

СТРУКТУРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОТИПОВ СК1-ПОДОБНЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ, НЕПОСРЕДСТВЕННО СВЯЗАННЫХ С РЕГУЛЯЦИЕЙ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

П.А. КАРПОВ*, А.В. РАЕВСКИЙ, Я.А. ШЕРЕМЕТ, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, ул. Осиповского, 2а, Киев, 04123, Украина

E-mail: karpov@nas.gov.ua*

Идентифицировано 18 изоформ СК1-подобных протеинкиназ у *A. thaliana*. Сравнение каталитических доменов протеинкиназ СК1 крысы (α , β , γ 1-3, δ и ϵ) и 18-ти гомологов из *A. thaliana* подтвердило значительное структурное сходство 13-ти протеинкиназ: SKL1 (СК1 δ), SKL2, SKL3, SKL4, SKL5, SKL6, SKL7, SKL8, SKL9, SKL10, SKL11, SKL12 и SKL13. Было обнаружено, что СК1-специфический ингибитор D4476 взаимодействует с KCID крысы и отобранными растительными гомологами аналогичным АТФ-конкурентным способом. Взаимодействие с лигандом было подтверждено значениями оценочных функций докинга, результатами молекулярной динамики и результатами хемогенного анализа. Известно, что взаимодействие протеинкиназ СК1 с субстратными белками в значительной степени зависит от наличия специфических мотивов, расположенных в С-концевой области. Соответствующие мотивы взаимодействия с EB1 были выявлены в С-концевых областях SKL1 и SKL2. Также была подтверждена роль С-концевого фрагмента SKL6 во взаимодействии с β -тубулином.

Ключевые слова: казеин киназа 1, растительные гомологи, тубулин, EB1, фосфорилирование, ингибитор, D4476, *Arabidopsis*.

Введение. Среди представителей суперсемейства протеинкиназ казеин-киназы 1 (СК1) являются несомненными лидерами по количеству субстратов фосфорилирования [1–3]. Однако доказательства непосредственного участия в формировании тубулинового кода высших растений для протеинкиназ данного семейства появились сравнительно недавно [4]. В частности, было показано, что растительная протеинкиназа СК1-like 6 (SKL6) фосфорилирует β -тубулин в положениях Ser413 and Ser420, а нарушение ее экспрессии вызывает перестройки микротрубочек в клетках *Arabidopsis thaliana* и увеличение общей гетерогенности клеток [4].

Таким образом, факт, что растительные СК1 вносят непосредственный вклад в тубулиновый код и функциональную специализацию микротрубочек высших растений не вызывает сомнений [4–6].

Наши предыдущие эксперименты с использованием линии *A. thaliana*, экспрессирующей маркер микротрубочек – химерный конструктор GFP-Мар4, – подтвердили существование ответной реакции микротрубочек растений на обработку СК1-специфическим ингибитором D4476 (4-[4-(2,3-дигидро-бензо[1,4]диоксин-6-ил)-5-пиридин-2-ил-1H-имидазол-2-ил]бензамид) [6, 7]. Было показано, что действие D4476 носит дозозависимый характер и оказывает влияние на морфологию корней проростков *A. thaliana* [6]. Кроме того, наблюдавшиеся морфологические реакции коррелировали с реорганизацией системы микротрубочек, инициированной избирательным ингибированием активности СК1 [6].

Известно всего несколько сильных и селективных ингибиторов СК1 и, как правило, они прошли достаточную апробацию исключительно на животных объектах [3, 8, 9]. В настоящее время D4476 несомненно, является одним из наиболее перспективных инструментов прижизненного исследования роли СК1-специфического фосфорилирования [9, 10]. Биохимическое профилирование против обширной группы протеинкиназ человека (включающей СК1 δ), показало, что D4476 в концентрации 10 мкМ ингибирует протеинкиназу СК1 δ более чем на 90 %, но практически не влияет на активность других протеинкиназ исследованной панели [9, 10]. Было выдвинуто предположение, что D4476 аналогичным образом ингибирует активность всех изоформ протеинкиназы СК1. Данное допущение основывалось на значительном сходстве последовательностей

их каталитических доменов и подобии эффекта D4476, наблюдавшемся в случае протеинкиназы СК1 млекопитающих и *Schizosaccharomyces pombe* [9]. Тем не менее, данное предположение не является однозначным, поскольку в 2008 г. был зарегистрирован патент (US 2008/0146617 A1), подтверждающий ингибирующий эффект D4476 (10 мкМ) для протеинкиназы СК1ε и отсутствие такого в случае СК1γ1 (CSNK1G1) и СК1γ2 (CSNK1G2) животных [11]. Кроме того, ингибирующий эффект D4476 был подтвержден на примере протеинкиназы СК1α эритроцитов человека [12]. Таким образом, определенные отличия ингибирующего действия D4476 на уровне изоформ протеинкиназы СК1 животных вероятно существуют.

В случае растений специфичность действия D4476 на уровне изоформ СК1-подобных протеинкиназ практически не исследована. Ранее нами показано, что D4476 оказывает сильный дозозависимый эффект на рост и морфологию корней *A. thaliana* [6]. Одновременно опыты на растениях, экспрессирующих ассоциированный с микротрубочками флуоресцентный GFP-маркер (GFP-MAP4), подтвердили связь наблюдаемых морфологических реакций и пространственной реорганизации микротрубочек, вызванной ингибированием протеинкиназ СК1 [6]. Тем не менее, вопрос о том, какие из изоформ растительных СК1-подобных протеинкиназ являются наиболее восприимчивыми к действию D4476, а также, какие из них непосредственно связаны с перестройками системы микротрубочек, так до конца и не ясен.

Целью настоящего исследования являлась оценка структурной специфичности действия D4476 на различные изоформы СК1-подобных протеинкиназ *A. thaliana*, а также поиск протеинкиназ СКЛ, которые наиболее вероятно связаны с ранее наблюдавшимися перестройками системы кортикальных микротрубочек у растений [6].

Материалы и методы. Последовательности животных протеинкиназ СК1 были взяты из репозитория UniProtKB <http://www.uniprot.org/> и NCBI GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> [13] на основании данных литературы [9, 12, 14–18]. Данные последовательности использовались в качестве контроля при отборе растительных гомологов из базы данных

UniProtKB (Swiss-Prot и TrEMBL) [19]. Также при отборе растительных протеинкиназ СКЛ учитывалась актуальная аннотация статей UniProtKB. Помимо непосредственного отбора из UniProtKB, поиск гомологов осуществлялся с использованием сетевого сервиса SIB BLAST Network Service и алгоритма BLASTp [20, 21]. Растительные гомологи отбирались на основании таких показателей, как идентичность и сходство последовательностей, процент гепов и уровень ожидания (E-value) [20]. Случаи многократного депонирования последовательностей выявлялись путем сравнения информации о локусах их генов, представленной в TAIR (www.arabidopsis.org).

Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей были выполнены в программе ClustalX (2.1) (<http://www.clustal.org>) с применением весовых матриц BLOSUM [22]. Для составления логов выравниваний был использован сетевой инструмент WebLogo v.3 (<http://weblogo.berkeley.edu/>) [23].

Филогенетические деревья растительных и животных протеинкиназ строились на основании результатов множественных выравниваний последовательностей каталитических доменов с применением алгоритма связывания ближайших соседей (NJ) [24, 25]. Границы каталитических доменов были установлены на основании результатов анализа доменной архитектуры с применением сетевого сервиса SMART [26]. Анализ и визуализация дендрограм были выполнены с применением программ TreeView X Ver.5 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) [27] и MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>) [28].

Хомогенное профилирование СК1-подобных протеинкиназ было выполнено с помощью метода иерархической кластеризации (UPGMA) фрагментов последовательностей, формирующих АТР-связывающий карман киназного домена, а также с учетом аминокислотных остатков, участвующих в образовании водородных связей с ингибитором D4476. Протокол анализа основывался на рекомендациях, представленных в литературе [29–31].

Для профильного моделирования пространственной структуры по гомологии была использована программа Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [32] и ряд шаблонных структур

из RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org): 1CK1 (СК1d, 2.30 Å) из *R. norvegicus*, 2CMW (СКγ1, 1.75 Å), 2C47 (СКγ2, 2.40 Å) и 2CHL (СКγ3, 1.95 Å) из *H. sapiens*, 1CSN (СКΠ1, 2.0 Å) [33], 1EH4 (СКΠ1, 2.80 Å) [33] из *S. pombe*. Отбор шаблонных структур основывался на результатах поиска с применением Protein Data Bank BLAST (www.rcsb.org) [35]. После 10 нс оптимизации сольватированных моделей в силовом поле amber99 их качество было оценено при помощи сервера ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) (www.protein.bio.puc.cl) [36].

Визуализация, выравнивание и анализ структурных моделей были выполнены с применением программы PyMol 1.5 (www.pymol.org). Оценка среднеквадратичных отклонений (RMSDs) пространственных структур была выполнена с применением аналитических функций программ MODELLER 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [32] и PyMol (<https://pymol.org>). Качество и стереохимическая корректность структурных моделей оценивалась с применением сервисов PROCHECK (www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/) [37] и MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) [38]. Результирующие структурные модели были дополнительно проверены при помощи сервиса Verify3D (Structure Evaluation Server – http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) [39].

Модель ингибитора D4476 для последующего докинга была построена с применением редактора Marvin Sketch (www.chemaxon.com), а соответствующие файлы топологии были получены при помощи сервиса SwissParam (www.swissparam.ch) [40]. Лиганд-белковый докинг был выполнен в программе CCDC GOLD 5.1 (www.ccdc.cam.ac.uk/) [41]. Область докинга на поверхности СК1δ (UniProt: Q06486/PDB: 1CK1 2.30 Å) была задана как окружность с радиусом в 10 Å относительно СЕ атома аминокислотного остатка Met85 и аналогичным образом в случае структурной модели растительного гомолога. Во время докинга были использованы параметры генетического алгоритма как: размер популяции 100; селекция 1,1; количество островов – 10; число генетических операций – 100,000. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия (vdW) и длина водородных связей равнялись 4.0 Å и 2.5 Å соответственно.

Боковые цепи аминокислот Ile23, Lys38, Met82, Asp128, Lys130, Leu135, Ile148, Asp149 были заданы как подвижные. Ранжирование конформаций лиганда во время докинга основывалось на показателе GoldScore. Для отбора лучших результатов докинга также учитывались внутренние оценочные функции ChemScore и ASP. Как дополнительный контроль нами было использовано структурное сравнение построенных комплексов с экспериментальными PDB-структурами лиганд-белковых комплексов 1CSN и 1EH4 из *S. pombe* с ATP и IC261, соответственно. Лучшие позиции D4476 были определены на основании карт водородных связей (h-bonds) и наличия коротких контактов (short-contacts). Прошедшие проверку модели комплексов являлись отправной точкой для последующей молекулярной динамики.

Молекулярная динамика комплексов была выполнена в программе GROMACS (ver. 4.5.5) [42] с использованием силового поля charmm27 (www.charmm.org) [43]. Заряды систем были рассчитаны с применением CGenFF (CHARMM General Force Field) [44]. Предварительно каждая система была помещена в водное окружение TIP3P со слоем молекул воды равной 10 Å. Нейтрализация системы достигалась сбалансированным замещением молекул воды ионами Na⁺ и Cl⁻. Минимизация энергии комплексов выполнялась с использованием метода наискорейшего спуска (25000 шагов). Усредненную модель строили на основании результатов траектории молекулярной динамики начинавшейся после 50 пс с начала расчета. Расчетный диапазон для каждого комплекса составлял 5 нс. Расчет траекторий проводили в NPT-ансамбле (изобарический-изотермический ансамбль: p, P и T = const): температура – 310 К (алгоритм термостата Берендсена) и постоянном давлении в 1 бар (баростат Парринелло-Рамана). Для фиксации всех связей содержащих атомы водорода был применен алгоритм LINCS (LINEar Constraint Solver). Временной шаг молекулярной динамики составлял 2 фс. Для расчета электростатических взаимодействий был применен алгоритм Эвальда для сетки частиц (Particle-mesh Ewald – PME) с порядком интерполяции (pme_order) 4 и размером ячейки 0,1 нм. Ван-дер-ваальсовы и кулоновские силы рассчитывали при дистанции отсечения равной

10 Å, а периодичность записи координат составляла 200 ps.

Кроме того, при расчете электростатических взаимодействий использовали метод РМЕ при радиусе отсечения потенциала Леннарда-Джонса = 1,2 нм, временном шаге = 2 фс и общей длине траектории не менее 300 нс.

Все расчеты молекулярной динамики были выполнены на кластере ИПБиГ НАН Украины, входящего в состав Украинского Национального Грида (Ukrainian National Grid - <http://grid.nas.gov.ua>).

Результаты исследований и их обсуждение.

Ранее, результаты экспериментов на клетках животных и *S. pombe* показали высокую специфичность ингибитора D4476 по отношению к протеинкиназам семейства СК1 [10]. В случае *H. sapiens*, а также других млекопитающих (*R. norvegicus*, *Mus musculus*, и т.д.), семейство СК1 представлено семью протеинкиназами: KC1A (UniProt: P48729), KC1AL (UniProt: Q8N752), KC1D (UniProt: P48730), KC1E (UniProt: P49674), KC1G1 (UniProt: Q9HCP0), KC1G2 (UniProt: P78368) and KC1G3 (UniProt: Q9Y6M4). Однако у высших растений число изоти-

пов СК1-подобных протеинкиназ отличается большим разнообразием. Так, blastp-сканирование протеома *A. thaliana* (UniProtKB) против каталитических доменов протеинкиназ KC1D (*H. sapiens* (UniProt: P48730), *R. norvegicus* (Q06486), *M. musculus* (Q9DC28), *B. taurus* (P35508), *P. abelii* (Q5RC72)) выявило 33 растительных гомолога СК1. Последующее сравнение координат локусов соответствующих генов (данные Taig), выявило дублирующиеся депонирования, что позволило сократить первоначальную выборку до 18-ти уникальных последовательностей СК1 и СК1-like протеинкиназ (табл. 1). Дополнительно, отбор растительных гомологов контролировался результатами NJ-кластеризации (рис. 1). В настоящее время из 18-ти растительных гомологов 13-ти уже присвоен статус аннотированных последовательностей. Одновременно, выравнивание последовательностей и NJ-кластеризация подтвердили неоднородность каталитических доменов СК1-подобных протеинкиназ *A. thaliana*.

Поскольку D4476 является АТФ-конкурентным ингибитором, механизм его действия основывается на связывании данного лиганда в

Таблица 1. Изотипы казеин киназы 1 (СК1) и казеин-киназа 1 подобных (СКЛ) протеинкиназ *A. thaliana*, отобранные на основании анализа баз данных и гомологии животным протеинкиназам СК1

<i>Arabidopsis thaliana</i> СК1 kinases	Ген	UniProt	Локус гена	
			координаты, bp	направление
CKL2	At1g72710	Q9CAI5	27372271-27376584	Forward
CKL9	At1g03930	Q9ZWB3	1004769-1008370	Forward
CKL13	At1g04440	Q5XF24	1202255-1205803	Forward
CKL5	At2g19470	Q9ZUP4	8433611-8436553	Reverse
F17H15.21	At2g25760	O82321	10984808-10988924	Reverse
CKL10	At3g23340	Q9LW62	8350803-8353959	Forward
F20H23.1/T11I18.5	At3g03940	Q9SRW8	1014025-1019224	Reverse
At3g13670/MMM17.17	At3g13670	Q9LID3	4469222-4473547	Forward
CKL1 (CKIδ)	At4g26100	P42158	13227450-13230797	Reverse
At4g08800/T32A17.110	At4g08800	Q9LDY6	5614134-5615919	Forward
		Q1PEB0		
CKL11	At4g14340	Q39050	8248286-8251998	Reverse
CKL6	At4g28540	Q8LPJ1	14106959-14110706	Forward
CKL3	At4g28880	Q93Z18	14251214-14254432	Forward
CKL4	At4g28860	Q8LPI7	14246283-14249544	Forward
CKL12	At5g57015	Q8VYK9	23071097-23074843	Forward
CKL7	At5g44100.1	Q9FFH8	17749118-17752716	Reverse
CKL8	At5g43320.1	Q9LSX4	17385867-17389527	Reverse
MRG7.15	At5g18190	Q9FK52	6009967-6014689	Reverse

фосфат-связывающем кармане [10]. Таким образом, возникает логичный вопрос относительно степени консервативности аминокислотного состава данного сайта у СК1-подобных протеинкиназ *A. thaliana*. Несмотря на общее сходство, результаты выравнивания участков последовательностей фосфат-связывающего кармана протеинкиназ СК1 (α , $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, δ , and ϵ) из *H. sapiens* и 18-ти СК1-Like киназ из *A. thaliana* выявили заметную гетерогенность данного сайта даже на уровне видоспецифичных групп отобранных протеинкиназ (рис. 2).

В то же самое время результаты анализа ортогольных протеинкиназ СК1, принадлежащих разным видам млекопитающих, показали значительную консервативность данного сайта. Так, например, выравнивание участков фосфат-связывающего сайта ряда животных KC1D показало их полную идентичность (рис. 3). Ранее Repa et al. (2004) показали, что D4476 в концентрации 10 мкМ оказывает 90%-ный ингибирующий эффект на протеинкиназу KC1D (СК1 δ) и, практически, не влияет на другие протеинкиназы тестируемой панели [10]. В связи с этим, для дальнейшего сравнительного исследования лиганд-белкового взаимодействия было решено использовать каталитические домены протеинкиназы KC1D из *R. norvegicus* и ближайшего растительного гомолога.

Кроме того, было решено выполнить сравнение пространственной структуры всех СК1 из *R. norvegicus* и их растительных гомологов из *A. thaliana*. Результаты blastp-поиска в UniProt-KB позволили нам оценить степень сходства СКL-киназ из *A. thaliana* и эталонной последовательности KC1D (P42158) из *R. norvegicus*. Согласно отчету BLAST, максимальный вес выравнивания «Score» (456) принадлежал растительной протеинкиназе, ранее определенной как СК1 δ (СКL1) (UniProt: P42158 – идентичность – 78 %, сходство – 92 %, количество гепов равно 0). При этом основные показатели для всей группы растительных гомологов также имели высокие значения: вес выравнивания равен $324,5 \pm 131,5$, идентичность – 37–79 %, сходство – 58–92 %, гепы – 0–11 % (табл. 2) .

Для последующей оценки структурных отличий каталитических доменов этих белков была выполнена их 3D-реконструкция. Моделирование было выполнено для всех изоформ

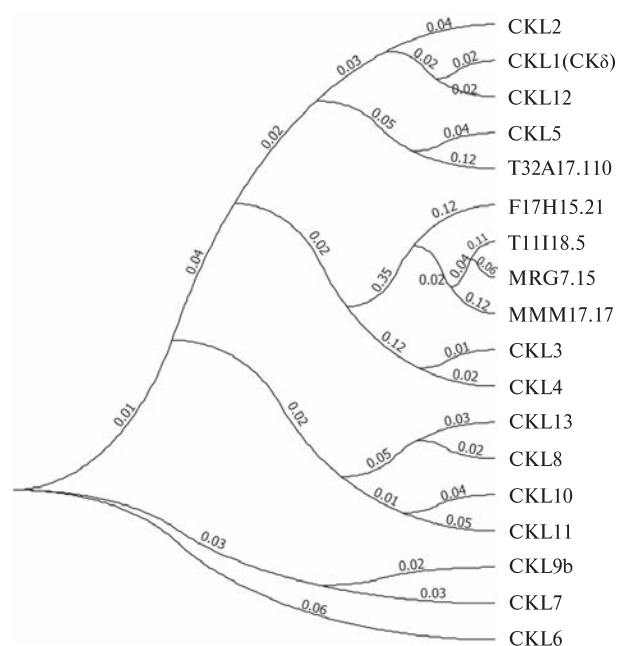


Рис. 1. Гетерогенность последовательностей их киназных доменов по результатам NJ-кластеризации последовательностей каталитических доменов СК1-подобных протеинкиназ *A. thaliana*: CKL11 – Casein kinase 1-like protein 11, CKL2 – Casein kinase 1-like protein 2, CKL3 – Casein kinase 1-like protein 3, CKL4 – Casein kinase 1-like protein 4, CKL5 – Casein kinase 1-like protein 5, CKL6 – Casein kinase 1-like protein 6, CKL7 – Casein kinase 1-like protein 7, CKL8 – Casein kinase 1-like protein 8, CKL9b (CKL9/ADK1) – Casein kinase 1-like protein 9, CKL10 – Casein kinase 1-like protein 10, CKL12 – Casein kinase 1-like protein 12, CKL13 – Casein kinase 1-like protein 13, KC1D (CKL1/CKI δ) – Casein kinase I isoform delta-like, F17H15.21 – Putative casein kinase I (At2g25760), T11H18.5 – Putative casein kinase (At3g03940), MMM17.17 – Putative casein kinase (At3g13670), T32A17.110 – Casein kinase I like protein (AT4g08800), MRG7.15 – Casein kinase-like protein (At5g18190)

протеинкиназ СК1 из *R. norvegicus* (UniProt: P97633 Isoform 1), KC1AL (UniProt: P97633 Isoform 2), KC1D (UniProt: Q06486), KC1E (UniProt: Q9JJ76), KC1G1 (UniProt: Q62761), KC1G2 (UniProt: Q62762), KC1G3 (UniProt: Q62763) и отобранных растительных гомологов из *A. thaliana* (табл. 1 и 2). Шаблонное моделирование, первичная оптимизация геометрии и молекулярная динамика трехмерных моделей каталитических доменов были выполнены согласно ранее описанному протоколу (см. Мате-

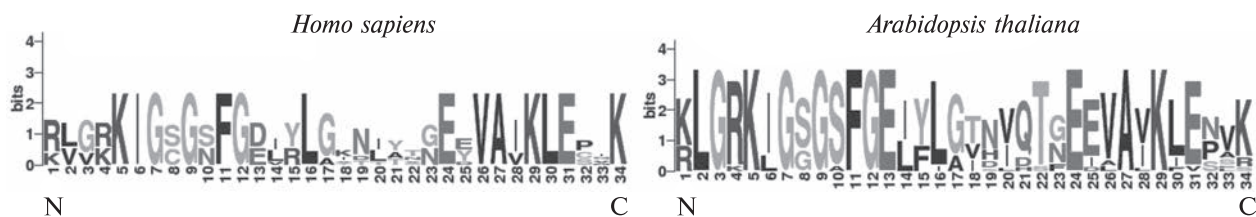


Рис. 2. Логи, составленные на основании выравнивания участков, формирующих АТФ-связывающий карман у всех известных изоформ протеинкиназы CK1 *H. sapiens* и протеинкиназы CKL *A. thaliana*



Рис. 3. Множественное выравнивание фрагмента, соответствующего фосфат-связывающему сайту животных протеинкиназ KC1D (*H. sapiens* – P48730, *B. taurus* – P35508, *R. norvegicus* – Q06486, *P. abelii* – Q5RC72 и *M. musculus* – Q9DC28)

риалы и методы). Результаты структурного наложения координат атомов полученных моделей подтвердили высокое сходство всех изоформ протеинкиназы CK1 из *R. norvegicus*. (рис. 4, а). В случае *A. thaliana* некоторые из гомологов (T11H18.5, MRG7.15 MMM17.17) были исклю-

чены из последующего исследования, что было обусловлено наличием значительных структурных отличий. Кроме того, растительные гомологи F17H15.21 и T32A17.110 были исключены из последующего исследования, поскольку в настоящее время их полные последователь-

Таблица 2. Степень сходства растительных протеинкиназ CKL из *A. thaliana* и эталонной последовательности изоформа KC1D казеин киназы 1 (Csnk1d) из *R. norvegicus*

Протеинкиназа	Вес выравнивания	E-value	Идентичность	Сходство	Гепты
			%		
CKL1 (CK1δ)	456	e-129	78	92	—
CKL12	455	e-128	79	90	—
CKL10	451	e-127	75	91	—
CKL9 (ADK1)	451	e-127	75	91	—
CKL7	449	e-126	75	91	—
CKL2	448	e-126	77	91	0
CKL6	442	e-124	74	89	—
CKL11	432	e-121	73	88	—
CKL8	431	e-121	71	88	—
CKL13	428	e-120	71	88	—
CKL5	428	e-120	71	88	—
CKL3	405	e-113	69	85	—
CKL4	405	e-113	69	85	—
T32A17.110	348	4e-96	63	78	11
F17H15.21	196	1e-50	37	58	5
MMM17.17	194	5e-50	37	60	6
MRG7.15	193	1e-49	37	58	5
T11H18.5	134	8e-32	39	59	3

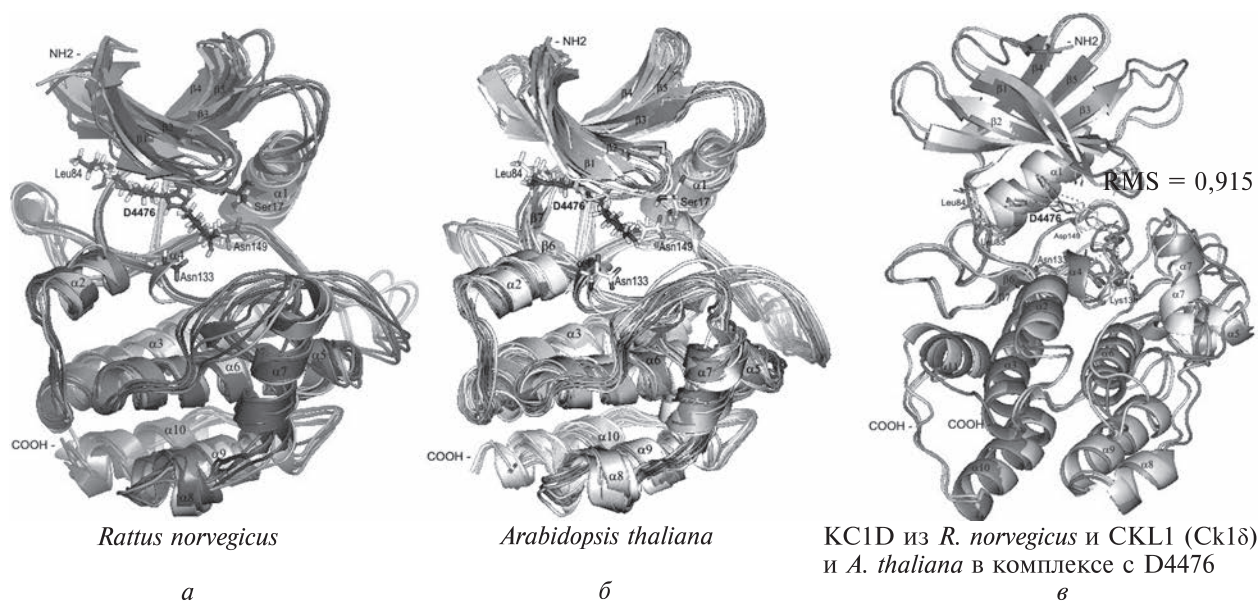


Рис. 4. Результаты структурного наложения координат С-атомов СК1-подобных протеинкиназ из *R. norvegicus* (а: KC1A, KC1AL, KC1D, KC1E, KC1G1, KC1G2 и KC1G3) и *A. thaliana* (б: CKL1 (CK1δ), CKL1, CKL2, CKL3, CKL4, CKL5, CKL6, CKL7, CKL8, CKL9b, CKL10, CKL12, CKL13), а также сравнение животного и растительного изоформ протеинкиназы KC1D/CK1δ в комплексе со специфическим ингибитором D4476 (в)

ности отсутствуют. Всего было отобрано 13 растительных протеинкиназ СКЛ, показавших наибольшее структурное сходство с животными СК1 (рис. 4, б). Кроме того, структурное наложение PDB-структуры каталитического домена протеинкиназы KC1D (PDB: 1CKI 2.30 Å) из *R. norvegicus* и модели протеинкиназы CKL1 (CK1d, UniProt: P42158) из *A. thaliana* подтвердило их значительное сходство (RMS = 0,915) (рис. 4, в). Это окончательно определило данные протеинкиназы как приоритетные мишени для последующего молекулярного докинга D4476.

Протокол лиганд-белкового докинга, а также верификация его результатов детально изложены ранее (см. раздел «Материалы и методы»). Для дополнительной верификации результатов и контрольной калибровки оценочных функций программы CCDC Gold нами был выполнен докинг с использованием экспериментально доказанных структур протеинкиназ СК1 из *S. pombe* (PDB ID: 1CSN, 1EH4) с АТФ и IC261 соответственно. Полученные модели комплексов подтвердили отсутствие стерических барьеров для связывания D4476

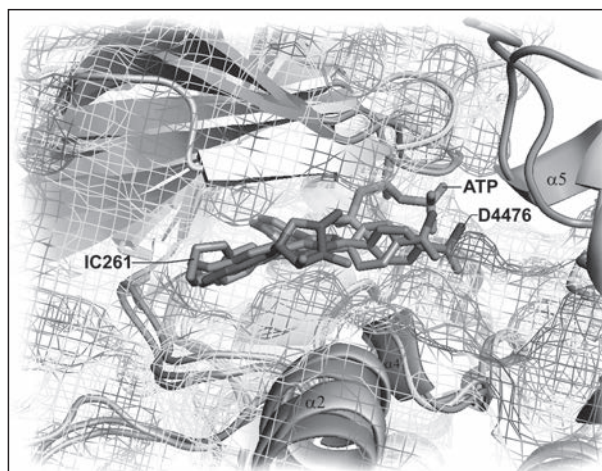


Рис. 5. Структурное выравнивание СК1/СК1-подобных протеинкиназ из *R. norvegicus* (красный), *A. thaliana* (зеленый) и *S. pombe* (серый) в комплексе с лигандами: АТФ (АТФ), D4476 и IC261. Наложение АТФ-связывающих карманов позволяет сравнить позиции и ориентацию лигандов (АТФ (АТФ), IC261 и D4476) в сайте и подтверждает отсутствие структурных препятствий для связывания D4476

(рис. 5). Критериями отбора оптимальных активных конформаций D4476 в сайте протеин-

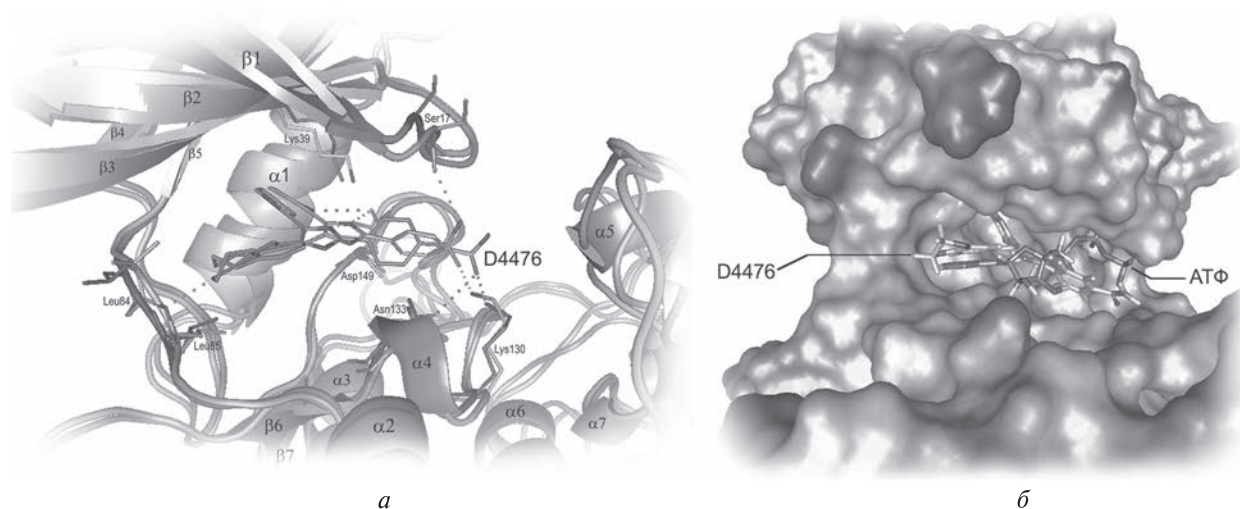


Рис. 6. Сравнение результатов молекулярного докинга D4476 (4-(4-(2,3-dihydrobenzo(1,4)dioxin-6-yl)-5-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)benzamide) в АТФ-связывающий карман KC1D из *R. norvegicus* (красный) и SK1δ (SKL1) из *A. thaliana* (зеленый): *a* – сравнение результатов докинга D4476 в целевой сайт животного (KC1D) и растительного (SK1δ) гомологов. На рисунке выделены аминокислоты, важные для связывания лиганда; *б* – сравнение позиций D4476 и нативного АТФ целевом сайте SK1δ из *A. thaliana*

киназ KC1D (*R. norvegicus*) и SKL1 (KC1δ, из *A. thaliana*) являлись: число водородных связей и наличие коротких контактов. Построенные комплексы сравнивались как между собой, так и с экспериментально подтвержденными структурами белков 1CSN и 1EH4 (рис. 5 и 6).

Последующую молекулярную динамику комплексов выполняли в программе GROMACS с применением силового поля charmm27 (см. Материалы и методы). Главной целью расчетов было определение аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании лиганда. Ранее построенные комплексы SK1D-D4476 для *R. norvegicus* и SK1δ-D4476 для *A. thaliana* были использованы как источники исходных координат. По окончании расчетов было установлено, что на протяжении 5 нс молекулярной динамики, среднее число водородных связей составляет 3,9 для комплекса из *R. norvegicus* и 2,9 для комплекса из *A. thaliana*.

Согласно результатам докинга в случае обоих комплексов водородные связи и короткие контакты с D4476 образовывали 5 аминокислот сайта: Ser17, Lys130, Asn133, Asp149 и Leu84 (рис. 6). Результаты расчета молекулярной динамики (SD, RMSD, локальные потенциалы Леннарда–Джонса, средние показатели куло-

новского взаимодействия (120.915 кДж/моль в случае *R. norvegicus* и 101,475 кДж/моль в случае *A. thaliana*)), полностью подтвердили первоначальные выводы о ключевой роли данных аминокислот в связывании D4476 (рис. 7 и 8).

Значительное внутри- и межвидовое сходство протеинкиназ SKL растений и протеинкиназ SK1 животных позволило нам применить кластеризацию фрагментов, которые непосредственно участвуют в формировании АТФ-связывающего кармана. Учитывая структурное сходство группы, такая кластеризация является оптимальным методом экспресс-оценки сходства аминокислотного состава и выявления возможных альтернативных мишеней ингибитора. Исследуемая группа включала фрагменты АТФ-связывающего кармана протеинкиназы KC1D крысы, а также протеинкиназы SK1α, δ, γ1, γ2, и ε (KC1A, KC1D, KC1G1, KC1G2, KC1E) человека, поскольку для данных протеинкиназ существуют биохимические доказательства прямого ингибирующего эффекта D4476 (положительный контроль – протеинкиназы SK1α, δ и ε), или наоборот его отсутствия (отрицательный контроль – протеинкиназы SK1γ1 и γ2) [9–11]. Для каждой из протеинкиназ мы получили профиль состоящий из семи фрагментов формирующих АТФ-связывающий кар-

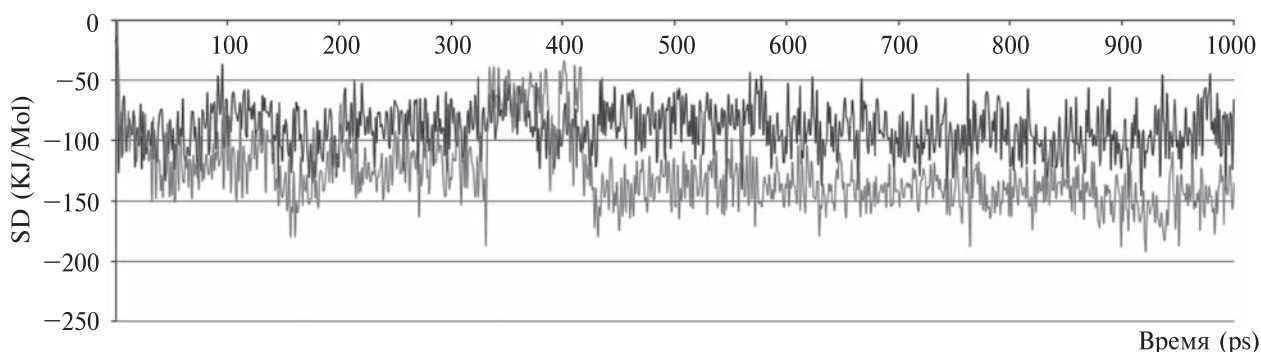


Рис. 7. Анализ динамики кулоновских взаимодействий D4476 с целевым сайтом KC1D из *R. norvegicus* и SKL1(SK1 δ) из *A.thaliana*. Примечание: серым цветом обозначена траектория KC1D из *R. norvegicus*; черным цветом – SKL1(SK1 δ) из *A.thaliana*

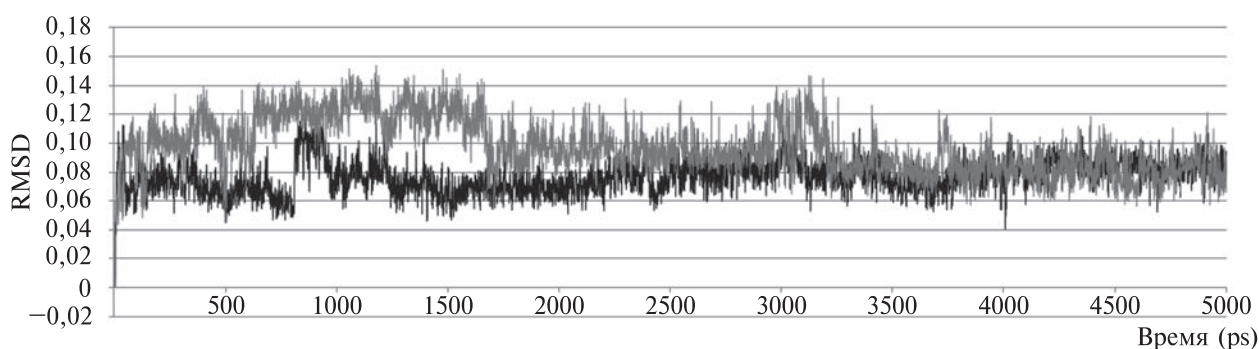


Рис. 8. Результаты расчета флуктуаций среднеквадратичного отклонения (RMSD) D4476 в комплексе с SK1D из *R. norvegicus* и SKL1 (SK1 δ) из *A. thaliana*. Примечание: серым цветом обозначена траектория SK1D из *R. norvegicus*; черным цветом – SKL1 (SK1 δ) из *A. thaliana*

ман (рис. 9). Для этого применяли два вида кластеризации: 1) когда после первичного выравнивания удалялись все консервативные колонки – «*» (за исключением колонок аминокислотных остатков, участвующих в связывании лиганда – «#»), и 2) с использованием исключительно колонок аминокислот, участвующих в формировании комплекса с молекулой D4476 (рис. 10, а, б).

В обоих случаях мы наблюдали кластеризацию всех растительных СК1-подобных протеинкиназ с животными протеинкиназами СК1 α , δ и ϵ , способными взаимодействовать с D4476: KC1D_RAT (Q06486), KC1D_HUMAN (P48730), KC1E_HUMAN (P49674), KC1A_HUMAN (P48729). В то же самое время протеинкиназы KC1G1_HUMAN (Q9HCP0) и KC1G2_HUMAN (P78368), использовавшиеся как негативный контроль, формировали отдельную кладу (рис. 10, а, б). Из пяти остатков,

непосредственно взаимодействующих с лигандом, замены существуют только в позициях, эквивалентных Ser17 протеинкиназы KC1D из крысы. В случае белков SKL1_ARATH (SK1 δ , P42158), SKL12_ARATH (Q8VYK9), SKL5_ARATH (Q9ZUP4), SKL9_ARATH (Q9ZWB3), SKL7_ARATH (Q9FFH8), SKL13_ARATH (Q5XF24), SKL8_ARATH (Q9LSX4), SKL10_ARATH (Q9LW62) и SKI1_ARATH (Q39050) серин в данной позиции был консервативен. В случае белков SKL2_ARATH, SKL6_ARATH (Q8LPJ1), SKL3_ARATH (Q93Z18) и SKL4_ARATH (Q8LPI7) в данном положении вместо серина (гидрофобный момент (НМ) = -1,1; изоэлектрическая точка (pI) = 5,7; индекс гидрофобности в случае SKL1 из *Arabidopsis* равна -0,8) был глицин (гидрофобный момент (НМ) = 0,7; изоэлектрическая точка (pI) = 6,0; индекс гидрофобности в случае протеинкиназы SKL6 из *Arabidopsis* равна -0,4).[45] По

	1	2	3	4	5	6	7
CKL1 ARATH (CK1δ, P42158)	KIGSGSFGEIYLG	LAIKL	LYR	NVK	VLVMDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDFGLA
CKL12 ARATH (Q8VYK9)	KIGSGSFGEIYLG	VAIKL	LYR	NIK	TLVMDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDFGLA
CKL2 ARATH (Q9CAI5)	KIGSGSFGEIYLG	VAIKL	LYK	NVK	VLVIDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	VIDFGLA
CKL5 ARATH (Q9ZUP4)	KIGSGSFGEIYLG	VAIKL	IYR	NMK	VLVMDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDYGLA
CKL9 ARATH (Q9ZWB3)	KIGSGSFGELYLG	VAVKL	LYM	NLK	VMVIDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDFGLG
CKL7 ARATH (Q9FFH8)	KIGSGSFGELYLG	VAVKL	LYM	NIK	VMVIDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDFGLG
CKL6 ARATH (Q8LPJ1)	KIGSGSFGELFLA	AAVKL	IYM	SLK	AMVIDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDFGLA
CKL13 ARATH (Q5XF24)	KLGSFSFGEIFLG	VAVKL	LYM	HLK	CMVIDLLGPSMEEF	IKPDNFLM	IIDYGLA
CKL8 ARATH (Q9LSX4)	KLGSFSFGELFLG	VAVKL	LYM	HLK	CMVIDLLGPSMEDL	IKPDNFLM	IIDYGLA
CKL10 ARATH (Q9LW62)	KIGSGSFGELYIG	VALKL	LYM	HIK	CMAIDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDYGLA
CKL11 ARATH (Q39050)	KLGSFSFGELYLG	VAVKL	IYM	HLK	CMVIDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	IIDYGLA
CKL3 ARATH (Q93Z18)	KIGSGSFGEIFLA	VAVKI	LYR	RIK	ALVMDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	LIDFGLA
CKL4 ARATH (Q8LPI7)	KIGSGSFGEIFLA	VAVKI	LYR	RIR	ALVMDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	LIDFGLA
KC1D RAT (1CKI, 1CKJ)	KIGSGSFGDIYLG	VAIKL	IYK	TIR	VMVELLGPSLEDL	VKPDNFLM	IIDFGLA
KC1D HUMAN (P48730)	KIGSGSFGDIYLG	VAIKL	IYK	TIR	VMVELLGPSLEDL	VKPDNFLM	IIDFGLA
KC1E HUMAN (P49674)	KIGSGSFGDIYLG	VAIKL	FYK	SIK	VMVELLGPSLEDL	VKPDNFLM	IIDFGLA
KC1A HUMAN (P48729)	KIGSGSFGDIYLA	VAVKL	LYK	HIR	VLVMDLLGPSLEDL	IKPDNFLM	LIDFGLA
KC1G1 HUMAN (Q9HCP0)	KIGGNFEGELRLG	VAIKL	FYK	QVY	AMVLELLGPSLEDL	VKPDNFLM	IIDFGLA
KC1G2 HUMAN (P78368)	KIGGNFEGELRLG	VAIKL	FYK	QVY	AMVLELLGPSLEDL	VKPDNFLM	IIDFGLA

* #* ** * * * *#**** #* #** *# **

Рис. 9. Выравнивание аминокислотных фрагментов формирующих АТФ-связывающий карман у животных протеинкиназ СК1 и их растительных гомологов из *A. thaliana*: «*» – консервативные аминокислоты, «#» – аминокислотные остатки непосредственно участвующие в связывании D4476 у KC1D из крысы и CKL1 (CK1δ) из *A. thaliana* (рис. 4 и 6, а)

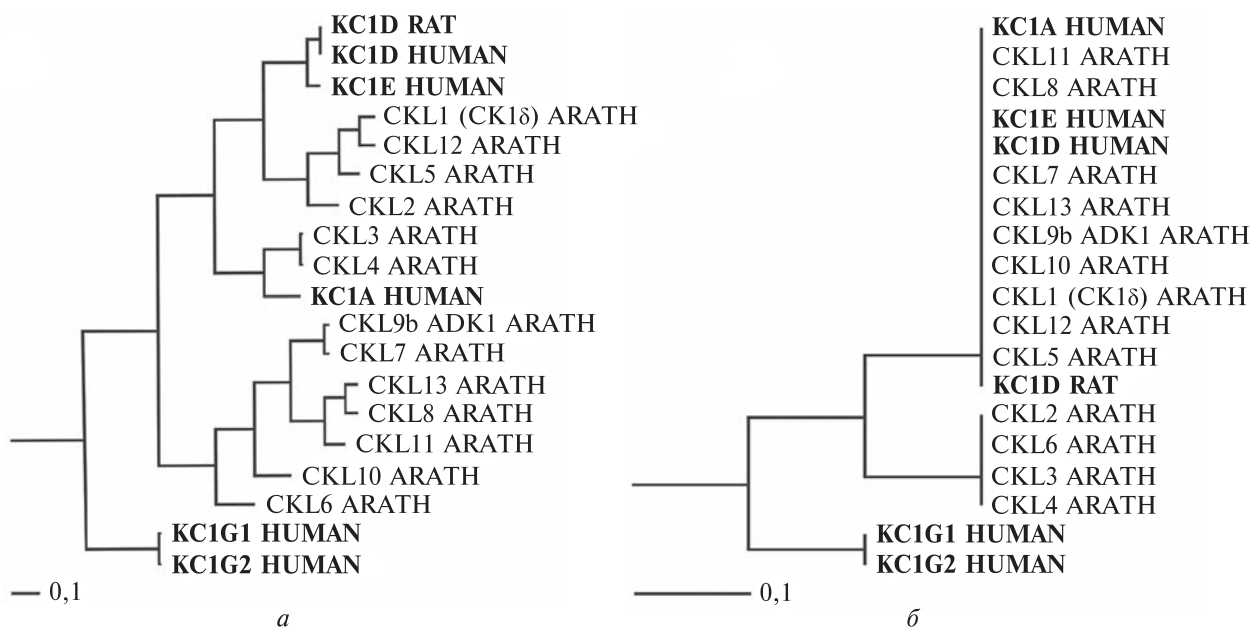


Рис. 10. Результаты хомогенной кластеризации 13-ти СК1-подобных протеинкиназ из *A. thaliana*. Анализ основывался на UPGMA-кластеризации фрагментов последовательностей, формирующих АТФ-связывающий сайт: а – с использованием аминокислотных фрагментов формирующих АТФ-связывающий карман (с предварительным удалением всех консервативных колонок аминокислот не участвующих в связывании D4476); б – с использованием кластеризации аминокислотных остатков, соответствующих колонкам аминокислот, непосредственно участвующих в связывании АТФ-конкурентного ингибитора D4476. Животные KC1D_RAT (Q06486), KC1D_HUMAN (P48730), KC1E_HUMAN (P49674) и KC1A_HUMAN (P48729) были использованы как позитивный контроль, а KC1G1_HUMAN (Q9HCP0) и KC1G2_HUMAN (P78368) как негативный контроль [9–11]

своим свойствам обе аминокислоты являются небольшими и полярными, что позволяет предполагать, что данная замена не является

критической для взаимодействия с D4476. Более того, ранее, ингибирующее действие D4476 было экспериментально подтверждено для про-



Аминокислоты: гидрофобные, отрицательно заряженные, положительно заряженные

Рис. 11. Сравнение аминокислотного состава фосфат связывающих участков CKL1 (At4g26100.1) и CKL6 (At4g28540.1) из *A. thaliana*: Leu85, Lys130, Asn133, Asp149 – консервативные аминокислотные остатки непосредственно участвующие во взаимодействии с D4476. Обнаружено что в положении, соответствующем Ser17 (индекс гидрофобности равен -0,8) протеинкиназы CKL1, протеинкиназа CKL6 имеет глицин – Gly21 (индекс гидрофобности равен -0,4)

теинкиназы CKL6 из *Arabidopsis* [4], а также, для животных протеинкиназ KC1D из крысы и человека.

Нами было выполнено сравнение аминокислотного состава участков, связывающих фосфат, протеинкиназ CKL1 (At4g26100.1) и CKL6 (At4g28540.1) из *A. thaliana* (рис. 11). Учитывая сходство пространственных структур и значительное сходство последовательностей (идентичность равна 78 %, сходство – 92 %) сравниваемых участков (рис. 10), можно предположить, что взаимодействие данных протеинкиназ с D4476 должно быть схожим. Из этого следует, что все 13 СК1-подобных протеинкиназ из *A. thaliana* должны взаимодействовать с D4476 и иметь схожий коэффициент ингибирования.

СК1-подобные протеинкиназы A. thaliana, способные взаимодействовать с микротрубочками. Анализ С-концевых участков. Биоинформационное исследование показало, что все 13 изоформ СК1-подобных протеинкиназ *A. thaliana* вероятнее всего одинаково взаимодействуют с D4476 (рис. 10). Таким образом, способность индивидуальных изоформ протеинкиназ СКЛ влиять на динамику микротрубочек растений должна зависеть от их способности взаимодействовать с тубулином микротрубочек или ассоциированными БАМ. Известно, что С-концевой домен протеинкиназы CKL6 из *A. thaliana* способен локализоваться с кортикальными микротру-

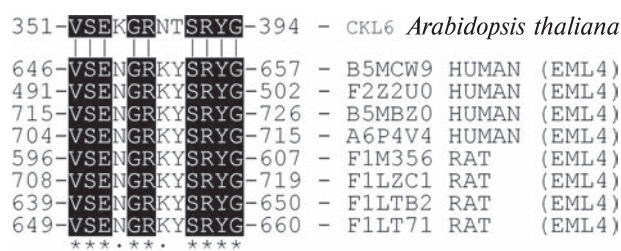


Рис. 12. Сравнение мотива 383-VSEKGRNTSRYG-394 тубулин-связывающего домена протеинкиназы CKL6 *A. thaliana* и гомологичных участков из EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) человека (B5MCW9, F2Z2U0, B5MBZ0, A6P4V4) и крысы (F1M356, F1LZC1, F1LTB2, F1LT71)

бочками [4]. Было показано, что данный фрагмент (351-RRNVRGPPSPHQNHTRHRTLDEIP-SMKPAVN**MVSEKGRNTSRYG**SASR-397) ассоциируется с микротрубочками *in vivo* и взаимодействует с тубулином *in vitro* [4]. Blastp-поиск показал отсутствие гомологичных участков у какого-либо из изоформ протеинкиназы СК1 представителей *Mammalia* и *Fungi*. В то же самое время, гомологичные участки были обнаружены у ряда СК1-подобных протеинкиназ растений: I1N9S4 из *Glycine max*, B9SS69 (RCOM_1169490) из *Ricinus communis*, G7I5I9 (MTR_1g076040) из *Medicago truncatula*, B9HKH5 (POPTRDRAFT_803757) из *Populus trichocarpa*, F6HZM0 (VIT_07s0005g03710) из *Vitis vinifera* и т.д. Таким образом, есть основания

полагать, что данный домен присущ исключительно растительным гомологам протеинкиназы SKL6 из *A. thaliana*. Кроме того, мы обнаружили области, гомологичные мотиву 383-VSEKGRNTSRYG-394 C-концевого домена EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) человека (B5MCW9_HUMAN, F2Z2U0_HUMAN, B5MBZ0_HUMAN, A6P4V4_HUMAN) и крысы (F1M356_RAT, F1LZC1_RAT, F1LTB2_RAT, F1LT71_RAT), что является еще одним аргументом в пользу важности вышеупомянутого домена для взаимодействия SKL6 с тубулином микротрубочек (рис. 12).

Помимо непосредственного фосфорилирования тубулина, другим возможным путем регуляции динамики микротрубочек в клетках животных является фосфорилирование ассоциированных белков: MAP1 (EB1), MAP2 и MAP4 [46–48]. Однако, ранее было показано, что у растений существуют исключительно гомологи MAP1 (EB1) [49, 50]. Существуют экспериментальные подтверждения фосфорилирования животных EB1 протеинкиназой SKIδ, что напрямую зависит от наличия у нее небольшого мотива Ser-x-Ile-Pro (SxIP), который специфически распознается EB1 доменом EB1 [46, 51]. Анализ C-концевых доменов SK1-подобных протеинкиназ из *A. thaliana* выявил SxIP мотивы у SKL1 (367-SmIP-370) и SKL2 (340-SgIP-343; 421-SkIP-424). Кроме того, в C-концевой области протеинкиназы SKL2 нами также обнаружен очень похожий мотив, содержащий близкую замену 315-SalP-318, (I→L317).

Обобщая результаты наших предыдущих экспериментов [6] и данные литературы, можно сделать заключение о существенной роли растительных SK1-подобных протеинкиназ в регуляции системы микротрубочек растений. Очевидно, что такая регуляция может происходить как путем прямого фосфорилирования молекул тубулина протеинкиназой SKL6, так и посредством фосфорилирования ассоциированных белков EB1 протеинкиназами SKL1 и SKL2. Наше предположение также согласуется с данными GeneVestigator (www.genevestigator.ethz.ch) относительно выраженной экспрессии SKL6, SKL1 и SKL2 в различных зонах и тканях корня *A. thaliana*, а также, результатами более ранних экспериментальных исследований [4,

6]. Таким образом, обнаруженные нами ранее эффекты прижизненного воздействия D4476 на систему микротрубочек *A. thaliana* очевидно, не являются, следствием ингибирования одного определенного изоформа SK1-подобных протеинкиназ. Несомненно, наблюдаемые эффекты носят более сложный и комплексный характер, а выделенные нами изоформы SKL6, SKL1 и SKL2 являются, возможно, лишь малой частью регуляторного механизма, реализуемого непосредственно через тубулиновый код и фосфорилирование структурных БАМ.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Это исследование не получило финансирования от учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

STRUCTURAL PATTERN OF CK1-LIKE PROTEIN KINASES ASSOCIATED WITH REGULATION OF PLANT MICROTUBULE CYTOSKELETON

P.A. Karpov, A.V. Rayevsky, Y.A. Sheremet, A.I. Yemets, Y.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Ukraine 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2a, E-mail: karpov@nas.gov.ua

It was identified 18 isoforms of CK1-like protein kinases in *A. thaliana*. Comparison of catalytic domains in rat CK1 (α , β , γ_{1-3} , δ , and ϵ) and 18 plant homologs from *A. thaliana*, confirm high structural similarity for 13 CK1-like kinases: CKL1 (CK1 δ), CKL2, CKL3, CKL4, CKL5, CKL6, CKL7, CKL8, CKL9, CKL10, CKL11, CKL12 and CKL13. It was found that CK1-specific inhibitor D4476 interact with rat KC1D and 13 plant homologs in similar ATP-competitive manner. Ligand binding were confirmed by docking scoring functions, molecular dynamics and chemogenomic analysis. The specific binding of CK1 kinases with substrate proteins depend on specific motifs located in their C-end region. The specific motifs of EB1 binding was identified in plant CKL1 and CKL2. Also, it was confirmed the role of C-end region in CKL6- β -tubulin interaction.

СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНА
ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОТИПІВ СК1-
ПОДІБНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ, ЯКІ БЕРУТЬ
БЕЗПОСЕРЕДНЮ УЧАСТЬ В РЕГУЛЯЦІЇ
СИСТЕМИ МІКРОТРУБОЧОК
ВИЩИХ РОСЛИН

П.А. Карпов *, А.В. Раевський., Я.О. Шеремет,
А.І. Ємець, Я.Б. Блюм

Ідентифіковано 18 ізотипів СК1-подібних протеїнкіназ у *A. thaliana*. Порівняння каталітичних доменів протеїнкіназ СК1 пацюка (α , β , γ 1-3, δ і ϵ) і 18-ти гомологів з *A. thaliana* підтвердило значну структурну подібність у випадку 13-ти протеїнкіназ: SKL1 (СК1 δ), SKL2, SKL3, SKL4, SKL5, SKL6, SKL7, SKL8, SKL9, SKL10, SKL11, SKL12 і SKL13. Було встановлено, що СК1-специфічний інгібітор D4476 взаємодіє з KC1D пацюка і відібраними рослинними гомологами у аналогічної АТФ-конкурентної манери. Взаємодію з лігандом було підтверджено значеннями оціночних функцій докінгу, результатами молекулярної динаміки і результатами хомогенного аналізу. Відомо, що взаємодія протеїнкіназ СК1 з субстратними білками в значній мірі залежить від наявності специфічних мотивів, розташованих в С-кінцевій ділянці. Відповідні мотиви що відповідають за взаємодію з EB1, були знайдені в С-кінцевих ділянках SKL1 і SKL2. Також була підтверджена роль С-кінцевого фрагмента SKL6 у взаємодії з β -тубуліном.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Cheong, J.K., Virshup, D.M., Casein kinase 1: Complexity in the family, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2011, vol. 43, no. 4, pp. 465–9.
- Elmore, Z.C., Guillen, R.X., and Gould, K.L., The kinase domain of CK1 enzymes contains the localization cue essential for compartmentalized signaling at the spindle pole, *Mol. Biol. Cell*, 2018, vol. 29, no. 13, pp. 1664–74.
- Qiao, Y., Chen, T., Yang, H., Chen, Y., Lin, H., Qu, W., Feng, F., Liu, W., Guo, Q., Liu, Z., and Sun, H., Small molecule modulators targeting pro-tein kinase CK1 and CK2, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, vol. 181, pp. 111581, doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111581.
- Ben-Nissan, G., Cui, W., Kim, D.J., Yang, Y., Yoo, B.C., and Lee, J.Y. Arabidopsis Casein kinase 1-Like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules, *Plant Physiol.*, 2008, vol. 148, pp. 1897–907.
- Ben-Nissan, G., Yang, Y., and Lee, J.Y., Partitioning of casein kinase 1-like 6 to late endosome-like vesicles, *Protoplasma*, 2010, vol. 240, pp. 45–56.
- Karpov, P.A., Sheremet, Ya.A., Blume, Ya.B., and

- Yemets, A.I., Studying the role of protein kinases CK1 in organization of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells, *Cytol. Genet.*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 441–50.
- Yemets, A., Sheremet, Y., Vissenberg, K., Van Orden, J., Verbelen, J.-P., and Blume, Y.B., Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells, *Cell Biol. Int.*, 2008, vol. 32, pp. 630–7.
- Cozza, G., Gianoncelli, A., Montopoli, M., Caparrotta, L., Venerando, A., Meggio, F., Pinna, L.A., Zaggoto, G., and Moro, S., Identification of novel protein kinase CK1 delta (CK1delta) inhibitors through structure-based virtual screening, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, vol. 18, pp. 5672–5.
- Perez, D.I., Gil, C., and Martinez, A., Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases, *Med. Res. Rev.*, 2011, vol. 31, vol. 924–54.
- Rena, G., Bain, J., Elliot, M., and Cohen, P., D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a, *EMBO Rept.*, 2004, vol. 5, pp. 60–5.
- Aud, D.E., Peng, S.L.-Y., Methods of treating inflammatory diseases, 2008 (Jun.19, 2008); US 2008/0146617 A1.
- Zelenak, C., Eberhard, M., Jilani, K., Qadri, S.M., Macek, B., and Lang, F., Protein kinase CK1 α regulates erythrocyte survival, *Cell Physiol. Biochem.*, 2012, vol. 29, pp. 171–80.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W., GenBank, *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39 (Database issue), D32–37.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome, *Science*, 2002, vol. 298, pp. 1912–34.
- Wittau, M., Wolff, S., Xiao, Z., Henne-Bruns, D., and Knippschild, U., Die stressinduzierte Casein Kinase 1 delta kann die Spindeldynamik durch direkte Interaktion mit dem Mikrotubuli assoziierten Protein MAP1A beeinflussen. In: Rothmund M., Jauch KW., Bauer H. (eds) Chirurgisches Forum 2005. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, vol. 34, ch. 13, Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 37–9.
- Albornoz, A., Yáñez, J.M., Foerster, C., Aguirre, C., Pereiro, L., Burzio, V., Moraga, M., Reyes, A.E., and Antonelli, M., The CK1 gene family: expression patterning in zebrafish development, *Biol. Res.*, 2007, vol. 40, pp. 251–66.
- Löhler, J., Hirner, H., Schmidt, B., Kramer, K., Fischer, D., Thal, D.R., Leithäuser, F., and Knippschild, U., Immunohistochemical characterisation of cell-type specific expression of CK1 δ in various tissues of young adult BALB/c mice, *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 1, e4174.

18. Ikeda, K., Zhapparova, O., Brodsky, I., Semenova, I., Tirnauer, J.S., Zaliapin, I., and Rodionov, V., CK1 activates minus-end-directed transport of membrane organelles along microtubules, *Mol. Biol. Cell*, 2011, vol. 22, pp. 1321–9.
19. The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucl. Acids Res.*, 2017, vol. 45, D158–169.
20. Claverie, J-M, Notredame, C., *Bioinformatics for dummies*, 2nd Ed. New York: Wiley Publishing, 2007, 457 p.
21. Korf, I., Yandell, M., and Bedell, J., BLAST. Sebastopol: O'Reilly and Associates, 2003, 368 p.
22. 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., and Higgins, D.G., Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, no. 21, pp. 2947–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
23. Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E., WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.*, 2004; vol. 14, pp. 1188–90.
24. Atteson, K., The performance of neighbor-joining algorithms of phylogeny reconstruction. In Jiang T., Lee D., eds. *Lecture Notes in Computer Sci.* Berlin: Springer-Verlag 1997; vol. 1276, pp. 101–10.
25. Hall, B.G., *Phylogenetic trees made easy*. 3 Ed. Sinauer Ass Inc, 2008: 233 p.
26. Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P., SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource, *Nucl. Acids Res.*, 2012; vol. 40 (D1), D302–5.
27. Page, R.D., TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 1996, vol. 12, pp. 357–8.
28. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, 2011; vol. 28, no. 10 2731–9. doi: 10.1093/molbev/msr121.
29. Jacoby, E., *Chemogenomics, methods and applications*. *Meth. Mol. Biol.*, Springer, Humana Press, 2009; vol. 575, pp. 315.
30. Huang, D., Zhou, T., Lafleur, K., Nevado, C., and Caffisch, A., Kinase selectivity potential for inhibitors targeting the ATP binding site: a network analysis, *Bioinformatics*, 2010; vol. 26, no. 2, pp. 198–204.
31. Baron, R., *Computational Drug Discovery and Design*, *Meth. Mol. Biol.*, Springer, 2012, vol. 819, 628 p.
32. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper U., and Sali, A., Comparative protein structure modeling with Modeller. *Cur. Prot. in Bioinform.*, 2006. doi: 10.1002/0471250953.bi0506s15.
33. Xu, R.M., Carmel, G., Sweet, R.M., Kuret, J., and Cheng, X., Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase, *EMBO J.*, 1995, vol. 14, no. 5, pp. 1015–23.
34. Mashhoon, N., DeMaggio, A.J., Tereshko, V., Bergmeier, S.C., Egli, M., Hoekstra, M.F., and Kuret, J., Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor, *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, no. 26, pp. 20052–60. doi: 10.1074/jbc.M001713200.
35. Gu, J., Bourne, P.E., *Structural Bioinformatics*, 2nd Ed. New Jersey: John Wiley and Sons, vol. 2009, 1035 p.
36. Melo, F., Feytmans, E., Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy, *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 277, pp. 1141–52.
37. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.*, 1993, vol. 26, pp. 283–91.
38. Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, no. 1, pp. 12–21. doi: 10.1107/S09074449-09042073.
39. Eisenberg, D., Lüthy, R., and Bowie, J.U., VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Meth. Enzymol.*, 1997, vol. 277, pp. 396–404.
40. Zoete, V., Cuendet, M.A., Grosdidier, A., and Michielin, O., SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules, *J. Comput. Chem.*, 2011, vol. 32, no. 11, pp. 2359–68.
41. Hartshorn, M.J., Verdonk, M.L., Chessari, G., Brewerton, S.C., Mooij, W.T., Mortenson, P.N., and Murray C.W., Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance, *J. Med. Chem.*, 2007, vol. 50, no. 4, pp. 726–41. doi: 10.1021/jm061277y.
42. Stacklies, W., Seifert, C., and Graeter, F., Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations, *BMC Bioinformatics*, 2011, vol. 12, no. 101, pp. 1–5.
43. MacKerell, Jr.A.D., Banavali, N., and Foloppe, N., Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids, *Biopolymers*, 2001, vol. 56, no. 4, pp. 257–65.
44. Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., and Mackerell, A.D. Jr., CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields, *J. Comp.*

- Chem.*, 2010, vol. 31, no. 4, pp. 671–90. doi: 10.1002/jcc.21367.
45. Biro, J.C., Amino acid size, charge, hydropathy indices and matrices for protein structure analysis, *Theor. Biol. and Med. Model.*, 2006, vol. 3, no. 15, doi:10.1186/1742-4682-3-15.
 46. Zyss, D., Ebrahimi, H., and Gergely, F., Casein kinase I delta controls centrosome positioning during T cell activation, *J. Cell Biol.*, 2011, vol. 195, pp. 781–97.
 47. Wolff, S., Xiao, Z., Wittau, M., Süssner, N., Stüter, M., and Knippschild, U., Interaction of casein kinase I delta (CKI delta) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A), *Biochem. Biophys. Acta*, 2005, no. 1745, pp. 196–206.
 48. Löhler, J., Hirner, H., Schmidt, B., Kramer, K., Fischer, D., Thal, D.R., Leithduser, F., and Knippschild, U., Immunohistochemical characterisation of cell-type specific expression of CK1delta in various tissues of young adult BALB/c mice, *PLoS One*, 2009; 4: e4174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004174>.
 49. Hamada, T., Microtubule-associated proteins in higher plants, *J. Plant Res.*, 2007, vol. 120, pp. 79–98.
 50. Karpov, P.A., and Blume, Y.B., Baird, W.V., Yemets, A.I., Breviario, D., Bioinformatic search for plant homologues of animal structural MAPs in the *Arabidopsis thaliana* genome, *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology*, Springer, Netherlands, 2008, pp. 373–94. doi: 10.1007/978-1-4020-8843-8_18.
 51. Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., et al. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal, *Cell*, 2009, vol. 138, pp. 366–76.

Поступила в редакцию 24.01.20
 После доработки 24.02.20
 Принята к публикации 18.07.20