

УДК 581.1

МЕТОД КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ В ВЫЯВЛЕНИИ ТИРОЗИНОВОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ

А.Р. Мухитов, Н.В. Петрова, О.В. Власова, Ф.Г. Каримова

Аннотация

Выявлено значительное число фосфорилированных по тирозину сайтов белков клеток каллуса гороха *Pisum sativum* и морского галофита водоросли *Dunaliella maritima* методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием моноклональных первичных антител к фосфорилированному тирозину PY20 и вторичных антител, конъюгированных с FITC. Показана высокая (мкМ) специфичность связывания использованных антител с фосфотирозиновыми белками растений. Ингибитор протеинтирозинфосфатаз ортованадат натрия повысил в 10–12 раз количество сайтов тирозинового фосфорилирования белков растений. При действии антиоксиданта аскорбиновой кислоты и восстанавливающего агента ДТТ количество сайтов фосфорилирования по тирозину белков растений *in vivo* за 10 мин понижалось в 2 раза, тогда как при действии ингибитора каталазы аминотриазола – повышалось в 1.5–3 раза (в среднем из 4 экспериментов). Полученные результаты обсуждаются с позиции редокс-регуляции активности протеинтирозинфосфатаз.

Ключевые слова: тирозиновое фосфорилирование белков, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, горох, *Dunaliella maritima*.

Введение

В постгеномную эру внимание исследователей направлено на изучение клеточного протеома и способов регуляции активности мультидоменных белков и их надмолекулярных комплексов. Очень актуально в настоящее время выявление детальных молекулярных путей, которые управляют определенными биологическими процессами. Известно, что активность белков регулируется посттрансляционными модификациями, среди которых важную роль играет фосфорилирование белков, активность 30% истинных белков эукариот регулируется этой посттрансляционной модификацией [1].

Процессы фосфорилирования-дефосфорилирования белков по аминокислотным остаткам серина, треонина и тирозина выполняют существенную роль в регуляции множества клеточных процессов, таких, как сигнальная трансдукция, геномная регуляция и клеточный метаболизм, в том числе фундаментальных процессов пролиферации, дифференцировки и адаптации. Фосфорилирование белков изменяет их функции, физико-химические свойства (например, растворимость), активность, субклеточную локализацию, образование или распад надмолекулярных комплексов, осуществляет регуляцию взаимодействия клеток эукариот. Фосфорилирование белков осуществляется протеинкиназами, относящи-

мися к одному из самых больших семейств белков, кодируемых 1.5–2.5% всех эукариотических генов [2]. В растениях число протеинкиназ составляет 1100–1700, что в 2–3 раза больше, чем у позвоночных, из них 487 с топологией рецепторных киназ, но рецепторные функции которых экспериментально не подтверждены, такие белки названы рецептор-подобные киназы (RLK) [3].

Выявлено, что фосфорилирование белков по остаткам тирозина определяет белок-белковые взаимодействия при сборке мультидоменных белков [4]. Важность этих клеточных событий демонстрируют исследования, показавшие, что 60–80% клеточного протеома функционирует в мультидоменных комплексах [5]. Тирозиновое фосфорилирование – важнейшая посттрансляционная модификация белков, контролирующая клеточный сигналинг и метаболизм, необходимая для быстрой сборки мультибелковых сигнальных комплексов, а также для сборки мультидоменных белков в фундаментальных метаболических путях. Геном человека кодирует 518 киназ, включая 58 рецепторных тирозинкиназ и 32 нереперторные протеинтирозинкиназы (РТК) [6].

Фосфорилирование белков растений по остаткам тирозина мало изучено. Полагали, что этот тип фосфорилирования белков в растениях осуществляют митоген-активируемые протеинкиназы, представленные в растениях довольно большим числом [7]. Однако затем были экспериментально обнаружены протеинкиназы STY *Arabidopsis*, структурно сходные с РТК src-семейства позвоночных [8]. В 2006 г. анализ генома *Arabidopsis thaliana* обнаружил 57 генов, кодирующих различные протеинкиназы, имеющие тирозинкиназные мотивы. Сравнительный анализ протеинкиназ STY-семейства и их распределения в хромосомах *A. thaliana*, а также рецепторных и нереперторных РТК, Raf- и Ras-киназ клеток животных выявил, что все эти протеинкиназы формируют группу РТК смешанного происхождения [9].

Реакцию дефосфорилирования белков осуществляют протеинфосфатазы: протеинсерин/треонинфосфатазы, протеинтирозинфосфатазы (РТР) и протеинтирозинфосфатазы двойной специфичности. Все члены суперсемейства РТР имеют в активном центре цистеин, необходимый для каталитической активности. В геноме *Arabidopsis thaliana* существует 18 генов РТР, однако молекулярные механизмы их регуляции практически не изучены [10]. Выявлено, что каталитический домен AtPTR1 имеет высокую гомологию с РТР млекопитающих и обратимо инактивируется перекисью водорода [11].

Для исследования фосфорилированных белков используют традиционные методы разделения белков, меченных изотопами ортофосфата ($^{32}\text{P}_n$) или γ - ^{32}P АТФ, с последующими 1D- и 2D-электрофорезом и радиоавтографией. Более современный метод включает разделение белков методами гель-электрофореза с последующим переносом их на нитроцеллюлозные или поливинилидендифторидные мембраны; затем детекцию хемилюминисценции фосфорилированных белков проводят специфическими антителами, конъюгированными с пероксидазой. Белки, разделенные 2D-электрофорезом, вырезают и подвергают трипсинолизу, затем идентифицируют методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с последующим соотношением полученных результатов с базой данных идентифицированных белков. Поскольку разделение белков методом 2D-электрофореза в связи с объективными ограничениями является «искусством», по мнению Го-

воруна и Арчакова [12], задачи исследования фосфопротеома диктуют необходимость разработки новых методов и подходов, дающих возможность идентификации большего числа фосфопептидов в одном эксперименте. На сегодня существуют новые техники разделения и обогащения фракции фосфопептидов в комбинации с высокочувствительными методами определения пептидной последовательности масс-спектрометрией [13, 14].

Одним из методов, позволяющих проводить идентификацию и количественную оценку фосфорилированных белков, а также их локализацию, является конфокальная лазерная сканирующая микроскопия с использованием специфических флуоресцентных зондов. Целью нашей работы было определение числа сайтов фосфотирозиновых белков клеток каллусной культуры гороха и морского галофита водоросли *Dunaliella maritima* и их редокс-регуляции с помощью экзогенных соединений, вызывающих окисление/восстановление тиоловых групп белков.

1. Материалы и методы

Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *Dunaliella maritima* (морской галофит) без клеточной стенки из коллекции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, любезно предоставленная нам М.Г. Владимировой. Клетки этой водоросли представляют удобный модельный объект для исследования физиологии солевого (и других видов) стресса. Отсутствие клеточной стенки облегчает проникновение антител, используемых для детекции фосфотирозиновых белков. Для выращивания *D. maritima* использовали жидкую среду [15] следующего состава (в мМ): NaCl – 500, K₂HPO₄ – 5, Ca(NO₃)₂ – 0.75, MgSO₄ – 6, Fe-ЭДТА – 0.125, Трис-HNO₃ – 50; pH 7.2; микроэлементы (в мкМ): H₃BO₃ – 11, MnSO₄ – 19, ZnSO₄ – 5.3, KJ – 0.5, Na₂MoO₄ – 0.12, CuSO₄ – 0.016, CoCl₂ – 0.019. Культуру клеток водорослей выращивали в стерильных условиях при температуре 26 °С при освещении белыми люминесцентными лампами 10000 лк. В опытах использовались клетки водорослей (3–4-дневного возраста), находящиеся в логарифмической фазе роста. Количество клеток в опыте – 10⁶ клеток в 1 мл среды.

Другим объектом исследования служили клетки 9-дневной каллусной культуры, полученной из корней гороха *Pisum sativum*. Каллус гороха пассировали в темноте при температуре 25–26 °С на среде, содержащей соли по MS [16] с добавлением: тиамина – 0.5 мг/л, пиридоксина – 0.1 мг/л, никотиновой кислоты – 0.5 мг/л, индолилмасляной кислоты – 0.5 г/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты – 2 мг/л, индолилуксусной кислоты – 0.5 мг/л, сахарозы – 1.5%, 100 мг/мл мезоинозита и 2 г/л фитагеля.

Исследование фосфорилирования белков по тирозину проводили с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Клетки *D. maritima* и *P. sativum* после воздействия эффекторов *in vivo* фиксировали 10 мин 3.7%-ным раствором параформальдегида (PFA) в фосфатно-солевом буфере (PBS) состава (в мМ): NaCl – 137, KCl – 2.68, K₂HPO₄ – 1.16, Na₂HPO₄·12H₂O – 6.45, pH 7.2. Клетки отмывали от PFA центрифугированием 3 раза по 5 мин при 450 g (MiniSpin plus, Eppendorf) в PBS. Затем обрабатывали 100 мкМ (для *D. maritima*) или 150 мкМ (для *P. sativum*) раствора дигитонина в течение 10 мин.

Блокировали клетки 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина 15 мин. Затем обрабатывали 45 мин первичными антителами к фосфорилированному тирозину (mouse monoclonal anti-phosphotyrosine unconjugated, Biosource, USA). Отмывали клетки 3 раза по 5 мин в PBS и обрабатывали вторичными антителами, конъюгированными с FITC (goat antimouse IgG fluorescein conjugate, Calbiochem, USA) 45 мин. Антитела к фосфорилированному тирозину и вторичные антитела применяли в разведении 1 : 1000. Отмывали 2 раза по 5 мин в PBS. Ядра клеток гороха окрашивали DAPI (краситель, специфичный для ДНК). Затем готовили препараты и анализировали их с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss). Для возбуждения флуоресценции FITC применяли аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Для исключения автофлуоресценции применяли λ -режим сканирования препаратов с последующей обработкой изображений с использованием алгоритма линейного разложения, позволяющего разделить сигналы близкие по спектральным характеристикам.

Для доказательства специфичности связывания первичных антител с фосфотирозиновыми белками растений использовали фосфотирозин (Sigma). Для этого клетки обрабатывали первичными антителами, прединкубированными в течение 30 мин с фосфотирозином в концентрациях 5, 10 и 100 мкМ при комнатной температуре. Для проверки специфичности вторичных антител выполняли указанные выше процедуры обработки, за исключением этапа применения первичных антител. Для учета автофлуоресценции исследовали контрольные необработанные клетки *D. maritima* и *P. sativum*. Как показали наши исследования, клетки *D. maritima* и *P. sativum* обладают интенсивной автофлуоресценцией в области 505–528 нм при длине волны возбуждающего лазера 488 нм, что затрудняет локализацию сигнала от FITC (эмиссия – 519 нм). Для выделения флуоресценции от FITC применяли сканирование препаратов в λ -режиме LSM. Полученные спектры флуоресценции затем были использованы при обработке изображений с помощью алгоритма линейного разложения программой LSM 5 (Release version 4.0).

2. Результаты и обсуждение

Первым этапом иммуноцитохимических исследований любым методом является доказательство специфичности используемых антител. В наших экспериментах исследовалась специфичность первичных и вторичных антител. Результаты экспериментов, приведенных на рис. 1 и 2, указывают на высокую специфичность использованных нами первичных антител к фосфотирозиновым белкам растений. После инкубации первичных антител с антигеном (5 мкМ фосфотирозина) интенсивность флуоресцентного свечения FITC и, соответственно, количество сайтов, фосфорилированных по тирозину белков клеток водорослей (рис. 1, *а*) и каллуса гороха (рис. 2, *б*), резко уменьшались (на 70%) по сравнению с контролем. Повышение концентрации фосфотирозина до 10–100 мкМ при инкубации с антителами вызывало еще большее падение интенсивности свечения FITC как в клетках водорослей (рис. 1, *д*, *е*), так и в клетках каллуса гороха (рис. 2, *с*). Данные по обработке исследованных растительных клеток лишь вторичными антителами (рис. 1, *в*), согласно которым свечение

FITC не детектировалось, указывают на отсутствие неспецифического связывания вторичных антител. Высокая специфичность моноклональных антител РУ20 к фосфотирозиновым белкам, подтвержденная нашими данными иммуноцитохимической визуализации фосфотирозиновых белков клеток водоросли *D. maritima* (рис. 1) и клеток каллуса высшего растения гороха (рис. 2), согласуется с ранее проведенными экспериментами с использованием методов электрофореза и иммуноблоттинга [17].

Известно, что любой стресс или экзогенное соединение вызывает повышение внутриклеточного содержания H_2O_2 [18], которая может вызвать окисление тиоловых групп цистеина белков. Активность ферментов, фосфорилирующих-дефосфорилирующих по тирозину белки, РТК и РТР, контролируется окислением-восстановлением тиоловых групп цистеинов в каталитических центрах (существенных тиоловых групп) этих ферментов [19]. Найдено, что окисление существенной тиоловой группы РТК активирует фермент, тогда как окисление существенной тиоловой группы РТР ингибирует их активность [20]. Уникальность тирозинового фосфорилирования белков заключается в том, что активность РТР в 10 раз выше активности РТК [21], поэтому подавление активности РТР вызывает значительное повышение уровня фосфотирозиновых белков.

В наших экспериментах в контрольном варианте клеток водорослей (рис. 1, б; 3, б) и клеток каллуса гороха (рис. 2, а) наблюдается значительное число фосфотирозиновых белков; очевидно, это связано со стрессом при подготовке образца. Для обращения действия стресса в экспериментах обычно применяют восстанавливающий агент дитиотрейтол (ДТТ), хорошо проникающий внутрь клеток. Данные, приведенные на рис. 3, з и 4, з, демонстрируют способность агента ДТТ восстанавливать *in vivo* существенные SH-группы РТР, соответственно, активность РТР, вследствие чего наблюдалось значительное уменьшение уровня тирозинового фосфорилирования белков (в 2 раза) в сравнении с контролем.

Для того чтобы оценить вклад РТР в уровень тирозинового фосфорилирования белков, мы использовали специфический ингибитор тирозиновых протеинфосфатаз ортованадат натрия, который, по данным литературы, оказывает драматические эффекты на клеточное деление и рост тканей при малых концентрациях, а в фармакологических концентрациях может вызвать неопластическую трансформацию. Ванадий классифицирован международным агентством по изучению рака (IARC) как потенциальный канцероген, он обладает сходными свойствами с арсенатом и хроматом [22]. Ванадат хорошо проникает в клетку, образуя с эндогенной H_2O_2 комплекс пероксованадата, который быстро и необратимо окисляет активный сайт РТР [22]. Показано, что ванадат ингибировал РТР1 из *A. thaliana* [23].

Данные по влиянию ванадата, представленные на рис. 1, ж при сравнении с контролем (рис. 1, б) позволяют количественно оценить число потенциально активных сайтов фосфорилирования белков по тирозину. Анализ данных пространственного распределения интенсивности флуоресценции свечения FITC в клетках водоросли (данные не приведены) свидетельствует о 10–12-кратном увеличении числа сайтов, фосфорилированных по тирозину белков, под действием экзогенного ванадата, что указывает на высокую активность РТР и согласуется с данными, полученными на клетках позвоночных [21].

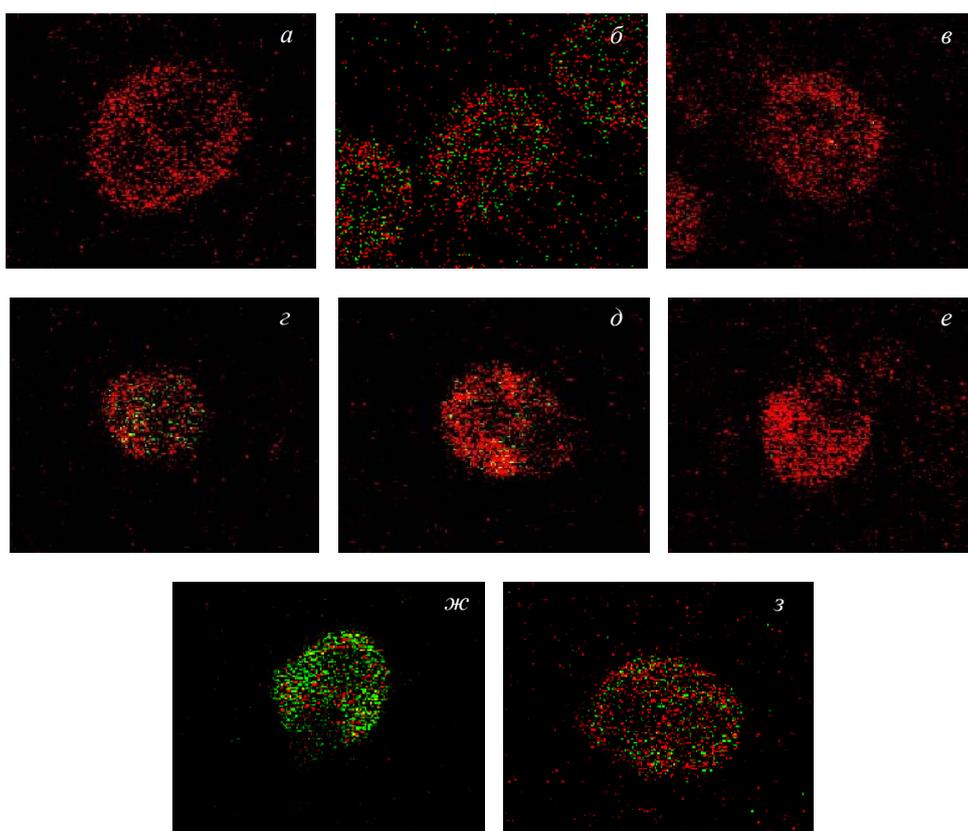


Рис. 1. Иммуноцитохимическая локализация фосфорилированных по тирозину сайтов белков в клетках *Dunaliella maritima*: (а) автофлуоресценция, (б) контроль, (в) контроль специфичности вторичных антител, (z) 5 мкМ фосфотирозина, (d) 10 мкМ фосфотирозина, (e) 100 мкМ фосфотирозина, (ж) 0.1 мМ ортованадата натрия *in vivo* за 10 мин, (з) 10 мМ аминотриазола *in vivo* за 10 мин. Красный цветом показана автофлуоресценция, зеленым – флуоресценция FITC

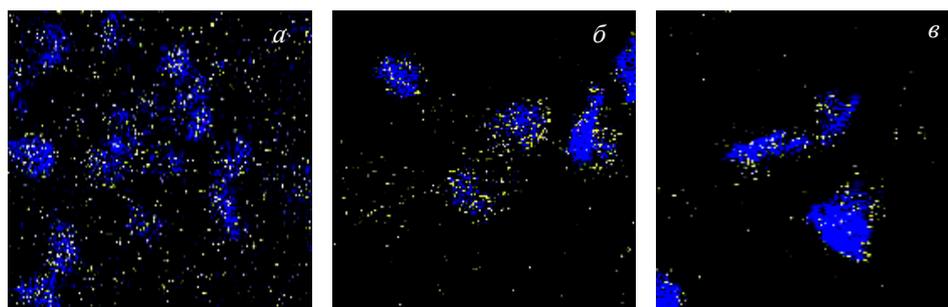


Рис. 2. Специфичность связывания фосфотирозинового антитела PY20 с белками клеток каллуса из корней *Pisum sativum*: (а) иммуноцитохимическая локализация фосфорилированных по тирозину сайтов белков в контроле, (б) 5 мкМ фосфотирозина, (в) 10 мкМ фосфотирозина. Зеленым цветом показана флуоресценция FITC, синим цветом – ядра, окрашенные DAPI

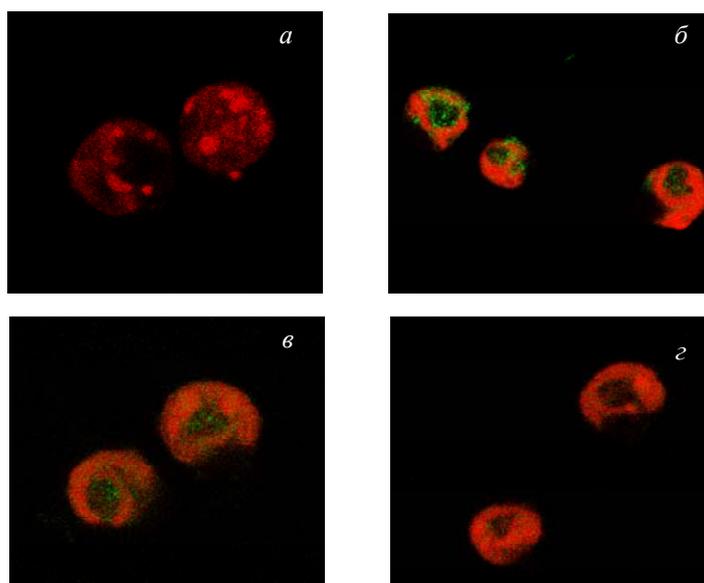


Рис. 3. Влияние восстанавливающих агентов *in vivo* за 10 мин на тирозиновое фосфорилирование белков клеток *Dunaliella maritima*: (а) автофлуоресценция, (б) контроль, (в) 10 мМ аскорбиновой кислоты, (г) 10 мМ дитиотрейтола. Красный цветом показана автофлуоресценция, зеленым – флуоресценция FITC

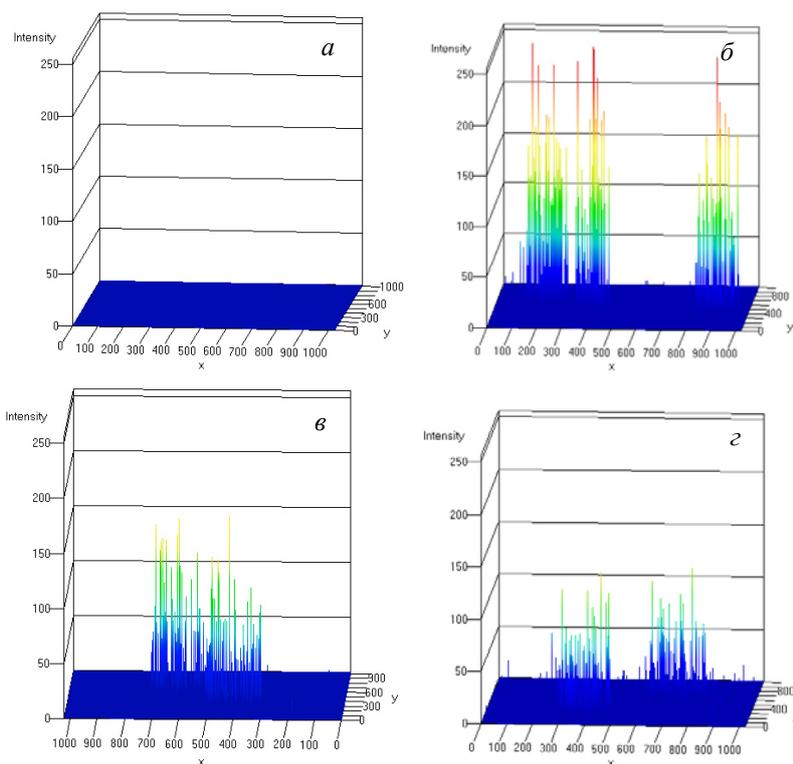


Рис. 4. Диаграммы пространственного распределения интенсивностей флуоресценции FITC в клетках *Dunaliella maritima*: (а) автофлуоресценция, (б) контроль, (в) 10 мМ аскорбиновой кислоты, (г) 10 мМ дитиотрейтола

Эффекты ванадата в клетках морского галофита *D. maritima* (рис. 1, ж) могут быть объяснены также последствиями, вызванными подавлением активности РТР, поскольку в числе фосфорилирующихся по тирозину белков находятся АТФазы Р-типа, а также H^+ -АТФазы плазматических мембран клеток растений [24]. В лаборатории Ю.В. Балнокина (ИФР РАН) показано функционирование на плазматических мембранах *D. maritima* Na^+ -АТФазы Р-типа, выкачивающей Na^+ из клеток, что позволяет этой водоросли обитать в высокосоленой среде, сохраняя значительно ниже внутриклеточную концентрацию Na^+ по сравнению со средой [25]. Ими показано подавление активности Na^+ -АТФазы ванадатом (что, очевидно, связано с ингибированием активности РТР), что влечет повышение содержания внутриклеточного Na^+ , соответственно, вызывает солевой стресс. В нашей лаборатории показано, что солевой стресс вызывает повышение внутриклеточного содержания H_2O_2 , что приводит к подавлению активности РТР¹.

Вклад РТР в уровень тирозинового фосфорилирования белков также демонстрирует наш эксперимент с действием ингибитора каталазы аминотриазолом, который повышал уровень тирозинового фосфорилирования белков (рис. 1, з) в сравнении с контролем (рис. 1, б) в среднем в 1.5–3 раза (из 4 экспериментов). Этот эффект связан с повышением внутриклеточного содержания H_2O_2 , окисляющей существенные SH-группы РТР, ингибируя их активность¹.

К антиоксидантной системе клеток растений относятся низкомолекулярные соединения, среди которых выделяется аскорбиновая кислота, внутриклеточное содержание которой достигает 100 мМ [26]. Инкубация клеток *D. maritima* с 10 мМ аскорбата в среде роста в наших экспериментах вызывала *in vivo* за десять минут значительное (в 2 раза) уменьшение уровня тирозинового фосфорилирования белков (рис. 3, в; 4, в) по сравнению с контролем (рис. 3, б; 4, б), очевидно, благодаря ее антиоксидантной функции (связывание активных форм кислорода).

Классические методы 2D-гель-электрофореза не позволяют проводить детекцию фосфорилированных по тирозину белков со средним содержанием и минорных белков, таких как протеинкиназы, которые существуют в клетках в единичных копиях [27]. Возможно, поэтому в ранних исследованиях указывалось, что фосфотирозиновые белки в клетках позвоночных в оптимальных условиях составляют лишь 0.1% от всех фосфобелков [6, 28]. Если 30% белков эукариот фосфорилированы, по крайней мере, по одному аминокислотному остатку [29], то 10000 различных белков типичной эукариотической клетки со средней длиной из 400 аминокислот имеют 700000 потенциальных сайтов фосфорилирования для каждой протеинкиназы: из них (фосфорилированных сайтов) фосфорилируется по серину – 17%, по треонину – 5.7–8.5%, 3% по тирозину [30], что составляет для тирозинового фосфорилирования около 21000 сайтов.

Новейшие технологии позволили повысить определяемое число фосфотирозиновых белков и сайтов фосфорилирования по тирозину в единичных белках [29]. Было обнаружено в одном эксперименте до 64 уникальных сайтов в 32

¹ Петрова Н.В., Мухитов А.Р., Каримова Ф.Г. Редокс-регуляция тирозинового фосфорилирования белков в ответных реакциях растений на различные стрессы и соединения // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – принята в печать.

белках, только половина из них документирована в литературе. Эти данные указывают на существование большего числа фосфотирозиновых сайтов в белках [30], чем 0.1–0.5% [21]. Данные, полученные нами в экспериментах с иммуноцитохимической локализацией фосфотирозиновых белков с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, свидетельствуют о значительно большем числе фосфотирозиновых сайтов белков растений, что согласуется с данными литературы. Результаты экспериментов с ингибитором РТР ортованадатом указывают на сходство механизмов регуляции уровня тирозинового фосфорилирования белков клеток растений и позвоночных.

Summary

A.R. Mukhitov, N.V. Petrova, O.V. Vlasova, F.G. Karimova. The Confocal Laser Scanning Microscopy for Detection of Plant Tyrosine Phosphorylation.

A significant number of protein phosphotyrosine sites of the cells of *Pisum sativum* callus culture and the cells of marine halophyte green alga *Dunaliella maritima* was shown using the monoclonal primary antyphosphotyrosine antibodies PY20 and FITC-conjugated secondary antibodies by the confocal laser scanning microscopy. A high specificity (μM) of the binding of the antibodies used to protein phosphotyrosine sites in plants was detected. The protein tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate increased (in 10–12 times) in the number of plant protein phosphotyrosine sites. When treated *in vivo* during 10 min with antioxidant ascorbic acid and reducing agent DTT, the number of protein phosphotyrosine sites decreased 2-fold, whereas it increased 1.5–3-fold (in average from 4 experiments) under effect of the catalase inhibitor aminotriazol. The results obtained were discussed in view of the redox regulation of protein tyrosine phosphatases activity.

Key words: protein tyrosine phosphorylation, confocal laser scanning microscopy, pea, *Dunaliella maritima*.

Литература

1. *Cohen P.T.W.* Overview of the serine/threonine phosphatases // Signalling through Protein Phosphatases / Eds. Arino J., Alexander D.R., Hohmann, S. Heidelberg. – Springer-Verlag, 2004. – P. 1–20.
2. *Cohen P.* The origin of protein phosphorylation // Nature Cell Biol. – 2002. – V. 4, No 5. – P. E127–E130.
3. *Becraft P.W.* Receptor kinase signaling in plant development // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2002. – V. 18. – P. 163–192.
4. *Hunter T.* Signaling – 2000 and beyond // Cell. – 2000. – V. 100, No 1. – P. 113–127.
5. *Pawson T., Linding R.* Synthetic modular systems – reverse engineering of signal transduction // FEBS Lett. – 2005. – V. 579, No 8. – P. 1808–1814.
6. *Mann M., Ong S.E., Gronborg M. et al.* Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome // Trends in Biotechnol. – 2002. – V. 20, No 6. – P. 261–268.
7. *Ichimura K., Shinozaki K., Tena G. et al. (MAPK Group)* Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7, No 7. – P. 301–308.
8. *Rudrabhatla P., Rajasekharan R.* Mutational analysis of stress-responsive peanut dual specificity protein kinase: identification of tyrosine residues involved in regulation of protein kinase activity // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278, No 19. – P. 17328–17335.

9. Rudrabhatla P., Reddy M.M., Rajasekharan R. Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – V. 60, No 2. – P. 293–319.
10. Kerk D., Bulgrien J., Smith D.W. et al. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129, No 2. – P. 908–925.
11. Gupta R., Luan S. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 1149–1152.
12. Говорун В.М., Арчаков А.И. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, Вып. 10. – С. 1341–1359.
13. Gruhler A., Schulze W.X., Matthiesen R. et al. Stable isotope labeling of Arabidopsis thaliana cells and quantitative proteomics by mass spectrometry // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2005. – V. 4, No 11. – P. 1697–1709.
14. Nühse T.S., Bottrill A.R., Jones A.M.E., Peck S.C. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses // *The Plant J.* – 2007. – V. 51, No 5. – P. 931–940.
15. Абдуллаев А.А., Семенов В.Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Теод. и некоторые ее физиологические характеристики // *Физиол. раст.* – 1974. – Т. 21, № 6. – С. 1145–1153.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plantarum.* – 1962. – V. 15, No 3. – P. 474–497.
17. Каримова Ф.Г., Петрова Н.В. Влияние H₂O₂ на фосфорилирование по тирозину белков гороха // *Физиол. раст.* – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 365–372.
18. Pastory G.M., Foyer C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. – P. 460–468.
19. Monteiro H.P., Stern A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – V. 21, No 3. – P. 323–333.
20. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. – СПб.: Айю, 1998. – 245 с.
21. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling // *Cell.* – 1995. – V. 80, No 2. – P. 225–236.
22. Hulley P., Davison A. Regulation of tyrosine phosphorylation cascades by phosphatases: what the actions of vanadium teach us // *J. Trace Elem. Exp. Med.* – 2003. – V. 16, No 4. – P. 281–290.
23. Xu Q., Fu H.H., Gupta R., Luan S. Molecular characterization of a tyrosine specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in Arabidopsis // *Plant Cell.* – 1998. – V. 10, No 5. – P. 849–857.
24. Potikha T.S., Collins C.C., Johnson D.I. et al. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 119, No 3. – P. 849–858.
25. Popova L.G., Shumkova G.A., Andreev I.M., Balnokin Y.V. Functional identification of electrogenic Na⁺-translocating ATPase in the plasma membrane of the halotolerant microalga *Dunaliella maritima* // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579, No 22. – P. 5002–5006.
26. Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2000. – V. 3, No 3. – P. 229–235.

27. *Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y. et al.* Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2000. – V. 97, No 17. – P. 9390–9395.
28. *Cooper J.A., Sefton B.M., Hunter T.* Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins // *Methods Enzymol.* – 1983. – V. 99. – P. 387–402.
29. *Cohen P.* The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update // *Trends Biochem. Sci.* – 2000. – V. 25, No 12. – P. 596–601.
30. *Ubersax J.A., Ferrell J.E. Jr.* Mechanisms of specificity in protein phosphorylation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – V. 8, No 7. – P. 530–541.
31. *Brill L.M., Salomon A.R., Ficarro S.B. et al.* Robust phosphoproteomic profiling of tyrosine phosphorylation sites from human T cells using immobilized metal affinity chromatography and tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76, No 10. – P. 2763–2772.
32. *Salomon A.R., Ficarro S.B., Brill L.M. et al.* Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – V. 100, No 2. – P. 443–448.

Поступила в редакцию
14.12.07

Мухитов Александр Ринатович – кандидат биологических наук, научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: alexmukhitov@mail.ru

Петрова Наталья Валентиновна – младший научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: npetrova@mail.knc.ru

Власова Ольга Владимировна – младший научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: vov1985@mail.ru

Каримова Фатима Габдуллазяновна – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией сигнальных систем Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: karimova@mail.knc.ru