

С.А. БРЯНЦЕВА¹, Е.С. ГАВРЮШИНА¹,
А.И. ЕМЕЦ³, П.А. КАРПОВ³, Я.Б. БЛЮМ³,
Ю.Ф. ДРЫГИН¹, Е.С. НАДЕЖДИНА²

¹ Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва

² Институт белка РАН, Москва

³ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

MAST2-ПОДОБНАЯ ПРОТЕИНКИНАЗА ИЗ ВИНОГРАДА *VITIS VINIFERA*: КЛОНИРОВАНИЕ КДНК, КОДИРУЮЩЕЙ КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ДОМЕН



*Ранее в рамках проекта по идентификации протеинкиназ, фосфорилирующих белки микротрубочек растений, с помощью биоинформационного подхода нами были обнаружены гены предполагаемых гомологов ассоциированной с микротрубочками в животных клетках протеинкиназы MAST2. Соответственно, ген наиболее близкого гомолога MAST2, предполагаемого белка, названного нами GMLK (Grape MAST2-Like Kinase, A7NTE9_VITVI), был идентифицирован в геноме винограда *Vitis vinifera*. В настоящей работе приводятся результаты успешного клонирования кДНК белка GMLK (A7NTE9) из листьев винограда сорта Пино Нуар.*

© С.А. БРЯНЦЕВА, Е.С. ГАВРЮШИНА, А.И. ЕМЕЦ,
П.А. КАРПОВ, Я.Б. БЛЮМ, Ю.Ф. ДРЫГИН,
Е.С. НАДЕЖДИНА, 2010

Введение. Микротрубочки играют принципиально важную роль в функционировании как животных, так и растительных клеток. Они необходимы для осуществления митоза и мейоза, для обеспечения внутриклеточного транспорта и позиционирования органелл, а также играют существенную роль в поддержании формы клеток. В цитоплазме микротрубочки расположены неслучайно: они образуют системы, выглядящие как сети или пучки. Эти системы могут быть плотными, правильно организованными подобно веретену деления или достаточно рыхлыми, как в большинстве интерфазных животных клеток [1]. В растительных клетках микротрубочки обычно расположены регулярно: они ориентируются относительно длинной оси клеток [2]. Нарушение системы микротрубочек влияет на клеточную морфологию [3]. Для функционирования системы микротрубочек важна как структура их сети, так и динамика отдельных микротрубочек, составляющих сеть. Микротрубочки — очень динамичные структуры, их сети легко перестраиваются в ответ на различные воздействия на клетки [4]. Динамика микротрубочек и перестройки их сетей могут регулироваться с помощью обратимого фосфорилирования составляющих микротрубочки белков [5–7]. Особенно ярко паттерн фосфорилирования белков микротрубочек изменяется при коренной перестройке их сети во время перехода к митозу [8–10], но он важен также и в интерфазе [11].

Ранее мы продемонстрировали, что тубулин растительных микротрубочек подвергается интенсивному фосфорилированию при помощи различных типов серин/треонин-протеинкиназ [12–14], а также тирозинкиназ [15, 16]. Не вызывает сомнения, что фосфорилирование и других белков, из которых состоят микротрубочки растений, также катализируется различными протеинкиназами [17–19]. Хотя некоторые типы протеинкиназ, регулирующих функции микротрубочек растений, могут быть идентифицированы с помощью селективных ингибиторов [20, 21], их спектр остается пока не изученным. Следовательно, идентификация набора протеинкиназ, составляющих кинем микротрубочек, представляет собой актуальный вопрос. Показано, что некоторые белки, ассоциированные с тубулином микротрубочек, обладают известной степенью сходства у животных и растений [22]. Консервативен и сам ту-

булин. Соответственно, можно предположить и консервативность многих типов протеинкиназ, регулирующих структуру и функционирование микротрубочек у животных и растений.

У животных известны около 20 протеинкиназ, ассоциированных с микротрубочками и/или фосфорилирующих различные белки микротрубочек — «микротрубочковых» протеинкиназ. В своей предыдущей работе мы предприняли биоинформационный поиск генов растительных протеинкиназ на основании гомологии «микротрубочковым» протеинкиназам животных и человека [23–26]. Одной из таких протеинкиназ кинома микротрубочек человека является MAST2 (UniProt: MAST2_HUMAN; Q6P0Q8; синонимы: KIAA0807, MAST205) [27, 28]. Гомологи этой протеинкиназы имеются во многих высших растениях [24–26]. Наиболее близким гомологом MAST2 оказался предполагаемый белок GMLK (Grape MAST2-Like Kinase, A7NTE9_VITVI) из винограда *Vitis vinifera* [24, 26]. Предполагаемый белок GMLK насчитывает 423 аминокислотных остатка, и его ген располагается в хромосоме 18 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=29760&chr=18>).

Цель настоящей работы заключалась в клонировании кДНК, кодирующей белок GMLK (A7NTE9_VITVI), из листьев винограда сорта Пино Нуар для дальнейшего изучения свойств этого белка.

Материалы и методы. Выделение РНК. РНК выделяли из листьев винограда сорта Пино Нуар (Pinot Noir), собранных с растений коллекции винсовхоза «Ливадия» (Украина, Крым) и доставленных в лабораторию в свежем виде в течение 4 дней. Из вымытых и просушенных листьев вырезали кружки диаметром 3 см, замораживали их в жидком азоте и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких месяцев.

Выделение РНК проводили по методу [29] с некоторыми модификациями. Для приготовления всех растворов использовали свободную от РНКаз тридистиллированную воду. Кружки, вырезанные из листьев, растирали в ступке с жидким азотом, 400 мг растертой в пудру ткани быстро помещали в пробирку на 2 мл, немедленно добавляли 1,4 мл прогретого до $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ буфера ХТ (0,2 М бората натрия, 0,03 М ЭДТА, 1 % SDS, 1 % дезоксихолата натрия, 2 % β -мер-

каптоэтанола, 0,5 % спермидина, 1 % Тритона X-100, 2 % PVP-40 (молекулярная масса 36 000), рН 9,0), тщательно перемешивали и выдерживали 5 мин при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Лизат охлаждали, добавляли 1 мг протеиназы К, инкубировали 1 ч при $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ при аккуратном перемешивании. Затем добавляли 2 М КСl до конечной концентрации 160 мМ, осторожно перемешивали, чтобы не разрушать ДНК, и выдерживали пробирку 45 мин в ледяной бане. Центрифугировали 15 мин при $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12700 об/мин (15 000 g) на центрифуге Eppendorf 5415 D (в дальнейшем условия центрифугирования были такими же). Супернатант переносили в новую пробирку на 2 мл, добавляли $1/3$ объема 8 М LiCl до конечной концентрации 2 М и β -меркаптоэтанол до конечной концентрации 1 % (v/v), РНК осаждали в ледяной бане в течение ночи. Центрифугировали 25 мин, после чего отбирали супернатант. Затем два раза промывали осадок 1 мл холодного раствора 2 М LiCl, центрифугируя 15 мин. Суспендировали осадок в 600 мкл 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, тщательно перемешивая при комнатной температуре. Добавляли $1/10$ объема 2 М CH_3COOK , рН 5,5, перемешивали и выдерживали 10 мин на ледяной бане. Центрифугировали 15 мин для удаления нерастворимого материала, переносили супернатант в новую пробирку. РНК переосаждали, добавляя 0,9 объема холодного изопропанола, выдерживали 1 ч при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, центрифугировали 25 мин и промывали осадок холодным 80%-ным этанолом. Осадок высушивали в вакуум-эксикаторе и растворяли в 50 мкл тридистиллированной воды.

Получение библиотеки кДНК и специфической кДНК. Для получения первой цепи ДНК использовали обратную транскриптазу Superscript II (Invitrogen) согласно инструкции производителя. Для получения специфической кДНК использовали последовательно две пары праймеров: 1) прямой ATG TCA ACT CCT STA CAT CCC TTA C и обратный AGT GTC TCG AGA TTT GGA TGG AC; 2) прямой AAA GAA TTC GAT GTC AAC TCC TCT ACA TCC C и обратный ATA GGT ACC AGT GTC TCG AGA TTT GGA TGG. Вторая пара праймеров содержала рестриктные сайты EcoRI и KpnI для клонирования. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) ставили в две стадии. Вначале проводи-

ли реакцию с 2 мкл библиотеки кДНК винограда и первой парой праймеров, 1 цикл: 94 °С 30 с, 49 °С 30 с, 2–40 циклов, 72 °С 80 с. Затем брали 2 мкл смеси из этой реакции и ставили новый ПЦР со второй парой праймеров в тех же условиях, но проводили 30 циклов амплификации.

Секвенирование ДНК осуществляли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ.

Клонирование кДНК и ее экспрессия в культурируемых животных клетках. Полученную специфическую кДНК (ПЦР-продукт) встраивали в вектор pEGFP-C1 («Clontech», США) по сайтам EcoRI/KpnI. Использовали рестриктазы и лигазу фирмы «Fermentas» (Литва). Полученную плазмиду pEGFP-MAST2HP наращивали в *Escherichia coli* (штамм DH-5α), очищали с помощью набора QIAprep Spin MiniPrep («Qiagen», Германия) по инструкции производителя.

Клетки Vero (клетки почки зеленой мартышки) культивировали в среде DMEM/F12 («PanEco», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для трансфекции использовали реагент Lipofectamin 2000 («Invitrogen», США). Через 20 ч после трансфекции клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом и проводили иммуноокрашивание микротрубочек с помощью моноклональных антител DM-1a к тубулину («Sigma-Aldrich», США) и козьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с родамином («Jackson Immunoresearch», США). Препарат просматривали в микроскопе Axiovert 2000M («Carl Zeiss», Германия) и фотографировали с помощью цифровой видеокамеры AxioCam HRc («Carl Zeiss»), управляемой программой AxioVision 3.1 («Carl Zeiss Vision»).

Результаты исследований и их обсуждение. Для клонирования кДНК белка GMLK (A7NTE9_VITVI) нами было решено выделить РНК из листьев винограда, изготовить библиотеку кДНК, с помощью ПЦР амплифицировать специфическую кДНК, кодирующую белок

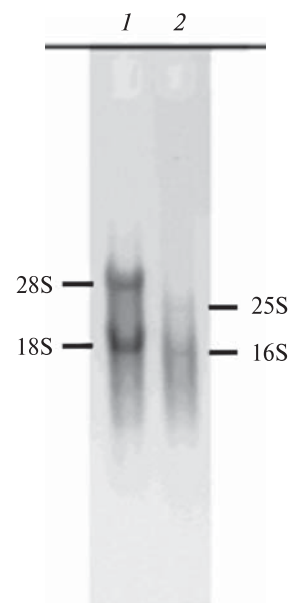


Рис. 1. Электрофорез в 1%-ной агарозе с 0,5 мкг/мл бромистого этидия в ТВЕ-системе: 1 – суммарная РНК клеток асцитной карциномы Krebs II (3 мкг); 2 – суммарная РНК из листьев винограда (1 мкг). Обозначена рибосомная РНК

GMLK, клонировать ее в векторе для экспрессии в животных клетках и, трансфицировав животные клетки, проверить, способен ли белок синтезироваться в растворенном виде и не токсичен ли он для клеток. При осуществлении этого плана для начала была предпринята попытка выделения РНК из листьев винограда с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», Германия). Эта попытка оказалась безуспешной – выход РНК был очень небольшим (менее 5 нг/мкл), и рибосомную РНК не было видно на электрофорезе. Впрочем, подобные результаты были получены с тканями винограда при применении набора RNeasy Plant и другими авторами [29, 30]. Поэтому нами было решено использовать другие методы выделения РНК, в частности метод, изложенный в работе Moser et al. [29], с внесением некоторых модификаций. Выделение РНК согласно протоколу, описанному в «Материалах и методах», позволило получить около 10 мкг РНК в конечном препарате из 400 мг ткани, причем РНК в процессе выделения избавлялась от загрязняющих ее пигментов. Судя по результатам электрофореза, РНК имела удовлетворительное качество, несмотря на некоторую степень деградации 25S рибосомной РНК (рис. 1).

Выделенный препарат РНК листьев винограда использовали для получения библиотеки кДНК. Для этого проводили реакцию с об-

MAST2HP 1 MSTPLHPLHKERTSIDDFEIIKPISRGAFGKVF LARKRTTGDLFAIKVLK K LDMIRKNDI 60
A7NTE9 1 MSTPLHPLHKERTSIDDFEIIKPISRGAFGKVF LARKRTTGDLFAIKVLK K LDMIRKNDI 60

MAST2HP 61 ERILAERNILITVRNPFVVRFFYSFTCRDNVYLVMEYLN GGDLYSLLRKL SCLEEDVARI 120
A7NTE9 61 ERILAERNILITVRNPFVVRFFYSFTCRDNVYLVMEYLN GGDLYSLLRKL SCLEEDVARI 120

MAST2HP 121 YIAELVLALEYLHSLGIVHRDLKPDNIIAH DGHIKLTD FGLSKIGLINSTVDLSGPETD 180
A7NTE9 121 YIAELVLALEYLHSLGIVHRDLKPDNIIAH DGHIKLTD FGLSKIGLINSTVDLSGPETD 180

MAST2HP 181 GSTDAFLDSLNLHTQQTDDRHQQSAVGT PDYL APEILLGTEHG YAADWWSVGIILFELIT 240
A7NTE9 181 GSTDAFLDSLNLHTQQTDDRHRQSAVGT PDYL APEILLGTEHG YAADWWSVGIILFELIT 240

MAST2HP 241 GVXPFTA EHP EII FDNILNRKIPWPSVPGDMSYEAQDLINRFLIHDPDLRLGANGS SEVK 300
A7NTE9 241 GVPPFTA EHP EII FDNILNRKIPWPSVPGDMSYEAQDLINRFLIHDPDLRLGANGT SEVK 300

MAST2HP 301 THPFFKGVNWDTLALQKAVFVPQPSADDTSYFVSRY SQIPSGLPDEQDCSDSATD TSDL 360
A7NTE9 301 THPFFKGVNWDTLALQKAVFVPQPSADDTSYFVSRY SQIPSGLPDEQDCSDSATD SSDL 360

MAST2HP 361 YNSNGLEMDECGDLAEFDSSPLNLSLINF S FKNLSQLASIN YDVL LQTGKDPTKCSPSKS 420
A7NTE9 361 YNSNGLEMDECGDLAEFDSSPLNLSLINF S FKNLSQLASIN YDVL LQTGKDPTKCSPSKS 420

MAST2HP 421 RDT 423
A7NTE9 421 RDT 423

a

MAST2HP 10 KERTSIDDFEIIKPISRGAFGKVF LARKRTTGDLFAIKVLK K LDMIRKNDIERILAERNI 69
K+ S +DFE IK IS GA+G VFL R ++T FA+K + K ++I +N I++ ER+I
HuMAST2 504 KKTPSEEDFETIKLISNGAYGAVFLVRHKSTRQR FAMKKINKQNLI LRNQIQQAFVERDI 563

MAST2HP 70 LITVRNPFVVRFFYSFTCRDNVYLVMEYLN GGDLYSLLRKLSCLEEDVARIYIAELVLAL 129
L NPFVV F SF + ++ +VMEY+ GGD +LL+ + L D+ R+Y AE VLAL
HuMAST2 564 LTFAENPFVVMFC SFDTKRHL CMVMEYVEGGDCATLLKNIGALPDMVRLYFAETVLAL 623

MAST2HP 130 EYLHSLGIVHRDLKPDNIIAH DGHIKLTD FGLSKIGLINSTVDLSGPETD GSTDAFLDS 189
EYLH+ GIVHRDLKPDN+LI GHIKLTD FGLSKIGL++ T +L + FLD
HuMAST2 624 EYLHNYGIVHRDLKPDNLLITSMGHIKLTD FGLSKIGLMSLT TNLY EGHIEKDAREFLD- 682

MAST2HP 190 LNLHTQQTDDRHQQSAVGT PDYL APEILLGTEHG YAADWWSVGIILFELITGVXPFTA EHP 249
+ GTP+Y+APE++L +G DW++GIIL+E + G PF +
HuMAST2 683 -----KQVCGTPEYIAPEVILRQGYGKPV DWWAMGIILYEF LVGCV PFFGDT 729

MAST2HP 250 PEIIFDNILNRKIPWPSVPGDMSYEAQDLINRFLIHDPDLRLGANGS SEVKTHPFFKGVN 309
PE +F +++ +I WP + +AQDL ++ L +P RLG + EVK H PFF G++
HuMAST2 730 PEELFGQVISDEIVWPEGDEALPPDAQDLT SKLLHQNPLERLGTGSAYEVKQH PFFFTGLD 789

MAST2HP 310 WDTLALQKAVFVPQPSADDTSYF---VSRYSQIPSGLPDEQDCSDSATD TSDLYSNSGL 366
W L QKA F+PQ +S DDTSYF RY + S DE++ S+
HuMAST2 790 WTGLLRQKA E FIPQLESEDDTSYFDTRSER YHHMDS --EDEEEVSE----- 833

MAST2HP 367 EMDECGDLAEFDSSPLNLSLINF S FKNLSQLASIN YDVL LQTGKDPTKCSPSKSRD 422
D C ++ +F S + + S + LS L + PTK S S+ ++
HuMAST2 834 --DGCLEIRQFSSCSPRFNKVYSSMERLSLLEE-----RRTPPPTKRSLSSEEKE 880

б

Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей клонированного белка MAST2HP и белка GMLK (A7NTE9) (а), а также протеинкиназы MAST2 человека HuMAST2 (фрагмент) (б). Выравнивание выполнено с помощью NCBI BLAST 2 сервиса с помощью программ [20]

ратной транскриптазой SuperScript, как описано в «Материалах и методах». По нашему предыдущему опыту, SuperScript дает гораздо лучшие результаты при получении библиотек кДНК, чем другие обратные транскриптазы.

Для изолирования специфической кДНК использовали ранее созданную библиотеку кДНК. После проведения первого раунда ПЦР (40 циклов с первой парой праймеров) ПЦР-продукт получался несколько гетерогенным. Поэтому использовали еще 30 циклов ПЦР со второй парой праймеров, что привело к получению четкой полосы ПЦР-продукта при его анализе в агарозном электрофорезе (данные не представлены). Результаты секвенирования ПЦР-продукта показали его однородность и соответствие целевому белку GMLK. После встраивания в вектор было проведено полное секвенирование встройки по обеим цепям ДНК, и его результаты подтвердили правильность встройки кДНК в вектор, а также наличие открытой рамки считывания по всей длине встройки, со стоп-кодоном в ее конце.

Клонированная нами кДНК и предсказываемый кодируемый белок (MAST2-homologous protein – MAST2HP) практически полностью совпадали по первичной структуре с белком GMLK (A7NTE9_VITVI) и кодирующей его кДНК (рис. 2). Нами было обнаружено семь точечных замен нуклеотидов, приводящих к четырем точечным заменам аминокислот. Эти расхождения могут быть следствием использования разных сортов винограда при клонировании GMLK и MAST2HP или же могут быть вызваны ошибками ПЦР при получении обоих образцов. Расхождения не затронули функционально важных участков каталитического киназного домена, входящего в состав MAST2HP.

Нами была также проведена экспрессия полученного конструкта в гетерологичной системе: в культивируемых клетках Vero (рис. 3). Продукт экспрессии, выявляемый по свечению зеленого флуоресцентного белка, достаточно равномерно распределялся по цитоплазме и ядру клеток, отмечались лишь небольшие тельца включения. Клетки, экспрессирующие конструкт, в своем большинстве не утрачивали жизнеспособности, они делились, что было видно по наличию пар клеток, связанных оста-

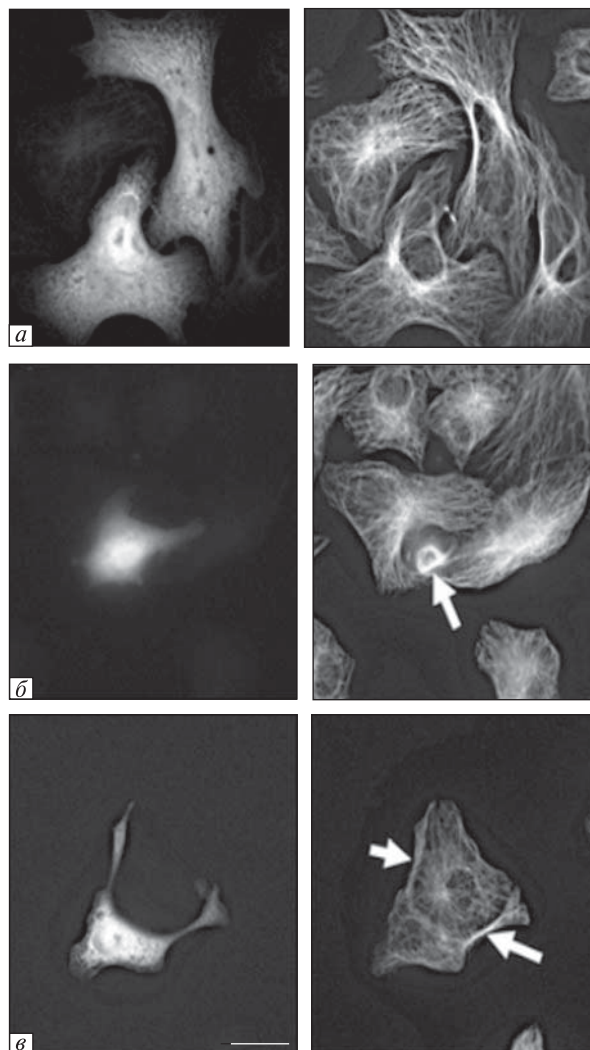


Рис. 3. Микротрубочки в культивируемых клетках Vero, экспрессирующих rEGFP-MAST2HP: *a* – пара клеток после деления, *б* – перестройка системы микротрубочек (стрелка), *в* – изменение формы клетки (отростки показаны стрелками). Слева – вид клеток во флуоресцентном канале для GFP, справа – вид клеток во флуоресцентном канале для родамина. Масштабная линейка – 20 мкм

точными тельцами (рис. 3, *a*). Система микротрубочек чаще всего не отличалась от контроля, однако иногда отмечали ее коллапс с образованием пучков микротрубочек (рис. 3, *б*). Нередко наблюдали изменение формы клеток – клетки образовывали длинные выросты (рис. 3, *в*). Таким образом, белок MAST2HP не является высокотоксичным для клеток, экспрессируется в растворенной форме даже в

гетерологичной системе и возможно, что действительно влияет на систему микротрубочек.

Ранее было показано, что гетерологичная экспрессия MAST205 в клетках животных приводит к полноценному функционированию этой киназы, однако при условии наличия киназного домена [32]. Делеция же киназного домена или доминант-негативная мутация в гене, кодирующем MAST205, нарушает ее функциональную активность.

Следовательно, можно предположить, что функции белка MAST2HP в гетерологичных клеточных системах могут реализовываться посредством зависящего от фосфорилирования механизма.

Известны также работы, в которых изучали функционирование другой группы связанных с микротрубочками протеинкиназ в гетерологичных растительных клеточных системах — Аврора-подобных протеинкиназ арабидопсиса [33]. Поэтому в дальнейшем для изучения свойств исследуемого белка в клетках растений нами планируется клонировать слитый с GFP MAST2HP в вектор pROC для агробактериальной трансформации.

Настоящая работа была выполнена в рамках двустороннего проекта — 08-04-90454 «Сравнительный анализ киномов микротрубочек животных и высших растений» (Совместный конкурс Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ-НАН 08-04-90454-Укр_а) и Национальной академии наук Украины (08-04-90454, номер госрегистрации 0108U004809) в 2008–2009 гг.

S.A. Bryantseva, E.S. Gavryushina,
A.I. Yemets, P.A. Karpov, Ya.B. Blume,
Yu.F. Drygin, E.S. Nadezhdina

MAST2-LIKE PROTEIN KINASE FROM GRAPE VINE *VITIS VINIFERA*: CLONING OF CATALYTIC DOMAIN cDNA

The aim of our work is the identification of protein kinases phosphorylating microtubule proteins in plant cells. Using bioinformatic approach, we found genes of putative homologues of microtubule-associated mammalian protein kinase MAST2 in higher plant genomes. The gene of closest MAST2 homologue, putative protein, named GMLK (Grape MAST2-Like Kinase, A7NTE9_VITVI), was found in grape *Vitis vinifera*. We report here the cloning of cDNA of GMLK (A7NTE9) from Pinot Noir grape vine leaves.

S.A. Брянцева, Е.С. Гаврюшина,
А.И. Емец, П.А. Карпов, Я.Б. Блум,
Ю.Ф. Дрыгин, Е.С. Надеждина

MAST2-ПОДІБНА ПРОТЕЇНКИНАЗА З ВИНОГРАДУ *VITIS VINIFERA*: КЛОНУВАННЯ КДНК, ЩО КОДУЄ КАТАЛІТИЧНИЙ ДОМЕН

Раніше у рамках проекту по ідентифікації протеїнкіназ, що фосфорилують білки микротрубочок рослин, за допомогою біоінформаційного підходу нами були виявлені гени передбачуваних гомологів асоційованої із микротрубочками у тваринних клітинах протеїнкінази MAST2. Відповідно, ген найбільш близького гомолога MAST2, передбачуваного білка, названого нами GMLK (Grape MAST2-Like Kinase, A7NTE9_VITVI), був ідентифікований у геномі винограду *Vitis vinifera*. У даній роботі наводяться результати успішного клонування кДНК білка GMLK (A7NTE9) із листя винограду сорту Піно Нуар.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wade R.H. On and around microtubules: an overview // Mol. Biotechnol. — 2009. — **43**, № 2. — P. 177–191.
2. Wasteney G.O. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells // Curr. Opin. Plant Biol. — 2004. — **7**, № 6. — P. 651–660.
3. Minc N., Bratman S.V., Basu R., Chang F. Establishing new sites of polarization by microtubules // Curr. Biol. — 2009. — **19**, № 2. — P. 83–94.
4. Lopus M., Yenjerla M., Wilson L. Microtubule Dynamics (Advanced Review) // Wiley Encyclopedia of Chemical Biology / Ed. T.P. Begley. — NJ: Wiley, 2009. — Vol. 3. — P. 153–160.
5. Hammond J.W., Cai D., Verhey K.J. Tubulin modifications and their cellular functions // Curr. Opin. Cell Biol. — 2008. — **20**, № 1. — P. 71–76.
6. Verhey K.J., Gaertig J. The tubulin code // Cell Cycle. — 2007. — **6**, № 17. — P. 2152–2160.
7. Westermann S., Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. — 2003. — **4**, № 12. — P. 938–947.
8. Fourest-Lieuvin A., Peris L., Gache V. et al. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1 // Mol. Biol. Cell. — 2006. — **17**, № 3. — P. 1041–1050.
9. Hong K.U., Kim H.J., Kim H.S. et al. Cdk1-cyclin B1-mediated phosphorylation of tumor-associated microtubule-associated protein/cytoskeleton-associated protein 2 in mitosis // J. Biol. Chem. — 2009. — **284**, № 24. — P. 16501–16512.
10. Kufer T.A., Nigg E.A., Silljé H.H. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle // Chromosoma. — 2003. — **112**, № 4. — P. 159–163.
11. Holmfeldt P., Stenmark S., Gullberg M. Interphase-specific phosphorylation-mediated regulation of tubulin

- dimer partitioning in human cells // *Mol. Biol. Cell.* — 2007. — **18**, № 5. — P. 1909–1917.
12. Blume Ya., Smertenko A., Ostapets N.N., Viklicky V., Draber P. Post-translational modifications of plant tubulin // *Cell Biol. Int.* — 1997. — **21**. — P. 918–920.
 13. Ben-Nissan G., Cui W., Kim D.-J. et al. Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules // *Plant Physiol.* — 2008. — **148**. — P. 1897–1907.
 14. Yemets A.I., Lloyd C., Blume Ya.B. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology* / Eds W.V. Baird, Ya.B. Blume, D. Breviario, A.I. Yemets. — Dordrecht : Springer, 2008. — P. 145–159.
 15. Blume Y., Yemets A., Sheremet Y. et al. Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on an *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells // *BMC Plant Biol.* — 2010. — **10**, № 1. — #29. [doi:10.1186/1471-2229-10-29.]
 16. Blume Ya.B., Yemets A.I., Sulimenko V. et al. Tyrosine phosphorylation of tubulin in plant cells // *Planta.* — 2008 — **229**, № 1. — P. 143–150.
 17. Liu B.-Q., Jin L., Zhu L., Li J., Huang S., Yuan M. Phosphorylation of microtubule-associated protein SB401 from *Solanum berthaultii* regulates its effect on microtubules // *J. Integr. Plant Biol.* — 2009. — **51**, № 3. — P. 235–242.
 18. Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y. et al. Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells // *Genes Dev.* — 2006. — **20**. — P. 1004–1014.
 19. Walia A., Lee J.S., Wasteneys G., Ellis B. Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells // *Plant J.* — 2009. — **59**, № 4. — P. 565–575.
 20. Шеремет Я.А., Емец А.И., Виссенберг К., Вербелен Ж.-П., Блюм Я.Б. Влияние ингибиторов серин/треонин протеинкиназ на морфологию корня *Arabidopsis thaliana* и организацию микротрубочек в его клетках // *Цитология.* — 2010. — **52**, № 5. — С. 389–398.
 21. 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.
 22. Карпов П.А., Блюм Я.Б. Bioinformatic search for plant homologues of animal structural MAPs in the *Arabidopsis thaliana* genome // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology* / Eds W.V. Baird, Ya.B. Blume, D. Breviario, A.I. Yemets. — Dordrecht : Springer, 2008. — P. 373–394.
 23. Карпов П.А., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко А.Ю., Надеждина Е.С., Блюм Я.Б. Биоинформационный поиск растительных гомологов Ste20-подобных серин/треониновых протеинкиназ // *Цитология и генетика.* — 2009. — **43**, № 6. — С. 68–77.
 24. Карпов П.А., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко А.Ю., Надеждина Е.С., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. Биоинформационный поиск растительных гомологов ассоциированной с микротрубочками протеинкиназы MAST2 // *Тр. Никит. бот. сада.* — 2009. — **131**. — С. 181–187. [http://www.nbuv.gov.ua/portal/Chem_Biol/znpdnds/2009_131.pdf]
 25. Карпов П.А., Надеждина Е.С., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныпорко Н.Ю., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б. Биоинформационный поиск растительных протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток // *Цитология и генетика.* — 2009. — **43**, № 3. — С. 63–79.
 26. Karpov P.A., Nadezhdina E.S., Yemets A.I., Matusov V.G., Nyporko A.Yu., Shashina N.Yu., Blume Ya.B. Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases // *BMC Genome.* — 2010. — **11**(Suppl 1): S14. — doi:10.1186/1471-2164-11-S1-S14.
 27. Garland P., Quraishie S., French P., O'Connor V. Expression of the MAST family of serine/threonine kinases // *Brain Res.* — 2008. — **1195**. — P. 12–19.
 28. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome // *Science.* — 2002. — **298**. — P. 1912–1934.
 29. Moser C., Gatto P., Moser M., Pindo M., Velasco R. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues // *Mol. Biotechnol.* — 2004. — **26**, № 2. — P. 295–299.
 30. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants // *Phytochem. Anal.* — 2008. — **19**, № 6. — P. 520–525.
 31. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucl. Acids Res.* — 1997. — **25**. — P. 3389–3402.
 32. Wang D., Lee H.J., Cooper D.S., Cebotaro L., Walden P.D., Choi I., Yun C.C. Coexpression of MAST205 inhibits the activity of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 // *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2006. — **290**, № 2. — F. 428–437.
 33. Demidov D., Van Damme D., 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**, № 3. — P. 836–848.

Поступила 20.11.09