

П.А. КАРПОВ¹, Е.С. НАДЕЖДИНА^{2,3},
А.И. ЕМЕЦ¹, В.Г. МАТУСОВ¹, А.Ю. НЫПОРКО¹,
Н.Ю. ШАШИНА³, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

² Институт белка РАН, Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОСФОРИЛОВАНИИ БЕЛКОВ МИКРОТРУБОЧЕК И РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК



Выполнен биоинформационный поиск растительных гомологов протеинкиназ *SLK*, *PAK6*, *PAK7*, *MARK1*, *MAST2*, *TTBK1*, *TTBK2*, *AURKA*, *PLK1*, *PLK2* и *PASK* человека (*Homo sapiens*), участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток. Показано наличие у растений гомологов протеинкиназ *SLK*, *MAST2* и *AURKA*. Определено, что ближайшим гомологом протеинкиназы *AURKA* человека является белок с неизвестной функцией *A7PY12_VITVI* (*STALK* – *Serine-Threonine Aurora-Like Kinase*) из винограда (*Vitis vinifera*). Выполнены реконструкция и анализ пространственной структуры белка *STALK*, подтвердившие его принадлежность к группе *AURKA*-подобных протеинкиназ.

© П.А. КАРПОВ, Е.С. НАДЕЖДИНА, А.И. ЕМЕЦ,
В.Г. МАТУСОВ, А.Ю. НЫПОРКО, Н.Ю. ШАШИНА,
Я.Б. БЛЮМ, 2009

Введение. Микротрубочки являются обязательным и универсальным структурным элементом клеток эукариот [1–3]. Упомянутая динамическая структура отвечает за деление клеток, поддержание их формы, внутриклеточный транспорт, позиционирование органелл и т.п. Известно, что наиболее консервативным белком микротрубочек является гетеродимерный белок тубулин, формирующий их протофиламенты [4–6]. Его микрогетерогенность обеспечивается посредством экспрессии множественных генов и за счет посттрансляционных модификаций, наиболее изученными из которых являются фосфорилирование, ацетилирование, тирозилирование/детирозилирование, полиглутамилирование, полиглицилирование, пальмитоилирование [3]. В ряду перечисленных посттрансляционных модификаций тубулина фосфорилирование занимает особое место в силу своей широкой распространенности [7] и участия в регуляции структуры и активности порядка 30 % белков эукариот [8, 9]. Нашими усилиями было продемонстрировано, что тубулин растительных микротрубочек также подвергается интенсивному фосфорилированию при помощи различных типов серин/треонин-протеинкиназ [10], а также тирозинкиназ [11, 12].

Не вызывает сомнения, что фосфорилирование и других белков, формирующих микротрубочки растений и участвующих в делении их клеток, также опосредуется различными типами протеинкиназ, гомологи которых хорошо изучены в животных клетках [12, 13]. Некоторые из них обладают известной степенью сходства у животных и растений других белков, в частности, ассоциированные с микротрубочками белки первого типа (БАМ-1) [14]. Соответственно в таких случаях может сохраняться общность эпитопов фосфорилирования и, в силу этого, консервативность определенных типов протеинкиназ, участвующих в этих процессах.

Конечно же многие белки, входящие в состав микротрубочек, являются не только видо- и тканеспецифичными по своей природе, обеспечивая таким образом структурную и функциональную микрогетерогенность системы микротрубочек, но существенно разнятся у растений и животных [14–16]. Следовательно набор протеинкиназ (кином), участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек, также должен различаться у животных и рас-

тений. Тем не менее, несмотря на изученность белков микротрубочек животной клетки, состав белков микротрубочек растений, в том числе и связанных с ними протеинкиназ, изучен не столь глубоко. Это обуславливает необходимость поиска генов растительных протеинкиназ и их продуктов на основании гомологии протеинкиназам животных и человека.

Для всех протеинкиназ характерно наличие консервативных каталитических (протеинкиназных) доменов (250–300 аминокислотных остатков), которые в свою очередь содержат уникальные субдоменные мотивы, позволяющие идентифицировать их на уровне подсемейств серин/треонин-, тирозин- и дуальных протеинкиназ [17, 18].

Это обстоятельство позволяет осуществлять поиск и идентификацию протеинкиназ на основании сканирования баз данных с применением алгоритмов семейства BLAST [19]. Каталитический домен является главным отличительным структурно-функциональным элементом, позволяющим находить новые протеинкиназы с применением методов *in silico*. Гомология этих доменов уже позволила идентифицировать протеинкиназы ряда многоклеточных организмов [20–25].

Стараниями ряда проектов секвенированы и частично расшифрованы полные последовательности ряда геномов эукариот. В частности, кроме геномных проектов растений, представленных в банке данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj>), можно также отметить проект Genoscope (<http://www.genoscope.cns.fr>), предоставляющий информацию и возможность анализа *in silico* последовательностей таких растений, как *Arabidopsis thaliana*, *Ectocarpus siliculosus*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Alnus glutinosa*, *Aphanomyces euteiches*, *Casuarina glauca*, *Citrus clementina*, *Eucalyptus*, *Juglans regia*, *Phaseolus vulgaris*, *Pinus pinaster*, *Populus trichocarpa* × *deltoides*, *Quercus*, *Saccharum* ssp., *Theobroma cacao*, *Triticum* sp., *Vitis vinifera*. Доступность такой информации позволяет развивать исследования по расшифровке геномов растений, где последовательности изученных ранее протеинкиназ животных и человека могут быть использованы в качестве инструмента для поиска и анализа растительных гомологов.

Целью настоящей работы является биоинформационный поиск растительных гомологов протеинкиназ человека – представителей различных групп/семейств [26], которые могут принимать участие в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток. К упомянутым классам протеинкиназ относятся группы AGC (содержащие протеинкиназы A, G и C), CAMK (кальций/кальмодулин-зависимые), CK1 (казеинкиназы) и STE (гомологи дрожжевых Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 протеинкиназ). Исходя из этого, для реконструкции кинома микротрубочек растений мы использовали последовательности следующих протеинкиназ человека (*Homo sapiens*): SLK, PAK6 и PAK7, относящихся к группе STE; MARK1 и PASK, относящихся к CAMK; MAST2 и AURKA, относящихся к AGC; ТТБК1 и ТТБК2, относящихся к CK1, а также протеинкиназ Plk1 и Plk2, не принадлежащих к какой-либо группе протеинкиназ человека [26].

Материалы и методы. Эталонные последовательности протеинкиназ человека, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек – SLK, PAK7, PAK6, MARK1, MAST2, ТТБК1, ТТБК2, AURKA, PLK1, PLK4, PASK, взяты из базы данных Swiss-Prot (www.expasy.org) [27] на основании анализа информации, представленной в Swiss-Prot и NCBI (GenBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) [28] и соответствующих публикациях [26, 29–31, 33–42, 44–47]. В дальнейшем они были использованы для поиска растительных гомологов в базах данных UniProt (Swiss-Prot и TrEMBL) [27]. Поиск осуществляли с применением инструмента BLASTp (SIB BLAST Network Service) согласно следующим параметрам: таксономическая группа – Viridiplantae; весовая матрица – BLOSUM62 и E threshold=10 (количество случайных выравниваний анализируемой последовательности) с подключением «Filter the sequence for low-complexity regions» и «Gapped alignment» (www.expasy.org) [19].

Доменную архитектуру найденных гомологов анализировали с применением сетевых инструментов SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [48], Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) [49], Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite/>) [50], а также данных, представленных в базе

данных Swiss-Prot. Принадлежность к соответствующему семейству той или иной протеинкиназы подтверждали на основании результатов анонимного сканирования аминокислотных последовательностей растительных гомологов (RAW-формат) с применением веб-приложения SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) с подключением всех аналитических модулей. С этой целью учитывали результаты парных выравниваний последовательностей соответствующей протеинкиназы и ее предполагаемого гомолога, а также анализа их доменного состава и архитектуры (такие результаты сканирования в веб-приложении SMART – <http://smart.embl-heidelberg.de/> как соответствие моделям Маркова и структуре соответствующих доменов, гомология с модельными последовательностями). Следовательно, отбор гомологов осуществляли с учетом таких показателей, как процент идентичности между последовательностями, процент их сходства и показатель случайной ожидаемости последовательностей (E-value) [51]. Множественные выравнивания анализируемых аминокислотных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal X (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) с применением серии матриц BLOSSUM [52].

Филогенетические деревья растительных гомологов протеинкиназ MAST2 и STK6_HUMAN строили на основании результатов множественных выравниваний аминокислотных последовательностей протеинкиназных доменов [17, 18] или их полных аминокислотных последовательностей [53] с применением метода связывания ближайших соседей (Neighbor-joining, или NJ) [54, 55]. Определение границ протеинкиназного домена производили с использованием инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Визуализацию и анализ дендрограмм выполняли с помощью программ TreeView X Ver.5 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) [56] и MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) [57]. Консервативность остатков и мотивов в функционально важных положениях растительных гомологов оценивали на основании данных исходных последовательностей протеинкиназ человека (www.expasy.org).

Для реконструкции пространственной структуры STALK применяли метод гомологического

(профильного) моделирования [58]. В качестве матрицы свертки использовали пространственную структуру комплекса протеинкиназы AURORA2 с ингибитором PNA-6806260 [59], депонированную в Protein Data Bank (PDB) (код доступа 2J4Z) [60]. Оптимизацию геометрии построенной промодели осуществляли путем минимизации энергии согласно методу L-BFGS [61]. Визуализацию полученных данных производили с помощью программы DS Visualizer 2.0 (Accelrys Software Inc.). Структурные различия между STALK и AURO-RA2 оценивали на основании расчета RMSD (корень среднеквадратичного отклонения их координат) с использованием возможностей программного пакета Swiss-Pdb Viewer 4.0 [62].

Результаты исследований и их обсуждение.

На основании информации, представленной в доступных базах данных и опубликованных статьях [26, 29–47, 63, 64], были отобраны протеинкиназы человека, участвующие в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток (табл. 1). В зависимости от сложности доменной организации протеинкиназ для сканирования в SIB BLASTp использовали либо их полные аминокислотные последовательности (в случае AURKA), либо последовательности их каталитического домена (SLK, PAK7, MARK1, SLK, MAST2, TTBK1, PLK1, PLK4 и PASK), представленные на рис. 1. Результаты сканирования базы данных UniProt с помощью инструмента SIB BLAST (BLASTp) позволяют обнаружить растительные гомологи протеинкиназ человека из семейств SLK, MAST2 и AURKA.

Растительный гомолог SLK_HUMAN (Q9H2G2) из Vitis vinifera. Сканирование базы UniProt выявило всего один растительный гомолог SLK_HUMAN (Q9H2G2), оказавшийся белком с неизвестной функцией из винограда (*Vitis vinifera*) – A7P2E2_VITVI (TrEMBL) [65]. Результаты парного выравнивания консенсусной области этого белка (отчет BLASTp) показали достаточно высокое сходство последовательности его каталитического домена с эталонной (идентичность – 46 %, сходство – 65 %) (рис. 2, а и табл. 2). В структуре найденного гомолога обнаружены функционально важные участки и положения аминокислот, соответствующие каталитическому домену S_TKc, а также участки

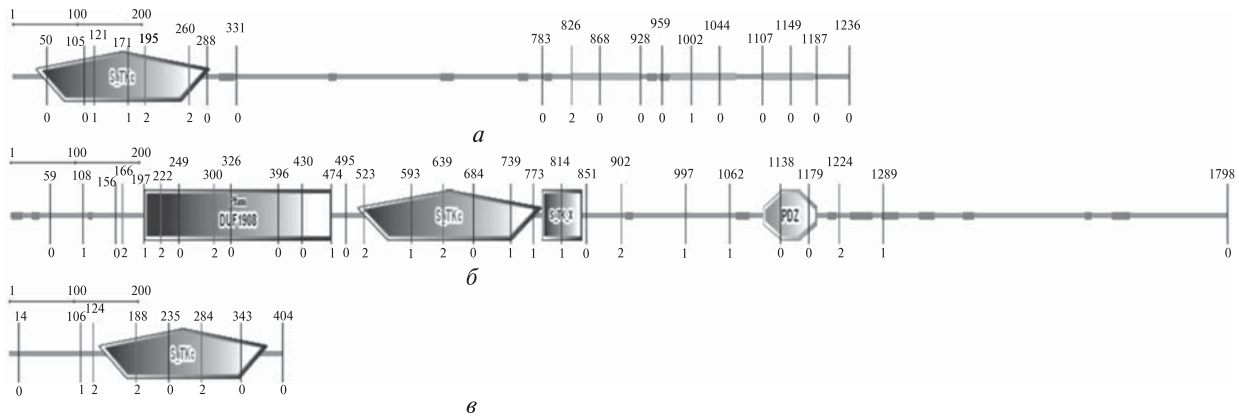


Рис. 1. Доменная архитектура протеинкиназ SLK_HUMAN (а), MAST2_HUMAN (б) и STK6_HUMAN (в): S_TKc – каталитический домен серин-треонин киназ; S_TK_X – вспомогательный S_TKc домен; DUF1908 – домен с неизвестной функцией (DUF1908); PDZ – домен, обнаруженный в PSD-95, Dlg и ZO-1/2 (синоним: DHR – область гомологии Dlg или GLGF relatively well conserved tetrapeptide in these domains)

Таблица 1
Протеинкиназы человека, участвующие в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток

Протеинкиназа	GenBank (mRNA)	Ген	Локус	UniProt
SLK (KIAA0204, LOSK, MGC133067, STK2, bA16H23.1, se20-9)	NM_014720	NC_000010.9	Chr.10; Loc.10q25.1	Q9H2G2
PAK7 (RP5-1119D9.3, KIAA1264, MGC26232, PAK5)	NM_177990	NC_000020.9	Chr.20; Loc.20p12	Q9P286
PAK6 (PAK5)	NM_020168	NC_000015.8	Chr.15; Loc.15q14	Q9NQU5
MARK1 (KIAA1477, MARK, MGC126512, MGC126513)	NM_018650	NC_000001.9	Chr.1; Loc.1q41	Q9P0L2
MAST2 (MTSSK, MAST205, FLJ39200, KIAA0807, RP4-533D7.1)	NM_015112	NC_000001.9	Chr.1; Loc.1p34.1	Q6P0Q8
TTBK1 (BDTK, KIAA1855, RP3-330M21.4)	NM_032538	NC_000006.10	Chr.6; Loc.6p21.1	Q5TCY1
TTBK2 (KIAA0847, SCA11, TTBK)	NM_173500	NC_000015.8	Chr.15; Loc.15q15.2	Q61Q55
AURKA (AIK, ARK1, AURA, AURORA2, ВТАК, MGC34538, STK15, STK6, STK7)	NM_198436	NC_000020.9	Chr.20; Loc.20q13.2-q13.3	O14965
PLK1 (PLK, STPK13)	NM_005030	NC_000016.8	Chr.16; Loc.16p12.1	P53350
LK4 (SAK, STK18)	NM_014264	NC_000004.10	Chr.4; Loc.4q28	O00444
PASK (DKFZp434O051, DKFZp686P2031, KIAA0135, PASKIN, STK37)	NM_015148	NC_000002.10	Chr.2; Loc.2q37.3	Q96RG2

максимальной гомологии для протеинкиназ SLK (согласно данным статьи UniProt для Q9H2G2 из *Homo sapiens*). Незначительные различия наблюдаются только в положениях 3 (замена Асп на Лиз), 5 (замена Ала на Сер), 6 (замена Фен на Тир) и 8 (замена Лиз на Ала) фосфат-связывающего участка (NP_BIND АТР). Согласно шкалам Фроммеля [66] и ОМН [67] все замены, кроме положения 8, где остаток неполярного гидрофобного Лиз заме-

нен на остаток гидрофильного Ала, носят сходный характер. Обнаружена была также замена остатка фосфосерина на фосфотреонин в 189-м положении. Анонимное сканирование полной последовательности A7P2E2_VITVI в SMART позволило обнаружить каталитический домен S_TKc в области с 213 по 467 аминокислотный остаток, соответствующего стандартной модели с E-value = 2.77e-99 (рис. 2, б).

A7P2E2_VITVI, 784 аминокислотных остатка, последовательность GSVIVT00030023001 из генома *Vitis vinifera* на хромосоме 1

```

Query: 29  NPEDFWELIIGE LGDGAFGK VYKAQNKETS VLA AAKVIDT-KSEEELEDYMV EIDILASCD 87
          +P  +E++ ELG G++G VYKA++ TS L A KVI + EE E+ E I++L C
Sbjct: 208  DPSTKYELLNE LGKGSYGAVYKARDIRTSELVAIKVISLCEGEEGYEEIRGE IEMLQQCS 267
          NP_BIND (ATP) BINDING ATP ↑

Query: 88  HPNIVKLLDAFYENNLWILIEFCAGGAVDAVMLELERPLTESQIQVVCKOTLDALNYLH 147
          HPN+V+ L ++ E LWI++E+C GG+V +LM E PL E QI +C++ L L+YLH
Sbjct: 268  HPNVVRYLGSYQGEYLVIMVEYCGGGSVADLMNTTEEPLEDEYQIAYICREALKGLSYLH 327

Query: 148  DNKI IHRDLKAGN I LFTLDGDIKLADFGVSAKNTRTIQRD SFIGTPY WMAPEV VMCETS 207
          +HRD+k GNIL T G++KL DFGV+A+ TRT+ +R+ +FIGTP+WMAPEV+
Sbjct: 328  SIFKVHRDLKGGN ILLTEQGEV KLGDFGVAAQLTRTMSKRNT FIGTPH WMAPEV I ----- 382
          ACT_SITE ↑ 189 ↑

Query: 208  KDRPYDYKADVWSLGITL IEMAE IEPHHELN PMRVLLKIAKSEPPPTLAQPSRWSSNFKD 267
          ++ YD K DVW+LG++ IEMAE PP ++PMRVL I+ P L +WS F D
Sbjct: 383  QESRYDGVKVDVWALGVSA IEMAE GLPPRSVAVH PMRVLFMISIEPAPMLEDKKWSLVFHD 442

Query: 268  FLKKCLEKNVDARWTTSQLLOHPFV 292
          F+ KCL K R T S++L+H F+
Sbjct: 443  FVAKCLTKEPRLRPTASEMLKHKFI 467
    
```

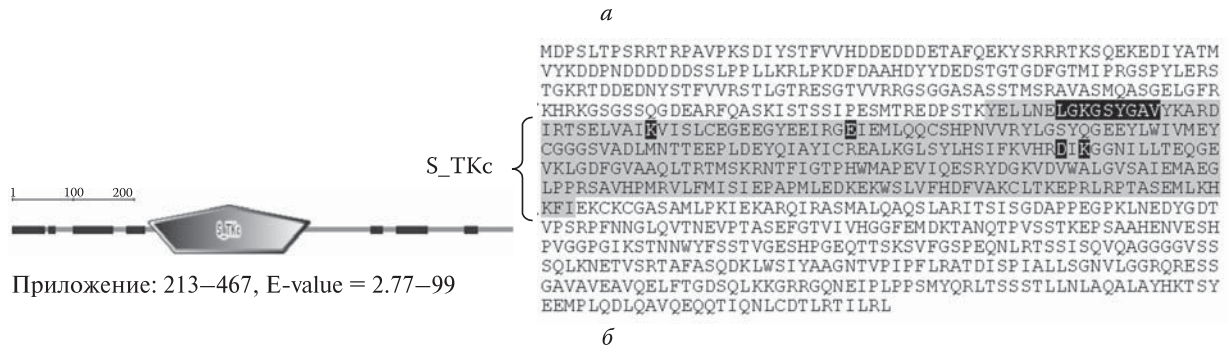


Рис. 2. Характеристика растительного гомолога SLK человека, выделенного из *Vitis vinifera* – A7P2E2_VITVI: а – консенсусная область; б – анализ доменной организации A7P2E2_VITVI; S_TKc – каталитический (киназный) домен; NP_BIND (ATP) – область связывания нуклеотидфосфата; Binding site (ATP) – сайт связывания с АТФ; ACT_SITE – акцептор протонов. FIGTP, WMAPEV, IEMAE, PMRVL – мотивы, консервативные для SLK человека и A7P2E2_VITVI винограда

Растительные гомологи MAST2_HUMAN (Q6P0Q8). Как и в случае биоинформационного скрининга гомологов SLK, сканирование базы данных UniProt на наличие потенциальных растительных гомологов протеинкиназы MAST2_HUMAN было выполнено с использованием аминокислотной последовательности каталитического домена S_TKc, границы которого определены на основании соответствия модели SMART [48].

В результате сканирования базы Swiss-Prot/TrEMBL выявлено 26 растительных гомологов MAST2_HUMAN: 5 из *V. vinifera*, 8 из *A. thaliana*, 1 из *O. sativa*, 5 из *O. sativa* sp. *japonica*, 2 из *O. sativa* sp. *indica*, 1 из *Medicago truncatula* и 4 из *Physcomitrella patens* sp. *patens* (табл. 2). Известно, что для животных протеинкиназ MAST2

характерно наличие вспомогательного С-концевого S_TK_X домена (sTKc или sTKx), называемого С-концевым протеинкиназным доменом [68], который вместе с каталитическим S_TKc доменом отвечает за взаимодействие с микротрубочками [46]. Результаты анализа доменной организации полных аминокислотных последовательностей растительных гомологов протеинкиназы MAST2_HUMAN свидетельствуют о наличии в составе 11 из 26 обнаруженных последовательностей протеинкиназ С-концевого S_TK_X домена (SMART: SM00133): A7PHB5, A7NTE9, A7NXD3, A5BWH0 (*V. vinifera*); Q9MB45, Q9LVI5, Q94F38, Q8GZ40 (*A. thaliana*) и A9TQ65, A9TUB0, A9T694 (*P. patens* sp. *patens*) (рис. 3 и табл. 2). При этом максимальное сходство консенсусных областей

Таблица 2
 Результаты поиска растительных гомологов протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток

Потенциальный гомолог	Вид	База данных	Длина консенсуса, а.к.	Вес выравнивания	E-value	Идентичность	Сходство	Gaps
						%		
SLK								
A7P2E2_VITVI	<i>Vitis vinifera</i>	tr	624	244	2e-62	46	65	2
MAST2								
A7QWR7_VITVI	<i>Vitis vinifera</i>	tr	804	314	5e-83	47	63	4
A7PHB5_VITVI*	—	tr	803	313	7e-83	46	64	1
A7NTE9_VITVI*	—	tr	754	295	3e-77	46	63	4
A7NXD3_VITVI*	—	tr	615	241	4e-61	39	56	9
A5BWH0_VITVI*	—	tr	615	241	4e-61	39	56	9
Q9LE81_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tr	793	310	9e-82	46	63	4
Q9MB45_ARATH*	—	tr	778	304	5e-80	44	63	4
Q9LV15_ARATH*	—	tr	778	304	5e-80	44	63	4
Q94F38_ARATH*	—	tr	770	301	4e-79	46	62	3
Q8GZ40_ARATH*	—	tr	769	300	6e-79	44	63	4
Q0WLU7_ARATH	—	tr	753	294	4e-77	45	63	4
Q9MAJ4_ARATH	—	tr	708	277	7e-72	43	59	11
Q9LP76_ARATH	—	tr	706	276	1e-71	42	56	12
Q9AUR3_ORYSA	<i>Oryza sativa</i>	tr	791	309	2e-81	44	58	7
Q10E10_ORYSJ	<i>O. sativa sp. japonica</i>	tr	791	309	2e-81	44	58	7
A3AM04_ORYSJ	—	tr	791	309	2e-81	44	58	7
Q2QM12_ORYSJ	—	tr	780	305	3e-80	46	61	6
Q10E09_ORYSJ	—	tr	732	286	1e-74	41	56	9
A3CJ17_ORYSJ	—	tr	708	277	7e-72	43	59	9
A2XLA4_ORYSI	<i>O. sativa sp. indica</i>	tr	791	309	2e-81	44	58	7
A2ZMW0_ORYSI	—	tr	713	279	2e-72	44	59	9
Q32YB5_MEDTR	<i>Medicago truncatula</i>	tr	786	307	6e-81	45	62	6
A9TQ65_PHYPA*	<i>Physcomitrella patens sp.</i>	tr	732	286	1e-74	43	60	5
A9TWY7_PHYPA	—	tr	730	285	2e-74	43	61	6
—	—	tr	728	285	3e-74	44	61	5
—	—	tr	727	284	4e-74	42	56	9
AURKA								
Q5SNH4_ORYSJ	<i>O. sativa sp. japonica</i>	tr	947	369	e-100	64	77	2
Q4R1K7_ORYSJ	—	tr	921	359	2e-97	66	80	1
A2WLL4_ORYSI	<i>O. sativa sp. indica</i>	tr	946	369	e-100	64	77	2
A9PFI9_POPTR	<i>Populus balsamifera sp. trichocarpa</i>	tr	945	368	e-100	62	78	1
A7P4F7_VITVI	<i>Vitis vinifera</i>	tr	945	368	e-100	63	77	1
A5BPE0_VITVI	—	tr	942	367	e-100	63	77	1
A7PY12_VITVI	—	tr	869	339	3e-91	56	76	1
B4F8A1_MAIZE	<i>Zea mays</i>	tr	944	368	e-100	62	76	2
AUR2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sp	938	365	3e-99	65	78	1
AUR2_ARATH Isof.2	—	sp	936	365	4e-99	65	79	1
AUR1_ARATH	—	sp	931	363	2e-98	60	76	1
AUR3_ARATH	—	sp	863	337	1e-90	57	76	1

* Наличие вспомогательного каталитического S_{TK}X домена.

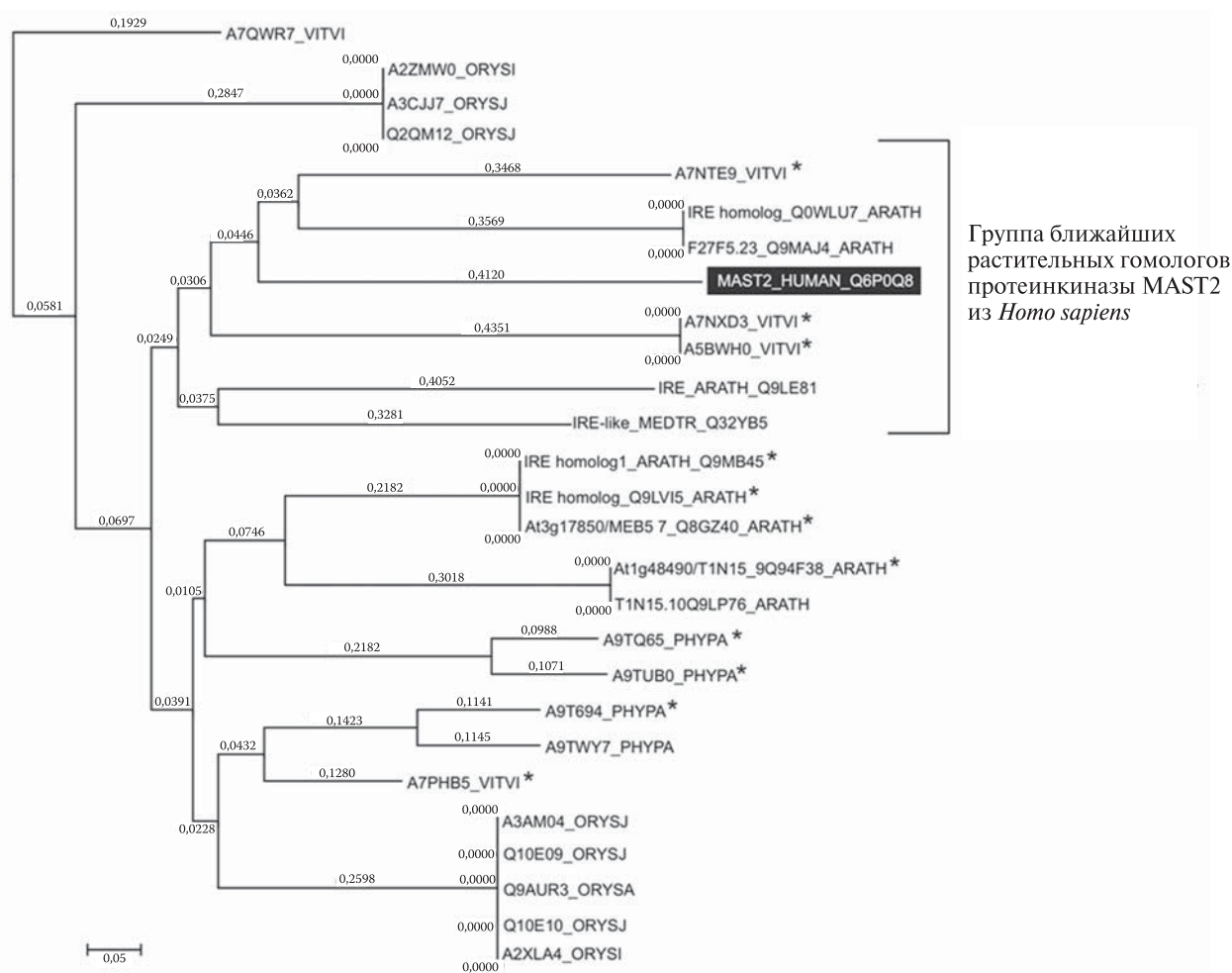


Рис. 4. Филогенетическое древо растительных гомологов MAST2 из *Homo sapiens*. * Растительные гомологи, содержащие характерный для животных MAST2-протеинкиназ вспомогательный каталитический S_TK_X домен

каталитических доменов эталонной последовательности и растительного гомолога наблюдалось в случае белка с неизвестной функцией A7QWR7 из винограда (идентичность – 47 %, сходство – 63 %) (табл. 2).

Филогенетический анализ последовательностей методом ближайших соседей показал, что общую кладу с MAST2_HUMAN на основании гомологии последовательностей каталитического домена образуют следующие растительные гомологи: Q0WLU7_ARATH, Q9MAJ4_ARATH, Q9LE81_ARATH (*A. thaliana*), A7NTE9_VITVI*, A7NXD3_VITVI*, A5BWH0_VITVI* (*V. vinifera*) и Q32YB5_MEDTR (*M. truncatula*) (рис. 4). Таким образом, наиболее вероятными растительными гомологами протеинкиназ се-

мейства MAST2 являются A7NTE9_VITVI* (423 остатка; хромосома 18), A7NXD3_VITVI* (550 остатков; хромосома 5), A5BWH0_VITVI* (550 остатков; хромосома 5) из *V. vinifera*. Именно в этих случаях наблюдается наиболее высокая степень сходства последовательностей, подтвержденная результатами множественных выравниваний группы гомологов (рис. 3), кластическими данными (рис. 4) и наличием характерного для протеинкиназ MAST2 вспомогательного S_TK_X домена (рис. 5). Анализ сходства протеинкиназы MAST2 человека и потенциальных растительных гомологов по таким функционально важным элементам, как наличие вспомогательного S_TK_X домена, консервативность аминокислотного остатка

518-526 NP_BIND ATP	541 BINDING ATP	635 Active site Proton acceptor	S_TK_X домен	UniProt	
ISRGAFGRV	K	D	-	A7QWR7	<i>V. vinifera</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	A7PHB5	<i>V. vinifera</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	Q9LE81	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	Q9AUR3	<i>O. sativa</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	Q10E10	<i>O. sativa</i> sp. <i>japonica</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	A3AM04	<i>O. sativa</i> sp. <i>japonica</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	A2XLA4	<i>O. sativa</i> sp. <i>indica</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	Q32YB5	<i>M. truncatula</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	Q2QM12	<i>O. sativa</i> sp. <i>japonica</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	Q9MB45	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	Q9LVI5	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGHV	K	D	+	Q94F38	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	Q8GZ40	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGKV	K	D	+	A7NTE9	<i>V. vinifera</i>
ISRGAFGKV	K	D	-	Q0WLU7	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	Q10E09	<i>O. sativa</i> sp. <i>japonica</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	A9TQ65	<i>Physcomitrella patens</i> sp. <i>patens</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	A9TWY7	<i>Physcomitrella patens</i> sp. <i>patens</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	A9TUB0	<i>Physcomitrella patens</i> sp. <i>patens</i>
ISRGAFGRV	K	D	+	A9T694	<i>Physcomitrella patens</i> sp. <i>patens</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	A2ZMW0	<i>Oryza sativa</i> sp. <i>indica</i>
ISRGAFGKV	K	D	-	Q9MAJ4	<i>A. thaliana</i>
ISRGAFGRV	K	D	-	A3CJJ7	<i>O. sativa</i> sp. <i>japonica</i>
ISRGAFGHV	K	D	-	Q9LP76	<i>A. thaliana</i>
IGKCAFGEV	K	D	+	A7NXD3	<i>V. vinifera</i>
IGKCAFGEV	K	D	+	A5BWH0	<i>V. vinifera</i>
ISNGAYGAV	K	D	+	Q6P0Q8	<i>H. sapiens</i> MAST2

* . . * * * * *

Рис. 5. Сходство MAST2 из *H. sapiens* и потенциальных растительных гомологов по наличию вспомогательного S_TK_X домена, консервативности остатка Асп-635 в активном центре и АТФ-связывающих мотивов (NP_BIND ATP и Лиз-541)

Асп-635 в предполагаемом активном центре гомологов, консервативность АТФ-связывающих мотивов (NP_BIND ATP) и консервативность аминокислотного остатка Лиз-541, позволяет рассматривать растительный гомолог из винограда (A7NTE9) (рис. 5) в качестве наиболее перспективного объекта дальнейших исследований с привлечением структурного моделирования и молекулярно-генетических методов.

Растительные гомологи протеинкиназы *Auroora* человека (STK6_HUMAN – O14965). Протеинкиназа *Auroora* А принадлежит к группе семейств серин-треониновых протеинкиназ AGC [26] и является одной из основных протеинкиназ, регулирующих митоз [30, 41]. В случае протеинкиназы *Auroora* А, в отличие от SLK и MAST2, для сканирования баз данных была использована полная последовательность STK6_HUMAN (O14965). Это обусловлено тем, что упомянутая протеинкиназа имеет относительно простую доменную организацию. Ее доменный

состав представлен исключительно протеинкиназным доменом, составляющим около 50 % всей последовательности, и низкоструктурированными N- и C-хвостами. В результате сканирования базы UniProt с применением инструмента BLASTp было обнаружено 12 растительных гомологов протеинкиназы STK6_HUMAN (рис. 6), характеризующихся, помимо высокой степени сходства доменной архитектуры, высоким уровнем гомологии по последовательности протеинкиназного домена и N- и C-придоменных участков. При этом сходство аминокислотных последовательностей достигало 76–80 % (при идентичности 56–66 %).

Ранее в работе, посвященной поиску растительных гомологов протеинкиназ *Auroora* [69], авторами уже отмечался высокий процент идентичности, характерный для каталитических доменов *Auroora*, которые обнаружены у арабидопсиса (64–95 %). Найденные же нами гомологи принадлежали *O. sativa* sp. *japonica* (Q5SNH4_ORYSJ, Q4R1K7_ORYSJ), *O. sativa*

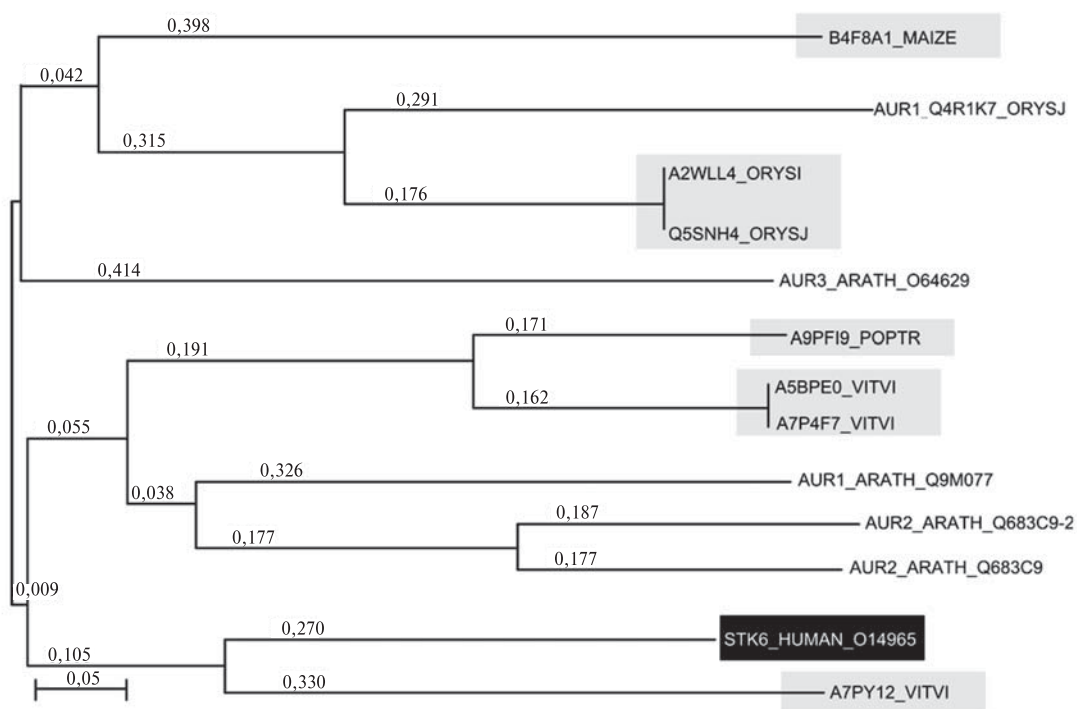


Рис. 7. Филогенетическое древо для кладиического сравнения близости протеинкиназы STK6_HUMAN (Auroга) и ее растительных гомологов

sp. indica (A2WLL4_ORYSI), *Populus balsamifera* sp. *trichocarpa* (A9PFI9_POPTR), *V. vinifera* (A7P4F7_VITVI, A5BPE0_VITVI, A7PY12_VITVI), *Zea mays* (B4F8A1_MAIZE) и *A. thaliana* (AUR2_ARATH, AUR2_ARATH Isof. 2, AUR1_ARATH, AUR3_ARATH). В сочетании с низким процентом пропусков в их последовательностях (1–2 %) высокий уровень идентичности является свидетельством не только гомологии последовательности, но и гомологии пространственной структуры и функции этих белков (рис. 6). Кроме того, для протеинкиназ AUR2_ARATH, AUR2_ARATH Isof. 2, AUR1_ARATH, AUR3_ARATH из *A. thaliana* гомология уже доказана (в том числе функции), о чем свидетельствует их депонирование в базе Swiss-Prot. В качестве потенциальной растительной протеинкиназы Ауорога также позиционируется последовательность Q4R1K7_ORYSJ (*Osa*AUR1) из *O. sativa* sp. *japonica*, депонированная в базе данных TrEMBL [70].

Высокая консервативность положений функционально важных остатков и мотивов, гомология первичных последовательностей и доменной организации (результаты анализа с

применением коллекции доменов и моделей Маркова) позволяет нам определить все обнаруженные S_TKc протеинкиназы как растительные структурные и функциональные гомологи протеинкиназ Ауорога человека, причем ближайшим гомологом STK6_HUMAN, как показал кладиический анализ (рис. 7), является белок с неизвестной функцией A7PY12_VITVI из *V. vinifera* (сходство – 76 %, идентичность – 56 %, E-value = 3e-91).

Учитывая роль, которую протеинкиназы Ауорога играют в регуляции белков микротрубочек [47] и деления клеток [30, 41, 70], растительный гомолог A7PY12 из (*Vitis vinifera*), названный нами STALK (S_T AURKA LIKE KINASE), был выбран в качестве модельного для предсказания пространственной структуры и построения модели с применением молекулярного моделирования *in silico* (рис. 8, см. вклейку в конце номера). Степень идентичности первичных структур STALK и Ауорога составляет 60,1 %, степень сходства – 81,7 %. Кроме того, идентичные и гомологичные аминокислотные остатки распределены вдоль пептидной цепи достаточно равномерно, что га-



Рис. 9. Консервативные мотивы, характерные для Ауорога протеинкиназ животных, которые обнаружены в составе белка STALK из *V. vinifera*: *a* – консервативный мотив активационной петли; *б* – блок разрушения D2-типа (D2-type destruction box)

рантирует высокую достоверность реконструированной нами пространственной структуры белка STALK.

Отличия в пространственной ориентации аминокислотных остатков STALK и Ауорога, формирующих активный центр (Асп-141, Лиз-143) и сайт связывания с АТФ (Лей-24, Гли-25, Арг-26, Гли-27, Лиз-28, Фен-29, Гли-30, Арг-31, Вал-32, Лиз-47), не превышают 0,3Å, в то время как аналогичная величина для целых доменов цепи составляет 0,43Å. Это свидетельствует о большей «консервативности» пространственной структуры данных участков по сравнению с пространственной структурой молекулы белка в целом и наряду с консервативностью аминокислотного состава может служить дополнительным доказательством каталитических свойств исследуемого белка. Максимальные отличия пространственной структуры протеинкиназ STALK от Ауорога наблюдаются в диапазонах положений от 169 до 173 и от 233 до 238. Кроме того, остаток Тре-171, входящий в состав первого структурно-вариабельного участка протеинкиназы STALK, соответствует фосфорилируемому остатку Тре-287 протеинкиназы Ауорога человека.

Для протеинкиназ Ауорога животного происхождения характерно наличие в петле активации каталитического домена консервативного мотива (DFGWSxxxxxxxRxTxCGTxDYLPPE), несущего остатки, фосфорилируемые цАМФ-зависимой протеинкиназой [71]. Кроме того, для упомянутых протеинкиназ характерно наличие в С-концевой области каталитического домена мотива, именуемого «блоком разрушения D2-типа» (D2-type destruction box) [Rxx(L/I)xxVxxHPW], который, вероятно, является мишенью при зависимом от протеосом разрушении белка [72].

Анализ последовательности белка STALK показал (практически с полным совпадением) наличие обоих мотивов, характерных для про-

теинкиназ Ауорога животных (рис. 9). Это является дополнительным подтверждением функциональной гомологии белка STALK (A7PY12) из винограда и протеинкиназы STK6 человека.

Таким образом, результаты поиска растительных гомологов протеинкиназ SLK, PAK6, PAK7, MARK1, MAST2, TTBK1, TTBK2, AURKA, PLK1, PLK2 и PASK человека, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток, с большой степенью вероятности указывают на наличие у растений протеинкиназ SLK, MAST2 и AURKA. Отсутствие у растений гомологов протеинкиназ PAK6, PAK7, MARK1, TTBK1, TTBK2, PLK1, PLK2 и PASK связано, вероятно, с серьезными различиями клеток растений и животных по ряду белков микротрубочек. Несмотря на консервативность тубулинов животных и растений, а также наличие растительных гомологов для таких белков, как БАМ-1 [73], существуют различия по ряду белков микротрубочек. Так, например, у растений отсутствует группа БАМ, содержащих tau-повторы (тип II) [14, 73], что, в свою очередь, может отражаться на наличии у растений протеинкиназ, фосфорилирующих данные субстраты. В то же время протеинкиназы, участвующие в регуляции процессов, общих как для животной, так и для растительной клетки, и фосфорилирующие соответствующие консервативные эпитопы белки микротрубочек (тубулин, MAP1, моторные белки и т.д.), сами демонстрируют существенное сходство.

Ярким примером является протеинкиназа Ауорога А, отвечающая за формирование дочерних centrosом в предмитотической фазе, асимметричное деление клетки и формирование веретена деления [47]. Поступающий от циклин-зависимой протеинкиназы Cdk1 сигнал передается на протеинкиназы «второго уровня», одной из которых и является Ауорога [38, 47]. В клетках животных и человека AURKA

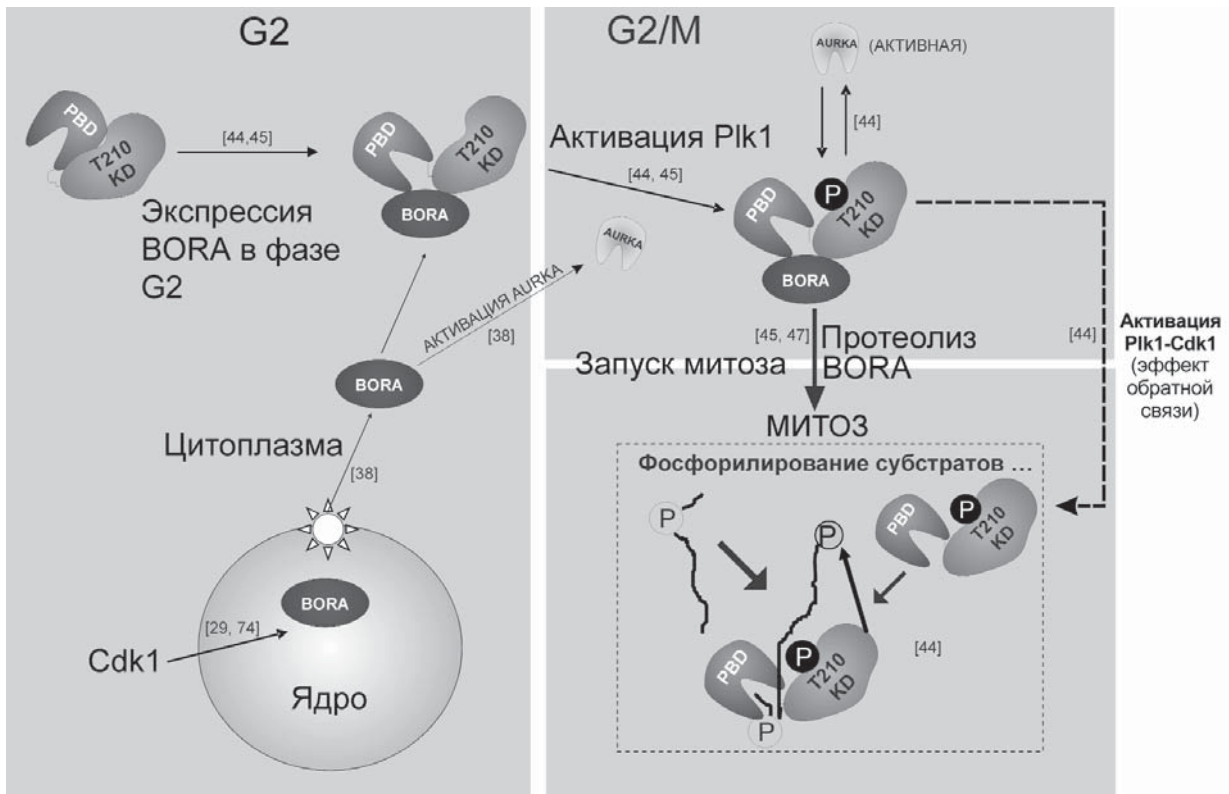


Рис. 10. Схема участия Plk1, AURKA и BORA в клеточном цикле (на основании данных литературы) [29, 38, 44, 45, 74]

(Aurora kinase A) участвует в запуске митоза [30]. При этом активация AURKA происходит посредством образования комплекса с белком BORA (FLJ22624; RP11-342J4.2; C13orf34) (рис. 10) [29, 38, 44, 74].

Недавно был предложен механизм, согласно которому BORA и AURKA совместно контролируют переход из фазы G2 клеточного цикла в фазу M [44]. При этом BORA обратимо связывается с Plk1 и меняет ее конформацию так, что остаток Тре-210 в каталитическом домене Plk1 становится доступным для фосфорилирования посредством AURKA [44]. Эта цепь событий приводит к протеолизу BORA, гиперактивации Cdk1 и запуску митоза [45, 47] (рис. 10).

Поскольку нами показано, что среди обнаруженных в ходе биоинформационного скрининга белков наиболее близким растительным гомологом протеинкиназы Aurora человека является белок с неизвестной функцией A7PY12_VITVI (STALK) из *V. vinifera* (по данным анали-

за последовательностей и реконструкции пространственной структуры STALK), можно предположить, что аналогичный механизм взаимодействия STALK возможен и в растительной клетке. Однако в случае потенциальных растительных гомологов протеинкиназы SLK человека многие вопросы остаются спорными. Протеинкиназа SLK человека демонстрирует высокий уровень экспрессии в различных типах клеток и регулирует радиальное расположение микротрубочек [75]. На основании аналогии с механизмом регуляции хPlk1 *Xenopus laevis* [76] предполагается, что протеинкиназа SLK человека регулирует активность Plk1 (гомолога Plx1 *X. laevis*) [32], однако окончательных доказательств или опровержений указанного механизма пока нет.

Таким образом, нами были выявлены растительные гомологи протеинкиназ SLK, MAST2 и Aurora A человека, принимающих участие в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток. При этом наличие

у растений гомологов протеинкиназ SLK и MAST2 показано впервые. В то же время растительных гомологов протеинкиназ PAK7, PAK6, MARK1, TTBK1, TTBK2, PLK1, PLK4 и PASK человека выявить не удалось. Появление новых данных по секвенированию геномов растений и животных вместе с применением биоинформационных и экспериментальных методов позволит продолжить и углубить исследования растительных протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток.

Настоящая работа выполнена в рамках проекта 08–04–90454: «Сравнительный анализ киномов микротрубочек животных и высших растений» (Совместный конкурс НАН Украины–РФФИ 2008–2009 гг.).

P.A. Karpov, E.S. Nadezhkina, A.I. Yemets, V.G. Matusov, A.Yu. Nyporko, N.Yu. Shashina, Ya.B. Blume

BIOINFORMATIC SEARCH OF PLANT PROTEIN KINASES, PARTICIPATING IN MICROTUBULE PROTEIN PHOSPHORYLATION AND CELL DIVISION REGULATION

Bioinformatic search of plant homologues of human protein kinases SLK, PAK6, PAK7, MARK1, MAST2, TTBK1, TTBK2, AURKA, PLK1, PLK2 and PASK participating in microtubular protein phosphorylation and cell division regulation is carried out. The homologues of protein kinases SLK, MAST2 and AURKA were identified. It is found that closest homologue of human AURKA protein kinase is a protein with unknown function A7PY12_VITVI (STALK – Serine-Threonine Aurora-Like Kinase) from grape (*Vitis vinifera*). Reconstruction and analysis of three-dimensional structure of STALK protein confirmed its relation to the group of AURKA-like protein kinases.

П.А. Карпов, Е.С. Надеждина, А.И. Емец, В.Г. Матусов, О.Ю. Нипорко, Н.Ю. Шашина, Я.Б. Блюм

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ ПОШУК РОСЛИННИХ ПРОТЕЇНКИНАЗ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У ФОСФОРИЛЮВАННІ БІЛКІВ МІКРОТРУБОЧОК ТА РЕГУЛЯЦІЇ КЛІЙННОГО ПОДІЛУ

Виконано біоінформаційний пошук рослинних гомологів протеїнкіназ SLK, PAK6, PAK7, MARK1, MAST2, TTBK1, TTBK2, AURKA, PLK1, PLK2 і PASK людини, які беруть участь у фосфорилуванні білків микротрубочок та регуляції поділу клітин. Показана наявність у рослин гомологів протеїнкіназ SLK, MAST2 і AURKA. Визначено, що найближчим гомологом протеїнкінази AURKA людини є білок з невідомою функ-

цією A7PY12_VITVI (STALK – Serine-Threonine Aurora-Like Kinase) з винограду (*Vitis vinifera*). Проведено реконструкцію і аналіз просторової структури білка STALK, що підтвердили його приналежність до групи AURKA-подібних протеїнкіназ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Надеждина Е.С., Зиновкина Л.А. Регуляция системы микротрубочек животных клеток // Усп. биол. химии. – 1999. – 39. – P. 187–224.
2. Amos L.A. Tubulin and microtubules // Nature Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/>. – 2005. – P. 1–7. [doi:10.1038/npg.els.0003890]
3. McKean P.G., Vaughan S., Gull K. The extended tubulin superfamily // J. Cell Sci. – 2001. – 114. – P. 2723–2733.
4. Демчук О.Н., Блюм Я.Б. Построение филогенетического древа растительных тубулинов на основании гомологии их белковых последовательностей // Цитология и генетика. – 2005. – 39, № 2. – С. 3–9.
5. Нипорко А.Ю., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // Биополимеры и клетка. – 2001. – 17, № 1. – С. 61–69.
6. Little M., Seehaus T. Comparative analysis of tubulin sequences // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – 90B. – P. 655–670.
7. Wang H., Chevalier D., Larue C., Cho S.K., Walkera J.C. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana* // The Arabidopsis Book. – Rockville, 2007. – P. 1–38.
8. Hargreaves A.J., Wandosell F., Avila J. Phosphorylation of tubulin enhances its interaction with membranes // Nature. – 1986. – 323, № 6091. – P. 827–828.
9. Robinson D.R., Wu Y.M., Lin S.F. The protein tyrosine kinase family of the human genome // Oncogene. – 2000. – 19, № 49. – P. 5548–5557.
10. Blume Ya.B., Lloyd C.W., Yemets A.I. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression // The Plant Cytoskeleton : A Key Tool for Agro-Biotechnology / Eds Ya.B. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviario. – Netherlands : Springer, 2008. – P. 145–155.
11. Blume Y., Yemets A., Sulimenko V., Sulimenko T., Chan J., Lloyd C., Dráber P. Tyrosine phosphorylation of plant tubulin // Planta. – 2008. – 229, № 1. – P. 143–150.
12. Yemets A., Sheremet Y., Vissenberg K., Van Orden J., Verbelen J.P., Blume Y.B. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in Arabidopsis root cells // Cell Biol Int. – 2008. – 32, № 6. – P. 630–637.
13. Шеремет Я.А., Емец А.И., Вербелен Ж.-П., Блюм Я.Б. Влияние ингибиторов протеинкиназы и протеинфосфатазы на прохождение митоза в син-

- хронизированной культуре клеток табака BY-2 // Цитология. — 2007. — **49**, № 9. — С. 807–808.
14. Karpov P.A., Blume Y.B. Bioinformatic search for plant homologues of animal structural MAPs in the *Arabidopsis thaliana* genome // The Plant Cytoskeleton: A Key Tool for Agro-Biotechnology / Eds Ya.B. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviaro. — Netherlands : Springer, 2008. — P. 373–397.
 15. Hamada T. Microtubule-associated proteins in higher plants // J. Plant Res. — 2007. — **20**, № 1. — P. 79–98.
 16. Sedbrook J.C. MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization // Curr. Opin. Plant Biol. — 2004. — **7**, № 6. — P. 632–640.
 17. Chunhua Z., Brankle S., Mallery E., Szymanski D.B. Composition and function of the *Arabidopsis* WAVE complex during epidermal morphogenesis // 16th Int. Conf. on Arabidopsis Res. (15–19 June, 2005) : Abstracts. — Madison, 2005. — P. 131.
 18. Hanks S.K., Quinn A.M. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members // Meth. Enzym. — 1991. — **200**. — P. 38–62.
 19. Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. 2003. Published by O'Reilly & Associates, Inc., 1005 Gravenstein Highway North, Sebastopol, CA 95472. — 368 p.
 20. Lucini C., Castaldo L., Lamanna C., Maruccio L., Vega J.A., Gargiulo G. Neuronal and non-neuronal Trk neurotrophin receptor-like proteins in *Eisenia foetida* (Annelida Oligochaeta) // Neurosci. Lett. — 1999. — **261**. — P. 163–166.
 21. Miller M.A., Malik I.A., Shenk M.A., Steele R.E. The Src/Csk regulatory circuit arose early in metazoan evolution // Oncogene. — 2000. — **19**, № 34. — P. 3925–3930.
 22. Müller P., Aichinger C., Feldbrügge M., Kahmann R. The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis* // Mol. Microbiol. — 1999. — **34**, № 5. — P. 1007–1017.
 23. Rikke B.A., Murakami S., Johnson T.E. Paralogy and orthology of tyrosine kinases that can extend the life span of *Caenorhabditis elegans* // Mol. Biol. Evol. — 2000. — **17**, № 5. — P. 671–683.
 24. Sakuma M., Onodera H., Suyemitsu T., Yamasu K. The protein tyrosine kinases of the sea urchin *Anthocidaris crassispina* // Zool. Sci. — 1997. — **14**. — P. 941–946.
 25. Suga H., Hoshiyama D., Kuraku S., Katoh K., Kubokawa K., Miyata T. Protein tyrosine kinase cDNAs from amphioxus, hagfish, and lamprey: isoform duplications around the divergence of cyclostomes and gnathostomes // J. Mol. Evol. — 1999. — **49**, № 5. — P. 601–608.
 26. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome // Science. — 2002. — **298**, № 5600. — P. 1912–1934.
 27. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. — 2008. — **36**. — D190–D195. [doi:10.1093/nar/gkm895]
 28. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank // Nucl. Acids Res. — 2005. — **33**. — D34–D38. [doi:10.1093/nar/gki063]
 29. Bailly E., Doree M., Nurse P., Bornens M. p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase // EMBO J. — 1989. — **8**, № 13. — P. 3985–3995.
 30. Bettencourt-Dias M., Giet R., Sinka R., Mazumdar A., Lock W.G., Balloux F., Zafiroopoulos P.J., Yamaguchi S., Winter S., Carthew R.W., Cooper M., Jones D., Frenz L., Glover D.M. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression // Nature. — 2004. — **432**. — P. 980–987.
 31. Bettencourt-Dias M., Rodrigues-Martins A., Carpenter L., Riparbelli M., Lehmann L., Gatt M.K., Carmo N., Balloux F., Callaini G., Glover D.M. SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development // Curr. Biol. — 2005. — **15**. — P. 2199–2207.
 32. 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 // Mol. Biol. Cell. — 2008. — **19**. — P. 1952–1961.
 33. Chaar Z., O'reilly P., Gelman I., Sabourin L.A. v-Src-dependent down-regulation of the Ste20-like kinase SLK by casein kinase II // J. Biol. Chem. — 2006. — **281**, № 38. — P. 28193–28199.
 34. Drewes G., Ebneth A., Preuss U., Mandelkow E.-M., Mandelkow E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption // Cell. — 1997. — **89**. — P. 297–308.
 35. Eswaran J., Lee W.H., Debreczeni J.E., Filippakopoulos P., Turnbull A., Fedorov O., Deacon S.W., Peterson J.R., Knapp S. Crystal structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs // Structure. — 2007. — **15**, № 2. — P. 201–213.
 36. Hofer T., Spielmann P., Stengel P., Stier B., Katschinski D.M., Desbaillets I., Gassmann M., Wenger R.H. Mammalian PASKIN, a PAS-serine/threonine kinase related to bacterial oxygen sensors // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — **288**, № 4. — P. 757–764.
 37. Houlden H., Johnson J., Gardner-Thorpe C., Lashley T., Hernandez D., Worth P., Singleton A.B., Hilton D.A., Holton J., Revesz T., Davis M.B., Giunti P., Wood N.W. Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11 // Nat. Genet. — 2007. — **39**, № 12. — P. 1434–1436.
 38. Hutterer A., Berdnik D., Wirtz-Peitz F., Igman M.,

- Schleiffer A., Knoblich J.A. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora // *Dev. Cell.* – 2006. – **11**. – P. 147–157.
39. Matenia D., Griesshaber B., Li X.Y., Thiessen A., John C., Jiao J., Mandelkow E., Mandelkow E.M. PAK5 kinase is an inhibitor of MARK/Par-1, which leads to stable microtubules and dynamic actin // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – **16**, № 9. – P. 4410–4422.
40. Neef R., Gruneberg U., Kopajtich R., Li X., Nigg E.A., Sillje H., Barr F.A. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1 // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – **9**, № 4. – P. 436–444.
41. Nigg E.A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – **2**. – P. 21–32.
42. O'regan L., Blot J., Fry A.M. Mitotic regulation by NIMA-related kinases // *Cell Div.* – 2007. – **2**. – P. 25.
43. Sato S., Cerny R.L., Buescher J.L., Ikezu T. A Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation // *J. Neurochem.* – 2006. – **98**, № 5. – P. 1573–1584.
44. Seki O.A., Coppinger J.A., Jang C.-Y., Yates J.R., Fang G. Bora and the kinase Aurora A cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry // *Science.* – 2008. – **320**, № 20. – P. 1655–1658.
45. Seki A., Coppinger J.A., Du H., Jang C.Y., Yates J.R. 3rd, Fang G. Plk1- and beta-TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression // *J. Cell. Biol.* – 2008. – **181**, № 1. – P. 65–78.
46. Walden P.D., Cowan N.J. A novel 205-kilodalton testis-specific serine/threonine protein kinase associated with microtubules of the spermatid manchette // *Mol. Cell Biol.* – 1993. – **13**, № 12. – P. 7625–7635.
47. Wiese C., O'Brien L.L. What's so Bor (a) ing about Aurora-A activation? // *Dev. Cell.* – 2006. – **11**, № 2. – P. 133–134.
48. Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks // *Nucl. Acids Res.* – 2006. – **34**. – D257–D260. [doi:10.1093/nar/gkj104]
49. Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coghill P.C., Sammut J.S., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L., Bateman A. The Pfam protein families database // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – **36**. – D281–D288. [doi:10.1093/nar/gkm960]
50. Hulo N., Bairoch A., Bulliard V., Cerutti L., Cuče B., De Castro E., Lachaize C., Langendijk-Genevaux P.S., Sigrist C.J.A. The 20 years of PROSITE // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – **36**. – D245–D249. [doi:10.1093/nar/gkm977]
51. Claverie J.-M., Notredame C. *Bioinformatics for dummies.* – New York : Wiley Publ., 2007. – 436 p.
52. 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. – **23**. – P. 2947–2948.
53. Larkin E.K., Morris N.J., Li Y., Nock N.L., Stein C.M. Comparison of affected sibling-pair linkage methods to identify gene × gene interaction in GAW15 simulated data // *BMC Proc.* – 2007b. – **1** (Suppl 1.) – S66.
54. Atteson K. The performance of neighbor-joining algorithms of phylogeny reconstruction // *Lecture Notes in Computer Science / Eds T. Jiang, D. Lee.* – Berlin : Springer-Verlag, 1997. – **1276**. – P.101–110.
55. Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics.* – New York : Oxford Univ. Press, 2000. – 333 p.
56. Page R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // *Comp. Appl. Biosci.* – 1996. – **12**. – P. 357–358.
57. Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // *Brief. Bioinform.* – 2008. – **9**. – P. 299–306.
58. Krieger E., Nabuurs S.B., Vriend G. Homology modeling // *Structural Bioinformatics / Eds P.E. Bourne, H. Weissig.* – Hoboken: John Wiley & Sons, 2003. – P. 509–524.
59. Fancelli D., Moll J., Varasi M., Bravo R., Artico R., Berta D., Bindl S., Cameron A., Candiani I., Cappella P., Carpinelli P., Croci W., Forte B., Giorgini M.L., Klapwijk J., Marsiglio A., Pesenti E., Rocchetti M., Roletto F., Severino D., Soncini C., Storici P., Tonani R., Zugnoni P., Vianello P. 1,4,5,6-tetrahydropyrrolo [3,4-c] pyrazoles: identification of a potent Aurora kinase inhibitor with a favorable antitumor kinase inhibition profile // *J. Med. Chem.* – 2006. – **49**. – P. 7247–7251.
60. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucl. Acids Res.* – 2000. – **28**. – P. 235–242.
61. Das B., Meirovitch H., Navon I.M. Performance of hybrid methods for large-scale unconstrained optimization as applied to models of proteins // *J. Comput. Chem.* – 2003. – **24**. – P. 1222–12231.
62. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer : An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.* – 1997. – **18**. – P. 2714–2723.
63. Потехина Е.С., Зиновкина Л.А., Надеждина Е.С. Характеристика ферментативной активности протеинкиназы LOSK: возможная регуляторная роль структурного домена // *Биохимия.* – 2003. – **68**. – С. 225–234.
64. Zinovkina L., Burakov A., Kovalenko O., Potekhina E., Nadezhdina E. Catalytically dead LOSK (SLK) kinase domain inhibits microtubule organization activity of

- centrosome // Cell Motil. and Cytoskel. — 2003. — **54**. — P. 182.
65. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyere C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas F., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pu M.E., Vaille G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla // Nature. — 2007. — **449**. — P. 463–467.
66. Frommel C. The apolar surface area of amino acids and its empirical correlation with hydrophobic free energy // J. Theor. Biol. — 1984. — **111**. — P. 247–260.
67. Sweet R.M., Eisenberg D. Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure // J. Mol. Biol. — 1983. — **171**. — P. 479–488.
68. Sun L., Gu S., Li X., Sun Y., Zheng D., Yu K., Ji C., Tang R., Xie Y., Mao Y. Identification of a novel human MAST4 gene, a new member of the microtubule associated serine-threonine kinase family // Мол. биология. — 2006. — **40**, № 5. — P. 808–815.
69. Demidov D., VanDamme D.L., Geelen D., Blattner F.R., Houben A. Identification and dynamics of two classes of Aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants // Plant Cell. — 2005. — **17**. — P. 836–848.
70. Kawabe A., Matsunaga S., Nakagawa K., Kurihara D., Yoneda A., Hasezawa S., Uchiyama S., Fukui K. Characterization of plant Aurora kinases during mitosis // Plant Mol Biol. — 2005. — **58**, № 1. — P. 1–13.
71. Walter A.O., Seghezzi W., Korver W., Sheung J., Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation // Oncogene. — 2000. — **19**. — P. 4906–4916.
72. Arlot-Bonnemains Y., Klotzbucher A., Giet R., Uzbekov R., Bihan R., Prigent C. Identification of a functional destruction box in the *Xenopus laevis* Aurora-A kinase pEg2 // FEBS Lett. — 2001. — **508**. — P.149–152.
73. Guo L., Ho C.M., Kong Z., Lee Y.R., Qian Q., Liu B. Evaluating the microtubule cytoskeleton and its interacting proteins in monocots by mining the rice genome // Ann. Bot. — 2009. — **103**, № 3. — P. 387–402.
74. Riabowol K., Draetta G., Brizuela L., Vandre D., Beach D. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells // Cell. — 1989. — **57**, № 3. — P. 393–401.
75. Коваленко О.В., Бураков А.В., Зиновкина Л.А., Потехина Е.С., Надеждина Е.С. Протеинкиназа LOSK/SLK регулирует радиальное расположение микротрубочек в клетке // Цитология. — 2003. — **45**. — P. 886–887.
76. 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.

Поступила 27.01.09