

Gustafson J.P., Chao S., Anderson O.D. // Genetics. – 2004. – V. 168. – P. 609-623.

11. Deletion Mapping of Homoeologous Group 6-Specific Wheat Expressed Sequence Tags / Randhawa H. S., Dilbirligi M., Sidhu D., Erayman M., Sandhu D. // Genetics. – 2004. – V. 168. – P. 677-686.

12. Fluorescently labeled M13 tagged SSR markers in map construction and assessment of allelic diversity in wheat and durum wheat / Raman R., Thomas A., Imtiaz M., Stodart B., Raman H., Martin P., Hare R., Milgate A., Mackay M. // Proc. X Intern. Wheat Genet. Symposium, 1-6 September 2003. – Roma: SIMI, 2003. – V. 2. – P. 798-800.

13. A microsatellite map of wheat / Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P. Ganl M.W. // Genetics. – 1998. – 149. – P. 2007-2023.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ АССОЦИИРОВАННОЙ С МИКРОТРУБОЧКАМИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ MAST2

П.А. КАРПОВ¹, кандидат биологических наук;

А.И. ЕМЕЦ¹, кандидат биологических наук; В.Г. МАТУСОВ¹;

А.Ю. НЫПОРКО¹, кандидат биологических наук;

Е.С. НАДЕЖДИНА^{2,3}, доктор биологических наук;

Н.Ю. ШАШИНА³; Я.Б. БЛЮМ¹, доктор биологических наук

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

² Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия

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

Введение

Протеинкиназа MAST2 (*microtubule associated serine/threonine protein kinase 2*) семейства MAST, принадлежит к группе цАМФ-, цГМФ-зависимых протеинкиназ и протеинкиназ С (AGC) и играет значительную роль в регуляции микротрубочек и клеточного цикла [7, 11]. У животных она отвечает за фосфорилирование дистрофина/урофина в клетках мозга, модуляцию их сродства к микротрубочкам и ассоциированным с ними белкам (БАМ), образование мультибелкового комплекса при созревании сперматозоидов, а также за взаимодействие с PTEN – регулятором клеточного роста и апоптоза [10, 11].

Считается, что у человека протеинкиназа MAST2 участвует в комплексе фосфорилирования белков микротрубочек посредством БАМ [11]. Взаимодействие MAST2 (Q6P0Q8) с микротрубочками происходит за счет двух доменов – киназного и PDZ (PROSITE: PDOC50106, область 948-1212 аминокислотных остатков) [8, 11]. PDZ домены служат для контакта трансмембранных белков с цитоскелетом, что в свою очередь, обеспечивает фиксированное положение сигнальных комплексов [8].

Несмотря на фундаментальную роль протеинкиназ MAST2 в животных клетках, их растительных гомологи долгое время оставались неизвестными. Недавно нами было показано существование потенциальных гомологов протеинкиназы MAST2 человека у высших растений [1]. Соответственно целью настоящей работы явился расширенный поиск растительных гомологов MAST2, основанный на идентификации характерного для данной группы протеинкиназ комплекса каталитического (S_TKc) и вспомогательного (S_TK_x) доменов.

Объекты и методы исследования

Для поиска растительных гомологов протеинкиназ, ассоциированных с микротрубочками, использовалась аминокислотная последовательность каталитического комплекса (домены S_TKc и S_TK_x) протеинкиназы MAST2 (Q6P0Q8) человека (*Homo*

sapiens). Сканирование базы данных UniProt выполнялось в BLASTp (SIB BLAST Network Service) [9] с применением весовой матрицы BLOSUM62 при E threshold = 10 (количество случайных выравниваний анализируемой последовательности), активной фильтрации низкоструктурированных областей и гепированных выравниваний. Отбор растительных гомологов осуществлялся на основании таких показателей, как процент идентичности, процент сходства и случайная ожидаемость этих результатов (E-value) [2].

Границы доменов определяли с помощью инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [6]. Множественные выравнивания выполняли в программе ClustalX (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) с применением серии матриц BLOSSUM [5]. Консервативность функционально важных положений оценивалась на основании сравнения с исходной последовательностью протеинкиназы MAST2 человека (www.expasy.org: Q6P0Q8). Доменная архитектура растительных гомологов анализировалась с применением сетевого инструмента SMART [6].

Для реконструкции пространственной структуры исследуемого белка применяли методы гомологичного (профильного) моделирования [4]. В качестве матрицы свёртки использовали пространственную структуру цАМФ-зависимой протеинкиназы из свиньи (P36887; pdb: 1CDK).

Результаты и обсуждение

Сканирование (BLASTp) базы данных UniProt [9] против аминокислотной последовательности каталитического комплекса (S_TKc + S_TK_x) протеинкиназы MAST2 *Homo sapiens* выявило 34 потенциальных растительных гомолога: 5 из *Vitis vinifera* L. (A7PHB5; A7QWR7; A7NTE9; A7NXD3; A5BWH0), 7 из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Q9LE81; Q94F38; Q9MB45; Q9LV15; Q8GZ40; Q9LP76; Q9MAJ4), 6 из *Oriza sativa* ssp. *japonica* (Q9AUR3; Q10E10; B9FB59; Q2QM12; B9GEC7; Q10E09), 2 из *O. sativa* ssp. *indica* (A2XLA4; B8BN29), 1 из *Medicago truncatula* (Q32YB5), 4 из *Physcomitrella patens* ssp. *patens* (A9TWY7; A9TUB0; A9TQ65; A9T694), 5 из *Populus balsamifera* ssp. *trichocarpa* (Torr. et A.Gray) Brayshaw (B9I4L4; B9I2C4; B9IEF3; B9HKH3; B9GRP0), 1 из *Zea mays* L. (C0PG45), 3 из *Ricinus communis* L. (B9T5A7; B9R7R7; B9R9Q3) (табл.) Все обнаруженные белки депонированы в неаннотированной базе данных транслированных последовательностей TrEMBL и описаны либо как белки с неизвестной функцией, либо как потенциальные серин/ треониновые протеинкиназы, либо потенциальные AGC и IRE протеинкиназы (табл.).

Результаты анализа доменной архитектуры с помощью сетевого инструмента SMART подтвердили наличие характерного для семейства протеинкиназ AGC дополнительного S_TK_x домена [3, InterPro: SM00133 S_TK_x] у 17 из найденных белков: A7PHB5, A7NTE9, A7NXD3, A5BWH0 (*V. vinifera*); Q9MB45, Q9LV15, Q94F38, Q8GZ40 (*A. thaliana*); A9TQ65, A9TUB0, A9T694 (*P. patens* ssp. *patens*); B9I2C4, B9IEF3, B9HKH3, B9GRP0 (*P. balsamifera* ssp. *trichocarpa*); B9T5A7, B9R7R7 (*R. communis*). Результаты анализа последовательностей остальных гомологов также выявили наличие S_TK_x доменов, идентифицированных на основании сходства аминокислотных последовательностей и наличия мотивов, консервативных для доменов S_TK_x [3]. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей комплекса каталитических доменов (S_TKc + S_TK_x) протеинкиназы MAST2 человека и обнаруженных растительных гомологов, а также данные отчета BLASTp-сканирования показали, что ближайшими растительными гомологами MAST2 человека являются белки с ранее неизвестной функцией из *V. vinifera* (A7PHB5) и *P. balsamifera* ssp. *trichocarpa* (B9I4L4) (рис. 1). При этом максимальное сходство консенсусных областей каталитических доменов эталонной последовательности и растительного гомолога наблюдалось в случае белка с неизвестной функцией A7PHB5 из винограда (идентичность – 48%, при 67%-ном сходстве).

Таблица

Результаты поиска растительных гомологов протеинкиназы MAST2, участвующей в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления

UniProt	Предполагаемая функция	Вид	Длина альбиноса	Вес выравнивания	E-value	Идентичность (%)	Сходство	Профиль	Текущий статус спецификации
A7PEB5	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	305	2e-81	48	67	0	G3V1V1000178830001	
B9I4L4	Serine/threonine-protein kinase**	<i>P. trichocarpa</i>	320	305	4e-81	49	65	5	POPIRDRAFT_806679
Q9LE81	IRE Serine/threonine-protein kinase**	<i>A. thaliana</i>	321	303	1e-80	48	65	5	IREOR_A5g62310
A7QWR7	AGC protein kinase**	<i>V. vinifera</i>	318	303	1e-80	49	65	4	G3V1V100018775001
B9I2C4	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	321	301	7e-80	46	63	4	POPIRDRAFT_806321
Q9AUR3	AGC protein kinase*	<i>O. sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	323	299	2e-79	47	63	5	OSNINB5003NM16_3
Q10E10	AGC protein kinase*	<i>O. sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	323	299	2e-79	47	63	5	Os03g0711800
B9PH59	AGC protein kinase*	<i>O. sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	323	299	2e-79	47	63	5	OsJ_12320
A2XLA4	AGC protein kinase*	<i>O. sativa</i> ssp. <i>indica</i>	323	299	2e-79	47	63	5	OsI_13249
Q3ZYB5	Nodule-specific IRE-like*	<i>M. truncatula</i>	322	299	3e-79	48	63	6	MTRE
COP945	Putative uncharacterized protein*	<i>Z. mays</i>	323	299	3e-79	47	64	5	ZM_BF60371B12
Q2QM12	IRE S-TKc protein kinase**	<i>O. sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	321	298	6e-79	48	64	4	OsJ_280621500
B3BN29	AGC protein kinase*	<i>O. sativa</i> ssp. <i>indica</i>	321	298	6e-79	48	64	4	OsI_39164
B9I5A7	AGC protein kinase*	<i>R. communis</i>	321	296	1e-78	46	63	4	RCOM_0034220
Q94F38	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	316	296	2e-78	48	64	3	At1g34907TIN15_9
B9JFC7	AGC protein kinase*	<i>Oryza sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	321	296	2e-78	48	63	4	OsJ_36911
Q9MB45	IRE homolog***	<i>A. thaliana</i>	321	295	3e-78	47	66	4	IREH1
Q9LY5	IRE homolog, protein kinase-like**	<i>A. thaliana</i>	321	295	3e-78	47	66	4	MEB5_7
B9K7R7	AGC protein kinase*	<i>R. communis</i>	316	295	5e-78	46	64	3	RCOM_1593890
B9EF3	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	321	295	5e-78	46	62	4	POPIRDRAFT_824614
B9EQQ3	S-TKc-protein kinase**	<i>R. communis</i>	320	293	1e-77	46	64	5	RCOM_1499970
Q8GZ40	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	321	292	3e-77	46	65	4	At3g17830MEB5_7
A3NTE9	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	319	290	2e-76	46	63	4	G3V1V10014640001
A2TWY7	AGC protein kinase*	<i>P. patens</i> ssp. <i>patens</i>	325	282	2e-74	43	60	6	PTTADRAFT_132077
A9TUB0	AGC protein kinase*	<i>P. patens</i> ssp. <i>patens</i>	324	281	4e-74	44	60	5	PTTADRAFT_130879
A2IQ65	AGC protein kinase*	<i>P. patens</i> ssp. <i>patens</i>	324	281	4e-74	45	62	5	PTTADRAFT_148834
A2I694	AGC protein kinase*	<i>P. patens</i> ssp. <i>patens</i>	325	281	4e-74	44	60	6	PTTADRAFT_140919
Q10E09	AGC protein kinase*	<i>Oryza sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	323	276	1e-72	44	61	8	LOC_Os03g50390
Q9LP76	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	352	271	4e-71	43	58	13	TIN15_10
Q9MAJ4	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	342	270	1e-70	44	59	10	F27F5_23
B9HKH3	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	335	242	3e-62	39	57	8	POPIRDRAFT_766459
B93RP0	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	332	240	1e-61	39	57	9	POPIRDRAFT_754158
A7NED3	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	336	238	5e-61	39	56	9	G3V1V10000255001
A5BWH0	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	336	238	5e-61	39	56	9	VITSV_001730

Примечание: согласно данным InterPro ("Информатор БиоМЛН" InterPro)

Высокая степень сходства первичных последовательностей каталитических доменов белка с неизвестной функцией A7RHB5 из винограда и протеинкиназы MAST2 человека делает первую оптимальным кандидатом для реконструкции пространственной структуры по гомологии.

Ввиду отсутствия информации о пространственной структуре эталонной протеинкиназы MAST2 человека, пространственная структура каталитического домена A7RHB5, названного нами GMLK (Grape MAST2-Like Kinase), была реконструирована с использованием в качестве матрицы каталитического домена цАМФ-зависимой протеинкиназы из свиньи (*Sus scrofa*) (pdb: 1CDK, Swiss-Prot: KAPCA_PIG, UniProt: P36887, рис. 2).

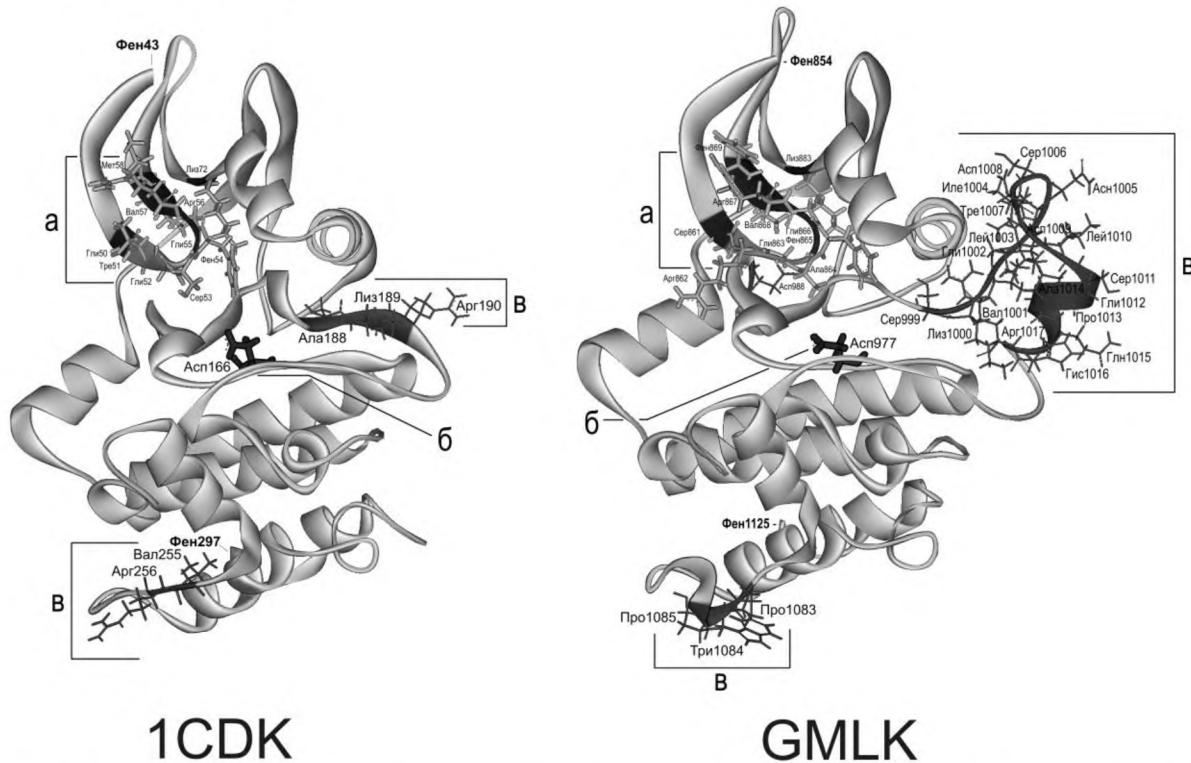


Рис. 2. Пространственная структура каталитических доменов цАМФ-зависимой протеинкиназы из свиньи (*Sus scrofa*) (pdb: 1CDK) и ее растительного гомолога – GMLK (Grape MAST2-Like Kinase) из *Vitis vinifera*: а – область связывания АТФ (NP_BIND ATP), б – активный сайт, в – вариабельные области

Уровень идентичности последовательностей каталитических доменов матрицы (1CDK) и целевого белка (A7RHB5) составляет 40,9% при 66,8%-ном сходстве. Это является достаточным для корректного предсказания трёхмерной структуры по гомологии [4]. Интересно то, что, несмотря на имеющиеся различия в доменной архитектуре матрицы и целевого белка, а также наличие дополнительной петли из 15 аминокислот в каталитическом домене белка A7RHB5, границы каталитических доменов обоих белков совпадают.

Обнаружено, что расхождение в пространственных структурах соответствующих полным последовательностям каталитических доменов по всей длине цепей составляет 1,63 Å. Наиболее вариабельными участками в структуре GMLK оказались области петель, соответствующих доменам Сер-999 – Арг-1017 и Про-1083 – Про-1085 в аминокислотной последовательности цАМФ-зависимой протеинкиназы свиньи (P36887; pdb: 1CDK). Определённая вариабельность также наблюдается в области остатка Асп-988 (соответствует Асп-1777 у 1CDK) и, что наиболее интересно, в области Арг-862 – Ала-864

(Тре-51 – Сер-53 у 1CDK), которая входит в область нуклеотид-связывающей петли. Впрочем, последний факт вполне объясним, учитывая упомянутую замену Тре-51 на Арг-862 в начале нуклеотид-связывающей петли. Кроме того, наблюдается консервативность дополнительного остатка Лиз-883 (Лиз-72 – у 1CDK) АТФ-связывающего центра и активного центра (акцептор протонов) – Асп-977 (аналог у 1CDK – Асп-166). Также, у GMLK отсутствует модифицированный треонин, соответствующий положению Тре-197 у 1CDK. Следует отметить, что у исходной протеинкиназы MAST2 человека, этот остаток также отсутствует, а модификации треонина известны только для остатков треонина, находящихся вне катализитического домена.

Выводы

На основании гомологии последовательности катализитического комплекса протеинкиназы MAST2 из *Homo sapiens*, участвующей в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции клеточного цикла, обнаружено 34 растительных гомолога. Анализ результатов BLASTp-сканирования базы данных UniProt и результаты множественных выравниваний последовательностей катализитических комплексов показали, что ближайшими растительными гомологами протеинкиназы MAST2 из *H. sapiens* являются белки с ранее неизвестной функцией: A7PHB5 из *V. vinifera* и B9I4L4 из *P. balsamifera ssp. trichocarpa*. Реконструкция пространственной структуры катализитического домена протеинкиназы A7PHB5 из *V. vinifera* подтвердила высокое сходство ее катализитического домена и катализитических доменов группы животных MAST2-подобных цАМФ-зависимых протеинкиназ.

Данная работа выполнена в рамках проекта 08-04-90454: «Сравнительный анализ киномов микротрубочек животных и высших растений» (Совместный конкурс НАН Украины – РФФИ 2008-09 г.г.).

Список литературы

1. Биоинформационный поиск растительных протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток / Карпов П.А., Надеждина Е.С., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко А.Ю., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. // Цитол. и генетика. – 2009. – № 3. – С. 63-79.
2. Claverie J.-M., Notre Dame C. Bioinformatics for dummies. – New York: Wiley Publishing, 2007. – 436 p.
3. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains // Science. – 1988. – V. 241, N 4861. – P. 42-52.
4. Krieger E., Nabuurs S.B., Vriend G. Homology modeling // Structural Bioinformatics / Ed. by Bourne P.E., Weissig H.: John Wiley & Sons. – 2003. – P. 509-524.
5. Clustal W and Clustal X version 2.0 / Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGgettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. // Bioinformatics. – 2007. – V. 23. – P. 2947-2948.
6. SMART 5: domains in the context of genomes and networks / Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P. // Nucl. Acids Res. – 2006. – V. 34 (Database issue). – P. 257-260.
7. The protein kinase complement of the human genome / Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. // Science. – 2002. – V. 298, № 5600. – P. 1912-1934.
8. Ranganathan R., Ross E.M. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes // Curr. Biol. – 1997. – V. 7. – P. 770-773.
9. UniProt Consortium. The universal protein resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. – 2008. – V. 36 (Database issue). – P. 190-195.
10. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and

phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases / Valiente M., Andrés-Pons A., Gomar B., Torres J., Gil A., Tapparel C., Antonarakis S.E., Pulido R. // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, N 32. – P. 28936-28943.

11. 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. – V. 13, N 12. – P. 7625-7635.

ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ГМ-РОСЛИН

С.Д. РУДИШИН, *кандидат біологічних наук*
Університет «УКРАЇНА», Вінниця

Вступ

Аналітичний погляд на початок ХХІ століття свідчить, що дві глобальні проблеми – харчування та екологічна безпека – стають для цивілізації найголовнішими. Усі інші – економічні, енергетичні, технологічні, демографічні, медичні, соціальні, військові, психологічні – прямо або опосередковано пов’язані з ними. Сьогодні виробництво сільськогосподарської продукції досягає близько 5 млрд. тонн на рік. Щоб збільшити цей показник вдвічі і забезпечити їжею у 2025 р. майже 9 млрд. населення Землі, традиційних способів буде недостатньо. Звідси, створення і впровадження генетично модифікованих організмів (ГМО) є науково-політичною проблемою.

Необхідно констатувати, що засоби масової інформації, а не академічні наукові журнали, з самого початку робіт у цьому напрямку наділили ГМО презумпцією вини. Звідси ГМ рослини вважаються потенційно небезпечними доти, доки не доведена їх повна безпечність. Зауважимо, що менший запас у пересічного українця біологічних знань, то більше паніка населення від жаху статей журналістів. Генетики-професіонали більш спокійні і толерантні [1, 2, 4, 8, 9]. За таких умов особливо важливим стає професійне розуміння проблеми, здійснення заходів щодо посилення біобезпеки на державному рівні, захисту громадян від можливих ризиків використання ГМО. Екологічна і біологічна науки, освіта і просвіта стають одним з головних важелів екологічно-безпечноного (збалансованого) розвитку будь-якої країни, інструментом екологізації людської діяльності, вдосконалення виробництва і природокористування на засадах коеволюційної прарадигми з урахуванням можливостей біосфери. Високий рівень біологічних та екологічних знань сьогодні є основним фактором підвищення якості і безпеки життя, збереження і відновлення потенціалу природи [7]. Крім того, важливо оцінити місце України в процесі розвитку новітніх біотехнологій та її власні економічні інтереси як потужного виробника продовольства.

Обговорення

За останні 25 років біотехнологія, використовуючи рекомбінантні (гібридні) ДНК, перетворилася в унікальний науковий метод дослідження і одночасно у виробництво продукції сільського господарства, харчування. ДНК-технології дозволяють біотехнологам відбирати і вводити в рослини конкретні гени стійкості до шкідників, хвороб, гербіцидів, холоду, нестачі вологи, засolenня, кислотності ґрунту тощо. Відомо понад 20 способів проникнення та міжвидової міграції генетичних елементів; до їх складу зараховують трансформацію, трансдукцію, транспозони, віруси, нестатевий обмін хромосомами, утворення симбіотичних асоціацій тощо. Технологія створення ГМ-рослин складається з багатьох етапів, серед яких можна виділити такі: 1) одержання конкретних генів, створення векторів; 2) трансформація рослинних клітин за допомогою бактеріальних плазмід; 3) підтвердження трансформації молекулярно-генетичними методами – виявлення