

Spectra of genetic polymorphisms of the general groups of 1 and 2 classes of mobile genetic elements at North American endemic *Boecheera* accessions were investigated by transposon display technique. For the first time the potential markers on the basis Cin4a and Isaak associated with apomixis at *Boecheera* accessions from the German and Netherlands collections simultaneously were found out.

**КАРПОВ П.А.<sup>1</sup>, ЕМЕЦ А.И.<sup>1</sup>, МАТУСОВ В.Г.<sup>1</sup>, НЫПОРКО А.Ю.<sup>1</sup>,  
НАДЕЖДИНА Е.С.<sup>2,3</sup>, БЛЮМ Я.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт белка РАН, Москва

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

### **БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ STE20-ПОДОБНЫХ СЕРИН/ТРЕОНИН ПРОТЕИНКИНАЗ**

Серин-треониновые протеинкиназы дрожжей STE20 и их животные гомологи SLK (STE20-подобные серин/треонин-протеинкиназы) отвечают за регуляцию полярности клеток на различных стадиях клеточного цикла [1-3]. Показано, что в клетках дрожжей протеинкиназа STE20 активирует MAPKKK каскады [4], регулирует рост и обратную связь в условиях дефицита глюкозы [5], участвует в осмосенсорных Sho1-сигнальных путях [6], феромон-зависимой передаче сигналов [7], прямой регуляции апоптоза [8], фосфорилировании белков [9], регуляции роста псевдогифов [10], регуляции выхода из митоза [11], передаче сигналов во время роста мицелия [12], детерминации сайтов почкования клетки [13]. В клетках млекопитающих протеинкиназа SLK (LOSK) ассоциирована с микротрубочками и центросомами, а ее ингибирование приводит к дезориентации и беспорядочному расположению микротрубочек. Таким образом, LOSK обеспечивает радиальное расположение микротрубочек и необходима для правильной локализации аппарата Гольджи в различных типах клеток [14]. На основании аналогии с *Xenopus laevis* [15] предполагается, что SLK (гомолог xPlk1 *X. laevis*) может регулировать активность Plk1 (гомолога Plx1 *X. laevis*) [14, 16]. Считается, что SLK фосфорилируется протеинкиназами ATM или ATR, которые принимают участие в опосредовании клеточного ответа на повреждения ДНК [17]. Предполагаемая связь протеинкиназы SLK с процессом репарации ДНК подтверждается ее способностью индуцировать апоптоз путем непосредственного фосфорилирования и активации протеинкиназы-1, регулирующей апоптотические сигналы (ASK-1), с последующей активацией p38 митоген-активированной протеинкиназы, участвующей в MKK4/MKK7-JNK и MKK3/MKK6-p38 каскадах, контролирующей цитокинез и ответ на стресс [18]. Вероятно, этим свойством объясняется роль протеинкиназы SLK в регуляции клеточного деления, в частности, в контроле микротрубочек в интерфазе [14].

Для протеинкиназ SLK животных характерно наличие каталитического домена (порядка 250-260 аминокислотных остатков) в N-концевой области молекулы [19]. В свою очередь, каталитический домен (порядка 248-252 аминокислотных остатков) STE20 дрожжей расположен в C-концевой области молекулы [20]. Несмотря на различную локализацию, киназные домены STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей имеет высокую степень сходства аминокислотных последовательностей. В свое время это явилось основой для биоинформационного предсказания SLK киназ у животных на основании их гомологии STE20 дрожжей [21].

В настоящее время информация о растительных гомологах STE20-подобных протеинкиназ практически отсутствует. Единственным потенциальным растительным гомологом является протеинкиназа SIK1 из *Arabidopsis thaliana* [21, GenBank:

GI:2352083]. Таким образом, целью нашего исследования являлся поиск растительных гомологов STE20-подобных протеинкиназ на основании данных биоинформационного сканирования баз данных с применением в качестве поисковых векторов аннотированных последовательностей каталитических доменов протеинкиназа SLK животных и STE20 дрожжей.

**Материалы и методы** Эталонные последовательности STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей были взяты из базы данных Swiss-Prot ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) [23]. Поиск растительных гомологов производили путем BLASTp-сканирования базы данных UniProt (Swiss-Prot и TrEMBL) [23] против последовательностей каталитических доменов протеинкиназ SLK\_HUMAN человека и STE20\_YEAST из *Saccharomyces cerevisiae*. BLASTp-сканирование (SIB BLAST Network Service) выполняли при следующих параметрах: весовая матрица – BLOSUM62, порог E (число ожидаемых совпадений в случайной выборке) = 10 с подключением фильтров: «Filter the sequence for low-complexity regions» и «Gapped alignment») ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) [24]. Отбор растительных гомологов осуществляли на основании таких показателей, как процент идентичности последовательностей, процент их сходства и случайная ожидаемость этих результатов (E-value) [25].

Доменную архитектуру белков анализировали с применением сетевого инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [26], а также на основании информации, представленной в базе данных UniProt. Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal X (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) с применением серии матриц BLOSSUM [27].

Филогенетический анализ выполняли на основании результатов множественных выравниваний последовательностей протеинкиназных доменов [28, 29] с применением метода UPGMA [30]. Границы протеинкиназного домена определяли на основании моделей SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Визуализация и анализ дендрограмм осуществляли с помощью программ TreeView X Ver.5 [31] и MEGA4 [32].

**Результаты и обсуждение.** В результате BLASTp-сканирования UniProt против последовательности каталитического домена SLK\_HUMAN были обнаружены растительные гомологи STE20-подобной протеинкиназы человека. Согласно данным BLASTp-сканирования UniProt, идентичность консенсусных областей достигала 45-46% при 65-66%-ном сходстве (Табл.), и, как показали результаты анализа в SMART, обнаруженные последовательности во всех случаях соответствовали каталитическим доменам серин-треониновых протеинкиназ. Все обнаруженные растительные гомологи STE20-подобных протеинкиназ депонированы в базе данных TrEMBL и обозначены как белки с неизвестной функцией. Исключение составляет только продукт O24527 из *A. thaliana*, представленный как предполагаемый STE20-гомолог - SLK1. Также было выполнено аналогичное сканирование базы данных UniProt с использованием в качестве поискового вектора последовательности каталитического домена STE20-протеинкиназы из *S. cerevisiae* (STE20\_YEAST), являвшейся в свое время исходной последовательностью при поиске животных гомологов [33]. В результате была подтверждена гомология найденных растительных последовательностей STE20-подобным протеинкиназам. При этом идентичность консенсусных областей последовательности протеинкиназы STE20\_YEAST составляла 38-40% при 58%-ном сходстве (Табл.).

После исключения дублирующихся статей базы данных на основании сопоставления координат соответствующих генов было выделено 9 растительных гомологов STE20-подобных протеинкиназ (Табл.), принадлежащих *Arabidopsis thaliana* (Q9LQA1, O24527), *Hordeum vulgare* var. *distichum* (Q9ARL7), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (Q10CN6), *Oryza sativa* subsp. *indica* (B8AK85), *Physcomitrella patens* subsp. *patens* (A9RVK0), *Solanum chacoense* (B3GK00), *Sorghum bicolor* (Q8LKU7) и *Vitis vinifera* (A7P2E2).

Таблица – Растительные гомологи STE20-подобных серин-треониновых протеинкиназ, выделенные на основании результатов SIB-BLAST сканирования базы данных UniProt против каталитических доменов SLK из *Homo sapiens* и STE20 из *Saccharomyces cerevisiae*

Номер UniProt	Вид	Протяженность консенсуса			Математическое ожидание			Идентичность (%)			Сходство (%)			Гены (%)		
		SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST
A9RVK0	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens	243	187	6e-47	46	39	65	58	2	2	1					
A7P2E2	<i>Vitis vinifera</i>	243	189	1e-62	46	40	65	58	2	2	1					
Q9LQA1 (F4N2.1.17)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	242	190	2e-62	46	40	66	58	2	2	1					
O24527 (SIK1)	-/-	242	190	2e-62	46	40	66	58	2	2	1					
Q10CN6	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	241	188	4e-62	45	39	65	58	2	2	1					
B8AK85	<i>Oryza sativa</i> subsp. indica	241	188	4e-62	45	39	65	58	2	2	1					
Q8LKU7 (170F8.3)	<i>Sorghum bicolor</i>	241	187	5e-62	45	38	65	58	2	2	1					
Q9ARL7	<i>Hordeum vulgare</i> var. distichum	239	184	1e-61	45	38	65	58	2	2	1					
B3GK00	<i>Solanum chacoense</i>	238	187	3e-61	45	40	66	58	2	2	1					

Примечание: SLK\_HUMAN - STE20-подобная протеинкиназа из *Homo sapiens*; STE20\_YEAST - протеинкиназа STE20 из *Saccharomyces cerevisiae*



Рис. 1 – Выравнивание последовательностей каталитических доменов STE20 протеинкиназ дрожжей, SLK протеинкиназ животных и их потенциальных растительных гомологов.

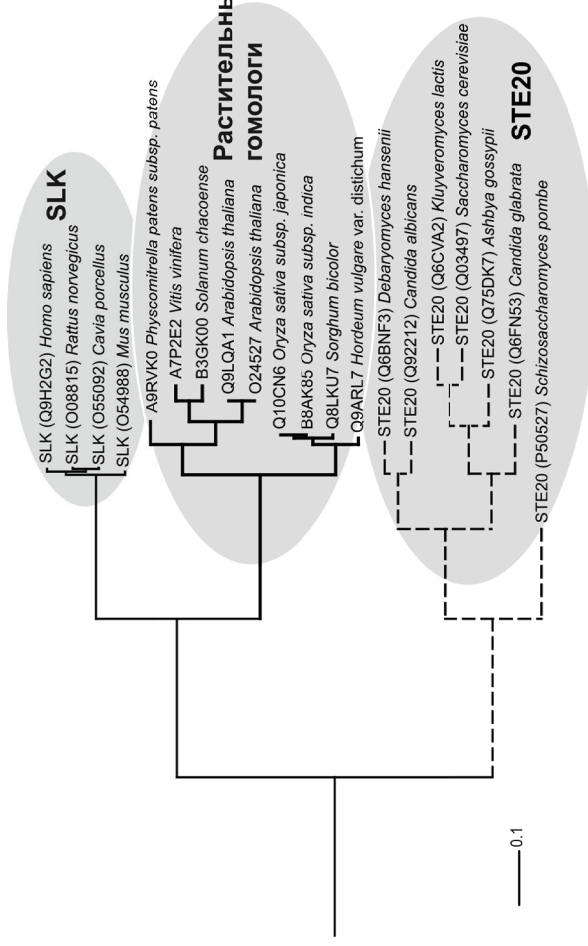


Рис.2 – Результаты филогенетического анализа близости животных, дрожжевых и растительных STE20-подобных киназ на основании сходства аминокислотных последовательностей их каталитических доменов.

Примечание: кладиственный анализ выполнен с применением алгоритма UPGMA

Для определения положения группы найденных растительных протеинкиназ относительно групп STE20-подобных протеинкиназ животных и STE20-протеинкиназ дрожжей, было выполнено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей их каталитических доменов и последовательностей каталитических доменов экспериментально проверенных животных (SLK) и дрожжевых (STE20) протеинкиназ (Рис.1) и построено филогенетическое UPGMA древо (Рис.2). Полученные результаты подтверждают высокую степень консервативности найденных растительных доменов на уровне аминокислотных последовательностей каталитических доменов (идентичность = 87-100%; сходство = 95-100%). При этом выявленная группа растительных STE20-подобных протеинкиназ оказалась довольно близкой как животным SLK протеинкиназам (идентичность = 44-46%; сходство = 64-65%), так и STE20-протеинкиназам дрожжей (идентичность = 38-43%; сходство = 54-62%). Однако при этом наблюдается образование общей клады с животными SLK, что свидетельствует в пользу большего сходства животных SLK и потенциальных растительных гомологов, а также и об их большей эволюционной близости. При этом согласно данным кладиственного анализа и данным дистанции парных выравниваний, ближайшими гомологами STE20-подобных протеинкиназ представителей царства животных и царства растений являются протеинкиназа животного происхождения SLK\_MOUSE из *Mus musculus* и растительные протеинкиназы A9RVK0 из мха *P. patens* subsp. *patens* (идентичность = 45%; сходство = 65%) и A7P2E2 из *V. vinifera* (идентичность=46%; сходство=65%).

**Выводы.** На основании гомологии последовательностей каталитических доменов обнаружено 9 растительных гомологов STE20-подобных серин-треониновых киназ. Показано, что ближайшими растительными гомологами STE20-подобных серин-треониновых протеинкиназ являются A9RVK0 из мха *Physcomitrella patens* subsp. *patens* и A7P2E2 из винограда *Vitis vinifera*.

Данная работа была выполнена в рамках проекта 08-04-90454: «Сравнительный анализ киномов микротрубочек животных и высших растений» (Совместный конкурс НАН Украины — РФФИ 2008-2009 г.).

#### Литература

1. Nichols C.B., Fraser J.A., Heitman J. PAK kinases Ste20 and Pak1 govern cell polarity at different stages of mating in *Cryptococcus neoformans* // Mol. Biol. Cell. – 2004. – Vol.15. – P. 4476–4489.
2. Yamada E., Tsujikawa K., Itoh S., Kameda Y., Kohama Y., Yamamoto H. Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. – Vol.1495, №3. – P.250-262.
3. Pytowski B., Hicklin D.J., Kornhaber G., Dellaratta D.V., Witte L. Identification and initial characterization of mSLK, a murine member of the STE20 family of kinases // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – Vol.359, №2. –P.310-319.
4. Wu C., Whiteway M., Thomas D.Y., Leberer E. Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol.270, №27. – P.15984-15992.
5. Froquet R., Cherix N., Birke R., Benghezal M., Cameroni E., Letourneur F., Mösch H.U., De Virgilio C., Cosson P. Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and *Dictyostelium* // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol.283. №11. – P.6764-6772.
6. Tatebayashi K., Tanaka K., Yang H.Y., Yamamoto K., Matsushita Y., Tomida T., Imai M., Saito H. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway // EMBO J. – 2007. –V.26. №15. – P.3521-3533.

7. Moskow J.J., Gladfelter A.S., Lamson R.E., Pryciak P.M., Lew D.J. Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell Biol. – 2000. – Vol.20, №20. – P.7559-7571.
8. Ahn S.H., Cheung W.L., Hsu J.Y., Diaz R.L., Smith M.M., Allis C.D. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae* // Cell. – 2005. – Vol.120, №1. – P.25-36.
9. Nespoli A., Vercillo R., di Nola L., Diani L., Giannattasio M., Plevani P., Muzi-Falconi M. Alk1 and Alk2 are two new cell cycle-regulated haspin-like proteins in budding yeast // Cell Cycle. – 2006. – Vol. 5, №13. – P.1464-1471.
10. Pan X., Heitman J. Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion // Mol. Cell Biol. – 2000. – Vol.20, №22. – P.8364-8372.
11. Sullivan M., Uhlmann F. A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit // Nat. Cell Biol. – 2003. – Vol. 5, №3. – P.249-254.
12. Cullen P.J., Sabbagh W.Jr., Graham E., Irick M.M., van Olden E.K., Neal C., Delrow J., Bardwell L., Sprague G.F.Jr. A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast // Genes Dev. – 2004. – Vol.18, №14. – P.1695-1708.
13. Ni L., Snyder M. A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Biol. Cell. – 2001. – Vol.12, №7. – P.2147-2170.
14. Burakov A.V., Zhapparova O.N., Kovalenko O.V., Zinovkina L.A., Potekhina E.S., Shanina N.A., Weiss D.G., Kuznetsov S.A., Nadezhdina E.S. Ste20-related Protein Kinase LOSK (SLK) controls microtubule radial array in interphase // MBC Online. - 2008. - Vol. 19, №5. – P.1952-1961.
15. Qian Y.W., Erikson E., Maller J.L. Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1 // Science. – 1998. – 282. - P.1701-1704.
16. Ellinger-Ziegelbauer H., Karasuyama H., Yamada E., Tsujikawa K., Todokoro K., Nishida E. Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells // Genes Cells. – 2000. – Vol.5, №6. – P.491-498.
17. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R. 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage // Science. – 2007. – Vol.316, №5828. – P.1160-1166.
18. Hao W., Takano T., Guillemette J., Papillon J., Ren G., Cybulsky A.V. Induction of apoptosis by the Ste20-like kinase SLK, a germinal center kinase that activates apoptosis signal-regulating kinase and p38 // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol.281, №6. – P.3075-3084.
19. Sabourin L.A., Rudnicki M.A. Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase // Oncogene. – 1999. - Vol.18, №52. – P.7566-7575.
20. Cvrčková F., C. De Virgilio, E. Manser, Pringle J.R., Nasmyth K. Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast // Genes Dev. – 1995. – Vol.9. – P.1817-1830.
21. Lee K.-K., Yonehara S. Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST) // J. Biol. Chem. – 2002. - Vol.277, №14. - P.12351–12358.
22. Winge P., Brembu T., Bones A.M. Cloning of a *Arabidopsis thaliana* serine/threonine kinase with homology to yeast STE20 and mammalian stress activated kinases // Submitted (APR-1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases: GI:2352083. - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2352083>.

23. *The UniProt Consortium*. The Universal Protein Resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. - 2008. – Vol.36. – D190-D195. [doi:10.1093/nar/gkm895].
24. *Korf I., Yandell M., Bedell J.* BLAST. O'Reilly & Associates, Sebastopol, 2003. – 368p.
25. *Claverie J.-M., Notredame C.* Bioinformatics for dummies. 2nd Ed. Wiley Publ., New York, 2007. – 436 p.
26. *Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P.* SMART 5: domains in the context of genomes and networks // Nuc. Acids Res. – 2006. – Vol.34. - D257-D260. [doi:10.1093/nar/gkj104].
27. *Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G.* Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. – 2007. – Vol.23. – P. 2947-2948.
28. *Chunhua Z., Brankle S., Mallery E., Szymanski D.B.* Composition and function of the *Arabidopsis* WAVE complex during epidermal morphogenesis. In: 17th Int. Conference on *Arabidopsis* Research. June 28 – July 2, 2006. Abstracts. – 2006. - #131.
29. *Hanks S.K., Quinn A.M.* Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members // Methods Enzymol. – 1991. – Vol.200. – P. 38-62.
30. *Nei M., Kumar S.* Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. - 2000. – 333 p.
31. *Page R.D.M.* TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // Comp. Appl. in the Biosciences. - 1996. – Vol.12. – P. 357-358.
32. *Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K.* MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // Brief. in Bioinform. – 2008. – Vol. 9. – P. 299-306.
33. *Dan I., Watanabe N.M., Kusumi A.* The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades // Trends Cell Biol. – 2001. – Vol.11, №5. - P.220-230.

#### **Резюме**

Обнаружено 9 растительных гомологов STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей. На основании сходства последовательностей каталитических доменов показано, что ближайшими растительными гомологами STE20-подобных протеинкиназ являются A9RVK0 из *Physcomitrella patens* subsp. *patens* и A7P2E2 из *Vitis vinifera*.

Знайдено 9 рослинних гомологів STE20-подібних протеїнкіназ тварин і дріжджів. На підставі подібності послідовностей каталітичних доменів встановлено, що найближчими рослинними гомологами STE20-подібних протеїнкіназ є A9RVK0 із *Physcomitrella patens* subsp. *patens* і A7P2E2 із *Vitis vinifera*.

It was identified 9 plant homologs of the animal and yeast Ste20-like protein kinases. It is shown, on the basis of similarity of sequences of catalytic domains, that nearest plant homologs of Ste20-like protein kinases are the A9RVK0 from *Physcomitrella patens* subsp. *patens* and A7P2E2 from *Vitis vinifera*.

#### **КОЖУХОВА Н.Э.**

*Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН*

*Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дорога, 3, e-mail: [natavolk@rambler.ru](mailto:natavolk@rambler.ru)*

### **СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУКУРУЗЫ**