

БІОІНФОРМАТИЧНА ОЦІНКА РОЛІ MAST/IRE-ЗАЛЕЖНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ У ФОРМУВАННІ ТУБУЛІНОВОГО КОДУ

П.А. КАРПОВ^{1,*}, С.П. ОЖЕРЄДОВ¹, А.О. СТЕШЕНКО², С.І. СПІВАК¹, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
вул. Байди Вишневецького, 2а, Київ, 04123, Україна

² Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна

E-mail: karpov@nas.gov.ua; karpov@ifbg.org.ua

Протеїнкінази є однією з найбільших та різноманітних суперродин еукаріотичних ферментів. Проте, лише деякі з них здатні брати безпосередню участь у фосфорилуванні тубуліну і формуванні «тубулінового коду». Раніше нами було встановлено структурну та функціональну гомологію рослинної протеїнкінази IREN1 і тваринних протеїнкіназ родини MAST, а також експериментально доведено їхню участь у регуляції мікротрубочкового цитоскелету вищих рослин і тварин. В той же час, безпосередній внесок MAST/IRE-специфічного фосфорилування у «тубуліновий код» залишається недостатньо зрозумілим. В межах актуального дослідження, було виконано біоінформатичну та структурно-біологічну оцінку ймовірності таких взаємодій, а саме ідентифіковані сайти фосфорилування тубуліну, які мають найбільшу подібність до профілів специфічного фосфорилування амінокислот протеїнкіназами MAST/IRE. Також були визначені консервативні сайти MAST/IRE-специфічного фосфорилування тубулінів людини та *Arabidopsis: Thr73 (80)*, який має більшість ізотипів α -тубуліну, та *Ser115*, характерний для більшості ізотипів β -тубуліну тварин і рослин. Згідно топології, перший може впливати на структуру гетеродимеру α - β -тубуліну, а другий, на взаємодію між протофіламентами мікротрубочок. Також в цій роботі було визначено ще один сайт потенційного фосфорилування – *Ser433*, який був визначений у обох ізотипів γ -тубуліну *Arabidopsis thaliana*, але відсутній у ссавців. Зовнішнє положення *Ser433* в рослинному γ -тубуліні дозволяє припустити, що його фосфорилування може впливати на структуру комплексу γ TuRC, але не впливає на внутрішні контакти і взаємодії малих комплексів γ TuSC.

Ключові слова: протеїнкінази, MAST, IREN1, тубулін, фосфорилування, сайт фосфорилування.

Вступ. Мікротрубочки (MT) є ключовим елементом цитоскелету, який бере участь у ба-

гатьох важливих клітинних процесах, таких як поділ клітин, підтримання їх полярності, внутрішньоклітинний транспорт і рух (Amos and Schlieper, 2005; Desai and Mitchison, 1997; Howard and Hyman, 2003; Lansbergen and Akhmanova, 2006). Тубулін, як основний білок MT, є важливим субстратом для посттрансляційних модифікацій (ПТМ) (Gadadhar et al, 2017; Janke, 2014; Wloga et al, 2017; Yu et al, 2015). Спільно із експресією різних ізотипів тубуліну, різноманітні ПТМ формують основу «тубулінового коду», як основного джерела функціонального різноманіття MT. Зміни зарядів, локальних конформацій і об'ємів у ділянках цільових сайтів, що спричиняються додаванням або видаленням різних хімічних груп, формують і контролюють функціональну спеціалізацію та пластичність MT (Gadadhar et al, 2017; Smertenko et al, 1997). Відомі ПТМ тубуліну включають фосфорилування, ацетилювання, поліглутамілювання, убіхітинілювання, тирозилування/детирозилування, метилування, утворення $\Delta 2$ -тубуліну, нітрування тирозину, поліамінування, гліцилювання та ін. (Blume et al, 2010; Chakraborti et al, 2016; Wloga et al, 2017; Smertenko et al, 1997; Yemets et al, 2011). Зокрема, фосфорилування є надзвичайно важливою модифікацією, яка інтегрує різні шляхи передачі сигналів, що впливають на клітинний поділ, проліферацію, диференціацію, рух, транскрипцію генів, метаболізм, адаптацію до умов середовища, тощо (Sawyer, 2007).

У рослин фосфорилування здійснюється численними протеїнкіназами. Так, кіном *A. thaliana* представлений понад 1000 генів протеїнкіназ (за нашими даними – 1021 ген) (Chudinova et al, 2017; Karpov et al, 2017; Wang et al, 2003, 2007; Zulawski et al, 2014). Однак, лише

незначна їх частина пов'язана з регуляцією цитоскелету та клітинного поділу, і лише деякі з них можуть брати безпосередню участь у фосфорилуванні тубуліну (Hornbeck et al, 2015; Magiera et al, 2014). Згідно з експериментальними даними для більшості протеїнкіназ, залучених до регуляції цитоскелету та клітинного поділу, цільові білки, а також сайти їх фосфорилування досить часто визначені недостатньо чітко або невідомі (Hornbeck et al, 2015). Це цілком стосується групи асоційованих з мікротрубочками серин/треонінових протеїнкіназ (MAST = Microtubule-Associated Serine/Threonine Kinases), що належать до родини протеїнкіназ AGC Ser/Thr. У ссавців і плодових мушок протеїнкінази MAST беруть активну участь у процесах регуляції різних мікротрубочкових структур (інтерфазних мікротрубочок, препрофазної стрічки і мітотичного веретена). Вищі рослини також мають протеїнкінази, гомологічні MAST, але структурно-функціональні механізми взаємодії їх з цитоскелетом залишаються недостатньо вивченими (Bryantseva et al, 2010; Chudinova et al, 2017; Karpov et al, 2009, 2010). Раніше нами було підтверджено подібність послідовностей та структур рослинної протеїнкінази IREN1 (Incomplete Root Hair Elongation 1; At3g17850) та тваринних протеїнкіназ родини MAST (Karpov et al, 2010; Chudinova et al, 2017). Також нами було клонувано фрагмент MAST2-подібної кінази винограду, що містив каталітичний домен та повнорозмірної кДНК IREN1 з *A. thaliana* (Bryantseva et al, 2010; Chudinova et al, 2017). Рекомбінантний білок GFP-IREN1, що експресувався у клітинах ссавців, виявив колокалізацію рослинного гомолога з центросомою. При цьому, було продемонстровано, що центросомальна колокалізація рослинної IREN1 пов'язана з N-кінцевою ділянкою зазначеної протеїнкінази (Chudinova et al, 2017). Однак, в той же час сайти фосфорилування ізотипів тубуліну протеїнкіназами MAST/IRE залишаються невідомими.

Для рослин однією з найбільш чутливих тестових систем, що демонструють вплив фосфорилування тубуліну на морфо-фізіологічні характеристики клітин, є кореневі волоски (Yemets et al, 2008; Karpov et al, 2019). Oyama et al (2002). Виявлено, що зниження рівнів

експресії протеїнкінази IREN1 погіршує ріст корневих волосків арабідопсису (Oyama et al, 2002). У нормі ріст кореневого волоска починається з розширення вакуолі, а згодом у субапикальній ділянці, біля вакуолі, відбувається збільшення кількості МТ, які позиціонуються паралельно поздовжній осі (Grierson et al, 2014). Інформація про те, яким чином відбувається релокалізація МТ цитоплазмі та яким чином це пов'язано з регуляцією онтогенезу кореневого волоску, відсутня. Однак існує припущення, що це може бути пов'язано саме з IREN1, оскільки гомологічні IREN1, MAST людини, регулюють формування морфологічно подібних структур – паралельних МТ в «манжетах» сперматидів (Chudinova et al, 2017; Walden and Millette 1996). Крім того, активність MAST2 була зафіксована в круглих сперматозоїдах на початку формування «манжетів», як і її різке зниження на заключних стадіях сперматогенезу (Walden et al, 1993). Також відомо, що у ранніх ембріонах дрозофіли MAST-подібна протеїнкіназа «Drop out» (dor) регулює мембранні центри первинної нуклеації мікротрубочок шляхом фосфорилування молекул динеїну (Hain et al, 2014; Pelissier et al, 2003). В свою чергу, нами виявлено, що рослинна IREN1 колокалізується з центрами організації мікротрубочок у клітинах тварин і потенційно причетна до регуляції мікротрубочок (Chudinova et al, 2017). В той же час, питання, чи пов'язана ця регуляція з безпосереднім фосфорилуванням тубуліну, і чи дійсно рослинні IRE-подібні протеїнкінази належать до унікальної групи модуляторів «тубулінового коду» рослин, залишається невивченим. Тому в цій роботі нами, на підставі результатів біоінформатичних та структурно-біологічних досліджень, було визначено найбільш вірогідні сайти MAST/IRE-специфічного фосфорилування ізотипів тубуліну людини і *A. thaliana*.

Матеріали та методи. Контрольні сайти MAST-специфічного фосфорилування. Як основні контрольні сайти MAST-специфічного фосфорилування використовували експериментально підтверджені сайти, відомі для протеїнкінази Greatwall людини (MASTL, GWL, UniProtKB: Q96GX5): 55-KGQKYFD¹SGDYNMAK-69, ідентифікований у cAMP-залежному фосфопро-

ARP19 HUMAN (P56211)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 HUMAN (P56211-2)	39-KGQKYFD	SGDYNMAK-53
ARP19 MOUSE (P56212)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 MOUSE (P56212-2)	39-KGQKYFD	SGDYNMAK-53
ARP19 PIG (Q712U6)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 PIG (Q712U6-2)	39-KGQKYFD	SGDYNMAK-53
ARP19 RAT (Q712U5)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 RAT (Q712U5-2)	39-KGQKYFD	SGDYNMAK-53
AR19A XENLA (Q6DEB4)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
AR19B XENLA (Q6GQG3)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ARP19 BOVIN (Q28055)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 BOVIN (Q28055-2)	39-KGQKYFD	SGDYNMAK-53
ARP19 CHICK (Q5ZLY8)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 TAEGU (B5G1C4)	55-KGQKYFD	SGDYNMAK-69
ARP19 TAEGU (B5G1C4-2)	39-KGQKYFD	SGDYNMAK-53
ENSA HUMAN (O43768)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA HUMAN (O43768-2)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA HUMAN (O43768-5)	56-KGQKYFD	SGDYNMAK-70
ENSA HUMAN (O43768-6)	56-KGQKYFD	SGDYNMAK-70
ENSA MOUSE (P60840)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA MOUSE (P60840-2)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA PIG (P68211)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA RAT (P60841)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA RAT (P60841-2)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA BOVIN (P68210)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA BOVIN (P68210-2)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA CHICK (Q5ZIF8)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA DANRE (Q1L8X2)	67-KGQKYFD	SGDYNMAK-81
ENSA DANRE (Q1L8X2-2)	56-KGQKYFD	SGDYNMAK-70
ENSA SALSA (B5XE27)	58-KGQKYFD	SGDYNMAK-72
ENSA XENLA (Q7ZXH9)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74
ENSA XENTR (Q6NVR1)	60-KGQKYFD	SGDYNMAK-74

Рис. 1. Експериментально підтвержені сайти Greatwall-кінази тварин, ідентифіковані в сAMP-регульованих фосфопротеїні 19 (ARP19) та альфа-ендосульфїні (ENSA), депонованих в UniProtKB

їні 19 (ARP19, UniProtKB: P56211) та 60-KGQKYFDSGDYNMAK-74, ідентифікований у альфа-ендосульфїні (ENSA, UniProtKB: O43768) (рис. 1). Як додаткове джерело інформації про MAST-специфічне фосфорилування були використані бази даних PhosphoNetworks (www.phosphonetnetworks.org), які містять інформацію, отриману з використанням комбінації біоінформатичних методів та верифікованих із залученням методу білкових чипів (Hu et al, 2014a,b; Newman et al, 2013).

MAST1-специфічні сайти фосфорилування білків людини, депоновані в PhosphoNetworks,

включали:

SSBP3 (IDGLPKNSPNNISGI),
 CHEK2 (SHGSSACSQPHGSVT),
 C14orf106 (VQGVPLESSNNDIFL),
 NCL (TPAKAVTTPGKKGAT),
 TFDP1 (VFIDQNI SPGKGVVS),
 NCL (TPAKKTVIPAKAVTT),
 NOL7 (SQTNIKKSPGKVKEV),
 RPA2 (VDTDDTSENTVVPP),
 C14orf106 (SIVATTKSKKDTFVL),
 EIF4B (SRTGSESSQTGTSTT),
 NOL7 (VQKVQSVSQNKSYLA),
 CSDE1 (FSNPKTTSPNKGKEK),

ERCC6L (PSGETLS **S**ENKSSWL),
 ERCC6L (FSSQIP**S**VNKSMS),
 EIF4B (EKSL**E**EN**F**LNKEEDC),
 EIF2AK2 (VSPLLL**T**ITNSSEGL),
 GRK5 (VLDIEQ**F**STVKG**V**NL),
 ORC1L (VAFSEIT**S**PSKRSQP),
 CSDE1 (VRL**L**GR**N**SN**S**KRL**L**LG),
 EIF2AK2 (TLTVW**K****S**PEKNERH),
 ERAL1 (LDTPG**I****S**PGK**Q**KRH),
 PHB2 (SFTRGSD**S**LIK**G**KK-),
 MTA1 (SSV**L**SSL**I**PAKVAPV),
 CXXC1 (MLARG**S**AS**P**HKSS**P**Q),
 NOC2L (SRRKGR**A**SE**H**KD**Q**LS),
 MDM4 (DIPT**L**PT**S**E**H**K**C**I**H**S),
 NOC2L (PGG**S**PS**A****S**RRKGR**A**S),
 FOXP4 (PKMTG**S**P**I**LVKN**M**IS),
 RPA2 (QLKH**M**SV**S**SI**K**Q**A**VD),
 EIF4A3 (ATMAT**S**GS**A**R**K**R**L**L**K**),
 TFDP1 (LMAM**N**I**S**KE**K**KE**I**K),
 PPP1R13L (EPFG**S**RG**S**PR**K**A**A**TD),
 FOXP4 (GGPAR**R****S**SD**K**FC**S**P).

MAST2-специфічні сайти фосфорилування білків людини, депоновані в PhosphoNetworks, включали:

SMARCA4 (DDSEGE**E****S**EEEE**E**GE),
 SMARCA4 (SDSEES**G****S**EEEE**E**E),
 NUP133 (DEL**F**SS**H****S**DL**D**SD**S**E),
 ERCC6L (TCL**S**W**E**F**S**E**K**D**D**E**P**E),
 ERCC6L (DGE**D**ED**D****S**FK**D**T**S**SI),
 CHGB (KGER**G**ED**S**SEE**K**H**L**E),
 CHGB (GER**G**ED**S**SEE**K**H**L**EE),
 NUP133 (V**V**DEL**F**SS**H**SD**L**SD),
 ERHB3 (SDPT**Y**T**S****S**LG**G**K**I**PI),
 NFATC4 (PAL**S**RR**G****S**LG**E**E**G**SE),
 CTTN (G**K**TE**K**HA**S**Q**K**D**Y**SS**G**)
 CTTN (E**K**L**Q**L**H**E**S**Q**K**D**Y**SK**G**).

Конструювання мотивів сайтів MAST-специфічного фосфорилування. Мотиви MAST-специфічних сайтів фосфорилування конструювали згідно з рекомендаціями сервісу PROSITE (<https://prosite.expasy.org>) (Sigrist et al, 2013). Під час сканування білків за допомогою програми ScanProsite було застосовано опцію пошуку у визначеній користувачем колекції мотивів та білків-мішеней (Option 3 – Submit PROTEIN sequences and MOTIFS to scan them against each other) (Sigrist et al, 2013). Як білки-мішені використовували актуальні редакції послідовностей ізотипів α -, β - і γ -тубуліну лю-

дини та арабідопсису, депонованих в UniProtKB (www.uniprot.org, UniProt Consortium, 2023):

H. sapiens – ізотици α -тубуліну:

TBA1A (Q71U36), TBA1B (P68363),
 TBA1C (Q9BQE3), TBA3C (P0DPH7),
 TBA3E (Q6PEY2), TBA4A (P68366),
 TBA8 (Q9NY65) і TBAL3 (A6NHL2);

ізотици β -тубуліну:

TBB1 (Q9H4B7), TBB2B (Q9BVA1),
 TBB2A (Q13885), TBB4A (P04350),
 TBB4B (P68371), TBB5 (P07437),
 TBB3 (Q13509), TBB6 (Q9BUF5)
 TBB8 (Q3ZCM7);

ізотици γ -тубуліну:

TBG1 (P23258) і TBG2 (Q9NRH3).

A. thaliana – ізотици α -тубуліну:

BA1 (P11139), TBA2 (B9DGT7),
 TBA3 (Q56WH1), TBA4 (Q0WV25),
 TBA5 (B9DHQ0), TBA6 (P29511);

ізотици β -тубуліну:

TBB1 (P12411), TBB2 (Q56YW9),
 TBB3 (Q9ASR0), TBB4 (P24636),
 TBB5 (P29513), TBB6 (P29514),
 TBB7 (P29515), TBB8 (P29516),
 TBB9 (P29517);

ізотици γ -тубуліну:

TBG1 (P38557) і TBG2 (P38558).

Філогенетична кластеризація. Кластеризацію контрольного та потенційних сайтів фосфорилування, визначених з використанням профільного пошуку, виконували шляхом вирівнювання відповідних амінокислотних послідовностей за допомогою програми ClustalX (v.2.0.10) із залученням UPGMA-кластеризації (Atteson et al, 1997) та бутстрепінгу (Efron et al, 1996). Подальша візуалізація та аналіз дендрограми були виконані за допомогою програм MEGA v.11 (www.megasoftware.net) (Tamura et al, 2021) та FigTree (Tree Figure Drawing Tool) версії 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>). Передбачені позиції мотивів порівнювали з експериментально підтвердженими сайтами з бази даних PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) і зберігали у форматі Xp \pm 7 (*.fasta) (Hornbeck et al, 2015).

Структурно-біологічні дослідження. Візуалізацію структурних моделей, аналіз білкових

комплексів і топології сайтів фосфорилування було виконано за допомогою програми PyMOL v.1.5.0.5 (www.pymol.org). Структурний аналіз ґрунтувався на використанні структур RCSB Protein Data Bank – 6BR1, 6BRF, 6BRY, 6BS2 (для α - та β -тубулінів) (Banerjee et al., 2018) раніше побудованої 3D-моделі рослинного комплексу γ TuSC (Karpov et al., 2017) та моделях, побудованих за допомогою серверів гомологічного моделювання білкових структур I-Tasser (Yang et al., 2015) та Swiss-Model (Bienert et al., 2017).

Результати. Для прогнозування сайтів специфічного фосфорилування α -, β - та γ -тубулінів *H. sapiens* та *A. thaliana*, перш за все, було побудовано узагальнений мотив на підставі послідовностей експериментально підтверджених сайтів протеїнкінази родини MAST. Первинна вибірка включала експериментально підтвержені сайти специфічного фосфорилування протеїнкіназою GWL (Greatwall/MASTL), – специфічні сайти фосфорилування відомі для цАМФ-регульованого фосфопротеїну 19 (ARP19) та альфа-ендосульфїну (ENSA) (рис. 1). Крім того, до вибірки були додані сайти з проекту PhosphoNetworks, асоційовані з протеїнкіназами MAST1 і MAST2 людини (www.phospho-networks.org) (Hu et al., 2014a,b; Newman et al., 2013) (докладніше див. розділ «Матеріали та методи»). Повна вибірка включала 77 сайтів фосфорилування: 31 для GWL, 33 для MAST1 і 12 для MAST2. На підставі результатів вирівнювання контрольних сайтів, за умови рестрикції відкриття гепів, нами було створено відповідний пошуковий мотив (згідно із правилами PROSITE): {CHNRWY}-{NWY}-{CHQWY}-{CWY}-{CFHV}-{CGMWY}-{MQRWY}-{ST}-{CIMWY}-{CFMQWY}-{DEGHKNSTY}-{MPW}-{NPTW}-{CMY}-{FMNRWY}.

На наступному етапі досліджень зазначений мотив був використаний для ідентифікації перспективних консенсусних ділянок у повному наборі послідовностей ізотипів α -, β - та γ -тубулінів *H. sapiens* та *A. thaliana* (див. розділ «Матеріали та методи»). За результатами пошуку з використанням інструменту ScanProsite виявлено 51 потенційний сайт MAST-специфічного фосфорилування тубулінів для *H. sapiens* і 66 для *A. thaliana*. Результати порівняльного аналізу ідентифікованих сайтів фос-

форилування тубулінів людини з даними PhosphoSitePlus (www.phosphosite.org) підтвердили їх збіг з результатами мас-спектрометрії. Оскільки цей мотив виявляє деградовану природу, кількість передбачених сайтів MAST/IRE-фосфорилування була надмірною. У зв'язку з цим на наступному етапі було проведено спільну кластеризацію прогнозованих та експериментально підтверджених сайтів GWL. Оскільки послідовності всіх GWL-сайтів з білків ARP19 та ENSA виявилися ідентичними, кластеризацію проводили з використанням однієї спільної послідовності: KGQKYFD \square GDYNMAK (55-KGQKYFD \square GDYNMAK-69 з ARP19 людини/UniProtKB: P56211 та 60-KGQKYFD \square GDYNMAK-74 з ENSA людини/UniProtKB: O43768) (рис. 1). Для спільної кластеризації всі сайти вибірки були підготовлені у загальноприйнятій формі S/T \pm 7 і збережені у форматі файлу *.fasta. При цьому, при вирівнюванні ділянок ПТМ, відкриття ге-пів було заборонено. Таким чином, була застосована кластеризація в ClustalX на основі UPGMA та бутстрепінгу без звичайного вирівнювання послідовностей (рис. 2). Побудоване дерево дозволило визначити найбільш перспективні сайти фосфорилування α -, β - та γ -тубулінів, які утворювали спільну кладу з контрольною послідовністю. Для α - та β -тубулінів було відібрано по одному сайту для ізотипів α - та β -тубулінів. Ці сайти мали спільне розташування для більшості ізотипів α - та β -тубулінів у *H. sapiens* та *A. thaliana*.

Для α -тубуліну найближчий кластер формувала група фрагментів, яка відповідала сайту Thr73 (Thr81 у TBAL3 (A6NHL2) людини). Зазначений сайт був виявлений майже у всіх α -тубулінів людини (TBA1A, TBA1B, TBA3C, TBA3E, TBA8 і TBAL3) і всіх α -тубулінів арабідопсису (TBA1, TBA2, TBA3, TBA4, TBA5 і TBA6) (рис. 3). Винятком був лише ізотип TBA4A людини. За результатами аналізу структурних моделей фрагментів мікротрубочок *H. sapiens* та *A. thaliana* (рис. 4, а) було встановлено локалізацію Thr73 на внутрішньої контактній ділянці гетеродимерів α/β -тубуліну (рис. 4, б). Таким чином, отримані результати свідчать про те, що фосфорилування Thr73 може впливати на збирання та цілісність гетеродимерів тубуліну у тварин і вищих рослин.

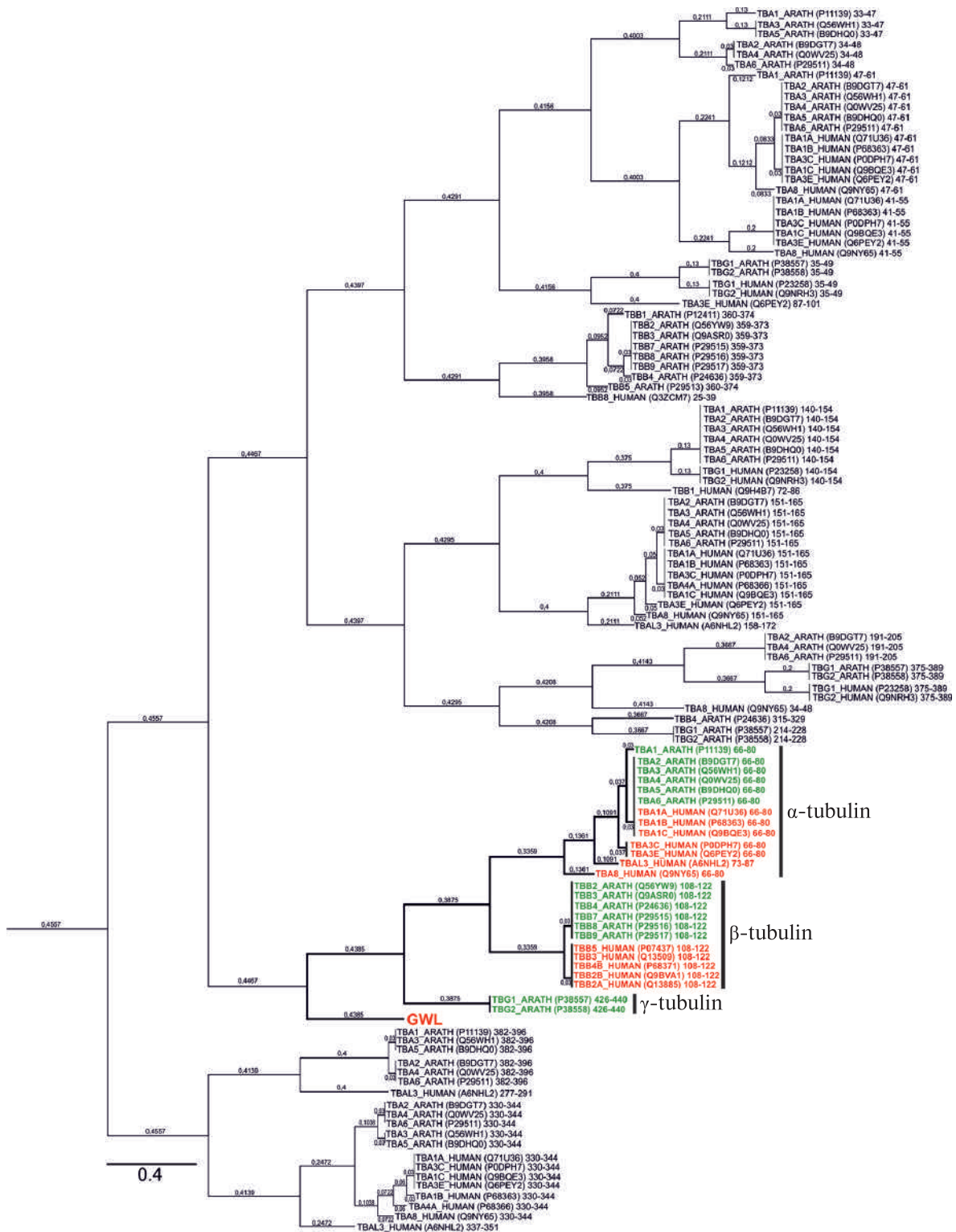


Рис. 2. Результати спільної кластеризації (bootstrapping методом UPGMA з обмеженням відкриття гелів) сайтів MAST/IRE-специфічного фосфорилювання, передбачених для ізотипів тубуліну людини та арабідопсису і експериментально доведеного консервативного сайту MASTL (GWL – Serine/threonine-protein kinase greatwall) з ARP19 (сAMP-регульований фосфопротеїн 19) та ENSA_HUMAN (Альфа-ендосульфін)

CONTROL:

>ARP19/ENSA (GWL)

KGQKYFD**S**GDYNMAK

α-tubulin

Thr73 (81)

```

>TBA1 ARATH (P11139) : 66-VFLDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA2 ARATH (B9DGT7) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA3 ARATH (Q56WH1) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA4 ARATH (Q0WV25) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA5 ARATH (B9DHQ0) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA6 ARATH (P29511) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA1A HUMAN (Q71U36) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA1B HUMAN (P68363) : 66-VFVDLEPTIVIDEVRT-80
>TBA3C HUMAN (P0DPH7) : 66-VFVDLEPTIVVDEVRT-80
>TBA3E HUMAN (Q6PEY2) : 66-VFVDLEPTIVVDEVRT-80
>TBA8 HUMAN (Q9NY65) : 66-VMIDDLEPTIVVDEVRA-80
>TBA13 HUMAN (A6NHL2) : 73-LFVDLEPTIVIDGIRT-87
      : :*****: : : : :
    
```

No hit: TBA4A_HUMAN

β-tubulin

Ser115

```

>TBB2 ARATH (Q56YW9) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB3 ARATH (Q9ASR0) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB4 ARATH (P24636) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB7 ARATH (P29515) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB8 ARATH (P29516) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB9 ARATH (P29517) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB5 HUMAN (P07437) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB3 HUMAN (Q13509) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB4B HUMAN (P68371) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB2B HUMAN (Q9BVA1) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB2A HUMAN (Q13885) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
      *****:*****
    
```

No hit: TBB1_ARATH, TBB5_ARATH and TBB6_ARATH

No hit: TBB4A_HUMAN, TBB6_HUMAN, TBB8_HUMAN and TBB1_HUMAN

γ-tubulin

Ser433

```

>TBG1 ARATH (P38557) : 426-ESRDIISLVDEYKA-440
>TBG2 ARATH (P38558) : 426-ESRDIISLVDEYKA-440
      *****
    
```

No hit: TBG1_HUMAN and TBG2_HUMAN

Рис. 3. Ділянки потенційних сайтів фосфорилування, які виявили найбільшу подібність до контрольних сайтів GWL-кінази, ідентифікованих для α-, β- та γ-тубулінів. Відбір було здійснено на підставі максимальної подібності пошуковим патернам, а також, за результатами спільної кластеризації

Для β-тубуліну найближчим кластером виявилась група фрагментів, що відповідають сайту Ser115 та об'єднують більшість β-тубулінів *A. thaliana* (TBB2, TBB3, TBB4, TBB7, TBB8 і

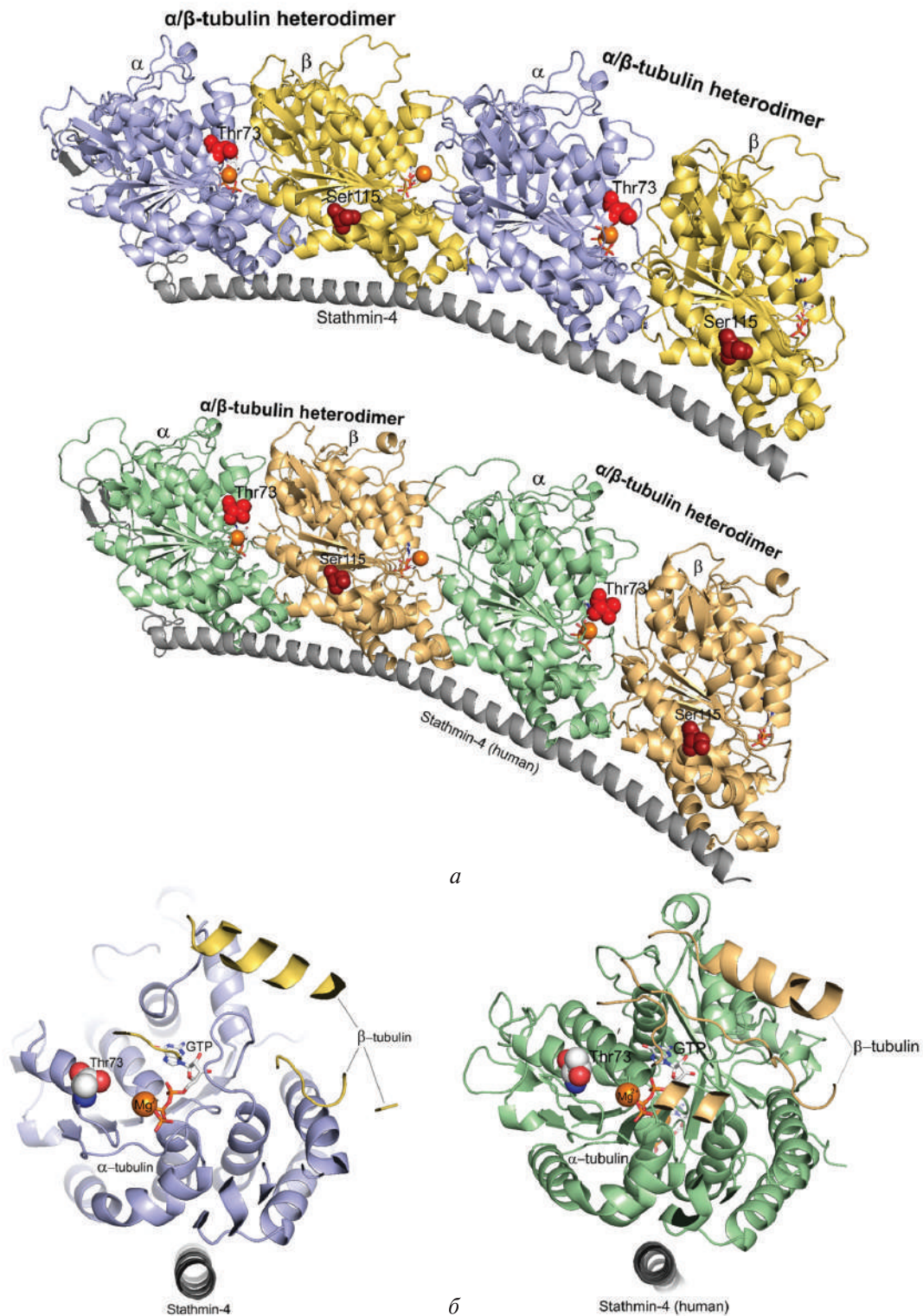
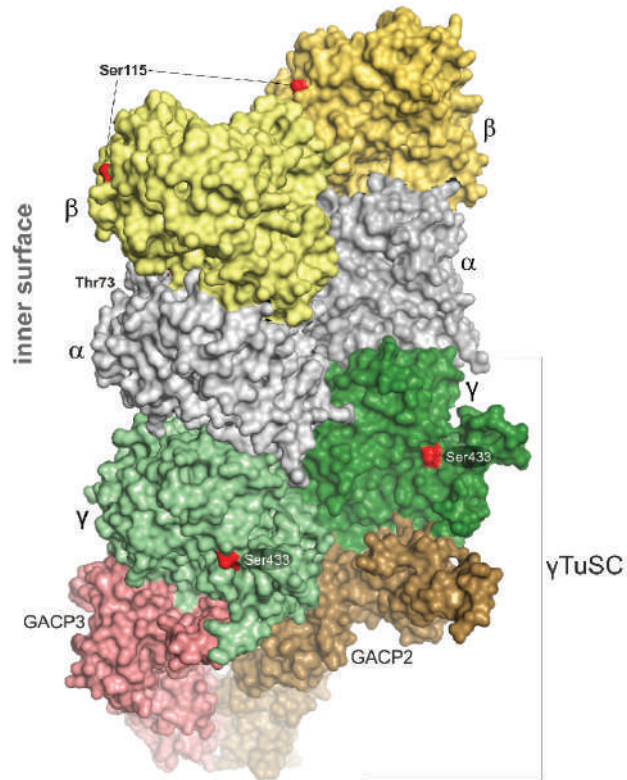


Рис. 4. Аналіз структурної топології визначених сайтів MAST/IREN1 у мікротрубочках ссавців та рослин: *a* – топологія Thr73(81) α -тубуліну та Ser115 β -тубуліну в протофіламенті мікротрубочок ссавців (зверху) та рослин (знизу); *б* – розташування Thr73 α -тубуліну у внутрішньодимерному контакті молекул α - та β -тубуліну експериментально вирішеної структури ссавців (PDB: 6BR1, зліва) та рослинної моделі (справа)



a

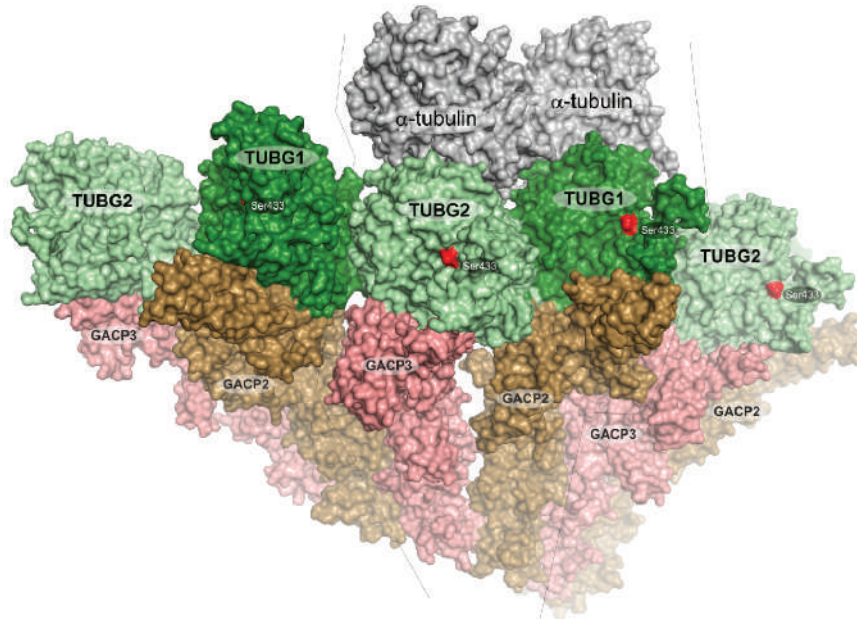


Рис. 5. Структурне розташування Ser115 в β -тубуліні та Ser433 в γ -тубуліні. Розташування залишку Ser115 на поверхні молекули β -тубуліну вказує на те, що його фосфорилування може впливати на взаємодію між сусідніми протофіламентами мікротрубочки (*a*). Положення Ser433 в молекулі γ -тубуліну пояснює, що цей залишок явно не впливає на внутрішні контактні поверхні малого комплексу γ -тубуліну (γ TuSC) та їх полімеризацію (*a*, *b*). Однак зовнішня локалізація залишку Ser433 дозволяє припустити, що у вищих рослин фосфорилування цієї амінокислоти може впливати на взаємодію великого комплексу (γ TuRC) з асоційованими білками

ТВВ9) і *H. sapiens* (ТВВ5, ТВВ3, ТВВ4В, ТВВ2В і ТВВ2А) (рис. 3). Водночас, даний сайт не ідентифіковано у ізотипів ТВВ1, ТВВ5 і ТВВ6 з *A. thaliana* та ТВВ4А, ТВВ6, ТВВ8 і ТВВ1 з *H. sapiens*. Топологія розташування Ser115 на поверхні молекули білка дозволяє припустити, що його фосфорилування має впливати на латеральні взаємодії сусідніх протофіламентів (рис. 4, а та рис. 5, а).

Окрема клада, що відповідає сайту Ser433, виявлялася у випадку γ -тубуліну (рис. 3). Сайти з цієї класифікації демонструють мінімальну відстань до контролю (сайту GWL-специфічного фосфорилування) і представлені лише двома ідентичними сайтами з γ -тубуліну арабідопсису: TBG1 і TBG2. При цьому, цей сайт відсутній у γ -тубулінів людини. Результати Blastp-пошуку цієї ділянки в розділі «reviewed» UniProtKB засвідчили, що перші 100 хітів представлені виключно послідовностями γ -тубуліну 71-го представника квіткових рослин (*Magnoliophyta*). Таким чином, якщо у майбутньому фосфорилування залишку S433 в *A. thaliana* буде підтверджено експериментально, це буде свідчати про наявність IRE-залежного механізму посттрансляційної регуляції, який притаманний виключно вищим рослинам.

Для аналізу структурної локалізації Ser433 нами було доповнено раніше побудовану модель центру первинної нуклеації мікротрубочок *A. thaliana* (фрагмент, представлений комплексом з трьох гетеротетрамерів γ TuSC) (Карпов et al, 2017). Для отримання більш повної картини до комплексу γ TuSC було додано два гетеродимера α/β -тубуліну. Аналіз положення сайту Ser433 показав, що фосфорилування зазначеного амінокислотного залишку не може впливати на внутрішні і кільцеві контактні інтерфейси малих комплексів γ TuSC (рис. 5, а, б). Проте його зовнішня локалізація вказує на те, що фосфорилування залишку Ser433 може впливати на зовнішні взаємодії структури великого комплексу γ TuRC рослинних центрів первинної нуклеації мікротрубочок (Yemets et al, 2008).

Обговорення. Як свідчать отримані результати, два з визначених потенційних сайтів MAST/IRE-специфічного фосфорилування є консервативними у людини та арабідопсису: залишок Thr73 (80), притаманний більшості

ізотипів α -тубуліну, та залишок Ser115, виявлений у більшості ізотипів β -тубуліну тварин і рослин. Третій потенційний сайт фосфорилування залишок Ser433 виявлений у обох ізотипів γ -тубуліну *A. thaliana*, але відсутній у γ -тубулінів ссавців. Слід зазначити, що Ser433 та його амінокислотне оточення зберігають консервативність у більшості представників *Magnoliophyta* (The UniProt Consortium T, 2023). Виділені амінокислотні залишки відповідають канонічним мотивам сайтів фосфорилування, а структурна топологія підтверджує їх доступність для модифікації.

Функціональне значення залишку Thr73 α -тубуліну підтверджується тим, що цей залишок локалізований в ділянці внутрішнього інтерфейсу димеру α/β -тубуліну (Prota et al, 2014). Положення залишку Thr73 свідчить про те, що його фосфорилування може не лише впливати на структуру гетеродимеру тубуліну, структуру GTP/GDP-обмінного сайту та взаємодію з кофактором (Mg^{2+}), а також впливати на властивості міждиммерного простору канонічного сайту зв'язування колхіцину (Prota et al, 2014; Vela-Corcía et al, 2018). За даними PhosphoSitePlus фосфорилування α -тубуліну людини за залишком Thr73 було раніше підтверджено за допомогою мас-спектрометрії (ID: 14582260) (Hornbeck et al, 2015; Mertins et al, 2016). Крім того, фундаментальна роль залишку Thr73 була підтверджена експериментами на культурах пухлинних клітин молочної залози HeLa, Jurkat і K562 (Hornbeck et al, 2015; Kettenbach et al, 2011; Mertins et al, 2016; Zhou et al, 2013).

Інший сайт – залишок Ser115 β -тубуліну – розташований у латеральній контактній зоні між протофіламентами мікротрубочок, і його фосфорилування у ссавців було раніше підтверджено даними фосфопротеомного аналізу білків клітин HeLa (Liu et al, 2015). Фосфорилування залишку Ser115 β -тубуліну у ссавців також було детектовано за допомогою мас-спектрометрії (ID: 4713923) (Hornbeck et al, 2015; Klammer et al, 2012; Mertins et al, 2016), а також доведено експериментами на культурах пухлинних клітин молочної залози, H2009, H2887, HeLa, Jurkat і MKN-45 (Hornbeck et al, 2015; Kettenbach et al, 2011; Klammer et al, 2012; Mertins et al, 2016). Крім того, нещодавно було

показано, що залишок Ser115 β -тубуліну *A. thaliana* може також фосфорилуватися NIMA-спорідненою кіназою 6 (NEK6) (Takatani et al, 2017).

Раніше нами було трансфікувано клітинну лінію нирок африканської зеленої мавпи (*Vero*) плазмідною конструкцією, що експресує химерний ген *GFP-IREH1* і показано, що продукт його експресії розподіляється в цитоплазмі, переважно колокалізуючись з центросомою. Проте подальші експерименти засвідчили відсутність колокалізації IREN1 з центросомами в клітинах зі зруйнованими МТ та її відновлення після повторної появи МТ. Отже, зв'язування рослинної протеїнкінази IREN1 з центросомою тварин залежить від МТ (Chudinova et al, 2017). Це також підтверджувалось імунопреципітацію химерних продуктів експресії генів рEGFP-IREH1 та рEGFP-C3 з лізатів клітин HEK293 з антитілами до GFP. В результаті імунопреципітації з γ -тубуліном ссавців утворення комплексу не виявлено. Таким чином, рослинна протеїнкіназа IREN1 в клітинах людини виявляє пряму або опосередковану спорідненість до мікротрубочкового, але не до центросомального тубуліну (Chudinova et al, 2017).

Порівнюючи дані попередніх експериментів та актуального біоінформатичного дослідження, можна зробити висновок, що залишок Thr73 (80) α -тубуліну та залишок Ser115 β -тубуліну є найбільш вірогідними цільовими сайтами рослинної протеїнкінази IREN1 та тваринної протеїнкінази MAST. Незважаючи на те, що раніше було експериментально доведено, що ці сайти є частиною «тубулінового коду» і фосфорилуються *in vitro* (Hornbeck et al, 2015; Klammer et al, 2012; Mertins et al, 2016), гіпотеза про їхню асоціацію з протеїнкіназами IREN1 і MAST висунута вперше. Консервативність цих ділянок у тубулінів рослин і тварин підтверджує нашу теорію про не лише структурну, але й певну функціональну консервативність рослинної IREN1 та тваринної MAST (Bryantseva et al, 2010; Chudinova et al, 2017; Karpov et al, 2009a, 2009b, 2010).

Не слід також ігнорувати можливість безпосереднього фосфорилування рослинного γ -тубуліну за участю IREN1. Незважаючи на те, що Ser433 присутній лише у γ -тубуліну рос-

лин, слід враховувати, що цей сайт виявився найбільш подібним до експериментально доведених сайтів тваринної протеїнкінази MASTL (GW – Serine/threonine-protein kinase greatwall) (рис. 1 та рис. 3). Проте на цьому етапі ця гіпотеза певною мірою залишається дискусійною, але, безсумнівно, потребує подальшого дослідження із використанням експериментальних методів.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані із використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин або людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

BIOINFORMATICAL VIEW ON CONTRIBUTION OF MAST/IRE- DEPENDENT PHOSPHORYLATION IN TUBULIN CODE

*P.A. Karpov, S.P. Ozheredov, A.O. Steshenko,
S.I. Spivak, Ya.B. Blume*

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS
of Ukraine, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2A, Kyiv,
04123, Ukraine

Educational and Scientific Center «Institute
of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko
National University of Kyiv, Volodymyrska str., 64/13,
Kyiv, 01601, Ukraine

E-mail: karpov@nas.gov.ua; karpov@ifbg.org.ua

Protein kinases represents one of the largest eukaryotic enzyme superfamilies. However, only a few of them can directly phosphorylate tubulin and contribute in modulation of 'tubulin code'. Previously, we confirmed the structural and functional homology of the plant protein kinase IREN1 and members of the mammalian MAST kinase family. Also, it was experimentally confirmed their participation in the regulation of the microtubule system in plant and animal cells. At the same time, the direct contribution of MAST/IRE to the «tubulin code» remains unclear. In the current work, based on bioinformatical and structural biology methods it was evaluated the possibility of such an interaction. The target sites of MAST/IRE-phosphorylation of tubulin were predicted based on similarity to the gene-

ralized specific profiles. Two potential MAST/IRE-specific sites, conserved in human and *Arabidopsis* tubulins were selected: Thr73 (80) existing in most isoforms of α -tubulin and Ser115 found in majority of human and plant isoforms of β -tubulin. It was predicted that phosphorylation of the first can affect assembly of α - β -tubulin heterodimer and phosphorylation of the second, may affect interaction between neighboring protofilaments of microtubules. The last one – Ser433, was found in both γ -tubulin isoforms of *A. thaliana*, but it was absent in mammals. External position of Ser433 in plant γ -tubulin make it possible, that phosphorylation of this amino acid can affect the structure of γ TuRC complex but it does not affect inner contacts of γ TuSC and their interaction in the ring.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Amos LA, Schlieper D (2005) Microtubules and maps. *Adv Protein Chem* 71:257–298. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)71007-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)71007-4)
- Atteson K (1997) The performance of neighbor-joining algorithms of phylogeny reconstruction. *Lecture Notes Comp Sci* 1276:101–110. <https://doi.org/10.1007/BFb0045077>
- Banerjee S, Arnst KE, Wang Y, Kumar G, Deng S, Yang L, Li GB, Yang J, White SW, Li W, Miller DD (2018) Heterocyclic-fused pyrimidines as novel tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site: Structural basis and antitumor efficacy *J Med Chem* 61(4):104–1718. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01858>
- Bienert S, Waterhouse A, de Beer TA, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T (2017) The SWISS-MODEL repository – new features and functionality. *Nucl Acids Res* 45(D1):D13–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Blume Ya, Yemets A, Sheremet Ya, Nyporko A, Sulimenko V, Sulimenko T, Draber P (2010) Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on a *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells. *BMC Plant Biology* 10:29. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-29>
- Bryantseva SA, Gavryushina ES, Yemets AI, Karpov PA, Blume YaB, Drygin YuF, Nadezhdina ES (2010) MAST2-like protein kinase from grape *Vitis vinifera*: Cloning of catalytic domain cDNA. *Cyt Genet.* 44(4):227–232. <https://doi.org/10.3103/S0095452710040079>
- Chakraborti S, Natarajan K, Curiel J, Janke C, Liu J (2016) The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton* 73(10):521–550. <https://doi.org/10.1002/cm.21290>
- Chudinova EM, Karpov PA, Fokin AI, Yemets AI, Lytvyn DI, Nadezhdina ES, Blume YB (2017) MAST-like protein kinase IREH1 from *Arabidopsis thaliana* co-localizes with the centrosome when expressed in animal cells. *Planta* 246(5):959–969. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2742-4>
- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Ann Rev Cell Develop Biol* 13:83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83>
- Efron B, Halloran E, Holmes S (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(23):13429–13434. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13429>
- Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C (2017) The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 130:1347–1353. <https://doi.org/10.1242/jcs.199471>
- Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J (2014) Root hairs. *Arabidopsis Book*. (eCollection 204) 12:e0172. <https://doi.org/10.1199/tab0172>
- Hain D, Langlands A, Sonnenberg HC, Bailey C, Bullock SL, Müller HA (2014) The *Drosophila* MAST kinase drop out is required to initiate membrane compartmentalisation during cellularisation and regulates dynein-based transport. *Development*. 141:2119–2130. <https://doi.org/10.1242/dev.104711>
- Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucl Acids Res* 43(D1):D512–D520. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1267>
- Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucl Acids Res* 43:D512–D520. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1267>
- Howard J, Hyman AA (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*. 422(6933):753–758. <https://doi.org/10.1038/nature01600>
- Hu J, Rho H, Newman R, Zhang J, Zhu H, Qian J (2014b) PhosphoNetworks: A Database for Human Phosphorylation Networks. *Bioinformatics* 30(1):141–142. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt627>
- Hu J, Rho HS, Newman RH, Hwang W, Neiswinger J, Zhu H, Zhang J, Qian J (2014a) Global analysis of phosphorylation networks in humans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1844(1 Pt. B):224–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.009>
- Janke C (2014) The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 206(4):461–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406055>
- Karpov PA, Nadezhdina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AYU, Shashina NYU, Blume YaB (2009) Bioinformatic search of plant protein kinases involved in the phosphorylation of microtubular

- proteins and the regulation of the cell cycle. *Cytol Genet* 43(3):201–215. <https://doi.org/10.3103/S0095452709030104>
- Karpov PA, Nadezhkina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Shashina NY, Blume YaB (2010) Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases. *BMC Genomics*. 11(Suppl 1):S14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-S1-S14>
- Karpov PA, Raevsky AV, Krasnoperova EE, Isayenkov SV, Yemets AI, Blume YaB (2017) Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. *Cytol Genet* 51(6):415–421. <https://doi.org/10.3103/S0095452717060056>
- Karpov PA, Sheremet YA, Blume YB, Yemets AI (2019). Studying the role of protein kinases ckl in organization of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells. *Cytol Genet* 53:441–450. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060033>
- Kettenbach AN, Schweppe DK, Faherty BK, Pechenick D, Pletnev AA, Gerber SA (2011) Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Sci Signal* 4(179):rs5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001497>
- Klammer M, Kaminski M, Zedler A, Oppermann F, Blencke S, Marx S, Müller S, Tebbe A, Godl K, Schaab C (2012) Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics*. 11(9):651–668. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016410>
- Lansbergen G, Akhmanova AS (2006) Microtubule plus end: A hub of cellular activities. *Traffic* 7(5):499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x>
- Liu N, Xiong Y, Ren Y, Zhang L, He X, Wang X, Liu M, Li D, Shui W, Zhou J (2015) Proteomic profiling and functional characterization of multiple post-translational modifications of tubulin. *J Proteome Res* 14:3292–3304. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00308>
- Magiera MM, Janke C (2014) Post-translational modifications of tubulin. *Curr Biol* 24(9):R351–R354. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.032>
- Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petrali F et al (2016) Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*. 534(7605):55–62. <https://doi.org/10.1038/nature18003>
- Newman RH, Hu J, Rho HS, Xie Z, Woodard C, Neiswinger J, Cooper C, Shirley M, Clark HM, Hu S, Hwang W, Jeong JS, Wu G, Lin J, Gao X, Ni Q, Goel R, Xia S, Ji H, Dalby KN, Birnbaum MJ, Cole PA, Knapp S, Ryazanov AG, Zack DJ, Blackshaw S, Pawson T, Gingras AC, Desiderio S, Pandey A, Turk BE, Zhang J, Zhu H, Qian J (2013) Construction of human activity-based phosphorylation networks. *Mol Syst Biol*. 9:655. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.12>
- Oyama T, Shimura Y, Okada K (2002) The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 30:289–299. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2002.01290.x>
- Pelissier A, Chauvin J-P, Lecuit T (2003) Trafficking through Rab11 endosomes is required for cellularization during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Biol* 13:1848–1857. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.023>
- Prota AE, Danel F, Bachmann F, Bargsten K, Buey RM, Pohlmann J, Reinelt S, Lane H, Steinmetz MO (2014) The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J Mol Biol* 426:1848–1860. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.005>
- Sawyer TK (2007) Protein kinases and protein phosphatases in signal transduction pathways. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier 959–992. <https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00075>
- Sigrist CJA, de Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucl Acids Res* 41:D344–D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Smertenko A, Blume YB, Viklický V, Opatrný Z, Dráber P (1997) Posttranslational modifications and multiple isoforms of tubulin in *Nicotiana tabacum* cells. *Planta*, 201(3):349–358. <https://doi.org/10.1007/s004250050077>
- Takatani S, Ozawa S, Yagi N, Hotta T, Hashimoto T, Takahashi Y, Takahashi T, Motose H (2017) Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 (NEK6)-mediated cortical microtubule destabilization. *Sci Rep* 7(1):7826. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08453-5>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38(7):3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab0>
- The UniProt Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucl Acid Res* 51 (D1):D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac12>
- Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A, Pérez-García A (2018) Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Sci Rep* 8(1):7161. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25335>

- Walden PD, Cowan NJ (1993) A novel 205-kilodalton testis-specific serine/threonine protein kinase associated with microtubules of the spermatid manchette. *Mol Cell Biol* 13:7625–7635. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.12.7625-7635.1993>
- Walden PD, Millette CF (1996) Increased activity associated with the MAST205 protein kinase complex during mammalian spermiogenesis. *Biol Reprod* 55(5):1039–1044. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.1039>. PMID: 8902215
- Wang D, Harper JF, Gribskov M (2003) Systematic trans-genomic comparison of protein kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 132(1):2152–2165. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021485>
- Wang H, Chevalier D, Larue C, Ki Cho S, Walker JC (2007) The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*. 5:e0106. <https://doi.org/10.1199/tab.0106>
- Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H (2017) Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. *Int J Mol Sci* 18(10):2207. <https://doi.org/10.3390/ijms18102207>
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12(1):7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yemets A, Sheremet Y, Vissenberg K, Van Orden J, Verbelen JP, Blume YaB (2008) Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biol Int* 32(6):630–637. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.01.013>
- Yemets AI, Krasnylenko YuA, Lytvyn DI, Sheremet YaA, Blume YaB (2011) Nitric oxide signaling via cytoskeleton in plants. *Plant Sci* 181(5):545–554. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.017>
- Yemets A, Stelmakh O, Blume YaB (2008) Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action. *Cell Biol Int* 32(6):623–629. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.01.012>
- Yu I, Garnham CP, Roll-Mecak A (2015) Writing and reading the tubulin code. *J Biol Chem* 290(28):17163–17172. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.637447>
- Zhou H, Di Palma S, Preisinger C, Peng M, Polat AN, Heck AJ, Mohammed S (2013) Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res* 12(1):260–271. <https://doi.org/10.1021/pr300630k>
- Zulawski M, Schulze G, Braginets R, Hartmann S, Schulze WX (2014) The *Arabidopsis* Kinome: phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. *BMC Genomes* 15(1):548. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-548>

Надійшла в редакцію 03.02.2024
Після доопрацювання 25.02.2024
Прийнята до друку 18.05.2024