

НОВОЖИЛОВ Д.О.✉, **КАРПОВ П.А.**, **РАЄВСЬКИЙ А.В.**, **ОЖЕРЕДОВ С.П.**, **БЛЮМ Я.Б.**

Інститут харчової біології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, Осиповського, 2А, e-mail: novozhylovd@gmail.com

✉ novozhylovd@gmail.com

Ca²⁺- ТА Ca²⁺-КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНІ ПРОТЕЇНКІНАЗИ – ПОТЕНЦІЙНІ РЕГУЛЯТОРИ СТРУКТУРИ І ФУНКЦІЙ МІКРОТРУБОЧОК У РОСЛИН

Як головні білки мікротрубочок, що відіграють визначальну роль у поділі клітин та залучені до росту і розвитку клітин та внутрішньоклітинного транспорту, α -, β - і γ -тубуліни є важливими субстратами посттрансляційних модифікацій [1–4]. Однією з таких модифікацій є фосфорилування тубуліну [5], проте конкретні докази регуляторних наслідків цієї посттрансляційної модифікації експериментально досліджені переважно для протеїнкіназ тварин [6, 7]. Це, зокрема, стосується і ролі Ca²⁺-залежних протеїнкіназ у регулюванні рослинного цитоскелету.

У рослин існує принаймні п'ять класів Ca²⁺-залежних протеїнкіназ, об'єднаних у суперродину CDPK-SnRK, для молекулярної структури яких характерна наявність доменів, здатних зв'язувати іони Ca²⁺ (так звані «EF-hands»), або здатність утворювати комплекси з білками, що мають домени «EF-hands» [8]. Загалом суперродина протеїнкіназ CDPK-SnRK об'єднує сім типів серин/треонінових протеїнкіназ: Ca²⁺-залежні протеїнкінази (CDPKs), CDPK-зв'язані кінази (CRKs), фосфоенолпіруват-карбоксилазні кінази (PPCKs), ФЕП-карбоксилаза-залежні кінази (PEPRKs), кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaMKs), Ca²⁺-кальмодулін-залежні протеїнкінази (CCaMKs), а також SNF1-подібні протеїнкінази (SnRKs) [9, 10].

Найбільша кількість доказів зв'язку з цитоскелетом накопичена для кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини, які представляють собою чисельну групу філогенетично пов'язаних ферментів. Значна частина цих протеїнкіназ бере участь в регуляції цитоскелету: CaMK2, MLCK, AMPK, BRSK, CHEK, DAPK, LKB1, MARK, PKD, RSK, DCLK1, TRIO, калірин та тітин [11, 12]. Однією з найбільш вивчених тваринних протеїнкіназ із погляду впливу на цитоскелет є протеїнкіназа CaMK2, для якої здатність фосфорилувати мікротрубочки підтверджена експериментально [11, 12]. Відомо, що протеїнкіназа CaMK2 γ регулює динаміку

мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок кінезину MCAK [13]. Також тваринні протеїнкінази CaMK2 беруть участь і в регуляції актинового цитоскелету [14]. Протеїнкінази CaMK2 можуть безпосередньо зв'язуватися з актином та регулювати динаміку та структуру мікрофіламентів шляхом фосфорилування чи зв'язування ряду білків, зокрема таких, як активатори і супресори кофіліну (регулятора деполімеризації актину) [15, 16]. Функції протеїнкіназ CaMK2 значно відрізняються залежно від ізоформи. Так, протеїнкіназа CaMK2 β мишей може безпосередньо зв'язуватися з F-актином та рекрутує до цього протеїнкіназу CaMK2 α [17]. Протеїнкіназа CaMK2 та кальцинейрин формують систему регуляції активності кофіліну за рахунок пригнічення активності активатора кофіліну SSH1L та регуляції його локалізації. Протеїнкіназа CaMK2 зв'язує SSH1L у комплексі з 14-3-3 білками, фосфорилує його за залишками Ser937 та Ser978. CaMK2 також фосфорилує супресор кофіліну LIMK1 за залишком Thr508 [15]. Ізоформа CaMK2 δ асоціюється та водночас регулює активний і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів мишей [18]. Також відомо, що протеїнкінази CaMK2 здатні фосфорилувати білки, асоційовані з мікротрубочками, зокрема MAP6, який бере участь у стабілізації мікротрубочок [11].

Незважаючи на численні докази зв'язку CaMK2 з цитоскелетом тварин, роль їх гомологів у регуляції мікротрубочок рослин досі залишається нез'ясованою. Враховуючи консервативність тубулінів і певну гомологію Ca²⁺-залежних протеїнкіназ тварин і вищих рослин [19], існують підстави для припущення наявності гомологічних сайтів фосфорилування в молекулах тубуліну рослинного походження. Тому завданням цього дослідження було визначення потенційних сайтів фосфорилування рослинних тубулінів Ca²⁺- та Ca²⁺-кальмодулін-залежними

© НОВОЖИЛОВ Д.О., КАРПОВ П.А., РАЄВСЬКИЙ А.В., ОЖЕРЕДОВ С.П., БЛЮМ Я.Б.

протеїнкіназами за допомогою методів профільного аналізу і структурної біоінформатики.

Матеріали і методи

Послідовності α -, β - та γ -тубулінів, а також компонентів γ -тубулінових комплексів 2 (GCP2/SPC97) та 3 (GCP3/SPC98) із *Arabidopsis thaliana* були відібрані з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org/) [20]. Визначення потенційних сайтів фосфорилування, які співпадають з профілями тваринних CaMK2, було виконане за допомогою сервісу KinasePhos 2.0 (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>) [20]. Визначення доступних для фосфорилування амінокислотних залишків здійснювали на підставі їх розташування на поверхні структурних моделей тубулінових комплексів. Для 3D-моделювання були використані шаблонні дані рентгеноструктурного аналізу з RCSB Protein Data Bank, відібрані за допомогою PDB-BLAST (www.rcsb.org). Гомологічне моделювання молекул тубуліну здійснювали за допомогою програми Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [22]. Повноатомні структурні моделі білків також були побудовані за допомогою сервісу I-Tasser (<http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>) [23]. Заключна збірка повноатомних моделей білків була виконана з використанням програми EasyModeller 4.0 [24].

Реконструкцію структур компонентів γ -тубулінових комплексів 2 (GCP2/SPC97) та 3 (GCP3/SPC98) проводили шляхом моделювання за гомологією (I-Tasser) і *ab initio* [23]. Деякі петлі, відсутні у кристалічних структурах, були побудовані з використанням сервісу SuperLooper [25]. Збірку макромолекулярних комплексів здійснювали шляхом білок-білкового докінгу за допомогою програми HADDOCK [26]. Первинну перевірку побудованих комплексів виконували з використанням криоелектронно-мікроскопічних карт комплексу γ TuSC із *Saccharomyces cerevisiae*. Також було використано результати крио-ЕМ мікроскопії і 3D-моделі GCPs/ γ -тубулінових комплексів, наданих Kollman Lab (<http://faculty.washington.edu/jkoll/>) [27–29].

Релаксацію структур побудованих моделей здійснювали шляхом короткочасної молекулярної динаміки (10 нс) в силовому полі G53a6 за допомогою програмного пакету GROMACS 4.5.3 (www.gromacs.org) та верифікували на підставі показників RMSD, розрахунків енергії та критеріїв якості білкових струк-

тур [30]. Стабільність 3D-моделей перевіряли за допомогою методу молекулярної динаміки в програмі GROMACS з використанням повноатомного силового поля charmm27 та водної моделі SPC [31]. Якість отриманих моделей перевіряли за допомогою сервісів MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) та QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) [32, 33].

Усі симуляції молекулярної динаміки здійснювали у віртуальній організації CSLabGrid за допомогою обчислювального кластеру Інституту (<http://grid.ifbg.org.ua/ganglia/>) Українського національного гріду (<http://ung.in.ua/>) [34]. Візуалізацію 3D структур та їх аналіз виконували за допомогою програмних пакетів PyMol 1.5 та UCSF Chimera 1.8 (www.pymol.org; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) [35].

Результати та обговорення

На основі порівняння з прихованими моделями Маркова (HMM-профілі) сайтів фосфорилування, специфічних для тваринних протеїнкіназ CaMK2 (за допомогою програми KinasePhos 2.0), було здійснено відбір можливих сайтів Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ у складі усіх відомих ізотипів α -, β - і γ -тубуліну з *A. thaliana*. Результати профільного пошуку свідчать про наявність імовірних сайтів фосфорилування у складі різних ізотипів β - та γ -тубуліну. На відміну від β - і γ -тубулінів, у послідовностях α -тубуліну консенсусні сайти фосфорилування не були знайдені.

Із метою визначення залишків серину та треоніну, доступних для фосфорилування, було перевірено положення потенційних сайтів для Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ із використанням побудованого фрагмента протофіламенту ($\alpha/\beta/\alpha/\beta$), а також моделі фрагмента центру первинної нуклеації мікротрубочок (фрагмент із трьох мономерів γ TuSC) з *A. thaliana*. На підставі результатів аналізу розташування потенційних сайтів для Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ на поверхні молекул тубулінів було виключено залишки, що, згідно з їх топологією, що не можуть бути доступними для ферментів. За результатами профільного пошуку і їх екстраполяції на побудовані моделі рослинних γ -тубулінових комплексів (γ TuSC) було відібрано 4 доступних сайти на поверхні TBG1/TUBG1 і TBG2/TUBG2: Ser259 та Ser321 (рис. 1) і Ser32 та Ser376 (рис. 2). Усі 4 сайти виявилися консервативними для обох ізотипів γ -тубулінів арабідопсису. Також була

підтверджена їх консервативність при порівнянні послідовностей γ -тубулінів людини та арабідопсису, що дозволяє припустити схожість

функціонального навантаження на ці сайти у рослинних і тваринних γ -тубулінів.

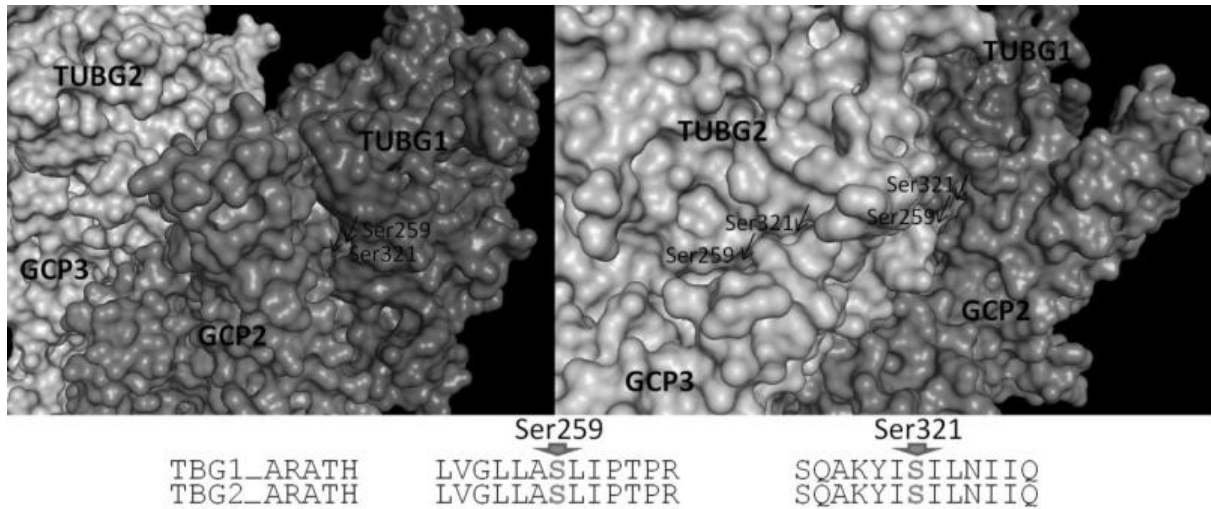


Рис. 1. 3D-модель малого γ -тубулінового комплексу γ TuSC з *A. thaliana*. Показана топологія потенційних сайтів фосфорилування γ -тубулінів (TUBG1 і TUBG2) за залишками Ser259 і Ser321 (позначено жовтим кольором), що відповідають канонічному профілю протеїнкіназ CaMK2.

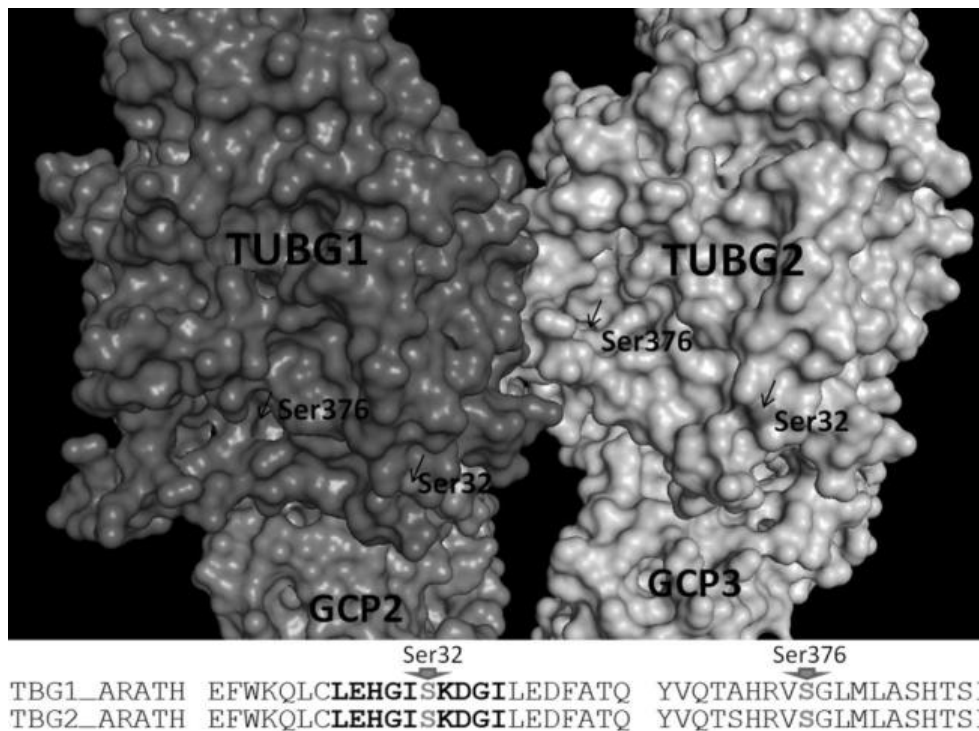


Рис. 2. 3D-модель малого γ -тубулінового комплексу з *A. thaliana*. Стрілками позначені залишки Ser32 і Ser376 – потенційні сайти фосфорилування γ -тубулінів Ca^{2+} - та кальмодулін-залежними протеїнкіназами.

Розташування потенційних сайтів фосфорилування поруч із контактними поверхнями молекул гетеротетрамерного комплексу γ TuSC дозволяє також зробити припущення стосовно

можливого впливу фосфорилування у цих положеннях для збирання і розбирання центрів первинної нуклеації мікротрубочок у рослин. Так, Ser259 і Ser321 розташовані безпосередньо

біля контактів TUBG1 і TUBG2 з білками Spc98 і Spc97 відповідно. У той самий час залишки Ser32 та Ser376 знаходяться у місцях можливих контактів γ -тубулінів суміжних мономерів γ TuSC, тобто модифікації у цих положеннях можуть впливати на об'єднання мономерів у кільце центру первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuRC).

У ході аналізу можливих сайтів для Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ на пове-

рхні α -/ β -тубулінового димера залишок Thr312 β -тубуліну також було ідентифіковано як потенційний сайт специфічного фосфорилювання (рис. 3). На просторовій структурі димера α - і β -тубуліна видно, що цей залишок знаходиться у зоні контакту субодиниць α - і β -тубуліну. Це може бути свідченням того, що цей потенційний сайт фосфорилювання важливий для утворення тубулінового димера.

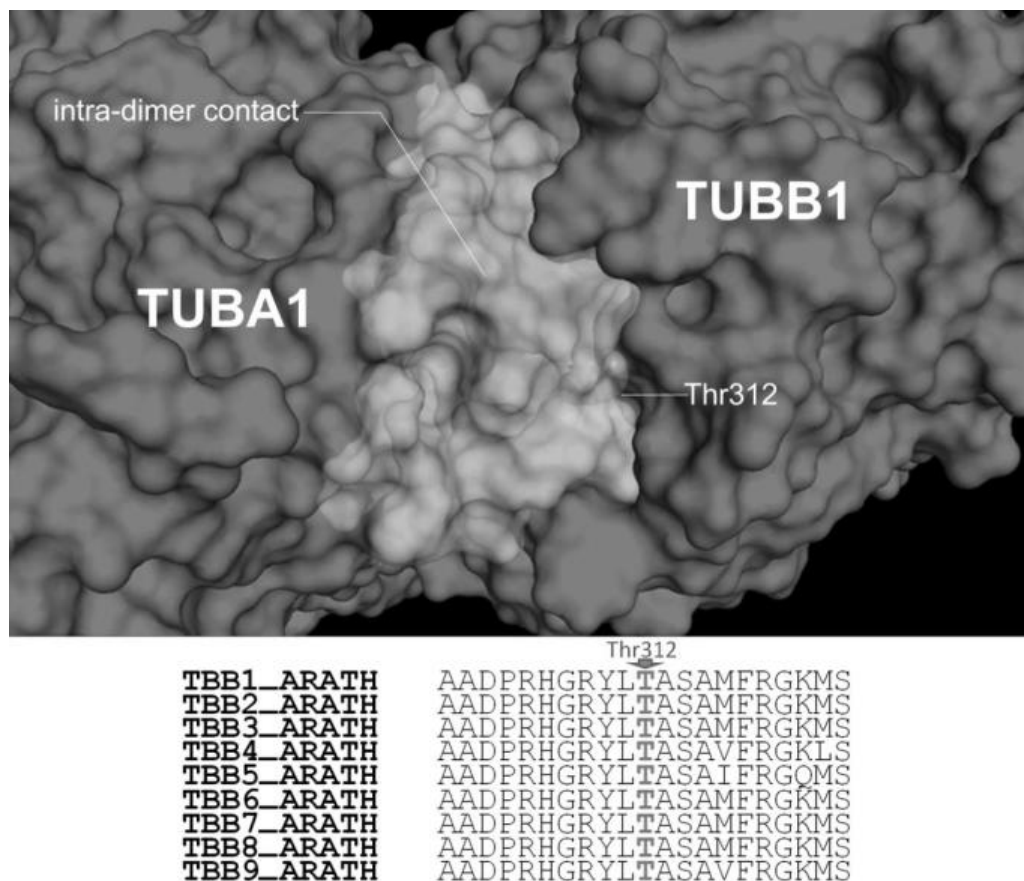


Рис. 3. Потенційний сайт фосфорилювання Thr312 на 3D-моделі димера β -тубуліну з *A. thaliana*. Світліша зона позначає область інтрадимерного контакту.

Висновки

Встановлено існування на поверхні усіх ізотипів β - і γ -тубулінів *A. thaliana* потенційних сайтів, що відповідають консервативним профілям для фосфорилювання за участю Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ 2 (CaMK2), – це амінокислотні залишки Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376 для обох ізотипів γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) і залишок Thr312, консервативний у всіх ізотипів β -тубуліну (TBB1-TBB9). Враховуючи розташування визначених амінокис-

лотних залишків, можна припустити участь Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ у регуляції структурно-динамічних властивостей мікротрубочок рослин. Очевидно, що фосфорилювання амінокислотних залишків у цих положеннях може мати значний вплив як на формування α / β -тубулінового димера і формування центрів первинної нуклеації мікротрубочок, так і на їх динамічні характеристики.

Література

1. Wloga D., Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules // *J. Cell Sci.* – 2010. – V. 123. – P. 3447–3455.
2. Janke C., Kneussel M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton // *Trends Neurosci.* – 2010. – V. 33. – P. 362–372.
3. Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell mechanics and the cytoskeleton // *Nature.* – 2010. – V. 463, N 7280. – P. 485–492.
4. Hammond J., Cai D., Verhey K.J. Tubulin modifications and their cellular functions // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2008. – V. 20. – P. 71–76.
5. Yemets A.I., Lloyd C., Bulmer Ya.B. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression // *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology* / Ed. Bulmer Ya.B. et al. – Netherlands: Springer, 2008. – P. 145–159.
6. Karpov P.A., Nadezhdina E.S., Yemets A.I., Matusov V.G., Nyporko A.Yu., Shashina N.Yu., Blume Ya.B. Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases // *BMC Genomics.* – 2010. – V. 11, 1. – S 14. – doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.
7. Paganelli L., Caillaud M.C., Quentin M., Damiani I., Govetto B., Lecomte P., Karpov P.A., Abad P., Chabouté M.E., Favery B. Three BUB1 and BUBR1/MAD3-related spindle assembly checkpoint proteins are required for accurate mitosis in Arabidopsis // *New Phytol.* – 2015. – V. 205, N 1. – P. 202–215.
8. Harmon A.C. Calcium-regulated protein kinases of plants // *Gravitat. Space Biol. Bulletin.* – 2003. – V. 16, N 2. – P. 83–90.
9. Hrabak E.M., Chan C.W., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.G., Sussman M.R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.K., Harmon A.C. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132. – P. 666–680.
10. Jaworski K., Szmidi-Jaworska A., Kopcewicz J. Plant protein kinases stimulated by calcium // *Postepy Biochem.* – 2005. – V. 51, N 2. – P. 188–197.
11. Baratier J., Peris L., Brocard J., Gory-Fauré S., Dufour F., Bosc C., Fourest-Lieuvain A., Blanchoin L., Salin P., Job D., Andrieux A. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase I // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281, N 28. – P. 19561–19569.
12. Wandosell F., Serrano L., Hernández M.A., Avila J. Phosphorylation of tubulin by a calmodulin-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261, N 22. – P. 10332–10339.
13. Holmfeldt P., Zhang X., Stenmark S., Walczak C.E., Gullberg M. CaMKIIγ-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation // *EMBO J.* – 2005. – V. 24, N 6. – P. 1255–1266.
14. Hoffman L., Farley M.M., Waxham M.N. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II isoforms differentially impact the dynamics and structure of the actin cytoskeleton // *Biochemistry.* – 2013. – V. 52, N 7. – P. 1198–1207.
15. Zhao J.W., Gao Z.L., Ji Q.Y., Wang H., Zhang H.Y., Yang Y.D., Xing F.J., Meng L.J., Wang Y. Regulation of cofilin activity by CaMKII and calcineurin // *Am. J. Med. Sci.* – 2012. – V. 344, N 6. – P. 462–472.
16. Robison A.J., Bass M.A., Jiao Y., MacMillan L.B., Carmody L.C., Bartlett R.K., Colbran R.J. Multivalent interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic density proteins NR2B, densin-180, and alpha-actinin-2 // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, N 42. – P. 35329–35336.
17. Shen K., Teruel M.N., Subramanian K., Meyer T. CaMKIIβ functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIα/β heterooligomers to dendritic spines // *Neuron.* – 1998. – V. 21, N 3. – P. 593–606.
18. Easley C.A., Faison M.O., Kirsch T.L., Lee J.A., Seward M.E., Tombes R.M. Laminin activates CaMK-II to stabilize nascent embryonic axons // *Brain Res.* – 2006. – V. 1092, N 1. – P. 59–68.
19. Новожилов Д.О., Карпов П.А., Блюм Я.Б. Біоінформаційний пошук Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ, потенційно пов'язаних з регуляцією рослинного цитоскелету // *Цитология и генетика.* – 2017. – Т. 51, № 4. – С. 3–12.
20. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – V. 36. – D. 190–195.
21. Huang H.D., Lee T.Y., Tseng S.W., Horng J.T. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – V. 33. – W226–229.
22. Eswar N., Webb B., Marti-Renom M.A., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. Comparative protein structure modeling with MODELLER // *Curr. Prot. Bioinform.* – 2006. – Sup. 15: 5.6.1–5.6.30. – doi: 10.1002/0471250953.bi0506s15.
23. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction // *Nat. Meth.* – 2015. – V. 12. – P. 7–8.
24. Kuntal B.K., Aparoy P., Reddanna P. EasyModeller: A graphical interface to MODELLER // *BMC Res. Not.* – 2010. – V. 3, N 226. – doi: 10.1186/1756-0500-3-226.
25. Hildebrand P.W., Goede A., Bauer R.A., Gruening B., Ismer J., Michalsky E., Preissner R. SuperLooper – a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – V. 37. – W571–574.
26. Dominguez C., Boelens R., Bonvin A.M.J.J. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125, N 7. – P. 1731–1737.
27. Kollman J.M., Merdes A., Mourey L., Agard D.A. Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – V. 12. – P. 709–721.
28. Kollman J.M., Zelter A., Muller E.G., Fox B., Rice L.M., Davis T.N., Agard D.A. The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – V. 19, N 1. – P. 207–215.
29. Kollman J.M., Greenberg C.H., Li S., Moritz M., Zelter A., Fong K.K., Fernandez J.-J., Sali A., Kilmartin J., Davis T.N., Agard D.A. Ring closure activates yeast γTuRC for species-specific microtubule nucleation // *Nat. Struct. & Mol. Biol.* – 2015. – V. 22. – P. 132–137.

30. Stacklies W., Seifert C., Graeter F. Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations // BMC Bioinform. – 2011. – V. 12, N 101. – doi: 10.1186/1471-2105-12-101.
31. Nei M., Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. – New York: Oxford University Press, 2000. – 352 p.
32. Davis I.W., Leaver-Fay A., Chen V.B., Block J.N., Kapral G.J., Wang X., Murray L.W., Arendall W.B. III, Snoeyink J., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids // Nucl. Ac. Res. – 2007. – V. 35. – W375–383.
33. Benkert P., Künzli M., Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation // Nucl. Acids Res. – 2009. – V. 37. – W510–514.
34. Karpov P.A., Brytsun V.M., Rayevsky A.V., Demchuk O.M., Pydiura N.O., Ozheredov S.P., Samofalova D.A., Spivak S.I., Yemets A.I., Kalchenko V.I., Blume Ya.B. High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on potential of virtual organization CSLabGrid // Sci. Innov. – 2015. – V. 11, N 1. – P. 85–93.
35. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis // J. Comput. Chem. – 2004. – V. 25, N 13. – P. 1605–1612.

NOVOZHYLOV D.O., KARPOV P.A., RAEVSKY A.V., OZHEREDOV S.P., BLUME Ya.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: novozhylovd@gmail.com*

Ca²⁺- AND Ca²⁺-CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASES AS POTENTIAL REGULATORS OF MICROTUBULE STRUCTURE AND FUNCTIONS

Aim. Evaluate involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in regulation of plant microtubules using bioinformatic and structural biological methods. **Methods.** Sequences of tubulins isoforms was taken from UniProtKB. Profile prediction of phosphorylation sites was done using KinasePhos 2.0 service. Locating of potential phosphorylation sites was conducted on 3D-models of *A. thaliana* γ -tubulin complex and tubulin dimer, build using template X-ray RCSB Protein Data Bank structures; Modeller 9v8, I-Tasser, EasyModeller, HADDOCK, GROMACS 4.5.3, MolProbity, QMEAN software and visualized through PyMol 1.5 and UCSF Chimera 1.8. **Results.** It was predicted existence of potential phosphorylation sites matched profiles of calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMK2) in all Arabidopsis isoforms of β - and γ -tubulin: Ser32, Ser259, Ser321, Ser376 in both isoforms of γ -tubulin (TBG1 and TBG2), and Thr312 conserved in all β -tubulins (TBB1-TBB9). **Conclusions.** Considering location of specified amino acid residues, we assume that calcium/calmodulin-dependent protein kinases may be involved in regulation of plant microtubules. We assume that phosphorylation in these positions may have a significant impact on the microtubule dynamics, formation of α - β -tubulin dimer and primary microtubule nucleation centers in plants. **Keywords:** plant microtubules, tubulin, γ TuSC complexes, phosphorylation, calcium/calmodulin-dependent protein kinases, protein kinase CaMK2, potential sites.