

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

**Карпов Павло Андрійович**



УДК: 57.052.6:576.32/.36:576.311.348.7

**КІНОМ МІКРОТРУБОЧОК ЯК НЕВІД'ЄМНА СКЛАДОВА РЕГУЛЯЦІЇ  
ТУБУЛІНОВОГО КОДУ У РОСЛИН**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеню  
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

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

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Корнелюк Олександр Іванович,**  
Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України, завідувач відділу білкової  
інженерії та біоінформатики;

доктор хімічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Вовк Андрій Іванович,**  
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
ім. В. П. Кухаря НАН України,  
директор, завідувач відділу механізмів  
біоорганічних реакцій;

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Пушкарьов Володимир Михайлович,**  
ДУ «Інститут ендокринології та обміну  
речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН  
України», головний науковий співробітник  
відділу фундаментальних та прикладних  
проблем ендокринології.

Захист відбудеться 14 квітня 2021 р. об 11<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а. Тел/факс: (044) 463 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

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

Автореферат розіслано 12 березня 2021 р.

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



Н.Л. Пастухова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Молекули  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, є головними компонентами системи мікротрубочок, які характеризуються значною міжвидовою консервативністю послідовностей і просторових структур у представників різних царств (Nogales et al., 1998). Проте, незважаючи на безумовну подібність, навіть на рівні окремих організмів, мікротрубочки демонструють значне морфологічне і функціональне різноманіття. Регуляторний механізм, що лежить в основі такої функціональної пластичності отримав назву «тубулінового коду» (Gadadhar et al., 2017). Загально визнаними факторами модуляції тубулінового коду виступають експресія різних ізотипів тубуліну, а також різноманітні посттрансляційні модифікації (Gadadhar et al., 2017).

Поза сумнівом, фосфорилування – один з найбільш важливих типів посттрансляційних модифікацій, які обумовлюють конформаційні зміни цільових білків, впливають на властивості молекулярних інтерфейсів, динамічну нестабільність мікротрубочок, регулюють взаємодію з асоційованими білками, забезпечують регуляцію активного транспорту за участю моторних білків та ін. (Franker et al., 2013). Незважаючи на значний прогрес досліджень у цьому напрямку за останні 50 років, слід зауважити, що розуміння більшості фундаментальних аспектів фосфорилування тубуліну, визначення сайтів асоційованих з певними протеїніназами і ролі більшості модифікацій досі залишається обмеженим.

Існуючі публікації за напрямом дослідження кіному мікротрубочок і тубулінового коду найчастіше охоплюють виключно модифікації мікротрубочок тваринного походження (Verhey & Gaertig, 2007; Barisic & Maiato, 2016; Gadadhar et al., 2017; Ferreira et al., 2018; Janke & Magiera, 2020). Відомо декілька робіт, присвячених ролі посттрансляційних модифікацій тубуліну дріжджів (Kollman et al., 2015). Аналогічні дослідження рослин значно поступаються (Verhey & Gaertig, 2007). У більшості випадків, публікації присвячені дослідженню ролі окремих протеїніназ і модифікацій тубуліну, а цілісне розуміння кіному мікротрубочок рослин наразі знаходиться на первинному етапі становлення (Parrotta et al., 2014).

Загалом, протеїнінази сприймаються як специфічні і динамічні молекулярні перемикачі, які регулюють більшість біологічних процесів еукаріот (Taylor et al., 2012). Для  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну тварин і дріжджів існування численних сайтів фосфорилування було підтверджено даними мас-спектрометрії (Redeker, 2010; Liu et al., 2015; Wloga et al., 2017; Liu et al., 2015). На сьогодні доведено, що фосфорилування тубуліну як тваринного, так і рослинного походження здійснюється за залишками серину (S / Ser), треоніну (T / Thr) і тирозину (Y / Tyr). Більшість функціонально-важливих сайтів фосфорилування молекул тубуліну у тварин і рослин зберегли консервативність і первинне функціональне значення, проте, у випадку кіномів мікротрубочок, ми маємо більш очевидні відмінності. Перш за все, у тварин зазначені модифікації здійснюються протеїніназами, які мають серин-треонінову (S/T), тирозинову (Y), а також дуальну (S/T/Y) специфічність, а у рослин існують лише

протеїнкінази, які мають серин-треонінову (S/T) або дуальну (S/T/Y) специфічність (Blume et al., 2008a; 2008b). Не викликає сумніву більш складна організація рослинних кіномів, а також існування певних структурних відмінностей рослинних і тваринних протеїнкіназ. Проте, як засвідчило актуальне дослідження, більша частина протеїнкіназ, що асоційовані з регуляцією клітинного циклу і системи мікротрубочок у *Homo sapiens* і *Arabidopsis thaliana*, виявляють консервативність каталітичних доменів (Karpov et al., 2010). При цьому подібність каталітичних доменів протеїнкіназ тубулінового коду значно перевищує показники загальної подібності тотальних кіномів рослинного і тваринного походження (Karpov et al., 2010a; 2010b). Саме така взаємна консервативність молекул тубуліну і протеїнкіназ тубулінового коду зумовлюють можливість біоінформаційного визначення консервативних сайтів фосфорилування молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, з'ясування їх функціональної ролі і ідентифікації протеїнкіназ, здатних здійснювати зазначені модифікації. У свою чергу, поєднання біоінформаційних і традиційних лабораторних методів утворюють потужний тандем для ефективної анотації кіному мікротрубочок і визначення протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин (Karpov et al., 2019; 2020; Krasnoperova et al. 2019a,b; Chudinova et al., 2017; Paganelli et al., 2015; Bryantseva et al., 2010).

Таким чином, актуальність представленої роботи полягає в тому, що, виходячи з можливостей аналізу повного рослинного кіному, було необхідно виявити і охарактеризувати основні шляхи ензиматичного фосфорилування тубуліну рослин як одного з критичних факторів функціональної спеціалізації мікротрубочок, визначити коло протеїнкіназ, здатних безпосередньо фосфорилувати  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубулін, ідентифікувати сайти такого фосфорилування та обґрунтувати роль визначених протеїнкіназ в регуляції тубулінового коду вищих рослин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу було виконано в рамках бюджетних тематик відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»: «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (№ ДР 0115U002084, 2015-2019 рр.); «Вивчення цитоскелету як критичної мішені для розробки нових агробіотехнологій та пошуку біологічно активних речовин за допомогою засобів геноміки та біоінформатики» (№ ДР 0110U001224, 2010-2014 рр.); в межах вітчизняних і міжнародних спільних проєктів: «Ідентифікація рослинного гомолога протеїнкінази MAST2 людини та з'ясування його ролі в регуляції структури цитоскелету» (проєкт НАН України, № ДР 0115U001642, 2015-2019 рр.); «Вивчення цитоскелету як критичної мішені для розробки нових агробіотехнологій та пошуку біологічно активних речовин за допомогою засобів геноміки та біоінформатики» (проєкт НАН України, № ДР 0110U001224, 2010-2014 рр.); «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (проєкт НАН України, № ДР 0115U002084, 2015-2019 рр.); «Використання грид-технологій у фундаментальних та прикладних дослідженнях



цитоскелету, шляхом створення та розвитку віртуальної організації CSLabGrid» (проект НАН України, № ДР 0112U004000, 2012 р.); «Дослідження протеїніназ, що регулюють центри організації мікротрубочок у вищих рослин» (спільний проект конкурсу фундаментальних досліджень «ДФФД-РФФД-2013», № ДР 0113U004487, Ф53.4/045, 2013 р.); «Роль протеїніназ в регуляції гама-тубулінових комплексів та нуклеації мікротрубочок» (спільний конкурс НАН України та Чеської академії наук, 2017-2019 рр.); «Порівняльний аналіз кіномів мікротрубочок у тварин та у вищих рослин» (спільний проект НАН України-РФФД, № ДР 0108U004809, 2008-2009 рр.). Ресурсоємні обчислення дисертаційного дослідження було виконано в рамках роботи ВО CSLabGrid, яка є частиною Українського Національного Гріду.

**Мета та завдання.** Метою роботи було визначення протеїніназ рослинного походження, безпосередньо причетних до фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, ідентифікація сайтів фосфорилування цих білків та з'ясування наслідків цієї пост трансляційної модифікації у формуванні тубулінового коду вищих рослин.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Виконати реконструкцію повного кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana* на підставі актуальної ревізії баз даних і біоінформатичного аналізу геномої і протеомної інформації;
2. З'ясувати коло тваринних протеїніназ, для яких доведена асоціація з регуляцією системи мікротрубочок та клітинним поділом, а також визначити наявність або відсутність їх рослинних гомологів;
3. Відібрати на підставі даних літератури, спеціалізованих web-ресурсів, наявності консенсусів мотивам специфічних сайтів фосфорилування, коло протеїніназ, безпосередньо причетних до фосфорилування молекул тубуліну;
4. На підставі гомології послідовностей, результатів філогенетичного і структурно-біологічного аналізу визначити потенційну групу рослинних протеїніназ, залучених до формування тубулінового коду;
5. Визначити наявність консервативних сайтів специфічного фосфорилування у ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну рослин та здійснити їх прогнозування на підставі відповідності існуючим і створеним *de novo* мотивам канонічних сайтів відомих протеїніназ;
6. Виконати структурно-біологічний аналіз макромолекулярних комплексів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну з метою прогнозування топології і функціональної ролі визначених сайтів фосфорилування;
7. Визначити оптимальні методи експериментального підтвердження зв'язку відібраних рослинних гомологів з регуляцією системи мікротрубочок;
8. Експериментально дослідити зв'язок біоінформатично визначених протеїніназ тубулінового коду з регуляцією системи мікротрубочок вищих рослин;
9. На підставі аналізу баз даних, біоінформатичного, структурно-біологічного і експериментального досліджень визначити остаточний перелік протеїніназ тубулінового коду вищих рослин;

10. Узагальнити внесок фосфорилування в регуляцію тубулінового коду вищих рослин, визначених сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну і асоційованих протеїнкіназ. Виконати реконструкцію повного кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana* на підставі актуальної ревізії баз даних і біоінформатичного аналізу геномої і протеомної інформації;

11. З'ясувати коло тваринних протеїнкіназ, для яких доведена асоціація з регуляцією системи мікротрубочок та клітинним поділом, а також визначити наявність або відсутність їх рослинних гомологів;

12. Відібрати на підставі даних літератури, спеціалізованих web-ресурсів, наявності консенсусів мотивам специфічних сайтів фосфорилування, коло протеїнкіназ, безпосередньо причетних до фосфорилування молекул тубуліну;

13. На підставі гомології послідовностей, результатів філогенетичного і структурно-біологічного аналізу визначити потенційну групу рослинних протеїнкіназ, залучених до формування тубулінового коду;

14. Визначити наявність консервативних сайтів специфічного фосфорилування у ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну рослин та здійснити їх прогнозування на підставі відповідності існуючим і створеним *de novo* мотивам канонічних сайтів відомих протеїнкіназ;

15. Виконати структурно-біологічний аналіз макромолекулярних комплексів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну з метою прогнозування топології і функціональної ролі визначених сайтів фосфорилування;

16. Визначити оптимальні методи експериментального підтвердження зв'язку відібраних рослинних гомологів з регуляцією системи мікротрубочок;

17. Експериментально дослідити зв'язок біоінформатично визначених протеїнкіназ тубулінового коду з регуляцією системи мікротрубочок вищих рослин;

18. На підставі аналізу баз даних, біоінформатичного, структурно-біологічного і експериментального досліджень визначити остаточний перелік протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин;

19. Узагальнити внесок фосфорилування в регуляцію тубулінового коду вищих рослин, визначених сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну і асоційованих протеїнкіназ.

**Об'єкт дослідження** – особливості кіному та посттрансляційної регуляції мікротрубочок рослин, що реалізуються через безпосереднє фосфорилування молекул тубуліну і формування тубулінового коду.

**Предмет дослідження** – протеїнкінази рослинного кіному, які приймають участь у регуляції системи мікротрубочок через безпосереднє фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вищих рослин, сайти фосфорилування і наслідки визначених модифікацій тубуліну.

**Методи дослідження.** Біоінформатичні і структурно-біологічні методи; методи аналізу гомології послідовностей і структур; метод структурного моделювання молекулярних комплексів за допомогою методів білок-білкового і ліганд-білкового докінгу; методи анотації структурних особливостей білків за допомогою профільного пошуку і визначення специфічних функціональних мотивів; дослідження молекулярних процесів шляхом моделювання

молекулярної динаміки; методи філогенетичного і кладистичного аналізу; аналіз баз даних; прогнозування білок-білкових взаємодій; фізіологічні експерименти із застосуванням ліній дикого генотипу, мутантних ліній, рослин, що експресували флуоресцентні конструкти, методи специфічного забарвлення з використанням специфічних антитіл; метод прижиттєвого спостереження за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії; аналіз динаміки цитоскелетних структур під впливом селективного інгібіторного пригнічення цільових протеїназ; методи генетичної інженерії і молекулярно-генетичного аналізу.

Статистична і математична обробка результатів експериментальних досліджень була виконана із використанням програм Microsoft Excel v. 2007 - 12.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Виконана найбільш актуальна на початок 2021 року ревізія кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana*, що встановила наявність 1021 протеїнази (1022 каталітичних домени) серин-треонінової і дуальної специфічності.

Вперше визначено коло протеїназ, що безпосередньо здійснюють фосфорилування молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну і беруть участь у формуванні тубулінового коду вищих рослин, а також визначено сайти фосфорилування, характерні для цих протеїназ і надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі таких модифікацій для функціонування тубуліну і мікротрубочок в цілому.

Вперше на прикладі *A. thaliana* встановлено, що у фосфорилуванні рослинного  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну беруть участь безпосередньо три протеїнази групи AGC (IREN1 /At3g17850, KPK1 /At3g08730 і KPK2 / At3g08720), дві протеїнази групи CMGC (CDK1 / At3g48750 і YAK1 / At5g35980) і філогенетично близький гетеротетрамерий холоензим SK2 (субодиниці: SKA1 / At5g67380), SKA2 / At3g50000, SKB1 CSK2B / At5g47080, SKB2 / At4g17640), ізотип SKL6 (At4g28540) казеїнази 1, SNF1-споріднені протеїнази KIN10 / At3g01090 і KIN11 / At3g29160, NIMA-протеїназа NEK6 (At3g20860) і дев'ять  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеїназ: п'ять представників родини СРК (СРК7/At5g12480, СРК14/At2g41860, СРК20/At2g38910, СРК21/AT4G04720, СРК32/At3g57530), три представника родини CDPK/CRK (CRK2/CAMK2 (At3g19100), CRK3/CAMK3 (At2g46700)), протеїназа CRK8/CAMK8 (At1g49580) і SnAK1-кіназа GRIK2 (At5g60550).

За результатами дисертаційного дослідження запропонована найбільш повна узагальнююча модель внеску фосфорилування в регуляцію структури і властивостей макромолекулярних комплексів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вищих рослин, що реалізується шляхом безпосередньої модуляції тубулінового коду.

Таким чином, вперше, на підставі аналізу повного кіному *A. thaliana* виявлено і охарактеризовано основні шляхи ензиматичного фосфорилування тубуліну рослин за участю різних типів протеїназ, з'ясована роль фосфорилування як ключового фактору функціональної спеціалізації мікротрубочок, визначено коло протеїназ, здатних фосфорилувати молекули  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, ідентифіковано сайти такого фосфорилування та надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі визначених протеїназ в регуляції тубулінового коду вищих рослин.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати дисертаційної роботи суттєво розширюють існуючі уявлення щодо ензиматичної регуляції мікротрубочок рослин шляхом безпосереднього фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну і визначають ферменти і сайти такої модифікації. Це значно розширює перелік молекулярних мішеней і можливості впливу на процеси, безпосередньо пов'язані з функціональним станом мікротрубочок: мітотичну активність та ріст клітин; полярність та форма клітин; активний транспорт везикул, гранул і органел; розходження хромосом у процесах мітозу і мейозу. Завдяки цьому відкриваються нові можливості подальших досліджень ролі сигнальних каскадів, з'ясування зв'язку впливу зовнішніх і внутрішніх факторів з відповіддю системи мікротрубочок, що може знайти своє подальше застосування у розвитку технологій захисту рослин, біотехнології, генної інженерії, селекції, тощо.

Дані стосовно повного кіному *A. thaliana* і кіному мікротрубочок пропонуються як основа для створення програмного інструментарію з метою прогнозування специфічності біологічно активних речовин на рослинних об'єктах. На сьогодні аналогічний програмний інструмент існує лише для кіному *Homo sapiens* –KinMap ([www.kinhub.org](http://www.kinhub.org)).

Протоколи та методи біоінформатичного і експериментального дослідження, використані для реконструкції повних кіномів, функціональної анотації білків, визначення ролі окремих функціональних доменів і модифікацій, специфічності інгібіторів і аналізу сайтів зв'язування лігандів, будуть використані як базові інструменти майбутніх досліджень регуляції клітинних функцій у вищих рослин за участю посттрансляційних модифікацій.

Оригінальні методичні розробки використовуються у освітніх процесах Київського національного університету імені Тараса Шевченка (на магістерському і бакалаврському рівнях вищої освіти), Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (на освітньо-науковому рівні), а також були використані на XI і XII Міжнародних літніх школах-конференціях «Молекулярна мікробіологія та біотехнологія» на платформі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (м. Одеса, 2017 і 2018 рр.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною науковою працею, в якій висвітлені власні результати дослідження автора. Безпосередньо автором розроблено концепцію і структуру роботи, здійснені дослідження експериментальної частини, аналіз результатів, їх представлення, формулювання основних положень та висновків. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантові належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. При обговоренні результатів у процесі підготовки публікацій автор консультувався з академіком НАН України, д.б.н., професором Блюмом Я.Б. Усі наукові узагальнення, положення, результати та висновки, викладені у дисертації, сформульовано автором особисто.

**Апробація результатів досліджень.** Основні положення роботи доповідалися на міжнародних конференціях: 7th Baltic genetics congress (Latvia, Riga, 2018); FEBS Advanced Lecture Course and 33rd European Cytoskeletal Forum Meeting on «Biology and pathology of the cytoskeleton: the crossroads of three

cytoskeletal systems» (Czech Republic, Prague, 2018); International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology (Ukraine, Odesa, 2016); International Symposium on Cell Biology jointly with 4th Ukrainian Congress for Cell Biology (Ukraine, Uzhhorod, 2014); Moscow Conference on Computational Molecular Biology / MCCMB'13, (Russia, Moscow, 2013); Human Genome Meeting and 21st International Congress of Genetics / HGM2013/21st ICG (Singapore, 2013); 50th ASCB Annual Meeting (USA, San Francisco, 2012); 3rd International Symposium «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» / ISABMD'2012 (Ukraine, Lviv, 2012); 8th International Conference on «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology» BGRS\SB'12 (Russia, Novosibirsk, 2012); International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology, UCCB'2012, (Ukraine, Yalta, 2012); Биология растений и биотехнология (Украина, Белая Церковь, 2011); Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology, MCCMB'11 (Russia, Moscow, 2011); 50th ASCB Annual Meeting (USA, Philadelphia, 2010); 7th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology, BGRS'2010 (Russia, Novosibirsk, 2010); Actual problems of applied genetics, breeding and biotechnology of plants - International conference of the 200th anniversary of Charles Darwin and the 200th anniversary of Nikitsky Botanical Gardens (Ukraine, Yalta, 2009); Plant Genomics European Meeting 8, Plant GEM8 (Portugal, Lisbon, 2009); Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology / MCCMB'09 (Russia, Moscow, 2009); Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина / V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Россия, Москва, 2009); The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting (USA, San Francisco, 2008); Workshop on Computational Systems Biology Approaches to Analysis of Genome Complexity and Regulatory Gene Networks (Singapore, 2008); V міжнародна конференція «Геном рослин» (Україна, Одеса, 2008); Biotechnology Conference «Science and advance in the Black Sea region» (Bulgaria, Albena, 2008); Международная школа-конференция молодых ученых: «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях» (Россия, Звенигород, 2008); 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології (Україна, Київ, 2007); International conference on structural genomics / 4th ISGO (China, Beijing, 2006).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 65 наукових праць, з них 27 статей у фахових виданнях (зокрема, 3 – у виданнях Q1, 2 – у виданнях Q3), 2 розділи монографій, виданих закордонними видавництвами, 38 тез доповідей тез доповідей міжнародних та вітчизняних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 545 сторінках, складається зі вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел та 8 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 402 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована 21 таблицями, 132 рисунками. Перелік використаних джерел налічує 637, з них 2 українською, 4 російською мовою, решта англійською.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У межах огляду літератури проаналізована і узагальнена актуальна інформація стосовно ролі фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну в формуванні функціональної спеціалізації мікротрубочок. Проведено критичний аналіз сучасного тлумачення терміну «тубуліновий код» як джерела структурно-функціональної спеціалізації мікротрубочок і складових зазначеного феномену (роль ізотипів тубуліну і внесок посттрансляційних модифікацій). На підставі аналізу літератури визначені місце і роль зворотного фосфорилування як одного з типів посттрансляційного перетворення  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну. Виокремлюються фактори консервативності молекул тубуліну і протеїнкіназ, що обумовлюють існування консервативних рис посттрансляційної регуляції мікротрубочок у рослин і у представників інших царств. Проаналізовані особливості фосфорилування у тварин і рослин. Розглянуто аспекти еволюції кіному рослин, внеску геномних перебудов і дуплікацій генів протеїнкіназ як складової їх пристосування до наземного існування. Обґрунтовується певна консервативність групи протеїнкіназ, що причетні до регуляції процесів клітинного поділу, регуляції цитоскелету і, зокрема, тубулінового коду. Узагальнюється інформація стосовно існуючих доказів безпосереднього фосфорилування тубуліну, відомих сайтів і протеїнкіназ, що причетні до зазначених модифікацій. Надається структурна модель / схема, яка узагальнює інформацію стосовно топології і амінокислотного оточення експериментально-доведених сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, що виявляють консервативність у *H. sapiens*, *S. cerevisiae* і *A. thaliana*.

Окремо розглядається зв'язок певних родин і протеїнкіназ з регуляцією цитоскелету і тубулінового коду. Визначено родини, підродини і окремі протеїнкінази, гомологи яких можуть складати кіном тубулінового коду вищих рослин.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Досліджуваний матеріал.** Протеїнкінази кіному *H. sapiens* визначені на підставі даних Manning et al. (2002), літератури і спеціалізованих баз даних: UniProtKB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), NCBI GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)). Послідовності і структури рослинних протеїнкіназ відібрані на підставі гомології, даних літератури, аналізу баз даних і трансляційного сканування повних геномів. Нуклеотидні і амінокислотні послідовності отримано з репозиторіїв NCBI GenBank (Benson et al., 2013) і UniProtKB (UniProt Consortium, 2019) відповідно. Об'єктами структурно-біологічних досліджень були експериментально підтверджені (x-Ray, NMR, EM) структурні моделі з репозиторію RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), моделі побудовані методами гомологічного моделювання. Моделі комплексів протеїнкіназ із специфічними інгібіторами отримані шляхом молекулярного докінгу. Молекулярна динаміка моделей білків і їх комплексів в умовах моделювання фізіологічно оточення. Об'єктами філогенетичної кластеризації були повні амінокислотні послідовності, окремі домени, мотиви і сайти білків. Послідовності каталітичних доменів протеїнкіназ

було використано для реконструкції повного кіному *A. thaliana*, окремих груп і родин протеїназ. Фрагменти експериментально підтверджених і теоретичних сайтів фосфорилування представлено у форматі Хр±7. Дослідження топології сайтів фосфорилування молекул тубуліну виконувалось на структурних моделях фрагментів мікротрубочки, побудованих з використанням шаблонної ЕМ-структури 3J6F з *Sus scrofa* (Alushin et al., 2014). Моделі макромолекулярних комплексів центрів первинної нуклеації мікротрубочок *A. thaliana* були побудовані з використанням даних кріо-ЕМ мікроскопії і 3D-моделі GCPs/γ-тубулінових комплексів з репозиторію Kollman Lab (<https://sites.uw.edu/jkoll/>) (Kollman et al., 2015). Контролем були анотовані послідовності тваринного, дріжджового та іншого походження. Пріоритетними об'єктами під час дослідження топології сайтів фосфорилування були ізотипи α-, β- і γ-тубуліну *H. sapiens* і *A. thaliana* депоновані в UniProtKB.

Генетичний матеріал рослин винограду сорту 'Pinot Noir'. Клітина лінія 'Vero' (verda geno), що експресувала ксенологічні продукти рослинного походження. Рослини *A. thaliana*: дикого генотипу (Col-0), лінії що експресували цільові флуоресцентні конструкти, мутантні рослини (SALK\_139618C та SALK\_127939C) з бібліотеки Ноттінгемського стокового центру арабідопсису (<http://arabidopsis.info/>), трансгенні лінії з гіперекспресією цільових генів, трансгенні РНКі-лінії, рослини, що експресують GFP-маркер мікротрубочок GFP-MAP4 (Mathur and Chua, 2000). Суспензійні культури *A. thaliana* та *N. tabacum* BY-2. Рослинні конструкти, клоновані в *E. coli* та *A. tumefaciens*. Імунопреципітати клітин 'Vero' і HEK293 що були трансфектовані рослинними конструктами. Клітини, забарвлені антитілами, компетентними до тубуліну і відповідних протеїназ (Szechyńska-Hebda et al. 2006).

**Методи дослідження.** Пошук і аналіз нуклеотидних і амінокислотних послідовностей здійснювався із використанням баз даних UniProtKB, GenBank, TAIR і Kinase.com. Гомологи визначались за допомогою алгоритмів родини *blast* із використанням web-сервісів NCBI BLAST, ExPASy BLAST і PDB-BLAST (Altschul et al., 1990). Вирівнювання амінокислотних послідовностей виконувались в програмі ClustalX (v.1.83-2.1) із застосуванням матриць Gonnet і BLOSUM (Larkin et al., 2007). Локуси генів перевірялись за допомогою web-ресурсу TAIR і інструменту NCBI Genome Data Viewer (MapView). Доменна архітектура досліджувалась за допомогою web-сервісів: SMART (Letunic et al., 2012), Pfam (Mistry et al., 2020), InterPRO (Hunter et al., 2009) і PROSITE (Sigrist et al., 2012). Основні методи філогенетичного аналізу Neighbor-Joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987), UPGMA (Rédei et al., 2008) і bootstrap (Efron et al., 1996). Візуалізація і аналіз дендрограм виконувались в програмах MEGA7 (Huson and Linz, 2018), TreeView X (Page, 1996) NJplot (Perrière and Gouy, 1996) і Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Білок-білкові взаємодії аналізувались за допомогою web-інструменту STRING (Szklarczyk et al., 2019)

Джерелом інформації про просторову структуру білків був RCSB Protein Data Bank. Візуалізація і аналіз 3D-структур здійснювалась в програмі PyMOL. Моделювання просторової структури білків здійснювалось за допомогою он-лайн сервісів SWISS-MODEL, I-TASSER, програм MODELLER 8v7 (Webb and Sali,

2016) і EasyModeller 4.0 (Kuntal et al., 2010). Структурні шаблони профільного моделювання відбирались за допомогою інструменту PDB-BLAST. Молекулярна динаміка (МД) розраховувалась в програмі GROMACS (Pronk et al., 2013) із використанням силових полів (ff): CHARMM, amber99, OPLS-AA, GROMOS 53a6 (G53a6). Критерії якості 3D-моделей: середньоквадратичні відхилення атомів і енергетичні коливання МД, карти Рамачандрана, графіки DOPE і ANOLEA, протоколи web-сервісів PROCHECK і MolProbity. Прогнозування сайтів фосфорилування здійснювалось на підставі гомології, даних маспектрометрії, кластеризації теоретичних і експериментальних сайтів, аналізу в програмах KinasePhos (Huang et al., 2005) і GPS 3.0 (Cheng et al., 2015). Фосфорилований стан амінокислот моделювався за допомогою плагіну PyTMs (Warnecke et al., 2014) і параметрів топології з отриманих з SwissSidechain (Gfeller et al., 2013). Електростатичні взаємодії досліджувались за методом PME (Essmann et al., 1995).

Реконструкція білкових комплексів здійснювалось шляхом гомологічного заміщення або білок-білкового докінгу в HADDOCK 2.2 (Koukos et al., 2019). Докінг лігандів здійснювався в програмі CCDC Gold v. 5.3.0 (Ogawa et al., 2010). Якість комплексів підтверджувалась оціночними функціями програм і результатами молекулярної динаміки. Джерелом структур лігандів були бази даних ZINC, PubChem і ChEMBL, а файли їх структурної топології було отримано за допомогою web-сервісів PRODRG і Swiss-Param. Обрахунки молекулярної динаміки було виконано з використанням обчислювальних потужностей грид-кластеру ДУ «ІХБГ НАН України», а також, віртуальних організацій CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/csllabgrid>) і MolDynGrid (<https://moldyngrid.org>).

Лабораторні дослідження: молекулярно-генетичні методи (ПЛР, електрофорез в агарозному гелі, генетичне клонування, ампліфікація, ксенологічна експресія та ін.), специфічне інгібування протеїнкіназ, використання мутантних рослин, дослідження рослинних моделей, що відрізняються за рівнем мітотичної активності, методи фізіологічного експерименту, методи флуоресцентної (ФМ) і лазерної конфокальної мікроскопії (ЛКМ). Кореляції інгібування протеїнкіназ, морфологічних реакцій і поведінки мікротрубочок (ЛКМ) - прижиттєво на рослинах *A. thaliana*, що експресують МТ-маркер GFP-MAP4. Фотофіксація морфологічних реакцій виконувалась через 6, 24, 48 і 72 годин, за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Морфометричний аналіз коренів було виконано за допомогою програми ImageJ v. 1.38d (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Клонування і експресія гомолога MAST2: 1) з *V. vinifera* в клітинах лінії 'Vero' (*Chlorocebus aethiops*) і 2) IREN1 з *A. thaliana* в клітинах 'Vero' і HEK293 (*H. sapiens*). Створення RFP-конструктів *KIN10-RFP* та *KIN10-BFP*, трансформація *E. coli* (за допомогою плазмідних векторів pART7-RFP і TagBFP-AS-C), отримання плазмідної ДНК, трансформація протопластів *A. thaliana* і суспензійної культури BY2 (*N. tabacum*). Транскрипційний аналіз органоспецифічної експресії *KIN10*. Дослідження органоспецифічної експресії *KIN10* на рослинах *A. thaliana* екотипу Col-0. Визначення органоспецифічної експресії генів шляхом денситометрії електрофореграм в програмі TotalLab (©TotalLab Ltd). Рівні експресії *SnRK1 $\alpha$* , визначались відносно контрольних маркерів мітоз-залежної експресії: *AtCYCB1;1* (*CYCB1-1* / AT4G37490) і *AtBRCA1*



(*BRCA1* / AT4G21070). Ампліфікація *GMLK*, *IREH1*, *AtCYCB1;1*, *AtBRCA1*, *KIN10* і *KIN11* виконувалась з використанням специфічних праймерів, а якість продуктів визначалась на підставі кривої плавлення продуктів ПЛР. Вплив SnRK1 $\alpha$  на ростові процеси *A. thaliana* визначався шляхом порівняння рослин з гіперекспресією (OX) і РНК-інтерференцією (РНКі) *KIN10*, з рослинами дикого генотипу Col-0. Культивування тваринних, рослинних і бактеріальних культур *in vitro* здійснювалось за стандартними протоколами. Мітотичний індекс визначався на коренях 14-денних проростків за методом давлених препаратів (мікроскоп Carl Zeiss Axioskop 40 + Plan-Neofluar 40x/1.3 + 100x/2.6 Immersion Oil), за допомогою програми AxioVisionsRel4.7. Колокалізація  $\alpha$ -,  $\gamma$ -тубуліну і цільових протеїніназ визначалась на підставі флуоресценції компетентних антитіл (Szechyńska-Hebda et al. 2006), за допомогою ЛСК мікроскопів Carl Zeiss LSM 510 META (Plan Achromat 63x/1.4 Oil DIC; лазер TRITC 543-нм; барвники FITC і TRITC; фільтри - META: BP 505-530 нм + LP 560 нм) і Olympus IX51, (фотокамера - Olympus XM10).

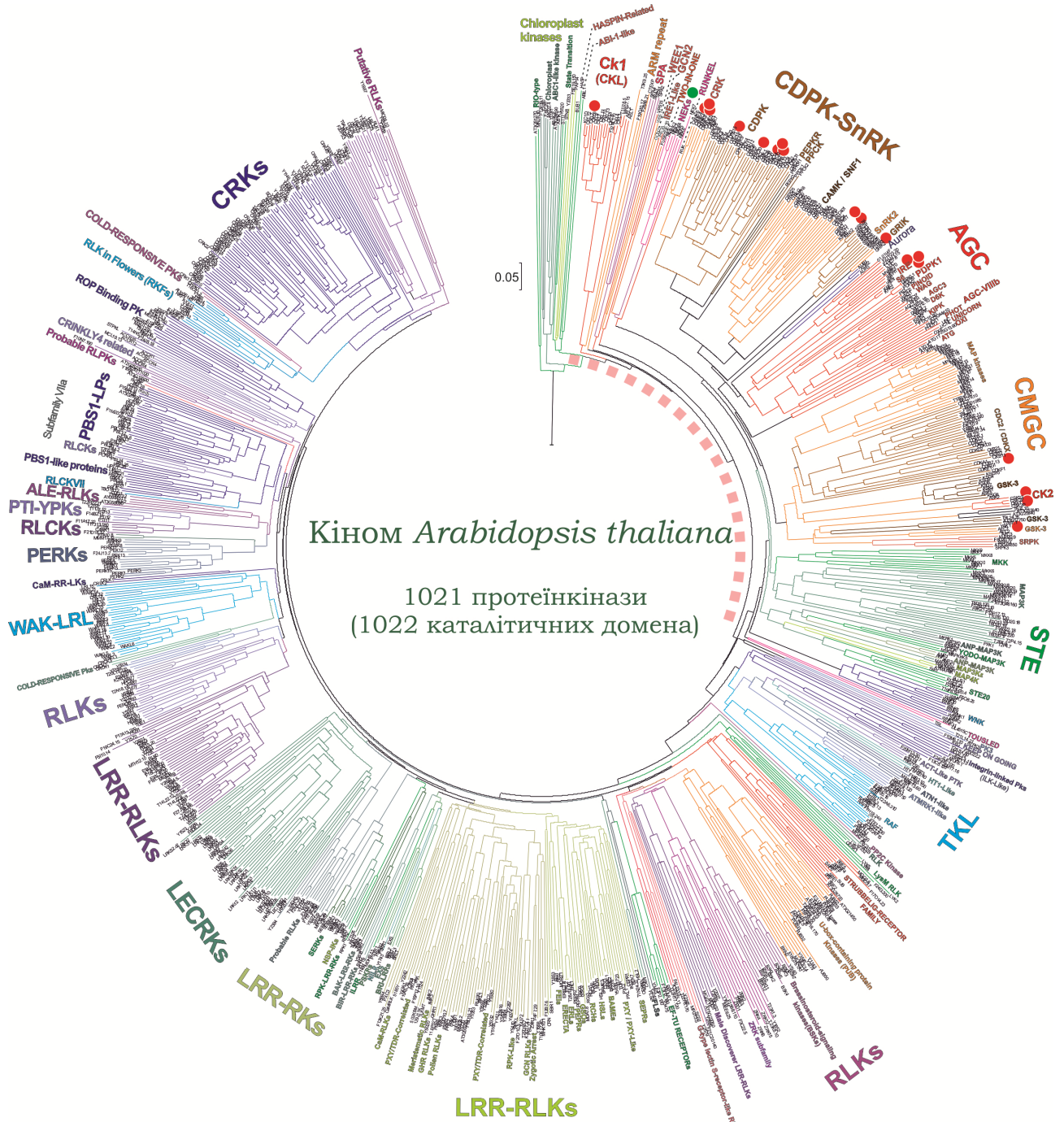
Експерименти виконувались якнайменше у трьох повторях і оброблялись статистично (Лакін, 1980). Достовірність підтверджувалась t-тестом Ст'юдента. Обробка і представлення математичних здійснювались в програмі Microsoft Office Excel 2007.

## **РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ ПОШУК РОСЛИННИХ ПРОТЕЇНкіНАЗ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У ФОСФОРИЛЮВАННІ БІЛКІВ МІКРОТРУБОЧОК ТА РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ПОДІЛУ**

### **Реконструкція повного кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana*.**

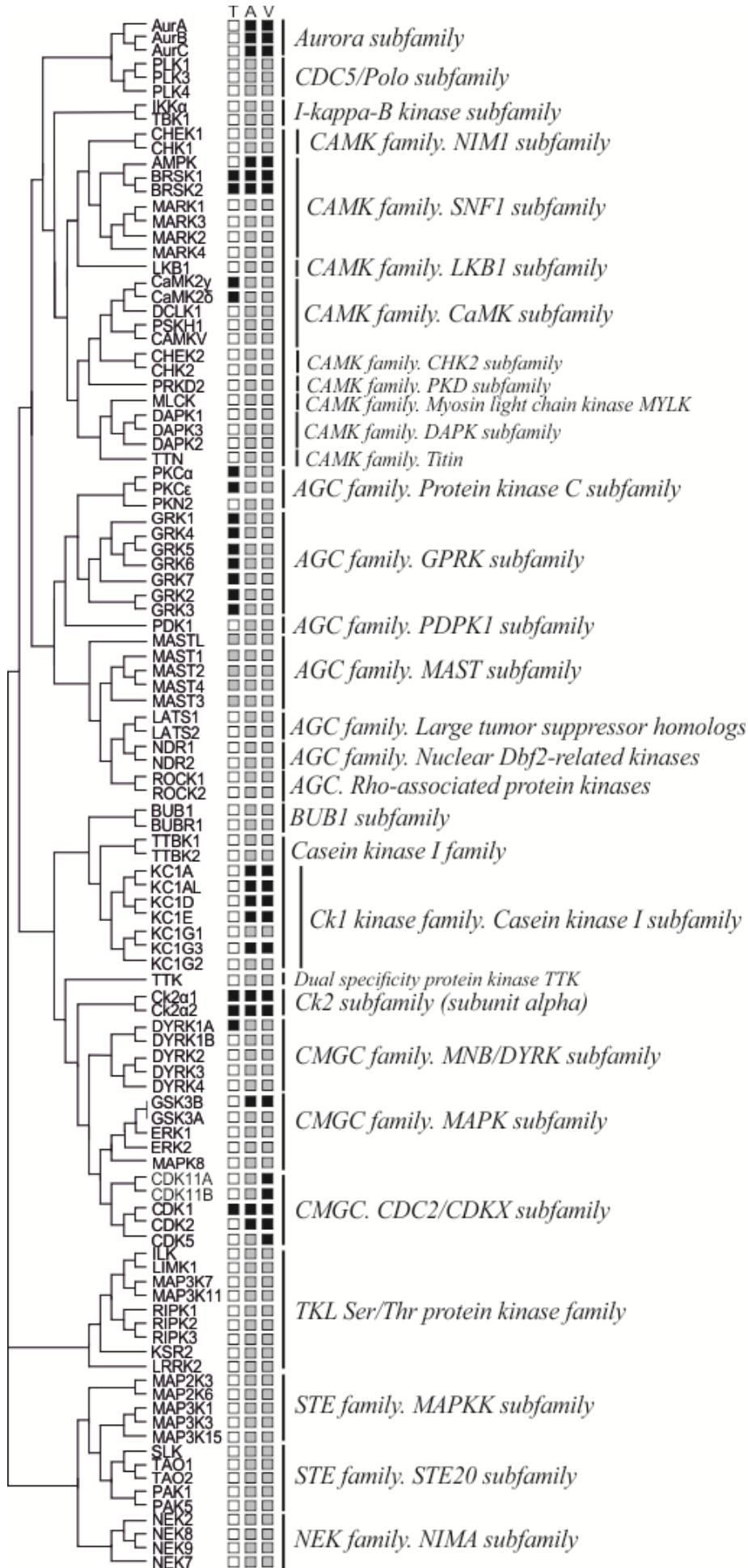
Актуальне дослідження супроводжувалось анотацією кіному *A. thaliana*. Остання ревізія була завершена 01.02.2021 року і визначила, що кіном *A. thaliana* нараховує 1021 протеїнінази (1022 каталітичних доменів) серин-треонінової і дуальної специфічності. Дані наведено без врахування сплайс-ізоформ, а унікальність кожної з протеїніназ підтверджена унікальністю локусів відповідних генів. За даними Tair (The Arabidopsis Information Resource - [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) і літератури (Cheng et al., 2017; Woodward et al., 2018), остання ревізія геному *A. thaliana* нараховує 27655 білок-кодуючих генів. Таким чином, протеїнінази складають ~3.7 % від всіх білок-кодуючих генів *A. thaliana*. За результатами ревізії була виконана узагальнююча анотація і побудовано топологічно коректне філогенетичне древо повного кіному *A. thaliana* (Рис. 1). На наступних етапах дослідження, отримана вибірка повних послідовностей і каталітичних доменів протеїніназ *A. thaliana* була використана для філогенетичної ідентифікації протеїніназ тубулінового коду.

**Пошук рослинних гомологів протеїніназ, асоційованих з регуляцією клітинного циклу і системи мікротрубочок *Homo sapiens*.** З 518 протеїніназ людини було відібрано 105 серин-треонінових протеїніназ (на початок 2021 року), для яких існує експериментальне підтвердження фосфорилування мікротрубочок і причетності до регуляції клітинного циклу (Kagrov et al., 2009) (Рис. 2).



**Рис.1.** Кластеризація 1022-х каталітичних доменів, що належать 1021-м протеїнкіназам *A. thaliana*, за методом зв'язування найближчих сусідів (NJ) станом на I квартал 2021 року. Топологія і коріння древа були визначені за методом Shiu et al. (2001) шляхом додавання до вибірки ксенологічних послідовностей arhA (KKA3\_ENTFL, P0A3Y5) з *Enterococcus faecalis* і RIO1 (RIO1\_YEAST, Q12196) з *Saccharomyces cerevisiae*.

- - маркер протеїнкіназ тубулінового коду: червоні – досліджені в межах актуального дослідження, зелений – протеїнкінази NIMA (NEK) на підставі даних літератури (Takatani et al., 2017). Червоною пунктирною лінією позначено пул протеїнкіназ, причетних до базових функцій регуляції цитоскелету і клітинного поділу.



**Рис. 2.** 105 протеїніназ *H. sapiens*, для яких існує експериментальне підтвердження фосфорилування мікротрубочок і причетності до регуляції клітинного циклу, результати пошуку протеїніназ тубулінового циклу «Т», а також, наявність їх гомологів у *A. thaliana* «А» і інших представників *Viridiplantae* «V»:

«Т» - фосфорилування тубуліну (■ - доведений факт, □ - опосередковані докази, □ - не фосфорилує α-, β- або γ-тубулін);

«А» - наявність гомологів у *A. thaliana* (■ - ідентичність >25%, подібність >80%, E-value < 10<sup>-5</sup>, □ - подібність послідовностей перевищує 60%);

«V» - наявність гомологів у представників *Viridiplantae* (■ - ідентичність >25%, подібність >80%, E-value < 10<sup>-5</sup>, □ - подібність послідовностей перевищує 60%).

*Примітка.* визначення рослинних гомологів ґрунтувалося на порогових критеріях показників ідентичності, подібності і показнику E-value, згідно із даними літератури: ідентичність >25%, подібність >80%, E-value < 10<sup>-5</sup>. (Stroehlein et al., 2018; Claverie & Notredame, 2007)

Аналіз літератури і баз даних визначив протеїнкінази *H. sapiens*: BRSK1/2, CAMK2 $\gamma/\delta$ , PKC $\alpha/\epsilon$ , GRK1-7, CK2 (Ck2 $\alpha$ 1 і Ck2 $\alpha$ 2), DYRK1A і CDK1 як агентів тубулінового коду (Рис. 2 «Т»).

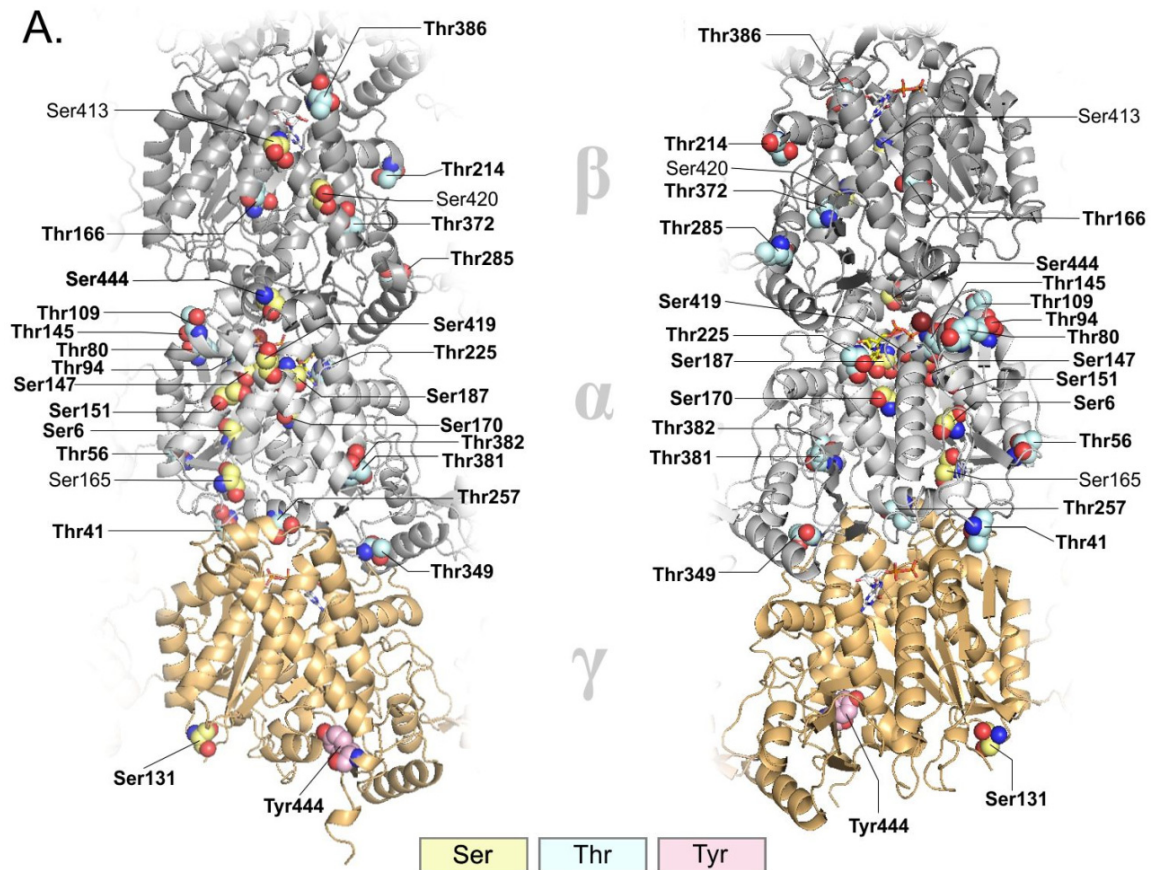
Водночас, була підтверджена консервативність топології (Рис. 3.А) і амінокислотного оточення (Рис. 3.Б) експериментально-доведених сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну *H. sapiens*, *S. cerevisiae* і *A. thaliana*. В сукупності із прононсованою консервативністю тваринних і рослинних протеїнкіназ асоційованих з регуляцією системи мікротрубочок і клітинного поділу, отримані дані підтвердили первинне припущення щодо спільних механізмів і певної консервативності протеїнкіназ, причетних до безпосереднього фосфорилування тубуліну у тварин і вищих рослин.

Таким чином, було визначено первинні пріоритетні групи протеїнкіназ, гомологи яких вірогідно є агентами тубулінового коду вищих рослин. Ключовими критеріями відбору груп наступного цільового дослідження було: 1) існування щонайменше одного факту експериментального підтвердження існування сайту специфічного фосфорилування (враховуючи екстраполяції гомології); 2) наявність факту білок-білкової взаємодії мікротрубочки і цільової протеїнкінази, або вагомні експериментальні дані, що вказують на потенційну можливість фосфорилування тубуліну; 3) значні показники подібності послідовностей рослинних гомологів; 4) подібність доменних архітектур і наявність специфічних мотивів.

Слід зазначити, що в межах актуального дослідження було визначено очевидну філогенетичну компактність суперклади протеїнкіназ, функціональне призначення яких в значній мірі пов'язане з регуляцією базових функцій клітини. Як довело наступне дослідження, саме до цієї групи належать всі протеїнкінази, для яких на наступному етапі дослідження була показана здатність фосфорилувати  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубулін (Рис. 1, червоні маркери «●»; Рис. 2 «Т»). До зазначеної групи також приєдналися всі без виключення рослинні гомологи 109-ти протеїнкіназ людини, які, за даними літератури, причетні до регуляції системи мікротрубочок і клітинного поділу (Рис. 2 «А» і «V»). Таким чином, це ще раз підтверджує первинну гіпотезу стосовно певної консервативності і еволюційної архаїчності протеїнкіназ «домашнього господарства» у представників різних царств, до яких належать і цільові протеїнкінази тубулінового коду.

Прононсована гомологія була доведена для групи рослинних протеїнкіназ зазначеної групи (Рис. 2 «А» і «V»). Деякі з них досліджували окремо: SLK, PAK6, PAK7, MARK1, TTBK1, TTBK2, PLK1, PLK4, PASK та ін. Проте, метою дослідження було визначення саме протеїнкіназ, здатних до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну. Саме тому об'єктами ретельного біоінформатичного, структурно-біологічного і лабораторного дослідження стали гомологи протеїнкіназ, що належали до груп: AGC (підродина MAST і GPRK / GRK), CDPK-SnRK (CDPK, CRK, SNF1 і SnAK1), Casein kinase 1 (підродина CK1, BUB1 / BUBR1), GMGC (підродина MNB / DYRK, MAPK, CDC2 / CDKX, PKC) і CK2 (Casein kinase 2). До остаточного переліку рослинних протеїнкіназ тубулінового коду належить і протеїнкіназа NEK6 (родина NEK, підродина NIMA), яка, згідно даним літератури, фосфорилує Thr166  $\beta$ -тубуліну, що викликає деполімеризацію рослинних мікротрубочок (Takatani et al., 2017).





**Б.**

**$\alpha$ -тубулін (TBA1B\_HUMAN)**

Ser6 1-MRECI <sup>S</sup> IHV <sup>Q</sup> G-11	Thr41 36-MPSDK <sup>K</sup> LIGGGD-46	Thr56 51-TFFSE <sup>S</sup> GAGKH-61	Thr80 75-IDEV <sup>R</sup> EGTYRQ-85
Thr94 89-PEQLI <sup>T</sup> IGKEDA-99	Thr109 104-ARGHY <sup>T</sup> IGKEI-114	Ser147 140-SFGGG <sup>S</sup> SGFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAP-175	Ser165 Ser170
Ser187 182-VEPYN <sup>S</sup> SILTTH-192	Thr225 220-ERPTY <sup>T</sup> NLNRL-230	Thr257 251-LTEFQ <sup>S</sup> NLVPY-262	Thr349 344-VDWCP <sup>S</sup> IGFKVG-354
Thr381 376-CMLSN <sup>T</sup> VAIAEA-387	Thr382 414-EEGE <sup>S</sup> SEARED-424	Ser419	

**$\beta$ -тубулін (TBB3\_HUMAN)**

Thr166 161-DRIMN <sup>S</sup> F <sup>S</sup> SVVP-171	Thr214 209-DICFR <sup>S</sup> LKLAT-219	Thr285 280-QYRAL <sup>S</sup> VP <sup>S</sup> ELT-290	Thr372 367-FIGN <sup>S</sup> SAIQEL-377
Thr386 381-ISEQF <sup>S</sup> AMFRR-391	Ser413 408-FTEAE <sup>S</sup> NMNDLVSEYQQY-425	Ser420	Ser444 439-DDEE <sup>S</sup> SEAQGP-450

**$\gamma$ -тубулін (TBG1\_HUMAN)**

Ser131 126-ADGSD <sup>S</sup> LEGFV-136	Tyr444 438-ATRPD <sup>S</sup> ISWGTQE-451
--	--

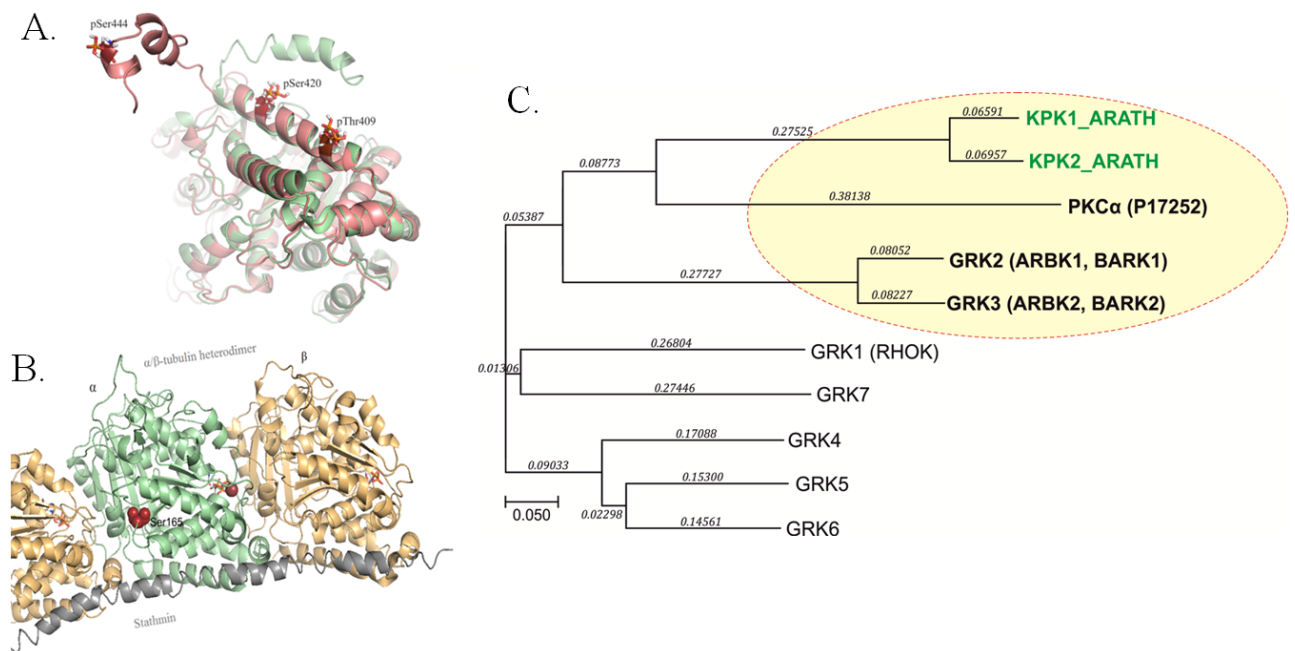
**Рис. 3.** Топологія (А) і амінокислотне оточення (Б) експериментально-доведених сайтів фосфорилювання  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, що виявляють консервативність у *H. sapiens*, *S. cerevisiae* і *A. thaliana*.

*Примітка:* Ліворуч – зовнішня поверхня мікротрубочки. Праворуч – внутрішня поверхня мікротрубочки. Для демонстраційної моделі було використано ізоформи  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну людини, у яких присутні відомі сайти фосфорилювання амінокислотних залишків серину, треоніну і тирозину. Нежирним шрифтом позначено сайти фосфорилювання, існування яких було показано на підставі гомології.

## ВКЛАД ПРОТЕЇНКІНАЗ AGC В ТУБУЛІНОВИЙ КОД ВИЩИХ РОСЛИН

Аналіз літератури і баз даних визначила протеїнкінази групи AGC - GPRKs, MASTs і PKC $\alpha$ , як агентів тубулінового коду ссавців. Філогенетичні дистанції і показники подібності послідовностей визначили рослинні протеїнкінази IRE (IREN1 і GWL) і S6K (KPK1 і KPK2) як потенційних агентів тубулінового коду вищих рослин.

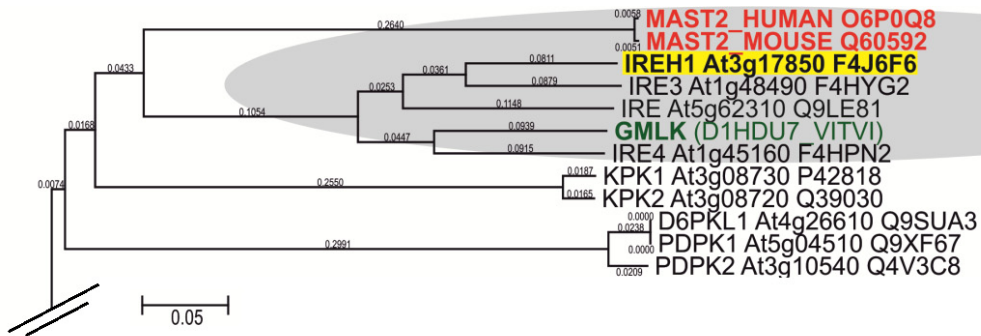
*Зв'язок рослинних протеїнкіназ S6K з регуляцією тубулінового коду.* KPK1 і KPK2 визначено як найближчі гомологи GPRK (GRK) і PKC $\alpha$ . Під час філогенетичної кластеризації тваринні MAST і рослині IRE, а також тваринні GPRK, PKC $\alpha$  і рослині S6 (KPK1 і KPK2) утворюють спільні клади. Порівняння 3D-моделей рослинних S6K і структур GPRK і PKC $\alpha$  з Protein Data Bank підтвердило їх подібність. Підтверджена ідентичність сайтів GRK-специфічного фосфорилювання Thr409 і Ser420  $\beta_{III}$ -тубуліну *H. sapiens* і  $\beta$ -тубуліну (TBB3\_ARATH) *A. thaliana* (Рис. 4.А). Третій сайт - Ser444  $\beta$ -тубуліну у *A. thaliana* має заміну на тирозин (Рис. 4.А). Також була підтверджена ідентичність PKC $\alpha$ -специфічного сайту Ser165  $\alpha$ -тубуліну і у *H. sapiens*, і у *A. thaliana*, що вказує на роль S6K-залежного фосфорилювання у регуляції рухливості мікротрубочок рослин (Рис. 4.В).



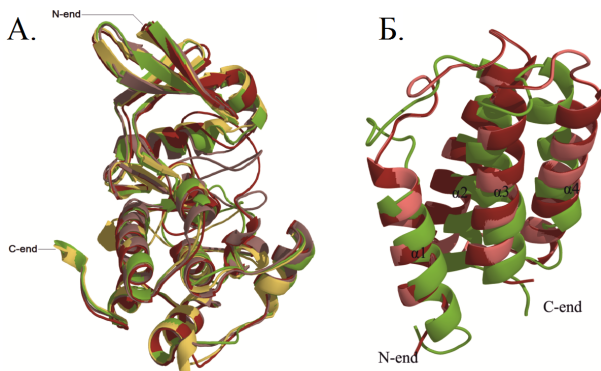
**Рис. 4.** Консервативність AGC-залежного фосфорилювання тубуліну *H. sapiens* і *A. thaliana*: **А)** Структурне вирівнювання  $\beta_{III}$ -тубуліну *H. sapiens* (рожевий колір) і TBB3\_ARATH з *A. thaliana* (зелений колір), підтверджує ідентичність топології Thr409 і Ser420; **В)** Топологія Ser165  $\alpha$ -тубуліну на прикладі фрагменту протофіламенту *A. thaliana*; **С)** Спільна кластеризація повних послідовностей рослинних S6K-кіназ (KPK1 і KPK2) з *A. thaliana* і тваринних протеїнкіназ родин GPRK і PKC з *H. sapiens*.

Отримані дані вказують на нову, раніше не описану функцію рослинних AGC-кіназ підродини S6K (KPK1 і KPK2), як агентів тубулінового коду.

Протеїнкінази IRE як регулятори тубулінового коду вищих рослин. Біоінформатичний пошук, подібність доменних архітектури, філогенетична кластеризація (Рис. 5) і структурне порівняння (Рис. 6) визначили рослинні протеїнкінази IRE (Incomplete root hair elongation) як найближчих рослинних гомологів тваринних протеїнкіназ MAST (Microtubule-associated serine/threonine-protein kinases).



**Рис. 5.** Результат спільної кластеризації каталітичних доменів повного кіному *A. thaliana*, тваринних протеїнкіназ MAST2 (MAST2\_HUMAN, Q6P0Q8; MAST2\_MOUSE, Q60592) і гомолога з *Vitis vinifera* (GMLK, VIT\_17s0000g02000, F6GSP4\_VITVI). Фрагмент кладограми.



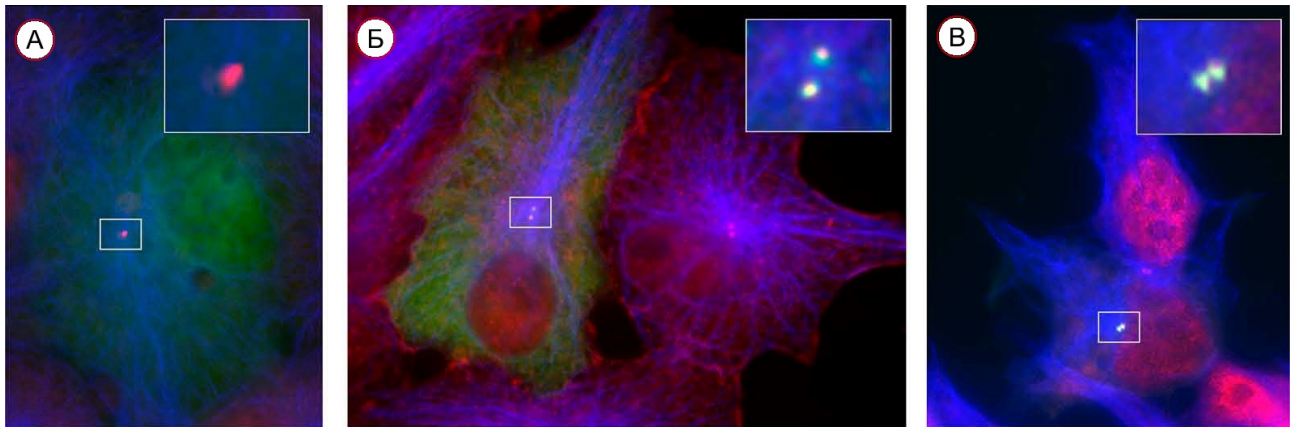
**Рис. 6.** Порівняння 3D-структур:

**А.** Каталітичних доменів протеїнкіназ MAST2 людини і миші (червоний), GMLK з винограду (жовтий) і IREH1 з арабідопсису (зелений);

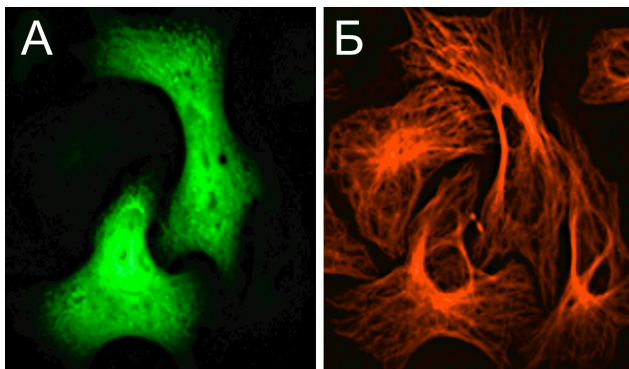
**Б.** Доменів MA\_Ser / Thr\_Kinase\_dom взаємодії з мікротрубочками протеїнкіназ MAST1 (червоний), MAST2 (рожевий) людини і IREH1 (зелений) арабідопсису.

Внутрішньоклітинна локалізація IREH1 *A. thaliana* в клітинах 'Vero' і HEK293. Було клоновано рекомбінантні GFP-конструкції протеїнкінази IREH1 з *A. thaliana*: повнорозмірний GFP-конструкт *pEGFP-IREH1* і вкорочений мутантний GFP-конструкт *pEGFP-IREH1-tr*. За рахунок інтеграції у ORF передчасного стоп-кодону (TAA), *pEGFP-IREH1-tr* бракувало ділянки, що кодує каталітичний домен (2319-2356 bp). Було досліджено локалізацію продуктів GFP-конструктів IREH1 в клітинах 'Vero' і HEK293: *pEGFP-C3* (Рис. 7.А, контроль - GFP-фрагмент), *pEGFP-IREH1* (Рис. 7.Б, GFP-конструкт повнорозмірної IREH1) і *pEGFP-cIREH1-tr* (Рис. 7.В, GFP-конструкт N-кінцевої частини IREH1 без каталітичного домену). Доведено, що центросомальна локалізація рослинної IREH1 залежить від N-кінцевого домену. Це пояснює результати іншого експерименту, а саме, нездатність до центросомальної локалізації каталітичного фрагменту IREH1-гомолога (GMLK) з *Vitis vinifera* - (*pEGFP-MAST2HP*). Останній дифузно розташовувався у цитоплазмі (Рис. 8.А), проте повторював загальні контури системи мікротрубочок (Рис. 8.Б). Слід зазначити, експресія рослинних конструктів не змінювала морфологію тваринних клітин або розташування інтерфазних мікротрубочок.





**Рис. 7.** Центросомальна локалізація pEGFP-C3 (А), pEGFP-IREN1 (Б) і pEGFP-cIREN1-tr (В) в тваринних клітинах 'Vero' і HEK293, визначена експресією конструктів IREN1 з *A. thaliana*. Поєднання флуоресценції GFP-конструктів (зелений канал), імунологічно визначеного  $\gamma$ -тубуліну центросом (червоний колір) і імунологічно визначеного  $\alpha$ -тубуліну (синя флуоресценція). Ділянки, відмічені контуром, відповідають збільшеним зображенням в виносках. Масштаб 10 мкМ.



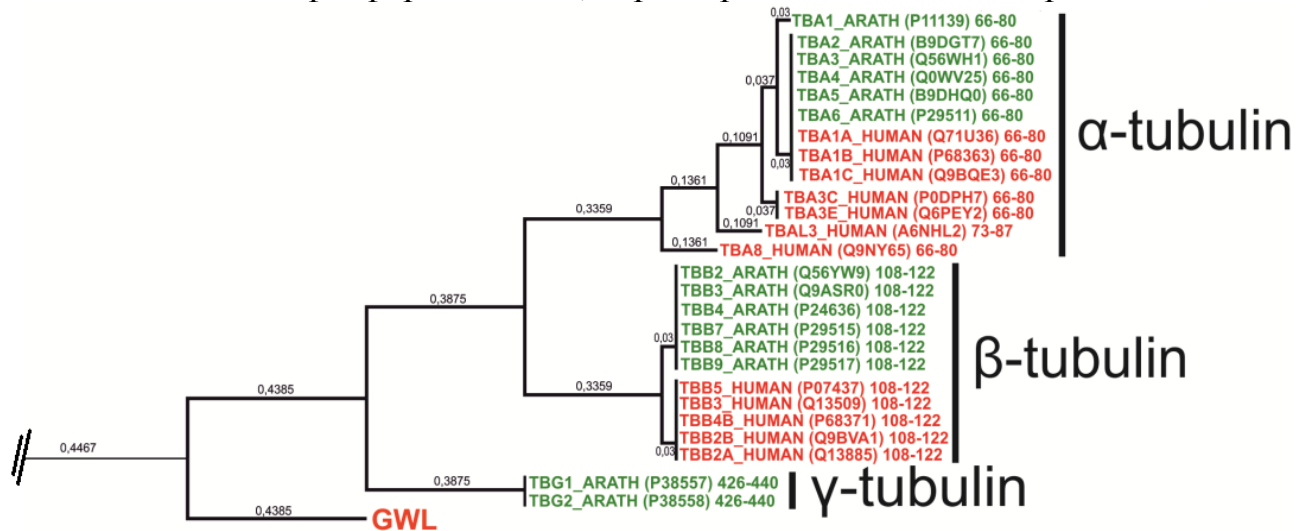
**Рис.8.** Флуоресценція GFP-продукту pEGFP-MAST2HP (А), створеного на основі каталітичного фрагменту протеїнкінази GMLK *Vitis vinifera* і мікротрубочок *Chlorocebus pygerythrus* (Б) у флуоресцентному каналі родаміну (Rhodamine B).

На знімках дочірні клітини 'Vero' після мітозу.

*Визначення сайтів MAST / IREN1-специфічного фосфорювання ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну.* Аналіз експериментальних сайтів MAST-специфічного фосфорювання: 31 для GWL (MASTL), 33 для MAST1 і 12 для MAST2, дозволив скласти узагальнений пошуковий патерн PROSITE: {CHNRWY}-{NWY}-{CHQWY}-{CWY}-{CFHV}-{CGMWY}-{MQRWY}-{ST}-{CIMWY}-{CFMQWY}-[DEGHKNSTY]-{MPW}-{NPTW}-{CMY}-{FMNRWY}. Наступне визначення відповідних сайтів у ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну виконувалось на підставі профільного пошуку і результатів спільної UPGMA-кластеризації прогнозованих і експериментально-підтверджених сайтів (вирівнювання фрагментів «S/T $\pm$ 7 а.к.», заборона інсерції гепів, застосування бутстрепінгу). Топологія сайтів виконувалась на 3D-моделях протофіламентів мікротрубочок *H. sapiens* і *A. thaliana*. Підтверджено, що Thr73 (80)  $\alpha$ -тубуліну і Ser115  $\beta$ -тубуліну є можливими мішенями рослинних IREN1 і тваринних MAST (Рис. 9). Раніше, фосфорювання цих сайтів *in vitro* було підтверджено маспектрометрією, проте їх зв'язок з MAST/IREN1-специфічним фосфорюванням продемонстровано вперше. Максимальна подібність експериментальних і теоретичних сайтів спостерігалась у Ser433  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana*. Зовнішня топологія свідчить, що фосфорювання Ser433 не



впливає на внутрішні контакти  $\gamma$ TuSC, що зумовлює відсутність впливу на структуру комплексу. Відсутність цього сайту у ссавців пояснює, чому, незважаючи на центросомальну локалізацію GFP-конструктів рослинної IREN1 в клітинах 'Vero', не спостерігали її взаємодії з тваринним  $\gamma$ -тубуліном за результатами імуноблотінгу. Консервативність Ser433 була підтверджена для інших представників *Viridiplantae*. Таким чином, ми маємо справу з механізмом IREN1-залежного фосфорилування, характерним виключно для рослин.



**Рис. 9.** Клада, що об'єднала контрольну послідовність сайту GWL-специфічного фосфорилування і сайти MAST/IREN1-специфічного фосфорилування тубуліну *H. sapiens* і *A. thaliana*, визначених за результатами біоінформатичного пошуку: Thr73 (80)  $\alpha$ -тубуліну, Ser115  $\beta$ -тубуліну і Ser433  $\gamma$ -тубуліну (повне древо наведено в дисертації).

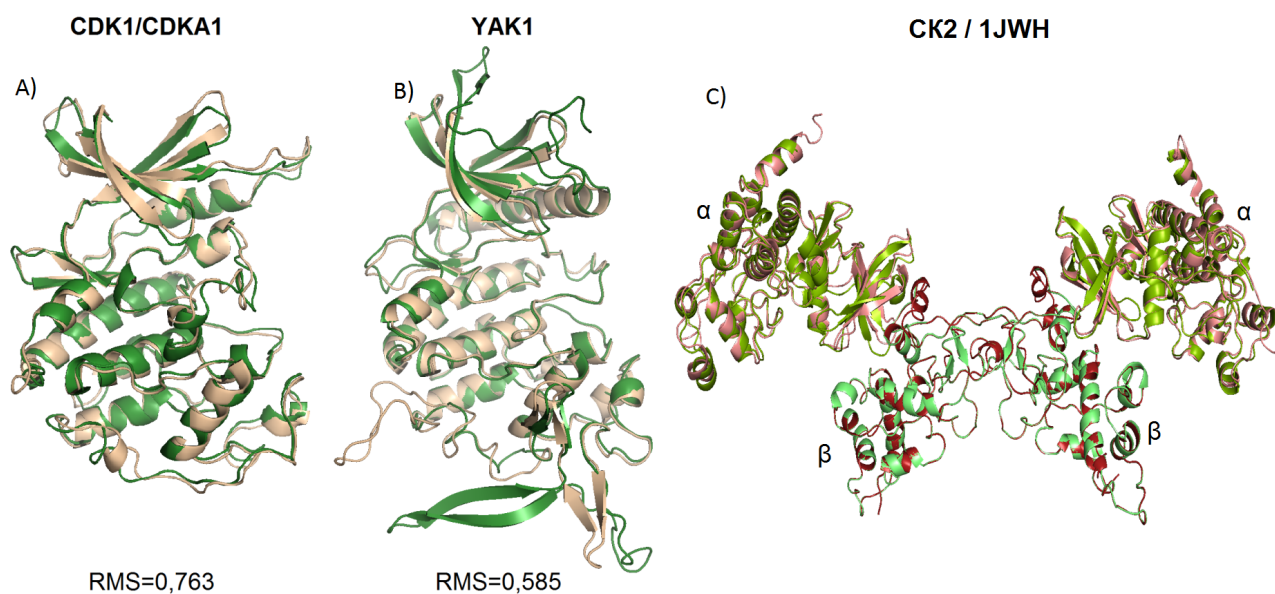
## ВНЕСОК СМГС-ПОДІБНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ В ТУБУЛІНОВИЙ КОД ВИЩИХ РОСЛИН

Підтверджено, що у випадку родини СМГС, ми маємо справу з еволюційно-архаїчною групою протеїнкіназ, які зберегли структурну і функціональну консервативність у представників різних царств.

В межах дослідження було доведено існування у вищих рослин гомологів тваринної циклін-залежної протеїнкінази 1 і YAK1-подібної протеїнкінази подвійної специфічності. Отримані нами результати дозволили визначити рослинні протеїнкінази CDKA1 (AT3G48750) і AtYAK1 (AT5G35980) як найближчих гомологів циклін-залежної кінзи 1 (CDK1) і YAK1-подібної протеїнкінази подвійної специфічності (Dyrk1A / MNB / Yak1), які у *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* здатні до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну.

Подібність просторових структур каталітичних доменів (Рис. 10.А і В), петель активації (P+1) і зв'язування з субстратом ( $helix_G$ ), механізму активації, амінокислотного складу АТФ-зв'язуючого карману і результати моделювання взаємодії з канонічними АТФ-конкурентними інгібіторами (ЕНВ, d15 і IRB) YAK1-подібних протеїнкіназ, визначили рослинну протеїнкіназу YAK1 як

функціональний еквівалент протеїнкіназ Dyrk1A з *H. sapiens*, YAK1 з *S. cerevisiae* і MNB з *D. melanogaster*.

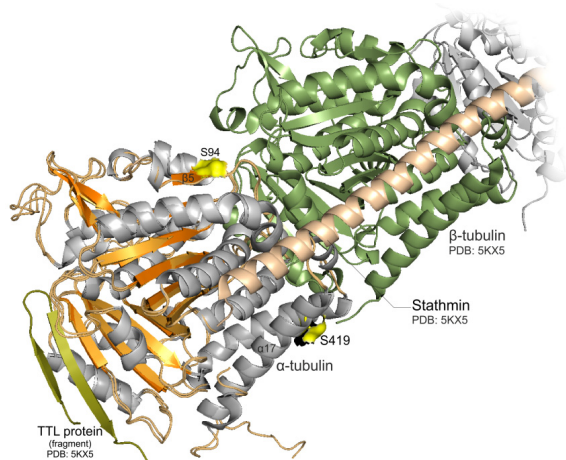


**Рис. 10.** Структурне порівняння каталітичних доменів циклін-залежних протеїнкіназ 1 (A) і YAK1-подібних протеїнкіназ дуальної специфічності (B) з *A. thaliana* (відображено зеленим кольором) і *S. cerevisiae* (відображено бежевим кольором). Структурне вирівнювання моделі комплексу CK2 ( $\alpha\beta$ ) і експериментальної структури (PDB: 1JWH, x-Ray) CK2 *H. sapiens* (C).

Консервативність зазначених протеїнкіназ безпосередньо пов'язана з регуляцією інтеграції гетеродимерів  $\alpha\beta$ -тубуліну до структури мікротрубочки через фосфорилування Ser172  $\beta$ -тубуліну (Рис. 12). Отримані дані підтверджують, що перехід гетеродимеру в фосфорильований стан -  $\alpha$ -тубулін /  $\beta$ -тубулін (pSer172) змінює електростатичні показники контактної поверхні гетеродимеру, що зумовлює його відокремлення від мікротрубочки (Karpov & Blume, 2019). Слід зазначити, що цей сайт проявляє суперконсервативність, а CDKA1 і YAK1 здійснюють безпосереднє фосфорилування тубуліну виключно за Ser172  $\beta$ -тубуліну. Цей молекулярний механізм є спільним для рослин, тварин, дріжджів і дрозофіли (Karpov & Blume, 2019). Отримані результати дозволяють стверджувати, що фосфорилування Ser172 рослинного  $\beta$ -тубуліну викликає пригнічення інтеграції гетеродимеру  $\alpha\beta$ -тубуліну в структуру протофіламенту мікротрубочки. Таким чином, CDK1- і YAK1-залежне фосфорилування є фактором негативної регуляції динамічної нестабільності мікротрубочок. Подібність сайту фосфорилування Ser172 і пов'язаних з ним CDK1 і YAK1-подібних протеїнкіназ доводить існування зазначеного механізму регуляції динамічної нестабільності мікротрубочок у *A. thaliana* та доводить роль протеїнкіназ CDK1 (AT3G48750) і YAK1 (AT5G35980) як агентів тубулінового коду.

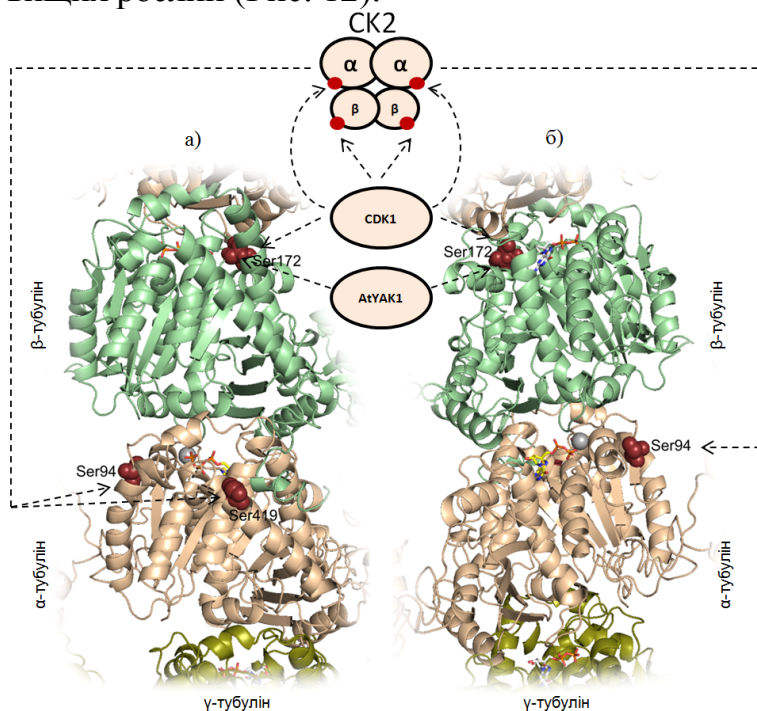
Визначена можливість CK2-залежного фосфорилування Ser94 і Ser419 рослинного  $\alpha$ -тубуліну (Karpov & Blume, 2019). Топологія і молекулярна динаміка підтверджують, що фосфорилування Ser94 впливає на цілісність

димеру  $\alpha\beta$ -тубуліну (Рис. 11). У свою чергу, фосфорилування Ser419, найімовірніше, регулює інтерфейси взаємодії рослинної мікротрубочки з моторними білками родини кінезинів (Karpov & Blume, 2019; Demchuk et al., 2019).



**Рис. 11.** Топологія сайтів СК2-залежного фосфорилування Ser94 і Ser419  $\alpha$ -тубуліна *T. equiperdum* і *A. thaliana* за результатами структурного вирівнювання з комплексом 5KX5 (PDB):  $\alpha$ -тубулін – моделі  $\alpha$ -тубуліну *T. equiperdum* і *A. thaliana* (результат структурного накладання на структуру ланцюга  $\alpha$ -тубуліну комплексу 5KX5),  $\beta$ -тубулін –  $\beta$ -тубулін *Ovis aries*, Statmin – статмін-4 *Rattus norvegicus*, TTL protein – фрагмент тубулін тирозин лігази (TTL) *Gallus gallus*.

Враховуючи, що комплекс CDK1+Cyclin В регулює цілісність СК2 через фосфорилування її каталітичних ( $\alpha$ ) і регуляторних ( $\beta$ ) субодиниць (Yde et al., 2008; Fourest-Lieuvin et al., 2006), актуальне дослідження дозволяє запропонувати узагальнену схему SMGC-залежної регуляції мікротрубочок вищих рослин (Рис. 12).



**Рис.12.** Узагальнена схема участі рослинних SMGC-кіназ CDK1 і YAK1 та філогенетично близької протеїнкінази СК2 в регуляції рослинних мікротрубочок через безпосереднє фосфорилування молекул  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліну *A. thaliana*.

**а)** зовнішня проекція фрагменту мікротрубочки;

**б)** внутрішня проекція фрагменту мікротрубочки.

За результатами дослідження зроблено висновок, що безпосередній внесок в тубуліновий код вищих рослин здійснюють три протеїнкінази CDK1 (CDK), Yak1 (MNB / DYRK) та близька до групи SMGC протеїнкіназа СК2 (Karpov et al., 2008; 2009; Блюм и др., 2009; Karpov et al., 2010; Karpov et al., 2010a; 2010b; Karpov et al., 2011; Raevsky et al., 2011; Кораблев и др. 2011; Karpov et al., 2014; Karpov & Blume, 2018; 2019; Demchuk et al., 2019).

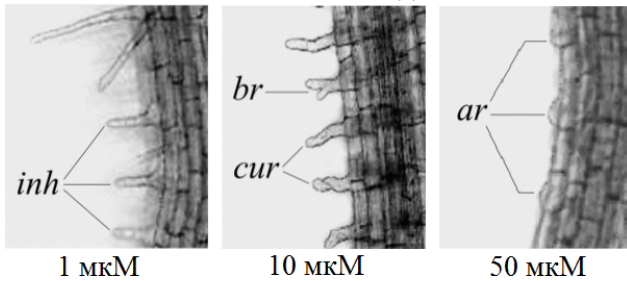


## ВНЕСОК СК1-СПЕЦИФІЧНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ В ТУБУЛІНОВИЙ КОД ВИЩИХ РОСЛИН

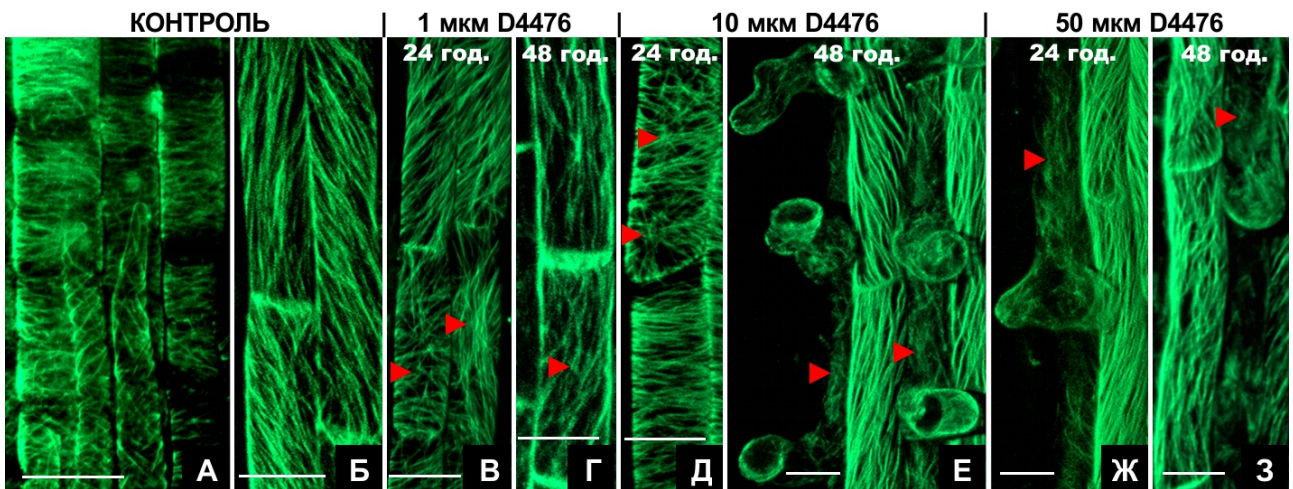
Ben-Nissan et al. (2008) було показано, що рослинна протеїнкіназа SKL6 фосфорилує  $\beta$ -тубулін, що викликає перебудови мікротрубочок в клітинах *A. thaliana*.

Застосування СК1-специфічного інгібітора D4476 засвідчило значні дозозалежні морфологічні і ростові відповіді первинного коріння *A. thaliana*. Найбільш чутливою маркерною системою були трихобласти (кореневі волоски) (Рис. 13). Застосування D4476 на лінії *A. thaliana*, що експресує флуоресцентний маркер мікротрубочок GFP-МАР4, підтвердило зв'язок СК1-специфічного інгібування, перебудов тубулінового цитоскелету і морфологічних реакцій первинного коріння (Рис. 13 і 14). Проте механізми впливу на систему мікротрубочок і роль окремих представників родини залишалися невивченими.

D4476 / 24 год.

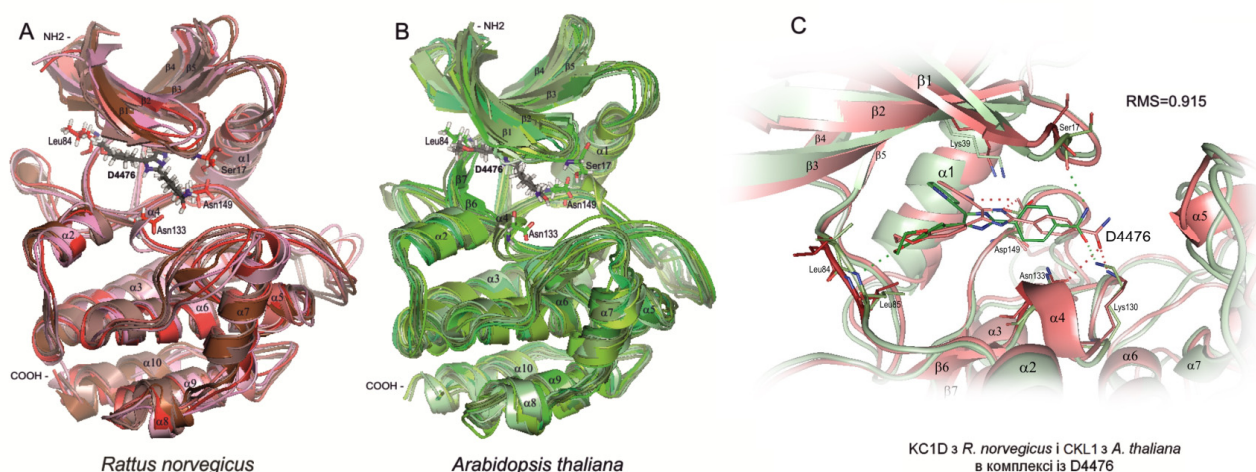


**Рис. 13.** Дозозалежна відповідь трихобластів первинних коренів *A. thaliana* на 24-годинну обробку СК1-специфічним інгібітором D4476: *inh* – пригнічення, *cur* – закручування, *br* – галуження, *ar* – зупинка росту («арешт») корневих волосків.



**Рис. 14.** Організація кортикальних мікротрубочок в клітинах первинних коренів контрольних (А, Б) і оброблених D4476 (В-З) проростків *A. thaliana* (лінія, що експресує флуоресцентний химерний конструкт GFP-МАР4): зона розтягнення (А); зона диференціації (Б); зона диференціації корневих волосків – незначна дезорганізація мікротрубочок в окремих клітинах (В); зона розтягування – зміна орієнтації мікротрубочок з поперечно-похилого типу на подовжній (Г); зона диференціації – дезорієнтація мікротрубочок (Д); зона диференціації – хаотична і подовжня орієнтація мікротрубочок в окремих клітинах (Е); зона диференціації – дезорієнтація мікротрубочок в трихобластах (Ж); зона диференціації – дезорієнтація мікротрубочок в трихобластах і в клітинах зони елонгації (З). Масштаб = 20 мкм.

Від початку D4476 було визначено як специфічний інгібітор тваринних протеїнкіназ СК1. Реконструкція просторових структур, їх порівняння, дані молекулярного докінгу, молекулярної динаміки, і хомогеномної кластеризації сайтів зв'язування D4476 СК1-подібних протеїнкіназ з *R. norvegicus* і *A. thaliana* визначили коло протеїнкіназ цільового інгібування (Рис.15. А, В). З 18 СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* лише 13 (СКЛ1 (СК1 $\delta$ ), СКЛ2, СКЛ3, СКЛ4, СКЛ5, СКЛ6, СКЛ7, СКЛ8, СКЛ9, СКЛ10, СКЛ11, СКЛ12 і СКЛ13) здатні взаємодіяти з D4476 (Рис.15. В, С).



**Рис. 15.** Результати структурного вирівнювання координат С $\alpha$ -атомів СК1-подібних протеїнкіназ *R. Norvegicus*. А: КС1А, КС1АЛ, КС1Д, КС1Е, КС1Г1, КС1Г2 і КС1Г3) і *A. thaliana* В: СКЛ1 (СК1 $\delta$ ), СКЛ1, СКЛ2, СКЛ3, СКЛ4, СКЛ5, СКЛ6, СКЛ7, СКЛ8, СКЛ9b, СКЛ10, СКЛ12, СКЛ13).

С. Порівняння результатів докінгу D4476 в цільовому сайті тваринної КС1Д і рослинної СКЛ1. На малюнку позначено амінокислоти, які утворюють стабільні водневі зв'язки з лігандом під час молекулярної динаміки.

Було встановлено, що дія D4476 на структуру і динаміку мікротрубочок зумовлена інгібуванням лише трьох ізотипів СКЛ1 (At4g26100) і СКЛ2 (At1g72710), які мають SxIP мотиви (СКЛ1: 367-SmIP-370, і СКЛ2: 340-SgIP-343, 421-SkIP-424, 315-SalP-318 (I  $\rightarrow$  L317)) взаємодії з МТ-асоційованим білком EB1 і СКЛ6, для якої доведена наявність унікального тубулін-зв'язуючого С-кінцевого домену. Таким чином, з 18-ти СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* лише СКЛ6 (AT4G28540) можна вважати агентом тубулінового коду, що обґрунтовано здатністю зв'язуватися з мікротрубочкою і фосфорилувати  $\beta$ -тубулін за залишками Ser413 и Ser420. Було спростовано існування цього мотиву у будь-якого іншого ізотипу СК1 з *Mammalia* або *Fungi*. Утім, гомологічні ділянки були знайдені у СК1-подібних протеїнкіназ інших видів рослин. Таким чином, зазначений домен притаманний виключно рослинним гомологам СКЛ6 *A. thaliana*. Аргументом, що підтверджує здатність вищезгаданого домену СКЛ6 взаємодіяти з тубуліном мікротрубочок, є наявність ділянок гомологічних мотиву 383-VSEKGRNTSRYG-394 С-кінцевого домену EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) - МТ-асоційованого білку ссавців (Рис. 16.).

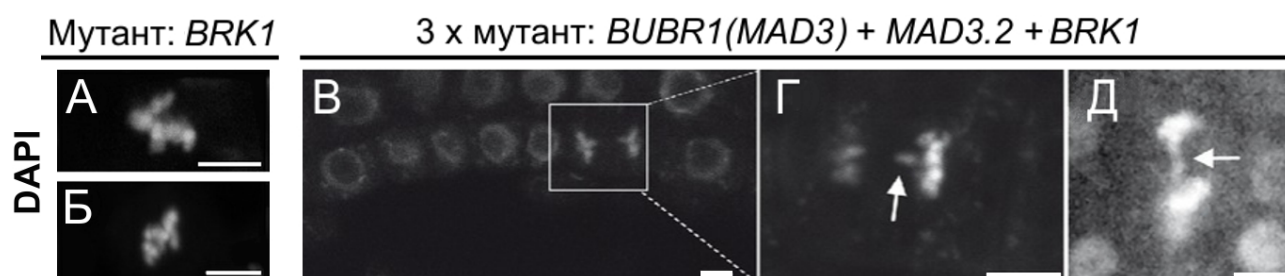
351-	VSEKGRNTSRYG	-394	-	CKL6	<i>A. thaliana</i>	
646-	VSENGRKYSRYG	-657	-	B5MCW9	HUMAN	(EML4)
491-	VSENGRKYSRYG	-502	-	F2Z2U0	HUMAN	(EML4)
715-	VSENGRKYSRYG	-726	-	B5MBZ0	HUMAN	(EML4)
704-	VSENGRKYSRYG	-715	-	A6P4V4	HUMAN	(EML4)
596-	VSENGRKYSRYG	-607	-	F1M356	RAT	(EML4)
708-	VSENGRKYSRYG	-719	-	F1LZC1	RAT	(EML4)
639-	VSENGRKYSRYG	-650	-	F1LTB2	RAT	(EML4)
649-	VSENGRKYSRYG	-660	-	F1LT71	RAT	(EML4)
	***:***:****					

**Рис.16.** Порівняння консервативного мотиву тубулін-зв'язуючого домену протеїнкінази CKL6 *A. thaliana* і гомологічних ділянок EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) ссавців.

Таким чином, лише CKL6 впливає на мікротрубочки безпосередньо через фосфорилування Ser413 і Ser420  $\beta$ -тубуліну, а вплив CKL1 і CKL2 можна вважати опосередкованим через фосфорилування структурних БМ (Karpov et al., 2019; 2020).

## РОСЛИННА ПРОТЕЇНКІНАЗА BUB1 І ЇЇ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦІЇ РОСЛИННОГО ЦИТОСКЕЛЕТУ І ТУБУЛІНОВОГО КОДУ

У ссавців і дріжджів протеїнкіназа BUB1 (підродина BUB1 = Budding Uninhibited by Benzimidazol 1) є основою комплексу SAC (spindle-assembly checkpoint), що відповідає за коректне формування мітотичного веретена. В межах дисертаційного дослідження було встановлено існування рослинних гомологів BUB1 (=BRK1, At2g20635) (Karpov et al., 2010) і отримано докази їх участі в формуванні комплексу SAC. Із використанням мутантних рослин була доведена необхідність функціональної BUB1 (BRK1) для коректного формування мітотичного веретена *A. thaliana* (Paganelli et al., 2015) (Рис. 17).



**Рис. 17.** Порушення мітозу в клітинах первинних коренів мутантних рослин *A. thaliana*. **А, Б** – мутація за геном *BUB1* (=BRK1, At2g20635). **В-Д** – потрійний мутант компонентів комплексу SAC (spindle assembly checkpoint): *BUBR1* + *MAD3.2* + *BRK1* (*BUB1* Related Kinase 1 = *BUB1*). Забарвлення DAPI (4',6-діамідин-2'-феніліндол-дигідрохлорид). Bar=5 мкм.

Іноді, BUB1 визначається як протеїнкіназа, наближена до родини СК1. Утім, кластеризація повного кіному *A. thaliana* визначила BUB1 як окрему протеїнкіназу, більш філогенетично наближену до протеїнкіназ HASP (HASPIN-Related) і ABIL (ABI-1-like) (Рис. 1).

Для з'ясування внеску BUB1 в тубуліновий код було виконано профільний пошук сайтів специфічного фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana* і *H. sapiens*. Оскільки пошукові профілі сайтів BUB1 в репозиторіях спеціалізованих програм і web-сервісів були відсутні, узагальнений мотив було складено *de novo* на підставі експериментально-підтверджених сайтів (всього 21) з PhosphoSitePlus, UniProtKB і проаналізованої літератури. Сканування



ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana* і *H. sapiens* визначило один потенційний сайт фосфорилування  $\beta$ -тубуліну (Ser188/189). Проте, відсутність даних маспектрометрії в PhosphoSitePlus і певні структурні перепони свідчать про низьку імовірність посттрансляційної модифікації зазначеної амінокислоти. Таким чином, BUB1/BRK1-специфічне фосфорилування тубуліну малоїмовірне і визначені ефекти вважаємо опосередкованими.

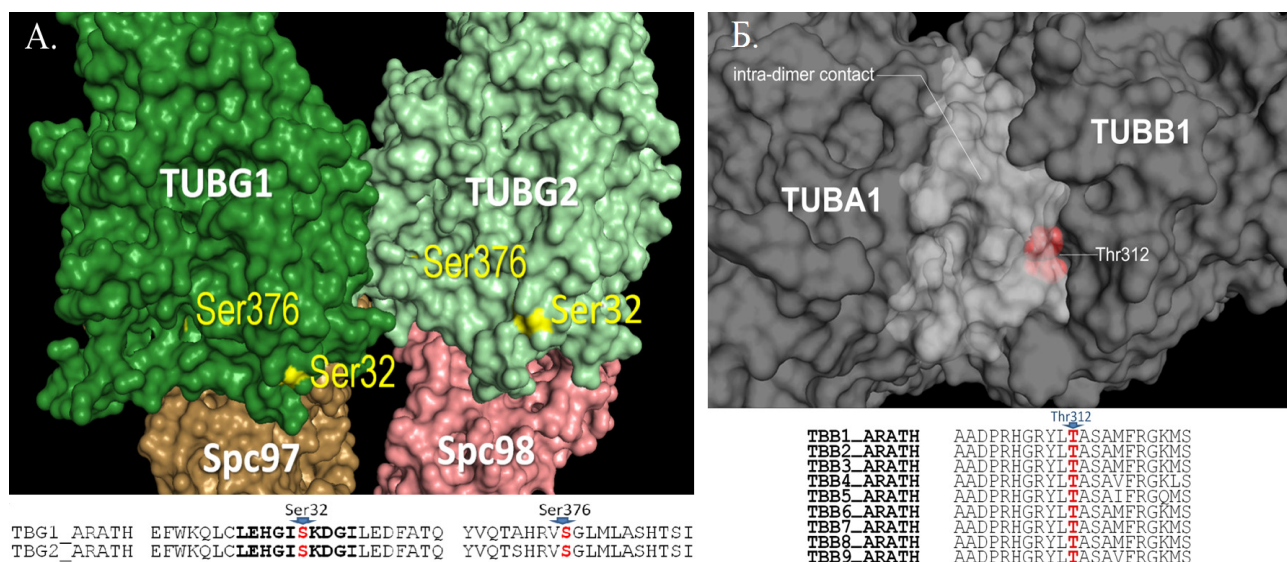
## ДОСЛІДЖЕННЯ ВНЕСКУ ПРЕДСТАВНИКІВ СУПЕР-РОДИНИ ПРОТЕЇНКІНАЗ CDPK-SNRK В ТУБУЛІНОВИЙ КОД ВИЩИХ РОСЛИН

Рослинні  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні (CDPK) і SNF-споріднені (SnRK) протеїнкінази утворюють суперродину CDPK-SnRK (7 типів) протеїнкіназ, що грають ключову роль у регуляції росту, онтогенезу, адаптації та відповіді на стрес (Swulius and Waxham, 2008; Kudla et al., 2010, Karpov et al., 2019). Дані про участь CDPK-SnRK в регуляції тваринного цитоскелету існують досить давно, проте свідчення можливості безпосереднього фосфорилування тубуліну з'явилися нещодавно (Easley et al., 2006; Nemoto et al., 2015). У випадку рослин аналогічні дані були відсутні.

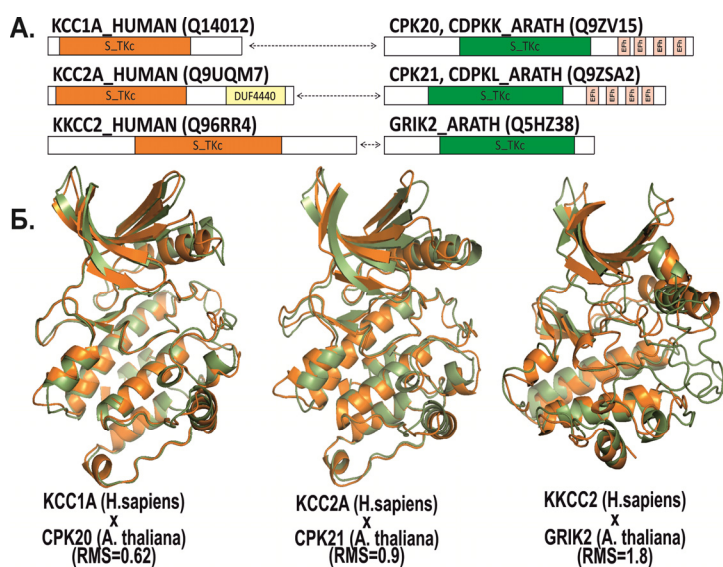
*Роль рослинних CDPK.* Більшість доказів регуляції цитоскелету існує для тваринних  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-залежних протеїнкіназ 2 (CaMK2). Враховуючи гомологію каталітичних доменів тваринних CaMK2 і рослинних  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеїнкіназ (CDPK), було виконано пошук сайтів фосфорилування рослинного  $\alpha/\beta/\gamma$ -тубуліну, що відповідали НММ-профілям специфічних сайтів тваринних CaMK2. Топологічно доступні для модифікації сайти було знайдено для ізотипів  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana*: Ser32, Ser259, Ser321 і Ser376 у випадку  $\gamma$ -тубуліну (TBG1 і TBG2) і Thr312 у випадку  $\beta$ -тубуліну (TBV1-TBV9) (Рис. 18 А і Б). Топологія Thr312  $\beta$ -тубуліну підтверджує участь зазначеної амінокислоти в формуванні інтрадимерного контакту гетеродимеру  $\alpha/\beta$ -тубуліну, а сайти CaMK2-залежного фосфорилування  $\gamma$ -тубуліну причетні до регуляції міжмолекулярної взаємодії комплексу  $\gamma$ TuSC. Відомо, що у  $\beta$ -тубуліну тварин Thr312 входить до сайту зв'язування колхіцину, а його фосфорилування доведено експериментально (Sahakyun et al., 2019).

Вважається, що ключові події еволюції  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеїнкіназ відносять нас до первинних подій еволюції еукаріотів. Незважаючи на відмінності доменної архітектури, каталітичні домени CDPK з різних царств зберегли значну консервативність, що, враховуючи консервативність молекул тубуліну, передбачало консервативність цільових сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування (Karpov et al., 2019).

За результатами аналізу 494 сайтів тваринних  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеїнкіназ (PhosphoSitePlus) було складено пошукові мотиви, що визначили сайти  $\text{Ca}^{2+}$ -специфічного фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубуліну у *A. thaliana*. Аналіз відібраних сайтів, подібність послідовностей і просторової організації каталітичних доменів протеїнкіназ тваринного і рослинного походження дозволили визначити рослинні кальцій-залежні протеїнкінази СРК20 (At2g38910), СРК21 (AT4G04720) і GRIK2 (At5g60550) як агентів тубулінового коду *A. thaliana* (Рис. 19).



**Рис.18.** Топологія сайтів на поверхні молекул тубуліну *A. thaliana*, що відповідають НММ-профілям  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-залежного фосфорилування: **А.** Ser32 і Ser376  $\gamma$ -тубуліну; **Б.** Thr312  $\beta$ -тубуліну (світла ділянка позначає інтрадимерний інтерфейс). Ідентичність послідовностей підтверджує консервативність сайтів всіх ізотипів  $\gamma$ - і  $\beta$ -тубуліну.



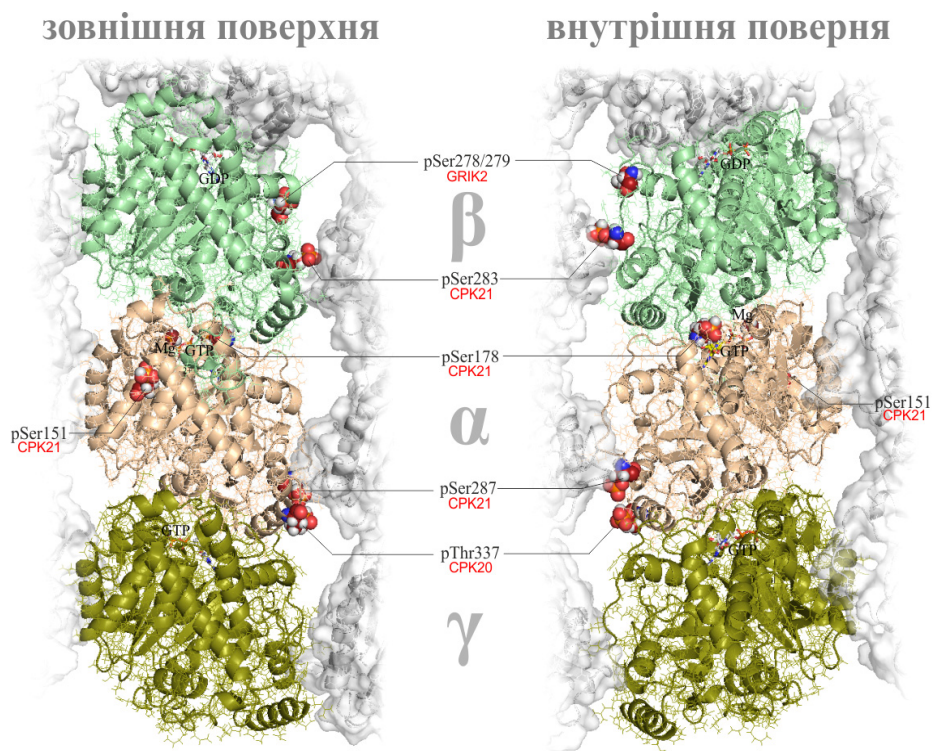
**Рис.19.** Порівняння доменної архітектури (**А.**) і структур каталітичних доменів (**Б.**) гомологічних протеїнкіназ.

S\_TKc – каталітичний S\_TKc домен, DUF4440 – невідомий домен (Pfam: PF14534), EFh – тандеми EFh повторів (InterPro: IPR035799). Помаранчевим кольором позначено каталітичні домени протеїнкіназ людини, зеленим – каталітичні домени гомологів з *A. thaliana*.

Ключовими аргументами пошуку були: відповідність складеним мотивам сайтів, спільна кластеризація контрольної групи експериментально-підтверджених сайтів (494 сайти з PhosphoSitePlus) і рослинних хітів; наявність експериментальних аргументів для відповідних залишків тваринних і дріжджових гомологів (маспектрометрія, мутації та ін.); аналіз структурної топології визначених сайтів. Зазначені аргументи дозволили визначити Thr337, Ser287, Ser178  $\alpha$ -тубуліну і Ser283  $\beta$ -тубуліну як сайти  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної регуляції латеральної взаємодії протофіламентів рослинної мікротрубочки, а протеїнкінази CPK20 (At2g38910) і CPK21 (AT4G04720) – як найбільш імовірних агентів зазначених модифікацій (Рис. 20). Водночас, Ser251  $\alpha$ -тубуліну було визначено як сайт CPK-залежного фосфорилування, що впливає на взаємодію з асоційованими білками, а Ser278/279  $\beta$ -тубуліну – як сайт



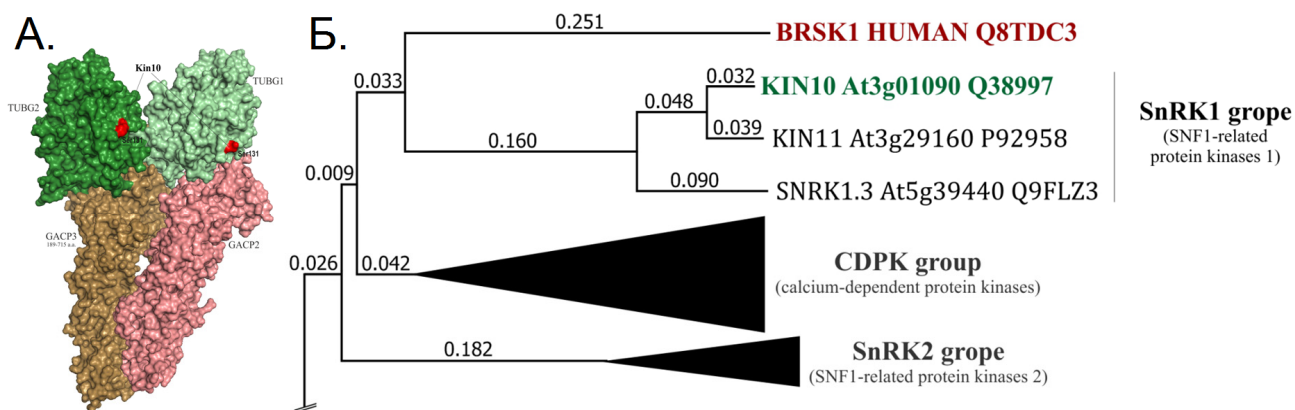
GRIK2-залежної регуляції зв'язування таксолу, що дозволяє висловити гіпотезу стосовно причетності цієї модифікації до процесу стабілізації рослинних мікротрубочок (Рис. 20).



**Рис. 20.** Внесок  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилювання в регуляцію тубулінового коду *A. thaliana*: сайти фосфорилювання та їх асоціація з відповідними протеїнкіназами (CPK20, CPK21 і GRIK2).

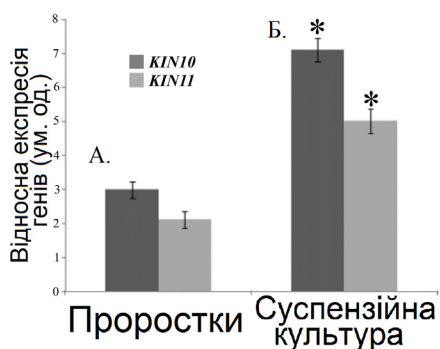
Виконане нами структурно-біологічне дослідження топології вже відомих сайтів CDPK/CRK-специфічного фосфорилювання залишків тирозину (pTyr444/443 і pTyr450/449) рослинного  $\beta$ -тубуліну (ізотипи ТВВ2, ТВВ3 і ТВВ7) підтвердило їх розташування на зовнішній поверхні мікротрубочок. С-кінцева локалізація та позаглобулярне розташування зазначених сайтів вказує на відсутність їх безпосереднього впливу на структуру мікротрубочок рослин. Найбільш імовірним функціональним призначенням цих модифікацій є формування унікальних інтерфейсів взаємодії з БАМ, що визначає протеїнкінази CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) як агентів тубулінового коду *A. thaliana*.

*Роль рослинних SnRK1.* Результати біоінформатичного пошуку і лабораторних (молекулярно-генетичний аналіз, флуоресцентна мікроскопія, моделі з різним рівнем мітотичної активності, рослини мутантних ліній) досліджень підтвердили причетність SNF1-залежного фосфорилювання до регуляції рослинного цитоскелету і визначили рослинні протеїнкінази SnRK1 (KIN10 і KIN11) як функціональних гомологів тваринних BRSK (1 і 2) (Рис. 21). Встановлено, що SNF1-залежне фосфорилювання Ser131  $\gamma$ -тубуліну рослин і ссавців має спільні риси і належить до ключових молекулярних механізмів регуляції структури комплексу  $\gamma$ TuSC та їх збирання в комплекс  $\gamma$ TuRC. Крім того, отримані дані свідчать про можливість впливу цієї модифікації на формування інтерфейсів TUBG1(2)-GACP(2)3 центрів первинної нуклеації мікротрубочок рослин.



**Рис. 21.** Топологія SnRK1-специфічного сайту фосфорилування рослинного  $\gamma$ -тубуліну (А) і спільна NJ-кластеризація (фрагмент) каталітичних доменів протеїнкінази BRSK1 *H. sapiens* і повного кіному *A. thaliana* – 1022 послідовності каталітичних доменів (Б).

За допомогою створених референтних генетичних конструкцій каталітичних субодиниць SnRK1 $\alpha$  (KIN10 і KIN11), експериментів із застосуванням нокаутних ліній *KIN10<sup>KO</sup>* і *KIN11<sup>KO</sup>* і рослин *A. thaliana* дикого генотипу «Col-0», модельних систем з різним рівнем мітотичної активності (інтактні рослини і суспензійна культура) було доведено, що дисфункція генів *KIN10* і *KIN11* призводить до зниження мітотичної активності рослинних клітин. Експресія *KIN10* і *KIN11* в клітинах суспензійної культури майже в 2,5 рази перевищувала аналогічні показники у інтактних проростків (Рис. 22), що свідчить про причетність SnRK1 до регуляції мітотичних процесів.



**Рис.22.** Експресія *KIN10* та *KIN11* *A. thaliana*, розрахована відносно конститутивної експресії гену актину (*AtActin*):

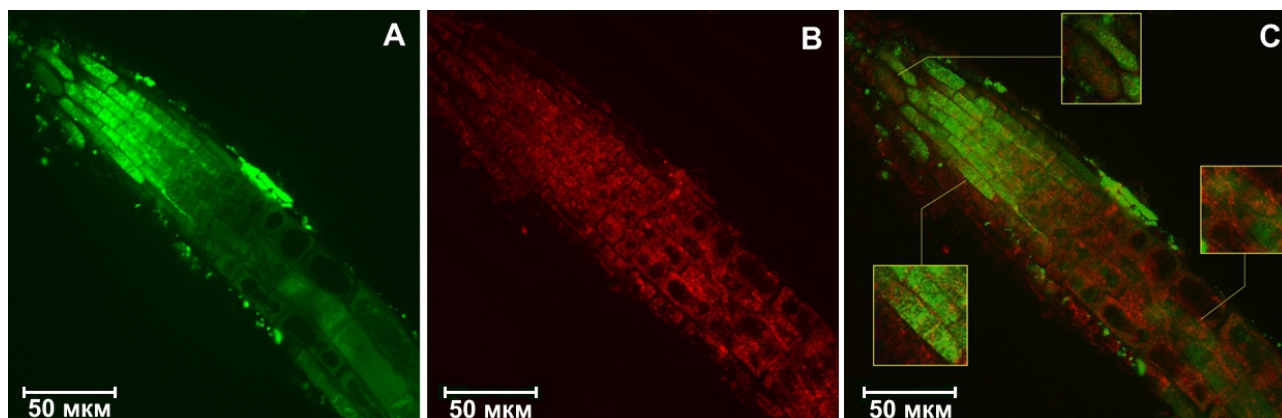
А. – у 7-денних проростків генотипу «Col-0»;  
Б. – у 7-денних клітин суспензійної культури (з моменту пасажу).

*Примітка:* усереднені дані надано у форматі  $M \pm m$ ;  $p \leq 0,05$ .

Більша мітотична активність клітин суспензійної культури була також підтверджена експресією маркерних генів *CYCB1-1* і *AtBRCA1*, що вказує на зв'язок протеїнкіназ SnRK1 $\alpha$  (KIN10 і KIN11) з регуляцією мітотичного апарату. Для *KIN10* (At3g01090.2) експресія була підтверджена в клітинах усіх досліджених тканин кореня, стебла, листка і квітки *A. thaliana*.

На наступному етапі були визначені відмінності у розподілі і інтенсивності флуоресценції  $\gamma$ -тубуліну меристематичних клітин коренів рослин дикого генотипу «Col-0» і нокаутних ліній SALK\_139618C (*KIN10<sup>KO</sup>*) та SALK\_127939C (*KIN11<sup>KO</sup>*). Виявили, що вплив *KIN10* і *KIN11* на мітотичну активність має синергічний ефект, а результати імунофлуоресцентної мікроскопії клітин кореня *A. thaliana* (Col-0) підтвердили колокалізацію флуоресценції  $\gamma$ -тубуліну і *KIN10* (Рис. 23). Слід зазначити, що у клітинах і

проростків, і суспензійної культури експресія *KIN10* домінувала, що свідчить на користь більш активної участі в мітотичних процесах саме *KIN10*.



**Рис. 23.** Імунофлуоресценція  $\gamma$ -тубулін- і *KIN10*-компетентних антитіл в клітинах кореня *A. thaliana* (генотип «Col-0»):

**А** – зелена флуоресценція маркера  $\gamma$ -тубуліну (канал FITC); **Б** – червона флуоресценція маркера *KIN10* (канал TRITC); **В** – сумісна флуоресценція маркерів  $\gamma$ -тубуліну та *KIN10*.

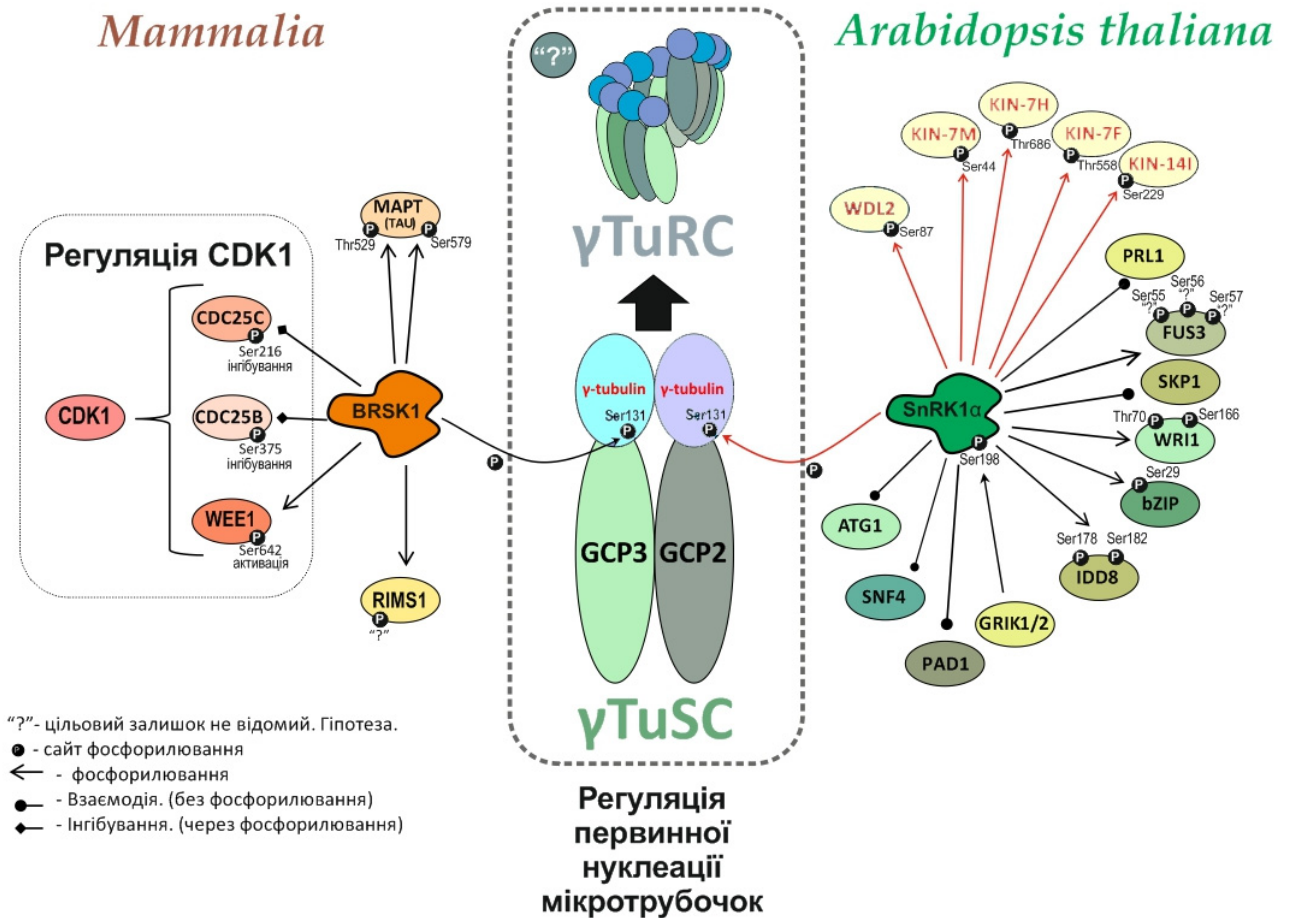
Інтенсивність флуоресценції  $\gamma$ -тубуліну та мітотичний індекс у клітинах рослин *KIN10*<sup>KO</sup> були нижчими, ніж у клітинах рослин *KIN11*<sup>KO</sup>, що додатково свідчить про домінуючу роль *KIN10*.

Таким чином, отримані дані підтвердили первинний біоінформатичний прогноз стосовно участі SnRK1 $\alpha$  в регуляції системи мікротрубочок і їх роль як агентів тубулінового коду вищих рослин.

З метою остаточного визначення механізмів SnRK1 $\alpha$ -специфічної регуляції системи мікротрубочок вищих рослин, на підставі 42 експериментально підтверджених сайтів BRSK1/2-специфічного фосфорилування, було складено узагальнений мотив сайту специфічного фосфорилування. Подальший пошук консенсусних ділянок серед 204 цитоскелетних білків *A. thaliana*, депонованих в UniProtKB, підтвердив наявність консенсусу з сайтом Ser131  $\gamma$ -тубуліну (TBG1 і TBG2), а також визначив нові сайти у асоційованого з мікротрубочками білку WDL2 (UniProtKB: Q9ASW8) і у чотирьох ізотипів кінезин-подібних білків: KN7M (UniProtKB: Q9SJU0), KN7H (UniProtKB: F4JZ68), KN7F (UniProtKB: F4JUI9) і KN14I (UniProtKB: F4IL57).

Таким чином, безпосередній вплив на систему мікротрубочок *A. thaliana* можливий лише як результат SnRK1 $\alpha$ -залежного фосфорилування Ser131 обох ізотипів  $\gamma$ -тубуліну (TBG1 і TBG2), а також Ser87 структурного БАМ - WDL2. Фосфорилування останнього дозволяє передбачати вплив SnRK1 $\alpha$ -залежного фосфорилування на орієнтацію кортикальних мікротрубочок під час інтерфази. Зокрема, WDL2 визначає зміну орієнтації кортикальних мікротрубочок під впливом фотоінгібування елонгації у клітинах гіпокотилу (Liu et al., 2013). Загалом, отримані дані не лише визначили *KIN10* і *KIN11* як агентів тубулінового коду вищих рослин, але й уточнили сферу функціональної активності рослинних SnRK $\alpha$  (Рис. 24).

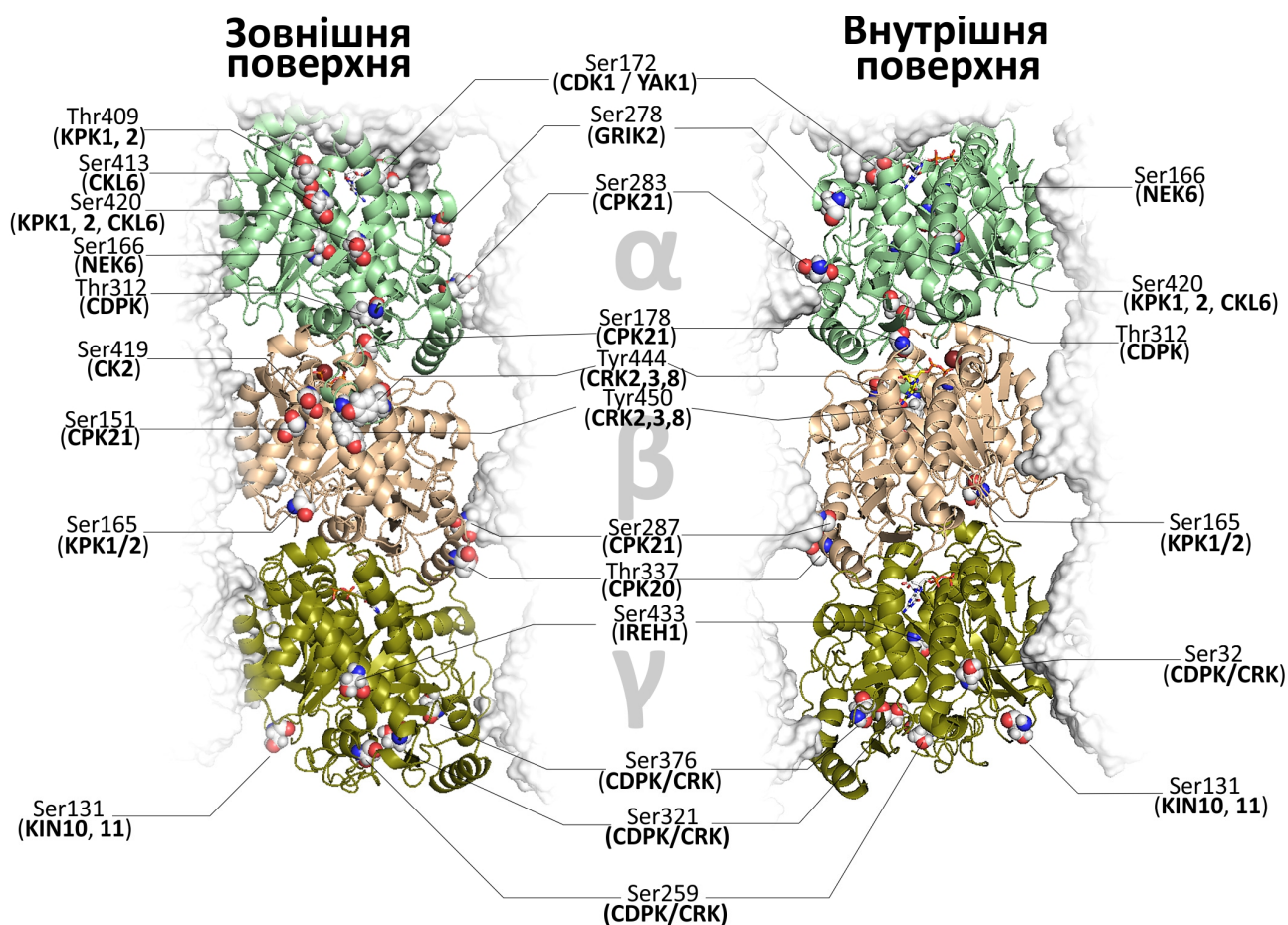




**Рис. 24.** Схематичне порівняння функціональної активності SnRK1 у рослин (SnRK $\alpha$ ) і тварин (BRSK1). Стрілки і шрифт червоного кольору вказують на молекулярні мішені SnRK $\alpha$ -залежного фосфорилування білків рослинного цитоскелету, визначені в межах актуального дисертаційного дослідження:  $\gamma$ -tubulin – ізоформи  $\gamma$ -тубуліну (TBG1 і TBG2), WDL2 – структурний БМ WDL2; KIN-7M/-7H/-7F/-14I – білки родини кінезинів. Назви білків відповідають офіційним депонуванням в UniProtKB.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ І ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

За результатами досліджень запропоновано узагальнену схему внеску фосфорилування в тубуліновий код вищих рослин (Рис.25). Порівняння отриманих результатів, даних літератури і інформації спеціалізованих баз даних дозволяють стверджувати, що на сьогодні, актуальна ревізія сайтів фосфорилування рослинного тубуліну і протеїнкіназ, що здійснюють зазначені модифікації, є найбільш повною і не має аналогів у світі. Поєднання у дисертаційному дослідженні методів біоінформаційного, структурно-біологічного і експериментального дослідження засвідчили свою ефективність. У більшості випадків, первинний біоінформатичний прогноз отримував експериментальне підтвердження і спрощував функціональну анотацію протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин.



**Рис. 25.** Узагальнена схема розташування сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну рослин на прикладі структурної моделі фрагменту мікротрубочки *A. thaliana* (зовнішня і внутрішня проекції) з протеїнкіназами, асоційованими із зазначеними модифікаціями.

Отримані результати цілком підтвердили первинне припущення стосовно того, що протеїнкінази тубулінового коду рослин мають належати до консервативного пулу регуляторів базових функцій клітини, які проявляють консервативність у представників різних царств. Екстраполяція даних анотації на філогенетичне древо повного кіному *A. thaliana* (Рис. 1) підтверджує, що усі визначені протеїнкінази тубулінового коду належать саме до цієї групи. Проте, незважаючи на очевидні спільні риси, кіном мікротрубочок у ссавців і вищих рослин, має певні відмінності. Зокрема, найбільш помітна різниця стосується відсутності у рослин виключно тирозин-специфічних протеїнкіназ, відмінностей в організації кальцій-залежних протеїнкіназ, особливостей доменних архітектур гомологів рослинного, тваринного і дріжджового походження. Проте, каталітичні домени протеїнкіназ зберегли досить значну подібність. Це дозволило не лише здійснити первинний пошук гомологів цільової групи (Рис. 2), але й визначити суто рослинні протеїнкінази, еволюція яких вважається наслідком пристосування до наземного існування, фототрофного живлення, залежності рослин від субстрату та ін. (Zulawski et al., 2014; Karpov et al., 2019).

Протеїнкіназами, здатними до безпосереднього фосфорилування молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну на прикладі *A. thaliana*, визначено:

три протеїнкінази групи AGC: родина IRE – IREN1 (At3g17850) і родину S6K – KPK1 (S6K1 / At3g08730) і KPK2 (S6K2 / At3g08720);

дві протеїнкінази групи CMGC – CDK1 (CDKA1 / At3g48750) і YAK1 (At5g35980) і філогенетико-близький гетеротетрамерний холоензим СК2 (субодиниці: СКА1 (CSK21 / At5g67380), СКА2 (CSK22 / At3g50000), СКВ1 (CSK2B / At5g47080), СКВ2 (CSK2C / At4g17640));

ізотип СКЛ6 (At4g28540) казеїнкінази 1;

SNF1-споріднені протеїнкінази SnRK1 $\alpha$  – KIN10 (At3g01090) і KIN11 (At3g29160);

NIMA-кіназу НЕК6 (At3g20860);

дев'ять Са<sup>2+</sup>-залежних протеїнкіназ, визначених на підставі біоінформатичного дослідження – п'ять представників родини СРК (СРК7 / At5g12480, СРК14 / At2g41860, СРК20 / At2g38910, СРК21 / AT4G04720, СРК32 / At3g57530), три представника родини СДПК/СРК (СРК2 / САМК2 (At3g19100), СРК3 / САМК3 (At2g46700) і СРК8 / САМК8 (At1g49580)) і представника SnAK1-кіназ – GRIK2 (At5g60550).

Загалом, за результатами дисертаційного дослідження була підтверджена роль фосфорилування як одного з ключових типів посттрансляційних модифікацій рослинного тубуліну. Розуміння зворотного фосфорилування як важливого фактору регуляції рослинного цитоскелету склалося давно, але повномасштабне визначення протеїнкіназ, здатних до безпосереднього фосфорилування, було виконано вперше.

Отримані результати мають перспективу практичного застосування як основа методів і технологій цілеспрямованого впливу на базові функції і властивості тубулінового цитоскелету.

## ВИСНОВКИ

В результаті аналізу кіному *Arabidopsis thaliana* виявлено і охарактеризовано основні шляхи ензиматичного фосфорилування тубуліну рослин як одного з критичних факторів функціональної спеціалізації мікротрубочок, визначено коло протеїнкіназ, що здатні безпосередньо фосфорилувати молекули  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, ідентифіковано сайти такого фосфорилування та надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі визначених протеїнкіназ в регуляції тубулінового коду рослин.

Зокрема, у результаті проведених досліджень встановлено:

1. Ревізія баз даних і біоінформатичне сканування геному *Arabidopsis thaliana* визначили, що, без врахування продуктів альтернативного сплайсингу, повний кіном арабідопсису представлено 1021 (1022 каталітичних домена) протеїнкіназою серин-треонінової і дуальної специфічності, що складає близько 3,7 % всіх білок-кодуєчих генів.

2. Гомологія послідовностей і дані філогенетичного дослідження засвідчили існування рослинних гомологів для 105 протеїнкіназ *Homo sapiens*, що асоційовані з регуляцією системи мікротрубочок і клітинного циклу. Визначено, що найбільш перспективними для пошуку рослинних протеїнкіназ тубулінового коду за гомологією є тваринні протеїнкінази групи AGC (GPRKs, MASTs і PKC $\alpha$ ), CMGC (родина CDC/CDKX і MNB/DYRK), близької до CMGC підродина CK2, самостійної родини казеїнкінази 1 (підродина CK1), самостійної підродина BUB1, а також Ca<sup>2+</sup>-залежних (CDPK) і SNF-споріднених (SnRK) протеїнкіназ суперродина CDPK-SNRK.

3. Результати біоінформатичного і структурно-біологічного досліджень протеїнкіназ групи CMGC підтверджують існування у вищих рослин гомологів циклін-залежної протеїнкінази 1 (CDK1) і YAK1-подібної протеїнкінази подвійної специфічності (Dyck1A/MNB/Yak1), які у дріжджів, комах і тварин причетні до регуляції цитоскелету і здатні безпосередньо фосфорилувати тубулін. Доведено, що протеїнкінази CDKA1 (AT3G48750) і AtYAK1 (AT5G35980) *A. thaliana* конкурують за спільний сайт фосфорилування  $\beta$ -тубуліну за залишком Ser172.

4. Ідентичність фосфорилування  $\beta$ -тубуліну за залишком Ser172 у грибів, комах, ссавців і вищих рослин, дозволяє стверджувати, що зазначене фосфорилування викликає пригнічення інтеграції гетеродимеру  $\alpha\beta$ -тубуліну в структуру мікротрубочки і є частиною посттрансляційної регуляції тубулінового коду вищих рослин. Подібність сайту фосфорилування Ser172 і асоційованих з ним циклін-залежних кіназ 1 і YAK1-подібних протеїнкіназ доводить існування зазначеного механізму регуляції динамічної нестабільності мікротрубочок у *A. thaliana* і визнає представників групи протеїнкіназ CMGC - CDK1 (AT3G48750) і YAK1 (AT5G35980) як агентів тубулінового коду вищих рослин.

5. Встановлено, що CK2-залежне фосфорилування  $\alpha$ -тубуліну *T. equiperdum* і *A. thaliana* має ідентичний характер і може відбуватися за залишками Ser94 і Ser419. Проте показники молекулярної динаміки і густини заряду свідчать, що помітні зміни властивостей сайтів від додавання фосфату, спостерігаються лише у випадку Ser419, що не впливає на внутрішні інтерфейси мікротрубочки, але регламентує взаємодію з моторними білками родини кінезинів.

6. Доведено, що протеїнкінази групи AGC є важливими регуляторами цитоскелету вищих рослин, проте роль агентів тубулінового коду належить протеїнкіназі родини IRE – IREN1/At3g17850, а також протеїнкіназам родини S6K – KPK1 (S6K1/At3g08730) і KPK2 (S6K2/At3g08720).

7. Флуоресценція GFP-конструктів рослинної протеїнкінази IREN1 в моделі тваринних клітин Vero і HEK293, а саме: контрольного GFP-фрагменту pEGFP-C3, повної IREN1 - pEGFP-IREN1, позбавленого каталітичного домену N-кінцевого фрагменту - pEGFP-cIREN1-tr, і результати структурного моделювання, дозволяють зробити висновок, що центросомальне позиціонування і впізнавання субстратів IREN1 має дуальну природу. Встановлено, що N-кінцевий домен IREN1 відповідає за внутрішньоклітинну локалізацію, але остаточне позиціонування і впізнавання сайту фосфорилування залежить від каталітичного домену, що розташовано в C-кінцевій частині молекули.

8. Унікальний для рослин амінокислотний залишок Ser433  $\gamma$ -тубуліну є найбільш вірогідним сайтом IRE-специфічного фосфорилування тубуліну. Ser433 належить до зовнішніх інтерфейсів комплексу  $\gamma$ TuSC, що зумовлює відсутність впливу на структуру малого кільця, але передбачає роль зазначеної модифікації у регуляції повного комплексу  $\gamma$ TuRC. Відсутність аналогічного сайту у ссавців, пояснює, чому, незважаючи на центросомальну локалізацію рослинної IREN1 в клітинах 'Vero', імуноблотинг не визначає взаємодії рослинної протеїнкінази і тваринного  $\gamma$ -тубуліну.

9. Застосування СК1-специфічного інгібітору D4476 на лінії *A. thaliana*, що експресує флуоресцентний маркер мікротрубочок - GFP-MAP4, підтвердило зв'язок СК1-специфічного інгібування, перебудов тубулінового цитоскелету і морфологічних реакцій первинного кореня, що доводить причетність рослинних СК1-подібних протеїнкіназ до регуляції системи кортикальних мікротрубочок і визначає їх як агентів посттрансляційної регуляції тубулінового коду вищих рослин.

10. Встановлено, що з 18 ізотипів СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* лише 13 (СКЛ1 (СК1 $\delta$ ), СКЛ2, СКЛ3, СКЛ4, СКЛ5, СКЛ6, СКЛ7, СКЛ8, СКЛ9, СКЛ10, СКЛ11, СКЛ12 і СКЛ13) здатні взаємодіяти з СК1-специфічним інгібітором D4476 (4-[4-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксін-6-іл)-5-(2-піридиніл)-1H-імідазол-2-іл]бензамід), але при цьому ефект впливу на систему мікротрубочок обумовлений інгібуванням лише трьох ізотипів: СКЛ1 (At4g26100) і СКЛ2 (At1g72710), які взаємодіють з МТ-асоційованим білком EB1, і СКЛ6 (AT4G28540), що фосфорилує  $\beta$ -тубулін за залишками Ser413 і Ser420. Таким чином, лише ізотип СКЛ6 можна вважати агентом тубулінового коду вищих рослин.

11. За допомогою НММ-профілів специфічного фосфорилування підтверджена відповідність Thr312  $\beta$ -тубуліну та Ser32, Ser259, Ser321, Ser376  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana* профілю сайтів CaMK<sub>2</sub>-залежного фосфорилування. Топологія Thr312 підтверджує участь зазначеної амінокислоти  $\beta$ -тубуліну в формуванні інтрадимерного контакту гетеродимеру  $\alpha/\beta$ -тубуліну, а сайти фосфорилування  $\gamma$ -тубуліну причетні до регуляції міжмолекулярної взаємодії гетеротетрамерного комплексу  $\gamma$ TuSC рослинного центра первинної нуклеації мікротрубочок.

12. За результатами профільного пошуку, структурної топології і спільної кластеризації 494 експериментально підтверджених сайтів і потенційних сайтів Ca<sup>2+</sup>-залежного фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana*, визначили Thr337, Ser287, Ser178  $\alpha$ -тубуліну і Ser283  $\beta$ -тубуліну як сайти Ca<sup>2+</sup>-залежної регуляції латеральної взаємодії протофіламентів мікротрубочки, а протеїнкінази СРК20 (At2g38910) і СРК21 (AT4G04720) - як найбільш імовірних агентів зазначених модифікацій. Водночас, Ser251  $\alpha$ -тубуліну визначено як сайт СРК-залежної регуляції взаємодії з асоційованими білками, а Ser278/279  $\beta$ -тубуліну - як сайт GRIK2-залежної регуляції зв'язування таксолу, що дозволяє висловити гіпотезу стосовно причетності цього сайту до стабілізації мікротрубочок.

13. Аналіз топології експериментально-визначених сайтів атипичного СДРК/СРК-залежного фосфорилування Tyr444/443 і Tyr450/449 ізотипів ТВВ2,



TBB3 і TBB7  $\beta$ -тубуліну, визначив розташування сайтів атипного CDPK/CRK-залежного фосфорилування Tug444/443 і Tug450/449 ізотипів TBB2, TBB3 і TBB7  $\beta$ -тубуліну на зовнішній поверхні мікротрубочок. С-кінцева локалізація і позаглобулярне розташування вказують на відсутність безпосереднього впливу цих сайтів на структуру мікротрубочки, а найбільш імовірним призначенням їх модифікацій є формування унікальних інтерфейсів взаємодії з БАМ. Це визначає рослині  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні протеїнкінази CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) агентами тубулінового коду вищих рослин.

14. Біоінформатичне дослідження, молекулярно-генетичний аналіз, дані флуоресцентної мікроскопії, експерименти із використанням мутантних рослин і культур з різним рівнем мітотичної активності, підтвердили причетність протеїнкіназ SnRK1 (KIN10 і KIN11) до регуляції рослинного цитоскелету і визначили їх функціональними гомологами тваринних протеїнкіназ BRSK 1 і 2. Їх участь у фосфорилуванні Ser131  $\gamma$ -тубуліну у рослин і ссавців має спільні риси, згідно топології сайту, впливає на формування інтерфейсів TUBG1(2)-GACP(2)3 центрів первинної нуклеації мікротрубочок.

15. За допомогою створених референтних генетичних конструкцій протеїнкіназ SnRK1 $\alpha$  (KIN10 і KIN11), експериментів із застосуванням нокаутних ліній *KIN10<sup>KO</sup>* і *KIN11<sup>KO</sup>* і рослин *A. thaliana* дикого генотипу Col-0, модельних систем з різним рівнем мітотичної активності (інтактні рослини і суспензійна культура), було доведено, що дисфункція генів *KIN10* і *KIN11* призводить до зниження мітотичної активності рослинних клітин. Встановлено, що вплив KIN10 і KIN11 на мітотичну активність має синергічний ефект, а результати імунофлуоресцентної мікроскопії клітин кореня рослин *A. thaliana* лінії Col-0 підтвердили колокалізацію флуоресценції  $\gamma$ -тубуліну і KIN10.

16. Узагальнений мотив, складений на підставі 42-х експериментально підтверджених сайтів BRSK1/2-специфічного фосфорилування, дозволив вконтати пошук сайтів Snf1-специфічного фосфорилування у 204 цитоскелетних білків *A. thaliana*. Консенсусні ділянки було знайдено у випадку сайту Ser131  $\gamma$ -тубуліну (TBG1 і TBG2), а також, асоційованого з мікротрубочками білку WDL2 (At1g54460) і чотирьох ізотипів кінезин-подібних білків: KN7M (At2g21380), KN7H (At5g66310), KN7F (At4g38950) і KN14I (At2g47500), що підтверджує внесок SnRK1 $\alpha$ -специфічного фосфорилування в регуляцію системи мікротрубочок вищих рослин і визначає рослині протеїнкінази KIN10 і KIN11 як агентів тубулінового коду.

17. Таким чином, на прикладі *A. thaliana* встановлено, що у фосфорилуванні рослинного  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну беруть безпосередню участь принаймні:

- три протеїнкінази групи AGC: представник родини IRE – IREH1 (At3g17850) і представники родини S6K – KPK1 (S6K1/At3g08730) і KPK2 (S6K2/At3g08720);
- дві протеїнкінази групи CMGC – CDK1 (CDKA1/At3g48750) і YAK1 (At5g35980) і філогенетично близький до групи CMGC гетеротетрамерий холоензим SK2 (субодиниці: SKA1 (CSK21/At5g67380), SKA2 (CSK22/At3g50000), SKB1 (CSK2B/At5g47080), SKB2(CSK2C/At4g17640));
- казеїнкіназа 1, а саме, її ізотип SKL6 (At4g28540);

- SNF1-споріднені протеїнкінази SnRK1 $\alpha$  – KIN10 (At3g01090) і KIN11 (At3g29160);
- NIMA-протеїнкіназа NEK6 (At3g20860);
- дев'ять Ca<sup>2+</sup>-залежних протеїнкіназ: п'ять представників родини СРК (СРК7/At5g12480, СРК14/At2g41860, СРК20/At2g38910, СРК21/AT4G04720, СРК32/At3g57530), три представники родини СДПК/СРК (СРК2/САМК2 (At3g19100), СРК3/САМК3 (At2g46700)), протеїнкіназа СРК8/САМК8 (At1g49580) і SnAK1-кіназа GRIK2 (At5g60550).

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Karpov PA**, Rayevsky AV, Sheremet YaA, Yemets AI, Blume YaB. Structural biology characteristic of CK1-like protein kinase isotypes associated with regulation of plant microtubules. *Cytol Genet.* 2020; 54 (4): 293-304. doi.: 10.3103/S0095452720040052 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз отриманих результатів, написання статті*)
2. **Karpov PA**, Sheremet YA, Blume YB, Yemets AI. Studying the role of protein kinases CK1 in organization of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells. *Cytol. Genetics.* 2019; 53 (6): 441–450. doi.: 10.3103/S0095452719060033 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, виконання біоінформатичних і структурно-біологічних експериментів, участь в аналізі даних фізіологічних експериментів, узагальнення результатів і написання статті*)
3. **Karpov PA**, Blume YB. Plant  $\beta$ -tubulin phosphorylation on Ser172 as canonical suppressing factor of microtubule growth. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2019; 24: 321-326. doi.: 10.7124/FEEO.v24.1123 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті*)
4. Demchuk OM, **Karpov PA**, Blume YB. 3D-modeling of carboxyl-terminal phosphorylation of plant  $\alpha\beta$ -tubulin and its role in kinesin-8/microtubule interaction. *Cell Biol. Int.* 2019; 43 (9): 1072-1080. doi.: 10.1002/cbin.10818 (*Особистий внесок здобувача: участь у розробленні схеми дослідження, біоінформатичний пошук амінокислотних залишків, здатних до фосфорилування в ділянці міжмолекулярного інтерфейсу кінезин-8/тубулін, участь у написанні статті*)
5. Krasnoperova EE, Goriunova II, Isayenkov SV, **Karpov PA**, Blume YB, Yemets AI. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic subunits of the SnRK1 protein kinase complexes in the regulation of *Arabidopsis*  $\gamma$ -Tubulin. *Cytol. Genetics.* 2019. 53(5): 349-356. doi.: 10.3103/S0095452719050104 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, виконання структурно-біологічних експериментів, участь в інтерпретації отриманих даних і написанні статті*)

6. Krasnoperova OE, Buy DD, Goriunova II, Isayenkov SV, **Karpov PA**, Blume YaB, Yemets AI. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*. Cytol. Genetics. 2019; 53 (3): 185-191. doi.: 10.3103/S0095452719030022 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні концепції дослідження, визначення білків-субстратів протеїнкіназ SnRK1, що можуть бути пов'язані з регуляцією тубулінового цитоскелету рослин, розробка схеми SnRK1-залежної регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок у вищих рослин*)

7. **Karpov PA**, Novozhylov DO, Isayenkov SV, Blume YB. Motif-based prediction of plant tubulin phosphorylation sites associated with calcium-dependent protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. Cytol. Genetics. 2018; 52 (6): 428–439. doi.: 10.3103/S0095452718060038 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, постановка експериментів, аналіз результатів, написання статті*)

8. **Karpov PA**, Blume YB. Is it really that Casein kinase 2 is able to phosphorylate  $\alpha$ -tubulin in plants? Cytol. Genetics. 2018; 52 (2): 103-111. doi.: 10.3103/S0095452718020044 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, постановка експериментів, аналіз результатів, написання статті*)

9. **Karpov PA**, Raevsky AV, Krasnoperova EE, Isayenkov SV, Yemets AI, Blume YB. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. Cytol. Genetics. 2017; 51 (6): 415–421. doi.: 10.3103/S0095452717060056 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, постановка експериментів, аналіз результатів, написання статті*)

10. Chudinova EM, **Karpov PA**, Fokin AI, Yemets AI, Lytvyn DI, Nadezhdina ES, Blume YB. MAST-like protein kinase IREH1 from *Arabidopsis thaliana* colocalizes with the centrosome when expressed in animal cells. Planta. 2017; 246 (5): 959–969. doi.: 10.1007/s00425-017-2742-4 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, виконання біоінформатичної і структурно-біологічної частини дослідження, узагальнення результатів, написання статті*)

11. Novozhylov DO, **Karpov PA**, Blume YB. Bioinformatic search for  $\text{Ca}^{2+}$ - and Calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. Cytol. Genetics. 2017; 51 (4): 239–246. doi.: 10.3103/S0095452717040053 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми дослідження, робота з базами даних, участь у написанні статті*)

12. Новожилов ДО, **Карпов ПА**, Раевский АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ.  $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{Ca}^{2+}$ -Кальмодулін-залежні протеїнкінази - потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 323–328. doi.: 10.7124/FEEO.v20.788 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, участь у написанні статті*)

13. Краснопорова ОЄ, Ісаєнков СВ, **Карпов ПА**, Ємець АІ. Нові генетичні конструкції KIN10-His та KIN11-His як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкіназ SnRK1 та BRSK. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 68-72. doi.: 10.7124/FEEO.v20.736 (*Особистий внесок здобувача: участь в аналізі літературних джерел, участь у розробці схеми досліджень (структурно-біологічна частина), виконання структурного моделювання, участь у написанні статті*)

14. Краснопорова ОЄ, Ісаєнков СВ, **Карпов ПА**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії в різних органах *Arabidopsis thaliana*. Доповіді Національної академії наук України. 2016; 1: С.81-91. doi.: 10.15407/dopovidi2016.01.081 (*Особистий внесок здобувача: участь у плануванні і виконанні філогенетичного аналізу і інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті*)

15. Paganelli L, Caillaud M-C, Quentin M, Damiani I, Govetto B, Lecomte P, **Карпов ПА**, Abad P, Chabouté M-E, Favery B. Three BUB1 and BUBR1/MAD3-related spindle assembly checkpoint proteins are required for accurate mitosis in *Arabidopsis*. New Phytologist. 2015; 205 (1): 202-215. doi.: 10.1111/nph.13073 (*Особистий внесок здобувача: біоінформатична і структурно-біологічна частина дослідження, біоінформатичне прогнозування молекулярних взаємодій на стадії планування експериментів, інтерпретація отриманих даних на підставі даних біоінформатики і структурної біології, участь у дискусії і написанні статті*)

16. **Карпов Р**, Raevsky A, Korablyov M, Blume Y. Identification of plant homologues of Dual Specificity Yak1-Related Kinases. Comput. Biol. J. 2014; 12 (ID 909268): 1–14. doi.: 10.1155/2014/909268 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті*)

17. **Карпов ПА**, Rayevsky AV, Blume YB. Bioinformatic search for plant homologs of the protein kinase Bub1—a key component of the mitotic spindle assembly checkpoint. Cytol. Genetics. 2010; 44 (6): 376–388. doi: 10.3103/S0095452710060095 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті*)

18. **Карпов ПА**, Nadezhdina ES, Yemets AI, Blume YB. Results of the clusterization of human microtubule and cell cycle related serine/threonine protein kinases and their plant homologues. Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2010; 65 (4): 213–216. doi.: 10.3103/S0096392510040267 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, робота з базами даних GenBank і UniProt, виконання філогенетичного аналізу, аналіз отриманих результатів, написання статті*)

19. Bryantseva SA, Gavryushina ES, Yemets AI, **Карпов ПА**, Blume YB, Drygin YF, Nadezhdina ES. MAST2-like protein kinase from grape *Vitis vinifera*: Cloning of catalytic domain cDNA. Cytol. Genetics. 2010; 44 (4): 227–232. doi.: 10.3103/S0095452710040079 (*Особистий внесок здобувача: участь у*

*розробленні схеми досліджень, аналіз літературних джерел, виконання біоінформатичної частини дослідження, пошук и підготовка первинного рослинного матеріалу Vitis vinifera, участь у написанні статті)*

20. **Карпов PA**, Nadezhdina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AYu, Shashina NYu, Blume YaB. Bioinformatic Search of Plant Microtubule- and Cell Cycle Related Serine-Threonine Protein Kinases. BMC Genomics. 2010; 11 (Suppl 1): S14. doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14. *(Особистий внесок здобувача: один з основних авторів ідеї дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз отриманих результатів, написання статті)*

21. **Карпов ПА**, Емец АИ, Матусов ВГ, Ныпорко АЮ, Надеждина ЕС, Шашина НЮ, Блюм ЯБ. Биоинформационный поиск растительных гомологов ассоциированной с микротрубочками протеинкиназы MAST2. Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. 2009; 131: 181-187. *(Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)*

22. **Карпов PA**, Emets AI, Matusov VG, Nyporko AYu, Nadezhdina ES, Blume YaB. Bioinformatics search for plant homologues of STE20-like serine/threonine protein kinases. Cytol. Genetics. 2009; 43 (6): 419–428. doi.: 10.3103/S0095452709060097 *(Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)*

23. **Карпов ПА**, Емец АИ, Матусов ВГ, Ныпорко АЮ, Надеждина ЕС, Блюм ЯБ. Биоинформационный поиск растительных гомологов Ste20-подобных серин/треониновых протеинкиназ. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2009; 7: 12-18. *(Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)*

24. **Карпов PA**, Nadezhdina ES, Emets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Shashina NY, Blume YaB. Bioinformatic search of plant protein kinases involved in the phosphorylation of microtubular proteins and the regulation of the cell cycle. Cytol. Genetics. 2009; 43 (3): 201-215. doi.: 10.3103/S0095452709030104 *(Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)*

25. **Карпов ПА**, Емец АИ, Блюм ЯБ. Анализ кинома Arabidopsis thaliana на основании гомологии каталитическому домену тирозинкиназы Zap70 Mus musculus. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2008; 4: 157-163. *(Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)*

26. **Карпов PA**, Yemets A, Blume Y. Calmodulin in Action: CaM Protein Kinases as Canonical Targets in Plant Cell. In book: Calmodulin: Structure, Mechanisms and Functions. Chapter: 1. 2019; Publisher: Nova Science Publishers, Inc., USA; Part of ISBN: 978-1-53614-948-7: 1-38. *(Особистий внесок здобувача: розробка ідеї роботи, аналіз літературних джерел, робота з базами даних, виконання тестових експериментів, структурне моделювання і підготовка ілюстрацій, узагальнення матеріалу і написання глави монографії)*

27. **Karpov PA**, Blume YB. Bioinformatic search for plant homologues of animal structural MAPs. (Chapter 18). In book: The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology. Springer, Netherlands (ISBN: 978-1-4020-8843-8); 2008; 10: 373-397. (Особистий внесок здобувача: паритетна участь у розробці концепції дослідження і вищезазначеної глави монографії, аналіз даних літератури, виконання експериментів, аналіз отриманих даних, узагальнення результатів дослідження і написання глави монографії)

28. **Karpov P**, Spivak S, Lytvyn D, Yemets A, Blume Y. Creation of chimeric genetic constructions of plant protein kinase IREH1 from *Arabidopsis thaliana*. 7th Baltic genetics congress, 2018, 24-27 October, Riga, Latvia. p.213.

29. **Karpov P**, Rayevsky A, Sulimenko V, Draber P, Blume Y. Plant MT-nucleation centers and protein kinases capable for  $\gamma$ TuSC phosphorylation. FEBS Advanced Lecture Course and 33rd European Cytoskeletal Forum Meeting on “Biology and pathology of the cytoskeleton: the crossroads of three cytoskeletal systems”, 2018, 20-24 September, Prague, Czech Republic. #99. p.115

30. Новожилов ДО, **Карпов ПА**, Блюм ЯБ. Біоінформаційний пошук СРК і CRK протеїнкіназ, потенційно пов'язаних з регуляцією рослинного цитоскелету. International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2016, 2-6 October, Odesa, Ukraine. p.59.

31. Demchuk O, **Karpov P**, Blume YB. Potential sites of posttranslational modifications of plant  $\alpha/\beta$ -tubulins affecting their interaction with kinesin-8. International Symposium on Cell Biology jointly with 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2014, 17-20 September, Uzhhorod, Ukraine. p.5.

32. Spivak S, **Karpov P**, Demchuk O, Blume YB. The identification of potential phosphorylation sites with serine, threonine and tyrosine residues in human microtubules. International Symposium on Cell Biology. Jointly with 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2014, 17-20 September, Uzhhorod, Ukraine. p.11.

33. Raevsky AV, **Karpov PA**, Blume YB. Structure modeling, molecular screening and docking of mammalian AMPK and its plant homolog KIN10 for new ATP-competitive inhibitors. Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13), 2013, 25–28 July, Moscow, Russia. p.203-204.

34. Blume YB, Samofalova DA, Raevsky AV, Danilova KS, **Karpov PA**. Bioinformatic analysis of the moss kinome: going down the stairway of evolution. HGM2013/21st ICG, 2013, 13–18 April, Singapore, Non-Flowering Plant; HGM2013-ICG-1849.

35. **Karpov PA**, Yemets AI, Rayevsky AV, Blume YB. Different casein kinase isoforms as important regulating factors of plant microtubular functioning. 50th ASCB Annual Meeting (2012 ASCB Annual Meeting), 2012, 15-19 December, San Francisco, CA, USA. ID: #1197, B463. <http://ascb.org/meetings/files/program/2012-AM-Program-Web.pdf>

36. **Karpov PA**, Sheremet YA, Raevsky AV, Yemets AI, Blume YB. Casein kinases CKL6 and CK1D as important factors of plant microtubule regulation. 3rd International Symposium «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» (ISABMD'2012), 2012, 17-23 September, Lviv, Ukraine. p.30.

37. **Karpov PA**, Samofalova DA, Raevsky AV, Danilova KS, Blume YB. Bioinformatic analysis of the moss kinome: going down the stairway of evolution. 3rd International Symposium «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» (ISABMD'2012), 2012, 17-23 September, Lviv, Ukraine. p.64.
38. Spivak SI, **Karpov PA**, Demchuk OM, Blume YB. The identification of potential phosphorylation sites with Ser, Tre and Tyr residues in Arabidopsis microtubules. 3rd International Symposium «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» (ISABMD'2012), 2012, 17-23 September, Lviv, Ukraine. p.158.
39. Sheremet YaA, **Karpov PA**, Yemets AI, Blume YaB. Casein kinase 1 participates in organization of plant microtubules. 3rd International Symposium «Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design» (ISABMD'2012), 2012, 17-23 September, Lviv, Ukraine. p.157.
40. **Karpov PA**, Raevsky AV, Sheremet YA, Blume YB. The role of casein kinases 1 in plant cytoskeleton regulation. The Eighth International Conference on «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology» (BGRS\SB'12), 2012, 25-29 June, Novosibirsk, Russia. p.138.
41. Raevsky AV, **Karpov PA**, Sheremet YA, Blume YB. Molecular docking of inhibitor D4476 in ATP-binding pocket of CK1 $\delta$  from *Ratus norvegicus* and CK1D from *Arabidopsis thaliana* and results of molecular dynamics simulations. International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology (UCCB2012), 2012, 16-20 May, Yalta, Ukraine. p.12.
42. **Karpov PA**, Sheremet YA, Raevsky AV, Blume YB. Animal and plant Casein kinases 1 isoforms as a targets for specific inhibitors for medicine and plant biology. International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology (UCCB2012), 2012, 16-20 May, Yalta, Ukraine. p.22.
43. Sheremet Y, **Karpov P**, Yemets A, Raevsky A, Blume Y. Casein kinase 1 is involved *Arabidopsis* root hairs formation and growth via regulation of microtubules organization. International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd Ukrainian Congress for Cell Biology (UCCB2012), 2012, 16-20 May, Yalta, Ukraine. p.23.
44. Кораблев МД, **Карпов ПА**, Раевский АВ, Блюм ЯБ. Поиск и предсказание трехмерной структуры вероятных партнеров растительных гомологов протеинкиназы Dyrk1A. Биология растений и биотехнология. 2011, 5-7 октября, Белая Церковь, Украина. с.73.
45. Raevsky AV, **Karpov PA**, Korablyov MD, Isaenkov SV, Blume YB. Prediction and validation of plant DYRK1A homologs spatial structure. Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'11), 2011, 21-24 July, Moscow, Russia. p.308-309.
46. **Karpov PA**, Raevsky AV, Isaenkov SV, Spivac SI, Blume YB. Identification of Plant Homologs of Dual Specificity Yak1-Related Kinase 1A. Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'11), 2011, 21-24 July, Moscow, Russia. p.148-149.
47. **Karpov PA**, Yemets A.I., Raevsky AV, Blume YB. Bioinformatic search and identification of plant microtubule and cell cycle regulating kinases. 50th

ASCB Annual Meeting (2010 ASCB Annual Meeting), 2010, Philadelphia, USA. ID: #1947.

48. **Карпов ПА**, Емец АИ, Надеждина ЕС, Брянцева СА, Блюм ЯБ. Биоинформационный поиск растительных гомологов протеинкиназы MAST2, ассоциированной с микротрубочками. Український біохімічний з'їзд, 2010, 13–17 вересня, Одеса, Україна, ISSN 0201 — 8470. Укр. біохім. журн., 2010, т.82, № 4 (додаток 1). с.29-30.

49. **Карпов PA**, Yemets AI, Blume YB. Bioinformatic search for plant homologues of checkpoint serine/threonine-protein kinase Bub1. The Seventh International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology (BGRS'2010), 2010, 20-27 June, Novosibirsk, Russia. p.126.

50. **Карпов PA**, Nadezhdina ES, Yemets AI, Blume YB. Cladistic analysis of plant homologs of human microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases. 2nd Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics», 2010, 18-21 May, Moscow, Russia. p.218.

51. Матусов ВГ, **Карпов ПА**, Емец АИ, Ныпорко АЮ, Надеждина ЕС, Шашина НЮ, Блюм ЯБ. Биоинформационный поиск растительных гомологов протеинкиназы MAST2, ассоциированной с микротрубочками. Actual problems of applied genetics, breeding and biotechnology of plants - International conference of the 200th anniversary of Charles Darwin and the 200th anniversary of Nikitsky Botanical Gardens, 2009, 3-6 November, Yalta, Ukraine. p.46.

52. **Карпов PA**, Nadezhdina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Shashina NY, Blume YB. Bioinformatic Search of Plant Microtubule- and Cell Cycle Related Serine-Threonine Protein Kinases. Plant Genomics European Meeting 8 (Plant GEM8), 2009, 07-10 October, Lisbon, Portugal. S6. P.6. p.185.

53. **Карпов PA**, Nadezhdina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Shashina NY, Blume YB. Bioinformatic Search of Plant Microtubule- and Cell Cycle Related Serine-Threonine Protein Kinases. Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'09), 2009, 20-23 July, Moscow, Russia. p.145-147.

54. Блюм ЯБ, **Карпов ПА**, Надеждина ЕС, Матусов ВГ, Ныпорко АЮ, Шашина НЮ, Емец АИ. Реконструкция кинома микротрубочек растений с помощью инструментов биоинформатики. Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина / V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Часть II. 2009, 21-28 июня, Москва, Россия. с.11.

55. **Карпов PA**, Yemets AI, Blume YB. Bioinformatic Analysis of Arabidopsis thaliana Chromosome I Kinome. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, 2008, 13-17 December, San Francisco, USA. A supplement to Molecular Biology of the Cell, 2008; 19: 564. (#1948/B411).

56. Blume YB, **Карпов PA**, Nyporko AY, Samofalova DA, Sheremet YO, Yemets AI. Bioinformatic analysis of Arabidopsis kinome and phosphatome for investigation of microtubule functions and applied aspects of their regulation in plants. Workshop on Computational Systems Biology Approaches to Analysis of



Genome Complexity and Regulatory Gene Networks, 2008, 20-25 November, Singapore. [http://www.ims.nus.edu.sg/Programs/08compsys/files/blume\\_ab.pdf](http://www.ims.nus.edu.sg/Programs/08compsys/files/blume_ab.pdf)

57. **Karpov PA**, Sheremet YA, Yemets AI, Nadezhdina ES, Blume YB. Bioinformatic analysis of plant microtubule and cell cycle regulating kinases. Workshop on computational systems biology approaches to analysis of genome complexity and regulatory gene networks, 2008, 20-25 November, Singapore. [http://www2.ims.nus.edu.sg/Programs/08compsys/files/blume\\_ab.pdf](http://www2.ims.nus.edu.sg/Programs/08compsys/files/blume_ab.pdf)

58. Blume YB, **Karpov PA**, Nyporko AY, Samofalova DA, Sheremet YO, Yemets AI. Elucidation of microtubule regulation for practical applications through bioinformatic analysis of *Arabidopsis* kinome and phosphatome. V міжнародна конференція «Геном рослин», 2008, 13-16 жовтня, Одеса, Україна. с.162–164.

59. Blume YB, **Karpov PA**, Nyporko AY, Samofalova DA, Sheremet YO, Yemets AI. Bioinformatic analysis of *Arabidopsis* kinome and phosphatome for investigation of microtubule functions and applied aspects of their regulation. Biotechnology Conference «Science and advance in the Black Sea region», 2008, 28 September, Albena, Bulgaria. p.16-18.

60. **Karpov PA**, Blume YB. Search of *Arabidopsis thaliana* homologues of animal protein-tyrosine kinases based on tBLASTn scanning of genome. Plant Genome European Meetings (Plant GEM 2008), 2008, 24-27 September, Albena, Bulgaria. p.80.

61. **Karpov P**, Yemets A, Blume Y. Kinom of the *Arabidopsis thaliana* Chromosome I based on the database search and bioinformatics analysis. Plant Genome European Meetings (Plant GEM 2008), 2008, 24-27 September, Albena, Bulgaria. p.78.

62. **Karpov PA**, Blume YB. Bioinformatic search for plant homologues of animal structural microtubule-associated proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. Plant Genome European Meetings (Plant GEM 2008), 2008, 24-27 September, Albena, Bulgaria. p.79.

63. **Карпов ПА**, Ныпорко АЮ, Смофалова ДА, Шеремет ЯА Емец АИ, Блюм ЯБ. Биоинформационный анализ кинома и фосфатома *Arabidopsis* в связи с исследованием функционирования микротрубочек и прикладные аспекты их регулирования. Международная школа-конференция молодых ученых: «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях». Звенигород, 7-12 декабря 2008 г. с.31.

64. **Карпов ПА**, Ємец АІ, Блюм ЯБ. Дослідження кіному *Arabidopsis thaliana* із застосуванням методів біоінформатики. 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології, 2007, 23-26 жовтня, Київ, Україна. с.244.

65. **Karpov PA**, Blume YB. Homology of non-receptor tyrosine kinases based on the similarity of their primary structure and domain organization. International conference on structural genomics. 4th ISGO, 22-26 October, 2006, Beijing, China. p. 140.

## АНОТАЦІЯ

**Карпов П.А. Кіном мікротрубочок як невід’ємна складова регуляції тубулінового коду у рослин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

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

Досліджено фосфорилювання як посттрансляційний фактор тубулінового коду, що забезпечує функціональну гетерогенність і спеціалізацію мікротрубочок. Проведена ревізія кіному *Arabidopsis thaliana* (1021 протеїнкіназа), визначено коло протеїнкіназ, що причетні до регуляції цитоскелету, клітинного поділу і фосфорилювання молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну. За допомогою методів біоінформатики, структурної біології, молекулярно-генетичного і фізіологічного експерименту, сучасної мікроскопії, мутантних і трансгенних експериментальних моделей, досліджено участь окремих протеїнкіназ. Встановлено, що у вищих рослин фосфорилювання  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну здійснюють 3 протеїнкінази групи AGC (родина IRE – IREN1; родина S6K – KPK1 і KPK2), 2 протеїнкінази групи CMGC (CDK1 і YAK1), гетеротетрамерний холоензим СК2 (СКА1 / СКА2 / СКВ1 / СКВ2), ізотип SKL6 протеїнкінази СК1, 2 протеїнкінази SnRK1 $\alpha$  (KIN10 і KIN11), протеїнкіназа NEK6 (родини NEK, підродина NIMA), а також, 9 рослинних Ca<sup>2+</sup>-залежних протеїнкіназ: 5 з родини СРК (СРК7, СРК14, СРК20, СРК21 і СРК32), 3 з родини CDPK/CRK (CRK2, CRK3 і CRK8) і GRIK2 (SnAK1). Отримані докази про структуру протеїнкіназ, відповідні сайти фосфорилювання і їх роль в модуляції тубулінового коду розкривають нові фундаментальні аспекти функціональної пластичності рослинних мікротрубочок. Результати дослідження можуть слугувати підґрунтям методів і технологій цілеспрямованого впливу на базові функції і властивості тубулінового цитоскелету.

**Ключові слова:** рослина клітина, цитоскелет, посттрансляційні модифікації, фосфорилювання, протеїнкінази, тубулін, тубуліновий код, мікротрубочки, регуляція

## SUMMARY

**Karpov P.A. Microtubule kinome as an integral regulator of plant tubulin code. – Manuscript.**

Thesis for Doctor of Science (Dr. Sci.) degree in Biology, speciality 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The structure of microtubules (MT), as well as sequences of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin, is highly conserved. Despite the high conservation, MTs adapt to variety of cellular functions and demonstrate variety of properties. Two different mechanisms

can generate MT diversity: the expression of tubulin isotypes, and the generation of different posttranslational modifications (PTMs). It was demonstrated that phosphorylation of mammalian tubulin modulate MTs structure, dynamics and interaction with different associated and transport proteins (MAPs). At the same time, despite progress in the study of mammalian and yeast MT kinoms there are still significant gap in our knowledge of plant MT phosphorylation.

The objective of the study was to identify plant protein kinases involved in direct phosphorylation of  $\alpha$ -/ $\beta$ -/ $\gamma$ -tubulin and kinase-specific phosphorylation sites, to elucidate their function in plant tubulin code. A complete revision of *Arabidopsis thaliana* kinom (1021 genes) and *Homo sapiens* protein kinases (105 enzymes) involved in the regulation of the cytoskeleton, cell division, phosphorylation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -tubulin were performed. The closest plants homologes were identified, using bioinformatical and structural biology methods. Bioinformatical evidence was completed by modern cell biology, molecular biology and physiological experiments, modern microscopy, experiments on mutant and transgenic models.

It was concluded that in higher plants, phosphorylation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin are associated with 3 AGC kinases (family IRE - IREH1; family S6K - KPK1 and KPK2), 2 CMGC kinases (CDK1 and YAK1), proteinkinase CK2 (subunits: CKA1 / CKA2 / CKB1 / CKB2), CK1 isotype CKL6, 2 isotypes of SnRK1 $\alpha$  (KIN10 and KIN11), NIMA-kinase NEK6 (NEK family), and 9 plant Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases: 5 CPK family members (CPK7, CPK14, CPK20, CPK21 and CPK32), 3 CDPK / CRK family members (CRK2, CRK3 and CRK8) and SnAK1-kinase GRIK2.

Such comprehensive list of plant tubulin code protein kinases and information on their sites reveals fundamental aspect of plant MTs functional diversity, and display applied interest as the base for new methods and technologies of target influence on plant cytoskeleton.

**Key words:** plant cell, cytoskeleton, posttranslational modifications, phosphorylation, protein kinases, tubulin, tubulin code, microtubules, regulation

Підписано до друку 11.03.2021 р. Зам. № 98.  
Формат 60x84 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.  
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 1,9.  
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.  
м. Київ, вул. Предславинська, 28  
095-941-84-99, 067-209-54-30  
email: komprint@ukr.net