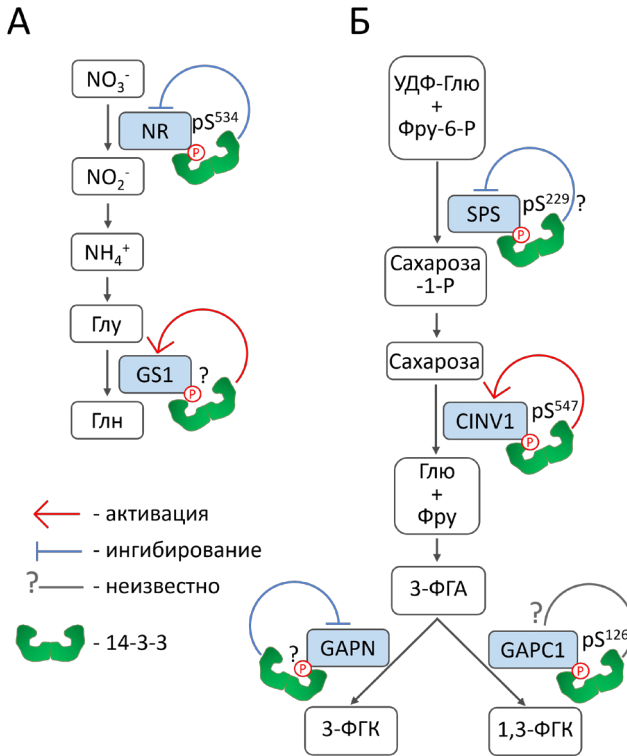


Рис. 6. Гипотетическая схема регуляции метаболизма растений с участием 14-3-3.

На схеме приведены самые достоверные по мнению авторов обзора данные об эффекте 14-3-3 на белки-партнеры.

А. Схема регуляции метаболизма азота.

Б. Схема регуляции метаболизма углеводов.

показано, что связывание 14-3-3 препятствует деградации SPS *in vitro* [138]. Эффект 14-3-3 на активность SPS неоднозначен. Согласно работе Toger *et al.*, при связывании 14-3-3 происходило ингибирование SPS [98]. Однако в исследовании Moorhead *et al.* при работе на клеточных экстрактах получены другие данные: было отмечено, что фосфопептид от Raf-1 (белка-партнера 14-3-3 из млекопитающих) обладает слабым ингибирующим действием на сахарозофосфатсинтазную активность, что может свидетельствовать об активации SPS белками 14-3-3 [136]. К сожалению, наличие противоречивых данных и отсутствие информации о строении комплексов 14-3-3 с SPS оставляет множество вопросов и требует дальнейших исследований.

Инвертаза CINV1 (Alkaline/neutral invertase), которая катализирует расщепление сахарозы до глюкозы и фруктозы, также является белком-партнером 14-3-3 (рис. 6 Б). С помощью дрожжевой двугибридной системы было продемонстрировано, что CINV1 из *A. thaliana* связывается с 14-3-3 изоформами ε, κ, λ, ν, φ, χ, ψ, ω и не связывается с μ [139]. За связывание, по-видимому, отвечает остаток Ser547, который может быть фосфорилирован кальций-зависимыми протеинкиназами (СРК) [139]. После связывания с 14-3-3 активность CINV1 возрастает [139]. Для данного белка-партнера структурная информация об устройстве комплексов с 14-3-3 также отсутствует в литературе.

Среди ферментов углеводного метаболизма взаимодействие с 14-3-3 описано для нефосфорилирующей глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPN) пшеницы [140]. Этот фермент проводит необратимую реакцию окисления глицеральдегид-3-фосфата сразу в 3-фосфоглицерат с восстановлением НАДФ⁺ (рис. 6 Б). Считается, что роль фермента особенно важна в нефотосинтезирующих тканях для снабжения их НАДФН [140, 141]. При исследовании влияния фосфопептидов на активность комплекса GAPN с 14-3-3 было показано, что взаимодействие 14-3-3 с GAPN приводит к ингибированию фермента, втрое снижая максимальную скорость катализируемой GAPN реакции [140]. Однако как участок узнавания 14-3-3, так и фосфорилирующая его киназа остаются неизвестными.

14-3-3 взаимодействуют с цитозольной глицеральдегидфосфатдегидрогеназой GAPC1 из *A. thaliana* [138] (рис. 6 Б). Скорее всего, в связывании принимает участие остаток Ser126 в составе пептида KVVIpSEP (последовательность сходна с мотивом узнавания 14-3-3 II типа) [58, 142], однако эффект взаимодействия остается неопианным.

14-3-3 растений могут связываться и влиять на функции белков-регуляторов углеводного метаболизма. Было показано, что 14-3-3 связывают трегалозофосфатсинтазу TPS5 в *A. thaliana* [143]. Это фермент, катализирующий образование трегалозо-6-фосфата – сигнальной молекулы, регулирующей метаболизм углеводов. За связывание, по-видимому, ответственны остатки Ser22 and Thr49, располагающиеся ближе к N-концу белка; мотивы узнавания 14-3-3 в обоих случаях сходны с мотивами I типа, но отличаются от канонических отсутствием пролина в положении +2 [58, 143]. *In vitro* эти остатки может фосфорилировать протеинкиназа SnRK1 [143]. Другой важный регуляторный фермент углеводного метаболизма, 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза (F2KP), также взаимодействует с 14-3-3. F2KP образует сигнальный метаболит – фруктозо-2,6-бисфосфат, который, предположительно, регулирует направление метаболизма сахаров либо в сторону образования сахарозы, либо в сторону крахмала [144]. Kulma *et al.* показали с помощью метода pull-down, что F2KP *A. thaliana* специфически взаимодействует с 14-3-3 и связывает 14-3-3 из клеточных экстрактов [145]. За связывание, предположительно, отвечают остатки Ser220 и Ser303 [145]. Однако в исследованиях *in vitro* исследователи не обнаружили существенного влияния 14-3-3 на активность F2KP, возможно, потому, что были выбраны условия, не пригодные для анализа этого взаимодействия *in vitro* [145].

В интерактивных исследованиях в качестве белков-партнеров 14-3-3 идентифицированы также многие белки гликолиза и связанных с ним метаболических реакций обмена углеводов. Это, например, фосфоенолпируваткарбоксилаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [133], фосфоглицератизомераза, пируваткиназа, транскетолаза и сахарозофосфатсинтаза [130], триозофосфатизомераза, енолаза и фруктозо-бисфосфатальдолаза [132]. К сожалению, эта важная информация пока не подтверждена прямыми исследованиями взаимодействия указанных ферментов с 14-3-3, что могло бы стать интересным направлением работы в дальнейшем.

Регуляция метаболизма серы. В исследовании Shin *et al.* в качестве белков-партнеров 14-3-3 был идентифицирован ряд ферментов метаболического пути ассимиляции серы [146]. Среди них наиболее подробно были изучены ферменты биосинтеза цистеина: о-ацетилсерин(тиол)лиаза (OASTL) и серинацетилтрансфераза (SAT). Их взаимодействие с 14-3-3 χ было подтверждено методом коиммунопреципитации [146]. Однако детали взаимодействия 14-3-3 с белками метаболизма серы остаются загадочными.

Таким образом, накоплен огромный пласт данных о том, что 14-3-3 вовлечены в регуляцию целого ряда ключевых ферментов метаболизма азота, углеводов и серы. Однако на данном этапе четкое понимание глобальной роли 14-3-3 в этих важных процессах отсутствует. Кроме того, структурно-функциональные детали взаимодействия 14-3-3 с ферментами метаболизма часто неизвестны, а ряд исследований содержат противоречащие друг другу данные.

14-3-3 РАСТЕНИЙ КАК РЕГУЛЯТОРЫ МЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТА

14-3-3 – растворимые цитозольные белки, однако они могут регулировать работу мембранных транспортеров и ферментов, связываясь с ними с цитозольной стороны. В ряде исследований отмечена локализация 14-3-3 растений вблизи плазматической мембраны [37, 76, 81, 147].

Регуляция транспорта через плазматическую мембрану. Вероятно, одним из самых известных и охарактеризованных белок-белковых взаимодействий 14-3-3 растений является взаимодействие 14-3-3 и H^+ -АТФазы плазматической мембраны (РМА (Plasma Membrane ATPase) или АНА (*Arabidopsis* H^+ -ATPase/autoinhibited H^+ -ATPase)). РМА относится к семейству катион-транспортирующих АТФаз Р-типа и переносит протоны из клетки наружу с затратой энергии. Это фермент, ответственный за создание на плазматической мембране трансмембранного протонного градиента, который необходим для жизнедеятельности растения в качестве источника энергии для вторично-активного транспорта [148]. На С-конце РМА располагается автоингибиторный мотив [149]. Взаимодействие с 14-3-3 происходит за фосфорилированный С-концевой мотив YpTV-SOON (мотив III типа), у РМА2 из *Nicotiana plumbaginifolia* фосфорилируется Thr948 [150, 151]. Этот С-концевой мотив является частью автоингибиторного домена [152]. После связывания 14-3-3 с РМА автоингибирование снимается, и происходит активация фермента [58, 151] (рис. 3 Б). В результате взаимодействия РМА активируется и олигомеризуется, формируется активный комплекс из шести субъединиц РМА и трех молекул 14-3-3, как было показано с помощью комбинации методов кристаллографии и криоэлектронной микроскопии [99] (рис. 7 А). Активность РМА приводит к снижению pH в апопласте и поддержанию трансмембранного протонного градиента, что необходимо для нормальных процессов роста и развития растений, таких как удлинение гипокотилей и корней [153], движения устьичных клеток [99, 154] и рост пыльцевых трубок [155]. Взаимодействие 14-3-3 с РМА является мишенью растительного патогена – аскомицетного гриба *Phomopsis amygdali* (*Fusicoccum amygdali*). Этот гриб синтезирует и выделяет токсин фузикоцин, который сильно повышает сродство 14-3-3 к мотиву III типа АТФазы РМА, занимая свободное место в амфипатической бороздке комплекса 14-3-3 и короткого С-концевого фосфопептида [88] (рис. 2 Б, В). Фузикоцин сам по себе довольно слабо связывается с 14-3-3 (константа диссоциации (K_d) порядка 66 мкМ), для повышения силы связывания важно одновременное присутствие фосфопептида и токсина [88, 156]. Механизм действия фузикоцина был выявлен после получения пространственной структуры его комплекса с 14-3-3 и фосфопептидом РМА2, что придало импульс развитию целого направления исследований. На данный момент пространственные структуры комплексов 14-3-3 *Nicotiana tabacum* с фрагментами РМА2 *Nicotiana plumbaginifolia* являются самыми представленными среди структур растительных 14-3-3, доступных в Protein Data Bank (7 из 19 известных структур, из них 3 – с фосфопептидом [88, 157] и 4 – с более протяженным С-концевым фрагментом РМА2 [99, 158, 159]) (Таблица 3).

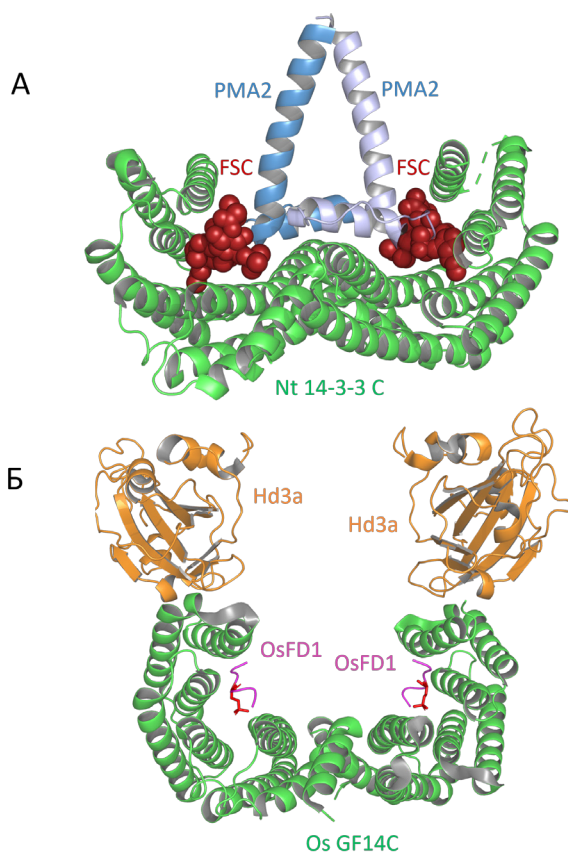


Рис. 7. Известные на данный момент пространственные структуры 14-3-3 и белков-партнеров.

А. Структура комплекса изоформы 14-3-3 С из *N. tabacum* (зеленый) с двумя С-концевыми фрагментами PMA2 из *N. plumbaginifolia* (синий и голубой) и фузикококцином (красный) (PDB код 2O98 [99]).

Б. Структура комплекса изоформы 14-3-3 GF14C из риса *O. sativa* (зеленый) с флоригеном Hd3a (оранжевый) и фосфопептидом от транскрипционного фактора OsFD1 (розовый цвет, остаток фосфосерина обозначен красным) (PDB код 3AXY [96]). Изображения сделаны в программе PyMol.

Возникающая в результате чрезмерная активация РМА приводит к гиперполяризации мембраны и постоянному открытию устьиц и неконтролируемой транспирации [160]. Невозможность регулировать водный обмен приводит к патологическому фенотипу с пожелтевшими и высыхающими листьями [160]. Примечательно, что одно из первых названий 14-3-3 растений – фузикокоцин-связывающий белок (ФСВР) – было дано в связи с обнаружением 14-3-3 в составе мембрано-связанного белкового комплекса с РМА, содержащего фузикокоцин [8, 161–163]. Впоследствии стало ясно, что фузикокоцин стабилизирует не только взаимодействие 14-3-3 и РМА, но и ряд других взаимодействий 14-3-3 с белками-партнерами растений и животных, именно через мотивы III типа [164, 165]. Некоторые структурные исследования посвящены поиску малых молекул,

Таблица 3. Пространственные структуры* комплексов 14-3-3 растений, приведенные в обратном хронологическом порядке по дате обнаружения.

№	Идентификатор в PDB	Белок 14-3-3	Белок-партнер или иной лиганд	Тип мотива узнавания 14-3-3	Год обнаружения структуры	Ссылка
1	8QTC	14-3-3 ω <i>A. thaliana</i>	Фосфопептид транскрипционного фактора BZR1 <i>A. thaliana</i>	II	2023	[26]
2	8QTF	14-3-3 ω <i>A. thaliana</i>	Фосфопептид транскрипционного фактора BZR1 <i>A. thaliana</i>	II		
3	8QT5	14-3-3 λ <i>A. thaliana</i>	Фосфопептид транскрипционного фактора BZR1 <i>A. thaliana</i>	II		
4	8QTT	14-3-3 ω <i>A. thaliana</i>	Фосфопептид ингибитора киназы BRI1 <i>A. thaliana</i>	–		
5	8HEW	St14f <i>S. tuberosum</i>	Фосфопептид StFDL1 <i>S. tuberosum</i>	I	2023	[182]
6	7XBQ	St14f <i>S. tuberosum</i>	–	–	2022	[183]
7	5NWI	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой пептид калиевого канала KAT1 <i>A. thaliana</i>	III	2017	[165]
8	5NWJ	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой пептид калиевого канала KAT1 <i>A. thaliana</i>			
9	5NWK	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой пептид калиевого канала KAT1 <i>A. thaliana</i> и фузикоцин			
10	4DX0	14-3-3 E <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой фрагмент АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> и производное пиразола	III	2012	[159]
11	3AXY	GF14-C <i>Oryza sativa</i>	Флориген Hd3a <i>Oryza sativa</i> , пептид транскрипционного фактора OsFD1 <i>Oryza sativa</i>	I	2011	[96]
12	3M51	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой фрагмент АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> и pyrrolidone1	III	2010	[158]
13	3M50	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой фрагмент АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> и epibestatin			
14	3E6Y	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой пептид АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> и cotylenin A	III	2009	[157]
15	2O98	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой фрагмент АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> и фузикоцин	III	2007	[99]
16	1O9E	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	Фузикоцин	–	2003	[88]
17	1O9C	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	–	–		
18	1O9D	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой пептид АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	III		
19	1O9F	14-3-3 C <i>Nicotiana tabacum</i>	С-концевой пептид АТФазы PMA2 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> и фузикоцин	III		

* данные на июль 2024 года.

стабилизирующих взаимодействие 14-3-3 и РМА2 аналогично фузикоцину. Было обнаружено, что стабилизирующий эффект оказывают: соединение cotylenin A [157], производное пирролинона ruggolidone I [158], дипептид epibestatin [158] и производное пиразола [159]. С этими тремя соединениями были получены пространственные структуры, места их связывания с 14-3-3 аналогичны фузикоцину (Таблица 3).

Несмотря на общепризнанную функцию фузикоцина как соединения, активирующего РМА, накапливаются данные о сторонних физиологических эффектах этой малой молекулы, таких как изменения в ионных токах калия, влияние на активность ряда ферментов, фитогормонов и протеинкиназных сигнальных каскадов. Высказаны мысли о существовании эндогенной растительной молекулы, аналогичной по функциям фузикоцину, за счет своих свойств запускающей определенный согласованный физиологический ответ с вовлечением целого ряда белков, то есть, осуществляющей функцию фитогормона [166]. Таким образом, в вопросе физиологического действия фузикоцина остается много неясного. Возможно, исследования, направленные под новым ракурсом, помогут детально описать известные явления.

Транспорт ионов калия через мембрану также регулируется 14-3-3. Было показано, что 14-3-3 усиливают ионный ток через потенциал-зависимые калиевые каналы KAT1 (K^+ -channel in *Arabidopsis thaliana* 1), проводящие калий через мембрану внутрь клетки [167, 168] (рис. 8). В работе Saponaro *et al.* было показано, что взаимодействие 14-3-3 и KAT1 происходит через С-концевой мотив III типа YFSpSN-COOH (у *A. thaliana* фосфорилируется остаток серина Ser676) [165]. Исследователи получили пространственные структуры 14-3-3 *Nicotiana tabacum* в комплексе с фосфопептидом мотива III типа от KAT1 в присутствии и в отсутствие фузикоцина [165]. Полученные данные позволяют предполагать влияние 14-3-3 на процесс открывания устьиц двумя параллельными путями: с одной стороны, действие через РМА АТФазу для генерации протонного градиента и гиперполяризации мембраны для усиления ионного тока в клетки или, с другой стороны, влияние на каналы KAT1 для непосредственного усиления входа K^+ в клетку [165]. Оба процесса в конечном итоге приводят к поступлению воды в замыкающие клетки устьиц и их устойчивому раскрытию. Роль белков 14-3-3 в регуляции движений замыкающих клеток устьиц детально разобрана в обзоре Cotelle *et al.* [147].

В работе van Kleeff *et al.* было исследовано взаимодействие 14-3-3 и K^+ -каналов GORK (Guard Cell Outward Rectifier K^+ -channel) из *A. thaliana* [169] (рис. 8). Эти каналы выводят ионы калия из клеток и тем самым участвуют в важных процессах закрытия устьиц и поддержания гомеостаза K^+ в клетках корня [170]. С помощью pull-down анализа исследователи показали, что эти каналы взаимодействуют с изоформами 14-3-3 λ , ν и χ . Однако авторам не удалось подтвердить прямое взаимодействие 14-3-3 с каналами GORK с помощью дрожжевой двугибридной экспрессии. Было установлено, что 14-3-3 взаимодействуют с кальций-зависимой киназой СРК21, повышают ее активность, а СРК21, в свою очередь, фосфорилирует и взаимодействует с каналом GORK [169]. СРК21 фосфорилирует GORK по остаткам Thr344, Ser518 и Ser649 [169]. С помощью исследования нокаутных мутантных растений по СРК21, 14-3-3 χ и ϕ было показано, что эти белки необходимы для поддержания нормальных ионных токов калия через канал GORK [169].

14-3-3 могут взаимодействовать с аквапоринами и осуществлять определенную роль в регуляции их функций. Было выяснено, что аквапорины растений из группы PIP (Plasma membrane Intrinsic Protein) могут взаимодействовать с 14-3-3 [171, 172]. Аквапо-

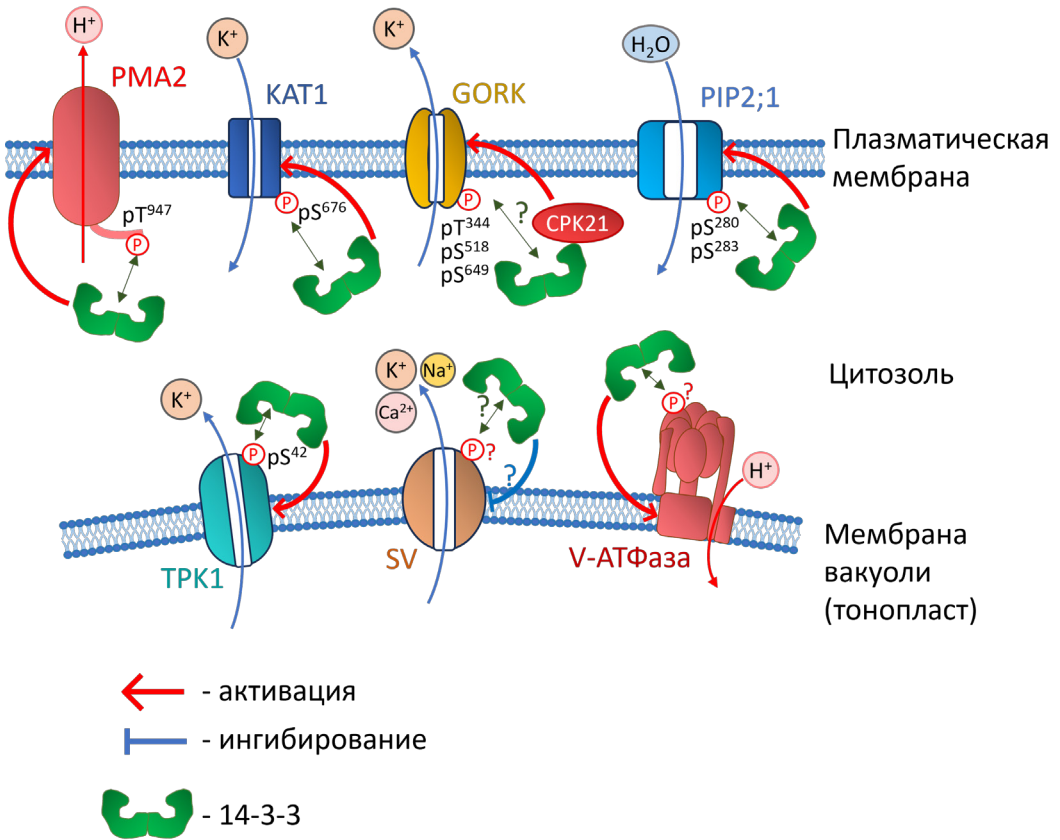


Рис. 8. Схема влияния 14-3-3 на функции мембранных белков.

Взаимодействие 14-3-3 с цитозольными частями интегральных белков плазматической мембраны регулирует их функции: связывание 14-3-3 с PMA2 приводит к активации фермента, взаимодействие 14-3-3 с калиевыми каналами KAT1 и GORK вызывает усиление ионных токов через каналы, связывание с аквапоринами PIP2;1 поддерживает их открытое состояние. В мембране вакуоли взаимодействие 14-3-3 с калиевым каналом TRP1 приводит к ослаблению тока через канал, связывание с каналами SV вызывает замедление тока катионов через них, а предпологаемое взаимодействие 14-3-3 с V-ATФазой приводит к ее активации.

рины осуществляют облегченный транспорт воды через мембрану, в частности, PIP2;1 у *A. thaliana* осуществляет суточную регуляцию потоков жидкости в листьях [173]. С помощью нокаутных по 14-3-3 линий было продемонстрировано, что 14-3-3 необходимы для поддержания нормальных функций PIP2;1 [172]. Возможно, во взаимодействии с 14-3-3 вовлечены расположенные ближе к С-концу остатки серинов Ser280 и Ser283 аквапорина PIP2;1 [172], фосфорилированию которых присваивается регуляторная роль [173]. Это направление также характеризуется нехваткой структурной информации, которая могла бы пролить свет на механизм регуляции функции аквапоринов под действием фосфорилирования и связывания белков 14-3-3.

Регуляция транспорта через мембрану вакуоли. 14-3-3 регулируют не только транспорт через плазматическую мембрану, но и через мембрану вакуоли (тонопласт). 14-3-3

могут регулировать транспорт ионов калия в просвет вакуоли через каналы семейства ТРК/КСО (tandem-pore K^+ channels/ K_{tr} -like channels) (рис. 8). Функции этих каналов у растений во многом плохо изучены. Эти каналы с цитозольной стороны содержат мотив I распознавания 14-3-3 на N-конце (фосфорилируемый остаток ТРК1 *A. thaliana* это Ser42) и домен EF-руки на C-конце [174]. Взаимодействие 14-3-3 λ и ТРК1 из *A. thaliana* было показано с помощью методов pull-down и поверхностного плазмонного резонанса [175]. Взаимодействие трех изоформ 14-3-3 ячменя *Hordeum vulgare* (14-3-3 А, В и С) и канала HvКСО1, гомолога ТРК1 *A. thaliana*, было показано с помощью поверхностного плазмонного резонанса [176]. Связываясь с ТРК1, 14-3-3 активируют этот канал [175]. Интересно, что при исследовании ТРК1 из *H. vulgare* получены противоречивые данные: две из трех исследованных изоформ, 14-3-3 В и С, ингибировали канал HvКСО1, а 14-3-3 А при этом не оказывала эффекта на ионный ток [176]. Latz *et al.* показали, что остаток серина в мотиве узнавания 14-3-3 у ТРК1 *A. thaliana* фосфорилирует кальций-зависимая протеинкиназа СРК3 [177]. По-видимому, активность ТРК1 важна для поддержания ионного гомеостаза при ответе растения на солевой стресс [177].

Группа медленных катионных каналов (SV) также является мишенью действия 14-3-3 (рис. 8). Эти каналы проводят катионы Ca^{2+} , K^+ и Na^+ , активируясь в моменты повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [170]. С помощью регистрации ионных токов было выяснено, что 14-3-3 замедляют ток через эти каналы [175, 178]. Детали взаимодействия остаются неизвестными.

V-АТФаза также взаимодействует с 14-3-3 [179] (рис. 8). V-АТФаза выполняет ряд важных функций на мембране вакуоли: перенося протоны через мембрану, данный фермент осуществляет формирование электрохимического потенциала, контроль тургорного давления, стабилизацию pH цитоплазмы [180, 181]. 14-3-3, вероятно, взаимодействуют с субъединицей А V-АТФазы [179], однако точный участок узнавания 14-3-3 неизвестен. Количество связанных с V-АТФазой белков 14-3-3 возрастает при облучении синим светом, как и активность V-АТФазы, однако непосредственный эффект 14-3-3 на активность фермента не охарактеризован [179].

Из перечисленных примеров видно, что белки 14-3-3 растений задействованы в регуляции функций множества мембранных белков. Среди них не только протон-транспортирующие АТФазы, но также ионные каналы и аквапорины. Многие из таких белков-партнеров 14-3-3 задействованы в регуляции движений замыкающих клеток устьиц. Таким образом, открытие/закрытие устьиц контролируется 14-3-3 не только на этапе получения и передачи сигнала синего света через фототропины, но и непосредственно через регуляцию ионных токов.

14-3-3 КАК РЕГУЛЯТОРЫ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ

Образ жизни растений без возможности убежать от стрессового фактора подразумевает подстраивание биохимических характеристик клетки под конкретные условия, к которым экспонировано растение. Разнообразие внешних факторов привело к образованию разветвленной сигнальной сети, призванной тонко настраивать адаптивные биохимические процессы. Связывая фосфорилированные остатки в белках, 14-3-3 могут являться участниками таких сигнальных каскадов или создавать дополнительный уровень регуляции сигнальных каскадов протеинкиназ и протеинфосфатаз.

Сигнальные пути ответа на биотический стресс. Каскады МАР протеинкиназ (Mitogen-Activated Protein kinases) – одни из самых известных у растений. Это линейный каскад из последовательно фосфорилирующих киназ: киназа киназы МАР киназы (МАРККК) фосфорилирует киназу МАР киназы (МАРКК), которая фосфорилирует терминальную МАР киназу (МАРК), активируя ее [184]. Активность этого сигнального пути может приводить к клеточному делению и дифференцировке, к клеточной гибели, ответам на абиотические и биотические стрессы [184]. Oh *et al.* обнаружили, что МАРККК α из томата *Solanum lycopersicum* физически взаимодействует с изоформой 14-3-3 TFT7, и что это взаимодействие происходит в области фосфопептид-связывающей бороздки 14-3-3 [185]. Возможный остаток связывания в пределах МАРККК α — это Ser535, аминокислотное окружение которого соответствует мотиву II узнавания 14-3-3 [185]. Исследователи также показали, что присутствие 14-3-3 увеличивает стабильность белка МАРККК α в клетках, а также увеличивает количество фосфорилированных этой киназой белков-мишеней [185]. При сверхэкспрессии TFT7 наблюдалось увеличение эффекта патоген-индуцированной программируемой клеточной гибели, вызываемого МАРККК α [185]. В другой работе Oh *et al.* показали, что TFT7 (изоформа 14-3-3 из *S. lycopersicum*) связывает изоформу МАРКК из *S. lycopersicum*, SIMKK2 (которая является мишенью МАРККК α) [75]. Возможный участок узнавания 14-3-3 находится в окружении фосфорилируемого Thr33 и соответствует мотиву II типа [75]. В этом случае исследователи, однако, не обнаружили прямых эффектов TFT7 на активность и стабильность SIMKK2 [75]. Было высказано предположение об адаптерной функции 14-3-3: поскольку димерный белок содержит два сайта узнавания фосфорилированных мотивов, по одному из них может связаться SIMKK2, а по другому – МАРККК α (что было показано ранее), это приводит к сближению двух киназ из сигнального каскада и ускорению передачи сигнала [75]. Картину регуляции МАР киназного каскада 14-3-3 дополняет недавнее исследование Dong *et al.* [111]. В этой работе было продемонстрировано, что 14-3-3 κ и λ взаимодействуют с МАРККК5 и PBL19 *A. thaliana*. PBL19 – это протеинкиназа из семейства RLCK, которая может фосфорилировать С-конец МАРККК5 и активировать ее, однако доступ PBL19 к фосфорилируемым остаткам ограничен автоингибиторным N-концом МАРККК5. Исследователи показали, что 14-3-3 λ , связываясь с С-концом МАРККК5, снимает ингибирование и открывает доступ PBL19 для фосфорилирования и активации МАРККК5 [111] (рис. 3 Д). Таким образом, 14-3-3 λ выполняет функцию скаффолда, способствующего активации МАРККК5 [111]. Активность МАРККК5 далее приводит к запуску иммунного ответа растений против патогенов [111]. Однако, как и во многих других случаях, полное понимание регуляции МАРК-каскада под действием 14-3-3 затруднено ввиду отсутствия структурной информации о соответствующих комплексах.

Определение роли 14-3-3 в регуляции МАРК-каскада под действием 14-3-3 объясняет значимую роль 14-3-3 в регуляции иммунного ответа растений на патогены. Было обнаружено, что эффекторный белок ряда патогенных про- и эукариот, а также вирусов, могут непосредственно взаимодействовать с 14-3-3 растения-хозяина. Так, для белка оболочки CP (coat protein) вируса чёрного ожога свеклы (beet black scorch virus (BBSV), (+)РНК вирус) было показано взаимодействие с 14-3-3а *N. benthamiana* [186]. Был предложен механизм, при котором рекрутирование 14-3-3 белком CP приводило к снижению активности другого белка-партнера 14-3-3 – киназы МАРККК α , что препятствовало запуску клеточной гибели и способствовало размножению вируса [186]. Для

белка-партнера 14-3-3 ХорQ из фитопатогенной бактерии *Xanthomonas euvesicatoria* был показан сходный эффект, при котором рекрутирование 14-3-3 ХорQ вызывало подавление клеточной гибели, опосредованной MAPKKK α , по-видимому, из-за нарушения белок-белковых взаимодействий 14-3-3, в том числе, с MAPKKK α [187]. Бактерии секретируют также и другие эффекторные белки, взаимодействующие с 14-3-3, такие как ХорX [188] и ХорN1 [189] бактерий из рода *Xanthomonas*, а также НорM1 [190] и НорQ1 [191] из *Pseudomonas syringae*. Взаимодействие 14-3-3 с указанными эффекторными белками снижало иммунный ответ растений на патогены и способствовало протеканию инфекции. Патоген растений, оомицет *Phytophthora palmivora*, вызывающий гниlostные заболевания многих тропических культурных растений, секретирует в клетку растения белок FIRE. Было показано, что FIRE взаимодействовал с белками 14-3-3 растения-хозяина за счёт мотива узнавания 14-3-3 I типа, что приводило к успешной инфекции организма оомицетом. Молекулярный механизм данного процесса остается понятным не до конца [192]. Как можно предположить из приведенных данных, механизм рекрутирования клеточных 14-3-3 за счет связывания с эффекторными белками широко используется патогенами растений для подавления иммунного ответа, что характеризует 14-3-3 как важный элемент регуляции иммунитета растений [193]. Однако как детали взаимодействий, так и молекулярные механизмы функционирования 14-3-3 в иммунном ответе у растений остаются неосвещенными.

Сигнальные пути ответа на абиотический стресс. 14-3-3 участвуют в сигнальном каскаде SOS (Salt Overly Sensitive pathway), регулирующем ответ растения на солевой стресс. Основные участники каскада SOS – это серин/треониновые протеинкиназы SOS2 и PKS5 (SOS2-LIKE PROTEIN KINASE 5), Na⁺/H⁺-обменник плазматической мембраны SOS1 и кальций-связывающий белок SOS3 [194]. В нормальных условиях активность SOS2 и SOS1 низкая. При солевом стрессе концентрация Ca²⁺ в клетках повышается, что вызывает взаимодействие SOS3 и SOS2, активацию SOS2 и фосфорилирование SOS1. Фосфорилированный SOS1 активируется и выкачивает ионы натрия из клетки, контролируя солевой гомеостаз [195]. Роль 14-3-3 в каскаде SOS продемонстрирована в исследовании Yang *et al.*, где было показано, что в нормальных условиях протеинкиназа PKS5 фосфорилирует SOS2 по остатку Ser294, что приводит к взаимодействию 14-3-3 λ с SOS2, вызывая снижение активности SOS2 [62]. Примечательно, однако, что остаток Ser294 не соответствует каноническим мотивам узнавания 14-3-3 (окружение остатка имеет вид DGIEGS²⁹⁴YVAENV). С помощью метода термофореза исследователи показали, что 14-3-3 κ и λ способны связывать Ca²⁺ [62]. При повышении концентрации Ca²⁺ при солевом стрессе 14-3-3 диссоциируют от SOS2, и активность протеинкиназы возрастает, что приводит к активации SOS1 и выкачиванию ионов натрия из клеток [62]. Интересно, что авторы показали также, что 14-3-3 λ взаимодействует с PKS5 и ингибирует ее [62].

Сигнальные пути фототропинов. Важная роль 14-3-3 растений состоит во взаимодействии с фототропинами PHOT1 и PHOT2. Фоторопины – мембрано-ассоциированные рецепторы синего света, протеинкиназы, запускающие внутриклеточный сигналинг, задействованный в открывании устьиц, фототропизме, движениях хлоропластов [196, 197]. Фототропины состоят из двух LOV-доменов, расположенных ближе к N-концу и отвечающих за улавливание квантов света, и C-концевого киназного домена, обеспечивающего передачу сигнала [196, 198]. В процессе активации фоторецептора квант синего света (максимум поглощения при 447 нм) непосредственно улавливает флавин-

моонуклеотид (FMN) в составе LOV-домена, после чего FMN ковалентно присоединяется за остаток цистеина, что вызывает конформационные перестройки, приводящие к автофосфорилированию фототропина и запуску сигнального каскада [196, 198]. В работе Sullivan *et al.* PHOT1 и PHOT2 из *A. thaliana* были проанализированы на предмет взаимодействия с шестью изоформами 14-3-3, четыре из которых относятся к неэпсилон группе (κ, λ, υ, φ), а две – к эпсилон-группе (ε, ο) [199]. С помощью фар-вестерн-блоттинга была показана специфичность взаимодействия PHOT1 с некоторыми из исследованных неэпсилон изоформ: κ, λ, φ, в то время как эпсилон изоформы (ε, ο) никак не взаимодействовали с белком на мембране [199]. Исследователи показали, что за взаимодействие с 14-3-3 отвечают остатки Ser350, Ser376 и Ser410, расположенные между двумя LOV-доменами [199]. В то же время, PHOT2 не взаимодействовал с 14-3-3 λ и κ [199]. В более позднем исследовании Tseng *et al.* с помощью фар-вестерн-блоттинга и дрожжевой двугибридной системы показали, что PHOT2 взаимодействует с 14-3-3 λ [200]. С помощью дрожжевой двугибридной системы и функциональных исследований мутантных растений было также продемонстрировано, что остаток Ser747, расположенный в киназном домене, ответственен за взаимодействие с 14-3-3 [200]. Исследователи продемонстрировали, что на растениях *A. thaliana* эффект открывания устьиц, запускаемый PHOT2, нарушается при мутировании 14-3-3 λ, но не 14-3-3 κ [200]. Эти интересные данные указывают на узкую изоформенную специфичность действия 14-3-3 λ, что в отсутствие необходимого числа строгих контролей не может не вызывать некоторое удивление, поскольку филогенетически близкие изоформы λ и κ идентичны по аминокислотной последовательности на 93% [200]. Исследования Sullivan *et al.* и Tseng *et al.* фактически противоречат друг другу относительно вывода о взаимодействии 14-3-3 и белка PHOT2 и расходятся касательно участка связывания 14-3-3 для сходных белков PHOT1 и PHOT2. Детальное исследование взаимодействия фототропинов с 14-3-3 с привлечением методов структурной биологии могло бы прояснить накопившиеся вопросы и уточнить наблюдения.

Сигнальные каскады фитогормонов. Сигнальный каскад газообразного фитогормона этилена также регулируется со стороны 14-3-3. На растениях *A. thaliana* было показано, что 14-3-3 взаимодействуют с ключевым ферментом биосинтеза этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазой (ACS). В работе Yoon *et al.* это взаимодействие было показано при коиммунопреципитации с 14-3-3 ω, а также *in vivo* с помощью метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации для всех четырех протестированных изоформ 14-3-3 ι, ο, κ, φ [113]. Исследователи показали, что при сверхэкспрессии в клетках 14-3-3 ω стабильность ACS увеличивается, а при обработке растений пептидом R18 (ингибирующим связывание 14-3-3 с другими пептидами за счет блокирования амфипатической бороздки) снижение общего количества ACS ускоряется, вероятно, из-за деградации. Авторы также показали, что 14-3-3 ω взаимодействует с белками ETO1-Like (EOL) – компонентами убиквитин-лигазы E3 – которые отправляют на путь деградации некоторые изоформы ACS [113, 201]. В более поздней работе Catalá *et al.* также продемонстрировали взаимодействие 14-3-3 ψ (RARE COLD INDUCIBLE 1A (RC1A)) и ACS с помощью методов коиммунопреципитации и бимолекулярной флуоресцентной комплементации [202]. Однако исследователи показали, что в присутствии в клетках 14-3-3 ψ стабильность белка ACS не увеличивается (как в случае с 14-3-3 ω), а снижается, и объяснили расхождение с предыдущими данными за счет специфичности взаимодействия 14-3-3 ω и 14-3-3 ψ с белками-партнерами [202]. На наш взгляд, это

бесспорно интересное направление требует систематизации имеющихся данных и проведения новых исследований, направленных на объяснение накопившихся расхождений, не в последнюю очередь с привлечением методов структурной биологии.

14-3-3 РАСТЕНИЙ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Одно из первых названий 14-3-3 растений – фактора, ассоциированного с G-боксом (GF14) – было дано этим белкам в связи с обнаружением их в комплексе с соответствующим участком ДНК [7], что может указывать на участие этих белков в регуляции транскрипции генов.

На растениях *A. thaliana* было продемонстрировано, что 14-3-3 регулируют транскрипционные факторы BZR1 и BES1: компоненты сигнального пути растительных гормонов – brassinостероидов. В отсутствие brassinостероидов эти белки фосфорилированы протеинкиназой GSK3-семейства BIN2: BZR1 фосфорилирован по остатку Ser173 [102], а BES1 – по Ser171 [101], фосфорилированные остатки находятся в окружении мотива II типа. Фосфорилирование приводит к связыванию с 14-3-3 (для BZR1 показано связывание с изоформами λ и ω [26, 102], а для BES1 – с λ [101]), из-за чего белки-партнеры 14-3-3 удерживаются в цитоплазме и не могут проникнуть в ядро (рис. 3 В). В присутствии brassinостероидов сигнальный каскад от рецепторного комплекса (BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE-1) и BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE-1)) приводит к ингибированию протеинкиназы BIN2 фосфатазой BSU1 [203]. Это приводит к дефосфорилированию BZR1 и BES1, диссоциации их комплексов с 14-3-3 и импорту факторов BZR1 и BES1 в ядро, где они осуществляют запуск транскрипционных программ, необходимых при ответе на brassinостероиды [101, 102]. Таким образом, 14-3-3 участвуют в цитоплазматическом удерживании (cytoplasmic sequestration) транскрипционных факторов, возможно, благодаря наличию в С-концевой области 14-3-3 последовательности ядерного экспорта (NES), как было показано для белков-партнеров 14-3-3 человека и дрожжей [50, 52].

14-3-3 могут непосредственно участвовать в сборке транскрипционных комплексов. На моделях суспензионной культуры *Oryza sativa* и эмбрионов *Zea mays* было показано, что 14-3-3 входят в состав белкового комплекса, связывающего последовательность ДНК регуляторного элемента EM1a в составе промотора гена *EM*, транскрипция которого активируется при сигналинге фитогормона абсцизовой кислоты [110]. В комплекс входят также белки-регуляторы транскрипции Viviparus1 (VP1) и EmBP1 (фактор b-ZIP семейства) [110]. Впоследствии на эмбриональной культуре клеток *A. thaliana* была показана ассоциация 14-3-3 с последовательностью промотора гена *AtEm1* [204].

Важная роль 14-3-3 состоит в регуляции цветения на этапе формирования флориген-активирующего белкового комплекса. На модели риса *Oryza sativa* было показано, что изоформа 14-3-3 под названием GF14c как *in vitro*, так и *in vivo* взаимодействует с так называемым флоригеном – белком Hd3a (Heading date 3a) (гомолог Hd3a у *A. thaliana* кодируется геном *FLOWERING LOCUS T (FT)*) [41, 96]. Флориген синтезируется в листьях и транспортируется к апикальной меристеме побега, где проникает в цитоплазму клетки и связывается с GF14c. После этого комплекс проникает в ядро, где с ним связывается транскрипционный фактор OsFD1 (гомолог OsFD1 у *A. thaliana* называется FD) [96]. Образуется флориген-активирующий комплекс (FAC), состоящий из димера GF14c, димера OsFD1 и двух белков Hd3a; комплекс активирует транскрипцию OsMADS15 (гомолог у *A. thaliana* называется *APETALA1 (API)*), что приводит к началу

цветения [96]. Пространственная структура части FАС получена с помощью рентгеновской кристаллографии и представляет собой единственную структуру 14-3-3 растений с полноразмерным белком-партнером в базе данных белковых структур PDB (в структуре 3АХУ разрешены 164 аминокислотных остатка из 179 у Hd3а) [96]. Интересно, что участок связывания Hd3а находится вне лиганд-связывающей бороздки GF14с – за связывание отвечают 8 и 9 альфа-спирали на С-конце GF14с [96]. OsFD1 фосфорилирован по Ser192 (мотив узнавания 14-3-3 I типа) и связан в бороздке 14-3-3 (при получении структуры был использован 9-членный фосфопептид OsFD1) [96]. Впоследствии на модели *A. thaliana* было показано, что фосфорилирование транскрипционного фактора FD по остатку Thr282, гомологичному Ser192 у OsFD1, осуществляют кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK), такие как СРК6 и СРК33 [205].

14-3-3 могут опосредованно регулировать экспрессию генов, влияя на стабильность факторов транскрипции. Такой механизм регуляции был показан для транскрипционного фактора WRINKLED1 (WRI1) – основного регулятора биосинтеза триацилглицеридов [114]. WRI1, вероятно, взаимодействует с 14-3-3 за участок, в котором также предполагается связывание E3 убиквитин-лигазы [114]. Таким способом 14-3-3 может защищать белок от протеасомной деградации и способствовать экспрессии генов биосинтеза растительных триглицеридов, регулируемых WRI1 [114] (рис. 3 Е).

В работе Guo *et al.* было показано, что 14-3-3 гевеи *Hevea brasiliensis* (изоформа HbGF14а) регулирует активность транскрипционного фактора HbRZFP1 (*H. brasiliensis* RING zinc finger protein) [206]. HbRZFP1 связывается с промотором и ингибирует экспрессию гена трансферазы каучука HRT2 (*Hevea rubber transferase*), которая присоединяет изопреновые звенья к растущему полимеру каучука. Как *in vivo*, так и *in vitro* (методы бимолекулярной флуоресцентной комплементации, дрожжевой двугибридной экспрессии и pull-down) было продемонстрировано, что HbGF14а взаимодействует с HbRZFP1 [206]. Был предложен механизм регуляции, согласно которому связывание HbGF14а с транскрипционным фактором HbRZFP1 приводит к нарушению взаимодействия HbRZFP1 с ДНК промотора HRT2, в результате экспрессия трансферазы возрастает [206]. Несколько работ также были сфокусированы на исследовании роли 14-3-3 в процессе биосинтеза каучука. Было показано, что HbGF14с (изоформа 14-3-3 из *H. brasiliensis*) взаимодействует с белком SRPP (Small Rubber Particle Protein), который представлен в каучуковых частицах и вовлечен в биосинтез кучука [207, 208]. Однако детали взаимодействия и механизм регуляции неизвестны.

Как видно из перечисленного, 14-3-3 участвуют в регуляции работы множества транскрипционных факторов и ДНК-белковых комплексов. Однако механизмы и эффекты регуляции зачастую плохо изучены, а детали белок-белковых взаимодействий остаются загадочными. Возможно, привлечение современных методов структурной биологии и исследование процессов на белковом уровне поможет в исследовании подобных нерешенных вопросов.

У. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

«БЕЛЫЕ ПЯТНА» В ИССЛЕДОВАНИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ 14-3-3

Как видно из представленных в настоящем обзоре данных, 14-3-3 вовлечены в регуляцию множества важных биохимических и физиологических процессов растений, при этом факт вовлеченности 14-3-3 в эти процессы не вызывает никаких сомнений. Исследованиям функций белков 14-3-3 растений посвящены сотни исследовательских работ

и десятки обзорных статей. Однако, несмотря на более чем тридцатилетнюю историю изучения 14-3-3 растений, ряд вопросов о структуре и функциях этих белков остается неисследованным. Общая черта многих из этих фундаментальных проблем – отсутствие системного подхода в исследованиях и, как следствие, фрагментарность полученных данных. 14-3-3 – мультигенное семейство, представленное сразу несколькими изоформами в пределах одного вида растений. Для получения полного представления обо всем семействе в одном виде растений необходимо исследование либо всех представителей семейства, либо некоторой заведомо репрезентативной выборки изоформ. В первом случае задача становится крайне трудоемкой даже для таких видов растений, в которых присутствует сравнительно небольшое число изоформ. Во втором случае, однако, непонятно, какие критерии использовать при отборе изоформ для анализа. Поэтому в большинстве исследований изоформы нередко выбирают наугад, что еще больше затрудняет интерпретацию данных и делает невозможным глобальные обобщения. Ниже мы приведем некоторые наиболее интересные нерешенные вопросы – своего рода «белые пятна» в области исследования растительных 14-3-3.

Сходны или различны между собой гомодимеры 14-3-3 растений по биохимическим свойствам? Один из фундаментальных вопросов касается биохимических характеристик белков 14-3-3. Белки 14-3-3 довольно консервативны, процент попарной идентичности первичных структур изоформ 14-3-3 из *A. thaliana* в среднем составляет 60%, в нескольких случаях – 80-90%. Однако до сих пор не было экспериментально проверено, насколько эти белки действительно сходны даже по базовым биохимическим характеристикам. Начав исследовать этот вопрос, мы с удивлением обнаружили, что белки 14-3-3 из *A. thaliana* существенно различаются на уровне эпсилон- и неэпсилон групп по целому ряду биохимических параметров, характеризующих стабильность гомодимеров, гидрофобность их поверхности, термическую и протеолитическую стабильность и другие свойства [209]. Изоформы эпсилон-группы, в отличие от неэпсилон-изоформ, склонны к диссоциации на мономеры, характеризуются сниженной температурой полуперехода (наибольшее отличие от неэпсилон-изоформ составляет целых 20 °C) и большей подверженностью ограниченному протеолизу [209]. Таким образом, уже на уровне гомодимеров белки 14-3-3 растений могут разительно различаться между собой. Поиск таких отличительных черт и биохимических особенностей имеет принципиальную важность, поскольку эти характеристики могут оказывать большое влияние на время жизни (стабильность) и биологические функции изоформ 14-3-3 у растений. Кроме того, понимание отличительных свойств изоформ разных подгрупп может помочь при филогенетическом анализе и при проецировании обнаруженных свойств, присущих подгруппе или отдельным изоформам в одних растениях, на другие, менее изученные. В отсутствие такой информации многочисленные накопленные факты не поддаются надлежащей систематизации и осмыслению.

Какие гетеродимеры 14-3-3 растений могут формироваться? Существуют ли предпочтения изоформ при образовании гетеродимеров? Гетеродимеризация растительных 14-3-3 была показана в нескольких работах – как *in vitro*, так и *in vivo*. Для 13 изоформ *A. thaliana* 14-3-3 теоретически способны образоваться 78 различных гетеродимеров, однако данные о практической возможности образования представлены в литературе лишь для 11 из них, причем все они принадлежат к филогенетической группе неэпсилон. Более того, в литературе не хватает информации о способности растительных 14-3-3 гетеродимеризоваться в нативной форме, без применения стадий денатурации и рена-

турации. Остается неизвестным, гетеродимеризуются ли эpsilon-изоформы растений друг с другом, и происходит ли гетеродимеризация с участием представителей эpsilon- и неэpsilon-изоформ. Также неизвестно, какой биологический смысл имеет способность к формированию гетеродимеров, и дает ли она какие-то преимущества.

Существует ли у растительных 14-3-3 иерархия по сродству к фосфорилированным пептидам? Какова причина различий в сродстве для тех изоформ 14-3-3, для которых эти различия продемонстрированы? Для 14-3-3 животных было показано, что вне зависимости от типа белка-партнера практически в неизменном виде сохраняется иерархия сродства – ряд возрастания прочности комплексов с лигандами у изоформ 14-3-3 [92]. Для 14-3-3 растений неизвестно, существует ли такая закономерность. В нескольких работах было показано, что 14-3-3 из *A. thaliana* с различным сродством связывают фосфопептиды (или белки-партнеры). Для выведения закономерностей о сродстве необходим системный подход, однако ни в одной из указанных работ не исследован полный набор изоформ даже для модельного растения *A. thaliana*. Максимальное число проанализированных в одном исследовании изоформ – это 9 из 13. Ожидает решения также фундаментальный вопрос о причине различий в аффинностях у изоформ 14-3-3. Остатки, экспонированные в лиганд-связывающую бороздку 14-3-3 и ответственные за связывание с фосфопептидами, абсолютно консервативны, поэтому не очевидно, чем с точки зрения структуры белка могут обеспечиваться различия в силе связывания. Данный вопрос актуален как для 14-3-3 растений, так и для 14-3-3 млекопитающих.

Насколько распространена и универсальна регуляция растительных 14-3-3 с помощью фосфорилирования? Каковы функциональные эффекты фосфорилирования? Белки 14-3-3 сами могут подвергаться специфическому фосфорилированию, и этой модификации приписывается важная роль в регуляции связывания 14-3-3 с белками-партнерами и в поддержании структуры димера 14-3-3 [74, 82]. В масштабных фосфопротеомных исследованиях обнаружены десятки фосфорилируемых остатков у 14-3-3 растений [83, 210]. Однако функционально охарактеризованы лишь две позиции, находящиеся в области димерного интерфейса 14-3-3. Также остается неясным, насколько консервативны и универсальны механизмы регуляции 14-3-3 под действием фосфорилирования для изоформ растений различных видов.

Специфичность или избыточность функций растительных изоформ 14-3-3? Данный вопрос уже поднимался в нескольких обзорах о 14-3-3 растений [46, 211, 212]. Ассоциирована ли каждая изоформа 14-3-3 с определенными белками-партнерами или все 14-3-3 могут связывать все подходящие по формальным признакам белки-партнеры и компенсировать функции друг друга? Четкий ответ на данный вопрос в настоящее время отсутствует. В качестве иллюстрации можно рассмотреть исследования, посвященные изоформам 14-3-3 κ и λ из *A. thaliana*. Эти два белка возникли в результате относительно недавней дупликации одного гена [14], они идентичны на 93% по первичной структуре, это наибольшая идентичность для изоформ 14-3-3 у *A. thaliana*. От столь близких изоформ, κ и λ , можно было бы ожидать сильного перекрытия функций и наименьшей степени субфункционализации. С этим согласуются некоторые экспериментальные данные, характеризующие функции этих изоформ как вырожденные: одиночные мутации как 14-3-3 λ , так и κ не оказывали эффекта на флагеллин-индуцированную экспрессию маркерных генов [111]. Оба одиночных и даже двойной мутант по 14-3-3 λ и κ были неотличимы от растений дикого типа по длине корней [36]. И все же, в нескольких исследованиях были продемонстрированы различающиеся

свойства и эффекты этих наиболее сходных по последовательности изоформ: 14-3-3 λ , но не κ , связывала белок RPW8.2 при иммунопреципитации [213]; для 14-3-3 λ , но не для κ , была продемонстрирована роль в phot2-опосредованном открывании устьиц *in vivo* [200]; 14-3-3 λ и κ взаимодействовали с фототропином phot1, но при этом 14-3-3 λ связывала белок в несколько раз сильнее, чем 14-3-3 κ [199]; аффинность 14-3-3 λ к различным мишеням была стабильно выше, чем у 14-3-3 κ [58]. Таким образом, даже очень сходные между собой изоформы 14-3-3 могут проявлять как черты специфичности, так и вырожденности функций. Видимо, для 14-3-3 растений нет общего правила о вырожденности или специфичности, и степень выраженности функционального эффекта определенных изоформ зависит от конкретных белок-белковых взаимодействий.

Нехватка информации о белках-партнерах 14-3-3 растений. Серьезная проблема исследований 14-3-3 растений заключается в нехватке информации о взаимодействиях 14-3-3 с белками-партнерами: нередко отсутствуют данные об участке связывания 14-3-3, о функциональных последствиях взаимодействия, пространственных структурах комплексов с белками-партнерами. Наличие пространственной структуры помогает выявить механизм регуляции белков-партнеров с помощью взаимодействия с 14-3-3. На настоящий момент известны только две структуры комплексов 14-3-3 растений с белками-партнерами или их крупными фрагментами: флоригеном Hd3a *Oryza sativa* и С-концевым фрагментом H⁺-АТФазы плазматической мембраны PMA2 *Nicotiana plumbaginifolia* [96, 99] (рис. 7 А, Б). В результате, детали механизмов действия 14-3-3 на все остальные белки-партнеры растений не известны или не полны, что приводит к неоднозначности интерпретации экспериментальных данных и противоречиям. Так, например, масса противоречий касается взаимодействия 14-3-3 и сахарозо-фосфатсинтазы (SPS), поскольку ни первоначально обозначенный в работе Toroser *et al.* [98] фосфорилируемый сайт узнавания 14-3-3 (Ser229 из *Spinacia oleracea*), ни ингибирующий эффект 14-3-3 при связывании с ферментом не удалось подтвердить в более поздних работах. Регуляторный механизм наиболее полно описан для двух классических белков-партнеров 14-3-3 – NR [124] и АТФазы PMA [99]. Для многих других белков детали взаимодействия с 14-3-3 неизвестны. Так, например, для взаимодействий 14-3-3 с нефосфорилирующей глицеральдегидфосфатдегидрогеназой (GAPN), 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазой (ACS), глутаминсинтетазой, транскрипционных факторов WR11, VP1 и EmBP1, неизвестны ни участок связывания 14-3-3, ни фосфорилирующая его киназа. Исходя из общих представлений о взаимодействии 14-3-3 с белками-партнерами, полное описание регуляторного механизма возможно тогда, когда известен 1) сайт узнавания 14-3-3 в пределах белка-партнера; 2) фосфорилирующая его киназа; 3) эффект связывания 14-3-3 на активность и конформацию белка *in vitro*; 4) функциональные последствия взаимодействия *in vivo*. Единообразное и ответственное следование данному плану при исследовании белков-партнеров могло бы устранить противоречия и внести ясность в представления о регулируемых при участии 14-3-3 процессах в растениях.

Насколько применим дрожжевой двугибридный метод для исследования взаимодействий 14-3-3 с белками-партнерами? Дрожжевой двугибридный метод неоднократно применяли в исследованиях 14-3-3. Метод в скрининговом формате с использованием библиотек кДНК позволил обнаружить десятки и сотни белок-белковых взаимодействий [171, 214]. Однако для проверки конкретных бинарных взаимодействий метод может не

подойти ввиду особенностей взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами. Для связывания 14-3-3 необходимо фосфорилирование белка-партнера определенной киназой, возможно, специфичной для растений, по специфическому мотиву. К тому же, внутриклеточная локализация образованного белкового комплекса может быть отлична от ядерной, например, если белок-партнер мембранный или примембранный. Эти особенности затрудняют использование метода и ограничивают его применимость ко многим белок-белковым взаимодействиям 14-3-3. Так, например, сомнителен вывод об отсутствии прямого взаимодействия 14-3-3 и K^+ -каналов GORK на основании отрицательных результатов в дрожжевой двугибридной системе, несмотря на показанное в той же работе специфическое связывание 14-3-3 и GORK методом pull-down [169]. Таким образом, применять метод для исследования белковых взаимодействий с участием 14-3-3, в том числе растительных, следует с большой осторожностью и желательно с привлечением ортогональных методов.

Могут ли 14-3-3 растений регулировать функционирование белков-партнеров через шапероно-подобную активность и влияние на LLPS? Ряд механизмов, по которым связывание с 14-3-3 меняет биологическую функцию белка-партнера, описаны как для 14-3-3 растений, так и млекопитающих (Рис. 3 А-Е). Однако такие интересные механизмы как шапероно-подобная активность 14-3-3 и влияние на LLPS описаны на настоящий момент только для 14-3-3 млекопитающих [117–119] (Рис. 4 Б, В). Поскольку структурно растительные 14-3-3 принципиально сходны с гомологами из млекопитающих и обладают ничуть не меньшей биологической значимостью, то разумно предполагать, что данные механизмы могут быть обнаружены и у растений. У растений явление LLPS было описано для нескольких важнейших физиологических процессов, в том числе, при формировании молекулярных конденсатов в ядре при регуляции цветения и при запуске транскрипционного ответа в сигналинге фитохрома phyB [215]. В последних двух процессах белки 14-3-3 непосредственно участвуют и, возможно, имеют определенную роль в происходящих явлениях LLPS.

Есть ли 14-3-3 в хлоропластах и митохондриях и как они туда проникают? Для 14-3-3 характерна локализация в цитозоле и ядре клетки, у этих белков отсутствует сигнальная последовательность для импорта в хлоропласты [216]. Однако в нескольких ранних исследованиях было показано, что 14-3-3 растений могут быть локализованы в строме хлоропласта [44, 106]. Более того, было показано, что 14-3-3 могут взаимодействовать и регулировать активность некоторых хлоропластных белков, таких как глутаминсинтаза GS2 [129], крахмалсинтаза [44], а также АТФ-синтаз хлоропластов и митохондрий [217]. Остается неизвестным, как 14-3-3 проникают в двумембранные органеллы, и какие функции там выполняют. Эти вопросы, затронутые в основном в ранних работах, нуждаются в пересмотре с применением современных методов биохимического и структурного анализа.

Проблемы фенотипического анализа растений, мутантных по 14-3-3. Фенотипический анализ мутантов мог бы предоставить возможности для обнаружения и исследования специфических функций изоформ 14-3-3 у растений. Был проделан большой объем работ по нокаутированию, сверхэкспрессии, гетерологичной экспрессии 14-3-3 у разных видов растений [18, 25, 37–45, 169]. Однако исследования с получением мутантов по 14-3-3 часто несистемные и неполные. О нехватке системности свидетельствует тот факт, что в литературе отсутствуют работы, где производили бы мутации и давали опи-

сание фенотипов одиночных мутантов по всем 13 изоформам модельного объекта *A. thaliana*. Для исследований изоформы нередко выбирают случайно или экспрессируют изоформу одного растения в другом. В исследованиях часто фокусируются на определенном признаке мутантных растений, не рассматривая другие (очень мало или вообще нет исследований по типу «одна изоформа – много признаков» или «один признак – все изоформы»). Как было отмечено выше, основные фенотипические проявления мутаций 14-3-3 затрагивают характеристики роста растений, время перехода к цветению, устойчивость к солевому стрессу и накопление крахмала. Очевидно, что данные эффекты имеют практическую значимость, например, в сельском хозяйстве. Можно предположить, что в подобных исследованиях авторы придают огласке только яркие данные и умалчивают об остальных эффектах мутаций или не замечают их. Интерпретацию результатов заметно осложняет компенсаторный эффект изоформ при нокаутировании, определенно имеющий место в случае достаточно функционально сходных друг с другом белков 14-3-3. Охват и фундаментальная значимость работ по обратной генетике 14-3-3 растений могли бы сильно возрасти при использовании системного подхода и всестороннего анализа мутантных по 14-3-3 линий.

Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда 24-74-00091.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cornell, B., Toyo-oka, K. (2017). 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **10**, 318. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00318>
2. Moore, B., Perez, V., Carlson, F. (1967). Physiological and biochemical aspects of nervous integration. *Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall*, 343–359.
3. Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: A historic overview. *Seminars in Cancer Biology*, **16**(3), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.005>
4. Brandt, J., Thordal-Christensen, H., Vad, K., Gregersen, P., Collinge, D. (1992). A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *The Plant Journal*, **2**(5), 815–820. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1992.t01-18-00999.x>
5. de Vetten, N. C., Lu, G., Feri, R. J. (1992). A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins. *The Plant Cell*, **4**(10), 1295–1307.
6. Hirsch, S., Aitken, A., Bertsch, U., Soll, J. (1992). A plant homologue to mammalian brain 14-3-3 protein and protein kinase C inhibitor. *FEBS Letters*, **296**(2), 222–224. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80384-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80384-S)
7. Lu, G., DeLisle, A. J., De Vetten, N. C., Ferl, R. J. (1992). Brain proteins in plants: an Arabidopsis homolog to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**(23), 11490–11494. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.23.11490>

8. Korthout, H. A. A. J., de Boer, A. H. (1994). A Fusococcin Binding Protein Belongs to the Family of 14-3-3 Brain Protein Homologs. *The Plant Cell*, **6**(11), 1681. <https://doi.org/10.2307/3869953>
9. Daugherty, C. J., Rooney, M. F., Miller, P. W., Ferl, R. J. (1996). Molecular organization and tissue-specific expression of an Arabidopsis 14-3-3 gene. *The Plant Cell*, **8**(8), 1239–1248. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1239>
10. Bachmann, M., Huber, J. L., Liao, P.-C., Gage, D. A., Huber, S. C. (1996). The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Letters*, **387**(2–3), 127–131. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00478-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00478-4)
11. Jia, C., Guo, B., Wang, B., Li, X., Yang, T., Li, N., ... Yu, Q. (2022). Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the 14-3-3 (TFT) Gene Family in Tomato, and the Role of SITFT4 in Salt Stress. *Plants*, **11**(24), 3491. <https://doi.org/10.3390/plants11243491>
12. XU, W. F., SHI, W. M. (2006). Expression Profiling of the 14-3-3 Gene Family in Response to Salt Stress and Potassium and Iron Deficiencies in Young Tomato (*Solanum lycopersicum*) Roots: Analysis by Real-time RT-PCR. *Annals of Botany*, **98**(5), 965–974. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl189>
13. Jarillo, J. A., Capel, J., Leyva, A., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J. (1994). Two related low-temperature-inducible genes of Arabidopsis encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology*, **25**(4), 693–704. <https://doi.org/10.1007/BF00029607>
14. Mikhaylova, Y. V., Puzanskiy, R. K., Shishova, M. F. (2021). Evolution of 14-3-3 proteins in angiosperm plants: Recurring gene duplication and loss. *Plants*, **10**(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122724>
15. Yao, Y., Du, Y., Jiang, L., Liu, J. Y. (2007). Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **40**(3), 349–357. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.3.349>
16. Zhang, Z.-B., Wang, X.-K., Wang, S., Guan, Q., Zhang, W., Feng, Z.-G. (2022). Expansion and Diversification of the 14-3-3 Gene Family in *Camellia sinensis*. *Journal of Molecular Evolution*, **90**(3), 296–306. <https://doi.org/10.1007/s00239-022-10060-6>
17. Li, X., Dhaubhadel, S. (2011). Soybean 14-3-3 gene family: identification and molecular characterization. *Planta*, **233**(3), 569–582. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1315-6>
18. Ren, J., Zhang, P., Dai, Y., Liu, X., Lu, S., Guo, L., ... Mao, J. (2023). Evolution of the 14-3-3 gene family in monocotyledons and dicotyledons and validation of MdGRF13 function in transgenic Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03035-4>
19. Cao, H., Yan, Y. (2016). Molecular Characterization of the 14-3-3 Gene Family in *Brachypodium distachyon* L. Reveals High Evolutionary Conservation and Diverse Responses to Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, **7**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01099>
20. Carretero-Paulet, L., Fares, M. A. (2012). Evolutionary Dynamics and Functional Specialization of Plant Paralogs Formed by Whole and Small-Scale Genome Duplications. *Molecular Biology and Evolution*, **29**(11), 3541–3551. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss162>
21. Landis, J. B., Soltis, D. E., Li, Z., Marx, H. E., Barker, M. S., Tank, D. C., Soltis, P. S. (2018). Impact of whole-genome duplication events on diversification rates in angiosperms. *American Journal of Botany*, **105**(3), 348–363. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1060>
22. Zuo, X., Wang, S., Xiang, W., Yang, H., Tahir, M. M., Zheng, S., ... Zhang, D. (2021). Genome-wide identification of the 14-3-3 gene family and its participation in floral transition by interacting with TFL1/FT in apple. *BMC Genomics*, **22**(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07330-2>
23. DeLille, J. M., Schnke, P. C., Ferl, R. J. (2001). The Arabidopsis 14-3-3 Family of Signaling Regulators. *Plant Physiology*, **126**(1), 35–38. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.35>

24. Yashvardhini, N., Bhattacharya, S., Chaudhuri, S., Sengupta, D. N. (2018). Molecular characterization of the 14-3-3 gene family in rice and its expression studies under abiotic stress. *Planta*, **247**(1), 229–253. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2779-4>
25. Liu, J., Jiang, C., Kang, L., Zhang, H., Song, Y., Zou, Z., Zheng, W. (2020). Over-Expression of a 14-3-3 Protein From Foxtail Millet Improves Plant Tolerance to Salinity Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, **11**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00449>
26. Oberfell, E., Hohmann, U., Moretti, A., Chen, H., Hothorn, M. (2024). Mechanistic Insights into the Function of 14-3-3 Proteins as Negative Regulators of Brassinosteroid Signaling in *Arabidopsis*. *Plant And Cell Physiology*, pcae056. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae056>
27. Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, **44**(W1), W344–W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
28. The Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181**(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
29. van Heusden, G. P. H., Wenzel, T. J., Lagendijk, E. L., de Steensma, H. y., van den Berg, J. A. (1992). Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. *FEBS Letters*, **302**(2), 145–150. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80426-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80426-H)
30. van Heusden, G. P. H., Yde Steensma, H. (2006). Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast*, **23**(3), 159–171. <https://doi.org/10.1002/yea.1338>
31. Van Heusden, G. P. H., Griffiths, D. J. F., Ford, J. C., Chin-A-Woeng, T. F. C., Schrader, P. A. T., Carr, A. M., Steensma, H. Y. (1995). The 14-3-3 Proteins Encoded by the BMH1 and BMH2 Genes are Essential in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Can be Replaced by a Plant Homologue. *European Journal of Biochemistry*, **229**(1), 45–53. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.00451.x>
32. van Heusden, G. P. H., van der Zanden, A. L., Ferl, R. J., Steensma, H. Y. (1996). Four *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast *bmh1 bmh2* double disruption. *FEBS Letters*, **391**(3), 252–256. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00746-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00746-6)
33. Kumar, K., Muthamilarasan, M., Bonthala, V. S., Roy, R., Prasad, M. (2015). Unraveling 14-3-3 Proteins in C4 Panicoids with Emphasis on Model Plant *Setaria italica* Reveals Phosphorylation-Dependent Subcellular Localization of RS Splicing Factor. *PLOS ONE*, **10**(4), e0123236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123236>
34. Tian, F., Wang, T., Xie, Y., Zhang, J., Hu, J. (2015). Genome-Wide Identification, Classification, and Expression Analysis of 14-3-3 Gene Family in *Populus*. *PLOS ONE*, **10**(4), e0123225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123225>
35. Wang, Y., Xu, Q., Shan, H., Ni, Y., Xu, M., Xu, Y., ... Li, X. (2023). Genome-wide analysis of 14-3-3 gene family in four gramineae and its response to mycorrhizal symbiosis in maize. *Frontiers in Plant Science*, **14**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1117879>
36. van Kleeff, P. J. M., Jaspert, N., Li, K. W., Rauch, S., Oecking, C., de Boer, A. H. (2014). Higher order *Arabidopsis* 14-3-3 mutants show 14-3-3 involvement in primary root growth both under control and abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, **65**(20), 5877–5888. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru338>
37. Keicher, J., Jaspert, N., Weckermann, K., Möller, C., Throm, C., Kintzi, A., Oecking, C. (2017). *Arabidopsis* 14-3-3 epsilon members contribute to polarity of PIN auxin carrier and auxin transport-related development. *eLife*, **6**, e24336. <https://doi.org/10.7554/eLife.24336>
38. Mayfield, J. D., Paul, A.-L., Ferl, R. J. (2012). The 14-3-3 proteins of *Arabidopsis* regulate root growth and chloroplast development as components of the photosensory system. *Journal of Experimental Botany*, **63**(8), 3061–3070. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers022>

39. He, Y., Wu, J., Lv, B., Li, J., Gao, Z., Xu, W., ... Zhang, J. (2015). Involvement of 14-3-3 protein GRF9 in root growth and response under polyethylene glycol-induced water stress. *Journal of Experimental Botany*, **66**(8), 2271–2281. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv149>
40. Mayfield, J. D., Folta, K. M., Paul, A.-L., Ferl, R. J. (2007). The 14-3-3 Proteins μ and ν Influence Transition to Flowering and Early Phytochrome Response. *Plant Physiology*, **145**(4), 1692–1702. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108654>
41. Purwestri, Y. A., Ogaki, Y., Tamaki, S., Tsuji, H., Shimamoto, K. (2009). The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. *Plant and Cell Physiology*, **50**(3), 429–438. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp012>
42. Wang, X., Chang, L., Tong, Z., Wang, D., Yin, Q., Wang, D., ... Peng, M. (2016). Proteomics Profiling Reveals Carbohydrate Metabolic Enzymes and 14-3-3 Proteins Play Important Roles for Starch Accumulation during Cassava Root Tuberization. *Scientific Reports*, **6**(1), 19643. <https://doi.org/10.1038/srep19643>
43. Pan, R., Wang, Y., An, F., Yao, Y., Xue, J., Zhu, W., ... Chen, S. (2023). Genome-wide identification and characterization of 14-3-3 gene family related to negative regulation of starch accumulation in storage root of *Manihot esculenta*. *Frontiers in Plant Science*, **14**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1184903>
44. Sehnke, P. C., Chung, H.-J., Wu, K., Ferl, R. J. (2001). Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(2), 765–770. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.765>
45. Zhu, Y., Kuang, W., Leng, J., Wang, X., Qiu, L., Kong, X., ... Zhao, Q. (2023). The apple 14-3-3 gene MdGRF6 negatively regulates salt tolerance. *Frontiers in Plant Science*, **14**(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1161539>
46. Paul, A. L., Denison, F. C., Schultz, E. R., Zupanska, A. K., Ferl, R. J. (2012). 14-3-3 Phosphoprotein interaction networks - Does isoform diversity present functional interaction specification? *Frontiers in Plant Science*, **3**(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00190>
47. Rosenquist, M., Sehnke, P., Ferl, R. J., Sommarin, M., Larsson, C. (2000). Evolution of the 14-3-3 protein family: Does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *Journal of Molecular Evolution*, **51**(5), 446–458. <https://doi.org/10.1007/s002390010107>
48. Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., ... Yaffe, M. B. (1999). Structural Analysis of 14-3-3 Phosphopeptide Complexes Identifies a Dual Role for the Nuclear Export Signal of 14-3-3 in Ligand Binding. *Molecular Cell*, **4**(2), 153–166. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80363-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80363-9)
49. Jiang, W., Tong, T., Li, W., Huang, Z., Chen, G., Zeng, F., ... Chen, Z.-H. (2022). Molecular Evolution of Plant 14-3-3 Proteins and Function of Hv14-3-3A in Stomatal Regulation and Drought Tolerance. *Plant and Cell Physiology*, **63**(12), 1857–1872. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac034>
50. Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, **397**(6715), 172–175. <https://doi.org/10.1038/16488>
51. Su, C.-H., Zhao, R., Velazquez-Torres, G., Chen, J., Gully, C., Yeung, S.-C. J., Lee, M.-H. (2010). Nuclear export regulation of COP1 by 14-3-3 σ in response to DNA damage. *Molecular Cancer*, **9**(1), 243. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-243>
52. Kumagai, A., Dunphy, W. G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Development*, **13**(9), 1067–1072.
53. Sluchanko, N. N., Gusev, N. B. (2017). Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins. *The FEBS Journal*, **284**(9), 1279–1295. <https://doi.org/10.1111/febs.13986>

54. Shen, W., Clark, A. C., Huber, S. C. (2003). The C-terminal tail of Arabidopsis 14-3-3 ω functions as an autoinhibitor and may contain a tenth α -helix. *Plant Journal*, **34**(4), 473–484. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01739.x>
55. Truong, A. B., Masters, S. C., Yang, H., Fu, H. (2002). Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **49**(3), 321–325. <https://doi.org/10.1002/prot.10210>
56. Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsil, T. (2004). 14-3-3 Protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(47), 49113–49119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408671200>
57. Athwal, G. S., Huber, S. C. (2002). Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *Plant Journal*, **29**(2), 119–129. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01200.x>
58. Pallucca, R., Visconti, S., Camoni, L., Cesareni, G., Melino, S., Panni, S., ... Aducci, P. (2014). Specificity of ϵ and non- ϵ isoforms of Arabidopsis 14-3-3 proteins towards the H⁺-ATPase and other targets. *PLoS ONE*, **9**(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090764>
59. Börnke, F. (2005). The variable C-terminus of 14-3-3 proteins mediates isoform-specific interaction with sucrose-phosphate synthase in the yeast two-hybrid system. *Journal of Plant Physiology*, **162**(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.09.006>
60. Lu, G., Sehnke, P. C., Ferl, R. J. (1994). Phosphorylation and Calcium Binding Properties of an Arabidopsis GF14 Brain Protein Homolog. *The Plant Cell*, **6**(4), 501. <https://doi.org/10.2307/3869930>
61. Athwal, G. S., Huber, J. L., Huber, S. C. (1998). Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation. *Plant and Cell Physiology*, **39**(10), 1065–1072. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029303>
62. Yang, Z., Wang, C., Xue, Y., Liu, X., Chen, S., Song, C. P., ... Guo, Y. (2019). Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance. *Nature Communications*, **10**(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09181-2>
63. Day, I. S., Reddy, V. S., Shad Ali, G., Reddy, A. S. N. (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis. *Genome biology*, **3**(10), RESEARCH0056. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-research0056>
64. Manak, M. S., Ferl, R. J. (2007). Divalent Cation Effects on Interactions between Multiple Arabidopsis 14-3-3 Isoforms and Phosphopeptide Targets. *Biochemistry*, **46**(4), 1055–1063. <https://doi.org/10.1021/bi061366c>
65. Trošanová, Z., Louša, P., Kozeleková, A., Brom, T., Gašparik, N., Tungli, J., ... Hritz, J. (2022). Quantitation of Human 14-3-3 ζ Dimerization and the Effect of Phosphorylation on Dimer-monomer Equilibria. *Journal of Molecular Biology*, **434**(7), 167479. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167479>
66. Chaudhri, M., Scarabel, M., Aitken, A. (2003). Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **300**(3), 679–685. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02902-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02902-9)
67. Yang, X., Lee, W. H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C. V., Grossmann, J. G., ... Elkins, J. M. (2006). Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(46), 17237–17242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605779103>
68. Verdoodt, B., Benzinger, A., Popowicz, G. M., Holak, T. A., Hermeking, H. (2006). Characterization of 14-3-3 σ Dimerization Determinants: Requirement of Homodimerization for Inhibition of Cell Proliferation. *Cell Cycle*, **5**(24), 2920–2926. <https://doi.org/10.4161/cc.5.24.3571>

69. Wilker, E. W., Grant, R. A., Artim, S. C., Yaffe, M. B. (2005). A Structural Basis for 14-3-3 σ Functional Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(19), 18891–18898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500982200>
70. Torosyan, H., Paul, M. D., Forget, A., Lo, M., Diwanji, D., Pawłowski, K., ... Verba, K. A. (2023). Structural insights into regulation of the PEAK3 pseudokinase scaffold by 14-3-3. *Nature Communications*, **14**(1), 3543. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38864-0>
71. Tugaeva, K. V., Titterington, J., Sotnikov, D. V., Maksimov, E. G., Antson, A. A., Sluchanko, N. N. (2020). Molecular basis for the recognition of steroidogenic acute regulatory protein by the 14-3-3 protein family. *The FEBS Journal*, **287**(18), 3944–3966. <https://doi.org/10.1111/febs.15474>
72. Ghorbani, S., Fossbakk, A., Jorge-Finnigan, A., Flydal, M. I., Haavik, J., Kleppe, R. (2016). Regulation of tyrosine hydroxylase is preserved across different homo- and heterodimeric 14-3-3 proteins. *Amino Acids*, **48**(5), 1221–1229. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2157-0>
73. Wu, K., Lu, G., Sehnke, P., Ferl, R. J. (1997). The Heterologous Interactions among Plant 14-3-3 Proteins and Identification of Regions That Are Important for Dimerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **339**(1), 2–8. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9841>
74. Gökirmak, T., Denison, F. C., Laughner, B. J., Paul, A. L., Ferl, R. J. (2015). Phosphomimetic mutation of a conserved serine residue in Arabidopsis thaliana 14-3-3 ω suggests a regulatory role of phosphorylation in dimerization and target interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, **97**, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.022>
75. Oh, C.-S., Martin, G. B. (2011). Tomato 14-3-3 Protein TFT7 Interacts with a MAP Kinase Kinase to Regulate Immunity-associated Programmed Cell Death Mediated by Diverse Disease Resistance Proteins *. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(16), 14129–14136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225086>
76. Paul, A.-L., Sehnke, P. C., Ferl, R. J. (2005). Isoform-specific Subcellular Localization among 14-3-3 Proteins in Arabidopsis Seems to be Driven by Client Interactions. *Molecular Biology of the Cell*, **16**(4), 1735–1743. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0839>
77. Zhang, Z.-T., Zhou, Y., Li, Y., Shao, S.-Q., Li, B.-Y., Shi, H.-Y., Li, X.-B. (2010). Interactome analysis of the six cotton 14-3-3s that are preferentially expressed in fibres and involved in cell elongation. *Journal of Experimental Botany*, **61**(12), 3331–3344. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq155>
78. Woodcock, J. M., Murphy, J., Stomski, F. C., Berndt, M. C., Lopez, A. F. (2003). The Dimeric Versus Monomeric Status of 14-3-3 ζ Is Controlled by Phosphorylation of Ser58 at the Dimer Interface. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(38), 36323–36327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304689200>
79. Denison, F. C., Gökirmak, T., Ferl, R. J. (2014). Phosphorylation-related modification at the dimer interface of 14-3-3 ω dramatically alters monomer interaction dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **541**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.025>
80. Sluchanko, N. N., Chernik, I. S., Seit-Nebi, A. S., Pivovarova, A. V., Levitsky, D. I., Gusev, N. B. (2008). Effect of mutations mimicking phosphorylation on the structure and properties of human 14-3-3 ζ . *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **477**(2), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.020>
81. Swatek, K. N., Wilson, R. S., Ahsan, N., Tritz, R. L., Thelen, J. J. (2014). Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases. *Biochemical Journal*, **459**(1), 15–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20130035>
82. Lachaud, C., Prigent, E., Thuleau, P., Grat, S., Da Silva, D., Brière, C., ... Cotelle, V. (2013). 14-3-3-Regulated Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in Arabidopsis. *Cell Death Differentiation*, **20**(2), 209–217. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.114>
83. de Boer, A. H., van Kleeff, P. J. M., Gao, J. (2013). Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma*, **250**(2), 425–440. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0437-z>

84. Bustos, D. M., Iglesias, A. A. (2006). Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **63**(1), 35–42. <https://doi.org/10.1002/prot.20888>
85. Karlberg, T., Hornyak, P., Pinto, A. F., Milanova, S., Ebrahimi, M., Lindberg, M., ... Schüler, H. (2018). 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface. *Nature Communications*, **9**(1), 3785. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06194-1>
86. Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S., Li, M. (2006). C-terminal binding: An expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Letters*, **580**(6), 1531–1535. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.014>
87. Johnson, C., Crowther, S., Stafford, M. J., Campbell, D. G., Toth, R., MacKintosh, C. (2010). Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochemical Journal*, **427**(1), 69–78. <https://doi.org/10.1042/BJ20091834>
88. Würtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A., Oecking, C. (2003). Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO Journal*, **22**(5), 987–994. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg104>
89. Stevers, L. M., Lam, C. V., Leysen, S. F. R., Meijer, F. A., van Scheppingen, D. S., de Vries, R. M. J. M., ... Ottmann, C. (2016). Characterization and small-molecule stabilization of the multisite tandem binding between 14-3-3 and the R domain of CFTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**(9), E1152–E1161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516631113>
90. Centorrino, F., Ballone, A., Wolter, M., Ottmann, C. (2018). Biophysical and structural insight into the USP8/14-3-3 interaction. *FEBS Letters*, **592**(7), 1211–1220. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13017>
91. Manschwetus, J. T., Wallbott, M., Fachinger, A., Obergruber, C., Pautz, S., Bertinetti, D., ... Herberg, F. W. (2020). Binding of the Human 14-3-3 Isoforms to Distinct Sites in the Leucine-Rich Repeat Kinase 2. *Frontiers in Neuroscience*, **14**. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00302>
92. Gogl, G., Tugaeva, K. V., Eberling, P., Kostmann, C., Trave, G., Sluchanko, N. N. (2021). Hierarchized phosphotarget binding by the seven human 14-3-3 isoforms. *Nature Communications*, **12**(1), 2–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21908-8>
93. Bachmann, M., Huber, J. L., Athwal, G. S., Wu, K., Ferl, R. J., Huber, S. C. (1996). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Letters*, **398**(1), 26–30. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01188-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01188-X)
94. Lambeck, I., Chi, J. C., Krizowski, S., Mueller, S., Mehlmer, N., Teige, M., ... Schwarz, G. (2010). Kinetic analysis of 14-3-3-inhibited *Arabidopsis thaliana* nitrate reductase. *Biochemistry*, **49**(37), 8177–8186. <https://doi.org/10.1021/bi1003487>
95. Nishiyama, K., Aihara, Y., Suzuki, T., Takahashi, K., Kinoshita, T., Dohmae, N., ... Hagihara, S. (2024). Discovery of a Plant 14-3-3 Inhibitor Possessing Isoform Selectivity and In Planta Activity. *Angewandte Chemie International Edition*, n/a(n/a), e202400218. <https://doi.org/10.1002/anie.202400218>
96. Taoka, K. I., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., ... Shimamoto, K. (2011). 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature*, **476**(7360), 332–335. <https://doi.org/10.1038/nature10272>
97. Lambeck, I. C., Fischer-Schrader, K., Niks, D., Roeper, J., Chi, J.-C., Hille, R., Schwarz, G. (2012). Molecular Mechanism of 14-3-3 Protein-mediated Inhibition of Plant Nitrate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(7), 4562–4571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323113>
98. Toroser, D., Athwal, G. S., Huber, S. C. (1998). Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Letters*, **435**(1), 110–114. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01048-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01048-5)

99. Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., ... Oecking, C. (2007). Structure of a 14-3-3 Coordinated Hexamer of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase by Combining X-Ray Crystallography and Electron Cryomicroscopy. *Molecular Cell*, **25**(3), 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.017>
100. Finnemann, J., Schjoerring, J. K. (2000). Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant Journal*, **24**(2), 171–181. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00863.x>
101. Ryu, H., Cho, H., Kim, K., Hwang, I. (2010). Phosphorylation Dependent Nucleocytoplasmic Shuttling of BES1 Is a Key Regulatory Event in Brassinosteroid Signaling. *Molecules and Cells*, **29**(3), 283–290. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0035-x>
102. Gampala, S. S., Kim, T. W., He, J. X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M. Y., ... Wang, Z. Y. (2007). An Essential Role for 14-3-3 Proteins in Brassinosteroid Signal Transduction in Arabidopsis. *Developmental Cell*, **13**(2), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.06.009>
103. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., Takahashi, Y. (2014). Scaffold Function of Ca²⁺-Dependent Protein Kinase: Tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase1 Transfers 14-3-3 to the Substrate repression of shoot growth after Phosphorylation. *Plant Physiology*, **165**(4), 1737–1750. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236448>
103. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., Takahashi, Y. (2014). Scaffold Function of Ca²⁺-Dependent Protein Kinase: Tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase1 Transfers 14-3-3 to the Substrate repression of shoot growth after Phosphorylation. *Plant Physiology*, **165**(4), 1737–1750. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236448>
104. Huang, X., Zhang, Q., Jiang, Y., Yang, C., Wang, Q., Li, L. (2018). Shade-induced nuclear localization of PIF7 is regulated by phosphorylation and 14-3-3 proteins in Arabidopsis. *eLife*, **7**, e31636. <https://doi.org/10.7554/eLife.31636>
105. May, T., Soll, J. (2000). 14-3-3 Proteins Form a Guidance Complex with Chloroplast Precursor Proteins in Plants. *The Plant Cell*, **12**(1), 53. <https://doi.org/10.2307/3871029>
106. Sehnke, P. C., Henry, R., Cline, K., Ferl, R. J. (2000). Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. *Plant Physiology*, **122**(1), 235–241. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.235>
107. Fellerer, C., Schweiger, R., Schöngruber, K., Soll, J., Schwenkert, S. (2011). Cytosolic HSP90 Cochaperones HOP and FKBP Interact with Freshly Synthesized Chloroplast Preproteins of Arabidopsis. *Molecular Plant*, **4**(6), 1133–1145. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr037>
108. Law, Y.-S., Ngan, L., Yan, J., Kwok, L. Y., Sun, Y., Cheng, S., ... Lim, B. L. (2018). Multiple Kinases Can Phosphorylate the N-Terminal Sequences of Mitochondrial Proteins in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, **9**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00982>
109. Law, Y. S., Zhang, R., Guan, X., Cheng, S., Sun, F., Duncan, O., ... Lim, B. L. (2015). Phosphorylation and dephosphorylation of the presequence of precursor multiple organellar rna editing factor3 during import into mitochondria from Arabidopsis. *Plant Physiology*, **169**(2), 1344–1355. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01115>
110. Schultz, T. F., Medina, J., Hill, A., Quatrano, R. S. (1998). 14-3-3 Proteins Are Part of an Abscisic Acid–VIVIPAROUS1 (VP1) Response Complex in the Em Promoter and Interact with VP1 and EmBP1. *The Plant Cell*, **10**(5), 837–847. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.5.837>
111. Dong, X., Feng, F., Li, Y., Li, L., Chen, S., Zhou, J.-M. (2023). 14-3-3 proteins facilitate the activation of MAP kinase cascades by upstream immunity-related kinases. *The Plant Cell*, **35**(6), 2413–2428. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad088>
112. Song, P., Yang, Z., Guo, C., Han, R., Wang, H., Dong, J., ... Li, J. (2023). 14-3-3 proteins regulate photomorphogenesis by facilitating light-induced degradation of PIF3. *New Phytologist*, **237**(1), 140–159. <https://doi.org/10.1111/nph.18494>

113. Yoon, G. M., Kieber, J. J. (2013). 14-3-3 Regulates 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase Protein Turnover in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **25**(3), 1016–1028. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110106>
114. Ma, W., Kong, Q., Mantyla, J. J., Yang, Y., Ohlrogge, J. B., Benning, C. (2016). 14-3-3 protein mediates plant seed oil biosynthesis through interaction with AtWRI1. *Plant Journal*, **88**(2), 228–235. <https://doi.org/10.1111/tpj.13244>
115. Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O., Pfizenmaier, K. (2006). Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III β protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity. *Journal of Cell Science*, **119**(17), 3613–3621. <https://doi.org/10.1242/jcs.03104>
116. Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., Tzivion, G. (2011). Bimodal regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, **1813**(8), 1453–1464. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.001>
117. Sluchanko, N. N., Roman, S. G., Chebotareva, N. A., Gusev, N. B. (2014). Chaperone-like activity of monomeric human 14-3-3 ζ on different protein substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **549**, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.03.008>
118. Yano, M., Nakamuta, S., Wu, X., Okumura, Y., Kido, H. (2006). A Novel Function of 14-3-3 Protein: 14-3-3 ζ Is a Heat-Shock-related Molecular Chaperone That Dissolves Thermal-aggregated Proteins. *Molecular Biology of the Cell*, **17**(11), 4769–4779. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0229>
119. Liu, Y.-Q., Liang, C.-Q., Chen, Z.-W., Hu, J., Hu, J.-J., Luo, Y.-Y., ... Li, Y.-M. (2023). 14-3-3 ζ Participates in the Phase Separation of Phosphorylated and Glycated Tau and Modulates the Physiological and Pathological Functions of Tau. *ACS Chemical Neuroscience*, **14**(7), 1220–1225. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00034>
120. Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., ... Krapp, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **53**(370), 959–970. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.959>
121. MacKintosh, C., Meek, S. E. M. (2001). Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**(2), 205–214. <https://doi.org/10.1007/PL00000848>
122. Lu, G., Campbell, W. H., Schneider, G., Lindqvist, Y. (1994). Crystal structure of the FAD-containing fragment of corn nitrate reductase at 2.5Å resolution: relationship to other flavoprotein reductases. *Structure*, **2**(9), 809–821. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00082-4)
123. Sinnige, M. P., Roobeek, I., Bunney, T. D., Visser, A. J. W. G., Mol, J. N. M., De Boer, A. H. (2005). Single amino acid variation in barley 14-3-3 proteins leads to functional isoform specificity in the regulation of nitrate reductase. *Plant Journal*, **44**(6), 1001–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02599.x>
124. Chi, J. C., Roeper, J., Schwarz, G., Fischer-Schrader, K. (2015). Dual binding of 14-3-3 protein regulates Arabidopsis nitrate reductase activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **20**(2), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1232-4>
125. Sugden, C., Donaghy, P. G., Halford, N. G., Hardie, D. G. (1999). Two SNF1-Related Protein Kinases from Spinach Leaf Phosphorylate and Inactivate 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase, Nitrate Reductase, and Sucrose Phosphate Synthase in Vitro 1. *Plant Physiology*, **120**(1), 257–274. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.257>
126. Crepin, N., Rolland, F. (2019). SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology*, **51**, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.006>
127. Broeckx, T., Hulsmans, S., Rolland, F. (2016). The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *Journal of Experimental Botany*, **67**(22), 6215–6252. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw416>

128. Pozuelo, M., MacKintosh, C., Galván, A., Fernández, E. (2001). Cytosolic glutamine synthetase and not nitrate reductase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is phosphorylated and binds 14-3-3 proteins. *Planta*, **212**(2), 264–269. <https://doi.org/10.1007/s004250000388>
129. Riedel, J., Tischner, R., Mäck, G. (2001). The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta*, **213**(3), 396–401. <https://doi.org/10.1007/s004250000509>
130. Swatek, K. N., Graham, K., Agrawal, G. K., Thelen, J. J. (2011). The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing Arabidopsis seed. *Journal of Proteome Research*, **10**(9), 4076–4087. <https://doi.org/10.1021/pr200263m>
131. Gao, J., van Kleeff, P. J. M., Li, K. W., de Boer, A. H. (2021). Physiological and interactomic analysis reveals versatile functions of Arabidopsis 14-3-3 quadruple mutants in response to Fe deficiency. *Scientific Reports*, **11**(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94908-9>
132. Paul, A. L., Liu, L., McClung, S., Laughner, B., Chen, S., Ferl, R. J. (2009). Comparative interactomics: Analysis of Arabidopsis 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. *Journal of Proteome Research*, **8**(4), 1913–1924. <https://doi.org/10.1021/pr8008644>
133. Chang, I.-F., Curran, A., Woolsey, R., Quilici, D., Cushman, J. C., Mittler, R., ... Harper, J. F. (2009). Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in Arabidopsis thaliana. *PROTEOMICS*, **9**(11), 2967–2985. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800445>
134. McMichael, R. W., Klein, R. R., Salvucci, M. E., Huber, S. C. (1993). Identification of the Major Regulatory Phosphorylation Site in Sucrose-Phosphate Synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **307**(2), 248–252. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1586>
135. Huber, S. C. (2007). Exploring the role of protein phosphorylation in plants: from signalling to metabolism. *Biochemical Society Transactions*, **35**(1), 28–32. <https://doi.org/10.1042/BST0350028>
136. Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., ... MacKintosh, C. (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal*, **18**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00417.x>
137. Lutfiyya, L. L., Xu, N., D'Ordine, R. L., Morrell, J. A., Miller, P. W., Duff, S. M. G. (2007). Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *Journal of Plant Physiology*, **164**(7), 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.04.014>
138. Cotelle, V., Meek, S. E. M., Provan, F., Milne, F. C., Morrice, N., MacKintosh, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO Journal*, **19**(12), 2869–2876. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2869>
139. Gao, J., Van Kleeff, P. J. M., Oecking, C., Li, K. W., Erban, A., Kopka, J., ... De Boer, A. H. (2014). Light modulated activity of root alkaline/neutral invertase involves the interaction with 14-3-3 proteins. *Plant Journal*, **80**(5), 785–796. <https://doi.org/10.1111/tpj.12677>
140. Bustos, D. M., Iglesias, A. A. (2003). Phosphorylated Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Heterotrophic Cells of Wheat Interacts with 14-3-3 Proteins. *Plant Physiology*, **133**(4), 2081–2088. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030981>
141. Habenicht, A., Quesada, A., Cerff, R. (1997). Sequence of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana plumbaginifolia* and phylogenetic origin of the gene family. *Gene*, **198**(1), 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00320-X)
142. Huber, S. C., MacKintosh, C., Kaiser, W. M. (2002). Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant Molecular Biology*, **50**(6), 1053–1063. <https://doi.org/10.1023/A:1021284002779>
143. Harthill, J. E., Meek, S. E. M., Morrice, N., Pegg, M. W., Borch, J., Wong, B. H. C., MacKintosh, C. (2006). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phos-

- phate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *The Plant Journal*, **47**(2), 211–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02780.x>
144. Truesdale, M. R., Toldi, O., Scott, P. (1999). The Effect of Elevated Concentrations of Fructose 2,6-Bisphosphate on Carbon Metabolism during Deacidification in the Crassulacean Acid Metabolism Plant *Kalanchoe daigremontiana* 1. *Plant Physiology*, **121**(3), 957–964. <https://doi.org/10.1104/pp.121.3.957>
145. Kulma, A., Villadsen, D., Campbell, D. G., Meek, S. E. M., E. Harthill, J., Nielsen, T. H., MacKintosh, C. (2004). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *The Plant Journal*, **37**(5), 654–667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01992.x>
146. Shin, R., Jez, J. M., Basra, A., Zhang, B., Schachtman, D. P. (2011). 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Letters*, **585**(1), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.025>
147. Cotelle, V., Leonhardt, N. (2016). 14-3-3 Proteins in Guard Cell Signaling. *Frontiers in Plant Science*, **6**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01210>
148. Li, Y., Zeng, H., Xu, F., Yan, F., Xu, W. (2022). H⁺-ATPases in Plant Growth and Stress Responses. *Annual Review of Plant Biology*, **73**(1), 495–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-plant-102820-114551>
149. Palmgren, M. G., Sommarin, M., Serrano, R., Larsson, C. (1991). Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(30), 20470–20475. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54948-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54948-6)
150. Jaspert, N., Oecking, C. (2002). Regulatory 14-3-3 proteins bind the atypical motif within the C terminus of the plant plasma membrane H⁺-ATPase via their typical amphipathic groove. *Planta*, **216**(1), 136–139. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0915-1>
151. Svanneid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., ... Sommarin, M. (1999). Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell*, **11**(12), 2379–2391. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.12.2379>
152. Jelich-Ottmann, C., Weiler, E. W., Oecking, C. (2001). Binding of Regulatory 14-3-3 Proteins to the C Terminus of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase Involves Part of Its Autoinhibitory Region. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(43), 39852–39857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106746200>
153. Takahashi, K., Hayashi, K., Kinoshita, T. (2012). Auxin Activates the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **159**(2), 632–641. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196428>
154. Pei, D., Hua, D., Deng, J., Wang, Z., Song, C., Wang, Y., ... Gong, Z. (2022). Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 by BAK1 is required for ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **34**(7), 2708–2729. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac106>
155. Pertl-Obermeyer, H., Gimeno, A., Kuchler, V., Servili, E., Huang, S., Fang, H., ... Obermeyer, G. (2022). pH modulates interaction of 14-3-3 proteins with pollen plasma membrane H⁺ ATPases independently from phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, **73**(1), 168–181. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab387>
156. Fuglsang, A. T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., ... Palmgren, M. G. (1999). Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H⁺-ATPase AHA2 Involves the Three C-terminal Residues Tyr946-Thr-Val and Requires Phosphorylation of Thr947*. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(51), 36774–36780. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36774>
157. Ottmann, C., Weyand, M., Sassa, T., Inoue, T., Kato, N., Wittinghofer, A., Oecking, C. (2009). A Structural Rationale for Selective Stabilization of Anti-tumor Interactions of 14-3-3 proteins by Cytolenin A. *Journal of Molecular Biology*, **386**(4), 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.005>

158. Rose, R., Erdmann, S., Bovens, S., Wolf, A., Rose, M., Hennig, S., ... Ottmann, C. (2010). Identification and Structure of Small-Molecule Stabilizers of 14-3-3 Protein-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, **49**(24), 4129–4132. <https://doi.org/10.1002/anie.200907203>
159. Richter, A., Rose, R., Hedberg, C., Waldmann, H., Ottmann, C. (2012). An Optimised Small-Molecule Stabiliser of the 14-3-3-PMA2 Protein-Protein Interaction. *Chemistry – A European Journal*, **18**(21), 6520–6527. <https://doi.org/10.1002/chem.201103761>
160. Camoni, L., Visconti, S., Aducci, P., Marra, M. (2019). From plant physiology to pharmacology: fusicoccin leaves the leaves. *Planta*, **249**(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3051-2>
161. De Boer, A. H., Watson, B. A., Cleland, R. E. (1989). Purification and Identification of the Fusicoccin Binding Protein from Oat Root Plasma Membrane. *Plant Physiology*, **89**(1), 250–259. <https://doi.org/10.1104/pp.89.1.250>
162. Marra, M., Fullone, M. R., Fogliano, V., Pen, J., Mattei, M., Masi, S., Aducci, P. (1994). The 30-Kilodalton Protein Present in Purified Fusicoccin Receptor Preparations Is a 14-3-3-Like Protein. *Plant Physiology*, **106**(4), 1497–1501. <https://doi.org/10.1104/pp.106.4.1497>
163. Oecking, C., Eckerskorn, C., Weiler, E. w. (1994). The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Letters*, **352**(2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00949-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00949-X)
164. Paiardini, A., Aducci, P., Cervoni, L., Cutruzzola, F., Di Lucente, C., Janson, G., ... Camoni, L. (2014). The phytotoxin fusicoccin differently regulates 14-3-3 proteins association to mode III targets. *IUBMB Life*, **66**(1), 52–62. <https://doi.org/10.1002/iub.1239>
165. Saponaro, A., Porro, A., Chaves-Sanjuan, A., Nardini, M., Rauh, O., Thiel, G., Moroni, A. (2017). Fusicoccin activates KAT1 channels by stabilizing their interaction with 14-3-3 proteins. *Plant Cell*, **29**(10), 2570–2580. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00375>
166. de Boer, A. H. (2024). The Fusicoccin story revisited. *Journal of Experimental Botany*, **erae300**. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae300>
167. Sottocornola, B., Visconti, S., Orsi, S., Gazzarrini, S., Giacometti, S., Olivari, C., ... Moroni, A. (2006). The Potassium Channel KAT1 Is Activated by Plant and Animal 14-3-3 Proteins *. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(47), 35735–35741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603361200>
168. Sottocornola, B., Gazzarrini, S., Olivari, C., Romani, G., Valbuzzi, P., Thiel, G., Moroni, A. (2008). 14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes. *Plant Biology*, **10**(2), 231–236. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2007.00028.x>
169. van Kleeff, P. J. M., Gao, J., Mol, S., Zwart, N., Zhang, H., Li, K. W., de Boer, A. H. (2018). The Arabidopsis GORK K⁺-channel is phosphorylated by calcium-dependent protein kinase 21 (CPK21), which in turn is activated by 14-3-3 proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, **125**, 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.013>
170. Hedrich, R. (2012). Ion Channels in Plants. *Physiological Reviews*, **92**(4), 1777–1811. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2011>
171. Jaspert, N., Thom, C., Oecking, C. (2011). Arabidopsis 14-3-3 proteins: Fascinating and less fascinating aspects. *Frontiers in Plant Science*, **2**(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00096>
172. Prado, K., Cotellet, V., Li, G., Bellati, J., Tang, N., Tournaire-Roux, C., ... Maurela, C. (2019). Oscillating aquaporin phosphorylation and 14-3-3 proteins mediate the circadian regulation of leaf hydraulics. *Plant Cell*, **31**(2), 417–429. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00804>
173. Prado, K., Boursiac, Y., Tournaire-Roux, C., Monneuse, J.-M., Postaire, O., Da Ines, O., ... Maurel, C. (2013). Regulation of Arabidopsis Leaf Hydraulics Involves Light-Dependent Phosphorylation of Aquaporins in Veins. *The Plant Cell*, **25**(3), 1029–1039. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108456>

174. Voelker, C., Gomez-Porrás, J. L., Becker, D., Hamamoto, S., Uozumi, N., Gambale, F., ... Dreyer, I. (2010). Roles of tandem-pore K⁺ channels in plants – a puzzle still to be solved*. *Plant Biology*, **12**(s1), 56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00353.x>
175. Latz, A., Becker, D., Hekman, M., Müller, T., Beyhl, D., Marten, I., ... Hedrich, R. (2007). TPK1, a Ca²⁺-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K⁺ channel is activated by 14-3-3 proteins. *The Plant Journal*, **52**(3), 449–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03255.x>
176. Sinnige, M. P., ten Hoopen, P., van den Wijngaard, P. W. J., Roobeek, I., Schoonheim, P. J., Mol, J. N. M., de Boer, A. H. (2005). The barley two-pore K⁺-channel HvKCO1 interacts with 14-3-3 proteins in an isoform specific manner. *Plant Science*, **169**(3), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.013>
177. Latz, A., Mehlmer, N., Zapf, S., Mueller, T. D., Wurzing, B., Pfister, B., ... Becker, D. (2013). Salt Stress Triggers Phosphorylation of the Arabidopsis Vacuolar K⁺ Channel TPK1 by Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs). *Molecular Plant*, **6**(4), 1274–1289. <https://doi.org/10.1093/mp/sss158>
178. van den Wijngaard, P. W. J., Bunney, T. D., Roobeek, I., Schönknecht, G., de Boer, A. H. (2001). Slow vacuolar channels from barley mesophyll cells are regulated by 14-3-3 proteins. *FEBS Letters*, **488**(1–2), 100–104. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02394-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02394-2)
179. Klychnikov, O., Li, K., Lill, H., de Boer, A. (2007). The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins. *Journal of Experimental Botany*, **58**(5), 1013–1023. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl261>
180. Cosse, M., Seidel, T. (2021). Plant Proton Pumps and Cytosolic pH-Homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, **12**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.672873>
181. Seidel, T. (2022). The Plant V-ATPase. *Frontiers in Plant Science*, **13**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.931777>
182. Taoka, K., Kawahara, I., Shinya, S., Harada, K., Yamashita, E., Shimatani, Z., ... Kojima, C. (2022). Multifunctional chemical inhibitors of the florigen activation complex discovered by structure-based high-throughput screening. *The Plant Journal*, **112**(6), 1337–1349. <https://doi.org/10.1111/tbj.16008>
183. Harada, K., Furuuta, K., Yamashita, E., Taoka, K., Ichiro, Tsuji, H., Fujiwara, T., ... Kojima, C. (2022). Crystal structure of potato 14-3-3 protein St14f revealed the importance of helix I in StFDL1 recognition. *Scientific Reports*, **12**(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15505-y>
184. Mishra, N. S., Tuteja, R., Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **452**(1), 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.05.001>
185. Oh, C.-S., Pedley, K. F., Martin, G. B. (2010). Tomato 14-3-3 Protein 7 Positively Regulates Immunity-Associated Programmed Cell Death by Enhancing Protein Abundance and Signaling Ability of MAPKKK α . *The Plant Cell*, **22**(1), 260–272. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070664>
186. Gao, Z., Zhang, D., Wang, X., Zhang, X., Wen, Z., Zhang, Q., ... Zhang, Y. (2022). Coat proteins of necroviruses target 14-3-3a to subvert MAPKKK α -mediated antiviral immunity in plants. *Nature Communications*, **13**(1), 716. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28395-5>
187. Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S., Kim, J., Mudgett, M. B., Sessa, G. (2014). Xanthomonas euvesicatoria type III effector XopQ interacts with tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity. *The Plant Journal*, **77**(2), 297–309. <https://doi.org/10.1111/tbj.12391>
188. Deb, S., Ghosh, P., Patel, H. K., Sonti, R. V. (2020). Interaction of the Xanthomonas effectors XopQ and XopX results in induction of rice immune responses. *The Plant Journal*, **104**(2), 332–350. <https://doi.org/10.1111/tbj.14924>

189. Taylor, K. W., Kim, J.-G., Su, X. B., Aakre, C. D., Roden, J. A., Adams, C. M., Mudgett, M. B. (2012). Tomato TFT1 Is Required for PAMP-Triggered Immunity and Mutations that Prevent T3S Effector XopN from Binding to TFT1 Attenuate *Xanthomonas* Virulence. *PLoS Pathogens*, **8**(6), e1002768. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002768>
190. Lozano-Durán, R., Bourdais, G., He, S. Y., Robatzek, S. (2014). The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist*, **202**(1), 259–269. <https://doi.org/10.1111/nph.12651>
191. Giska, F., Lichočka, M., Piechocki, M., Dadlez, M., Schmelzer, E., Hennig, J., Krzymowska, M. (2013). Phosphorylation of HopQ1, a Type III Effector from *Pseudomonas syringae*, Creates a Binding Site for Host 14-3-3 Proteins. *Plant Physiology*, **161**(4), 2049–2061. <https://doi.org/10.1104/pp.112.209023>
192. Evangelisti, E., Guyon, A., Shenhav, L., Schornack, S. (2023). FIRE mimics a 14-3-3-binding motif to promote *Phytophthora palmivora* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 1–44. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-22-0251-r>
193. Sheikh, A. H., Zacharia, I., Tabassum, N., Hirt, H., Ntoukakis, V. (2024). 14-3-3 proteins as a major hub for plant immunity. *Trends in Plant Science*, S1360138524001456. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.06.001>
194. Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., Li, X. (2013). The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Molecular Plant*, **6**(2), 275–286. <https://doi.org/10.1093/mp/sst017>
195. Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(12), 8436–8441. <https://doi.org/10.1073/pnas.122224699>
196. Christie, J. M. (2007). Phototropin Blue-Light Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, **58**(1), 21–45. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951>
197. Fankhauser, C., Christie, J. M. (2015). Plant Phototropic Growth. *Current Biology*, **25**(9), R384–R389. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.020>
198. Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., Sullivan, S. (2015). Plant Flavoprotein Photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, **56**(3), 401–413. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu196>
199. Sullivan, S., Thomson, C. E., Kaiserli, E., Christie, J. M. (2009). Interaction specificity of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases. *FEBS Letters*, **583**(13), 2187–2193. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.011>
200. Tseng, T.-S., Whippo, C., Hangarter, R. P., Briggs, W. R. (2012). The Role of a 14-3-3 Protein in Stomatal Opening Mediated by PHOT2 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **24**(3), 1114–1126. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092130>
201. Christians, M. J., Gingerich, D. J., Hansen, M., Binder, B. M., Kieber, J. J., Vierstra, R. D. (2009). The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by controlling type-2 ACC synthase levels. *The Plant Journal*, **57**(2), 332–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03693.x>
202. Catalá, R., López-Cobollo, R., Mar Castellano, M., Angosto, T., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Salinas, J. (2014). The *Arabidopsis* 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation. *Plant Cell*, **26**(8), 3326–3342. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127605>
203. Mora-García, S., Vert, G., Yin, Y., Caño-Delgado, A., Cheong, H., Chory, J. (2004). Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Development*, **18**(4), 448–460. <https://doi.org/10.1101/gad.1174204>
204. del Viso, F., Casaretto, J. A., Quatrano, R. S. (2007). 14-3-3 Proteins are components of the transcription complex of the ATEM1 promoter in *Arabidopsis*. *Planta*, **227**(1), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0604-1>

205. Kawamoto, N., Sasabe, M., Endo, M., Machida, Y., Araki, T. (2015). Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Scientific Reports*, **5**(1), 8341. <https://doi.org/10.1038/srep08341>
206. Guo, D., Yang, Z.-P., Li, H.-L., Wang, Y., Zhu, J.-H., Peng, S.-Q. (2018). The 14-3-3 protein HbGF14a interacts with a RING zinc finger protein to regulate expression of the rubber transferase gene in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Experimental Botany*, **69**(8), 1903–1912. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery049>
207. Yang, Z.-P., Li, H.-L., Guo, D., Tian, W.-M., Peng, S.-Q. (2012). Molecular characterization of a novel 14-3-3 protein gene (Hb14-3-3c) from *Hevea brasiliensis*. *Molecular Biology Reports*, **39**(4), 4491–4497. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1239-7>
208. Yang, Z.-P., Li, H.-L., Guo, D., Tang, X., Peng, S.-Q. (2014). Identification and characterization of the 14-3-3 gene family in *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **80**, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.034>
209. Sedlov, I. A., Sluchanko, N. N. (2024). Multi-dimensional demarcation of phylogenetic groups of plant 14-3-3 isoforms using biochemical signatures. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.07.02.601760>
210. Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., ... Baginsky, S. (2009). Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiology*, **150**(2), 889–903. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138677>
211. Denison, F. C., Paul, A. L., Zupanska, A. K., Ferl, R. J. (2011). 14-3-3 Proteins in Plant Physiology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **22**(7), 720–727. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2011.08.006>
212. Comparot, S., Lingiah, G., Martin, T. (2003). Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **54**(382), 595–604. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg057>
213. Yang, X., Wang, W., Coleman, M., Orgil, U., Feng, J., Ma, X., ... Xiao, S. (2009). Arabidopsis 14-3-3 lambda is a positive regulator of RPW8-mediated disease resistance. *The Plant Journal*, **60**(3), 539–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03978.x>
214. Schoonheim, P. J., Veiga, H., da Costa Pereira, D., Friso, G., van Wijk, K. J., de Boer, A. H. (2007). A Comprehensive Analysis of the 14-3-3 Interactome in Barley Leaves Using a Complementary Proteomics and Two-Hybrid Approach. *Plant Physiology*, **143**(2), 670–683. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090159>
215. Kim, J., Lee, H., Lee, H. G., Seo, P. J. (2021). Get closer and make hotspots: liquid–liquid phase separation in plants. *EMBO reports*, **22**(5), e51656. <https://doi.org/10.15252/embr.202051656>
216. Wilson, R. S., Swatek, K. N., Thelen, J. J. (2016). Regulation of the Regulators: Post-Translational Modifications, Subcellular, and Spatiotemporal Distribution of Plant 14-3-3 Proteins. *Frontiers in Plant Science*, **7**(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00611>
217. Bunney, T. D., Van Walraven, H. S., De Boer, A. H. (2001). 14-3-3 Protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(7), 4249–4254. <https://doi.org/10.1073/pnas.061437498>