#### НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»

КРАСНОПЬОРОВА ОЛЕНА ЄВГЕНІВНА

УДК 575.8-57.023:581.1

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

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі клітинної біології і біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:	доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України <b>Ємець Алла Іванівна</b> , Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», завідувач відділу клітинної біології і біотехнології
Офіційні опоненти:	доктор біологічних наук, професор Панчук Ірина Ігорівна, Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, професор кафедри молекулярної генетики та біотехнології
	доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Козеко Людмила Євгенівна, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, провідний науковий співробітник відділу клітинної біології та анатомії.

Захист відбудеться «\_\_\_\_» 2020 р. о\_\_\_\_год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2a. Тел/факс: (044) 434 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

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

Автореферат розіслано «\_\_» \_\_\_\_2020 р.

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

Н.Л. Пастухова

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обгрунтування вибору теми дослідження. Протеїнкінази є однією з ключових груп ферментів, що беруть участь у регуляції широкого спектру клітинно-фізіологічних біохімічних та процесів шляхом зворотного фосфорилювання-дефосфорилювання білків. Їх функції та механізми дії можуть бути схожими в багатьох організмах. Існує певна еволюційна консервативність протеїнкіназ, причетних до таких фундаментальних процесів, як ріст, поділ та диференціація клітин, клітинна загибель тощо. стосується протеїнкіназ, асоційованих Особливо це 3 регуляцією функціонування цитоскелету, зокрема, мікротрубочок і, таким чином, перебігу мітотичних процесів в цілому (Gardiner et al., 2012; Per et al., 2017; McCormick et al., 2019). Незважаючи на те, що механізми сигнальних каскадів в рослинах набагато складніші, ніж у тварин, вищі рослини мають велику кількість гомологів тваринних протеїнкіназ, які беруть участь в регуляції цитоскелету, зокрема структури мікротрубочок. До таких протеїнкіназ належать такі їх родини, як САМК, СК1, AUR, TTK/MPS1, SLK, протеїнкінази NEK та інші. Існують протеїнкінази, функціонування яких добре вивчено в тваринах, але зовсім мало відомо про функціонування їх гомологів в рослинних клітинах (Karpov et al., 2010; Chen et al., 2009).

Однією з таких протеїнкіназ є протеїнкіназа BRSK1 тварин (Brainspecific serine/threonine-protein kinase 1), яка відіграє ключову роль у дуплікації центросом. Механізми дії та функціонування протеїнкінази BRSK1 досить добре вивчені в тваринних організмах. Протеїнкіназа BRSK1 є головним регулятором поляризації нейронів. опосередковуючи фосфорилювання білків, пов'язаних з мікротрубочками. Зокрема, ШЯ протеїнкіназа фосфорилює не лише тау-білок та МАР2, але безпосередньо утубулін. Однак, мало що відомо про можливі рослинні гомологи протеїнкінази BRSK1. При проведені пошуку її найближчих рослинних гомологів було ідентифіковано високу схожість протеїнкінази BRSK1 з представниками підродини SnRK1 протеїнкіназ Arabidopsis thaliana (Karpov et al., 2010).

Протеїнкінази SnRK1 є важливими факторами репрограмування транскрипційної активності та регулюють роботу більше, ніж 1000 генів. Ці ферменти найбільш залучені в процеси адаптації рослин до абіотичних та біотичних стресів. Протеїнкінази SnRK1 активуються при зниженні внутрішньоклітинного рівня глюкози, запускаючи зміни транскрипційного профілю, що сприяє відновленню клітинного гомеостазу, стимулючи подальший ріст та розвиток рослин (Scott et al., 1992; Zorina et al., 2011). Припускають, що саме протеїнкінази SnRK1 можуть виконувати функції у рослинних клітинах, подібні до функцій протеїнкінази BRSK1, зокрема, взаємодіяти з елементами цитоскелету та регулювати процеси клітинного поділу. Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених вивченню цих ферментів, участь протеїнкіназ SnRK1 в процесах клітинного поділу не з'ясована. Саме необхідністю вивчення цього питання і визначається актуальність даного дисертаційного дослідження.

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

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

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

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

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

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

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

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

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

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

8. Визначити роль протеїнкінази KIN10 у фосфорилюванні γтубуліну *A. thaliana* шляхом ідентифікації та реконструкції локалізації потенційного сайту фосфорилювання в структурі малого γ-тубулінового комплексу γTuSC. **Об'єкт дослідження**. Структурні та функціональні характеристики представників серин-треонінових протеїнкіназ підродини SnRK1 (KIN10 та KIN11) *А. thaliana*.

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

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

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

**Практичне значення отриманих результатів.** Вивчення особливостей функціонування протеїнкіназ SnRK1 (KIN10, KIN11) є важливим для розуміння сигнальних каскадів та механізмів формування адаптації рослин до умов енергетичного, осмотичного та сольового стресів. Отримані дані мають важливе значення для розуміння впливу енергетичного, осмотичного та сольового стресів на корінь рослин. Зокрема, вони можуть бути використані як підґрунтя для подальшої розробки практичних підходів вирощування рослин в умовах дії абіотичних стресів. Результати досліджень можуть бути використані у навчальному процесі під час підготовки фахівців з клітинної та молекулярної біології.

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

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

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 160 сторінках друкованого тексту та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 269 посилань. Дисертаційна робота містить 25 рисунків, 1 таблицю, 1 додаток.

# ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У першому розділі (огляді літератури) проаналізовано дані стосовно загальної характеристики, особливостей функціонування рослинних серинтреонінових протеїнкіназ. Описано структуру та особливості протеїнкіназ підродини SnRK1 (KIN10, KIN11), їхні відмінності від протеїнкіназ підродин SnRK2 та SnRK3. Охарактеризовано відомі гомологи протеїнкіназ підродини SnRK1, а саме протеїкінази SNF1 дріжджів та протеїнкінази АМФК ссавців. Також розглянуто роль протеїнкіназ у регуляції структури та функцій рослинного цитоскелету. Охарактеризовано можливого гомолога протеїнкіназ SnRK1 – протеїнкінази BRSK1 тварин. Висунуто припущення про можливу участь протеїнкінази SnRK1 в процесах росту та розвитку рослин за механізмом, подібним до механізму дії протеїнкінази BRSK1.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Біоінформатичний аналіз. Bci використані амінокислотні послідовності протеїнкіназ було отримано бази Protein 3 даних KnowledgeBase UniProtKB (www.uniprot.org/) (The UniProt Consortium. Nucl. Acids Res. 2008). Сканування BLASTp проводили з використанням наступних параметрів: ваговий коефіцієнт BLOSUM62, поріг Е-значення. Грунтуючись на кількох характеристиках, можливі гомологи були обрані в відсотках від ідентичності послідовностей, відсотках подібності послідовностей та їх випадкової відповідності (E-value).

Вирівнювання амінокислотних послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ здійснювали за допомогою програми ClustalX (версія 2.0) (www.clustal.org). Амінокислотні послідовності каталітичних доменів з використанням вирівнювали набору вагових матриць BLOSSUM. Архітектуру каталітичних доменів було проаналізовано за допомогою (http://smart.embl\_heidel\_berg.de/, інструменту **SMART** HAMMER2, HAMMER3), Pfam (http://pfam.xfam.org/), PROSITE (Http : //prosite.expasy.org/). Моделі каталітичних доменів протеїнкіназ BRSK1, KIN10 та KIN11 було створено з використанням сервера I-Tasser. Кладистичний аналіз проводили на основі множинних вирівнювань кіназних доменів з використанням методу найближчих сусідів Neighbor-Joining. Дендрограми каталітичних доменів обраних протеїнкіназ було побудовано та проаналізовано допомогою програми MEGA7 3a (http://www.megasoftware.net/). Ймовірні сайти фосфорилювання на у-тубуліні було передбачено із застосуванням сервера KinasePhos 2.0. Структурне моделювання гомології у-тубулінів було виконано в Modeller 9v8 (http://salilab.org/modeller/).

Робота з рослинним матеріалом. В дослідженнях використовували A. thaliana (екотип Col-0), трансгенну лінію A. thaliana з гіперекспресією гена KIN10 (OX), трансгенну лінію А. thaliana з РНК-інтерференцією KIN10 (РНКі), дві лінії нокаутних мутантів *kin10* та *kin11 А*. thaliana (SALK\_139618С та SALK 127939С), отриманих з Європейського стокового центру арабідопсиса (http://arabidopsis.info/). Дослідження також проводили на клітинах суспензійної культури А. thaliana. Для поверхневої стерилізації насіння А. thaliana обробляли 6%-ним розчином гіпохлориту натрію протягом 10-15 хв з подальшим п'ятиразовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Насіння висаджували на стерильне живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС), яке містило половинний набір макро- і мікросолей МС, збагачене тіаміном і міо-інозитолом (2 г/л), з додаванням 10 г/л сахарози та 4 г/л джелрайту, pH 5,7. Суспензійну культуру A. thaliana вирощували впродовж 7-ми діб на середовищі Гамборга, доповненому 2,5 мг/мл 2,4-Д, 2,5 мг/мл кінетину, а також 10 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН 5,7.

Для транскрипційного аналізу *KIN10* за умов дії сольового, осмотичного та енергетичного стресів проростки *A. thaliana* вирощували на рідкому середовищі MC. Двотижневі проростки переносили на середовище MC з додаванням 100 мM NaCl, 10%-ного поліетиленгліколю (ПЕГ 4000), або на середовище MC без додавання сахарози відповідно, та аналізували через 2, 8 та 24 год.

Для створення плазмідної конструкції кодуючу послідовність *KIN10* без стоп-кодону ампліфікували з попередньо синтезованої кДНК за допомогою ПЛР. ПЛР-фрагменти *KIN10* розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі, вирізали та виділяли з гелю за допомогою набору GeneJET Gel Extraction (Fermentas) та клонували у плазмідний вектор pART7-RFP (люб'язно наданий д-ром Антоні Гобером, Університет міста Йорк, Великобританія). Отриману генетичну конструкцію

рАRT7-*KIN10-RFP* переносили в *E. coli* штаму *DH5a*. Перенесення химерного гена *KIN10-RFP* в протопласти *A. thaliana* здійснювали за допомогою ПЕГ-індукованого методу трансформації. Ефективність трансформації протопластів оцінювали, використовуючи люмінесцентний мікроскоп Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина).

Для аналізу органоспецифічної експресії *КІN10* використовували двомісячні рослини А. thaliana (Col-0). Загальну РНК виділяли окремо з кожного органу рослини (корінь, стебло, листя, квітки) за допомогою TRIzol Reagent (Invitrogen, США) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Синтез кДНК проводили за допомогою RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) відповідно до протоколу компаніївиробника. Ділянку послідовності KIN10 (700 п. н.) ампліфікували за допомогою ПЛР із попередньо синтезованої кДНК. Як контроль використовували рівень експресії фактору елонгації а (AtEFa). Після проведення ПЛР ампліфіковані фрагменти генів KIN10 та EFa розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі. Рівень експресії в визначали шляхом денситометричного різних органах аналізу електрофореграм з використанням програми TotalLab (Велика Британія), яка  $\epsilon$  у вільному доступі (https://totallab-quant.software.informer.com/2.0/).

Для дослідження експресії маркерних генів клітинної проліферації *СYCB1-1* (АТ4G37490) та *BRCA1* (АТ4G21070) в нокаутних мутантних лініях *kin10* та *kin11* використовували 7-денні проростки *A. thaliana*. Для визначення рівнів експресії *KIN10/KIN11* та *AtCYCB1/AtBRCA1* використовували 7-денну суспензійну культуру *A. thaliana*. Експресію генів *AtCYCB1;1/AtBRCA1* та *KIN10/KIN11* визначали за допомогою кількісної ПЛР ( $\Delta\Delta$ Ct метод). Для порівняння рівнів експресії генів як референтний використовували ген актину (*AtActin*).

Для дослідження росту та розвитку коренів 7-денні проростки трансгенних ліній *A. thaliana* вирощували на середовищі МС без та з додаванням сахарози. Аналіз проводили через 24, 48, та 72 год, фіксуючи показники за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Довжину коренів обраховували за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d), яка є у вільному доступі (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Морфологію проростків аналізували у прохідному світлі за допомогою мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина). Як контроль використовували проростки *A. thalina* (екотип Col-0).

Мітотичний індекс меристематичних клітин проростків мутантних ліній *kin10* та *kin11* обраховували за стандартною формулою (Паушева, 1988). Клітини аналізували за допомогою мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина) з об'єктивами Plan-Neofluar 40x/1.3 і 100x/2.6 Immersion Oil. Отримані дані обробляли за допомогою програмного забезпечення AxioVisionsRel4.7 (CarlZeiss, Німеччина).

Для імунофлуоресцентного аналізу внутрішньоклітинної локалізації γтубуліну використовували 7-денні проростки мутантних ліній *kin10* та *kin11 A. thaliana*. Як первинні антитіла використовували мишачі моноклональні антитіла TU-31 проти у-тубуліну (люб'язно надані д-ром. П. Драбером, Інститут молекулярної генетики Чеської АН, Прага, Чеська Республіка) та первинні кролячі моноклональні антитіла проти KIN10 (AS10919, Agrisera), у розведенні 1:50. Як вторинні антитіла використовували FITC-кон'юговані анти-мишачі антитіла (Sigma-Aldrich, США) та TRITC-кон'юговані анти-(Sigma-Aldrich, США) у розведенні кролячі антитіла 1:100. Зразки досліджували 3a допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 510 МЕТА (Carl Zeiss, Німеччина) з використанням об'єктиву Plan Apochromat 63х/1.4 Oil DIC. Емісія FITC відбувалася при збудженні 488-нм лінією аргонового лазеру, в той час як емісія TRITC при 543-нм лінією гелій/неонового лазеру.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кладистичний аналіз протеїнкіназ SnRK1 та їх гомологів. За результатами проведеної NJ-кластеризації нами було ідентифіковано KIN10, KIN11 та SNRK1.3 (AT5G39440), які утворюють підродину SnRK1 у *A. thaliana*, як найближчих рослинних гомологів протеїнкінази BRSK1, що підтверджує результати попередніх досліджень (Karpov et al., 2010). Групуючись у спільну кладу з протеїнкіназою BRSK1 людини (рис. 1), вони виявляють вищий рівень подібності до своїх гомологів у тваринних організмах, ніж до представників підродин рослинних протеїнкіназ SnRK2 та SnRK3 (рис. 2).



Рис. 1. Спільна NJ-кластеризація каталітичного домена протеїнкінази BRSK1 людини та каталітичних доменів всіх відомих протеїнкіназ *A. thaliana* 



Також порівнювали 3D-моделі каталітичних доменів протеїнкінази BRSK1 з KIN10 та KIN11. Аналіз архітектури доменів показав, що обидві каталітичні субодиниці KIN10 та KIN11 містять убіхітин-асоційований домен UBA (Ubiquitin associated domain), який також був ідентифікований в двох ізоформах протеїнкінази BRSK1 (рис. 3). Крім того, рослинна протеїнкіназа KIN10, а також дві ізоформи BRSK1 характеризуються наявністю асоційованого з C-кінцем кіназного домену 1 (KA1). За нашими даними тільки одна ізоформа протеїнкінази KIN11 містить домен KA1.



Рис. 3. Доменна архітектура трьох ізоформ BRSK1 людини та її найближчих рослинних гомологів *А. thaliana*: S\_TKc, - каталітичний домен серин/треонінових протеїнкіназ, UBA - убіхітин-асоційований домен, KA1 - С-кінцевий кіназний домен 1

8

Накладання оптимізованих 3D-моделей остаточно підтвердило структурну гомологію каталітичних доменів протеїнкіназ BRSK1 людини та KIN10 з *A. thaliana* (RMSD = 0,173) (рис. 4).



Накладання та порівняння 3D-моделей каталітичних доменів KIN10 з KIN11 та KIN11 з протеїнкіназою BRSK1 (рис. 5) підтвердило високу ідентичність KIN10 з KIN11 (RMSD = 0,138) та меншу ідентичність KIN11 з BRSK1 (RMSD = 0,188).

Дослідження клітинної локалізації KIN10. Внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкінази KIN10 вивчали на протопластах A. thaliana (Col-0), трансформованих генетичною конструкцією, що містила химерний ген KIN10-RFP. Встановлено, шо химерний KIN10-RFP протеїн має цитоплазматичну локалізацію переважно примембранній y області протопластів (рис. 6). Отримані дані співпадають з результатами попередніх досліджень (Fragoso S, et al., 2009).



Рис. 6. Флуоресценція химерного білка KIN10-RFP R протопластах Α. thaliana після трансформації конструкцією pART7-KIN10-RFP: (A): флуоресценція RFP клітинах V thaliana після трансформації Α. контрольним вектором pART7-RFP (позитивний контроль) (Б).

Оцінка рівнів експресії *КІN10* в різних органах *A. thaliana*. У результаті визначення рівнів експресії гена *КІN10* в різних органах *A. thaliana* найвищий рівень його експресії було зафіксовано в листі (рис. 7). Найнижчий рівень експресії *КІN10* зафіксовано в коренях. Порівняно з листям, рівень експресії *КІN10* в коренях був приблизно в сім разів нижчим. В стеблі було зафіксовано майже в два рази вищий рівень експресії *КІN10* порівняно з коренями. В квітках рівень експресії *КІN10* був в 5 разів вищим, ніж в коренях. Отримані результати свідчать про важливу участь протеїнкінази КІN10 у регуляції біосинтетичних та сигнальних процесів, пов'язаних із фотосинтезом та метаболізмом цукрів.



Рис. 7. Рівні експресії *KIN10* у різних органах *A. thaliana* (Col-0).

Примітка: дані подано у вигляді М $\pm$ m;  $p \le 0.05$ .

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



Рис. 8. Рівні експресії КІN10 через 2, 8 та 24 год за дії сольового, осмотичного та енергетичного стресів Примітка: дані подано у вигляді M ± m; p ≤ 0,05

Аналіз росту та розвитку головних коренів трансгенних ліній А. thaliana з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена KIN10. Нами було проаналізовано зміни росту та розвитку головних коренів проростків трансгенних ліній A. thaliana з гіперекспресією та РНК-інтерференцією KIN10 і дикого типу (Col-0) за нормальних умов та за умов енергетичного стресу. Серед всіх досліджених ліній A. thaliana найбільшою довжиною коренів як на стандартному середовищі МС, так і на середовищі МС без сахарози характеризувались проростки дикого типу (Col-0) (рис. 9).



Рис. 9. Показники довжини головних коренів проростків ліній *A. thaliana* з гіперекспресією (ОХ) та РНК-інтерференцією (РНКі) гена *KIN10* (по вертикалі, мм) на середовищі МС з сахарозою (А) та на середовищі МС без сахарози (Б). Контроль - *A. thaliana* (Col-0); по горизонталі - час, год Примітка: дані подано у вигляді М±т; р ≤ 0,05.

У лінії з гіперекспресією *KIN10* (OX) на середовищі без сахарози зафіксовано в два рази вищий показник довжини коренів, ніж на середовищі MC з сахарозою. У проростків лінії з PHK-інтерференцією гена *KIN10* (PHKi) на середовищі MC без додавання сахарози порівняно з проростками з гіперекспресією *KIN10* зафіксовано в два рази нижчий показник довжини

коренів через 0 та 24 год. Довжина коренів у проростків з РНКінтерференцією була майже в три рази меншою порівняно з проростками з гіперекспресією через 48 та 72 год вирощування. На середовищі МС з сахарозою у проростків з РНК-інтерференцією довжина коренів була більшою в чотири та п'ять разів (через 0 та 24 год) та в сім та дев'ять разів (через 48 та 72 год) порівняно з проростками, що росли на середовищі без сахарози.

Головні корені проростків з РНК-інтерференцією на середовищі МС з сахарозою порівняно з диким типом були потовщені та мали надмірну кількість кореневих волосків (рис. 10).



Рис. 10. Морфологічні зміни коренів проростків ліній А. різних thaliana, вирощених на середовищі МС з сахарозою (1), та проростків, вирощених на середовищі МС без сахарози (2): **А** - дикий тип *A*. *thaliana* (Col-0); Б - проростки з РНК-інтерференцією *KIN10*; B проростки 3 гіперекспресією *KIN10*: Масштаб – 1мм

На середовищі МС без сахарози лінія з РНК-інтерференцією та дикий тип мали малу кількість кореневих волосків. У проростків з гіперекспресією *KIN10* спостерігали протилежний ефект. На середовищі МС з сахарозою корені цієї лінії були потовщені та мали малу кількість кореневих волосків. На середовищі МС без додавання сахарози корені проростків з гіперекспресією *KIN10* характеризувались нормальною морфологією, але у них спостерігали короткі кореневі волоски.

Зміни мітотичного індексу клітин проростків мутантних ліній kin10 та kin11 A. thaliana за умов енергетичного стресу. Мітотичний індекс клітин кореневої апікальної меристеми були нижчими в проростках мутантних ліній kin10 та kin11 порівняно з диким типом. Зокрема, вони були майже в три рази нижчими при вирощуванні на середовищі з сахарозою. За умов енергетичного дефіциту мітотичний індекс також був нижчий в обох мутантних лініях (в п'ять разів) (рис. 11). У мутантів, що росли за умов енергетичного дефіциту, фіксували нижчий мітотичний індекс, ніж в проростках, що росли за нормальних умов.



Рис. 11. Показники мітотичного індекса кореневої меристеми апікальної клітин *A. thaliana* (Col-0) та мутантних ліній kin10 та kin11, що росли за нормальних умов та за VMOB енергетичного стресу (без додавання сахарози).

Примітка: дані подано у вигляді M ± m; p ≤ 0,05.

Також лініях kin10 мутантних kin11 було В нокаутних та проаналізовано кореляцію рівнів експресії маркерних генів клітинної проліферації за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту (рис. 12). Для цього використовували маркерні гени клітинної проліферації СҮСВ1;1 та AtBRCA1. Встановлено, що у обох мутантних ліній рівні експресії генів СҮСВ1;1 та AtBRCA1 були нижчими, ніж у дикого типу. Зокрема, у лінії kin10 за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами експресія була нижчою як у СҮСВ1;1 (майже в чотири рази), так і у AtBRCA1 (приблизно в сім разів). У мутантній лінії kin11 експресія також була нижчою як у СҮСВ1;1 (майже в три рази), так і у AtBRCA1 (майже в п'ять разів) за умов енергетичного дефіциту порівняно з нормальними умовами.



Рис. 12. Рівні експресії маркерних генів СҮСВ1;1 та AtBRCA1 у контрольній та мутантних лініях 7-денних проростків thaliana Α. 3 експресією нокаутованою *KIN10* та *KIN11*: Α за нормальних умов; Б - за умов енергетичного дефіциту

Примітка: дані подано у вигляді M ± m; p ≤ 0,05. Також було проведено порівняння рівнів експресії генів *KIN10* та *KIN11* у клітин суспензійної культури *A. thaliana* та в інтактних проростках. Відомо, що суспензійні клітини *A. thaliana* характеризуються високим мітотичним індексом у порівнянні із клітинами інтактних проростків. На нашу думку, цей показник також може корелювати з рівнем експресії генів досліджуваних протеїнкіназ KIN10 та KIN11.



Рис. 13. Рівні експресії KIN10 генів та KIN11 по відношенню до конститутивного експресії рівня гена актину (AtActin) у 7-денних проростках A. thaliana (Col-0) та 7-денній суспензійній культурі A. thaliana Примітка: дані подано у вигляді М ± m; р ≤ 0,05

У клітинах суспензійної культури *A. thaliana* було зафіксовано вищі (майже в 2,5 рази) рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* у порівнянні з інтактними проростками (рис. 13). Для підтвердження того, що суспензійна культура має високий мітотичний індекс, порівнювали також рівні експресії маркерних генів клітинної проліферації – *CYCB1;1* та *AtBRCA1* - у суспензійній культурі клітин *A. thaliana* та в інтактних проростках (рис. 14). Було ідентифіковано вищий рівень експресії *CYCB1;1* та *AtBRCA1* саме у суспензійній культурі. Отримані дані підтверджують високий рівень клітинної проліферації в суспензійній культурі.



Рис. 14. Рівні експресії генів CYCB1 маркерних та AtBRCA1 відношенню по ЛО конститутивного рівня експресії гена актину (AtActin) у 7-денних проростках A. thaliana (Col-0) та 7-денній суспензійній культурі A. thaliana

Примітка: дані подано у вигляді M ± m; p ≤ 0,05

**Розподіл** *ү***-тубуліну в клітинах коренів нокаутних мутантів та колокалізація білка KIN10 з** *ү***<b>-тубуліном в клітинах кореня** *А. thaliana*. Для визначення інтенсивності флуоресценції *ү*-тубуліну в меристематичних клітинах мутантних ліній проростки вирощували за нормальних умов (у присутності сахарози) та за умов енергетичного стресу (рис. 15).



Рис. 15. Розподіл інтенсивності флуоресценції γ-тубуліну в меристематичних клітинах коренів мутантних ліній *kin10* та *kin11 A. thaliana*: **A** - вирощених за нормальних умов; **Б** - за умов енергетичного дефіциту

В мутантних ліній було зафіксовано нижчий рівень флуоресценції  $\gamma$ тубуліну, ніж в Col-0, — як за нормальних умов, так і за умов енергетичного стресу. Інтенсивність флуоресценції  $\gamma$ -тубуліну була нижчою (майже в 2 рази для *kin10* та в 0,5 рази для *kin11*) у мутантних ліній, вирощених за умов енергетичного дефіциту, порівняно з контролем (рис. 16).



Рис. 16. Інтенсивність флуоресценції  $\gamma$ -тубуліну (M±m; p  $\leq$  0,05) в клітинах коренів мутантних ліній *kin10* та *kin11* і дикого типу *A. thaliana* 

Також для оцінки можливостей взаємодії каталітичної субодиниці KIN10 з у-тубуліном досліджували колокалізацію KIN10 та у-тубуліну в коренів проростків Результати клітинах А. thaliana (рис. 17). імунофлуоресцентного аналізу свідчать про колокалізацію сигналів від мічених специфічними антитілами антигенів – у-тубуліну та KIN10 – в Така колокалізація флуоресцентних сигналів від цитоплазмі клітин. у-тубуліну та KIN10 може свідчити про безпосередню функціональну взаємодію цих двох білків в досліджуваних клітинах.



Рис. 17. Результати імунофлуоресцентної мікроскопії клітин коренів A. thaliana (Col-0) з використанням моноклональних антитіл проти ү-тубуліну та KIN10: А – флуоресценція γтубуліну (зелений сигнал, FITCканал); Б – флуоресценція KIN10 (червоний сигнал, TRITC-канал); В – колокалізація флуоресценції ү-тубуліну та KIN10.

Масштаб – 50 мкм

Зниження інтенсивності флуоресценції γ-тубуліну в меристематичних клітинах коренів нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* може свідчити про

зниження мітотичної активності в клітинах цих рослин. Проте інтенсивність флуоресценції γ-тубуліну та мітотичного індексу в нокаутних мутантів *kin10* були нижчими, ніж в *kin11*. Такі результати можуть підтверджувати важливу роль досліджуваних протеїнкіназ також і у процесах клітинного поділу рослин.

Ідентифікація та реконструкція локалізації потенційного сайту фосфорилювання  $\gamma$ -тубуліну протеїнкіназою KIN10 в структурі малого комплексу  $\gamma$ TuSC *A. thaliana.* По гомології з раніше встановленим сайтом фосфорилювання  $\gamma$ -тубуліну протеїнкіназою BRSK1 було підтверджено можливість фосфорилювання залишку Сер-131  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana* за участю протеїнкінази KIN10. Нами встановлено, що цей сайт присутній лише в обох ізоформах  $\gamma$ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) та, відповідно, відсутній у  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубулінах (рис. 18).

	Kin10
TBA1 ARATH P1113 TBA2 ARATH B9DG7 TBA3 ARATH 056WF TBA4 ARATH 00WV2 TBA5 ARATH B9DH0 TBA6 ARATH P2951	<ul> <li>121-RLRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142</li> <li>121-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142</li> <li>121-RVRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142</li> <li>121-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142</li> <li>121-RVRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142</li> <li>121-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142</li> </ul>
TBB1 ARATH P1241 TBB2 ARATH Q56YW TBB3 ARATH Q9ASH TBB4 ARATH P2463 TBB5 ARATH P2951 TBB6 ARATH P2951 TBB7 ARATH P2951 TBB8 ARATH P2951 TBB8 ARATH P2951	120-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-141           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENSDCLOGFOVCHSL-140           120-VVRKEAENSDCLQGFQVCHSL-140           120-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-141           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140           119-VVRKEAENCDCLQGFQVCHSL-140
TBG1 ARATH P3855 TBG2 ARATH P3855	7 121-MIDREADGSDSLEGFVLCHSI-142 121-MIDREADGSDSLEGFVLCHSI-142

Рис. 18. Вирівнювання всіх ізоформ тубуліну *A. thaliana* відповідного до сайту фосфорилювання ( $Xp \pm 10$ ) по залишку Cep-131 (TUBG1 та TUBG2).

Шляхом реконструкції 3D-структури  $\gamma$ -тубулінового комплексу  $\gamma$ TuSC A. thaliana було продемонстровано, що залишок Cep-131 експонується на поверхні молекул обох ізоформ  $\gamma$ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2). Результати аналізу топології цього комплексу свідчать про те, що фосфорилювання залишку Cep-131 може визначати взаємодію обох ізоформ  $\gamma$ -тубуліну (рис. 19). Відповідно, подібні зміни можуть впливати на структуру малого  $\gamma$ -тубулінового комплексу  $\gamma$ TuSC у A. thaliana, а також на подальше формування кільцевого  $\gamma$ -тубулінового комплексу  $\gamma$ TuRC, що є одним із критичних етапів регуляції поділу клітин.



Рис. 19. Зовнішня проекція фрагменту γTuRC (три об'єднані γTuSC) центру первинної нуклеації мікротрубочок *А. thaliana* з позначенням локалізації амінокислотного залишку Сер-131 (обведено жовтим) як вірогідного сайту фосфорилювання протеїнкіназою KIN10 на поверхні молекул TUBG2 та TUBG1.

Таким чином, отримані результати демонструють важливу роль протеїнкіназ KIN10 та KIN11 в процесах росту та розвитку *A. thaliana*.

#### ВИСНОВКИ

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

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

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

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

4. Виявлено, що у рослин *A. thaliana* дикого типу (Col-0), які росли в умовах сольового, осмотичного та енергетичного стресів протягом 2-24 год, рівні експресії гена *KIN10* суттєво змінювались. Найнижчий рівень його експресії було зафіксовано через 2 год, а вже через 8 год відбувалось підвищення рівня експресії в п'ять разів. Однак через 24 год спостерігали зниження рівня експресії гена *KIN10* на 20-30% порівняно з рівнем експресією *KIN10*, який мав місце через 8 год з початку експерименту. Такі результати свідчать про потенційну роль KIN10 у формуванні відповіді рослин на досліджувані стресові чинники в перші 8 год їх дії.

Продемонстровано, трансгенні 5. що лінії Α. thaliana 3 гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена KIN10 характеризувалися меншою довжиною коренів у порівнянні з довжиною коренів рослин дикого типу. Енергетичний дефіцит був критичним фактором для росту коренів проростків лінії з РНК-інтерференцією, але корені проростків лінії з гіперекспресією гена KIN10 мали в два рази більшу довжину за умов цього стресу. Отримані результати свідчать на користь того, що як надмірна, так і пригнічена експресія гена KIN10 може негативно впливати на нормальний ріст коренів як за умов енергетичного дефіциту, так і за нормальних умов.

6. Встановлено, що мітотичний індекс та рівні експресії маркерних генів клітинної проліферації *СYCB1;1 та AtBRCA1* характеризувались нижчими значеннями у нокаутних ліній *kin10* та *kin11* порівняно з контролем як за нормальних умов, так і за умов енергетичного дефіциту. Отримані результати свідчать про те, що протеїнкінази KIN10 та KIN11 задіяні у процесах проходження мітозу рослинними клітинами.

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

Продемонстровано, потенційне ЩО фосфорилювання 8. обох ізоформ у-тубуліну (TUBG1 і TUBG2) А. thaliana по залишку Сер-131, який експонується на поверхні їх молекул, за участю протеїнкінази KIN10 може впливати на структуру малого у-тубулінового комплексу уTuSC та на подальше формування кільцевого у-тубулінового комплексу уTuRC. Таким формування чином. змінюючи структуру та процес у-тубулінових комплексів, протеїнкіназа KIN10 може впливати на подальші процеси клітинного поділу.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Краснопьорова О.Є.**, Новожилов Д.О., Блюм Я.Б., Ісаєнков С.В. Створення плазмідної конструкції протеїнкінази AtKIN10, злитої із RFP для дослідження клітинної локалізації цього ферменту. Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. 2014;84:95–99. (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

2. Краснопьорова О.Є., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вивчення клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 з Arabidopsis thaliana. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;17:55–58. (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

3. Краснопьорова О.Є., Карпов П.А., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази КІN10 та особливості її експресії у різних органах *Arabidopsis thaliana*. Доповіді НАН України. 2016;1:81–91. doi:10.15407/dopovidi2016.01.081 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

4. **Krasnoperova E.E.**, Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume Ya.B. Influence of protein kinase KIN10 gene expression on root phenotype of *Arabidopsis thaliana* root system under condition of energy stress. Cytol. Genet. 2016;50(4):215–220. doi:10.3103/S009545271604006X (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

5. Краснопьорова О.Є., Ісаєнков С.В., Карпов П.А., Ємець А.І. Нові генетичні конструкції *KIN10-HIS/KIN11-HIS* як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкіназ SnRK1 та BRSK1. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:68–72. (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

6. Karpov P.A., Rayevsky A.V., **Krasnoperova E.E.**, Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume YaB. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants. Cytol. Genet. 2017;51(6):415–421. doi:10.3103/S0095452717060056 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

7. **Krasnoperova E.E.,** Buy D.D., Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume YaB., Yemets AI. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*. Cytol. Genet. 2019;53(3):185–191. doi:10.3103/S0095452719030022 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

8. **Krasnoperova E.E.,** Goriunova I.I., Isayenkov S.V., Karpov P.A., Blume YaB., Yemets A.I. Potential involvement of KIN10 and KIN11 catalytic

subunits of the SnRK1 protein kinase complexes in the regulation of Arabidopsis  $\gamma$ -tubulin. Cytol. Genet. 2019;53(5):349–356. doi:10.3103/S0095452719050104 (Особистий внесок здобувача: опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

9. Краснопьорова О.Є., Новожилов Д.О., Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Клонування протеїнкінази КІN10 з *Arabidopsis thaliana*. Збірник тез доповідей міжнародної наукової конференції «Селекційно-генетична наука і освіта», 18-20 березня, Умань. 2013, с. 57–58.

10. Новожилов Д.О., **Краснопьорова О.Є.**, Ісаєнков С.В., Блюм Я.Б. Особливості росту та розвитку коренів проростків трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana*, що мають підсилену або пригнічену експресію гену протеїнкінази KIN10. Збірник тез доповідей міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2013: біологічні науки», 18-22 березня, Київ. 2013, с. 78.

11. Краснопёрова Е.Е., Новожилов Д.О., Исаенков С.В., Блюм ЯБ. Исследование роли протеинкиназы KIN10 в регуляции элементов цитоскелета. Збірник тез доповідей конференції «Биология наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых» 21-26 квітня, Пущино. 2013, с. 493.

12. **Krasnoperova E.E.,** Isayenkov S.V., Yemets A.I., Blume YaB. Expression profiling and cladistic analysis of serine/threonine protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana*. Abstracts of the International Conference for Young Scientists «Actual problems of microbiology and biotechnology», Odesa. 2015, p. 17.

13. Краснопьорова О.С., Курило В.В., Ісаєнков С.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Трансформація тютюну (*Nicotiana tabacum*) генами *KIN10-RFP* та *KIN10-GFP*. Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практична конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології», 3-7 жовтня, Вінниця. 2016, с. 248–249.

14. **Краснопьорова О.Є.**, Буй Д.Д., Ісаєнков С.В., Ємець А.І. Вивчення експресії КІN10 та КІN11 за умов дії сольового та осмотичного стресів. Збірник тез доповідей третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 16-18 травня, Київ. 2017, с. 14.

## АНОТАЦІЯ

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

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

Порівняно структури каталітичних субодиниць (KIN10 та KIN11) протеїнкіназ SnRK1 з протеїнкіназою BRSK1 людини. Результати

кластеризації каталітичних доменів всіх відомих протеїнкіназ A. thaliana та каталітичного домену протеїнкінази BRSK1 людини показують, шо протеїнкіназа KIN10 є найближчим рослинним гомологом BRSK1 людини. Показано внутрішньоклітинну локалізацію химерного білка KIN10-RFP в протопластах A. thaliana. Порівняно рівні експресії гена KIN10 в різних органах A. thaliana. Показано високий рівень транскриптів KIN10 в надземній частині рослини. Визначено динаміку експресії КІΝ10 за умов сольового, осмотичного та енергетичного стресів через 2, 8 та 24 год. Проаналізовано зміни росту та розвитку коренів проростків трансгенних ліній A. thaliana з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена KIN10 за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Зафіксовано низькі показники мітотичного індексу та флуоресценції γ-тубуліну в клітинах коренів нокаутних ліній *kin10* та kin11 A. thaliana за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Показано, що шляхом потенційного фосфорилювання у-тубуліну по Сер-131, протеїнкіназа KIN10 може впливати на структуру малого у-тубулінового комплексу vTuSC та на його подальше формування у кільцевий утубуліновий комплекс уTuRC, таким чином регулюючи процеси клітинного поділу.

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

#### АННОТАЦИЯ

# Краснопёрова Е.Е. Серин-треониновые протеинкиназы подсемейства SnRK1 (KIN10 и KIN11) *Arabidopsis thaliana*: особенности функционирования и участие в делении клеток. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2020

Сравнивали структуры каталитических субъединиц (KIN10 и KIN11) протеинкиназы SnRK1 с протеинкиназой BRSK1 человека. Результаты кластеризация каталитических доменов всех известных протеинкиназ A. thaliana и каталитического домена протеинкиназы BRSK1 человека показывают, что протеинкиназа KIN10 является ближайшим растительным гомологом BRSK1 человека. Показано внутриклеточную локализацию химерного белка KIN10-RFP в протопластах A. thaliana. Проанализированы уровни экспрессии гена KIN10 в разных органах A. thaliana. Высокий уровень зафиксирован транскриптов KIN10 надземной В части растения. Продемонстрировано корреляцию экспрессии KIN10 в условиях солевого, осмотического И энергетического стрессов через 2, 8 И 24 часа. изменения роста и развития Проанализированы корней проростков трансгенных линий A. thaliana с гиперэкспрессией и РНК-интерференцией гена *KIN10* в нормальных условиях и в условиях энергетического дефицита. Зафиксировано низкие показатели митотического индекса и флуоресценции

 $\gamma$ -тубулина в клетках корней нокаутных линий kin10 и kin11 A. thaliana при нормальных условиях и в условиях энергетического дефицита. Показано, что фосфорилирования ү-тубулина путем потенциального по Cep-131, протеинкиназа KIN10 может влиять на структуру малого у-тубулинового комплекса yTuSC и на его дальнейшее формирование в кольцевой уобразом регулируя процессы тубулиновых комплекс γTuRC, таким клеточного деления.

**Ключевые слова:** протеинкиназа SnRK1, γ-тубулин, уровень экспрессии, проростки *A. thaliana*, трансгенные линии, митотический индекс, флуоресценция.

#### **SUMMARY**

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

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

The structures of the catalytic subunits (KIN10 and KIN11) of SnRK1 protein kinase and human BRSK1 protein kinase were compared. The results of clusterization of the catalytic domains of all known A. thaliana protein kinases and the human BRSK1 protein kinase catalytic domain show, that KIN10 protein kinase is the closest plant homologue of human BRSK1. The intracellular localization of the KIN10-RFP chimeric protein in protoplasts of A. thaliana was shown. The levels of KIN10 expression in different organs of A. thaliana were analyzed. A high level of KIN10 transcripts in the aerial part of the plants was recorded. Correlation of KIN10 expression under conditions of salt, osmotic and energy stress after 2, 8 and 24 hours was demonstrated. Changes in the growth and development of the roots of seedlings of transgenic lines of A. thaliana with enhanced and suppressed expression of KIN10 under normal conditions and under conditions of energy deficiency were analyzed. Low levels of the mitotic index and fluorescence of  $\gamma$ -tubulin in the root cells of kin10 and kin11 knockout lines of A. thaliana under normal conditions and under conditions of energy deficiency were detected. It was shown that by potential phosphorylation of  $\gamma$ -tubulin on Ser-131, KIN10 protein kinase can affect the structure of the small  $\gamma$ -tubulin complex  $\gamma$ TuSC and its further formation in the ring  $\gamma$ -tubulin complex  $\gamma$ TuRC, thereby regulating cell division processes.

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