

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

НОВОЖИЛОВ ДМИТРО ОЛЕГОВИЧ



УДК 577.212: 004

**ПОШУК Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ, ЗВ'ЯЗАНИХ З
МІКРОТРУБОЧКАМИ РОСЛИН, ТА З'ЯСУВАННЯ ЇХ РОЛІ У
ФОСФОРИЛЮВАННІ ТУБУЛІНУ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація є рукописом
Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології
Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович, Державна установа
«Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН
України», директор, завідувач відділу геноміки та
молекулярної біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Пушкарьов Володимир Михайлович, Державна
установа «Інститут ендокринології та обміну
речовин ім. В.П. Комісаренка
НАМН України», головний науковий
співробітник відділу фундаментальних і
прикладних проблем ендокринології

кандидат біологічних наук, доцент
Нипорко Олексій Юрійович,
Інститут високих технологій КНУ імені Тараса
Шевченка, завідувач кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики

Захист відбудеться «29» квітня 2021 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Тел/факс: (044) 463-05-32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «__» березня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДИСЕРТАЦІЇ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Мікротрубочки пов'язані з реалізацією численних ключових функцій клітини шляхом їх залучення до процесів формування і підтримки форми клітини, визначені її полярності, процесів клітинного поділу, формування клітинної стінки, мікрокомпаратменталізації клітини, транспорту везикул, гранул і органел, процесів руху клітини, а тому вивчення механізмів їх регуляції є важливим напрямком у сучасній клітинній біології (Fojo, 2008; Hashimoto, 2015). Одним з основних механізмів регуляції структурних і динамічних властивостей мікротрубочок є їх посттрансляційні модифікації, в тому числі фосфорилування (Wloga and Gaertig, 2010; Fourest-Lieuvin et al., 2006). Фосфорилування тубуліну як основного білку мікротрубочок пов'язане з регуляцією тубулін-тубулінових взаємодій, взаємодії тубуліну з іншими білками мікротрубочок, реорганізацією мікротрубочок у процесі мітозу та регуляцією взаємодії мікротрубочок з іншими клітинними структурами (Alvarado-Kristensson et al., 2009; Eklund et al., 2014; Ben-Nissan et al., 2008; Motose et al., 2011; Lee, 2009).

На сьогоднішній день відома низка Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, котрі безпосередньо або опосередковано взаємодіють і регулюють як тубуліновий (мікротрубочки), так і актиновий (мікрофіламенти) цитоскелет у відповідь на кальцієві стимули. Серед них найбільш вивченим є вплив на структурно-функціональні характеристики мікротрубочок протеїнкіназ CaMK2, здатних фосфорилувати як тубулін безпосередньо, так і білки, асоційовані з мікротрубочками, такі як MAP6 (McVicker et al., 2015; Lu et al., 2002; Holmfeldt et al., 2005). Зокрема, протеїнкіназа CaMK2 γ регулює динамічну структуру мікротрубочок, модифікуючи як тубулін, так і деполімеразу мікротрубочок МСАК (Kif2C, kinesin-like protein 6), а протеїнкіназа CaMK2 δ ембріональних аксонів мишей асоціюється і з мікротрубочками, і з мікрофіламентами (Holmfeldt et al., 2005; Hong et al., 1996).

У рослин рівень внутрішньоклітинного кальцію змінюється у відповідь на широкий спектр стимулів, як то фітогормони, світло, механічні подразнення, абіотичні чинники, дія патогенів тощо. Низка кальцієвих внутрішньоклітинних сенсорів впізнає специфічні кальцієві сигнатури та трансдукує їх у подальші ланки сигнальних каскадів, що можуть включати зміни фосфорилування білків цитоскелету. У рослин існує декілька груп таких кальцієвих сенсорів, зокрема це кальцій-залежні протеїнкінази CDPK (Hrabak et al., 2003).

На жаль, наразі роль рослинних гомологів протеїнкіназ CaMK2, таких як протеїнкінази CDPK, у регуляції мікротрубочок не вивчена. Можна припустити, що еволюційна консервативність молекул тубуліну і виражена гомологія кальцій-залежних протеїнкіназ тварин і вищих рослин свідчить про імовірність наявності у них схожих функцій, зокрема в регуляції структурно-функціональних властивостей мікротрубочок завдяки існуванню схожих сайтів фосфорилування тубулінів тварин і рослин. Завдяки консервативності основних цільових білків, біоінформаційні методи дозволяють з досить високою вірогідністю прогнозувати можливість фосфорилування рослинними

протеїнкіназами різних білків цитоскелету, зокрема тубуліну. Саме цим визначається актуальність проблеми і необхідність вивчення ролі Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежних рослин у регуляції структури і функцій їх мікротрубочок шляхом фосфорилування тубуліну.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в рамках бюджетних науково-дослідних робіт «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (№ ДР 0115U002084, 2015-2019 рр.), «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (№ ДР 0120U100937, 2020-2024 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було з'ясування можливості фосфорилування тубуліну рослин за участю різних типів кальцій-залежних протеїнкіназ, визначення потенційних сайтів такої модифікації, а також оцінка доцільності використання відомих інгібіторів протеїнкіназ СаМК2 для вивчення функцій рослинних протеїнкіназ CDPK.

Для досягнення мети роботи були поставлені наступні завдання:

1. Відбір амінокислотних послідовностей Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana*, кальмодулін-залежних протеїнкіназ *Homo sapiens* і *Mus musculus*, що беруть участь у регуляції структурно-функціональних властивостей мікротрубочок, та аналіз їх доменної архітектури.
2. Проведення NJ кластеризації послідовностей каталітичних доменів Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, кальмодулін-залежних протеїнкіназ *H. sapiens* і *M. musculus*, що беруть участь у регуляції тубулінового цитоскелету.
3. Визначення за результатами кластеризації найближчих гомологів серед вибірки кальцій-регульованих протеїнкіназ рослинного і тваринного походження.
4. Проведення профільного аналізу сайтів фосфорилування тубулінів тваринними протеїнкіназами, визначення спільних профілів сайтів фосфорилування. Відбір протеїнкіназ, профілі фосфорилування яких є характерними для відповідних сайтів тубуліну *A. thaliana*. Визначення кальцій-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, які здатні фосфорилувати різні субодиниці тубуліну, на основі гомології до протеїнкіназ тварин, визначених за допомогою профільного аналізу.
5. Пошук імовірних сайтів фосфорилування різних ізотипів тубуліну *A. thaliana*, базуючись на профілях фосфорилування СаМК2 та перевірка просторової доступності цих сайтів на тривимірних моделях димеру $\alpha\beta$ -тубуліну та малого γ -тубулінового комплексу.
6. Відбір перспективних ліній нокаут них мутантів *A. thaliana* по генах Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, які здатні фосфорилувати тубулін.
7. Оцінка можливості використання кальмодулін-спрямованих інгібіторів тваринних протеїнкіназ СаМК2 для пригнічення активності протеїнкіназ

CDPK рослинного походження. Визначення потенційного сайту зв'язування інгібіторів KN-93 та KN-62 у структурі протеїнкінази СРК1 з *A. thaliana*.

8. Перевірка спроможності інгібіторів KN-93 та KN-62 взаємодіяти з протеїнкіназами CDPK *A. thaliana* за допомогою молекулярного докінгу.

Об'єкт дослідження. Ідентифікація кальцій-залежних серин-треонінових протеїнкіназ підродини CDPK *A. thaliana*, залучених до регулювання структурно-функціональних особливостей мікротрубочок рослин.

Предмет дослідження. Роль кальцій-залежних протеїнкіназ (CDPK) *A. thaliana* у регуляції мікротрубочок рослин шляхом фосфорилування тубуліну.

Методи дослідження. В роботі використані методи класичної та структурної біоінформатики. Були використані методи попарного і множинного вирівнювання, профільного аналізу, кладистичного аналізу, тривимірного моделювання, молекулярний докінг.

Вперше проведено пошук та відібрано кальцій-залежні протеїнкінази *A. thaliana*, здатні регулювати структурно-функціональні властивості цитоскелету, на основі подібності їх каталітичних доменів до тваринних гомологів. За допомогою NJ кластеризації визначені найближчі гомологи тваринних Ca^{2+} - кальмодулін-залежних протеїнкіназ типу 2 (CaMK2), рибосомальних S6 кіназ (RSK), кіназ, асоційованих з апоптозом (DAPK) та чекпоінт-кінази 2 (CHK2) серед кальцій-залежних (СРК) та кальмодулін-залежних (CRK) протеїнкіназ *A. thaliana*. На основі аналізу профілів фосфорилування кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин здійснено пошук протеїнкіназ CDPK *A. thaliana*, здатних фосфорилувати тубуліни. Проведена NJ кластеризація 494-х сайтів фосфорилування тваринних протеїнкіназ, створені спільні профілі фосфорилування, визначені протеїнкінази, профілям фосфорилування яких відповідають консенсусні послідовності у складі різних ізотипів тубуліну (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 1A (CaMK1A), кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2A (CaMK2A), кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа кіназа 2 (CaMKK2) з *H. sapiens* та кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2A (CaMK2A) з *R. norvegicus*), визначені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana* - кальцій-залежна протеїнкіназа 20 (СРК20), кальцій-залежна протеїнкіназа 21 (СРК21) та кіназа взаємодії з гемінівірусним Рер 2 (GRIK2). Проведено пошук сайтів фосфорилування, що відповідають профілям протеїнкінази CaMK2 у послідовностях різних тубулінів *A. thaliana* та перевірена доступність цих сайтів на тривимірних моделях димеру α/β -тубуліну і малого γ -тубулінового комплексу (γ TuRC). Визначені потенційні сайти фосфорилування γ -тубуліну - Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376, а для β -тубуліну - Thr312. Проведений аналіз можливості використання інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 людини для рослинних протеїнкіназ CDPK, визначений потенційний сайт зв'язування інгібіторів KN-93 та KN-62 у структурі кальцій-зв'язуючого домену СРК1 з *A. thaliana*, а також проведений молекулярний докінг лігандів KN-93, KN-62 до СРК1 *A. thaliana*, результати якого підтвердили можливість використання цих інгібіторів у дослідженні вищезгаданих протеїнкіназ у рослин.

Практичне значення отриманих результатів. Вивчення функцій рослинних протеїнкіназ CDPK та особливостей їх взаємодії з мікротрубочками є важливим для розуміння механізмів регуляції тубулінового цитоскелету рослин. Отримані дані можуть бути використані у подальшому для вивчення особливостей функціонування і регуляції мікротрубочок рослин цитоскелету та сигнальних каскадів, опосередкованих протеїнкіназами CDPK, котрі включають структурні перебудови та динамічні зміни мікротрубочок. Відібрані мутантні лінії *A. thaliana* по генах, що кодують CPK20 і CPK21, та отримані докази щодо можливості використання сполук KN-93 і KN-62 як потенційних інгібіторів рослинних протеїнкіназ CDPK можуть бути використані для подальшого експериментального вивчення особливостей функціонування протеїнкіназ підродиною CDPK у рослин.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем спільно з науковим керівником було обрано тему наукового дослідження, сформульовано основну мету і завдання роботи, інтерпретовано отримані результати, розроблено структуру і план дисертаційної роботи та підготовлено публікації. Здобувачем особисто опрацьовані літературні джерела за темою дисертації, проведені експериментальні дослідження та викладено основні положення дисертаційної роботи.

Апробація роботи. Основні наукові положення, висвітлені в дисертаційній роботі, були представлені на Міжнародному симпозіумі з клітинної біології спільно з 5-м з'їздом українського товариства клітинної біології (2-6 жовтня 2016 р., Одеса), X-му з'їзді УТГіС ім. М.І. Вавилова (2-6 жовтня 2017 р., Умань), а також на XII-й Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (2-6 жовтня 2017 р., Умань) та XV-й (21-25 вересня 2020 р., Кам'янець-Подільський) Міжнародних наукових конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів».

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 наукових праць, з них 4 статті у профільних виданнях та 1 тези доповіді збірнику матеріалів конференції.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 177 сторінках друкованого тексту та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 264 посилання. Дисертаційна робота містить 12 рисунків, 4 таблиці, 2 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляді літератури) узагальнено літературні дані стосовно структури, ролі та функціях мікротрубочок, розглянуто відмінності у організації мікротрубочок у рослинних і тваринних клітинах. Охарактеризовані різні типи посттрансляційних модифікацій тубулінів. Описана функціональна роль Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ різного еволюційного походження та їх класифікація. Охарактеризована роль тваринних протеїнкіназ CaMK2, MLCK, AMPK, BRSK, CHEK, DAPK, LKB1, MARK, PKD, RSK, DCLK1, TRIO, каліріну і тігіну, а також Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ

рослинного походження. Окрему увагу зосереджено на участі кальцій-регульованих протеїніназ у регуляції мікротрубочок. Розглянуто механізм дії різних типів інгібіторів протеїнінази CaMK2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Усі досліджувані амінокислотні послідовності були відібрані з бази даних UniProtKB (UniProt Consortium, 2018) у вигляді анотованих послідовностей у форматі FASTA. Депоновані в UniProtKB білки *A. thaliana* ідентифікували шляхом порівняння локусу їх генів з координатами, представленими в інформаційному ресурсі Arabidopsis (TAIR – www.arabidopsis.org). Доменну архітектуру білків визначали на основі результатів профільного аналізу з використанням інструментів SMART, Pfam, PROSITE та InterPro (Finn et al., 2016, 2017; Sigrist et al., 2013; Letunic et al., 2015). Також були враховані дані, представлені порталом ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org).

Ступінь подібності досліджуваних послідовностей протеїніназ і філогенетична ідентифікація найближчих гомологів встановлювали на підставі N-J (Neighbor-Joining) кластеризації послідовностей їх каталітичних доменів (Gascuel and Steel, 2006). Вирівнювання загальної вибірки послідовностей каталітичних доменів кальцій- та кальмодулін- залежних протеїніназ *A. thaliana* та серія їх вирівнювань проти послідовностей каталітичних доменів тваринних кальмодулін-залежних протеїніназ було виконано за допомогою програми ClustalX (v. 2.1) (Larkin et al., 2007) з використанням вагових матриць BLOSSUM (Styczynski et al., 2008). Візуалізацію та аналіз побудованих дендрограм було виконано із використанням програми MEGA7 (v. 7.0.14) (Kumar et al., 2016).

Вибірка послідовностей експериментально підтверджених сайтів фосфорилування, що відповідають протеїніназам ссавців, була отримана за допомогою ресурсу PhosphoSitePlus у форматі Xp±7 (Hornbeck et al., 2015). Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей вибірки сайтів фосфорилування проводили з використанням програми ClustalX (V. 2.0.10) (Larkin et al., 2007). При вирівнюванні була використані вагові матриці BLOSSUM, а також застосована опція заборони вставки гепів. Кладистичний аналіз сайтів зв'язування і ідентифікацію найближчих гомологів проводили на підставі спільної кластеризації амінокислотних послідовностей шляхом спільної N-J кластеризації. Візуалізацію і аналіз дендрограм здійснювали за допомогою програми MEGA7 (v. 7.0.14) (Kumar et al., 2016). Паттерни сайтів фосфорилування складала відповідно до протоколу інструмента PROSITE (Sigrist et al., 2013).

Для визначення профілів фосфорилування, які відповідають тубулінам *A. thaliana*, був використаний інструмент PROSITE (Sigrist et al., 2013). Як цільові білки для пошуку PROSITE були використані послідовності тубуліну *A. thaliana*, відібрані з бази даних UniProtKB, а мотивами слугували спільні паттерни послідовностей, що відповідають кладам і субкладам, отриманими при кластеризації послідовностей сайтів фосфорилування.

Для визначення найближчих гомологів серед послідовностей сайтів, які фосфорилуються протеїнкіназами тварин, і потенційних сайтів фосфорилування тубулінів рослин була створена вибірка послідовностей, що об'єднувала загальну вибірку фрагментів послідовностей сайтів фосфорилування та сайти фосфорилування, визначені для тубулінів *A. thaliana* за допомогою PROSITE (Sigrist et al., 2013). За допомогою ClustalX з використанням вагових матриць BLOSSUM та заборною гепів було проведено повторне множинне вирівнювання сайтів фосфорилування та ідентифікація найближчих гомологів шляхом N-J кластеризації у програмі MEGA7 (Larkin et al., 2007; Kumar et al., 2016; Styczynski et al., 2008).

Для визначення найближчих рослинних гомологів протеїнкіназ, чий профілі фосфорилування найбільш споріднені з профілями фосфорилування тубулінів, було проведено пошук гомологічних полідовностей з використанням сервісу SIB BLAST Network Service (Lee et al., 2009). Вирівнювання послідовностей досліджуваних протеїнкіназ проти бази даних UniProtKB здійснювали за допомогою алгоритму BLASTp (BLASTp ver. 2.2.31+) (Lee et al., 2009). Сканування проводили з використанням вагової матриці BLOSUM62 з пороговим значенням числа співпадінь у випадковій вибірці (E-Value) 10 (Styczynski et al., 2008). Також була задіяна активна фільтрація ділянок низької організації чи ділянок, що містять велику кількість гепів. Потенційні гомологи були відібрані на основі відсоткових показників ідентичності і подібності послідовностей, відсотка гепів і значенні E-value. Визначення потенційних серин-/треонінових сайтів фосфорилування у послідовностях різних ізоформ α -, β - та γ -тубуліну *A. thaliana*, що співпадають з профілями тваринних CaMK2, було виконане за допомогою сервісу KinasePhos (Huang et al., 2005).

Для 3D-моделювання були використані дані рентгеноструктурного аналізу з RCSB Protein Data Bank (Burley et al., 2017), відібрані за допомогою PDB-BLAST (www.rcsb.org). Гомологічне моделювання молекул тубуліну здійснювали за допомогою програми Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) (Eswar et al., 2006). Повноатомні структурні моделі білків також були побудовані за допомогою сервісу I-Tasser (Eswar et al., 2006). Заключна збірка повноатомних моделей білків була отримана з використанням програми EasyModeller 4.0 (Kuntal et al., 2010).

Структуру компонентів γ -тубулінових комплексів 2 (GCP2/SPC97) та 3 (GCP3/SPC98) реконструювали шляхом моделювання за гомологією з використанням сервісу I-Tasser (Eswar et al., 2006). Деякі петлі, відсутні у кристалічних структурах, були побудовані з використанням сервісу SuperLooper (Hildebrand et al., 2009). Збірку макромолекулярних комплексів здійснювали шляхом білок-білкового докінгу за допомогою програми HADDOCK (Dominguez et al., 2003). Первинну перевірку побудованих комплексів виконували з використанням кріоелектронно-мікроскопічних карт комплексу γ TuSC із *Saccharomyces cerevisiae*. Також було використано результати кріо-ЕМ мікроскопії і 3D-моделі GCPs/ γ -тубулінових комплексів, наданих Kollman Lab (<http://faculty.washington.edu/jkoll/>) (Kollman et al., 2008, 2011, 2015).

Релаксацію структур побудованих моделей здійснювали шляхом короткочасної молекулярної динаміки (10 нс) в силовому полі G53а6 за допомогою програмного пакету GROMACS 4.5.3 (Pronk et al., 2013) та верифікували на підставі показників RMSD, розрахунків енергії та критеріїв якості білкових структур (Stacklies et al., 2011). Стабільність 3D-моделей перевіряли за допомогою методу молекулярної динаміки в програмі GROMACS з використанням повноатомного силового поля charmm27 та водної моделі SPC (Nei and Kumar, 2000). Якість отриманих моделей перевіряли за допомогою сервісів MolProbity (Davis et al., 2007) та QMEAN (Benkert et al., 2009).

Для аналізу просторової доступності передбачених сайтів фосфорилування побудовані моделі тубулінових комплексів і залишки, які є імовірними сайтами фосфорилування, були візуалізовані за допомогою програмних пакетів PyMol 1.5 (www.pymol.org) та UCSF Chimera 1.8 (Pettersen et al., 2004). Доступні для фосфорилування амінокислотні залишки визначали виходячи з їх розташування на поверхні тубулінових комплексів.

Пошук мутантних ліній *A. thaliana* за генами протеїнкіназ СРК20 та СРК21 проводили у бібліотеках NASC (The Nottingham Arabidopsis Stock Centre) (<http://arabidopsis.info>) та ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) (<https://abrc.osu.edu>). Для визначення інтрон-екзонної структури мутантів був використаний інструмент SIGnAL T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

Доменну архітектуру і межі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana* визначали за допомогою сервісу SMART (Letunic et al., 2015). Пошук та аналіз гомологічних білкових структур проводили в репозиторії RCSB Protein Data Bank за допомогою вбудованих пошукових і аналітичних інструментів (Burley et al., 2017). Референсна структура кальмодуліну з малбранхеамідом була взята з бази даних PDB у форматі .pdb. За допомогою онлайн сервісу SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) на основі профільної реконструкції було побудовано модель кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1. Просторове вирівнювання та аналіз структури проводили за допомогою програмного пакету PyMol (www.pymol.org). Для порівняння амінокислотного оточення також було використано профільне вирівнювання послідовностей за допомогою програми ClustalX (Larkin et al., 2007).

Структури лігандів KN93 і KN62 були взяті з бази даних ChEMBL (Gaulton et al., 2012) у форматі SMILE. Конвертація їх структур у повноатомний формат *.mol2 була виконана за допомогою інструменту OpenBabel (O'Boyle et al., 2011). Молекулярний докінг проводили за допомогою програми CCDC GOLD Suite 5.3 з урахуванням повної рухливості лігандів за умови статичності амінокислотних залишків активного центру (Verdonk et al., 2003). У кожному випадку здійснювали 100 циклів генетичного алгоритму. Оцінювання результатів докінгу спиралось на показники оціночних функцій програми CCDC GOLD: GoldScore і ASPScore. Структури візуалізували і аналізували результати докінгу в програмах CCDC HERMES (Verdonk et al., 2003) та PyMol (www.pymol.org).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пошук Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних регулювати мікротрубочки, на основі гомології до амінокислотних послідовностей тваринних протеїнкіназ, що регулюють цитоскелет. За результатами аналізу літератури і баз даних було відібрано амінокислотні послідовності 34-х протеїнкіназ CDPK і 8-ми протеїнкіназ CRK *A. thaliana*, а також 41-ну послідовність кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, для яких існують експериментальні докази їх зв'язку з регуляцією цитоскелету. Була проаналізована їх доменна архітектура і визначені межі каталітичних доменів. За допомогою N-J кластеризації послідовностей каталітичних доменів відібраних протеїнкіназ були ідентифіковані найближчі гомологи між тваринними кальмодулін-залежними кіназами, що регулюють цитоскелет та протеїнкіназами CDPK і CRK-кіназами *A. thaliana*. Рослинні протеїнкінази CDPK і CRK-протеїнкінази вибірки утворювали окрему субкладу, що входить до спільної класи з протеїнкіназами людини і миші CaMK2, DCLK1 та одним з каталітичних доменів протеїнкіназ RSK. Проте результати такого вирівнювання спільної групи каталітичних доменів рослинних і тваринних протеїнкіназ не дали чітких результатів, тому для отримання більш детального розподілу протеїнкіназ за гомологією була проведена серія з 42-х вирівнювань кожної окремої CDPK і CRK проти вибірки тваринних протеїнкіназ. Згідно отриманих результатів було виявлено декілька характерних типів розміщення протеїнкіназ CDPK і CRK на дендрограмі, що вказує на різну ступінь подібності протеїнкіназ усередині цих груп до протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2.

Амінокислотні послідовності каталітичних доменів рослинних Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ CDPK виявили більшу подібність до тваринних протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2, а послідовності каталітичних доменів кальмодулін-залежних протеїнкіназ CRK – до RSK, DAPK та CHK2. протеїнкінази CPK7, CPK14, CPK32 та CPK21 були ідентифіковані як найближчі гомологи протеїнкіназ CaMK2. Протеїнкінази CaMK2 беруть активну участь у регуляції як актинового, так і тубулінового цитоскелету (Zhao et al., 2012; Jung et al., 2004; Robison et al., 2005; Easley et al., 2006; Holmfeldt et al., 2005; Lu et al., 2002), при цьому функції різних ізоформ протеїнкіназ CaMK2 значно відрізняються. Так, протеїнкіназа CaMK2 β миші може безпосередньо зв'язуватись з F-актином та рекрутує до актину протеїнкіназу CaMK2 α (Shen et al., 1998). Протеїнкіназа CaMK2 та кальцинейрин регулюють активність кофіліну, у якій сама протеїнкіназа пригнічує активність активатора кофіліну SSH1L та регулює його локалізацію, фосфорилуючи його за залишками Ser-937 та Ser-978. Ця ж протеїнкіназа шляхом фосфорилування залишку Thr-508 активує супресор кофіліну LIMK1 (Zhao et al., 2012). Протеїнкіназа CaMK2 γ впливає на динаміку мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок MCAK (Holmfeldt et al., 2005). Ізоформа CaMK2 δ асоціюється та регулює актиновий і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів миші (Hong et al., 1996). Доведено, що тваринні протеїнкінази CaMK2 фосфорилують MAP білки (MAP2 і MAP6), що беруть участь у стабілізації мікротрубочок (Lu et al.,

2002). Таким чином, враховуючи значну гомологію, подібні функції тваринної протеїнкінази CaMK2 також можуть бути притаманні і рослинним гомологам з *A. thaliana* - протеїнкіназам СРК14, СРК32, СРК7 і СРК21.

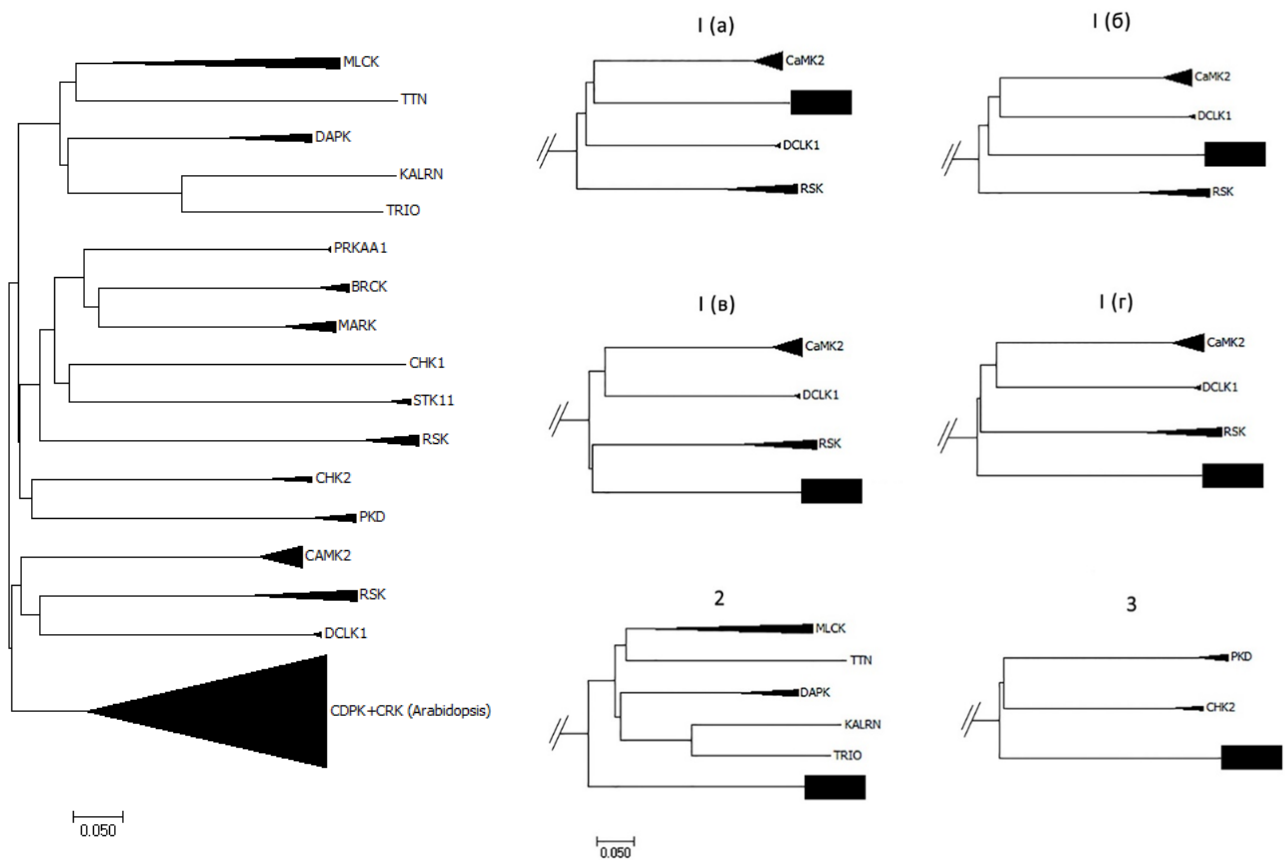


Рис. 1. Результати NJ-кластеризації каталітичних доменів тваринних і рослинних Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ та об'єднання шляхом індивідуальної кластеризації CDPK і CRK арабідопсису і тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ. Номерами (1-3) позначені типи об'єднання. Трикутниками позначені субклади однотипних протеїнкіназ (CaMK2, RSK, DCLK1, MLCK, DAPK, PKD, CHK2), а прямокутниками - протеїнкінази *A. thaliana*, що утворюють клади за відповідним типом.

Найближчими гомологами тваринних протеїнкіназ RSK є протеїнкінази СРК17, СРК34, СРК2. Протеїнкінази групи RSK фосфорилують β -субодиницю шапероніна ССТ2 по залишку Ser260, який впливає на організацію актинового і тубулінового цитоскелету (Abe et al., 2009). Протеїнкінази RSK беруть участь у регуляції розподілу мікротрубочок веретена поділу та стабілізації взаємодій кінетохора з мікротрубочками (Park et al., 2016).

Найближчі гомологи протеїнкіназ DAPK - протеїнкінази СРК20 та СРК27. Протеїнкіназа DAPK1 регулює активність білку MAPT (tau) та, відповідно, динаміку мікротрубочок (Kim et al., 2014; Duan et al., 2013). Окрім фосфорилування цього білку за залишком Thr231 DAPK1 інгібує Pin1-регулятор MAPT – шляхоми фосфорилування залишку Ser71 (Kim et al., 2014).

Протеїнкіназа DAPK1 може зв'язуватись з MAP1B, асоціюючись таким чином з мікротрубочками (Harrison et al., 2008). Також вона фосфорилує такі складові актинового цитоскелету, як кофілін (по Ser3) і LIMK (по Thr508) (Ivanovska et al., 2013). Протеїнкіназа DAPK1 впливає на фосфорилування тропоміозину-1, регулюючи, таким чином, формування стресових фібрил (Houle et al., 2007). Фосфорилуючи MARK1 і MARK2, DAPK1 також опосередковано впливає на фосфорилування MAP1, MAP2, MAP4, що у свою чергу, призводить до дестабілізації мікротрубочок (Wu et al., 2011).

Найближчі гомологи протеїнкінази CHK2 у рослин – це протеїнкінази CRK16, CRK18, CRK28, CRK28 та CRK6. Для протеїнкінази CHK2 була показана участь у регуляції організації веретена поділу, метафазної пластинки та прогресії клітинного циклу. Інгібування протеїнкінази CHK2 призводить до порушення локалізації γ -тубуліну у центросомах і веретена поділу (Dai et al., 2014). Тваринна CHK2 колокалізується і взаємодіє з PLK1 - важливим регулятором збірки веретена поділу, сергегації хромосом та виходу з мітозу. Вважається, що саме CHK2 регулює локалізацію PLK1 в контрольній точці організації веретена поділу (Jiang et al., 2014).

Базуючись на подібності каталітичних доменів рослинних протеїнкіназ груп CDPK і CRK до цих же послідовностей протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2, було зроблене припущення про можливу наявність схожих функцій відповідних протеїнкіназ CDPK і CRK у рослинній клітині. Отримані результати дозволили визначити, які саме групи кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, що регулюють цитоскелет, є спорідненими з рослинними протеїнкіназами CDPK і CRK, та припустити наявність у різних представників рослинних Ca^{2+} - і Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ функцій, аналогічних їх тваринним гомологам. Також розподіл рослинних протеїнкіназ за ступенем подібності між декількома групами тваринних протеїнкіназ може свідчити про значну функціональну гетерогенність усередині груп CDPK і CRK.

Пошук Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних безпосередньо фосфорилувати мікротрубочки на основі аналізу профілів сайтів фосфорилування. Для більш точного визначення, які саме з кальцій-залежних протеїнкіназ рослин можуть фосфорилувати білки мікротрубочок, був проведений аналіз спільних профілів їх фосфорилування. Була створена вибірка послідовності сайтів фосфорилування Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців та профілів цих сайтів, а також загальний паттерн по повній вибірці послідовностей. Однак тестове сканування виявило вироджений характер такого глобального паттерну.

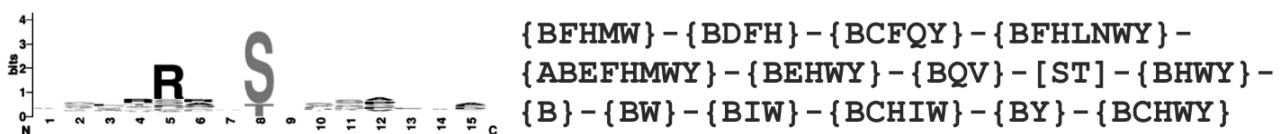


Рис. 2. Узагальнюючий лог і паттерн, що відповідають 494-м депонованим в PhosphoSitePlus експериментально підтвердженим сайтам, які фосфорилуються тваринними Ca^{2+} -залежними протеїнкіназами.

Побудований профіль добре ідентифікував відомі сайти модифікацій, не дозволяючи при цьому здійснити селективний пошук сайтів саме для Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ.

Була проведена N-J кластеризація профілів, що дозволила створити низку спільних профілів сайтів фосфорилування для профілів різних груп протеїнкіназ ссавців. Таким чином, були визначені клади різного порядку, що поєднують схожі сайти фосфорилування та асоційовані з ними протеїнкінази ссавців. У більшості випадків необхідний рівень специфічності був досягнутий лише на рівні клад другого порядку. Були визначені ті спільні профілі фосфорилування, яким відповідають консенсусні послідовності у складі ізотипів тубуліну та відбраковані ті профілі, яким не відповідають жодні консенсусні послідовності тубуліну *A. thaliana*. Потенційні сайти фосфорилування, що відповідають створеним профілям, були знайдені у всіх ізотипів тубуліну *A. thaliana*.

Для профіля кладі II.1 {BEFHNPWY}-{BDEFHQ}-{BCFIMQWY}-{BEFHLMNWY}-{ABEFHIMWY}-{BDEGHTWY}-{BDEFGHLQTVW}-{ST}-{BDEFHLNQY}-{BFHLMNTWY}-{BDEFILMNQW}-{BCEFHLNQW}-{BCEFILMNWY}-{BEHIMNQWY}-{BCFHINQWY} були знайдені консенсуси у складі послідовностей ізотипів тубуліну TBA3, TBA5, TBG1 і TBG2.

Для профіля кладі III {BCDEGHPV}-{BCHMPVWY}-{BCDEFIW}-{BCDFIMRW}-{AGHIKMQRST}-{BDFHVV}-{BCDEHPWY}-{ST}-{BCDEHLNPWY}-{BCFHIKQVWY}-{AFGIKLPRST}-{BDEHIKNPW}-{BCDFIKLW}-{BCFHKPVW}-{BCHPW} знайдені консенсуси у складі послідовностей ізотипів тубуліну TBG1 і TBG2.

Для профіля кладі IV.1 {BCHMV}-{BCGHMW}-{BFMQTW}-{BCDFM}-[AEGIKPQRTV]-{BCFHV}-{BCDLMTW}-{ST}-{BCFMNPRWY}-{BCFHMNWY}-{BHTW}-{ABCGK}-{BCFIWY}-{BCFHISW}-{BH} були знайдені консенсуси у складі послідовностей ізотипів тубуліну TBA1, TBA2, TBA3, TBA4, TBA5, TBA6, TBB4 і TBB9.

Для профіля кладі V.1 {BDEFHKMY}-{ABFIWY}-{BCDHPQTVW}-{ABCGKLNTY}-[AHKLNQRSTV]-{BCDEFHPW}-{BCKLNQTVW}-{ST}-{ABDGNQRW}-[ADEFGIKMQT]-{BFMRTWY}-[DEHLMQRSV]-{BCMSVWY}-{ABCMR}-{BCGKMRWY} консенсуси були знайдені у складі послідовностей ізотипів тубуліну TBB1, TBB2, TBB3 і TBB5.

Для профіля кладі V.4 {BCHMNPY}-{BGHRWY}-{BDFHV}-{BDFHINQW}-[ADKPQRSTV]-{BCDFIWY}-{BCEFWY}-{ST}-{BCFIKNTW}-{BFHKMWY}-{BCDIW}-{ABC FMWY}-{BDIMNTW}-{BFKPWY}-{BCHQWY} консенсуси були знайдені у складі послідовностей ізотипів тубуліну TBA1, TBB1, TBB2, TBB3, TBB4, TBB5, TBB8, TBB9, TBB6 і TBG2.

Спільна кластеризація експериментально встановлених сайтів фосфорилування тваринних протеїнкіназ і сайтів, передбачених для тубуліну *A. thaliana*, дозволила відібрати тваринні протеїнкінази, що фосфорилують схожі сайти. Таким чином, потенційні сайти фосфорилування, виявлені у *A. thaliana*, мали найбільшу подібність до сайтів фосфорилування тваринними протеїнкіназами CaMK1A і CaMK2A *H. sapiens*, CaMK2A *R. norvegicus*, а також CaMKK2 *H. sapiens*.

Базуючись на отриманих даних, був проведений пошук протеїнкіназ *A. thaliana*, які є найближчими гомологами протеїнкіназ CaMK1, CaMK2 та CaMKK2 відповідних ізотипів. Для цього були визначені межі каталітичних доменів протеїнкіназ CaMK1A, CaMK2A, CaMKK2 *H. sapiens* та CaMK2A *R. norvegicus*. Проведена NJ-кластеризація послідовностей каталітичних доменів і пошук засобами blastp дозволили виявити протеїнкінази CPK20, CPK21, GRIK2 як найбільш вірогідні гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana*. Таким чином, протеїнкінази CPK20 і CPK21 були визначені як представники Ca²⁺-залежних протеїнкіназ групи CDPK, найбільш імовірно залучених до фосфорилування тубуліну. Також високий рівень подібності протеїнкіназ CPK20 і CPK21 до своїх тваринних гомологів був підтверджений шляхом просторового вирівнювання структур моделей каталітичних доменів цих протеїнкіназ (RMSD для CPK20/CaMK1 склав 0,62, а для CPK21/CaMK2A – 0,896).

Пошук та аналіз ймовірних сайтів фосфорилування тубулінів *A. thaliana*. Надалі був проведений пошук ймовірних сайтів фосфорилування на основі порівняння з НММ-профілями сайтів фосфорилування, специфічних для тваринних протеїнкіназ CaMK2 у складі усіх відомих ізотипів α -, β - і γ - тубуліну *A. thaliana*. Була встановлена наявність у складі послідовностей усіх ізотипів β - і γ -тубуліну потенційних сайтів, що відповідають консервативним профілям для фосфорилування за участю Ca²⁺- та протеїнкіназ CaMK2. Для TBG1 і TBG2 - це залишки Ser32, Ser147, Ser151, Ser259, Ser321, Ser376, Ser391 та Ser395. Для TBB1, TBB2, TBB3, TBB4, TBB5, TBB6, TBB7, TBB8, TBB9 – це залишки Ser146, Ser154, Ser219, Ser222, Ser231, Ser279, Thr312, Ser374, Ser383. У послідовностях α -тубуліну консенсусні сайти фосфорилування були відсутні.

Для визначення просторової доступності для модифікації визначених залишків були також побудовані тривимірні моделі фрагменту центру первинної нуклеації мікротрубочок та димеру α/β -тубуліну. У TUBG1 і TUBG2 доступними для фосфорилування виявились залишки Ser259 і Ser321, що знаходяться у місцях контактів з білками GCP2 і GCP3 відповідно, а також Ser32 та Ser376, що знаходяться у місцях контактів γ -тубуліну суміжних мономерів γ TuSC. Розміщення потенційних сайтів фосфорилування у цих позиціях може свідчити про участь такої модифікації у формуванні центрів первинної нуклеації мікротрубочок. Серед потенційних сайтів фосфорилування β -тубуліну на поверхні білкової глобули був Thr312, який знаходиться у зоні контакту α - і β -тубуліну і може бути важливим для утворення димеру тубуліну.

Таким чином, нами визначено принаймні 5-ть потенційних сайтів у складі тубулінів *A. thaliana*, які потенційно можуть фосфорилуватись тваринними гомологами рослинних протеїнкіназ CDPK. Враховуючи розташування визначених амінокислотних залишків, можна припустити участь цих модифікацій у регуляції структурно-динамічних властивостей мікротрубочок. Фосфорилування амінокислотних залишків у цих положеннях може мати значний вплив як на формування димеру α/β -тубуліну і формування центрів первинної нуклеації мікротрубочок, так і на їх динамічні характеристики.

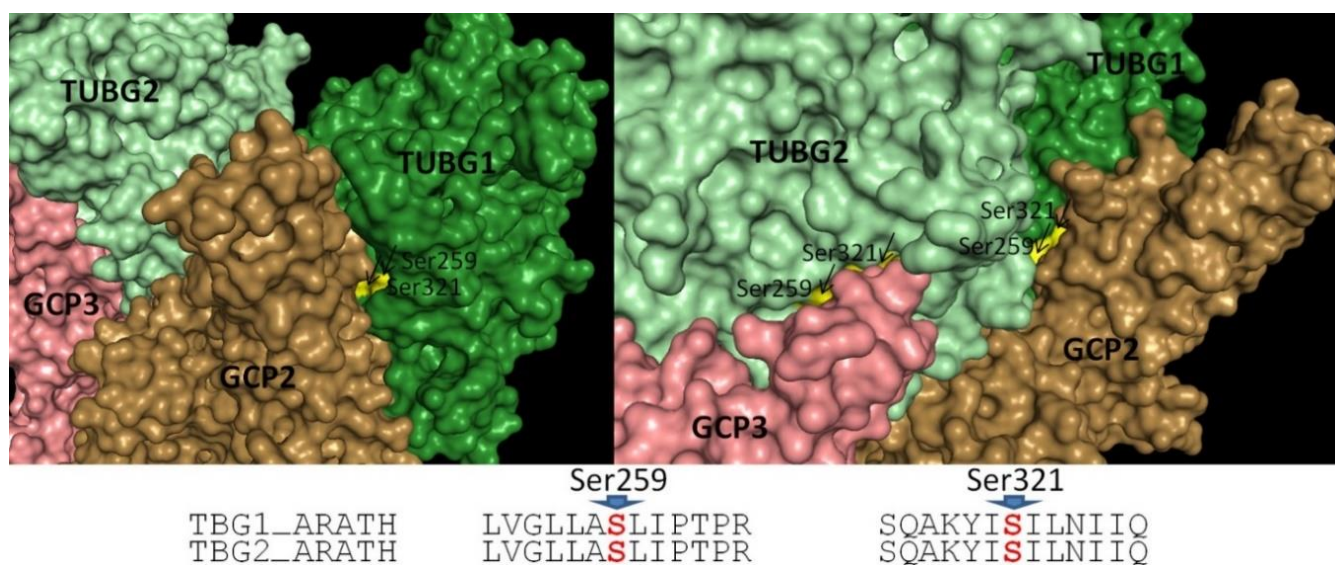


Рис. 3. 3D-модель малого γ -тубулінового комплексу γ TuSC з *A. thaliana*. Показана топологія потенційних сайтів фосфорилювання γ -тубулінів (TUBG1 і TUBG2) по залишках Ser259 і Ser321.

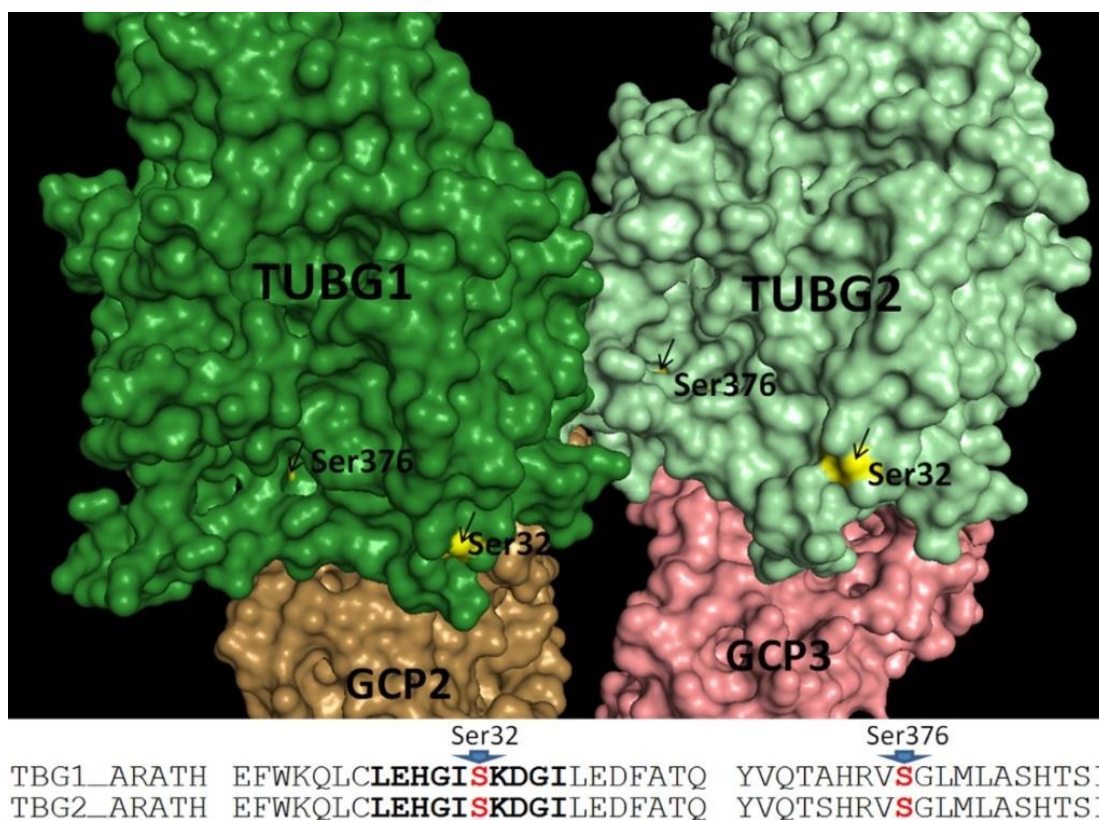


Рис. 4. 3D-модель малого γ -тубулінового комплексу з *A. thaliana*. Стрілками позначені залишки Ser32 і Ser376 - потенційні сайти фосфорилювання γ -тубулінів Ca^{2+} - та кальмодулін-залежними протеїнкіназами.

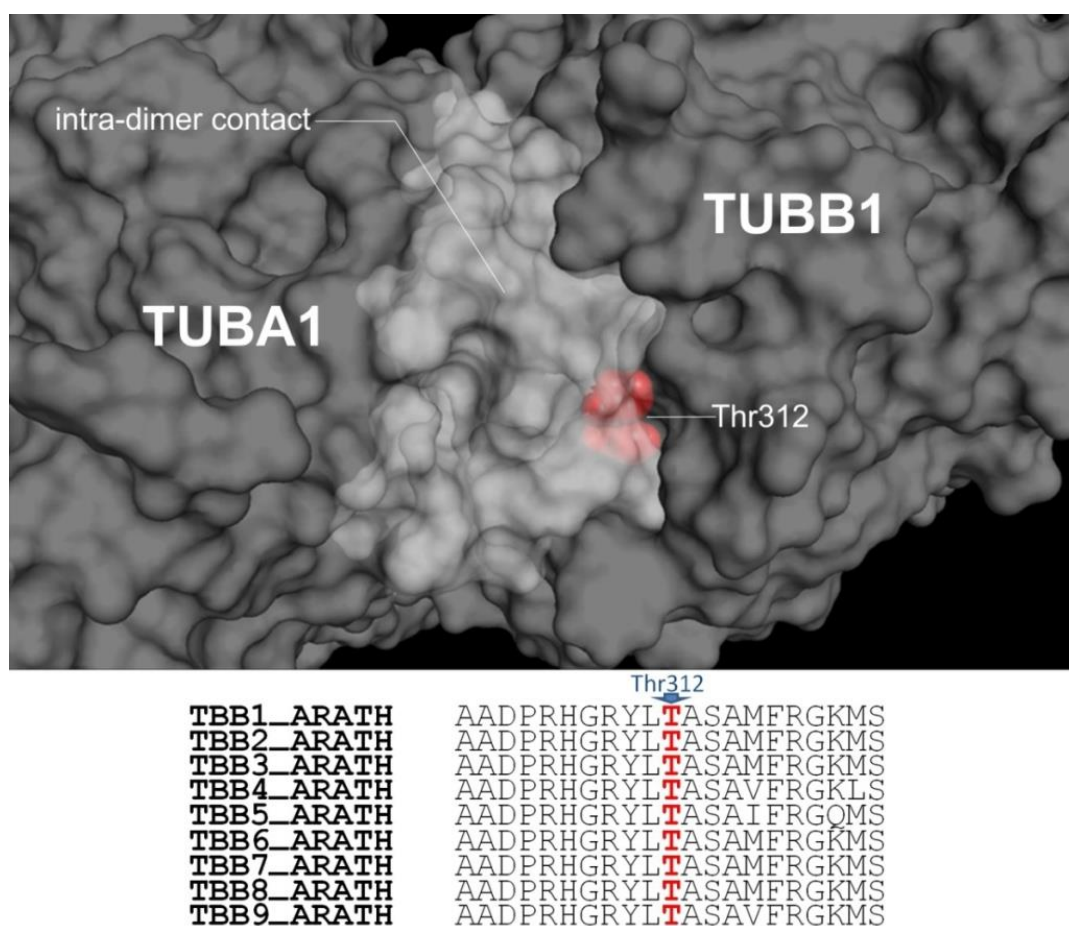


Рис. 5. Потенційний сайт фосфорилювання Thr312 на 3D-моделі димеру β -тубуліну з *A. thaliana*. Світліша область позначає зону інтрадиммерного контакту.

Аспекти регуляції фосфорилювання мікротрубочок рослин Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежними протеїнкіназами. Після визначення кола Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ, які можуть бути залучені до фосфорилювання тубуліну у рослин, нами було проведено пошук можливих інструментів для клітинно-біологічного вивчення функцій рослинних протеїнкіназ CDPK. Для CPK20 та CPK21, як протеїнкіназ, найбільш імовірно залучених до фосфорилювання тубуліну, нами були підібрані перспективні лінії нокаутних мутантів (SALK_073448C для CPK20 та SALK_029412C для CPK21). Також було проведено аналіз можливості використання інгібіторів протеїнкінази CAMK2 для пригнічення активності її рослинних гомологів серед протеїнкіназ CDPK. Для цього були визначені межі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana* і здійснено пошук гомологічних структур у базі даних PDB. За таким алгоритмом була створена вибірка з експериментально встановлених структур, які на наступному етапі були використані для шаблонного моделювання відповідних доменів рослинних протеїнкіназ CPK.

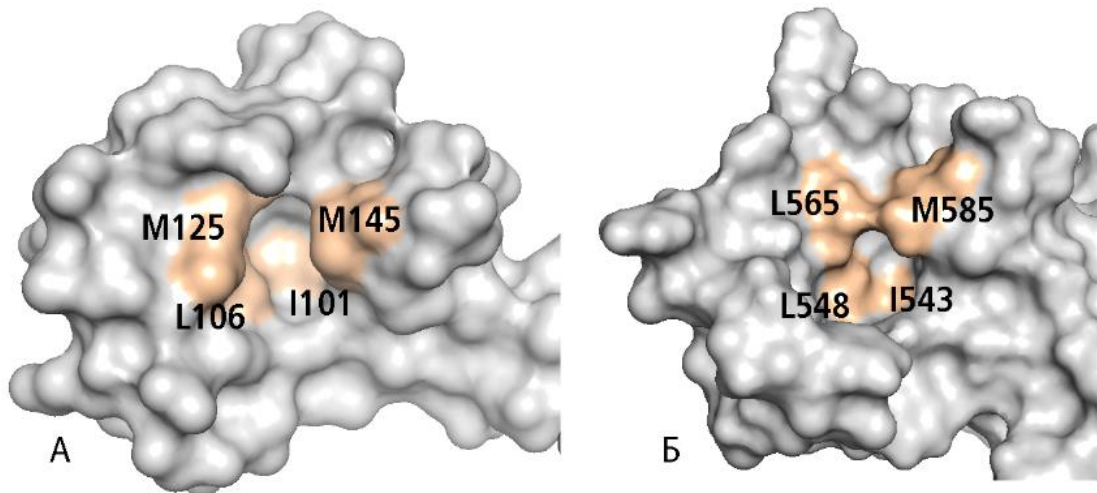


Рис 6. Фрагмент структури молекули кальмодуліну CALM1 з *H. sapiens* (PDB: 6EEW) (А) та моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana* (Б). Кольором відмічено амінокислоти сайту зв'язування мелбранкаміду на поверхні CALM1, та відповідні залишки гомологічної ділянки протеїнкінази СРК1.

Результати аналізу контрольної тривимірної структури кальмодуліну з малбранхеамідом (6EEW) дозволили визначити амінокислотне оточення референсного ліганду. Порівняння амінокислотного оточення референсного ліганду (CALM1: Ile101, Leu106, Met125, Met145) з аналогічними залишками у послідовності протеїнкінази СРК1 свідчить про наявність ідентичних залишків у послідовності протеїнкінази СРК1: Ile543, Leu548, Met585. У випадку кальмодулін-подібного домену рослинної протеїнкінази СРК1 спостерігається заміна залишку Met125 на лейцин у структурно-відповідному положенні Leu565. Таким чином, на основі експериментально встановленого сайту зв'язування кальмодулінового інгібітору малбранхеаміду були визначені ділянки CALM1 і СРК1, за якими було побудовано карту сайту для наступного молекулярного докінгу.

Результати аналізу докінгу референсного інгібітору проти всієї поверхні молекули кальмодуліну дозволили виявити два енергетично та конформаційно вигідних сайти, навколо яких концентрувалась більшість варіантів розташування конформерів, причому, згідно оціночних функцій, енергетично вигідним були варіанти, що відповідають експериментально підтвердженому сайту референсної структури. Після цього було проведено молекулярний докінг KN-93 і KN-62 у структури відповідних кишень кальмодуліну у гомологічну ділянку моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana*. Результати оціночних функцій свідчать про те, що KN-93 та KN-62 мають гомологічні і енергетично вигідні сайти зв'язування у структурах кальмодуліну людини та кальцій-залежної протеїнкінази арабідопсису.

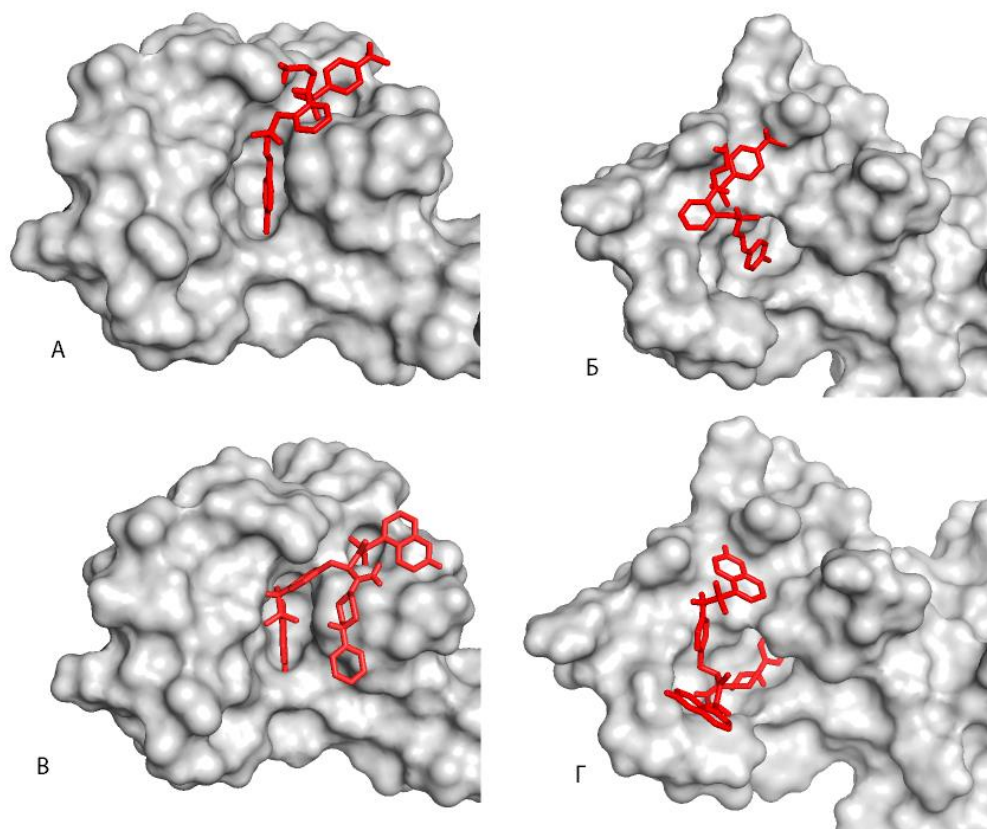


Рис. 7. Приклади результатів молекулярного докінгу. А - CALM1 *H. sapiens* з KN-93; Б - CPK1 *A. thaliana* з KN-93; В - CALM1 *H. sapiens* з KN-62; CPK1 *A. thaliana* з KN-62.

Хоча вважається, що KN-93 та KN-62 пригнічують активність CaMK2, а також ряду інших тваринних протеїнкназ у вищих концентраціях, отримані результати свідчать про наявність енергетично вигідних сайтів зв'язування цих інгібіторів у структурах і кальмодуліну людини, і кальцій-залежної протеїнкнази арабідопсису. Ці результати підтримують наше припущення щодо можливості використання даних сполук для пригнічення активності рослинних CDPK і дають підстави для подальшого експериментального дослідження дії вищезазначених сполук на рослинних об'єктах *in vitro* та *in vivo*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проаналізована можливість фосфорилування тубуліну рослин Ca^{2+} - і кальмодулін-залежними протеїнкназами (CDPK та CRK), а також визначені протеїнкнази, що найбільш імовірно здійснюють таку модифікацію. Визначена доцільність використання кальмодулін-спрямованих інгібіторів Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкназ типу 2 (CaMK2) для пригнічення активності Ca^{2+} -залежних протеїнкназ рослин (CDPK). Отримані результати дозволяють сформулювати наступні висновки:

1. Проаналізовано доменну архітектуру Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana* та вибірки тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ, що регулюють структурно-функціональні властивості мікротрубочок за рахунок фосфорилування тубуліну. Визначено каталітичні домени як єдині консервативні структури, наявні у всіх протеїнкіназ вибірки, послідовності котрих можуть бути використані для кластеризації з метою визначення найближчих гомологів.
2. За допомогою методу метод приєднання сусідів (NJ, Neighbor joining) проведена кластеризація послідовностей каталітичних доменів кальцій-залежних (СРК) та кальмодулін-залежних (СРК) протеїнкіназ *A. thaliana* та каталітичних доменів кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, залучених до фосфорилування білків мікротрубочок.
3. За результатами NJ кластеризації встановлено, що найближчими гомологами рослинного походження для протеїнкіназ СаМК2 є протеїнкінази СРК7, СРК14, СРК32 та СРК21; для протеїнкіназ RSK (рибосомальні S6 кінази) – протеїнкінази СРК17, СРК34, СРК2; для протеїнкіназ DAPK (кінази, асоційовані з апоптозом) – протеїнкінази СРК20 та СРК27, а для СНК2 (чек-поінт кіназа 2) – протеїнкінази СРК16, СРК18, СРК28, СРК4 та СРК6.
4. За допомогою профільного методу встановлені протеїнкінази тварин, здатні фосфорилувати тубулін: СаМК1А (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 1А), СаМК2А (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2А), СаМКК2 (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа кіназа 2) з *H. sapiens* та СаМК2А з *R. norvegicus*. Визначені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana*: СРК20, СРК21 та GRIK2 (протеїнкіназа взаємодії з гемінівірусним Rep 2). Це дозволяє припустити, що серед протеїнкіназ СДПК *A. thaliana* саме СРК20 та СРК21 можуть фосфорилувати білки мікротрубочок.
5. Встановлено існування на поверхні молекул усіх ізотипів β - і γ -тубуліну *A. thaliana* потенційних сайтів, що відповідають консервативним профілям для фосфорилування за участю протеїнкіназ СаМК2, які формуються амінокислотними залишками Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376 у обох ізотипів γ -тубуліну (ТВГ1 і ТВГ2) і залишком Thr312, консервативним для всіх ізотипів β -тубуліну (ТВВ1-ТВВ9). Виходячи з локалізації визначених сайтів фосфорилування запропонована їх можлива участь у формуванні кільця центрів первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuRC) та димеру α/β тубуліну.
6. На підставі встановлених закономірностей фосфорилування тубуліну рослин протеїнкіназами СРК20 та СРК21 проведено відбір існуючих мутантних ліній *A. thaliana* по генах, що кодують ці протеїнкінази. Відібрано найбільш перспективні для досліджень функціональної ролі протеїнкіназ СРК20 та СРК21 нокаутні мутанти *A. thaliana* - SALK_073448C та SALK_029412C.
7. Показана наявність просторово гомологічних ділянок у структурі тваринного кальмодуліну та Ca^{2+} -зв'язуючого домену рослинних протеїнкіназ СДПК як потенційних сайтів зв'язування кальмодулін-

спрямованих інгібіторних сполук протеїнкінази CaMK2 - KN-93 та KN-62. Продемонстрована подібність амінокислотного оточення цих сайтів у структурах кальмодуліну 1 з *H. sapiens* та Ca²⁺-зв'язуючого домену Ca²⁺-залежної протеїнкінази 1 (CPK1) з *A. thaliana* для потенційного ліганду.

8. Шляхом молекулярного докінгу перевірена можливість кальмодулін-опосередкованих інгібіторів CaMK2 - KN-93 та KN-62 зв'язуватись з рослинними протеїнкіназами CDPK. Показана наявність енергетично вигідних сайтів зв'язування KN-93 та KN-62 у структурах кальмодуліну людини та кальцій-залежної протеїнкінази 1 арабідопсису, що дозволяє запропонувати їх використання як інгібіторів рослинних протеїнкіназ підродино CDPK.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Новожилов Д.О.**, Карпов П.А., Самофалова Д.О., Попітак М.А., Блюм Я.Б. Інгібуючий вплив KN-93 і KN-62 як результат CaM-спрямованого блокування активації протеїнкінази CaMK2 тварин і протеїнкіназ CDPK рослинного походження. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2020; 26:298–304. doi.org/10.7124/FEEO.v26.1283 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

2. Карпов Р.А., **Novozhylov D.O.**, Isayenkov S.V., Blume Y.B. Motif-based prediction of plant tubulin phosphorylation sites associated with calcium-dependent protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. Cytol. Genet. 2018; 52(6):428–439. doi.org/10.3103/S0095452718060038 (*Особистий внесок здобувача: разом із співавторами проведено дослідження, опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

3. **Novozhylov D.O.**, Карпов Р.А., Blume Y.B. Bioinformatic search for Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. Cytol. Genet. 2017; 51(4):239–246. doi.org/10.3103/S0095452717040053 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

4. **Новожилов Д.О.**, Карпов П.А., Раєвський А.В., Ожередов С.П., Блюм Я.Б. Ca²⁺- та Ca²⁺/-кальмодулін-залежні протеїнкінази – потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20:323–328. doi.org/10.7124/FEEO.v20.788 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

5. Новожилов Д.О., Карпов П.А., Блюм Я.Б. Біоінформаційний пошук CPK і CRK протеїнкіназ, потенційно пов'язаних з регуляцією рослинного цитоскелету. Збірник тез доповідей 5-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 2-6 жовтня Одеса. 2016; 59.

АНОТАЦІЯ

Новожилов Д.О. Пошук Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, зв'язаних з мікротрубочками рослин, та з'ясування їх ролі у фосфорилуванні тубуліну. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню можливості фосфорилування тубуліну рослин за участю різних типів кальцій-залежних протеїнкіназ, визначенню потенційних сайтів такої модифікації, а також оцінка доцільності використання відомих інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 для пригнічення активності рослинних протеїнкіназ CDPK.

Був проведений пошук Ca^{2+} - (CDPK) і Ca^{2+} -кальмодулін-залежних (CRK) протеїнкіназ рослин, здатних безпосередньо фосфорилувати тубулін, регулюючи таким чином його структурно-функціональні властивості. Шляхом NJ кластеризації послідовностей каталітичних доменів визначені найближчі гомологи серед CDPK і CRK-протеїнкіназ з *A. thaliana* та Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, участь яких у регуляції структури та функцій цитоскелету експериментально доведена. Найближчими гомологами для протеїнкіназ CaMK2 визначені CPK7, CPK14, CPK32 та CPK21; протеїнкіназ RSK - CPK17, CPK34, CRK2; протеїнкіназ DAPK - CPK20, CPK27; протеїнкіназ CNK2 - CPK16, CPK18, CPK28, CRK4 та CRK6.

Була проведена кластеризація профілів експериментально підтверджених сайтів фосфорилування, характерних для Ca^{2+} -та кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців. В ході профільного аналізу були визначені клади різного порядку, що поєднують схожі сайти фосфорилування білків та асоційовані з ними протеїнкінази ссавців. На основі створених профілів сайтів фосфорилування були знайдені консенсусні послідовності у складі різних ізотипів тубулінів *A. thaliana* та визначені протеїнкінази, здатні фосфорилувати рослинні тубуліни - CaMK1A, CaMK2A, CaMKK2 з *H. sapiens* та CaMK2A з *R. norvegicus*. Визначені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana*: CPK20, CPK21 та GRIK2. Таким чином, протеїнкінази CPK20 та CPK21 були визначені, як рослинні Ca^{2+} -залежні протеїнкінази, що найбільш імовірно здатні фосфорилувати мікротрубочки.

В ході роботи була доведена наявність у складі молекул різних субодиниць тубуліну *A. thaliana* сайтів, що відповідають паттернам фосфорилування CaMK2. Були побудовані просторові моделі α -/ β -тубулінового димеру та малого γ -тубулінового кільця (γ TuSC), за допомогою яких була переревірена просторова доступність визначених залишків. Як потенційні сайти фосфорилування були визначені Ser32, Ser259, Ser321 і Ser376 для γ -тубуліну та Thr312 для β -тубуліну. Запропонована можлива участь визначених сайтів фосфорилування у формуванні комплексу γ TuRC та α / β тубулінового димеру.

Також був проведений пошук можливих інструментів для вивчення функцій рослинних протеїнкіназ групи CDPK. Були проаналізовані існуючі мутантні лінії *A. thaliana* за генами, що кодують протеїнкінази CPK20 і CPK21 та підібрані перспективні лінії нокаут-мутантів (SALK_073448C для протеїнкінази CPK20 та SALK_029412C для протеїнкінази CPK21).

Був проведений аналіз можливості використання кальмодулін-спрямованих інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 для пригнічення активності рослинних Ca²⁺-залежних протеїнкіназ. Була встановлена наявність потенційного сайту зв'язування інгібіторів KN-93 і KN-62 у структурі Ca²⁺-зв'язуючого домену CPK1 з *A. thaliana*, аналогічного до такого у структурі кальмодуліну 1 з *H. sapiens*, доведена подібність амінокислотного оточення цих сайтів для потенційного ліганду. Шляхом молекулярного докінгу показана наявність енергетично вигідних сайтів зв'язування KN-93 та KN-62 у структурах кальмодуліну людини та кальцій-залежної протеїнкінази 1 арабідопсису, що дозволяє запропонувати їх використання у якості інгібіторів рослинних протеїнкіназ підродина CDPK.

Ключові слова: протеїнкіназа, CDPK, CRK, CaMK2, гомологія, сайт фосфорилування, профіль фосфорилування, тубулін, молекулярний докінг.

SUMMARY

Novozhylov D.O. Search for Ca²⁺-dependent protein kinases related to plant microtubules and elucidation of their role in tubulin phosphorylation. - Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a speciality 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to determination of the possibility of phosphorylation of plant tubulin by calcium-dependent protein kinases, identifying potential sites for such modification, evaluating the feasibility of using known inhibitors of protein kinase CaMK2 to suppress the activity of plant protein kinases CDPK.

The initial search was performed based on the homology of *A. thaliana* calcium-dependent protein (CDPK) and calmodulin-dependent kinases (CRK, CDPK-related kinases) and animal protein kinases involved in the regulation of the cytoskeleton according to the literature data. The search was performed by N-J (Neighbor-Joining) clustering of catalytic domain sequences as the most evolutionarily conservative structures. The closest homologues for the CaMK2 protein kinase - CPK7, CPK14, CPK32 and CPK21; for protein kinases RSK - CPK17, CPK34, CRK2; for protein kinases DAPK - CPK20, CPK27; for protein kinase CHK2 - CPK16, CPK18, CPK28, CRK4 and CRK6.

Clustering of the profiles of experimentally confirmed phosphorylation sites known for Ca²⁺- and Ca²⁺-calmodulin-dependent mammalian protein kinases was

performed. In the course of profile analysis were identified clades of different orders, combining similar phosphorylation sites and associated mammalian protein kinases. Based on the created profiles of phosphorylation sites, consensus sequences were found in the sequences of various isotypes of *A. thaliana* tubulins, which made it possible to determine protein kinases capable of phosphorylating plant tubulin - CaMK1A, CaMK2A, CaMKK2 from *H. sapiens* and CaMK2A from *R. norvegicus*. Their closest homologues among *A. thaliana* protein kinases were determined: CPK20, CPK21, and GRIK2. Therefore, it is CPK20 and CPK21 that are considered to be calcium-dependent protein kinases able to phosphorylating plant microtubules.

Possible tools for studying the functions of plant CDPKs were searched. Existing mutant *A. thaliana* lines for the CPK20 and CPK21 genes were analyzed. Promising lines of knockout mutants were selected (SALK_073448C for CPK20 and SALK_029412C for CPK21).

The possibility of using calmodulin-targeted CaMK2 protein kinase inhibitors to suppress the activity of plant Ca²⁺-dependent protein kinases was analyzed. The presence of a potential binding site for inhibitors KN-93 and KN-62 in the structure of the Ca²⁺-binding domain of CPK1 from *A. thaliana*, similar to that in the structure of calmodulin 1 from *H. sapiens*, was determined, and the similarity of the amino acid environment of these sites for potential ligands was proved. Molecular docking has shown the presence of energetically favorable binding sites for KN-93 and KN-62 in the structures of human calmodulin and calcium-dependent protein kinase 1 of arabidopsis, which makes it possible to propose KN-93 and KN-62 as inhibitors of plant protein kinases of the CDPK subfamily.

Підписано до друку 25.03.2021 р. Зам. № 149.
Формат 60x84 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 0,9.
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.
м. Київ, вул. Предславинська, 28
095-941-84-99, 067-209-54-30
email: komprint@ukr.net