

П.А. КАРПОВ, А.В. РАЕВСКИЙ, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
E-mail: karпов.p.a@gmail.com

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ ПРОТЕИНКИНАЗЫ BUB1 – КЛЮЧЕВОГО ЗВЕНА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ СБОРКИ ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ



С помощью биоинформационного поиска обнаружено 14 растительных гомологов протеинкиназы контрольной точки сборки веретена деления BUB1 животных, дрожжей и слизевиков. Показано, что ближайшими растительными гомологами протеинкиназ Bub1 являются белки с ранее неизвестной функцией XP_002274770.1 (CBI21878.1) из *Vitis vinifera*, EEC82122.1 из *Oryza sativa indica*, EEE67244.1 из *O. sativa japonica*, EEF44403.1 из *Ricinus communis*, CAL57156.1 из *Ostreococcus tauri*. Выполнена реконструкция и анализ пространственной структуры каталитических доменов белков EEC82122.1, EEE67244.1 и XP_002274770.1 (CBI21878.1), подтверждающие их принадлежность к протеинкиназам контрольной точки сборки веретена деления BUB1.

© П.А. КАРПОВ, А.В. РАЕВСКИЙ, Я.Б. БЛЮМ, 2010

Введение. Ключевая протеинкиназа контрольной точки (чекпоинт-контроль) сборки веретена деления – BUB1 (Budding Uninhibited by Benzimidazoles) – необходима для корректной сборки веретена деления и правильного экваториального выстраивания хромосом [1]. Данная серин-треониновая протеинкиназа играет ключевую роль в работе целого ансамбля чекпоинт белков (CENPF, BUB1B, CENPE и MAD2L1), принимающих участие в регуляции кинетохора [2, 3]. BUB1 необходима для правильной локализации протеинкиназы PLK1 относительно кинетохора [4], которая в свою очередь отвечает за определение локализации SGOL1 (Shugoshin-like 1, SGO1) [5], влияя таким образом на когезию сестринских хроматид. BUB1 является субстратом для макрокомплекса циклосом, известного также как комплекс, стимулирующий анафазу (Anaphase Promoting Complex or Cyclosome, или APC/C) [6]. APC/C является мультисубъединичной убихитин-зависимой протеазой, подвергающей деградации такие ключевые белки митоза, как секурин и циклин B, обуславливая тем самым расхождение хромосом и завершение митоза [6, 7]. В свою очередь ингибирование APC/C осуществляется комплексом белков точки рестрикции митоза (MTP), получившим название MCC (Mitotic Checkpoint Complex), и реализуется посредством взаимодействия с субстратом APC/C – протеинкиназой Cdc20 [8].

Данная группа белков впервые была обнаружена в клетках дрожжей и считается эволюционно консервативной [9]. Для них также характерна локализация в области кинетохора, где они регулируют активность последнего, участвуя в процессе экваториального позиционирования хромосом [2, 3]. Наличие в клетке кинетохора, не прикрепленного к микротрубочкам веретена деления, вызывает нарастание на хромосоме плотности сигналов белков MTP, что свидетельствует об их чувствительности к взаимодействию кинетохора с микротрубочками. При этом показано, что на этапе метафазного выравнивания сигнал BUB1 и hBUBR1 уменьшается в несколько раз, а такие чекпоинт белки, как MAD1 и MAD2, полностью покидают область кинетохора [10].

Играя ключевую роль в митозе и мейозе клеток млекопитающих, BUB1 является партнером таких белков, как Mad1, Cdc20, Bub3, Mad2, BubR1, Skp1, CenpE, CenpF, Plk1, Pp2A, Sgo1,

Sgo2 и Rec8 [11]. Для BUB1 и ряда других МТР белков (BUB3, MAD1, MAD2, MAD3 и Mps1) дрожжей были идентифицированы гомологи у целого ряда высших организмов, принадлежащих к слизевикам [12], грибам [13] и млекопитающим [14]. Так, например, к настоящему времени в базе данных UniProt депонированы пять аннотированных последовательностей Bub1: BUB1_HUMAN (UniProt: O43683) из *Homo sapiens*, BUB1_MOUSE (UniProt: O08901) из *Mus musculus*, BUB1_YEAST (UniProt: P41695) из *Saccharomyces cerevisiae*, BUB1_SCHPO (UniProt: O94751) из *Schizosaccharomyces pombe* и BUB1_DICDI (UniProt: Q54CV5) из *Dictyostelium discoideum*. При этом также доказана консервативность их функций, в частности, касающихся регуляции точки рестрикции митоза.

Фундаментальная роль, которую играет в делении клеток группа протеинкиназ точки контроля сборки веретена деления у миксомицетов, грибов и животных, позволяет также предполагать консервативность данной группы белков и у высших растений. Поэтому целью нашего исследования являлся биоинформационный поиск ортологов ключевой протеинкиназы контрольной точки сборки веретена деления BUB1 у представителей водорослей и высших растений.

Материалы и методы. Эталонные (аннотированные) последовательности протеинкиназ контрольной точки сборки веретена деления у дрожжей, миксомицетов и животных были взяты из базы данных UniProt (www.expasy.org) [15]. Поиск растительных гомологов выполнялся на основании анализа результатов BLAST-сканирования баз данных UniProt (Swiss-Prot и TrEMBL) [15] и nr (GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF) базы данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast_databases.shtml) против последовательностей каталитических доменов протеинкиназ животных – BUB1_HUMAN (O43683) из *Homo sapiens*, BUB1_MOUSE (O08901) из *Mus musculus* и протеинкиназ грибов – BUB1_YEAST (UniProt: P41695) из *Saccharomyces cerevisiae*, BUB1_SCHPO (UniProt: O94751) из *Schizosaccharomyces pombe* и BUB1_DICDI (UniProt: Q54CV5) из слизевика *Dictyostelium discoideum*.

BLAST-сканирование (SIB BLAST Network Service и NCBI BLAST 2.2.23) выполняли при

следующих параметрах: весовая матрица – BLOSUM62, порог E (число ожидаемых совпадений в случайной выборке) = 10 при подключении фильтров: «Filter the sequence for low-complexity regions» и «Gapped alignment» (www.expasy.org; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) [16, 17]. Отбор растительных гомологов осуществляли на основании таких показателей, как процент идентичности последовательностей, процент их сходства, а также случайного ожидания этих результатов (E-value) [16].

Доменную архитектуру белков анализировали с применением сетевого инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [18, 19], а также на основании информации, представленной на ресурсе ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>). Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal X (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) [20]. Выравнивания аминокислотных последовательностей осуществляли с применением серии матриц BLOSSUM [20].

Кладистический анализ выполняли на основании результатов множественных выравниваний последовательностей каталитических киназных доменов [21, 22] с применением метода связывания ближайших соседей (Neighbor-Joining, или N-J) [23, 24]. Визуализацию и анализ дендрограмм проводили с помощью программы MEGA4 [25].

Консервативность остатков и мотивов функционально важных положений оценивали на основании сравнительного анализа относительно исходных эталонных аннотированных последовательностей, депонированных в UniProt (www.expasy.org): BUB1_HUMAN (O43683), BUB1_MOUSE (O08901), BUB1_YEAST (UniProt: P41695) и BUB1_SCHPO. Границы мотивов каталитической, активационной и связывающей субстрат (P+1) петель были установлены на основании анализа структуры каталитического домена (Bub1C: каталитический домен и прилегающая N-концевая пристройка) Bub1 (PDB: 3E7E) *Homo sapiens* и данных, представленных в литературе [26].

Анализ потенциальной функции растительных гомологов выполняли на основании моделирования белок-белковых взаимодействий против сигнальных каскадов млекопитающих

(*Homo sapiens*, *Mus musculus*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) и слизевика *Dictyostelium discoideum* с применением инструмента STRING 8.3 (<http://string-db.org/>) [27].

Для реконструкции пространственной структуры каталитических доменов протеинкиназ применяли метод гомологичного (профильного) моделирования [28]. В качестве матрицы свертки использовали пространственную структуру каталитического комплекса Bub1C протеинкиназы Bub1 (BUB1_HUMAN, UniProt: O43683) человека, депонированную в Protein Data Bank (PDB) (код доступа PDB: 3E7E) [26]. Отсутствующие в матричной шаблонной структуре (3E7E) петли достраивались и оптимизировались в программе Modeller 9v7 [29]. Для реконструкции пространственных структур каталитических доменов растительных гомологов использовали программные пакеты Modeller 9v7 [29] и GROMACS (<http://www.gromacs.org/>) с портированным силовым полем amber99SB (<http://ambermd.org/>).

Для более точной реконструкции некоторых элементов вторичной структуры в качестве матрицы свертки использовали фрагменты ряда структур, депонированных в PDB (3LAU, 3COH, 3CFA, 3M11) и имеющих высокую степень локального сходства при одновременно более низкой идентичности и сходстве полных аминокислотных последовательностей. Участки, имевшие низкое сходство с исходной матричной структурой (PDB: 3E7E), были реконструированы на основании результатов анализа с применением сервера SuperLooper [30, 31] и баз данных петель LIP [32] и LIMP [30].

Недостающие протоны водорода в реконструированных моделях добавляли на основании результатов анализа с применением инструмента H⁺⁺ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) [33], что позволило достичь нейтрального значения протонирования (рН 7,0) ионизируемых групп белка. AM1-BCC [34] заряды субстрата были рассчитаны при помощи программного обеспечения Antechamber [35]. Минимизацию энергии систем выполняли с использованием метода сопряженного градиента в водном окружении при толщине слоя молекул TIP3P в 10 Å. Оценка качества структур

основывалась на результатах обработки моделей на сервере Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu>) [36]. Визуализацию и анализ полученных данных производили с помощью программ DS Visualizer 2.5 (Accelrys Software Inc.) и PyMOL 1.1 (<http://www.pymol.org/>).

Результаты исследований и их обсуждение. В результате BLASTp сканирования баз данных UniProt и GenBank (включая RefSeq – NCBI Reference Sequence) против аннотированных последовательностей каталитических доменов протеинкиназ BUB1 из *Homo sapiens* (UniProt: O43683), *Mus musculus* (UniProt: O08901), *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt: P41695), *Schizosaccharomyces pombe* (UniProt: O94751) и *Dictyostelium discoideum* (UniProt: Q54CV5) было выявлено 14 потенциальных растительных гомологов (табл. 1–3). При этом последовательности потенциальных растительных гомологов и протеинкиназ Bub1 животного происхождения имели идентичность 30–37 % при 49–57%-ном сходстве (табл. 1), растительных гомологов и протеинкиназ Bub1 из грибов – 31–38 % при 50–56%-ном сходстве (табл. 2) и растительных гомологов и Bub1 подобной протеинкиназы из *D. discoideum* – 25–41 % при 45–51%-ном сходстве (табл. 3). Процент гепов выравнивания последовательностей при этом находился в диапазоне 5–13 % в случае животных (табл. 1), 3–11 % в случае грибных (табл. 2) и 8–11 % в случае протеинкиназ Bub1 миксомицетов (табл. 3).

Анализ с применением сервиса аннотирования белок-белковых взаимодействий – STRING 8.3, подтвердил соответствие всех найденных последовательностей протеинкиназам Bub1. При этом соответствие было подтверждено результатами сканирования против сигнальных каскадов млекопитающих (*H. sapiens*, *M. musculus*), грибов (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) и слизевиков (*D. discoideum*).

Последующая проверка целостности последовательностей с применением инструмента SMART показала, что только 5 из 14 потенциальных растительных гомологов имеют доменную архитектуру, соответствующую протеинкиназам BUB1 животных, грибов и миксомицетов (включая наличие каталитического серин-треонинового специфического домена и домена Mad3_BUB1_I) [37]: XP_002274770.1

Таблица 1

Результаты поиска растительных гомологов протеинкиназы Bub1, выделенные на основании результатов BLASTp-сканирования баз данных против последовательностей каталитических доменов протеинкиназ Bub1 из *Homo sapiens* (UniProt: O43683, BUB1_HUMAN) и *Mus musculus* (UniProt: O08901, BUB1_MOUSE)

GenBank / UniProt	Вид	Вес выравнивания		E-value		Идентичность		Сходство		Гены	
		BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	%					
						BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE
EDQ61453.1 A9T515	<i>Physcomitrella patens</i>	178	182	2e-44	3e-44	33	33	52	55	5	7
NP_179656.4 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173	177	2e-41	2e-42	37	36	54	55	7	6
XP_002884.213.1 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	169	175	3e-40	6e-42	36	36	54	55	9	9
XP_002274770.1 / CBI21878.1	<i>Vitis vinifera</i>	171	177	1e-40	9e-43	35	37	54	57	8	7
ACF81779.1 B4FI36	<i>Zea mays</i>	165	170	5e-39	2e-40	35	34	54	55	6	7
EEC82122.1 B8B6H5	<i>Oryza sativa</i> Indica Group	162	157	4e-38	2e-36	35	34	53	53	6	7
EEE67244.1 B9FXF7	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	161	158	7e-38	8e-37	36	35	53	54	6	7
BAG89097.1 Q7XIR5	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	161	158	7e-38	8e-37	36	35	53	54	6	7
EEF44403.1 B9RVW6	<i>Ricinus communis</i>	160	164	2e-37	1e-38	35	35	52	53	9	6
EEE90855.1 B9HGN9	<i>Populus triho-carpa</i>	162	169	4e-38	4e-40	35	36	53	54	9	7
ACF79918.1 B4FCS5	<i>Zea mays</i>	149	159	4e-34	3e-37	35	35	53	55	6	7
EER97270.1 C5X9D8	<i>Sorghum bicolor</i>	149	153	5e-34	2e-35	36	33	56	54	5	7
CAL57156.1 Q00Y95	<i>Ostreococcus tauri</i>	145	151	7e-33	1e-34	32	33	50	50	10	8
ACO64062.1 C1E7Y9	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	134	144	2e-29	2e-32	30	29	49	51	13	10

Примечание. BUB1_HUMAN – протеинкиназа чекпоинт-контроля сборки веретена деления из *Homo sapiens*; BUB1_MOUSE – протеинкиназа чекпоинт-контроля сборки веретена деления из *Mus musculus*.

(CBI21878.1, GSVIVT01020577001) из *Vitis vinifera*, EEC82122.1 (B8B6H5; OsI_26148) из *Oryza sativa* Indica Group, EEE67244.1 (B9FXF7; OsJ_24392) из *Oryza sativa* Japonica Group, EEF44403.1 (B9RVW6) из *Ricinus communis* и CAL57156.1 (Q00Y95) из водоросли *Ostreococcus tauri*. Остальные 9 последовательностей в нас-

тоящее время представлены фрагментами, содержащими только гомологичный каталитический домен.

Кладоистический анализ группы из пяти растительных гомологов, принадлежащих к водорослям и цветковым растениям (*Embryophyta*), и аннотированных последовательностей

Результаты поиска растительных гомологов протеинкиназы Bub1, выделенные на основании результатов BLASTp-сканирования баз данных против последовательностей каталитических доменов протеинкиназ Bub1 из *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt: P41695 / BUB1_YEAST) и *Schizosaccharomyces pombe* (UniProt: O94751 / BUB1_SCHPO)

GenBank / UniProt	Вид	Вес выравнивания		E-value		Идентичность		Сходство		Гены	
		BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	%					
						BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO
EDQ61453.1 A9T515	<i>Physcomitrella patens</i>	173	160	3e-41	1e-37	37	35	55	50	5	11
NP_179656.4 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173	177	2e-41	2e-42	37	36	54	55	7	6
XP_002274770.1 / CBI21878.1	<i>Vitis vinifera</i>	171	177	1e-40	9e-43	35	37	54	57	8	7
XP_002884213.1 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	169	175	3e-40	6e-42	36	36	54	55	9	9
EEE90855.1 B9HGN9	<i>Populus trichocarpa</i>	169	157	5e-40	2e-36	35	37	55	57	7	3
ACF81779.1 B4FI36	<i>Zea mays</i>	164	166	1e-38	4e-39	35	36	54	54	4	7
BAG89097.1 Q7XIR5	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	163	170	3e-38	2e-40	35	35	54	52	8	10
EEE67244.1 B9FXF7	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	163	170	3e-38	2e-40	35	35	54	52	8	10
EEC82122.1 B8B6H5	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	163	169	3e-38	4e-40	35	35	54	51	8	14
EEF44403.1 B9RVW6	<i>Ricinus communis</i>	162	165	4e-38	6e-39	33	33	55	53	5	10
CAL57156.1 Q00Y95	<i>Ostreococcus tauri</i>	156	144	3e-36	2e-32	32	33	52	55	11	11
EER97270.1 C5X9D8	<i>Sorghum bicolor</i>	152	162	5e-35	5e-38	36	36	55	55	4	4
ACF79918.1 B4FCS5	<i>Zea mays</i>	150	159	1e-34	5e-37	35	38	54	56	4	3
ACO64062.1 C1E7Y9	<i>Micromonas</i> sp. <i>RCC299</i>	–	134	–	1e-29	–	31	–	53	–	10

Примечание. BUB1_YEAST – протеинкиназа чекпоинт-контроля сборки веретена деления из *S. cerevisiae*; BUB1_SCHPO – протеинкиназа чекпоинт-контроля сборки веретена деления из *S. pombe*.

протеинкиназ Bub1 млекопитающих, грибов и слизевиков, выполненный на основании кластеризации последовательностей каталитических доменов методом связывания соседей (N-J), показал близость гомологов из *Embryophyta* к группе протеинкиназ Bub1 животного проис-

хождения (рис. 1). При этом гомолог из водоросли *O. tauri* образовал кладу с протеинкиназами Bub1 из *H. sapiens* и *M. musculus*. Таким образом, гомологи из высших растений образовывали отдельную кладу, близкую по топологии к протеинкиназам Bub1 животных. При

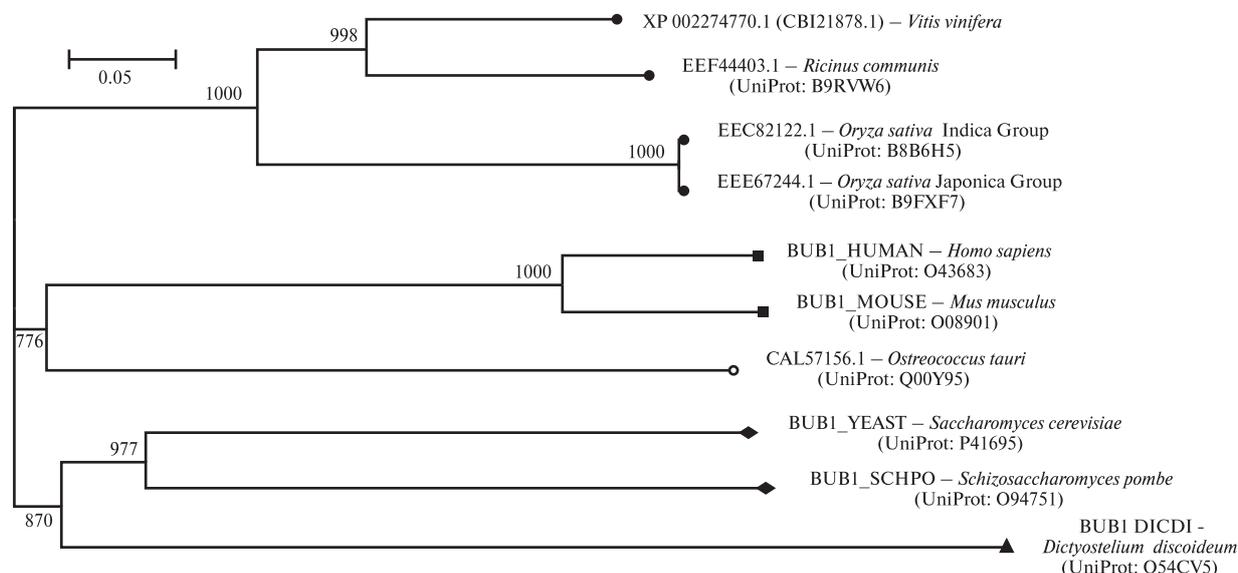


Рис. 1. Результаты кластеризации потенциальных растительных – цветковые растения (●) и водоросли (○) гомологов и аннотированных последовательностей из млекопитающих (■), грибов (◆) и слизевиков (▲). Филогенетическое древо было построено на основании множественного выравнивания последовательностей каталитических доменов методом связывания ближайших соседей (N-J)

Таблица 3

Результаты поиска растительных гомологов протеинкиназы Bub1, выделенные на основании результатов BLAST-сканирования баз данных против последовательности каталитического домена протеинкиназы Bub1 из *Dictyostelium discoideum* (UniProt: Q54CV5)

GenBank / UniProt	Вид	Вес выравнивания	E-value	Идентичность	Сходство	Гены
				%		
EEE90855.1 B9HGN9	<i>Populus trichocarpa</i>	304	1e-25	28	49	10
EEF44403.1 B9RVW6	<i>Ricinus communis</i>	272	5e-22	26	48	9
NP_179656.4 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	263	6e-21	27	46	8
XP_002884213.1 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	249	3e-19	29	46	10
XP_002274770.1 / CBI21878.1	<i>Vitis vinifera</i>	248	3e-19	27	47	10
EDQ61453.1 A9T515	<i>Physcomitrella patens</i>	233	2e-17	28	46	9
BAG89097.1 Q7XIR5	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	227	9e-17	25	46	9
EEE67244.1 B9FXF7	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	227	9e-17	25	46	9
EEC82122.1 B8B6H5	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	226	1e-16	25	46	9
EER97270.1 C5X9D8	<i>Sorghum bicolor</i>	211	6e-15	26	46	9
ACF81779.1 B4FI36	<i>Zea mays</i>	206	2e-14	25	45	8
ACF79918.1 B4FCS5	<i>Zea mays</i>	204	4e-14	26	45	9
CAL57156.1 Q00Y95	<i>Ostreococcus tauri</i>	193	8e-13	30	51	9
ACO64062.1 C1E7Y9	<i>Micromonas</i> sp. <i>RCC299</i>	178	4e-11	41	46	11

этом наиболее близкое положение согласно данным кладиического анализа демонстрируют Bub1 из *H. sapiens* и два белка с неизвес-

тной функцией из двух разновидностей риса (индийская и японская группы): EEC82122.1 (B8B6H5) – *Oryza sativa* Indica Group и

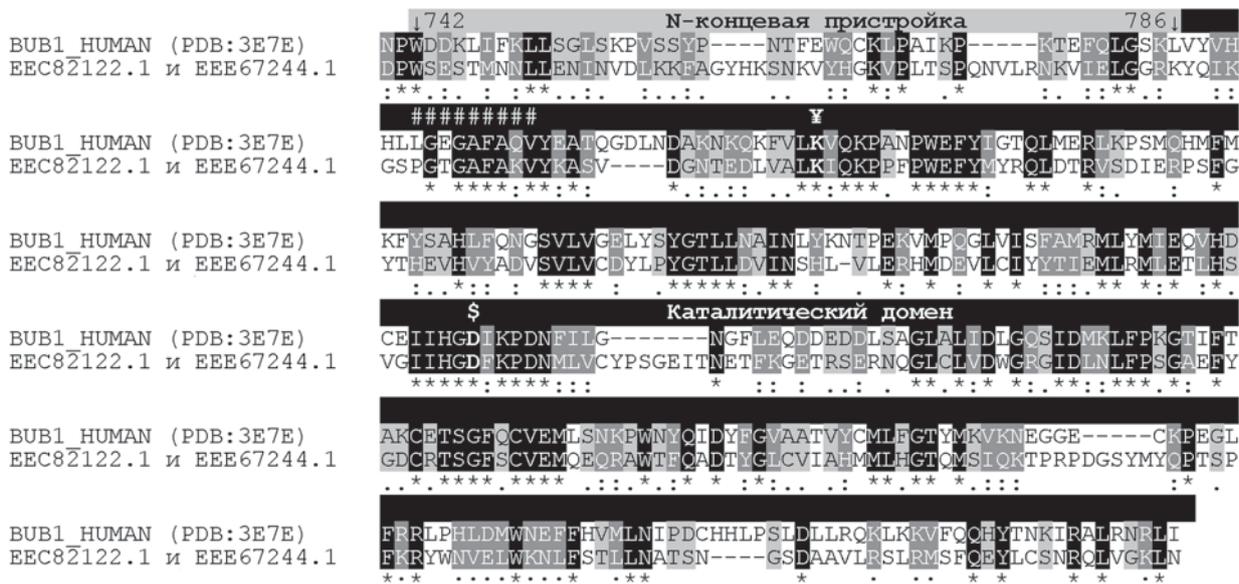


Рис. 2. Парное выравнивание последовательностей каталитического комплекса Bub1C (каталитический домен и прилегающая к нему N-концевая пристройка) [26] протеинкиназы Bub1 (UniProt: O43683; BUB1_HUMAN) из *Homo sapiens* и последовательности, соответствующей растительным гомологам из риса: EEC82122.1 – белок с неизвестной функцией из *Oryza sativa* Indica и EEE67244.1 – белок с неизвестной функцией из *Oryza sativa* Japonica). Здесь и на рис. 3: ##### – нуклеотид (АТФ)-связывающая область (BUB1_HUMAN: 793–801); § – активный сайт (BUB1_HUMAN: D917); ¥ – сайт связывания АТФ (BUB1_HUMAN: K821)



Рис. 3. Парное выравнивание последовательностей каталитического комплекса Bub1C (каталитический домен и прилегающая к нему N-концевая пристройка) [26] протеинкиназы Bub1 (UniProt: O43683; BUB1_HUMAN) из *Homo sapiens* и растительного гомолога – белка с неизвестной функцией (XP_002274770.1 / CBI21878.1) из *Vitis vinifera*

Оценка качества моделей реконструированных структур каталитических доменов протеинкиназы Bub1 из *Homo sapiens* (PDB: 3E7E) и ее растительных гомологов из *Oryza sativa* и *Vitis vinifera*

Критерий оценки	Структура каталитического домена протеинкиназы		
	Bub1 из <i>Homo sapiens</i> (PDB: 3E7E)	Гомологи из риса *	Гомолог из <i>V. vinifera</i> : XP_002274770.1 (CBI21878.1)
Межатомные контакты			
Частота замен	1.42	3.3	0.64
Оценка качества геометрии белка			
процент некорректных ротамеров	1.61	2.31	1.55
процент отклонения (выброс по Рамачандрену)	1.45	1.62	1.40
процент совпадения (соответствие по Рамачандрену)	91.91	88.22	89.12
частота атомов углеродного скелета с отклонением > 0.25 Å (Cβ отклонение)	7	9	5
общий счет согласно MolProbity	1.52	1.46	1.43
процент аминокислот, образующих некорректные связи	0.00	0.00	0.00
процент аминокислот, образующих некорректные углы	0.00	0.00	0.25

*Два идентичных белка – EEC82122.1 из *O. sativa* Indica и EEE67244.1 из *O. sativa* Japonica.

EEE67244.1 (B9FXF7) – *O. sativa* Japonica Group. Таким образом, данные кладиического анализа свидетельствуют о более близком положении растительных гомологов по отношению к протеинкиназам Bub1 животных (*Mammalia*), нежели к ортологам из грибов и слизевиков. Последующий анализ парных выравниваний последовательностей каталитических доменов гомологов из риса индийской и японской групп показал их полную идентичность.

Для дальнейшего предсказания, а также для анализа пространственной структуры каталитических доменов растительных гомологов были выбраны белки с ранее неизвестной функцией из *V. vinifera* XP_002274770.1 (CBI21878.1, GSVIVT01020577001), EEC82122.1 (B8B6H5; OsI_26148) из *O. sativa* Indica Group и EEE67244.1 (B9FXF7; OsJ_24392) из *O. sativa* Japonica Group. Поскольку два белка из *O. sativa* имеют идентичные последовательности, задача сводилась к реконструкции только двух структур каталитических доменов гомологов из *V. vinifera* и *O. sativa*. Как показал анализ информации, представленной в базе данных Protein Data Bank (PDB), наиболее подходящей матрицей для реконструкции пространственной

структуры по гомологии в настоящее время является структура 3E7E [26], соответствующая каталитическому комплексу Bub1C (каталитический домен и прилегающая к нему N-концевая пристройка) протеинкиназы BUB1_HUMAN (UniProt: O43683) из *H. sapiens*. Парное выравнивание Bub1C области протеинкиназы BUB1 (UniProt: O43683) человека и соответствующих областей растительных гомологов (рис. 2 и 3) показали высокое сходство нуклеотид (АТФ)-связывающих областей и консервативность таких функционально важных аминокислотных остатков, как лизин сайта связывания АТФ (BUB1_HUMAN: K821) и остаток аспарагиновой кислоты активного сайта (BUB1_HUMAN: D917).

Учитывая то, что в исходной структуре 3E7E каталитического комплекса (Bub1C) протеинкиназы Bub1 из *H. sapiens* отсутствуют два участка каталитического домена (с Глн932 по Сер939 и с Глн806 по Асн814), нами была выполнена реконструкция недостающих фрагментов (реализовано в программе Modeller 9v7) с учетом информации о полной последовательности Bub1 человека, представленной в базе данных UniProt (O43683), с последующей оптимизацией в силовом поле amber99SB.

Мотив фосфат (АТФ)-связывающего центра

BUB1_HUMAN	793-IGEGAFQV-801	- Homo sapiens
BUB1_MOUSE	793-IGEGAFQV-801	- Mus musculus
BUB1_YEAST	711-IGEGYATV-719	- Saccharomyces cerevisiae
BUB1_SCHPO	724-IGGAFQV-732	- Schizosaccharomyces pombe
EEC82122.1	263-PGTGAFQV-271	- Oryza sativa Indica
EEE67244.1	263-PGTGAFQV-271	- Oryza sativa Japonica
EEF44403.1	225-AGGGFAKV-233	- Ricinus communis
XP_002274770.1	285-AGKGFQV-293	- Vitis vinifera
CAL57156.1	717-IGGAFQV-725	- Ostreococcus tauri

* * * *

Каталитическая петля

BUB1_HUMAN	913-IIHGDIKPDN-922	- Homo sapiens
BUB1_MOUSE	913-IIHGDIKPDN-922	- Mus musculus
BUB1_YEAST	829-IIHGDIKPDN-838	- Saccharomyces cerevisiae
BUB1_SCHPO	857-IIHGDIKADN-866	- Schizosaccharomyces pombe
EEC82122.1	378-IIHGDIKPDN-387	- Oryza sativa Indica
EEE67244.1	378-IIHGDIKPDN-387	- Oryza sativa Japonica
EEF44403.1	339-IIHGDIKPDN-348	- Ricinus communis
XP_002274770.1	400-IIHGDIKPDN-409	- Vitis vinifera
CAL57156.1	851-IVHADIKPDN-860	- Ostreococcus tauri

* * * **

Активационная петля

BUB1_HUMAN	946-DLGQSIDMKLFQK-959	- Homo sapiens
BUB1_MOUSE	946-DLGQSIDMKLFQK-959	- Mus musculus
BUB1_YEAST	871-DFGRSIDMTLLPQ-884	- Saccharomyces cerevisiae
BUB1_SCHPO	900-DFGRSIDLSLFEK-913	- Schizosaccharomyces pombe
EEC82122.1	418-DWGRGIDNLFQSG-431	- Oryza sativa Indica
EEE67244.1	418-DWGRGIDNLFQSG-431	- Oryza sativa Japonica
EEF44403.1	379-DWKGIDLHLFQDD-392	- Ricinus communis
XP_002274770.1	440-DWGRGIDLSLQSN-453	- Vitis vinifera
CAL57156.1	890-DYGRAIDLLMFQEE-903	- Ostreococcus tauri

* * *

R + 1 – петля, ответственная за связывание с субстратом

BUB1_HUMAN	960-TIFTAKQETSQFQC-973	- Homo sapiens
BUB1_MOUSE	960-TIFTAKQETSQFQC-973	- Mus musculus
BUB1_YEAST	885-TKFKSNWKADQDC-898	- Saccharomyces cerevisiae
BUB1_SCHPO	914-VKFIADWTDLQDC-927	- Schizosaccharomyces pombe
EEC82122.1	432-AEFYGDQRTSQFSC-445	- Oryza sativa Indica
EEE67244.1	432-AEFYGDQRTSQFSC-445	- Oryza sativa Japonica
EEF44403.1	393-IKFEGDQRTSQFRC-406	- Ricinus communis
XP_002274770.1	454-TEFKGDQRTSQFRC-467	- Vitis vinifera
CAL57156.1	904-AAFVGDAGAEAFRC-917	- Ostreococcus tauri

* . . : . *

Рис. 5. Выравнивания функционально важных мотивов каталитических доменов протеинкиназы Bub1 из представителей *Mammalia*, *Fungi*, *Mycetozoa* и их растительных гомологов (*Viridiplantae*: *Embryophyta* и *Algae*)

Оптимизированная структура Bub1 (3E7E) человека была использована для последующего профильного моделирования пространственной структуры каталитических доменов целевых белков из риса и винограда. Для реконструкции спорных участков также были использованы дополнительные матричные структуры, депонированные в PDB: 3LAU, 3COH, 3CFA, 3MII. Остальные манипуляции проводились согласно методикам, представленным в разделе «Материалы и методы». Анализ качества реконструированных структур, выполненный с помощью сервера Molprobit (табл. 4), подтвердил высокое качество построенных нами моделей [28, 36].

Для оценки степени сходства структуры каталитических доменов протеинкиназы Bub1 из *H. sapiens* (PDB: 3E7E; UniProt: O43683)[26] и растительных гомологов из риса (идентичные белки EEC82122.1 из *O. sativa* Indica и EEE67244.1 из *O. sativa* Japonica) и XP_002274770.1 (CBI21878.1) из *V. vinifera* было выполнено наложение структур, подтвердившее высокую степень их сходства (рис. 4, см. вклейку). Общие отличия матричной структуры 3E7E и реконструированных моделей были определены на основании суммарного значения среднеквадратичного отклонения (RMSD) для анализируемых структур растительных белков. При этом общее значение RMSD для

модели каталитического домена протеинкиназы из риса составило 1,28 Å, а для XP_002274770.1 (CBI21878.1) из *V. vinifera* — 1,22 Å. Считается, что структуры имеют достоверное сходство, если значение среднеквадратичного отклонения составляет ≤ 3 Å [28]. Таким образом, мы можем сделать заключение о высоком уровне сходства пространственной укладки каталитических доменов ключевой протеинкиназы контрольной точки сборки веретена деления Bub1 из *Homo sapiens* и анализировавшихся растительных гомологов из риса и винограда.

Поскольку каталитические свойства и функция протеинкиназ во многом определяются не только фолдингом, но и аминокислотным составом функционально важных мотивов и консервативных функционально важных аминокислот [38–40], таких как область связывания АТФ, каталитическая петля, активационная петля и субстрат-связывающая петля (P+1), нами был выполнен анализ упомянутых положений. Границы данных мотивов были определены на основании информации, представленной в литературе [26] для протеинкиназы Bub1 человека, а также информации, представленной в базе данных UniProt для эталонных последовательностей протеинкиназ Bub1 животных, грибов и миксомицетов. В случае растительных гомологов данные мотивы были определены для белков из *O. sativa* Indica (EEC82122.1), *O. sativa* Japonica (EEE67244.1), *R. communis* (EEF44403.1), *V. vinifera* (XP_002274770.1) и *O. tauri* (CAL57156.1) (рис. 5). Результаты выравнивания мотивов демонстрируют не только высокую степень их сходства, но также позволяют идентифицировать аминокислотные остатки, консервативные на уровне различных царств, которые, вероятно, несут основную функциональную нагрузку. Так, суперконсервативными (на примере Bub1 *H. sapiens*) являются аминокислотные остатки мотива фосфат-связывающего центра — Гли794, Гли796, Ала799 и Вал801. В составе каталитической петли помимо канонических консервативных остатков, обуславливающих каталитические свойства серин-треониновых протеинкиназ (Асп917 и Лиз919), также выявлены суперконсервативные положения — Гис915, Асп921 и Асн922. В

активационной петле помимо обязательного консервативного остатка Асп952 также идентифицированы суперконсервативные аминокислотные остатки Асп946 и Гли948. В составе субстрат-связывающей петли (P+1) выделяются всего два суперконсервативных положения — Фен961 и Цис973.

Дополнительно было выполнено структурное наложение модели протеинкиназы Bub1 (PDB: 3E7E; UniProt: O43683) из *H. sapiens* и моделей каталитических доменов растительных гомологов из риса (идентичные белки EEC82122.1 из *O. sativa* Indica и EEE67244.1 из *O. sativa* Japonica) и *V. vinifera* (XP_002274770.1 / CBI21878.1) с последующим анализом топологии функционально важных положений на примере реконструированных структур (рис. 6, см. вклейку). Как видно из рис. 6, б, пространственное положение всех функционально важных мотивов в растительных гомологах полностью совпадает с пространственным положением аналогичных мотивов (петель) в протеинкиназе Bub1 человека, а пространственная топология аминокислотных остатков (включая Асп917) полностью подтверждает данные, полученные при выравнивании аминокислотных последовательностей. Достоверность сделанных выводов также подтверждают значения среднеквадратичного отклонения (RMSD) функционально важных мотивов (петель), определенных для растительных гомологов из риса и винограда относительно структуры Bub1 человека, которые не превышают значения ≤ 3 Å [28]. Так, для мотива области связывания АТФ общие значения RMSD составили 1,36 Å в случае гомологов из риса (EEC82122.1 и EEE67244.1) и 2,09 Å в случае XP_002274770.1 из *V. vinifera*. Для мотива каталитической петли общие значения RMSD равнялись 0,75 Å в случае гомологов из риса (EEC82122.1 и EEE67244.1) и 0,97 Å в случае XP_002274770.1 из *V. vinifera*. При этом значения RMSD для остатков растительных гомологов, соответствующих Асп917 протеинкиназы Bub1 *H. sapiens*, были 0,76 и 0,75 Å соответственно. Для мотива активационной петли общие значения RMSD составили 1,09 Å в случае гомологов из риса (EEC82122.1 и EEE67244.1) и 0,82 Å в случае XP_002274770.1 из *V. vinifera*. Для мотива петли

R+1 общие значения RMSD равнялись 2,0 Å в случае гомологов из риса (EEC82122.1 и EEE67244.1) и 1.1 Å – XP_002274770.1 из *V. vinifera*.

На рис. 7 (см. вклейку) представлены модели пространственных структур каталитических доменов протеинкиназы Bub1 из *H. sapiens* и ее растительных гомологов из риса (EEC82122.1 из *O. sativa* Indica, а также EEE67244.1 из *O. sativa* Japonica) и *V. vinifera* (XP_002274770.1), представленные с учетом отображения положений наиболее важных элементов структуры и остатков. Полученные нами данные биоинформационного анализа последовательностей, кладистического анализа, а также анализа доменной архитектуры, белок-белковых взаимодействий и структурной биоинформатики позволяют с высокой долей уверенности идентифицировать растительные белки с ранее неизвестной функцией (EEC82122.1 (B8B6H5; OsI_26148) из *Oryza sativa* Indica Group, EEE67244.1 (B9FXF7; OsJ_24392) из *Oryza sativa* Japonica Group, EEF44403.1 (B9RVW6) из *Ricinus communis*, XP_002274770.1 (CBI21878.1, GSVIVT 01020577001) из *Vitis vinifera* и CAL57156.1 (Q00Y95) из *Ostreococcus tauri*) как растительные ортологи протеинкиназы Bub1 контрольной точки сборки веретена деления, ранее идентифицированной у животных, грибов и слизевиков.

P.A. Karpov, A.V. Raevsky,
Ya.B. Blume

BIOINFORMATIC SEARCH
FOR PLANT HOMOLOGS
OF PROTEIN KINASE BUB1 – THE KEYPOINT
OF MITOTIC SPINDLE ASSEMBLY

Fourteen plant homologs of animal, yeast and myxomycetes spindle assembly checkpoint protein kinases were identified bioinformatically. It was shown that the closest plant homologues of the BUB1 protein kinases are unknown proteins XP_002274770.1 (CBI21878.1) from *Vitis vinifera*, EEC82122.1 from *Oryza sativa* Indica, EEE67244.1 from *O. sativa* Japonica, EEF44403.1 from *Ricinus communis* and CAL57156.1 from *Ostreococcus tauri*. The reconstruction and analysis of spatial structures of the EEC82122.1, EEE67244.1 and XP_002274770.1 (CBI21878.1), catalytic domains confirmed their conformity to spindle assembly checkpoint protein kinases BUB1.

П.А. Карпов, О.В. Раевский,
Я.Б. Блюм

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ ПОШУК РОСЛИННИХ
ГОМОЛОГІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ BUB1 –
КЛЮЧОВОЇ ЛАНКИ ФОРМУВАННЯ
ВЕРЕТЕНА ПОДІЛУ

За допомогою біоінформаційного пошуку знайдено 14 рослинних гомологів протеїнкінази контрольної точки формування веретена поділу BUB1 тварин, дріжджів та слизевиків. Показано, що найближчими рослинними гомологами протеїнкінази Bub1 є білки з раніше невідомою функцією XP_002274770.1 (CBI21878.1) із *Vitis vinifera*, EEC82122.1 із *Oryza sativa* Indica, EEE67244.1 із *O. sativa* Japonica, EEF44403.1 із *Ricinus communis* та CAL57156.1 із *Ostreococcus tauri*. Було виконано реконструкцію та аналіз просторової структури каталітичних доменів білків EEC82122.1, EEE67244.1 і XP_002274770.1 (CBI21878.1), що підтвердило їх належність до протеїнкіназ контрольної точки формування веретена поділу BUB1.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ouyang B., Lan Z., Meadows J., Pan H., Fukasawa K., Li W., Dai W. Human Bub1: a putative spindle checkpoint kinase closely linked to cell proliferation // Cell Growth Differ. – 1998. – 9, № 10. – P. 877–885.
- Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggins G.J., Willson J.K., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers // Nature. – 1998. – 392, № 6673. – P. 300–303.
- Johnson V.L., Scott M.I., Holt S.V., Hussein D., Taylor S.S. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression // J. Cell Sci. – 2004. – 117, № 8. – P. 1577–1589.
- Qi W., Tang Z., Yu H. Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1 // Mol. Biol. Cell. – 2006. – 17, № 8. – P. 3705–3716.
- Wang X., Yang Y., Duan Q., Jiang N., Huang Y., Darzynkiewicz Z., Dai W. sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1 // Dev. Cell. – 2008. – 14, № 3. – P. 331–341.
- Tang Z., Shu H., Oncel D., Chen S., Yu H. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint // Mol. Cell. – 2004. – 16, № 3. – P. 387–397.
- McGuinness B.E., Anger M., Kouznetsova A., Gilbert-Bernabé A.M., Helmhart W., Kudo N.R., Wuensche A., Taylor S., Hoog C., Novak B., Nasmyth K. Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint // Curr. Biol. – 2009. – 19, № 5. – P. 369–380.
- Morrow C.J., Tighe A., Johnson V.L., Scott M.I., Ditchfield C., Taylor S.S. Bub1 and aurora B cooperate to

- maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20 // *J. Cell Sci.* – 2005. – **118**, № 16. – P. 3639–3652.
9. Roberts B.T., Farr K.A., Hoyt M.A. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – **14**. – P. 8282–8291.
 10. King J.M., Nicklas R.B. Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**, № 21. – P. 3815–3823.
 11. Marchetti F., Venkatachalam S. The multiple roles of Bub1 in chromosome segregation during mitosis and meiosis // *Cell Cycle*. – 2010. – **9**, № 1. – P. 58–63.
 12. Eichinger L., Pachebat J.A., Glöckner G., Rajandream M.A., Sugang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Xu Q., Tunggal B., Kummerfeld S., Madera M., Konfortov B.A., Rivero F., Bankier A.T., Lehmann R., Hamlin N., Davies R., Gaudet P., Fey P., Pilcher K., Chen G., Saunders D., Sodergren E., Davis P., Kerhornou A., Nie X., Hall N., Anjard C., Hemphill L., Bason N., Farbrother P., Desany B., Just E., Morio T., Rost R., Churcher C., Cooper J., Haydock S., van Driessche N., Cronin A., Goodhead I., Muzny D., Mourié T., Pain A., Lu M., Harper D., Lindsay R., Hauser H., James K., Quiles M., Madan Babu M., Saito T., Buchrieser C., Wardroper A., Felder M., Thangavelu M., Johnson D., Knights A., Louseged H., Mungall K., Oliver K., Price C., Quail M.A., Urushihara H., Hernandez J., Rabinowitsch E., Steffen D., Sanders M., Ma J., Kohara Y., Sharp S., Simmonds M., Spiegler S., Tivey A., Sugano S., White B., Walker D., Woodward J., Winkler T., Tanaka Y., Shaulsky G., Schleicher M., Weinstock G., Rosenthal A., Cox E.C., Chisholm R.L., Gibbs R., Loomis W.F., Platzer M., Kay R.R., Williams J., Dear P.H., Noegel A.A., Barrell B., Kuspa A. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* // *Nature*. – 2005. – **435**, № 7038. – P. 43–57.
 13. Ghaemmaghami S., Huh W.-K., Bower K. et al. Global analysis of protein expression in yeast // *Nature*. – 2003. – **425**. – P. 737–741.
 14. Pangilinan F., Li Q., Weaver T., Lewis B.C., Dang C.V., Spencer F. Mammalian BUB1 protein kinases: map positions and *in vivo* expression // *Genomics*. – 1997. – **46**. – P. 379–388.
 15. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – **36**. – D190–195.
 16. Claverie J.-M., Notredame C. *Bioinformatics for dummies* / 2nd ed. – New York : Wiley Publ., 2007. – 436 p.
 17. Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. O'Reilly & Associates. – Sebastopol, 2003. – 368 p.
 18. 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**. – D257–260.
 19. Letunic I., Doerks T., Bork P. SMART 6: recent updates and new developments // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – **37**. – D229–232.
 20. 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.
 21. 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. Enzymol.* – 1991. – **200**. – P. 38–62.
 22. Zhang C., Brankle S., Mallery E., Szymanski D. Composition and function of the Arabidopsis WAVE complex during epidermal morphogenesis // 16th Intl. Conference on Arabidopsis Research, Madison, WI (June 15–19, 2005). – P. 131.
 23. Atteson K. The performance of neighbor-joining algorithms of phylogeny reconstruction // *Lecture Notes in Computer Science* / Eds T. Jiang, D. – Berlin : Lee Springer-Verlag, 1997. – **1276**. – P. 101–110.
 24. Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. – New York : Oxford Univ. Press, 2000. – 333 p.
 25. 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.
 26. Kang J., Yang M., Li B., Qi W., Zhang C., Shokat K.M., Tomchick D.R., Machius M., Yu H. Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1 // *Mol. Cell*. – 2008. – **32**. – P. 394–405.
 27. Jensen L.J., Kuhn M., Stark M., Chaffron S., Creevey C., Muller J., Doerks T., Julien P., Roth A., Simonovic M., Bork P., von Mering C. STRING 8 – a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – **37**. – D412–416.
 28. Venselaar H., Krieger E., Vriend G. *Homology modeling* // *Structural Bioinformatics* / 2nd ed. Eds P.E. Bourne, H. Weissig. – Hoboken NJ. John Wiley & Sons, 2009. – P. 715–732.
 29. Eswar N., Marti-Renom M.A., Webb B., Madhusudan M.S., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. Comparative protein structure modeling with MODELLER // *Curr. Protocols Bioinform.* – 2006. Supl.15: 5.6.1–5.6.30.
 30. Hildebrand P.W., Goede A., Bauer R.A., Gruening B., Ismer J., Michalsky E., Preissner R. SuperLooper – a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – **37**. – W571–574.
 31. Spassov V.Z., Flook P.K., Yan L. LOOPER: a molecular mechanics-based algorithm for protein loop prediction // *Protein Engineering Design and Selection*. – 2008. – **21**, № 2. – P. 91–100.
 32. Michalsky E., Goede A., Preissner R. Loops In Proteins (LIP) – a comprehensive loop database for homology

- modelling // Protein Engineering. — 2003. — **16**, № 12. — P. 979–985.
33. *Gordon J.C., Myers J.B., Folta T., Shoja V., Heath L.S., Onufriev A.* H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules // Nucl. Acids Res. — 2005. — **33**. — P. 368–371.
34. *Jakalian A., Jack D.B., Bayly C.I.* Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model 2. Parameterization and validation // J. Comput. Chem. — 2002. — **23**. — P. 1623–1641.
35. *Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D.A.* Antechamber, an accessory software package for molecular mechanical calculations // J. Comput. Chem. — 2005. — **25**. — P. 1157–1174.
36. *Davis I.W., Leaver-Fay A., Chen V.B., Block J.N., Kapral G.J., Wang X., Murray L.W., Arendall III W.B., Snoeyink J., Richardson J.S., Richardson D.C.* MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids // Nucl. Acids Res. — 2007. — **35**, Web Server iss. — W375–W383.
37. *Hardwick K.G., Johnston R.C., Smith D.L., Murray A.W.* MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p // J. Cell Biol. — 2000. — **148**, № 5. — P. 871–882.
38. *Champion A., Kreis M., Mockaitis K., Picaud A., Henry Y.* Arabidopsis kinome: after the casting // Funct. Integr. Genomics. — 2004. — **4**. — P. 163–187.
39. *Karpov P.A., Nadezhdina E.S., Yemets A.I., Matusev V.G., Nyporko A.Y., Shashina N.Y., Blume Y.B.* Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases // BMC Genomics. — 2010. — **11**(Suppl. 1). — S14 (doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14).
40. *Taylor S.S., Radzio-Andzelm E., Hunter T.* Protein kinase 8. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase // FASEB J. — 1995. — **9**. — P. 1255–1266.

Поступила 21.07.09