

УДК 577.322.4:5:7

А.Ю. НЫПОРКО, О.Н. ДЕМЧУК, Я.Б. БЛЮМ

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины,
ул. акад. Заболотного, 148, Киев, Украина

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ α -ТУБУЛИНА РАСТЕНИЙ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОВЫШЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ХОЛОДУ



Проанализирована уникальность точечных аминокислотных замен в последовательностях двух изоформ α -тубулинов психрофильной водоросли хлоромонас (*Chloromonas*), наличие которых может определять повышенную устойчивость к холоду этой водоросли. Сравнение всех известных аминокислотных последовательностей α -тубулинов растительного происхождения позволило установить, что только замена M268→V является уникальной и может оказывать существенное влияние на особенности пространственной структуры α -тубулина растений. С помощью моделирования молекулярных поверхностей α -тубулина *Chloromonas*, *Chlamydomonas reinhardtii* и гусиной травы *Eleusine indica* показано, что внедрение аминокислотной замены M268→V в последовательность тубулина гусиной травы приводит к уподоблению поверхности этого белка поверхности нативного α -тубулина хлоромонасы. Отмечено также изменение локальных гидрофобных свойств поверхности молекулы α -тубулина в зоне интердимерного контакта вследствие вышеупомянутой замены, что может играть важную роль в повышении уровня холодоустойчивости микротрубочек. Выявлена критическая роль аминокислотного остатка в положении 268 для формирования поверхности интердимерного контакта молекулы α -тубулина и высказано предположение о важности замен в этом положении для обеспечения устойчивости растений к абиотическим факторам различной природы (холод, гербициды).

© А.Ю. НЫПОРКО, О.Н. ДЕМЧУК, Я.Б. БЛЮМ, 2003

Введение. Микротрубочки вообще и микротрубочки растений в частности являются одной из клеточных структур, принимающих участие в формировании реакции клетки на холодовой стресс и участвующих в процессах ее адаптации к пониженным температурам [1]. Будучи одной из ключевых мишеней эукариотических клеток для реализации эффектов низких положительных температур [1–4], микротрубочки могут играть двоякую роль в ответе растительных клеток на воздействие холода. Во-первых, они деполимеризуются в ответ на воздействие низких позитивных температур, и это явление коррелирует с соответствующими изменениями процессов клеточного роста [5]. Такая деполимеризация микротрубочек при действии низких температур запускает каскад клеточных реакций, результатом которых является общее повышение холодоустойчивости растения [6, 7]. В свою очередь чувствительность микротрубочек к холоду варьирует в зависимости от вида организма и может регулироваться гормонами, такими, как абсцизовая кислота [8, 9], и на уровне формирования физиологического ответа, т.е. в процессе холодовой акклиматизации [9, 10].

Во-вторых, в определенных случаях микротрубочки могут обладать повышенной холодовой стабильностью. Повышенная устойчивость к холоду ряда организмов — животных (антарктические рыбы *Notothenia coriiceps* и *Chionodraco rastrispinosus*) [2], растений (психрофильные водоросли рода *Chloromonas*) [11], грибов (*Saccharomyces cerevisiae*) [3] — не только коррелирует с точечными аминокислотными заменами в последовательностях молекул тубулина, специфичными для представителей каждого органического царства, но и по всей видимости предопределяется повышенной холодовой стабильностью микротрубочек, содержащих измененный тубулин [2, 3]. Следовательно, сравнение аминокислотных последовательностей различных изоформ тубулинов из организмов, характеризующихся различной степенью холодоустойчивости, позволяет выявить структурные домены, ответственные за адаптацию микротрубочек к пониженным температурам.

Сравнительный анализ последовательностей α -тубулина мезофильной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и психрофильной водоросли *Chloromonas* показывает, что они характеризуют-

ся некоторыми весьма интересными аминокислотными различиями, которые могут рассматриваться как достоверные кандидаты для объяснения феномена повышенной холодоустойчивости психрофильных водорослей [11]. В частности, эти различия включают замену M268→V в последовательности α -тубулина хлоромонасы. Весьма примечательно, что этот остаток метионина расположен в высококонсервативном участке молекулы тубулина [12], и его замена на треонин генетически коррелирует с фенотипом гусиной травы (*Eleusine indica*), несущим признак промежуточной устойчивости к динитроанилинам [13].

Разработка инструментария для моделирования пространственной структуры тубулина [14] и его адаптация для воссоздания трехмерной структуры тубулинов растений [15] дает возможность оценить влияние этих специфических замен на особенности пространственной структуры соответствующих молекул тубулина. Использование такого подхода открывает возможности более широкой интерпретации роли выявленных закономерностей в повышении холодоустойчивости микротрубочек высших растений с последующим конструированием сельскохозяйственных культур с заданными свойствами путем применения генно-инженерных технологий. В качестве начального этапа реализации этой идеи нами была поставлена цель разработки пространственной модели молекулы α -тубулина психрофильной водоросли *Chloromonas* для ее сравнения с соответствующей пространственной моделью молекулы α -тубулина мезофильной водоросли *Ch. reinhardtii*, а также α -тубулина гусиной травы *E. indica*, что позволило бы смоделировать оптимальную структуру холодоустойчивого α -тубулина гусиной травы, несущую специфическую аминокислотную замену хлоромонасы.

Материалы и методы. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью метода множественного выравнивания с использованием программы ClustalW [16].

Реконструкцию пространственной структуры молекул тубулина производили с использованием метода моделирования по гомологии (профильного моделирования) [17]. Процедура моделирования и внесения точеч-

ных мутаций описана в наших предыдущих работах [15, 18].

Анализ особенностей пространственной структуры. Поверхности молекул исследуемых тубулинов рассчитывали с помощью программы MSMS [19]. Расчет поверхностного потенциала, визуализацию молекулярной поверхности и визуализацию контактных групп осуществляли с помощью программного пакета Swiss-PdbViewer [20]. Анализ гидрофобных свойств поверхности проводился по методу оценки величины свободной энергии [21] с использованием веб-сервера GRASS [<http://trantor.bioc.columbia.edu/GRASS/>]. Для расчета изображения использовали программный пакет Glview [<http://home.sfn.edu/hg/>].

Результаты исследований и их обсуждение. В работе, посвященной исследованию возможной роли тубулина в адаптации психрофильных водорослей к низким температурам [11], идентифицированы ряд позиций в аминокислотных последовательностях двух α -тубулинов психрофильной водоросли *Chloromonas* (ant1 и ant3), которые отличают их от α -тубулина представителей мезофильных водорослей *Ch. reinhardtii* и *Volvox carteri*, обладающих идентичными аминокислотными последовательностями α -тубулина. Замены в α -тубулинах хлоромонасы относительно α -тубулина хламидомонады и вольвокса обнаружены в 14 положениях аминокислотной последовательности: V4→A, I9→L, I14→C/V, V16→I, A19→T, C65→A, V75→I, G168→A, V170→I, T179→N, V202→I, M268→V, A295→V, E441→D. Нами было предположено, что сравнительный анализ этих замен может позволить идентифицировать именно те замены, которые при условии их уникальности могут оказаться характерными признаками тубулинов, способных нормально функционировать при пониженных температурах.

Действительно, уже поверхностный анализ описанных аминокислотных замен свидетельствует о том, что в ряде они носят не универсальный характер по отношению к обоим последовательностям α -тубулина хлоромонасы. Так, замены в позициях 9, 170, 179 обнаруживаются только в гене ant1, а в позициях 19, 75, 168, 441 — только в гене ant3. Аминокислотные остатки в положении 14 вообще отличаются во

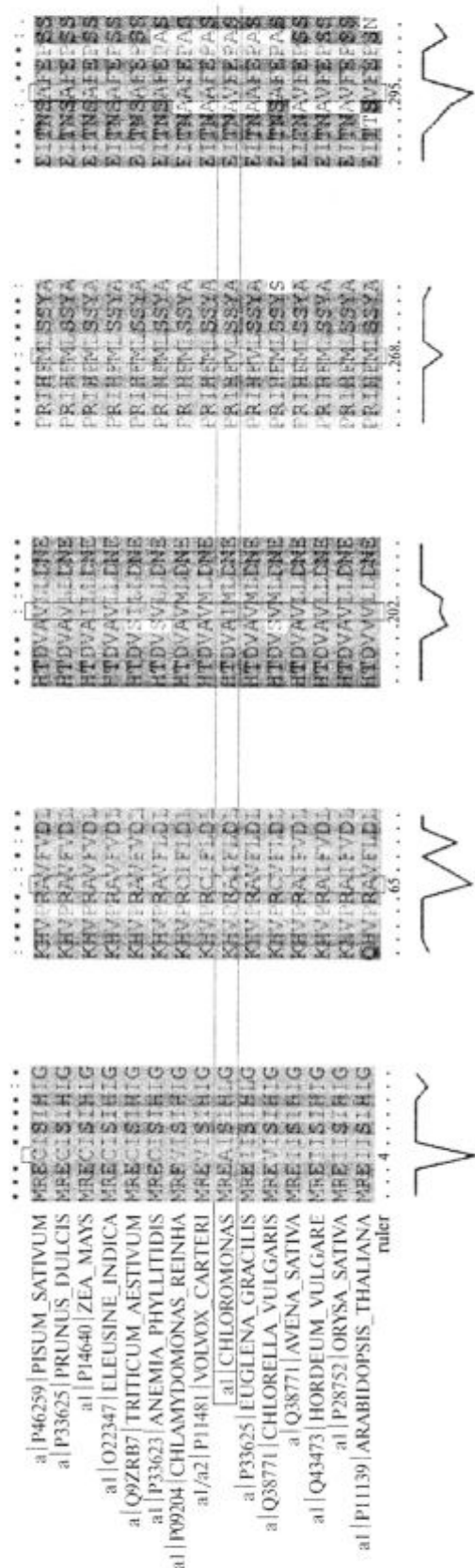


Рис. 1. Сравнительный анализ последовательностей растительных α -тубулинов. Представлены участки последовательностей, непосредственно прилегающие к аминокислотным остаткам, для которых обнаружены замены в α -тубулине хлоромонасы (места расположения этих остатков выделены рамкой)

всех трех анализируемых последовательностях α -тубулина, что свидетельствует о вариативности этого остатка. Таким образом, остается только пять аминокислотных замен в позициях 4, 65, 202, 268, 295, характерных для обоих α -тубулинов хлоромонасы, которые могут рассматриваться в качестве кандидатов на мутации, ответственных за устойчивость водоросли к условиям пониженных температур.

С точки зрения эволюционной теории вероятность одновременного мутагенеза по пяти позициям одной белковой молекулы представляется очень низкой [22]. Логичнее допустить, что функциональную значимость имеют одна или две аминокислотные замены, расположенные в тех участках молекулы тубулина, которые участвуют во взаимодействии его мономеров между собой или во взаимодействии тубулинов с моторными белками или структурными белками, ассоциированными с микротрубочками (МАБ). Для более точного отбора аминокислотных замен α -тубулина хлоромонасы, наиболее вероятно претендующих на роль ключевых для обеспечения феномена холодоустойчивости, нами было проведено сравнение последовательности α -тубулинов хлоромонасы с последовательностями α -тубулинов гусиной травы как модельного объекта, использованного ранее для построения пространственных моделей растительного тубулина [15], а затем и с остальными полностью расшифрованными последовательностями α -тубулинов растений (рис. 1). Результаты проведенного анализа свидетельствуют о том, что замены в позициях 65 и 295 можно не принимать во внимание при дальнейшем рассмотрении по следующим причинам. Остаток аланина в позиции 65 присутствует как в случае тубулина холодоустойчивого хлоромонасы, так и в случае тубулина теплолюбивой гусиной травы. В свою очередь различные изоформы α -тубулина *E. indica* могут содержать в положении 295 как остаток аланина, характерный для хламидомонады, так и остаток валина, который имеется в этой позиции у хлоромонасы.

Результаты расширенного анализа свидетельствуют о том, что позиция 4 в растительных α -тубулинах является достаточно вариативной. Она может содержать остатки либо цистеина, либо изолейцина, принадлежащих к различ-

ным группам аминокислот. Этот факт также уменьшает вероятность ведущей роли остатка в позиции 4 в обеспечении холодоустойчивости. Хотя хлоромонас является единственным растением, которое содержит аланиновый остаток в этой позиции, следует сразу заметить, что сайт, в котором аминокислотные остатки различных групп могут довольно свободно варьировать, вероятнее всего не имеет существенного значения в определении специфических свойств белковой молекулы [23]. Анализ позиции 202 показывает, что растительные α -тубулины содержат как правило в этом положении остаток валина и реже — остаток изолейцина (например, кукуруза и арабидопсис). Наличие определенного аминокислотного остатка в этой позиции является как правило «маркерным признаком» тубулина для каждого вида, за исключением овса, различные изоформы α -тубулинов которого могут содержать остатки как валина, так и изолейцина.

Таким образом, наиболее вероятной аминокислотной заменой в последовательности α -тубулина хлоромонасы, которая может быть ответственной за холодоустойчивость микротрубочек у этой психрофильной водоросли, является замена в позиции 268 (M268 → V). Тотальный анализ всех известных аминокислотных последовательностей α -тубулинов растений свидетельствует о том, что эта замена носит уникальный характер. Следует отметить, что хотя и метионин, и валин принадлежат к одному классу аминокислотных остатков, они весьма существенно отличаются по своим гидрофобным/гидрофильным свойствам. Этот факт подчеркивался в предыдущих исследованиях [4, 11], однако до сих пор возможные изменения структуры молекул тубулина, которые могут происходить вследствие подобной аминокислотной замены, никем не анализировались.

Прежде всего можно предположить, что изменение степени устойчивости/чувствительности к пониженным температурам связано с перестройками молекулярной поверхности молекулы α -тубулина, что наиболее вероятно должно отражаться на их структурно-динамических свойствах собираться в микротрубочки или взаимодействовать с моторными белками и МАБ. Справедливости ради необходимо также отметить, что аналогичные эффекты могут

быть опосредованы структурными изменениями и в последовательности β -тубулина растений, поиск которых осуществляется в настоящее время [24]. Например замены, которые сопровождают возникновение холодоустойчивости у дрожжей, в настоящее время известны только для β -тубулинов [3]. В случае тубулинов животных, изолированных из антарктических рыб, обнаружены замены как в последовательностях по α -, так и в последовательностях β -тубулинов [4]. Расположение этих замен является уникальным как в случае дрожжей, так и в случае животных, что, в свою очередь, может свидетельствовать об эволюционно различных путях возникновения механизмов приспособления к низким температурам представителей различных органических царств.

Не исключено, что мутации, определяющие холодоустойчивость β -тубулина, могут регулировать свойства этого белка за счет изменения его ГТФазной активности, как это было показано, в частности, для мутантов растений, устойчивых к антимикротрубочковым веществам [25]. Например показано, что определенные структурные замены, отличающие представителей одних и тех же семейств ферментов у психрофильных, мезофильных и термофильных организмов, могут изменять температурные оптимумы их ферментативной активности [26]. Следовательно, по аналогии можно предположить, что в случае определенных изменений структуры β -тубулина может происходить смещение температурного оптимума или диапазона его ГТФазной активности, вследствие чего изменятся параметры сборки и разборки микротрубочек. Однако на нынешнем этапе более углубленное рассмотрение несомненно интересной потенциальной роли β -тубулина в обеспечении холодовой стабильности микротрубочек у растений представляется невозможным в силу отсутствия более полной информации относительно особенностей структуры β -тубулинов холодоустойчивых растений.

Для детальной оценки влияния критической мутации, обнаруженной в α -тубулине психрофильной водоросли *Chloromonas*, на пространственные характеристики молекулы α -тубулина высших растений нами была смоделирована молекула α -тубулина гусяной травы, несущая соответствующую мутацию в позиции 268. Осо-

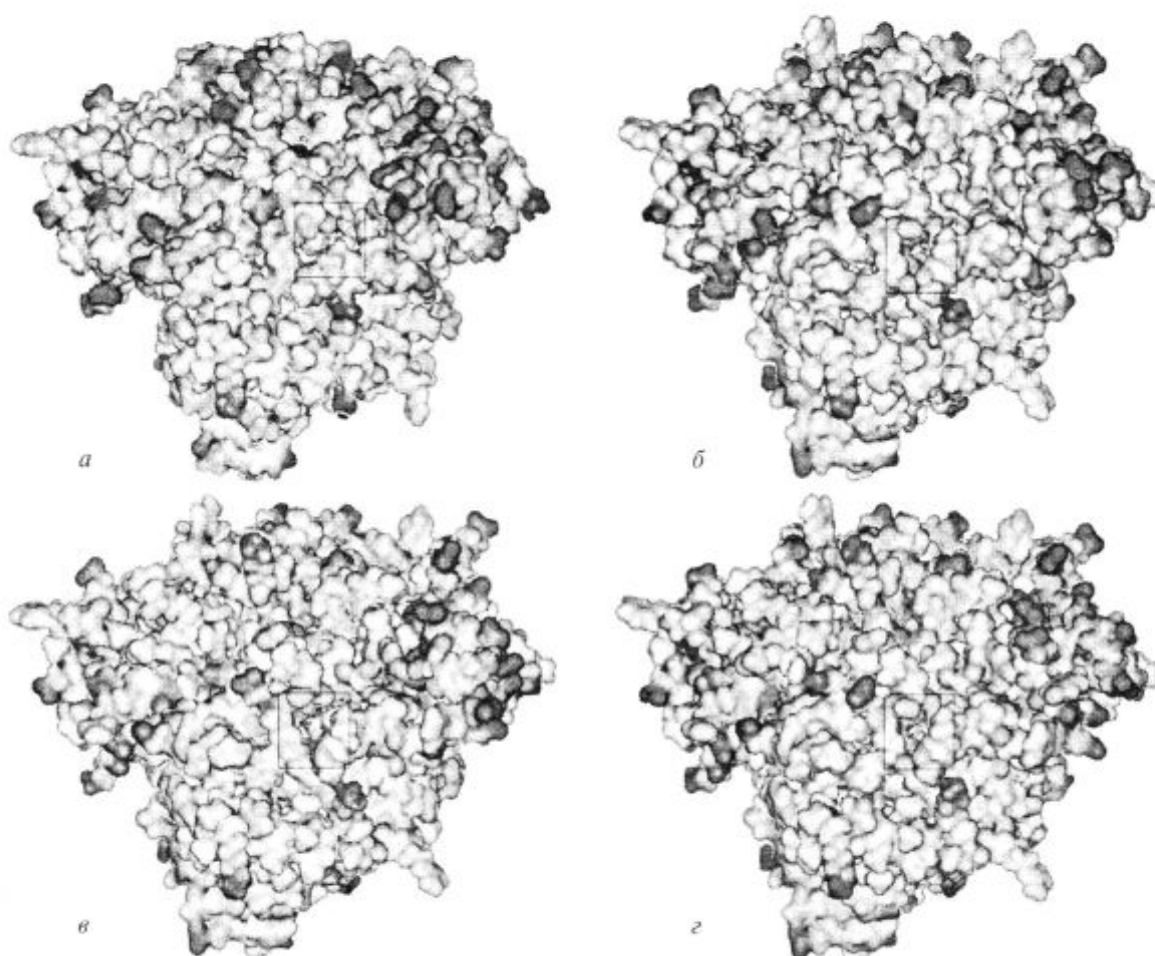


Рис. 2. Карты молекулярных поверхностей α -тубулинов растений: а — *Ch. reinhardtii*, б — *Chloromonas*, в — *E. indica*, г — тубулин *E. indica*, содержащий аминокислотную замену M268 $\rightarrow$ V. Область расположения остатка 268 выделена рамкой

бенности молекулярной поверхности полученной молекулы сравнивали с соответствующими поверхностями α -тубулинов хламидомонады, хлоромонасы и гусяной травы. Молекулярные поверхности всех исследуемых белков представлены на рис. 2. Результаты осуществленного структурного анализа оказались весьма интересными, поскольку позволили установить, что аминокислотный остаток в позиции 268 располагается под поверхностью молекулы в зоне интердимерного контакта. При этом в некоторых случаях он может быть частично экспонирован на поверхности молекулы.

Как видно из рис. 2, каждая из смоделированных молекул имеет свой собственный рельеф поверхности, который характеризуется вполне определенной пространственной ориен-

тацией поверхностных группировок экспонированных наружу аминокислотных остатков. В то же время легко убедиться, что у молекулы α -тубулина гусяной травы, несущей мутацию в положении 268 (рис. 2, б), рельеф поверхности явно напоминает рельеф, образуемый поверхностными группами в трехмерной модели оригинального α -тубулина хлоромонасы (рис. 2, г). В частности, соответствующим образом меняется ориентация боковых цепей целого ряда аминокислотных остатков, которые экспонируются на поверхности молекулы тубулина. Среднеквадратическое отклонение между аминокислотными остатками, которые образуют интердимерную поверхность молекул тубулина хлоромонасы и тубулина гусяной травы, несущей замену в положении 268, составляет

0,4383391 Å против 2,151579 Å между соответствующими группами хлоромонасы и хламидомонады и 0,7929012 Å между соответствующими аминокислотными остатками молекулы тубулина хлоромонасы и гусиной травы (без указанной замены). Таким образом, эффект единичной замены оказывается просто разительным, особенно если учесть эволюционную отдаленность исследуемых организмов.

Принимая во внимание наблюдаемое явление уподобления поверхностей α -тубулинов столь отдаленных растений, с большой вероятностью можно допустить, что именно специфические пространственные характеристики поверхности междимерного взаимодействия тубулинов играют решающую роль в адаптации микротрубочек и соответственно всего растительного организма к тому или иному температурному диапазону. Отличия в ориентации поверхностных групп молекул тубулина имеют своим следствием изменение потенциальной энергии взаимодействия поверхностей молекул α - и β -тубулинов соседних димеров. Можно предположить, что для поддержания нормального динамического равновесия сборки/разборки микротрубочек необходимо, чтобы уровень полной энергии исследуемой системы находился на некотором вполне определенном уровне [27]. В случае снижения температуры кинетическая энергия системы микротрубочек вполне закономерно будет уменьшаться. Таким образом, для поддержания энергетического баланса в системе необходимо соответствующее увеличение потенциальной энергии, уровень которой определяется именно пространственной ориентацией молекулярных группировок [28]. Перестройки, которые наблюдаются на молекулярной поверхности тубулина гусиной травы вследствие замены M268 → V, обязательно будут иметь своим следствием изменение величины энергии взаимодействия, что является предварительным подтверждением нашего предположения. Однако полная проверка такой рабочей гипотезы нуждается в проведении дополнительных исследований.

В то же время замена M268 → V должна приводить к существенным изменениям гидрофобных свойств молекулы тубулина. Остаток валина имеет одну из наибольших величин гидрофобности среди всех прочих аминокислот

по всем общепринятым шкалам оценки этого параметра [21, 29]. Как было показано рядом исследователей, мутации в молекулах животных тубулинов, которые имеют своим следствием увеличение их толерантности к холоду, направлены именно в сторону роста гидрофобных показателей. В то же время следует заметить, что подобная замена (или замены) не будет существенно влиять на суммарный гидрофобный потенциал молекулы тубулина — в масштабах целой молекулы белка колебание этого параметра окажется незначительным. Поэтому количественная оценка гидрофобности всей молекулы тубулина может и не дать существенной информации.

Более показательные результаты можно получить при оценке гидрофобных свойств отдельных участков поверхности белковой молекулы [30]. Распределение гидрофобного потенциала на поверхности исследуемых молекул тубулинов показано на рис. 3. Сравнение представленных моделей свидетельствует о том, что каждая из исследуемых молекул характеризуется уникальным образом распределения гидрофобных свойств на их поверхности. Следует также отметить, что результаты такого сравнения не позволяют однозначно утверждать об очень высокой степени сходства потенциальных карт распределения гидрофобности в α -тубулине хлоромонасы и α -тубулине гусиной травы, несущем замену в положении 268. В целом, это свидетельствует о высокой специфичности гидрофобных свойств поверхностей белковых молекул, характеризующихся небольшими аминокислотными различиями, вообще и молекул тубулинов в частности. Таким образом, полученные нами результаты дают возможность только констатировать уникальность поверхностных липофильных паттернов для каждой из исследуемых нами молекул [31], но на их основании невозможно достоверно утверждать, что увеличение гидрофобности отдельного аминокислотного остатка приводит к увеличению гидрофобного потенциала всей поверхности молекулы.

Как отмечалось, позиция 268 в последовательности α -тубулина интересна не только своей потенциальной ролью в обеспечении холодоустойчивости микротрубочек растений.

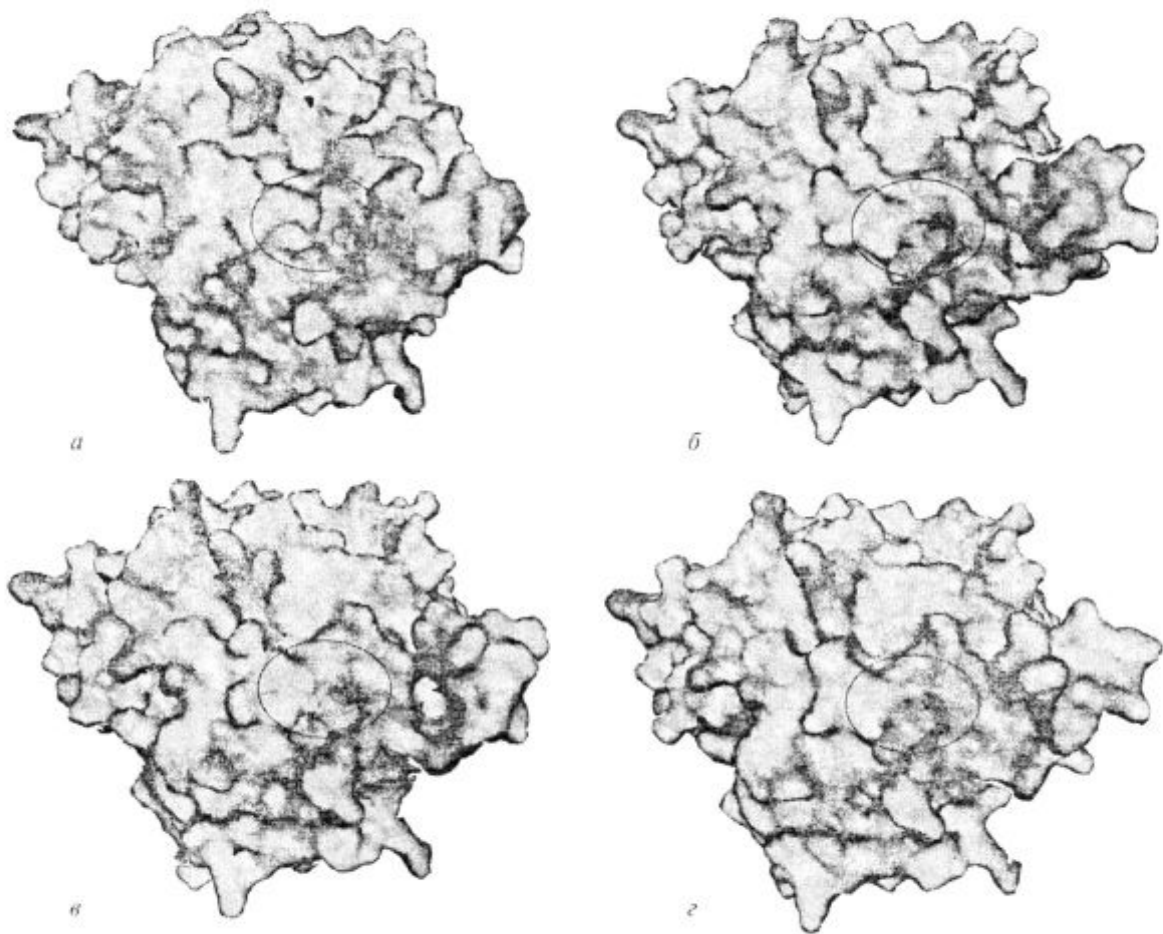


Рис. 3. Распределение гидрофобного потенциала на поверхности молекул α -тубулинов растений: а — *Ch. reinhardtii*, б — *Chloromonas*, в — *E. indica*, г — тубулин *E. indica*, содержащий аминокислотную замену M268 $\rightarrow$ V. Область расположения остатка 268 выделена эллипсом

Заменой метионина на треонин именно в этой позиции последовательности α -тубулина гусиной травы обусловлено возникновение промежуточной (частичной) устойчивости этого организма к гербицидам динитроанилинового ряда [13, 32]. Повышенная стабильность интердимерных контактов тубулинов против деполимеризационных эффектов, обеспечивающая в этом случае промежуточную устойчивость к динитроанилинам, может быть обусловлена минорными изменениями гидрофобности α -тубулина гусиной травы, возникающими вследствие замены M268 $\rightarrow$ T. Более резко выраженные изменения гидрофобных свойств α -тубулина хлоромонасы, обусловленные заменой M268 $\rightarrow$ V, также могут вызывать аналогичный стабилизирующий эффект интердимерных контактов

тубулинов. Изложенные факты наводят на мысль о существенной роли этого аминокислотного остатка в обеспечении нормального функционирования α -тубулина в составе микротрубочек растений, а также позволяют высказать предположение о критической роли поверхности молекулы α -тубулина, участвующей в интердимерном контакте, в обеспечении устойчивости микротрубочек растений к стрессовым факторам различной природы.

В целом, полученные результаты позволяют сделать несколько общих выводов относительно участия микротрубочек в реализации механизмов холодоустойчивости у растений. В частности, критическую роль в развитии повышенной устойчивости к низким температурам у микротрубочек растений играет изменение состояния

поверхности интердимерного взаимодействия тубулинов. Здесь наблюдается явное отличие от исследованных ситуаций с микротрубочками животных, где адаптация к низким температурам достигается за счет изменений в поверхности латерального контакта между тубулиновыми протофиламентами [4]. Поэтому предсказание оптимальной структуры «холодоустойчивой» молекулы α -тубулина растений с помощью компьютерного моделирования, базирующегося на внесении соответствующих прогнозируемых аминокислотных замен в ту часть его последовательности, которая участвует в интердимерном взаимодействии, объективно открывает потенциальные возможности конструирования молекул α -тубулина, обеспечивающих повышение холодовой устойчивости микротрубочек.

Вполне возможно также, что в более широком смысле адаптация растительной клетки к абиотическим факторам, имеющим совершенно различную природу (т.е. холод и гербициды), может происходить за счет общих молекулярных механизмов, связанных с определенными перестройками поверхности интердимерного контакта в протофиламентах микротрубочек за счет точечных мутаций. Следовательно, более детальное структурно-биологическое понимание этих механизмов может предоставить нам дополнительные возможности для разработки высокоэффективных инструментов создания сельскохозяйственных культур, устойчивых к различным стрессовым факторам окружающей среды, путем целенаправленного применения генно-инженерных технологий.

SUMMARY. The uniqueness of the point substitutions in the sequences of two α -tubulin isotypes from psychrophilic alga *Chloromonas* that can determine the increased cold tolerance of this alga was analyzed. The comparison of all known amino acid sequences of plant α -tubulins enabled to ascertain that only M268 $\rightarrow$ V replacement is unique and may have a significant influence on spatial structure of plant α -tubulins. Modeling of molecular surfaces of α -tubulins from *Chloromonas*, *Chlamydomonas reinhardtii* and goose grass *Eleusine indica* showed that insertion of the amino acid replacement M268 $\rightarrow$ V into the sequence of goose grass tubulin led to the likening of this protein surface to the surface of native α -tubulin from *Chloromonas*. Alteration of local hydrophobic properties of α -tubulin molecular surface in interdimeric contact zone as a result of the mentioned replacement was shown that

may play important role in increasing the level of cold resistance of microtubules. The crucial role of amino acid residue in 268 position for forming the interdimeric contact surface of α -tubulin molecule was revealed. The assumption is made about the importance of replacements at this position for plant tolerance to abiotic factors of different nature (cold, herbicides).

РЕЗЮМЕ. Проаналізовано унікальність точкових амінокислотних замін в послідовностях двох ізотипів α -тубулінів психрофільної водорості хлоромонас (*Chloromonas*), наявність яких може визначати підвищену стійкість до холоду цієї водорості. Порівняння всіх відомих амінокислотних послідовностей α -тубулінів рослинного походження дозволило встановити, що лише заміна M268 $\rightarrow$ V є унікальною і може справляти істотний вплив на особливості просторової структури α -тубуліна рослин. За допомогою моделювання молекулярних поверхней *Chloromonas*, *Chlamydomonas reinhardtii* та гусячої трави *Eleusine indica* показано, що впровадження амінокислотної заміни M268 $\rightarrow$ V в послідовність гусячої трави приводить до уподібнення поверхні цього білка поверхні нативного α -тубуліна хлоромонаса. Відзначено також зміну локальних гідрофобних властивостей молекули α -тубуліна в зоні інтердимерного контакту внаслідок згаданої заміни, що може відігравати важливу роль в підвищенні рівня холодостійкості микротрубочок. Виявлено критичну роль амінокислотного залишка в положенні 268 для формування поверхні інтердимерного контакту молекули α -тубуліна і висказано припущення щодо важливості замін в цьому положенні для забезпечення стійкості рослин до абіотичних факторів різної природи (холод, гербициди).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nick P. Control of the response to low temperatures // Plant microtubules: potential for biotechnology / Ed. P. Nick. — Berlin; Heidelberg; New York : Springer Verlag, 2000. — P. 121–135.
2. Detrich H.W. Microtubule assembly in cold-adapted organisms: functional properties and structural adaptations of tubulins from Antarctic fishes // Comp. Biochem. Physiol. — 1997. — **118A**. — P. 501–513.
3. Gupta M.L., Bode C.J., Dougherty C.A., Marquez R.T., Himes R.H. Mutagenesis of beta-tubulin cysteine residues in *Saccharomyces cerevisiae*: mutation of cysteine 354 results in cold-stable microtubules // Cell Motil Cytoskeleton. — 2001. — **49**. — P. 67–77.
4. Detrich H.W., Parker S.K., Williams R.C., Nogales E., Downing K.H. Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the α - and β -tubulins of Antarctic fishes // J. Biol. Chem. — 2000. — **275**. — P. 37038–37047.
5. Pihakaski-Maunsbach K., Puhakainen T. Effect of cold exposure on cortical microtubules of rye (*Secale cereale*) as observed by immunocytochemistry // Physiol. Plant. — 1995. — **93**. — P. 563–571.

6. Durso N.A., Cyr R.J. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and higher plant homologue of elongation factor 16 // *Plant Cell*. — 1994. — **6**. — P. 893–905.
7. Mazars C., Thion L., Thuleau P., Graziana A., Knight M.R., Moreau M., Ranjeva R. Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts // *Cell Calcium*. — 1997. — **22**. — P. 413–420.
8. Sakiyama M., Shibaoka H. Effect of abscisic acid on the orientation and cold stability of cortical microtubules in epicotyl cells of the dwarf pea // *Protoplasma*. — 1990. — **157**. — P. 165–171.
9. Olinevich O.V., Khokhlova L.P., Raudaskoski M. Effect of abscisic acid and cold acclimation on the cytoskeletal and phosphorylated proteins in different cultivars of *Triticum aestivum* L. // *Cell Biol. Int.* — 2000. — **24**. — P. 365–373.
10. Hughes M.A., Dunn M.A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature // *J. Exp. Bot.* — 1996. — **47**. — P. 291–305.
11. Willem S., Scahna M., Devos N., Gerday C., Loppes R., Matagne R.F. Protein adaptation to low temperatures: a comparative study of α -tubulin sequences in mesophilic and psychrophilic algae // *Extremophiles*. — 1999. — **3**. — P. 221–226.
12. Anthony R.G., Hussey P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton // *Trends Plant Sci.* — 1999. — **4**. — P. 112–116.
13. Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // *Plant Cell*. — 1998. — **10**. — P. 297–308.
14. Nogales E. Structural insights into microtubule function // *Annu. Rev. Biochem.* — 2000. — **69**. — P. 277–302.
15. Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // *Биополимеры и клетка*. — 2001. — **17**. — С. 61–69.
16. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucl. Acids Res.* — 1997. — **24**. — P. 4876–4882.
17. Guex N., Peitsch M.C. Molecular modelling of proteins // *Immunol. News*. — 1999. — **6**. — P. 132–134.
18. Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Моделирование и анализ пространственной структуры молекул γ -тубулина высших растений // *Доп. НАН України*. — 2002. — № 1. — С. 145–149.
19. Sanner M.F., Spehner J.-C., Olson A.J. Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces // *Biopolymers*. — 1996. — **38**. — P. 305–320.
20. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis*. — 1997. — **18**. — P. 2714–2723.
21. Radzicka A., Wolfenden R. Comparing the polarities of the amino-acids — side-chain distribution coefficients between the vapor-phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous-solution // *Biochemistry*. — 1988. — **27**. — P. 1664–1670.
22. Ellis J., Dodds P., Pryor T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2000. — **3**. — P. 278–284.
23. Ibdah M., Bar-Ilan A., Livnah B., Schloss J.V., Barak Z., Chipman D.M. Homology modeling of the structure of bacterial acetohydroxy acid synthase and examination of the active site by site-directed mutagenesis // *Biochemistry*. — 1996. — **35**. — P. 16282–16291.
24. Wick S.M., Carter J.V. Reverse transposon tagging to identify insertional mutants of maize beta tubulins // *Cell Biol. Int.* — 1998. — **21**. — P. 907–908.
25. Солодушко В.Г. Роль β -тубуліну у стійкості мутантних ліній *Nicotiana plumbaginifolia* до дії сполук з антимиотрубочковою активністю : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 1997. — 21 с.
26. Gianese G., Bossa F., Pascarella S. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes // *Proteins*. — 2002. — **47**. — P. 236–249.
27. Wales D.J., Scheraga H.A. Global optimization of clusters, crystals, and biomolecules // *Science*. — 1999. — **285**. — P. 1368–1372.
28. Mitsutake A., Sugita Y., Okamoto Y. Generalized-ensemble algorithms for molecular simulations of biopolymers // *Biopolymers*. — 2001. — **60**. — P. 96–123.
29. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a proteins // *J. Mol. Biol.* — 1982. — **157**. — P. 105–132.
30. Kumar S., Tsai C.J., Nussinov R. Maximal stabilities of reversible two-state proteins // *Biochemistry*. — 2002. — **41**. — P. 5359–5374.
31. Morikis D., Roy M., Newlon M.G., Scott J.D., Jennings P.A. Electrostatic properties of the structure of the docking and dimerization domain of protein kinase A II α // *Eur. J. Biochem.* — 2002. — **269**. — P. 2040–2051.
32. Zeng L., Baird W.V. Inheritance of resistance to antimicrotubule dinitroaniline herbicides in an «intermediate» resistant biotype of *Eleusine indica* (Poaceae) // *Amer. J. Bot.* — 1999. — **86**. — P. 940–947.

Поступила 17.03.03