



УДК 577.113 : 577.152.313

ГЕНЫ Ser/Thr-ФОСФАТАЗ РАСТЕНИЙ: ДЕТЕКЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, РОДСТВЕННЫХ PPT/rdgC

© 1997 г. А. В. Андреева, К. Р. Хос, Д. Э. Эванс, Н. Беннетт*, М. А. Кутузов*^{***, #}

Университет Оксфорд-Брукс, Оксфорд, Великобритания;

*Лаборатория молекулярной и клеточной биофизики, URA CNRS № 520, Центр ядерных исследований в Гренобле, Франция;

**Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 08.10.96 г. Принята к печати 09.01.97 г.

С использованием ПЦР на геномной ДНК кукурузы идентифицирована неизвестная ранее последовательность, предположительно кодирующая фрагмент Ser/Thr-фосфатазы (обозначенной как PP6Zm), родственной фосфатазам PPT/rdgC. В результате скрининга банка данных dbEST с использованием частичной аминокислотной последовательности PP6Zm был обнаружен вероятный гомолог PP6Zm, продуцируемый у *Arabidopsis thaliana* (EMBL AT6726). Поиск в банке данных SwissProt показал, что частичная аминокислотная последовательность AT6726 обладает наибольшим сходством (54.3%) с фосфатазой rdgC *Drosophila melanogaster*. Мы нашли также, что фосфатаза кукурузы PP1Zm6, описанная ранее как изоформа PP1 (EMBO J. 1993. V. 12. P. 3497), является растительным гомологом фосфатазы PPT млекопитающих. Кроме того, в геноме кукурузы обнаружено 6 фрагментов новых (псевдо)генов, гомологичных генам фосфатаз, кодирующих изоформы PP1, PP2A и PPX. Показано наличие у кукурузы мультигенного семейства фосфатаз PP2A, известного ранее только для двудольных растений, а также мультигенного семейства PP1, обнаруженного ранее как у двудольных, так и у однодольных растений.

Ключевые слова: фосфорилирование белков, Ser/Thr-фосфатазы, ПЦР, кукуруза (*Zea mays*).

Одним из наиболее распространенных способов регуляции клеточных функций на посттрансляционном уровне является фосфорилирование белков. За последние годы наблюдался значительный прогресс в понимании структуры и функций белковых фосфатаз; было найдено, что фосфатазы не менее важны, чем киназы, и их активность также регулируется с помощью разнообразных механизмов (см. обзоры [1, 2]). Все эукариотические Ser/Thr-фосфатазы относятся к одному из двух классов, по-видимому, не родственных друг другу [1–3]. Один из этих классов включает фосфатазы, родственные фосфатазе PP2C животных [3], которые активны только в присутствии миллимолярных концентраций Mg^{2+} и устойчивы к ингибированию оокадаевой кислотой. Активность фосфатаз другого класса не зависит от концентрации Mg^{2+} и ингибируется (с различной аффинностью) оокадаевой кислотой. На основании сравнения аминокислотных последовательностей были выделены три подкласса фосфатаз, чувствительных к оокадаевой кислоте: PP1, PP2A и PP2B [1–3]. Позже был описан чет-

вертый подкласс [4–6], включающий в себя несколько новых фосфатаз: PP5/PPK, PPT и rdgC (для простоты в дальнейшем он будет обозначен как подкласс PPT/rdgC). У растений фосфатазы подклассов PP2B и PPT/rdgC обнаружены не были, тогда как фосфатазы, принадлежащие к подклассам PP1 и PP2A, представлены у растений большим числом изоформ, чем у животных и грибов [2, 7–10].

Наиболее распространенными подходами для поиска новых генов фосфатаз являются ПЦР на кДНК и/или скрининг библиотек кДНК. Эти подходы позволяют выявить экспрессирующиеся гены и оценить уровни их экспрессии в различных тканях [9]. Однако таким способом трудно детектировать гены с постоянно низким уровнем экспрессии либо экспрессирующиеся только в определенных тканях и/или на определенной стадии развития. Проблемы такого рода могут быть преодолены при постановке ПЦР на геномной ДНК а не на кДНК. Впервые подход с использованием геномной ДНК был применен Ченом с соавт. [11] для идентификации ряда новых фосфатаз, кодируемых в геномах дрожжей, дрозофилы и человека. Используя этот же подход, мы идентифицировали фрагменты новых (псевдо)генов фосфатаз в геноме кукурузы (*Zea mays*). Один из них, PP6Zm

Автор для переписки (BMC/DBMS, С.Е.А.-G, 17 av. des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France; тел.: (33) 476-88-53-02; факс: (33) 476-88-54-87).

по структуре отдаленно родствен генам известных фосфатаз и, вероятно, соответствует белку подкласса PPT/rdgC. Сравнение частичной аминокислотной последовательности PP6Zm с последовательностями банка данных dbEST выявило наличие вероятного гомолога этой фосфатазы у *Arabidopsis thaliana*. На основании сравнения аминокислотных последовательностей мы также относим к подклассу PPT/rdgC фосфатазу кукурузы PP1Zm6, описанную ранее как изоформа PP1 [9]. Насколько нам известно, это первое сообщение о существовании фосфатаз, родственных PPT/rdgC, у растений. Полученные результаты также свидетельствуют о существовании мультигенных семейств PP2A у однодольных растений.

Для постановки ПЦР на геномной ДНК кукурузы были использованы олигонуклеотиды, соответствующие двум высококонсервативным участкам структуры фосфатаз PP1/PP2A/PP2B-класса: V(I)TVCGDV(I)(L)HG и GDY(F)VDRGY(K) [4, 11]. Эти консервативные участки разделены более вариабельной последовательностью длиной 23 и 24 а. о. [4, 11]. Таким образом, ожидаемая длина полученных в результате ПЦР фрагментов генов фосфатаз, включая праймеры, составляет около 120 п. о. (при условии отсутствия интронов на этом участке). Продукты ПЦР разделяли элект-

рофорезом, полосу соответствующей длины элюировали из агарозы и клонировали в векторе рGEM-3Zf(-). Около 90% полученных клонов несли вставки ожидаемой длины. Секвенирование 45 таких клонов показало, что 42 из них содержали фрагменты генов фосфатаз, родственных следующим группам: 1) PPT/rdgC (1 клон, рис. 1); 2) PP2A (10 клонов, 3 изоформы; рис. 2а); 3) PPX (2 клон, 1 изоформа; рис. 2б); 4) PP1 (29 клонов, 4 изоформы; 1 псевдоген; рис. 3).

Геном кукурузы кодирует фосфатазы, родственные PPT/rdgC

Один из клонированных фрагментов (рис. 1, PP6Zm) не обладал ясно выраженной гомологией ни с одним из семейств генов белковых фосфатаз, ранее охарактеризованных у растений. Тем не менее очевидно, что этот клон кодирует фрагмент фосфатазы, поскольку большинство наиболее консервативных аминокислотных остатков, характерных для фосфатаз в этой районе, присутствуют в найденной последовательности (Gln¹, Asp⁴, Gly¹³, Phe²³). Наибольшее сходство (38% идентичных остатков) было найдено с фосфатазой rdgC – кальцийзависимой фосфатазой дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) [12], которая в

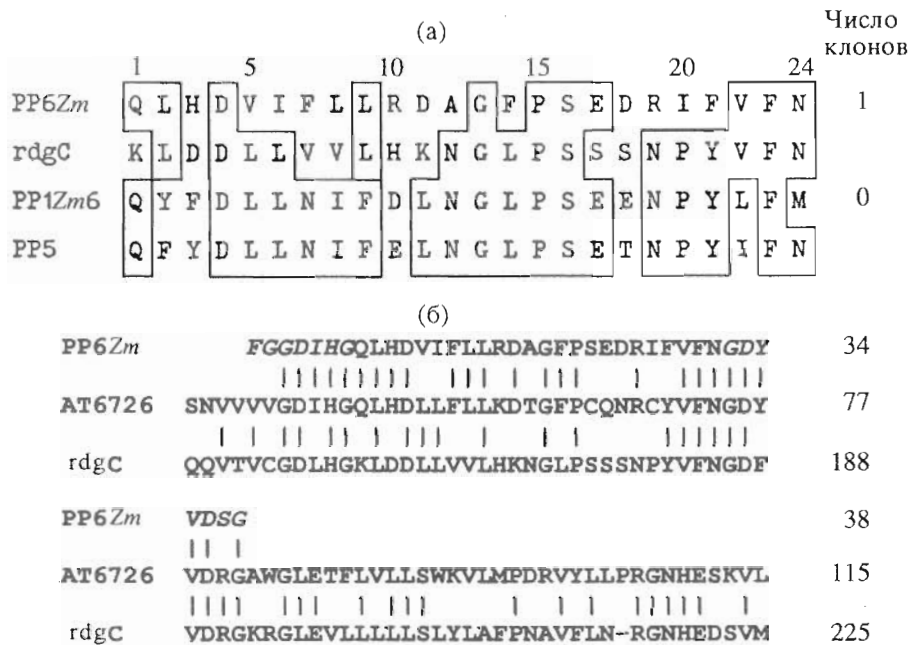


Рис. 1. Фосфатазы кукурузы подкласса PPT/rdgC. (а) – сравнение частичной аминокислотной последовательности новой фосфатазы кукурузы, обозначенной как PP6Zm, с последовательностями фосфатазы rdgC из *D. melanogaster* [12], PP1Zm6 кукурузы [9] и PP5 человека [6]. Показана аминокислотная последовательность, соответствующая нуклеотидной последовательности между двумя праймерами. Начало отсчета соответствует первому аминокислотному остатку, следующему за структурой праймера. Аминокислотные остатки, идентичные хотя бы для двух последовательностей, взяты в рамку. (б) – сравнение частичной аминокислотной последовательности AT6726 EMBL с последовательностью PP6Zm и с соответствующим участком rdgC из *D. melanogaster* [12]. Аминокислотные остатки последовательности AT6726, идентичные остаткам PP6Zm или rdgC, показаны вертикальными линиями. Аминокислотные остатки PP6Zm, соответствующие структуре праймеров, выделены курсивом.

свою очередь имеет высокое сходство (50% идентичных остатков) с фосфатазой кукурузы, описанной ранее как изоформа PP1 и обозначенной как PP1Zm6 [9] (рис. 1а). Сравнение PP1Zm6 с таблицей аминокислотных последовательностей фосфатаз, приведенной в работе Бартона с соавт. [4], выявило 75% идентичности с фосфатазой PP5(PPT) человека. Если принимать во внимание консервативные замены (F на Y, Y на F, E на D и I на L), сходство PP1Zm6 и PP5 достигает 92% (рис. 1). Столь высокая гомология аминокислотных последовательностей у таких отдаленно родственных видов, как кукуруза и человек, позволяет постулировать, что PP1Zm6 [9] является не изоформой PP1, а гомологом PP5 млекопитающих. Интересно, что фосфатаза PPT дрожжей, которую считают гомологом PP5 млекопитающих, только на 46% идентична в этом районе белку PP5 человека (последовательность приведена в работе [6]). Частичная аминокислотная последовательность PP6Zm имеет большее сходство с соответствующим районом белка rdcC, чем с PPT дрожжей или PP5 человека (38, 33 и 33% соответственно). Несмотря на относительно низкое общее содержание идентичных остатков, ряд структурных особенностей позволяет нам отнести фосфатазу PP6 к подклассу PPT/rdgC:

а) вставка одного аминокислотного остатка в позиции 20 (пролин в PP1Zm6, rdcC и PP5, треонин в PPT дрожжей и изолейцин в PP6);

б) наличие последовательности незаряженных остатков (позиции 5–9), которые либо полностью гидрофобны (rdgC и PP6Zm), либо содержат Asn в позиции 7 (PP5, PPT дрожжей и PP1Zm6); большинство других фосфатаз содержат в соответ-

ствующей позиции положительно или отрицательно заряженные остатки;

в) замена первого остатка глицина в паре G¹²G¹³, консервативной в большинстве последовательностей фосфатаз [4].

Скрининг банка данных dbEST с использованием частичной аминокислотной последовательности PP6Zm показал ее значительное сходство (62.5% без учета структуры праймеров) с аминокислотной последовательностью полипептида, кодируемого фрагментом кДНК (EMBL AT6726) из *Arabidopsis thaliana* (рис. 1б), что говорит о существовании вероятного гомолога PP6Zm у *A. thaliana*. Сравнение частичной аминокислотной последовательности AT6726 с последовательностями банка данных SwissProt показало, что AT6726 обладает наибольшим сходством (54.3%) с фосфатазой rdcC *D. melanogaster* (рис. 1б).

В отличие от фрагмента гена гипотетической фосфатазы PP6Zm, найденного в геномной ДНК, PP1Zm6 и AT6726 отвечают фрагментам кДНК, и, следовательно, можно утверждать, что соответствующие им гены экспрессируются.

Мультигенные семейства фосфатаз PP2A и PP1 кукурузы

На основании результатов анализа с помощью Саузерн-блоттинга был сделан вывод о существовании мультигенных семейств PP2A у двудольных растений, а именно у *A. thaliana* [7], гороха и рапса [13]. У *A. thaliana* Саузерн-блоттинг показывает наличие по крайней мере пяти изоформ PP2A [8]; гены четырех из них были клонированы [7, 8]. У кукурузы ранее был идентифицирован

	(а)													Число клонов										
	1	5	10	15	20	23																		
PP2AZm1	Q	F	H	D	L	M	K	L	F	A	T	G	G	H	V	R	E	T	N	Y	I	F	M	0
PP2AZm2	E	.	R	I	.	K	S	.	D	.	.	L	1
PP2AZm3	.	.	Y	.	.	I	E	.	R	I	.	.	D	S	.	D	.	.	L	3
PP2AZm4	.	.	Y	.	.	I	E	.	R	I	.	.	D	A	.	D	.	.	L	6
	(б)																							
	1	5	10	15	20	23																		
PPXZm	Q	F	Y	E	M	K	E	L	F	K	V	G	G	D	S	P	K	T	N	Y	L	F	L	2
PPX1At	.	.	.	D	.	M	
PPX2At	.	.	.	D	

Рис. 2. Фосфатазы кукурузы, родственные PP2A. (а) – мультигенное семейство фосфатаз PP2A. Ранее описанная изоформа [9] обозначена как PP2AZm1. Аминокислотные остатки новых изоформ (PP2AZm2–4), идентичные соответствующим остаткам PP2AZm1, отмечены точками. Указано число клонов, несущих соответствующие амплифицированные фрагменты геномной ДНК. (б) – сравнение частичной аминокислотной последовательности фосфатазы PPX кукурузы (PPXZm) с соответствующими районами двух изоформ PPX (PPX1At и PPX2At) из *A. thaliana* [14]. Аминокислотные остатки, идентичные соответствующим остаткам PPXZm, обозначены точками.

только один ген фосфатазы PP2A [9]. Мы идентифицировали три новые изоформы PP2A (рис. 2а, PP2AZm2-4), что впервые прямо показывает существование мультигенных семейств PP2A у однодольных растений. Интересно, что частичная аминокислотная последовательность PP2AZm2 полностью совпадает с соответствующим районом PP2A млекопитающих и дрозофилы.

Два гомолога PPX-фосфатаз, наиболее структурно близких к PP2A, но классифицируемых как отдельное семейство внутри PP2A-подкласса [4-6], были клонированы у *A. thaliana* [14]. Мы также обнаружили один фрагмент гена фосфатаз PPX в геноме кукурузы, высокоомологичный (91%) геном обеих изоформ *A. thaliana* (рис. 2б).

Мультигенное семейство фосфатаз PP1 кукурузы было ранее охарактеризовано с помощью ПЦР на кДНК, приготовленной из листьев и корней [9]. Было найдено 6 изоформ PP1, структура одной из них (PP1Zm1) совпадала с соответствующим участком известной полной первичной структуры PP1 кукурузы [15]. Эта изоформа является преобладающей как в листьях, так и в корнях [9]. Три из четырех изоформ PP1 кукурузы, найденных в настоящей работе, совпадают с изоформами, описанными в работе [9]: PP1Zm1, PP1Zm2 и PP1Zm4 (рис. 3). Мы также обнаружили вероятный псевдоген фосфатазы PP1Zm1 с делецией 5 п. о., начиная с 1-й позиции кодона Phe²² (данные не приведены).

В отличие от семейства PP2A только одна новая изоформа PP1 была идентифицирована в данной работе (рис. 3; используя систему обозначений работы [9], мы называем эту изоформу PP1Zm7). Вероятно, это говорит о том, что большинство изоформ PP1 кукурузы уже найдено. Восемь изоформ PP1 было проклонировано у *A. thaliana* [2]. Было бы интересно выяснить, консервативно ли число изоформ PP1 у однодольных и двудольных.

Таким образом, в настоящей работе идентифицировано 6 новых генов Ser/Thr-фосфатаз в геноме кукурузы (хотя принадлежность найденных фрагментов псевдогенам полностью исключить пока нельзя). Фосфатаза, кодируемая одним из них (PP6Zm), отнесена нами к PPT/rdgC-подклассу [9], не идентифицированному ранее у растений. Кроме того, другая фосфатаза кукурузы, PP1Zm6, ранее идентифицированная как изоформа PP1, вероятно, является растительным гомологом фосфатаз PP5/PPT/PPK млекопитающих [5, 6, 16].

Обнаружение растительных фосфатаз, родственных фосфатазам PPT/rdgC, весьма неожиданно. Этот подкласс представляет собой обособленную группу, только отдаленно родственную фосфатазам подклассов PP1, PP2A и PP2B [4, 5], и включает кальцийзависимую фосфатазу rdgC, обнаруженную до сих пор только у *D. melanogaster* [12], и фосфатазы млекопитающих и дрожжей, содержащие тетратрикопептидные повторы и обозначаемые как PPT [5], PP5 [6] или PPK [16]. Единственной известной функцией белка rdgC является кальцийзависимое дефосфорилирование родопсина [17]. Сходная фосфатазная активность была обнаружена в фоторецепторных клетках быка [18], однако соответствующие гены позвоночных не идентифицированы. Фосфатаза PP5 у человека была обнаружена в ядре [6]; ее функция неясна. Предполагают, что гомолог PP5 у крысы принимает участие в дефосфорилировании рецептора натрийуретического фактора [16]. Выключение гена фосфатазы дрожжей (PPT), также содержащей тетратрикопептидные повторы и, вероятно, представляющей собой гомолог PP5/PPT/PPK млекопитающих, не является летальным [6]. Единственное следствие делеции этого гена – незначительное уменьшение чувствительности к α-феромону [6]. В обоих этих процессах (фоторецепция у животных [19] и передача сигнала от рецептора α-феромона у дрожжей

	1	5	10	15	20	23	Число клонов
PP1Zm1	Q	Y S D L L R L F D Y G G Y P P Q A N Y L F L					4
PP1Zm2	.	.	.	E	.	D	15
PP1Zm3	.	.	.	E	.	F . E S	0
PP1Zm4	.	F	.	E	.	L . T	7
PP1Zm5	.	F E	.	.	.	L T S T . I . .	0
PP1Zm7	.	.	.	E	.	F . E	2

Рис. 3. Новая (PP1Zm7) и ранее идентифицированные (PP1Zm1-5 [9]) изоформы PP1 кукурузы. Аминокислотные остатки, идентичные соответствующим остаткам PP1Zm1, обозначены точками. Указано число клонов, несущих соответствующие амплифицированные фрагменты геномной ДНК. PP1Zm6 [9] не включена в рисунок (см. текст и рис. 1).

[20]) принимают участие G-белки и G-белокзависимые рецепторы. Более того, недавно было высказано предположение, что рецептор натрийуретического фактора также функционально связан с G-белками [21].

Таким образом, представляется вероятным, что фосфатазы, родственные PPT/rdgC, могут принимать участие в процессах передачи сигнала, включающих G-белки. Очевидно, что для определения их функций необходимо иметь больше структурной информации о растительных фосфатазах этого подкласса. Нами ведется работа по получению полноразмерных генов фосфатаз растений, родственных PPT/rdgC. Особый интерес представляла бы идентификация регуляторных участков этих фосфатаз.

Фосфатаза PP5 человека высокочувствительна к ооадаевой кислоте с аффинностью, промежуточной между обнаруженными для фосфатаз PP2A и PP1 [6]. Существование растительного гомолога PP5 указывает на то, что приписывать различные физиологические функции белкам PP2A или PP1 в растительной клетке на основании чувствительности к ооадаевой кислоте следует с большой осторожностью.

Активность и, по крайней мере в некоторых случаях, специфичность к субстрату фосфатаз семейства PP1 и PP2A могут регулироваться путем ассоциации каталитической и регуляторных субъединиц [2, 22]. В связи с этим идентификация мультигенных семейств PP1 и PP2A как у двудольных [7, 10, 13], так и у однодольных растений [9, данная работа] представляет значительный интерес, так как присутствие многочисленных изоформ каталитических субъединиц может увеличивать число возможных комбинаций с регуляторными субъединицами. Это могло бы привести к образованию огромного числа фосфатаз с различными свойствами, включая специфичность к субстратам. В то время как у животных несколько семейств регуляторных субъединиц PP1 и PP2A было идентифицировано и функционально охарактеризовано [2, 22, 23], об их аналогах у растений известно очень мало. Клонирование генов регуляторных субъединиц фосфатаз PP2A растений было опубликовано совсем недавно [13, 24, 25], а для PP1 они еще не идентифицированы.

У всех изученных эукариот (кроме растений) фосфатазы PP2A и PP1 представлены несколькими изоформами (1–2 и до 4 соответственно, см. [8] и ссылки в этой работе). Почему растения нуждаются в большем числе генов каталитических субъединиц фосфатаз PP2A и PP1 по сравнению с другими эукариотами? У животных функция этих фосфатаз не ограничена ни определенными аспектами физиологии клетки, ни определенными клеточными компартментами. В зависимости от того, какие регуляторные субъединицы входят в их состав, эти фосфатазы способны принимать

участие в самых разнообразных процессах. Следовательно, можно предположить, что функции "избыточных" изоформ у растений могут иметь отношение к тем аспектам физиологии клетки, которые специфичны для растений. Два таких аспекта – это фотосинтез и наличие растительной клеточной стенки. Существует по крайней мере одно сообщение, свидетельствующее о том, что фосфатаза PP1 может участвовать в светоиндуцированной активации экспрессии фотосинтетических генов [9]. Аппарат Гольджи растительной клетки, в котором синтезируются многочисленные компоненты клеточной стенки, во многих отношениях отличается от такового у животных [26], и потенциально в его работе также могут принимать участие дополнительные фосфатазы. Было показано, что в животных клетках выключение фосфатазы PP2A приводит к нарушениям внутриклеточного мембранного транспорта [27]. Очевидно, что для понимания роли множественности изоформ Ser/Thr-фосфатаз в растительной клетке необходимы дальнейшие исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотидные праймеры, содержащие сайты *EcoRI* (выделены курсивом) GCGAATTC-TIACIGTITGT(C)GGIGAT(C)ITICAT(C)GG и GCGAATTCTA(T)ICCCG(T)A(G)TCAACA(G)A(T)-AA(G)TCICCC, были синтезированы Ж.-Б. Исартелем (Отдел молекулярной и структурной биологии, Центр ядерных исследований в Гренобле, Франция) и соответствовали двум высококонсервативным участкам структуры фосфатаз PP1/PP2A/PP2B-класса: V(I)TVCGDV(I)(L)HG и GDY(F)VDRGY(K) [11]. ПЦР на геномной ДНК кукурузы (Clontech) проводили по следующей программе: 3 мин при 94°C, затем 35 циклов (1 мин при 51°C, 1 мин при 72°C, 1 мин при 94°C), затем 10 мин при 72°C в 50 мкл раствора, содержащего 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP, 10 mM трис-HCl, pH 8.3 (20°C), 1 мкг геномной ДНК, два праймера (1 мкМ каждый) и 1 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле; полосу, соответствующую длине ~120 п. о., вырезали, обрабатывали *EcoRI* и клонировали в векторе pGEM-3Zf(-) (Promega). Секвенирование двухцепочечной ДНК проводили по обоим целям.

Полученные последовательности сравнивали с банками SwissProt и dbEST, используя алгоритм FASTA (программное обеспечение European Bioinformatics Institute на Internet). Для скрининга использовали аминокислотные последовательности, соответствующие участкам между праймерами.

Частично материалы данной работы представлены на ежегодной конференции Британского общества экспериментальной биологии (Кантербери, Великобритания, 1997) и на конгрессе ЕСВО (Брайтон, Великобритания, 1997).

Работа финансировалась Университетом Оксфорд-Брукс (А.В. Андреева, К.Р. Хос), Королевским обществом (Д.Э. Эванс, грант "University Research Fellowship" с 1983 г.), CNRS (Н. Беннетт) и Комиссариатом по атомной энергии Франции (М.А. Кутузов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wera S., Hemmings B.A. // *Biochem. J.* 1995. V. 311. P. 17–29.
2. Smith R.D., Walker J.C. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 101–125.
3. Cohen P., Cohen P.T.W. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 21435–21438.
4. Barton G.J., Cohen P.T.W., Barford D. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 220. P. 225–237.
5. Becker W., Kentrup H., Klumpp S., Schultz J.E., Joost H.G. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 22586–22592.
6. Chen M.X., McPartin A.E., Brown L., Chen Y.H., Barker H.M., Cohen P.T.W. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 4278–4290.
7. Ariño J., Pérez-Callejón E., Cunillera N., Camps M., Posas F., Ferrer A. // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. P. 475–485.
8. Casamajor A., Pérez-Callejón E., Pujol G., Ariño J., Ferrer A. // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 26. P. 523–528.
9. Sheen J. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 3497–3505.
10. Smith R.D., Walker J.C. // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. P. 307–316.
11. Chen M.X., Chen Y.H., Cohen P.T.W. // *FEBS Lett.* 1992. V. 306. P. 54–58.
12. Steele F.R., Washburn T., Rieger R., O'Tousa J.E. // *Cell.* 1992. V. 59. P. 669–676.
13. Evans I.M., Fawcett T., Boulter D., Fordham-Skelton A.P. // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 24. P. 689–695.
14. Pérez-Callejón E., Casamajor A., Pujol G., Clua E., Ferrer A., Ariño J. // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 23. P. 1177–1185.
15. Smith R.D., Walker J.C. // *Plant Physiol.* 1991. V. 97. P. 677–683.
16. Chinkers M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 11075–11079.
17. Byk T., Bar-Yaacov M., Doza Y.N., Minke B., Selinger Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 1907–1911.
18. Kutuzov M.A., Bennett N. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 238. P. 613–622.
19. Yarfitz S., Hurley J.B. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14329–14332.
20. Kurjan J. // *Annu. Rev. Genetics.* 1993. V. 27. P. 147–179.
21. Khurana M.L., Pandey K.N. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 316. P. 392–398.
22. Hubbard M.J., Cohen P. // *Trends Biochem. Sci.* 1993. V. 18. P. 172–177.
23. McCright B., Virshup D.M. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 26123–26128.
24. Rundle S.J., Hartung A.J., Corum J.W. III., O'Neill M. // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 28. P. 257–266.
25. Slabas A.R., Fordham-Skelton A.P., Fletcher D., Martinez-Rivas J.M., Swinhoe R., Croy R.R.D., Evans I.M. // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 26. P. 1125–1138.
26. Driouich A., Faye L., Staehelin L.A. // *Trends Biochem. Sci.* 1993. V. 18. P. 210–214.
27. Davidson H.W., McGowan C.H., Balch W.E. // *J. Cell Biol.* 1992. V. 116. P. 1343–1355.

Genes of Ser/Thr Protein Phosphatases of Plants: Detection of Sequences Related to PPT/rdgC

A. V. Andreeva*, C. R. Hawes*, D. E. Evans*, N. Bennet**, and M. A. Kutuzov**, ***

*School of Biological and Molecular Sciences, Oxford Brookes University, Oxford, UK

**Laboratoire de Biophysique Moléculaire & Cellulaire, URA CNRS 520,
Département de Biologie Moléculaire et Structurale, Commissariat à l'Énergie Atomique, Grenoble, France

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,
Moscow, GSP-7, 117871 Russia

Received October 8, 1996; in final form, January 9, 1997

Abstract—An unknown sequence that may encode a fragment of the Ser/Thr protein phosphatase (designated PP6Zm) related to PPT/rdgC phosphatases was identified using PCR on maize genomic DNA. A dbEST search using a partial amino acid sequence of PP6Zm revealed a putative homolog of PP6Zm expressed in *Arabidopsis thaliana* (EMBL AT6726). A search of the SwissProt database indicated that the partial amino acid sequence of AT6726 has the highest identity (54.3%) to the rdgC phosphatase from *Drosophila melanogaster*. The maize phosphatase PPLZm6, described previously as a PPT isoform (EMBO J., 1993, vol. 12, p. 3497), was found by us to be a plant homolog of mammalian PPT. In addition, six fragments of new (pseudo)genetic homologous to the phosphatase genes encoding PPI, PP2A, and PPX isoforms were detected in the maize genome. The existence in maize of a multigene PP2A family, reported only for dicotyledons, and of a PPI multigene family, found earlier in both di- and monocotyledons, was shown.

Key words: protein phosphorylation, Ser/Thr protein phosphatases, polymerase chain reaction, *Zea mays*.