

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

КРАСНОПЬОРОВА ОЛЕНА ЄВГЕНІВНА

УДК 575.2:577.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**СЕРИН-ТРЕОНІНОВІ ПРОТЕЇНКІНАЗИ
ПІДРОДИНИ SnRK1 (KIN10 та KIN11) *ARABIDOPSIS THALIANA*:
ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТА УЧАСТЬ В ПОДІЛІ КЛІТИН**

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.Є.Краснопьорова

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор Ємець Алла Іванівна

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Краснопьорова О.Є. Серин-треонінові протеїнкінази SnRK1 (KIN10 та KIN11) *Arabidopsis thaliana*: особливості функціонування та участь в поділі клітин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2020.

Протеїнкінази є однією з ключових груп ферментів, що беруть участь у регуляції широкого спектру біохімічних та клітинно-фізіологічних процесів шляхом зворотного фосфорилування-дефосфорилування білків. Існують протеїнкінази, функції яких добре вивчено в тваринних клітинах, але зовсім мало відомо про функції їх гомологів в рослинних клітинах. Однією з таких протеїнкіназ є протеїнкіназа BRSK1 тварин, яка є головним регулятором поляризації нейронів та дуплікації центросом, опосередковуючи фосфорилування білків, пов'язаних з мікротрубочками. Однак, мало що відомо про можливі рослинні гомологи протеїнкінази BRSK1. При проведенні пошуку її найближчих рослинних гомологів було ідентифіковано високу схожість протеїнкінази BRSK1 з представниками підродина SnRK1 (KIN10, KIN11) протеїнкіназ *A. thaliana*. Припускають, що саме протеїнкінази SnRK1 (KIN10, KIN11) можуть виконувати функції у рослинних клітинах, подібні до функцій протеїнкінази BRSK1.

Спираючись на данні попередніх досліджень пошуку рослинних гомологів протеїнкінази BRSK1 людини, було показано високу подібність амінокислотної послідовності BRSK1 саме з протеїнкіназою KIN10 з *A. thaliana*. В даному дисертаційному дослідженні було проведено спільну NJ-кластеризацію каталітичних доменів всіх відомих протеїнкіназ з *A. thaliana* та каталітичного домену BRSK1 людини. За результатами спільної

NJ-кластеризації було ідентифіковано протеїнкіназу KIN10, як найближчого рослинного гомолога BRSK1 людини. Для підтвердження гомології протеїнкіназ BRSK1 та KIN10, а також можливої гомології BRSK1 та KIN11, було проведено порівняння 3D-моделей їх каталітичних доменів. Аналіз архітектури доменів показав, що обидві протеїнкінази KIN10 та KIN11 містять убіхітин-асоційований домен UBA (Ubiquitin associated domain), якого також було ідентифіковано в двох ізоформах протеїнкінази BRSK1. Важливо зауважити, що подібний убіхітиновий домен присутній в ряді протеїнкіназ, пов'язаних з первинними центрами організації мікротрубочок.

Крім того, рослинна протеїнкіназа KIN10, а також дві ізоформи BRSK1 характеризуються наявністю асоційованого з С-кінцем кіназного домену 1 (KA1). Численні білки, що містять цей домен, пов'язані з цитоскелетом та регуляцією клітинного поділу. За нашими даними тільки одна ізоформа протеїнкінази KIN11 містить домен KA1. Такі результати показують більшу структурну подібність саме протеїнкінази KIN10 з протеїнкіназою BRSK1 людини. Таким чином, архітектура та склад домена KIN10 може свідчити про зв'язок цієї протеїнкінази з цитоскелетом.

Також було проведено накладення та порівняння 3D-моделей каталітичних доменів KIN10 з BRSK1 та KIN11 з BRSK1. Накладання оптимізованих 3D-моделей остаточно підтвердило структурну гомологію каталітичних доменів протеїнкіназ BRSK1 людини та KIN10 з *A. thaliana* (RMSD = 0,173). Порівняння оптимізованих 3D-моделей показало меншу подібність KIN11 з BRSK1 (RMSD = 0,188) ніж KIN10 з BRSK1 (RMSD = 0,173).

Для кращого розуміння механізмів внутрішньоклітинного функціонування протеїнкінази KIN10 визначали внутрішньоклітинну локалізацію цього ферменту. Для цього було створено генетичні конструкції, що містили химерні гени *KIN10-BFP* та *KIN10-RFP*. Отриманими генетичними конструкціями трансформували протопласти суспензійної культури BY-2 тютюну та протопласти *A. thaliana* (Col-0). Встановлено, що

химерні протеїни KIN10-BFP та KIN10-RFP локалізуються переважно у примембранній області цитоплазми протопластів. Такі дані підтверджують важливу участь протеїнкінази KIN10 у регуляції біохімічних процесів цитоплазми.

Також було важливо дослідити рівень експресії гена *KIN10* у різних органів *A. thaliana*. У результаті визначення рівнів експресії гена *KIN10* в різних органах *A. thaliana* найвищий рівень його експресії було зафіксовано в листі. Найнижчий рівень експресії *KIN10* зафіксовано в коренях. Порівняно з листям, рівень експресії гена *KIN10* в коренях був приблизно в сім разів нижчим. В стеблі було зафіксовано майже в два рази вищий рівень експресії *KIN10* порівняно з коренями. В квітках рівень експресії *KIN10* був в 5 разів вищим, ніж в коренях. Отримані результати свідчать про важливу роль протеїнкінази KIN10 у регуляції біосинтетичних та сигнальних процесів, пов'язаних із фотосинтезом та метаболізмом цукрів.

В роботі було проаналізовано рівні експресії *KIN10* за умов сольового, осмотичного та енергетичного стресів, через 2, 8, та 24 год. Встановлено, що у рослин *A. thaliana* дикого типу (Col-0), які зростали в умовах сольового, осмотичного та енергетичного стресів, рівні експресії *KIN10* дуже варіюють. Найнижчий рівень експресії *KIN10* фіксували через 2 год. Через 8 год спостерігали підвищення експресії цього гена в середньому майже в п'ять разів за умов дії всіх використаних в дослідженні стресів. Через 24 год вирощування в умовах дії стресових чинників спостерігали зниження рівнів експресії *KIN10* на 20-30% порівняно з обробкою протягом 8-ми год. Варто зауважити, що за дії енергетичного стресу у всіх зразках рівні експресії *KIN10* були вищими.

Проаналізовано зміни росту та розвитку головних коренів проростків трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією *KIN10* і дикого типу (Col-0) за нормальних умов та за умов енергетичного стресу. Серед всіх досліджених ліній *A. thaliana* найбільшою довжиною коренів, як на стандартному середовищі МС, так і на середовищі МС без

сахарози, характеризувались проростки дикого типу (Col-0). У лінії з гіперекспресією *KIN10* (OX) на середовищі без сахарози зафіксовано в два рази вищий показник довжини коренів, ніж на середовищі MS з сахарозою. Це може свідчити про можливе підвищення чутливості рослин до дефіциту сахарози та прискорення формування стресової відповіді. Також припускається, що для забезпечення надмірної експресії *KIN10* рослина витрачає більше своїх ресурсів, що може позначатися на її рості та розвитку за нормальних умов. У проростків лінії з РНК-інтерференцією гена *KIN10* (РНКі) на середовищі MS без додавання сахарози порівняно з проростками з гіперекспресією *KIN10* зафіксовано в два рази нижчий показник довжини коренів через 0 та 24 год. Довжина коренів у проростків з РНК-інтерференцією була майже в три рази меншою порівняно з проростками з гіперекспресією через 48 та 72 год вирощування. Таке явище може бути пов'язано з порушеннями сигнальних процесів, які регулюються продуктом гена *KIN10*. На середовищі MS з сахарозою у проростків з РНК-інтерференцією довжина коренів була більшою в чотири та п'ять разів (через 0 та 24 год) та в сім та дев'ять разів (через 48 та 72 год) порівняно з проростками, що росли на середовищі без сахарози. Можна припустити, що пригнічення рівня експресії гена *KIN10* не було критичним фактором для їхнього нормального розвитку. Проте, для забезпечення надмірної експресії *KIN10* рослина витрачає більше своїх ресурсів, що може позначатися на її рості та розвитку.

Для кращого розуміння участі протеїна SnRK1 у процесах клітинного поділу, визначали мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми у проростках мутантних нокаутних ліній *kin10* та *kin11* *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми був нижчим в проростках мутантних ліній *kin10* та *kin11* порівняно з диким типом. Зокрема, він був майже в три рази нижчим при вирощуванні на середовищі з сахарозою. За умов енергетичного дефіциту мітотичний індекс також був нижчий в обох

мутантних лініях (приблизно в п'ять разів). У мутантів, що росли за умов енергетичного дефіциту, фіксували нижчий мітотичний індекс, ніж в проростках, що росли за нормальних умов.

Для підтвердження отриманих результатів про низький мітотичний індекс було проаналізовано кореляцію рівнів експресії маркерних генів клітинної проліферації в нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Як маркерні гени використовували *CYCB1;1*(AT4G37490) – ген циклін-залежної протеїнкінази, що є важливим регулятором клітинного поділу та фазового переходу під час клітинного циклу та *AtBRCA1*(AT4G21070) – рослинний гомолог *BRCA1* тварин, який бере участь в регуляції клітинного циклу та подвоєнні центросом шляхом регулювання нуклеації мікротрубочок. Зниження рівня експресії *CYCB1;1* та *AtBRCA1* свідчить про затримку клітинної проліферації та порушення процесів поділу клітини. Встановлено, що у обох мутантних ліній рівні експресії генів *CYCB1;1* та *AtBRCA1* були нижчими, ніж у дикого типу. Зокрема, у лінії *kin10* за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами експресія була нижчою як у *CYCB1;1* (майже в чотири рази), так і у *AtBRCA1* (приблизно в сім разів). У мутантній лінії *kin11* експресія також була нижчою як у *CYCB1;1* (майже в три рази), так і у *AtBRCA1* (майже в п'ять разів) за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами.

Для підтвердження кореляції між клітинним поділом та рівнем експресії генів *KIN10* та *KIN11* порівнювали рівні експресії цільових генів у клітинах суспензійної культури *A. thaliana* та інтактних проростків. Відомо, що суспензійні клітини *A. thaliana* характеризуються високим мітотичним індексом у порівнянні із клітинами інтактних проростків. На нашу думку цей показник також може корелювати з рівнем експресії генів досліджуваних протеїнкіназ *KIN10* та *KIN11*. У клітинах суспензійної культури *A. thaliana* було зафіксовано вищі (майже в 2,5 рази) рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* у порівнянні з інтактними проростками.

Також визначали розподіл флуоресценції γ -тубуліну у меристематичних клітинах коренів нокаутних мутантів *kin10* та *kin11*, яка може корелювати з його кількістю, шляхом оцінки інтенсивності флуоресценції після імунофлуоресцентного забарвлення відповідними антитілами проти γ -тубуліну. Визначення інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах мутантних ліній проводили на проростках, які зростали за нормальних умов (у присутності сахарози) та за умов енергетичного стресу.

В клітинах мутантних ліній було зафіксовано нижчий рівень флуоресценції γ -тубуліну, ніж в Col-0, як за нормальних умов, так і за умов енергетичного стресу. Інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну була нижчою (майже в 2 рази для *kin10* та в 0,5 рази для *kin11*) у мутантних лініях, вирощених за умов енергетичного дефіциту, порівняно з контролем. Зниження інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* може свідчити про зниження мітотичної активності в клітинах цих рослин. Більш того, інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну та мітотичного індексу в нокаутних мутантів *kin10* були нижчими, ніж в *kin11*.

Також для оцінки можливостей взаємодії каталітичної субодиниці KIN10 з γ -тубуліном досліджували колокалізацію KIN10 та γ -тубуліну в клітинах коренів проростків *A. thaliana*. Результати імунофлуоресцентного аналізу свідчать про колокалізацію сигналів від мічених специфічними антитілами антигенів – γ -тубуліну та KIN10 – в цитоплазмі клітин. Така колокалізація флуоресцентних сигналів від γ -тубуліну та KIN10 може свідчити про безпосередню функціональну взаємодію цих двох білків в досліджуваних клітинах.

Зважаючи на значну схожість KIN10 та BRSK1, можна припустити певну ідентичність відповідних сайтів фосфорилування. По гомології з раніше встановленим сайтом фосфорилування γ -тубуліну протеїнкіназою BRSK1 було підтверджено можливість фосфорилування залишку Ser-131 γ -

тубуліну *A. thaliana* за участю протеїнкінази KIN10. Подібні зміни можуть впливати на структуру малого γ -тубулінового комплексу γ TuSC у *A. thaliana*, а також на подальше формування кільцевого γ -тубулінового комплексу γ TuRC, що є одним із критичних етапів регуляції поділу клітин. Таким чином, можна припустити зв'язок протеїнкінази KIN10 з регуляцією структури та функцій первинних центрів організації мікротрубочок рослин подібно до свого найближчого тваринного гомолога – протеїнкінази BRSK1.

Ключові слова: протеїнкіназа SnRK1, γ -тубулін, рівень експресії, проростки *A. thaliana*, трансгенні лінії, мітотичний індекс, флуоресценція.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті

1. **Краснопьорова О.Є.**, Новожилов Д.О., Блюм Я.Б., Ісаєнков С.В. Створення плазмідної конструкції протеїнкінази AtKIN10, злитої із RFP для дослідження клітинної локалізації цього ферменту. Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. 2014;84:95–99. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
2. **Краснопьорова О.Є.**, Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вивчення клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 з *Arabidopsis thaliana*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;17:55–58. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
3. **Краснопьорова О.Є.**, Карпов П.А., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії у різних органах *Arabidopsis thaliana*. Доповіді НАН України. 2016;1:81–91. doi:10.15407/dopovidi2016.01.081 (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).

4. **Krasnoperova E.E.**, Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Influence of protein kinase KIN10 gene expression on root phenotype of *Arabidopsis thaliana* root system under condition of energy stress. *Cytol. Genet.* 2016;50(4):215–220. doi:10.3103/S009545271604006X (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
5. **Краснопьорова О.Є.**, Ісаєнков С.В., Карпов П.А., Ємець А.І. Нові генетичні конструкції *KIN10-HIS/KIN11-HIS* як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкіназ SnRK1 та BRSK1. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:68–72. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
6. Карпов Р.А., Rayevsky A.V., **Krasnoperova E.E.**, Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume YaB. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. *Cytol. Genet.* 2017;51(6):415–421. doi:10.3103/S0095452717060056 (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
7. **Krasnoperova E.E.**, Buy D.D., Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume YaB., Yemets AI. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.* 2019;53(3):185–191. doi:10.3103/S0095452719030022 (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
8. **Krasnoperova E.E.**, Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume YaB., Yemets A.I. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic subunits of the SnRK1 protein kinase complexes in the regulation of *Arabidopsis* γ -tubulin. *Cytol. Genet.* 2019;53(5):349–356. doi:10.3103/S0095452719050104 (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).

Тези:

9. **Краснопьорова О.Є.,** Новожилов Д.О., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Клонування протеїнкінази KIN10 з *Arabidopsis thaliana*. Збірник тез доповідей міжнародної наукової конференції «Селекційно-генетична наука і освіта», 18-20 березня Умань. 2013, с. 57–58.
10. Новожилов Д.О., **Краснопьорова О.Є.,** Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Особливості росту та розвитку коренів проростків трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana*, що мають підсилену або пригнічену експресію гену протеїнкінази KIN10. Збірник тез доповідей міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2013: біологічні науки», 18-22 березня Київ. 2013, с. 78.
11. **Краснопєрова Е.Е.,** Новожилов Д.О., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Исследование роли протеинкиназы KIN10 в регуляции элементов цитоскелета. Збірник тез доповідей конференції «Биология наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых» 21-26 квітня Пушино. 2013, с. 493.
12. **Krasnoperova E.E.,** Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume YaB. Expression profiling and cladistic analysis of serine/threonine protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana*. Abstracts of the International Conference for Young Scientists «Actual problems of microbiology and biotechnology» Odesa. 2015, p. 17.
13. **Краснопьорова О.Є.,** Курило В.В., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Трансформація тютюну (*Nicotiana tabacum*) генами *KIN10-RFP* та *KIN10-GFP*. Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практична конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології», 3-7 жовтня Вінниця. 2016, с. 248–249.
14. **Краснопьорова О.Є.,** Буй Д.Д., Ісаєнков С.В., Ємець А.І. Вивчення експресії KIN10 та KIN11 за умов дії сольового та осмотичного стресів. Збірник тез доповідей третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 16-18 травня Київ. 2017, с. 14.

SUMMARY

Krasnoperova E.E. Serine-threonine protein kinases of the SnRK1 subfamily (KIN10 and KIN11) of *Arabidopsis thaliana*: peculiarities of functioning and participation in cell division. – Qualifying scientific work, manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D.) on a speciality 03.00.22 – molecular genetics. Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Protein kinases are one of the key groups of enzymes involved in the regulation of a wide range of biochemical and cellular-physiological processes by reverse phosphorylation-dephosphorylation of proteins. The functions of many protein kinases are well studied in animal cells, however very little is known about the functions of their homologues in plant cells. One of those protein kinases is animal BRSK1 protein kinase, which is a major regulator of neuronal polarization and centrosome duplication, mediating phosphorylation of microtubule-associated proteins. However, little is known about the possible plant homologues of BRSK1 protein kinase. During the search for its closest plant homologues, a high similarity of BRSK1 protein kinase with representatives of the SnRK1 subfamily (KIN10, KIN11) *A. thaliana* protein kinases was identified. It is suggested, that the protein kinases SnRK1 (KIN10, KIN11) could have similar to protein kinase BRSK1 can functions in the plant cells.

According to data from previous studies on plant homologues search for human BRSK1 protein kinase, the high similarity of the amino acid sequence of BRSK1 with the protein kinase KIN10 from *A. thaliana* was found. In this work, the NJ-clustering study of catalytic domains of all known protein kinases of *A. thaliana* and catalytic domain of BRSK1 was conducted. The results of NJ-clustering have identified KIN10 protein kinase as the closest plant homologue of human BRSK1. To confirm the homology of BRSK1 and KIN10 protein kinases, as well as the possible homology of BRSK1 and KIN11, a comparison of 3D models of their catalytic domains was performed. Domain architecture analysis has

shown that both KIN10 and KIN11 protein kinases contain the UBA (ubiquitin associated domain) domain, which was also identified in two isoforms of the BRSK1 protein kinase. A similar UBA domain is present in a number of protein kinases associated with the primary microtubule organizing centers.

Additionally, the plant protein kinase KIN10 as well as two isoforms of BRSK1 are characterized by the presence of associated with the C-terminal kinase domain 1 (KA1). Several proteins containing the KA1 domain are associated with cytoskeleton and cell division regulation. According to our data, only one isoform of KIN11 protein kinase contains the KA1 domain. These results exhibit a high structural similarity of KIN10 protein kinase with human BRSK1 protein kinase. Thus, the domain architecture and composition of KIN10 may indicate on an interaction between this protein kinase and the cytoskeleton. The 3D modeling results and comparison of spatial structure of KIN10 and BRSK1 show that KIN11 and BRSK1 can serve as the final confirmation of structural homology of the catalytic domains of human protein kinase BRSK1 and the KIN10 from *A. thaliana* (RMSD = 0.173). Comparison of 3D models showed less similarity of KIN11 with BRSK1 (RMSD = 0.188) than KIN10 with BRSK1 (RMSD = 0.173).

In order to better understand the mechanisms of intracellular functioning of KIN10 protein kinase, intracellular localization of this enzyme was determined. For this purpose, constructs carrying the chimeric genes KIN10-BFP and KIN10-RFP were created. The protoplasts of BY-2 tobacco cell culture and the protoplasts of *A. thaliana* (Col-0) were transformed by obtained genetic constructs. It was found that the chimeric proteins KIN10-BFP and KIN10-RFP were found to be localized mainly in the submembrane region of protoplasts' cytoplasm. These results confirm the important role of KIN10 protein kinase in the regulation of cytoplasmic biochemical processes.

It was also important to investigate the level of *KIN10* gene expression in different organs of *A. thaliana*. The highest expression levels of the *KIN10* gene were recorded in the leaves. The lowest level of *KIN10* expression in the roots was identified. In comparison with the leaves, the expression level of the *KIN10* gene in

the roots was approximately seven times lower. The level of *KIN10* expression in the stem tissue was almost twice higher than in roots. In flowers, the *KIN10* expression level was elevated five times in comparison with roots. The obtained results show the important role of KIN10 protein kinase in the regulation of biosynthetic and signaling processes associated with photosynthesis and sugar metabolism.

The levels of *KIN10* expression under salinity, osmotic and metabolic stress, after 2, 8, and 24 hours were analyzed. It was found that in wild-type *A. thaliana* plants (Col-0), grown under stress conditions of salinity, osmotic and metabolic stress have significant variations on *KIN10* expression level. The lowest level of *KIN10* expression was recorded after 2 h of stress *учшыгку*. After 8 h, an increase in the expression of this gene was observed on average by almost five times under the conditions of all the stresses used in the study. After 24 h of cultivation under stress conditions tors, the levels of *KIN10* expression were reduced by 20-30% compared to treatment for 8 h. It should be noted, that the highest expression levels of *KIN10* were detected under metabolic stress in all samples.

Changes in the growth and development of the primary roots of seedlings of transgenic *A. thaliana* lines with overexpression and RNA interference of *KIN10* and wild-type (Col-0) under normal conditions and under energy stress were analyzed. Among all investigated *A. thaliana* lines, wild-type seedlings (Col-0) were characterized by the longest root length on both standard MS and sucrose free MS media. In the line with overexpression of *KIN10* (OX) on the sucrose free medium the root length was two times shorter than on MS medium with sucrose. This may indicate a possible increase in plant sensitivity to sucrose deficiency and accelerate the formation of a stress response. It is also assumed that in order to maintain overexpression of *KIN10*, the plant spends more of its resources, which may affect its growth and development under normal conditions.

In comparison with seedlings overexpressing *KIN10*, the root length of the seedlings of the line with RNA interference of the *KIN10* gene (RNAi) on sucrose

free MS medium was two times shorter at 0 and in 24 h. Roots in seedlings with RNA interference were almost three times shorter compared to roots of seedlings with overexpression *KIN10* in 48 and 72 h of cultivation. It may be due to disturbances in the signaling processes regulated by the *KIN10* gene product. On MS medium with sucrose, the length of the roots of seedlings with RNA interference was four and five times longer (in 0 and 24 h) and seven and nine times (in 48 and 72 h) compared to seedlings that grew on a sucrose free MS medium. It can be assumed that the suppression of *KIN10* gene was not a critical factor for their normal development. On contrary, in order to maintain overexpression of *KIN10*, the plant spends more of its resources, which can affect its growth and development.

To better understand the involvement of SnRK1 protein kinases in cell division processes, the mitotic index of root apical meristem cells in seedlings of knockout mutant lines *kin10* and *kin11* *A. thaliana* under normal conditions and in conditions of energy deficiency was determined. The mitotic index of root apical meristem cells was lower in seedlings of mutant lines *kin10* and *kin11* compared to wild-type. In particular, it was almost three times lower when plants were grown on a medium with sucrose. Under condition of energy deficiency, the mitotic index was also five times lower in both mutant lines. Mutants growing under conditions of energy deficiency had a lower mitotic index than seedlings growing under normal conditions.

The correlation of expression levels of marker genes for cell proliferation under normal conditions and under conditions of energy deficiency in knockout mutants *kin10* and *kin11* was also analyzed. *CYCB1; 1* (AT4G37490), a cyclin-dependent protein kinase gene that is an important regulator of cell division and phase transition during the cell cycle, and *AtBRCA1* (AT4G21070), a plant homologue of animal *BRCA1* involved in cell cycle regulation and centrosome duplication by regulating the nucleation of microtubules were used as marker genes.

In both mutant lines, the expression levels of the *CYCB1; 1* and *AtBRCA1* genes were lower than in the wild-type line. In particular, in the *kin10* line, under energy deficiency conditions, expression was lower in both *CYCB1; 1* (almost four-fold) and *AtBRCA1* (approximately seven-fold) compared to normal conditions. In the *kin11* mutant line, expression was also lower in both *CYCB1; 1* (almost three-fold) and *AtBRCA1* (almost five-fold) under energy deficiency conditions than under normal conditions.

In order to confirm the correlation between cell division and the expression level of the *KIN10* and *KIN11* genes, the expression levels of the target genes in *A. thaliana* cell suspension culture and in intact seedlings were compared. It is known that suspension cells have higher mitotic index compared to cells of intact seedlings. In our opinion, this indicator may also correlate with the level of gene expression of the studied protein kinases KIN10 and KIN11. Higher (almost 2.5-fold) levels of *KIN10* and *KIN11* gene expression were recorded in *A. thaliana* suspension culture cells compared to intact seedlings.

The distribution of γ -tubulin fluorescence in meristematic root cells of knockout mutants *kin10* and *kin11*, which may correlate with its amount, was also determined by estimating the fluorescence intensity after immunofluorescence staining with specific monoclonal antibody against γ -tubulin. Determination of the fluorescence intensity of γ -tubulin in meristematic cells of mutant lines was performed on seedlings that grown under normal conditions (in the presence of sucrose) and under energy stress. Mutant lines showed a lower level of γ -tubulin fluorescence than Col-0, both under normal conditions and under energy stress. The fluorescence intensity of γ -tubulin was lower (almost 2-fold for *kin10* and 0.5-fold for *kin11*) in mutant lines grown under energy deficiency compared to controls. A decrease in the fluorescence intensity of γ -tubulin in meristematic cells of the roots of knockout mutants *kin10* and *kin11* may indicate a decrease in mitotic activity in the cells of these plants. Moreover, the fluorescence intensity of γ -tubulin and mitotic index in knockout mutants *kin10* were lower than in *kin11*.

In order to assess the interaction of the catalytic subunit of KIN10 with γ -tubulin the colocalization of KIN10 and γ -tubulin in seedling root cells of *A. thaliana* was also investigated. The results of immunofluorescence microscopy analysis indicate the colocalization of signals from specific antibody-labeled antigens - γ -tubulin and KIN10 - in cell cytoplasm. Such colocalization of fluorescent signals from γ -tubulin and KIN10 may indicate a direct functional interaction of these two proteins in the studied cells.

Due to the significant similarity of KIN10 and BRSK1, it is possible to assume a certain identity of the respective phosphorylation sites. As a result, a potential phosphorylation site of γ -tubulin at the Ser-131 residue was found. We suppose that KIN10 protein kinase can directly phosphorylate Ser-131 in both isoforms from *A. thaliana* similar to protein kinase BRSK1. Such changes may affect the structure of the small γ -tubulin complex γ TuSC in *A. thaliana*, as well as the subsequent formation of the ring γ -tubulin complex γ TuRC, which is one of the critical factors in the regulation of cell division. Thus, we can assume the connection of protein kinase KIN10 with the regulation of the structure and functions of the primary microtubule-organizing center similar to its closest animal homologue - protein kinase BRSK1.

Key words: protein kinase SnRK1, γ -tubulin, expression level, *A. thaliana* seedlings, transgenic lines, mitotic index, fluorescence.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ПРОТЕЇНКІНАЗИ ТА ЇХ ФУНКЦІЇ В РОСЛИНАХ.....	26
1.1.Протеїнкінази та їх класифікація.....	26
1.2.Рослинні серин/треонінові протеїнкінази та їх роль у регуляції клітинних процесів.....	28
1.3.Характеристика підродина SnRK1 протеїнкіназ та її гомологів.....	34
1.3.1. Структура SnRK1.....	35
1.3.2. Регуляція активності SnRK1 у рослинах.....	36
1.3.3. Функції SnRK1.....	39
1.3.4. Гомологи SnRK1.....	43
1.4.Роль протекінкіназ у регуляції цитоскелета рослин.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	56
2.1. Характеристика рослинного матеріалу	56
2.2. Характеристика реактивів, використаних у роботі.....	56
2.3. Біоінформатичний аналіз.....	57
2.4. Робота з рослинним матеріалом та моделювання стресових умов.....	64
2.5. Створення генетичних конструкцій з химерними генами <i>KIN10-RFP</i> та <i>KIN10-BFP</i> та трансформація протопластів <i>A. thaliana</i> та суспензійної культури ВУ-2.....	65
2.6. Молекулярно-генетичний аналіз експресії генів <i>KIN10</i> і <i>KIN11</i> в рослинах та суспензійній культурі <i>A.thaliana</i>	71
2.7. Аналіз росту та розвитку головних коренів трансгенних ліній <i>A. thaliana</i>	74
2.8. Визначення мітотичного індексу в клітинах проростків та суспензійної культури <i>A.thaliana</i>	74

2.9. Імунофлуоресцентний аналіз розподілу γ -тубуліну в коренях нокаутних мутантів <i>A. thaliana</i>	76
2.10. Статистична обробка отриманих даних.....	78
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	79
3.1. Кладистичний аналіз SnRK1 протеїнкіназ та їх гомологів.....	79
3.1.1. Результати NJ-кластеризації та філогенетичний аналіз.....	79
3.1.2. Аналіз та порівняння 3D-моделей каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 та KIN11 з каталітичним доменом протеїнкінази BRSK1 людини.....	84
3.2. Дослідження внутрішньоклітинної локалізації KIN10 в протопластах <i>A. thaliana</i> та суспензійної культури BY-2.....	87
3.3. Оцінка рівнів експресії <i>KIN10</i> в різних органах <i>A. thaliana</i>	90
3.4. Визначення експресії <i>KIN10</i> за умов сольового, осмотичного та енергетичного стресів.....	93
3.5. Аналіз росту та розвитку головних коренів трансгенних ліній <i>A. thaliana</i> з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена <i>KIN10</i>	95
3.6. Зміни мітотичного індексу клітин проростків мутантних ліній <i>kin10</i> та <i>kin11</i> <i>A. thaliana</i> за умов енергетичного стресу	100
3.7. Розподіл γ -тубуліну в клітинах коренів нокаутних мутантів та колокалізація білка KIN10 з γ -тубуліном в клітинах кореня <i>A. thaliana</i>	107
3.8. Ідентифікація та реконструкція локалізації потенційного сайту фосфорилування γ -тубуліну протеїнкіназою KIN10 в структурі малого комплексу γ TuSC <i>A. thaliana</i>	112
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	118
ВИСНОВКИ.....	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128
ДОДАТОК.....	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БСА – бичачий сироватковий альбумін

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота

МС – живильне середовище Мурасіге-Скуга

МТ – мікротрубочки

RFP – червоний флуоресцентний білок

BFP – синій флуоресцентний білок

ПЕГ – поліетиленгліколь

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Протеїнкінази є однією з ключових груп ферментів, що беруть участь у регуляції широкого спектру біохімічних та клітинно-фізіологічних процесів шляхом зворотного фосфорилування-дефосфорилування білків. Їх функції та механізми дії можуть бути схожими в багатьох організмах. Існує певна еволюційна консервативність протеїнкіназ, причетних до таких фундаментальних процесів, як ріст, поділ та диференціація клітин, клітинна загибель тощо. Особливо це стосується протеїнкіназ, асоційованих з регуляцією функціонування цитоскелету, зокрема, мікротрубочок і, таким чином, перебігу мітотичних процесів в цілому [262, 263, 264].

Незважаючи на те, що механізми сигнальних каскадів в рослинах набагато складніші, ніж у тварин, вищі рослини мають велику кількість гомологів тваринних протеїнкіназ, які беруть участь в регуляції цитоскелету, зокрема структури мікротрубочок. До таких протеїнкіназ належать такі їх родини, як САМК, СК1, АUR, ТТК/МPS1, SLK, протеїнкінази НЕК та інші. Існують протеїнкінази, функціонування яких добре вивчено в тваринних клітинах, але зовсім мало відомо про функціонування їх гомологів в рослинних клітинах [196, 197].

Однією з таких протеїнкіназ є протеїнкіназа BRSK1 тварин (Brain-specific serine/threonine-protein kinase 1), яка відіграє ключову роль у дуплікації центросом. Механізми дії та функціонування протеїнкінази BRSK1 досить добре вивчені в тваринах. Протеїнкіназа BRSK1 бере участь в цілому ряді функцій в тваринних клітинах. Відомо, що BRSK1 є головним регулятором поляризації нейронів, опосередковуючи фосфорилування білків, пов'язаних з мікротрубочками [265, 266, 267, 268, 269].

Зокрема, ця протеїнкіназа фосфорилує не лише тау-білок та MAP2, але безпосередньо γ -тубулін. Однак, мало що відомо про можливі рослинні

гомологи протеїнкінази BRSK1. При проведенні пошуку її найближчих рослинних гомологів було ідентифіковано високу схожість протеїнкінази BRSK1 з представниками підродини SnRK1 протеїнкіназ *A. thaliana* [196].

Протеїнкінази SnRK1 є важливими факторами репрограмування транскрипційної активності та регулюють роботу більше, ніж 1000 генів. Ці ферменти найбільш залучені в процеси адаптації рослин до абіотичних та біотичних стресів. Протеїнкінази SnRK1 активуються при зниженні внутрішньоклітинного рівня глюкози, запускаючи зміни транскрипційного профілю, що сприяє відновленню клітинного гомеостазу, стимулюючи подальший ріст та розвиток рослин [10, 11].

Припускають, що саме протеїнкінази SnRK1 можуть виконувати функції у рослинних клітинах, подібні до функцій протеїнкінази BRSK1, зокрема, взаємодіяти з елементами цитоскелету та регулювати процеси клітинного поділу. Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених вивченню цих ферментів, участь протеїнкіназ SnRK1 в процесах клітинного поділу не з'ясована. Саме необхідністю вивчення цього питання і визначається актуальність даного дисертаційного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі клітинної біології і біотехнології та відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (ДУ «ІХБГ НАН України») в рамках бюджетних науково-дослідних робіт «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2012–2016 рр., номер держреєстрації 0112U001597) та «Дослідження відповіді рослин на дію абіотичних та біотичних чинників на клітинному та генетичному рівнях для покращення їх адаптивних властивостей до негативного впливу змін кліматичних умов» (2017–2021 рр., номер держреєстрації 0117U000909).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було дослідити особливості функціонування каталітичних субодиниць (KIN10 та KIN11) протеїнкіназ SnRK1, експресії їх генів за стресових умов, а також можливість залучення до поділу клітин *A. thaliana*.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1 Порівняти структуру каталітичних субодиниць (KIN10 та KIN11) протеїнкіназ SnRK1 з протеїнкіназою BRSK1 тваринного походження.

2 Створити конструкцію з химерним геном *KIN10-RFP* та вивчити внутрішньоклітинну локалізацію білка KIN10 у *A. thaliana*.

3 Порівняти рівні експресії гена *KIN10* в різних органах *A. thaliana*, а також їх зміни за умов дії осмотичного, сольового та енергетичного стресів.

4 Дослідити зміни росту та розвитку коренів трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту.

5 Дослідити вплив енергетичного стресу на проліферативну активність в проростках контрольних та мутантних нокаутних ліній *kin10* і *kin11* *A. thaliana*.

6 Порівняти рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* та маркерних генів проліферації в інтактних проростках та суспензійній культурі *A. thaliana*.

7 Проаналізувати особливості розподілу γ -тубуліну в клітинах коренів нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* та дослідити колокалізацію білка KIN10 з γ -тубуліном в клітинах кореня *A. thaliana* за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії.

8 Визначити роль протеїнкінази KIN10 у фосфорилуванні γ -тубуліну *A. thaliana* шляхом ідентифікації та реконструкції локалізації потенційного сайту фосфорилування в структурі малого γ -тубулінового комплексу γ TuSC.

Об'єкт дослідження. Структурні та функціональні характеристики представників серин-треонінових протеїнкіназ підродина SnRK1 (KIN10 та KIN11) *A. thaliana*.

Предмет дослідження. Особливості функціонування KIN10 та KIN11 у рослинах за нормальних та стресових умов, а також при поділі клітин *A. thaliana*.

Методи дослідження. У роботі були використані молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), ПЛР зі зворотною транскрипцією, клонування генів та створення генетичних конструкцій), цитологічні (лазерна скануюча конфокальна мікроскопія, світлова та люмінесцентна мікроскопія), біоінформатичні (кладистичний аналіз, структурно-біологічна оцінка взаємодії білків) методи та методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше за допомогою біоінформатичних підходів показано високу подібність каталітичних доменів протеїнкінази BRSK1 людини та протеїнкіназ SnRK1 (KIN10 і KIN11) *A. thaliana*. Вперше показано зниження росту коренів трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. За допомогою методів *in silico* доведено можливість фосфорилування цієї протеїнкіназою залишка Ser-131 в молекулі γ -тубуліну *A. thaliana*. Вперше зафіксовано зниження мітотичного індексу та зниження рівня флуоресценції γ -тубуліну у коренях нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту.

Практичне значення отриманих результатів. Вивчення особливостей функціонування протеїнкіназ SnRK1 (KIN10, KIN11) є важливим для розуміння сигнальних каскадів та механізмів формування адаптації рослин до умов енергетичного, осмотичного та сольового стресів. Отримані дані мають важливе значення для розуміння впливу енергетичного, осмотичного та сольового стресів на корінь рослин. Зокрема, вони можуть

бути використані як підґрунтя для подальшої розробки практичних підходів вирощування рослин в умовах дії абіотичних стресів. Результати досліджень можуть бути використані у навчальному процесі під час підготовки фахівців з клітинної та молекулярної біології.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було обрано тему наукового дослідження, здійснено постановку наукових завдань, інтерпретацію отриманих результатів, розробку структури дисертаційної роботи та підготовлено публікації за результатами проведених досліджень. Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертації, проведено основні експериментальні дослідження та викладено основні положення дисертаційної роботи.

Апробація роботи. Основні наукові положення, висвітлені в дисертаційній роботі, були представлені на XI-й Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна-2013: Біологічні науки» (Київ, Україна, 18-22 березня, 2013), Міжнародній науковій конференції «Селекційно-генетична наука і освіта», (Умань, Україна, 18-20 березня, 2013); 17-й Міжнародній Пушинській школі-конференції молодих вчених «Биология - наука XXI века» (Пушино, Росія 21-26 квітня, 2013); X-й Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, Україна, 14-18 вересня 2015); Міжнародній конференції молодих вчених «Actual Problems of Microbiology and Biotechnology» (Одеса, Україна, 1-4 червня, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, Україна, 3-7 жовтня 2016); X-й Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, Україна, 2-6 жовтня 2017); III-й конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (Київ, Україна, 16-18 травня 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, з них 8 статей та 6 тез доповідей у профільних виданнях та збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 160 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 269 посилань. Дисертаційна робота містить 25 рисунків, 1 таблицю, 1 додаток.

РОЗДІЛ 1

ПРОТЕЇНКІНАЗИ ТА ЇХ ФУНКЦІЇ В РОСЛИНАХ

(огляд літератури)

1.1. Протеїнкінази та їх класифікація

Процес фосфорилування, що здійснюють протеїнкінази, є одним з ключових регуляторних механізмів, які відбуваються у сигнальних каскадах живої клітини. Фосфорилування – це динамічна посттрансляційна модифікація білка, що дозволяє створювати та інтегрувати зовнішньо- та внутрішньо-клітинні сигнали. Приєднання чи від'єднання фосфатної групи впливає на структуру білка та відповідно на його функції. Саме фосфорилування може регулювати взаємодію між патернами білків, що формують певні білкові комплекси відповідно до їх функцій [1, 2, 3].

Протеїнкінази відіграють основну роль у контролі фосфорилування білків, яке регулює практично всі аспекти активності живої клітини. Ці ферменти поділяються на типові еукаріотичні протеїнкінази (ePK), що мають значну структурну схожість своїх кіназних доменів, які складаються з 250-300 амінокислот і відповідають за реакцію фосфорного перенесення та нетипові еукаріотичні протеїнкінази, що не мають такої подібності [3].

Еукаріотичні протеїнкінази складають велику суперродину, що включає в себе сотні тисяч представників, які є складовими всіх клітинних функцій у всіх типах еукаріотичних організмів. Кількість генів, які кодують ці ферменти складає від 1,5 до 2,5% всіх еукаріотичних генів. Еукаріотичні протеїнкінази беруть участь в регуляції найрізноманітніших клітинних процесів, включаючи диференціювання клітин, апоптоз, міграцію, аутофагію, нейрональну пластичність та ін. [4, 5]. Загалом протеїнкінази здійснюють регуляцію більшості біохімічних процесів, які відбуваються у клітині, особливо тих, що беруть участь в міжклітинних комунікаціях та координації клітинних процесів [6].

Попри присутність у всіх типах протеїнкіназ спільного консервативного домену, це надзвичайно динамічні та специфічні структури. Ці ферменти відіграють роль молекулярних перемикачів, що вмикаються і вимикаються за допомогою дуже точних біологічних механізмів. Подібні механізми зазвичай ініційовані зовнішніми сигналами, а саме: гормонами, нейромедіаторами, дефіцитом поживних речовин та будь-якими іншими стресовими факторами [7].

Активація мембранних рецепторів викликає запуск складних каскадів активації ферментів, що переважно призводить до вторинного синтезу різних продуктів реакцій та фосфорилування або дефосфорилування цільових білків. Подібні цитоплазматичні сигнали призводять до запуску різних швидких фізіологічних реакцій та тимчасового регулювання активності ферментів, іонних каналів, білків цитоскелету, та багатьох інших клітинних структур. Крім того, ці сигнали можуть розповсюджуватись також у ядро, де викликають довготривалі зміни у експресії тих чи інших генів. Дія деяких протеїнкіназ є специфічною, такі ферменти мають один або декілька субстратів. Інші протеїнкінази є багатофункціональними та мають широкий спектр білків-субстратів [8].

В залежності від того, на які амінокислотні групи у структурі білка переноситься залишок фосфату, протеїнкінази еукаріот поділяють на п'ять великих класів. Представники протеїнкіназ першого класу переносять фосфат на гідроксильні (-ОН) групи серину та треоніну, другого класу переносять фосфат на гідроксильні (-ОН) групи тирозину. Протеїнкінази третього класу утворюють фосфоамідний зв'язок та переносять залишок фосфату на атоми таких амінокислот, як гістидин, лізин чи аргінін. Ферменти четвертого класу фосфорилують залишки цистеїну в структурі білка, а протеїнкінази п'ятого класу здатні фосфорилувати залишки аспарагінової та глютамінової кислот. Деякі протеїнкінази мають змішану кіназну активність та є подвійноспецифічними, що дозволяє їм переносити фосфат на гідроксильні (-ОН) групи серину, треоніну та тирозину [9].

1.2. Рослинні серин/треонінові протеїнкінази та їх роль у регуляції клітинних процесів

Серед усіх класів протеїнкіназ, найпоширенішим вважаються саме серин/треонінові протеїнкінази. Якщо, наприклад, тирозинові протеїнкінази характерні тільки для тварин, а гістидинові — для рослин та бактерій, то серин/треонінові протеїнкінази були знайдені у всіх групах організмів та присутні у кожного окремого виду [10, 11]. Ці ферменти є важливими елементами таких процесів як диференціація клітин, ріст, морфогенез, апоптоз та ін. Протеїнкінази також можуть брати участь у багатьох клітинних процесах побічно, шляхом регуляції клітинного циклу [11, 12].

Цікавою родиною серин/треонінових протеїнкіназ є кальцій/кальмодулін залежні протеїнкінази (Calcium-dependent protein kinase — CDPK). Регуляція цих протеїнкіназ відбувається за рахунок зв'язування Ca^{2+} з висококонсервативним кальцій-зв'язуючим білком кальмодуліном. CDPK-кінази є унікальними для рослин, оскільки відсутні в тварин та грибах. Варто зауважити, що представники цієї родини були знайдені в найпростіших, таких як *Paramecium tetraurelia* та *Plasmodium falciparum*. Близько 72 членів CDPK були ідентифіковані у геномі *A. thaliana*. В інших рослинах CDPK також представлені великою різноманітністю ізоформ. Загалом CDPK є однією з найбільш чітко визначених родин рослинних протеїнкіназ [13, 14].

При порівнянні з протеїнкіназами ссавців виявилось, що CDPK найбільш подібні до тваринних CaMK-кіназ (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase), які також є важливими компонентами сигнальної системи у тваринній клітині. CaMK-кінази беруть участь у регуляції транскрипції та багатьох інших важливих клітинних реакціях, що запускаються шляхом підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} [15].

Іншою цікавою родиною серин/треонінових протеїнкіназ є рецептор-подібні кінази (receptor-like protein kinases — RLKs), що представляють

собою клас трансмембранних протеїнкіназ подібних до RTK-кіназ (Receptor tyrosine kinases) ссавців [16]. Родина RLK є компонентом сигнальних шляхів, що формують клітинну відповідь на дію різноманітних стимулів. Зокрема вони беруть участь в сигнальних процесах, обумовлених роботою брасиностероїдів, розвитку меристеми, сприйняття флагеліну, контролі розвитку та опаданні листя та ін. Ця родина протеїнкіназ характеризується наявністю N-кінцевого гідрофобного хвоста, прикріпленого до мембрани, та цитоплазматичного кіназного домена. Тільки в *A. thaliana* було виявлено близько 300 членів цієї родини [17, 18].

Також до серин/треонінових протеїнкіназ належить велика родина мітоген-активуючих кіназ (Mitogen-activated protein kinase — MAPK). За амінокислотною послідовністю свого кіназного домену MAPK протеїнкінази належать до різних груп, але функціонально об'єднуються в каскади фосфорилування, що діють у напрямку MAPKKK—> MAPKK—> MAPK [19]. В рослинах ці каскади вивчені недостатньо, але вважається, що MAPK протеїнкінази активуються через малі G-білки, які в своїй активній формі безпосередньо взаємодіють з MAPKKK. Під час активації сигнальних каскадів регулюється активність низки функціональних білків, у тому числі транскрипційних факторів. MAPK активуються у відповідь на дію фітогормонів і таких стимулів як дотик, холодний шок, паводок, різні фізичні пошкодження, інфекції та ін.. Представники цієї родини протеїнкіназ описані також для люцерни, тютюну, вівса, петунії та багатьох інших видів рослин [20].

Загалом MAPK-кінази є універсальними посередниками передачі сигналу у еукаріот [21]. Зокрема в клітинному сигналінгу *A. thaliana* знайдено близько 100 генів, які можуть викликати експресію різних MAPK-кіназ та відповідно інтегрувати перехресне фосфорилування різних сигнальних шляхів [22, 23].

В деяких роботах було показано, що інгібування у рослинах різних MAPK-кіназ зумовлює пониження стійкості до дії стресів різної природи та

накопичення саліцилової кислоти. Проте гіперекспресія генів, що кодують МАРК, посилює стійкість рослин до різних захворювань та стресових факторів. Також важливою особливістю більшості МАРК є те, що активація цих ферментів короткочасна. Це пов'язано з тим, що при активації МАРК стимулюється транскрипція МАРК-фосфатаз подвійної специфічності [24].

Іншою важливою родиною серин-треонінових протеїнкіназ є циклін-залежні кінази (Cyclin-dependent kinase — CDK). Загалом CDKs є невеликими білками та мають мінімальний кіназний домен (34 кД), в комплексі з різними циклінами можуть виконувати різні функції. Варто зауважити, що CDKs є невід'ємними елементами сигнальних шляхів. CDKs важливі регулятори клітинного циклу та беруть участь у рості та диференціації клітин [25].

Також представники цієї групи беруть участь в пристосуванні рослин до абіотичних стресів [26]. Активність CDKs регулюється взаємодією з іншими білками, а також шляхом фосфорилування чи дефосфорилування іншими кіназами та фосфатазами. У вільному стані ці ферменти є каталітично неактивними та набувають кіназних властивостей тільки після зв'язування з циклінами [27].

Гени рослинних циклін-залежних протеїнкіназ *CDK* поділяють щонайменше на шість класів А-Е. Чотири з них беруть участь в регуляції клітинного циклу рослин. Зокрема було показано, що *CDKA* регулює G1/S та G2/M фази мітозу. Інгібування *CDKA* в *A. thaliana* призводить до летальності зародку [28].

Функціональна активність CDK залежить від того, з якими циклінами вони будуть асоціюватися. Субстрати CDK-комплексів включають у себе транскрипційні регулятори, білки цитоскелету, ядерні та мембранні білки, а також безліч інших білків клітинного циклу [29].

До серин-треонінових протеїнкіназ також належить родина казеїн-кіназ (Casein Kinase 1 — СК1 та Casein Kinase 2 — СК2). Казеїн-кінази були знайдені як в рослинних, так і в тваринних організмах. Ці ферменти беруть участь у клітинному поділі та процесах обміну речовин. СК поділяють на дві

підгрупи СК1 і СК2, що значно відрізняються одна від одної за просторовою структурою та амінокислотною послідовністю, але мають деякі подібності у функціях [30]. Вважається, що активність СК1 і СК2 не має чіткого контролю. Загалом, ці протеїнкінази забезпечують конститутивний рівень фосфорилування, а їх регуляція здійснюється за рахунок активності протеїнових фосфатаз [31].

Члени підгрупи СК1 є високо консервативними мономерними білками. Вони локалізовані як в цитоплазмі, так і в ядрі та беруть участь у процесах репарації ДНК, клітинного циклу, цитокінезі, везикулярному транспорті, морфогенезі та розвитку коренів. Велике різноманіття ізоформ СК1 було виявлено у різних видів рослин, а саме: арабідопсисі, рисі, пшениці, кукурудзі та ін.[32, 33].

Інша підгрупа СК2 має переважно ядерну локалізацію та виконує різні регуляторні функції. На сьогоднішній день відомо більше 300 субстратів цієї підгрупи. Більшість субстратів являють собою регуляторні білки, що беруть участь в найрізноманітніших клітинних процесах, пов'язаних з виживанням клітини та цілого організму [34].

Важливою родиною серин/треонінових протеїнкіназ рослин є SnRK (sucrose non-fermenting-related kinase) протеїнкінази. Рослинні протеїнкінази SnRK, утворюють велику родину сигнальних білків. SnRK є необхідними елементами широкої низки різноманітних процесів у живій клітині. Зокрема SnRK протеїнкінази є важливими регуляторами метаболізму та стресової відповіді [35].

Ці ферменти активуються переважно за умов дії стресу, коли знижується рівень глюкози та аденозитрифосфатів, а концентрація АМФ підвищується. Процеси, що регулюються SnRK протеїнкіназами, спрямовані на зниження рівня активності біосинтетичних процесів та активацію альтернативних катаболічних шляхів. Це сприяє підвищенню рівня АТФ, та перерозподілу енергетичних ресурсів на адаптаційні потреби [36]. На

сьогоднішній день відомо близько 38 членів цієї родини в *A. thaliana*, що в цілому поділяють на три підродини: SnRK1, SnRK2 та SnRK3 [37].

SnRK1. Підродина SnRK1 відіграє важливу роль у регуляції вуглецевого метаболізму та енергетичного статусу, тоді як SnRK2 та SnRK3 мають потенційні функції в сигнальних шляхах, що опосередковуються стресом та абсцизовою кислотою (АБА) [38]. Протеїнкінази SnRK1 фосфорилують та інактивують ряд важливих метаболічних ферментів, таких як нітрат-редуктаза (NR), сахарозофосфатсинтаза (SPS) та 3-гідроксиметил-3-метилглутарил-кофермент А редуктаза (HMGR) [39, 40].

Також представники SnRK1 є незамінними компонентами в реакціях стресової відповіді рослин на посуху, вуглеводний дефіцит, холод, гіпоксію, сольовий та осмотичний стреси, вірусну інфекцію та ін. [41]. Більш того, активність протеїнкіназ SnRK1 необхідна для росту рослин під час темряви [42]. У порівнянні з SnRK2 та SnRK3, SnRK1 є найближчими гомологами тваринних АМФК (AMP activated protein kinases) та протеїнкіназ комплексу SNF1 (Sucrose non-fermenting 1) з дріжджів [43], що підкреслює унікальність цієї підродини та виділяє її з інших SnRK.

SnRK2. SnRK2 являє собою невелику підродину протеїнкіназ. Відомо, що SnRK2 є менш консервативними ніж SnRK1, та притаманні лише рослинам [38]. Використовуючи комп'ютерне моделювання, було показано, що SnRK2 мають більшу ідентичність з SnRK3 ніж з SnRK1 [44].

SnRK2 активуються переважно при дії різних стресових чинників, а саме: дефіцит поживних речовин, холод, посуха, засолення ґрунтів та ін. [45]. Але як саме відбувається активація цих протеїнкіназ під час передачі сигналу про стрес в рослині та як відбувається трансдукція стресових сигналів, залишається невідомим.

Відомо, що SnRK2 є позитивним регулятором посухостійкості в коренях рослин *A. thaliana*. Також припускається, що SnRK2 опосередковують сигнали ініційовані під час посухи та є одним з ключових регуляторів закриття продихів. Деякі роботи свідчать про те, що активність

деяких SnRK2 може регулюватися кальцієм [46]. Протеїнкінази SnRK2 регулюють роботу низки генів, які активуються під час впливу різних стресових факторів, зокрема: *RD29A*, *COR15A*, та *DREB1A/CBF3*. Загалом геном *A. thaliana* містить близько 10 генів SnRK2 [47].

Було показано, що саме АБК стимулює активність цієї підродини протеїнкіназ. Хоча АБК не бере участі в регуляції експресії генів SnRK2 [48, 49]. Важливе значення SnRK2 зафіксовано у регуляції сигнальних процесів обумовлених АБК, а саме проростання насіння та ріст коренів. Лише кілька білків були ідентифіковані як субстрати SnRK2, в тому числі BZIP (basic leucine-zipper) фактори транскрипції, що беруть участь у регуляції АБК-чутливих генів та іонні канали SLAC1 (Slow anion channel-associated 1) та KAT1 (K⁺ transport systems), які є ключовими елементами у АБК-регуляції руху протонів [50]. Цікаво, що АБК може активувати тільки п'ять з дев'яти підкласів SnRK2. Механізми активації та подальші біохімічні реакції за участю цієї підродини недостатньо вивчені [51].

Також відомо, що протеїнофосфатази 2С групи А (PP2Cs — Group A protein phosphatases type 2C) інгібують роботу SnRK2 [52]. Інгібування та мутації представників SnRK2 призводять до деяких дефектів проростання насіння, гальмування росту проростків та порушеної регуляції відкриття протонів. В таких рослин спостерігаються експресія стрес-чутливих АБК-генів та відповідно різке зниження толерантності рослин до посухи [53, 54].

SnRK3. Протеїнкінази підродини SnRK3, також відомі як СІРКs (CBL-interacting protein kinases) або PKs (SOS2-like protein kinase) представлені найбільшим різноманіттям рослинних SnRK. В *A. thaliana* було знайдено близько 25 генів SnRK3 [55, 56]. Порівняно з SnRK1 та SnRK2, представники SnRK3 не мають схожості С-кінцевих доменів [57]. Також показано, що протеїнкінази SnRK3 взаємодіють з кальциневрін В-подібним кальмодулін-зв'язуючим білком (CBL — calcineurin B-like protein) [58].

Представники SnRK3 також відіграють важливу роль в формуванні рослинної відповіді на дію різних стресів. Зокрема протеїнкінази цієї групи

беруть участь в адаптації рослин до високих концентрацій натрію та низьких рівнів калію [59]. Вважається, що дія різних стресових сигналів спричиняє специфічні взаємодії між *CBL* та *SnRK3*, що призводять до зміни в експресії генів та формуванні відповідних змін у фізіологічному статусі рослин [60].

Також було показано, що за умов дії стресу АБК може ініціювати експресію *CBL* та генів *CIPK3* [61]. Гіперекспресія певних представників *SnRK3* модулює гіперчутливість до АБК під час проростання насіння. Також протеїнкінази *SnRK3* беруть участь в процесах закриття продихів. Активність цих ферментів пригнічується сахарозою та посилюється цитокінінами, світлом та низькою температурою [62]. Загалом, попри всю різноманітність, механізми дії протеїнкіназ *SnRK3* є досить мало вивченими на сьогоднішній день. Відомо, що різні представники цієї групи можуть мати різноманітні функції в рослинах та впливати на експресію широкого спектру генів.

1.3. Характеристика підродина *SnRK1* протеїнкіназ та її гомологів

Серед усіх рослинних *SnRK*-кіназ найбільш консервативними протеїнкіназами є підродина *SnRK1*. Ця група протеїнкіназ відіграє важливу роль у регуляції метаболізму вуглеводнів та енергетичного балансу у еукаріот. *SnRK1* має ключову роль у регуляції анаболічних та катаболічних процесів, що беруть участь у формуванні рослинної відповіді на дію низки стресових факторів [41]. Властивості та функції *SnRK1* були широко вивчені в декількох представників рослинного царства, а саме ячмінь, арабідопсис, рис та ін. Проте незважаючи на велику кількість робіт, присвячених вивченню цих протеїнкіназ, функціональна роль *SnRK1* розкрита лише частково.

1.3.1. Структура SnRK1

SnRK1 протеїнкінази мають гетеротримерну структуру, що складається з $\alpha\beta\gamma$ субодиниць. Всі субодиниці SnRK1, що були ідентифіковані у рослинах *A. thaliana*, позначаються як AKIN. Зокрема, в *A. thaliana* було ідентифіковано дві субодиниці α (AKIN10 і AKIN 11), три β субодиниці (AKIN β 1, AKIN β 2 і AKIN β 3) та дві γ субодиниці (AKIN γ і AKIN $\beta\gamma$) [63].

Каталітична α -субодиниця SnRK1 складається з двох доменів: кіназного, що відповідає за каталітичну активність, та регуляторного. Кіназний каталітичний домен має канонічну складку, що складається з 11 субдоменів [64]. Регуляторний домен має дві основні частини: убіквітин-асоційований домен (UBA), що опосередковує взаємодію з убіквітиновими білками та кіназо-асоційований домен 1 (KA1), який відповідає за взаємодію з регуляторною субодиницею [65, 66].

В *A. thaliana* експресується дві каталітичні субодиниці SnRK1 — α 1 (AKIN10 або SnRK1.1) та α 2 (AKIN11 або SnRK1.2). Варто зауважити, що AKIN10 є домінуючою каталітичною субодиницею, її активність становить близько 90% від загальної кількості комплексів SnRK1 [66, 67]. У порівнянні з AKIN11, AKIN10 відіграє ключову роль у передачі сигналів пов'язаних з вуглеводним обміном та АБК. Також у геномі *A. thaliana* було ідентифіковано псевдоген каталітичної субодиниці SnRK1 α 3 (AKIN12) без виявленої кіназної активності [68, 69].

В *A. thaliana* було ідентифіковано три ізоформи регуляторної β -субодиниці SnRK1 — AKIN β 1 і AKIN β 2, та специфічна для рослин AKIN β 3 [70, 71]. Варто зауважити, що ізоформи AKIN β 1 та AKIN β 2 можуть змінювати своє місцеположення за допомогою N-миристилювальної регуляції [72], а AKIN β 1 та AKIN β 3 взаємодіють з нітратредуктазою, яка може бути фосфорильована SnRK1 [73].

Використовуючи рекомбінантний білок AKIN β 2 було показано, що AKIN β 2 може зв'язуватися з крохмалем, але виявляє слабкий зв'язок із

амілазою та амілопектином [73]. Однак інші експерименти з використанням рекомбінантних CBD доменів AKIN β 1 та AKIN β 2 показали, що жоден з двох вуглевод-зв'язуючих модулів, розташованих в субодинацях AKIN β 1 та AKIN β 2, не взаємодіє з жодними вуглеводами, включаючи крохмаль [74]. Варто зауважити, що домен CTD β -субодинаці зв'язує α - та γ -субодинаці. Це може бути однією з головних функцій β -субодинаці SnRK1 протеїнкіназ [75].

Також в *A. thaliana* було ідентифіковано дві ізоформи регуляторних γ -субодинаць SnRK1. Дані субодинаці складаються з чотирьох тандемних мотивів цистатіонін- β -синтази, які можуть зв'язувати нуклеотиди аденіну для регулювання кіназної каталітичної активності SnRK1 [76]. В *A. thaliana* γ -субодинаця може взаємодіяти з AKIN β 1, AKIN β 2 та AKIN10 [77]. Загалом AKIN γ може мати деякі невідомі функції, що пов'язані з активністю SnRK1 у рослинах. Також припускається, що AKIN γ бере участь у передачі сигналів SnRK1 опосередковано [77, 78].

1.3.2. Регуляція активності SnRK1 у рослинах

Відомо, що активність SnRK1 протеїнкіназ може регулюватися зворотнім фосфорилуванням. Зокрема, консервативні залишки треоніну розташовані в Т-петлі α -субодинаць SnRK1 (Тре-175 в AKIN10 та Тре-176 в AKIN11). Фосфорилування цих залишків Тре в Т-петлі каталітичних субодинаць, є необхідним для активації протеїнкіназ. [74, 79]. Варто зауважити, що стан фосфорилування Т-петлі SnRK1 не впливає на експресію генів регульованими SnRK1 [66].

Стан фосфорилування Т-петлі SnRK1 залишається незмінним, навіть якщо активність SnRK1 змінюється у відповідь на дію різних стресів та їх усунення [38, 69]. Ці результати дозволяють припустити, що SnRK1 активуються декількома механізмами. Крім того, консервативні залишки, що зв'язуються з АТФ (за участю К48 в AKIN10 та К49 в AKIN11) необхідні для

активності протеїнкінази, оскільки мутація лізину на цих залишках інактивує її [79].

Також було знайдено декілька висхідних фосфатаз SnRK1. Дві з цих висхідних фосфатаз, такі як АБІ (АБІ — abscisic acid insensitive) та протеїн фосфатаза 2СА (PP2CA), інактивують SnRK1 шляхом дефосфорилування. Такі дані вказують на зв'язок між SnRK1-опосередкованим шляхом та АБК-сигнальним шляхом [66]. Інша фосфатаза 2С-типу (PP2C), PP2C74, також взаємодіє з AKIN10 *in vitro* [80]. Таким чином фосфатази є потенційними регуляторами SnRK1. Незважаючи на ідентифікацію більшості фосфатаз SnRK1 протеїнкіназ, детальний регуляторний механізм SnRK1 шляхом зворотнього фосфорилування незрозумілий.

Активність SnRK1 також може регулюватися іншими посттрансляційними механізмами, включаючи убіквітинування та малу модифікацію білка убіквітину (SUMO) (SUMOylation). Одним з прикладів такої регуляції є деградація AKIN10 убіквітиною лігазою [81]. На основі біоінформатичного аналізу, було показано, що AKIN10 має передбачувані сайти приєднання SUMO [82]. Більш того, активність SnRK1 також може регулюватися N-миристилюванням AKIN β 1 та AKIN β 2 на плазматичній мембрані. При запобіганні N-миристилювання AKIN β 1 субодиниця переміщується в ядро, а AKIN β 2 — у цитоплазму. У рослинах з мутацією N-миристилтрансферази 1 (nmt1-) активність SnRK1 зростає в 5 разів, тоді як експресія гена *AKIN β 1* збільшується вдвічі, на відміну від генів *AKIN β 2* та *AKIN β 3*, експресія яких зменшується [72]. Ці результати показують, що N-миристилювання субодиниць AKIN β може бути негативним регулятором активності SnRK1.

Активність SnRK1 може регулюватися кількома цукрами та їх фосфатами [39, 74]. Зокрема, інактивацію SnRK1 здійснюють: трегалоза-6-фосфат (Т6Р), глюкозо-1-фосфат (G1P), глюкозо-6-фосфат (G6P), фруктозо-1,6-бісфосфат, а також глюкоза та сахароза [79, 83,84].

Відомо, що T₆P інгібує активність SnRK1 [86]. Зокрема було показано, що T₆P інгібує активність SnRK1 при фізіологічних концентраціях *in vitro* у присутності невідомого фактора, ймовірно, теплостійкого білка. Цей невідомий білок присутній тільки у молодих рослинних тканинах, зокрема в проростках [87].

Показано, що за умов присутності невідомого білка, G1P та G6P також інгібують SnRK1 в саджанцях *A. thaliana*. Інгібувати активність SnRK1 можуть рибоза-5-фосфат (R5P) та рилулоза-5-фосфат (Ru5P). Проте фруктозо-6-фосфат (F6P) та уридин-5'-дифосфоглюкоза (UDPG) не здійснюють інгібування SnRK1 [84]. Інгібування активності SnRK1 також може здійснювати каталаза (CAT), шляхом локальної дисмутації H₂O₂ [88]. Відомо, що саме CAT є важливим регулятором рівня H₂O₂ в клітині. Хоча головне місце локалізації CAT є пероксисоми, цей фермент також локалізується в цитоплазмі, де може взаємодіяти та інгібувати протеїнкінази SnRK1 [88, 89].

Загалом активність SnRK1 протеїнкіназ інгібується цукрами та цукровими фосфатами шляхом відображення енергетичного статусу (доступності вуглецю) рослини. Коли знижується доступність вуглецю, супутнє падіння рівнів цукрів та цукрових фосфатів, активує механізми інгібування активності SnRK1. Активовані SnRK1 фосфорилують та інактивують кілька важливих метаболічних ферментів, які контролюють біосинтез стероїдів та ізопреноїдів, асиміляцію азоту для синтезу амінокислот та нуклеотидів, синтез сахарози та розподіл вуглецю [39, 40].

Також активність SnRK1 може регулюватися іншими механізмами. На основі проведених досліджень було показано, що SnRK1 протеїнкінази можуть взаємодіяти з міоїнозит-поліфосфат-5-фосфатазою 13 (5PTase13), яка бере участь у сигнальному шляху інозиту. За умов дії холоду 5PTase13 підвищує активність SnRK1. Проте, ця фосфатаза знижує активність SnRK1 в умовах енергетичного голодування [90].

Показано, що рекомбінантні та ендогенні SnRK1 протеїнкінази з трьохтижневих рослин *A. thaliana* інгібуються невідомим білковим фактором (> 30 кДа), екстрагованим з молодих листків *A. thaliana* [74]. Крім того, експресія регуляторних субодиниць AKIN β може регулюватися цукрами та світлом, але це безпосередньо не впливає на активність SnRK1. Зокрема, темрява сприяє експресії *akin β 1*, яка репресується сахарозою, хоча ці сигнали функціонують незалежно. В той час, експресія *akin β 2* не регулюється світлом. Крім того активність *akin β 3* регулюється тільки темрявою та є незалежною від цукру. Ці різні регуляторні патерни експресії генів субодиниць AKIN β є наслідком функціонування специфічних регуляторних послідовностей у їх власних промоторах [91].

1.3.3. Функції SnRK1

Протеїнкінази SnRK1 можуть індукувати значні транскрипційні зміни для активації катаболічних та інгібуння анаболічних шляхів [79]. Зокрема протеїнкінази SnRK1, як інтегратори транскрипційної мережі, фосфорилують ферменти та регулюють експресію генів багатьох білків для швидкого коригування та відновлення енергетичного балансу у рослинах. Комплекси SnRK1 є центральними регуляторами метаболічного гомеостазу клітин та мають вирішальне значення для нормального росту і розвитку рослин, а також формування відповіді на дію різних стресів [74].

Зокрема, *in vitro*, SnRK1 можуть фосфорилувати та інактивувати декілька метаболічних ферментів, таких як а) 3-гідрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктази, що є ключовим ферментом у шляху синтезу стероїду та ізопреноїду, б) сахарозо-фосфат-синтази, що бере участь у біосинтезі нітратредуктази, що є важливим елементом у першій стадії засвоєння нітратів, та в) трегалозо-6-фосфатсинтази 5 (TPS5), що бере участь у біосинтезі трегалозо-6-фосфату [92, 39].

Крім того, SnRK1 впливають на активність нефосфорилуючої гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (np-Ga3PDHase) в пшениці, яка бере участь у каталізуванні незворотнього окислення гліцеральдегід-3-фосфату (Ga3P) до 3-фосфогліцерата (3-PGA). 3-PGA є інгібітором SnRK1 протеїнкіназ в гліколізі [83]. SnRK1 фосфорилують сахарозо-синтазу, що опосередковано регулює активність ключового ферменту при деструкції сахарози [93]. Також було показано, що SnRK1 можуть фосфорилувати білки теплового шоку (HSP), які є важливими елементами в механізмах пристосування рослин до абіотичних стресів [94, 95]. Ці результати показують, що протеїнкінази SnRK1 є важливими інтеграторами, які беруть участь у регулюванні обміну вуглецю, азоту та ліпідів у рослинах.

Наприклад, AKIN10 фосфорилує продукти генів трехалози II класу — TPS 7 та TPS 8, за допомогою яких SnRK1 знижує рівень T₆P для підтримки своєї активності. Також AKIN10 може фосфорилувати фактор ініціації трансляції eIFiso4G1 та білок тирозинфосфатазу 1, який є первинною мішенню активних форм кисню (ROS) *in vitro* [96].

Крім того, було вивчено ступінь регуляції транскрипції каталітичної субодиниці AKIN10 в *A. thaliana*. Ідентифіковано 278 генів, які активує AKIN10, та 322 гени, репресовані цим ферментом [79]. Ці AKIN10-активовані гени в основному залучені у різні катаболічні процеси, такі як процеси деградації клітинної стінки, крохмалю, сахарози, амінокислот, ліпідів та білків, що продукують альтернативні джерела енергії і метаболіти для підтримки енергетичного балансу клітин. Тим не менш, існує багато генів, репресованих AKIN10, що беруть участь у енерговитратному біогенезі рибосом та в анаболізмі [79]. Більш того, шляхом регуляції транскрипції, AKIN10 позитивно активує процеси аутофагії [79].

Антисенсова репресія гена SnRK1 пшениці пригнічує транзиторну активність промотору гена α -амілази 2 в культивованих ембріонах пшениці [97]. Крім того, антисенсова супресія *SnRK1* (*PKIN1*) з картоплі може знижувати експресію генів та активність сахарозо-синтази. Такі дані

підтверджують значну роль SnRK1 у підтримці енергетичного балансу рослин, шляхом регуляції експресії генів, що кодують білки, пов'язані з метаболізмом рослин [98].

Комплекси SnRK1 також мають важливу регуляторну роль у рості та розвитку рослин. Зокрема, SnRK1 сприяють дозріванню насіння та гальмують його проростання шляхом позитивного регулювання АБК-сигналіngu [99, 100]. SnRK1 можуть регулювати деякі фактори транскрипції, що беруть участь у АБК-сигналіngu. Одним з таких елементів є транскрипційний фактор bZIP (basic region-leucine zipper transcription factor), що є регулятором дозрівання та проростання насіння [101, 102]. Гіперекспресія bZIP11 інгібує ріст рослин шляхом перепрограмування метаболізму, зокрема зниження рівня Т₆Р [103, 104].

Відомо, що Т₆Р є незамінним сигнальним метаболітом, який бере участь у регуляції росту та розвитку рослин, починаючи з контролю розвитку ембріодів до старіння листя, а також фотосинтезу, утилізації вуглеводів та біосинтезу крохмалю у відповідь на доступність вуглецю. Підвищені концентрації Т₆Р є показником високої доступності вуглецю у клітині. Шляхом фосфорилування SnRK1 можуть інактивувати трегалозу-6-фосфатсинтазу 5 [105, 106, 107]. Крім того, AKIN10 також підвищує експресію генів трегалозу-6-фосфатсинтази 8-11, що беруть участь у біосинтезі Т₆Р. Тим часом Т₆Р пригнічує активність SnRK1 [92, 79, 108, 109].

Мутанти *A. thaliana* з гіперекспресією bZIP11, накопичують Т₆Р та мають знижену активність SnRK1 [110]. В *A. thaliana* фактор транскрипції bZIP11 трансляційно репресується сахарозою [111]. Таким чином зв'язок між Т₆Р та SnRK1 обумовлюється механізмом: коли концентрація сахарози висока, збільшується і концентрація Т₆Р яка інгібує SnRK1 і, отже, bZIP11-залежну експресію генів. При зниженні рівня сахарози або вуглецю зниження Т₆Р активує SnRK1 і потім bZIP11-залежну експресію гена [110]. Такий механізм показує, що SnRK1 та Т₆Р регулюють комплексну сигнальну мережу у відповідь на різні рівні енергетичного статусу в рослинах.

Крім того, шляхом фосфорилювання протеїнкінази SnRK1 позитивно регулюють фактор транскрипції В3-домену FUSCA3, який є ключовим регулятором розвитку насіння та важливим компонентом в механізмах гормональної взаємодії в *A. thaliana* [112]. Також АБК посттрансляційно регулює активність SnRK1, інактивуючи білкові фосфатази групи А типу 2С (PP2Cs), які можуть дефосфорилювати та інактивувати SnRK1. АБК сприяє передачі сигналу SnRK1 під час стресу та усунення умов дефіциту енергії в *A. thaliana* [66]. Загалом АБК позитивно регулює транскрипцію генів SnRK1 [39, 66, 99, 100]. Таким чином, протеїнкінази SnRK1 є необхідними для АБК-опосередкованого дозрівання насіння та вмикання механізму зворотного зв'язку, що в свою чергу вмикає АБК-регулювання комплексів SnRK1 на декількох рівнях.

Антагоністична функція між гіберелінами та АБК відіграє важливу роль у регулюванні переходу від формування та розвитку проростання зародків до насіння [113]. Гіберелінова кислота, яка стимулює ріст та розвиток рослин, пригнічує експресію різних субодиниць SnRK1 [114]. Також протеїнкінази SnRK1 відіграють важливу регуляторну роль у вегетативному розвитку, старінні та цвітінні. Нокаутні мутанти *A. thaliana akin10* та *akin11* характеризуються раннім цвітінням, в той час, як гіперекспресія SnRK1 затримує вегетативний ріст, цвітіння та старіння [79].

Зазвичай гени каталітичних субодиниць AKIN10 та AKIN11 експресуються протягом усього життєвого циклу рослин *A. thaliana*, включаючи вегетативний розвиток і цвітіння. Адже за нормальних умов росту та розвитку експресія цих каталітичних субодиниць є незмінною в рослинах [69]. Більш того, активність протеїнкіназ SnRK1 показує зворотну залежність від віку рослин, тобто у саджанців загалом та молодому листі активність цих ферментів вища порівняно зі старими рослинами [115].

Крім того, представники SnRK1 сприяють експресії генів білків, що беруть участь у фотосинтезі [116]. AKIN10 активує експресію декількох генів, залучених до фотосинтезу та фотодихання в *A. thaliana* [79]. Зокрема

AKIN10 регулює експресію білка CP12-2 циклу Кальвіна в хлоропластах, який зв'язується з двома димерами фосфорибулокінази (PRK) та двома тетрамерами гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH), утворюючи стабільний і зворотній GAPDH-CP12-PRK комплекс, який призводить до інактивації обох ферментів [79, 117, 118]. PRK і GAPDH є важливими каталітичними ферментами у фазі регенерації та у фазі відновлення циклу Кальвіна-Бенсона відповідно. Гіперекспресія *AKIN10* пригнічує експресію транскрипційного фактора MYB75/PAP1, який індукує продукцію антоціаніну, що також регулюється сигнальним шляхом сахарози [79, 119].

Також каталітична субодиниця AKIN10 посилює експресію D-гліцерату 3-кінази, що каталізує утворення 3-PGA з гліцерату у фотодиханні і зв'язує останній з циклом Кальвіна-Бенсона, що сприяє повторному використанню вуглецю, отриманого з гліколяту [120, 121]. Крім того, фотосинтетичні проміжні продукти R5P та Ru5P можуть інгібувати SnRK1, що забезпечує регулювання зворотньої активності SnRK1 [84].

1.3.4. Гомологи SnRK1

SNF1. Найближчим гомологом SnRK1 протеїнкіназ вважається SNF1 протеїнкіназа дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, яку було ідентифіковано в 1981 році [122]. SNF1 є необхідним елементом в механізмах адаптації клітин дріжджів до дефіциту глюкози та росту клітин на альтернативних джерелах. SNF1 також фосфорилує геномні транскрипційні компоненти та гістони в ядрі, стимулюючи довгострокові коригування у відповідь на низький рівень глюкози [123].

Протеїнкіназа SNF1 подібно до SnRK1 має гетеротримерну структуру $\alpha\beta\gamma$ [124]. Геном *S. cerevisiae* кодує каталітичну α -субодиницю Snf1, три альтернативні β -субодиниці Sip1, Sip2 і Gal83, а також γ -субодиницю Snf4. Тому існують три альтернативних комплекси SNF1 [126].

α -Субодиниця Snf1 являє собою конститутивно виражений пептид, що складається з 633 амінокислотних залишків. Вона включає кіназний домен поблизу N-кінця та C-кінцеву регуляторну область [125, 126]. Активація каталітичної субодиниці Snf1 потребує фосфорилування Тре-210 в сегменті активаційної петлі, зміна Тре-210 на Ала, Глн або Асп призводить до інактивації протеїнкінази [127].

Також геном *S. cerevisiae* кодує три β -субодиниці Sip1, Sip2 та Gal83. Sip1 і Sip2 були знайдені як Snf1-взаємодіючі білки [128]. β -Субодиниці демонструють значне функціональне перекриття, оскільки кожна з них є достатньою для активації SNF1. β -субодиниці містять консервативні C-кінцеві послідовності, які опосередковують їх взаємодію з комплексом SNF1 [129].

γ -субодиниця Snf4 комплексу SNF1 є пептидом, що експресується і складається з 322 амінокислотних залишків [130]. Поверхневий заряд γ -субодиниці може змінюватися, впливаючи на взаємодію між α - та β -субодиницями. Таким чином Snf4 може регулювати каталітичну активність комплексу, зв'язуючи Snf1 та β -субодиниці, незалежно від наявності цукрів та їх фосфатів в клітині [131].

Протеїнкіназа SNF1 має важливу роль у різних життєво-чутливих процесах розвитку клітин, включаючи ранню та пізню стадії мейозу та споруляцію, старіння, гаплоїдний інвазивний ріст та диплоїдний псевдогіфальний ріст [86, 132, 133]. Крім того, SNF1 бере участь у клітинних відповідях на формування таких стресів як, тепловий шок, лужний рН, порушення іонного транспорту, генотоксичний стрес та ін. [134, 135, 136]. Загалом SNF1 впливає на клітинні регуляторні процеси за допомогою різних механізмів. Зокрема, SNF1 є важливим елементом у контролі геномної транскрипції. Також ця протеїнкіназа має прямий вплив на активність метаболічних ферментів, що беруть участь у метаболізмі жирних кислот та зберіганні вуглеводів [137].

Було ідентифіковано понад 400 генів, експресія яких залежить від активності SNF1 за умов дефіциту глюкози. Найбільше SNF1-залежних генів функціонує в транскрипції та сигнальній трансдукції, що підтверджує центральну регуляторну роль цієї протеїнкінази. SNF1 здійснює прямий вплив на транскрипцію через репресори [138], активатори [139], хроматин [140] і, наймовірніше, транскрипційний апарат [141]. Також SNF1 є позитивним регулятором аутофагії, процесів утилізації органел та макромолекул [142].

SNF1 впливає на багато генів, репресованих глюкозою, за допомогою контролю транскрипційного репресора Mig1, який функціонує спільно з корепресором Ssn6 (Cys8) -Tur1 [143]. SNF1 також регулює різні активатори транскрипції. Протеїнкіназа SNF1 необхідна для активації Cat8 та Sip4, які зв'язуються з елементом відповіді на джерело вуглецю, знайденим у глюконеогенних генах [144, 145].

АМФК. Іншим близьким гомологом SnRK1 протеїнкіназ є 5`АМФ-активована протеїнкіназа (АМФК) ссавців. Цей фермент було вперше ідентифіковано в 1973 році у печінці щурів [146, 147]. Подібно до своїх гомологів в рослинах та дріжджах, протеїнкіназа АМФК є важливим регулятором енергетичного гомеостазу у клітині. Підтримуючи та відновлюючи енергетичний гомеостаз, АМФК активує катаболічні шляхи для генерування АТФ та пригнічує біосинтетичні шляхи для збереження АТФ у відповідь на дію енергетичного стресу [148].

Однією з важливих функцій АМПК є сприяння поглинання глюкози, стимулюючи транслокацію транспортера глюкози типу 4 (GLUT4) до плазматичної мембрани, підвищуючи функцію глюкозного транспортера 1 (GLUT1) для стимулювання катаболізму глюкози під час скорочення м'язів [149, 150]. Підтримуючи гомеостаз, АМФК може здійснювати швидкі метаболічні зміни, фосфорилуючи білки в цитоплазмі, або поступово впливати на метаболічні процеси, регулюючи транскрипцію в ядрі.

Подібно до своїх гомологів, АМФК є гетеротримером та складається з трьох субодиниць α , β та γ у співвідношенні 1 : 1 : 1. α -субодиниця — каталітична: вона визначає активність комплексу протеїнкіназ, через який АМФК впливає на метаболічні шляхи на рівні білка та гена [151, 152]. Субодиниці β та γ - регуляторні; вони також частково беруть участь у модуляції активності кіназного комплексу [153].

Існує по дві ізоформи α - і β -субодиниць, та 3 ізоформи γ -субодиниці, кожна з яких кодується окремими генами. Таким чином, в клітині можливо 12 різних варіантів тримерної АМФК, що забезпечує широкий простір для тонкої регуляції її функцій. Така різноманітна ізоформна композиція свідчить про різноманітні клітинні функції АМФК, а також тканинну специфічність та субклітинну локалізацію [154].

Каталітична α -субодиниця комплексу АМФК являє собою білок з молекулярною масою 63 кДа [155]. α -Субодиниця включає в себе серин/треоніновий кіназний домен, аутоінгібіторний домен та послідовність, що відповідає за зв'язування β -субодиниці. Кіназний домен, який визначає кіназну активність комплексу, розташовується на N-кінці білка [156]. Головним компонентом кіназного домену є «активаційний мотив», що включає в себе первинний сайт активації АМФК — висококонсервативний треоніновий залишок, фосфорилування якого активує кіназний комплекс [157]. Кіназні домени майже ідентичні для обох ізоформ та мають 94% подібності [158].

β -Субодиниця вважається основою кіназного комплексу [159]. β -субодиниця (30 кДа) має дві специфічні області: глікоген-зв'язуючий домен та домен зв'язування α - та γ -субодиниць. Присутність глікоген-зв'язуючого домену дозволяє комплексу АМФК зв'язуватися з глікогеном та олігосахаридами з різною спорідненістю в залежності від ізоформи [160].

Найбільш важливою субодиницею АМФК є γ -субодиниця, оскільки вона здійснює функціонування комплексу як датчика рівня АМФ всередині клітини [161]. Залежно від ізоформи γ -субодиниці їх молекулярна маса

коливається від 38 до 63 кДа. Основна відмінність цих ізоформ полягає в довжині їх N-кінцевої послідовності [162]. Всі три ізоформи містять чотири еволюційно консервативних цистатіонін-бета-синтазних повторів. Головна функція цих повторів полягає в контролі внутрішньоклітинних метаболітів, зокрема, зв'язування аденінового нуклеотиду з АМФК [163].

Зазвичай АМФК активується в стресових умовах таких, як гіпоксія, ішемія, тепловий шок, оксидативний стрес, тривале скорочення м'язів [164]. Хоча АМФК активується АМФ при збільшенні його концентрації в клітині, ця протеїнкіназа не є прямим індикатором рівня АМФ. Насправді, АМФК реагує на зміни в співвідношенні АМФ/АТР як найбільш чутливого показника енергетичного статусу, що пояснюється конкурентоспроможним зв'язуванням АМФ і АТР з АМФК [165].

Також АМФК відіграє важливу роль у гормональному сигналінгу. АМФК може регулювати ендокринну систему, і в той же час її активність регулюється рядом гормонів, таких як лептин, інтерлейкін 6, резистин, грелін та адипонектин [166]. Крім того, АМФК контролює апетит через нейроендокринну систему, що робить її ключовим регулятором енергетичного обміну на рівні всього тіла [167]. Зміни активності цієї протеїнкінази може призводити до таких захворювань, як цукровий діабет 2-го типу, ожиріння та онкологічні захворювання.

Окрім метаболічних змін, АМФК також стимулює катаболізм жирних кислот, сприяючи їх перенесенню в мітохондрії та їх деградацію шляхом β -окислення [168]. АМФК стимулює катаболізм глюкози, збільшуючи гліколіз через фосфорилування білка фосфофруктокінази 2 на Сер-466, що стимулює швидкість гліколізу [169].

Крім того, АМФК бере участь у процесах апоптозу та аутофагії [170, 171], здійснює регуляцію мітохондріального біогенезу та мітофагії. Також протеїнкіназа АМФК може активувати мітохондріальний біогенез шляхом прямого фосфорилування пероксидом [172].

Важлива роль АМФК протеїнкінази в регуляції росту клітин, проліферації та поляризації [173]. АМФК бере участь в процесах мітозу. Зокрема, було показано, що в мутантах дрозофіли з нокаутованим геном *АМФК*, спостерігали дефекти веретена поділу [174]. Інгібування АМФК призводить до затримки мітозу, порушення мітотичного веретена, викликаючи його дезорієнтацію [175]. Цікаво зауважити, що всі протеїнкінази, які належать до родини АМФК протеїнкіназ, що включає дванадцять представників, беруть участь у клітинній проліферації та поляризації [176].

1.4. Роль протеїнкіназ у регуляції цитоскелету рослин

Оскільки рослини є нерухомими організмами, їм необхідно швидко адаптуватися до будь яких змін навколишнього середовища. Саме тому динамічна мембрана на основі цитоскелета має важливе значення для внутрішнього та міжклітинного сигналіngu в організмах рослин. Дослідження особливостей функціонування цитоскелета та пов'язаних з ним елементів є надзвичайно актуальним, адже уявлення про цю структуру дуже швидко змінюються, переглядаються і розширюються [177]. Відомо, що цитоскелет виконує опорну функцію в клітині, приймає участь у регуляції морфогенезу рослинних клітин, внутрішньоклітинному транспорті, передачі сигналу та багатьох інших клітинних процесах [178].

Рослинний цитоскелет складається з актинових філаментів, мікротрубочок та великої кількості асоційованих білків, що є необхідними елементами для правильного функціонування, організації та регуляції структури цитоскелета. Білки, асоційовані з цитоскелетом, є ефекторами сигнальних каскадів, а також беруть участь у конкурентних та кооперативних взаємодіях всередині клітин для регулювання динаміки та організації цитоскелетних структур. Адже саме цитоскелет з'єднує різні органели та інші елементи клітини один з одним та з плазматичною мембраною [178, 179].

Актинові філаменти є важливими елементами багатьох клітинних процесів. Зокрема, актинові філаменти беруть участь в транспортуванні везикул та клітинних органел, цитоплазматичному транспорті, розташуванні веретена поділу та ін. Актиновий цитоскелет впливає на розширення пилкових трубок, циркуляцію фітогормонів в клітині, фотосинтез шляхом транспорту хлоропластів, закриття та відкриття продихів. Виконуючи безліч функцій, актиновий цитоскелет повинен реагувати на внутрішні та зовнішні сигнали, змінюючи свою організацію на механічні властивості. Подібні сигнали передаються через каскади, які впливають на актин-зв'язуючі білки, які регулюються великою кількістю протеїнкіназ, шляхом фосфорилування/дефосфорилування [180, 181].

В регуляції актинових філаментів беруть участь протеїнкінази CDPK (calcium-regulated protein kinases), які впливають на активність актин-зв'язуючих білків, внаслідок змін концентрацій Ca_2^+ в клітині. Також відомо, що іони Ca_2^+ можуть реконструювати актиновий цитоскелет, безпосередньо, шляхом взаємодії з актин-зв'язуючими білками активуючи чи інактивуючи їх. Подібна регуляція є зворотною, адже актиновий цитоскелет може змінювати клітинний гомеостаз Ca^{2+} , регулюючи приплив і відтік Ca^{2+} в клітині [182]. Також однією з ключових протеїнкіназ, що беруть участь в реорганізації актинових філаментів є протеїнкіназа C (PKC), яка має декілька ізоформ. Відомо, що PKC є одним з ключових компонентів внутрішньоклітинного сигналіngu, впливаючи на проходження багатьох клітинних процесів. Окремі ізоформи протеїнкінази C, впливають на різні функції актинового цитоскелету, шляхом реорганізації структури актинових філаментів [183].

Іншими важливими та універсальними цитоскелетними компонентами всіх еукаріотичних клітин є мікротрубочки. Завдяки своїм динамічним властивостям мікротрубочки беруть участь у багатьох клітинних процесах, включаючи поділ клітин, внутрішньоклітинний транспорт, формування та позиціонування органел. Для формування, належної функції та структурних

переходів, протягом клітинного циклу необхідна точна часова та просторова регуляція динаміки та організації мікротрубочок [178, 184].

Така регуляція досягається за допомогою білків, асоційованих із мікротрубочками, MAP (microtubule-associated proteins), що беруть участь в організації та динаміці мікротрубочок. До числа подібних білків належать родини моторних білків кінезинів та міозинів, а також білки, що регулюють динаміку та організацію кортикальних мікротрубочок та інші. Активність цих структур регулюється великою кількістю протеїнкіназ, які можуть активувати/інактивувати той чи інший білок в залежності від протікання тієї чи іншої функції [185].

Загалом MAP, беруть участь в динаміці мікротрубочок, регулюючись зворотнім фосфорилуванням, адже протеїнкінази та фосфатази є головними регуляторами мікротрубочок протягом клітинного циклу. Існує велика кількість протеїнкіназ, що залучена до фосфорилування MAP, а саме CDK, AUR, MAPK, NEK та інші [186].

Відомо, що протеїнкінази CDK є одними з головних регуляторів клітинного циклу та цитоскелетних перебудов. Протеїнкінази CDK беруть участь у регуляції структури та динаміки мікротрубочок. Оскільки механізм взаємодії протеїнкіназ CDK з мікротрубочками недостатньо вивчений, єдиним відомим цитоскелетним субстратом CDK є кінезин NACK1 (NPK1-activating kinesin-1). Також *in vitro* була показана взаємодія CDK з MAP65-1 (Microtubule-associated proteins 65-1) та декількома іншими MAP [186, 187].

Протеїнкінази AUR (Aurora kinase) є також важливим елементом регуляції клітинного циклу. Ці серин-треонінові протеїнкінази регулюються фосфорилуванням та убіхітин-залежним протеолізом. У рослин AUR не тільки асоційовані з мітотичними структурами, але і безпосередньо взаємодіють з MAP [188]. Оскільки протеїнкінази AUR не мають доменів, що зв'язують мікротрубочки, їх колокалізація з мітотичними структурами, швидше за все, пов'язана з безпосередніми взаємодіями з MAP. Зокрема, представники AUR фосфорилують POK2 (phragmoplast orienting kinesin 2) та

MAP65-1 під час метафази. З трьох членів родини AUR в *A. thaliana*, двоє з них — AUR1 та AUR2, є важливими елементами регуляції клітинного поділу в онтогенезі рослин [189].

Також важливими регуляторами MAP є протеїнкінази MAPK - це збірна група білків, що включає в себе декілька родин. В рослинах *A. thaliana* протеїнкінази MAPK фосфорилують білки MPK4 та MPK6, які належать до родини MAP65, протеїнкіназа MPK6 також фосфорилує білок EB1c (Plus-End Proteins EB1c). Представники MAPK-кіназ регулюються протеїнкіназами MAPK (MAPKK), які, в свою чергу, регулюються протеїнкіназами MAPKK (MAPKKK). У рослинах знайдено декілька сигнальних каскадів MAPK, що залучені до регулювання динаміки мікротрубочок під час клітинного поділу [190, 191].

Протеїнкінази MAPK, регулюючи транскрипційні фактори, функціонують всередині ядра і фосфорилують білки, які вже пов'язані з ДНК. Більшість транскрипційних факторів, що регулюються MAPK, є димерами. При активації деякі MAPK протеїнкінази також димеризуються. Димеризація MAPK може посилюватися шляхом фосфорилування димеризованих транскрипційних факторів [191].

Один з сигнальних каскадів MAPK, що є важливим регулятором структури мікротрубочок, має назву NACK-PQR - шлях (NPK1-NQK1/MEK1-NRK1). В *A. thaliana* цей шлях складається з білків ANP2 / ANP3 (*Arabidopsis* nucleus and phragmoplast-localized kinase, MAP3K), МКК6, та MPK4/MPK6. Саме цей сигнальний каскад відіграє вирішальну роль під час формування фрагмопласту та клітинної стінки. NACK-PQR впливає на організацію мітотичних структур за допомогою зворотнього фосфорилування білків MAP65. Цікаво, що активація MAP3K негативно регулюється протеїнкіназами CDK. Також саме CDK перешкоджає протеїнкіназам MAPK фосфорилувати білок MAP65-1, оскільки єдиний сайт фосфорилування MAPK в MAP65-1 перекривається з сайтом фосфорилування для CDK [191,192].

Інший рослинний каскад MAPK, є невід'ємною частиною регуляції поділу клітин. Він складається з YODA (YDA, MAP3K), MKK4 / MKK5 та MPK3 / MPK6. YODA бере участь у декількох етапах клітинного поділу. Цей каскад регулює скоординовану локальну проліферацію клітин, яка формує морфологію рослинних органів [193, 194].

Також важливою родиною протеїнкіназ, що бере участь у регуляції мітотичних мікротрубочкових структур, є NEKs (NIMA-related kinases). Представники цієї родини серин-треонінових протеїнкіназ є важливими контролюючими елементами нормального проходження поділу клітин. У рослинах NEKs регулюють кортикальні мікротрубочки, впливають на розширення клітин, ріст органів та реакцію рослини на стресові фактори. Також деякі представники протеїнкіназ NEK можуть взаємодіяти з веретеном поділу та фрагмопластом [195].

Крім того, велика кількість протеїнкіназ, які беруть участь у регуляції елементів цитоскелета рослин залишається не вивченими. Зважаючи на високу консервативність та схожість цитоскелетних елементів, зокрема мікротрубочок тварин та вищих рослин, протеїнкінази тварин та рослин мають певну гомологію та схожі сайти фосфорилування. Зокрема, було показано, що вищі рослини мають безліч гомологів тваринних протеїнкіназ до яких належать CAMK (Ca²⁺/кальмодулін-залежна протеїнкінази), казеїнакінази II, CK1 (казеїнові кінази), Aurora-подібні кінази, TTK/MPS1-подібні, SLK (STE20-подібна серин/треонінова протеїнкінази) та протеїнкінази родини NEK та ін. [196].

Однією з найкраще досліджених тваринних протеїнкіназ є BRSK1 (Brain-specific serine/threonine-protein kinase 1). Відомо, що протеїнкіназа BRSK1 тісно пов'язана з цитоскелетом та клітинним поділом [197, 198, 199], відіграє ключову роль в поляризації нейронів. Зокрема, BRSK1 регулює поляризацію нейронів, шляхом фосфорилування WEE1 (Wee1-like protein kinase) по залишку Сер-642 у постмітотичних нейронах, що призводить до зниження активності WEE1 у поляризованих нейронах. У нейронах BRSK1

локалізується в синаптичних везикулах та бере участь у вивільненні нейротрансмітерів шляхом фосфорилування RIMS1 (Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1). Також BRSK1 діє як позитивний регулятор подвоєння центросом, опосередковуючи фосфорилування γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2), призводячи до транслокації γ -тубуліну та пов'язаних з ним білків [197, 198].

BRSK1 є важливим регулятором формування кільцевого білкового комплексу γ TuRC (γ -tubulin ring complex) в зростаючій мікротрубочці, який призводить до утворення димеру, що складається з α - і β -тубуліну [199]. Також BRSK1 регулює клітинну локалізацію γ -тубуліну і тим самим контролює прогресування S-фази [200]. Зниження рівня BRSK1 або утворення нефосфорилуючих мутантних форм значно зменшує ядерний рівень γ -тубуліну.

Фосфорилування γ -тубуліну по залишку Ser-131 протеїнкіназою BRSK1 посилює полімеризацію γ -тубуліну в утвореній центріолі та інгібує ацентричне утворення центросом в інших місцях клітини [200]. Однак фосфорилування Ser-131 γ -тубуліну також зменшує полімеризацію астральних мікротрубочок в центросомах [198, 199] що, ймовірно, полегшує доступ BRSK1 до Ser-385 при фазовому переході G1-S.

Попри велику зацікавленість до особливостей функціонування протеїнкінази BRSK1 в тваринних клітинах не було досліджено і виявлено її можливих гомологів в клітинах рослин. За результатами пошуку найближчих гомологів тваринної BRSK1 у рослинах *A. thaliana* було виявлено високу схожість BRSK1 з представниками підродинами протеїнкіназ SnRK1 [196].

Загалом представники родини протеїнкіназ SnRK з *A. thaliana* є ключовими елементами в механізмах формування відповіді рослин на дію стресів біотичної та абіотичної природи. Головне направлення функціонування цих ферментів – виживання та розвиток рослин за стресових умов. Хоча протеїнкінази родини SnRK характеризуються

багатофункціональністю, роль цих ферментів не зафіксована в регуляції цитоскелета та пов'язаного з цим процесом клітинного поділу [41, 49].

Було ідентифіковано схожість протеїнкінази BRSK1 з підродиною протеїнкіназ SnRK1, а саме з каталітичною субодиницею KIN10, яка в багатьох джерелах описується як самостійна протеїнкіназа. Функції, які виконує протеїнкіназа BRSK1 в клітині, є нетиповими для представників SnRK-кіназ. Враховуючи вище зазначене можна характеризувати SnRK1 як унікальну підродину в родині SnRK.

Відомо, що підродина SnRK1 в рослинах *A. thaliana* має дві активні каталітичні субодиниці (KIN10 та KIN11), описані як самостійні протеїнкінази. Хоча протеїнкіназа KIN10 має близько 90% активності та функціональності даної підродини, KIN11 може частково взаємозамінити KIN10 в більшості функцій цього фермента [66, 67]. Враховуючи схожість KIN10 та KIN11, очікувано, що протеїнкіназа BRSK1 може мати високу схожість також з KIN11.

Такі дані можуть свідчити про наявність гомології BRSK1 та представників протеїнкіназ SnRK1, а також про часткову подібність функцій та механізмів дії цих ферментів. Функціонування представників протеїнкіназ SnRK1 з цього боку не вивчено. Саме тому завданням даної роботи було дослідити структурну схожість протеїнкінази BRSK1 та представників підродини SnRK1 (KIN10 та KIN11) з *A. thaliana*. Оскільки BRSK1 безпосередньо взаємодіє з білками цитоскелету, зважаючи на їх високу консервативність, важливо було виявити подібний механізм взаємодії для протеїнкіназ SnRK1 в рослинних клітинах.

Відомо, що BRSK1 є важливим регулятором клітинного поділу, інгібування активності BRSK1 призводить до затримки процесів пов'язаних з мітозом [197]. Тому в цій роботі було проаналізовано кореляцію інгібування активностей представників підродини SnRK1 (KIN10 та KIN11) з показниками мітотичного індексу в рослинних клітинах. Оскільки протеїнкінази також є енергетичними сенсорами, цікаво було визначити

можливі зміни мітотичного індексу в рослинах за умов впливу на них енергетичного стресу.

Зважаючи на те, що протеїнкіназа KIN10 має більшу частину активності на функціонального навантаження під родини SnRK1, в цій роботі більш детально розкрито аспекти функціонування саме цього ферменту. Адже для кращого розуміння участі протеїнкінази KIN10 в процесах клітинного поділу, важливо було дослідити внутрішньоклітинну локалізацію цього фермента та експресію *KIN10* в різних органах рослини. Також було визначено взаємозв'язок між активністю *KIN10* та ростом і розвитком коренів *A. thaliana*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика рослинного матеріалу

В дослідженнях використовували *A. thaliana* (екотип Col-0), трансгенну лінію *A. thaliana* з гіперекспресією гена *KIN10* (OX), трансгенну лінію *A. thaliana* з РНК-інтерференцією *KIN10* (РНКi). Насіння трансгенних ліній *A. thaliana* були люб'язно надані д-ром Філіпом Роландом (лабораторія молекулярної біології рослин Університету Левена, Бельгія). Також використовували дві лінії нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* *A. thaliana* (SALK_139618C та SALK_127939C), отриманих з Європейського стокового центру арабідопсиса (<http://arabidopsis.info/>), та суспензійні культури *A. thaliana* та *N. tabacum* BY-2.

2.2. Характеристика реактивів, використаних у роботі

Duchefa (Нідерланди): набір мікро- і макро- солей середовища Мурасіге-Скуга, збагаченого вітамінами;

«Хіммед» (Україна): калій азотнокислий (KNO_3), калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4), натрій молібденовокислий ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$), борна кислота (H_3BO_3), марганець сірчанокислий п'ятиводний ($MnSO_4 \times 5H_2O$), кобальт хлористий шестиводний ($CoCl_2 \times 6H_2O$), кальцій хлорид двохводний ($CaCl_2 \times 2H_2O$), кальцій хлорид ($CaCl_2$), гідроксид натрію (NaOH).

«Макрохім» (Україна): амоній азотнокислий (NH_4NO_3), мідь сірчанокисла п'ятиводна ($CuSO_4 \times 5H_2O$), «РОСН» (Польща), магній сірчанокислий семиводний ($MgSO_4 \times 7H_2O$), цинк сірчанокислий семиводний ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), «Sigma» (США), карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО), «Симбіас» (Україна): калій

йодистий (KI), ООО «Реактив» (Україна), залізо сірчаноокисле семиводне ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), «Merck» (Німеччина), мікробіологічний агар, сахароза, «ДнепрАзот» (Україна), гіпохлорит натрію (NaOCl) (комерційний засіб «Білизна»), целюлаза Onozuka R-10 (Sigma, США), пектиназа (Serva, США), поліетиленгліколь (ПЕГ-4000, Fluka), бичачий сиворотковий альбумін (БСА) (Thermo Fisher Scientific, США).

Taq ДНК-полімераза (Thermo Fisher Scientific, США), полімераза Pfu (Fermentas, Литва), Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany), транскриптаза ReverseertAid RT cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific, США), TRIzol-реагент (Invitrogen), лігаза (Fermentas T4 DNA Ligase), SYBR® Green JumpStart™TaqReadyMix™ (Sigma-Aldrich, США). Вектор TagBFP-AS-C (Євроген, Росія), вектор pGWR7 (Університет м. Гента, Бельгія) вектор pART7-RFP (Університет м. Окленд, Нова Зеландія), первинні кролячі моноклональні антитіла проти KIN10 (AS10919, Agrisera, Франція), первинні мишачі моноклональні антитіла проти γ -тубуліну TU-31, люб'язно надані д-ром П. Драбером (Інститут молекулярної генетики, Прага, Чеська Республіка), FITC-кон'юговані анти-мишачі антитіла (Sigma-Aldrich, США), TRITC-кон'юговані анти-кролячі антитіла (Sigma-Aldrich, США).

2.3. Біоінформатичний аналіз

Для проведення кладистичного аналізу та побудови філогенетичного дерева кіному *A. thaliana* та протеїнкінази BRSK1, всі використані амінокислотні послідовності протеїнкіназ було отримано з бази даних Protein KnowledgeBase UniProtKB (www.uniprot.org/) (The UniProt Consortium. Nucl. Acids Res. 2008). Для кладистичного аналізу та побудови філогенетичного дерева найближчих гомологів KIN10 та KIN11 з *A. thaliana* було створено вибірку амінокислотних послідовностей каталітичних доменів представників SNF-споріднених протеїнкіназ. Також було відібрано каталітичні домени

інших ймовірних гомологів підродина SnRK1 з різних організмів (табл. 2.1) [201]. Всі використані амінокислотні послідовності протеїнази, було отримано з бази даних Protein KnowledgeBase UniProtKB (www.uniprot.org/) (The UniProt Consortium. Nucl. Acids Res. 2008).

Таблиця 2.1

Вибірка протеїнази із бази даних UniProt для кладистичного аналізу

Назва	Номер	Організм	Головні функції
KIN10	Q38997	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у вуглеводному обміні, синтезі жирних кислот
KIN11	P92958	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у вуглеводному обміні, синтезі жирних кислот
AKin11	Q9FLZ3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Не досліджено
SRK2I	Q39193	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Разом з SRK2D є ключовим компонентом і активатором АКБ-шляхів
SRK2D	Q39192	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Разом з SRK2I є ключовим компонентом і активатором АКБ-шляхів
SRK2C	Q9M9E9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції генів толерантності до посухи і осмотичного стресу
SRK2J	O64812	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2A	P43291	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2H	Q9FFP9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2F	Q9SMQ4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2B	Q9C958	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2G	P43292	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2E	Q940H6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Один з ключових активаторів АКБ-шляхів
CIPK1	Q8RWC9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKE	Q9LZW4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKN	Q93VD3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у чутливості до посухи та транспірації листя
CIPK6	O65554	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у чутливості до посухи
CIPKO	Q9LDI3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у контролі внутрішньоклітинного гомеостазу та солестійкості
CIPK2	Q9LYQ8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPK7	Q9XIW0	<i>Arabidopsis</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у

		<i>thaliana</i>	холодостійкості
CIPKB	O22932	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, негативний регулятор протонного насоса АНА2
CIPKA	Q9C562	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKF	P92937	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKL	Q94CG0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPK3	Q2V452	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у солестійкості, холодостійкості, стійкості до гіперосмотичного стресу
CIPK8	Q9STV4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKC	Q9SN43	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPK9	Q9MAM1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у K ⁺ гомеостазі
CIPKD	O22971	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKG	Q9SEZ7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKJ	Q9FJ55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKM	O80902	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKQ	Q84VQ3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Кальцій-залежне регулювання утворення активних форм кисню
CIPKK	Q9FJ54	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Компонент АБК-шляхів, участь у проростанні насіння
CIPKI	Q9LP51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKH	Q94C40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPK5	Q9LEU7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPK4	Q9SUL7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
CIPKP	Q8W1D5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у солестійкості
AAPK1	P45894	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Участь в інсулін-опосередкованих сигналах
AAPK1	Q5EG47	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль в регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK1	Q09136	<i>Sus scrofa</i>	Ключова роль в регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK1	Q13131	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль в регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий,

			вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q95ZQ4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Регуляція клітинного енергетичного рівня
AAPK1	P54645	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK1	Q5RDH5	<i>Pongo abelii</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	P54646	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q5RD00	<i>Pongo abelii</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q28948	<i>Sus scrofa</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q09137	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q8BRK8	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AMPKA	Q54YF2	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Енергетичний сенсор, участь в метаболізмі
BRSK1	B2DD29	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і подвоєнні центросом
BRSK1	Q8TDC3	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і подвоєнні центросом
BRSK2	Q69Z98	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і секреції інсуліну
BRSK2	Q8IYWQ3	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і секреції інсуліну
BRSK1	Q5RJI5	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і подвоєнні центросом
BRSK2	D3ZML2	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і секреції інсуліну
CIPK3	Q8LIG4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPK2	Q7X996	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPK1	Q9LGV5	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPK4	Q2QMI0	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPK8	Q5JLD8	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів

CIPK5	Q9LWM4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPK6	Q6Z9F4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKB	Q0JI49	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKD	Q5QNM6	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKA	Q10LQ2	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKF	Q2RBF0	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKI	Q5W736	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKH	Q75L42	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKE	Q2QYM3	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPK7	Q75GK4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKJ	Q68Y49	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKC	Q5JLS2	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKN	Q6ZLP5	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKM	Q5KQF5	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKG	Q6ERS4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
CIPKW	Q2QY53	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент АКБ-шляхів
HUNKA	Q5XHI9	<i>Xenopus laevis</i>	Не досліджено, можлива участь в розвитку нервової системи
HUNK	Q68UT7	<i>Pan troglodytes</i>	Участь у ембріональному розвитку нервової системи
HUNK	B1WAS2	<i>Xenopus laevis</i>	Не досліджено, можлива роль в ембріональному розвитку
HUNK	O88866	<i>Mus musculus</i>	Не досліджено, можлива роль в ембріональному розвитку мишей
HUNKB	Q6VZ17	<i>Xenopus laevis</i>	Не досліджено, можлива участь в розвитку нервової системи
MARK4	Q96L34	<i>Homo sapiens</i>	Участь у клітинній полярності та регуляція динаміки мікротрубочок
MARK2	Q7KZI7	<i>Homo sapiens</i>	Участь у клітинній полярності та регуляція динаміки мікротрубочок
MARK3	P27448	<i>Homo sapiens</i>	Регуляція динаміки мікротрубочок, регуляція активності деяких гістондеацетилаз
MARK1	Q9P0L2	<i>Homo sapiens</i>	Участь у клітинній полярності та регуляція динаміки мікротрубочок
MELK	Q14680	<i>Homo sapiens</i>	Участь у регуляції клітинного циклу, апоптозі та регуляції сплайсингу
NUAK2	Q66HE5	<i>Rattus norvegicus</i>	Стрес-активуюча кіназа, бере участь в толерантності до енергетичного голоду
SIK2	Q9IA88	<i>Gallus gallus</i>	Участь у регуляції трансдукції інсулінового сигналіngu
SIK3	Q9Y2K2	<i>Homo sapiens</i>	Участь у розвитку хрящової тканини та ендохондральному скостенінні
SNF1	P52497	<i>Candida albicans</i>	Участь у енергетичному обміні, трансдукція глюкози
SNF1	Q00372	<i>Candida glabrata</i>	Участь у енергетичному обміні, трансдукція глюкози
SNF1	O74536	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Участь у енергетичному обміні, трансдукція глюкози

SNF1	P06782	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Участь у енергетичному обміні, трансдукція глюкози
Y8013	Q54VU4	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Регулювання транскрипції

Сканування BLASTp. Сканування BLASTp проводили з використанням наступних параметрів: ваговий коефіцієнт BLOSUM62, поріг E-значення (кількість збігів у випадковій вибірці) був 10 з фільтрами; тобто фільтрували послідовність для регіонів з низькою складністю і вирівнювали з розривом (<http://web.expasy.org/blast/>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Грунтуючись на кількох характеристиках, гомологи рослин було обрано в відсотках від ідентичності послідовностей, відсотках подібності послідовностей та їх випадкової відповідності (E-value) [202]. Депоновані в UniProtKB білки *A. thaliana* ідентифікували шляхом порівняння їх локусу генів з координатами, представленими в інформаційному ресурсі *Arabidopsis* (TAIR – www.arabidopsis.org).

Вирівнювання послідовностей. Вирівнювання амінокислотних послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ здійснювали за допомогою програми ClustalX (версія 2.0) (www.clustal.org). Амінокислотні послідовності каталітичних доменів вирівнювали за використання набору вагових матриць BLOSSUM [202, 203].

Аналіз архітектури домену. Архітектуру каталітичних доменів було проаналізовано за допомогою інструменту SMART (http://smart.embl_heidelberg.de/), HAMMER2, HAMMER3) [204, 205] Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) [206], PROSITE ([Http : //prosite.expasy.org/](http://prosite.expasy.org/)) [207] і InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/) [208], а також за допомогою ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org/).

Кладистичний аналіз. Моделі каталітичних доменів протеїнкіназ BRK1, KIN10 та KIN11 було створено з використанням сервера I-Tasser [209]. Кладистичний аналіз проводили на основі множинних вирівнювань кіназних доменів [210] з використанням методу найближчих сусідів

Neighbor-Joining [211]. Дендрограми каталітичних доменів обраних протеїнкіназ було побудовано та проаналізовано за допомогою програми MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) [212].

Профільне передбачення сайтів фосфорилування. Ймовірні сайти фосфорилування на γ -тубуліні було передбачено із застосуванням сервера KinasePhos 2.0 [213].

3D-моделювання. Структурне моделювання гомології γ -тубулінів було виконано в Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [214] на основі шаблонних рентгеноструктурних структур RCSB Protein Bank: 1Z5V (2.71 Å), 1Z5W (3.00 Å) і 3CB2 (2.30 Å), зазначених в PDB-BLAST (www.rcsb.org). Крім того, в I-Tasser було створено повні атомні моделі (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [209]. Остаточне складання повних атомних моделей γ -тубуліну здійснювали в Modeller з використанням графічного оточення EasyModeller 4.0 [215].

Програмне забезпечення I-Tasser використовували для генерації моделей GCP2 / SPC97 і GCP3 / SPC98 з двохступеневим гібридним методом пошуку моделей гомології та *ab initio* моделювання. Деякі цикли, відсутні в кристалічних структурах, було перебудовано з використанням сервера SuperLooper [216].

Макромолекулярні комплекси було побудовано з використанням HADDOCK білок-білкового докінгу [217]. Первісна перевірку побудованих мультисубодитичних моделей було виконано відповідно до cryo-EM моделі комплексу γ TuSC із *Saccharomyces cerevisiae*. Крім того, було використано результати cryo-EM-мікроскопії і 3D-моделі GCPs/ γ -тубулінових комплексів, представлених в роботі Kollman Lab. ([Http://faculty.washington.edu/jkoll/](http://faculty.washington.edu/jkoll/)) [218, 219].

Структури білків релаксували за допомогою короткого моделювання MD (10 нс) в силовому полі G53a6 з пакетом GROMACS 4.5.3 (www.gromacs.org) і перевіряли з використанням вбудованих функцій: RMSD, розрахунки енергії і т. д. [220]. Моделювання сфокусовані на

перевірці стабільності субодиниць, виконувалися в GROMACS з використанням силового поля повного атома charmm27 і моделі води SPC.

Для оцінки якості моделі каталітичного домену, всі моделі було перевірено за допомогою серверів MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) і QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) [221]. Все MD моделювання було виконано в VO CSLabGrid і IFBG Cluster (<http://grid.ifbg.org.ua/ganglia/>), що належить до української національної мережі (UNG – <http://ung.in.ua/>) [222]. Для молекулярної візуалізації, структурного вирівнювання та аналізу було використано PyMol 1.5 і UCSF Chimera 1.8 (www.pymol.org; www.cgl.ucsf.edu/chimera) [223].

2.4. Робота з рослинним матеріалом та моделювання стресових умов

Для поверхневої стерилізації насіння *A. thaliana* трансгенних (OX та РНКі) та мутантних ліній (SALK_127939С та SALK_139618С) обробляли 6%-ним розчином гіпохлориту натрію протягом 10-15 хв з подальшим п'ятиразовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Далі насіння висаджували в асептичних умовах на стерильне живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС), яке містило половинний набір макро- і мікросолей МС, збагачене тіаміном і міо-інозитолом (2 г/л), з додаванням 10 г/л сахарози та 4 г/л джелрайту, рН 5,7, та на аналогічне середовище МС, але без додавання сахарози. Далі проводили стратифікацію насіння у холодильнику за температури +4°C протягом 24 год, потім пророщували при постійній температурі + 24°C та 16-годинному фотоперіоді.

Для транскрипційного аналізу *KIN10* за умов дії сольового, осмотичного та енергетичного стресів, проростки *A. thaliana* вирощували на рідкому середовищі МС, яке містило половинний набір мікро- та макро-солей МС, збагачене тіаміном і міо-інозитолом (2 г/л), з додаванням 10 г/л

сахарози та 4 г/л джелрайту, рН 5,7. Двотижневі проростки переносили на рідке середовище МС з додаванням 100 мМ NaCl, 10% поліетиленгліколю (PEG 4000, Fluka), або на рідке середовище МС без додавання сахарози відповідно, та аналізували через 2, 8 та 24 год.

Суспензійну культуру *A. thaliana* [224, 225] вирощували впродовж 7-ми діб на модифікованому середовищі Гамборга [226], що містило 2,5 мг/мл 2.4-Д, 2,5 мг/мл кінетину, а також 10 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН 5,7

2.5. Створення генетичних конструкцій з химерними генами *KIN10-RFP* та *KIN10-BFP* та трансформація протопластів *A. thaliana* та суспензійної культури ВУ2

Для створення плазмідних конструкцій, кодуючи послідовність *KIN10* без стоп кодону ампліфікували із попередньо синтезованої кДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням відповідних праймерів, що містять *XhoI* та *SmaI* сайти рестрикції, відповідно:

KIN10*XhoI*_for5'-GCCTCGAGATGGATGGATCAGGCACAGG-3'

KIN10*SmaI*_rev5'-CGCCCGGGGAGGACTCGGAGCTGAGCAA-3'.

Умови ампліфікації із ДНК полімеразою Pfu (Fermentas, Литва) були наступними: початкова денатурація 95 °С протягом 3 хв, наступні 35 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 с при 95 °С, 30 с при 56 °С та 1 хв при 72 °С, фінальна елонгація – при 72 °С протягом 3 хв. ПЛР-фрагменти *KIN10* розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі, вирізали та виділяли із гелю за допомогою набору GeneJET Gel Extraction (Fermentas).

Для проведення клонування використовували плазмідні вектори pART7-RFP (люб'язно наданий д-ром А. Гобером, Університет м. Йорк, Великобританія), та TagBFP-AS-C (Євроген, Росія), які було розрізано у мультиклональних сайтах рестриктазами *XhoI* і *SmaI* та оброблено лужною фосфатазою. Розрізаний у мультиклональних сайтах плазмідний вектор

pART7-RFP, що містив 35S промотор, використовували для подальшої реакції лігування (Fermentas T4 DNA Ligase) із ДНК фрагментом -*KIN10* у співвідношенні 1:6 (Рис. 2.1).

Розрізаний у мультиклональних сайтах плазмідний вектор TagBFP-AS-C (Євроген, Росія), також використовували для реакції лігування (Fermentas T4 DNA Ligase) з ДНК фрагментом -*KIN10* у співвідношенні 1:6. Отриманий функціональний Entry-клон використовували у реакції LR-рекомбінації для переносу фрагменту ДНК, що кодує химерний білок KIN10-BFP, у вектор призначення pGWR7 (Рис. 2.1.) [227, 228, 229, 230]. LR-рекомбінацію проводили наступним чином: до 6 мкл попередньо створеного Entry-клону (100 нг) додавали 1 мкл вектора призначення pGWR7 (100 нг) та 1 мкл ТЕ-буфера (рН 8,0). До 8 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл суміші ферментів LR Clonase™ II (Invitrogen, США) та перемішували піпетуванням, після чого інкубували при 25°C протягом 18 год. Для зупинки реакції до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнази К та інкубували при 37 °C протягом 10 хв [231].

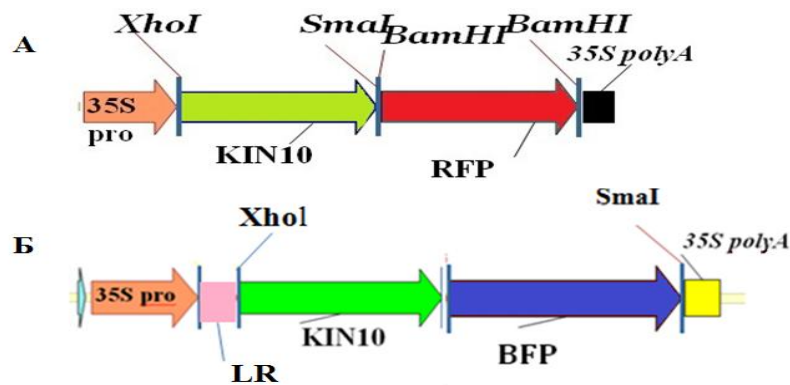


Рис. 2.1 Фрагменти плазмідних конструкцій: **А.** pART7-*KIN10-RFP*, де 35S pro – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; XhoI, SmaI, BamHI – сайти рестрикції; 35S-polyA – сайт поліаденілування; KIN10 – цільовий ген; RFP – ген червоного флуоресцентного білка; **Б.** pGWR7-*KIN10-BFP*, де 35S pro – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; XhoI, SmaI – сайти рестрикції; LR – сайт для LR-клонази; KIN10 – цільовий ген; BFP – ген синього флуоресцентного білка.

Трансформація конструкціями бактеріальних клітин *E. coli* та виділення плазмідної ДНК. Для приготування компетентних клітин *E. coli* штаму DH5a бактерії висівали на чашки Петрі з твердим LB середовищем (10 г/л триптон, 5 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl, 8 г/л агар), та інкубували протягом 18 годин при 37°C. Одну колонію додавали в 5 мл рідкого LB середовища (10 г/л триптон, 5 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl). Спочатку первинну культуру інкубували 16 год при 37°C на шейкері при 250 об/хв, потім 1 мл первинної культури переносили в 500 мл рідкого LB середовища. Бактерію культивували при 19°C та постійному перемішуванні на шейкері при 250 об/хв до моменту, коли оптична щільність культури (OD₆₀₀) досягала 0,35-0,4. Після цього рідку бактеріальну культуру інкубували на льоду протягом 30 хв та переносили у стерильні центрифужні пробірки об'ємом 50 мл. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 10 хв при 4°C. Після видалення супернатанту, бактеріальний осад залишали на льодяній бані. Бактеріальні клітини ресуспендували у 50 мл льодяного розчину MgCl₂ (100 мМ) та інкубували протягом 15 хв. Суспензію бактерій центрифугували при 5000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при 4°C протягом 19 хв, видаляли супернатант та ресуспендували у 50 мл льодяного розчину CaCl₂ (100 мМ). Ресуспендований розчин бактерій залишали на льодяній бані на 20 хв. Після цього, розчин бактерій знову центрифугували при 5000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при 4°C протягом 10 хв. Супернатант видаляли, а бактеріальний осад ресуспендували у 50 мл льодяного розчину CaCl₂ (85 мМ) та 15 %-му гліцерину. Клітини осаджали при 4000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при 4°C протягом 10 хв, супернатант видаляли, осад ресуспендували у 2 мл розчину CaCl₂ (85 мМ) та 15 %-му гліцерину. Із бактеріальної суспензії робили аліквоти по 50 мкл у стерильних поліпропіленових мікроцентрифужних пробірках типу Eppendorf. Мікроцентрифужні пробірки із аліквотами бактеріальної суміші занурювали у

рідкий азот для миттєвої заморозки. Заморожені аліквоти зберігали при -80°C .

Трансформацію бактеріальних компетентних клітин проводили наступним чином: аліквоти бактеріальних клітин діставали із кельвінатора (-80°C) і негайно переносили на льодяну баню. Після того, як бактеріальні клітини повністю розмерзлися, до 50 мкл суміші бактеріальних клітин додавали близько 3 мкл плазмідної ДНК. Суміш ДНК із бактерією інкубували на льоду протягом 15 хв, далі піддавали температурному шоку при 42°C протягом 45 сек. Після цього суміш ДНК із бактерією переносили на лід та інкубували протягом 5 хв.

Після 3 хв інкубації на льоду до суміші бактерії та ДНК додавали 600 мкл рідкого середовища LB та перемішували на шейкері (250 об/хв.) при 37°C протягом 1 год. Далі клітини осаджували 10 хв на мікроцентрифузі 4500 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) та видаляли 400 мкл супернатанту. Потім 200 мкл трансформаційної суміші висівали на чашки Петрі на тверде середовище LB, що містило канаміцин (100 мкл/100мл). Чашки Петрі із протрансформованими бактеріями інкубували 16 год при 37°C . На наступний день проводився скринінг бактеріальних колоній. Із кожної чашки Петрі відбирали 10-12 колоній для подальшого інокулювання в 5 мл рідкого LB із канаміцином (100мкл/100мл). Пробірки із інокульованими індивідуальними колоніями інкубували 16 год при 250 об/хв на шейкері при 37°C .

Виділення плазмідної ДНК за допомогою лужного методу відбувалось наступним чином: бактеріальні клітини (1,5 мкл клітинної культури) осаджували центрифугуванням (5 хв). Потім бактеріальну суміш ресуспендували в 125 мкл буферу P1 (Tris/HCl, pH 8.0; 10 мл EDTA, 100 мг/мл RNaseA) та інкубували 5 хв за кімнатної температури. Для лізису клітин додавали 270 мкл лужного розчину P2 (0,2 М NaOH) обережно перемішували (без вортекса) та інкубували 5 хв за кімнатної температури. Розчин нейтралізували, додаючи 200 мкл холодного розчину P3 (5М коAc), обережно перемішували (без вортекса) та інкубувати 5 хв на льоду. Далі

центрифугували 15 хв 14000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при 4 °С. Надосадову рідину переносили в нову центрифужну пробірку типу Eppendorf, додавали 600 мкл ізопропанолу та залишали на 1 год в холодильнику. Центрифугували 15 хв при 14 000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при 4 °С. Надосадову рідину видаляли, а осад ресуспендували в 75%-му етанолі (150 мкл) та центрифугували 15 хв при 14 000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при 4 °С. Надосадову рідину видаляли, осад висушували на повітрі 10-15 хв та ресуспендували в 50 мкл H₂O.

Виділення та трансформація протопластів *A. thaliana*. Ізолювання та трансформацію протопластів проводили наступним чином: молоде листя арабідопсису розміщували на чашки Петрі із буфером для плазмолізу (500 мМ манітол, 10 мМ CaCl₂, 10 мМ MES-КОН (рН 5,6)). Далі рослинний матеріал нарізали та переносили у ферментативний розчин (1% целюлаза (Sigma, США), 0,3% мацераза (Sigma, США), 0,4 М манітол, 20 мМ MES-КОН (рН 5,6), 20 мМ KCl, 10 мМ CaCl₂, 0,1% БСА (Thermo Fisher Scientific, США)) та інкубували 3-4 год у темряві. Далі ферментативний розчин із рослинним матеріалом фільтрували через нейлонову сітку. До 1 об'єму суспензії протопластів додавали 0,5 об'єму 200 мМ CaCl₂ та обережно перемішували. Суспензію протопластів осаджували центрифугуванням при 500-700 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 2 хв та ресуспендували у 3 мл охолодженого середовища W5 (125 мМ CaCl₂, 154 мМ NaCl, 2 мМ MES-КОН (рН 5,6), 5 мМ KCl). Далі протопласти інкубували на льодяній бані у темряві протягом 30 хв. Після цього їх осаджували центрифугуванням при 500-700 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 1 хв та ресуспендували у 3 мл розчину MMg (0,4 М манітол, 15 мМ MgCl₂, 4 мМ MES-КОН (рН 5,7)). До окремих пробірок додавали 10 мкл плазмідної ДНК (10-20 мкг), 100 мкл суспензії протопластів у розчині MMg та обережно перемішували. В останню чергу до суміші ДНК із протопластами додавали 110 мкл розчину 110 μL of PEG-CMS (40% Поліетиленгліколю (PEG 4000, Fluka), 0,2 М манітол, 0,14 М Ca(NO₃)₂).

Обережно перемішували та залишали інкубуватись у темряві при 23°C протягом 20 хв. Після етапу інкубації до трансформаційної суміші поступово додавали наступне середовище (0,6 М манітол, 4 мМ MES-KOH (рН 5,7), 4 мМ KCl, 3 мМ CaCl₂) в послідовності: 0,5мл, 1мл, 2 мл, 3 мл та залишали інкубуватись у темряві протягом 14-16 год. Ефективність трансформації протопластів оцінювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), застосовуючи відповідні світлофільтри.

Виділення та трансформацію протопластів із суспензійних клітин ВУ-2. Процедури ізолювання та трансформації протопластів проводили наступним чином: для виділення протопластів використовували 50 мл двохденної суспензійної культури ВУ-2. Клітини осаджували центрифугуванням при 1000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 5 хв. Після чого осад ресуспендували в 50 мл середовища MS із стандартним набором макро- та мікросолей, 30,5 г/л манітолу, 30 г/л глюкози, 200 мг/л 2,4-Д, 1 %-ний розчин целюлази (Sigma, США, 0,1%-ний розчин пектинази (Serva, США), рН 5,5 та інкубували в темряві 30-40 хв за температури 30 °С. Після чого центрифугували при 1000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 5 хв. Отриманий осад протопластів ресуспендували в середовищі MS, склад якого наведено вище.

Далі розчин з протопластами центрифугували при 1000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 5 хв, супернатант видаляли, а осад ресуспендували в вище зазначеному середовищі MS (рН 5,5). Якість ізольованих протопластів оцінювали за допомогою світлового мікроскопу, кількість протопластів рахували за допомогою камери Фукса-Розенталя.

Для проведення трансформації до 30 мкл плазмідної ДНК додавали 150 мкл протопластів та 450 мкл розчину PEG-mixture (12,6 г PEG-6000 (Fluka), 4,1 г манітолу, 1,18 г Ca(NO₃)₂ (рН 9)). Протопласти інкубували 15-30 хв в темряві за кімнатної температури. Після чого обережно по краплині додавали 3 мл 0,275М Ca(NO₃)₂·4H₂O (64,94 г/л). Отриману суміш центрифугували 7 хв при 1000 об/хв. Супернатант видаляли, а осад протопластів ресуспендували в

2,5 мл середовищі MS (30,5 г/л манітолу, 30 г/л глюкози, 200 мг/л 2,4- Д та 1 %-ний розчин целюлази (Sigma, США)). Суміш протопластів та плазмідної ДНК інкубували 24 год в темряві при 24°C. Після етапу інкубації частоту трансформації протопластів оцінювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), застосовуючи відповідні світлофільтри (BP365/12.FT 395. LP 397) для візуалізації BFP в клітинах.

2.6. Молекулярно-генетичний аналіз експресії генів *KIN10* і *KIN11* в рослинах та суспензійній культурі *A.thaliana*

Транскрипційний аналіз. Для аналізу органоспецифічної експресії *KIN10* використовували двомісячні рослини *A. thaliana* (екотип Col-0). Для транскрипційного аналізу загальну РНК виділяли окремо з кожного органу рослини (корінь, стебло, листя, квітки). Виділення РНК проводили з використанням TRIzol Reagent (Invitrogen, США) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Якість та цілісність виділеної РНК визначали спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Концентрацію РНК у різних зразках доводили до рівного значення. Синтез кДНК проводили за допомогою RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Ділянку послідовності *KIN10* (700 п. н.) ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із попередньо синтезованої кДНК використовуючи наступну пару праймерів:

Kin10_for CCTCAAGCCTGAAAАСТТGC,

Kin10_rev TGCATACGGGGAGTACСТТС.

ПЛР проводили в мікропробірках на 200 мкл в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш (об'ємом 25 мкл) містила п'ятикратний ПЛР-буфер, 2,5 ммоль MgCl₂, 2 мкл кДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 10 мм дНТФ, 0,5 од. Taq полімерази (Fermentas, Литва),

за наступних умов: початкова денатурація — 95°C протягом 5 хв, наступні 35 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 с при 95°C, 30 с при 56°C та 1 хв при 72°C, фінальна елонгація — при 72°C протягом 3 хв.

Як контроль використовували рівень експресії фактору елонгації α (AtEF α). Для проведення ПЛР AtEF α також використовували вищезазначені умови ампліфікації та використовували наступні праймери:

AtEF α _forGGAGTGGCAAAAACACTGGT,

AtEF α _revCTTGCCTCTTACCCATCCAA.

Після проведення ПЛР ампліфіковані фрагменти генів *KIN10* та *EF α* розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі. Рівень експресії в різних органах визначали шляхом денситометричного аналізу електрофореграм з використанням програми TotalLab (Велика Британія), яка є у вільному доступі (<https://totallab-quant.software.informer.com/2.0/>).

Дослідження експресії маркерних генів клітинної проліферації *CYCB1-1* і *BRCA1* та *KIN10* і *KIN11* в нокаутних лініях *kin10* і *kin11* та суспензійній культурі. Експресію маркерних генів клітинної проліферації *CYCB1-1* (AT4G37490) та *BRCA1* (AT4G21070) в нокаутних мутантних лініях SALK_127939C та SALK_139618C досліджували у 7-денних проростків *A. thaliana*. Визначення рівнів експресії *KIN10* і *KIN11* та *AtCYCB1* і *AtBRCA1* в суспензійній культурі *A. thaliana*, проводили, використовуючи 7-денну суспензійну культуру.

Загальну РНК виділяли за допомогою TRIzol Reagent (Invitrogen, США) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Якість виділеної РНК визначали спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу у агарозному гелі. Концентрацію РНК у всіх зразках доводили до рівного значення. Синтез кДНК проводили за допомогою RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Termo Fisher Scientific, США) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником.

Експресію генів *AtCYCB1;1* і *AtBRCA1* та *KIN10* і *KIN11* визначали за допомогою кількісної ПЛР ($\Delta\Delta$ Ct метод) [232]. Ампліфікацію специфічних

фрагментів генів здійснювали за використання SYBR® Green JumpStart™Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, США) та відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 2 мкл кДНК, 1 мкл прямого та зворотнього праймерів. ПЛР проводили з інтеркалюючим барвником SybrGreen (490 нм) на ампліфікаторі iQ5 (Bio-Rad, США) за наступним протоколом: 95°C 5хв; наступні 40 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 с при 95°C, 30 с при 55°C та 30 с при 72°C, фінальна елонгація – при 72°C протягом 4 хв. Рівень флуоресценції вимірювали на стадії синтезу ампліконів. Для порівняння рівнів експресії генів, як референтний використовували ген актину (*AtActin*). Фрагменти генів *AtCYCB1;1*, *AtBRCA1* та *KIN10*, *KIN11* ампліфікували з використанням наступних праймерів:

CYCB1;1_for 5`CTGTTGAGAGTGAATGGAGG3`,
CYCB1;1_rev 5`TAACCGACAAGAACCGATCC3`;
BRCA1_for 5`CATTGATTGGATTAAGGCGTG3`,
BRCA1_rev 5GATAAGGTCCTTCTCGTATTCC3`;
KIN10_for 5`CCTCAAGCCTGAAAACCTTGC3`,
KIN10_rev 5`TGCATACGGGGAGTACCTTC3`;
KIN11_for 5`GCGGGATGGTCATTTTCTAA3`,
KIN11_rev 5`AATCCAGTGGCCTACAGGTG3`;
AtAct_for 5`CCCTCAGCACATTCCAGCA3`,
AtAct_rev 5`TGGGACTAAAACGCAAAACGAA3`.

Після ампліфікації якість продуктів оцінювали на підставі аналізу кривої плавлення продуктів ПЛР. Рівні експресії генів визначали окремо для кожної пари праймерів. Для оцінки якості та підтвердження відтворюваності результатів реакції експерименти проводили у трьох повторях.

2.7. Аналіз росту та розвитку головних коренів трансгенних ліній *A. thaliana*

Для дослідження росту та розвитку коренів, 7-денні проростки трансгенних ліній з гіперекспресією (OX) та РНК-інтерференцією (РНКі) *KIN10 A. thaliana*, вирощували на твердому середовищі МС без та з додавання сахарози. Аналіз проводили через 24, 48, та 72 год, фіксуючи показники за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Довжини коренів обраховували за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d), <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, яка є у вільному доступі.

Морфологію проростків трансгенних ліній *KIN10 A. thaliana* (OX та РНКі) аналізували у прохідному світлі за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина) у прохідному світлі. Як контроль використовували проростки *A. thaliana* (екотип Col-0). Експерименти повторювали три рази.

2.8. Визначення мітотичного індексу у проростках та суспензійній культурі *A. thaliana*

Для визначення мітотичного індексу було використано проростки мутантних ліній *kin10* та *kin11 A. thaliana* (SALK_139618C та SALK_127939C), як контроль – проростки дикого екотипу *A. thaliana* (Col-0). Насіння стерилізували протягом 10-ти хв в гіпохлориті натрію, тричі відмивали стерильною водою та висаджували на живильне середовище Мурасіге-Скуга, яке містило половинний набір макро- і мікросолей МС, збагачене тіаміном і міо-інозитолом (2 г/л), з додаванням 10 г/л сахарози та 4 г/л джелрайту, рН 5,7.

Для моделювання умов енергетичного дефіциту насіння мутантних ліній та дикого типу висаджували на аналогічне середовище, однак без додавання сахарози. Висаджене насіння стратифікували за температури +4°C

протягом 24 год, а далі культивували протягом 14 діб при +22°C та довжині світлового періоду 16 год на добу.

Для визначення мітотичного індексу корені 14-денних проростків витримували 2 год у холодній воді (+4°C) для синхронізації мітозів, після чого фіксували у фіксаторі Кларка (льодяна оцтова к-та: 96% ацетоалкоголь, 1:3) протягом 24 год. Після 3-кратного промивання у 70%-ному етиловому спирті, корені переносили у 4%-ний ацетоорсеїн та інкубували протягом 1 год. Давлені препарати виготовляли в 45%-му розчині молочної кислоти.

Мітотичний індекс меристематичних клітин обраховували за формулою:

$$MI = \frac{\sum (P + M + A + T)}{\sum (I + P + M + A + T)} * 100\%, \text{ де} \quad (2.1)$$

$\sum (P+M+A+T)$ – сумарна кількість клітин, які знаходяться у профазі (P), метафазі (M), анафазі (A), телофазі (T)

$\sum (I+P+M+A+T)$ – сумарна кількість клітин, які знаходяться у інтерфазі (I), профазі (P), метафазі (M), анафазі (A), телофазі (T).

Значення K_{MI} обраховували, як співвідношення значень MI для оброблених варіантів з контролем:

$$KM = \frac{MI_{\text{вар.}}}{MI_{\text{контроль}}} \quad (2.2)$$

Клітини аналізували за допомогою мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина) з об'єктивами Plan-Neofluar 40x/1.3 і 100x/2.6 Immersion Oil. Отримані дані обробляли за допомогою програмного забезпечення AxioVisionRel4.7 (CarlZeiss, Німеччина). Математичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу з використанням MS Excel (2010).

2.9. Імунофлуоресцентний аналіз розподілу γ -тубуліну в коренях нокаутних мутантів *A.thaliana*

Для імунофлуоресцентного аналізу внутрішньоклітинного розподілу γ -тубуліну використовували 7-денні проростки мутантних ліній *kin10* та *kin11* *A. thaliana* (SALK_139618C та SALK_127939C). Як контроль в дослідженні було використано *A. thaliana* екотип (Col-0). Детекцію γ -тубуліну за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії в клітинах коренів *A. thaliana* було проведено у відповідності до модифікованого нами методу [233].

Як первинні антитіла використовували мишачі моноклональні антитіла TU-31 проти γ -тубуліну, (люб'язно надані д-ром П. Драбером, Інститут молекулярної генетики Чеської АН, Прага, Чеська Республіка), у розведенні 1:50, та первинні кролячі моноклональні антитіла проти KIN10 (AS10919, Agrisera, Франція), (люб'язно надані д-ром Е. Доддом, Університет Бристоля, Великобританія) у розведенні 1:50. Як вторинні антитіла використовували FITC-кон'юговані анти-мишачі антитіла (Sigma-Aldrich, США) у розведенні 1:100 та TRITC-кон'юговані анти-кролячі антитіла (Sigma-Aldrich, США) у розведенні 1:100. Для фарбування антитілами корені 7-денних проростків іммобілізували на поверхні предметних скелець, вкритих 0,01%-м полі-L-лізином. Далі корені фіксували у 4%-му розчині параформальдегіду, приготованого на основі буферного розчину MBS (50 мМ PIPES-КОН, (рН 7), 5 мМ EDTA, 5мМ MgSO₄) з додаванням 0,1%-го Тритону X-100 протягом 1 год.

Зразки відмивали протягом 15 хв у буферному розчині MBS з додаванням 0,1%-го Тритону X-100, після чого ферментували протягом 15 хв в фосфатно-сольовому буферному розчині MBS з додаванням 1%-ої целюлази (Sigma, США) та 0,5%-ої пектоліази (Sigma, США). Відмиванню зразків у 0,1%-му Тритон X-100 у буфері MBS передувала обробка охолодженим метанолом протягом 6 хв за температури -20 С. Наступним

кроком була регідратація зразків за допомогою буфера MBS, що містив 0,02%-ий Твін-20.

Для запобігання неспецифічного зв'язування антитіл зразки витримували протягом 30 хв у 2%-му розчині БСА (Thermo Fisher Scientific, США), приготованого на основі буферного розчину MBS. На зразки наносили мишачі моноклональні антитіла проти γ -тубуліну (TU-31), та інкубували протягом 24 год за кімнатної температури. Після чого, зразки відмивали чотири рази у буфері MBS, наносили FITC-кон'юговані анти-мишачі антитіла та інкубували за температури +37 С протягом 2-х год.

При вивченні колокалізації γ -тубуліну та KIN10, після нічної інкубації з мишачими антитілами проти γ -тубуліну зразки відмивали у буфері TBS (50 мМ Tris-Cl, рН 7.6; 150 мМ NaCl), після чого інкубували ще 24 год з первинними кролячими моноклональними антитілами проти KIN10. Потім зразки відмивали 4 рази у буфері TBS та інкубували за температури +37 С протягом 2 год з TRITC-кон'югованими анти-кролячими антитілами, далі відмивали 4 рази у буфері MBS та інкубували за тих же умов з FITC-кон'югованими анти-мишачими антитілами.

В якості негативного контролю використовували зразки, які обробляли лише первинними антитілами. Частину зразків було оброблено лише вторинними антитілами без інкубації з первинними, а також частину зразків було оброблено з перехресною взаємодією між невідповідними первинними та вторинними антитілами.

Зразки досліджували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) з використанням об'єктиву Plan Achromat 63x/1.4 Oil DIC. Емісія FITC відбувалася при збудженні 488-нм лінією аргонного лазера, в той час як емісія TRITC при 543-нм лінією гелій/неонового лазера. Сигнали емісії барвників FITC та TRITC диференціювали за допомогою META-системи коротко- та довгохвильовими фільтрами BP (505-530 нм) та LP (560 нм) відповідно.

2.10. Статистична обробка отриманих даних

Усі експерименти було проведено якнайменше для трьох незалежних повторів. Використовували аналіз середніх значень, як загально прийнятий у біології метод математичної статистики [234]. Статистичну перевірку достовірності відмінностей між середніми значеннями було проведено за використання t-тесту Ст'юдента для рівня значущості 5 %. Побудову графіків та діаграм було проведено за використання програми Microsoft Office Excel 2010 (MS Windows).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Кладистичний аналіз SnRK1 протеїнкіназ та їх гомологів

3.1.1. Результати NJ-кластеризації та філогенетичний аналіз

Протеїнкінази BRSK є важливими регуляторами клітинного поділу в тваринних організмах. Зокрема, один з представників BRSK-кіназ, а саме протеїнкіназа BRSK1 людини, бере участь у подвоєнні центросом та поляризації нейронів кори головного мозку [235]. Також цей фермент здійснює фосфорилування асоційованого з мікротрубочками протеїну тау, впливаючи на його здатність зв'язуватися з мікротрубочками, що може призводити до певних змін в їх організації [198, 199].

Попередні дослідження пошуку рослинних гомологів протеїнкінази BRSK1 людини, вказують на високу подібність амінокислотної послідовності каталітичного домену BRSK1 саме з протеїнкіназою KIN10 з *A. thaliana* [196]. Для підтвердження отриманих раніше даних та встановлення ступеня подібності протеїнкінази BRSK1 людини з представниками підродини SnRK1, а саме KIN10, було проведено аналіз спільної NJ-кластеризації каталітичних доменів всіх відомих протеїнкіназ з *A. thaliana* та BRSK1 людини. За результатами проведеної NJ-кластеризації було ідентифіковано KIN10, KIN11 та SNRK1.3 (AT5G39440), які утворюють підродину SnRK1 в *A. thaliana*, як найближчих рослинних гомологів BRSK1. Ці рослинні протеїнкінази групуються у спільну кладу з протеїнкіназою BRSK1 людини (Рис. 3.1) [236].

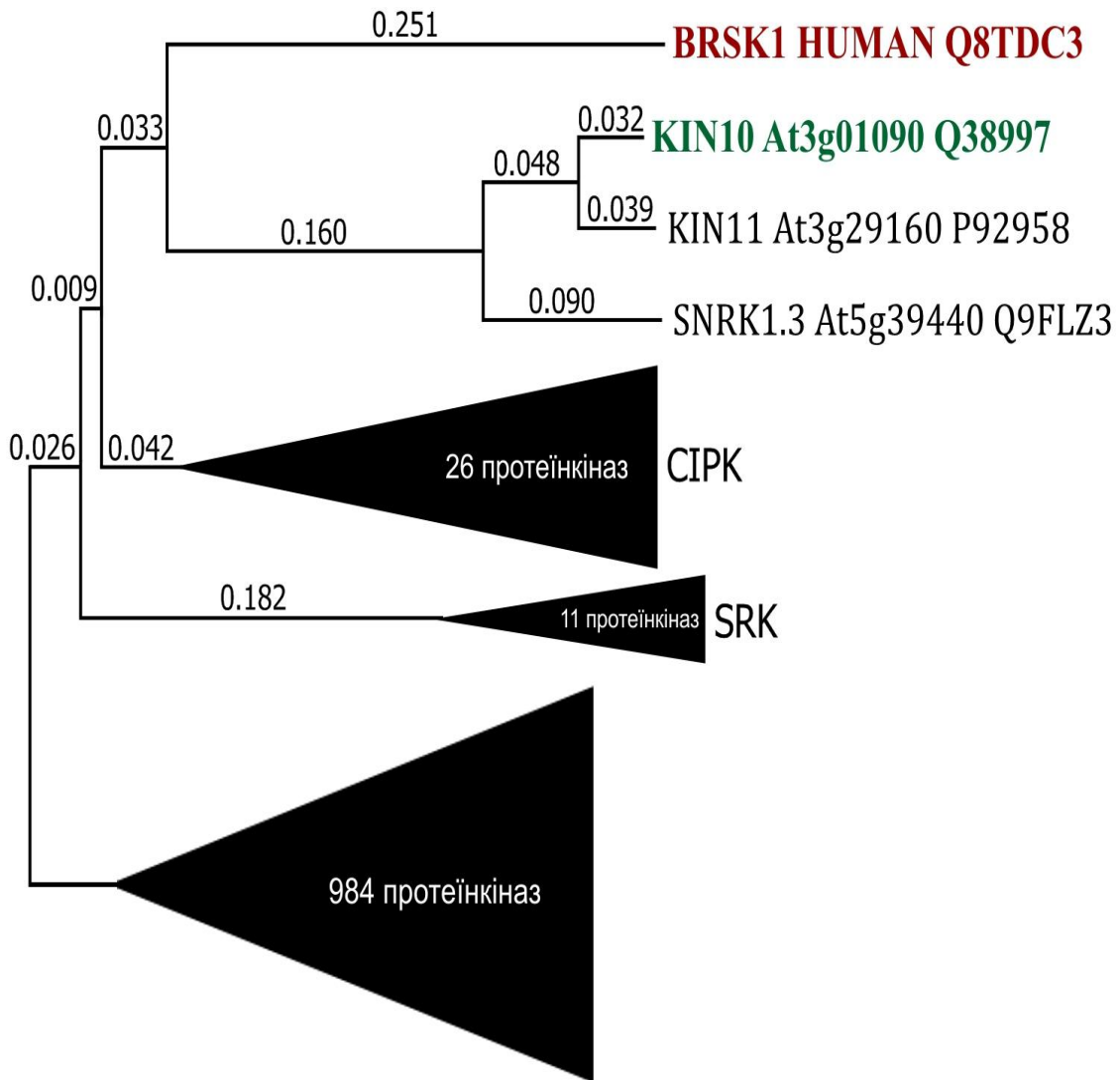


Рис. 3.1 Спільна NJ-кластеризація каталітичного домена протеїнкінрази BRSK1 людини та каталітичних доменів всіх відомих протеїнкіназ *A. thaliana*

Для кращого розуміння функціональної ролі підродиною SnRK1, було проведено пошук найближчих гомологів SnRK1 (KIN10 та KIN11) протеїнкіназ. Для цього було створено вибірку каталітичних доменів ймовірних гомологів підродиною SnRK1 з різних організмів (таблиця 2.1) [237]. Також було відібрано каталітичні домени представників підродин SnRK2 та SnRK3, які вважаються найближчими рослинними гомологами SnRK1 [238].

Результати множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей каталітичних доменів обраних протеїнкіназ показали високу подібність KIN10 та KIN11 з протеїнкіназами SNF1, які вважаються аналогами KIN10 та KIN11 в дріжджах. Відомо, що подібно до KIN10 та KIN11, протеїнкінази SNF1 є енергетичними сенсорами та ключовими регуляторами метаболізму в клітинах дріжджів. Представники цієї підродини є компонентами широкого спектру ферментативних реакцій в клітині та важливими регуляторами транскрипції. Зниження рівня глюкози в клітинах дріжджів призводить до активації протеїнкіназ SNF1 [56].

Показано, що представники підродини SnRK1 більш подібні до своїх гомологів у тваринних організмах, ніж до підродин рослинних протеїнкіназ SnRK2 та SnRK3 (Рис. 3.2). Така подібність може свідчити про унікальність цих протеїнкіназ та виконання ними нетипових для родини SnRK функцій в клітинах рослин. Зокрема, в результаті кластеризації було показано, що протеїнкінази KIN10 та KIN11 мають високий рівень подібності з підродинами тваринних 5'-АМФ-активуєчих протеїнкіназ [237]. Ці білки є енергетичними сенсорами та беруть участь в регуляції метаболізму у тваринних клітинах [158].

Відомо, що тваринні 5'-АМФ-активуєчі протеїнкінази є важливими регуляторами транскрипції, енергетичного обміну, клітинної полярності, білкового, вуглеводного та ліпідного біосинтезу, а також процесів клітинного росту та проліферації. Протеїнкінази KIN10 та KIN11 також є одним із головних регуляторів транскрипції в рослинних клітинах та подібно до 5'-АМФ-активуєчих протеїнкіназ беруть участь в енергетичному обміні та регуляції метаболізму [41], що може свідчити про функціональну близькість цих тваринних гомологів із зазначеними рослинними протеїнкіназами.

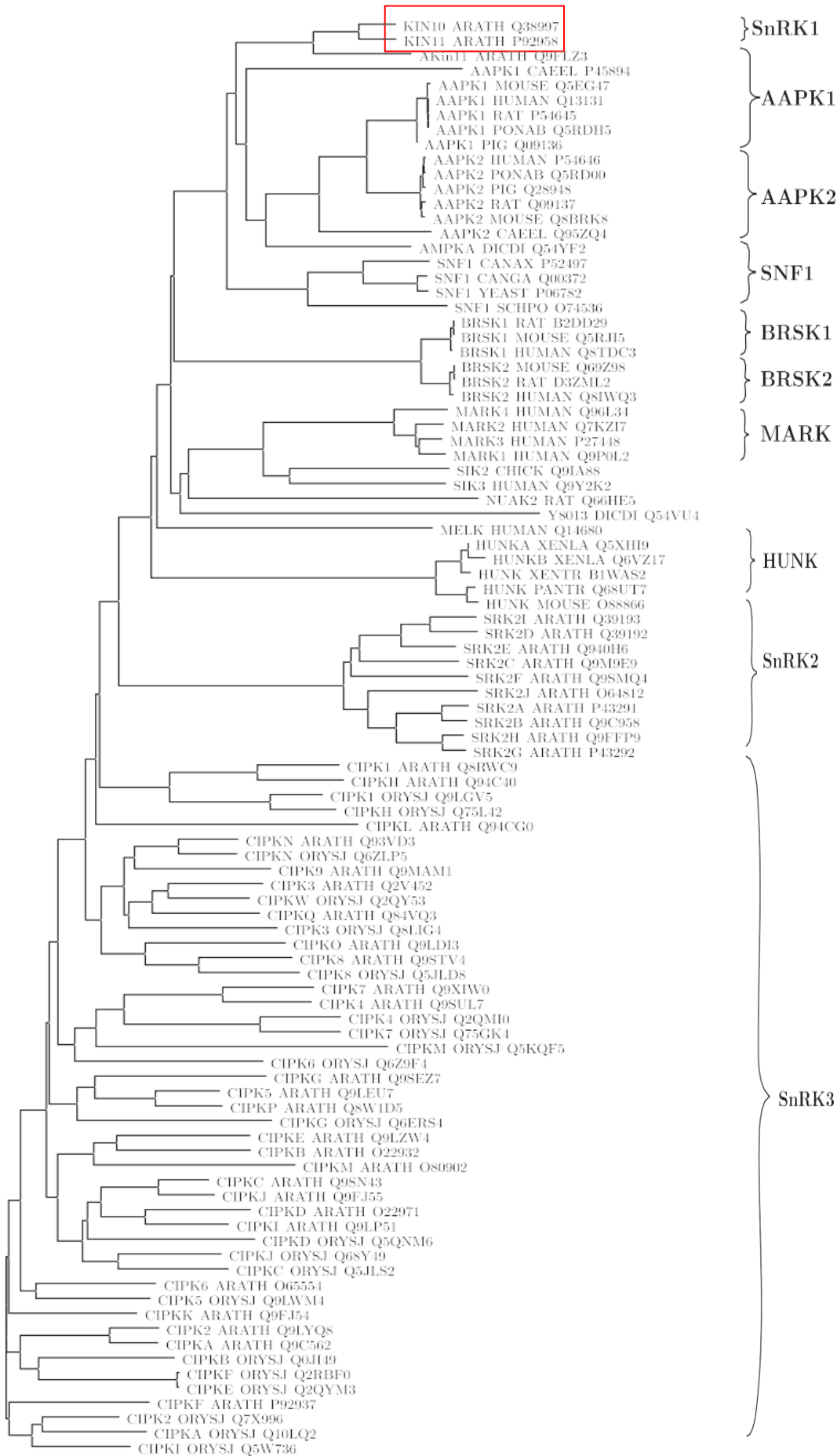


Рис. 3.2 Філогенетичне дерево найближчих гомологів протеїнкіназ KIN10 та KIN11.

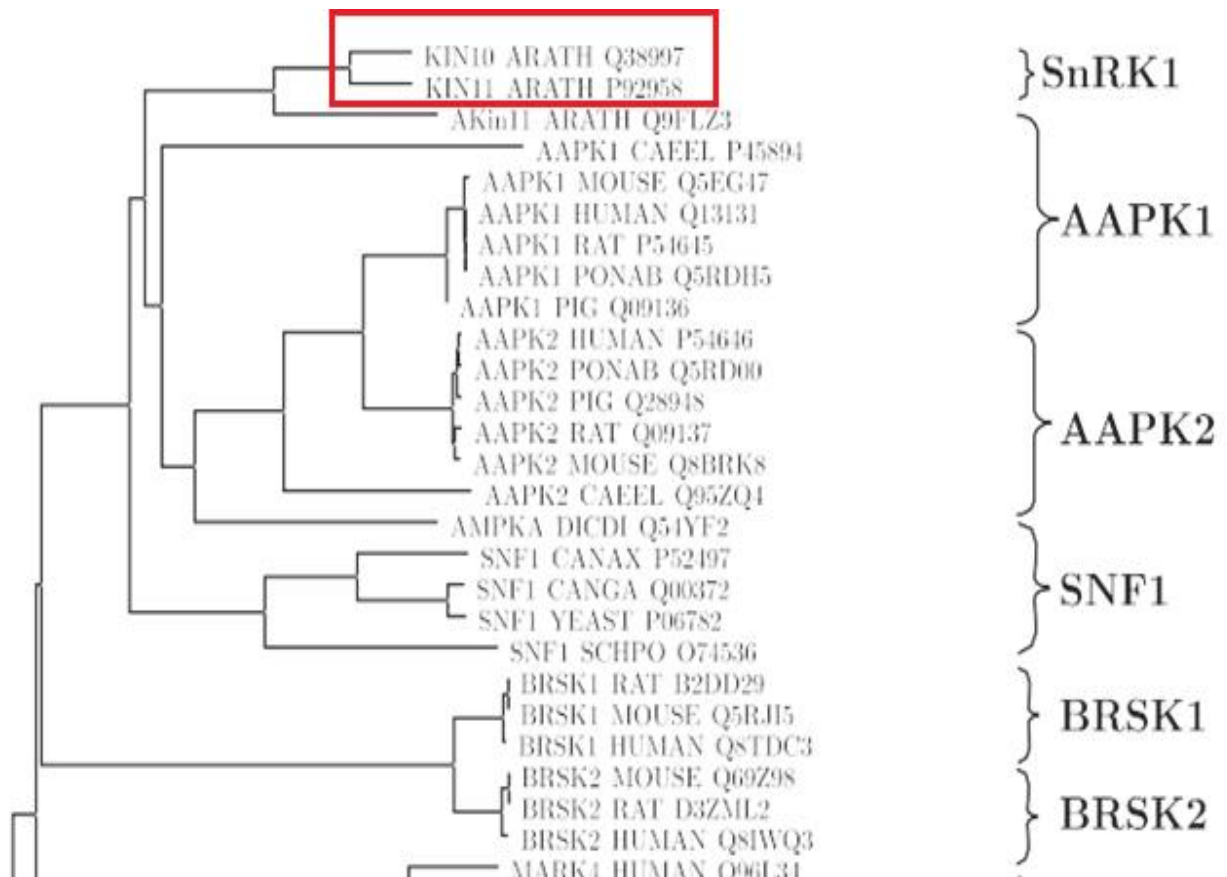


Рис. 3.3 Фрагмент філогенетичного дерева найближчих гомологів протеїнкіназ KIN10 та KIN11.

Аналіз результатів кластеризації найближчих гомологів протеїнкіназ SnRK1, показує високу подібність протеїнкіназ KIN10 та KIN11 до тваринних протеїнкіназ BRSK1 та BRSK2 (Рис. 3.3) [237]. Такі результати підтверджують дані, що протеїнкіназа KIN10 є близьким гомологом BRSK1 в рослинних організмах. Варто зауважити, що протеїнкіназа BRSK2, подібно до BRSK1, є регуляторами поляризації нейронів. Також BRSK2 є важливим елементом в процесах аксоногенеза, та проходження клітинного циклу. Відомо, про важливу участь BRSK2 у регуляції секреції інсуліну у відповідь на підвищений рівень глюкози, ймовірно, за допомогою фосфорилування протеїнкіназ CDK16 та PAK1 [239].

3.1.2. Аналіз та порівняння 3D-моделей каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 та KIN11 з каталітичним доменом протеїнкінази BRSK1 людини

Для дослідження подібності протеїнкінази BRSK1 з протеїнкіназами SnRK1, було проведено порівняння 3D-моделів їх каталітичних доменів. Аналіз архітектури доменів показав, що обидві ізоформи KIN10 та KIN11, крім каталітичного домену (S_ТКс), містять убіхітин-асоційований домен UBA (Ubiquitin associated domain), що також був ідентифікований в двох ізоформах BRSK1. Домен UBA виконує кілька важливих функцій в якості інгібітора, активатора та стабілізатора, в залежності від стану фосфорилування кіназного домену або кофакторних взаємодій [240, 241]. Можна припустити, що регуляторні механізми двох ізоформ BRSK1 тварин та двох ізоформ KIN10 та KIN11 рослин можуть бути схожими (Рис. 3.4) [236].

Протеїнкінази, що містять домен UBA, беруть участь в різних біологічних процесах, таких як полярність клітин, контроль клітинного циклу, внутрішньоклітинна передача сигналів, а також стабілізація мікротрубочок та білкова стабільність. Подібний убіхітиновий домен присутній в ряді протеїнкіназ, пов'язаних з первинними центрами організації мікротрубочок [241].

Слід зазначити, що третя ізоформа BRSK1 не містить UBA домена, що свідчить не на користь її функціональної подібності до рослинних KIN10 та KIN11. Крім того, рослинна протеїнкіназа KIN10, а також дві ізоформи BRSK1 характеризуються наявністю асоційованого з С-кінцем кіназного домену 1 (KA1).

Численні білки, що містять домен KA1, пов'язані з цитоскелетом (MARK 1, 2, 3) та регуляцією клітинного поділу (MELK) [242]. Відомо, що у своїй просторовій конфігурації цей домен створює гідрофобну увігнуту поверхню, що оточена позитивно зарядженими групами амінокислотних

залишків [243] Ця увігнута поверхня є сайтом зв'язування для негативно заряджених ділянок білків цитоскелету, так як КА1 домен є важливим для субклітинної локалізації [241].

За нашими даними тільки одна ізоформа протеїнкінази KIN11 містить домен КА1. Такі результати показують більшу структурну ідентичність саме протеїнкінази KIN10 з протеїнкіназою BRSK1 людини. Також архітектура та склад каталітичного домена KIN10 свідчить про зв'язок цієї протеїнкінази з цитоскелетом.

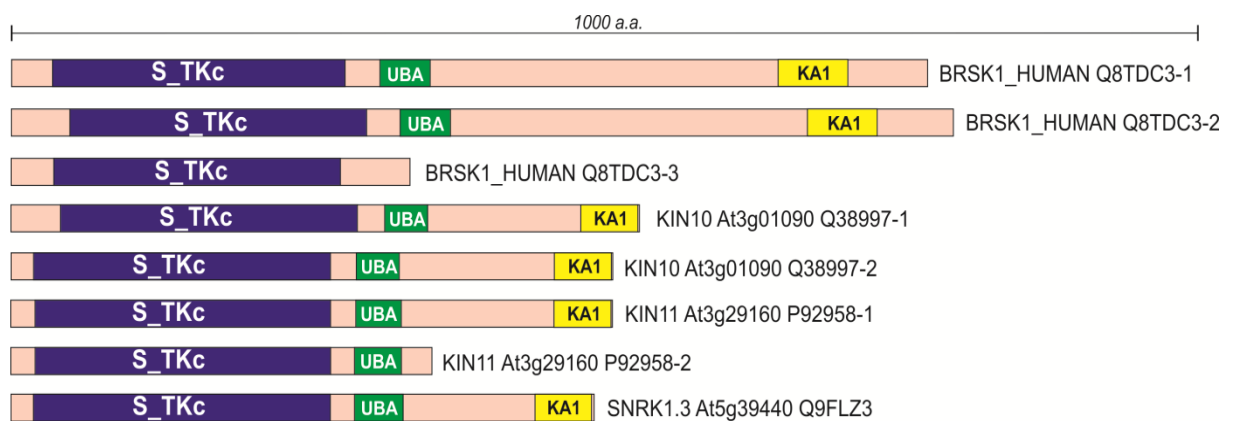


Рис. 3.4 Доменна архітектура трьох ізоформ BRSK1 людини та її найближчих рослинних гомологів *A. thaliana*: S_TKc - каталітичний домен серин/треонінових протеїнкіназ, UBA - убіхітин-асоційований домен, КА1 - С-кінцевий кіназний домен 1.

Також було проведено порівняння каталітичних доменів протеїнкіназ BRSK1 та KIN10 шляхом 3D-моделювання їх просторової структури. Було підтверджено високу подібність їх структурної організації. Накладення оптимізованих 3D-моделей остаточно підтвердило структурну гомологію каталітичних доменів протеїнкіназ BRSK1 людини та KIN10 з *A. thaliana* (RMSD = 0,173) (Рис. 3.5) [236, 244].

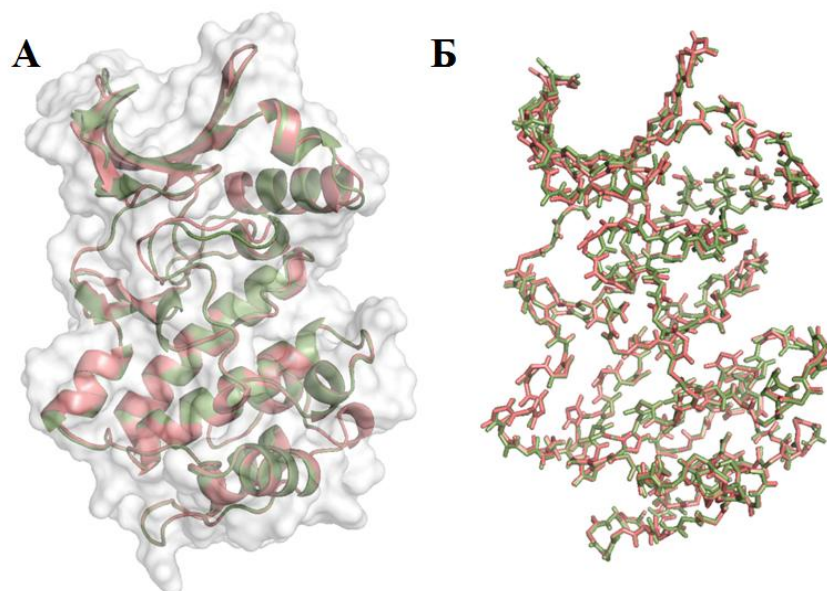


Рис. 3.5 Структурна суперпозиція каталітичних доменів протеїнкіназ BRSK1 людини (червоний) і KIN10 із *A. thaliana* (сірий) (RMSD = 0,173):

А - у вигляді стрічкової структури;

Б - у вигляді головних ланцюгів.

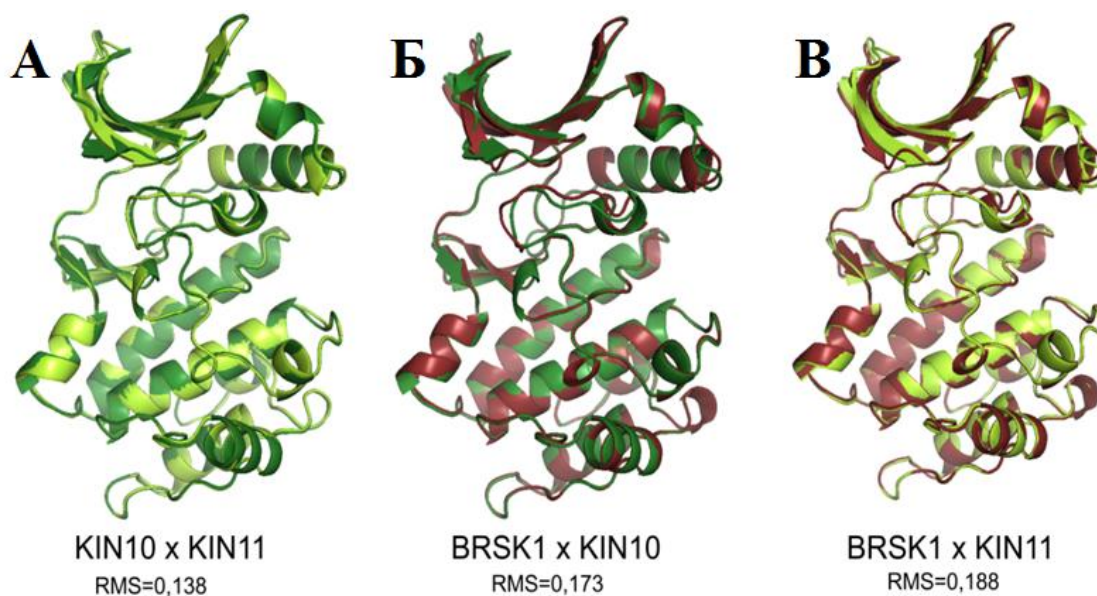


Рис. 3.6 Структурне накладання 3D-моделей каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 і KIN11 (**А**), та структурне порівняння KIN10 (**Б**) і KIN11 (**В**) з каталітичним доменом протеїнкінази BRSK1 людини.

Було виконано накладення та порівняння 3D-моделей каталітичних доменів KIN10 з KIN11 та відповідно KIN11 з BRSK1 (Рис. 3.6). Отримані результати підтвердили високу ідентичність KIN10 з KIN11 (RMSD = 0,138). Необхідно зауважити, що порівняння оптимізованих 3D-моделей показало меншу подібність KIN11 з BRSK1 (RMSD = 0,188) ніж KIN10 з BRSK1 (RMSD = 0,173) [236, 244].

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.1, були опубліковані в статтях:

Краснопьорова О.Є., Карпов П.А., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії у різних органах. Доповіді НАН України. 2016;1:81–91. doi:10.15407/dopovidi2016.01.081

Karpov P.A., Rayevsky A.V., Krasnoperova E.E., Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. Cytol. Genet. 2017;51(6):415–421. doi:10.3103/S0095452717060056

Краснопьорова О.Є., Ісаєнков С.В., Карпов П.А., Ємець А.І. Нові генетичні конструкції *KIN10-HIS/KIN11-HIS* як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкіназ SnRK1 та BRSK1. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:68–72.

3.2. Дослідження внутрішньоклітинної локалізації KIN10 в протопластах *A. thaliana* та суспензійної культури ВУ-2

Для поглибленого розуміння механізмів функціонування протеїнкінази KIN10 у клітині, наступним етапом нашої роботи, було визначити внутрішньоклітинну локалізацію цього ферменту. Внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкінази KIN10 вивчали на протопластах суспензійної культури ВУ-2 тютюну, трансформованих генетичною конструкцією, що містила химерний ген *KIN10-BFP*, та на протопластах *A. thaliana* (Col-0),

трансформованих генетичною конструкцією, що містила химерний ген *KIN10-RFP*.

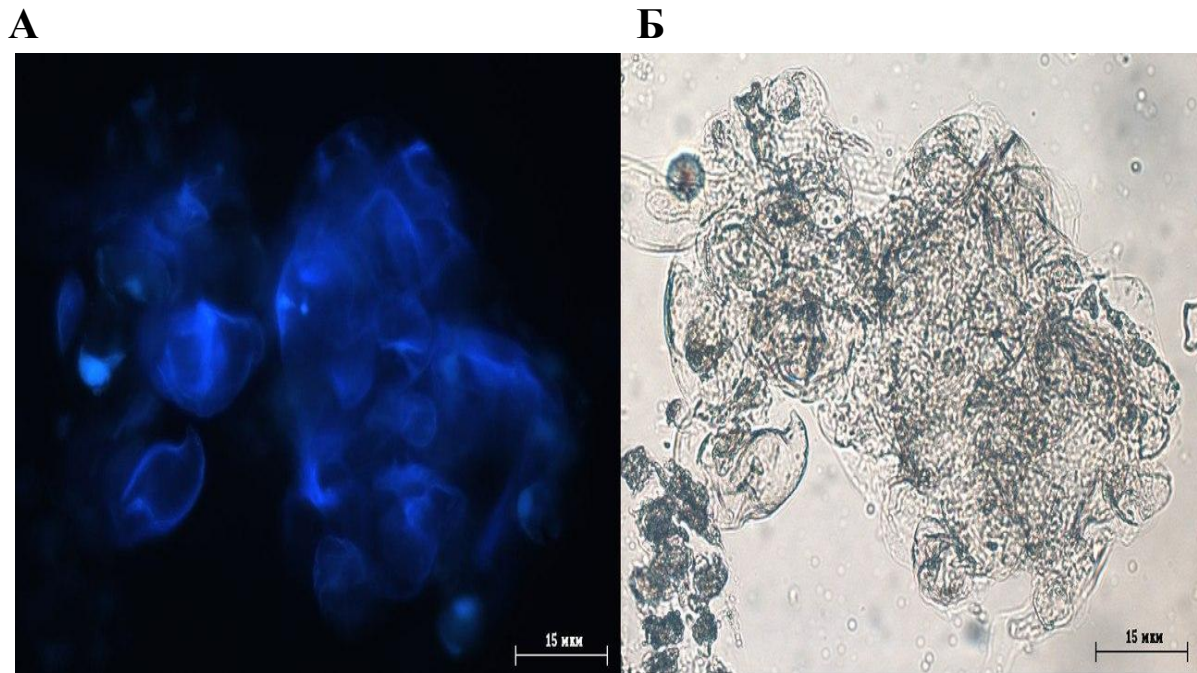


Рис. 3.7 Флуоресценція химерного білка KIN10-BFP (А) в протопластах суспензійної культури BY-2 (Б) після трансформації конструкцією рGWR7-*KIN10-BFP*.

За допомогою люмінесцентної мікроскопії було встановлено, що химерні білки KIN10-BFP (Рис. 3.7) та KIN10-RFP (Рис. 3.8) локалізуються переважно у примембранній області протопластів [201, 229, 230]. У деяких випадках спостерігали флуоресценцію блакитного кольору і в ядрах клітин.

Відомо, що протеїнкінази SnRK1 характеризуються своєю багатофункціональністю [245], що і обумовлює такий тип розподілу даного ферменту в живій клітині. Відповідно до такого характеру розподілу химерних злитих білків, можна припустити, що KIN10 відіграє важливу роль у регуляції біохімічних процесів цитоплазми. Як уже зазначалося раніше, ген *KIN10* може впливати також на профілі експресії ядерних генів [246, 69]. Згідно отриманих результатів та даних інших дослідників, каталітична субодиниця KIN10 має переважно цитоплазматичну та хлоропластну локалізацію [69]. Ця протеїнкіназа бере участь в багатьох клітинних процесах

як безпосередньо, так і опосередковано шляхом регуляції активності інших важливих клітинних елементів.

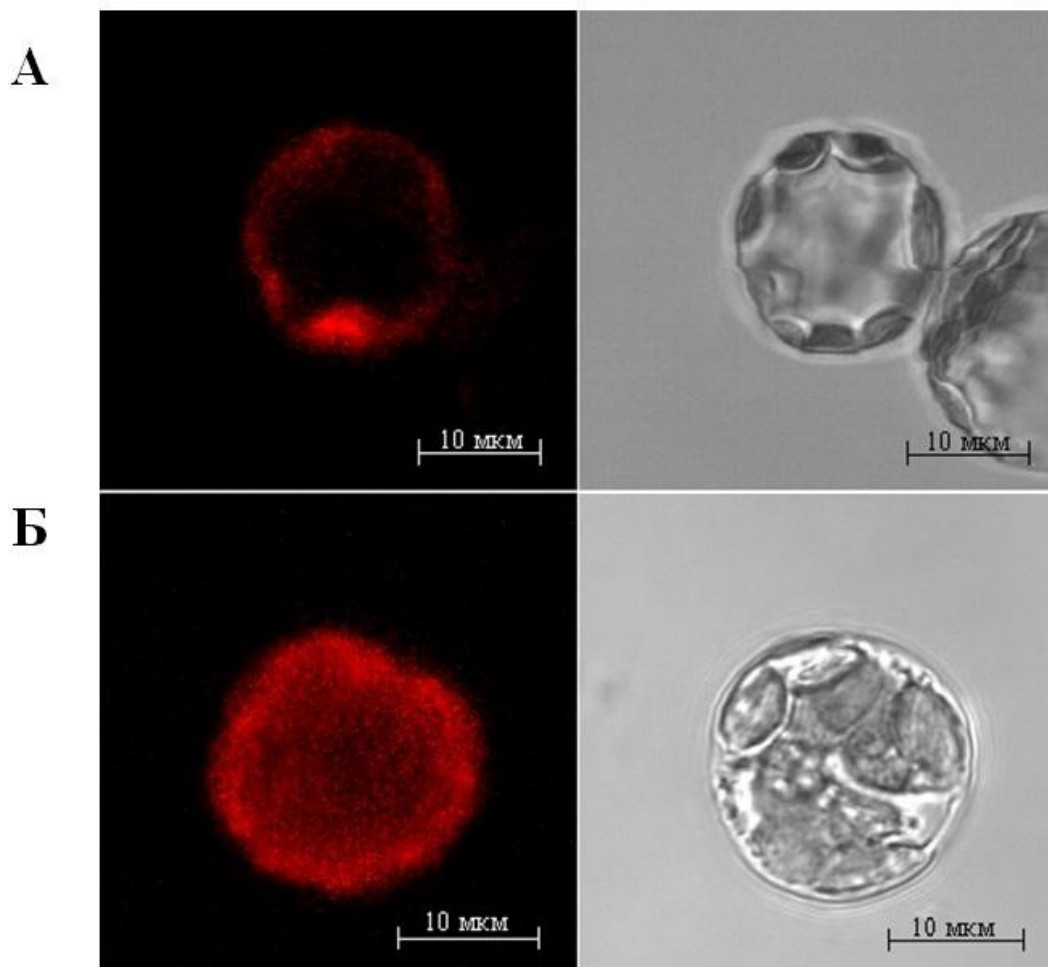


Рис. 3.8 Флуоресценція химерного білка KIN10-RFP в протопластах *A. thaliana* після трансформації конструкцією pART7-KIN10-RFP: (А); флуоресценція RFP у клітинах *A. thaliana* після трансформації контрольним вектором pART7-RFP (позитивний контроль) (Б).

Припускається, що цитоплазматична локалізація KIN10 пов'язана саме з регуляцією активності різних цитоплазматичних ферментів, а саме нітратредуктази, HMG-CoA редуктази та ін. [243], тому такий характер клітинної локалізації є прогнозованим. Окрім того, слід зазначити, що саме завдяки цитоплазматичній локалізації та можливій участі у регуляції роботи цитоскелету, протеїнкіназа KIN10 може відігравати роль у

внутрішньоклітинному транспорті, на що опосередковано вказують дані з роботи [246].

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.2, були опубліковані в статтях:

Краснопьорова О.Є., Новожилов Д.О., Блюм Я.Б., Ісаєнков С.В. Створення плазмідної конструкції протеїнкінази AtKIN10, зливої із RFP, для дослідження клітинної локалізації цього ферменту. Збірник наукових праць Уманського Національного Університету садівництва. 2014;84:95–99.

Краснопьорова О.Є., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вивчення клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 з *Arabidopsis thaliana*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;17:55–58.

Krasnoperova E.E., Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume Ya.B., Yemets A.I. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic subunits of SnRK1 protein kinases complexes in the regulation of *Arabidopsis* γ -tubulin. Cytol. Genet. 2019;53(5):349–356. doi:10.3103/S0095452719050104.

3.3. Оцінка рівнів експресії *KIN10* в різних органах *A. thaliana*

Відомо, що протеїнкіназа KIN10 є важливим елементом нормального функціонування рослин на всіх стадіях клітинного циклу [247, 248]. Тому для поглибленого розуміння механізмів функціонування цього фермента було важливо зрозуміти характер експресії гена *KIN10* в різних органах рослин. У результаті визначення рівнів експресії гена *KIN10* в різних органах *A. thaliana* найвищий рівень його експресії було зафіксовано в листі (Рис. 3.9). Відомо, що саме у листі відбувається широкий спектр біосинтетичних процесів [237].

Найнижчий рівень експресії *KIN10* було зафіксовано в коренях. Порівняно з листям, рівень експресії *KIN10* в коренях був приблизно в сім разів нижчим. В стеблі було зафіксовано майже в два рази вищий рівень експресії *KIN10* порівняно з коренями. В квітках рівень експресії *KIN10* був в 5 разів вищим, ніж в коренях (Рис. 3.10).

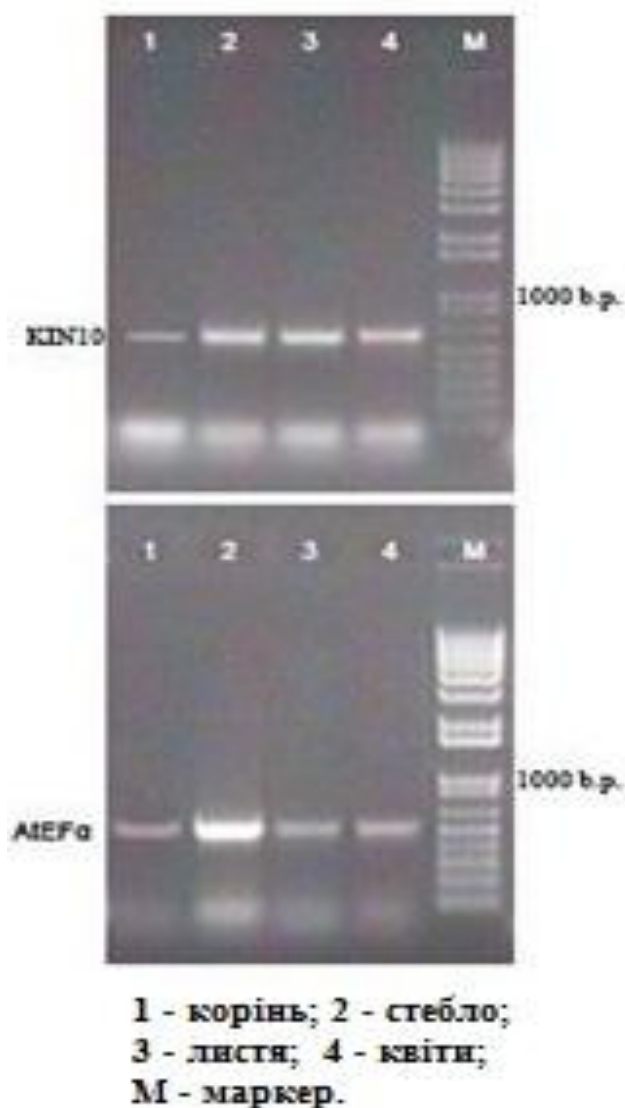


Рис. 3.9 Електрофореграма ампліконів гена *KIN10*, рівень експресії якого відрізняється в різних органах рослин *A. thaliana* (Col-0) .

Одним із головних місць клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 є хлоропласти, де і проходять процеси фотосинтезу [69]. Відомо, що представники протеїнкіназ SnRK1 складаються з трьох субодиниць — α , β та γ [69]. Існує припущення, що в *A. thaliana* внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкінази SnRK1 (KIN10) регулює певний комплекс $\beta\gamma$ -субодиниць, що має сигнальний хлоропластний транзитний пептид. При взаємодії з цим комплексом каталітичні субодиниці можуть потрапляти в хлоропласти і,

таким чином, регулювати активність біосинтетичних процесів у цих органелах [69].

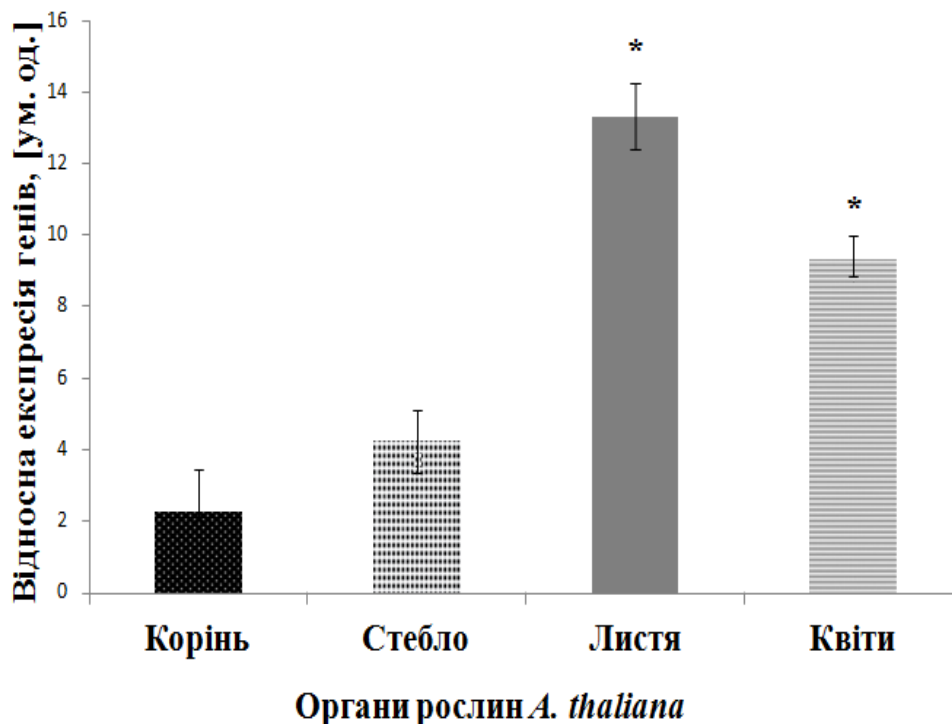


Рис. 3.10 Рівні експресії *KIN10* у різних органах *A. thaliana* (Col-0).

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; *- $p \leq 0,05$.

В коренях нами було зафіксовано найнижчу експресію протеїнкінази *KIN10*. Відомо, що корінь є підземним вегетативним органом, і його клітинах відсутні хлоропласти та процеси, пов'язані з фотосинтезом [69]. Таким чином, отримані результати аналізу свідчать про важливу участь протеїнкінази *KIN10* у регуляції біосинтетичних та сигнальних процесів, пов'язаних із фотосинтезом та метаболізмом цукрів та низьку необхідність активності *KIN10* в коренях.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.3, були опубліковані в статті: Краснопорова О.Є., Карпов П.А., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази *KIN10*

та особливості її експресії у різних органах. Доповіді НАН України. 2016;1:81–91 doi:10.15407/dopovidi2016.01.081

3.4. Визначення рівнів експресії *KIN10* за дії сольового, осмотичного та енергетичного стресів

Оскільки відомо, що протеїнкіаза *KIN10* є важливим елементом в формуванні відповіді рослин на дію стресів різної природи [74], було проведено транскрипційний аналіз гена *KIN10* за умов впливу сольового, осмотичного та енергетичного стресів. Встановлено, що у рослин *A. thaliana* дикого типу (Col-0), які зростали в умовах сольового, осмотичного та енергетичного стресів дуже варіюють рівні експресії *KIN10* (Рис. 3.11).

Найнижчий рівень експресії *KIN10* фіксували через 2 год. Через 8 год спостерігали підвищення експресії цього гена в середньому майже в п'ять разів за умов дії всіх використаних в дослідженні стресів. Через 24 год вирощування в умовах дії стресових чинників спостерігали зниження рівнів експресії *KIN10* на 20-30%, порівняно з обробкою протягом 8 год.

Такі результати можуть бути обумовлені тим, що захисні механізми рослин після 8год дії стресу, знаходяться у активній фазі метаболічних та транскрипційних перебудов. Проте через 24 год за підтримку гомеостазу рослин відповідають уже інші сигнальні та регуляторні процеси, що не залежать від *KIN10*.

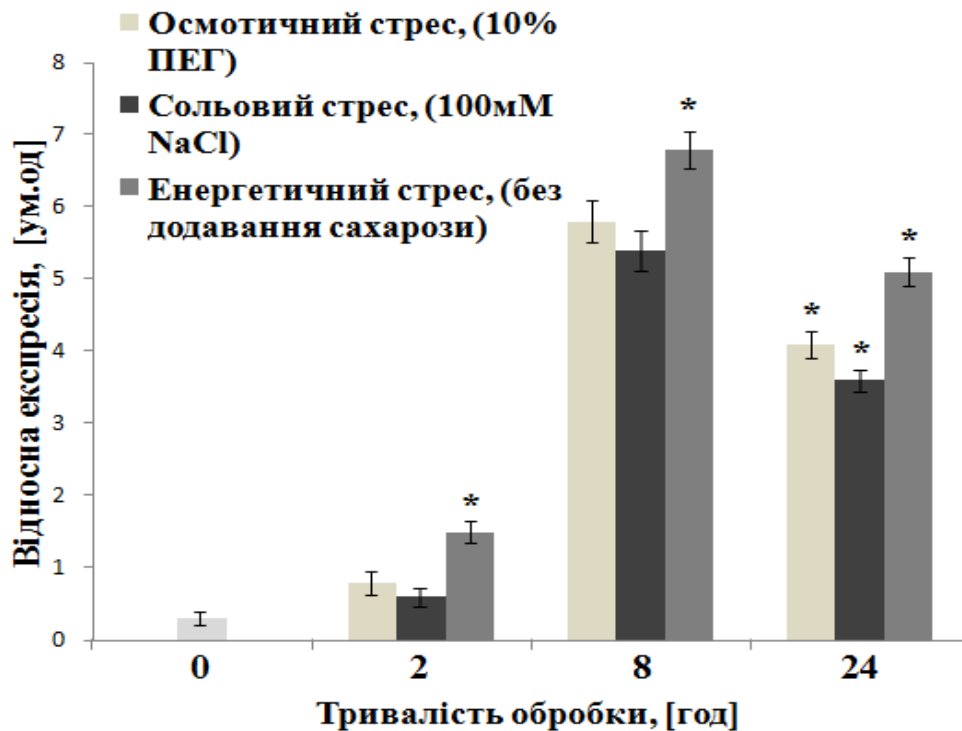


Рис. 3.11 Рівні експресії *KIN10* через 2, 8 та 24 год за дії сольового, осмотичного та енергетичного стресів.

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; *- $p \leq 0,05$.

Також варто зауважити, що за умов дії енергетичного стресу у всіх зразках експресія *KIN10* була вищою. Такі результати можуть свідчити про вирішальну участь *KIN10* в процесах адаптації рослин до умов енергетичного дефіциту [249].

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.4 були опубліковані в тезах: Краснопорова О.Є., Буй Д.Д., Ісаєнков С.В., Ємець А.І. Вивчення експресії *KIN10* та *KIN11* за умов дії сольового та осмотичного стресів. Збірник тез доповідей третьої конференції молодих учених "Біологія рослин та біотехнологія", 16-18 травня Київ. 2017, с. 14.

3.5. Аналіз росту та розвитку головних коренів трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10*

Нами було проаналізовано зміни росту та розвитку головних коренів проростків трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією *KIN10* і дикого типу (Col-0) за нормальних умов та за умов енергетичного стресу. Серед всіх досліджених ліній *A. thaliana* найбільшою довжиною коренів як на середовищі МС з сахарозою, так і на середовищі МС без сахарози характеризувались проростки дикого типу (Col-0).

Активність протеїнкінази KIN10 у контрольній лінії проростків не зазнавала змін, тому протеїнкіназа KIN10 нормально активувалася при зниженні клітинного рівня глюкози та АТФ. Вмикаючи відповідні адаптаційні механізми KIN10 сприяла подальшому росту та розвитку рослин. Жодні сигнальні механізми не були порушені. Варто зауважити, що довжина коренів проростків дикого типу на середовищі МС без додавання сахарози була нижчою (майже в 2-2,5 рази) ніж на середовищі МС з сахарозою (Рис. 3.12) [250].

Зовсім інші закономірності спостерігали для ліній рослин з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10*. У лінії з гіперекспресією *KIN10* (OX) на середовищі без сахарози було зафіксовано в два рази вищий показник довжини коренів, ніж на середовищі МС з сахарозою. Такі результати можуть свідчити про підвищення чутливості рослин до дефіциту сахарози та прискорення формування стресової відповіді.

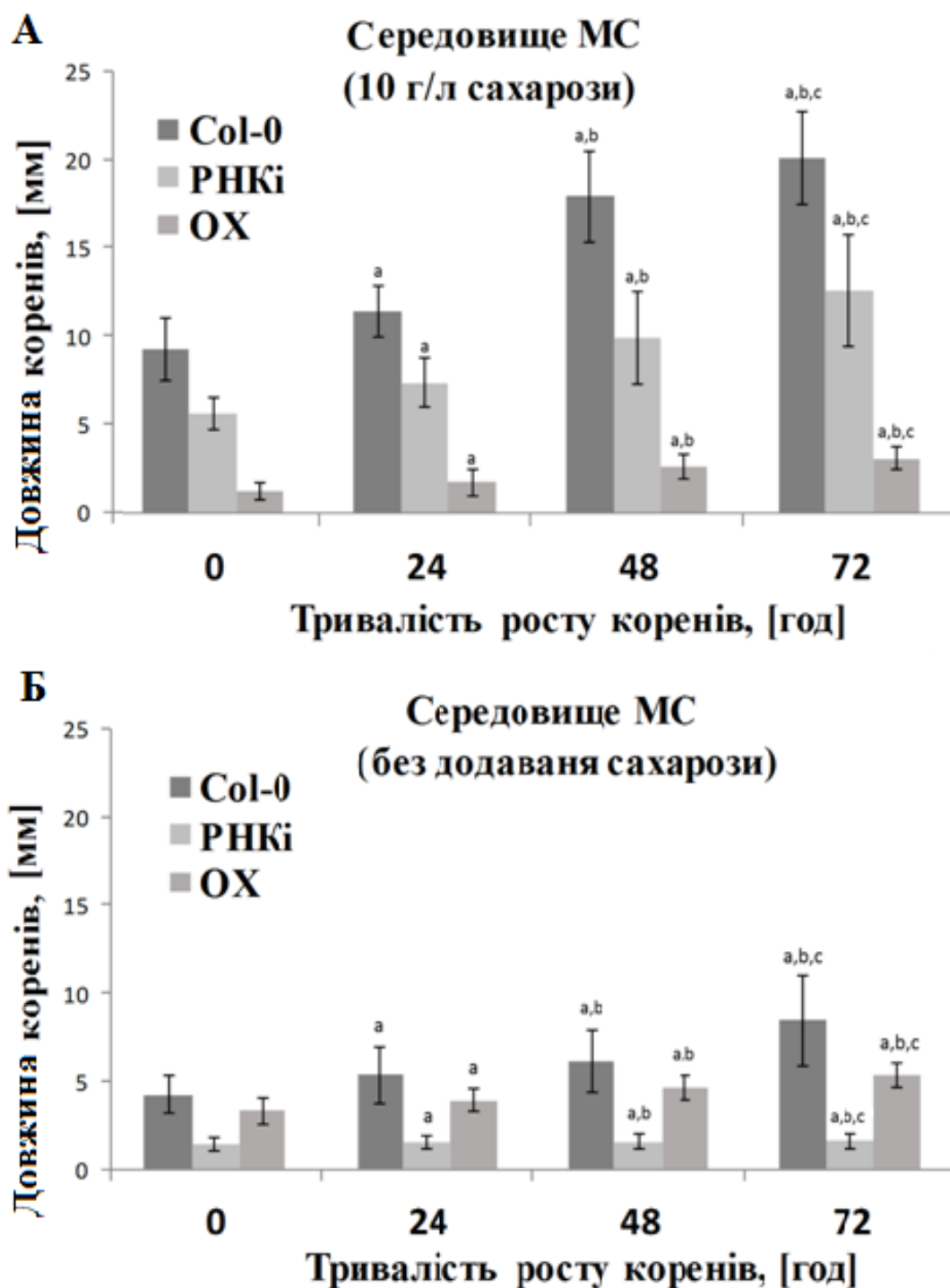


Рис. 3.12 Показники довжини головних коренів проростків ліній *A. thaliana* з гіперекспресією (ОХ) та РНК-інтерференцією (РНКi) гена *KIN10* (по вертикалі, мм) на середовищі МС з сахарозою (А) та на середовищі МС без сахарози (Б). Контроль - *A. thaliana* (Col-0); по горизонталі - час, год

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; $p \leq 0,05$.

Відомо, що підвищення експресії *KIN10*, як одного з головних посередників передачі стресового сигналу при дефіциті цукрів у клітині, допомагає рослинам швидше адаптуватись до відповідних стресових факторів [259]. Потрібно зауважити, що довжина коренів у проростків з гіперекспресією гена *KIN10* була меншою (приблизно в 0,9 разів через 0 год, та майже в 2 рази через 72 год) на середовищі без сахарози, ніж у проростків дикого типу. Це може бути обумовлено певними порушеннями у регуляції їхніх внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Зокрема, рослини з гіперекспресією *KIN10* витрачають більше ресурсів на синтез цього ферменту.

Подібні зміни можуть призводити до порушень метаболізму глюкози, що впливають на формування різних сигнальних процесів. Проте гіперекспресія *KIN10* сприяє вмиканню всіх необхідних механізмів рослинної відповіді на умови енергетичного дефіциту. Такі рослини мають змогу краще та швидше адаптуватися до стресу, хоча і характеризуються зниженим ростом головних коренів.

У проростків лінії з РНК-інтерференцією гена *KIN10* (РНКі) на середовищі МС без додавання сахарози зафіксовано в два рази нижчий показник довжини коренів через 0 та 24 год порівняно з проростками з гіперекспресією *KIN10*. Довжина коренів у проростків з РНК-інтерференцією була майже в три рази меншою порівняно з проростками з гіперекспресією через 48 та 72 год вирощування. Таке явище може бути пов'язано з порушеннями сигнальних процесів, які регулюються продуктом гена *KIN10*. Таким чином, ці рослини можуть зазнавати певних ускладнень в формуванні відповідей на дію енергетичного дефіциту. Слід зазначити, що у рослин з РНК-інтерференцією *KIN10* може порушуватись метаболізм глюкози та інших речовин, що тісно пов'язані з цим процесом.

Вважається, що саме протеїнкіназа *KIN10* бере участь у метаболічних змінах, що обумовлюють фізіологічний статус рослин за умов енергетичного дефіциту. Зокрема, протеїнкіназа *KIN10* бере участь у регуляції метаболізму

крохмалю [69]. Отже, РНК-інтерференція гена *KIN10* може негативно вплинути на метаболізм крохмалю, що є одним із головних джерел енергії рослин. Також пригнічення експресії гена *KIN10* впливає на формування відповіді на дію енергетичного дефіциту, що призводить до затримки фізіологічного розвитку організму.

На середовищі МС з сахарозою у проростків з РНК-інтерференцією довжина коренів була більшою в чотири та п'ять разів (через 0 та 24 год) та в сім та дев'ять разів (через 48 та 72 год) порівняно з проростками, що росли на середовищі без сахарози. Отже, пригнічення рівня експресії *KIN10* не було критичним фактором для їхнього нормального розвитку. Навпаки, надмірна експресія *KIN10* у рослин за нормальних умов може призводити до порушень метаболізму глюкози та енергетичного сигналіngu. Саме тому, за нормальних умов спостерігали майже в два рази меншу довжину коренів у трансгенних проростків з гіперекспресією *KIN10*. Зокрема, припускається, що для забезпечення надмірної експресії *KIN10* рослина витрачає більше своїх ресурсів, що може спричиняти затримку росту та розвитку.

Окрім того, за нормальних умов посилення експресії *KIN10* рослина може сприймати як сигнал стресу. Ці рослини будуть витрачати частину своїх енергетичних резервів на формування непотрібної стресової відповіді. Таке явище призводитиме до дефіциту ресурсів, погіршення росту та розвитку самої рослини.

Також варто зазначити, що під час проведення морфологічного аналізу десятиденних проростків трансгенних ліній *A. thaliana*, рослини характеризувались зміненою морфологією головного кореня (Рис. 3.13). Зокрема, головні корені проростків з РНК-інтерференцією на середовищі МС з сахарозою порівняно з диким типом були потовщені та мали надмірну кількість кореневих волосків. На середовищі МС без сахарози лінія з РНК-інтерференцією та дикий тип мали малу кількість кореневих волосків.

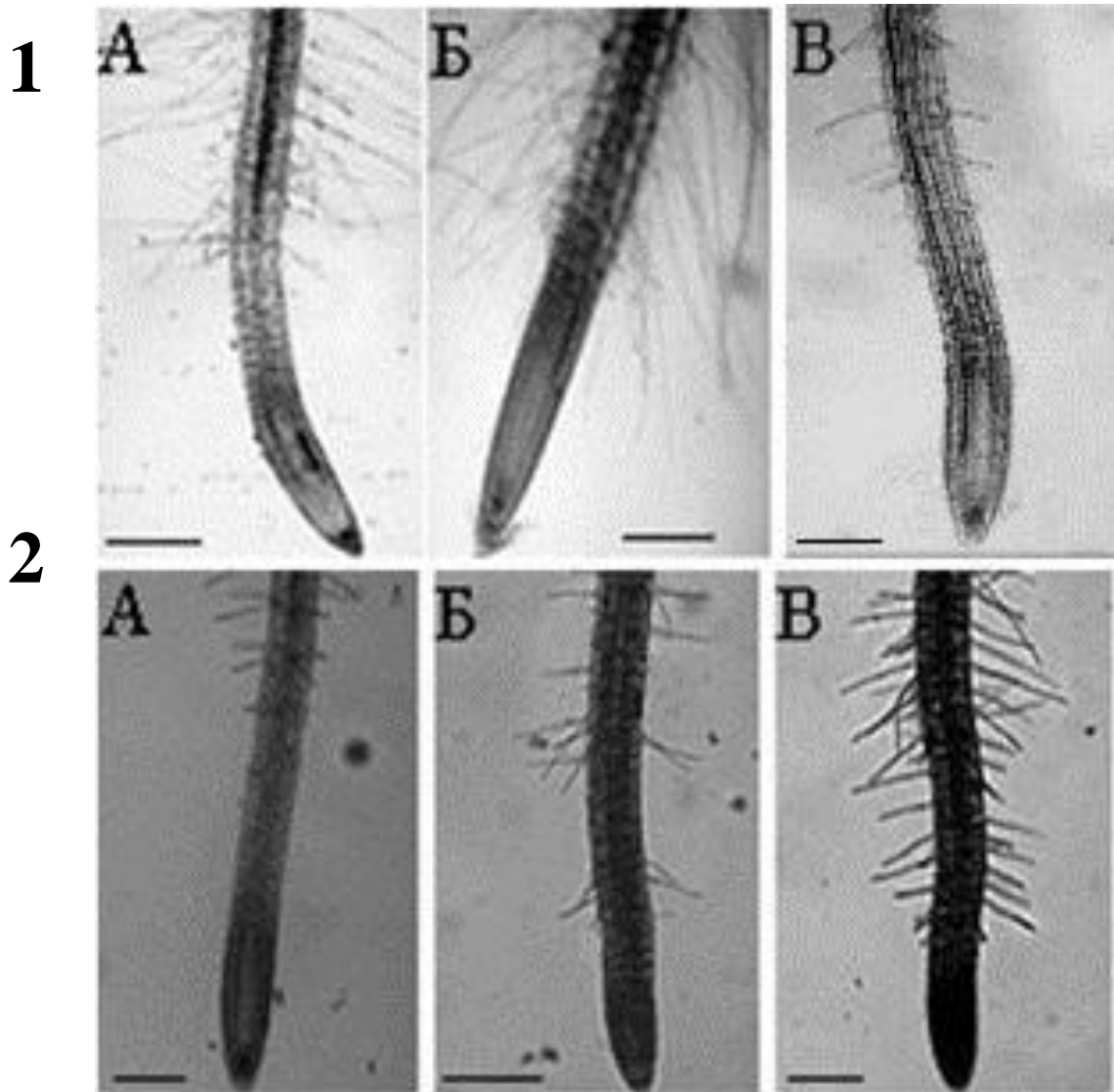


Рис. 3.13 Морфологічні зміни коренів проростків різних ліній *A. thaliana*, вирощених на середовищі МС з сахарозою (1), та проростків, вирощених на середовищі МС без сахарози (2): А - дикий тип *A. thaliana* (Col-0); Б - проростки з РНК-інтерференцією *KIN10*; В - проростки з гіперекспресією *KIN10*; Масштаб – 1мм

У проростків з гіперекспресією *KIN10* спостерігали протилежний ефект. На середовищі МС з сахарозою корені цієї лінії були потовщені та мали малу кількість кореневих волосків. На середовищі МС без додавання сахарози корені проростків з гіперекспресією *KIN10* характеризувались

нормальною морфологією, але у них спостерігали короткі кореневі волоски. Всі ці дані свідчать про важливу роль KIN10 у регуляції процесів, пов'язаних з розвитком та ростом коренів.

Раніше було описано, що інгібування певних типів серин-треонінових протеїнкіназ, а саме циклін-залежних, Ca^{2+} -кальмодулін-залежних та протеїнкінази C призводить до змін орієнтації та організації мікротрубочок епідермальних клітин, клітин кори перехідної зони та зони диференціації [251]. Також було продемонстровано, що індукція формування великої кількості корневих волосків після обробки інгібіторами протеїнкіназ, а саме оломоуціном, стауроспорином, H7 та W7, є наслідком саме зміни орієнтації мікротрубочок у клітинах кореня після інгібування вищезазначених типів протеїнкіназ [251].

Оскільки протеїнкіназа KIN10 має високу ідентичність з тваринною BRSK1, яка взаємодіє саме із γ -тубуліном, можна припустити, що зміна морфології коренів, використаних в цій роботі трансгенних ліній *A. thaliana* може бути пов'язана зі структурними змінами мікротрубочок. Також, аналізуючи результати проведених досліджень, варто відзначити, що зміни рівнів експресії гена *KIN10*, можуть призводити до виражених морфологічних змін в певних органах рослин.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.5, були опубліковані в статті: Krasnoperova E.E., Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Influence of protein kinase KIN10 gene expression on root phenotype of *Arabidopsis thaliana* root system under condition of energy stress. *Cytol. Genetics*. 2016;50(4):215–220. doi:10.3103/S009545271604006X.

3.6. Зміни мітотичного індексу клітин проростків мутантних ліній *kin10* та *kin11* *A. thaliana* за умов енергетичного стресу

Для вивчення ролі протеїнкіназ SnRK1 у процесах клітинного поділу визначали мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми у

нокаутних лініях *kin10* та *kin11* *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми був нижчим в проростках мутантних ліній *kin10* та *kin11* порівняно з диким типом (Рис. 3.14). Зокрема, він був майже в три рази нижчим при вирощуванні на середовищі з сахарозою. За умов енергетичного дефіциту мітотичний індекс також був нижчий в обох мутантних лініях (в п'ять разів). У мутантів, що росли за умов енергетичного дефіциту, фіксували нижчий мітотичний індекс, ніж в проростках, що росли за нормальних умов [252].

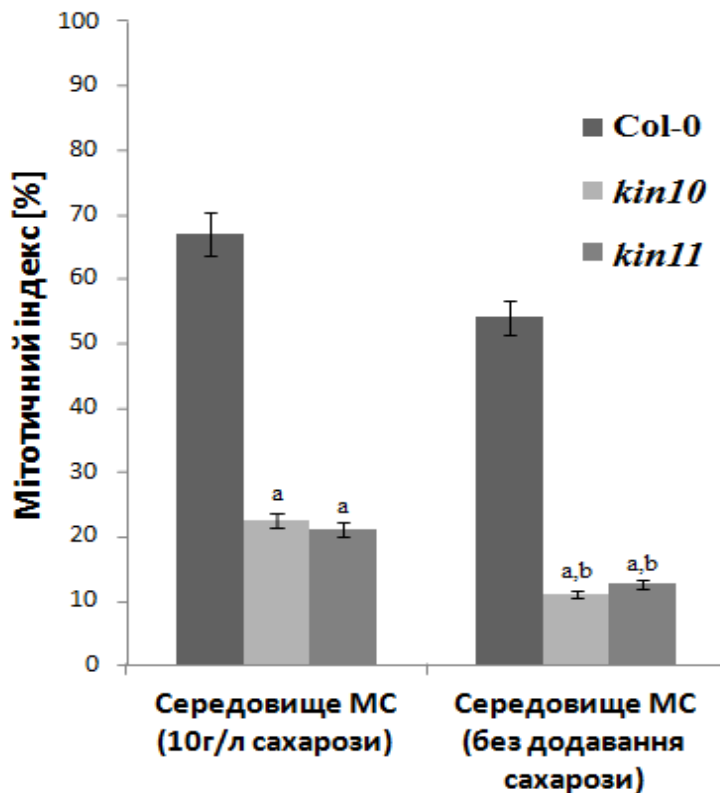


Рис. 3.14 Показники мітотичного індекса кореневої апікальної меристеми клітин *A. thaliana* (Col-0) та мутантних ліній *kin10* та *kin11*, що росли за нормальних умов та за умов енергетичного стресу (без додавання сахарози).

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; $p \leq 0,05$.

Для підтвердження низького рівня клітинної проліферації в нокаутних лініях *kin10* та *kin11*, було проаналізовано кореляцію рівнів експресії маркерних генів клітинної проліферації за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту (Рис. 3.15) [252]. Для цього використовували маркерні гени клітинної проліферації *CYCB1;1* та *AtBRCA1*.

Відомо, що *CYCB1;1*(AT4G37490) є циклін-залежною серин-треоніною протеїнкіназою, регулятором клітинного поділу та фазового переходу під час клітинного циклу. *AtBRCA1*(AT4G21070) – рослинний гомолог *BRCA1* тварин, бере участь в регуляції клітинного циклу та подвоєнні центросом шляхом регулювання нуклеації мікротрубочок. Зниження рівня експресії гена *AtBRCA1* може негативно впливати на функціонування γ -тубуліну. Загалом зниження рівнів експресії генів *CYCB1;1* та *AtBRCA1* свідчить про затримку клітинної проліферації та порушення процесів нуклеації мікротрубочок [253, 254, 255]. Встановлено, що у обох мутантних ліній рівні експресії генів *CYCB1;1* та *AtBRCA1* були нижчими, ніж у дикого типу.

Варто зазначити, що у мутантних лініях *kin10* та *kin11*, вирощених в умовах енергетичного дефіциту, експресія *CYCB1;1* та *AtBRCA1* була нижчою, порівняно з аналогічними рослинами, вирощеними за нормальних умов (контроль). Зокрема, у лінії *kin10* за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами експресія була нижчою як у *CYCB1;1* (майже в чотири рази), так і у *AtBRCA1* (приблизно в сім разів). У мутантній лінії *kin11* експресія також була нижчою як у гена *CYCB1;1* (майже в три рази), так і у *AtBRCA1* (майже в п'ять разів) за умов енергетичного дефіциту порівняно з контроле

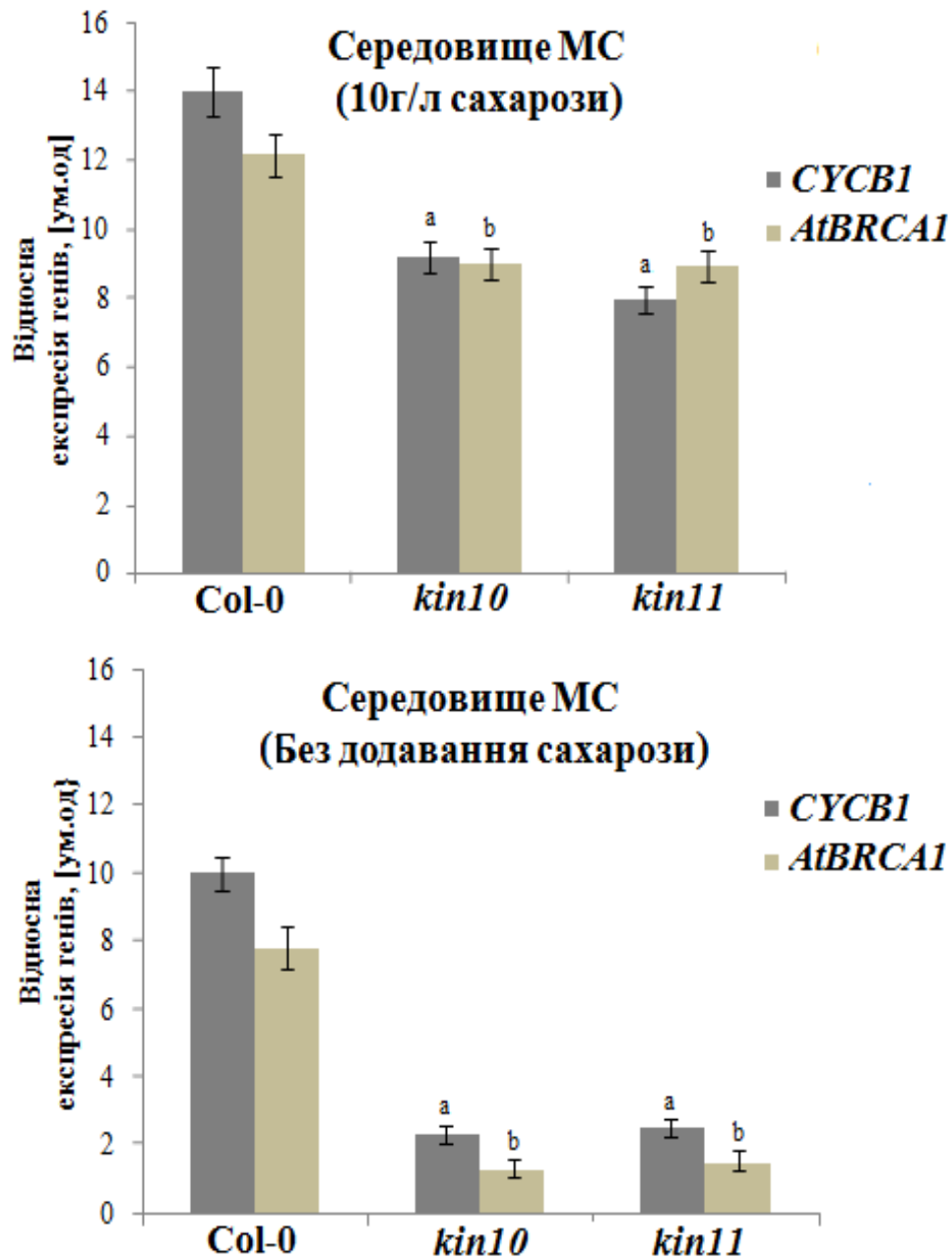


Рис. 3.15 Рівні експресії маркерних генів *CYCB1;1* та *AtBRCA1* у контрольній та мутантних лініях 7-денних проростків *A. thaliana* з нокаутованою експресією *KIN10* та *KIN11*: **А** - за нормальних умов; **Б** - за умов енергетичного дефіциту

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; $p \leq 0,05$.

Відомо, що представники протеїнкіназ SnRK1 здійснюють особливо важливі функції під час енергетичного дефіциту. Адже активність цих ферментів залежить від енергетичного балансу клітини [43]. Зниження енергетичного балансу призводить до активації протеїнкіназ KIN10 та KIN11, які сприяють вмиканню процесів катаболізму в клітині, вимикаючи всі можливі енергозатратні механізми. Тому нокаутні мутанти *kin10* та *kin11*, які були вирощені в умовах енергетичного дефіциту, значно вразливіші, ніж вирощені за нормальних умов. Відповідно, клітини таких рослин можуть мати низький рівень клітинної проліферації. Таким чином, можна припустити, що активність генів *KIN10* та *KIN11* пов'язана з клітинним поділом.

Для підтвердження гіпотези про можливість існування певної позитивної кореляції між інтенсивністю клітинного поділу та рівнем експресії генів *KIN10* та *KIN11* було проведено порівняння рівнів експресії генів *KIN10* та *KIN11* у клітин суспензійної культури *A. thaliana* та в інтактних проростках. Відомо, що суспензійні клітини *A. thaliana* характеризуються більш високим мітотичним індексом у порівнянні із клітинами інтактних проростків [256]. На нашу думку цей показник також може корелювати з рівнем експресії генів досліджуваних протеїнкіназ KIN10 та KIN11.

У клітинах суспензійної культури *A. thaliana* було зафіксовано вищі (майже в 2,5 рази) рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* у порівнянні з інтактними проростками (Рис. 3.16). Враховуючи значне перевищення рівнів експресії генів *KIN10* та *KIN11* у клітинах суспензійної культури, можна припустити, що один з механізмів дії цих протеїнкіназ може бути пов'язаний саме з регуляцією клітинного поділу.

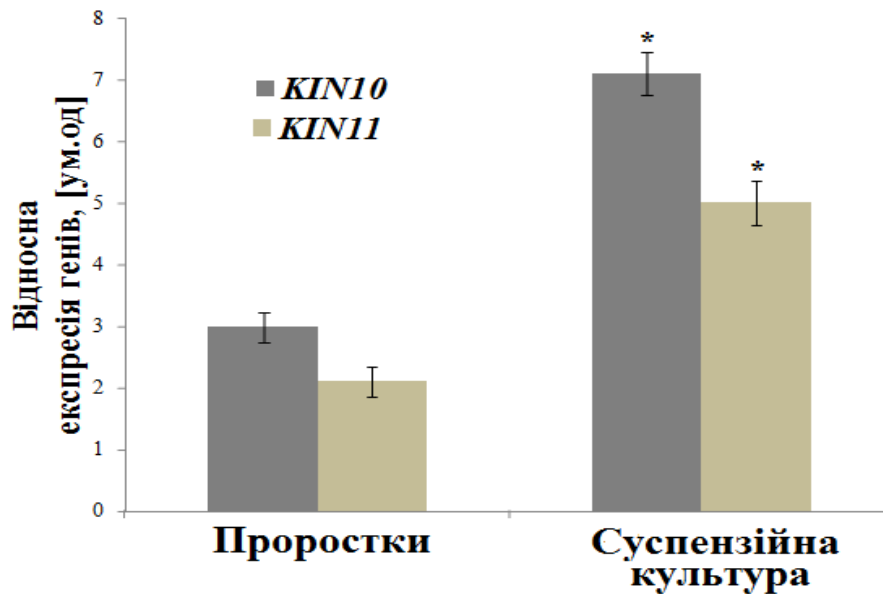


Рис. 3.16 Рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* по відношенню до конститутивного рівня експресії гена актину (*AtActin*) у 7-денних проростках *A. thaliana* (Col-0) та 7-денній суспензійній культурі *A. thaliana*

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; *- $p \leq 0,05$.

Варто зауважити, що експресія *KIN10* була вищою, ніж експресія *KIN11*, як у звичайних проростках *A. thaliana*, так і в клітинах суспензійної культури. Такі результати можуть свідчити про більш важливу активність саме *KIN10* під час проходження стадій клітинного поділу. Також отримані дані підтверджують ключову роль та високе функціональне навантаження *KIN10* порівняно з *KIN11* в під родині SnRK1 протеїнкіназ.

Для підтвердження того, що суспензійна культура має високий мітотичний індекс, порівнювали також рівні експресії маркерних генів клітинної проліферації – *CYCB1;1* та *AtBRCA1* - у суспензійній культурі клітин *A. thaliana* та в інтактних проростках (Рис. 3.17). Було ідентифіковано вищий рівень експресії *CYCB1;1* та *AtBRCA1* саме у суспензійній культурі, що свідчить про високий рівень клітинної проліферації в суспензійній культурі. Зважаючи на високу експресію генів *KIN10* та *KIN11* в суспензійній культурі порівняно з інтактними проростками *A. thaliana*, можна припустити,

що каталітичні субодиниці SnRK1 (KIN10 та KIN11) безпосередньо залучені в регуляцію процесів клітинного поділу.

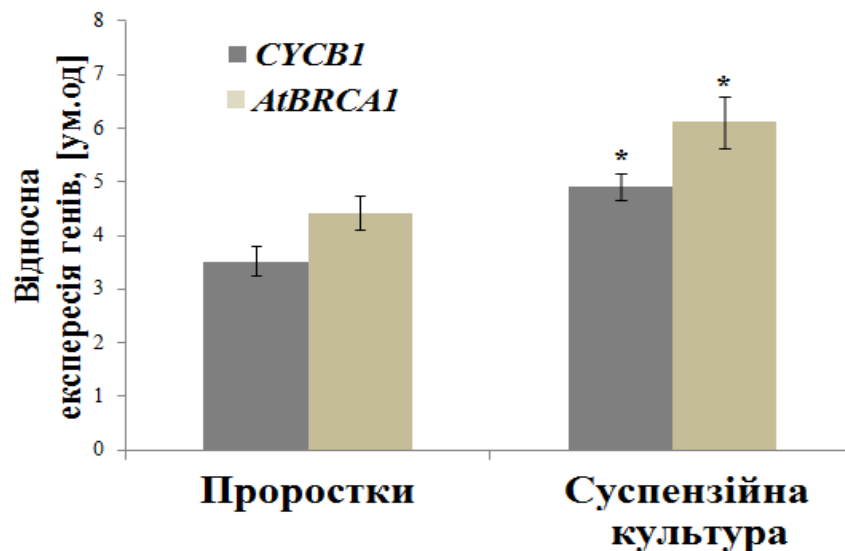


Рис. 3.17 Рівні експресії маркерних генів *CYCB1* та *AtBRCA1* по відношенню до конститутивного рівня експресії гена актину (*AtActin*) у 7-денних проростках *A. thaliana* (Col-0) та 7-денній суспензійній культурі *A. thaliana*.

Примітка: дані подано у вигляді $M \pm m$; *- $p \leq 0,05$.

Отримані нами результати показують, що мітотичний індекс та рівні експресії маркерів клітинної проліферації *CYCB1;1* та *AtBRCA1* у нокаутних лініях SALK_139618C та SALK_127939C *A. thaliana*, мають нижчі показники, ніж у контрольній лінії за нормальних умов. За умов енергетичного дефіциту експресія даних генів також знижувалась. У суспензійній культурі *A. thaliana*, яка характеризується інтенсивним клітинним поділом, було встановлено високий рівень експресії як маркерних генів, так і *KIN10/KIN11*, у порівнянні з рослинами дикого типу (контроль). Отже, отримані дані можуть розглядатись як додаткове підтвердження нашого припущення стосовно можливої участі каталітичних субодиниць протеїнкіназ SnRK1 (KIN10 та KIN11) у регуляції процесів клітинної проліферації вищих рослин, як за нормальних умов так и за умов енергетичного дефіциту.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.6, були опубліковані в статті: Krasnoperova E.E., Buy D.D., Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume Ya.B., Yemets A.I. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division of *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.* 2019;53(3):185–191. doi:10.3103/S0095452719030022

3.7. Розподіл γ -тубуліну в клітинах коренів нокаутних мутантів та колокалізація білка KIN10 з γ -тубуліном в клітинах кореня *A. thaliana*

Зважаючи на результати наших попередніх досліджень, однією з можливих функцій представників протеїнкіназ SnRK1 є регуляція процесів клітинного поділу шляхом безпосередньої взаємодії з γ -тубуліном [236]. Для дослідження взаємозв'язку протеїнкіназ KIN10 та KIN11 з γ -тубуліном визначали інтенсивність флуоресценції γ -тубуліном після його детекції методом імуофлуоресцентної мікроскопії за використання відповідних моноклональних антитіл проти γ -тубуліну, яка може корелювати з його кількістю у клітинах головних коренів нокаутних мутантів по генах *KIN10* (лінія SALK_139618C) та *KIN11* (лінія SALK_127939C),

Як відомо, представники протеїнкіназ SnRK1 беруть участь в пристосуванні рослин до дії різних стресів. Зокрема, активність цих ферментів важлива для нормального функціонування рослинного організму за умов енергетичного дефіциту [257]. Тому для визначення інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах мутантних ліній проростки вирощували за нормальних умов (у присутності сахарози) (Рис. 3.18) та за умов енергетичного стресу (Рис. 3.19) .

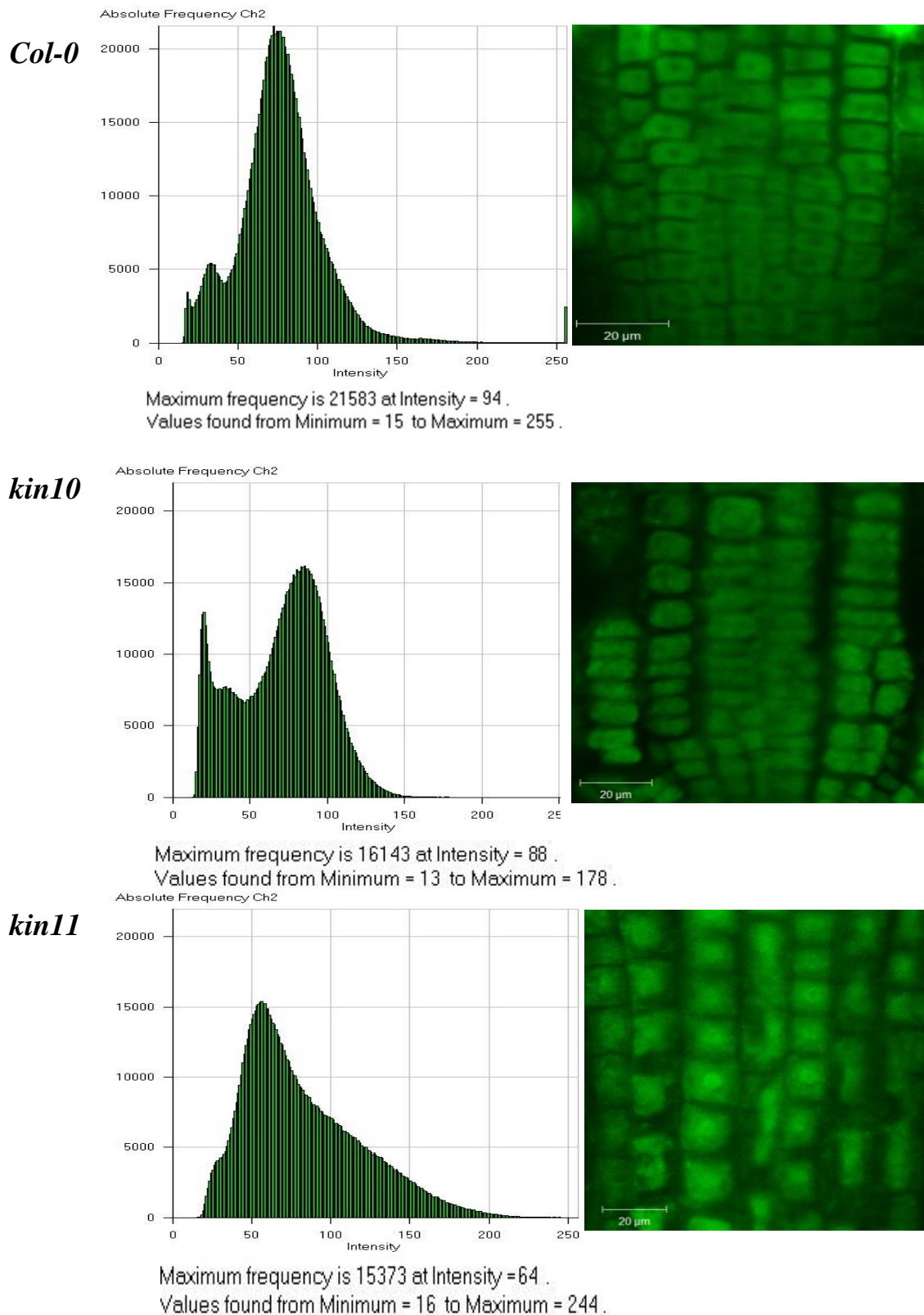


Рис. 3.18 Розподіл інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів контрольної (*Col-0*) та мутантних ліній *kin10* та *kin11* *A. thaliana*, вирощених на середовищі МС із сахарозою.

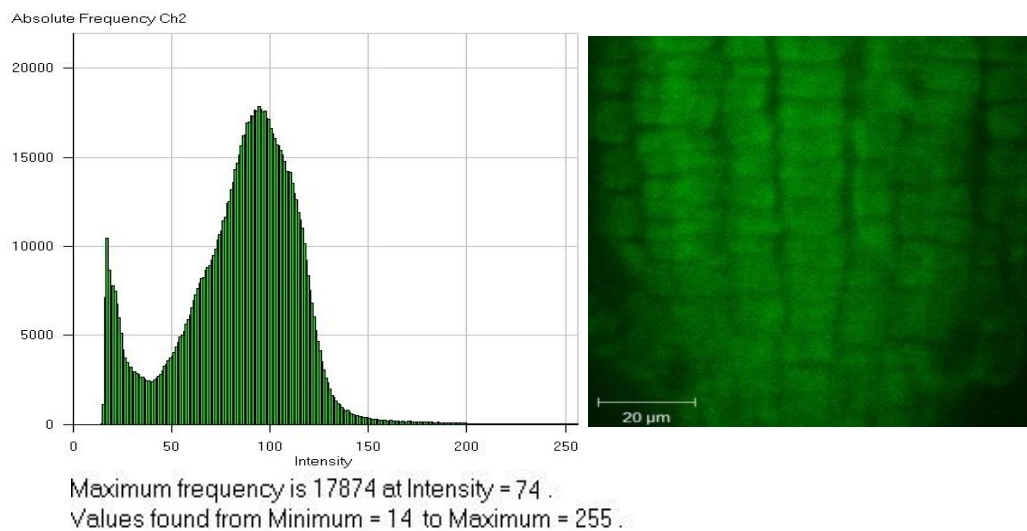
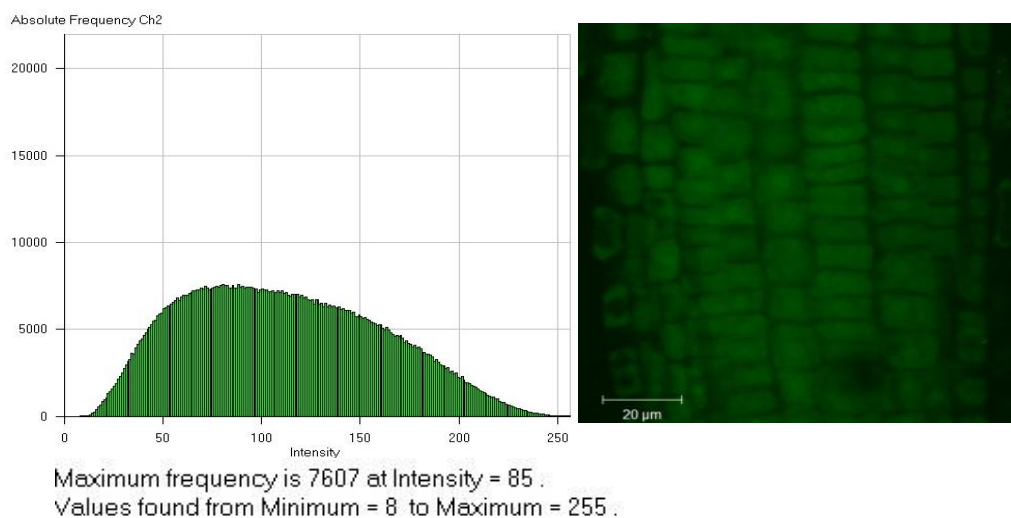
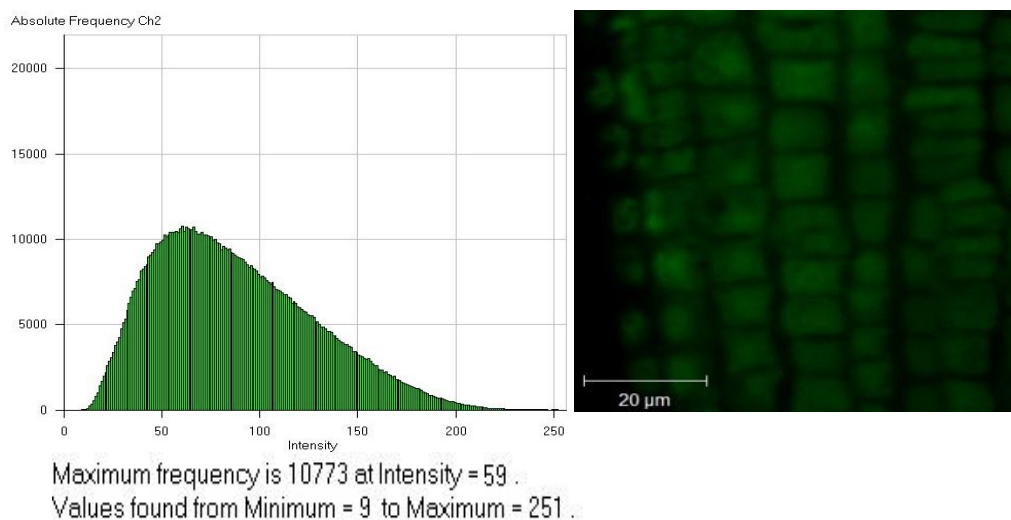
Col-0***kin10******kin11***

Рис. 3.19 Розподіл інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів контрольної (*Col-0*) та мутантних ліній *kin10* та *kin11* *A. thaliana*, вирощених за середовищі МС без додавання сахарози.

В мутантних лініях було зафіксовано нижчий рівень флуоресценції γ -тубуліну, ніж в Col-0, – як за нормальних умов, так і за умов енергетичного стресу. Синергічний ефект одночасної дисфункції *KIN10* або *KIN11* та енергетичного дефіциту характеризувався найнижчим рівнем інтенсивності внутрішньоклітинної флуоресценції γ -тубуліну [201]. Зокрема, інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну була нижчою (майже в 2 рази для *kin10* та в 0,5 рази для *kin11*) у мутантних ліній, вирощених за умов енергетичного дефіциту, порівняно з контролем (Рис. 3.20). Отримані дані вказують на існування безпосереднього зв'язку між функціонуванням центрів первинної нуклеації мікротрубочок та активністю *KIN10* та *KIN11*.

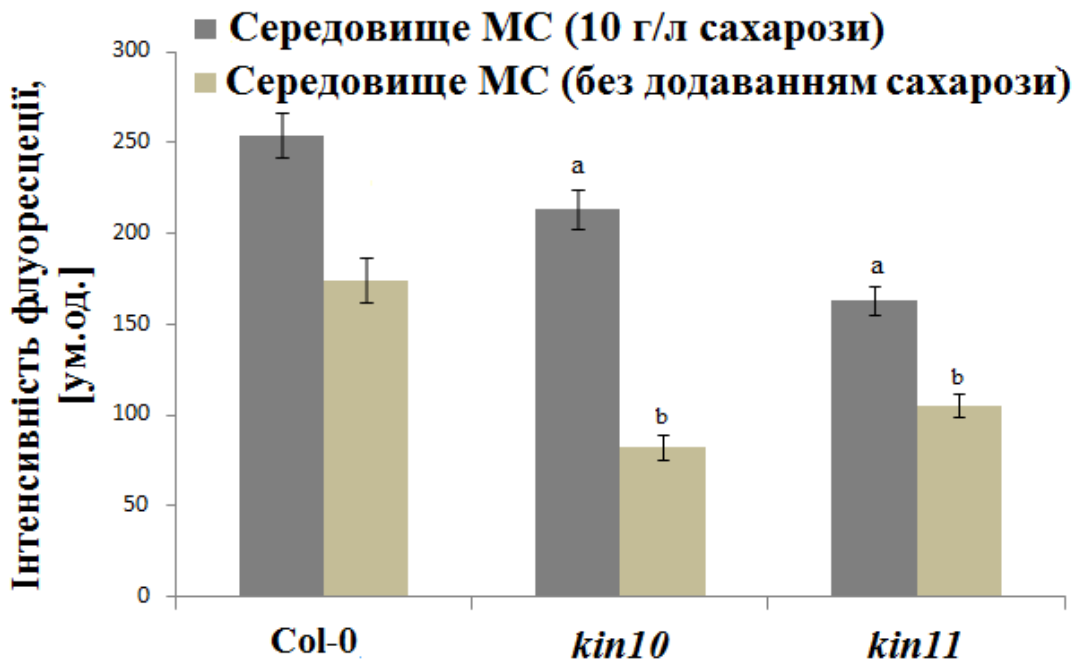


Рис. 3.20 Інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну ($M \pm m$; $p \leq 0,05$) в клітинах коренів мутантних ліній *kin10* та *kin11* і дикого типу *A. thaliana*

Також для оцінки можливої взаємодії каталітичної субодиниці KIN10 з γ -тубуліном досліджували колокалізацію KIN10 та γ -тубуліну в клітинах коренів проростків *A. thaliana* (Рис. 3.21). Результати імунофлуоресцентного аналізу свідчать про колокалізацію сигналів від мічених специфічними антитілами антигенів - γ -тубуліну та KIN10 – в цитоплазмі клітин, що

співпадає з результатами наших попередніх досліджень за використання антитіл TU-31 [258]. Така колокалізація флуоресцентних сигналів від γ -тубуліну та KIN10 може свідчити про безпосередню функціональну взаємодію цих двох білків в досліджуваних клітинах.

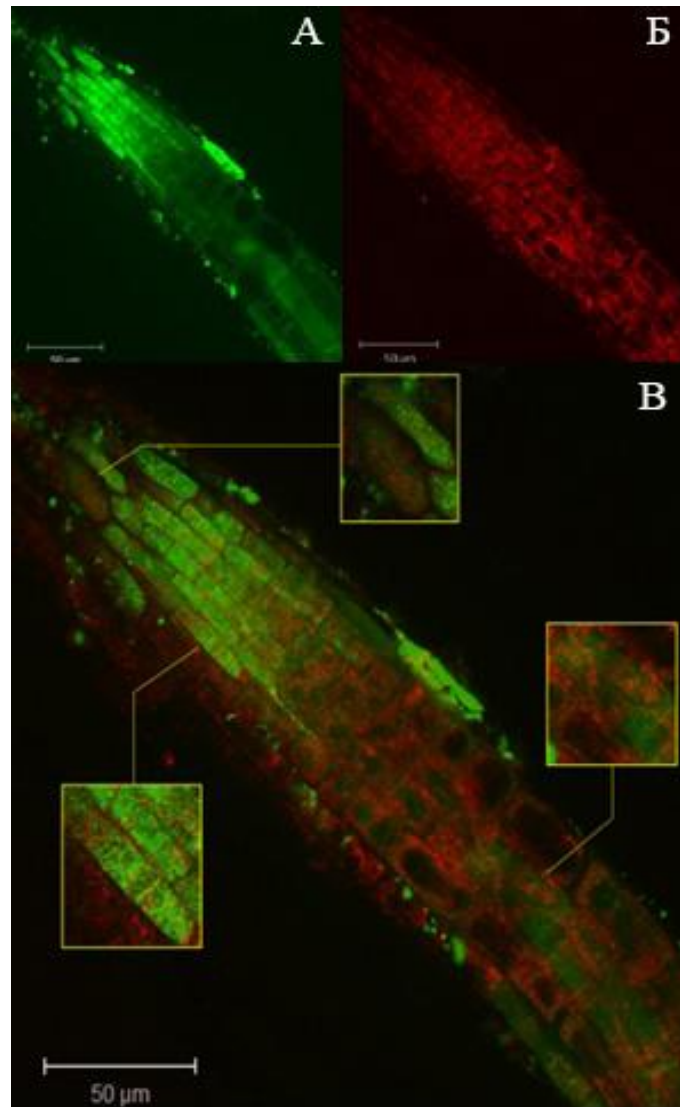


Рис. 3.21 Результати імунофлуоресцентної мікроскопії клітин коренів *A. thaliana* (Col-0) з використанням моноклональних антитіл проти γ -тубуліну та KIN10: **A** – флуоресценція γ -тубуліну (зелений сигнал, FITC-канал); **Б** – флуоресценція KIN10 (червоний сигнал, TRITC-канал); **В** – колокалізація флуоресценції γ -тубуліну та KIN10.

Масштаб – 50 мкм

Зниження інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* може свідчити про зниження мітотичної активності в клітинах цих рослин. Варто зауважити, що інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну та мітотичний індекс в нокаутних мутантів *kin10* були нижчими, ніж в *kin11*. Такі результати можуть свідчити про важливу роль досліджуваних протеїнкіназ також і у процесах клітинного поділу рослин.

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.7, були опубліковані в статті: Krasnoperova E.E., Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume Ya.B., Yemets A.I. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic subunits of protein kinases complexes SnRK1 in the regulation of Arabidopsis γ -tubulin. Cytol. Genet. 2019;53(5):349–356. doi:10.3103/S0095452719050104

3.8. Ідентифікація та реконструкція локалізації потенційного сайту фосфорилювання γ -тубуліну протеїнкіназою KIN10 в структурі малого комплексу γ TuSC *A. thaliana*

Зважаючи на значну подібність тубулінів ссавців та рослин, а також гомологію та подібність структури каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 та BRSK1, можна припустити, що вони мають певну схожість відповідних сайтів фосфорилювання. Використовуючи пошук профілю (Hidden Markov Models, HMM), було перевірено всі відомі ізоформи тубулінів в *A. thaliana*. По гомології з раніше встановленим сайтом фосфорилювання γ -тубуліну протеїнкіназою BRSK1 нами було підтверджено можливість фосфорилювання залишку Сер-131 γ -тубуліну *A. thaliana* за участю протеїнкінази KIN10. Зокрема, нами встановлено, що цей сайт присутній лише в двох ізоформах γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) та, відповідно, відсутній у α - і β -тубулінах (Рис. 3.22).

Kin10

TBA1	ARATH	P11139	121-RLRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA2	ARATH	B9DGT7	121-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA3	ARATH	Q56WH1	121-RVRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA4	ARATH	Q0WV25	121-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA5	ARATH	B9DHQ0	121-RVRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA6	ARATH	P29511	121-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBB1	ARATH	P12411	120-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-141
TBB2	ARATH	Q56YW9	119-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB3	ARATH	Q9ASR0	119-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB4	ARATH	P24636	119-VVRKEAENSDCLOGFOVCHSL-140
TBB5	ARATH	P29513	120-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-141
TBB6	ARATH	P29514	119-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB7	ARATH	P29515	119-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB8	ARATH	P29516	119-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB9	ARATH	P29517	119-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBG1	ARATH	P38557	121-MIDREADGSDSLEGFVLCHSI-142
TBG2	ARATH	P38558	121-MIDREADGSDSLEGFVLCHSI-142

: : * : . . * : * * : : :

Рис. 3.22 Вирівнювання всіх ізоформ тубуліну *A. thaliana* відповідного до сайту фосфорилування ($X_p \pm 10$) по залишку Сер-131 (TUBG1 та TUBG2).

Попередні дослідження показують, що *in vitro* протеїнкіназа BRSK1 фосфорилує γ -тубулін ссавців по залишкам Сер-385 та Сер-131 [259, 194]. Було продемонстровано, що перехідне збільшення ядерного пулу γ -тубуліну в S-фазі викликано BRSK1-опосередкованим фосфорилуванням Сер-385. Подібне фосфорилування індукує конформаційну зміну γ -тубуліну та приводить до його накопичення в ядерній області в S-фазі [260].

Загалом, безпосереднє фосфорилування протеїнкіназою BRSK1 обох відомих ізотипів γ -тубуліну призводить до їх транслокації та прискорює подвоєння центросом [194]. BRSK1 є багатофункціональним регулятором клітинного циклу, який запускає реплікацію центросоми та S-фазу у ссавців, контролюючи фосфорилування по сайтах Сер-131 [194] та Сер-385 у γ -тубуліні. Варто відмітити, що зниження активності цього ферменту призводить до значного зменшення кількості комплексів γ TuRC в клітині [239].

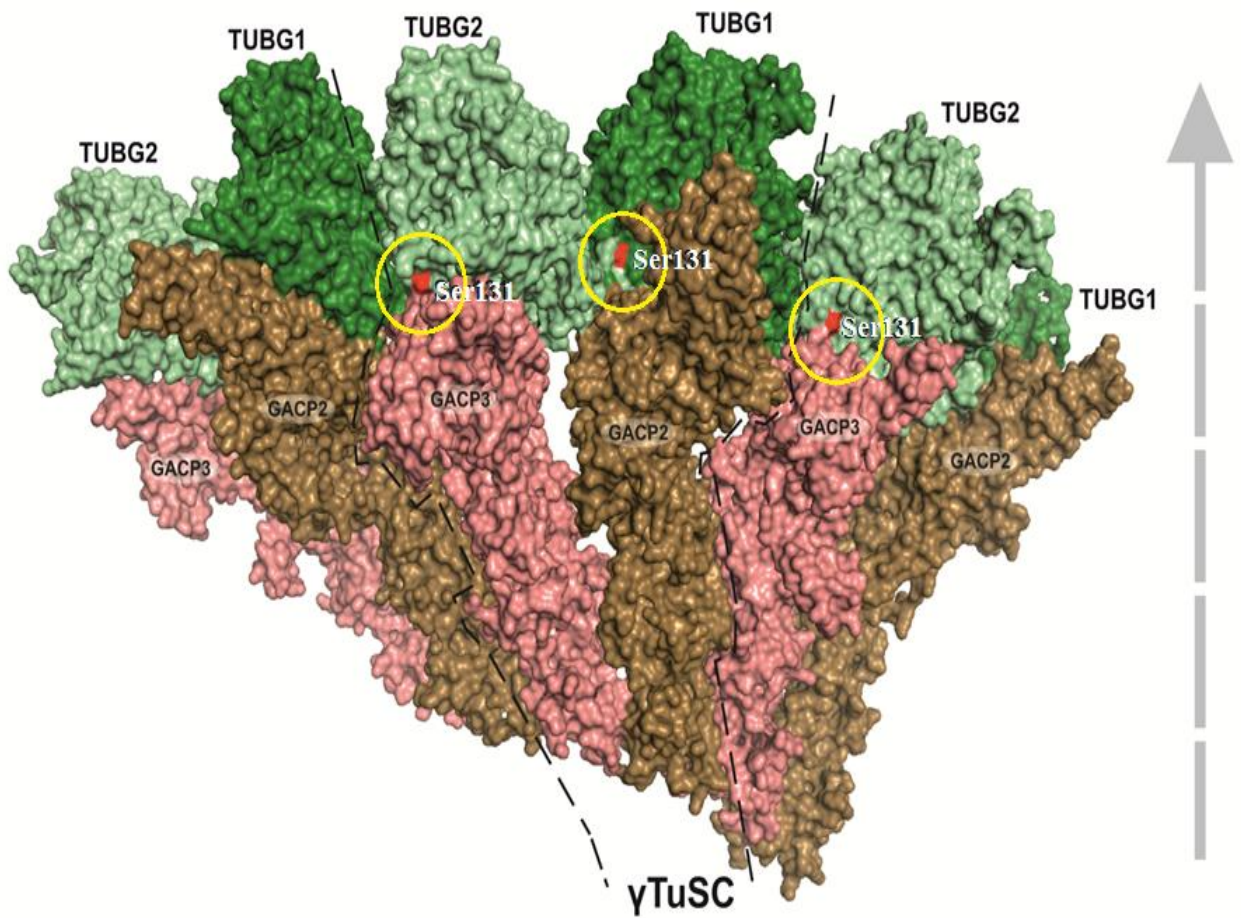


Рис. 3.23 Зовнішня проєкція фрагменту γ TuRC (три об'єднані γ TuSC) центру первинної нуклеації мікротрубочок *A. thaliana* з позначенням локалізації амінокислотного залишку Сер-131 (обведено жовтим) як вірогідного сайту фосфорилювання протеїнкіназою KIN10 на поверхні молекул TUBG2 та TUBG1.

Наші результати показали відсутність гомолога сайту фосфорилування Сер-385 у всіх ізоформах тубулінів в *A. thaliana*. Таким чином, в *A. thaliana* взаємодія BRSK1–подібних протеїнкіназ з цитоскелетом можлива лише за допомогою фосфорилування TUBG1 і TUBG2 по Сер-131. Нами було продемонстровано, що Сер-131 експонується на поверхні в обох ізоформах γ -тубуліна (TUBG1 и TUBG2). Аналіз топології підтверджує, що фосфорилування Сер-131 в TUBG1 та TUBG2 може визначати взаємодію γ -тубулін / γ -тубулін.

Відповідно, що подібні зміни здійснюють вплив на структуру мономера γ TuSC (γ -tubulin small complex) в *A. thaliana*, а також на його формування в γ TuRC (γ -tubulin ring complex). Також можна припустити, що протеїнкіназа KIN10 беру участь у регуляції структури та функцій первинних центрів організації мікротрубочок рослин. Зокрема, може фосфорилувати γ -тубулін рослинного комплексу γ TuSC по залишку Сер-131 (Рис. 3.23) подібно до свого найближчого тваринного гомолога – протеїнкінази BRSK1 [236].

Таким чином, консервативність молекул γ -тубуліну, топології сайту Сер-131 і вище зазначених протеїнкіназ, дозволяє припустити, що рослинна KIN10 може безпосередньо впливати на структуру комплексу γ TuRC в *A. thaliana*, що є одним із критичних етапів регуляції поділу клітин. Також можливий вплив цієї модифікації на взаємодію TUBG1-GACP3. Отримані дані підтверджують можливу причетність представників протеїнкіназ SnRK1 до коректного формування комплексів γ TuSC та γ TuRC у *A. thaliana*, подібно до протеїнкінази BRSK1 людини [261].

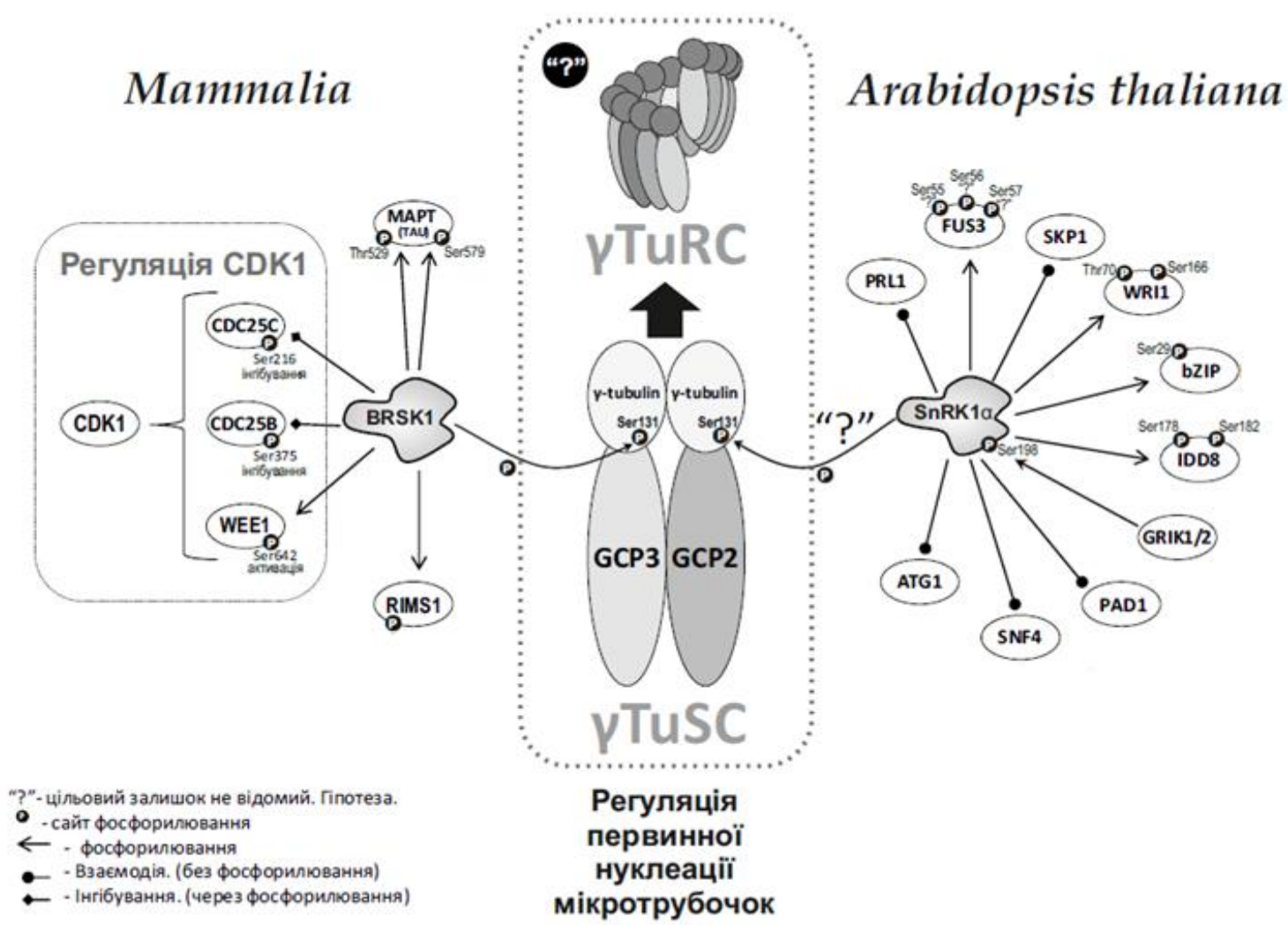


Рис. 3.24 Гіпотетична схема взаємодій протеїнкінази KIN10 (SnRKα) зі своїми мішенями у рослинних клітинах у порівнянні з протеїнкіназою BRSK1 у тваринних клітинах

Отримані нами дані демонструють важливу роль протеїнкіназ KIN10 та KIN11 в процесах росту та розвитку *A. thaliana*. Зважаючи на високу структурну подібність каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 та KIN11 та протеїнкінази BRSK1, можна ідентифікувати KIN10 та KIN11, як найближчих рослинних гомологів BRSK1 людини. Отримані результати свідчать, що протеїнкінази KIN10 та KIN11 частково здатні виконувати подібні до протеїнкінази BRSK1 функції у клітинах рослин (Рис. 3.24) [201]. Нами було показано, що протеїнкіназа KIN10 має більшу структурну подібність до BRSK1, ніж KIN11. Відповідно до отриманих даних, нами було висунуто припущення, що саме KIN10 бере участь у регуляції процесів клітинного поділу за подібним до тваринних BRSK1 сценарієм .

Результати проведених досліджень, описані в розділі 3.1, були опубліковані в статтях: Karpov P.A., Rayevsky A.V., Krasnoperova E.E., Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. *Cytol. Genet.* 2017;51(6):415–421. doi:10.3103/S0095452717060056

Краснопьорова О.Є., Карпов П.А., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії у різних органах. *Доповіді НАН України.* 2016;1:81–91. doi:10.15407/dopovidi2016.01.081

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У результаті виконання дисертаційної роботи за допомогою проведеної NJ-кластеризації було ідентифіковано KIN10, KIN11 та SNRK1.3 (AT5G39440), які утворюють підродину SnRK1 у *A. thaliana*, як найближчих рослинних гомологів протеїнкінази BRSK1. Проведено кладистичний аналіз протеїнкіназ SnRK1 (KIN10, KIN11) з *A. thaliana* та їх можливих гомологів з інших організмів. Результати кладистичного аналізу свідчать, що групуючись у спільну кладу з протеїнкіназою BRSK1 людини, представники підродини SnRK1 виявляють вищий рівень подібності до своїх гомологів у тваринних організмах, ніж до представників підродин рослинних протеїнкіназ SnRK2 та SnRK3. Зокрема, показано високу подібність підродини SnRK1 з 5'-AMФ-активуючими протеїнкіназами тварин та SNF-протеїнкіназами дріжджів.

Також проведено структурне порівняння 3D-моделей та повної амінокислотної послідовності каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 та KIN11 з протеїнкіназою BRSK1. Накладання та порівняння 3D-моделей каталітичних доменів KIN10 з KIN11 та KIN11 з протеїнкіназою BRSK1 підтвердило високу ідентичність KIN10 з KIN11 (RMSD = 0,138), та KIN10 з BRSK1 (RMSD = 0,173). Порівняння оптимізованих 3D-моделей показало меншу подібність KIN11 з BRSK1 (RMSD = 0,188) ніж KIN10 з BRSK1 (RMSD = 0,173).

Для глибшого розуміння механізмів функціонування протеїнкінази KIN10 у клітині, досліджували внутрішньоклітинну локалізацію цього ферменту. Для цього було створено векторні генетичні конструкції, які містили химерні гени *KIN10-BFP* та *KIN10-RFP*. Отриманими конструкціями трансформували протопласти суспензійної культури BY-2 тютюну (*N. tabacum*) та протопласти *A. thaliana*. Встановлено, що химерні протеїни KIN10-BFP та KIN10-RFP локалізуються переважно у примембранній області протопластів. У деяких випадках спостерігали ядерну локалізацію KIN10. Отримані результати співпадають з даними, опублікованими в роботах інших

дослідників, та підтверджують важливу роль KIN10 у регуляції біохімічних процесів, які відбуваються в цитоплазмі.

Нами також був проведений транскрипційний аналіз експресії гена *KIN10* в різних органах рослин *A. thaliana*. Найвищий рівень транскриптів було зафіксовано в листі – зеленій фотосинтезуючій частині рослини, де активно відбуваються біосинтетичні процеси. Найнижчий рівень експресії *KIN10* зафіксовано в коренях. Порівняно з листям, рівень експресії *KIN10* в коренях був приблизно в сім разів нижчим. В стеблі було зафіксовано майже в два рази вищий рівень експресії *KIN10* порівняно з коренями. В квітках рівень експресії *KIN10* був в 5 разів вищим, ніж в коренях. Отримані результати свідчать про важливу участь протеїнкінази KIN10 у регуляції біосинтетичних та сигнальних процесів, пов'язаних із фотосинтезом та метаболізмом цукрів.

Також встановлено, що у рослин *A. thaliana* дикого типу (Col-0), які зростали в умовах сольового, осмотичного та енергетичного стресів дуже варіюють рівні експресії *KIN10*. Найнижчий рівень експресії *KIN10* фіксували через 2 год. Через 8 год спостерігали підвищення експресії цього гена в середньому майже в п'ять разів за умов дії всіх змодельованих в дослідженні стресів. Через 24 год вирощування в умовах дії стресових чинників спостерігали зниження рівнів експресії *KIN10* на 20-30% порівняно з обробкою протягом 8-ми год.

Такі результати можуть бути обумовлені тим, що захисні механізми рослин після 8-ми год дії стресу, знаходяться у активній фазі метаболічних та транскрипційних перебудов, проте через 24 год за підтримку гомеостазу рослин відповідають уже інші сигнальні та регуляторні процеси, що не залежать від KIN10. За умов дії енергетичного стресу у всіх зразках експресія *KIN10* була вищою, що свідчить про більш вирішальну участь протеїнкінази KIN10 в процесах адаптації рослин до умов енергетичного дефіциту

Також в роботі вперше було проаналізовано зміни росту та розвитку головних коренів проростків трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією

та РНК-інтерференцією *KIN10* і дикого типу (Col-0) за нормальних умов та за умов енергетичного стресу. Серед всіх досліджених ліній *A. thaliana* найкращий ріст коренів як на стандартному середовищі МС, так і на середовищі МС без сахарози було зафіксовано у проростків дикого типу (Col-0). Це може пояснюватися тим, що дикий екотип не мав порушень в механізмах клітинного сигналіngu, проростки нормально реагували на відповідні умови росту. Зовсім інші закономірності спостерігали для ліній рослин з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10*. У лінії з гіперекспресією *KIN10* (OX) на середовищі без сахарози зафіксовано в два рази вищий показник довжини коренів, ніж на середовищі МС з сахарозою.

Довжина коренів у проростків з гіперекспресією гена *KIN10* була меншою (приблизно в 0,9 разів через 0 год, та майже в 2 рази через 72 год) на середовищі без сахарози, ніж у проростків дикого типу. Таке явище може бути пов'язано з певними порушеннями у регуляції їхніх внутрішньоклітинних сигнальних шляхів.

У проростків лінії з РНК-інтерференцією гена *KIN10* (РНКі) на середовищі МС без додавання сахарози порівняно з проростками з гіперекспресією *KIN10* зафіксовано в два рази меншу довжину коренів через 0 та 24 год. Довжина коренів у проростків з РНК-інтерференцією була майже в три рази меншою порівняно з проростками з гіперекспресією через 48 та 72 год вирощування. На середовищі МС з сахарозою у проростків з РНК-інтерференцією довжина коренів була більшою в чотири та п'ять разів (через 0 та 24 год) та в сім та дев'ять разів (через 48 та 72 год) порівняно з проростками, що росли на середовищі без сахарози. Отже, пригнічення рівня експресії *KIN10* не було критичним фактором для їхнього нормального розвитку.

Було встановлено морфологічні зміни коренів десятиденних трансгенних проростків *A. thaliana*. Головні корені проростків з РНК-інтерференцією на середовищі МС з сахарозою порівняно з диким типом були потовщеними та мали надмірну кількість кореневих волосків. На

середовищі МС без сахарози лінія з РНК-інтерференцією та дикий тип формували малу кількість корневих волосків. Зокрема, корені рослин з гіперекспресією *KIN10* за умов енергетичного дефіциту мали морфологію подібну до дикого типу. Корені цієї лінії рослин мали нормально сформовані кореневі волоски та кореневий чохлак. Проте на середовищі МС з сахарозою у них спостерігали малу кількість корневих волосків, які були короткими. У рослин з РНК-інтерференцією *KIN10* спостерігали протилежний ефект. За умов енергетичного дефіциту ці проростки мали поодинокі кореневі волоски малого розміру.

У проростків з гіперекспресією *KIN10* спостерігали протилежний ефект. На середовищі МС з сахарозою корені цієї лінії були потовщеними та мали малу кількість корневих волосків. На середовищі МС без додавання сахарози корені проростків з гіперекспресією *KIN10* мали нормальну морфологію, але на них формувались короткі кореневі волоски.

Особливий інтерес нашого дослідження полягав у з'ясуванні механізмів участі *KIN10* та *KIN11* в процесах клітинного поділу. Для цього було визначено мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми у *KIN10* та *KIN11*-нокаутних лініях *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми був нижчим в проростках мутантних ліній *kin10* та *kin11* порівняно з диким типом. Зокрема, він був майже в три рази нижчим при вирощуванні на середовищі з сахарозою. За умов енергетичного дефіциту мітотичний індекс також був нижчий в обох мутантних лініях (в п'ять разів) (рис. 11). У мутантів, що росли за умов енергетичного дефіциту, фіксували нижчий мітотичний індекс, ніж в проростках, що росли за нормальних умов.

В нокаутних мутантних лініях *kin10* та *kin11* було проаналізовано кореляцію рівнів експресії маркерних генів клітинної проліферації за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту (рис. 12). Для цього використовували маркерні гени клітинної проліферації *CYCB1;1* та *AtBRCA1*. Встановлено, що у обох мутантних ліній рівні експресії генів *CYCB1;1* та

AtBRCA1 були нижчими, ніж у дикого типу. Зокрема, у лінії *kin10* за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами експресія була нижчою як у *CYCB1;1* (майже в чотири рази), так і у *AtBRCA1* (приблизно в сім разів). У мутантній лінії *kin11* експресія також була нижчою як у *CYCB1;1* (майже в три рази), так і у *AtBRCA1* (майже в п'ять разів) за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами.

Для підтвердження гіпотези про можливість існування певної позитивної кореляції між інтенсивністю клітинного поділу та рівнем експресії генів *KIN10* та *KIN11* було проведено порівняння рівнів експресії генів *KIN10* та *KIN11* у клітин суспензійної культури *A. thaliana* та в інтактних проростках. Відомо, що суспензійні клітини *A. thaliana* характеризуються високим мітотичним індексом у порівнянні із клітинами проростків. На нашу думку, цей показник також може корелювати з рівнем експресії генів досліджуваних протеїназ *KIN10* та *KIN11*.

У клітинах суспензійної культури *A. thaliana* було зафіксовано вищі (майже в 2,5 рази) рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* у порівнянні з інтактними проростками. Враховуючи високий рівень експресії генів *KIN10* та *KIN11* у суспензійній культурі, можна припустити, що один з механізмів дії цих протеїназ може бути пов'язаний саме з клітинним поділом.

Також визначали інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів проростків мутантних ліній *kin10* та *kin11* за нормальних умов та за умов енергетичного стресу. В мутантних ліній було зафіксовано нижчий рівень флуоресценції γ -тубуліну, ніж в Col-0, – як за нормальних умов, так і за умов енергетичного стресу. Синергічний ефект одночасної дисфункції *KIN10* або *KIN11* та енергетичного дефіциту характеризувався зниження рівня інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в клітинах, що аналізували. Зокрема, інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну була нижчою (майже в 2 рази для *kin10* та в 0,5 рази для *kin11*) в клітинах мутантних ліній, вирощених за умов енергетичного дефіциту, порівняно з контролем. Отримані дані вказують на існування безпосереднього зв'язку між

функціонуванням центрів первинної нуклеації мікротрубочок та активністю *KIN10* та *KIN11*.

Для оцінки можливостей взаємодії каталітичної субодиниці *KIN10* з γ -тубуліном досліджували колокалізацію *KIN10* та γ -тубуліну в клітинах коренів проростків *A. thaliana*. Отримані результати імунофлуоресцентного аналізу свідчать про колокалізацію сигналів від мічених специфічними антитілами антигенів - γ -тубуліну та *KIN10* – в цитоплазмі клітин.

По гомології з раніше встановленим сайтом фосфорилування γ -тубуліну протеїнкіназою *BRSK1* було підтверджено можливість фосфорилування залишку Сер-131 γ -тубуліну *A. thaliana* за участю протеїнкінази *KIN10*. Нами встановлено, що цей сайт присутній лише в двох ізоформах γ -тубуліну (*TUBG1* і *TUBG2*) та, відповідно, відсутній у α - і β -тубулінах.

Шляхом реконструкції 3D-структури γ -тубулінового комплексу γ TuSC *A. thaliana* було продемонстровано, що залишок Сер-131 експонується на поверхні молекул обох ізоформ γ -тубуліну (*TUBG1* і *TUBG2*). Результати аналізу топології цього комплексу свідчать про те, що фосфорилування залишку Сер-131 може визначати взаємодію обох ізоформ γ -тубуліну. Відповідно, подібні зміни можуть впливати на структуру малого γ -тубулінового комплексу γ TuSC у *A. thaliana*, а також на подальше формування кільцевого γ -тубулінового комплексу γ TuRC, що є одним із критичних етапів регуляції поділу клітин.

Консервативність молекул γ -тубуліну, топології сайту Сер-131 та досліджуваних протеїнкіназ, дозволяє припустити, що рослинна *KIN10* може безпосередньо впливати на структуру комплексу γ TuRC в *A. thaliana*. Також можливий вплив цієї модифікації на взаємодію *TUBG1*-*GACP3*. Таким чином, отримані дані підтверджують можливу причетність представників протеїнкіназ *SnRK1* до коректного формування комплексів γ TuSC та γ TuRC у *A. thaliana*, подібно до протеїнкінази *BRSK1* людини

Отже, отримані результати демонструють важливу роль протеїнкіназ KIN10 та KIN11 в процесах росту та розвитку *A. thaliana*. Зокрема, ми припускаємо, що KIN10 та KIN11 відіграють важливу роль у регуляції процесів клітинного поділу вищих рослин. Така властивість свідчить про унікальність підродино SnRK1 протеїнкіназ *A. thaliana* та підтверджує більшу схожість протеїнкіназ SnRK1 з протеїнкіназами тварин, ніж з родиною SnRK протеїнкіназ рослин. Отримані нами дані показують нові аспекти функціонування даної підродино в рослинних клітинах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено подібність між каталітичними доменами протеїнкінази BRSK1 людини та протеїнкіназ SnRK1 (KIN10, KIN11) з *A. thaliana*. За допомогою трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10* виявлено залучення протеїнкіназ SnRK1 до регуляції процесів росту коренів за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Також продемонстровано можливу роль протеїнкіназ KIN10 та KIN11 у фосфорилуванні γ -тубуліну та їх участь у мітотичному поділі рослинних клітин.

1. Результати кластеризації каталітичних доменів всіх відомих протеїнкіназ *A. thaliana* та каталітичного домену протеїнкінази BRSK1 людини свідчать про те, що протеїнкіназа KIN10 є найближчим рослинним гомологом протеїнкінази BRSK1. Результати структурного порівняння каталітичних доменів протеїнкінази BRSK1 та протеїнкіназ SnRK1 (KIN10, KIN11) вказують на високу ступінь подібності цих ферментів, що може свідчити про виконання ними деяких аналогічних з BRSK1 функцій в рослинних клітинах.

2. У результаті вивчення внутрішньоклітинної локалізації химерного білка KIN10-RFP в протопластах *A. thaliana* встановлено, що цей білок розподіляється по всій цитоплазмі, переважно на периферії, в примембранній області.

3. При порівнянні рівнів експресії *KIN10* в різних органах *A. thaliana* найвищий рівень транскриптів спостерігали в надземній частині рослини, особливо в тих органах, де найбільш активно відбувається процес фотосинтезу.

4. Виявлено, що у рослин *A. thaliana* дикого типу (Col-0), які росли в умовах сольового, осмотичного та енергетичного стресів протягом 2-24 год, рівні експресії гена *KIN10* суттєво змінювались. Найнижчий рівень його експресії було зафіксовано через 2 год, а вже через 8 год відбувалось

підвищення рівня експресії в п'ять разів. Однак через 24 год спостерігали зниження рівня експресії гена *KIN10* на 20-30% порівняно з рівнем експресією *KIN10*, який мав місце через 8 год з початку експерименту. Такі результати свідчать про потенційну роль *KIN10* у формуванні відповіді рослин на досліджувані стресові чинники в перші 8 год їх дії.

5. Продемонстровано, що трансгенні лінії *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10* характеризувалися меншою довжиною коренів у порівнянні з довжиною коренів рослин дикого типу. Енергетичний дефіцит був критичним фактором для росту коренів проростків лінії з РНК-інтерференцією, але корені проростків лінії з гіперекспресією гена *KIN10* мали в два рази більшу довжину за умов цього стресу. Отримані результати свідчать на користь того, що як надмірна, так і пригнічена експресія гена *KIN10* може негативно впливати на нормальний ріст коренів як за умов енергетичного дефіциту, так і за нормальних умов.

6. Встановлено, що мітотичний індекс та рівні експресії маркерних генів клітинної проліферації *CYCB1;1* та *AtBRCA1* характеризувались нижчими значеннями у нокаутних ліній *kin10* та *kin11* порівняно з контролем як за нормальних умов, так і за умов енергетичного дефіциту. Отримані результати свідчать про те, що протеїнкінази *KIN10* та *KIN11* задіяні у процесах проходження мітозу рослинними клітинами.

7. Показано, що інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну була нижчою у нокаутних лініях *kin10* та *kin11* порівняно з контролем. Синергічний ефект одночасної дисфункції *KIN10* або *KIN11* та енергетичного дефіциту проявлявся в найнижчому рівні інтенсивності внутрішньоклітинної флуоресценції γ -тубуліну, що може свідчити про вплив активності протеїнкіназ *KIN10* та *KIN11* на функціонування γ -тубуліну, як за умов енергетичного дефіциту, так і за нормальних умов.

8. Продемонстровано, що потенційне фосфорилування обох ізоформ γ -тубуліну (*TUBG1* і *TUBG2*) *A. thaliana* по залишку Сер-131, який експонується на поверхні їх молекул, за участю протеїнкінази *KIN10* може

впливати на структуру малого γ -тубулінового комплексу γ TuSC та на подальше формування кільцевого γ -тубулінового комплексу γ TuRC. Таким чином, змінюючи структуру та процес формування γ -тубулінових комплексів, протеїнкіназа KIN10 може впливати на подальші процеси клітинного поділу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem.* 2001;268:5001–5010.
2. Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci.* 2005;118:2997–3002.
3. Endicott JA, Noble ME, Johnson LN. The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:587–613.
4. Taylor S, Keshwani MM, Steichen JM, Kornev AP. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2012;19:2517–2528.
5. Steven C, Almo S, Bonanno J, Sauder J, Emtage S, Dilorenzo T, Malashkevich V, Wasserman S, Swaminathan S, Eswaramoorthy S, Agarwal R, Kumaran D, Madegowda M, Ragumani S, Patskovsky Y, Alvarado J, Ramagopal U, Faber-Barata J, Chance M, Sali A, Fiser A, Zhang Z, Lawrence D, Burley S. Structural genomics of protein phosphatases. *J. Struct. Funct. Genomics.* 2007;8:121–140.
6. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* 2002;27:514–20.
7. Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2011;36:65–77.
8. Second Messenger Targets: protein kinases and phosphatases, neuroscience 2nd edition copyright © 2001, Sinauer Associates, Inc.
9. Старосила ДБ. Роль представників сімейства олігоаденілат-синтеаз, протеїнкінази Р та РНКазі І в антивірусній активності інтерферону. *Лабораторна діагностика.* 2013;3(65):63–69.
10. Scott J, Soderling T. Serine/threonine protein kinases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1992;2:289–295.

11. Zorina A, Stepanchenko N, Novikova G, Sinetova M, Panichkin V, Moshkov I, Zinchenko V, Shestakov S, Suzuki I, Murata N, Los D. Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the *Cyanobacterium Synechocystis*. *DNA Res.* 2011;18(3):137–151.
12. Fu L, Wang P, Xiong Y. Target of rapamycin signaling in plant stress responses. *Plant Physiol.* 2020; DOI: <https://doi.org/10.1104/pp>.
13. Mittal S, Mallikarjuna M, Rao A, Jain P, Dash P, Thirunavukkarasu N. Comparative analysis of CDPK family in maize, arabidopsis, rice, and sorghum revealed potential targets for drought tolerance improvement. *Front Chem.* 2017;5:115.
14. Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 2013;18(1):30–40
15. Chen F, Fasoli M, Tornielli GB, Dal Santo S, Pezzotti M, Zhang L, Cai B, Cheng ZM. The evolutionary history and diverse physiological roles of the grapevine calcium-dependent protein kinase gene family. *PLoS One.* 2013;8(12):e80818.
16. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007;19:17–123.
17. Tang D, Wang G, Zhou JM. Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *Plant Cell.* 2017;29(4):618–637.
18. Pandey S. Plant receptor-like kinase signaling through heterotrimeric G-proteins. *J Exp Bot.* 2020; pii: eraa016.
19. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* 2002;415:977–983.
20. Liang W, Yang B, Yu BJ, Zhou Z, Li C, Jia M, Sun Y, Zhang Y, Wu F, Zhang H, Wang B, Deyholos MK, Jiang YQ. Identification and analysis of MKK and MPK gene families in canola (*Brassica napus L.*). *BMC Genomics.* 2013;14:392–400.

21. Zhang M, Su J, Zhang Y, Xu J, Zhang S. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018;45:1–10.
22. Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010;61:621–649.
23. Yan H, Zhao Y, Shi H, Li J, Wang Y, Tang D. BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 1 Phosphorylates MAPKKK5 to Regulate Immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2018;176(4):2991–3002.
24. Jagodzik P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M, Ludwikow A. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Front Plant Sci.* 2018;9:1387.
25. Craddock CP, Adams N, Kroon JT, Bryant FM, Hussey PJ, Kurup S, Eastmond PJ. Cyclin-dependent kinase activity enhances phosphatidylcholine biosynthesis in *Arabidopsis* by repressing phosphatidic acid phosphohydrolase activity. *Plant J.* 2017;89:3–14.
26. Kitsios G, Doonan JH. Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant Signal. Behav.* 2011;6(2): 204–209.
27. Takatsuka H, Umeda-Hara C, Umeda M. Cyclin-dependent kinase-activating kinases CDKD;1 and CDKD;3 are essential for preserving mitotic activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2015;82:1004–17.
28. Wang H, Zhou Y, Bird DA, Fowke LC. Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Microsc.* 2008;231:234–346.
29. Dante RA, Sabelli PA, Nguyen HN, Leiva-Neto JT, Tao Y, Lowe KS, Hoerster GJ, Gordon-Kamm WJ, Jung R, Larkins BA. Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm: evidence for differential expression and functional specialization. *Planta.* 2014;239(2):493–509.

30. Cozza G, Pinna LA. Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin. Ther Targets*. 2016;20:319–340.
31. Kübler D, Seidler J, André S, Kumar S, Schwartz-Albiez R, Lehmann WD, Gabius HJ. Phosphorylation of multifunctional galectins by protein kinases CK1, CK2, and PKA. *Anal. Biochem*. 2014;449:109–117.
32. Park Y, Do KH, Kim IS, Park HH. Structural and functional studies of casein kinase I-like protein from rice. *Plant Cell Physiol*. 2012;53:304–311.
33. Saito A, Matsuo H, Kuwata K, On A, Kinoshita T, Yamaguchi J, Nakamichi N. Structure–function study of a novel inhibitor of the casein kinase 1 family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Direct*. 2019;3(9):e00172.
34. Moreno-Romero J, Espunya MC, Platara M, Ariño J, Martínez MC. A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J*. 2008;55:118–130.
35. Wang Y, Yan H, Qiu Z, Hu B, Zeng B, Zhong C, Fan C. Comprehensive analysis of SnRK gene family and their responses to salt stress in *Eucalyptus grandis*. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20(11): 2786.
36. Halford NG, Hey SJ. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J*. 2009;419:247–259.
37. Halford NG. Regulation of carbon and amino acid metabolism: roles of sucrose nonfermenting-1-related protein kinase-1 and general control nonderepressible-2-related protein kinase. *Adv. Plant Pathol*. 2006;43:93–142.
38. Coello P, Hirano E, Hey SJ, Muttucumaru N, Martinez-Barajas E, Parry MAJ, Halford NG. Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J. Exp. Botany*. 2012;63:913–924.
39. Sugden C, Crawford RM, Halford NG, Hardie DG. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is

associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* 1999;19:433–439.

40. Kulma A, Villadsen D, Campbell DG, Meek SE, Harthill JE, Nielsen TH, MacKintosh C. Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J.* 2004;37:654–667.

41. Baena-González E, Sheen J. Convergent energy and stress signaling. *Trends. Plant Sci.* 2008;13:474–482.

42. Thelander M, Olsson T, Ronne H. Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO.* 2004;23:1900–1910.

43. Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang YH. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Botany.* 2003;54:467–475.

44. Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell.* 2004;16:1163–1177.

45. Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101:17306–17311.

46. Mustilli A-C, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell.* 2002;14:3089–3099.

47. Mikołajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF, Dobrowolska G. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell.* 2000;12:165–178.

48. Hotta H, Aoki N, Matsuda T, Adachi T. Molecular analysis of a novel protein kinase in maturing rice seed. *Gene.* 1998;213:47–54.

49. Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2002;43:1473–1483.
50. Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 2004;40:41758–41766.
51. Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JJ. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes. Dev.* 2010;24:1695–1708.
52. Weiner JJ, Peterson FC, Volkman BF, Cutler SR. Structural and functional insights into core ABA signaling. *Plant Biol.* 2010;13:495–502.
53. Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol. Plant.* 2012;1:15–27.
54. Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MH, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong EL, Cutler S, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE. Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science.* 2011;335:85–88.
55. Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell.* 2001;13:1383–400.
56. Halford NG, Hardie DG. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants?. *Plant Mol. Biol.* 1998;37:735–748.
57. Shukla V, Mattoo AK. Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2): a family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signaling. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2008;14:91–100.

58. Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97:3735–3740.
59. Hu W, Xia Z, Yan Y, Ding Z, Tie W, Wang L, Zou M, Wei Y, Lu C, Hou X, Wang W, Peng M. Genome-wide gene phylogeny of CIPK family in cassava and expression analysis of partial drought-induced genes. *Front. Plant Sci.* 2015;6:914.
60. Luan S. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends. Plant Sci.* 2009;14:37–42.
61. Hashimoto K, Eckert C, Anschütz U, Scholz M, Held K, Waadt R, Reyer A, Hippler M, Becker D, Kudla J. Phosphorylation of Calcineurin B-like (CBL) Calcium Sensor Proteins by Their CBL-interacting Protein Kinases (CIPKs) Is Required for Full Activity of CBL-CIPK Complexes toward Their Target Proteins. *Biol. Chem.* 2012;287(11):7956–7968.
62. Chaves-Sanjuan A, Sanchez-Barrena MJ, Gonzalez-Rubio JM, Moreno M, Ragel P, Jimenez M, Pardo J, Martinez-Ripoll M, Quintero FJ, Alberta A. Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(42):4532–4541
63. Crozet P, Margalha L, Confraria A, Rodrigues A, Martinho C, Adamo M, Elias CA, Baena-González E. Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Fron. Plant Sci.* 2014;5:190.
64. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995;9:576–596.
65. Pang T, Xiong B, Li JY, Qiu BY, Jin GZ and Shen JK, Li J. Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 2007;282:495–506.
66. Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumbreras V, González-Guzmán M, Antoni R,

Rodriguez PL, Baena-González E. ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2013;25:3871–3884.

67. Confraria A, Martinho C, Elias A, Rubio-Somoza I, Baena-González E. miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in *Arabidopsis*. *Fron. Plant Sci*. 2013;4:197.

68. Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*. 2003;132:666–680.

69. Frago S, Espíndola L, Páez-Valencia J, Gamboa A, Camacho Y, Martínez-Barajas E and Coello P. SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. *Plant Physiol*. 2009;149:1906–1916.

70. Gissot L, Polge C, Bouly JP, Lemaitre T, Kreis M and Thomas M. AKIN β 3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic β subunits. *Plant Mol. Biol*. 2004;56:747–759.

71. Polge C, Jossier M, Crozet P, Gissot L, Thomas M. β -subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKIN β 1-subunit. *Plant Physiol*. 2008;148:1570–1582.

72. Pierre M, Traverso JA, Boisson B, Domenichini S, Bouchez D, Giglione C, Meinel T. N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007;19:2804–2821.

73. Avila-Castañeda A, Gutiérrez-Granados N, Ruiz-Gayosso A, Sosa-Peinado A, Martínez-Barajas E, Coello P. Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN β 2 and AKIN β 3. *Front. Plant Sci*. 2014;5:2–8.

74. Emanuelle S, Hossain MI, Moller IE, Pedersen HL, van de Meene AM, Doblin MS, Koay A, Oakhill JS, Scott JW, Willats WG, Kemp BE, Bacic A,

Gooley PR, Stapleton DI. SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *Plant J.* 2015;82:183–192.

75. Gissot L, Polge C, Bouly JP, Lemaitre T, Kreis M, Thomas M. AKIN β 3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic β subunits. *Plant Mol. Biol.* 2004;56:747–759.

76. Mayer FV, Heath R, Underwood E, Sanders MJ, Carmena D, McCartney RR, Leiper FC, Xiao B, Jing C, Walker PA, Haire LF, Ogrodowicz R, Martin SR, Schmidt MC, Gamblin SJ and Carling D. ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Met.* 2011;14:707–714.

77. Bouly JP, Gissot L, Lessard P, Kreis M, Thomas M. *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN α 1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J.* 1999;18:541–550.

78. Ramon M, Ruelens P, Li Y, Sheen J, Geuten K, Rolland F. The hybrid four-CBS-domain KIN $\beta\gamma$ subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant J.* 2013;75:11–25.

79. Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM and Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature.* 2007;448:938–942.

80. Tsugama D, Liu S, Takano T. A putative myristoylated 2C-type protein phosphatase, PP2C74, interacts with SnRK1 in *Arabidopsis*. *FEBS Letter.* 2012;586:693–698.

81. Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW. Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell.* 2008;20:152–167.

82. Elrouby N, Coupland G. Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse biological processes. *PNAS U.S.A.* 2010;107:17415–17420.

83. Piattoni CV, Bustos DM, Guerrero SA, Iglesias AA. Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at serine-404 by an SNF1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose-5-phosphate. *Plant Physiol.* 2011;156:1337–1350.
84. Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ. Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;63:89–98.
85. Martínez-Barajas E, Delatte T, Schluepmann H, de Jong GJ, Somsen GW, Nunes C, Primavesi LF, Coello P, Mitchell RA, Paul MJ. Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol.* 2011;156:373–381.
86. Maziarz M, Shevade A, Barrett L, Kuchin S. Springing into Action: Reg2 Negatively Regulates Snf1 Protein Kinase and Facilitates Recovery from Prolonged Glucose Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016;82(13):3875–3885.
87. Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schluepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 2009;149:1860–1871.
88. Mohannath G, Jackel J, Lee YH, Buchmann C, Wang H, Patil V, Adams AK, Bisaro DM. A complex containing SNF1-related kinase (SnRK1) and adenosine kinase in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 2014;9(1): e87592.
89. Buzduga IM, Volkov RA, Panchuk II. Metabolic compensation in *Arabidopsis thaliana* catalase-deficient mutants. *Cytol. Genet.* 2018;52(1):31–39.
90. Ananieva EA, Gillaspay GE, Ely A, Burnette RN, Erickson FL. Interaction of the WD40 domain of a myoinositol polyphosphate 5-phosphatase with SnRK1 links inositol, sugar, and stress signaling. *Plant Physiol.* 2008;148:1868–1882.

91. Polge C, Jossier M, Crozet P, Gissot L, Thomas M. β -subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKIN β 1-subunit. *Plant Physiol.* 2008;148:1570–1582.
92. Polge C, Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?. *Trends. Plant Sci.* 2007;12:20–28.
93. Hardin SC, Tang GQ, Scholz A, Holtgraewe D, Winter H, Huber SC. Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant J.* 2003;35:588–603.
94. Slocombe SP, Beaudoin F, Donaghy PG, Hardie DG, Dickinson JR, Halford NG. SNF1-related protein kinase (SnRK1) phosphorylates class I heat shock protein. *Plant Physiol. Biochem.* 2004;42(2):111–116.
95. Козеко ЛЄ. Синтез білка теплового шоку HSP70 і алкогольдегідрогенази у листках *Arabidopsis thaliana* і *Sium sisaroidium* у відповідь на затоплення ґрунту. Вісник Харківського національного аграрного університету. 2017;3:46–51.
96. Cho HY, Wen TN, Wang YT and Shih MC. Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in *Arabidopsis* under submergence. *J. Exp. Botany.* 2016;67:2745–2760.
97. Laurie S, McKibbin RS, Halford NG. Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J. Exp. Botany.* 2003;54:739–747.
98. Purcell PC, Smith AM, Halford NG. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant Journal.* 1998;14:195–202.
99. Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H. Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase

gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol.* 2006;140:263–278.

100. Radchuk R, Emery RJ, Weier D, Vigeolas H, Geigenberger P, Lunn JE, Feil R, Weschke W, Weber H. Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J.* 2010;61:324–338.

101. Bitrián M, Roodbarkelari F, Horváth M, Koncz C. BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control and cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *Plant J.* 2011;65:829–842.

102. López-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* 2002;32:317–328.

103. Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MM, Smeekens S. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of asparagine synthetase1 and proline dehydrogenase 2. *Plant J.* 2008;53:935–949.

104. Ma J, Hanssen M, Lundgren K, Hernández L, Delatte T, Ehlert A, Liu CM, Schluemann H, Dröge-Laser W, Moritz T, Smeekens S, Hanson J. The sucrose-regulated *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. *New Phytol.* 2011;191:733–745.

105. Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 2002;29:225–235.

106. Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluemann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O, Paul MJ. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotech. J.* 2004;2:71–82.

107. Schluepmann H, Berke L, Sanchez-Perez GF. Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J. Exp. Botany*. 2012;63:3379–3390.
108. Contento AL, Kim SJ, Bassham DC. Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Phys*. 2004;135:2330–2347.
109. Ramon M, De Smet I, Vandesteene L, Naudts M, Leyman B, Van Dijck P, Rolland F, Beeckman T, Thevelein JM. Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environm*. 2009;32:1015–1032.
110. Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jong GJ, Somsen GW, Wiese-Klinkenberg A, Primavesi LF, Paul MJ, Schluepmann H. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiol*. 2011;157:160–174.
111. Rook F, Gerrits N, Kortstee A, van Kampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S. Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J*. 1998;15:253–263.
112. Tsai AYL, Gazzarrini S. AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2012;69:809–821.
113. Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, Ho TH. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell*. 2001–13:667–679.
114. Bradford KJ, Downie AB, Gee OH, Alvarado V, Yang H, Dahal P. Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol*. 2003;132:1560–1576.

115. Tsai AYL, Gazzarrini. Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front. Plant Sci.* 2014;5:119.
116. Zhang Q, Lee J, Pandurangan S, Clarke M, Pajak A, Marsolais F. Characterization of *Arabidopsis* serine:glyoxylate aminotransferase, AGT1, as an asparagine aminotransferase. *Phytochem.* 2013;85:30–35.
117. Graciet E, Gans P, Wedel N, Lebreton S, Camadro JM, Gontero B. The small protein CP12: a protein linker for supramolecular complex assembly. *Biochem.* 2003;42:8163–8170.
118. Avilan L, Puppo C, Erales J, Woudstra M, Lebrun R, Gontero B. CP12 residues involved in the formation and regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-CP12-phosphoribulokinase complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. BioSystems.* 2012;8:2994–3002.
119. Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S. Sucrose specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol.* 2005;139:1840–1852.
120. Kleczkowski LA, Randall DD. Purification and characterization of D-glycerate-3-kinase from maize leaves. *Planta.* 1988;173:221–229.
121. Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H. D-glycerate 3-kinase, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell.* 2005;17:2413–2420.
122. Carlson M, Osmond BC, Botstein D. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics.* 1981;98:25–40.
123. De Virgilio C. The essence of yeast quiescence. *FEMS. Microb. Rev.* 2012;36:306–339.
124. Carling D, Thornton C, Woods A and Sanders MJ. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles?. *Biochem. J.* 2012;445:11–27.

125. Hsiang-En H, Tzu-Ning L, Chung-Shu Y, Tien-Hsien C, Yi-Chen L, Cheng-Fu K. Feedback control of Snf1 protein and its phosphorylation is necessary for adaptation to environmental stress. *J. Biol. Chem.* 2015;290(27):16786–16796.
126. Coccetti P, Nicastro R, Tripodi F. Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell.* 2018;5(11):482–494.
127. Mizuno T, Masuda Y, Irie K. The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, Negatively Regulates the Hog1 MAPK Pathway in ER Stress Response. *PLoS Genet.* 2015;11(9):e1005491.
128. Yang X, Jiang R, Carlson M. A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.* 1994;13:5878–5886.
129. Schmidt MC, McCartney RR. Beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO J.* 2000;19:4936–4943.
130. McCartney R, Garnar-Wortzel L, Chandrashekarappa D, Schmidt M. Activation and inhibition of Snf1 kinase activity by phosphorylation within the activation loop. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1864(11):518–528.
131. Townley R, Shapiro L. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science.* 2007;315:1726–1729.
132. Tripodi F, Frascini R, Zocchi M, Reghellin V, Coccetti P. Snf1/AMPK is involved in the mitotic spindle alignment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 2018;8:5853.
133. Kuchin S, Vyas VK, Carlson M. Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:3994–4000.
134. Hong SP, Carlson M. Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.* 2007;282:16838–16845.

135. McCartney RR, Schmidt MC. Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* 2001;276:36460–36466.
136. Portillo F, Mulet JM, Serrano R. A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS. Lett.* 2005;579:512–516.
137. Wang Z, Wilson WA, Fujino MA, Roach PJ. Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclindependent kinase Pho85p. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:5742–5752.
138. Ostling J, Ronne H. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur. J. Biochem.* 1998;252:162–168.
139. Young ET, Kacherovsky N, Van Riper K. Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *J. Biol. Chem.* 2002;277:38095–38103.
140. Lo WS, Gamache ER, Henry KW, Yang D, Pillus L, Berger SL. Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms *EMBO J.* 2005;24:997–1008.
141. Shirra MK, Rogers SE, Alexander DE, Arndt KM. The Snf1 protein kinase and Sit4 protein phosphatase have opposing functions in regulating TATA-binding protein association with the *Saccharomyces cerevisiae* INO1 promoter. *Genetics.* 2005;169:1957–1972.
142. Wang Z, Wilson WA, Fujino MA, Roach PJ. Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclindependent kinase Pho85p. *Mol. Cell Biol.* 2001;21:5742–5752.
143. Tzamarias D, Struhl K. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes. Dev.* 1995;9:821–831

144. Randez-Gil F, Bojunga N, Proft M, Entian K-D. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:2502–2510.
145. Vincent O, Carlson M. Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J.* 1998;17:7002–7008.
146. Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1973;54:1362–1369.
147. Carlson CA, Kim KH. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1973;248:378–380.
148. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell. Metab.* 2011;13:376–388.
149. Barnes K, Ingram JC, Porras OH, Barros LF, Hudson ER, Fryer LG, Foufelle F, Carling D, Hardie DG, Baldwin SA. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell. Sci.* 2002;115:2433–2442.
150. Jørgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frøsig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF. Knockout of the $\alpha 2$ but not $\alpha 1$ 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 2004;279:1070–1079.

151. Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP gamma Sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur. J. Biochem.* 1994;223:351–357.
152. Carling D, Thornton C, Woods A and Sanders MJ. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles?. *Biochem. J.* 2012;445:11–27.
153. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018;19(2):121–135.
154. Glosse P, Föllner M. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)-dependent regulation of renal transport. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):3481.
155. Mitchelhill KI, Stapleton D, Gao G, House C, Michell B, Katsis F, Witters LA, Kemp BE. AMPactivated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase, *J. Biol. Chem.* 1994;269:2361–1364.
156. KimbJ, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp. Mol. Med.* 2016; 48(4): e224.
157. Ross FA, Jensen TE, Hardie DG. Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *Biochem. J.* 2016;473(2):189–99.
158. Littler DR, Walker JR, Davis T, Wybenga-Groot LE, Finerty PJ, Newman E, Mackenzie F, Dhe-Paganon S. A conserved mechanism of autoinhibition for the AMPK kinase domain: ATP-binding site and catalytic loop refolding as a means of regulation. *Acta. Crystallogr. Sec. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2010;66:143–151.
159. Hardie DG. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J. R. Soc. Interface.* 2018;15(138): 20170774.
160. Bieri M, Mobbs JI, Koay A, Louey G, Mok YF, Hatters DM, Park JT, Park KH, Neumann D, Stapleton D, Gooley PR. AMP-activated protein kinase β -subunit requires internal motion for optimal carbohydrate binding. *Biophys. J.* 2012;102:305–314.

161. Moffat C, Harper EM. Metabolic functions of AMPK: aspects of structure and of natural mutations in the regulatory gamma subunits. *IUBMB Life*. 2010;62:739–745.
162. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J*. 2000;346:659–669.
163. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest*. 2004;113:274–284.
164. Wu SB, Wei YH. AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012;1822:233–247.
165. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*. 2001;23:1112–1119.
166. Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab*. 2006;17:205–215.
167. Stark R, Ashley SE, Andrews ZB. AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2013;366:215–223.
168. Wu SB, Wei YH. AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication of the cell survival in mitochondrial diseases. *Bioch. et Bioph. Acta*. 2011;1822:233–247.
169. Sravanth K, Hindupur B, Meera S, Shubham P, Gopalkrishnashetty SS, Namrata H, Vijaya Kumar, Geetashree M, Devaveena D, Annapoorni R. Identification of a novel AMPK-PEA15 axis in the anoikis-resistant growth of mammary cells. *Breast Cancer Res*. 2014;16:420.
170. Toby AD, Naomi X, Ling Y, Scott JW, Hoque A, Galic S, Parker BL, Ngoei K, Langendorf CG, O'Brien MT, Kundu M, Viollet B, Steinberg GR,

Sakamoto K, Kemp BE, Oakhill JS. The autophagy initiator ULK1 sensitizes AMPK to allosteric drugs. *Nat. Commun.* 2017;8:571.

171. Villanueva-Paz M, Cotán D, Garrido-Maraver J, Oropesa-Ávila M, de la Mata M, Delgado-Pavón A, de Lavera I, Alcocer-Gómez E, Álvarez-Córdoba M, Sánchez-Alcázar JA. AMPK regulation of cell Ggrowth, apoptosis, autophagy, and bioenergetics. *Exp. Suppl.* 2016;107:45–71.

172. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104:12017–22.

173. Schutt KL, Moseley JB. Transient activation of fission yeast AMPK is required for cell proliferation during osmotic stress. *Mol. Biol. Cell.* 2017;28:1804–1814.

174. Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee SH, Shong M, Kim JM, Kim J, Chung J. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2007;447:1017–1020.

175. Thaiparambil JT, Eggers CM, Marcus AI. AMPK regulates mitotic spindle orientation through phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Mol. Cell Biol.* 2012;32:3203–3217.

176. Williams T, Brenman JE. LKB1 and AMPK in cell polarity and division. *Trends. Cell Biol.* 2008;18:193–198.

177. Komis G, Luptovciak I, Duskocilova A, Samaj J. Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):1043–1062.

178. Blume YB. A Journey through plant cytoskeleton: hot spots in signaling and functioning. *Cell Biol. Int.* 2019;43(9):978–982.

179. Ma H, Liu M. The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants. *Mol. Biol. Rep.* 2019;46(5):5603–5608.

180. Paez-Garcia AJ, Sparks JA, Bang L, Blancaflor EB. Plant actin cytoskeleton: new functions from old scaffold. *concepts in cell biology. His. Evol.* 2018;103–137.

181. Henty-Ridilla JL, Shimono M, Li J, Chang JH, Day B, Staiger JC. The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular Patterns. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003290.
182. Shi S, Li S, Asim M, Mao J, Xu D, Ullah Z, Liu G, Wang Q, Liu H. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(7):1900.
183. Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal.* 2006;18(3):276–84.
184. Hamada T. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2014;312:1–52.
185. de Keijzer J, Kieft H, Ketelaar T, Goshima G, Janson ME. Shortening of microtubule overlap regions defines membrane delivery sites during plant cytokinesis. *Curr. Biol.* 2017;27:514–520.
186. Vavrdová T, Šamaj J, Komis G. Phosphorylation of plant microtubule-associated proteins during cell division. *Front. Plant. Sci.* 2019;10:238.
187. Costa S. Are division plane determination and cell-cycle progression coordinated?. *New Phytol.* 2017;213:16–21.
188. Schecher S, Walter B, Falkenstein M, Macher-Goeppinger S, Stenzel P, Krümpelmann K. Cyclin K dependent regulation of Aurora B affects apoptosis and proliferation by induction of mitotic catastrophe in prostate cancer: cyclin K in prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 2017;141:1643–1653.
189. Van Damme DV, De Rybel B, Gudesblat G, Demidov D, Grunewald W, De Smet I. *Arabidopsis* α Aurora kinases function in formative cell division plane orientation. *Plant Cell.* 2011;23:4013–4024.
190. Fujita S, Pytela J, Hotta T, Kato T, Hamada T, Akamatsu R. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2013;23:1969–1978.

191. Zhou S, Chen Q, Li X, Li Y. MAP65-1 is required for the depolymerization and reorganization of cortical microtubules in the response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 2017;264:112–121.
192. Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, Sasabe M, Machida Y. HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2010;51:1766–1776.
193. López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, Luna-Valdez D. *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J. Exp. Bot.* 2014;65:169–183.
194. Smékalová V, Luptovčiak I, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Doskočilová A. Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol.* 2014;203:1175–1193.
195. Brieño-Enríquez MA, Moak SL, Holloway JK, Cohen PE. NIMA-related kinase 1 (NEK1) regulates meiosis I spindle assembly by altering the balance between α -Adducin and Myosin X. *PLoS. One.* 2017;12(10):e0185780.
196. Karpov P, Nadezhdina E, Yemets A, Blume Ya. Results of the clusterization of human microtubule and cell-cycle related serine/threonine protein kinases and their plant homologues. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2010;65(4):213–216.
197. Chen D, Vogel J. SAD kinase keeps centrosomes lonely. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(9):1047–1048.
198. Alvarado-Kristensson M, Rodríguez MJ, Silió V, Valpuesta JM, Carrera AC. SADB phosphorylation of γ -tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* 2009;11:1081–1092.
199. Eklund G, Lang S, Glindre J, Ehlén Å, Alvarado-Kristensson M. The nuclear localization of γ -tubulin is regulated by SadB-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2014;289(31):21360–21373.

200. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2011;12:709–721.
201. Krasnoperova EE, Goriunova II, Isayenkov SV, Karpov PA, Blume Ya.B., Yemets AI. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic subunits of the SnRK1 protein kinase complexes in the regulation of *Arabidopsis* γ -tubulin. *Cytol. Genet.* 2019;53(5):349–356.
202. Claverie JM, Notredame C. *Bioinformatics for Dummies*, 2nd ed., New York: Wiley Publ. 2006.
203. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23:2947–2948.
204. Letunic I, Doerks T, Bork P. Smart: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucl. Acids. Res.* 2015;43:257–260.
205. Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P, SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucl. Acids. Res.* 2006;34:257–260.
206. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter, SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucl. Acids. Res.* 2016;44:279–285.
207. DeCastro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucl. Acids. Res.* 2006;34:362–365.
208. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucl. Acids. Res.* 2017;45:190–199.
209. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Meth.* 2015;12:7–8.

210. Hanks SK, Quinn AM. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Meth. in Enzymol.* 1991;200:38–62.
211. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 2000;352.
212. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. and Evol.* 2016;33:1870–1874.
213. Huang HD, Lee TY, Tseng SW, Horng JT. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucl. Acids Res.* 2005;33:226–229.
214. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A. Comparative protein structure modeling with MODELLER. *Curr. Prot. Bioinform.* 2006;15:561–5630.
215. Kuntal BK, Aparoy P, Reddanna P. EasyModeller: A graphical interface to MODELLER. *BMC. Res. Not.* 2010;3:226.
216. Hildebrand PW, Goede A, Bauer RA, Gruening B, Ismer J, Michalsky E, Preissner R. SuperLooper - a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins. *Nucl. Ac. Res.* 2009;37:571–574.
217. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* 2003;125:1731–1737.
218. Kollman JM, Zelter A, Muller EG, Fox B, Rice LM, Davis TN, Agard DA. The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol. Biol. Cell.* 2008;19:207–215.
219. Kollman JM, Greenberg CH, Li S, Moritz M, Zelter A, Fong KK, Fernandez J-J, Sali A, Kilmartin J, Davis TN, Agard DA. Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015;22:132–137.

220. Stacklies W, Seifert C, Graeter F. Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations. *BMC Bioinform.* 2011;12:101.
221. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucl. Ac. Res.* 2007;35:375–383.
222. Karpov PA, Bryrsun VM, Rayevsky AV, Demchuk OM, Pydiura NO, Ozheredov SP, Samofalova DA, Spivak SI, Yemets AI, Kalchenko VI, Blume YaB. High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on potential of virtual organization CSLabGrid. *Nauka innov.* 2015;11:92–100.
223. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004;25:1605–1612.
224. Menges M, Murray JA, Murray synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 2002;30:203–212.
225. Guzzo F, Portaluppi P, Grisi R, Barone S, Zampieri S, Franssen H, Levi M, Reduction of cell size induced by enod40 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2005;56:507–513.
226. Gamborg OL, Eveleigh DE. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968;46:417 – 421.
227. Joubert J, De Schutter K, Verkest A, Inz D, De Veylder L. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *Plant J.* 2004;37:889–896.
228. Karimi M, Inze D, Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends. Plant Sci.* 2002;7:193–195.
229. Краснопорова ОЄ, Новожилов ДО, Блюм ЯБ, Ісаєнков СВ. Створення плазмідної конструкції протеїнкінази AtKIN10 зливої із RFP для дослідження клітинної локалізації цього ферменту. Збірник

наукових праць Уманського національного університету садівництва. 2014;84:95–99.

230. Краснопорова ОЄ, Ісаєнков СВ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Вивчення клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 з *Arabidopsis thaliana*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;17:55–58

231. Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Nilson P. Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol.* 2007;145:1183–1891.

232. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 2001;25:402–408.

233. Szechyńska-Hebda M, Wedzony M, Dubas E, Kieft H, van Lammeren A. Visualisation of microtubules and actin filaments in fixed BY-2 suspension cells using an optimised whole mount immunolabelling protocol. *Plant Cell Rep.* 2006;25:758–766.

234. Лакін ГФ. Біометрія/Г.Ф. Лакін. М.: Вища школа. 1980;3:293.

235. Bright NJ, Carling D, Thornton C. Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2008;22:14946–14954.

236. Karpov PA, Rayevsky AV, Krasnoperova EE, Isayenkov SV, Yemets AI, Blume YaB. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. *Cytol. Genet.* 2017;51:415–421.

237. Краснопорова ОЄ, Карпов ПА, Ісаєнков СВ, Ємець АІ, Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії у різних органах. Доповіді НАН України. 2016;1:81–91 doi:10.15407/dopovidi2016.01.081

238. Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 2003;54:467–475.

239. Chen XY, Gu XT, Saiyin H, Wan B, Zhang YJ, Li J, Wang YL, Gao R, Wang YF, Dong WP, Najjar SM, Zhang CY, Ding HF, Liu JO, Yu L. Brain-selective kinase 2 (BRSK2) phosphorylation on PCTAIRE1 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 2012;287(36):30368–75.
240. Marx A, Nugoor C, Panneerselvam S, Mandelkow E. Structure and function of polarity-inducing kinase family MARK/Par-1 within the branch of AMPK/Snf1-related kinases. *FASEB. J.* 2010;24:1637–1648.
241. Naz F, Anjum F, Islam A, Ahmad F, Hassan MI. Microtubule affinity-regulating kinase 4: structure, function, and regulation. *Cell Biochem. Biophys.* 2013;67:485–499.
242. Tassan JP, Le Goff X. An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. *Biol. Cell.* 2004;96:193–199.
243. Elbert M, Rossi G, Brennwald P. The yeast par-1 homologs kin1 and kin2 show genetic and physical interactions with components of the exocytic machinery. *Mol. Biol. Cell.* 2005;16:532–549.
244. Краснопорова ОС, Исаєнков СВ, Карпов ПА, Ємець АІ. Нові генетичні конструкції *KIN10-HIS/KIN11-HIS* як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкіназ SnRK1 та BRSK1. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:68–72
245. Sheen J. Master regulators in plant glucose signaling network. *J. Plant Biol.* 2014;57:67–79.
246. Farris R, Ferrando A, Jsik J, Kleinow T, Okrýsz L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 2001;20:2742–2756.
247. Hey SJ, Powers SJ, Beale MH, Hawkins ND, Ward JL, Halford NG. Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified *HMG-CoA* reductase. *Plant Biotech. J.* 2005;4:219–229.

248. Son S, Oh CJ, An CS. *Arabidopsis thaliana* remorins interact with SnRK1 and play a role in susceptibility to beet curly top virus and beet severe curly top virus. *Plant Pathol. J.* 2014;30:269–278.
249. Confraria A, Martinho C, Elias A, Rubio-Somoza I, Baena-González E. miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 2013;4:1–39.
250. Krasnoperova EE, Isayenkov SV, Yemets AI, Blume Ya.B. Influence of protein kinase KIN10 gene expression on root phenotype of *Arabidopsis thaliana* root system under condition of energy stress. *Cytol. Genetics.* 2016;50(4):215–220.
251. Sheremet YaA, Yemets AI, Vissenberg K, Verbelen J-P, Blume YaB. The effect of inhibitors of serinetreonine protein kinases on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubules organization in its cells. *Tsitologiya.* 2010;5:399–406.
252. Krasnoperova EE, Buy DD, Goriunova II, Isayenkov SV, Karpov PA, Blume Ya.B, Yemets AI. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.* 2019;53(3):185–191.
253. Crisanto G. The *Arabidopsis* cell division cycle. *Arabidopsis Book*, 2009;7:e0120.
254. Trapp O, Seeliger K, Puchta H. Homologs of breast cancer genes in plants. *Front Plant Sci.* 2011;2:doi 10.3389/fpls.2011.00019.
255. Shevchenko GV, Talaliev AS, Doonan J. *Arabidopsis thaliana* seedlings from the Chernobyl NPP zone are tolerant to DNA-damaging agents, *Reports NAS Ukraine.* 2012;12:157–162.
256. Menges M, Murray JA, Murray synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 2002;30:203–212.
257. Hulsmans S, Rodriguez M, De Coninck B, Rolland F. The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions. *Trends Plant Sci.* 2016;21:648–661.

258. Yemets A, Stelmakh O, Blume YB. Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action. *Cell Biol Int.* 2008;32:623–629.
259. Eklund G, Lang S, Glindre J, Ehlén Å, Alvarado-Kristensson M. The nuclear localization of γ -tubulin is regulated by SadB-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2014;289:21360–21373.
260. Claverie JM, Notredame C. *Bioinformatics for dummies*. 2nd Ed. New York: Wiley Publishing. 2007;457.
261. Sample V, Ramamurthy S, Gorshkov K, Ronnett GV, Zhang J. Polarized activities of AMPK and BRSK in primary hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell.* 2015;26:1935–1946.
262. Gardiner J, Overall R, Marc J. Plant microtubule cytoskeleton complexity: microtubule arrays as fractals. *J. Exp. Bot.* 2012;63(2):635–642.
263. Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiol. Biochem.* 2017;115:126–140.
264. McCormick JW, Pincus D, Resnekov O, Reynolds KA. Strategies for Engineering and Rewiring Kinase Regulation. *Trends. Biochem. Sci.* 2019;19:30234–302348.
265. Yoshida H, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *J. Neurochem.* 2012;120(1):165–76.
266. Lu R, Niida H, Nakanishi M. Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31164–70.
267. Witte H, Neukirchen D, Bradke F. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* 2008;180(3):619–32.
268. Watabe AM, Nagase M, Hagiwara A, Hida Y, Tsuji M, Ochiai T, Kato F, Ohtsuka T. SAD-B kinase regulates pre-synaptic vesicular dynamics at

hippocampal Schaffer collateral synapses and affects contextual fear memory. *J. Neurochem.* 2016;136(1):36–47.

269. Ramírez Martínez L, Vargas Mejía M, Espadamala J, Gomez N, Lizcano JM, López-Bayghen E. Neuronal Growth Factor regulates Brain Specific Kinase 1 expression by inhibiting promoter methylation and promoting Sp1 recruitment. *Neurochem Int.* 2018;120:213–223.

Додаток А

Список публікацій здобувача

Статті:

1. **Краснопьорова О.Є.**, Новожилов Д.О., Блюм Я.Б., Ісаєнков С.В. Створення плазмідної конструкції протеїнкінази AtKIN10, злитої із RFP для дослідження клітинної локалізації цього ферменту. Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. 2014;84:95–99. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
2. **Краснопьорова О.Є.**, Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вивчення клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 з *Arabidopsis thaliana*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;17:55–58. (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
3. **Краснопьорова О.Є.**, Карпов П.А., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кластичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії у різних органах *Arabidopsis thaliana*. Доповіді НАН України. 2016;1:81–91. doi:10.15407/dopovidi2016.01.081 (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).
4. **Krasnoperova E.E.**, Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Influence of protein kinase KIN10 gene expression on root phenotype of *Arabidopsis thaliana* root system under condition of energy stress. Cytol. Genet. 2016;50(4):215–220. doi:10.3103/S009545271604006X (*Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті*).

Продовж. дод. А

5. **Краснопьорова О.Є.,** Ісаєнков С.В., Карпов П.А., Ємець А.І. Нові генетичні конструкції *KIN10-HIS/KIN11-HIS* як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкіназ SnRK1 та BRSK1. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:68–72. (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).
6. Karpov P.A., Rayevsky A.V., **Krasnoperova E.E.,** Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume YaB. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. Cytol. Genet. 2017;51(6):415–421. doi:10.3103/S0095452717060056 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).
7. **Krasnoperova E.E.,** Buy D.D., Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume YaB., Yemets AI. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*. Cytol. Genet. 2019;53(3):185–191. doi:10.3103/S0095452719030022 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).
8. **Krasnoperova E.E.,** Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume YaB., Yemets A.I. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic subunits of the SnRK1 protein kinase complexes in the regulation of *Arabidopsis* γ -tubulin. Cytol. Genet. 2019;53(5):349–356. doi:10.3103/S0095452719050104 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

Тезы:

9. **Краснопьорова О.Є.,** Новожилов Д.О., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Клонування протеїнкінази KIN10 з *Arabidopsis thaliana*. Збірник тез

Продовж. дод. А

доповідей міжнародної наукової конференції «Селекційно-генетична наука і освіта», 18-20 березня Умань. 2013, с. 57–58.

10. Новожилов Д.О., **Краснопьорова О.Є.**, Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Особливості росту та розвитку коренів проростків трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana*, що мають підсилену або пригнічену експресію гену протеїнкінази KIN10. Збірник тез доповідей міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2013: біологічні науки», 18-22 березня Київ. 2013, с. 78.
11. **Краснопёрова Е.Е.**, Новожилов Д.О., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Исследование роли протеинкиназы KIN10 в регуляции элементов цитоскелета. Збірник тез доповідей конференції «Биология наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых» 21-26 квітня Пушино. 2013, с. 493.
12. **Krasnoperova E.E.**, Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume YaB. Expression profiling and cladistic analysis of serine/threonine protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana*. Abstracts of the International Conference for Young Scientists «Actual problems of microbiology and biotechnology» Odesa. 2015, p. 17.
13. **Краснопьорова О.Є.**, Курило В.В., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Трансформація тютюну (*Nicotiana tabacum*) генами *KIN10-RFP* та *KIN10-GFP*. Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практична конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології», 3-7 жовтня Вінниця. 2016, с. 248–249.
14. **Краснопьорова О.Є.**, Буй Д.Д., Ісаєнков С.В., Ємець А.І. Вивчення експресії KIN10 та KIN11 за умов дії сольового та осмотичного стресів. Збірник тез доповідей третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 16-18 травня Київ. 2017, с. 14.