

А.Ю. НЫПОРКО¹, А.Н. ЖИВОЛУП², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины, Киев,
² Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МУТАНТНЫХ ТУБУЛИНОВ, УСТОЙЧИВЫХ К АНТИМИКРОТРУБОЧКОВЫМ СОЕДИНЕНИЯМ, ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ПОЗИЦИЙ НОВЫХ МУТАЦИЙ С АНАЛОГИЧНЫМИ СВОЙСТВАМИ



Все известные на сегодняшний день полные аминокислотные последовательности α - и β -тубулинов были выравнены и проанализированы для выявления закономерностей расположения мутаций, вызывающих устойчивость к антимикротрубочковым соединениям, и для предсказания позиций новых аналогичных мутаций. Было показано, что известные позиции аминокислотных замен, вызывающих уменьшение сродства к антимикротрубочковым веществам с деполимеризующим механизмом действия, являются консенсусными и локализуются в непосредственной близости от аминокислотных остатков, вовлеченных в интердимерные/интраподимерные взаимодействия и взаимодействия с нуклеотидами (в пределах шести остатков), но никогда не совпадают с ними. Для замен, вызывающих устойчивость к веществам, которые стабилизируют микротрубочки, подобная зависимость не прослеживается. Выявленные закономерности позволяют предсказывать позиции новых мутаций устойчивости к антимикротрубочковым соединениям с деполимеризующим механизмом действия.

© А.Ю. НЫПОРКО, А.Н. ЖИВОЛУП, Я.Б. БЛЮМ, 2003

Введение. Одной из важных особенностей молекул тубулинов является их способность специфическим образом связываться с целым рядом низкомолекулярных соединений [1–3]. Такого рода связывание может вызывать два типа нарушений системы клеточных микротрубочек. В первом случае низкомолекулярное вещество связывается с мономерами или димерами тубулина и препятствует полимеризации последних в надмолекулярные комплексы (микротрубочки и ЦОМТы), вследствие чего происходит разрушение кортикальной сети микротрубочек и/или ветвей деления (в зависимости от фазы клеточного цикла) [1, 2]. К веществам с деполимеризующим механизмом действия принадлежат соединения, взаимодействующие с колхициновым сайтом связывания (колхицин, колцемид, подофиллотоксин, комбретастатины, стаганации) [2], винбластиновым сайтом связывания (винбластин, винкристин, винералбин) [2], а также динитроанилины и фосфороамиды [4], фенилкарбаматы и бензамиды [5–7] и многие другие. Во втором случае низкомолекулярное вещество связывается с полимеризованной формой тубулина, вследствие чего происходит фиксация микротрубочек [2, 3]. К веществам со стабилизирующим механизмом действия относятся таксаны, эпотилоны, лолималиды, дискофермолид и элеутеробин.

Интерес исследователей к молекулярным механизмам, обеспечивающим процессы специфического взаимодействия тубулинов с низкомолекулярными соединениями, обусловлен тем, что многие из этих веществ имеют важное практическое значение. В частности, такие соединения используются как гербициды, фунгициды, антипротозойные, противогельминтные и противоопухолевые средства [3, 4, 8, 9]. Понимание этих механизмов позволяет решать задачи, связанные как с поиском или дизайном новых веществ с антимикротрубочковым механизмом действия, так и наоборот, с поиском или конструированием тубулинов, являющихся устойчивыми к воздействию указанных веществ.

Возникновение устойчивости к веществам с антимикротрубочковым механизмом действия, как правило, связано с точечными мутациями, которые происходят в молекулах тубулинов [4, 8, 9]. Можно сделать заключение, что наиболее хорошо объяснимыми с точки зрения особенностей молекулярного взаимодействия являются процессы приобретения устойчивости к таксанам и,

в частности, к таксолу, поскольку развитие трехмерной структуры молекулы тубулина [10, 11] позволило осуществить точный докинг таксола на поверхности молекулы β -тубулина [12]. Создание впоследствии пространственных моделей структуры тубулинов растений [13–15] предоставило нам возможность детально интерпретировать молекулярные механизмы, обеспечивающие возникновение устойчивости тубулина растений к соединениям динитроанилинового и фосфороамидного рядов, которые используются в качестве гербицидов [15–17]. Повышенный интерес к динитроанилинам и фосфороамидам обусловлен тем, что эти соединения характеризуются высокой степенью сродства к тубулину растений и грибов, но не к тубулину животных [4, 8]. В пользу чрезвычайно высокой специфичности этого взаимодействия свидетельствует обнаружение точечной мутации α -тубулина растений, определяющей устойчивость к динитроанилинам [18, 19]. Устойчивость к фосфороамидам носит перекрестный характер [8, 15, 16].

Следует отметить, что пока идентифицировано достаточно ограниченное количество позиций в аминокислотных последовательностях тубулинов, мутации по которым приводят к возникновению устойчивости к антимикротрубочковым соединениям. По нашим оценкам, на сегодняшний день достоверно показано наличие более 20 мутантных позиций (табл. 1), при этом всего лишь несколько из них являются характерными для α -тубулина. Все же остальные являются мутациями по β -тубулинам.

Интенсивные исследования тубулинов привели к накоплению значительного объема информации о первичных структурах этих белков. На сегодня в наиболее мощной белковой базе данных SWISS-PROT [20] содержится 110 полных первичных последовательностей α -тубулинов, 138 — β -тубулинов, а также 31 полная последовательность γ -тубулинов и 2 последовательности δ -тубулинов, изолированных из различных видов организмов и их тканей. Такой объем информации позволяет с высокой вероятностью определить совпадающие (консенсусные) последовательности для различных типов тубулинов. Представляется очень привлекательным выявить в этом море информации определенные закономерности расположения мутантных сайтов в первичных последовательностях тубулинов

(конечно, при условии существования таких закономерностей). Такие данные могут быть использованы для предсказания мест потенциальных мутаций, следствием которых является возникновение устойчивости к веществам — специфическим эффекторам тубулинов — без привлечения дополнительной информации о пространственной структуре молекул этих белков. В то же время следует заметить, что использование информации о пространственном расположении мутантных сайтов в молекуле белка является весьма целесообразным на этапе поиска этих закономерностей.

Таким образом, исследование закономерностей расположения в первичной последовательности тубулинов сайтов актуальных (и потенциальных) мутаций, которые приводят к возникновению устойчивости к антимикротрубочковым веществам, является предметом настоящей работы.

Материалы и методы. Сравнительный анализ первичной структуры α - и β -тубулинов был проведен с помощью программы ClustalW [21]. Проанализировано 144 последовательности α -тубулинов и 166 β -последовательностей тубулинов. При выполнении сравнительного анализа в соответствии с основным алгоритмом программы консервативными считались следующие группы аминокислотных остатков: S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W. Поскольку последовательности тубулинов проявляют высокую гетерогенность в N- и C-концевых областях и не имеют в этих районах аминокислотных остатков, вовлеченных в процессы полимеризации тубулинов, первые 44 и 27 последних позиций белков в сравнении было опущено.

Последовательности других типов тубулинов не включали в анализ вследствие отсутствия точной информации относительно наличия/отсутствия мутаций в этих белках, которые приводят к возникновению устойчивости.

Пространственное расположение известных мутаций анализировали с использованием моделей пространственной структуры растительных α - и β -тубулинов, разработанных нами ранее [13]. Визуализацию мутантных сайтов проводили при помощи программы MolMol [22].

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенный нами сравнительный анализ первичных последовательностей 144 α -тубулинов и 166 β -тубулинов позволил определить консен-

Сравнительный анализ первичной структуры мутантных тубулинов...

Мутации тубулинов, которые вызывают устойчивость к антимикротрубочковым агентам

Таблица 1

Мутация	Тип тубулина	Структурный элемент	Свойства мутации	Организм	Источник информации
N ₁₀₂ ->V/ I	β	T3	Устойчивость к ризоксину	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	[23]
A ₁₆₅ ->V	β	S5	Устойчивость к фенилкарбаматам Сверхчувствительность к бензимидазолу	<i>A. nidulans</i> <i>Neurospora crassa</i>	[24, 25] [26]
F ₁₆₇ ->Y	β	S5	Устойчивость к бензимидазолу	<i>S. cerevisiae</i> <i>N. crassa</i>	[27, 28]
P ₁₇₃ ->A	β		Устойчивость к эпотилонам	<i>Homo sapiens</i>	[29]
E ₁₉₈ ->A /Q /K /G	β		Устойчивость к бензимидазолам Сверхчувствительность к фенилкарбаматам	<i>Botryotinia fuckeliana</i> <i>Helminthosporium solani</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>N. crassa</i>	[30] [6] [31] [26]
F ₂₀₀ ->Y	β	S6	Устойчивость к бензимидазолу	<i>Telodorsagia circumcincta</i> <i>Botrytis cinerea</i>	[5] [32]
H ₂₁₅ ->L	β		Устойчивость к таксанам		[33]
R ₂₁₇ ->L	β		Устойчивость к таксанам		[33]
F ₂₂₈ ->L	β		Устойчивость к таксанам		[33]
T ₂₃₇ ->A	β		Устойчивость к бензимидазолам и фенилкарбаматам	<i>N. crassa</i>	[26]
T ₂₃₉ ->I	α	H7	Устойчивость к динитроанилинам и фосфороамидам	<i>Eleusine indica</i>	[19]
L ₂₄₀ ->I	β		Устойчивость к алкалоидам Vinca	<i>H. sapiens</i>	[34]
R ₂₄₁ ->H	β	T7	Устойчивость к бензимидазолам	<i>S. cerevisiae</i>	[35]
L ₂₅₀ ->F	β		Устойчивость к бензимидазолам и фенилкарбаматам	<i>N. crassa</i>	[26]
M ₂₈₈ ->T	α		Устойчивость к динитроанилинам и фосфороамидам		[19]
F ₂₇₀ ->V	β		Устойчивость к таксанам	<i>H. sapiens</i>	[36]
T ₂₇₄ ->I	β		Устойчивость к таксанам эпотилонам	<i>H. sapiens</i>	[37]
R ₂₇₄ ->G	β		Устойчивость к таксанам эпотилонам	<i>H. sapiens</i>	[37]
G ₂₉₂ ->E	β		Устойчивость к эпотилонам	<i>H. sapiens</i>	[29]
R ₃₆₆ ->C	β		Устойчивость к таксанам	<i>H. sapiens</i>	[38]
K ₃₈₀ ->E /M	β	S9	Перекрестная устойчивость к колхицину и динитроанилинам Сверхчувствительность к таксанам	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[39, 40]
K ₃₉₀ ->N	β		Устойчивость к инданоину	<i>H. sapiens</i>	[41]
A ₃₆₄ ->T	β		Устойчивость к таксанам	<i>H. sapiens</i>	[36]
Y ₄₂₂ ->C	β		Устойчивость к эпотилонам	<i>H. sapiens</i>	[29]

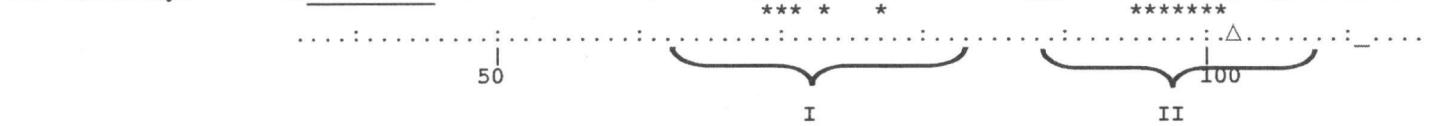
Примечание. Н — α-спирали, С — β-складки, Т — петлевые структурные элементы молекул тубулина, соответственно. Номенклатура структурных элементов приводится в соответствии с [10].

сусные аминокислотные последовательности для обоих типов тубулинов. Консенсусный мотив для α-тубулинов содержит 45 идентичных и 62 гомологичные аминокислотные позиции. Для β-тубулинов эти цифры составляют 68 и 67 соответственно (рис. 1). Дальнейшее сравнение полученных консенсусных последовательностей

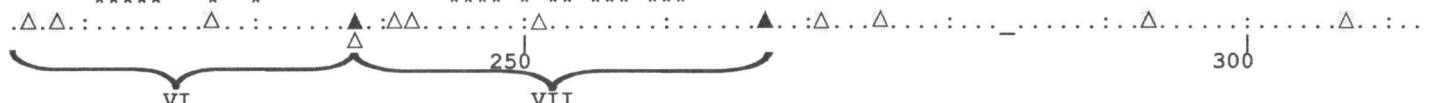
обнаружило как специфические, так и общие для обоих типов тубулинов белковые мотивы. Для обоих типов тубулинов совпадают 17 идентичных и 26 гомологичных позиций, образуя так называемый общетубулиновый консенсус.

Как уже замечено, на момент исследования нам известны 22 мутантные позиции устойчиво-

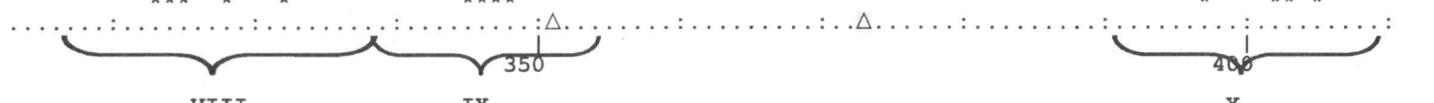
TBA консенсус ...=====1=F=4=====P=6=D=====65=====7 3P=====66=kED=1===== =====
TBB консенсус ...e=====5=====9V=====6=L2P===== 5PD=====NN=A G=YTEG=5i=



H3 S4 T4 H4 S5 T5 H5 S6 T6 H6
xxxxxxxxxxxx>>>>>|||||>>>>>xxxxxxxxxxxx>>>>|||||>>>>>>>>xxxxxxxxxxxx>>>>>/|||||>>xxxxxxxx



1==mm9=64-----65-----P=FK=G6-----i1N=T16-----4i69=KRAF H...
T=====Re=6=54644=====5==F=4WiP=====1====N T=====F H...
*** * * **** _____ 1====N T=====F H...
* * *



сти тубулинов к антимикротрубочковым соединениям, которые выявлены у 13 видов живых организмов. Обобщенная информация об анализируемых мутациях представлена в табл. 1. Мутации, обусловливающие возникновение устойчивости к веществам с деполимеризующим механизмом действия, найдены у грибов (подавляющее большинство мутаций, обеспечивающих устойчивость к фунгицидам бензимидазольного ряда), простейших и водорослей. Среди высших растений мутации такого свойства достоверно показаны лишь у злака *Eleusine indica*. Все известные мутации, вызывающие устойчивость к соединениям со стабилизирующим механизмом действия, выявлены на различных линиях раковых клеток человека.

В локализации мутаций нами обнаружена интересная закономерность: большинство анализируемых мутаций, которые определяют устойчивость к антимикротрубочковым агентам, лежат в идентичных или консервативных позициях одного из тубулинов, а две из них — α 239/ β 237 и β 240 — принадлежат к общетубулиновому консенсусу. Последняя позиция интересна тем, что она несет единственную известную на сегодня мутацию, вызывающую устойчивость к алкалоидам барвинка. Такую особенность расположения мутаций возможно объяснить, если учесть, что консенсусы как α -, так и β -тубулинов получены при сравнении значительной выборки последовательностей белков разнообразного видового и тканевого происхождения. Естественно допустить, что полученные консенсусные последовательности тубулинов в достаточной мере отражают степень консервативности этих белков, а общие в консенсусах обеих тубулинов позиции содержат обязательные аминокислотные остатки, замена которых является недопустимой для сохранения важнейших функций белка. Вместе с

тем, учитывая способность тубулинов гетерогенного происхождения формировать микротрубочки как *in vitro*, так и *in vivo*, и принимая во внимание универсальность действия большинства антимикротрубочковых агентов, закономерно ожидать, что мутации, способные повлиять на эффективность последних, затрагивают консервативные позиции аминокислотных последовательностей тубулинов. Замена консервативного аминокислотного остатка может вызывать локальные изменения ряда пространственных свойств тубулина и потерю сродства к антимикротрубочковому агенту, при этом не задевая критические функции белка.

Среди мутаций, обусловливающих устойчивость к деполимеризующим антимикротрубочковым соединениям, особняком стоит замена $F_{200} \rightarrow Y$: она приходится на неконсервативную позицию. Вторым необычным свойством этой мутации является то, что и фенилаланин (F), и тирозин (Y) — наиболее распространенные аминокислотные остатки, после метионина (M) в этой позиции, среди проанализированных β -тубулинов. Однако эффективность этой замены может быть хорошо объяснима, если мы допустим или непосредственное участие F_{200} во взаимодействии с бензимидазолом, или же стericеское препятствие гидроксильного радикала Y_{200} для связывания гербицида с тубулином.

В то же время следует отметить, что среди мутаций, вызывающих устойчивость к антимикротрубочковым веществам со стабилизирующим механизмом действия, также имеются три позиции, не относящиеся к консенсусным позициям. Это мутации в позициях β 270 и β 306 (устойчивость к таксанам), а также β 274 (перекрестная устойчивость к таксанам и эпотилонам).

Как видно из рис. 1, позиции аминокислотных остатков, вовлеченных в интердимерные/интра-

► Рис. 1. Сравнение консенсусов первичных структур α - и β -тубулинов и расположение мутантных позиций. Заглавными буквами обозначены идентичные аминокислотные позиции консенсуса в однобуквенном коде. Цифрами обозначены консервативные позиции следующих гомологичных групп: P,S,T,A — 1; N,E,Q,K — 2; N,H,Q,K — 3; N,D,E,Q — 4; Q,H,R,K — 5; M,I,L,V — 6; M,I,L,F — 7; H,Y — 8; F,Y,W — 9. Маленькими буквами обозначены гомологичные позиции в случае невозможности четкого определения принадлежности к одной консервативной группе (e — 2,4; f — 7,9; q — 3,5; k — 2,3,5; i, m — 6,7). Знаком (=) обозначены вариабельные позиции в последовательностях. Номенклатура и границы вторичных структур указаны согласно 6 и обозначены: X — альфа-спирали H1-H11; / — бета-складки S1-S10; > — петли T1-T7. Серым фоном выделены консервативные, черным — идентичные позиции, общие для белковых мотивов обоих классов тубулинов. Позиции проанализированных мутаций отмечены треугольниками. Аминокислотные остатки, вовлеченные в тубулин-тубулиновые и тубулин-нуклеотидные взаимодействия, отмечены звездочками. Вероятные области обнаружения мутаций устойчивости антимикротрубочковым агентам деполимеризующего действия выделены фигурными скобками с римской numerацией.

димерные взаимодействия и участвующих в связывании ГТФ, располагаются на консенсусных последовательностях тубулинов десятью компактными кластерами. Все исследуемые мутации, вызывающие устойчивость к соединениям с деполимеризующим механизмом действия, расположены в первичной последовательности не далее шести аминокислотных остатков от положений аминокислотных остатков, вовлеченных во взаимодействия тубулин/тубулин либо тубулин/ГТФ. При этом ни одна мутация не затрагивает сами функциональные аминокислотные остатки. Последнее наблюдение вполне объяснимо, ибо в противном случае (замена функционального остатка) имело бы место нарушение процесса полимеризации тубулинов. Исходя из положения мутаций, можно предположить, что сайты взаимодействия для всех веществ с деполимеризующей антимикротрубочковой активностью должны располагаться вблизи контактных поверхностей тубулинов, и соответственно мутации, обеспечивающие устойчивость к подобным соединениям, непосредственно изменяют пространственную структуру регионов связывания антимикротрубочковых соединений, в результате чего средство тубулина к этим веществам уменьшается либо утрачивается совершенно.

В случае мутаций к веществам со стабилизирующим механизмом действия картина выглядит несколько иначе. Большинство из известных мутаций такого типа располагаются вне выявленных кластеров, за исключением позиций $\beta 173$, $\beta 215$, $\beta 217$, $\beta 228$. Таким образом, закономерность, выявленная для мутаций, которые обеспечивают устойчивость к деполимеризующим агентам, в общем случае не распространяется на мутации к веществам стабилизирующего действия. Это вполне можно объяснить, исходя из упомянутого положения, что соединения, препятствующие полимеризации микротрубочек, связываются с тубулином именно в областях контактных поверхностей. Подобное прямое препятствование сборке вследствие связывания динитроанилинов с поверхностью интердимерного контакта молекулы α -тубулина растений было показано нами ранее [16]. В случае стабилизирующего воздействия непосредственное соседство поверхностей продольных контактов тубулинов и сайтов связывания стабилизирующих агентов, по-видимому, не является столь необходимым. К сожалению, в

настоящее время мы можем только предполагать, какие изменения в структуре микротрубочек происходят вследствие взаимодействий с таксантами и прочими стабилизирующими веществами.

Анализ пространственного распределения всех известных мутаций тубулинов, которые вызывают устойчивость к антимикротрубочковым веществам, представлен на рис. 2. Большинство мутаций, обусловливающих устойчивость к веществам, деполимеризующим микротрубочки, располагаются в пространстве молекулы β -тубулина одним кластером, примыкающим к поверхности интродимерного контакта. Исключение составляет мутация в позиции 102, близкая к интердимерной поверхности. Две мутантные позиции в молекуле α -тубулина локализованы вблизи интердимерной поверхности. Позиции мутаций этой группы не экспонированы на молекулярной поверхности.

В отличие от мутаций, которые вызывают устойчивость к веществам деполимеризующего действия, мутации устойчивости к стабилизирующим веществам располагаются на латеральной поверхности молекул β -тубулина. Кроме того, они не образуют единого кластера и, как правило, экспонированы на молекулярной поверхности. Различия в характере пространственного распределения «деполимеризующих» и «стабилизирующих» мутаций представляются вполне закономерными ввиду того, что при общей принципиальной специфичности взаимодействия с молекулами тубулинов как деполимеризующих, так и стабилизирующих соединений, те изменения, которые возникают в пространственной структуре молекул тубулина вследствие указанных взаимодействий, должны существенно различаться. К сожалению, в настоящее время сайты взаимодействия на поверхности тубулина идентифицированы только для динитроанилинов, фосфороамидов [16] и таксанов [12].

Суммируя изложенное, можно сформулировать ряд основных критериев, которым должны отвечать другие возможные сайты мутаций тубулинов, вызывающие устойчивость белка к антимикротрубочковым агентам с деполимеризующим типом действия. По нашим представлениям, эти сайты со значительной достоверностью должны отвечать следующим требованиям: относиться к позициям, которые являются консервативными для соответствующего тубулина; не

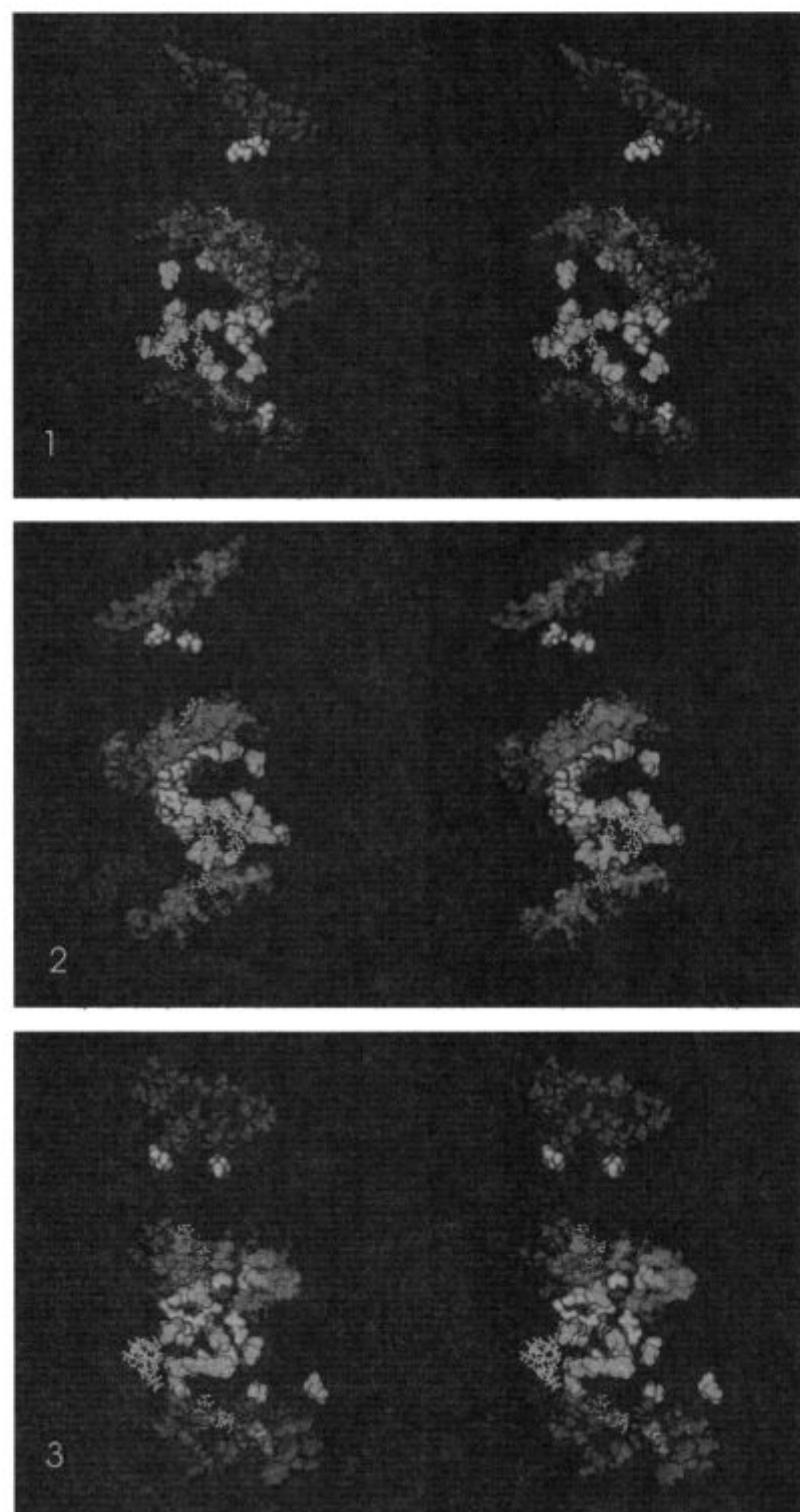


Рис. 2. Пространственное расположение в структуре димера тубулина сайтов известных мутаций, обуславливающих устойчивость к антимикротрубочковым веществам. Приведены стереонизображения со стороны внешней (1) и внутренней (2) поверхности микротрубочки и со стороны бокового контакта междуprotoфиламентами (3). Мутации деполимеризующего действия показаны красным цветом, мутации стабилизирующего действия — зеленым. Молекулы нуклеотидов и таксола показаны коричневым и фиолетовым цветом соответственно. Синим цветом выделены аминокислотные остатки, образующие поверхности продольных контактов

принадлежать к позициям консенсуса, общего для α - и β -тубулинов; не попадать на позиции обозначенных аминокислотных остатков, вовлеченных во взаимодействие тубулин/тубулин или тубулин/GTФ, или между ними в границах отдельного кластера; локализоваться в непосредственной близости к отмеченным областям взаимодействия тубулинов в процессе полимеризации или взаимодействии белка с GTФ — не далее шестого аминокислотного остатка.

Что касается характера аминокислотных замен в возможных сайтах мутаций, следствием которых будет повышение устойчивости к деполимеризующим антимикротрубочковым веществам, то в этом случае мы не можем сделать никаких предварительных выводов, поскольку характер известных мутаций не имеет какой-либо определенной направленности.

Применяя перечисленные условия, мы можем назвать вероятные позиции мутаций устойчивости тубулинов к деполимеризующим антимикротрубочковым соединениям последовательно для каждого из упомянутых десяти кластеров. Полученные результаты приведены в табл. 2. Наиболее богатым на вероятные позиции замены для α -тубулинов является кластер 8 (пять вероятных сайтов), для β -тубулинов — кластер 7 (семь ве-

роятных сайтов). В то же время следует отметить, что условие консервативности хотя и повышает вероятность возникновения эффективной мутации, но не является запретом на существование мутаций в других точках выделенных нами кластеров, что подтверждается наличием эффективных замен в позициях 198 и 200.

Что касается определения конкретных допустимых аминокислотных остатков в соответствующих вероятных сайтах мутаций, то тут мы вправе ожидать чего угодно. Согласно имеющимся данным мутации, приводящие к увеличению устойчивости к антимикротрубочковым веществам, могут быть направлены куда угодно: замены могут происходить как в рамках одной группы, так и приводить к смене типа остатка, гидрофобные свойства могут как увеличиваться, так и уменьшаться. Однако логично предположить, что в случае замены на аминокислоту, которая не входит в состав гомологичной группы, характерной для данной позиции, эффективность мутации должна возрастать (рис. 1). Учитывая специфические пространственные свойства пролина, можно уверенно исключить из числа допустимых замены на этот аминокислотный остаток во всех позициях, которые принадлежат к упорядоченным элементам вторичной структуры (альфа-спирали и бета-складки). Это ограничение охватывает позиции 66, 78, 154, 232, 235, 334, 335, 353, 354, 395, 396 для α -тубулинов и 68, 149–151, 153, 168, 188, 211, 234 и 267 для β -тубулинов. В то же время следует помнить, что упомянутые ограничения не являются критическими.

Выводы. Для мутаций, вызывающих устойчивость к веществам с деполимеризующим антимикротрубочковым действием, существует вполне определенная закономерность распределения в первичной последовательности тубулинов — они локализуются не далее шести аминокислотных остатков от аминокислот, принимающих участие в тубулин-тубулиновом либо тубулин-нуклеотидном взаимодействии. Это положение может быть базовым критерием для поиска новых мутаций с аналогичным типом действия. Мутации, которые вызывают устойчивость к веществам, стабилизирующими микротрубочки, не подчиняются данной закономерности. Для выявления четких критериев расположения мутаций этой группы необходимо более детальное исследование молекулярных механизмов действия веществ, стабилизирующих микротрубочки.

Таблица 2
Вероятные позиции мутаций устойчивости тубулинов
к антимикротрубочковым соединениям

Кластеры	α -тубулин	β -тубулин
I	P ₆₃ , 6 ₆₀ , 6 ₇₈ , 5 ₇₉	6 ₆₈
II	6 ₉₂ , 6 ₉₃	D ₉₀ , A ₁₀₄ , G ₁₀₆
III	C ₁₂₈ , 4 ₁₅₄	4 ₁₂₉ , G ₁₄₉ , T ₁₅₀ , L ₁₅₁ , 6 ₁₅₃
IV	S ₁₆₃ , L ₁₆₆	S ₁₆₈ , P ₁₈₃ , 6 ₁₈₈
V	4 ₂₀₄	i ₂₁₁
VI	6 ₂₁₈ , q ₂₃₂ , S ₂₃₅	5 ₂₁₇ , 6 ₂₃₄
VII		P ₂₄₄ , P ₂₆₂ , R ₂₆₃ , L ₂₆₄ , H ₂₆₅ , F ₂₆₆ , 9 ₂₆₇
VIII	m ₃₁₇ , 9 ₃₁₈ , 4 ₃₂₁ , 6 ₃₃₄ , 5 ₃₃₅	R ₃₁₉ , 6 ₃₂₂ , 5 ₃₃₇
IX	F ₃₅₀ , G ₃₅₃ , 6 ₃₅₄	F ₃₄₂ , 4 ₃₄₄
X	4 ₃₉₃ , i ₃₉₆	

Примечание. Номенклатура остатков соответствует используемой на рис. 1.

SUMMARY. All known for today complete amino acid sequences of α - and β -tubulins were aligned and analyzed to reveal the regularity of location of mutations result in the resistance to antimicrotubular compounds and a prediction of positions of new similar mutations. It was shown, that known positions of amino acid changes lead to decrease a affinity to antimicrotubular agents with depolymerizing mechanism of action are consensus and located in proximity to the residues involved in intradimeric/interdimeric interactions and interactions with nucleotides (within of six residues), but never coincide with them. For changes lead to resistance to stabilizing antimicrotubular compounds, similar dependence is not traced. The identified regularity enables to predict the positions of new mutations lead to resistance to agents with depolymerizing mechanism of action.

РЕЗЮМЕ. Всі відомі на сьогодні повні амінокислотні послідовності α - та β -тубулінів було вирівняно та проаналізовано з метою виявлення закономірностей розташування мутацій, що викликають стійкість до антимікротрубочкових речовин, і передбачення позицій нових подібних мутацій. Було показано, що відомі позиції амінокислотних замін, які викликають зменшення спорідненості до антимікротрубочкових речовин з деполімеризуючим механізмом дії, є консенсусними і локалізуються безпосередньо біля амінокислотних залишків, залучених до інtradимерної/інтердимерної взаємодії та до взаємодії з нуклеотидами (в межах шести залишків), але ніколи не співпадають з ними. Для замін, що викликають стійкість до сполук, що стабілізують мікротрубочки, подібна закономірність не прослідковується. Виявлено закономірність дозволяє передбачати позиції нових мутацій з деполімеризуючим механізмом дії.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Correia J.J. Effects of antimitotic agents on tubulin-nucleotide interactions // Pharm. Ther. — 1991. — 52. — P. 127–147.
- Correia J.J., Lobert S. Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs // Curr. Pharm. Design. — 2001. — 7. — P. 1213–1223.
- Dumontet C. Mechanisms of action and resistance to tubulin-binding agents // Exp. Opin. Investig. Drugs. — 2000. — 9. — P. 779–788.
- Baird W.V., Blume Ya.B., Wick S. Microtubular and cytoskeletal mutants / Plant microtubules: potential for biotechnology / Ed. P. Nick. — Berlin — Heidelberg : Springer Verlag, 2000. — P. 159–191.
- Elard L., Humbert J.F. Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta* // Parasitol. Res. — 1999. — 85. — P. 452–456.
- McKay G.J., Cooke L.R. A PCR-based method to characterise and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani* // FEMS Microbiol. Lett. — 1997. — 152. — P. 371–378.
- Young D.H., Lewandowski V. Covalent binding of the benzamide RH-4032 to tubulin in suspension-cultured tobacco cells and its application in cell-based competitive-binding assay. Plant Physiol. — 2000. — 124. — P. 115–124.
- Емец А. И. Блюм Я. Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиология растений. — 1999. — 46. — С. 899–907.
- Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б. Получение мутантов по генам белков микротрубочек // Цитология и генетика. — 1993. — 27. — С. 79–96.
- Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. Structure of $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography // Nature. — 1998. — 391. — P. 199–203.
- Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H. High-resolution model of the microtubule // Cell. — 1999. — 96. — P. 79–88.
- Snyder J.P., Nettles J.H., Cornett B., Downing K.H., Nogales E. The binding conformation of taxol in β -tubulin: A model based on electron crystallographic density // Proc. Nat. Acad. Sci. — 2001. — 98. — P. 5312–5316.
- Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // Биополимеры и клетка. — 2001. — 17. — С. 61–69.
- Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Моделирование и анализ пространственной структуры молекул γ -тубулина высших растений // Доп. НАН України. — 2002. — № 1. — С. 141–145.
- Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Are earlier predicted sites of different plant tubulins involved in interaction with dinitroanilines? // Mol. Biol. Cell. — 2002. — 13(S). — P. 463a.
- Ныпорко А.Ю., Емец А. И., Климкина Л.А., Блюм Я.Б. Взаимосвязь чувствительности каллуса *Eleusine indica* к трифлоралину и амипрофосметилу с особенностями взаимодействия этих соединений с тубулином // Физиология растений. — 2002. — 49. — С. 459–466.
- Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Structural modelling of the interaction of plant β -tubulin with dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides // Cell Biol. Int. — 2003. — 27. — №3.
- Antony R.G., Waldin T.R., Ray J.A., Bright S.W.J., Hussey P.J. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. — 1998. — 393. — P. 260–263.
- Yamamoto E., Zeng L., Biard W. V. α -Tubulins missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // Plant Cell. — 1998. — 10. — P. 297–308.
- Bairoch A., Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 2000 // Nucl. Acids Res. — 2000. — 28. — P. 45–48.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. — 1994. — 22. — P. 4673–4680.
- Koradi R., Billeter M., Whirick K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures // J. Mol. Graphics. — 1996. — 14. — P. 51–55.
- Takahashi M., Matsumoto S., Iwasaki S., Yahara I. Molecular basis for determining the sensitivity of eukary-

- otes to the antimitotic drug rhizoxin // Mol. Gen. Genet. — 1990. — **222**. — P.169–175.
24. Jung M. K., Oakley B. R. Identification of an amino acid substitutons in the ben, β -tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity // Cell Motil. Cytoskeleton. — 1990. — **17**. — P. 87–94.
 25. Jung M. K., Wilder I. B., Oakley B. R. Amino acid alterations in the ben (β -tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance // Cell Motil. Cytoskeleton. — 1992. — **22**. — P.170–174.
 26. Fujimura M., Kamakura T., Inoue H., Yamaguchi I. Amino-acid alterations in the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb // Curr Genet. — 1994. — **25**. — P. 418–422.
 27. Borck, K., Braymer, H.D. The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa* // J. Gen. Microbiol. — 1974. — **85**. — P. 51–56.
 28. Orbach M.J., Porro E.B., Yanofsky C. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker // Mol. Cell Biol. — 1986. — **6**. — P. 2452–2461.
 29. He L., Yang C.P., Horwitz S.B. Mutations in beta-tubulin map to domains involved in regulation of microtubule stability in epothilone-resistant cell lines. // Mol. Cancer. Ther. — 2001. — **1**. — P. 3–10.
 30. Park S.Y., Jung O.J., Chung Y.R., Lee C.W. Isolation and characterization of a benomyl-resistant form of beta-tubulin-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* // Mol. Cells. — 1997. — **7**. — P. 104–109.
 31. Buhr T.L., Dickman M.B. Isolation, characterization, and expression of a second beta-tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* // Appl. Environ. Microbiol. — 1994. — **60**. — P. 4155–4159.
 32. Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland F. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea* // Pest. Manag. Sci. — 2002. — **58**. — P. 876–888.
 33. Gonsales-Garay M., Chang L., Blade K., Menick D., Cabral F. A beta-tubulin leucine involved in microtubule assembly and paclitaxel resistance // J. Biol. Chem. — 1999. — **274**. — P. 23875–23882.
 34. Kavallaris M., Tait A.S., Walsh B.J., He L., Horwitz S.B., Norris M.D., Haber M. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells // Cancer Res. — 2001. — **61**. — P. 5803–5809.
 35. Thomas J.H., Neff N.F., Botstein D. Isolation and characterization of mutations in the β -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. — 1985. — **112**. — P. 715–734.
 36. Giannakakou P., Sackett D.L., Kang Y.K., Zhan Z., Buters J.T., Fojo T., Poruchynsky M.S. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization // J. Biol. Chem. — 1997. — **272**. — P. 17118–17125.
 37. Giannakakou P., Gussio R., Nogales E., Downing K.H., Zaharevitz D., Bollbuck B., Poy G., Sackett D., Nicolaou K.C., Fojo T. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — **97**. — P. 2904–2909.
 38. Hasegawa S., Miyoshi Y., Egawa C., Ishitobi M., Tamaki Y., Monden M., Noguchi S. Mutational analysis of the class I beta-tubulin gene in human breast cancer// Int. J. Cancer. — 2002. — **101**. — P. 46–51.
 39. Lee V.D., Huang B. Missense mutations at lysine 350 in β -tubulin confer altered sensitivity to microtubule inhibitors in *Chlamydomonas* // Plant Cell. — 1990. — **2**. — P. 1051–1057.
 40. Schilber M.J., Huang B. The colR4 and colR15 β -tubulin mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* confer altered sensitivities to misrotubule inhibitors and herbicides by enhancing microtubule stability // J. Cell Biol. — 1991. — **113**. — P. 605–614.
 41. Hua X.H., Genini D., Gussio R., Tawatao R., Shih H., Kipps T.J., Carson D.A., Leoni L.M. Biochemical genetic analysis of indanocine resistance in human leukemia // Cancer Res. — 2001. — **61**. — P. 7248–7254.

Поступила 10.01.03