

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Карпов Павло Андрійович

УДК: 57.052.6:576.32/.36:576.311.348.7

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



П.А. Карпов

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович

Київ – 2020

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 ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2020.

Молекули α -, β - і γ -тубуліну характеризуються значною міжвидовою консервативністю послідовностей і просторових структур. Проте, незважаючи на безсумнівну подібність, навіть на рівні окремих організмів, мікротрубочки демонструють значне морфологічне різноманіття і функціональну пластичність. Фундаментом такої гетерогенності є тубуліновий код.

Концепція «тубулінового коду» сформувалась лише на початку ХХІ сторіччя і розуміється як функціональна гетерогенність мікротрубочок, що виникає за рахунок посттрансляційних модифікацій і природної гетерогенності молекул тубуліну. Поза сумнівом, серед численних посттрансляційних перетворень тубуліну, зворотне фосфорилування є одним з найбільш важливих і універсальних типів модифікацій. Відомо, що фосфорилування впливає на локальні конформації, електростатичні властивості, молекулярні інтерфейси і динамічну нестабільність мікротрубочок. Локальні зміни поверхні мікротрубочки за рахунок фосфорилування також регулюють взаємодію з асоційованими структурними і моторними білками. Незважаючи на прогрес у дослідженні ролі модифікацій тубуліну тварин і дріжджів, розуміння більшості фундаментальних аспектів фосфорилування тубуліну рослин і досі залишаються «сутінковою зоною» клітинної біології. У більшості випадків дослідження тубулінового коду

рослин охоплюють окремі протеїнкази і модифікації, а цільне розуміння кіному мікротрубочок рослин наразі знаходиться на етапі становлення.

Актуальне дисертаційне дослідження присвячено визначенню кола рослинних протеїнказ, причетних до безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну, визначенню їх сайтів і з'ясуванню ролі фосфорилування у формуванні тубулінового коду вищих рослин.

У тубуліну тварин і дріжджів існування численних сайтів фосфорилування було підтверджено даними мас-спектрометрії. Доведено, що фосфорилування тубуліну тваринного, дріжджового і рослинного походження здійснюється за залишками серину (S / Ser), треоніну (T / Thr) і тирозину (Y / Tyr) [499]. Консервативність молекул тубуліну свідчить, що більшість функціонально-важливих сайтів фосфорилування мали зберегти консервативність і функціональну роль. Проте, на рівні кіномів мікротрубочок відмінності більш очевидні. У тварин зазначені модифікації здійснюються протеїнказами серин-треонінової (S/T), тирозинової (Y) і дуальної (S/T/Y) специфічності. У рослин існують лише серин-треонінові (S/T) і дуальні (S/T/Y) протеїнкази. Кіноми рослин мають більш складну організацію, а окремі протеїнкази демонструють структурну відмінність. Проте, як засвідчило актуальне дослідження, більша частина протеїнказ, асоційованих з регуляцією клітинного циклу і системи мікротрубочок у *Homo sapiens* і *Arabidopsis thaliana*, виявляє консервативність каталітичних доменів. Під час філогенетичної кластеризації повного кіному арабідопсису, всі визначені протеїнкази тубулінового коду локалізувались у складі консервативного кластеру, що об'єднує протеїнкази регуляції мітотичного апарату і базових функцій клітини. Подібність каталітичних доменів протеїнказ тубулінового коду значно перевищує показники загальної подібності тотальних кіномів рослин і тварин. Така синергічна консервативність молекул тубуліну і протеїнказ тубулінового коду зумовлює ефективність біоінформатичного визначення сайтів

фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну та протеїнкіназ, здатних здійснювати зазначені модифікації. Поєднання біоінформатичних і традиційних лабораторних методів створює оптимальний тандем для ефективною анотації кіному мікротрубочок і протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин.

Метою роботи було визначення рослинних протеїнкіназ, причетних до безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну, з'ясування їх сайтів і наслідків фосфорилування цільових амінокислот у формуванні тубулінового коду вищих рослин.

За результатами дослідження було визначено коло протеїнкіназ, що причетні до регуляції цитоскелету, клітинного поділу і фосфорилування молекул тубуліну. Із використанням біоінформатичних, структурно-біологічних і експериментальних методів, визначено 19 протеїнкінази вищих рослин, що здатні до безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну.

Виконана повна і найбільш актуальна на початок 2021 року ревізія кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana* з врахуванням поточного стану депонування геномної і протеомної інформації. З'ясовано, що кіном арабідопсису нараховує 1021 протеїнкіназу (1022 каталітичних доменів) серин-треонінової і дуальної специфічності.

На підставі результатів спільної кластеризації протеїнкіназ людини, асоційованих з регуляцією системи мікротрубочок і клітинного поділу, та групи протеїнкіназ рослинного походження, було визначено групу рослинних гомологів. Встановлено, що у вищих рослин головна роль у регуляції клітинного поділу і системи мікротрубочок через безпосереднє фосфорилування молекул α -, β - і γ -тубуліну належить протеїнкіназам груп AGC, CMGC, CK2, CDPK-SnRK (CAMK/CRK, CDPK, SNF1) і CK1.

Зокрема, було визначено, що участь у фосфорилуванні α -, β - і γ -тубуліну належить трьом протеїнкіназам групи AGC (родина IRE – IREN1; родина S6K – KPK1 і KPK2), двом протеїнкіназам групи CMGC (CDK1 і YAK1), гетеротетрамерному холоензиму CK2 (субодиниці: SKA1 / SKA2 /

СКВ1 / СКВ2), ізотипу протеїнкінази СК1 – СКЛ6, протеїнкіназам SnRK1 α (KIN10 і KIN11), групі з дев'яти рослинних Ca²⁺-залежних протеїнкіназ: п'яти представникам родини СРК (СРК7 / At5g12480, СРК14 / At2g41860, СРК20 / At2g38910, СРК21 / AT4G04720, СРК32 / At3g57530), трьом представникам родини CDPK/CRK: CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) і представнику SnAK1-кіназ – GRIK2 (At5g60550).

Отримано докази, що CMGC-кінази CDKA1 (AT3G48750) і AtYAK1 (AT5G35980) є частиною тубулінового коду вищих рослин. Рослинна YAK1 здатна фосфорилювати тубулін і виступає функціональним еквівалентом протеїнкіназ Dugk1A людини, YAK1 дріжджів і MNB дрозофіли. Встановлено, що CDK1- і YAK1-залежне фосфорилування β -тубуліну за залишком Ser172 у ссавців, комах, грибів і вищих рослин є консервативним механізмом пригнічення інтеграції гетеродимеру $\alpha\beta$ -тубуліну в структуру протофіламенту мікротрубочки. Запропонована модель CMGC-залежної регуляції мікротрубочок рослин через безпосереднє фосфорилування протеїнкіназами: CDK1, YAK1 і СК2. З'ясовано, що СК2-залежне фосфорилування α -тубуліну *Trypanosoma equiperdum* і *A. thaliana* має ідентичний характер і може відбуватися за залишками Ser94 і Ser419. Проте, молекулярна динаміка і показники густини заряду свідчать про помітні зміни властивостей ділянок сайтів лише у випадку фосфорилування Ser419, що не впливає на внутрішні інтерфейси мікротрубочки, але регламентує взаємодію з моторними білками родини кінезинів.

Доведено, що AGC-залежне фосфорилування тубуліну здійснюється протеїнкіназами родин IRE (IREH1) і S6K (KPK1 і KPK2). Отримано докази, що центросомальне позиціонування і впізнавання сайтів рослинною протеїнкіназою IREH1 має дуальну природу, яка залежить від спільного функціонування N-кінцевого домену асоціації з мікротрубочками (MA_Ser / Thr_Kinase_dom) і каталітичного домену. Роль IREH1 як агента тубулінового коду підтверджується існуванням у рослин унікального MAST/IRE-

специфічного сайту фосфорилування γ -тубуліну за залишком Ser433, а структурна топологія доводить вплив зазначеної модифікації на структуру комплексу γ TuRC.

Актуальне дослідження підтвердило участь рослинних СК1-подібних протеїнкіназ в регуляції тубулінового цитоскелету. Проте, з 18 СК1-подібних протеїнкіназ арабідопсису, агентом тубулінового коду є лише ізотип SKL6 (AT4G28540).

Підтверджено роль Ca^{2+} -залежного фосфорилування в регуляції системи мікротрубочок вищих рослин. Було показано існування на поверхні усіх ізотипів β - і γ -тубуліну арабідопсису канонічних сайтів Ca^{2+} /CaM-залежних протеїнкіназ 2 (CaMK2): Thr312 – для β -тубуліну (TBB1-TBB9) і Ser32, Ser259, Ser321 і Ser376 – для γ -тубуліну (TBG1 і TBG2). Визначено, що Ca^{2+} -залежне фосфорилування Thr312 β -тубуліну може впливати на формування інтрадимерного контакту гетеродимеру $\alpha\beta$ -тубуліну. Було встановлено, що Ca^{2+} -залежне фосфорилування γ -тубуліну здатне впливати на структуру гетеротетрамерного комплексу γ TuSC і формування центрів первинної нуклеації мікротрубочок у рослин. Загалом, агентами тубулінового коду *A. thaliana* було визначено рослинні Ca^{2+} -залежні протеїнкінази СРК20 (At2g38910), СРК21 (AT4G04720), GRIK2 (At5g60550), CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580).

З'ясовано, що CDPK/CRK-специфічне фосфорилування залишків тирозину рослинного β -тубуліну (TBB2, TBB3 і TBB7) відбувається виключно у С-хвостовій ділянці молекул β -тубуліну і не впливає на інтерфейси тубулін-тубулінової взаємодії. На підставі структурного моделювання, була підтверджена відсутність впливу зазначених модифікацій на структуру мікротрубочки і їхня роль у формуванні унікальних інтерфейсів взаємодії з БАМ.

Вперше було отримано докази функціональної гомології рослинних (KIN10 і KIN11) і тваринних (BRK1 і BRK2) SNF1-залежних протеїнкіназ

SnRK1 α . Встановлено, що SNF1-залежне фосфорилування Ser131 γ -тубуліну рослин і ссавців має спільні риси і визначається як молекулярний механізм регуляції структури комплексу γ TuSC. Отримано експериментальні докази синергічного ефекту KIN10 і KIN11 на мітотичну активність, що, зокрема, було підтверджено на прикладі рослин з нокаутом відповідних генів (лінії SALK_139618C / *KIN10*^{KO} і SALK_127939C / *KIN11*^{KO}). Встановлено, що вплив SnRK1 α -специфічного фосфорилування на систему мікротрубочок вищих рослин реалізується не лише через безпосереднє фосфорилування γ -тубуліну, а також через фосфорилування асоційованого з мікротрубочками білка WDL2 та чотирьох кінезин-подібних білків – KN7M, KN7H, KN7F і KN14I.

За підсумками дослідження запропоновано узагальнюючу модель внеску фосфорилування в регуляцію структури і властивостей макромолекулярних комплексів α -, β - і γ -тубуліну.

Отримані результати суттєво розширюють і узагальнюють існуючі уявлення стосовно ролі протеїнкіназ в посттрансляційній регуляції системи мікротрубочок вищих рослин через безпосереднє фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну. В межах актуального дослідження створені і деталізовані бази даних повного кіному арабідопсису та кіному рослинних мікротрубочок. Визначені протеїнкінази поширюють перелік молекулярних мішеней спрямованого впливу на мікротрубочки вищих рослин. Визначено зв'язок фосфорилування певних залишків α -, β - і γ -тубуліну з модуляцією структури, функцій і властивостей мікротрубочок. Вплив на функціональність і активність визначених протеїнкіназ дозволяє змінювати мітотичну активність, ріст, полярність та форму клітин, активний транспорт везикул, гранул і органел, розходження хромосом у процесах мітозу і мейозу. Отримані дані служать підґрунтям для досліджень ролі сигнальних каскадів і впливу зовнішніх факторів на систему мікротрубочок. У свою чергу, це відкриває шляхи для практичного застосування отриманих знань у галузях

захисту рослин, селекції, біотехнології, медицини, генної інженерії. Отримані дані анотації кіномів доцільно використовувати як основу програмного інструментарію для прогнозування специфічності комерційних інгібіторів тваринних протеїнказ відносно рослинного кіному. На сьогодні аналогічний програмний інструмент KinMap (www.kinhub.org) існує лише для кіному *Homo sapiens*.

У межах дисертаційного дослідження було відпрацьовано алгоритми біоінформатичного пошуку генів протеїнказ. З метою функціональної анотації протеїнказ, знайдено оптимальні підходи комплексного використання біоінформатичних і лабораторних методів дослідження. Зокрема, було відпрацьовано протоколи філогенетичної реконструкції повних кіномів, функціональної анотації білків з невідомими функціями, порівняння окремих функціональних доменів і сайтів зв'язування лігандів, що у подальшому можливо застосовувати як базовий алгоритм дослідження ферментів посттрансляційної регуляції.

Ключові слова: рослина клітина, цитоскелет, посттрансляційні модифікації, фосфорилування, протеїнкази, тубулін, тубуліновий код, мікротрубочки, регуляція

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті:

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.org: 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.org/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 β -tubulin phosphorylation on Ser172 as canonical suppressing factor of microtubule growth. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2019; 24: 321-326. doi.org/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 кінезін-8/тубулін, участь у написанні статті*) **Q3**
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* γ -Tubulin. Cytol. Genetics. 2019. 53(5): 349-356. doi.org/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.org/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.org/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 α -tubulin in plants? Cytol. Genetics. 2018; 52 (2): 103-111. doi.org/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.org/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) Q1

11. Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for Ca^{2+} - and Calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. Cytol. Genetics. 2017; 51 (4): 239–246. doi.org/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. Ca^{2+} - та Ca^{2+} -Кальмодулін-залежні протеїнкінази - потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 323–328. doi.org/10.7124/FEEO.v20.788 (*Особистий внесок здобувача: 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.org/10.7124/FEEO.v20.736 (*Особистий внесок здобувача: участь в аналіз 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.org/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, Karpov PA, 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*) **Q1**

16. Karpov P, 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. Karpov PA, 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.org/10.1186/1471-2164-11-S1-S14 (*Особистий внесок здобувача: ідея дослідження, аналіз літературних джерел, виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті*)

18. Karpov PA, 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.org/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*) **Q3**

19. Bryantseva SA, Gavryushina ES, Yemets AI, Karpov PA, Blume YB, Drygin YF, Nadezhdina ES. MAST2-like proteinkinase from grape *Vitis vinifera*: Cloning of catalytic domain cDNA. Cytol. Genetics. 2010; 44 (4): 227–232. doi.org/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. Karpov 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*) **Q1**

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. Karpov 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.org/10.1186/1471-2164-11-s1-s14 (*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. Karpov 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.org/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)

Окремі розділи в книгах:

26. Karpov 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)

Тези:

1. 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.
2. Karpov P, Rayevsky A, Sulimenko V, Draber P, Blume Y. Plant MT-nucleation centers and protein kinases capable for γ 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
3. 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.
4. Demchuk O, Karpov P, Blume YB. Potential sites of posttranslational modifications of plant α/β -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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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>

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Sheremet Ya.A., Karpov P.A., Yemets A.I., Blume Ya.B. 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.

13. 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.

14. Raevsky AV, Karpov PA, Sheremet YA, Blume YB. Molecular docking of inhibitor D4476 in ATP-binding pocket of CK1δ 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. 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.

22. Karpov 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.

23. Karpov 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.

24. 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.

25. Karpov 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.

26. Karpov 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.

27. 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.

28. Karpov 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).

29. 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 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

30. 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

31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. Карпов ПА, Ємець 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.

38. 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.

SUMMARY

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

Thesis for Doctor of Science 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, 2020.

Members of α -, β - and γ -tubulin families demonstrate significant interspecific conservatism in sequences and spatial structures. However, despite the undoubted similarity, even at the level of individual organisms, microtubules (MT) demonstrate significant morphological diversity and functional flexibility. The base of such heterogeneity is the ‘tubulin code’.

The concept of the ‘tubulin code’ was formed only at the beginning of the XXI century and is understood as a functional heterogeneity of MTs, caused by post-translational modifications and natural heterogeneity of tubulin molecules. Undoubtedly, among the numerous posttranslational transformations of tubulin, phosphorylation is one of the most important and common types of modifications. Phosphorylation affects local conformations, electrostatic properties, molecular interfaces and dynamic instability of MTs. Caused by phosphorylation, local surface changes in MTs regulate interactions with MT-associated structural and motor proteins. Despite progress in understanding of mammalian and yeast tubulin, posttranslational modifications in animals and yeast, our knowledge of the most fundamental aspects of plant tubulin phosphorylation, are still remains the "twilight zone" of cell biology. In most cases, data on plant ‘tubulin code’ covers several protein kinases and sites, and the entire understanding of plant MT-kinome are still in its infancy.

The current doctoral thesis was devoted to determine the range of plant protein kinases involved in direct phosphorylation of plant α -, β - and γ -tubulin, their sites and elucidation of their role in ‘tubulin code’ formation.

In animal and yeast tubulin, existence of numerous phosphorylation sites was confirmed by mass spectrometry. It is proved that phosphorylation of animal, yeast and plant tubulin occurs on serine (S / Ser), threonine (T / Thr) and tyrosine (Y / Tyr) residues. The conservatism of tubulin molecules suggests that most functionally important phosphorylation sites retain conservatism and function. However, MT-kinomes demonstrate more obvious differences. In animals, these modifications are performed by serine-threonine (S/T), tyrosine (Y) and dual (S/T/Y) protein kinases. In plants, there are only serine-threonine (S/T) and dual (S/T/Y) protein kinases. However, plant kinomes have more complex organization, and individual protein kinases demonstrate structural differences. However, this study showed that most of protein kinases associated with cell cycle and microtubule system regulation in *Homo sapiens* and *Arabidopsis thaliana* demonstrate conservatism of their catalytic domains. Phylogenetic clustering of *Arabidopsis* kinome, indicate, that all identified ‘tubulin code’ kinases located in conservative cluster, formed by protein kinases, regulating mitotic apparatus and basic cell functions. At the same time, the similarity rates of catalytic domains of ‘tubulin code’ kinases are significantly exceeds the same rates for total plant and mammalian kinomes. Such joint conservatism of tubulin molecules and ‘tubulin code’ kinases, determines the effectiveness of bioinformatical search for tubulin phosphorylation sites and protein kinases, associated with these modifications. The combination of bioinformatical and laboratory methods form an optimal tandem for effective annotation of plant MT-kinomes and ‘tubulin code’ kinases.

The objective of the study was to identify plant protein kinases involved in direct phosphorylation of α -/ β -/ γ -tubulin and kinase-specific phosphorylation sites, to elucidate their function in plant ‘tubulin code’.

The protein kinases, involved in the cytoskeleton, cell division and phosphorylation of tubulin were determined. 19 plant protein kinases, capable of direct phosphorylation of α -, β - and γ -tubulin were identified based on joint use of bioinformatical efforts and experimental methods.

Novelty statement. It was performed, most complete revision of *Arabidopsis thaliana* kinom, taking into account actual state of genomic and proteomic information (beginning of 2021). It was considered that *Arabidopsis* kinom is represented by 1,021 protein kinases (1,022 catalytic domains) of serine-threonine and dual specificity.

Plant homologues of human MT- and cell division kinases were selected based on results of blast scoring and joint clustering. It was found that in higher plants, a major role in regulation of cell division and MT system by direct phosphorylation of α -, β - and γ -tubulin are associated with protein kinases of AGC, CMGC, CK2, CDPK-SnRK groups (CAMK / CRK, CDPK, SNF1) and CK1 family.

It was concluded that in higher plants, phosphorylation of α -, β - and γ -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 α (KIN10 and KIN11), NIMA-kinase NEK6 (NEK family), and 9 plant Ca²⁺-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.

The CMGC protein kinases CDKA1 (AT3G48750) and AtYAK1 (AT5G35980) have been shown to be enzymes of 'tubulin code' in plant. It was found that plant AtYAK1 phosphorylate tubulin and acts as a functional counterpart of human Dyrk1A, yeast YAK1 and fruit fly MNB. It was established that CDK1 and YAK1-dependent phosphorylation of β -tubulin on Ser172 is the conserved mechanism of microtubules dissociation in worms, insects and fungi. It was proposed the model of CMGC-dependent regulation of microtubules, based on joint activity of CDK1, YAK1 and CK2. It was found that CK2-dependent phosphorylation of α -tubulin occur on Ser94 and Ser419 and identical in *Trypanosoma equiperdum* and *A. thaliana*. However, molecular dynamics and charge density indicate significant local changes only in the case of Ser419, which

does not affect the internal interfaces of microtubule, but regulates the interactions with MT-motor proteins of the kinesin family.

It was concluded that in AGC-dependent phosphorylation of α -, β - and γ -tubulin associated with IRE (IREH1) and S6K (KPK1 i KPK2) protein kinases. It was found that the MT-nucleation center positioning and recognition of phosphorylation sites by plant protein kinase IREH1 depends on the joint efforts of N-terminal domain of MT-association (MA_Ser / Thr_Kinase_dom) and the catalytic domain. The role of IREH1 as a ‘tubulin code’ agent is confirmed by the existence in plants of a unique MAST / IRE-specific site of γ -tubulin phosphorylation at the Ser433. The structural topology of Ser433, allow associating its phosphorylation with regulation of plant γ TuRC.

It was concluded the role of plant CK1-dependent phosphorylation with tubulin cytoskeleton regulation. However, of the 18 CK1-like protein kinases of *Arabidopsis*, only one isotype - CKL6 (AT4G28540) was proved as the ‘tubulin code’ agent.

It was concluded the role of Ca^{2+} -dependent phosphorylation with plant tubulin cytoskeleton regulation. It was proved the existence of canonical sites of Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinases 2 (CaMK2): Thr312 - for β -tubulin (TBB1-TBB9) and Ser32, Ser259, Ser321 and Ser376 tubulin (TBG1 and TBG2). It was determined that Ca^{2+} -dependent phosphorylation of β -tubulin on Thr312 can affect the formation of intradimeric contact of tubulin heterodimer. It was found that Ca^{2+} -dependent phosphorylation of γ -tubulin can affect the structure of the heterotetrameric complex γ TuSC and formation of centers of primary MT-nucleation in plants. In general, plant Ca^{2+} -dependent protein kinases: CPK20 (At2g38910), CPK21 (AT4G04720), GRIK2 (At5g60550), CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) and CRK8 were identified as agents of the ‘tubulin code’ of *A. thaliana*.

CDPK / CRK-specific phosphorylation of plant β -tubulin on tyrosine residues (TBB2, TBB3 and TBB7) was found to occur exclusively in the C-tail region of β -

tubulin and did not affect the tubulin-tubulin molecule interfaces. Based on the structural modeling, it was demonstrated the absence of the influence of these modifications on the structure of the microtubules and associate their role with formation of unique interfaces of interaction with MAPs.

For the first time, it was proposed the functional homology of plant (KIN10 and KIN11) and animal (BRSK1 and BRSK2) SNF1-dependent protein kinases SnRK1 α . It was found that SNF1-dependent phosphorylation of γ -tubulin on Ser131, have common features and regulate structures of plant and mammalian γ TuSC complexes. The synergistic effect of KIN10 and KIN11 on mitotic activity of *A. thaliana*, was confirmed using knockout plants (lines SALK_139618C / *KIN10*^{KO} and SALK_127939C / *KIN11*^{KO}). It was found that SnRK1 α -specific phosphorylation affects plant MTs not only by direct phosphorylation of γ -tubulin, but also indirectly, phosphorylating microtubule-associated protein WDL2 and kinesin-like proteins - KN7M, KN7H, KN7F and KN14I.

The results of the study, allow us to propose the model, describing the contribution of phosphorylation in plant ‘tubulin code’.

Practical relevance. The results, presented the current doctoral thesis, significantly expand and generalize conception of plant ‘tubulin code’ and the role of α -, β - and γ -tubulin phosphorylation in regulation of the microtubule system in higher plants. Within current study it was created and specified the databases of complete *Arabidopsis thaliana* kinom and protein kinases, associated with plant microtubules. The relationship between phosphorylation of certain α -, β - and γ -tubulin residues and modulation of the structure, functions and properties of microtubules has been determined. Regulation of functionality and activity of protein kinases, acting ‘tubulin code’ enable to modify mitotic activity, growth, polarity and shape of cells, active transport of vesicles, granules and organelles, chromosome divergence in mitosis and meiosis. The obtained data contribute the studies of plant signaling cascades and effect of external factors on plant microtubule system. In turn, this opens the way for practical application of the current findings in the fields

of plant protection, breeding, biotechnology, medicine, genetic engineering etc. Current annotation of *A. thaliana* kinom, should be used as the basis for software, predicting plant molecular targets of commercial protein kinase inhibitors, initially developed of mammalian protein kinases. At the present time, a similar tool - KinMap (www.kinhub.org) exists only for human kinom.

As a part of this research, bioinformatics protocol for the identification of new protein kinases was developed. The optimal approaches, for functional annotation of plant protein kinases, based on joint use of bioinformatical and laboratory methods were found. The protocols of phylogenetic reconstruction of complete kinoms, functional annotation of unknown proteins, comparison of functional domains and ligand-binding sites, can be used as a regular algorithm of an enzymatic post-translational regulation research.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	36
ВСТУП.....	40
РОЗДІЛ 1. Фосфорилювання як складова частина тубулінового коду.....	52
1.1. Тубуліновий код як основа функціональної спеціалізації мікротрубочок.....	52
1.2. Фосфорилювання як ключовий вид посттрансляційних модифікацій тубуліну.....	53
1.2.1. Молекулярний механізм і функціональна роль фосфорилювання.....	55
1.2.2. Особливості фосфорилювання у рослин	57
1.2.3. Фундаментальні особливості кіномів рослин.....	58
1.2.4. Роль фосфорилювання в регуляції цитоскелету	62
1.2.5. Консервативні аспекти і відмінності фосфорилювання тубуліну у рослин і інших еукариотичних організмів.....	64
1.2.6. Протеїнкінази, причетні до фосфорилювання тубуліну і регуляції тубулінового цитоскелету.....	67
1.2.7. Протеїнкінази, причетні до регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок.....	71
РОЗДІЛ 2. Кіном мікротрубочок і роль окремих протеїнкіназ.....	75
2.1. Група протеїнкіназ AGC і їх роль в регуляції тубулінового цитоскелету.....	75
2.1.1. AGC-залежне фосфорилювання тубуліну.....	75
2.1.2. PDK1 (3-фосфоінозитид-залежна протеїнкіназа-1).....	77
2.1.3. Рецепторні протеїнкінази, асоційовані з G-білками (G-protein-coupled receptor kinases).....	78
2.1.4. Серин-треонінові протеїнкінази, асоційовані з мікротрубочками (MAST - Microtubule Associated Serine/Threonine protein kinases)	79

2.1.5.	Родина NDR (Nuclear Dbf2-related).....	81
2.1.6.	PRho-асоційовані протеїнкінази ROCK1 і ROCK2.....	83
2.1.7.	Протеїнкінази С (Protein kinase C).....	83
2.1.8.	Протеїнкіназа С-подібні кінази.....	84
2.2.	Вклад протеїнкіназ групи CMGC в регуляцію системи мікротрубочок і безпосередньо в тубуліновий код.....	85
2.2.1.	CMGC-залежна регуляція тубулінового коду і системи мікротрубочок.....	86
2.2.1.1.	Циклін-залежні протеїнкінази (CDKs). Підродина CDC2/CDKX.....	87
2.3.1.2.	Мітоген-активовані протеїнкінази (MAPKs).....	88
2.3.1.3.	Глікоген-синтази кінази 3 (GSK-3).....	89
2.3.1.4.	YAK1-подібні протеїнкінази подвійної специфічності (Dual specificity YAK1-related kinases, MNB / DYRK).....	89
2.3.	Вклад казеїнкінази 2 в тубуліновий код.....	92
2.4.	Вклад представників родини Казеїн кіназа 1 в регуляцію тубулінового цитоскелета і безпосередньо в тубуліновий код.....	95
2.5.	Роль протеїнкіназ BUB1 в регуляції системи мікротрубочок і мітотичного апарату клітини.....	99
2.6.	Вклад супер-родини протеїнкіназ CDPK-SnRK в тубуліновий код вищих рослин.....	101
2.6.1.	Вклад кальцій-залежного фосфорилування в регуляцію рослинного цитоскелету.....	103
2.6.2.	Вклад SNF1-залежного фосфорилування в регуляцію цитоскелету	106
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....		110
3.1.	Загальний огляд матеріалів і методів, що були застосовані під час виконання дисертаційного дослідження.....	110
3.1.1.	Досліджуваний матеріал.....	110
3.2.	Методи дослідження.....	112
3.2.1.	Відбір цільових і еталонних послідовностей.....	112

3.2.2.	Пошук і відбір рослинних гомологів.....	112
3.2.3.	Вирівнювання амінокислотних послідовностей.....	113
3.2.4.	Аналіз доменної архітектури.....	114
3.2.5.	Кладистичний аналіз і реконструкція філогенетичних дерев.....	114
3.2.6.	Аналіз білок-білкових взаємодій.....	115
3.2.7.	Пошук і аналіз сайтів специфічного фосфорилювання.....	115
3.2.8.	Профільний пошук сайтів специфічного фосфорилювання молекул тубуліну.....	117
3.2.9.	Моделювання і структурно-біологічне дослідження просторової структури білків і їх комплексів.....	118
3.2.10.1.	Моделювання просторової структури протеїнкіназ	119
3.2.10.2.	Моделювання просторової структури молекул і макромолекулярних комплексів тубуліну.....	125
3.2.11.	Структурно-біологічне оцінювання сайтів специфічного фосфорилювання молекул тубуліну.....	128
3.2.11.1.	Аналіз структурної топології сайтів AGC-специфічного фосфорилювання молекул тубуліну.....	129
3.2.11.2.	Аналіз структурної топології сайтів CMGC- і SK2-специфічного фосфорилювання молекул тубуліну.....	129
3.2.12.	Реконструкція ліганд-білкових комплексів.....	130
3.2.13.	Інструменти для візуалізації, вирівнювання і аналізу структурних моделей.....	134
3.2.14.	Обчислювальні ресурси.....	134
3.3.	Протоколи лабораторних досліджень.....	134
3.3.1.	Протокол клонування і пріжиттєвого дослідження AGC-кінази GMLK винограду в тваринних клітинах лінії 'Vero' рослинної.....	136
3.3.2.	Протокол клонування і пріжиттєвого дослідження GFP-конструкту рослинної протеїнкінази IREN1 в моделях тваринних клітин.....	139

3.3.3.	Протокол дослідження впливу селективного інгібування протеїнкіназ СК1 на систему мікротрубочок і морфологію коріння <i>A. thaliana</i>	143
3.3.4.	Дослідження зв'язку рослинної протеїнкінази BRK1 (BUB1) з регуляцією мітотичного апарату і системи мікротрубочок.....	145
3.3.5.	Протокол дослідження ролі SNF1/SnRK1-специфічного фосфорилування в регуляції системи мікротрубочок <i>A. thaliana</i>	146
3.4.	Статистична обробка отриманих даних.....	158
РОЗДІЛ 4. Біоінформатичний пошук рослинних протеїнкіназ, що беруть участь у фосфорилуванні білків мікротрубочок та регуляції клітинного поділу.....		159
4.1.	Реконструкція повного кіному <i>Arabidopsis thaliana</i>	159
4.1.1.	Пошук рослинних гомологів протеїнкіназ, асоційованих з регуляцією клітинного циклу і системи мікротрубочок у <i>Homo sapiens</i>	163
4.2.	Біоінформатичний пошук протеїнкіназ тубулінового коду на підставі наявності канонічних сайтів специфічного фосфорилування.....	170
РОЗДІЛ 5. Вклад протеїнкіназ AGC в тубуліновий код вищих рослин... 180		
5.1.	Визначення представників AGC-кіназ людини, які пов'язані з регуляцією цитоскелету і наявність їх гомологів у <i>A. thaliana</i>	180
5.2.	Протеїнкінази КРК1 і КРК2 як потенційні агенти тубулінового коду вищих рослин.....	185
5.3.	Консервативність сайтів GRK- і РК α -специфічного фосфорилування молекул тубуліну у людини і <i>A. thaliana</i>	186
5.3.1.	Порівняння структурної топології GRK-специфічних сайтів фосфорилування β -тубуліну людини і арабідопсису.....	189
5.3.2.	Порівняння структурної топології РК α -специфічного сайту фосфорилування α -тубуліну людини і арабідопсису.....	192

5.4.	Рослинні AGC-кінази КРК1 і КРК2 як функціональні еквіваленти агентів тубулінового коду - тваринних протеїнкіназ GRK і РКСа.....	194
5.5.	Участь MAST/IREH-подібних протеїнкіназ в регуляції тубулінового цитоскелету і їх вклад в тубуліновий код.....	203
5.5.1.	Біоінформатичний пошук рослинних гомологів MAST-подібних серин-треонин специфічних протеїнкіназ.....	203
5.6.	Клонування кДНК, що кодує каталітичний домен рослинної MAST2-подібної протеїнкінази GMLK з <i>Vitis vinifera</i> , та її експресія в тваринних клітинах.....	210
5.6.1.	Клонування кДНК каталітичного домену протеїнкінази GMLK.....	210
5.6.2.	Експресія конструкту рослинної протеїнкінази GMLK в клітинах <i>Chlorocebus aethiops</i> лінії 'Vero'.....	214
5.7.	Участь протеїнкінази IRE-кінази в модуляції тубулінового коду вищих рослин.....	216
5.7.1.	Порівняння рослинної протеїнкінази IREN1 з <i>Arabidopsis thaliana</i> і представників протеїнкіназ групи MAST	216
5.7.2.	Локалізація продукту експресії GFP-конструкту рослинної протеїнкінази IREN1 в клітинах тварин.....	222
5.7.3.	Визначення сайтів MAST / IREN1-специфічного фосфорилування ізотипів α -, β - і γ -тубуліну.....	229
5.8.	Узагальнення результатів пошуку сайтів MAST/IREN1-специфічного фосфорилування ізотипів α -, β - і γ -тубуліну і їх кореляція з результатами попередніх досліджень.....	237

РОЗДІЛ 6. Вклад CMGC-специфічного фосфорилування в тубуліновий код вищих рослин.....

6.1.	Зв'язок CMGC і CMGC-подібних протеїнкіназ з регуляцією системи мікротрубочок і фосфорилуванням тубуліну.....	244
6.2.	Результати пошуку рослинних DYRK-подібних протеїнкіназ на підставі гомології амінокислотних послідовностей.....	246

6.2.1.	Структурне порівняння каталітичних доменів рослинних Yak1-подібних протеїнкіназ і зв'язаної з цитоскелетом протеїнкінази DYRK1A людини.....	250
6.2.2.	Визначення у рослинних Yak1-подібних протеїнкіназ функціонально-важливих елементів структури, які притаманні канонічним представникам MNB/DYRK.....	251
6.2.3.	Порівняння АТФ-зв'язуючих карманів і механізмів взаємодії Dyrk1A людини і її рослинних гомологів з АТФ-конкурентними інгібіторами.....	257
6.2.4.	Підтвердження взаємодії тваринних і рослинних DYRK-подібних протеїнкіназ з лігандами на підставі результатів обрахунку молекулярної динаміки.....	261
6.3.	Роль MNB/DYRK-подібних протеїнкіназ в регуляції цитоскелету і вклад Dyrk1A в тубуліновий код.....	265
6.4.	Аналіз енергетичної складової SMGC - специфічного фосфорилування Ser172 рослинного β -тубуліну.....	270
6.5.	Внесок протеїнкінази SK2 в тубуліновий код вищих рослин на прикладі гомологів з <i>Arabidopsis thaliana</i>	273
6.5.1.	Ізотипи α - і β -субодиниць комплексу SK2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	273
6.5.2.	Пошук SK2-специфічних сайтів фосфорилування молекул тубуліна.....	277
6.5.3.	Дослідження впливу фосфорилування α -тубуліну казеїн-кіназою 2 (SK2) на властивості структури α/β -тубулінового димеру.....	286
6.6.	Внесок SMGC-подібних протеїнкіназ в тубуліновий код вищих рослин.....	288
РОЗДІЛ 7. Внесок SK1-специфічного фосфорилування в тубуліновий код вищих рослин.....		292

7.1.	Дослідження внеску протеїнкіназ SK1 в тубуліновий код вищих рослин на прикладі <i>Arabidopsis thaliana</i>	292
------	--	-----

7.1.1.	Морфофізіологічна відповідь первинного кореня проростків <i>Arabidopsis thaliana</i> на обробку СК1-специфічним інгібітором D4476.....	292
7.1.2.	Зв'язок морфофізіологічних реакцій первинного кореня <i>Arabidopsis thaliana</i> і перебудов тубулінового цитоскелету під впливом специфічного інгібування рослинних протеїнкіназ SKL	295
7.1.3.	Біоінформатичне визначення рослинних СК1-подібних протеїнкіназ, причетних до регуляції тубулінового коду і системи мікротрубочок.....	302
7.1.4.	СК1-подібні протеїнкінази <i>A. thaliana</i> , здатні взаємодіяти з мікротрубочками.....	315
7.2.1.	Біоінформаційний пошук рослинних гомологів протеїнкінази BUB1.....	317
7.2.2.	Експериментальне підтвердження протеїнкінази BUB1 як частини комплексу контролю збирання мітотичного веретена (SAC) та її необхідності для коректного проходження мітозу у <i>A. thaliana</i>	332
РОЗДІЛ 8. Дослідження внеску представників супер-родини протеїнкіназ CDPK-SnRK в тубуліновий код вищих рослин.....		340
8.1.	Прогнозування сайтів CaMK2-специфічного фосфорилування рослинного тубуліну на підставі відповідності канонічним НММ-профілям.....	340
8.2.	Аналіз експериментально-підтверджених сайтів Ca ²⁺ -залежного фосфорилування і визначення їх консервативних профілів.....	343
8.3.	Аналіз топології сайтів Ca ²⁺ -залежного фосфорилування α-, β- і γ-тубуліну.....	355
8.3.1.	Топологія сайтів СРК20-залежного фосфорилування і їх потенційний вплив на структуру мікротрубочки <i>A thaliana</i>	356
8.3.2.	Потенційний вклад СРК21-залежного фосфорилування в тубуліновий код <i>A thaliana</i>	359

8.3.3.	Потенційний внесок GRIK2-залежного фосфорилування в тубуліновий код <i>A. thaliana</i>	365
8.4.	Структурна топологія сайтів CDPK/CRK-специфічного фосфорилування залишків тирозину β -тубуліну <i>A. thaliana</i>	370
8.5.	Внесок SNF1-залежного фосфорилування в регуляцію рослинного цитоскелету.....	373
8.5.1.	Положення рослинних Snf1-кіназ в кіномі <i>A. thaliana</i>	373
8.5.2.	Пошук рослинних гомологів тваринної протеїнкінази BRSK1....	375
8.5.3.	Створення генетичних конструкцій <i>KIN10-His</i> і <i>KIN11-His</i> для імунологічного дослідження локалізації рослинних протеїнкіназ <i>SnRK1α</i>	382
8.5.4.	Органоспецифічна експресія <i>KIN10</i> на прикладі <i>A. thaliana</i>	383
8.5.5.	Вплив дисфункції генів <i>kin10</i> та <i>kin11</i> на мітотичний індекс проростків <i>A. thaliana</i>	385
8.5.6.	Вплив дисфункції генів <i>SnRK1α</i> на внутрішньоклітинну флюоресценцію γ -тубуліну та колокалізація KIN10 і γ -тубуліну в клітинах <i>A. thaliana</i>	393
8.5.7.	Роль SNF1/SnRK-специфічного фосфорилування в регуляції системи мікротрубочок <i>A. thaliana</i>	396
РОЗДІЛ 9. Аналіз та узагальнення результатів дослідження.....		407
ВИСНОВКИ		421
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		427
ДОДАТОК 1.....		499
ДОДАТОК 2.....		504
ДОДАТОК 3.....		506
ДОДАТОК 4.....		515
ДОДАТОК 5.....		516
ДОДАТОК 6.....		520

ДОДАТОК 7.....	529
ДОДАТОК 8.....	536

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

4xSB - NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)

Å – ангстрем

AGC - група протеїнкіназ родин: A (PKA), G (PKG) і C (PKC)

ALogP – коефіцієнт ліпофільності

AromRings – ароматичні кільця

ARP19 - cAMP-regulated phosphoprotein 19

CK1(α , β , γ 1, γ 2, γ 3, δ і ϵ) – казеїн-кіназа 1 (ізотипи: α , β , γ 1, γ 2, γ 3, δ і ϵ)

CKL (CK1-like) – казеїн-кіназа 1 подібна протеїнкіназа вищих рослин

Cy5 - Cyanine5

D4476 - 4-[4-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксін-6-іл)-5-(2-піридиніл)-1H-імідазол-2-іл]бензамід

DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) - живильне середовище DMEM з додаванням середовища F12 в співвідношенні 1:1

EDTA (ЕДТА) - етилендіамінтетраоцтова кислота

GFP або ЗФБ - Зелений флуоресцентний білок (Green Fluorescent Protein)

GRK (1 і 2) - Кінази рецепторів, спряжені з G-білками (G protein-coupled receptor kinase 1 і 2 / Rhodopsin kinase GRK1 і 2)

GWL (MASTL) - Serine/threonine-protein kinase greatwall (Microtubule-Associated Serine/Threonine-protein kinase Long)

HAC – важкі атоми

HBA – акцептори H^+

HBD – донори H^+

HEK293 - клітинна лінія ембріональної нирки людини «Human Embryonic Kidney 293»

HEPES - N-(2-гідроксиетил)піперазин-N'-(2-етансульфонова кислота)

HMM - Прихована модель Маркова (Hidden Markov Model)

IgG - Імуноглобуліни класу G

IREH1 - incomplete root hair elongation homolog 1

IRK - Insulin Receptor Kinase

Ki – коефіцієнт інгібування

KPK1 (2) - Ribosomal-protein S6 kinase homolog 1 (2)

MAST (1-4) - Microtubule-Associated Serine/Threonine-protein kinase (1-4)

mnb - minibrain kinase

МТОС (ЦОМТ) - Центр організації мікротрубочок (Microtubule Organizing Center)

MW – молекулярна вага

NEK6 - NIMA-related kinase 6

NJ - метод зв'язування або приєднання сусідів (Neighbor Joining)

ORF - Open Reading Frame / відкрита рамка зчитування

PBS - Phosphate-Buffered Saline / фосфатно-буферно сольовий розчин

PDK1 - 3-phosphoinositide-dependent kinase 1

РНЕМ буфер - 18.14 g Pipes, 6.5 g HEPES, 3.8 g EGTA, 0.99 g MgSO₄, pH 7.0 w/
KOH

PIPES - (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid))

PKC α - протеїнкіназа C α (Protein kinase C alpha type)

PSA – площа полярної поверхні

RGS - RGS домен (Regulation of G-protein Signalling, InterPro: IPR016137)

RMSD або RMS – середньоквадратичне відхилення атомів

RMSE - root-mean-square error / середньоквадратична погрішність

RotBonds – обертальні зв'язки

rpm (revolutions per minute) - швидкість обертання в оборотах за хвилину
(об / хв)

SDS - EDTA Disodium Salt Dihydrate (Динатрієва сіль ЕДТА)

sIBM - sporadic inclusion body myositis (= Inclusion body myositis (IBM)) / міозит тіла з спорадичним включенням)

mTOR - протеїнкіназа MTOR (mammalian target of rapamycin)

TransIT®-LT1 - Transfection Reagent (реагент для трансфекції ДНК)

TRITC - тетраметилродамін-ізотіоціанат

UPGMA - (Unweighted Pair Group Method with arithmetic Mean) метод незважених парних груп із середнім арифметичним

Vero - клітинна лінія епітелію нирки *Chlorocebus aethiops*

γ TuRC - γ -tubulin ring complex (великий комплекс центру первинної нуклеації мікротрубочок / комплекс кільця γ -тубуліну)

γ TuSC - γ -tubulin small complex (малий комплекс / мономер γ TuRC)

БАМ – білки, асоційовані з мікротрубочками (= MAP)

Да – дальтон

IC50 – концентрація речовини, що інгібує ріст або викликає загибель 50 % клітин *in vitro*

кДа – кілодальтон

кДж – кілоджоуль

КЕ – конформаційна енергія

МД – молекулярна динаміка

мкг (або μg) - мікрограм = 1×10^{-6} г

мкм - мікромметр (мікрон, μm) = 10^{-6} м

мкМ - мікромоль (μmol) = 10^{-6} моль/л

мкс - мікросекунда (μs) = 10^{-6} с

мс - мілісекунда (ms) = 10^{-3} с

нс - наносекунда (ns) = 10^{-9} с

ПК (РК) – протеїнкіназа

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція

пс - пікосекунда (ps) = 10^{-12} с

ПТМ - посттрансляційні модифікації

ПФ (PP) – протеїнфосфатази

СНМ - сайти нуклеації мікротрубочок

фс - фемтосекунда (fs) = 10^{-15} с

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Молекули α -, β - і γ -тубуліну, є головними компонентами системи мікротрубочок, які характеризуються значною міжвидовою консервативністю послідовностей і просторових структур у представників різних царств [412, 585]. 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» [160]. Загально визнаними факторами модуляції тубулінового коду виступають експресія різних ізотипів тубуліну та різноманітні посттрансляційні модифікації [160, 571].

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. [155]. 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 [565, 29, 160, 148, 245, 246]. Відомо декілька робіт, присвячених ролі посттрансляційних модифікацій тубуліну дріжджів [49]. Аналогічні дослідження рослин значно поступаються [565]. У більшості випадків, публікації присвячені дослідженню ролі окремих

протеїнкіназ і модифікацій тубуліну, а цілісне розуміння кіному мікротрубочок рослин наразі знаходиться на первинному етапі становлення [431].

Загалом, протеїнкінази сприймаються як специфічні і динамічні молекулярні перемикачі, які регулюють більшість біологічних процесів еукаріот [539]. Для α -, β - і γ -тубуліну тварин і дріжджів існування численних сайтів фосфорилування було підтверджено даними мас-спектрометрії [456]. 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 протеїнкіназами, 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 [58, 59]. Не викликає сумніву більш складна організація рослинних кіномів та 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 [457]. При цьому подібність каталітичних доменів протеїнкіназ тубулінового коду значно перевищує показники загальної подібності тотальних кіномів рослинного і тваринного походження [457]. Саме така взаємна консервативність молекул тубуліну і протеїнкіназ тубулінового коду зумовлюють можливість біоінформаційного визначення консервативних сайтів фосфорилування молекул α -, β - і γ -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 протеїніназ тубулінового коду вищих рослин [73, 103, 271, 273, 274, 274, 280, 281, 284, 313, 314, 315, 423].

Таким чином, актуальність представленої роботи полягає в тому, що, виходячи з можливостей аналізу повного рослинного кіному, необхідно було виявити і охарактеризувати основні шляхи ензиматичного фосфорилування тубуліну рослин як одного з критичних факторів функціональної спеціалізації мікротрубочок, визначити коло протеїніназ, здатних безпосередньо фосфорилувати α -, β - і γ -тубулін, ідентифікувати сайти такого фосфорилування та обґрунтувати роль визначених протеїніназ 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 протеїнінази 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 ґрид-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 Грідю.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було визначення протеїніназ рослинного походження, безпосередньо причетних до фосфорилування α -, β - і γ -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 протеїнказ, залучених до формування тубулінового коду;

5. Визначити наявність консервативних сайтів специфічного фосфорилування у ізотипів α -, β - і γ -тубуліну рослин та здійснити їх прогнозування на підставі відповідності існуючим і створеним *de novo* мотивам канонічних сайтів відомих протеїнказ;

6. Виконати структурно-біологічний аналіз макромолекулярних комплексів α -, β - і γ -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 протеїнказ тубулінового коду з регуляцією системи мікротрубочок вищих рослин;

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

10. Узагальнити внесок фосфорилування в регуляцію тубулінового коду вищих рослин, визначених сайтів фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну і асоційованих протеїнказ. 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 протеїнказ, 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 α -, β - і γ -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 α -, β - і γ -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 α -, β - і γ -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 α -, β - і γ -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 одержаних 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 α -, β - і γ -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 α -, β - і γ -тубуліну беруть участь безпосередньо три протеїнкінази групи AGC (IREN1 /At3g17850, KPK1 /At3g08730 і KPK2 / At3g08720), дві протеїнкінази групи CMGC (CDK1 / At3g48750 і YAK1 / At5g35980) і філогенетично близький гетеротетрамерий холоензим СК2 (субодиниці: СКА1 / At5g67380), СКА2 / At3g50000, СКВ1 CSK2В / At5g47080, СКВ2 / At4g17640), ізотип СКL6 (At4g28540) казеїнкінази 1, SNF1-споріднені протеїнкінази KIN10 / At3g01090 і KIN11 / At3g29160, NIMA-протеїнкіназа НЕК6 (At3g20860) і дев'ять Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ: 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)), протеїнкіназа 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 α -, β - і γ -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 протеїнкіназ, з'ясована роль фосфорилування як ключового фактору функціональної спеціалізації мікротрубочок, визначено коло протеїнкіназ, здатних фосфорилувати молекули α -, β - і γ -тубуліну, ідентифіковано сайти такого фосфорилування та надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі визначених протеїнкіназ в регуляції тубулінового коду вищих рослин.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи суттєво розширюють існуючі уявлення щодо ензиматичної регуляції

мікротрубочок рослин шляхом безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -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).

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. В цілому, у проведенні досліджень, їх аналізі та узагальненні, частка автора складає близько 85%.

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 дисертації. 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 сторіноки друкованого тексту. Робота ілюстрована 21 таблицею, 132 рисунками. Перелік використаних джерел налічує 637, з них 2 – українською, 4 – російською мовою, решта – англійською.

РОЗДІЛ 1

ФОСФОРИЛЮВАННЯ ЯК СКЛАДОВА ЧАСТИНА ТУБУЛІНОВОГО КОДУ

1.1. Тубуліновий код як основа функціональної спеціалізації мікротрубочок

Вперше термін «тубуліновий код» було запропоновано Verhey & Gaertig (2007) як наслідок посттрансляційних модифікацій тубуліну, які призводять до хімічного різноманіття мікротрубочок [565]. На сьогодні термін все ще перебуває в стадії становлення і включає не лише посттрансляційні модифікації тубуліну, але і диференційовану експресію різних ізотипів α - та β -тубуліну [160]. Загалом, посттрансляційні модифікації тубуліну є зворотнім процесом ковалентного приєднання певних функціональних груп. Ці хімічні реакції здійснюються різноманітними ферментами, які здатні додавати хімічні групи до полімеризованого або розчинного тубуліну [160, 519].

Таким чином, джерелом структурної і функціональної гетерогенності мікротрубочок є первинна і вторинна гетерогенність тубуліну. Як і у інших еукаріот, у рослин існує декілька ізотипів α - і β -тубуліну, які обумовлюють первинну гетерогенність мікротрубочок за рахунок індивідуальних особливостей молекул окремих ізотипів тубуліну [186]. Експресія більшості генів рослинного тубуліну має конституційний характер, проте, деякі ізоטיפи проявляють клітинну і тканину специфічність [152, 430, 616]. Загалом, в геномі *A. thaliana* ідентифіковано шість генів α -тубуліну, дев'ять генів β -тубуліну і два гени γ -тубуліну [516, 69].

Вторинна гетерогенність мікротрубочок виникає внаслідок різних посттрансляційних модифікацій, які призводять до локальних змін заряду, структури та локальних конформацій молекул тубуліну [516]. Доведено, що у

рослин посттрансляційні модифікації тубуліну позначаються на структурних і динамічних властивостях мікротрубочок, ГТФ-азній активності, інтерфейсах взаємодії з БАМ та ін. [60, 456, 516]. Слід зазначити, що певні модифікації проявляють унікальність не лише на рівні α - або β -тубуліну, але навіть на рівні окремих ізотипів [407]. Доведено, що деякі посттрансляційні модифікації, які впливають на динаміку рослинних мікротрубочок, притаманні виключно α - або β -тубуліну. Так, у α -тубуліну зворотне тирозилування [516, 132] і нітротирозилування впливають на взаємодію з динеїном [256], а зворотне ацетилювання контролює взаємодію з кінезином і перехід клітин до мітозу [516, 167]. Проте, такі модифікації як поліглутамілювання [159] і фосфорилювання за залишками тирозину [516, 159], що впливають на орієнтацію мікротрубочок, притаманні водночас α - і β -тубуліну.

На сьогодні, більшість посттрансляційних модифікацій вивчено на прикладі тубулінового коду тварин, що пов'язано з більш тривалим дослідженням саме тваринного цитоскелету. Актуальний перелік модифікацій α -, β - і γ -тубуліну тварин включає: фосфорилювання за залишками серину, треоніну та тирозину [372, 591], полігліцилювання [619], пальмітилювання [68], убіквітинування [457], поліглутамілювання [66], зворотне тирозилування [33, 246], утворення $\Delta 2$ -тубуліну [323], нітротирозилування [440], зворотне ацетилювання [56], метилювання лізину [242] і зворотне сумоїлювання [471].

1.2. Фосфорилювання як ключовий вид посттрансляційних модифікацій тубуліну

Фосфорилювання є одним з найбільш поширених видів посттрансляційних модифікацій [577], яке регулює активність близько 30 % білків еукаріот [463]. Про фосфорилювання тубуліну було вперше повідомлено ще на початку 70-х років минулого століття [59, 60, 120, 160, 166]. Незважаючи на значний прогрес, за останні 50 років наше розуміння фосфорилювання

тубуліну, сайтів модифікацій, їх ролі і досі залишається неповним. На відмінність від більшості посттрансляційних модифікацій тубулінового коду, які відбуваються вже після інтеграції гетеродимерів тубуліну в мікротрубочки, фосфорилування може здійснюватись як на стадії гетеродимеру, так і на стадії мікротрубочки [613].

Доведено що фосфорилування тубуліну впливає на динаміку мікротрубочок. Так, фосфорилування Ser172 β -тубуліну протеїнкіназою Cdk1 контролює динаміку мікротрубочок під час мітозу через регуляцію сайту взаємодії з ГТФ і вплив на взаємодію α - і β -тубуліну гетеродимеру [153]. Нещодавно, на прикладі нейронів *Drosophila melanogaster* було доведено, що протеїнкіназа MNB (гомолог тваринної Dyrk1A) також здатна фосфорилувати Ser172 β -тубуліну [420, 271] і наслідки такого фосфорилування аналогічні [420].

Фосфорилування Ser165 α -тубуліну cAMP-залежною протеїнкіназою Ca (PKCa) також впливає на динаміку мікротрубочок і регулює рух клітин [120, 379]. В клітинах ссавців рецепторні протеїнкінази асоційовані з G-білками - GRK і фосфорилують Ser444 (ділянка C-хвосту) β III-тубуліну. Це впливає на взаємодію з асоційованими білками і необхідно для формування протофіламентів мікротрубочки [206, 613].

За допомогою методів радіоактивних меток і специфічних антитіл була доведена колокалізація CK2 і мікротрубочок, а також здатність цього ферменту безпосередньо фосфорилувати α -тубулін *Typanosoma equiperdum*, що, на думку Boscán et al. (2017), стабілізує мікротрубочки і підтримує їх структуру [64, 265].

Експериментально підтверджена здатність фосфорилувати Ser413 і Ser420 β -тубуліну рослинною CK1-подібною протеїнкіназою SKL6, що призводить до змін у організації кортикальних мікротрубочок [43, 346].

Показано, що у ссавців SNF1-кіназа BRSK1 (BR serine/threonine kinase 1) фосфорилує Ser131 і Ser385 обох ізотипів γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2), що

викликає конформаційні зміни γ -тубуліну і має кардинальний вплив на структуру центрів первинної нуклеації мікротрубочок і мітотичну активність клітин [93, 8, 139]. Активність BRSK1 обумовлює ядерну рекрутизацію γ -тубуліну під час переходу до S-фази клітинного циклу і пов'язана з поляризацією нейронів и подвоєнням центросом [308, 139].

Водночас, незважаючи на більш ніж п'ятдесятирічну історію дослідження фосфорилування тубуліну, навіть стосовно α -, β - і γ -тубуліну ссавців дані маспектрометрії свідчать про існування значно більшої кількості сайтів фосфорилування [220]. Таким чином, наше розуміння вкладу фосфорилування в структуру, динаміку і функціонування системи мікротрубочок можна визначити як фрагментарне, хоча існуючі факти свідчать про фосфорилування як одного з ключових факторів модуляції тубулінового коду.

1.2.1. Молекулярний механізм і функціональна роль фосфорилування. Зворотне фосфорилування білків грає ключову роль в більшості клітинних процесів і здійснюється за участю складного тандему протеїнкіназ і протеїнфосфатаз (рис. 1.1). Першим експериментально доведеним фосфопротеїном еукаріот став відкритий у 1883 р. шведським біохіміком Олофом Хаммарстеном фосфорильований білок молока - казеїн [529]. Процес приєднання залишку фосфорної кислоти (H_3PO_3) або фосфонової ($H_2(PO_3)$) до цільового амінокислотного залишку молекули акцептора [537] отримав назву фосфорилування.

Найчастіше фосфорилування білку шляхом перенесення γ -фосфату з АТФ чи GTP, здійснюється на гідроксильні групи (-OH) амінокислотних залишків серину (Ser, S), треоніну (Thr, T) і тирозину (Tyr, Y). Значно рідше, фосфорилування білків еукаріот здійснюється за залишками аргініну (Arg, R), аспарагінової кислоти (Asp, D), гістидину (His, H) та цистеїну (Cys, C) [529]. Введення в молекулу білка залишку фосфорної кислоти, як правило, змінює її властивості (рис. 1.1). Це пов'язано з хімічною природою фосфатної групи,

здатної формувати водневі зв'язки і електростатичні взаємодії з компонентами білкової молекули [537]. Внаслідок цього може змінюватись просторова структура субстрату (цільового білка), його стабільність, внутрішньоклітинна локалізація, активність або здатність взаємодіяти з іншими молекулами [376, 537].

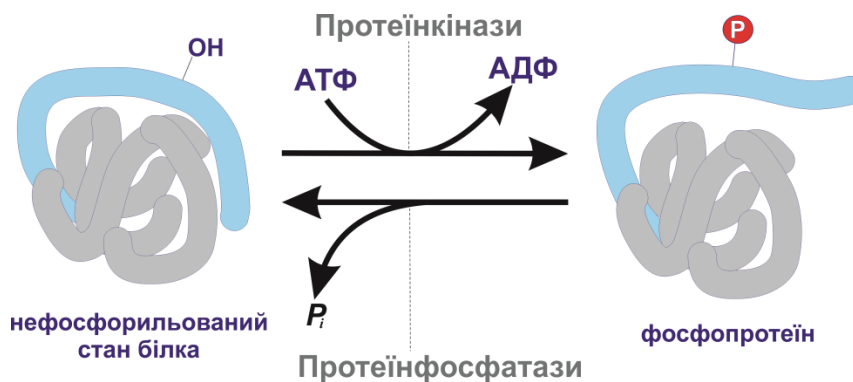


Рис. 1.1. Узагальнена схема зворотного фосфорилування білку.

Протеїнкінази або фосфотрансферази є ферментами, що каталізують перенесення γ -фосфату. Разом з іншими родинами ферментів (аміно- і глікозилтрансферази та ін.), протеїнкінази утворюють спільну групу ферментів трансфераз, яка відповідає коду EC2 (КФ2) класифікатору ЄС (enzyme commission)[23]. Протеїнкінази є найбільшою групою кіназ, представники якої проявляють субстратну селективність, що забезпечує специфічний вплив на властивості окремих білків-субстратів. Зазвичай, гени протеїнкіназ складають від 2 до 4 % тотального геному, а їх сукупність отримала назву кіном[376, 377]. При цьому, за результатами фосфопротеомного аналізу було доведено, що найменше третина усіх білків тварин і дріжджів зазнає фосфорилування щонайменше за одним амінокислотним залишком [14, 448].

Для всіх протеїнкіназ характерна наявність консервативних каталітичних (кіназних) доменів (250-300 а.к.), які містять унікальні субдоменні мотиви, що дозволяє ідентифікувати їх на рівні підродин тирозин-, серин-треонін- та дуальних кіназ [578, 380]. Це також дозволяє здійснювати пошук та

ідентифікацію протеїнкіназ на підставі сканування баз даних із застосуванням алгоритмів родини BLAST [105, 310]. Саме гомологія каталітичних доменів дозволяє ідентифікувати нові протеїнкінази та виконувати філогенетичну і біоінформаційну анотацію нових кіномів [376, 173].

1.2.2. Особливості фосфорилування у рослин. Розшифрування першої послідовності рослинної протеїнкінази відбулося лише у 1989 році, а вже у 1998 році було відомо більше 500 рослинних протеїнкіназ, враховуючи 175 протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana* [202, 340, 582]. Проте дослідження функції рослинних протеїнкіназ значно поступались дослідженням структури. Первинна анотація рослинних протеїнкіназ головним чином враховувала гомологію каталітичних доменів, що дозволило визначити у рослин біля десяти груп серин-треонін специфічних протеїнкіназ [340, 197]. В свою чергу, функціональна анотація рослинних протеїнкіназ була опосередкована і головним чином ґрунтувалась на допущенні функціональної подібності з найближчими гомологами тваринного або дріжджового походження [340]. Дослідження функції рослинних протеїнкіназ розпочались значно пізніше і кардинально відставали від протеїнкіназ тварин і дріжджів. На сьогодні, мережа каскадів серин-треонінових протеїнкіназ розглядається як своєрідний «центральный процесор» рослинної клітини [202]. Така система взаємодіючих протеїнкіназ і зв'язана з ними система функціональних антогоністів - протеїнфосфатаз, сприймає «інформацію введення», яка надходить від рецепторів про зміни зовнішнього середовища (фізичні фактори, фітогормони, ін.), конвертує її у відповідні відповіді, як то зміни у метаболізмі, експресії генів, вплив на поділ і ріст клітин [202].

Наряду із значною кількістю серин-треонінових (S_ТКс) протеїнкіназ, у рослин існує чимала група дуальних (STYКс) протеїнкіназ, які приймають участь у трансдукції сигналів, включаючи регуляцію системи мікротрубочок [158]. Крім того, під питанням залишається наявність спеціалізованих тирозинкіназ [5]. Незважаючи на те, що існування канонічних тирозинових

протеїназа (TyrKc) у рослин неодноразово спростовувалось, постійно з'являються дані стосовно існування їх окремих представників [5], що цілком можливо, оскільки було доведено існування у рослин їх антагоністів – протеїн-тирозин-фосфатаз [173].

Незаперечним фактом є те, що на фосфорилування залишків тирозину у рослин припадає значна частка кіназної активності. Рівень тирозин-фосфорильованого актину корелює з рухом листків у *Mimosa pudica* L. [173, 609, 258]. Інгібітори тирозинфосфатаз, включаючи оксид феніларзін [373], блокують тирозин-специфічне фосфорилування актину і закривання листків. Доведено, що дефосфорилування тирозину необхідне для епінастій *M. pudica* [258]. Зворотне фосфорилування тирозину спостерігають при функціонуванні продихового апарату *A. thaliana* [363].

1.2.3. Фундаментальні особливості кіномів рослин. Найбільшою відмінністю рослинних кіномів є загальна кількість протеїназ. Так, геном *A. thaliana* нараховує більше 1000 генів протеїназ, що в п'ять разів перевищує кіном *Saccharomyces cerevisiae* [581] і в два-три рази більше, ніж у інших еукаріотів, включаючи ссавців [12]. Варто зазначити, що кіном *A. thaliana* не є максимальним і у інших видів вищих рослин, наприклад, у *Oryza sativa* L. або у *Populus alba* L., кількість генів протеїназ може перевищувати 1500 [511, 342, 340].

Вважається, що значна кількість протеїназ квіткових рослин порівняно з іншими еукаріотами зв'язана з відносно більшим рівнем специфічної експансії генів рослинних протеїназ за рахунок геномних дуплікацій [340, 621]. Ця теорія підтримується фактом, що рослини значно більше інших еукаріот схильні до поліплоїдизації. Приблизно 70% видів сучасних рослин є поліпоїдами [421]. Дані еволюційної генетики свідчать, що більшість нещодавніх генетичних дуплікацій у наземних рослин припадає саме на протеїнази (у порівнянні з іншими родинами білків), що вважається наслідком адаптації рослин до наземного існування [195]. Це також

підтверджує факт, що деякі рослини, як то *Medicago truncatula*, *Selaginella moellendorffii* і *Chlamydomonas reinhardtii*, мають надлишок протеїнкіназ зі 100-відсотковою ідентичністю [340].

Нещодавно було показано, що існують так звані «малі» групи протеїнкіназ, які практично не зазнали дуплікацій і зберегли помітну консервативність у рослин і інших еукаріотичних організмів [340, 558]. Саме представники цих родин причетні до найбільш фундаментальних і консервативних аспектів регуляції клітинного циклу, базових функцій клітини, таких як відповіді на стрес, програмована клітинна загибель, виживання, та ін. [340, 558].

До подібних «малих» груп протеїнкіназ належать представники родин: АМРК / SNF1 (АМР-активовані протеїнкінази / сахароза-неферментуюча 1 кіназа), причетні до підтримки енергетичного гомеостазу [200], PDK1 (фосфоїнозитид-залежна кіназа 1) - універсальний активатор протеїнкіназ АGC, S6K-подібні протеїнкінази - гомологи тваринних рибосомальних S6-кіназ (S6Ks), IRE1 - інозитол-залежні кінази 1 [306, 470] та асоційована з регуляцією відповіді на голодування протеїнкіназа GCN2 (не потребуючий активації центральний контролер 2) [590].

Ще одна група протеїнкіназ, що не зазнали значних дуплікацій і зберегли помітну гомологію у рослин і тварин, це протеїнкінази *Auroga* [84] та представники підродин CDKA і CDKB циклін-залежних протеїнкіназ (CDK). Протеїнкінази підродин CDKA і CDKB грають центральну роль у регуляції мітозу, цитокінезу та контролю клітинного циклу. Подібно CDKA, рослинні представники підродини CDK7 зберегли консервативність функцій з циклін-активуючими кіназами (CAKs) дріжджового і тваринного походження [257, 130]. На відміну від CDKA і CDK7, функції підродини рослинних CDK-кіназ, зокрема, CDK20 (первинна назва CCK), значно відрізняються. У *A. thaliana* представник підродини протеїнкіназ, зв'язаних з клітинним циклом (CRRK) - CDKF1 функціонує як САК (CDK-activating kinase) [534]. Характерно, що інші

представники рослинних CDK, не зв'язані з регуляцією мітотичної активності, також зберегли низькокопійність і консервативність основних функцій [330, 576, 558].

Аналогічно CDK20, деякі підродини з низькою кількістю копій у рослин і тварин також можуть мати суттєві функціональні відмінності [340]. Найбільш яскравими прикладами є WEE1 і ULK, що регулюють процеси, характерні виключно для рослин. З іншого боку, гомологи RCK і TLK у інших еукаріот відрізняються за функцією і їх роль у тварин і грибів ще не зрозуміла. Відомо, що у дріжджів WEE1 грає центральну роль у клітинному циклі, впливає на прогрес клітинного циклу через інактивацію CDK1, яка, у свою чергу, активується фосфатазою Cdc25 [130].

Ще одним прикладом функціональної консервативності є роль гомологів протеїнкінази перехресної гібридизації RCK (ros cross-hybridizing kinase), яка належить до МАК-кіназ асоційованих з чоловічими статевими клітинами і впливає на морфологію джгутиків. У *A. thaliana* було знайдено три гени МАК-кіназ, які також пов'язані з чоловічою генеративною сферою і експресуються в чоловічому гаметофіті та пилковій трубці [466, 580].

Ідентифікована у *A. thaliana* протеїнкіназа TLK ініціює і регулює розвиток квітки [468] так регулює транскрипційне мовчання [577]. TLK знайдено у всіх еукаріот крім дріжджів. Рослинні TLK і їх ортологи у інших організмах впливають на динаміку хроматину, що підтверджується здатністю фосфорилувати консервативні субстрати гістон 3В і ASF1, які причетні до формування комплексу хроматину [348, 86, 441].

До зазначеної групи можна віднести також протеїнкінази подвійної специфічності, які об'єднують три підродини DYRK, HIPK і PRP4. Представники першої підродини зберегли певну консервативність послідовностей, структури і функції у більшості досліджених еукаріот і наразі визначаються як група MNB/DYRK/YAK. Зокрема, як довели актуальні дослідження, YAK1 з *A. thaliana*, YAK1 з *S. cerevisiae*, DyrK1A з *H. sapiens* і

MNB з *D. melanogaster* грають подібну роль в регуляції тубулінового цитоскелету у рослин, ссавців, грибів і комах [271, 264]. Рослини не мають гомологів HIPK, які у тварин регулюють транскрипцію [293], але мають численну групу протеїнкіназ PRP4, які, ймовірно, причетні до регуляції сплайсингу мРНК [340].

У процесі еволюції деякі рослинних протеїнкіназ зазнали дуплікацій, але зберегли базову консервативність основних сигнальних функцій. Представники родин MAPK, MAPK-кіназ (MAP2K), MAPK-кіназ-кіназ (MAP3K) [466, 311] і RSK-2 [11], що зустрічається у більшості еукаріотів і у рослин, проявляють помірну ступінь експансії. Вищезазначені протеїнкінази причетні до кількох консервативних сигнальних каскадів у рослин, грибів і тварин, проте, на рівні повного комплексу білок-білкових взаємодій функції рослинних протеїнкіназ мають значні відмінності [340].

У деяких випадках протеїнкінази еукаріот відповідають за різні функції, але зберігають консервативні механізми регуляції. Це відноситься до таких рослинних родин як OSTL1 (AMPK/SNF-related kinase family, open stomata-like; SnRK2) [191], CHK1 (SNF1-related SnRK3) [2] та CK1 (Casein kinase 1) [96, 281].

Вважається, що надмірна дуплікація генів є своєрідним маркером рослинних протеїнкіназ, що максимально дивергували і майже повністю задіяні у процесах, характерних виключно для рослин [340]. Специфічна для рослин експансія генів протеїнкіназ торкається родин GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) [481], NEK (NimA-related kinases) [392], CTR1, специфічні для рослин TKL (DRK-1 та DRK-2) та WNK (With No lysine) / NRBP (Nuclear Receptor Binding Protein). У більшості випадків, представники зазначених родин функціонують виключно у рослин і найчастіше пов'язані з адаптацією до факторів зовнішнього середовища. Нещодавно з'явилися дані, що рослинна протеїнкіназа NEK6 взаємодіє з мікротрубочками і впливає на морфогенез клітин епідермісу [397, 482] та приймає участь у відповіді на стрес [332, 623].

До родин рослинних протеїназ, що зазнали збільшення за рахунок дуплікацій генів, беззаперечно належать CDPK (кальцій-залежні протеїнази) [368] і RLK / Pelle [183]. На сьогодні це твердження справедливе для всіх наземних рослин [340, 265, 281]. Вважається, що дивергенція Ca²⁺-залежних протеїназ відбулась на зорі еволюції рослин і саме подальша експансія їх генів і функціональна дивергенція дозволили рослинам сприймати та / або реагувати на різні екологічні фактори [281]. Таким чином, більшість Ca²⁺-залежних протеїназ наземних рослин є продуктом пізніх дуплікацій [340, 281].

Проте, існує певна група рослинних протеїназ, гени яких, не зважаючи на ранню дивергенцію, зберегли досить низький рівень копійності. Представники деяких родин (WEE1, TLK та ін.), що виникли до дивергенції еукаріотичних видів, наразі кодуються поодинокими генами [80, 340]. Більшість з таких протеїназ причетна до регуляції консервативних процесів обміну речовин, клітинного циклу, мітозу та ін. Мала кількість копій в значній мірі пов'язана з їх роллю у домашньому господарстві клітини і узгоджується з висновком, що копійність генів домашнього господарства, як правило, низька [183, 460, 603]. Це підтримує головну ідею актуального дисертаційного дослідження і слугує початком для первинного пошуку протеїназ тубулінового коду рослин на підставі гомології [457]. Слід враховувати, що дивергенція рослин, тварин і грибів відбулась понад мільярда років тому. Значні відмінності у еволюції видів різних царств, особливості фізіологічній адаптації і тиск інших факторів, безсумнівно, сприяли виникненню індивідуальних відмінностей функціонування цих консервативних протеїназ.

1.2.4. Роль фосфорилювання в регуляції тубулінового цитоскелету.

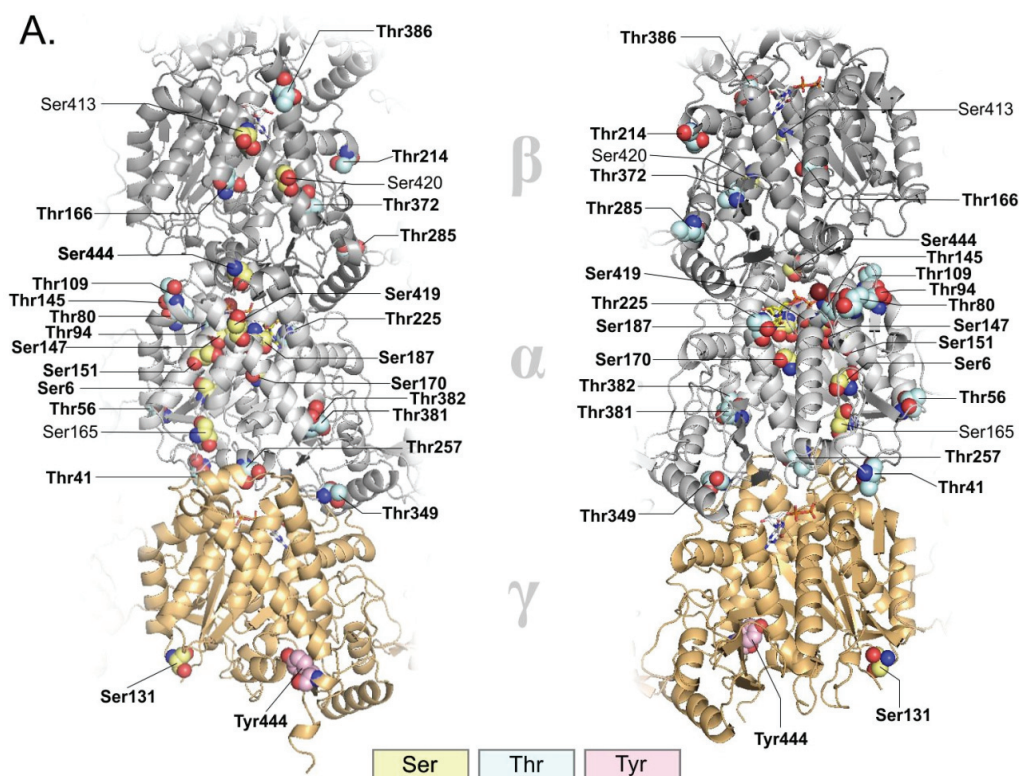
У тварин і рослин динаміка та функціонування мікротрубочок в значній мірі залежать від процесів каталітичного фосфорилювання і дефосфорилювання [611]. Зараз відомо, що фосфорилювання тубуліну здійснюється за

залишками серину, треоніну і тирозину [370]. Серин/треонінова протеїнкіназа MARK/Pag-1 людини впливає на організацію мікротрубочок, їх динамічний і статичний стан шляхом фосфорилування білків асоційованих з мікротрубочками. Було встановлено, що протеїнкіназа MARK фосфорилує MAP4, MAP2c і tau, що впливає на їх домени взаємодії з мікротрубочками. MARK-залежне фосфорилування запускає процес від'єднання БАР, наслідком чого є загальне зростання динамічної нестабільності мікротрубочок. Експериментально доведено, що зростання експресії MARK2 приводить до руйнування мікротрубочок, від окремих клітин від субстрату і апоптозу [131]. У тварин взаємодія MAPK із мікротрубочками залежить від інших протеїнкіназ, зокрема, атипової протеїнкінази Сζ, сАМР-залежної протеїнкінази РКА, MAPK, казеїнкіназ СК1 і СК2, СаМ-залежної протеїнкінази IV, GSK3β, ТТВК2 і Cdk1. Аналогічно, білки, які асоціюються з плюс-кінцями мікротрубочок у тварин, регулюються протеїнкіназами РКА, СК1 і GSK3β. Ряд протеїнкіназ, включаючи Cdk1, впливає на мікротрубочки через фосфорилування статміну. Значний вплив на систему тваринних мікротрубочок мають представники протеїнкіназ родин РАК (p21-activated kinases) і GСК (germinal center kinases) [617, 553].

Таким чином, ключову роль у процесах фосфорилування білків мікротрубочок еукаріот грають серин-треонінові і тирозин-специфічні протеїнкінази, зв'язані спільним еволюційним походженням [463]. Проте, у рослин процес фосфорилування і його ферменти мають як спільні риси, так і принципові відмінності. Експериментально підтверджено, що специфічне інгібування тирозин-специфічних протеїнкіназ і фосфатаз впливає на систему рослинних мікротрубочок [503, 502]. Проте, канонічні тирозинові протеїнкінази у рослин відсутні. Було встановлено, що фосфорилування мікротрубочок за залишками тирозину відбувається як у тваринного, так і у рослинного тубуліну [58]. Актуальні дані свідчать, що фосфорилування за

залишками тирозину у рослин здійснюється за рахунок атипової активності окремих серин/треонінових протеїнказ та значної групи протеїнказ дуальної специфічності [58, 59, 617]. Це підтверджується відповіддю системи мікротрубочок на специфічне інгібування окремих протеїнказ і протеїнфосфатаз та корелює з відповіддю цитоскелету на вплив зовнішніх факторів (екстремальні температури, осмотичний та інші стресові фактори) [58, 503, 505].

1.2.5. Консервативні аспекти фосфорилювання тубуліну у рослин і інших еукаріотичних організмів. У α -, β - і γ -тубуліну тварин і дріжджів існування численних сайтів фосфорилювання було підтверджено даними мас-спектрометрії [456]. На сьогодні доведено, що фосфорилювання рослинного тубуліну також здійснюється за залишками серину (S), треоніну (T), і тирозину (Y) [58]. Більшість функціонально-важливих сайтів фосфорилювання молекул тубуліну у тварин і рослин зберегли консервативність і основний вектор функціональної спеціалізації. Проте у протеїнказ, асоційованих з фосфорилюванням зазначених сайтів, ми маємо більш очевидні відмінності [457]. Перш за все, у тварин зазначені модифікації здійснюються протеїнказами, які мають серин/треонінову (S/T), тирозинову (Y) та дуальну (S/T/Y) специфічність. У рослин кіном складають протеїнкази, які мають серин/треонінову (S/T) або дуальну (S/T/Y) специфічність [58, 59]. Не викликає сумніву і більш складна організація рослинних кіномів, яка, на думку більшості дослідників, зумовлена прив'язкою рослин до субстрату, що вимагає більш складних адаптаційних механізмів. [116] Звертає увагу існування певних структурних відмінностей рослинних і тваринних протеїнказ, але загалом, протеїнкази домашнього господарства зберегли помітну подібність [340].



Б.

α-тубулін (TBA1B_HUMAN)

Ser6	Thr41	Thr56	Thr80
1-MRECISIHVQG-11	36-MPSDKIGGGD-46	51-TFFSEGGAGKH-61	75-IDEVREGTYRQ-85
Thr94	Thr109	Thr145	Ser147
89-PEQLIIGKEDA-99	104-ARGHYIGKEI-114	140-SFGGIGSGFT	LLMERLSVDYGKSKLEF
Ser187	Thr225	Thr257	Thr349
182-VEPYNISILTTH-192	220-ERPTYINLNRL-230	251-LTEFOINLVPY-262	344-VDWCPIIGFKVG-354
Thr381	Thr382	Ser419	
376-CMLSNITAIAEA-387	414-EEGEFSEARED-424		

β-тубулін (TBB3_HUMAN)

Thr166	Thr214	Thr285	Thr372
161-DRIMNIFSVVP-171	209-DICFRILKLAT-219	280-QYRALVPELT-290	367-FIGNSDAIQEL-377
Thr386	Ser413	Ser420	Ser444
381-ISEQIIFAMFRR-391	408-FTEAENMNDLVSEYQQY-425	439-DDEEESFAQGPK-450	

γ-тубулін (TBG1_HUMAN)

Ser131	Tyr444
126-ADGSDSLEGFV-136	438-ATRPDIISWGTQE-451

Рис. 1.2. Топологія (А) і амінокислотне оточення (Б) експериментально-доведених сайтів фосфорилування α -, β - і γ -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 α -, β - і γ -тубуліну людини, у яких присутні всі відомі сайти фосфорилування амінокислотних залишків серину, треоніну і тирозину. Нежирним шрифтом відзначено сайти, фосфорилування яких показано на підставі гомології.

Аналіз даних літератури і баз даних засвідчив існування значної групи експериментально підтверджених сайтів фосфорилування ізотипів α -, β - і γ -тубуліну у *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Arabidopsis thaliana*. Загалом, на сьогодні експериментально підтверджено існування 28 консервативних сайтів фосфорилування: 18 для α -тубуліну, 8 для β -тубуліну і 2 для γ -тубуліну [220, 219, 627, 134, 164]. Порівняння послідовностей молекул тубуліну і структурної топології зазначених сайтів, підтвердило їх ідентичність у людини, дріжджів і арабідопсису (рис. 1.2). Це свідчить про консервативність внеску цих модифікацій у формування тубулінового коду вищих рослин і їх функціональне значення для системи мікротрубочок.

Моделювання просторової структури підтвердило, що сайти фосфорилування α -тубуліну Ser277, Thr257 і Tyr357 можуть сприяти взаємодії між α - та β -тубуліном через наступні (Thr257, Tyr357) або сусідні (Ser277) димери, тоді як залишки треоніну (Thr80 і Thr94) розташовані на поверхні внутрішнього просвіту мікротрубочки.

Аналіз *in vivo* з використанням спрямованого мутагенезу Thr80, Thr94, Thr257, Ser277 та Tyr357 α -тубуліну, що імітував наявність або відсутність фосфорилування (заміщення залишком аланіну), або імітація статичного приєднання фосфатної групи (заміщення на залишок аспарагінової кислоти) засвідчили, що лише мутація Thr257Asp є критичною і запобігає включенню α -тубуліну в структуру мікротрубочки під час полімеризації.

Загалом встановлено, що фосфорилування тубуліну здатне впливати на включення тубуліну в структуру мікротрубочок, їх деградацію, морфологію і динаміку мікротрубочок, стійкість до холоду, динаміку мікротрубочок під час мітозу, формування контактних інтерфейсів зв'язування БАМ та ін. [1, 89, 153, 238, 412, 420] На прикладі мікротрубочок клітин, що експресували мутантний α -тубулін, було визначено, що мікротрубочки ліній, де мутації імітували фосфорилування (міміктичні мутації), були більш чутливими до холодової деполімеризації, ніж мікротрубочки ліній з мутаціями, які нівелювали

фосфорилування (Ala). Реполімеризація мікротрубочок значно швидше відбувалась в клітинах, α -тубулін яких мав заміщення цільових залишків на аланін. Водночас, у випадку міміктичної імітації фосфорильованного стану, реполімеризація відбувалась з помітною затримкою.

1.2.6. Протеїнкінази, причетні до фосфорилування тубуліну і регуляції тубулінового цитоскелету. Зараз відомо, що молекули α -, β - і γ -тубуліну фосфорилуються різними протеїнкіназами. Незважаючи на існування групи протеїнкіназ, для яких підтверджена здатність фосфорилувати тубулін *in vitro*, у більшості випадків нативна активність *in vivo* ще не досліджена і часто цільові сайти залишаються невідомими [597]. Водночас, на сьогодні, не відомо жодної протеїнкінази, для якої тубулін є унікальним субстратом [58, 469].

Навіть у тваринних клітин цілісне розуміння кіному мікротрубочок і його внеску в тубуліновий код остаточно не сформоване [328, 469]. Але можна стверджувати, що фосфорилування α - і β -тубуліну причетне як до позитивної, так і негативної регуляції полімеризації мікротрубочок. Ще перші функціональні дослідження засвідчили позитивну кореляцію фосфорилування β -тубуліну і диференціації клітин. Фосфорилування мікротрубочок також корелює із ступенем полімеризації, оскільки вплив таксолу збільшує, а обробка нокодазолом навпаки знижує рівень фосфорилування тубуліну [166]. В клітинах ссавців, визначені кореляції, головним чином, забезпечуються модифікаціями тубуліну за залишками тирозину та серину. Доведено, що тваринна нерцепторна тирозинкіназа Fes не лише фосфорилує тубулін, але й сприяє полімеризації мікротрубочок [328]. Така позитивна кореляція не зовсім зрозуміла, оскільки із позицій стехіометрії фосфорилування тубуліну не потрібно для прискорення збирання мікротрубочок [328]. Напроти, фосфорилування тваринного α -тубуліну за залишками тирозину здатне запобігти рекрутуванню дискретних молекул в структуру мікротрубочки [345] і погіршити її полімеризацію *in vitro* [574]. Аналогічно, Cdk1/циклін B-залежне

фосфорилування Ser172 β -тубуліну на стадії гетеродимеру $\alpha\beta$ -тубуліну знижує здатність їх інтеграції в структуру мікротрубочки [153].

В нейронах *Drosophila melanogaster* фосфорилування Ser172 β -тубуліну може здійснюватись протеїнкіназою MNB/DYRK1A, що також пригнічує полімеризацію [420, 456]. Таким чином, фосфорилування Ser172 впливає на динаміку мікротрубочок у процесі мітозу шляхом обмеження кількості розчинних гетеродимерів тубуліну [153]. Аналогічний вплив на структуру і динаміку мікротрубочок був підтверджений у дріжджів за допомогою ліній з міміктичними мутаціями цільового залишку β -тубуліну Ser172Ala і Ser172Glu [89]. Слід зазначити, що Ser172 β -тубуліну розташований у ділянці петлі T5, яка знаходиться у безпосередній близькості від сайту GTP/GDP і приймає часткову участь у формуванні контактної поверхні плюс-кінця і опосередковує зв'язування гетеродимерів в протофіламенти [412, 239]. Модифікації Ser172 (в тому числі міміктичні EGFP- β 3-tubulinS172D/E) впливають на карман зв'язування нуклеотидів, а поява негативно зарядженої фосфатної групи погіршує зв'язування і гідроліз GTP. Експериментально доведено, що зворотне фосфорилування Ser172 β -тубуліну, причетне до регуляції динаміки мікротрубочок під час мітозу [153]. На сьогодні зрозуміло, що фосфорилування Ser172 працює за консервативним механізмом у тварин, дріжджів, комах і рослин [564, 589, 153, 456].

В умовах *in vitro* вільні форми GRK2 (β ARK) і GRK5 здатні фосфорилувати β III-тубулін у складі очищеної фракції гетеродимерів $\alpha\beta$ -тубуліну [613, 206]. При цьому, взаємодія з протеїнкіназами GRK була підтверджена як для дискретних гетеродимерів тубуліну, так і для інтактного комплексу мікротрубочки. Під час моделювання реакції фосфорилування димерів $\alpha\beta$ -тубуліну протеїнкіназою GRK5 *in vitro*, радіоактивний фосфат виявлявся зв'язаним з фракцією мікротрубочок, що підтвердило вклад GRK5 в тубуліновий код, і, зокрема, її здатність фосфорилувати β III-тубулін (β III). Дані, отримані *in vitro*, підтверджуються колокалізацію GRK5 і мікротрубочок

в тваринній клітині. На прикладі фосфорилування β -тубуліну (β III), Yoshida et al. (2003) встановили, що GRK2- і GRK5-залежне фосфорилування відбувається за Ser444 (ділянка С-хвосту), що, на думку авторів, має впливати на взаємодію з асоційованими білками [613]. Вважається, що вищезгадана модифікація впливає на формування протофіламентів мікротрубочки [206, 613].

Експериментально доведено, що казеїн кіназа 1 - подібна протеїнкіназа SKL6 *A. thaliana* фосфорилує рослинний β -тубулін *in vitro* за залишками Ser413 і Ser420. Гіперекспресія SKL6 змінює інтерфазну організацію кортикальних мікротрубочок. Це ідентифікує SKL6 як новий БАМ і учасника тубулінового коду вищих рослин [43, 347, 280, 281].

Аналогічним чином, на зростання мікротрубочок може впливати фосфорилування α -тубуліну. Модифікований α 6-тубулін, що зазнав фосфорилування pSer165 протеїнкіназою PKC α [1], або має міміктичну мутацію (Ser165Asp), більш ефективно вбудовується в структуру мікротрубочок порівняно з немодифікованим α -тубуліном [379, 120]. У клітинах, оброблених активатором PKC (діацилгліцериновим(DAG)-лактоном), або експресуючих мутантний α 6-тубулін (Ser165Asp), тривалість фази росту мікротрубочок значно збільшується, тоді як фази скорочення і стабілізації значно поступаються контролю (необроблені клітини) або клітинам, що експресують мутантний α 6-тубулін [120]. Ser165 α 6-тубуліну входить до складу петлі H4-S5 і може впливати на взаємодію α - і β -тубуліну гетеродимерів протофіламенту під час складання мікротрубочки [1].

Використовуючи тубулін і радіактивномічену казеїн-кіназу 2 (СК2 α) та тубулін- і СК2 α -специфічні антитіла, було доведено колокалізацію СК2 і мікротрубочок, здатність цього ферменту до безпосереднього фосфорилування α -тубуліну *Trypanosoma equiperdum* [64, 456]. Отримані на *Trypanosoma* дані свідчать, що СК2-залежне фосфорилування тубуліну має

сприяти стабілізації і цілісності мікротрубочок, і робить свій внесок в динаміку перебудов мікротрубочок [64].

Крім того, було встановлено, що включення тубуліну в структуру мікротрубочки може блокуватися через фосфорилування залишків тирозину. В активованих Т-клітинах молекули α -тубуліну, фосфорильовані за залишками тирозину, залишались у розчинній фракції [345]. Аналогічні дані було отримано *in vitro* на прикладі α -тубуліну, С-кінцева ділянка якого зазнавала ІRK-залежне фосфорилування за тирозином [574].

Vogel et al. (2001) довели, що фосфорилування Tug445 тваринного γ -тубуліну причетне до регуляції мітозу. За гіпотезою авторів ця регуляція реалізується через контроль складу і кількості мікротрубочок [570].

Незважаючи на відсутність канонічних тирозинових протеїнкіназ, було доведено, що окремі рослинні протеїнкінази групи CRK, а саме AtCRK2, AtCRK3, і AtCRK8, здатні до нетипового для цих протеїнкіназ тирозин-специфічного фосфорилування С-кінцевої ділянки β -тубуліну *A. thaliana*. Зазначений механізм посттрансляційної регуляції поширюється лише на ізотипи ТВВ2, ТВВ3 і ТВВ7. Крім того, авторами було встановлено, що дані модифікації не впливають на структуру мікротрубочки, проте причетні до формування контактних інтерфейсів зв'язування БАМ [407, 20]

Туг-специфічне фосфорилування протеїнкіназою PSK (Ste20-подібна протеїнкіназа), екстрагованою з передміхурової залози, спостерігали *in vitro* у α - і β -тубулінів ссавців [388]. Нерцепторні тирозинкінази pp60c-src, Fes, Jak2 та Syk теж фосфорилують молекули тубуліну за залишками тирозину [383, 144, 328, 370, 437, 565]. Syk-залежне фосфорилування відбувається за залишками тирозину С-кінцевої ділянці α -тубуліну, що було підтверджено *in vivo* і *in vitro* [144, 437]. Здатність до безпосереднього фосфорилування тубуліну була підтверджена для протеїнкіназ інсулінового рецептору ссавців [574].

На сьогодні відомі факти безпосереднього фосфорилування γ -тубуліну. Повна анотація наразі існує для одного експериментально підтвердженого сайту фосфорилування γ -тубуліну Ser131, який проявляє консервативність у *H. sapiens*, *S. cerevisiae* і *A. thaliana*. У тварин фосфорилування Ser131 зв'язане з активністю SNF1-подібних протеїнкіназ. Тваринна SNF1-кіназа BRSK1 (BR serine/threonine kinase 1, Synonyms: KIAA1811, SAD1, SadB), зв'язана з безпосередньою регуляцією цитоскелету, клітинного поділу, здатна фосфорилувати Ser131 обох ізотипів тваринного γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) [93, 8, 139]. BRSK1 ссавців діє як позитивний регулятор подвоєння центросом через фосфорилування γ -тубуліну, що призводить до транслокації γ -тубуліну і асоційованих білків в центросому [8]. Результати експериментів *in vitro* свідчать, що перша ізоформа протеїнкінази BRSK1 (isoform 1, Q8TDC3-1) не лише фосфорилує γ -тубулін (TUBG1 і TUBG2), але й регулює асоційований з цитоскелетом білок ERC2 (ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2)) [8, 390]. В межах актуального дослідження було отримано докази існування рослинних гомологів SNF1-кіназ, їх зв'язку з регуляцією тубулінового цитоскелету і центрів первинної нуклеації *A. thaliana* [313, 314, 315].

1.2.7. Протеїнкінази, причетні до регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок. В тваринних клітинах основною органелою, яка організує мікротрубочки (центром первинної нуклеації), як правило, є центросома. Допоміжну роль в організації мікротрубочок відіграє апарат Гольджі. [308] Центросоми можна знайти і в клітинах нижчих рослин і мохів. У вищих рослин класичні центросоми відсутні, а функцію організації мікротрубочок беруть на себе мембранні структури, зокрема, ядерна оболонка, плазмолема, фрагмопласти [432]. У вищих рослин виявлені гомологи багатьох центросомних білків, які так само, як і у тварин, беруть участь в організації мікротрубочок. Функції та регуляція нецентросомних центрів первинної нуклеації мікротрубочок у рослин вивчені недостатньо. Відомо, що і у тваринній, і у рослинній клітинах зростання мікротрубочки починається з

точки первинної нуклеації по (-)-кінцю, а роль своєрідної «затравки» цього процесу належить унікальній кільцевій структурі – комплексу γ TuRC (gamma-Tubulin Ring Complex, gamma-TuRC), у складі якого γ -тубулін та білки гамма-тубулінового комплексу GCP2-7, MOZART1, 2A, 2B, Nedd1 [308]. Комплекс γ TuRC у тваринній клітині є частиною перицентриолярної речовини центросом, тоді як у клітинах рослин та грибів він асоційований із ядерною оболонкою [335].

Хоча зараз наші знання про протеїнкінази, які фосфорилують білки комплексу γ TuRC рослин, мізерно малі і неповні, отримані результати для центрів первинної нуклеації мікротрубочок у тварин і грибів свідчать, що роль їх фосфорилування у рослин може бути значною [351, 252]. Показано, що фосфорилування γ -тубуліну *Saccharomyces cerevisiae* за консервативним залишком Tyr445 С-хвоста забезпечує коректне формування веретена поділу і взаємодію мікротрубочки з актином [351]. Центросомальне накопичення комплексів γ TuRC під час мітозу контролюється низкою протеїнкіназ (Plk1, Aurora та ін.) [325, 320]. SNF1-кіназа BRSK1 діє у якості позитивного регулятора центросомної дуплікації, яка реалізується через фосфорилування γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) за залишком Ser131. BRSK1-залежне фосфорилування Ser131 призводить до транслокації γ -тубуліну і асоційованих білків у центросому [351]. Cdk1-залежне фосфорилування γ -тубуліну за Ser360 впливає на динаміку мікротрубочок веретена поділу під час метафаза-анафазного переходу [406]. Крім того, в тваринній клітині функціонування центросом також регулюється через Cdk1-залежне (Thr550) і Plk1-залежне (Thr382, Ser397, Ser637 і Ser426) фосфорилування центросомального фактору NEDD1 [622].

Tub4 (гомолог γ -тубуліну) з *S. cerevisiae* фосфорилується за залишком Tyr445 невідомою кіназою, що впливає на динамічну рухливість (+)-кінців мікротрубочок [570]. Білки Spc98, Spc110 і Spc72 фосфорилуються

протеїнкіназами регуляції клітинного циклу Cdk1 (Cdc28), Mps1 та Cdc5 [232, 156, 434].

Проте, на момент дисертаційного дослідження, достовірна інформація щодо ролі протеїнкіназ в регуляції центрів нуклеації мікротрубочок у рослин і, зокрема стосовно фосфорилування γ -тубуліну була відсутня. Значна гомологія γ -тубуліну представників різних царств, та досить висока подібність рослиного γ -тубуліну з α - і β -тубуліном (до 30%) вказує, що фосфорилування також може відігравати важливу роль в регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок у рослин.

Список публікацій автора дисертації, цитованих у розділі:

Karpov PA, 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.org/10.3103/S0096392510040267

Karpov PA, Nadezhdina ES, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Shashina NY, 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

Karpov P, 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).

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.org/10.3103/S0095452717060056

Karpov PA, Blume YB. Is it really that Casein kinase 2 is able to phosphorylate α -tubulin in plants? *Cytol. Genetics.* 2018; 52 (2): 103-111. doi.org/10.3103/S0095452718020044

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.org/10.3103/S0095452718060038

Karpov PA, Blume YB. Plant β -tubulin phosphorylation on Ser172 as canonical suppressing factor of microtubule growth. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019; 24: 321-326. doi.org/10.7124/FEEO.v24.1123

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.org/10.3103/S0095452719060033

Karpov 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.

Karpov PA, Blume YB. Plant β -tubulin phosphorylation on Ser172 as canonical suppressing factor of microtubule growth. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019; 24: 321-326. doi.org/10.7124/FEEO.v24.1123

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.org: 10.3103/S0095452720040052

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.org/10.3103/S0095452719030022

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* γ -Tubulin. *Cytol. Genetics*. 2019. 53(5): 349-356. doi.org/10.3103/S0095452719050104

РОЗДІЛ 2

КІНОМ МІКРОТРУБОЧОК І РОЛЬ ОКРЕМИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ

2.1. Група протеїнкіназ AGC і їх роль в регуляції тубулінового цитоскелету

2.1.1. AGC-залежне фосфорилування тубуліну

Протеїнкінази групи AGC (родини A, G і C) відомі як важливі регулятори росту, метаболізму, поділу і виживання клітин тварин, дріжджів, вищих рослин [15].

Незважаючи, що рослинні AGC-кінази вже багато років є об'єктами дослідження, інформація стосовно їх функціональної ролі і цільових білків-субстратів надзвичайно мала і фрагментарна і поступається дослідженням функціональної ролі AGC-кіназ у тварин і дріжджів [165, 62, 624]. Деякі рослинні AGC опосередковують передачу сигналів ауксину і, таким чином, приймають участь в регуляції росту і морфогенезу [62, 624]. Тваринні і рослинні AGC-кінази беруть участь в ліпідному сигналінгу через протеїнкіназу PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) і мішень рапаміцину - TOR (Target Of Rapamycin). Рослинні AGC приймають участь у формуванні імунної відповіді, процесах клітинної смерті і в сигнальних каскадах групи стрес-індукованих мітоген-активованих протеїнкіназ [165].

Чимало протеїнкіназ AGC позиціонують як важливі регулятори тубулінового і актинового цитоскелету ссавців і дріжджів [241, 543, 613, 83, 169, 177, 569, 399, 507, 120, 379, 444, 409]. У людини мутації або дисфункція представників даної групи призводить до патогенезу різних захворювань, зокрема раку і діабету [349, 124, 612, 177]. На сьогодні, група AGC-кіназ кіному людини об'єднує понад 60 протеїнкіназ, об'єднаних у 14 родин (рис. 2.1).

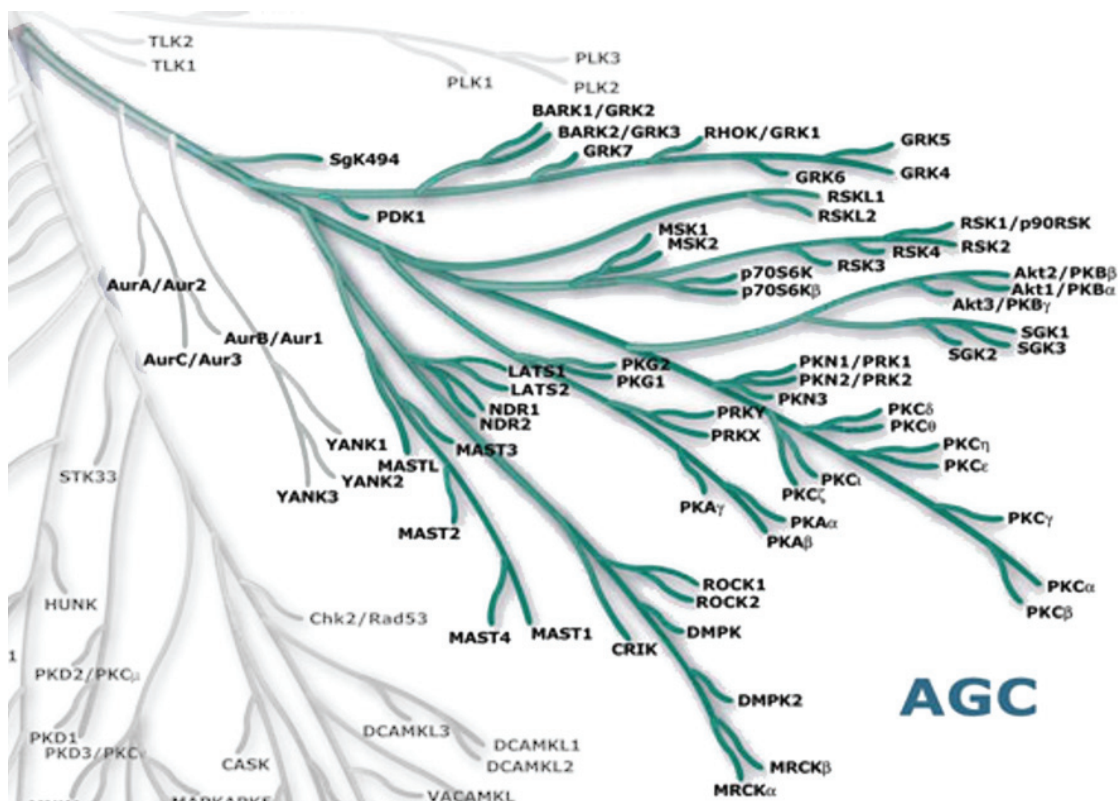


Рис. 2.1. Група AGC-кіназ людини, згідно Manning et al., 2002 [376].

Оскільки для рослинних AGC [62] відсутня інформація про їх вклад в тубуліновий код, актуальне дослідження спиралось на дані представників інших царств і, перш за все, AGC-кінази людини. Першочерговим завданням дослідження була ревізія кіному людини [376], відбір протеїнкіназ AGC, причетних до регуляції цитоскелету, системи мікротрубочок і відомих або експериментально обґрунтованих агентів тубулінових коду [220, 374].

Згідно даним літератури, вищезазначеним вимогам відповідають AGC-кінази ссавців PDK1 [241], представники підродини GPRK [543, 83], підродини MAST [169, 569], підродини NDR [399, 177] протеїнкінази ROCK1 і ROCK2 [507], протеїнкінази C (PKC) [444, 409], асоційовані з PKC протеїнкінази групи PKN / PRK (PKC-related serine / threonine-protein kinases) [569].

2.1.2. PDK1 (3-фосфоінозитид-залежна протеїнкіназа-1)

PDK1 (UniProtKB: PDPK1_HUMAN / O15530) є найбільш важливим представником всієї групи AGC [241]. Існують численні публікації, які свідчать, що дисфункція або пригнічення активності PDK1 ссавців призводить до порушення організації мікротрубочок і поділу клітин [124, 171, 221, 241]. Багато дослідників поєднують її з перебудовами тубулінового цитоскелету [124, 241]. Через призму регуляції цитоскелету PDK1 розглядається як одна з найважливіших мішеней таргетної терапії раку [349, 124]. Зараз відомо, що PDK1 є центральним медіатором клітинної передачі сигналів між фосфоінозитид-3-кіназою і важливими протеїнкіназами сигнальних каскадів: протеїнкіназа В, рибосомальна S6-кіназа p70, сироваткова і глюкокортикоїд-індукована кіназа, протеїнкіназа С та ін. [349].

Потенціал PDK1 як молекулярної мішені пояснюється тим, що ця протеїнкіназа активує всіх представників групи AGC (PKB / Akt, S6K, RSK, SGK, PKC і ін.) [36, 393, 241]. Така роль майстер-кінази робить PDK1 своєрідним «пляшковим горлечком», а її дисфункція призводить до порушення функціонування всієї групи [393]. Це опосередковано впливає на ріст, проліферацію, виживання, метаболізм клітин та інші процеси, безпосередніми регуляторами яких насправді є інші представники AGC [124, 177, 349, 587, 612].

Слід зазначити, що як сама PDK1, так і підпорядковані їй сигнальні каскади є надзвичайно консервативними у представників різних царств. Існування однойменних рослинних гомологів (PDK1, UniProtKB: PDPK1_ARATH / Q9XF67) - це незаперечний факт, так само, як і консервативність більшості PDK1-залежних каскадів у тварин, дріжджів і вищих рослин [493, 552]. Всі актуальні дані підтверджують, що, безпосередньої участі в фосфорилуванні тубуліну або асоційованих з мікротрубочками білків PDK1 не приймає. Таким чином, PDK1 не може

розглядатися як прямий агент тубулінового коду і її подальше дослідження у рослин не мало підстав в межах актуального дослідження.

2.1.3. Рецепторні протеїнкінази, асоційовані з G-білками (G-protein-coupled receptor kinases)

Протеїнкінази GRK функціонально кардинально відрізняються від решти AGC кіназ. Канонічна активація GRK відбувається під час утворення комплексу з трансмембранними рецепторами GPCR (G-protein-coupled receptors), що призводить до стабілізації конформації їх каталітичних доменів. [490, 543]

Тривалий час вважалось, що протеїнкінази GRK здатні активуватися і функціонувати лише у комплексі з рецептором (родопсин, м-холінорецептори, адренорецептори β) [613]. Згодом було доведено, що вільні форми GRK здатні проявляти кіназну активність, причому, субстратна специфічність вільних форм істотно відрізняється від протеїнкіназ, зв'язаних з рецепторами. Вважається, що різна субстратна специфічність зв'язаних і вільних форм GRK обумовлена відмінностями конформацій каталітичних доменів [613].

Примітно, що саме тубулін був першим експериментально доведеним субстратом вільних форм GRK-кіназ [188, 442, 83, 613]. Згодом було доведено існування ряду альтернативних субстратів, характерних лише для вільних форм GRK-кіназ: α -синуклеїн [445], фосдуцін і фосдуцін-подібні білки [476] і тощо [543]. Була підтверджена здатність грибних метаболітів баланола, парокстена та їх похідних пригнічувати кіназну активність всіх відомих представників тваринних GRK (GRK1-7). В якості субстрату в зазначених експериментах використовували біотинільовані димери тубуліну [543]. Доведено, що в умовах *in vitro* вільні форми GRK2 (β ARK) і GRK5 здатні фосфорилювати β III-тубулін у складі очищених гетеродимерів $\alpha\beta$ -тубуліну [613, 206]. Взаємодія з GRK-кіназами була підтверджена як у випадку

дискретних гетеродімерів тубуліну, так і у випадку інтактного комплексу мікротрубочки. Під час моделювання реакції фосфорилування димерів $\alpha\beta$ -тубуліну протеїнкіназою GRK5 *in vitro*, радіоактивний фосфат виявлявся зв'язаним з фракцією мікротрубочок, що підтверджує внесок GRK5 в тубуліновий код, і зокрема, її здатність фосфорилувати β III-тубулін (β III). Дані отримані *in vitro* підтверджуються колокалізацією GRK5 і мікротрубочок в клітинах тварин. На прикладі фосфорилування β -тубуліну (β III), Yoshida et al. (2003) встановили, що фосфорилування протеїнкіназами GRK2 і GRK5 відбувається за Ser444 (ділянка С-хвосту), що, на думку авторів, може впливати на взаємодію з асоційованими білками [613]. Сьогодні вважають, що вищезгадана модифікація важлива для формування протофіламентів мікротрубочки [206, 613].

На час актуального дослідження дані стосовно існування рослинних гомологів GRK-кіназ були відсутні.

2.1.4. Серин-треонінові протеїнкінази, асоційовані з мікротрубочками (MAST - Microtubule Associated Serine/Threonine protein kinases)

Тваринні протеїнкінази родини MAST грають важливу роль в регуляції системи мікротрубочок і клітинного циклу [169, 569]. Дані протеїнкінази, перш за все, асоціюються з системою мікротрубочок, колокалізуються з ними і впливають на організацію і динаміку тубулінового цитоскелету [54]. MAST2 клітин мозку фосфорилує дистрофін і утрофін, модулюючи їх спорідненість до мікротрубочок і БАМ, регулюючи утворення МТ-асоційованого мультіпротеїнового комплексу під час дозрівання сперматозоїдів, а також взаємодіє з PTEN, регулюючи процеси клітинного росту і апоптозу [554, 542].

Сьогодні не викликає сумніву, що MAST2 ссавців є частиною комплексу ферментів, які регулюють мікротрубочки, впливаючи на їх динаміку,

щонайменше, через фосфорилування асоційованих білків [542]. Вважається, що взаємодія MAST2 (Q6P0Q8) з мікротрубочками відбувається за рахунок двох доменів - кіназного і PDZ (PROSITE: PDOC50106, ділянка 948-1212 амінокислот) [168].

Крім того, в останні роки значна увага приділяється найбільш атиповому представнику групи MAST-кіназ - протеїнкіназі Greatwall (MASTL або GWL). Відомо, що Greatwall грає ключову роль у запуску мітозу, ініціації фази М і коректному проходженні поділу [567]. Сприяючи інактивації протеїнофосфатази 2А (PP2A) під час М-фази, Greatwall здійснює опосередковане інгібування PP2A шляхом активації ARPP19 і ENSA, фосфорилуючи їх за Ser62 і Ser67 відповідно. В свою чергу, ARPP19 і ENSA пригнічують активність комплексу фосфатази PP2A, специфічно інгібуючи субодиницю PPP2R2D (PR55δ) [567, 88]. Така інактивація PP2A під час фази М необхідна для підтримання високої активності комплексу циклін-В1-CDK1 [569]. Відомо, що відновлення контрольних точок після пошкодження ДНК також пов'язане з пригніченням активності Greatwall. Доведено що Greatwall здатна фосфорилувати гістони *in vitro*, однак це припущення доки не отримало остаточного експериментального підтвердження [77, 163].

Фундаментальний характер контролюючих процесів передбачає досить високу консервативність MAST-подібних протеїнкіназ у представників різних царств. Рослинні гомологи тривалий час залишались невідомими. Під час актуального дослідження було показано, що рослинні протеїнкінази IRE є найбільш близькими структурними і функціональними гомологами тваринних MAST. Було отримано експериментальні докази їх ролі в регуляції тубулінового цитоскелету [275, 73, 103, 104]. Крім того, вперше тваринні MAST і рослинні IRE було запропоновано у якості нових агентів тубулінового коду, а також визначено найбільш ймовірні сайти MAST / IRE-специфічного фосфорилування [274, 265, 275, 103, 104]. Слід зазначити, що на момент дослідження

узагальнений мотив сайту MAST-специфічного фосфорилування також був відсутній.

2.1.5. Родина NDR (Nuclear Dbf2-related)

Родина NDR (Nuclear Dbf2-related) входить до групи AGC-кіназ і об'єднує чотири протеїнкінази: дві LATS (LATS1 и LATS2), дві STK38 (STK38 і STK38L) [399]. Згідно з даними літератури, тваринні представники родини дуже часто асоціюються з регуляцією клітинного поділу [177]. Попередній пошук рослинних гомологів за подібністю послідовностей каталітичних доменів показав наявність досить значної подібності з певними рослинними протеїнкіназами, які належать до групи AGC [273, 276, 277].

Аналіз літератури і спеціалізованих баз даних засвідчив, що з двох представників STK38 (Serine / threonine-protein kinases 38) в регуляції клітинного поділу приймає участь лише протеїнкіназа STK38L (STK38-Like) [177]. Щодо канонічної STK38 така інформація відсутня. Було показано, що STK38L бере участь в регуляції структурних процесів в зрілих нейронах, або нейронах, що перебувають на заключних стадіях диференціації. Показано, що протеїнкіназа STK38L проявляє асоціацію з актиновими філаментами і мембранним комплексом STK24 / MST3, але не колокалізується з мікротрубочками [177]. У випадку індукованої інтерференції РНК протеїнкінази STK38L в клітинах лінії ADEX (Aberrantly Differentiated Endocrine eXocrine) спостерігається інгібування проліферації клітин та, індукція апоптозу. Пригнічення експресії STK38L викликає зростання експресії протеїнкінази LATS2 і регулятора клітинного циклу p21 [177]. Поза сумнівом, зв'язок STK38L і мітотичних процесів є очевидним, проте він є опосередкованим і не пов'язаний з фосфорилуванням білків тубулінового цитоскелету. Таким чином, в рамках актуального дисертаційного дослідження,

подальший аналіз ролі STK38 і STK38L в регуляції тубулінового цитоскелету не мав сенсу.

Large tumor suppressors 1 і 2 (Lats1 і Lats2) або Великі пухлинні супресори 1 і 2 є одними з центральних протеїнкіназ онкокаскаду Hippo, які забезпечують баланс між проліферацією клітин і апоптозом [587]. Встановлено, що їх роль реалізується завдяки негативній регуляції протеїнкінази CDK1 [177]. Слід відзначити, що тваринні Lats1 і 2 приймають участь у каскадах ключових контрольних точок клітинного циклу і мітозу. Підтверджено, що Lats1 і Lats2 локалізуються в центросомах, але їх роль в регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок ссавців і досі залишається незрозумілою. Mukai et al. (2015) встановили, що Lats1 взаємодіє з протеїнфосфатазою CDC25B, яка водночас проявляє центросомальну і ядерну локалізацію, впливаючи на зв'язок між формуванням центросом і проходженням мітозу. Хоча і було доведено, що Lats1 не фосфорилує Cdc25B, втрата Lats1 в ембріональних фібробластах миші спричиняє аномальне зростання рівня Cdc25B і гіперактивацію Cdk2, що, в свою чергу, викликає аномальне подвоєння центріолей [399]. Водночас, протеїнкінази LATS приймають участь у формуванні стійкості мікротрубочок до похідних таксолу як складові сигнального шляху Cdk1-LATS-Pin1 [612].

Нами було доведено існування рослинних гомологів тваринних LATS [273, 277], однак їх участь в регуляції системи мікротрубочок розглядається як опосередкована і не має безпосереднього зв'язку з посттрансляційними модифікаціями молекул тубуліну [612]. Таким чином, протеїнкінази LATS також не розглядались як агенти тубулінового коду і були за межами завдань дисертаційного дослідження.

2.1.6. PRho-асоційовані протеїнкінази ROCK1 і ROCK2

Згідно із даними літератури, ROCK1 і ROCK2 позиціонуються як протеїнкінази, асоційовані з цитоскелетом [507]. Однак, їх зв'язок з мікротрубочками і фосфорилуванням тубуліну у тварин не підтвердився. Ці протеїнкінази розглядаються як ключові регулятори актинового цитоскелету і клітинної полярності [508].

Підтверджено, що ROCK1 приймає участь в регуляції скорочення гладких м'язів, організації актинового цитоскелету, формуванні стресових волокон і осередкової адгезії, ретракції нейритів, клітинної адгезії і рухливості через фосфорилування ADD1, BRCA2, CNN1, EZR, DPYSL2, EP300, MSN, MYL9 / MLC2, NPM1, RDX, PPP1R12A і VIM [507, 508552]. Показано, що ROCK2 регулює дуплікацію центросом шляхом взаємодії з нуклеофосміном (Nucleophosmin / B23) [371, 259], а ROCK1 бере участь в позиціонуванні центросом [98], що також було підтверджено центросомальною локалізацією цих протеїнкіназ [235].

Таким чином, дані протеїнкінази, безсумнівно, впливають на фундаментальні процеси клітини, однак, не є агентами тубулінового коду.

2.1.7. Протеїнкінази C (Protein kinase C)

Тривалий час протеїнкінази C ссавців асоціювались виключно з регуляцією актинового цитоскелету. Але взаємодія з F-актином була підтверджена лише для ізотипу PKC ϵ . Особливістю цієї PKC-кінази є наявність актин-зв'язуючого мотиву (LKKQET), який розташовано між субдоменами C1a і C1b [444, 409]. Таким чином, до початку поточного десятиріччя вважалось, що зв'язок тваринних протеїнкіназ C з тубуліновим цитоскелетом є опосередкованим [409]. Але нещодавно було доведено, що протеїнкінази C,

зокрема, PKC α здатні до прямого фосфорилування тубуліну. Було встановлено, що PKC α фосфорилує α 6-тубулін людини за амінокислотним залишком Ser165 [379, 120]. На прикладі клітин раку молочної залози - лінія MCF-10A, було експериментально доведено, що у α 6-тубуліну людини PKC-специфічне фосфорилування відбувається саме за Ser165. Крім того, експерименти на лінії MCF-10A підтвердили вплив цієї модифікації на динаміку мікротрубочок [379].

Таким чином, протеїнкіназа PKC α як агент тубулінового коду ссавців відповідала концепції актуального дослідження і була початком під час пошуку рослинних гомологів.

2.1.8. Протеїнкіназа C - подібні кінази

PKN / PRK (PKC-related serine/threonine-protein kinases) [567]. Наразі ця група протеїнкіназ (PKN1 / PRK1, PKN2 / PRK2 і PKN3) розглядається як підродина протеїнкіназ C [450].

Доведено, що представники цієї групи залучені у регуляцію динаміки протофіламентів актинового цитоскелету, впливають на процеси міграції клітин, інвазії пухлинних клітин і транскрипцію. Фосфорилуючи кортактін (CTTN) в гіалурон-індукованих астроцитах, PKC-подібні протеїнкінази зменшують його здатність взаємодіяти з протофіламентами актину [180]. Так само, PKN-залежне фосфорилування гістон-діацетилази 5 (HDAC5) призводить до зниження швидкості її міграції, впливає на проходження фаз клітинного циклу (G2/M), мітоз і цитокінез через ECT2-опосередковану регуляцію [184]. В цілому, незважаючи на важливу роль в онтогенезі клітини, ці протеїнкінази не пов'язані з регуляцією системи мікротрубочок і не можуть розглядатися як агенти тубулінового коду. Крім того, їх зв'язок з регуляцією активного цитоскелету також є опосередованою.

Таким чином, виходячи з актуального стану дослідження зв'язку протеїнкіназ AGC з регуляцією цитоскелету, було зроблено висновок, що найбільш перспективними для пошуку рослинних AGC-агентів тубулінового коду є гомологи тварин протеїнкіназ GRK (GRK1-7), PKC α (протеїнкіназа C α) і MAST (MAST2 і GreatWall).

2.2. Вклад протеїнкіназ групи CMGC в регуляцію системи мікротрубочок і безпосередньо в тубуліновий код

З еволюційної точки зору, представники CMGC належать до групи архаїчних протеїнкіназ. На сьогодні їх існування підтверджено для всіх еукаріот, а їх представники проявляють значну подібність на рівні кіномів представників різних царств [261, 560]. Назва групи CMGC (іноді ідентифікується як родина) є акронімом, що складається з перших літер найбільш важливих підродин: циклін-залежні кінази (CDK), мітоген-активовані протеїнкінази (MAPK), глікогенсинтазні кінази 3 (GSK3) і CDC-подібні кінази (CLK). Згодом до групи додалися інші підродини CMGC, які включають протеїнкінази DYRK та SRPK [261]. На сьогодні, група протеїнкіназ CMGC людини об'єднує 62 каталітичні субодиниці [560]. Також існує певна кількість протеїнкіназ, які проявляють досить значну подібність каталітичних доменів до представників CMGC (CMGC-подібні протеїнкінази), але офіційно не належать до зазначеної групи [376].

Очевидно, що протеїнкінази CMGC збереглась у більшості філогенетично-віддалених організмів [261, 222]. Це означає, що базовим і найбільш важливим структурним і функціональним молекулярним механізмом, які асоційовані з консервативними субстратами і сайтами CMGC-специфічних модифікацій, також притаманна певна подібність [67]. Крім того, сайти/залишки, пов'язані з найбільш фундаментальними функціями еукаріотичної клітини, до яких без сумніву відноситься регуляція тубулінового

цітоскелету, є найбільш перспективним пулом структурної консервативності білків [276]. Це передбачає певну консервативність ферментів-трансфераз, асоційованих з тубуліновим кодом [615]. Зрозуміло, що еволюція протеїнкіназ відбувалась нерівномірно і представники різних родин зберегли різний рівень консервативності, подібність субстратів, сайтів і функцій [377]. Однак, у випадку CMGC-кіназ ми маємо приклад мінімальних еволюційних потрясінь видоутворення [67, 261, 540].

На початку актуального дослідження стало зрозуміло, що з усіх тваринних CMGC/ CMGC-подібних протеїнкіназ лише п'ять мають клітинну колокалізацію і/або доведений зв'язок з мікротрубочками і тубуліном: CDK1 (CDC2), CDK2, MAPK1 / ERK2, GSK, MNB / DYRK і CK2 [264]. Саме тому, аналізуючи внесок CMGC-специфічного фосфорилування в тубуліновий код, основна увага зосереджувалась саме на пошуку рослинних гомологів вищезазначених протеїнкіназ.

2.2.1. CMGC-залежна регуляція тубулінового коду і системи мікротрубочок

Ще на зорі анотації рослинних кіномів стало зрозуміло, що у рослин існують представники всіх основних груп CMGC-кіназ, знайдених у ссавців [202, 92]. На підставі гомології до протеїнкіназ тваринного і дріжджового походження, було встановлено, що рослинні CMGC найбільш активно задіяні в ключових кіназних каскадах і відповідають за сприйняття зовнішніх сигналів [588, 491]. Їх активація здійснюється подібним чином, шляхом аутофосфорилування відповідних сайтів активаційної петлі, у складі канонічних субдоменів VI і VIII, які у різних CMGC-кіназ мають суттєві родинні відмінності [588, 264]. В межах дисертаційного дослідження було

підтверджено існування рослинних гомологів канонічних CMGC-кіназ MNB / DYRK і CDK [588, 264].

2.2.1.1. Циклін-залежні протеїнкінази (CDKs). Підродина CDC2/CDKX. На сьогодні, регуляторна функція CDK-кіназ, зокрема, роль CDK1-циклінового комплексу, який регулює проходження клітинного циклу, визначається як консервативна для всіх еукаріот. У рослин існують гомологи цикліну і протеїнкіназ CDK, які мають консервативний канонічний мотив PSTAIRE. Було встановлено, що під час експресії різних рослинних CDK в модельній системі дріжджових клітин з дефектом за нативним геном CDC28 (CDK1_YEAST) окремі рослинні CDK були здатні нівелювати порушення клітинного циклу, які виникали під впливом нокауту нативного гену модельної системи [129]. Було встановлено, що протеїнкінази CDK самі є субстратами інтенсивного фосфорилування, що, в значній мірі, зумовлює їх фундаментальне значення як ключового перемикача сигнальних каскадів. Незважаючи на те, що роль значної кількості модифікацій ще не зовсім зрозуміла, співпадіння цих сайтів у тваринних, дріжджових і рослинних CDK визначає функціональний консерватизм їх посттрансляційної регуляції. Безсумнівна консервативність механізму активації протеїнкіназ CDK у тварин, дріжджів і рослин через фосфорилування залишку тирозину активаційної петлі [523, 534].

Давно відомо, що CDK1 (Cdc2) має суттєвий вплив на систему мікротрубочок тварин, дріжджів і рослин [564, 589, 153]. Fourest-Lieuvain et al. (2006) було експериментально підтверджено, що Cdk1 здатна фосфорилувати β -тубулін *in vitro* і *in vivo* [153]. Встановлено, що фосфорилування β -тубуліну відбувається за залишком Ser172 і цей сайт проявляє значну еволюційну консервативність. В свою чергу мутації Ser172, в тому числі міміктичні (EGFP- β 3-tubulinS172D/E), унеможливають вбудовування мутантних молекул тубуліну до структури мікротрубочки [153]. Структурне моделювання і експериментальні дані, отримані на інших модельних об'єктах, передбачають,

що фосфорилювання Ser172 погіршує як зв'язування GTP з β -тубуліном, так і інтеграцію димерів $\alpha\beta$ -тубуліну в структуру мікротрубочки [153, 271].

2.2.1.2. Мітоген-активовані протеїн кінрази (MAPKs - mitogen activated protein kinases) представляють досить гетерогенну групу CMGC-кіназ, активація яких відбувається під впливом зовнішніх факторів: стресові чинники, цитокіни, фактори росту, гормони та ін. [207]. Протеїнкінази MAPK регулюють активацію мітозу і регулюють процеси безпосередньо пов'язані з поділом клітин [531]. Як було зазначено, MAPK є збірною групою протеїнкіназ, яка містить три родини p38 MAPKs (або p38), JNK/SAPK (c-Jun-N-terminal kinase/Stress activated protein kinases) і ERK (Extracellular signal regulated kinases). Вважається, що активність протеїнкіназ ERK пов'язана з перцепцією сигналів і задіяна в процесах виживання і проліферації клітин [253]. В свою чергу, активація протеїнкіназ p38 і JNK/SAPK пов'язана з індукцією апоптозу [605].

Таким чином, зазначена група априорі зв'язана з фундаментальними процесами, які залежать від глобальної реорганізації цитоскелету [484]. Повна каталітична активність цих протеїнкіназ залежить від подвійного фосфорилювання за залишками сірину і тирозину мотиву Thr-X-Tyr активаційної петлі. Активаційне фосфорилювання здійснюється атиповими протеїнкіназами типу MAPKK, які здатні до фосфорилювання не лише залишків сірину і треоніну, але й тирозину [16, 531]. Зараз відомо, що рослинні протеїнкінази MAPK, наприклад АТМРК1 і АТМРК2 з *A. thaliana*, відповідають за сприймання сигналів ауксинів, АБК і етилену [531]. Рослинні MAPK, аналогічно протеїнкіназам інших організмів, приймають участь в регуляції проліферації клітин [523].

Встановлено, що суперконсервативний MAPK-каскад у рослин призводить до активації різноманітних факторів транскрипції, фосфоліпаз, білків сфери регуляції цитоскелету, білків, зв'язаних з мікротрубочками, експресії генів, які реагують на стимули навколишнього середовища [531, 311].

Доведено, що протеїнкінази MAPK з тваринних клітин регулюють полімеризацію мікротрубочок шляхом фосфорилування БАМ типу II (MAP2 і MAP4), але для рослин цей механізм неможливий внаслідок втрати цього типу БАМ [456]. Докази безпосереднього MAPK-залежного фосфорилування молекул тубуліну зараз відсутні. Таким чином, незважаючи на безсумнівний вклад в регуляцію цитоскелету, протеїнкінази MAPK не можуть вважатися агентами тубулінового коду.

2.2.1.3. Глікоген-синтази кінази 3 (GSK-3). Існування гомологів GSK-3 доведено у ссавців, *Drosophila*, дріжджів і рослин. Тваринні GSK-3 приймають участь у гормональних відповідях, є функціональними гомологами гена *shaggy/zeste-white 3*, який у *Drosophila* відповідає за морфогенетичну програму клітин, зумовлюючи їх полярність під час ембріогенезу [426]. Рослинні гомологи GSK-3 утворюють невелику мультигенну родину, представники якої у процесі розвитку демонструють значні відмінності рівня експресії [433]. У *A. thaliana* існує щонайменш п'ять генів, які кодують GSK-3-подібні протеїнкінази ASKs. Важливо зауважити, що з п'яти ASK проявляють дуальну специфічність дві протеїнкінази. Саме вони грають важливу роль, оскільки за рахунок автофосфорилування залишків тирозину активаційної петлі відбувається повна активація каталітичних властивостей тваринних GSK-3. Слід зазначити ідентичність топології цільового залишку активаційної петлі у рослинних ASK і тваринних GSK-3. Доведено, що рекомбінантні рослинні ASK здатні фосфорилувати MBP і інгібітор фосфатаз 2 (phosphatase inhibitor-2), що цілком співпадає з канонічною субстратною специфічністю тваринних GSK-3 [50]. Існують численні докази участі рослинних гомологів GSK-3 в процесах росту і розвитку рослин, проте, їх причетність до регуляції тубулінового коду і досі не має підтвердження і, найімовірніше, є опосередкованою [523, 253].

2.2.1.4. YAK1-подібні протеїнкінази подвійної специфічності (Dual specificity YAK1-related kinases, MNB / DYRK). Першу DYRK-подібна протеїнкіназа з *Saccharomyces cerevisiae* відкрили понад 30 років назад [290].

Згодом було встановлено, що представники родини DYRK (MNB / DYRK) належать до облігатних ферментів еукаріот. На сьогодні доведено, що протеїнкінази цієї родини причетні до регуляції більшості внутрішньоклітинних процесів [170]. Результати структурно-геномних досліджень, подібність каталітичних доменів представників родини DYRK (DYRK1A, DYRK1B (Mirk), DYRK2, DYRK3 (REDK) і DYRK4) свідчить про їх походження від спільної предкової послідовності. Таким чином, актуальні ізоформи генів DYRK-кіназ є наслідком генних дуплікацій, які, ймовірно, відбулись на останніх фазах еволюції багатоклітинних організмів [13, 37].

Тваринні протеїнкінази DYRK (Dual Specificity YAK1-Related Kinases), об'єднують групу тирозин-регульованих протеїнкіназ з підродини MNB/DYRK [193, 413] (рис. 6.1) і є структурними і функціональними гомологами дріжджової Yak1 [170, 415] і MNB (minibrain kinases) з *Drosophila* [415]. Встановлено, що тваринні DYRK приймають участь у кількох сигнальних каскадах регуляції розвитку і підтримання клітинного гомеостазу [13, 187]. Ключовими особливостями протеїнкіназ DYRK слугують достатньо консервативний механізм тирозин-специфічного аутофосфорилування та селективне серин-треонін специфічне фосфорилування субстратів за мотивом RPX(S/T)P [194]. На прикладі протеїнкінази DYRK1A з *Rattus norvegicus* було показано, що її здатність фосфорилувати екзогенні субстрати за серином перевищує фосфорилування за треоніном. Водночас, експериментальна перевірка підтвердила відсутність фосфорилування екзогенних субстратів за залишками тирозину [289]. Доведено, що аутофосфорильовані за тирозином протеїнкінази DYRK втрачають здатність до дуального фосфорилування і надалі функціонують як протеїнкінази серин-треонінової специфічності [194].

Тваринні DYRK фосфорилують велику кількість різноманітних субстратів і грають ключову роль у сигнальних каскадах клітинного циклу, ядерної регуляції, впливають на проліферацію клітин, диференціацію і

розвиток мозку [13, 187, 40]. Підтверджено, що Dyrk1A-залежне фосфорилування білку tau (TAU_HUMAN, P10636: 523-PGSRSR \square PSLPTP-535), впливає на розвиток мозку [478, 613], а мутації або гіперекспресія гену Dyrk1A безпосередньо асоційовані з розвитком синдрому Дауна [193, 398].

Як згадувалося раніше, Yak1 була першою і залишається єдиною протеїнкіназою родини MNB / DYRK, знайденою у *Saccharomyces cerevisiae* [478]. На початок актуального дослідження, існування протеїнкіназ DYRK (Dual Specificity YAK1-Related Kinases) було підтверджено у грибів, тварин, найпростіших і міксоміцетів. Водночас, у рослин існування рослинних протеїнкіназ DYRK залишалось гіпотетичним. Виконаний нами біоінформатичний пошук, дослідження інших авторів підтвердили існування рослинних білків з ще невідомою функцією, які проявляли подібність до вже анотованих представників MNB / DYRK тваринного і дріжджового походження [13, 340, 276, 452, 285, 264]. На підставі гомології послідовностей у рослин визначається від одного до трьох YAK1-подібних генів, хоч їх детальний опис спочатку був відсутній. З іншого боку, рослини не мають гомологів філогенетично близьких до протеїнкіназ НІРК (Homeodomain-Interacting Protein Kinases), які у тварин зв'язані з регуляцією транскрипції [293], але мають гомологи найбільш близької до DYRK протеїнкінази PRP4 (рис. 6.1) [340].

Нещодавно, на прикладі нейронів *Drosophila melanogaster* було доведено, що протеїнкіназа MNB фосфорилує Ser172 β -тубуліну [271, 420]. Автори довели ідентичність цього механізму фосфорилування β -тубуліну і для тваринної DYRK1A [420]. Ser172 розташовано всередині петлі T5 β -тубуліну, яка топологічно граничить з сайтом гідролізу GTP, входить до контактної інтерфейсу (+)-кінця мікротрубочки і впливає на утворення протофіламентів [239, 271, 412]. На сьогодні, протеїнкінази MNB / DYRK розглядаються як агенти тубулінового коду і регулюють збирання протофіламенту мікротрубочок з протеїнкіназою CDK1.

2.3. Вклад казеїнкінази 2 в тубуліновий код

Наразі немає єдиної думки стосовно положення казеїн-кінази 2 відносно групи CMGC. Згідно даним літератури, каталітичні субодиниці СК2 нерідко визначаються як протеїнкінази CMGC, але завдяки певним відмінностям каталітичних доменів вони відокремлені у самостійну родину CMGC-подібних протеїнкіназ [376, 108]. У філогенетичному плані каталітичні субодиниці тваринні СК2 є найбільш близькими гомологами канонічних протеїнкіназ CMGC (рис. 6.1) [377].

Казеїнкіназа 2 (СК2) є убіквінтарним ферментом еукаріот і найчастіше зустрічається у вигляді тетрамеру, який містить дві ізоензимні каталітичні (СК2 α and СК2 α') та дві регуляторні субодиниці [354]. Крім того, у ссавців було знайдено додаткову ізоформу каталітичної субодиниці - СК2 α'' [509]. У людини існує лише одна ізоформа регуляторної субодиниці СК2 β , однак, у інших організмів (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*) були знайдені додаткові ізотипи [354].

СК2 беруть участь в регуляції проходження клітинного циклу, циркадних ритмів, апоптозу, злоякісної трансформації, канцерогенезу і багатьох інших процесів [196, 566]. Доведено, що СК2 залучена до процесів контролю морфології і полярності клітин, впливає на системи мікрофіламентів і мікротрубочок [274, 276, 277, 284]. Останній факт було підтверджено на різноманітних модельних системах, починаючи від дріжджів і закінчуючи ссавцями [349, 350, 486]. Таким чином, участь СК2 в регуляції полярності клітин, їх морфології, структури і функцій цитоскелету не викликає сумнівів.

Перші експериментальні докази зв'язку СК2 і тубуліну в клітинах тварин були отримані під час дослідження інтактних мікротрубочок, отриманих з мозку кроля [125]. Згодом методами ко-імунопреципітації і Вестерн-блотингу було показано, що в клітинах тварин каталітичні субодиниці СК2 α і СК2 α' здатні до безпосередньої взаємодії з тубуліном; при цьому,

колокалізації вільних регуляторних субодиниць (СК2 β) і тубуліну не спостерігалась [145, 350]. Використовуючи метод інтерференції РНК встановили, що СК2 асоційована з мікротрубочками і опосередковує їх структурну цілісність [350]. При інкубації тканини сітківки щура з інгібіторами СК2 відбувається дезінтеграція мікротрубочок і блокування міграції ядра в ювінільних клітинах ретинальних попередників [85]. Інкубація культури астроцитів і везикулярних ендотеліальних клітин людини з інгібіторами СК2 спричиняє зміни форми клітин і порушення організації цитоскелету [312]. Все це свідчить, що фосфорилування білків мікротрубочок протеїнкіназою СК2 сприяє збірці мікротрубочок і безпосередньо впливає на їх динаміку [64].

Нещодавно була доведена колокалізація СК2 і мікротрубочок, і здатність цього ферменту безпосередньо фосфорилувати α -тубулін у *Trypanosoma equiperdum* [64, 456]. Результати імуноблотінгу очищених за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі і радіактивно-мічених фракцій тубуліну і СК2 показали наявність лише однієї позитивної маркерної мітки фосфорилування, яка ідентифікується при використанні СК2 α - і тубулін-специфічних антитіл [64]. Це доводить фізичну асоціацію пулів тубуліну і СК2 у *T. equiperdum*. Проте, незважаючи на докази такої взаємодії, сайт фосфорилування α -тубуліну протеїнкіназою СК2 залишався невідомим. Отримані на *Trypanosoma* дані свідчать що СК2-залежне фосфорилування тубуліну має сприяти стабілізації і цілісності мікротрубочок та робить свій внесок в динаміку перебудов мікротрубочок [64].

Відомо, що α -ланцюг рослинної СК2 містить консервативний каталітичний домен, а тетрамерний голоензим комплексу СК2 складається з двох α - і двох β -субодиниць [400]. Як і в разі СК2 з тварин і грибів, рослинний гомолог фосфорилує казеїн *in vitro* і проявляє активність, як аналогічні ферменти з представників інших царств [389]. Крім того, рослинна СК2 фосфорилує транскрипційний фактор GBFI, що зумовлює його взаємодію з ДНК [301]. У відповідь на дію світла СК2 фосфорилує транскрипційний

фактор PIF1, що призводить до протеосомної деградації PIF1 і активації фотоморфогенезу [74]. Оскільки рослинна СК2 фосфорилує фактори ініціації трансляції, прогнозується, що вона може приймати участь в ініціації трансляції [122]. Функціонуючи як компонент регуляції циркадних ритмів рослин, СК2 фосфорилує транскрипційний фактор CCA1 (Circadian Clock Associated 1) - головний циркадний осцилятор покритонасінних, що призводить до його стабілізації [361]. Встановлено, що СК2 необхідна для підтримання і контролю геномної стабільності і структури хроматину [394]. Крім того, СК2 може працювати як ектокіназа, і фосфорилує ряд екстроцелюлярних білків [400]. На прикладі *Solanum berthaultii* було доведено, що СК2 колокалізується з мікротрубочками і здатна фосфорилувати SB401 - білок, що зв'язується як з мікротрубочками, так і з F-актином [355]. Експериментально показано, що фосфорилування казеїн-кіназою 2 знижує здатність SB401 утворювати комплекс з мікротрубочками. Автори висунули припущення, що через фосфорилування білка SB401 рослинна СК2 здатна водночас регулювати як мікротрубочки, так і актинові філаменти [355]. Проте, крім опосередкованого впливу через асоційовані білки, дані стосовно безпосередньої взаємодії СК2 і тубуліну вищих рослин на момент дослідження були відсутні [456, 121].

Тому необхідна була ідентифікація сайтів СК2-специфічного фосфорилування α -тубуліну у *Trypanosoma equiperdum* і вищих рослин на прикладі тубуліну з *Arabidopsis thaliana*. Враховуючи значну міжвидову подібність молекул тубуліну і консервативність білків комплексу СК2 у *Trypanosoma* і *Arabidopsis*, така взаємодія була очевидна.

Підводячи підсумки стану дослідження протеїнкіназ CMGC і близьких до них казеїн-кіназ 2, були зроблені припущення стосовно можливості участі їх рослинних гомологів в регуляції тубулінового коду. В межах дисертаційного дослідження найбільш перспективними кандидатами на роль агентів тубулінового коду були обрані відомі і потенційні гомологи CMGC-кіназ CDK1 і DYRK1A, а також рослинні протеїнкінази СК2.

2.4. Вклад представників родини Казеїн кіназа 1 в регуляцію тубулінового цитоскелета і безпосередньо в тубуліновий код

Серин-треонін специфічні казеїн-кінази 1 належать до однойменної підродини казеїн-кіназ 1 (СК1), представники якої характеризуються еволюційним консерватизмом [376]. Всі відомі представники СК1 є мономерами, доменна архітектура яких включає лише серин-треонін специфічний кіназний домен, а їх експресія є облігатною і в певній мірі спостерігається майже у всіх клітинах організму [181]. СК1 обіймають лідируючі позиції за кількістю цільових субстратів фосфорилування і відіграють фундаментальну роль в найрізноманітніших життєво важливих процесах еукаріотичних клітин [492]. СК1 тварин і грибів мають безпосереднє відношення до регуляції клітинного циклу, сегрегації хромосом, диференціації та морфогенезу клітин, апоптозу, мембранного транспорту, регуляції циркадних ритмів і т.і. [464, 302, 438, 123, 426, 402, 236] Зокрема, доведено, що СК1 ссавців колокалізуються з цитоскелетом, впливають на динаміку мікротрубочок, а їх субстратами слугують білки тубулін і tau [495, 151, 346, 262, 435, 236]. Було встановлено, що ізотип СК1 α є однією з тваринних протеїнкіназ, яка бере безпосередню участь в гіперфосфорилуванні білку tau. Зазначений процес спостерігається при розвитку нейродегенеративних патологій, під час формування тілець спорадичного міозиту (sIBM) і хвороби Альцгеймера [262]. Доведено, що тваринна СК1 δ здатна вибірково взаємодіяти з мікротрубочками, впливати на їх динаміку і регулювати структуру і функцію апарату веретена поділу [595, 141]. СК1 δ ссавців і дріжджів здатні фосфорилувати такі структурні БММ як EB1 (MAP1) [628, 599]. Під час мітозу тваринна СК1 δ проявляє виражену асоціацію з мітотичним веретеном, транс-мережею апарату Гольджі і цитоплазматичними гранулярними частинками, безпосередньо асоційованими з мікротрубочками [317]. Експериментально була доведена асоціація і субстратна специфічність СК1 δ миші стосовно α і β -

тубуліну, MAP1A, MAP4, tau, статміну і APC (Adenomatous Polyposis Coli protein) [41, 369, 599, 628]. Один з основних механізмів стабілізації мікротрубочок тварин реалізується через SK1 δ -специфічне фосфорилування ряду амінокислотних залишків α - і β -тубуліну [4, 41, 372]. Це, ймовірно, може впливати на швидкість обороту мікротрубочок і на збирання мікротрубочок під час мітозу [317]. Існують підстави вважати, що SK1 δ може виступати як одна з головних протеїнкіназ, що забезпечує характерну для М-фази перебудову мережі мікротрубочок [41].

В клітинах тварин на поточний момент ідентифіковано сім ізотипів SK1 (SK1 α , SK1 β , SK1 γ 1, SK1 γ 2, SK1 γ 3, SK1 δ і SK1 ϵ), які є продуктами окремих генів, відрізняються локалізацією і рівнем експресії [303, 3, 333, 96]. Всі відомі SK1 мають консервативний каталітичний (кіназний) домен в N-кінцевій частині, варіабельний С-хвіст, на який припадає більшість амінокислотних замін, які в значній мірі детермінують субстратну специфічність різних ізотипів [179, 178, 89].

Очевидним є факт, що група рослинних SK1-подібних (SK1-Like) протеїнкіназ більш складніша і більша за кількістю ізотипів SK1 тваринного походження і SK1 грибів. Геном *Arabidopsis thaliana* нараховує, щонайменше, 14 генів SK1 і SK1-Like (SKL) кіназ, продукти експресії яких відрізняються за рівнем експресії та внутрішньоклітинною локалізацією (цитоплазма, ядро, ендоплазматичний ретикулум, везикуло-подібні гранульовані структури, тощо) [333].

Загальний план доменної організації і доменного складу рослинних SKL аналогічний SK1 тварин і дріжджів, а їх каталітичні домени зберігають значну подібність до кіназних доменів SK1 тварин і грибів [427, 276, 280, 281]. Це обумовлює подібність дії специфічних інгібіторів, що пройшли апробацію на тваринних і грибних SK1 і відкриває можливість застосування зазначених сполук для дослідження функціональної ролі рослинних SKL [280, 281]. Однак, останнє вимагає враховувати більш складний характер групи

рослинних SKL, більшість функцій яких і досі залишається не вивченою [579, 280]. Проте, особливе і фундаментальне положення рослинних протеїнкіназ SK1-like не викликає сумнівів. Рослинні SKL залучені у механізми регуляції метаболізму брасиностероїдів [356], гібериліновий сигналінг, процеси регуляції онтогенезу [116] і міжклітинного сигналінгу [337]. У арабідопсису активність протеїнкінази SKL6 (casein kinase-like 6), найімовірнішого функціонального гомолога тваринної SK1 δ , асоціює з пізньою фазою регуляції ендосомального компартменту, впливає на мембранний транспорт вищих рослин [44]. Аналогічно тваринній SK1 δ , рослинна SKL6 зв'язана з системою кортикальних мікротрубочок *in vivo*, фосфорилує тубулін *in vitro*. [43, 281] Експерименти із застосуванням домінантно-негативних мутантів і ліній з гіпертрофією функціонування, зумовлені нокаутом або наявністю ектопічної форми гену SKL6, показали, що SKL6-залежне фосфорилування рослинного тубуліну може грати вирішальну роль в регуляції інтерфазної динаміки мікротрубочок [43]. Експериментально доведено, що SKL6 фосфорилує рослинний β -тубулін *in vitro* за залишками Ser413 і Ser420. Гіперекспресія SKL6 змінює інтерфазну організацію кортикальних мікротрубочок. Це ідентифікує SKL6 як новий БАМ і учасника тубулінового коду вищих рослин [43, 347].

Значна частина функціональних аспектів SK1-залежної регуляції системи мікротрубочок вищих рослин і досі не з'ясована. Одним з ефективних і відносно доступних методів дослідження функції протеїнкіназ є застосування специфічних інгібіторів [514]. Відомо лише кілька потужних і водночас селективних інгібіторів SK1, які пройшли апробацію лише на тваринних об'єктах [108, 435]. Одним з найбільш перспективних SK1-спрямованих інгібіторів є D4476 (4-[4-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксін-6-іл)-5-(2-піридиніл)-1H-імідазол-2-іл]бензамід) [459, 435]. Масштабне біохімічне профілювання проти панелі протеїнкіназ людини включало SK1 δ показало, що 10 мкМ D4476 пригнічує SK1 δ на >90% і практично не впливає на активність інших

протеїнкіназ [459, 435]. Було висунуто припущення, що D4476, аналогічним чином може пригнічувати активність всіх ізотипів СК1 людини. Таке припущення ґрунтувалося на значній подібності послідовностей різних ізотипів СК1 і подібному впливі D4476 на деякі інші СК1 ссавців і *S. pombe* [435]. Однак, вважаємо таке припущення неоднозначним, оскільки ще в 2008 році було зареєстровано патент (US 2008/0146617 A1), що підтверджував інгібуючий ефект 10 мкМ D4476 по відношенню СК1ε людини і показував відсутність такого у випадку ізотипів СК1γ1 (CSNK1G1) і СК1γ2 (CSNK1G2) [18]. Інгібуючий ефект 10 мкМ D4476 було підтверджено для СК1α з еритроцитів людини [620]. Певні відмінності інгібуючої дії D4476 на рівні ізотипів казеїн-кінази 1 людини існують. Проте, на сьогодні, за інгібуючою здатністю і вибірковістю дії D4476 слугує найбільш популярною речовиною прижиттєвого дослідження функціональної ролі протеїнкіназ СК1. Для рослинних об'єктів залишається низка питань стосовно механізмів ліганд-білкової взаємодії D4476 і СКЛ рослин і функціональної ролі останніх.

Існують дані, що рослинні казеїн-кінази 1 здатні фосфорилувати тубулін [43, 347]. Ця група протеїнкіназ може здійснювати безпосередній вклад в тубуліновий код і функціональну спеціалізацію мікротрубочок [276]. Результати дослідження реакції тубулінового цитоскелету на обробку рослин *A. thaliana* інгібітором D4476 дозволили продемонструвати зв'язок між дією різних концентрацій D4476 і внутріклітинною реорганізацією системи мікротрубочок. Було підтверджена кореляція змін в організації кортикальних мікротрубочок і морфологічних проявів селективного пригнічення рослинних СКЛ [280].

Оцінка структурних особливостей взаємодії D4476 з різними ізотипами СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* включала визначення, які саме ізотипи рослинних СКЛ є найбільш ймовірними пріоритетними мішенями D4476 і можуть бути зв'язані з перебудовами системи мікротрубочок, що спостерігались під впливом СК2-специфічного інгібування [281].

Поєднання методів інгібіторного аналізу, фізіологічного експерименту, лазерної конфокальної мікроскопії, біоінформатики та структурної біології, дозволили не лише підтвердити взаємозв'язок СК2-залежного фосфорилування з перебудовами системи мікротрубочок рослин, але і виявити ізоформи рослинних SKL, причетних до цих перебудов. За результатами дослідження було не лише визначено рослинні SKL, що можуть впливати на тубуліновий цитоскелет *A. thaliana*, але і надано оцінку механізмів цього впливу:

- прямого, що реалізується безпосередньо через тубуліновий код;
- опосередкованого, що реалізується через фосфорилування структурних БАМ.

2.5. Роль протеїнкіназ BUB1 в регуляції системи мікротрубочок і мітотичного апарату клітини

Групу протеїнкінази BUB1 (BUB1, BUBR1 і SgK396) іноді визначають як окрему підродину протеїнкіназ, філогенетично наближену до родини SK1 [376]. Виконана в межах актуального дослідження кластеризація повного кіному *A. thaliana* і відмінності доменної архітектури визначають BUB1 у складі окремої клади (рис. 4.1), хоч і наближеної до клади SK1 (рис. 4.1) [279, 423].

Як ключова протеїнкіназа чекпоінт-контролю мітотичного апарату, тваринна BUB1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1) необхідна для збирання веретена поділу і екваторіального вирівнювання хромосом [422]. Ця серин-треонін специфічна протеїнкіназа грає ключову роль в роботі ансамблю чекпоінт-білків сфери регуляції кінетохору: CENPF, BUB1B, CENPE і MAD2L1.[82, 251, 296]. Зокрема, BUB1 детермінує локалізацію PLK1 відносно кінетохору [449], у свою чергу PLK1 контролює локалізацію SGOL1 (Shugoshin-like 1, SGO1) і в такий спосіб впливає на когезію сестринських

хроматид [580]. BUB1 слугує субстратом для макрокомплексу циклосом APC/C (Anaphase Promoting Complex or Cyclosome) [536]. Як мультисубодинична убіквітин-залежна протеаза, APC/C посилює деградацію ключових білків мітозу - секурину і цикліну-В, що зумовлює розходження хромосом і завершення мітозу [536]. Інгібування APC/C здійснюється комплексом білків мітотичної точки рестрикції (МТР), названим МСС (Mitotic Checkpoint Complex), і реалізується протеїнкіназою Cdc20 через взаємодію з ключовим субстратом APC/C [395]. Ця група білків, вперше найдена в клітинах дріжджів, вважається еволюційно консервативною [462]. Їх характерна локалізація - в компартменті кінетохору, звідки вони впливають на екваторіальне позиціонування хромосом [82, 251]. Поява кінетохору, не зв'язаного з мікротрубочками веретена, викликає зростання хромосомної концентрації білків комплексу МТР і свідчить про здатність кінетохору взаємодіяти з мікротрубочкою. Було показано, що на стадії метафазного вирівнювання сигнали BUB1 і hBUBR1 зменшуються у кілька разів, а чекпоінт-білки MAD1 і MAD2 залишають область кінетохору [296].

Граючи ключову роль в мітозі і мейозі у *Mamalia*, BUB1 є партнером білків Mad1, Cdc20, Bub3, Mad2, BubR1, Skp1, CenpE, CenpF, Plk1, Pp2A, Sgo1, Sgo2 і Rec8 [224, 258, 324, 524]. Для BUB1 і інших МТР білків (BUB3, MAD1, MAD2, MAD3 і Mps1) дріжджів були ідентифіковані гомологи у *Fungi* [462], *Mamalia* [424] і *Mycetozoa* [552]. Загалом, на час дослідження, в базі даних UniProtKB було депоновано п'ять анотованих послідовностей Bub1:

BUB1_HUMAN (UniProt: O43683) з *Homo sapiens*,

BUB1_MOUSE (UniProt: O08901) з *Mus musculus*,

BUB1_YEAST (UniProt: P41695) з *Saccharomyces cerevisia*,

BUB1_SCHPO (UniProt: O94751) з *Schizosaccharomyces pombe*,

BUB1_DICDI (UniProt: Q54CV5) з *Dictyostelium discoideum*.

Була доведена консервативність функції BUB1 у різних видів і, зокрема, її участь у регулюванні мітотичної точки рестрикції [298].

Незважаючи на відсутність прямих доказів фосфорилування тубуліну, фундаментальна роль, яку грає BUB1 у поділі клітин і формуванні мітотичного веретена, дозволяє розглядати цю протеїнкіназу як потенційного агента тубулінового коду. А тому в межах актуального дослідження вирішувалось кілька ключових задач:

- 1) пошук рослинних гомологів BUB1;
- 2) дослідження функціонального зв'язку рослинних гомологів з регуляцією мітотичного апарату;
- 3) з'ясування можливої участі рослинних гомологів BUB1 у безпосередньому фосфорилуванні α -, β - і γ -тубуліну.

2.6. Вклад супер-родини протеїнкіназ CDPK-SnRK в тубуліновий код вищих рослин

Кальцієві сигнали відіграють важливу роль у процесах росту, розвитку та адаптації рослин, включаючи реакції до біотичних і абіотичних стресів [526, 318]. Катіон кальцію (Ca^{2+}) є одним з найбільш поширених вторинних месенджерів клітинного сигналіngu. Більшість ефектів Ca^{2+} як вторинного месенджеру реалізується завдяки його взаємодії з кальцій-зв'язуючим білком кальмодуліном (CaM / надродина EF-hand), присутнім у цитоплазмі всіх еукаріотичних клітин. Безпосередньо кальмодулін не має ферментативної активності, але виконує функцію інтеграції і трансдукції Ca^{2+} -сигналу у сигнальні каскади ферментів, зокрема, Ca^{2+} /CaM-залежних протеїнкіназ [526]. Ca^{2+} -залежні протеїнкінази входять до каскадів фосфорилування, причетних до регуляції експресії генів за допомогою Ca^{2+} -залежних факторів транскрипції і активаторів Ca^{2+} -залежної відповіді [318].

Рослинні Ca^{2+} -залежні (CDPK) і SNF-споріднені (SnRK) протеїнкінази утворюють спільну суперродину CDPK-SnRK, яка об'єднує сім типів протеїнкіназ: Ca^{2+} -залежні протеїнкінази (CDPK), CDPK-подібні протеїнкінази (CRK), фосфоенолпіруват (ФЕП) карбоксилазні кінази (PPCK), PPCK-подібні

протеїнкінази (PEPRK), кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaMKs), кальцій / кальмодулін-залежні протеїнкінази (CCaMK), а також, SNF-споріднені протеїнкінази (SnRK) [225, 283].

Спектр процесів, до регуляції яких причетні протеїнкінази CDPK-SnRK, надзвичайно широкий. Існують опосередковані дані стосовно участі представників цієї суперродини в регуляції цитоскелету, проте підтвердження їх здатності до безпосереднього фосфорилування тубуліну з'явилися нещодавно [135, 407].

Перша інформація стосовно зв'язку Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ з регуляцією тубулінового і актинового цитоскелету з'явилась на початку 80-х років минулого сторіччя [575, 267, 283].

Най більша доказова база зв'язку з цитоскелетом накопичена для кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини, які утворюють чисельну групу філогенетично споріднених ферментів. Значна частина цих протеїнкіназ CaMK2, MLCK, AMPK, BRSK, CHEK, DAPK, LKB1, MARK, PKD, RSK, DCLK1, TRIO, калірин та тітин беруть участь у регуляції цитоскелету [28, 575]. Однією з найбільш вивчених тваринних протеїнкіназ є протеїнкіназа CaMK2, для якої здатність фосфорилувати мікротрубочки підтверджена експериментально [28, 575]. Відомо, що протеїнкіназа CaMK2 γ регулює динаміку мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок кінезину MCAK [214]. Hoffman et al. (2013) підтвердили, що тваринні протеїнкінази CaMK2 беруть участь і у регуляції актинового цитоскелету [213]. Біохімічно доведено, що вони можуть безпосередньо зв'язуватись з актином і впливати на динаміку та структуру мікрофіламентів через фосфорилування або утворюючи комплекси з рядом асоційованих білків таких, як активатори і супресори регулятора деполімеризації актину - кофіліну [625, 465]. Вважається, що функції ізоформ CaMK2 суттєво різняться. Наприклад, у миші лише ізотип CaMK2 β утворює комплекс з F-актином і рекрутує до цього протеїнкіназу CaMK2 α [500]. Протеїнкіназа CaMK2 та

кальцінейрин утворюють систему посттрансляційної регуляції активності кофіліну за рахунок пригнічення активатора кофіліну SSH1L та регуляції його внутрішньоклітинної локалізації. Протеїнкіназа CaMK2 зв'язує SSH1L у комплексі з 14-3-3 білками і здійснює його фосфорилування за залишками Ser937 та Ser978. CaMK2 також фосфорилує супресор кофіліну LIMK1 за залишком Thr508 [625]. Ізоформа CaMK2 δ асоціює та одночасно регулює актиновий і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів у мишей [135].

Зарас вважається, що CaMK2-залежне фосфорилування причетне до формірування електростатичних патернів інтерфейсів зв'язування різномонітних асоційованих білків на поверхні мікротрубочок [109].

Відомо, що тваринні протеїнкінази CaMK2 здатні фосфорилувати білки, асоційовані з мікротрубочками, зокрема, MAP6, який бере участь у стабілізації мікротрубочок [28].

2.6.1. Вклад кальцій-залежного фосфорилування в регуляцію рослинного цитоскелету

Незважаючи на численні докази зв'язку CaMK2 з цитоскелетом тварин, роль їх гомологів у регуляції мікротрубочок рослин і досі залишається нез'ясованою. Враховуючи консервативність тубуліну і певну гомологію Ca²⁺-залежних протеїнкіназ тварин і вищих рослин [416], існують підстави для припущення наявності гомологічних сайтів фосфорилування в молекулах тубуліну рослинного походження.

Відомо, що у протопластів тютюну α - і β -тубулін зазнає інтенсивного фосфорилування *in vitro* безпосередньо після активації Ca²⁺-кальмодулін-залежних протеїнкіназ [58]. У проростків *Arabidopsis thaliana* інгібування Ca²⁺-залежних протеїнкіназ за допомогою кальмодулін-специфічного інгібітору W7 призводить до реорганізації мікротрубочок і, як наслідок, до змін у морфології коренів [504]. Обробка корневих апексів триденних проростків *Allium cepa*

антагоністом кальмодуліну тріфлюроперазіном змінює орієнтацію мікротрубочок з поперечною на поздовжню [59]. Рослинні Ca^{2+} -залежні протеїнкінази, поза сумнівом, є важливою ланкою між кальцієвими сигналами і значним спектром фізіологічних, структурних і ростових відповідей рослинних клітин, які безпосередньо залежать від реорганізації мікротрубочок [488].

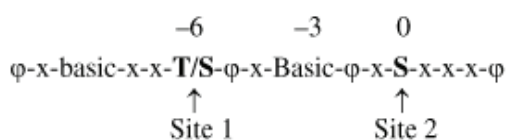
Для взаємодії з іонами Ca^{2+} у представників суперродини CDPK-SnRK (calcium-dependent protein kinase / Snf1-related protein kinase) є відповідні Ca^{2+} -зв'язуючі домени, які містять мотиви «EF-hand» (Pfam: PF00036, InterPro: IPR002048) або утворюють комплекси з кальмодуліном [204, 283]. Загалом суперродина об'єднує сім родин серин/треонінових протеїнкіназ: Ca^{2+} -залежні протеїнкінази (CDPKs - Calcium-Dependent Protein Kinases), CDPK-подібні протеїнкінази (CRKs - CDPK-Related Kinases), фосфоенолпіруват-карбоксилазні кінази (PPCKs - PhosphoenolPyruvate Carboxylase Kinases), ФЕП-карбоксилаза-залежні кінази (PEPRKs - PhosphoEnolPyruvate carboxylase kinase-Related Kinases), кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaMKs - CalModulin-dependent protein Kinases), Ca^{2+} -кальмодулін-залежні протеїнкінази (CCaMKs - Calcium and CalModulin-dependent protein Kinases), а також Snf1-подібні протеїнкінази (SnRKs - Snf1-Related protein Kinases) [225, 416, 283].

Найбільше доказів причетності до регуляції цитоскелету наразі отримано для Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ людини CaMK2, MLCK, AMPK, BRSK1/2, CHEK, DAPK, LKB1 (STK11), MARK, PKD і DCLK1, [416, 28, 575]. Найбільш вивченими є Ca^{2+} /кальмодулін-залежні протеїнкінази CaMK2 [28, 575]. Встановлено, що CaMK2 γ регулює динаміку мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок MCAK [214]. Протеїнкіназа CaMK2 здатна фосфорилувати білки, асоційовані з мікротрубочками, зокрема, MAP6, що призводить до стабілізації мікротрубочок у тваринній клітині [28]. У ссавців протеїнкіназа CaMK2 фосфорилує актин і актин-асоційовані білки [213, 625]. Підтверджено, що CaMK2 δ ембріональних аксонів миші асоціюється і регулює і актиновий, і тубуліновий цитоскелет [135].

Нещодавно було доведено, що окремі протеїнкінази AtCRK2, AtCRK3, і AtCRK8 групи CRK здатні до нетипового тирозин-специфічного фосфорилування С-кінцевої ділянки β -тубуліну *A. thaliana*. Цей механізм посттрансляційної регуляції поширюється лише на ізотипи TBB2, TBB3 і TBB7. Крім того, було встановлено, що ці модифікації не впливають на структуру мікротрубочки, однак причетні до формування контактних інтерфейсів взаємодії з БАМ [407, 20]

Незважаючи на численні докази зв'язку Ca^{2+} -залежного фосфорилування з цитоскелетом, роль рослинних протеїнкіназ в регуляції мікротрубочок і досі залишається недостатньо вивченою. Міжвидова консервативність молекул тубуліну і певна гомологія Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ припускає існування автентичних сайтів фосфорилування тубуліну тваринного і рослинного походження [416]. Тому одним із завдань дисертаційного дослідження був профільний пошук сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування рослинного тубуліну і потенційного внеску кальцієвих протеїнкіназ в тубуліновий код.

Згідно Huang et al. [251], послідовності потенційних сайтів у CDPK і SnRK1 подібні і можуть бути відображені у вигляді мотиву:



Використовуючи як субстрат синтетичний пептид ACS (1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase), Sebastia et al. підтвердили наявність певної унікальності субстратної специфічності у різних ізотипів CDPK. Було доведено, що CDPK здатні впізнавати три різні мотиви (ϕ = гідрофобний амінокислотний залишок):

- 1) класичний мотив - $\phi_{-5}\text{-x-R}_{-3}\text{-x-x-S}_0$ - [331, 21];
- 2) Мотив ACA2 - $[\text{R}_{-9}\text{-R}_{-8}\text{-x-R}_{-6}]\text{-}\phi_{-5}\text{-x-x-x-x-S}_0\text{-x-R}_{+2}$ [229];
- 3) Мотив ACS $\phi\text{-3-R-2-}\phi_{-1}\text{-S}_0\text{-}\phi_{+1}\text{-x-K}_{+3}\text{-R}_{+4}$ [496].

2.6.2. Вклад SNF1-залежного фосфорилування в регуляцію цитоскелету

В останні роки значна увага приділяється з'ясуванню функціональних особливостей родини протеїнкіназ SnRK (SNF1-related protein kinase), які детально охарактеризовані для *Arabidopsis thaliana*. З філогенетичної точки зору, протеїнкінази SnRK є найближчими гомологами протеїнкіназ тварин і протеїнкіназ SNF1 (Sucrose non-fermenting 1) дріжджів, які активуються АМФ (AMP activated protein kinase) [594, 487]. Для SnRK протеїнкіназ характерні багатофункціональність і складність механізмів дії [191, 443]. Функціональні комплекси цих протеїнкіназ є складними гетеромерами, до складу яких входять обов'язкові каталітичні субодиниці SnRK1 α (SnRK α -1/KIN10/At3g01090; SnRK α -2/KIN11/ At3g29160), а також асоційовані з ними регуляторні SnRK1 β (SnRK β -1/At5g21170; SnRK β -2/At4g16360; SnRK β -3/At2g28060) та активаційні SnRK1 γ (SnRK γ -1/At3g48530; SnRK γ -2/At1g69800) субодиниці і, ймовірно, субодиниця SnRK1 $\beta\gamma$ (SnRK $\beta\gamma$ /At1g09020) [410, 544]. Функції цих комплексів SnRK1 у рослин різноманітні [548]. Серед основних можна відзначити підтримку внутрішньоклітинного гомеостазу та формування відповіді на різноманітні стреси [544, 100]. Також протеїнкінази SnRK1 пригнічують анаболічні і активують катаболічні шляхи енергетичного обміну [544], регулюють циркадні ритми, проростання та дозрівання насіння, беруть участь у процесах аутофагії, метаболізмі крохмалю і т.д. Слід зазначити, що SnRK1 протеїнкінази є важливими транскрипційними факторами і регулюють роботу понад 1000 генів [443]. Однак багато функцій комплексів SnRK1 та їх компонентів досі недостатньо вивчені, що і зумовлює постійний інтерес до дослідження представників цієї родини [548, 113, 99].

Цікавим фактом є те, що протеїнкінази SnRK1 α (SnRK α -1/KIN10/At3g01090 та SnRK α -2/ KIN11/At3g29160) є найближчими гомологами тваринних протеїнкіназ BRSK (Brain-specific kinases 1/2) [634]. Представники родини BRSK відіграють важливу роль у формуванні полярності нейронів та

дуплікації центросом [70]. Враховуючи схожість каталітичних доменів протеїнкіназ SnRK1 α і BRSK 1/2, та міжвидову консервативність головних цитоскелетних білків тварин і рослин, ми припускаємо відповідну схожість сайтів фосфорилування та можливу участь протеїнкіназ KIN10 (At3g01090, AK21, SKIN10, SNR2, SNRK1.1) і KIN11 (AT3G29160, SNF1, SNRK1.2) у регуляції цитоскелету вищих рослин. Із метою пошуку нових субстратів і вивчення їх можливої взаємодії з білками цитоскелету, нами були створені генетичні конструкції pGWB8-KIN10:His і pGWB8-KIN11:His і підтверджена структурна гомологія каталітичних субодиниць рослинної SnRK1 і тваринної протеїнкінази BRSK1.

Таким чином, проаналізована і узагальнена актуальна інформація стосовно ролі фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну в формуванні функціональної спеціалізації мікротрубочок. Проведено аналіз тлумачення терміну «тубуліновий код» через призму структурно-функціональної спеціалізації мікротрубочок і складових зазначеного феномену (роль ізотипів тубуліну і внесок посттрансляційних модифікацій). Визначені місце і роль зворотного фосфорилування як одного з типів посттрансляційного перетворення α -, β - і γ -тубуліну. Виокремлено 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. Надано обґрунтування певної консервативності групи протеїнкіназ, причетних до регуляції процесів клітинного поділу, регуляції цитоскелету і тубулінового коду. Узагальнена інформація стосовно існуючих доказів безпосереднього фосфорилування тубуліну, відомих сайтів і протеїнкіназ, причетних до зазначених модифікацій. Представлені структурна схема, яка узагальнює інформацію стосовно топології і амінокислотного

оточення експериментально-доведених сайтів фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну, що виявляють консервативність у *H. sapiens*, *S. cerevisiae* і *A. thaliana*.

Список публікацій автора дисертації, цитованих у розділі 2

Karpov PA, Nadezhdina ES, Yemets AI, Blume YaB. Results of the clusterization of human microtubule and cel-cycle related serine/threonine protein kinases and their plant homologues. Moscow Univ Biol Sci Bulletin. 2010a; 65 (4): 213–216.

Karpov 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. BMC Genomics. 2010b; 11 (S.1): S14, doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.

Karpov PA, 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.

Paganelli L, Caillaud M-C, Quentin M, Damiani I, Govetto B, Lecomte P, Karpov PA, 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

Karpov PA, Blume YB. Is it really that Casein kinase 2 is able to phosphorylate α -tubulin in plants? Cytol. Genetics. 2018; 52 (2): 103-111.

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.

Karpov PA, Sheremet YaA, Blume YaB, Yemets AI. Studying the role of protein kinases CK1 in organization of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells. *Cytol Genet.* 2019; 53 (6): 441–450.

Karpov PA, Rayevsky AV, Sheremet YA, Yemets AI, Blume YB. Structural pattern of CK1-like protein kinases associated with regulation of plant microtubule cytoskeleton. *Cytol Genet.* 2020; 54 (4): 293-304.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Оскільки досліджена група протеїнкіназ, білків цитоскелету і їх взаємовідношень являють надзвичай складну систему, проведення актуального дослідження вимагало застосування диференційованого методологічного підходу для кожного окремого випадку. Тому дослідження мають значні методологічні відмінності і в узагальненому форматі можуть бути представлені лише частково. Тому вважаємо доцільно матеріали і методи дослідження викласти наступним чином: спочатку – узагальнений огляд застосованих матеріалів і методів дослідження, а далі методологічні особливості протеїнкіназ груп AGC (GPRKs, MASTs і PKC α), CMGC (родина CDC/CDKX і MNB/DYRK), близької до CMGC підродина CK2, самостійної родини казеїн-кінази 1 (підродина CK1), самостійної підродина BUB1, а також, Ca²⁺-залежних (CDPK) і SNF-споріднених (SnRK) протеїнкіназ суперродина CDPK-SNRK.

3.1. Загальний огляд матеріалів і методів, що були застосовані під час виконання дисертаційного дослідження

3.1.1. Досліджуваний матеріал

Протеїнкінази кіному *H. sapiens* визначались на підставі даних літератури [376, 377] і спеціалізованих баз даних: UniProtKB (www.uniprot.org), NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). Послідовності і структури рослинних протеїнкіназ відбирались на підставі гомології, даних літератури, аналізу баз даних і трансляційного сканування повних геномів. Нуклеотидні і амінокислотні послідовності – з репозиторіїв NCBI GenBank [45] і UniProtKB [552] відповідно. Об'єктами структурно-біологічних досліджень були експериментальні

структури (x-Ray, NMR, EM) з репозиторію RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org), моделі побудовані методами гомологічного моделювання. Комплекси протеїнкіназ із специфічними інгібіторами отримані шляхом молекулярного докінгу. Молекулярна динаміка 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 протеїнкіназ. Фрагменти експериментально підтверджених і теоретичних сайтів фосфорилування у форматі Xp±7. Дослідження топології сайтів фосфорилування молекул тубуліну виконувалось на структурних моделях фрагментів мікротрубочки побудованих з використанням шаблонної EM-структури 3J6F з *Sus scrofa* [7]. Моделі макромолекулярних комплексів центрів первинної нуклеації мікротрубочок *A. thaliana* були побудовані з використанням даних кріо-EM мікроскопії і 3D-моделі GCPs/γ-тубулінових комплексів з репозиторії Kollman Lab (<https://sites.uw.edu/jkoll/>) [307]. Контролем були ановані 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.

В дослідженнях використали: Генетичний матеріал рослин винограду сорту 'Pinot Noir'. Клітинну лінію 'Vero', 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 [382]. Суспензійні культури *A. thaliana* та *N. tabacum* BY-2. Рослинні конструкти, клоновані в *E. coli* та *A. tumefaciens*.

Імунопреципітати клітин НЕК293 трансфєкованих рослинними конструктами. Клітини, забарвлені антитїлами компетентними до тубуліну і відповідних протеїнказ [527].

3.2. Методи дослідження

3.2.1. Відбір цільових і еталонних послїдовностей

Пошук і аналіз нуклеотидних і амінокислотних послїдовностей здійснювався із використанням баз даних UniProtKB [552], GenBank [45], TAIR і Kinase.com.

Основою для пошуку рослинних гомологів цитоскелетних білків і протеїнказ були анотовані послїдовності, отримані з репозиторіїв UniProtKB (www.uniprot.org) [552] і NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) [45].

Основною базовою групою для пошуку рослинних гомологів протеїнказ були протеїнкази кіному *H. sapiens*. В окремих випадках було використано послїдовності і структури анотованих протеїнказ представників *Fungi*, *Mycetozoa* і *Viridiplantae*. Вибірку еталонних протеїнказ сформували за даними Manning et al., (2002) [62, 83, 120, 165, 169, 177, 241, 376, 379, 399, 409, 444, 507, 543, 567, 569, 613, 624], відповідних статей бази даних UniProtKB [552] та джерел літератури [15]. Відібрані послїдовності використовувались як контроль під час відбору рослинних гомологів з бази даних UniProtKB (Swiss-Prot і TrEMBL) [552]. Враховувались найбільш актуальні редакції статей UniProtKB.

3.2.2. Пошук і відбір рослинних гомологів

Окрім безпосереднього відбору UniProtKB (Protein KnowledgeBase - www.uniprot.org), пошук гомологів здійснювався за допомогою алгоритмів родини blast із використанням web-сервісів: NCBI BLAST, Expaty BLAST і PDB-BLAST [6].

Blastp-пошук виконувався з використанням послідовностей каталітичних доменів, повних послідовностей і окремих функціонально-важливих ділянок. Як було зазначено раніше, кіназний (каталітичний) домен є найбільш консервативною і не відмінною частиною каталітичних субодиниць всіх протеїнказ [305, 169]. Саме подібність послідовностей каталітичних доменів була використана як первинний критерій пошуку рослинних гомологів [103, 276, 277]. Межі послідовностей каталітичних доменів було визначено за допомогою інструменту SMART і на підставі інформації депонувань UniProtKB [343, 552]. Критеріями відбору гомологічних рослинних протеїнказ були довжина консенсусної ділянки, вага вирівнювання, показник вірогідності або рівень очікування (E-value), ідентичність (%), загальна подібність (%) і кількість гепів (%) [6, 105]. Під час остаточної анотації застосували пошук з використанням повних амінокислотних послідовностей.

Події багаторазового депонування ідентичних білків в UniProtKB виявлялись шляхом порівняння локусів їх генів, яка міститься на асоційованих сторінках web-ресурсу TAIR (The Arabidopsis Information Resource - www.arabidopsis.org) та за допомогою інструменту NCBI Genome Data Viewer (= MapViewer; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>).

3.2.3. Вирівнювання амінокислотних послідовностей

Вирівнювання амінокислотних послідовностей виконувались в програмі ClustalX2 (v.1.83-2.1) (www.clustal.org) [326] із застосуванням відповідних вагових матриць Gonnet і BLOSUM. При цьому застосовувався як штатний протокол множинного вирівнювання, так і протокол вирівнювання за профілем [326].

Для графічного відображення ступеню гетерогенності окремих мотивів або ділянок вирівнювань було використано логі ("Logs"), що будувались за допомогою мережевого сервісу WebLogo3 [112].

3.2.4. Аналіз доменної архітектури

Доменний склад, доменну архітектуру і межі доменів було визначено за допомогою мережевого сервісу SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>, HAMMER2, HAMMER3) [343]. Були застосовані аналогічні інструменти InterPRO (www.ebi.ac.uk/interpro/) [149], Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) [387] і PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) [513] та врахована інформація ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>).

3.2.5. Кладистичний аналіз і реконструкція філогенетичних дерев

Кладистичний аналіз протеїнази, тубуліну і сайтів фосфорилування ґрунтувався на спільній кластеризації відповідних амінокислотних послідовностей. Основними методами філогенетичного аналізу були Neighbor-Joining (NJ) [17, 321], UPGMA [455] і bootstrap [136]. Візуалізація і аналіз дендрограм виконувались в програмах MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) [321], TreeView X [425] NJplot [436] і Unipro UGENE [417].

Аналіз і візуалізація дендрограм здійснювались за допомогою програм TreeView X v.5 [425], FigTree v. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) і MEGA v.5.0 - 7.0.18 (<http://www.megasoftware.net/>) [321].

Під час реконструкції повного кіному *A. thaliana*, для отримання коректної топології філогенетичного дерева було застосовано метод доповнення вибірки ксенологічними послідовностями, зокрема, aphA (Aminoglycoside 3'-phosphotransferase, KKA3_ENTFL, P0A3Y5) з *Enterococcus faecalis* і Serine/threonine-protein kinase RIO1 (RIO1_YEAST, Q12196) з *Saccharomyces cerevisiae*. Зазначені послідовності вже використовувались раніше для визначення коректної топології філогенетичного дерева тотального кіному *A. thaliana* [217, 341, 512].

3.2.6. Аналіз білок-білкових взаємодій

Аналіз білок-білкових взаємодій було виконано за допомогою мережевого інструменту STRING v.11 (STRING Database - <https://string-db.org/>) [528].

Також зазначений інструмент було використано для аналізу білок-білкових взаємодій α - і β -субодиниць комплексу CK2 у *A. thaliana*. Відповідні ізотипи α - і β -субодиниць було відібрано на підставі аналізу з STRING з наступним пошуком найближчих рослинних гомологів за допомогою сервісу Blast [105, 310].

3.2.7. Пошук і аналіз сайтів специфічного фосфорилування

Враховуючи, що актуальне дослідження базувалось на парадигмі, що для молекул тубуліну і, асоційованих з його фосфорилуванням, протеїнази має бути притаманний певний еволюційний консерватизм, враховували певну консервативність сайтів фосфорилування [67, 249]. Зокрема, це брали до уваги під час визначення консервативних сайтів GRK-, РКC α - і MAST-специфічного фосфорилування молекул тубуліну. Первинна інформація стосовно експериментально підтверджених сайтів AGC-специфічного фосфорилування була отримана з ресурсів UniProtKB [552], PhosphoSitePlus [220], PhosphoNetworks [226, 227] і відповідних публікацій. Потенційні сайти фосфорилування тубуліну визначалися за допомогою локальної версії програми GPS v.3.0 (<http://gps.biocuckoo.org>) [352] і мережевого інструменту PROSITE tool (www.expasy.org) [513]. У окремих випадках застосовували спільну кластеризацію теоретичних і експериментально підтверджених сайтів фосфорилування.

Визначення сайтів специфічного фосфорилування засобами сервісу PROSITE tool. Мотиви специфічних сайтів фосфорилування було складено за рекомендаціями і протоколу сервісу PROSITE tool (www.expasy.org) [513]. Під

час сканування послідовностей ізотипів тубуліну за допомогою ScanProsite tool застосували можливість пошуку в базі даних цільових послідовностей, наданих користувачем, і можливість застосування оригінального мотиву, що надавався користувачем (Option 3) [513]. Зазначений метод було використано під час пошуку специфічних сайтів MAST- (Додаток 6.1), SnRK1- (Додаток 6.2), BUB1- і Ca²⁺-залежного фосфорилування тубуліну.

В якості основних контрольних сайтів MAST-специфічного фосфорилування було використано експериментально доведені сайти серин/треонін-протеїнкінази GWL – serine/threonine-protein kinase greatwall (MASTL, GWL, UniProtKB: Q96GX5) людини: 55-KGQKYFD**S**GDYNMAK-69, ідентифіковані на поверхні білка ARP19 - cAMP-regulated phosphoprotein 19 (UniProtKB: P56211) і 60-KGQKYFD**S**GDYNMAK-74 і ендонуклеази ENSA - alpha-endosulfine (UniProtKB: O43768). Як додаткове джерело інформації стосовно сайтів MAST-специфічного фосфорилування, було використано дані з PhosphoNetworks (www.phosphonetworks.org) – бази, що містить дані реконструкції мереж регуляції, створеної із використанням комбінованого підходу, що ґрунтувався на стратегії поєднання біоінформатичних даних і даних, отриманих за допомогою чипів (protein microarray-based strategy) (Додаток 6.1) [226, 227, 408].

Для визначення сайтів MNB/DYRK-специфічного фосфорилування було складено три пошукові патерни PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) [513] на основі даних літератури [289, 403]: R-x(1,3)-**[ST]**-[PVL], R-P-x-**S**-P і R-x-**S**-P. Для пошуку консенсусних ділянок застосували інструменти Pattern Search з web-ресурсу «Protein Information Resource» (PIR - <http://pir.georgetown.edu>), PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>)[513] і BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> у випадку мотиву RPxSP та деяких інших коротких мотивів).

Послідовності 494-х експериментально підтверджених сайтів Ca²⁺-залежного фосфорилування тваринного походження отримали (у форматі Xp±7) з web-ресурсу PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) [220].

Консервативні групи сайтів було визначено шляхом кластеризації, що виконувалась із заборonoю гепів на стадії вирівнювання (ClustalX) [326]. Патерни сайтів і наступний пошук консенсусних ділянок у ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* було виконано відповідно протоколу PROSITE [513]. В якості цільових білків було застосовано актуальні редакції послідовностей молекул α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* з ресурсу UniProtKB.

Кладистичний аналіз сайтів зв'язування і філогенетична ідентифікація найближчих гомологів ґрунтувались на спільній кластеризації амінокислотних послідовностей за методом зв'язування найближчих сусідів [17]. Візуалізацію і аналіз результатів кластеризації було виконано засобами програми MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) [321]. Остаточні уточнені патерні окремих груп сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування було складено відповідно до рекомендацій PROSITE [513]. Графічні логи визначених груп сайтів були побудовані за допомогою мережевого сервісу WebLogo3 [112]

3.2.8. Профільний пошук сайтів специфічного фосфорилування молекул тубуліну

Відповідні консенсуси у складі ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* було визначено шляхом сканування цільових послідовностей проти побудованих патернів PROSITE [513]. Наступна кластеризація спільної групи контрольних послідовностей і послідовностей сайтів, визначених за допомогою створених мотивів, була виконана за методом профільного вирівнювання амінокислотних послідовностей в ClustalX (v.2.0.10) із застосуванням алгоритму кластеризації UPGMA [455] і методу бутстрепінгу [136].

Візуалізація і аналіз дендрограм виконувались за допомогою програмного забезпечення MEGA [321] і FigTree V. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>). Позиції, що були відібрані на підставі результатів профільного пошуку, порівнювались з експериментально підтвердженими

сайтами, отриманими з ресурсу PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>), і зберігались у вигляді окремих бібліотек у форматі Xp±7 (*.fasta) [220].

Остаточні висновки стосовно доступності визначених сайтів для модифікації, прогнозування їх ролі, робили на підставі даних структурно-біологічного дослідження.

3.2.9. Моделювання і структурно-біологічне дослідження просторової структури білків і їх комплексів

Джерелом інформації про просторову структуру білків був RCSB Protein Data Bank. Візуалізацію і аналіз 3D-структур здійснювали в програмі PyMOL. Моделювання просторової структури білків – за допомогою он-лайн сервісів SWISS-MODEL, I-TASSER, програм MODELLER 8v7 [586] і EasyModeller 4.0 [322]. Структурні шаблони профільного моделювання відбирались за допомогою інструменту PDB-BLAST. Молекулярна динаміка (МД) розраховувалась в програмі GROMACS [446] із використанням силових полів (ff) CHARMM, amber99, OPLS-AA, GROMOS 53a6 (G53a6). Критеріями якості 3D-моделей були середньоквадратичні відхилення атомів і енергетичні коливання МД, карти Рамачандрана, графіки DOPE і ANOLEA, протоколи web-сервісів PROCHECK і MolProbity.

Реконструкцію білкових комплексів здійснювали шляхом гомологічного заміщення або білок-білкового докінгу в HADDOCK 2.2 [128]. Докінг лігандів – в програмі CCDC Gold v. 5.3.0 [254]. 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.(Додаток 5)

Обрахунки молекулярної динаміки було виконано з використанням обчислювальних потужностей грид-кластеру ДУ «ІХБГ НАН України» і віртуальних організацій CSLabGrid і MolDynGrid.

3.2.10.1. Моделювання просторової структури протеїнкіназ.

Відбір та аналіз якості структур протеїнкіназ з RCSB Protein Data Bank для шаблонного моделювання просторової структури. Шаблонні структури протеїнкіназ були вибрані за результатами PDB-BLAST пошуку в репозиторії бази даних RCSB Protein Data Bank [78, 472]. Критеріями відбору потенційних матриць були повнота структур (порівняно з повними послідовностями з UniProtKB) [552]), подібність амінокислотних послідовностей (ідентичність, схожість, кількість гепів), роздільна здатність PDB-структури (Å) [182, 126]. Згортка структурних моделей протеїнкіназ дійснювалась методом профільного моделювання.

Реконструкцію просторових структур протеїнкіназ виконували за допомогою методів шаблонного або гомологічного моделювання [316, 604, 52, 586, 322]. Програмні інструменти і протокол згортки первинних моделей були ідентичні тим, що використовували під час реконструкції просторових структур молекул тубуліну. Моделювання виконували із використанням одиничного або множинних структурних шаблонів за допомогою web-сервісів I-Tasser (згортка моделі здійснюється за усередненим профілем з групи шаблонних структур) [604], Swiss-Model (використовує одиничні шаблони) [52], локальної програми MODELLER 8v7 (використовує одиничні шаблони) [586], інтегрованої в оболонку EasyModeller 4.0 (дозволяє здійснювати контрольоване моделювання профілю згортки по групі шаблонних структур) [322].

Оптимізація та верифікація реконструйованих моделей протеїнкіназ за допомогою методу короткочасної молекулярної динаміки. Аналіз тривимірної структури і характер укладки поліпептидного ланцюга протеїнкіназ було виконано із застосуванням програми Swiss-PdbViewer v.4.1 [185] та інформації, представленої в базі даних класифікації білкових структур SCOP [10]. Оптимізація геометрії і перевірка стабільності структурної організації реконструйованих моделей здійснювались за допомогою програмного пакету

GROMACS 4.5 [446] із використанням силових полів: amber99 [218], OPLS-AA [515], GROMOS 53a6 (G53a6) [419], CHARMM [72] та ін. Окремі аспекти протоколів варіювали в залежності від складності задачі.

Оцінка якості структурних моделей. Оцінка якості моделей виконувалась на підставі показників середньоквадратичних відхилень між атомами моделей і енергетичних коливань під час молекулярної динаміки, даних карт Рамачандрана, графіків DOPE і ANOLEA [453]. Остаточна верифікація відібраних моделей виконувалась за допомогою сервісу MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) за показниками: відсоток помилкових ротамерів (%), відсоток відхилення або збігів (%), кількість атомів вуглецевого скелету з відхиленням $>0.25\text{\AA}$, загальний рейтинг структури за результатами MolProbity [593], відсоток амінокислот, що мають некоректні зв'язки (%), відсоток амінокислот, що утворюють некоректні кути (%) [94].

Моделювання просторової структури протеїнкіназ AGC. Структурні шаблони, використані для реконструкції просторової структури AGC-кіназ *H. sapiens*: 3krw, 3krx, 3v5w, 5ukl для GRK2 і GRK3; 4yhj для GRK4; 4tnb і 4tnd для GRK5; 2асх, 3пуп, 3пуо для GRK6; 3iw4 і 4га4 для PKC α .

Структурні шаблони, використані для реконструкції просторової структури гомологів з *A. thaliana*: 4l44, 4l46, 4tnb і 4tnd для KPK1_ARATH; 4l43, 4l44 і 4l46 для KPK2_ARATH; 5ncl для MLW24.2_ARATH; 5ncl для F21M11.15_ARATH; 4lqs і 5ncl для AtNdr1_ARATH.

Також було використано моделювання в I-Tasser, що використовує множинні шаблоні згортки структурних моделей [604].

Для остаточного структурного порівняння було використано наступні експериментальні структури з RCSB Protein Data Bank: 5UKL (x-Ray, 2.15 Å) [573] для GRK2, 4TNB (x-Ray, 2.113 Å) [309] для GRK5 і 3IW4 (x-Ray, 2.8 Å) [572] для PKC α .

Моделювання просторової структури MAST/IREH-подібних протеїнкіназ.

1) GMLK (Grape MAST2-Like Kinase) з *Vitis vinifera*. Реконструкцію каталітичних доменів MAST2 *H. sapiens* і A7PHB5 (GMLK (Grape MAST2-Like Kinase)) було виконано за методом гомологічного моделювання. Застосування сервісу Swiss-Model в обох випадках дозволило визначити найкращим шаблоном первинної згортки структуру каталітичного домену цАМФ-залежної протеїнкінази з *Sus scrofa* (RCSB Protein Data Bank: 1CDK, UniProtKB - P36887, KAPCA_PIG) [65, 275].

Реконструкція структурних моделей MAST2 людини, миші і GMLK з *V. vinifera* була виконана із застосуванням мережевого інструменту I-Tasser [103, 275, 604]. Гомологічна згортка 3D-моделі GMLK з *V. vinifera* була виконана із застосуванням шаблонних PDB-структур: 3d0e (2.00 Å), 2jed (2.32 Å), 4q9z (2.60 Å), 3pfq (4.00 Å), 3d0e (2.00 Å), 4aw2 (1.70 Å), 3wf7 (1.85 Å), 3d0e (2.00 Å) і 4dc2 (2.40 Å). При реконструкції структури каталітичних доменів MAST2 людини і миші було використано структури 3d0e (2.00 Å), 2jed (2.32 Å), 4q9z (2.60 Å), 3pfq (4.00 Å), 4gv1 (1.49 Å) і 4dc2 (2.40 Å).

2) Для реконструкції структурної моделі каталітичного домену IREN1 (At3g17850) з *A. thaliana* використали сервіс I-Tasser і шаблонні PDB-структури: 2f2u(A), 2v55(C), 2vd5(A), 3cqw(A), 3d0e(B) 3pfq(A), 3tku(A), 4aw2(A) 4crs(A) 4q9z(A). Структурна реконструкція і вирівнювання фрагментів N-кінцевого домену асоціації з мікротрубочками (MA_Ser/Thr_Kinase_dom) протеїнкінази IREN1 (332-424 а.к.) також виконувалось в I-Tasser із використанням шаблонних PDB-структур: 1pg2(A), 3ezl(A), 3h9b(A), 3h97(A), 3ib7(A), 3jvo(J), 3n2x(A), 3tka(A) і 4cjx(A).

Релаксацію сольватованих моделей було використано методом швидкої молекулярної динаміки (GROMACS 4.5.3, час - 1 нс, силове поле - G53a6).

Моделювання просторової структури протеїнкіназ GMGC.

Реконструкція просторової структури каталітичних доменів протеїнкіназ DYRK/MNB/DYRK. Гомологічне моделювання просторових структур виконали за допомогою програми Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [586]. Як шаблоні згортки використали x-Ray структури з RCSB Protein Data Bank: 3ANQ (2.6 Å), 2VX3 (2,4 Å) [520, 39] і 1Z57 (1,7 Å) [75], відібрані за результатами пошуку із використанням інструменту PDB-BLAST (www.rcsb.org/pdb/search/advSearch.do?st=SequenceQuery) [6].

Структурна модель каталітичного домену протеїнкінази YAK1 з *S. cerevisiae* (YAK1_YEAST, UniProtKB: P14680) була побудована із використанням шаблонної PDB-структури 5y86 (X-Ray, 1.9 Å) протеїнкінази Dyrk3 людини [294].

Структурна модель рослинної циклін-залежної протеїнкінази 1 (CDKA1_ARATH, UniProtKB: P24100) була побудована із використанням шаблонної PDB-структури 6gu7 (X-Ray, 2.75 Å), яка належить циклін-залежній протеїнкінази 1 людини. Структурна модель дріжджової циклін-залежної протеїнкінази 1 з *S. cerevisiae* (CDK1_YEAST, UniProtKB: P00546) була також побудована з використанням шаблонної PDB-структури 6gu7.

Для прогнозування елементів вторинної структури білку було застосовано декілька сервісів LOBO (<http://protein.bio.unipd.it/lobo/>) [545], ArchPred (<http://manaslu.aecom.yu.edu/loopred/>) [146], SooperLooper [211].

Реконструкція комплексу протеїнкінази CK2. Первинним шаблоном для реконструкції комплексу рослинної CK2 була PDB-структура 1JWH (x-Ray, 3.1 Å CK2 *H. sapiens*) [411]. Субодиниці α (СКА1 і СКА2) і β (СКВ1 і СКВ2) CK2 *A. thaliana* було реконструйовано окремо із використанням сервісу Swiss-Modell [47] і зібрано в комплекс шляхом білок-білкового докінгу в програмі HADDOCK 2.2 [128] з наступною оптимізацією отриманих комплексів за допомогою 20 нс молекулярної динаміки в програмному пакеті Gromacs-

5.0.4. [557]. Всього було виконано 8 довготривалих обрахунків молекулярної динаміки та 9 окремих симуляції на стадії попередньої підготовки. Середній розмір системи складав 111000 атомів з врахуванням атомів водню, іонів Na^+ і Cl^- та молекул води. Підготовчі етапи включали мінімізацію енергії із алгоритмами швидкого спуску (steepest descent method) та застосування методу сполучених градієнтів (conjugate gradient method). Додатковий етап включав розподілення води при повній фіксації $\text{C}\alpha$ -атомів. Молекулярна динаміка і оцінювання якості моделей було виконано із використанням раніше зазначених інструментів і методів.

Детальніше окремі аспекти використання зазначених підходів і методів надаються при викладенні результатів дисертаційного дослідження.

Реконструкція просторової структури каталітичних доменів протеїнкіназ SKI і SKL. Для профільного моделювання просторової структури за гомологією була використана програма Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [586] і ряд шаблонних структур з RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org): 1CKI (СК1 δ , 2.30 Å) з *R. norvegicus*, 2CMW (СК γ 1, 1.75 Å), 2C47 (СК γ 2, 2.40 Å) і 2CHL (СК γ 3, 1.95 Å) з *H. sapiens*, 1CSN (СКI1, 2.0 Å), 1EN4 (СКI1, 2.80 Å) з *Schizosaccharomyces pombe*. Відбір шаблонних структур ґрунтувався на результатах пошуку за гомологією послідовностей з використанням інструменту Protein Data Bank BLAST (www.rcsb.org) [182]. Після 10 нс оптимізації сольватованих моделей в силовому полі amber99 їх якість було перевірено за допомогою серверу ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) (www.protein.bio.puc.cl)[453, 185].

Реконструкція просторової структури каталітичних доменів рослинної протеїнкінази BUB1. Як матрицю згортки використали просторову структуру каталітичного домену протеїнкінази Bub1 (BUB1_HUMAN, UniProt: O43683) людини (PDB: 3E7E) [260]. Відсутні у шаблоні петлі було добудовано за допомогою програми Modeller 9v7 [143]. Для реконструкції просторових структур каталітичних доменів рослинних гомологів (EEC82122.1 з *O. sativa*

Indica, EEE67244.1 з *O. sativa* Japonica і XP_002274770.1 з *V. vinifera*) застосовувалися програмні пакети Modeller 9v7 [143], GROMACS (<http://www.gromacs.org/>) і силове поле amber99SB (<http://ambermd.org/>).

Для коректної реконструкції проблемних структурних елементів було використано додаткові PDB-структури 3LAU, 3CON, 3CFA і 3M1I. Ділянки, що мали значні структурні відхилення 3E7E, було додатково перевірено із застосуванням серверу SuperLooper [211] і баз петель: LIP і LIMP.

Нейтралізація системи була виконана шляхом протонування із застосуванням інструменту H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>), що дозволило досягти нейтрального значення протонування ($\text{pH} = 7.0$) іонізованих груп білка. AM1-BCC заряди були розраховані за допомогою програми Antechamber. Мінімізація енергії виконувалась за методом сполученого градієнта у моделі оточення TIP3P з шаром розчиннику = 10\AA . Оцінка якості структур здійснювалась за допомогою Molprobity (<http://molprobity.biochem.duke.edu>) [119].

Структурну модель каталітичного домену BRK1 (UniProtKB: F4IV10 / AT2G20635.1) з *A. thaliana* було побудовано із використанням інструменту I-Tasser і шаблонних PDB-структур: 6JKK (A), 5DMZ (A), 2LAN, 2WVI (A), 3SI5 (B), 4A1G (B), 1K9A (B), і 4AEZ (I).

Ca²⁺-залежні протеїнкінази. Шаблонне моделювання просторової структури Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ з *A. thaliana* було виконано із використанням серії шаблонних PDB-структур:

1jkk(A), 2v7o (A), 2vn9 (B), 2vz6 (B), 2x0g (A), 3hzt (A), 3ma6 (A), 3mft (A), 3sx9 (A) і 4qox (A) для СРК20 (At2g38910);

3i7b (A), 3hzt (A), 3kk8 (A), 3lij (A), 3soa (A), 2qg5 (A), 3soa (A), 3f3z (A), 3i7b (A) і 3sx9 (A) для СРК21 (At4g04720);

4czt (A), 4czt (A), 4czt (A), 4zhx (A), 4wb6 (A), 4zhx (A), 4czt (A), 4lqs (A), 3fe3 (A) і 4czt (A) для GRIK2 (At5g60550).

Для структурного порівняння використали експериментальні PDB-структури Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ *H. sapiens* - найближчих тваринних гомологів рослинних протеїнкіназ CPK20 (At2g38910), CPK21 (At4g04720) і GRIK2 (At5g60550):

CAMK1 (KCC1A, UniProtKB: Q14012) людини 4FG7 (X-ray, 2.70 Å), 4FG8 (X-ray, 2.20 Å), 4FG9 (X-ray, 2.40 Å);

CAMK2A (KCC1A, UniProtKB: Q9UQM7) людини 2VZ6 (X-ray, 2.30 Å) і 2VZ6 (X-ray, 2.30 Å)

KKCC2 (UniProtKB: Q96RR4) людини 2ZV2 (X-ray, 2.40 Å), 5UY6 (X-ray, 1.70 Å) і 5UYJ (X-ray, 1.60 Å).

SNF1-залежні протеїнкінази SnRK1 α . Шаблонне моделювання просторової структури SNF1-залежних протеїнкіназ з *A. thaliana* (Kin10 і Kin11) і *H. sapiens* (BRSK1) було виконано із використанням серії шаблонних PDB-структур:

KIN10 (UniProtKB - Q38997, At3g01090) з *A. thaliana*: 2y94 (A), 1ql6 (A), 2i0e (A), 3iw4 (C), 2biy (A), 2jed (A), 3a8x (A), 2iwi (B), 3c0g (B) і 2owb (A).

KIN11 (UniProtKB - P92958, At3g29160) з *A. thaliana*: 2yza (A), 4czt (A), 4zhx (A), 4b6l (A), 4zhx (A), 4cfh (A) і 4zhx (A).

BRSK1 (UniProtKB - Q8TDC3) з *H. sapiens*: 2yza (A), 4czt (A), 4czt (A), 4zhx (A), 4zhx (A), 4b6l (A), 4zhx (A), 4czu (A), 2yza (A) і 5kq5 (A).

3.2.10.2. Моделювання просторової структури молекул і макромолекулярних комплексів тубуліну

Послідовності α -, β - та γ -тубулінів, і компонентів γ -тубулінових комплексів 2 (GCP2/SPC97) та 3 (GCP3/SPC98) із *Arabidopsis thaliana* були відібрані з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org/) [552]. Визначення потенційних сайтів фосфорилування, співпадаючими з профілями тваринних CaMK2, було виконане за допомогою сервісу KinasePhos 2.0 (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>) [228]. Визначення доступних для фосфорилування амінокислотних залишків здійснювали на підставі їх

розташування на поверхні структурних моделей тубулінових комплексів. Для 3D-моделювання були використані шаблонні дані рентгеноструктурного аналізу з RCSB Protein Data Bank, відібрані за допомогою PDB-BLAST (www.rcsb.org). Гомологічне моделювання молекул тубуліну здійснювали за допомогою програми Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) [143]. Повноатомні структурні моделі білків також були побудовані за допомогою сервісу I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [604]. Заключна збірка повноатомних моделей білків була виконана з використанням програми EasyModeller 4.0 [322].

Реконструкцію структур компонентів γ -тубулінових комплексів 2 (GCP2/SPC97) та 3 (GCP3/SPC98) проводили шляхом моделювання за гомологією (I-Tasser) і ab initio [604]. Деякі петлі, відсутні у кристалічних структурах, були побудовані з використанням сервісу SuperLooper [211]. Збірку макромолекулярних комплексів здійснювали шляхом білок-білкового докінгу за допомогою програми HADDOCK [128]. Первинну перевірку побудованих комплексів виконували з використанням криоелектронно-мікроскопічних карт комплексу γ TuSC із *Saccharomyces cerevisiae*. Також було використано результати крио-ЕМ мікроскопії і 3D-моделі GCPs/ γ -тубулінових комплексів, наданих Kollman Lab (<https://sites.uw.edu/jkoll/>) [308].

Релаксацію структур побудованих моделей здійснювали шляхом короткочасної молекулярної динаміки (10 нс) в силовому полі G53a6 за допомогою програмного пакету GROMACS 4.5.3 (www.gromacs.org) та верифікували на підставі показників RMSD, розрахунків енергії та критеріїв якості білкових структур [521]. Стабільність 3D-моделей перевіряли за допомогою методу молекулярної динаміки в програмі GROMACS з використанням повноатомного силового поля charmm27 та водної моделі SPC [446]. Якість отриманих моделей перевіряли за допомогою сервісів MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) та QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) [119, 42].

Усі симуляції молекулярної динаміки здійснювали у віртуальній організації CSLabGrid за допомогою обчислювального кластеру Інституту (<http://grid.ifbg.org.ua/ganglia/>) Українського Національного Грідуну (<http://ung.in.ua/>) [456, 456]. Візуалізацію 3D структур та їх аналіз виконували за допомогою програмних пакетів PyMol 1.5 та UCSF Chimera 1.8 (www.pymol.org; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) [439].

Повні амінокислотні послідовності молекул тубуліну і протеїнкіназ отримали з бази даних UniProtKB (Protein KnowledgeBase - www.uniprot.org) [552]. (Додаток 3) Пошук гомологічних послідовностей здійснювали за допомогою сервісу SIB BLAST Network Service, використовуючи алгоритм BLASTp (BLASTp ver. 2.2.31+) [335].

Моделювання просторової структури α -тубуліну з *T. equiperdum* і *A. thaliana*. 3D-моделі молекул α -тубуліну з *T. equiperdum* (A0A1G4I5D2_TRYEQ) і найближчого гомолога з *A. thaliana* (TBA4_ARATH, Q0WV25) були побудовані з використанням серверу Swiss-Modell (<https://swissmodel.expasy.org/>) [47]. Гомологічна згортка 3D-моделей A0A1G4I5D2_TRYEQ і TBA4_ARATH виконувалось з використанням шаблонних PDB-структур 5kx5.1 (ланцюг «А» - Tubulin alpha chain, 2.5 Å) - Crystal structure of tubulin-stathmin-TTL-Compound 11 complex (ідентичність = 89.07%) [344] і 3e22.1 (ланцюг «А» - Tubulin alpha-1C chain, 3.8 Å) - Tubulin-colchicine-soblidotin: Stathmin-like domain complex (ідентичність = 85.97 %) [107], відповідно.

3.2.11. Структурно-біологічне оцінювання сайтів специфічного фосфорилювання молекул тубуліну

Остаточні висновки стосовно можливості фосфорилювання цільових сайтів і прогнозування ролі окремих модифікацій здійснювались на підставі даних їх структурної топології, яка визначалась за допомогою 3D-моделей і

PDB-структур комплексів α -, β - і γ -тубуліну. Ключові дослідження топології сайтів фосфорилування молекул тубуліну виконувались на структурних моделях фрагментів мікротрубочки, побудованих з використанням шаблонної EM-структури 3J6F 4.90 Å (Minimized average structure of GDP-bound dynamic microtubules) з *Sus scrofa*, отриманої за допомогою методу кріоелектронної мікроскопії [7] (Додаток 5). При моделюванні фрагменту мікротрубочки *A. thaliana* було використано повноатомні моделі α -тубуліну - TBBA6 (UniProtKB: P29511, TBA6_ARATH), β -тубулін - TBB3 (UniProtKB: Q9ASR0, TBB3_ARATH) і γ -тубулін - TBG1 (UniProtKB: P38557, TBG1_ARATH) [552].(Додаток 5) Моделювання і аналіз комплексів мікротрубочки виконувались в програмі PyMol [461]. Моделювання фосфорильованного стану цільових амінокислот здійснювалось за допомогою плагіну PyTMs [584], а відповідні параметри топології були отримані за допомогою програми SwissSidechain [172]. Віддалені електростатичні взаємодії моделювались за методом PME (Particle Mesh Ewald) [150]. Попередня нейтралізація системи виконувалась шляхом автоматичного випадкового заміщення молекул води іонами натрію та хлору, кількість яких відповідала концентрації фізіологічного розчину (0,15 Моль/літр). Оптимізація геометрії молекул здійснювалась в силовому полі charmm27 шляхом мінімізації потенційної енергії за алгоритмом крутого спуску (steepest descent) при максимальній кількості кроків = 1000 і показнику градієнту = 0,1. [72]

Наступний обрахунок молекулярної динаміки тривалістю 40 нс було здійснено із використанням модулів «grompp» та «mdrun». Для імітації об'єму розчинника було застосовано періодичні граничні умови. Температура системи підтримувалась на рівні 310 K за допомогою термостату Берендсена з часом взаємодії 0,1 пс. Постійний тиск підтримувався за допомогою зовнішнього баростату. Дистанції водневих зв'язків було зафіксовано на рівноважному рівні за допомогою алгоритму Lincs [209]. Аналіз результатів молекулярної динаміки здійснювався за допомогою модулів g_potential.

3.2.11.1. Аналіз структурної топології сайтів AGC-специфічного фосфорилування молекул тубуліну. Для аналізу топології сайтів AGC-специфічного фосфорилування було використано наступні PDB-структури макромолекулярних комплексів: химерна x-Ray структура протофіламенту мікротрубочки - 3DU7 (doi: 10.2210/pdb3DU7/pdb) [107] (для аналізу топології GRK-специфічних сайтів фосфорилування β -тубуліну і PKC α -специфічного сайту фосфорилування α -тубуліну); химерні x-Ray структури протофіламенту мікротрубочки - 6BR1, 6BRF, 6BRY, 6BS2 (для аналізу топології сайтів MAST/IRE-специфічного фосфорилування α - і β -тубуліну). Для аналізу топології MAST/IRE-специфічного сайту фосфорилування γ -тубуліну була використана структурна модель фрагменту центра первинної нуклеації мікротрубочок *A. thaliana*, представлена трьома комплексами γ TuSC [265].

3.2.11.2. Аналіз структурної топології сайтів CMGC- і CK2-специфічного фосфорилування молекул тубуліну

Модель для аналізу топології сайтів CMGC- і CK2-специфічного фосфорилування була побудована з використанням шаблонної PDB-структури 3J6F [7]. Повноатомні структурні моделі α -, β - і γ -тубуліну було побудовано за допомогою мережевого сервісу I-Tasser [604]

3D-моделі молекул α -тубуліну з *T. equiperdum* (A0A1G4I5D2_TRYEQ) і найближчого гомолога з *A. thaliana* (TBA4_ARATH, Q0WV25) були побудовані з використанням серверу Swiss-Modell (<https://swissmodel.expasy.org/>) [47]. Гомологічна згортка 3D-моделей A0A1G4I5D2_TRYEQ і TBA4_ARATH виконувалось з використанням шаблонних PDB-структур: 5kx5.1 (ланцюг «А» - Tubulin alpha chain, 2.5 Å) - Crystal structure of tubulin-stathmin-TTL-Compound 11 complex (ідентичність = 89.07%) [344] і 3e22.1 (ланцюг «А» - Tubulin alpha-1C chain, 3.8 Å) - Tubulin-colchicine-soblidotin: Stathmin-like domain complex (ідентичність = 85.97 %) [107], відповідно.

Топологію сайтів фосфорилування α -тубуліну визначали шляхом структурного вирівнювання і порівняння з химерним комплексом 5KX5 (Crystal structure of tubulin-stathmin-TTL-Compound 11 complex, X-Ray diffraction, 2,5 Å) з RCSB Protein Data Bank: Tubulin alpha chain (UniProtKB: D0VWZ0_SHEEP) і Tubulin beta chain (UniProtKB: D0VWY9_SHEEP) з *Ovis aries*, Stathmin-4 (UniProtKB: STMN4_RAT, P63043) з *Rattus norvegicus* [344].

Структурне вирівнювання і реконструкція комплексів виконувались за допомогою програми PyMOL [461]. Комплекси α/β - і β/α -тубуліну було побудовано в програмі Swiss-PdbViewer [250] на основі експериментальних структур з репозиторію Kollman Lab (<http://faculty.washington.edu/jkoll/>) [308].

3.2.12. Реконструкція ліганд-білкових комплексів

Молекулярний докінг здійснювався з урахуванням повної рухливості ліганду за умов статичності амінокислотних залишків мішені на основі генетичного алгоритму програми CCDC GOLD Suite 5.3 [254]. У кожному випадку здійснювалось щонайменше 100 циклів генетичного алгоритму зі збереженням 50-ти кращих фреймів. Остаточний відбір моделі комплексу здійснювався на підставі головних оціночних функцій програми CCDC GOLD: GoldScore, ChemScore і ASP. Параметри були використані для обчислення приблизної енергії комплексів і селекції можливих конформацій ліганду в сайті зв'язування на кожному кроці конформаційного пошуку [254]. Ключовим показником молекулярного докінгу була кількість водневих зв'язків.

Моделювання взаємодії Dyrk1A-подібних протеїнкіназ і АТФ-конкурентних інгібіторів. Було виконано реконструкцію комплексів з наступними лігандами: ЕНВ ((1z)-1-(3-етил-5-гідрокси-1,3-бензотіазол-2 (3H)-іліден)пропан-2-он), d15 (N-(5-{{(2S)-4-аміно-2-(3-хлорфеніл)бутаноіл}аміно}-1H-індазол-3-іл)бензамід) [520], IRB ((2Z, 3E)-7'-бром-3-(гідроксиіміно)-2'-оксо-1,1',2',3'-тетрагідро-2,3'-бііндол-5-карбонової кислоти) [39] і АДФ [414]. Для оцінювання активних конформацій лігандів було виконано порівняння

побудованих рослинних комплексів і депонованих в RCSB Protein Data Bank комплексів 2VX3, 3KVW, 3ANQ і 1Q8Y протеїнкінази DyrK1A людини і вищезазначених інгібіторів.

Було застосовано наступні параметри CCDC GOLD 5.3.0: радіус сайту = 12 Å, кількість операцій генетичного алгоритму (GA) = 100, оціночні функції - GoldScore і Astex Statistical Potential (ASP), поріг Сил Ван дер Ваальса (VdW) і водневих зв'язків (h-bonding) складав 4.0 і 2.5 відповідно. Також була дозволена рухливість ключових амінокислот [254]. Перед початком докінгу моделі цільових білків пройшли попередню релаксацію шляхом короткочасної молекулярної-динаміки (1 нс) із використанням силового поля G53аб пакету GROMACS 4.5.3 (<http://www.gromacs.org/>) [521].

Моделі лігандів (ЕНВ, d15 і IRB) було побудовано за допомогою редактора Marvin Sketch (www.chemaxon.com). Файли топології і параметризації лігандів були отримані за допомогою web-серверу SwissParam (www.swissparam.ch) [626].

Особливості взаємодії ліганд-білкової взаємодії було досліджено із використанням програми LigandScout (v. 3.0)[598]. Молекулярна динаміка ліганд-білкових комплексів в програмі GROMACS (симуляція в вакуумі і результуюча симуляція в моделі фізіологічного розчину) була виконана із використанням силового поля Charmm27 (www.charmm.org).

Кожна побудована система була занурена в модель водного боксу, де мінімальний шар молекул розчинника дорівнював 10 Å. Нейтралізація системи здійснювалась шляхом заміщення молекул води іонами Na⁺ і Cl⁻. Занурені структури піддавались молекулярній динаміці (20000 кроків) шляхом мінімізації енергії за алгоритмом найшвидшого спуску. Головний ланцюг білку «заморожувався», за умов збереження рухливості латеральних груп, а також молекул фізіологічного розчину на протязі 100 пс обрахунку молекулярної динаміки [521].

Розрахунки молекулярної динаміки виконувались за умов періодичних граничних умов ізотермічно-ізобарного (NPT) ансамблю (<http://www.gromacs.org>) з використанням алгоритму Термостату Берендсена, якій підтримував постійну температуру (310 K) і тиск (1 бар) системи. Крок обрахунку молекулярної динаміки дорівнював 2 фс. Електростатична складова взаємодії обчислювалась за допомогою методу PME [150] з порядком інтерполяції '4' і розміром комірки = 0,12 нм. Сили Ван-дер-Ваальса обраховувались з відстанню відсікання = 10 Å і кроком збереження координат = 100 пс. Для кожного комплексу обрахунок вільної динаміки виконувався на протязі 6 нс за умов T = 310 K.[521]

Моделювання взаємодії протеїніназ SKI і SKL і АТФ-конкурентного інгібітору D4476. Моделі лігандів, що були придатні для операцій молекулярного докінгу, було побудовано за допомогою спеціалізованого редактору Marvin Sketch (www.chemaxon.com), а відповідні файли топології було отримано за допомогою сервісу SwissParam (www.swissparam.ch).[626]. Ліганд-білковий докінгу було виконано в програмі CCDC GOLD 5.3.0 (www.ccdc.cam.ac.uk/)[254]. Цільову ділянку докінгу на поверхні SK1δ (UniProt: Q06486 / PDB: 1SKI 2.30 Å) було задано як коло з радіусом в 10 Å відносно СЕ атома амінокислотного залишку Met85. Аналогічним чином сайт було задано і у випадку структурної моделі рослинного гомолога. Під час докінгу використовували такі параметри генетичного алгоритму як: розмір популяції = 100, селекція = 1.1, кількість островів = 10, кількість генетичних операцій = 100,000. Дистанції Ван-Дер-Ваальсових взаємодій (vdW) і довжина водневих зв'язків дорівнювали 4.0 Å і 2.5 Å відповідно. Латеральні ланцюги амінокислот Ile23, Lys38, Met82, Asp128, Lys130, Leu135, Ile148 і Asp149 було задано як рухомі. Ранжування конформацій ліганду під час докінгу ґрунтувалось на показнику Gold Score. Відбір найкращих комплексів здійснювався на підставі показників Chemscore і ASP. У якості додаткового критерію було застосовано структурне порівняння побудованих комплексів з

експериментально-підтвердженими PDB-структурами комплексів СК1 *Schizosaccharomyces pombe* з АТФ (1CSN) і IC261(1EH4). Найкращі позиції інгібітору D4476 визначались на підставі карт водневих зв'язків (h-bonds) і дистанцій взаємодій (short-contacts).

Стабільність комплексів оцінювалась на підставі результатів молекулярної динаміки в програми GROMACS за умов використання силового поля CHARMM [72] і моделювання фізіологічного розчину (модулі «editconf» і «genbox»). Оптимізація геометрії моделей здійснювались за рахунок мінімізації вільної енергії із застосуванням обчислювальних модулів «grompp» і «mdrun», силового поля ffgmx і алгоритму крутого спуску (steepestdescent: 1000 кроків і градієнти=0,1). Умови молекулярної динаміки: T=300 К, на протязі 5, 30 і 100 нс. Файли координат (*.gro) і топології (*.itp) лігандів були отримані за допомогою сервера PRODRG [494].

Результати розрахунків МД для вільних білків, лігандів і комплексів, оцінювались на підставі середньоквадратичного відхилення атомів (RMSD) і коливань енергій ван дер Ваальсових і кулонівських взаємодій [212, 353].

Динамічна візуалізація моделювання поведінки комплексів під час молекулярної динаміки була здійснена за допомогою програмного пакета VMD 1.8.6 [234]. Оцінка якості моделей здійснювалась на підставі карт Рамачандрана [212], а показники середньоквадратичних відхилень атомів білків оцінювались за допомогою Swiss-PdbViewer v.4.0.1 [250] і PyMOL (www.pymol.org).

Хемогеномне профілювання СК1-подібних протеїназ було здійснено за методом ієрархічної кластеризації (UPGMA) з використанням фрагментів послідовностей, що формують АТФ-зв'язуючу кишеню кіназного домену, а також з врахуванням амінокислотних залишків, що утворюють водневі зв'язки з інгібітором D4476. Протокол аналізу ґрунтувався на рекомендаціях, представлених в літературі [243, 32].

3.2.13. Інструменти для візуалізації, вирівнювання і аналізу структурних моделей

Основним інструментом для візуалізації, вирівнювання і аналізу структурних моделей була програма PyMol 1.5.0.5 (www.pymol.org). Також було використано програми Discovery Studio 2016 (BIOVIA - www.3dsbiovia.com) [288], UCSF Chimera 2018 [439], Unipro UGENE [473] і VMD (Visual Molecular Dynamics) v. 1.9.3 [234].

3.2.14. Обчислювальні ресурси

Ресурсозатратні обрахунки було виконано з використанням обчислювальних потужностей Грід-кластеру Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України VO CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid>)[268, 269] і віртуальної лабораторії MolDynGrid ІМБГ НАН України (<http://moldyngrid.org>).[483]

3.3. Протоколи лабораторних досліджень

Лабораторні дослідження: молекулярно-генетичні методи (ПЛР, електрофорез в агарозному гелі, генетичне клонування, ампліфікація, ксенологічна експресія та ін.), специфічне інгібування протеїнази, використання мутантних рослин, дослідження рослинних моделей, що відрізнялися за рівнем мітотичної активності, методи фізіологічного експерименту, методи флуоресцентної (ФМ) і лазерної конфокальної мікроскопії (ЛКМ). Кореляції інгібування протеїнази, 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) *IREH1* 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 α , 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 α 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-дених 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 α -, γ -тубуліну і цільових протеїніназ визначалась на підставі флуоресценції компетентних антитіл [527] за допомогою ЛСК мікроскопів Carl Zeiss LSM 510 META (Plan Aplanachromat 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 щонайменше у трьох повторах і оброблялись статистично [636]. Достовірність підтверджувалась t-тестом Ст'юдента.

Обробка і представлення математичних здійснювались в програмі Microsoft Office Excel 2007.

3.3.1. Протокол клонування і прижиттєвого дослідження AGC-кінази GMLK винограду в тваринних клітинах лінії 'Vero' рослинної

Отримання РНК рослинної протеїнкінази GMLK (A7NTE9_VITVI). Препарат РНК винограду сорту 'Піно Нуар' (Pinot Noir) було отримано з листів рослин колекції винрадгоспу «Лівадія» (Крим, Україна). Рослинний матеріал надходив у лабораторію протягом щонайбільше чотирьох днів. З вимитих і просушених листків вирізались диски діаметром 3 см. Одержаний рослинний матеріал заморожувався рідким азотом і зберігався при -70°C . Кріогенно-зафіксований матеріал використовувався для всіх наступних лабораторних маніпуляцій (1-3 міс.).

Виділення РНК проводилось за модифікованим протоколом Moser et al. (2004) [396]. Приготування всіх розчинів здійснювалось з використанням вільної від РНКаз тридистильованої води. Згідно протоколу, вирізані з листків диски гомогенізувались в ступці з рідким азотом. 400 мг розтертої тканини в пробірці об'ємом 2 мл відразу змішували з 1,4 мл прогрітого до 80°C буфера ХТ (0,2 М борату натрію, 0,03 М ЕДТА, 1% SDS, 1% дезоксихолату натрію, 2% β -меркаптоетанолу, 0,5% спермідину, 1% Тритону Х-100, 2% PVP-40 (мол. вага = 36000), рН 9,0). Отримана суміш ретельно перемішувалась і витримувалась 5 хвилин при 80°C . До охолодженого лізату додавався 1 мг протеїнази К з подальшим інкубуванням отриманої суміші (1 г, $T=42^{\circ}\text{C}$, при акуратному перемішуванні). По завершенню культивування до реакційної суміші додавався розчин KCl (2 М) до отримання концентрації 160 мМ. Отриманий розчин обережно перемішувався (аби не руйнувати ДНК) і витримувався 45 хв на крижаній бані. Осадження виконувалось шляхом центрифугування (15 хв при $+6^{\circ}\text{C}$, 12700 об/хв/15000 g) на центрифугі

Eppendorf 5415 D. Отриманий супернатант переносився в нову пробірку на 2 мл з наступним додаванням 1/3 об'єму 8 М розчину LiCl до отримання кінцевої концентрації 2 М. Водночас додавався β-меркаптоетанол до отримання остаточної концентрації 1% (v/v). Надалі, осадження РНК здійснювалось на крижаній бані упродовж ночі.

Після відстоювання виконували центрифугування (25 хв.) з наступним відбором супернатанту. Після двократного промивання осаду, додавався 1 мл холодного розчину 2 М LiCl і виконувалось додаткове центрифугування (15 хв.). Отриманий осад ресуспензувався в 600 мкл 10 мкМ тріс-НСІ (рН = 7,5) і ретельно перемішувался при кімнатній температурі. Далі додавалось 1/10 об'єму 2 М оцтовокислого калію (CH₃COOK, рН = 5,5), суміш перемішувалась і витримувалась 10 хв. на крижаній бані. З метою віддалення нерозчинного осаду, виконували 15-хвилинне центрифугування, після чого супернатант переносився в нову пробірку. РНК переосаджувалось шляхом додавання 0,9 об'єму холодного ізопропанолу, з витримкою в 1 год. при -20°C, з наступним центрифугуванням на протязі 25 хвилин. Отриманий осад промивався холодним 80% етанолом, висушувався в вакуум-ексикаторі і розчинявся в 50 мкл тридистильованій воді.

Отримання бібліотеки кДНК і специфічної кДНК. Для отримання першого ланцюга ДНК застосовувалась зворотна транскриптаза Superscript II згідно із протоколом виробника (Invitrogen). Для отримання специфічної кДНК послідовно застосовувались дві пари праймерів:

прямий - ATG TCA ACT CCT STA CAT CCC TTA C/зворотний - AGT GTC TCG AGA TTT GGA TGG AC;

прямий - AAA GAA TTC GAT GTC AAC TCC TCT ACA TCC C/
зворотний - ATA GGT ACC AGT GTC TCG AGA TTT GGA TGG.

Друга пара праймерів також містила рестрикційні сайти EcoRI і KpnI, які були технічно-необхідні для подальшого клонування.

Протокол ПЛР включав дві стадії:

1) реакція з 2 мкл бібліотеки кДНК винограду і першої пари праймерів (1 цикл: 94°C / 30 сек., 49°C / 30 сек., 2-40 циклів, 72°C / 80 сек.);

2) 2 мкл відібраної реакційної суміші використовувалось для постановки нового ПЛР з другою парою праймерів (30 циклів ампліфікації при ідентичних умовах).

Секвенування ДНК здійснювалось із застосуванням штатного набору реактивів ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 з подальшим аналізом продуктів реакції за допомогою автоматичного секвенатора ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Клонування і експресія кДНК в культурі тваринних клітин. Отримана специфічна кДНК (ПЛР-продукт) вбудовувалась в вектор *pEGFP-C1* (Clontech) за сайтами EcoRI/KpnI. При цьому було застосовано рестриктази і лігаза фірми Fermentas (Зараз - Analytical Technology segment of the Thermo Fishe - www.thermofisher.com). Отримана плазміда *pEGFP-MAST2HP* нарощувалась в *Escherichia coli* (штам DH-5 α), очищувалась за допомогою набору QIAprep Spin MiniPrep (Qiagen) відповідно до протоколу виробника (www.qiagen.com).

Клітини лінії 'Vero' (індукована з тканин нирки *Cercopithecus aethiops*) культивувались в живильному середовищі DMEM / F12 (Paneco - www.paneco-ltd.ru) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки. Для виконання трансфекції використовувався реагент Lipofectamine 2000 (Life Technologies - www.thermofisher.com). Через 20 годин після трансфекції клітини фіксувались 4% формальдегідом і виконувалось імунофарбування мікротрубочок за допомогою моноклональних антитіл DM-1a, які мають специфічність до тубуліну (Sigma-Aldrich) і козячих антитіл, які мають специфічність до імуноглобулінів миші, кон'югованих з родаміном (Jackson Immuno Research Europe Ltd. - www.jacksonimmuno.com).

Отриманий препарат аналізувався за допомогою мікроскопу Axiovert 2000M (Carl Zeiss, Німеччина) і фотографувався за допомогою цифрової

камери AxioCam HRc (Carl Zeiss) під керуванням програми AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision).

3.3.2. Протокол клонування і прижиттєвого дослідження GFP-конструкту рослинної протеїнкінази IREN1 в моделях тваринних клітин

Рослинний матеріал. У якості джерела РНК було використано проростки арабідопсису. Пророщування насіння *A. thaliana* виконувалось в культуральній кімнаті ДУ «ІХБГ НАН України» згідно із стандартним протоколом Tair (www.arabidopsis.org). Зокрема, було застосовано рекомендації до протоколу Jane Russell et al.[477] і Lluís Balcells [24].

Виділення РНК. Фіксацію рослинного матеріалу (500 мг) було здійснено за допомогою реагенту TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Зразок було заморожено за допомогою рідкого азоту і гомогенізовано у присутності 5 мл TRIzol. Нерозчинну складову було усунено шляхом центрифугування (12000 x g, 10хв., T=4°C.). Інкубація супернатанту здійснювалась на протязі 5 хв і T=30°C.

РНК виділялось за допомогою реагенту TRIzol за одноступеневим протоколом Chomczynski & Sacchi (1987) [102]. За протоколом:

- 1) гомогенізація проростків після обробці рідким азотом;
- 2) центрифугування (12000 x g, 15 хв., T=4°C) і відбір рідкої фази;
- 3) додавання TRIzol + ½ об'єму ізопропанолу (100%);
- 4) інкубування при кімнатній температурі (10 хв.);
- 5) центрифугування (12000 x g, 5 хв., T=4°C.);
- 6) відбір супернатанту;
- 7) відмивка отриманого зразку РНК (EtOH 75%).

Подальше зберігання зразку РНК здійснювалось при T= -80°C.

Отримання бібліотеки кДНК конструкту рослинної протеїнкінази IREN1. Бібліотеку кДНК було отримано із застосуванням зворотної

транскриптази SuperScript® II (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) і протоколу випадкових праймерів. Група праймерів для клонування протеїнкінази IREN1 (IREL, At3g17850) була розроблена відповідно до послідовності AK117224.1 з GenBank [497]. Розроблені праймери було використано для отримання фрагментів *At3g17850* з перекриттям флангів. Клонування отриманих фрагментів було виконано в *pEGFP-M + C* плазміді. Підтвердження отриманих фрагментів було виконано методом секвенування ДНК із використанням генетичного аналізатору ABI PRISM 3130 (<http://ifbg.org.ua/uk/centr-kolektivnogo-koristuvannya>).

Клонування рослинної протеїнкінази IREN1. Для клонування трьох фрагментів рослинної AGC-кінази IREN1 (IREL, At3g17850), що перекривались за флангами: N (192-1689 п.о.), M (1601-2798 н.е.), C (2639-4183 п.о.) було використано наступні праймери:

```
NForIREL TTGAATCAGCGGAATCGAAAAA
NRevIREL TGAGCGTACAACAGCGTCTT
ForIREL-SacI ATATGAGCTCATGGTATTCAAGAACAACCTCTTCTTC
MForIREL ACAGTGCTGCAAAGGTACCA
MRevIREL GGTCTCAAGCTCCGAACAA
CForIREL ACCGCAGAAAGTTTGATGCACT
CRev IREL AAACGCCGGTAATGGCAGA
```

Ампліфіковані M- і C-фрагменти було видалено MRevIREL- BamHI ATATGGATCCCTTGTGATGCGGAATTTGTTGTGGC за допомогою ендонуклеази NdeI (Sybenzym), (сайт відповідає 2718 п.о.), з наступним лігуванням T4-лігазою ДНК (Fermentas). Лігаційна суміш ампліфікувалась за допомогою комплексу праймерів - ForIREL-MRevIREL-BamHI і інтегрувались в вектор pEGFP-C3 (Clontech) за сайтами KpnI і BamHI (внутрішній сайт KpnI відповідав 1619 п.о.). На наступному етапі, N-фрагмент було інтегровано в плазмиду pEGFP-M+C за сайтами SacI і KpnI. Отримана послідовність була підтверджена шляхом секвенування. Секвенування ДНК було виконано за допомогою набору реагентів ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 з

подальшим аналізом продуктів реакції за допомогою автоматизованого секвенатору Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Культивування штамів бактерій. Бактерії видів *E.coli* та *A.tumefaciens* вирощувалися на середовищі LB (Lysogeny broth): на 100 мл: 15 г пептону, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl [48]. Корекція рН до рівня 7,4 виконувалась за допомогою 0,01 н розчину NaOH. Агар-агар додавався після корекції рН. Остаточна концентрація агару в живильному середовищі LB складала 1,2 %. Поживне середовище об'ємом 1 л стерилізувалося шляхом автоклавування на протязі 40 хв.

Культивування *E. coli* і *A. tumefaciens* відбувалось за температури 37°C і 28°C відповідно. В залежності від потреби культивування, використовувалось рідке або тверде живильне середовище.

Культивування, трансфекція, і імунофлуоресцентне фарбування клітин тварин і людини. Клітинні лінії 'Vero' (з нирки зеленої мавпи) [606] і HEK293 (з ембріональної нирки людини) [176] культивувалися в живильному середовищі DMEM/F12 з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (PanEco) при 37°C і 5% концентрації CO₂. До культуральної суміші додавався гентаміцин (200 Іг/мл). Під час експериментів клітини висівались в культуральні ємності і вирощувались до формування 70% конфлюентного моношару. Трансфекція виконувалась з використанням реагенту TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA) згідно з інструкціями виробника. Забір клітин здійснювався на наступну добу. Фіксація матеріалу здійснювалась за допомогою метанолу з експозицією 1 хв. при -20°C з наступним перенесенням у свіжоприготований 3% розчин параформальдегіду (10 хв при +4°C). Забарвлення фіксованих клітин здійснювалось за допомогою мишачих антитіл до α -тубуліну (DM-1A, Sigma-Aldrich) і кролячих анти- γ -тубулінових антитіл (ab11320, Abcam) з наступною обробкою антитілами проти анти-мишачих і анти-кролячих імуноглобулінів (IgG), отриманих із осла і кон'югованих з Cy5 (Cyanine5) і TRITC відповідно (Jackson Immunoresearch). Візуалізацію

препаратів було здійснено за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії (мікроскоп Olympus IX51, фотокамера - Olympus XM10).

Імуноблотинг і імунопреципітація білків. Для електрофорезу та імуноблотінгу білків клітини HEK293 вирощували до 70% конфлюенції і трансфікували за вищезазначеним протоколом. Через 24 год клітини промивали двічі повним фосфатно-буферно-сольовий розчином (PBS), доповненим інгібіторами протеаз (Roche) без додавання EDTA. На наступному етапі, 30 мкл 2X SB (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 100 мМ β -меркаптоетанолу, 1% SDS, 0,01% бромфенолового синього і 10% гліцерину) додавали до кожної 30-мм пластинки, що містила щільний моношар клітин. Клітини збиралися за допомогою скребка і, отриманий гомогенат, інкубувався при 99°C на протязі 10 хв і зберігався при -20°C. Перед виконанням електрофорезу, зразки нагрівались в аналогічних умовах і центрифугувались протягом 1 хв при 13000 rpm.

Для імунопреципітації клітини HEK293 культивувалися і трансфікувалися за вищезгаданим протоколом. Після промивання льодяним PBS, клітини лізували в крижаному буфері RHEM (50 мМ PIPES, 50 мМ HEPES, 1 мМ EDTA, 2 мМ MgSO₄, pH 7,0), доповненому 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Тритон X-100, 0,25% дезоксихолату натрію і інгібіторами протеаз протягом 30 хв. Після цього лізат центрифугували на протязі 20 хв при 70 000 g і 4°C. Супернатант інкубувався протягом 3 год на льоду при обережному струшуванні в присутності 5 мкг GFP-специфічних антитіл (Proteinsintez) і 20 мкл 50% Protein A-Sepharose (Sigma-Aldrich) [600]. Після інкубації осад двічі промивався сумишню RHEM з додаванням детергентів і двічі RHEM (<http://phemtechnologies.fr>). Нарешті, 20 мкл 4xSB (NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)) додавалось до кожного зразка і нагрівалось протягом 10 хв при 99°C.

На наступному етапі зразки аналізувались за допомогою електрофорезу і вестерн-блоту за раніше описаним протоколом [104]. Для виявлення білків на

нітроцелюлозної мембрани (Bio-Rad) було використано антитіла до GFP (ab6556, Abcam), γ -тубуліну (Tu-30, Santa Cruz), α -тубуліну (DM-1A, Santa Cruz, sc-32293), anti-DIC 74.1 (Abcam, no. ab23905), вторинні антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою (Sigma-Aldrich). Для фарбування застосовували лужну фосфатазу BCIP/NBT (Thermo Fisher Scientific) [447].

3.3.3. Протокол дослідження впливу селективного інгібування протеїнкіназ СК1 на систему мікротрубочок і морфологію коріння *A. thaliana*

Рослинний матеріал і реактиви. Об'єктом дослідження були проростки *Arabidopsis thaliana* (екотип Landsberg erecta (Ler)), які експресують химерний білок GFP-МАР4, що має виражену спорідненість до рослинних мікротрубочок [382]. Пророщування насіння і культивування рослин здійснювалося в асептичних умовах, відповідно до протоколу, розробленому у ДУ «ІХБГНАН України» [609, 610]. У фізіологічних експериментах було використано чотириденні проростки.

Для дослідження впливу інгібування протеїнкіназ СК1 на морфологію кореня *A. thaliana*, на структуру і динаміку тубулінового цитоскелету, було використано СК1-специфічний інгібітор D4476 (CAS 301836-43-1, D4476 (4-[4-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксін-6-іл)-5-(2-піридиніл)-1H-імідазол-2-іл]бензамід), Sigma, USA). Для розчинення і виготовлення маточного розчину (10 мкМ) D4476 використовували диметилсульфоксид (DMSO), який зберігали при -20°C. Доведення маточного розчину D4476 до робочих концентрацій виконувалось безпосередньо перед початком експериментів.

Для прижиттєвої обробки рослинного матеріалу використовували розчини, що містили 0,1; 1; 10 і 50 мкМ D4476. Обробку коренів виконували згідно із протоколу, розробленому у ДУ «ІХБГНАН України» [609]. Вимірювання довжини первинного кореня проростків здійснювали через 6, 24 і

48 годин з моменту обробки інгібітором. Аналогічні концентрації D4476 і контрольні точки обробки було використано також і при дослідженні відповіді кортикальних мікротрубочок на СК1-специфічне інгібування кіназної активності. Усі морфометричні дослідження супроводжувалися фотофіксацією, а представлені в роботі експерименти було виконано щонайменше у трьох повторюваннях.

*Вимірювання приросту коріння *A. thaliana*.* Темпоральна фотофіксація коренів під час експериментів виконувалась з використанням цифрової фотокамери Canon Power Shot G6. Приріст довжини кореня вимірювали безпосередньо на цифрових фотознімках з використанням програми ImageJ (версія 1.44) [106]. Оцінювання приросту коріння здійснювалось за методикою, адаптованою для актуального дослідження в ДУ «ІХБГНАН України» [609, 610]. Підсумкові результати вимірювань були представлені як середні значення з врахуванням розбігу показника стандартної помилки ($\text{mean} \pm \text{standart error, SE}$).

Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія. Прижиттєва візуалізація мікротрубочок досягалася за рахунок GFP-флуоресценції, що асоційована з мікротрубочками химерного білку GFP-MAP4 [382]. Вивчення поведінки GFP-мічених мікротрубочок здійснювали на клітинах апікальної меристеми, перехідної зони меристематичної активності, зони елонгації і зони дозрівання / диференціації первинного кореня проростків *A. thaliana* [34]. Зразки клітин і тканин досліджували з використанням конфокального лазерного скануючого флуоресцентного мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Для прижиттєвого спостереження і фотофіксації застосовували імерсійний об'єктив Carl Zeiss 63x Plan-Apochromat NA 1.4. Порухення люмінесценції GFP досягали за допомогою аргонного лазера з довжиною хвилі 488 нм.

3.3.4. Дослідження зв'язку рослинної протеїнкінази BRK1 (BUB1) з регуляцією мітотичного апарату і системи мікротрубочок

У дослідженнях використовували рослини *A. thaliana* дикого генотипу (*Arabidopsis* WT= GABI_084G06, Col0) і лінії, що мали Т-ДНК (Т-DNA) інерції, отримані з Ноттінгемського стокового центру арабідопсису (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre) і лінії (DQH17 і EII34), отримані у Версальському відділенні INRA (Франція).

Дослідження виконувались на проростках *A. thaliana*, отриманими *in vitro* в культурі ізольованого насіння. Після поверхневої стерилізації, насіння пророщувались на твердому середовищі МС, що містило 1% сахарози, 0,7% агару (Sigma).

Визначення гістологічного патерну GUS-експресії BRK1 на прикладі *A. thaliana*. Для підтвердження асоціації експресії BRK1 з мітотичною активністю клітин *A. thaliana* досліджували гістохімічний патерн експресії цільового гену з використанням репортерної системи промоторної активності (застосування GUS-промотору). Дослідження виконувалось на рослинах, що експресували химерний GFP-конструкт BRK1:GFP:GUS (= *ProBRK1:GFP:GUS*). Для визначення експресії BRK1 використали 7-денні проростки і фертильні рослини *A. thaliana*. Гістологічна локалізація BRK1 визначалась на підставі наявності специфічного GUS-індукованого (β -глюкуронідаза) забарвлення. Гістологічний патерн GUS-експресії BRK1 *A. thaliana* визначався у листках 7-денних проростків на стадії активного росту, у кореневої меристемі, у латеральних корневих зачатках, суцвіттях, квітках, листках фертильних рослин і пиляках.

Дослідження флуоресценції конструкту BRK1:GFP в клітинах *A. thaliana*. Дослідження виконувалось на рослинах *A. thaliana*, що експресували флуоресцентний конструкт BRK1:GFP. Об'єктами дослідження були клітини кореневого апексу на стадіях інтерфази (G2), профазі - метафази,

ранньої та пізньої телофази. Для візуалізації меж клітин було застосовано споріднений до цитоплазматичної мембрани специфічний флуоресцентний фарбник FM4-64 (червоний канал). Експресія BRK1:GFP виконувалось під контролем промотору MAP65-3 (зелений канал).

Дослідження наслідків дисфункції гену BRK1 для функціонування мітотичного апарату. У дослідженні використали дві лінії мутантних рослин *A. thaliana*: нокаут-мутанти за геном *BRK1* (*AT1G20635*) і потрійний мутант за генами білків комплексу контрольної точки збирання веретена клітинного поділу (SAC): *BUBR1+MAD3.2+BRK1* (*AT2G33560+AT5G05510 + AT1G20635*). Для візуалізації і дослідження порушень мітотичного апарату в клітинах кореня мутантних рослин *A. thaliana* було використано флуоресцентний барвник DAPI (4',6-діамідин-2'-феніліндол-дигідрохлорид) за умов попередньої пермеабілізації мембран. Флуоресценція порушувалась фіолетовим лазером і детектувалась в діапазоні випромінювання 425-475 нм.

3.3.5. Протокол дослідження ролі SNF1/SnRK1-специфічного фосфорилювання в регуляції системи мікротрубочок *A. thaliana*

В дослідженнях було використано рослинний матеріал *A. thaliana* (Col-0), трансгенну лінію *A. thaliana* з гіперекспресією гена *KIN10* (OX), трансгенну лінію *A. thaliana* з РНК-інтерференцією *KIN10* (РНКi). Насіння трансгенних ліній *A. thaliana* були надані доктором Філіпом Роландом (лабораторія молекулярної біології рослин Університету Левена, Бельгія). Дві лінії нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* *A. thaliana* (SALK_139618C та SALK_127939C) отримали з Ноттінгемського стокового центру арабідопсису (<http://arabidopsis.info/>).

Характеристика реактивів, використаних у дослідженні.

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

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

«Макрохім» (Україна): амоній азотнокислий (NH_4NO_3), мідь сірчанокисла п'ятиводна ($CuSO_4 \times 5H_2O$), «ПОСН» (Польща), магній сірчанокислий семиводний ($MgSO_4 \times 7H_2O$), цинк сірчанокислий семиводний ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), «Sigma» (США), карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО), «Симбіас» (Україна): калій йодистий (KI), ООО «Реактив» (Україна), залізо сірчанокисле семиводне ($FeSO_4 \times 7H_2O$), «Merck» (Німеччина), мікробіологічний агар, сахароза, «ДнепрАзот» (Україна), гіпохлорит натрію ($NaOCl$) (комерційний засіб «Білизна»), целюлаза Onozuka R-10 (Sigma, США), пектиназа (Serva, США), поліетиленгліколь (ПЕГ-4000, Fluka), бичачий сиворотковий альбумін (БСА) (Thermo Fisher Scientific, США).

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

Робота з рослинним матеріалом. Для поверхневої стерилізації насіння *A. thaliana* трансгенних (OX та РНКi) та мутантних ліній (SALK_127939С та SALK_139618С), рослинний матеріал обробляли 6% розчином гіпохлориту натрію протягом 10-15 хв з подальшим п'ятиразовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Оброблене насіння висаджувались в асептичних умовах на стерильне живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС), яке містило половинний набір макро- і мікросолей МС, тіамін, 2 г/л міоїнозиту, 10 г/л сахарози, 4 г/л джелрайту, рН=5,7. Наступна стратифікація насіння здійснювалась протягом 24 год у холодильній камері при +4°C з наступним пророщуванням при стабільній температурі + 24°C і 16-годинному фотоперіоді.

Суспензійна культура *A. thaliana* [385] культивувалась впродовж 7-ми діб на модифікованому середовищі Гамборга [162], що містило 2,5 мг/мл 2.4-Д, 2,5 мг/мл кінетину, 10 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН=5,7.

Ампліфікація, клонування і трансформація кодуючих послідовностей рослинних SNF1-залежних протеїнкіназ KIN10 і KIN11. Виділення тотальної РНК з рослин *A. thaliana* здійснювали за допомогою TRIzol-регенту (Thermo Fisher Scientific, USA) відповідно до рекомендацій виробника. Якість отриманого препарату РНК підтверджували спектрофотометрично, та шляхом електрофорезу у агарозному гелі. Ампліфікація повнорозмірних кодуючих послідовностей протеїнкіназ KIN10 та KIN11 виконувалась за методом ПЛР з використанням синтезованої кДНК, отримана за допомогою набору RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) відповідно штатному протоколу виробника.

Ампліфікація повних кодуючих послідовностей генів протеїнкіназ здійснювалась за допомогою Gateway-праймерів, що містять маркерні сайти ВР-клонази [262]. Дизайн праймерів здійснювали в програмі Primer3 [475] (<http://simgene.com/Primer3>):

KIN10Gate_for 5'GGGGAGAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAT-3' ,

KIN10Gate_rev 5'GGGGAGCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGAGGACT-3'

KIN11Gate_for 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGAAGGCTTCATGGATCATTCATCAAATAGATTTGGC-3'

KIN11Gate_rev 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGATCACACGATCACGAAGCTC-3'

Клонування фрагментів кДНК в вектор призначення (Destination vector) здійснювалось шляхом Gateway-реакції [155], що дозволило отримати генетичні конструкції pGWB8-KIN10:His та pGWB8-KIN11:His.

Наступна трансформація компетентних клітин *E. coli* (штам DH5a) вищезазначеними конструктами була виконана за стандартною методикою [240] з відповідною адаптацією до завдань дослідження.

Трансформація компетентних клітин штаму GV3100 *A. tumefaciens* виконувалась згідно зі стандартною методикою [115].

Трансформація конструкціями бактеріальних клітин E. coli та виділення плазмідної ДНК. Для отримання компетентних клітин *E. coli* штаму DH5a бактерії висівали на чашки Петрі з твердим живильним середовищем LB (10 г/л триптон, 5 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl, 8 г/л агар) та інкубувались протягом 18 годин при T=37°C. Наступний пасаж здійснювався за принципом - 1 колонія/5 мл рідкого LB середовища (10 г/л триптон, 5 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl). На першому етапі, первинна культура інкубувалась 16 год при T=37°C на шейкері при 250 об/хв. На другому етапі 1 мл первинної культури переносився в 500 мл рідкого середовища LB. Штам *E. coli* культивувався за умов T=19°C і стаціонарного перемішування (250 об/хв.). Культивування здійснювалось до моменту, коли оптична щільність культури (OD600) досягала 0,35-0,4. Після цього рідку культуру *E. coli* інкубували на льоду протягом 30 хв і переносили у стерильні центрифужні пробірки об'ємом 50 мл. Клітини осаджували центрифугуванням 5000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) протягом 10 хв при T=4°C. Після видалення супернатанту

бактеріальний осад залишався на льодяній бані. Клітини *E. coli* ресуспендували у 50 мл льодяного розчину $MgCl_2$ (100 мМ) і інкубували протягом 15 хв. Суспензію бактерій центрифугували при 5000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при $T=4^{\circ}C$ протягом 19 хв, видаляли супернатант та ресуспендували у 50 мл льодяного розчину $CaCl_2$ (100 мМ). Отриманий розчин витримували на крижаний бані протягом 20 хв. Після цього бактеріальні клітини знову осаджували 10 хв при 5000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при $T=4^{\circ}C$. Супернатант знов видаляли, а бактеріальний осад ресуспендували у 50 мл крижаного 85 мМ розчину $CaCl_2$ з додаванням 15% гліцерину. На наступному етапі клітини осаджували протягом 10 хв при 4000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) і $T=4^{\circ}C$. Після видалення супернатанту осад ресуспендували у 2 мл розчину $CaCl_2$ (85 мМ) + 15% гліцерину. Із бактеріальної суспензії аліквоти по 50 мкл у стерильних мікроцентрифужних пробірках типу Eppendorf занурювали у рідкий азот. Подальше зберігання здійснювалось при $T= -80^{\circ}C$.

Трансформація компетентних клітин *E. coli* виконувалась за протоколом: отримані на попередньому етапі бактеріальні аліквоти переносили з кельвінатора на льодяну баню. Після повного розмерзання, до 50 мкл зразку додавали ~3 мкл плазмідної ДНК і інкубували на льоду протягом 15 хв з наступним моделюванням температурного шоку ($42^{\circ}C$) з експозицією 45 сек. Після цього реакційну суміш переносили на лід і інкубували ще протягом 5 хв.

Після витримки на льоду (3 хв.) до суміші бактерій та цільової ДНК додавалось 600 мкл рідкого середовища LB з наступним інкубуванням (1 год.) на орбітальному шейкері (250 об/хв.) при $T=37^{\circ}C$. На наступному етапі клітини осаджували (10 хв) центрифугуванням (Центрифуга 5417R, Eppendorf / 4500 об/хв.), що дозволяло здійснити забір 400 мкл супернатанту. Потім 200 мкл трансформаційної суміші висівали на агаризоване середовище LB з канаміцином (100 мкл/100мл). Після інкубування (16 год за умов $T=37^{\circ}C$), здійснювали відбір колоній (10-12) для повторного інокулювання в 5 мл

рідкого LB із канаміцином (100 мкл / 100 мл). Інокулят інкубувався протягом 16 год (шейкер = 250 об / хв., $T = 37^{\circ}\text{C}$).

Виділення плазмідної ДНК здійснювалось за допомогою лужного методу за протоколом: 1) осадження бактеріальних клітин (5 хв центрифугування 1,5 мкл культури); 2) ресуспендування осаду в 125 мкл буферу P1 (Tris/HCl, pH 8.0; 10 мл EDTA, 100 мг/мл RNaseA); 3) інкубування 5 хв за умов кімнатної температури; 4) додавання 0,2 М NaOH (P2) для лужного лізису клітин за умов обережного перемішування; 5) інкубування (5 хв. за умов кімнатної температури); 6) нейтралізація реакційної суміші додаванням 200 мкл холодного розчину P3 (5 М коAc) за умов обережного перемішування; 7) інкубація на льоду (5 хв.); 8) центрифугування 15 хв. 14000 об/хв (Центрифуга 5417 R, Eppendorf) при $T=4^{\circ}\text{C}$; 8) трансфер супернатанту в пробірку «Eppendorf» з додаванням 600 мкл ізопропанолу з наступним інкубуванням 1 год при $T=4^{\circ}\text{C}$; 9) центрифугування 15 хв при 14 000 об/хв (Центрифуга 5417R, Eppendorf) при $T=4^{\circ}\text{C}$; 10) видалення супернатанту і ресуспендування осаду в 75% етанолі (150 мкл) та центрифугування протягом 15 хв при 14 000 об/хв при 4°C ; 11) видалення супернатанту, висушування осаду на повітрі (10-15 хв.) з наступним ресуспендуванням в 50 мкл бідистильованої води.

Ізоляція і трансформація протопластів здійснювались за протоколом:

1) плазмоліз ювенільних листів арабідопсису в присутності буферного розчину (500 мМ манітол, 10 мМ CaCl₂, 10 мМ MES-KOH, pH 5,6);

2) подрібнення рослинного матеріалу і перенесення у ферментативний розчин (1% целюлаза (Sigma, США), 0,3% мацераза (Sigma, США), 0,4 М манітол, 20 мМ MES-KOH (pH 5,6), 20 мМ KCl, 10 мМ CaCl₂, 0,1% БСА (Thermo Fisher Scientific, США)) для інкубування на протязі 3-4 год. у темряві;

3) фільтрація отриманого розчину через сепараторну сітку і додавання до 1 об'єму суспензії з протопластами 0,5 об'єму 200 мМ розчину CaCl₂ та перемішування отриманого розчину;

4) осадження розчину центрифугуванням (500-700 об/хв., протягом 2 хв) та ресуспендування осаду у 3 мл охолодженого середовища W5 (125 мМ CaCl₂, 154 мМ NaCl, 2 мМ MES-КОН (рН 5,6), 5 мМ KCl);

5) інкубування розчину, збагаченому протопластами, на льодяній бані у темряві протягом 30 хв;

6) осадження протопластів центрифугуванням (500-700 об/хв протягом 1 хв);

7) Ресуспендування осаду у 3 мл розчину MMg (0,4 М манітол, 15 мМ MgCl₂, 4 мМ MES-КОН (рН 5,7)) і вибіркове додавання до окремих пробірок 10 мкл плазмідної ДНК (10-20 мкг), 100 мкл суспензії протопластів у розчині МаМg за умов делікатного перемішування;

8) додавання до суміші ДНК із протопластами 110 мкл розчину 110 μ L of PEG-CMS (40% Поліетиленгліколю (PEG 4000, Fluka), 0,2 М манітол, 0,14 М Ca(NO₃)₂). Делікатне перемішування отриманного розчину з наступною інкубацією у темряві при 23°C протягом 20 хв;

9) поступове (0,5мл + 1мл + 2 мл + 3 мл) додавання до трансформаційної суміші культурального середовища (0,6 М манітол, 4 мМ MES-КОН (рН 5,7), 4 мМ KCl, 3 мМ CaCl₂) і інкубування у темряві 14-16 год;

10) оцінювання ефективності трансформації протопластів за допомогою люмінесцентної мікроскопії (мікроскоп Axioskop 40, Carl Zeiss, Німеччина).

Молекулярно-генетичний аналіз експресії генів KIN10 і KIN11 в рослинах та суспензійній культурі A.thaliana. Для визначення профілю органоспецифічної експресії KIN10 використали двомісячні рослини *A. thaliana* екотипу Col-0. Для транскрипційного аналізу тотальну РНК було отримано окремо з коренів, стебла, листків і суцвіття. Препарат РНК отримали за допомогою TRIzol Reagent (Invitrogen, США, згідно протоколу виробника). Якість зразка РНК підтверджували спектрофотометрично і за допомогою електрофорезу.

Після стандартизації концентрації РНК, кДНК була отримана за допомогою стандартного набору RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Ампліфікація фрагменту послідовності *KIN10* (700 п. н.) здійснювалась за допомогою методу ПЛР із використанням отриманої кДНК і специфічних праймерів:

(↑) *Kin10_for* CCTCAAGCCTGAAAACCTTGC,
 (↓) *Kin10_rev* TGCATACGGGGAGTACCTTC.

Реакція ПЛР проводили в стандартних мікропробірках (200 мкл) за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США).

25 мкл реакційної суміші містило ПЛР-буфер (5x), MgCl₂ (2,5 ммоль), кДНК (2 мкл), ↑↓ праймери (1 мкМ кожного), дНТФ (10 мм), 0,5 од. Таq полімерази (Fermentas, Литва).

Реакцію виконували за протоколом:

- 1) первинна денатурація (95°C / 5 хв);
- 2) 35 циклів ампліфікації (95°C/30 с + 56°C/ 30 с + 72°C/1 хв), фінальна елонгація (72°C / 3 хв).

Паралельно, для контролю за ідентичним протоколом було визначено рівень експресії фактору елонгації α (*AtEF α*) *A. thaliana*. Реакція ПЛР здійснювалась з використанням парних праймерів:

(↑) *AtEF α _for* GGAGTGGCAAAAACACTGGT,
 (↓) *AtEF α _rev* CTTGCCTCTTACCCATCCAA.

Отримані фрагменти *KIN10* та *EF α* (контроль) визначали шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі. Рівень їх органо-специфічної експресії було визначено шляхом цифрової денситометрії електрофореграм в програмі TotalLab (<https://totallab-quant.software.informer.com/2.0/>).

Дослідження експресії KIN10 і KIN11 та маркерних генів СУСВ1-1 і BRCA1 в нокаутних лініях kin10 і kin11 та суспензійній культурі модельної

рослини *A. thaliana*. Для дослідження експресії маркерних генів клітинної проліферації (*CYCB1-1/AT4G37490* і *BRCA1/AT4G21070*) в нокаутних лініях SALK_127939C та SALK_139618C було використано 7-денні проростки. Для визначення експресії *KIN10* і *KIN11* та *AtCYCB1* і *AtBRCA1* в суспензійній культурі забір зразків здійснювали на сьомий день з моменту пасажу.

Препарат загальної РНК отримували за допомогою набору TRIzol Reagent (за протоколом Invitrogen, США). Якість зразку підтверджували спектрофотометрично і за допомогою електрофорезу. Концентрація РНК стандартизувалась. Для отримання кДНК було застосовано стандартний набір RevertAid RT cDNA Synthesis Kit за протоколом виробника (Fermentas, Литва).

Експресія генів *AtCYCB1-1* і *AtBRCA1* та *KIN10* і *KIN11* визначалась за допомогою $\Delta\Delta C_t$ методу кількісної ПЛР [359]. Ампліфікацію специфічних фрагментів генів здійснювали за допомогою киту SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ за протоколом виробника (Sigma-Aldrich, США). Реакційна суміш (загальним об'ємом 25 мкл) містила 2 мкл кДНК, 1 мкл прямого та зворотного праймерів. ПЛР виконувалось у присутності інтеркалюючого барвника SybrGreen (490 нм) із використанням ампліфікатора iQ5 (Bio-Rad, США) за протоколом: 1) 95°C 5хв, 2) 40 циклів ампліфікації (95°C / 30 с + 55°C / 30 с + 72°C / 30 с, 3) фінальна елонгація (72°C / 4 хв). Перевірка рівня флуоресценції здійснювалась на стадії синтезу ампліконів. Контролем під час порівняння рівнів експресії цільових генів протеїніназ SnRK1 був референтний ген актину (*AtActin*). Ампліфікація генів *AtCYCB1;1*, *AtBRCA1*, *KIN10* і *KIN11* була виконана з використанням специфічних праймерів:

(↑) CYCB1;1_for 5' -CTGTTGAGAGTGAATGGAGG-3'
 (↓) CYCB1;1_rev 5' -TAACCGACAAGAACCGATCC-3'
 (↑) BRCA1_for 5' -CATTGATTGGATTAAGGCGTG-3'
 (↓) BRCA1_rev 5' -GATAAGGTCCTTCTCGTATTCC-3'
 (↑) KIN10_for 5' -CCTCAAGCCTGAAAACCTTGC-3'
 (↓) KIN10_rev 5' -TGCATACGGGGAGTACCTTC-3'
 (↑) KIN11_for 5' -GCGGGATGGTCATTTTCTAA-3'
 (↓) KIN11_rev 5' -AATCCAGTGGCCTACAGGTG-3'
 (↑) AtAct_for 5' -CCCTCAGCACATTCCAGCA-3'
 (↓) AtAct_rev 5' -TGGGACTAAAACGCAAAACGAA-3'

Якість продуктів ампліфікації визначалась на підставі кривої плавлення продуктів ПЛР. Рівні експресії цільових генів визначали диференціально для продуктів кожної пари праймерів. З метою отримання достовірних результатів усі реакції і експерименти повторювались тричі.

Аналіз показників росту та розвитку головного коріння трансгенних ліній A. thaliana. Для оцінювання росту та розвитку коренів 7-денних проростків трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією (OX) і РНК-інтерференцією (РНКі) *KIN10* вирощувались на твердому середовищі МС без та з додавання сахарози. Фотофіксація виконувалась через 24, 48, та 72 год 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/>).

Аналіз морфології трансгенних проростків *A. thaliana* (*KIN10*: OX і РНКі) виконувався у прохідному світлі за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина). Проростки *A. thaliana* екотипу Col-0 було використано як контроль. Експерименти і виміри повторювались тричі.

Визначення мітотичного індексу. Для визначення мітотичного індексу в коренях 14-денні проростки отримували *in vitro*. Для синхронізації мітотичної активності, проростки на протязі 2-х годин витримувались в охолодженій воді (+4°C). Після холодової синхронізації, корені на протязі ~ 24 год. витримувались у фіксаторі Кларка: льодяна оцтова кислота x 96% ацетоалкоголь (1:3). Після 3-кратного промивання у 70% етиловому спирті,

корені переносили у 4% ацетоорсеїн і інкубували на протязі 1 год. Вивчення зразків здійснювалось за методом давлених препаратів. Для попередньої мацерації, зразки тканин витримувались в 45% розчині молочної кислоти.

Мітотичний індекс розраховувався за формулою:

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

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

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

Значення K_{MI} визначалось як співвідношення показників MI для оброблених варіантів з контролем:

$$KM = \frac{M_{вар.}}{M_{контроль}}$$

Цитологічний аналіз виконувався за допомогою мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина) з об'єктивами Plan-Neofluar 40x/1.3 і 100x/2.6 Immersion Oil. Отримані дані оброблялись за допомогою штатного програмного забезпечення AxioVisionsRel4.7 (CarlZeiss, Німеччина). Математична обробка даних здійснювалась за методом дисперсійного аналізу (MS Excel 2007).

Аналіз розподілу γ -тубуліну в коренях рослин нокаутних мутантів *A.thaliana*. Імунофлуоресцентне визначення внутрішньоклітинного розподілу γ -тубуліну здійснювали на 7-денних проростках kin10- та kin11-дефектних ліній *A. thaliana* (SALK_139618C та SALK_127939C). Рослини *A. thaliana* дикого екотипу Col-0 використали як контроль. Імунофлуоресцентна детекція γ -тубуліну в клітинах коренів *A. thaliana* була виконана за адаптованим методом Szechyńska-Hebda et al. (2006) [527].

Як первинні антитіла використали мишачі γ -тубулін-компетентні моноклональні антитіла TU-31 (люб'язно надані лабораторією доктора П.

Драбера, Інститут молекулярної генетики Чеської АН, Прага, Чеська Республіка), KIN10-компітентні моноклональні антитіла кроля (AS10919, Agrisera, Франція), (люб'язно надані доктором Е. Доддом, Університет Бристоля, Великобританія). В обох випадках розчинення здійснювалось у співвідношенні - 1:50. Як вторинні антитіла використовувались стандартні FITC-кон'юговані анти-мишачі антитіла (Sigma-Aldrich, США) у розведенні 1:100, а також, TRITC-кон'юговані анти-кролячі антитіла (Sigma-Aldrich, США) у розведенні 1:100. Для фарбування антитілами корені 7-денних проростків іммобілізували на поверхні предметних скелець, вкритих 0,01% полі-L-лізином. На подальшому етапі корені фіксували на протязі 1 год у 4% розчині параформальдегіду на основі буферу MBS (50 мМ PIPES-КОН, (рН 7), 5 мМ EDTA, 5мМ MgSO₄) з додаванням 0,1%-го Тритону X-100.

Після відмивання у ідентичному буферному розчині (15 хв) зразки ферментувались 15 хв в фосфатно-сольовому буферному розчині MBS з додаванням 1% целюлази (Sigma, США) і 0,5% пектоліази (Sigma, США). Після обробки охолодженим метанолом (6 хв, T=-20°C) зразки відмивали у буфері MBS з додаванням 0,1%-го Тритону X-100. Регідратацію зразків здійснювали за допомогою буфера MBS з додаванням 0,02%-ного Твін-20.

Для виключення можливості неспецифічного зв'язування антитіл зразки витримували 30 хв у буферному розчині MBS, що містив 2% БСА (Thermo Fisher Scientific, США). На протязі 24 годин зразки оброблялись мишачими γ -тубулін-компетентними антитілами (TU-31) в умовах кімнатної температури. Після 4-х кратного відмивання у MBS, зразки тканин на протязі 2 годин оброблялись FITC-кон'югованими анти-мишачими антитілами (за умов T=+37°C).

З метою визначення колокалізації γ -тубуліну і KIN10, після нічної інкубації з мишачими антитілами проти γ -тубуліну зразки відмивали у TBS (50 мМ Tris-Cl, рН 7.6; 150 мМ NaCl) і інкубували ще 24 годин у присутності первинних кролячих моноклональних антитіл, компетентних до KIN10.

Оброблені зразки 4-разово відмивали у TBS і інкубували 2 год з TRITC-кон'югованими анти-кролячими антитілами ($T=+37^{\circ}\text{C}$), 4-кратно відмивали у MBS і інкубували за аналогічних умов з FITC-кон'югованими анти-мишачими антитілами.

Як негативний контроль було використано зразки, оброблені виключно первинними антитілами. Частина зразків була оброблена лише вторинними антитілами (без інкубації з первинними). Також частина зразків була оброблена з моделюванням перехресної взаємодії між невідповідними первинними та вторинними антитілами.

Дослідження зразків виконувалось за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) з використанням об'єктиву Plan Achromat 63x/1.4 Oil DIC. Емісія FITC відбувалася при збудженні 488-нм лінією аргонного лазера, в той час як емісія TRITC при 543-нм лінією гелій/неонового лазера. Сигнали емісії барвників FITC та TRITC диференціювались за допомогою відповідної META-системи короткохвильового BP (505-530 нм) і довгохвильового LP (560 нм) фільтрів.

3.4. Статистична обробка отриманих даних.

Усі експерименти було проведено якнайменше у трьох незалежних повторях. Використовували аналіз середніх значень як загальноприйнятій у біології метод математичної статистики [636]. Статистичну перевірку достовірності відмінностей між середніми значеннями провели з використанням t-теста Ст'юдента для рівня значущості 5 %. Реконструкцію графіків та діаграм було виконано в програмі Microsoft Office Excel 2007.

РОЗДІЛ 4

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ ПОШУК РОСЛИННИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У ФОСФОРИЛЮВАННІ БІЛКІВ МІКРОТРУБОЧОК ТА РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ПОДІЛУ

4.1. Реконструкція повного кіному *Arabidopsis thaliana*

Первинний відбір протеїнкіназ *A. thaliana* здійснювався на підставі інформації баз даних UniProtKB, NCBI (GenBank/GenPept), Tair, PhosPhAt і P3DB (Plant Protein Phosphorylation DataBase). Гомологи шукали за ключовими словами та на підставі гомології з раніше анатованими послідовностями протеїнкіназ тваринного, дріжджового і рослинного походження. Було застосоване безпосереднє сканування геномних послідовностей *A. thaliana* з використанням трансляційного алгоритму tBlastn. Це дозволило визначити 1098 потенційних протеїнкіназ *A. thaliana*, депонованих в UniProtKB. Наступна перевірка за унікальністю локусів генів (дані ресурсу Tair), відповідністю канонічним профілям (SMART, Pfam, PROSITE та ін.) і інформації UniProtKB, GenBank/GenPept і Tair, скоротила первинну вибірку до 1024 потенційних протеїнкіназ. На підставі відповідності HMM-моделям каталітичних доменів протеїнкіназ і гомології послідовностей прогнозували субстратну специфічність і можливі функції відібраних рослинних гомологів. Первинна версія кіному *A. thaliana* складала 1024 (=1026 каталітичних доменів) унікальних протеїнкіназ, з яких 790 відповідали HMM-профілям серин-треонін специфічних (S_TKc) протеїнкіназ, 231 – протеїнкіназам дуальної специфічності (STYKc) і 3 одночасно відповідали профілю тирозин-специфічних (TyrKc) і дуальних протеїнкіназ. Отримана інформація дозволила відтворити кіноми I-V хромосом *A. thaliana* (Додаток 1).

У хромосомі I було визначено 276 унікальних генів протеїнкіназ. Профільний аналіз субстратної специфічності підтвердив, що 222

протеїнкінази мають серин-треонінову, 52 – дуальну, а 2 (Y1523 (At1g52310) і PT111 (At1g06700)) відповідали профілям STYKc- і TyrKc-кіназ (Додаток 1, рис. Д 1.1.)

Кіном хромосоми II склав 149 генів потенційних протеїнкіназ. Каталітичні домени 108 протеїнкіназ відповідали моделям серин-треонінової і 41 – дуальній специфічності. Було встановлено, що протеїнкіназа LRKS2 (At2G32800, Receptor like protein kinase S.2) має водночас два каталітичних домена, один із яких має серин-треонінову, а інший – дуальну специфічність (Додаток 1, рис. Д1.2).

Кіном хромосоми III нараховував 196 унікальних генів протеїнкіназ, з яких 146 відповідали НММ-профілям серин-треонінових протеїнкіназ, 49 – дуальних, а каталітичний домен PT13 (At3g59350, PT11-like tyrosine-protein kinase 3) одночасно відповідав профілям STYKc- і TyrKc-кіназ (Додаток 1, рис. Д1.3).

У випадку хромосоми IV було ідентифіковано 164 унікальних генів протеїнкіназ: 135 відповідали профілям серин-треонінової, а 29 - дуальної специфічності (Додаток 1, рис. Д1.4).

У хромосомі V було визначено 239 унікальні гені протеїнкіназ: 179 серин-треонінової і 49 дуальної специфічності (Додаток 1, рис. Д1.5).

Виконана в межах актуального дослідження на початку 2021 року остаточна ревізія повного кіному *A. thaliana* засвідчила, що близько 80% послідовностей протеїнкіназ *A. thaliana* вже отримали статус анотованих білків UniProtKB [552]. Проте, функціональна анотація більшості протеїнкіназ неповна або відсутня. Остання ревізія дозволила виключити деякі з раніше депонованих білків зі списку протеїнкіназ у зв'язку із спростуванням існування функціональних генів. Таким чином, в геномі *A. thaliana*, існує 1022 ділянки, що кодують функціональний кіназний домен у складі 1021 протеїнкіназ (рис. 4.1). Переважну більшість протеїнкіназ *A. thaliana* склали ферменти серин-треонінової і дуальної специфічності. Незважаючи на значне фосфорилування

за тирозином, існування у рослин виключно тирозин-специфічних протеїнкіназ тривалий час залишалось дискусійним.[58, 173] Зокрема, тирозин-специфічне фосфорилування рослинного тубуліну було доведено біохімічно [58, 258]. Первинний аналіз із застосуванням інструменту SMART визначав у *A. thaliana* три протеїнкінази – Y1523 (At1g52310), PTI1-1 (At1g06700) і PTI1-3 (At3g59350), каталітичні домени яких відповідали профілям тирозинової специфічності. Проте, остання перевірка вищезазначених протеїнкіназ із використанням різних сервісів (SMART, InterPro, Pfam і PROSITE) і методів профільного аналізу (HMM, патерні та ін.) дозволила зробити остаточний висновок стосовно дуальної специфічності протеїнкіназ Y1523 (At1g52310), PTI1-1 (At1g06700) і PTI1-3 (At3g59350) (Табл. 4.1). Результати нашого дослідження спростовують участь Y1523, PTI1-1 і PTI1-3 у фосфорилуванні тубуліну.

Таблиця 4.1

Результаті профільного аналізу субстратної специфічності протеїнкіназ Y1523, PTI1-1 і PTI1-3 з *A. thaliana*

Скорочена назва	Рекомендована назва	Локус	Модель каталітичного домену	
			TyrKc*	STYKc*
Y1523	C-type lectin receptor-like tyrosine-protein kinase At1g52310	At1g52310	SMART InterPro PROSITE	SMART InterPro Pfam PROSITE
PTI1-1	PTI1-like tyrosine-protein kinase 1	At1g06700	SMART InterPro PROSITE	Pfam InterPro PROSITE
PTI1-3	PTI1-like tyrosine-protein kinase 3	At3g59350	SMART PROSITE InterPro	Pfam InterPro PROSITE

*Примітка: TyrKc - відповідність профілю каталітичного домену тирозин-специфічних протеїнкіназ; STYKc - відповідність профілю каталітичного домену протеїнкіназ дуальної специфічності.

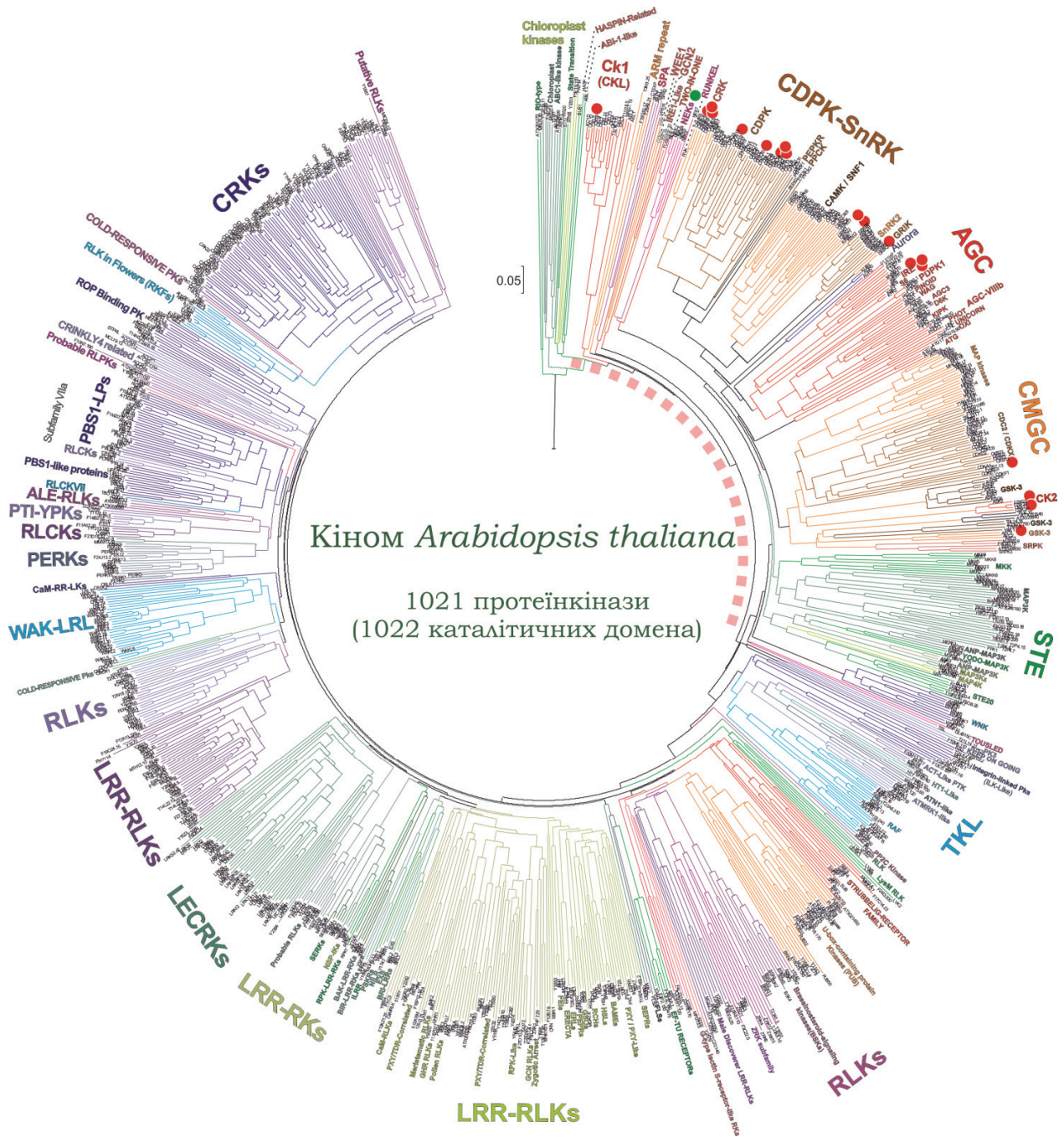


Рис.4.1. Кластеризація 1022-х каталітичних доменів, що належать 1021 протеїнкіназам *A. thaliana*, за методом зв'язування найближчих сусідів (NJ) станом на I квартал 2021 року. Топологія і коріння дерева були визначені за методом Shiu et al. (2001) шляхом додавання до вибірки ксенологічних послідовностей arhA (KKA3_ENTFL, P0A3Y5) з *Enterococcus faecalis* і RIO1 (RIO1_YEAST, Q12196) з *Saccharomyces cerevisiae* [512].

- - маркер протеїнкіназ тубулінового коду: червоні – досліджені в межах актуального дослідження, зелений – протеїнкінази NIMA (NEK) на підставі даних літератури [533]. Червоною пунктирною лінією позначено пул протеїнкіназ, причетних до базових функцій регуляції цитоскелету і клітинного поділу.

* Зображення високої роздільної здатності представлено у електронній версії документа.

Таким чином, на прикладі *A. thaliana* було визначено існування у вищих рослин виключно протеїнкіназ серин-треонінової і дуальної специфічності. Це підтверджує, що тирозин-специфічне фосфорилування у рослин повністю залежить від протеїнкіназ дуальної специфічності та атипової активності деяких з протеїнкіназ, які традиційно вважаються ферментами серин-треонінової специфічності [407].

Це дозволило зробити остаточний висновок, що агентами тубулінового коду у вищих рослин можуть бути виключно протеїнкінази серин-треонінової і дуальної специфічності [629, 630, 631]

4.1.1. Пошук рослинних гомологів протеїнкіназ, асоційованих з регуляцією клітинного циклу і системи мікротрубочок у *Homo sapiens*

На підставі аналізу літератури та кіному людини (<http://kinase.com/human/kinome/>) з 518 протеїнкіназ людини [133, 376] було відібрано 105 серин-треонінових протеїнкіназ (дані на початок 2021 року), для яких існує експериментальне підтвердження фосфорилування мікротрубочок і причетності до регуляції клітинного циклу [457, 457]. (табл.4.2, Додаток 4)

Раніше було встановлено, що очевидну гомологію з кіномом *H. sapiens* проявляє менше 70 % протеїнкіназ *A. thaliana* [276, 282]. Це співпадає з результатами сканування геномних послідовностей *A. thaliana* із застосуванням алгоритму `tblastn` і амінокислотних послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ *H. sapiens*, яке виконувалось під час актуального дисертаційного дослідження [274, 276]. В залежності від послідовності (каталітичні домени 105 протеїнкіназ), сканування геному *A. thaliana* визначало близько 55-70 % локусів генів протеїнкіназ [282, 284, 286].

Таблиця 4.2

**Протеїнкінази *Homo sapiens*, залучені у фосфорилювання білків
мікротрубочок і регуляцію клітинного циклу**

Назва	UniProtKB ID:	Назва	UniProtKB ID:	Назва	UniProtKB ID:
<i>Aurora subfamily:</i>		<i>AGC family</i>		<i>CMGC family</i>	
1. AurA	O14965	<i>GPRK subfamily</i>		<i>MNB/DYRK subfamily</i>	
2. AurB	Q96GD4	35. GRK1	Q15835	68. DYRK1A	Q13627
3. AurC	Q9UQB9	36. GRK4	P32298	69. DYRK1B	Q9Y463
<i>CDC5/Polo subfamily</i>		37. GRK5	P34947	70. DYRK2	Q92630
4. PLK1	P53350	38. GRK6	P43250	71. DYRK3	O43781
5. PLK3	Q9H4B4	39. GRK7	Q8WTQ7	72. DYRK4	Q9NR20
6. PLK4	O00444	40. GRK2	P25098	<i>MAPK subfamily</i>	
<i>I-kappa-B kinase subfamily</i>		41. GRK3	P35626	73. GSK3B	P49841
7. IKK α	O15111	<i>PDPK1 subfamily</i>		74. GSK3A	P49840
8. TBK1	Q9UHD2	42. PDK1	O15530	75. ERK1 (MAPK3)	P27361
<i>CAMK family</i>		<i>MAST subfamily</i>		76. ERK2 (MAPK1)	P28482
<i>NIM1 subfamily</i>		43. MASTL	Q96GX5	77. MAPK8 (JNK1)	P45983
9. CHEK1	O14757	44. MAST1	Q9Y2H9	<i>CDC2/CDKX subfamily</i>	
10. CHK1	O14757	45. MAST2	Q6P0Q8	78. CDK11A	Q9UQ88
<i>SNF1 subfamily</i>		46. MAST4	O15021	79. CDK11B	P21127
11. AMPK	P54646	47. MAST3	O60307	80. CDK1	P06493
12. BRSK1	Q8TDC3	<i>Large tumor suppressor homologs</i>		81. CDK2	P24941
13. BRSK2	Q8IWQ3	48. LATS1	O95835	82. CDK5	Q00535
14. MARK1	Q9P0L2	49. LATS2	Q9NRM7	<i>TKL Ser/Thr protein kinase family</i>	
15. MARK3	P27448	<i>Nuclear Dbp2-related kinases</i>		83. ILK	Q13418
16. MARK2	Q7KZ17	50. NDR1 (STK38)	Q15208	84. LIMK1	P53667
17. MARK4	Q96L34	51. NDR2 (STK38L)	Q9Y2H1	85. MAP3K7	O43318
<i>LKB1 subfamily</i>		<i>Rho-associated protein kinases</i>		86. MAP3K11	Q16584
18. LKB1	Q15831	52. ROCK1	Q13464	87. RIPK1	Q13546
<i>CaMK subfamily</i>		53. ROCK2	O75116	88. RIPK2	O43353
19. CaMK2 γ	Q13555	<i>BUB1 subfamily</i>		89. RIPK3	Q9Y572
20. CaMK2 δ	Q13557	54. BUB1	O43683	90. KSR2	Q6VAB6
21. DCLK1	O15075	55. BUBR1	O60566	91. LRRK2	Q5S007
22. PSKH1	P11801	<i>Casein kinase I family</i>		<i>STE family</i>	
23. CAMKV	Q8NCB2	56. TTBK1	Q5TCY1	<i>MAPKK subfamily</i>	
<i>CHK2 subfamily</i>		57. TTBK2	Q6IQ55	92. MAP2K3	P46734
24. CHEK2	O96017	<i>Casein kinase I subfamily</i>		93. MAP2K6	P52564
25. CHEK1	O14757	58. KC1A (α)	P48729	94. MAP3K1	Q13233
<i>PKD subfamily</i>		59. KC1AL (α -like)	Q8N752	95. MAP3K3	Q99759
26. PRKD2	Q9BZL6	60. KC1D (δ)	P48730	96. MAP3K15	Q6ZLN16
<i>Myosin light chain kinase MYLK</i>		61. KC1E (ϵ)	P49674	<i>STE20 subfamily</i>	
27. MLCK	Q15746	62. KC1G1 (γ 1)	Q9HCP0	97. SLK	Q9H2G2
<i>DAPK subfamily</i>		63. KC1G3 (γ 3)	Q9Y6M4	98. TAO1 (TAOK1)	Q7L7X3
28. DAPK1	P53355	64. KC1G2 (γ 2)	P78368	99. TAO2 (TAOK2)	Q9UL54
29. DAPK3	O43293	<i>Dual specificity protein kinase TTK</i>		100. PAK1	Q13153
30. DAPK2	Q9UIK4	65. TTK	P33981	101. PAK5	Q9P286
<i>Titin</i>		<i>Ck2 subfamily (subunit alpha)</i>		<i>NEK family.</i>	
31. TTN	Q8WZ42	66. Ck2 α 1	P68400	<i>NIMA subfamily</i>	
<i>CDC2/CDKX subfamily</i>		(CSK21)		102. NEK2	P51955
32. PKC α	P17252	67. Ck2 α 2	P19784	103. NEK8	Q86SG6
33. PKC ϵ	Q02156	(CSK22)		104. NEK9	Q8TD19
34. PKN2	Q16513			105. NEK7	Q8TDX7

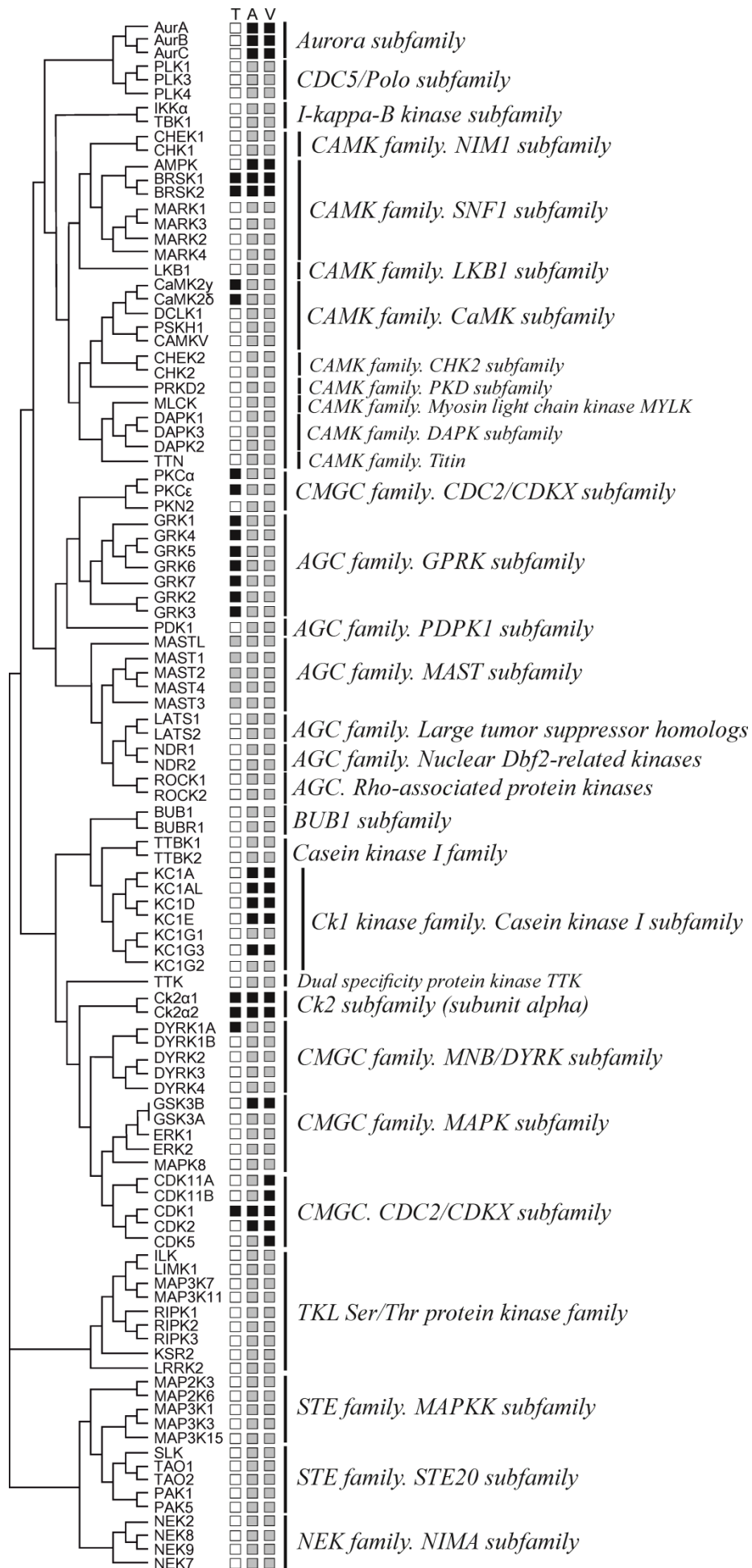


Рис. 4.2. 105 серин-треонінових протеїнказ, для яких існує експериментальне підтвердження фосфорилування мікротрубочок і причетності до регуляції клітинного циклу, результати пошуку протеїнказ тубулінового коду «Т», наявність їх гомологів у *A. thaliana* «А» та інших представників *Viridiplantae* «V»:

«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^{-5} , ■ - подібність послідовностей перевищує 60 %);

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

Наступне BLASTp-сканування бази даних UniProtKB із використанням послідовностей каталітичних доменів засвідчило наявність потенційних рослинних (*Viridiplantae*) гомологів для всіх зазначених протеїнказ *H. sapiens* (рис. 4.2). Наявність вираженої гомології було підтверджено для всіх 105 протеїнказ людини, що свідчить на користь консерватизму мітотичного апарату, цитоскелету і ферментів, асоційованих з їх посттрансляційною регуляцією білків цитоскелету у тварин і вищих рослин [276]. Такий консерватизм створив підґрунтя для наступного біоінформатичного і структурно-біологічного пошуку протеїнказ тубулінового коду вищих рослин.

З метою визначення пріоритетних об'єктів подальшого дослідження, перш за все, було відібрано протеїнкази *H. sapiens*, для яких існують прямі

або опосередковані докази фосфорилювання молекул тубуліну. Відповідне підтвердження було знайдено у протеїнкіназ CDK1 [129], CaMK2 γ [28, 575], CaMK2 δ [135, 28, 575], PKC α [1], PKC ϵ [444, 409], BRSK1 [401, 93, 8], BRSK2 [401, 93, 8], GRK1-7[543, 613, 206], CK2 α 1 [64], CK2 α 2 [64], DYRK1A [13] (рис. 4.2, маркер «Т», Додатки 2, 3 і 4).

На наступному етапі каталітичні домени зазначених 105 протеїнкіназ *H. sapiens* було перевірено на наявність рослинних гомологів. Сканування бази даних UniProtKB з використанням алгоритму blastp web-сервісу ExPASy BLAST (SIB BLAST) виконувалось з обмеженням: 1) за групою послідовностей протеому *A. thaliana* (рис. 4.2, маркер «А»), і 2) за групою «Viridiplantae» (рис. 4.2, маркер «V»). При цьому визначення найбільш перспективних рослинних гомологів ґрунтувалося на порогових критеріях показників ідентичності, подібності і показника E-value, згідно із даними літератури: ідентичність >25 %, подібність >80%, E-value < 10⁻⁵ [522, 105]. За результатами пошуку, цим критеріям відповідали рослинні гомологи наступних протеїнкіназ людини: Аутога-кінази – AurA, AurB, AurC; SNF1-кінази – AMPK, BRSK1 і BRSK2; казеїнкінази 1 – KC1A, KC1AL, KC1D, KC1E, KC1G3, каталітичні субодиниці казеїнкінази 2 – Ck2 α 1 і Ck2 α 2; MAPK-кіназа GSK3B; представники підродини CDC2/CDKX – PKC ϵ , CDK1, CDK2, CDK5, CDK11B. У випадку інших протеїнкіназ *H. sapiens* гомологія з рослинними білками була також досить високою і подібність їх послідовностей з гомологами *A. thaliana* перевищувала 60%. Наступна перевірка найближчих рослинних гомологів із використанням мережевого інструменту SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) і бази даних UniProtKB підтвердила їх належність до протеїнкіназ. Зокрема, це підтверджувалось наявністю ділянок, що відповідають канонічним профілям і НММ-моделям каталітичних доменів протеїнкіназ [276].

Сукупні дані первинного біоінформатичного дослідження дозволили визначити протеїнкінази людини, які виявились найбільш перспективними для наступного пошуку рослинних протеїнкіназ, причетних до безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну вищих рослин.

BLASTp-сканування бази даних UniProtKB проти послідовностей каталітичних доменів засвідчило наявність рослинних (*Viridiplantae*) гомологів для 35 з відібраних протеїнкіназ, що належать до груп AGC (Aurora, AGC, MAST), GMGC (CDC2/CDKX, MAP₁), CAMK (NIM1), STE (MAPKKK, STE20), до родин BUB, казеїн кіназ 2 (CK2), CDC5 (Polo-like), TTK, TKL і NEK (NIMA-like) (рис. 4.2).

Подібність послідовностей каталітичних доменів, результати спільної кластеризації, доменна архітектура і консервативність функціонально-важливих ділянок визначили, що у вищих рослин регуляція клітинного поділу, системи мікротрубочок і тубулінового коду може здійснюватися рослинними гомологами тваринних протеїнкіназ родин CAMK (підродина SNF1, CaMK), Casein kinase 1 (підродина CK1), GMGC (підродина MNB / DYRK, MAPK, CDC2/CDKX, PKC), AGC (підродина MAST і GPRK), STE (підродина STE20), NEK (підродина NIMA), протеїнкіназами гомологічними представникам під родин Aurora CK2 і BUB1.

Проте, пошук із застосуванням алгоритмів BLAST і FASTA не завжди дозволяє отримати точне уявлення стосовно функції протеїнкінази [105], що пов'язано з подібністю послідовностей каталітичних доменів [92] як для окремих протеїнкіназ людини, так і деяких із знайдених рослинних гомологів. Більш точно функція протеїнкінази може бути визначена на підставі результатів аналізу консервативності мотивів активаційної і каталітичної петель [92], доменного складу, просторової структури і методів молекулярно-генетичного аналізу [198, 92]. Застосування кладистичного аналізу значно скорочує кількість можливих варіантів, попереджає

суперечливі моменти і дозволяє ідентифікувати гомологи на рівні груп, підгруп і родин протеїнкіназ [92]. Результати NJ-кластеризації 35 протеїнкіназ людини і 198 рослинних гомологів (Додаток 2, рис. Д2), викрили клади, що відповідали групі AGC (родина Aurora, MAST, підгрупа NDR - родини NDR і LATS), групі CAMK (підродина NIM1), групу казеїнкіназ 1, групу циклін-залежних кіназ, групу CMGC (родина CDK, суперродина MAPK, підродина MAP кіназ) і CMGC-подібні протеїнкінази казеїнкіназа II (родина CK2), TTK / MPS1-подібні кінази (родина TTK), протеїнкінази контрольних точок збирання комплексу кінетохору - BUB1 / BUBR1 (родина BUB), протеїнкінази групи STE (STE20-подібні протеїнкінази), протеїнкінази родини NEK (підродина NIMA) і групи TKL (родина MLK, TKL, RIPK і LRRK2-подібні протеїнкінази).

Таким чином, 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. При цьому, гомологія послідовностей і дані філогенетичного дослідження засвідчили існування рослинних гомологів для 105 протеїнкіназ *Homo sapiens*, асоційованих 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 α), CMGC (родина CDC/CDKX і MNB/DYRK), близької до CMGC підродина CK2, самостійної родини казеїнкінази 1 (підродина CK1), самостійної підродина BUB1, а також Ca²⁺-залежних (CDPK) і SNF-споріднених (SnRK) протеїнкіназ суперродина CDPK-SNRK.

4.2. Біоінформатичний пошук протеїнкіназ тубулінового коду на підставі наявності канонічних сайтів специфічного фосфорилування

Під час первинного пошуку потенційних сайтів фосфорилування молекул тубуліну враховувалось два критерія:

- 1) відповідність НММ-моделям сайтів специфічного фосфорилування;
- 2) результати аналізу структурної топології визначених сайтів, що підтверджувало їх доступність для модифікації. (Додатоки 4 і 5)

Для профільного пошуку специфічних сайтів фосфорилування було виконано аналіз послідовностей α -, β - і γ -тубулінів *H. sapiens* і *A. thaliana* із використанням web-інструменту KinasePhos [228] (<http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw>). На сьогодні зазначений алгоритм реалізовано як локальний інструмент GPS 3.0 [352]. Топологія сайтів на поверхні молекул тубуліну була визначена за допомогою плагіну PyTMs пакету PyMOL (рис.4.3). (Додаток 5)

Співставлення двох зазначених критеріїв дозволило здійснити сайт-орієнтований пошук протеїнкіназ, потенційно здатних до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну. Оскільки існуючі НММ-моделі сайтів фосфорилування було складено для тваринних протеїнкіназ, визначення рослинних гомологів здійснювалось на підставі гомології послідовностей.

Із використанням зазначеного алгоритму пошуку, на поверхні молекул тубуліну людини і арабідопсису було ідентифіковано сайти 14 протеїнкіназ *Homo sapiens* (BRSK1, KCC2A, KAPCA, KAPCB, KGP2, AKT1, KPCA, CDK1, MK01, MK03, KC1D, CK2 (CSK21, CSK22) і IKKA) і 23-х протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana* (KIN10, CDPKL, PPCK1, PPCK2, IRE3, IREN1, IRE, IRE4, CDKA1, MPK13, MPK3, MPK5, KC1D, SKL12, SKL6, CSK23, CSK22, CSK21, CSK2P, WNK11, F20D22.2, T28J14.80, MQJ2.14) (табл. 4.2).

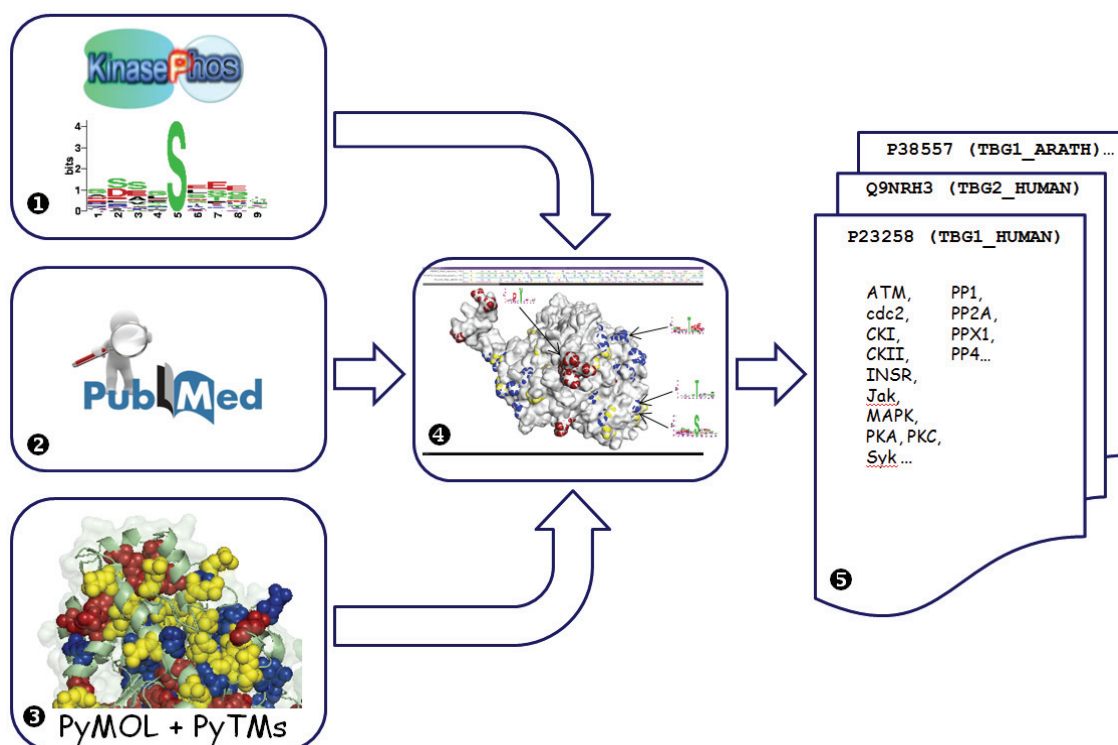


Рис. 4.3. Алгоритм пошуку протеїнкіназ, потенційно здатних до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну:

- 1 - пошук потенційних сайтів фосфорилування із використанням прихованих моделей Маркова (KinasePhos 2 / GPS 3.0);
- 2 - пошук інформації стосовно сайтів фосфорилування і відповідних протеїнкіназ на підставі аналізу літератури;
- 3 - моделювання можливих модифікацій тубуліну із використанням плагіну PyTMs, інтегрованого у програму PyMOL;
- 4 - аналіз топології сайтів із використанням структурних моделей молекул тубулінів; вилучення сайтів, які є недоступними для ферментів і, відповідно, для модифікацій.

Загалом, згідно результатів первинного біоінформатичного скринінгу, проносована гомологія була доведена для групи рослинних протеїнкіназ зазначеної групи (рис. 4.2., «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

(підродини MAST і GPRK / GRK), CDPK-SnRK (CDPK, CRK, SNF1 і SnAK1), Casein kinase 1 (підродина СК1, BUB1 / BUBR1), GMGC (підродини MNB / DYRK, MAPK, CDC2 / CDKX, PKC) і СК2 (Casein kinase 2). До остаточного переліку рослинних протеїнкіназ тубулінового коду належить і протеїнкіназа НЕК6 (родина НЕК, підродина NIMA), яка, згідно даним літератури, фосфорилує Thr166 β -тубуліну, що викликає деполімеризацію рослинних мікротрубочок [533].

Таблиця 4.2

Результати пошуку протеїнкіназ, що потенційно приймають участь у регуляції цитоскелету у *Homo sapiens* і *Arabidopsis thaliana*

Протеїнкінази	Gene names	UniProtKB	Recommended name
1	2	3	4
<i>Homo sapiens</i>			
CAMK Ser/Thr protein kinase family. SNF1 subfamily.			
BRSK1	<i>BRSK1, KIAA1811, SADI, SADB</i>	Q8TDC3	Serine/threonine-protein kinase BRSK1
CAMK Ser/Thr protein kinase family. CaMK subfamily.			
KCC2A	<i>CAMK2A, CAMKA, KIAA0968</i>	Q9UQM7	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha
AGC Ser/Thr protein kinase family. cAMP subfamily.			
KAPCA	<i>PRKACA, PKACA</i>	P17612	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha
KAPCB	<i>PRKACB</i>	P22694	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta
AGC Ser/Thr protein kinase family. cGMP subfamily.			
KGP2	<i>PRKG2, PRKGR2</i>	Q13237	cGMP-dependent protein kinase 2
AGC Ser/Thr protein kinase family. RAC subfamily.			
AKT1	<i>AKT1, PKB, RAC</i>	P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AGC Ser/Thr protein kinase family. PKC subfamily.			
KPCA	<i>PRKCA, PKCA, PRKACA</i>	P17252	Protein kinase C alpha type
CMGC Ser/Thr protein kinase family. CDC2/CDKX subfamily.			
CDK1	<i>CDK1, CDC2, CDC28A, CDKN1, P34CDC2</i>	P06493	Cyclin-dependent kinase 1
CMGC Ser/Thr protein kinase family. MAP kinase subfamily.			
MK01	<i>MAPK1, ERK2, PRKMI, PRKM2</i>	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1
MK03	<i>MAPK3, ERK1, PRKM3</i>	P27361	Mitogen-activated protein kinase 3
KC1D	<i>CSNK1D, HCK1D</i>	P48730	Casein kinase I isoform delta
Ser/Thr protein kinase family. CK2 subfamily.			
CK2: CSK21	<i>CSNK2A1, CK2A1</i>	P68400	Casein kinase II subunit alpha
CK2: CSK22	<i>CSNK2A2, CK2A2</i>	P19784	Casein kinase II subunit alpha'
Ser/Thr protein kinase family. I-kappa-B kinase subfamily.			
IKKA	<i>CHUK, IKKA, TCF16</i>	O15111	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha

Продовження табл. 4.2

1	2	3	4
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
CAMK Ser/Thr protein kinase family. SNF1 subfamily.			
KIN10	<i>KIN10, AK21, SKIN10, SNR2, SNRK1.1, At3g01090</i>	Q38997	SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha KIN10
Ser/Thr protein kinase family. CDPK subfamily.			
CDPKL	<i>CPK21, At4g04720</i>	Q9ZSA2	Calcium-dependent protein kinase 21
Phosphoenolpyruvate carboxylase kinases.			
PPCK1	<i>PPCK1, At1g08650</i>	Q9SPK4	Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1
PPCK2	<i>PPCK2, At3g04530</i>	Q93VK0	Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 2
AGC Ser/Thr protein kinase family.			
IRE3	<i>IRE31, At1g48490</i>	F4HYG2	Probable serine/threonine protein kinase IRE3
IREH1	<i>IREH1, At3g17850</i>	F4J6F6	Probable serine/threonine protein kinase IREH1
IRE	<i>IRE1, At5g62310</i>	Q9LE81	Probable serine/threonine protein kinase IRE
IRE4	<i>IRE4, At1g45160</i>	F4HPN2	Probable serine/threonine protein kinase IRE4
CMGC Ser/Thr protein kinase family. CDC2/CDKX subfamily.			
CDKA1	<i>CDKA-1, CDC2, CDC2A, At3g48750</i>	P24100	Cyclin-dependent kinase A-1
CMGC Ser/Thr protein kinase family. MAP kinase subfamily.			
MPK13	<i>MPK13, At1g07880</i>	Q9LQQ9	Mitogen-activated protein kinase 13
MPK3	<i>MPK3, At3g45640</i>	Q39023	Mitogen-activated protein kinase 3
MPK5	<i>MPK5, At4g11330</i>	Q39025	Mitogen-activated protein kinase 5
CK1 Ser/Thr protein kinase family. Casein kinase I subfamily.			
KC1D	<i>At4g26100</i>	P42158	Casein kinase I isoform delta-like
CKL12	<i>At5g57015</i>	Q8VYK9	Casein kinase I-like protein 12
CKL6	<i>CKL6, At4g28540</i>	Q8LPJ1, O65463	Casein kinase I-like protein 6
Ser/Thr protein kinase family. CK2 subfamily.			
CSK23	<i>At2g23080</i>	O64817	Probable casein kinase II subunit alpha
CSK22	<i>CKA2, At3g50000</i>	Q08466	Casein kinase II subunit alpha-2
CSK21	<i>CKA1, At5g67380</i>	Q08467	Casein kinase II subunit alpha-1
CSK2P	<i>At2g23070</i>	O64816	Casein kinase II subunit alpha, chloroplastic
Ser/Thr protein kinase family. WNK subfamily			
WNK11	<i>WNK11, At5g55560</i>	Q6ICW6	Probable serine/threonine-protein kinase WNK11
Uncharacterized protein kinase family proteins			
F20D22.2	<i>At1g04210</i>	O64486	Putative uncharacterized protein
T28J14.80	<i>At5g07140</i>	F4K6K4	Protein kinase family protein
MQJ2.14	<i>At5g58520</i>	Q0WN89	Protein kinase family protein

Таким чином, первинне біоінформатичне дослідження підтвердило попереднє припущення, що протеїнкінази тубулінового коду (агенти тубулінового коду) належать до консервативного пулу протеїнкіназ, причетних до базових функцій регуляції цитоскелету і клітинного поділу (рис. 4.1). Отримані дані підтвердили, що найбільш перспективними групами протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин є гомологи тваринних протеїнкіназ суперродин: AGC (AGC Ser/Thr protein kinase family), CMGC (CMGC/ CMGC-like + CK2), CK1 (CK1 Ser/Thr protein kinase family. Casein kinase I subfamily.), Bub1 і представники групи CDPK-SNRK (Calcium-dependent protein kinase/Snfl-related protein kinase).

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 4:

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.org/10.3103/S0095452718060038.

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.org/10.3103/S0095452717060056.

Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for Ca²⁺- and Calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. Cytol. Genetics. 2017; 51 (4): 239–246. doi.org/10.3103/S0095452717040053.

Новожилов ДО, Карпов ПА, Раевский АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ. Ca^{2+} - та Ca^{2+} -Кальмодулін-залежні протеїнкінази - потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 323–328. doi.org/10.7124/FEEEO.v20.788.

Karpov PA, 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.org/10.3103/S0096392510040267.

Karpov 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.

Karpov 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.org/ 10.1186/1471-2164-11-s1-s14.

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.

Karpov 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.org/10.3103/S0095452709030104.

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.

Karpov 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.

Новожилов ДО, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Біоінформаційний пошук СРК і CRK протеїназ, 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.

Demchuk O, Karpov P, Blume YB. Potential sites of posttranslational modifications of plant α/β -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.

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.

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.

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.

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.

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.

Karpov 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.

Karpov 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.

Karpov 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.

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.

Karpov 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).

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 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

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

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.

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.

Karpov P, Yemets A, Blume Y. Kinome 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.

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.

Карпов ПА, Ємець 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.

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.

РОЗДІЛ 5

Вклад протеїнкіназ AGC в тубуліновий код вищих рослин

5.1. Визначення представників AGC-кіназ людини, які пов'язані з регуляцією цитоскелету і наявність їх гомологів у *A. thaliana*.

На початку дослідження було виконано ревізію протеїнкіназ AGC людини і їх зв'язку з регуляцією цитоскелету. Початком складання вибірки були дані Manning et al. (2002) [376], відповідні статті ресурсу UniProtKB [552], дані з супутних джерел літератури [15, 493].

На підставі виконаного аналізу було відібрано 60 протеїнкіназ, які складають групу тваринних AGC, з яких, відповідно до даних літератури, 19 приймають участь у регуляції цитоскелету ссавців (табл. 5.1). З них лише 13 мають експериментальне підтвердження причетності до регуляції системи мікротрубочок і приймають безпосередню участь у модуляції тубулінового коду. А саме: представники підродини GPRK (GRK1 (RHOK), GRK2 (BARK1/ β ARK), GRK3 (BARK2), GRK4, GRK5, GRK6 і GRK7), які фосфорилують β тубулін [83, 543], асоційовані з мікротрубочками протеїнкінази підродини MAST (MAST1, MAST2, MAST3, MAST4 и MASTL / Greatwall), для яких на момент дослідження існували лише опосередковані докази причетності до регуляції кортикальних мікротрубочок і центросом [169, 569], а також, протеїнкіназа $C\alpha$ (PKC α), здатна фосфорилувати α -тубулін за залишком Ser165 (α 6-тубулін не онкогенної лінії клітин MCF-10A / ATCC® CRL-10317™ епітелію людини) [120, 379].

У інших представників AGC існували або докази опосередкованого впливу (майстер-кіназа PDK1 / PDPK1, яка активує усі протеїнкінази групи [241]), або їх активність була пов'язана з фосфорилуванням актину: протеїнкінази NDR2 (STK38L) [177], ROCK1 і ROCK2 [507], PKN2 (PRK2) [567] і ще один ізотип протеїнкінази C - PKC ϵ [444, 409].

Крім того, було показано, що протеїнкінази LATS1 і LATS2, які досить часто асоціюють з регуляцією системи мікротрубочок, не здатні до безпосереднього фосфорилування тубуліну, а їх вплив обумовлений участю у сигнальному шляху Cdk1-LATS-Pin1, що пояснює їх причетність до формування таксол-резистентності у мікротрубочок [399].

Таким чином, пріоритетними об'єктами подальшого дослідження були рослинні гомологи тваринних протеїнкіназ GPRK, PKC α і MAST. Попередній Blastp-пошук з використанням послідовностей каталітичних доменів підтвердив ймовірність існування гомологів вищезазначених протеїнкіназ у *A. thaliana*. Це також було підтверджено результатами спільної NJ-кластеризації повної вибірки каталітичних доменів AGC-кіназ людини і найближчих гомологів з *A. thaliana*, відібраними на підставі подібності послідовностей (табл. 5.1, рис.5.1).

За результатами первинного пошуку найближчих рослинних гомологів з *A. thaliana* за подібністю каталітичних доменів, група рослинних протеїнкіназ була досить обмеженою і містила: мастер-кіназу - 3-фосфоіносітид-залежну протеїнкіназу 1 (PDK1 / PDPK1 / Q9XF67); представників підродина S6 - KPK1 (ATPK1 / P42818) і KPK2 (AtPK2 / AtPK19 / Q39030), інозитол-залежні протеїнкінази - IRE (Q9LE81), IREN1 (F4J6F6), IRE3 (F4HYG2), IRE4 (F4HPN2), кальцій-залежні протеїнкінази - CDPKC (CPK12 / Q42396), CDPKT (CPK29 / Q8RWL2), CDPKP (CPK25 / Q9SJ61), CDPKH (CPK17 / Q9FMP5) і CDPKE (CPK14 / P93759) (табл. 5.1, рис.5.1).

При цьому, представники протеїнкіназ MAST утворювали спільну кладу з рослинними інозитол-залежними протеїнкіназами, а протеїнкінази GPRK і PKC α формували спільну кладу з рослинними представниками S6 кіназ (KPK1 і KPK2). Саме зазначені рослинні протеїнкінази і були визначені як пріоритетні об'єкти подальших досліджень (рис.5.1).

Таблиця 5.1

Узагальнені дані стосовно зв'язку AGC-кіназ людини з регуляцією цитоскелету і результати відбору ймовірних гомологів з *A. thaliana* на підставі подібності послідовностей каталітичних доменів

AGC Ser/Thr protein kinase family				
Протеїнкінази людини 1	Факт зв'язку з цитоскелетом 2	Наявність гомолога у <i>A. thaliana</i>		
		Ідентичність, % 3	Подібність, % 4	UniProtKB 5
PDPK1 subfamily				
PDK1 (PDPK1)*	[241]	49	64	PDPK1_ARATH
GPRK subfamily (G-protein-coupled receptor kinases / Rhodopsin kinases)				
GRK1/ RHOK	[215, 543]	35	60	KPK1_ARATH
GRK2/ BARK1	[215, 543, 613]	40	62	KPK2_ARATH
GRK3/ BARK2	[543]	39	61	KPK2_ARATH
GRK4*	[543]	39	56	KPK1_ARATH
GRK5	[543]	38	58	KPK1_ARATH
GRK6**	[543]	37	56	KPK1_ARATH
GRK7	[543]	38	60	KPK1_ARATH
MAST (Microtubule-associated serine/threonine-protein kinases)				
MAST1	[169]	49	65	IRE_ARATH
MAST2	[169]	48	66	IRE_ARATH
MAST3	[169]	48	65	IRE_ARATH
MAST4	[169]	48	65	IRE_ARATH
MASTL/ Greatwall	[169, 569]	56	73	IREH1_ARATH
Nuclear Dbf2-related (NDR) family of protein serine/threonine kinases				
Large tumor suppressor kinases				
LATS1	[399]	45	60	IRE_ARATH
LATS2	[399]	44	59	IRE_ARATH
Serine/threonine-protein kinases 38				
NDR1 (STK38)	-	45	62	IRE3_ARATH
NDR2 (STK38L)	[177]	44	61	IRE3_ARATH
Citron Rho-interacting kinase				
CRIK	-	39	59	KPK1_ARATH
PRho-associated protein kinases				
ROCK1	[507]	42	57	IRE3_ARATH
ROCK2	[507]	40	58	IRE3_ARATH
DMPK subfamily kinases				
DMPK	-	38	54	IRE3_ARATH
DMPK2	-	39	57	IRE4_ARATH
MRCKα	-	39	56	IRE3_ARATH
MRCKβ	-	38	57	IRE_ARATH
cGMP-dependent protein kinases				
PKG1	-	40	64	KPK1_ARATH
PKG2	-	41	66	KPK2_ARATH
Putative kinases PRKY і PRKX (cAMP subfamily)				
PRKY	-	40	67	KPK2_ARATH
PRKX	-	41	66	KPK2_ARATH

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
PKA kinases (cAMP subfamily)				
PKA α	-	42	66	KPK2_ARATH
PKA β	-	42	65	KPK2_ARATH
PKA γ	-	44	67	KPK2_ARATH
Ribosomal protein S6 kinases (S6 kinase subfamily)				
RSKR (Sgk494)	-	36	62	KPK1_ARATH
RSKL1	-	34	62	KPK1_ARATH
RSKL2	-	40	55	KPK2_ARATH
MSK1 (a, б)	-	52 37	71 56	a) KPK2_ARATH б) CDPKC_ARATH
MSK2	-	49 37	70 65	a) KPK2_ARATH б) CDPKT_ARATH
p70S6K	-	52	70	CDPKT_ARATH
p70S6K β	-	49	70	KPK2_ARATH
RSK1/p90RSK	-	51 51	72 52	a) KPK2_ARATH б) CDPKP_ARATH
RSK2	-	51 40	72 56	a) KPK2_ARATH б) CDPKH_ARATH
RSK3	-	51 42	72 58	a) KPK2_ARATH б) CDPKH_ARATH
RSK4	-	51 38	72 56	a) KPK2_ARATH б) CDPKE_ARATH
RAC-alpha serine/threonine-protein kinase				
AKT1 / PKB α	-	46	68	KPK2_ARATH
AKT2 / PKB β	-	44	69	KPK2_ARATH
AKT3 / PKB γ	-	45	67	KPK2_ARATH
Serum/glucocorticoid-regulated kinases				
SGK1	-	46	67	KPK1_ARATH
SGK2	-	46	66	KPK2_ARATH
SGK3	-	45	66	KPK1_ARATH
PKC-related serine/threonine-protein kinases				
PKN1 / PRK1	-	40	62	KPK2_ARATH
PKN2 / PRK2	[567]	39	63	KPK2_ARATH
PKN3	-	40	61	KPK2_ARATH
Protein kinase C				
PKCα	[120, 379]	41	66	KPK2_ARATH
PKC β	-	41	64	KPK2_ARATH
PKC γ	-	41	63	KPK2_ARATH
PKC δ	-	37	58	IRE_ARATH
PKCϵ	[444, 409]	42	64	KPK1_ARATH
PKC ζ	-	40	67	KPK2_ARATH
PKC η	-	44	64	KPK1_ARATH
PKC θ	-	40	59	IRE4_ARATH
PKC ι	-	39	67	KPK2_ARATH

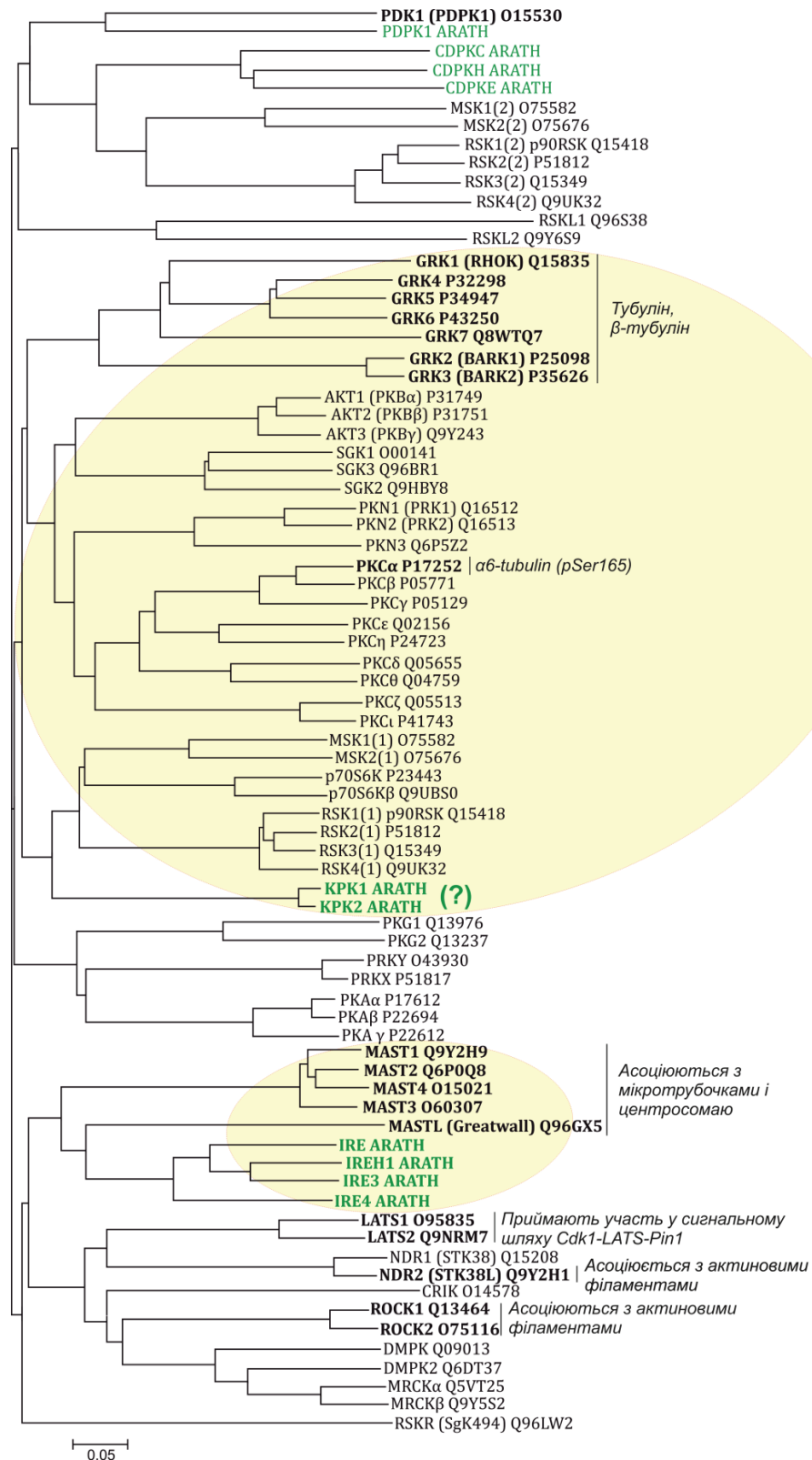


Рис.5.1. Результати спільної кластеризації послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ AGC людини і їх найближчих гомологів з *A. thaliana*, відібраних на підставі результатів Blastp-пошуку в UniProtKB.

5.2. Протеїнкінази КРК1 і КРК2 як потенційні агенти тубулінового коду вищих рослин

За результатом порівняння послідовностей каталітичних доменів рослинних AGC-кіназ підродина S6K (S6 kinase), КРК1 і КРК2 було визначено як найближчі спільні гомологи для тваринних протеїнкіназ групи GPRK (GRK) і для протеїнкінази Ca (PKCa). Слід зазначити, що для тваринних GPRK і для PKCa існують експериментальні докази фосфорилування тубуліну [215, 543, 613, 120, 379]. Оскільки підґрунтям актуального дослідження є парадигма, що для молекул тубуліну і асоційованими з його фосфорилуванням протеїнкіназ має бути притаманний певний еволюційний консерватизм, було необхідно підтвердити консервативність GPRK- і PKCa-асоційованих сайтів фосфорилування тубуліну у тварин і вищих рослин [365, 474, 244, 277].

Існували певні сумніви стосовно здатності S6K-кіназ (КРК1 і КРК2) до модифікації тубуліну. Це було зумовлено інформацією з відповідних статей UniProtKB (UniProtKB: P42818 і Q39030), яка стверджувала, що зазначені протеїнкінази мають виключно ядерну локалізацію. Але пізніше дослідженнями Henriques et al. (2010) було доведено, що КРК1 і КРК2 також присутні в цитоплазмі клітин *A. thaliana* [208]. Було доведено, що рослинні протеїнкінази S6K причетні до регуляції частоти поділу клітин у рамках механізму контролю розміру клітин під тиском чинників стресу. Крім того, було доведено існування безпосереднього зв'язку зниження активності S6K-кіназ і зростання кількості випадків спонтанної поліплоїдизації клітин *A. thaliana* [208]. Така кореляція експресії S6K і індексу поліплоїдизації, безсумнівно, є ще одним аргументом на користь зв'язку рослинних КРК-кіназ з регулюванням тубулінового цитоскелету. Було доведено, що протеїнкінази S6K також є частиною сигнальних каскадів, які відповідають за формування відповіді рослин на фактори наявності / відсутності поживних речовин, різноманітні стреси, обумовлюють хромосомну стабільність і регулюють

клітинну проліферацію. На думку Henriques et al. (2010), саме тандем з S6K, RBR1 і E2FA причетний до процесів еволюційної адаптації рослин до факторів середовища через регулювання плоідності, що, безсумнівно, неможливо без участі системи мікротрубочок [208].

5.3. Консервативність сайтів GRK- і PKCa-специфічного фосфорилування молекул тубуліну у людини і *A. thaliana*

Як згадувалось раніше, згідно гомології послідовностей, рослинні протеїнкінази КРК1 и КРК2 були визначені як можливі регулятори тубулінового коду вищих рослин. Кластеризація каталітичних доменів показала, що у рослин протеїнкінази КРК1 и КРК2 могли взяти на себе модифікації тубуліну, які у ссавців асоційовані з активністю GRK-кіназ і протеїнкінази Ca (PKCa) (рис. 5.1). Саме тому, наступною задачею стало порівняння експериментально доведених GRK- і PKCa-специфічних сайтів фосфорилування тубуліну людини і відповідних амінокислотних залишків молекул тубуліну *A. thaliana* для підтвердження або спростування їх консервативності.

У ссавців родина GRK (G protein-coupled receptor kinases) об'єднує сім протеїнкіназ: родопсин-кіназу - RHOK (GRK1), β ARK (GRK2), β ARK2 (GRK3), GRK4, GRK5 і GRK6 [445, 543]. Yoshida et al. (2003) довели, що протеїнкіназа GRK2 (β ARK) здатна фосфорилувати C-кінцеву ділянку β -тубуліну людини за залишками Thr409 і Ser420. Ці амінокислоти було визначено як єдині можливі сайти GRK-специфічного фосфорилування β -тубуліну [613, 445]. Але раніше, під час дослідження найбільш атипичного β -тубуліну - β III, було встановлено, що подвійний мутант β III-тубуліну (T409A / S420A) зазнає GRK-специфічного фосфорилування протеїнкіназами GRK2 і GRK5 на рівні $\sim 30\%$ у порівнянні з контролем (дикий ізотип β III-тубуліну) (рис. 5.2). Водночас, у потрійного мутанта β III-тубуліну (T409A / S420A /

S444A) фосфорилування не спостерігалось. Також було встановлено, що різний рівень фосфорилування тубуліну β_{III} протеїнкіназами GRK2 і GRK5 у порівнянні з рештою ізотипів β -тубуліну людини впливає на його електрофоретичну рухливість. Таким чином, Ser444 було підтверджено як ще один сайт GRK-специфічного фосфорилування, який унікальний виключно для β_{III} -тубуліну ссавців [83].

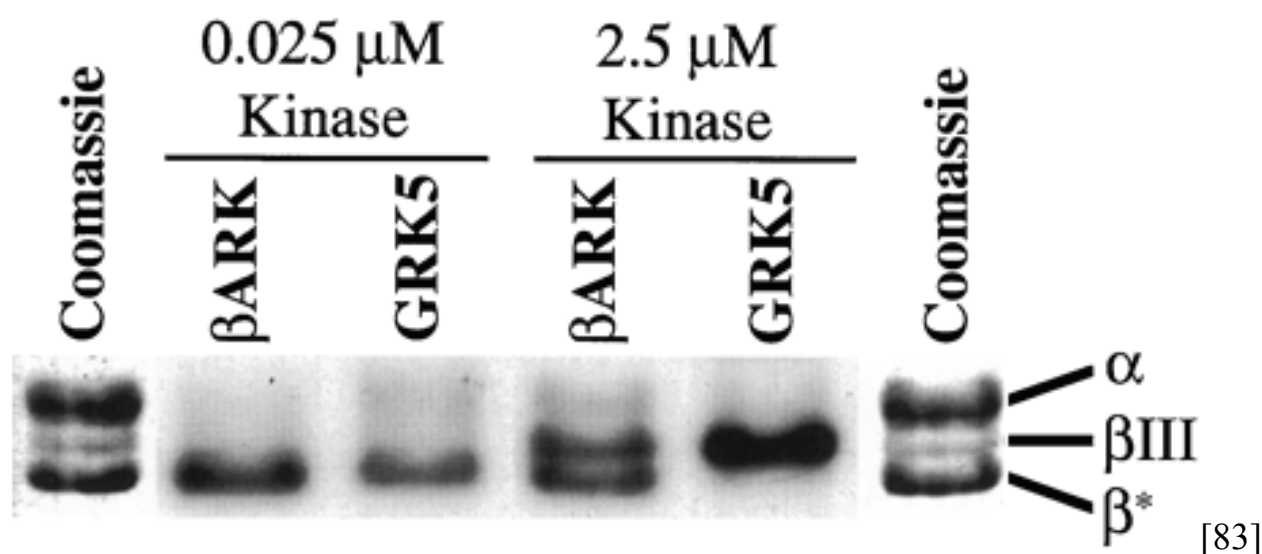


Рис. 5.2. Докази фосфорилування тотального β -тубуліну (β^*) протеїнкіназами β ARK2 (GRK2) і GRK5, підтвердження факту фосфорилування додаткового сайту (S444) ізотипу тубуліну β_{III} , отримані методом авторадіографії Carman et al., 1998 [83].

Коментар: крайні права і ліва треки електрофорезу - контроль, що підтверджує різну електрофоретичну рухливість карбоксиметилованого тубуліну (фарбування за Кумассі): α -, β_{III} -, and β^* (решта ізотипів β -тубуліну за виключенням β_{III}).

Крім того, факти фосфорилування Thr409, Ser420 і Ser444 підтверджуються результатами мас-спектрометрії, про що свідчать дані ресурсу PhosphoSitePlus (рис.5.3). Актуальний аналіз С-кінцевих фрагментів всіх відомих ізотипів β -тубуліну людини, із застосуванням інструменту GPS

v.3.0, підтвердив максимальний скор GRK-специфічного фосфорилування саме для амінокислотних залишків Thr409, Ser420 і Ser444.

Таким чином, за результатами порівняння С-хвостових ділянок, більшість ізотипів β -тубуліну людини (TBB2A, TBB2B, TBB4A, TBB4B, TBB5, TBB6, TBB8) мають два основних сайти GRK-специфічного фосфорилування (Thr409 і Ser420). Нетипова картина спостерігається лише у випадку двох ізотипів - TBB1 і TBB3 (β_{III}). У разі ізотипу TBB1 (UniProtKB: Q9H4B7), сайт Thr409 було втрачено і GRK-специфічне фосфорилування відбувається лише за залишком Ser420. У TBB3 / β_{III} (UniProtKB: Q13509), навпаки, присутній додатковий сайт - Ser444. Таким чином, на сьогодні доведено, що у вільної формі всі відомі ізотипи GRK (1-7) здатні фосфорилувати тубулін в умовах *in vitro* [543].

У *A. thaliana* існує дев'ять ізотипів β -тубуліну: TBB1, TBB2, TBB3, TBB4, TBB5, TBB6, TBB7, TBB8 і TBB9. Вирівнювання послідовностей С-кінцевих фрагментів показало існування сайту еквівалентного Thr409 у всіх вищезазначених ізотипів (рис.5.3). Сайт, еквівалентний Ser420, було знайдено лише у шести ізотипів: TBB1, TBB2, TBB3, TBB6, TBB7 і TBB8. У трьох ізотипів (TBB4, TBB5 і TBB9) в цьому положенні присутня нативна заміна на аланін (рис.5.3б). Жоден з ізотипів β -тубуліну *A. thaliana* не має сайту еквівалентного Ser444 β_{III} -тубуліну людини. Проте, у чотирьох рослинних ізотипів (TBB1, TBB2, TBB3 і TBB7) в положенні структурно-еквівалентному тваринному Ser444 присутній амінокислотний залишок тирозину. Профільне сканування послідовностей тубулінів за допомогою інструменту GPS v.3.0 [352] засвідчило найвищий скор відповідності цього сайту саме профілям сайтів тваринних протеїн-тирозин кіназ. Слід зазначити, що сканування в GPS v.3.0 всіх ізотипів β -тубуліну з *A. thaliana* підтвердило повну відповідність всіх сайтів еквівалентних Thr409 і Ser420 профілям GRK-специфічного фосфорилування.

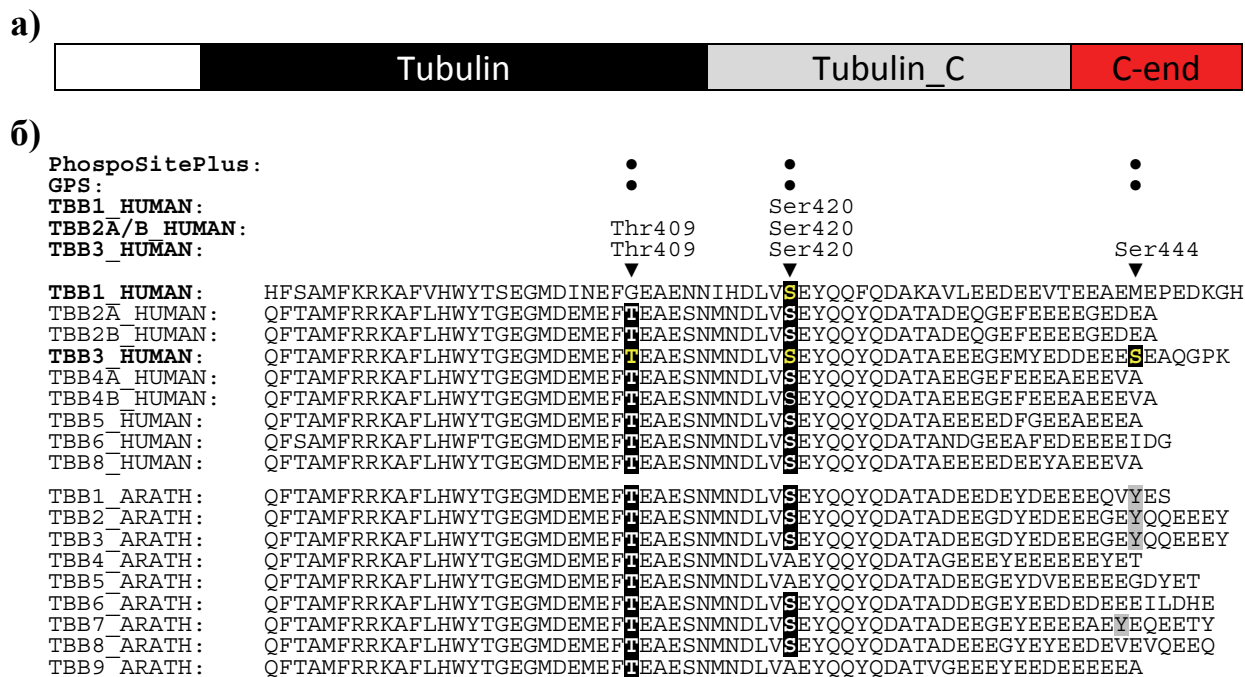


Рис.5.3. Результати порівняння С-кінцевих (C-end) ділянок молекул β -тубуліну з *H. sapiens* і *A. thaliana*. а) Узагальнена схема доменної організації молекул β -тубуліну. Червоним кольором позначено фрагмент, який використовувався для порівняння. б) Послідовності С-кінцевих фрагментів тваринного і рослинного β -тубуліну з маркуванням сайтів GRK-специфічного фосфорилування. Як контроль було використано експериментальні дані, отримані для TBB1, TBB2A/B і TBB3 людини, дані мас-спектрометрії з ресурсу PhosphoSitePlus і відповідність НММ-профілям канонічних сайтів (програма GPS v.3.0)[352].

5.3.1. Порівняння структурної топології GRK-специфічних сайтів фосфорилування β -тубуліну людини і арабідопсису. Для аналізу просторової топології GRK-специфічних сайтів фосфорилування β -тубуліну було обрано єдиний ізотип β -тубуліну людини, який водночас має всі три експериментально-підтверджені сайти - β_{III} (TBB3_HUMAN, Q13509), а також,

β_3 -тубулін (TBB3_ARATH, Q9ASR0) з *A. thaliana*. Для позиціонування повноатомних структурних моделей у комплекс фрагменту протофіламенту мікротрубочки було використано химерну x-Ray структуру 3DU7 (doi: 10.2210/pdb3DU7/pdb), отриману з RCSB Protein Data Bank [107]. Зазначений химерний комплекс фрагменту протофіламенту мікротрубочки представлено двома димерами $\alpha\beta$ -тубуліну, які належать *Bos taurus* (α -тубулін: TBA1C_BOVIN, Q3ZCJ7; β -тубулін: TBB2B_BOVIN, 6B856), і молекулою статміну 4 (Stathmin-4: STMN4_RAT, P63043) з *Rattus norvegicus*. Завдяки значному рівню гомології стало можливим заміщення молекул β -тубуліну у експериментальному комплексі 3DU7 повноатомними 3D-моделями β -тубуліну людини і арабідопсису, побудованими із використанням сервісу I-Tasser. Позиціонування рослинних моделей виконувалось в програмі PyMol шляхом структурного вирівнювання з молекулами β -тубуліну комплексу 3DU7, використовуючи їх як шаблон (рис. 5.4).

Візуалізація цільових амінокислот з використанням реконструйованої моделі підтвердила ідентичність топології і функціонального навантаження на сайти фосфорилування, які еквівалентні Thr409 і Ser420 у різних ізотипів β -тубуліну людини і арабідопсису. Фосфорилування цих сайтів ідентичним чином має впливати на конформаційну рухливість С-хвоста β -тубуліну, а це не може не позначатися на процесах взаємодії протофіламентів мікротрубочки [339]. Можна впевнено говорити про ідентичність цих молекулярних механізмів у тварин і вищих рослин. З урахуванням біофізичної сутності процесу, можна передбачати схожу роль фосфорилування Ser444 β_{III} -тубуліну людини і потенційного фосфорилування залишків тирозину в еквівалентних положеннях рослинних β -тубулінів: TBB1, TBB2, TBB3 і TBB7. Проте питання залишається відкритим і навіть якщо така модифікація має місце, вона однозначно не може бути пов'язана з активністю протеїнкіназ AGC.

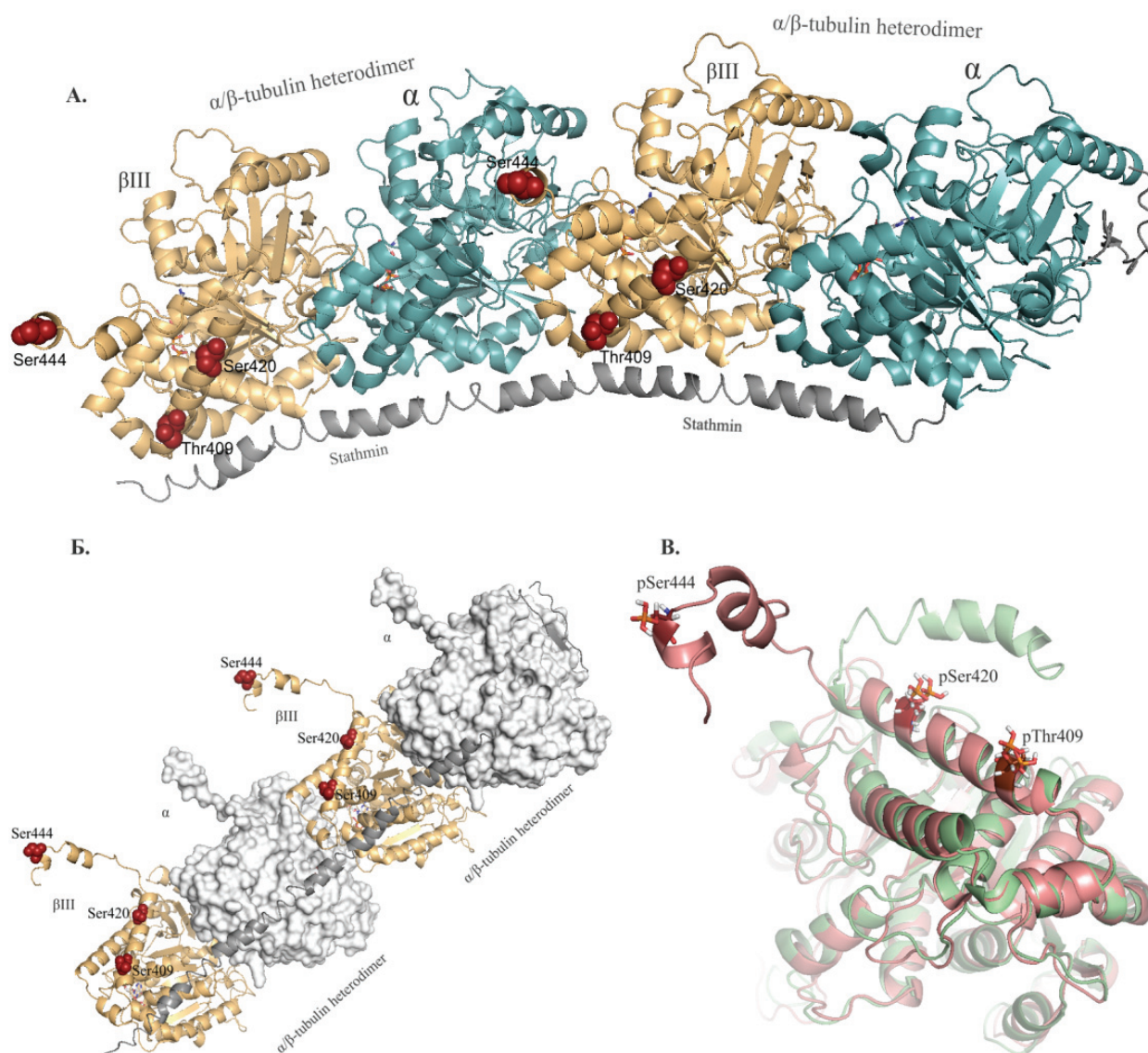


Рис.5.4. Аналіз топології сайтів GRK-специфічного фосфорилування (Thr409, Ser420 і Ser444) β_{III} -тубуліну людини (А і Б) і аналогічних сайтів β -тубуліну (TBB3_ARATH) *A. thaliana* (В): А - Латеральна проекція моделі комплексу протофіламенту. Локалізація експериментально підтверджених сайтів GRK-специфічного фосфорилування β_{III} -тубуліну людини; Б - Внутрішня проекція комплексу; В - Структурне вирівнювання β_{III} -тубуліну людини (рожевий колір) і TBB3_ARATH з *A. thaliana* (зелений колір), що підтверджує ідентичність топології Thr409 і Ser420.

5.3.2. Порівняння структурної топології РК α -специфічного сайту фосфорилування α -тубуліну людини і арабідопсису. Раніше, було експериментально доведено, що протеїнкіназа Ca (РК α) фосфорилує α_6 -тубулін (UniProtKB: TBA1C_HUMAN (Q9BQE3), Tubulin alpha-1C chain = Alpha-tubulin 6) людини за амінокислотним залишком Ser165 [379, 120].

Аналіз консервативності вищезгаданного сайту виконали вирівнюванням відповідних ділянок послідовностей всіх існуючих у *Homo sapiens* і *Arabidopsis thaliana* ізотипів α -тубуліну (рис.5.5). Результати порівняння підтвердили консервативність сайту у всіх ізотипів α -тубуліну як тваринного, так і рослинного походження (рис.5.5).

			pSer165
			▼
>sp	Q9BQE3	TBA1C_HUMAN	155-ERLSVDYGKKS S KLEFSIYPAP-175
>sp	Q71U36	TBA1A_HUMAN	155-ERLSVDYGKKS S KLEFSIYPAP-175
>sp	P68363	TBA1B_HUMAN	155-ERLSVDYGKKS S KLEFSIYPAP-175
>sp	P0DPH7	TBA3C_HUMAN	155-ERLSVDYGKKS S KLEFAIYPAP-175
>sp	P0DPH8	TBA3D_HUMAN	155-ERLSVDYGKKS S KLEFAIYPAP-175
>sp	Q6PEY2	TBA3E_HUMAN	155-ERLSVDYSKKS S KLEFAIYPAP-175
>sp	P68366	TBA4A_HUMAN	155-ERLSVDYGKKS S KLEFSIYPAP-175
>sp	Q9NY65	TBA8_HUMAN	155-ERLSLDYGKKS S KLEFAIYPAP-175
>sp	P11139	TBA1_ARATH	155-ERLSVDFGKKS S KLGF ^T IYPSP-175
>sp	B9DGT7	TBA2_ARATH	155-ERLSVDYGKKS S KLGF ^T VYPSP-175
>sp	Q56WH1	TBA3_ARATH	155-ERLSVDYGKKS S KLGF ^T IYPSP-175
>sp	Q0WV25	TBA4_ARATH	155-ERLSVDYGKKS S KLGF ^T VYPSP-175
>sp	B9DHQ0	TBA5_ARATH	155-ERLSVDYGKKS S KLGF ^T IYPSP-175
>sp	P29511	TBA6_ARATH	155-ERLSVDYGKKS S KLGF ^T VYPSP-175
			*****:*****:*.***.*

Рис.5.5. Результати порівняння фрагментів, які відповідають РК α -специфічному сайту фосфорилування Ser165 у ізотипів α -тубуліну *Homo sapiens* (HUMAN) і *Arabidopsis thaliana* (ARATH). Інвертування позначає контрольну послідовність α_6 -тубуліну (TBA1C_HUMAN, Q9BQE3) з *Homo sapiens*, яку використали як контроль під час порівняння сайтів РК α -специфічного фосфорилування [379, 120].

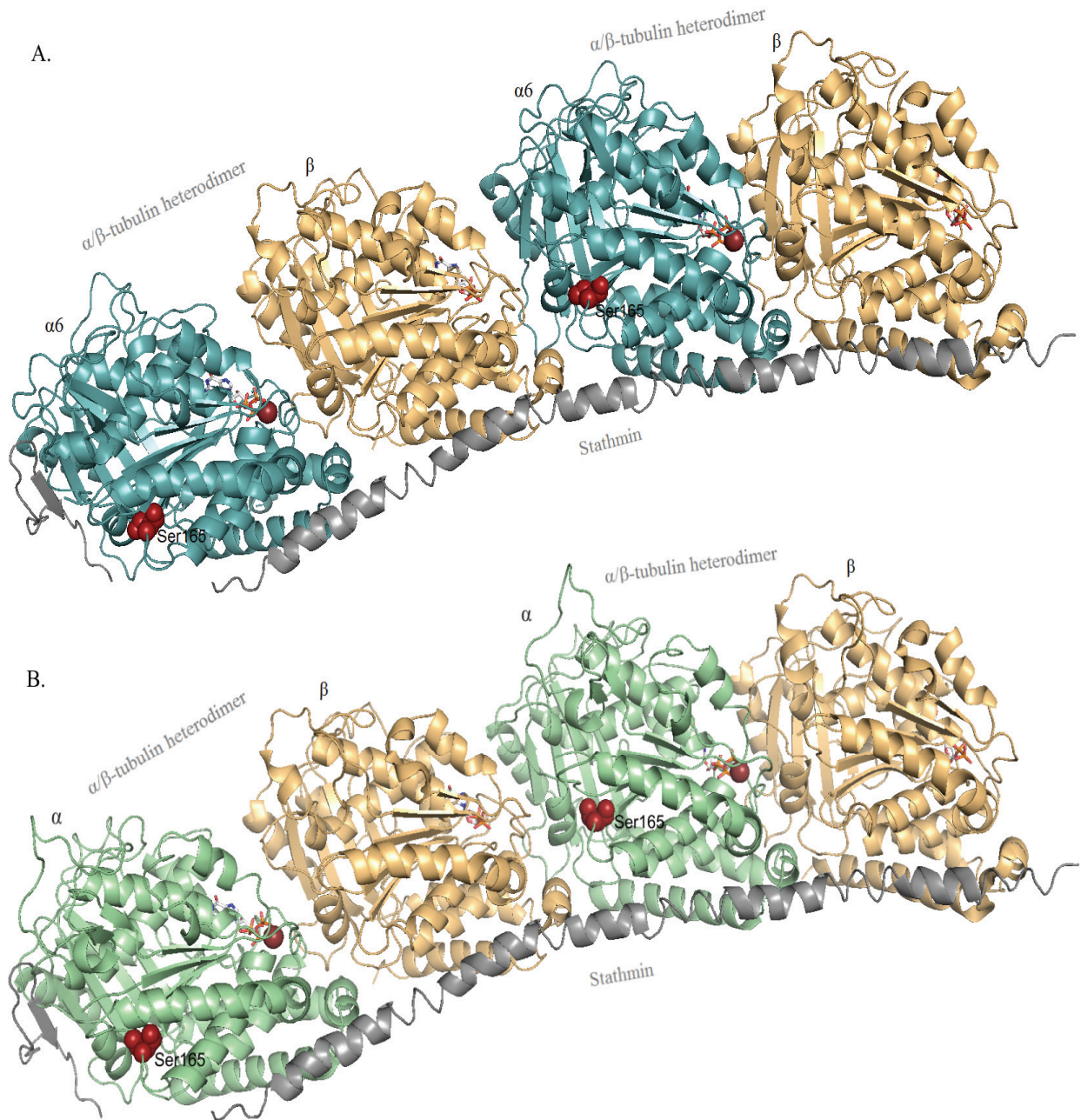


Рис.5.6. Результати реконструкції структурної топології РК α -специфічного сайту фосфорилування амінокислотного залишку Ser165. Підтверджено ідентичність його просторової топології в протофіламентах мікротрубочок людини (A) і арабідопсису (B).

Для визначення просторової топології PKC α -специфічних сайтів фосфорилування було побудовано повноатомні моделі α 6-тубуліну людини (TBA1C_HUMAN, Q9BQE3) і арабідопсису (TBA6_ARATH, P29511). В якості шаблонного комплексу для позиціонування побудованих повноатомних моделей в структуру протофіламенту мікротрубочки, аналогічно попередньому аналізу GRK-специфічних сайтів, було використано химерну PDB-структуру 3DU7 (DOI: 10.2210/pdb3DU7/pdb) з RCSB Protein Data Bank [107]. Позиціонування моделей було виконано в програмі PyMol шляхом структурного вирівнювання просторових координат з молекулами α -тубуліну *B. taurus* комплексу 3DU7 (рис. 5.6)

Візуалізація цільової амінокислоти Ser165 з використанням реконструйованої моделі підтвердила ідентичність топології і, відповідно, потенційного функціонального навантаження на вищезгаданий сайт у людини і арабідопсису. Раніше, на прикладі клітин раку молочної залози людини (лінії MDA-MB-468), було показано, що PKC-специфічне фосфорилування α -тубуліну за Ser165 призводить до збільшення довжини мікротрубочок і підвищення їх рухливості [1]. З огляду на консервативність сайту Ser165, амінокислотного оточення і ідентичної структурної топології, ми вправі очікувати на ідентичний регулюючий ефект і у мікротрубочок вищих рослин.

5.4. Рослинні AGC-кінази KPK1 і KPK2 як функціональні еквіваленти агентів тубулінового коду - тваринних протеїнкіназ GRK і PKC α

Попередні результати спільної кластеризації послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ AGC людини і їх найближчих гомологів з *A. thaliana*, результати Blastp-пошуку, аналізу літератури і структурного аналізу сайтів фосфорилування тубуліну визначили рослинні AGC-кінази

підродини S6K - KPK1(UniProtKB: P42818) і KPK2(UniProtKB: Q39030) як найбільш ймовірних гомологів тваринних протеїнкіназ GRK і PKC α .

Тривалий час вважалось, що зазначені рослинні протеїнкінази мають винятково ядерну локалізацію. Але пізніше була доведена їх наявність і активність в цитоплазмі [208]. Було підтверджено зв'язок протеїнкіназ S6K з відповіддю рослинної клітини на фактори стресу, участь в процесах спонтанної поліплоїдизації клітин, підтриманні хромосомної стабільності, проліферації клітин та інших процесах, тісно пов'язаних з перебудовами системи мікротрубочок [208].

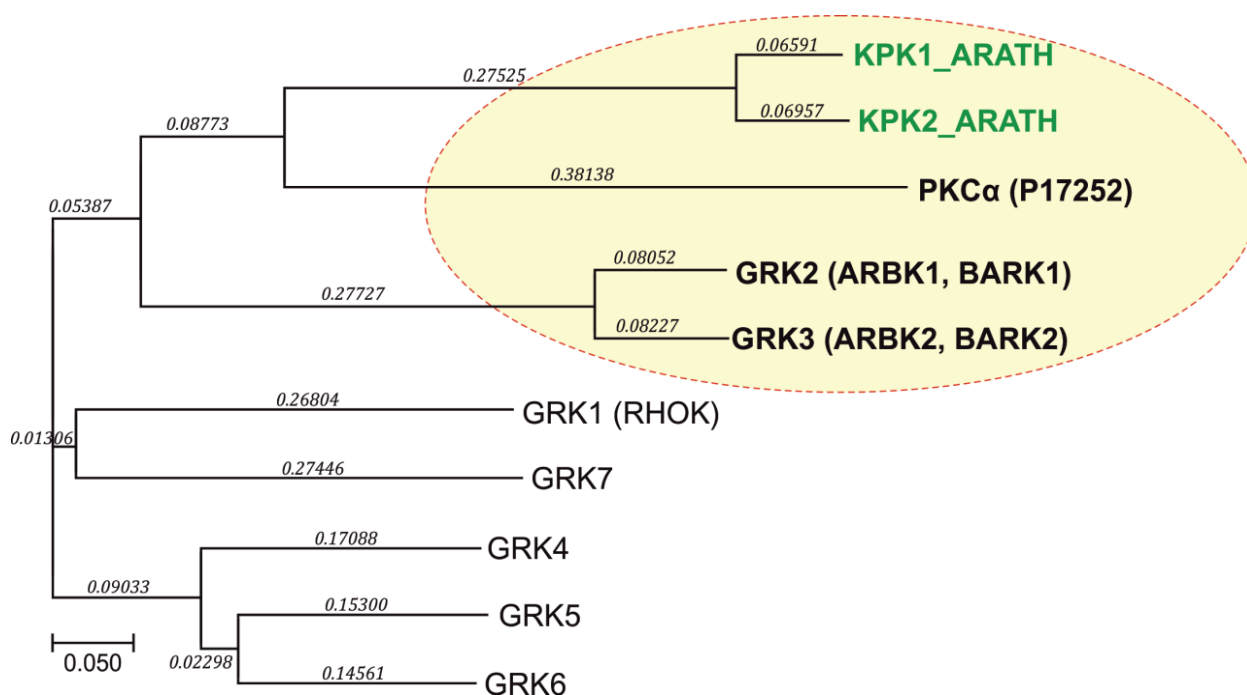


Рис.5.7. Результати спільної кластеризації повних послідовностей рослинних S6K-кіназ (KPK1 і KPK2) з *A. thaliana* і представників тваринних протеїнкіназ родин GPRK і PKC, здатних до безпосереднього фосфорилування тубуліну.

Додаткова NJ-кластеризація повних амінокислотних послідовностей КРК1 і КРК2 з *A. thaliana* та групи протеїнкіназ людини, яка включала РКСа і всі ізотипи протеїнкіназ GRK (1-7), підтвердила формування спільної клади, що об'єднала обидві рослинні S6K-кінази і тваринні протеїнкінази РКСа, GRK2 і GRK3 (рис.5.7.).

Функціональна подібність білків в значній мірі детермінується їх структурою [79]. Остаточне підтвердження функціональної гомології рослинних S6K-кіназ, тваринних РКСа і GRK-кіназ, вимагало порівняння їх структур.

Для запобігання можливої помилки, було виконано додаткову кластеризацію вищезазначених тваринних протеїнкіназ і повного кіному *A. thaliana* з виключенням двох раніше відібраних лідерів - КРК1 и КРК2. Така кластеризація дозволила відібрати ще трьох додаткових лідерів, які утворювали спільну кладу з контрольною групою AGC-кіназ людини: F21M11.15 (At1g03920, UniProtKB: Q9ZWB2), MLW24.2 (At3g23310, UniProtKB: Q9LW66) і AtNdr1 (At5g09890, UniProtKB: Q93V54) (рис.5.8). Для коректності висновків, вищезгадані протеїнкінази було включено до наступної роботи з реконструкції просторової структури рослинних гомологів і їх порівняння з експериментальними структурами тваринних протеїнкіназ з RCSB Protein Data Bank. Слід зазначити, що всі три згадані рослинні протеїнкінази належать до групи AGC-кіназ, що, зокрема, підтверджується наявністю характерної пролонгації їх каталітичних доменів (рис.5.9). Однак наразі всі вони мають не анований статус ('Unreviewed') і депоновані в UniProtKB як протеїнкінази з досі невідомою функцією. Їх належність до групи AGC-кіназ також підтверджується даними первинної анотації.

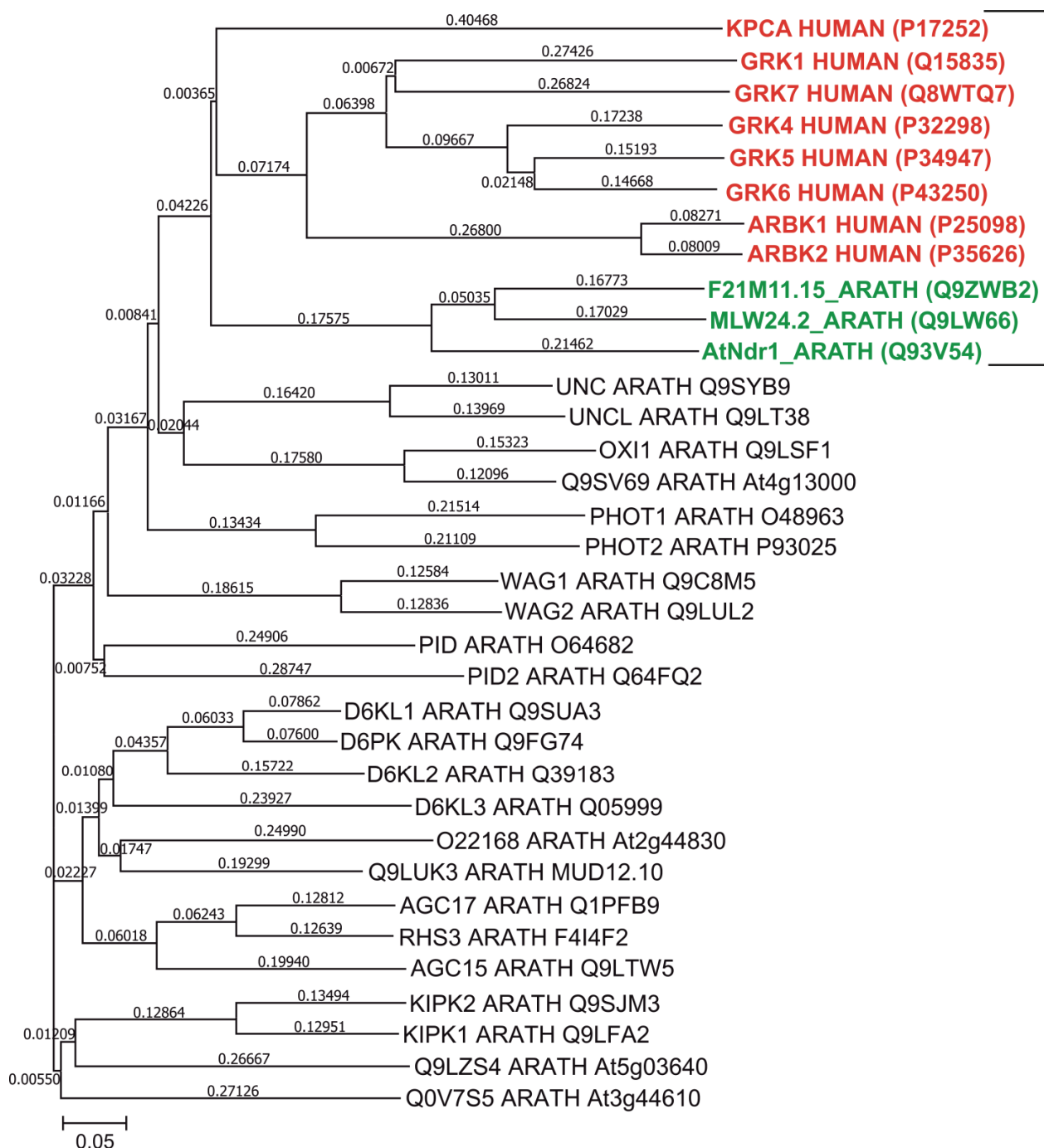


Рис.5.8. Результати спільної кластеризації неповного кіному *A. thaliana* (без протеїнкіназ КРК1 і КРК2), і представників тваринних протеїнкіназ родин GPRK і РКCa, здатних до безпосереднього фосфорилювання тубуліну.

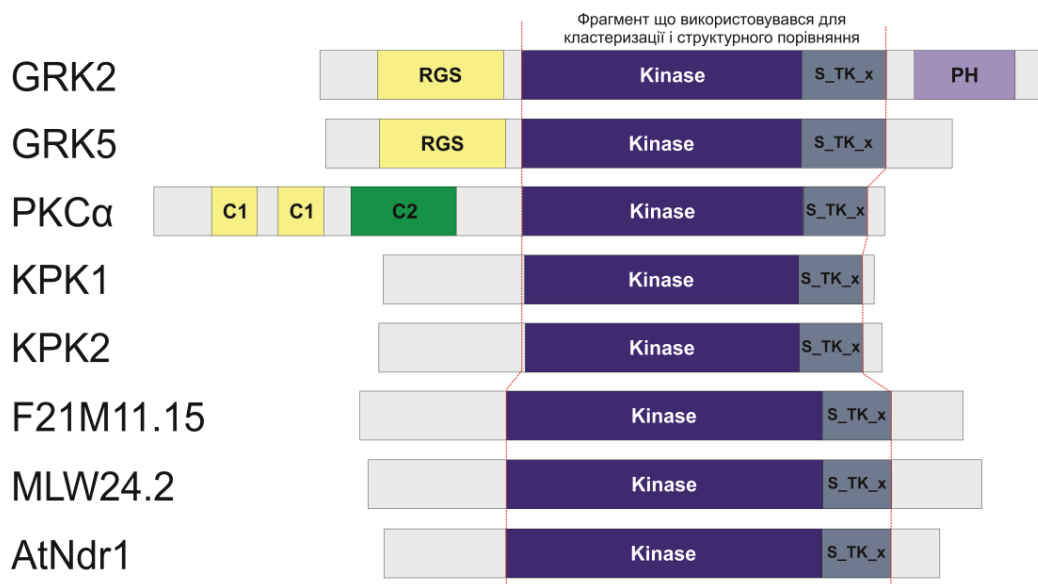


Рис.5.9. Профілі доменної організації AGC-кіназ людини (GRK2, GRK5 і PKCα) і їх гомологів з *A. thaliana* (KPK1, KPK2, F21M11.15, MLW24.2 і AtNdr1), які продемонстрували найбільшу подібність амінокислотних послідовностей і були відібрані для подальшого структурного порівняння з вищезгаданими тваринними протеїнкіназами.

Примітка: Kinase - кіназний домен; S_TK_x - характерна для AGC-кіназ пролонгація кіназного домену; RGS - регулятор сигнального домену G білку; PH - домен плейкстринової гомології; C1 - цинк-зв'язуючий домен C1; C2 - кальцій-зв'язуючий домен C2. Червоним пунктиром позначено межі каталітичних фрагментів Kinase + S_TK_x, притаманні протеїнкіназам родини AGC.

Оскільки за основу в нашому дослідженні обрано було протеїнкінази людини, для яких існують беззаперечні докази участі у фосфорилуванні тубуліну, основними еталонами при структурному порівнянні моделей рослинних гомологів були PDB-структури GRK-кіназ (GRK2 (βARK) і GRK5) [83], протеїнкінази Ca (PKCα) [379, 120]. Використовували наступні експериментально підтверджені структури з Protein Data Bank: 5UKL (x-Ray,

2.15 Å) [573] для GRK2, 4TNB (x-Ray, 2.113 Å) [309] для GRK5 і 3IW4 (x-Ray, 2.8 Å) [572] для РКСа.

Реконструкція 3D-структур рослинних гомологів була виконана із застосуванням мережевого інструменту I-Tasser. Побудовані моделі пройшли додаткову оптимізацію із застосуванням силового поля OPLS-AA. Подальше порівняння експериментально-доведених структур (GRK2, GRK5 і РКСа) АГС-кіназ людини і моделей рослинних гомологів було виконано в програмі PyMOL. Критерієм структурної подібності був показник середньоквадратичного відхилення координат С α -атомів (RMS).

Порівняння показників RMS підтвердило, що рослинні протеїнкінази F21M11.15, MLW24.2 і AtNdr1 явно поступаються раніше відібраним лідерам КРК1 і КРК2 за подібністю до еталонних PDB-структур тваринного походження. Максимальний збіг просторових координат було виявлено при порівнянні КРК1 і КРК2 з тваринною протеїнкіназою GRK5 (RMS = 0.567 і 0.487, відповідно) (табл. 5.2, рис.5.10).

Можемо відзначати консервативність більшої частини сайтів, асоційованих з активністю протеїнкіназ родин GPRK, РКС і їх рослинних гомологів у ссавців і вищих рослин. Зокрема, така консервативність спостерігається у GRK-асоційованих сайтів Thr409 і Ser420 фосфорилування тваринного і рослинного β -тубуліну. При цьому, унікальний для тваринного тубуліна β III (TBV3, β III-tubulin) - Ser444, [83, 613] третій з експериментально доведених сайтів GRK-специфічного фосфорилування у вищих рослин відсутній. У тварин цей сайт пов'язують з регулюванням взаємодії мікротрубочок з БАМ [238, 378]. Це логічно погоджується із значними відмінностями у складному спектрі БАМ тварин і вищих рослин.

Таблиця 5.2

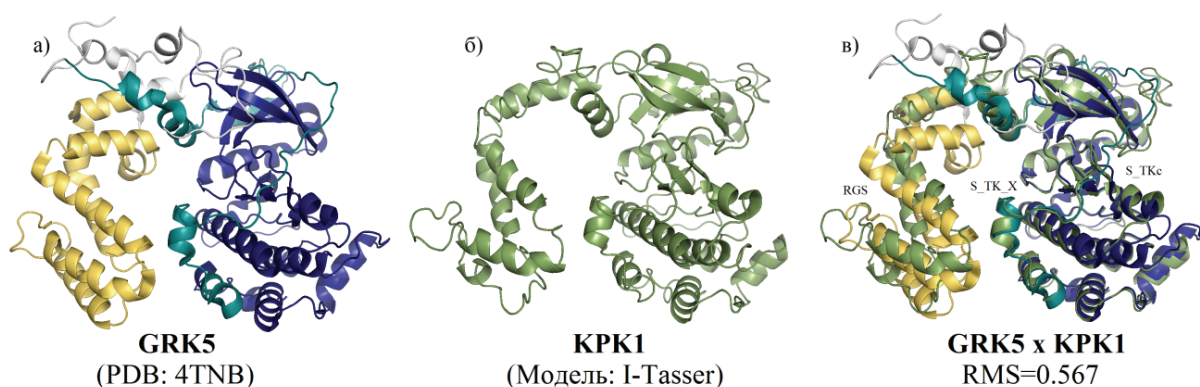
Показники середньоквадратичного відхилення, структурних моделей найближчих рослинних гомологів і експериментально-доведених структур AGC-кіназ людини, для яких підтверджена участь у фосфорилюванні молекул α - і β -тубуліну

	GRK2 (PDB: 5UKL)	GRK5 (PDB: 4TNB)	PKCα (PDB: 3IW4)
KPK1 (At3g08730)	RMS=1.319	RMS=0.567	RMS=1.434
KPK2 (At3g08720)	RMS=1.333	RMS=0.487	RMS=1.352
F21M11.15 (At1g03920)	RMS=2.451	RMS=2.342	RMS=1.910
MLW24.2 (At3g23310)	RMS=2.381	RMS=2.184	RMS=2.404
AtNdr1 (At5g09890)	RMS=2.075	RMS=2.288	RMS=2.186

Таким чином, відмінності у складі асоційованих білків у рослин і тварин можна розглядати як третій важливий фактор функціональної спеціалізації мікротрубочок, який обумовлює їх спеціалізацію нарівні з вкладом експресії різних ізотипів тубуліну і посттрансляційних модифікацій [456]. Слід зазначити, що в положенні, топологічно ідентичному Ser444 тубуліна β III, у чотирьох ізотипів β -тубуліну з *A. thaliana* присутня заміна амінокислотного залишку серину на тирозин (ТВВ1/Tyr445, ТВВ2/Tyr444, ТВВ3/Tyr444 і ТВВ7/Tyr443) (рис.5.3). Відповідність цього сайту профілю тирозин-специфічного фосфорилювання підтвердив аналіз із застосуванням

інструменту GPS 3.0 і максимальні показники оціночних функцій програми (Score = 15, 12-25, 7, 9, 8). Однак, у зв'язку з відсутністю у рослин канонічних тирозин-специфічних протеїнкіназ, фосфорилування амінокислотних залишків тирозину залишається найбільш дискусійним питанням посттрансляційних перетворень рослинних білків [59].

1. КПК1 (АТПК1) - Serine/threonine-protein kinase AtPK1/AtPK6



2. КПК2 (АТПК2) - Serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19

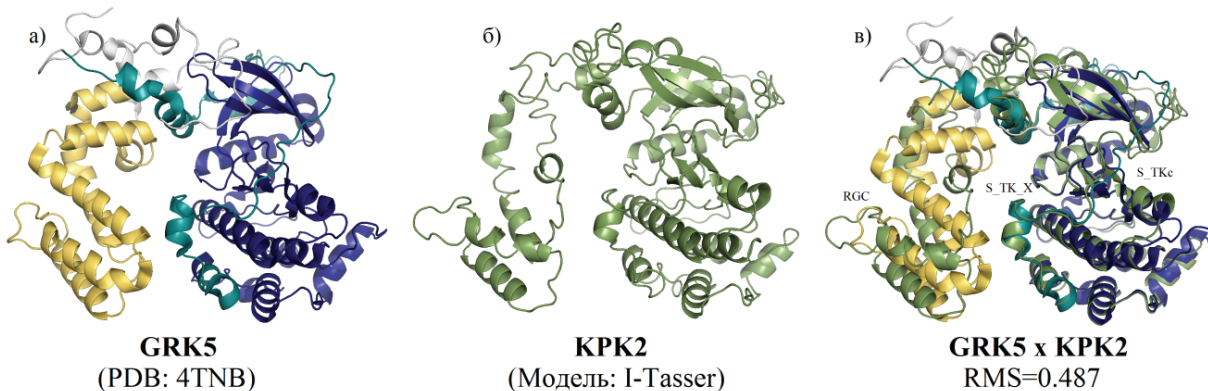


Рис.5.10. Структурне порівняння (1.в і 2.в) рослинних протеїнкіназ КПК1 (1.б) і КПК2 (2.б) з *A. thaliana* і протеїнкінази GRK5 (1.а і 2.а) людини.

Примітка: Блакитним кольором показано фрагмент кіназного домену. Синім кольором позначена ділянка характерної для АGC-кіназ пролонгації каталітичного домену. Жовтий колір вказує область регуляторного домену RGS. Зеленим кольором показано структури рослинних гомологів протеїнкінази КПК1 (1.б) і КПК2 (2.б).

Незаперечним є факт, що тирозин-специфічне фосфорилування тубуліну у рослин має місце [57, 502]. Нещодавно було показано, що фосфорилування тубуліну рослин за тирозином може здійснюватися кальцій-залежними протеїнкіназами CRK (CDPK / CPK-related PKs) [407]. Було експериментально доведено, що посттрансляційна регуляція рослинного тубуліну через модифікацію вищезгаданого сайту може здійснюватися за рахунок нітрування тирозину (3-NO₂-Tyr) [61, 25]. У рослин така модифікація модулює взаємодію мікротрубочки з асоційованими білками [57, 61]. Незважаючи на відмінності в типах модифікацій у тварин і рослин, концептуально, функціональна роль цього сайту в регуляції взаємодії мікротрубочки і асоційованих білків, ймовірно, зберігається.

Рослинні протеїнкінази, які виступають в ролі агентів модифікацій сайтів еквівалентних Thr409 і Ser420 β -тубуліну, Ser165 α -тубуліну тварин, без сумніву, протеїнкінази KPK1 і KPK2 є найбільш ймовірними кандидатами на цю роль. Це підтверджується як схожістю на рівні амінокислотних послідовностей і 3D-структур з протеїнкіназами GPRK і PKC, так і згаданими раніше опосередкованими даними відносно їх участі в регуляції внутрішньоклітинних процесів, пов'язаними із модуляціями структури і динаміки тубулінового цитоскелету: відповідь на стрес, поліплоїдизація клітин, підтримка хромосомної стабільності, проліферація клітин і та ін. [208]. Таким чином, отримані дані вказують на нову, раніше невідому, функцію рослинних AGC-кіназ підродина S6K (KPK1 і KPK2) як агентів тубулінового коду.

5.5. Участь MAST/IREN-подібних протеїнкіназ в регуляції тубулінового цитоскелету і їх вклад в тубуліновий код

5.5.1. Біоінформатичний пошук рослинних гомологів MAST-подібних серин-треонин специфічних протеїнкіназ

Як зазначалось раніше, каталітичний домен слугує найбільш консервативною і обов'язковою частиною каталітичних субодиниць всіх відомих протеїнкіназ [305, 169]. У AGC-подібних протеїнкіназ канонічний каталітичний домен має певну пролонгацію у вигляді додаткового S_TK_x домену. Така структурна особливість у вигляді S_TKc+S_TK_x комплексу також характерна риса всіх тваринних протеїнкіназ MAST [169]. BLAST-сканування бази даних UniProtKB [552] проти амінокислотної послідовності каталітичного комплексу (S_TKc + S_TK_x) протеїнкінази MAST2 з *Homo sapiens* дозволила відібрати на початку дослідження 34 потенційних рослинних гомолога: 5 з *Vitis vinifera* (A7PHB5; A7QWR7; A7NTE9; A7NXD3; A5BWH0), 7 з *Arabidopsis thaliana* (Q9LE81; Q94F38; Q9MB45; Q9LVI5; Q8GZ40; Q9LP76; Q9MAJ4), 6 з *Oriza sativa* ssp. japonica (Q9AUR3; Q10E10; B9FB59; Q2QM12; B9GEC7; Q10E09), 2 з *O. sativa* ssp. indica (A2XLA4; B8BN29), 1 з *Medicago truncatula* (Q32YB5), 4 з *Physcomitrella patens* ssp. patens (A9TWY7; A9TUB0; A9TQ65; A9T694), 5 з *Populus balsamifera* ssp. trichocarpa (B9I4L4; B9I2C4; B9IEF3; B9HKN3; B9GRP0), 1 з *Zea mays* L. (C0PG45) і 3 із *Ricinus communis* L. (B9T5A7; B9R7R7; B9R9Q3) (табл. 5.3). Усі виявлені білки були депоновані у не анотованій базі даних трансльованих послідовностей TrEMBL (зараз не анотована частина UniProtKB) і значились як білки з ще невідомою функцією, потенційні серин / треонінові протеїнкінази або потенційні протеїнкінази родин AGC і IRE (табл. 5.3).

Аналіз доменної архітектури за допомогою інструменту SMART підтвердив наявність властивого для протеїнкіназ AGC додаткового домену S_TK_x (InterPro: SM00133 S_TK_x) [197] у 17 з знайдених білків: A7PHB5, A7NTE9, A7NXD3, A5BWH0 (*V. vinifera*); Q9MB45, Q9LVI5, Q94F38, Q8GZ40 (*A. thaliana*); A9TQ65, A9TUB0, A9T694 (*P. patens* ssp. *patens*); B9I2C4, B9IEF3, B9HKN3, B9GRP0 (*P. balsamifera* ssp. *trichocarpa*); B9T5A7, B9R7R7 (*R. communis*). Результати аналізу послідовностей решти рослинних гомологів теж показали наявність ознак S_TK_x доменів, ідентифікованих на підставі подібності амінокислотних послідовностей і наявності мотивів, притаманних домену S_TK_x [197, 275]. Результати вирівнювання амінокислотних послідовностей каталітичного комплексу S_TKc + S_TK_x протеїнкінази MAST2 людини і знайдених рослинних гомологів, дані звіту BLASTр-сканування показали, що найближчими рослинними гомологами MAST2 людини є білки невідомої функції з *V. vinifera* (A7PHB5) і *P. balsamifera* ssp. *trichocarpa* (B9I4L4) (рис. 5.11).

Максимальну подібність консенсусних ділянок каталітичних доменів еталонної послідовності і рослинного гомолога спостерігали у білка з невідомою функцією A7PHB5 з *V. vinifera* (ідентичність – 48 %, при 67 %-ної подібності) (табл. 5.3, рис. 5.12). Значний рівень подібності первинних послідовностей каталітичних доменів гомолога з винограду і протеїнкінази MAST2 людини визначив A7PHB5 як оптимального кандидата для подальшої реконструкції просторової структури за гомологією.

Зважаючи на відсутність експериментальних структурних даних для протеїнкінази MAST2 людини і її рослинного гомолога A7PHB5 (GMLK (Grape MAST2-Like Kinase)), наступну реконструкцію каталітичного домену було виконано за методом гомологічного моделювання. В обох випадках, найкращим шаблоном первинної згортки було визначено структуру каталітичного домену цАМФ-залежної протеїнкінази з *Sus scrofa* (RCSB Protein Data Bank: 1CDK, UniProtKB - P36887, KAPCA_PIG) [65, 275].

Результати пошуку рослинних гомологів протеїнкінази MAST2, яка приймає участь у процесах фосфорилування білків мікротрубочок та регуляції поділу клітин ссавців

UniProt	Актуальна офіційна назва	Вид	Довжина консенсусу (а.к.)	Вага вирівнювання	E-value	Ідентичність (%)	Подібність (%)	Гепи (%)	Ген/кодуюча послідовність
A7PHB5	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	1246	306	2e-81	48	67	0	GSVIVT00017880001
B914L4	Serine/threonine-protein kinase**	<i>P. trichocarpa</i>	1055	305	4e-81	49	65	5	POPTRDRAFT_806679
Q9LE81	IRE Serine/threonine-protein kinase**	<i>A. thaliana</i>	1168	303	1e-80	48	65	5	IRE OR A15g2310
A7QWR7	AGC protein kinase**	<i>V. vinifera</i>	1161	303	1e-80	49	65	4	GSVIVT00008775001
B912C4	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	1322	301	7e-80	46	63	4	POPTRDRAFT_806321
Q9AUR3	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	1274	299	2e-79	47	63	5	OSINBb0033N16.3
Q10E10	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	1267	299	2e-79	47	63	5	Os03g0711800
B9FB59	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	1274	299	2e-79	47	63	5	OsJ_12320
A2XLA4	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. indica</i>	1090	299	2e-79	47	63	5	OsI_13249
Q32YB5	Nodule-specific IRE-like*	<i>M. truncatula</i>	1168	299	3e-79	48	65	6	MURE
C0PG45	Putative uncharacterized protein*	<i>Z. mays</i>	657	299	3e-79	47	64	5	ZM_BFb0371B12
Q2QM12	IRE S_TKc protein kinase**	<i>O. sativa ssp. japonica</i>	1021	298	6e-79	48	64	4	Os12g0621500
B8BN29	AGC protein kinase*	<i>O. sativa ssp. indica</i>	1022	298	6e-79	48	64	4	OsI_39164
B915A7	AGC protein kinase*	<i>R. communis</i>	1289	296	1e-78	46	63	4	RCOM_0054220
Q94F38	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	939	296	2e-78	48	64	3	At1g48490/TIN15_9
B9GEC7	AGC protein kinase*	<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	1004	296	2e-78	48	63	4	OsJ_36911
Q9MB45	IRE homolog I**	<i>A. thaliana</i>	1023	295	3e-78	47	66	4	IREH1
Q9LV15	IRE homolog; protein kinase-like**	<i>A. thaliana</i>	1398	295	3e-78	47	66	4	MEB5.7
B9R7R7	AGC protein kinase*	<i>R. communis</i>	1106	295	5e-78	46	64	3	RCOM_1593890
B9IEF3	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	1319	295	5e-78	46	62	4	POPTRDRAFT_824614
B9R9Q3	S_TKc-protein kinase**	<i>R. communis</i>	1211	293	1e-77	46	64	5	RCOM_1499970
Q8GZ40	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	1296	292	3e-77	46	65	4	At3g17850/MEB5_7
A7NTE9	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	423	290	2e-76	46	63	4	GSVIVT00014640001
A91WY7	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	1015	282	2e-74	43	60	6	PHYPADRAFT_152077
A9TUB0	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	1073	281	4e-74	44	60	5	PHYPADRAFT_150879
A9TQ65	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	1051	281	4e-74	45	62	5	PHYPADRAFT_148894
A9T694	AGC protein kinase*	<i>P. patens ssp. patens</i>	1008	281	4e-74	44	60	6	PHYPADRAFT_140919
Q10E09	AGC protein kinase*	<i>Oryza sativa ssp. japonica</i>	685	276	1e-72	44	61	8	LOC_Os03g50390
Q9LP76	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	1294	271	4e-71	43	58	13	TIN15.10
Q9MAJ4	AGC protein kinase*	<i>A. thaliana</i>	1092	270	1e-70	44	59	10	F27F5.23
B9HKH3	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	551	242	3e-62	39	57	8	POPTRDRAFT_766459
B9GRP0	AGC protein kinase*	<i>P. trichocarpa</i>	561	240	1e-61	39	57	9	POPTRDRAFT_754158
A7NXD3	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	550	238	5e-61	39	56	9	GSVIVT00020285001
A5BWH0	AGC protein kinase*	<i>V. vinifera</i>	550	238	5e-61	39	56	9	VITISV_001730

Примітка: згідно даним InterPro (*) або UniProtKB/TrEMBL(**)

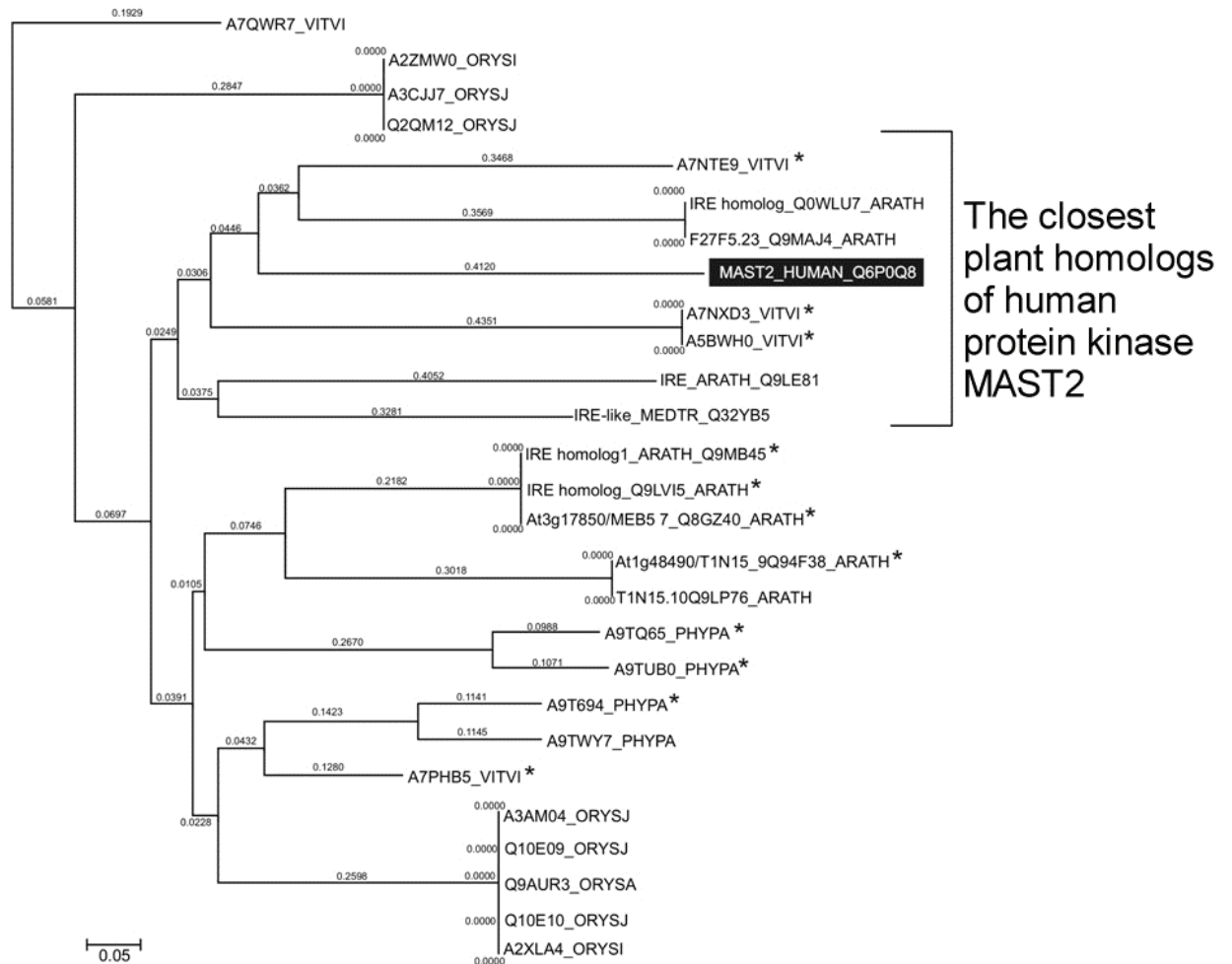


Рис.5.12. Результати спільної NJ-кластеризації протеїнкінази MAST2 з *Homo sapiens* і її рослинних гомологів, відібраних на підставі подібності каталітичних доменів.

* – рослинні гомологи з S_TK_X доменом, який є характерною рисою тваринних протеїнкіназ AGC і зокрема, MAST.

Рівень ідентичності послідовностей каталітичних доменів шаблону (1CDK) і рослинної GMLK (A7PHB5) складав 40.9 % при 66,8 % рівні подібності, що було достатнім для прогнозування тривимірної структури за гомологією [316]. Цікаво, що, не зважаючи на наявність розбіжностей у доменній архітектурі матриці і цільового білку (наявність у каталітичному домені рослинного гомологу додаткової петлі в 15 амінокислот), загальна будова обох каталітичних доменів співпадала.

Подальше структурне порівняння засвідчило, що тотальна розбіжність просторових структур каталітичних доменів між побудованими моделями складала 1,63 Å. Найбільш варіабельними ділянками структурної моделі GMLK були області петель, які відповідали фрагментам Ser999 - Arg1017 і Pro1083 - Pro1085 амінокислотної послідовності шаблонної структури цАМФ-залежної протеїнкінази *Sus scrofa* (P36887; pdb: 1CDK). Певна варіабельність також спостерігалась у ділянці залишку Asp988 (відповідає Asp1777 у 1CDK) і, що найцікавіше, в області Arg862 - Ala864 (Тре-51 – Ser53 у 1CDK), яка належить фрагменту нуклеотид-зв'язувальної петлі. Втім, останнє було цілком очікуваним, враховуючи заміну Thr51 / Arg862 на початку нуклеотид-зв'язуючої петлі і її потенційний вплив на структуру. Водночас, була підтверджена консервативність додаткового залишку Lys883 (Lys72 у 1CDK), який належить до АТФ-зв'язуючого і активного (акцептор протонів) центру – Asp977 (відповідає Asp166 у 1CDK). У GMLK був відсутній залишок треоніну, який у Tre197 1CDK може зазнавати модифікації. Проте слід зазначити, що тваринна протеїнкіназа MAST2 не мала цього залишку, а інші відомі сайти модифікацій знаходяться за межами каталітичних доменів і не здатні впливати на кіназну активність (рис. 5.13) [275].

Згодом, у зв'язку з появою в RCSB Protein Data Bank нових даних кристалографії, стало можливим виконати більш акуратне моделювання 3D-структур каталітичних доменів MAST-подібних протеїнкіназ. Була виконана реконструкція каталітичних доменів протеїнкіназ MAST2 людини, миші, рослинної GMLK з *Vitis vinifera* [103, 275]. Моделювання виконувалось із застосуванням інструменту I-Tasser, який використовує алгоритм первинної згортки, заснований на застосуванні множинних шаблонних структур [604]. Так, для рослинної GMLK були використані PDB-структури: 3d0e (2.00 Å), 2jed (2.32 Å), 4q9z (2.60 Å), 3pfq (4.00 Å), 3d0e (2.00 Å), 4aw2 (1.70 Å), 3wf7 (1.85 Å), 3d0e (2.00 Å) і 4dc2 (2.40 Å). При реконструкції структури каталітичних доменів MAST2 людини і миші було використано структури

3d0e (2.00 Å), 2jed (2.32 Å), 4q9z (2.60 Å), 3pfq (4.00 Å), 4gv1 (1.49 Å) і 4dc2 (2.40 Å).

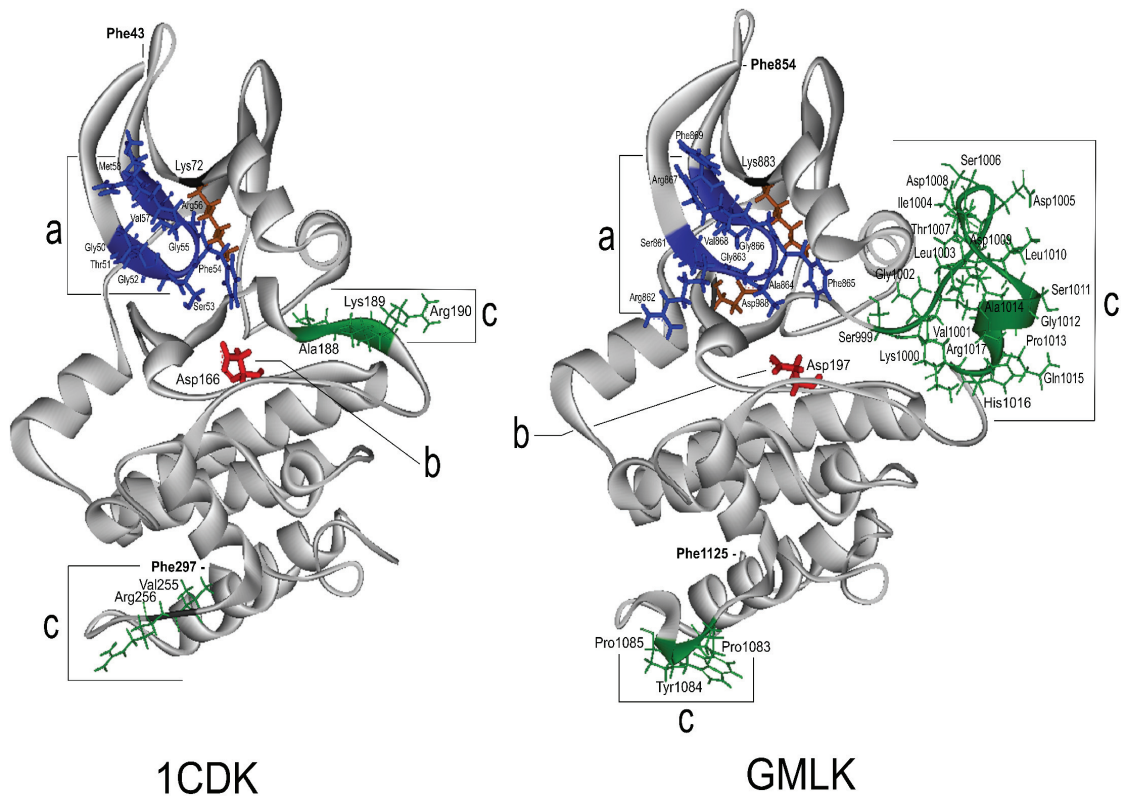


Рис. 5.13. Просторова структура каталітичних доменів цАМФ-залежної протеїнкінази із *Sus scrofa* (pdb: 1CDK) та її рослинного гомолога GMLK (Grape MAST2-Like Kinase) із *Vitis vinifera*: **a** - ділянка зв'язування АТФ (NP_BIND ATP), **b** - ключова амінокислота активного сайту, **c** - варіабельна ділянка.

Після релаксації сольватованих моделей методом швидкої молекулярної динаміки (GROMACS 4.5.3, час - 1 нс, силове поле - G53аб) виконали повторне структурне вирівнювання. Показник середньоквадратичного відхилення (RMS/RMSD) за результатами структурного накладання координат каталітичних доменів MAST2 людини і GMLK винограду склав 1,256 (рис.5.14). Зазвичай, $RMSD \leq 1$ є характерною ознакою ідентичних або фактично ідентичних структур [319]. Це дозволяє стверджувати, що 3D-структури каталітичних доменів MAST2 і GMLK, хоча і проявляють значну подібність, не позбавлені індивідуальних особливостей.

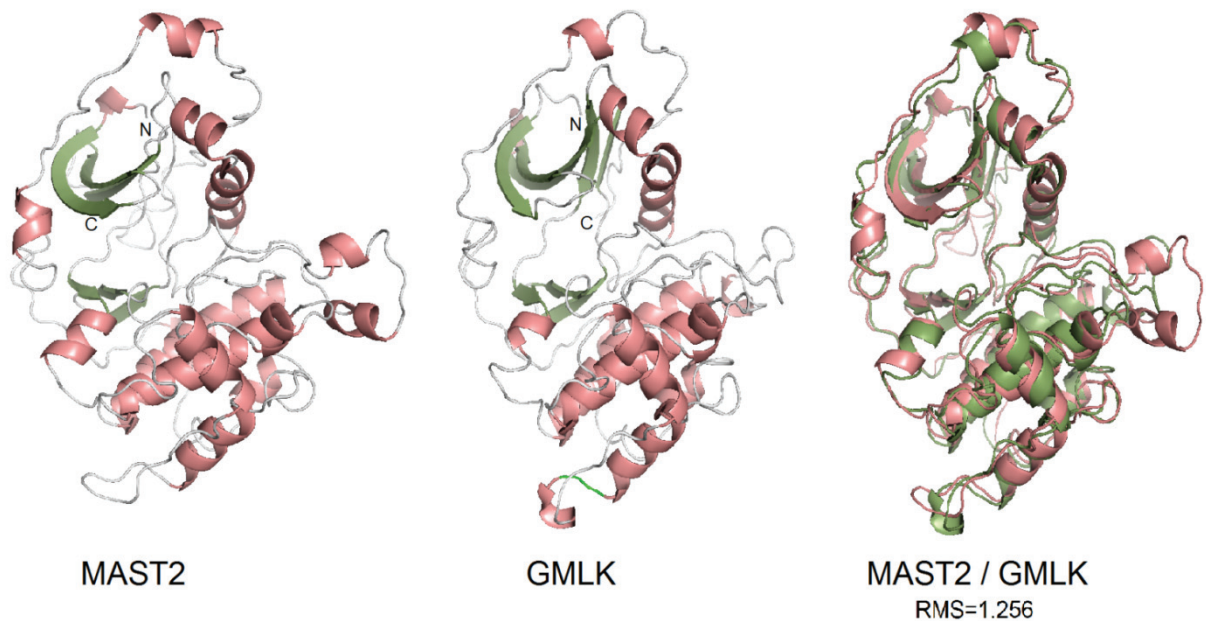


Рис.5.14. Порівняння структурних моделей каталітичних доменів MAST2 людини і GMLK винограду. N – початок (N-end), C – закінчення (C-end) ланцюга.

Таким чином, біоінформатичне і структурно-біологічне дослідження засвідчили значну ймовірність існування функціональної гомології тваринної протеїнкінази MAST2 і рослинної GMLK. Незважаючи на певні відмінності доменної організації та потенційних розбіжностей структур каталітичних доменів, гомолог з винограду (GMLK) виявляв найбільшу подібність до канонічного представника тваринних MAST, зокрема, до MAST2 людини. Тому саме ця протеїнкіназа була обрана для подальшого експериментального дослідження ролі рослинних гомологів в регуляції цитоскелету [632].

5.6. Клонування кДНК, що кодує каталітичний домен рослинної MAST2-подібної протеїнкінази GMLK з *Vitis vinifera*, та її експресія в тваринних клітинах

5.6.1. Клонування кДНК каталітичного домену протеїнкінази GMLK. Як первинне джерело РНК для клонування кДНК каталітичного домену рослинної GMLK (A7NTE9_VITVI) було використано листя

винограду сорту «Піно-нуар» (*Vitis vinifera* 'Pinot Noir'). Вибір сорту був обумовлений тим, що саме сорт «Піно-нуар» є донором ДНК для проекту Геном винограду (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Vitis_vinifera/101/) і саме цьому сорту належить депонований в UniProtKB білок A7NTE9_VITVI [562]. Автентичний рослинний матеріал було отримано з селекційної колекції Національного виробничо-аграрного об'єднання «Масандра», АРК Крим, Україна.

Наступний протокол дослідження передбачав створення бібліотеки кДНК, ампліфікацію специфічної кДНК за методом ПЛР і клонування отриманої послідовності, яка кодує каталітичний фрагмент GMLK в стандартному векторі експресії для тваринних клітин. Подальше завдання полягало в трансфекції тваринних клітин вищезазначеним ксенологічним конструктом, підтвердженні біосинтезу цільового продукту, оцінці цитотоксичності і внутрішньоклітинної динаміки в умовах чужорідної модельної системи.

Спроба отримати РНК з листів винограду за допомогою RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) виявилася невдалою, що підтверджувалося незначною кількістю РНК (менше 5 нг/мкл), і відсутністю диференціації рРНК під час електрофорезу. Слід зазначити, що у зразків тканин винограду аналогічний негативний результат був отриманий іншими вченими, які використовували стандартний кіт RNeasy Plant Mini Kit [396, 161]. Нами було прийнято рішення апелювати до альтернативних протоколів отримання РНК, зокрема, до модифікованого методу Moser et al. (2004) [396]. Зазначений протокол дав можливість отримати приблизно 10 мкг (в перерахунку на 400 мг рослинної сировини) очищеної від домішок РНК. Отримана РНК мала задовільну якість, незважаючи на наявність ознак початку деградації 25S рРНК (рис.5.15).

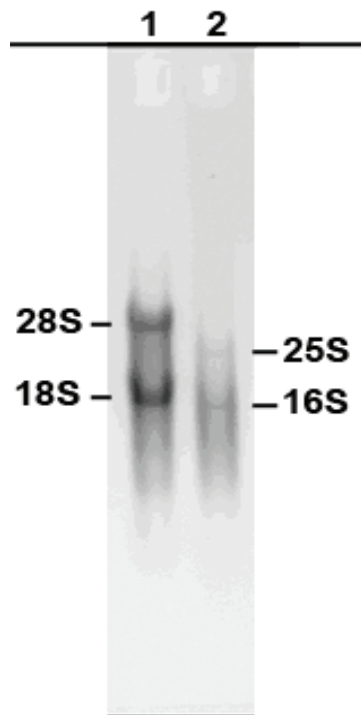


Рис.5.15. Електрофорез рибосомальної РНК з винограду. Електрофорез в 1% агарозному гелі з додаванням до буферного розчину (ТВЕ-буфер: Трис-ацетат-ЕДТА) 0,5 мкг/мл бромистого етидія: 1) тотальна РНК клітин асцитної карциноми Кребс ІІ (3 мкг), 2) тотальна РНК з листка винограду (1 мкг).

Позначення на малюнку відповідають рибосомальної РНК.

Отриманий препарат РНК став основою для створення бібліотеки кДНК шляхом реакції із зворотною транскриптазою SuperScript, яка продемонструвала найкращі результати у випадку цього рослинного об'єкту. Ця бібліотека кДНК стала початком для отримання повної послідовності специфічної кДНК.

Після проведення першого раунду ПЛР (40 циклів з першою парою праймерів) отриманий продукт мав помітну гетерогенність. Застосування альтернативної (другої) пари праймерів показало значно кращий результат. Напрацювання ПЛР-продукту було візуально помітно (дані електрофорезу) вже після 30 додаткових циклів ПЛР. Контрольний електрофорез в агарозному гелі довів якість напрацьованого ПЛР-продукту, який утворював диференційовану смугу. Результати секвенування ПЛР-продукту підтвердили

його однорідність і відповідність цільовому фрагменту GMLK винограду. Після вбудовування у вектор було здійснено повне секвенування вставки по обох ланцюгах ДНК. Результати секвенування підтвердили коректність вставки кДНК в вектор. Була підтверджена наявність повнофункціональної відкритої рамки зчитування, яка охоплювала всю довжину вставки і закінчувалась канонічним стоп-кодоном ТТА.

А

MAST2HP	1	MSTPLHPLHKERTSIDDFEIIKPISRGAFGKVF LARKRTTGDLFAIKVLK KLD MIRKNDI	60
GMLK	1	MSTPLHPLHKERTSIDDFEIIKPISRGAFGKVF LARKRTTGDLFAIKVLK KLD MIRKNDI	60
MAST2HP	61	ERILAERNILITVRNPFVVRFFYSFTCRDNVYLVMEYLN GGDLYSLLRKLSCLEEDVARI	120
GMLK	61	ERILAERNILITVRNPFVVRFFYSFTCRDNVYLVMEYLN GGDLYSLLRKLSCLEEDVARI	120
MAST2HP	121	YIAELVLAL EYLHSLGIVHRDLKPDN ILIAHDGHIKLTDFGLSKIGLINSTVDLSG PETD	180
GMLK	121	YIAELVLAL EYLHSLGIVHRDLKPDN ILIAHDGHIKLTDFGLSKIGLINSTVDLSG PETD	180
MAST2HP	181	GSTDAFLDSLNLHTQQTDDRHQOSAVGTPDYLAPEILLGTEHG YAADWWSVGIILFELIT	240
GMLK	181	GSTDAFLDSLNLHTQQTDDRHQOSAVGTPDYLAPEILLGTEHG YAADWWSVGIILFELIT	240
MAST2HP	241	GVXPFTA EHP E I I FDNILNRKIPWPSVPGDMSYEAQDLINRFLIHDPDLRLGANGSSEVK	300
GMLK	241	GVXPFTA EHP E I I FDNILNRKIPWPSVPGDMSYEAQDLINRFLIHDPDLRLGANGSSEVK	300
MAST2HP	301	THPFFKGVNWDTLALQKAVFVPQ PDSADDTSYFVSRY SQIPSGLPDEQDCSDSATDTSDDL	360
GMLK	301	THPFFKGVNWDTLALQKAVFVPQ PDSADDTSYFVSRY SQIPSGLPDEQDCSDSATDTSDDL	360
MAST2HP	361	YSNSGLEMDECGDLAEFDSSPLNLSLINF S FKNLSQLASIN YDVLLOTGKDPTKCSPSKS	420
GMLK	361	YSNSGLEMDECGDLAEFDSSPLNLSLINF S FKNLSQLASIN YDVLLOTGKDPTKCSPSKS	420
MAST2HP	421	RDT	423
GMLK	421	RDT	423

Б

MAST2HP	10	KERTSIDDFEIIKPISRGAFGKVF LARKRTTGDLFAIKVLK KLD MIRKNDIERILAERNI	69
HuMAST2	504	KKTPSEEDFETIKLISNGAYGAVFLVRHKSTRQR FAMKKINKQNLI LRN QIQAFVERDI	563
MAST2HP	70	LITVRNPFVVRFFYSFTCRDNVYLVMEYLN GGDLYSLLRKLSCLEEDVARIYIAELVLAL	129
HuMAST2	564	LTFAENPFVVMFCSFDTKRHL CMVMEYVEGGDCATLLKNIGALPVD MVRLYFAETVLAL	623
MAST2HP	130	EYLHSLGIVHRDLKPDN ILIAHDGHIKLTDFGLSKIGLINSTVDLSG PETD GSTDAFLDS	189
HuMAST2	624	EYLHNYGIVHRDLKPDN LLI TSMGHIKLTDFGLSKIGLMSLT TNL YEGHIEKDAREFLD-	682
MAST2HP	190	LNLHTQQTDDRHQOSAVGTPDYLAPEILLGTEHG YAADWWSVGIILFELITGVXPFTA EHP	249
HuMAST2	683	-----KQVCGTPEYI APEVILRQGYGKPV DWWAMGI ILYEFLVGCVPFFGDT	729
MAST2HP	250	PEIIFDNILNRKIPWPSVPGDMSYEAQDLINRFLIHDPDLRLGANGSSEVKTHPFFKGVN	309
HuMAST2	730	PEELFGQVISDEIVWPEGDEALPPDAQDLT SKLLHQNPLERLGTGSAYEVKQHPFFTGLD	789
MAST2HP	310	WDTLALQKAVFVPQ PDSADDTSYF---VSRY SQIPSGLPDEQDCSDSATDTS DLYSNSGL	366
HuMAST2	790	WTGLLRQKAEFIPQLESEDDTSYFDRSERYHHMDS--EDEEEVSE-----	833
MAST2HP	367	EMDECGDLAEFDSSPLNLSLINF S FKNLSQLASIN YDVLLOTGKDPTKCSPSKSRD	422
HuMAST2	834	--DGCLEIRQFSSCS PRFNKVYSSMERLSLLEE-----RRTPPPTKRSLSSEEKE	880

Рис. 5.16. Вирівнювання амінокислотних послідовностей клонованого рослинного білку MAST2HP і нативного білку GMLK (A7NTE9_VITVI) (А), її порівняння з протеїнкіназою MAST2 людини - HuMAST2 (фрагмент) (Б). Вирівнювання отримали за допомогою мережевого сервісу NCBI BLAST2.

Клонована кДНК і відповідний їй білок (MAST2-homologous protein - MAST2HP) майже цілком збігалися за первинною структурою GMLK (A7NTE9_VITVI) і відповідною кДНК (рис. 5.16). Було визначено 7 точкових замін нуклеотидів, які, у свою чергу, зумовлювали появу чотирьох дискретних замін амінокислот. Такі розбіжності могли бути наслідком первинної відмінності використаних ліній рослин винограду (внутрішньосортова віриабельність рослин «Піно-нуар») або спричинені кумулятивними помилками ПЛР актуального дослідження і первинного депонування A7NTE9_VITVI. Втім, вони не зачіпали функціонально важливих сайтів каталітичного домену MAST2HP і не мали критичного впливу на його функціонування.

5.6.2. Експресія конструкту рослинної протеїнкінази GMLK в клітинах *Chlorocebus aethiops* лінії 'Vero'

Наступним завданням було вивчення експресії створеного конструкту в гетерологічній системі культури клітин лінії 'Vero' (рис. 5.17). Для прижиттєвого спостереження внутрішньоклітинної динаміки цільового білку було створено конструкт, що експресує химерний білок рEGFP-MAST2HP, з флуоресцентним фрагментом GFP. Було визначено, що продукт конструкта досить рівномірно розподіляється як в цитоплазмі, так і в ядрі реципієнтних клітин. Флюоресценція виявляла лише незначні тільця включень. Клітини, що експресували конструкт, у більшості не втрачали життєздатності і зберігали здібність до поділу. Це підтверджувалось наявністю сестринських пар клітин, зв'язаних залишковими тільцями (рис. 5.17А). Система мікротрубочок найчастіше не відрізнялась від контролю, проте спостерігався епізодичний колапс цитоскелету окремих клітин, який проявлявся у формуванні пучків мікротрубочок (рис. 5.17Б).

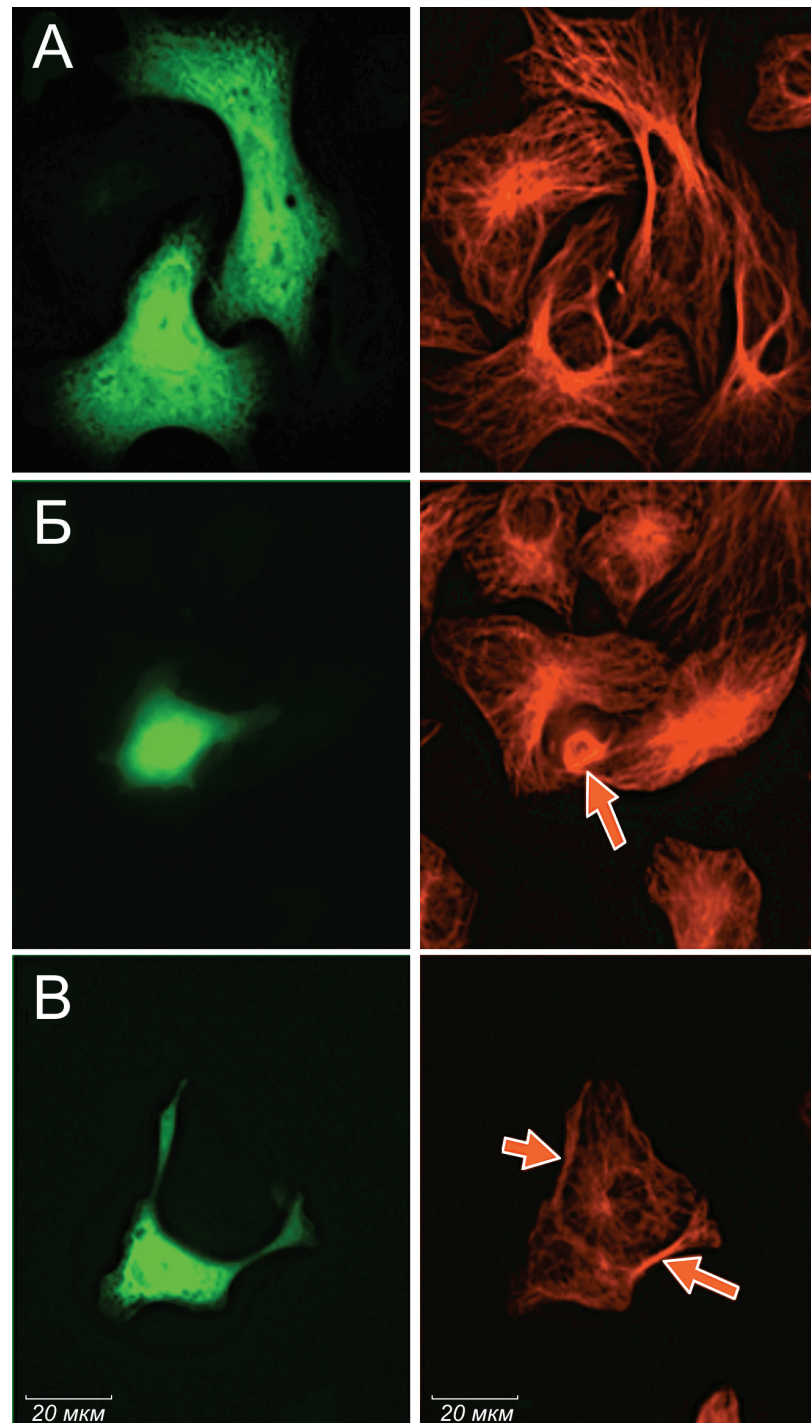


Рис.5.17. Система мікротрубочок в клітинах вервети (*Chlorocebus pygerythrus*) лінії 'Vero', які експресують ксенологічний флуоресцентний продукт - pEGFP-MAST2NP, створений на основі каталітичного фрагменту рослинної протеїнкінази GMLK з *Vitis vinifera*: **А** - пара клітин після поділу, **Б** - перебудова системи мікротрубочок (стрілка), **В** - зміна форми клітини (відростки показані стрілками). Зліва - клітини у флуоресцентному каналі GFP, праворуч - клітини у флуоресцентному каналі родаміну (Rhodamine B).

Також достаньо часто спостерігали зміну форми клітин, зокрема, деякі клітини утворювали довгі вирости (рис. 5.17В). Таким чином, ксенологічний білок MAST2HP не був високотоксичним для тваринних клітин, експресувався і існував в розчиненій формі навіть в гетерологічній системі. Певні відхилення в морфології трансформованих клітин свідчили на користь того, що MAST2HP мав певний вплив на систему мікротрубочок тваринної клітини.

Незважаючи на позитивний результат цього етапу дослідження, маємо констатувати складність і незручність рослин винограду як об'єкту дослідження. Також помітне відставання геномних і протеомних досліджень *Vitis vinifera* порівняно з канонічними модельними об'єктами. Тому, незважаючи на значну подібність каталітичних доменів GMLK винограду і тваринних MAST2, подальше дослідження її взаємозв'язку з регуляцією цитоскелету було виконано на прикладі гомологів з канонічної модельної рослини *Arabidopsis thaliana*.

5.7. Участь протеїнкінази IRE-кінази в модуляції тубулінового коду вищих рослин

5.7.1. Порівняння рослинної протеїнкінази IREN1 з *Arabidopsis thaliana* і представників протеїнкіназ групи MAST. Попередній пошук протеїнкіназ, які безпосередньо приймають участь в регуляції цитоскелету рослин, виявив групу ферментів, що містять каталітичні домени, гомологічні тваринній MAST2. Серед цих ферментів - чотири IRE-подібні протеїнкінази з *A. thaliana* At3g17850 (IREH1), At1g48490 (IRE3), At5g62310 (IPE) і At1g45160 (IRE4) були визначені як найближчі гомологи тваринних протеїнкіназ MAST [73, 103, 265, 273, 274, 275, 277,]. Для остаточного підтвердження IRE-подібних протеїнкіназ як найближчих гомологів тваринних MAST було виконано NJ-кластеризацію послідовностей каталітичних доменів всіх 1021 протеїнкіназ *A. thaliana* (1022 каталітичних

доменів). До вибірки було додано послідовність каталітичного домену раніше описаного гомологу з винограду протеїнкінази GMLK (VIT_17s0000g02000, F6GSP4_VITVI, раніше - D1HDU7_VITVI) [73, 273, 275, 276, 277]. За результатами такої глобальної кластеризації кіному *A. thaliana* було підтверджено, що саме протеїнкінази At3g17850 (IREH1), At1g48490 (IRE3), At5g62310 (IRE) і At1g45160 (IRE4) є найближчими гомологами тваринних протеїнкіназ MAST (рис.5.18).

Повна послідовність IREH1 з *A. thaliana* з позначенням ділянки каталітичного домену, N-кінцевого фрагменту, що використовувався у наступних дослідження внутрішньоклітинної локалізації і доменна організація наведені на рисунках 5.20, 5.21a, і 5.21b. Щоб визначити, чи дійсно N-кінцевий домен IREH1 має подібність до аналогічних ділянок тваринних MAST, було виконано пошук гомологічних послідовностей з протеому людини із використанням інструменту BLASTp.

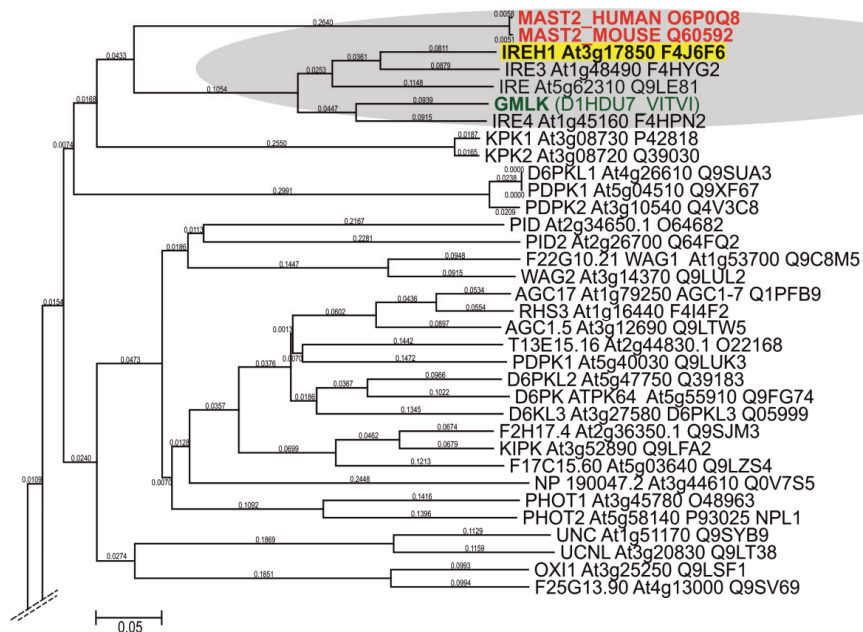


Рис.5.18. Результати спільної кластеризації каталітичних доменів повного кіному (1024 протеїнкінази) *A. thaliana* і контрольних послідовностей каталітичних доменів тваринних протеїнкіназ MAST2 (MAST2_HUMAN, Q6P0Q8; MAST2_MOUSE, Q60592) та знайденого раніше гомолога з винограду GMLK (VIT_17s0000g02000, F6GSP4_VITVI). Фрагмент кладограми, побудованої за результатами кластеризації.

* - Первинне депонування в UniProtKB як D1HDU7_VITVI.

MVFKNKLFFSSKKS GSSSPDSSNSPRSVGSNSPIRSDKKKSKSASKDEPPIPIPGFVGVGCKQTQIKDGLKKKDGSS
 KGKQLSSEVQAHSIGKSNLSPSSEVKKPPPPEVKEGPAFVSPIMASSLGLNRIKTRSGPLPQERVFNYRNDPATSNL
 SKMGADGGDLGSGSATSGSGSGNRRKEAGSSKLGLEENMDRTRP SDNKSDRDSLSPDTGPPRSLSP TLP PSGSRLQN
 VASSSGTGRSEMSSGRSGPLRNSDFCTPENS YEWENPKESSEPRYQALLRMTSAPRKRFP GDIKFSHELNSKGV RP
 FPLWKPRRSNNVEEVLNLI RAKFEKAKEEVNSDLAVFAADLVGVLEKNAESHPEWEETFEDLLILARSCAM TTPGDF
 WLQCEGIVQDLDDRQELPPGV LKQLHTRMLFILTRCTRLLQFHKESWGEEEQVVQLRQSRVLHSIEKI PPSGAGRS
 YSAAKVPSTKKAYSQEQHGLDWKEDAVVRSVPPLAPPENYAIKESSE PANIDRMSSWKKLPSPALKTVKEAPASEEQ
 NDSKVEPPNIVGSRQGRDDAAVAI LNFPPAKDSHEHSSKHRHNI SWGYWGEQPLISEESSIMCRICEEEVPTTHVED
 HSRVCTLADKYDQKGLSVDERLMAVAGTLDKIAETFRHKDSLAAAES PDGMKVSNSHLTEESDVLSPRLSDWSRKGS
 EDMLD CFPEADNSIFMDDL RGLPLMSCRTRFGPKSDQGMTTSSASSMTPRSP IPTPRPDPIEQILGGKGT FHDQDDI
 PQMSELADIAKCAADAI PGDDQSI PFLLSCLEDLRVVIDRRKFDAL TVETFGTRIEKLI REKYVHMCELM DDEKVDL
 LSTVIDEDAPLEDDVVRSLRTSPVHPRDRTSIDD **FEI IKPISRGAFGRVFLAKKRTTGDLFAIKVLKKADMIRKNAV**
ESILAERDILINVRNPFVVRFFYSFTCRDNLVLM EYLNGGDLYSLLRN LGCLEEDIVRVYIAEVVLALEYLHSEGV
VHRDLKPDNLLIAHDGHIKL TDFGLSKVGLINSTDDLAGPAVSGTSL LDEEESRLAASEEQ LERRKKRSVGT P DYL
AP EILLGTGHGATADWWSVGIILFELIVGIPPFNAEHPQQIFDNILNRKIPWHHVPEEMSAEAHDIIDRFLTEDPHQ
RLGARGAAEVKQHIFFKDINWDTLARQKA AFVPASES AIDTSYFRSRYSWNTSDEQFFPSGEVPDYS DADSMTNSSG
CSSNHHEEGEAEECEGHA EFESGIPVDYSFSNFSFKNLSQLASINYDLLSKGWKDEPQQI PHHK

Рис.5.20. Повна послідовність протеїнкінази IREN1 (AT3G17850.1). Підкреслення позначає N-кінцевий фрагмент, використаний для створення флуоресцентного конструкту pEGFP-c IREN1-tr (pEGFP-cIREN1-tr); маркером і товстим шрифтом позначено ділянку каталітичного домену.

Сканування ідентифікувало лише два хіти, що належали тваринним протеїнкіназам MAST1 і MAST2. Подальший аналіз показав, що ця ділянка містить фрагмент, який відповідає моделі домену MA_Ser/Thr_Kinase_dom, депонованої в репозиторії ресурсу InterPRO (домен серин / треонін-протеїнкінази, асоційований з мікротрубочкою; InterPRO: IPR015022; doi: 10.2210/pdb1v9v/pdb):

**Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1 OS=Homo sapiens
GN=MAST1 PE=1 SV=2 CRC64=189D24AE07B62A1E**

Length=1570

Score = 34.7 bits (78), Expect = 1.2, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 32/118 (27%), Positives = 54/118 (46%), Gaps = 8/118 (7%)

```

IREH1  318  NNVEEVLNLIIRAKFEKAKEEVNSDLAVFAA----ADLVGVLEKNAES--HPEWEETFEDLL  371
          N  +  +  ++  +  +F  KA  ++  L  F  +  D  V  L  A  S  H  +  E  D  L
MAST1  173  NEIVMMNHVYKERFPKATAQMEEKLRDFTRAYEPDSVLPADGVLSTFIHQIIEIARDCL  232
          N  +  +  ++  +  +F  KA  ++  L  F  +  D  V  L  A  S  H  +  E  D  L
IREH1  372  ILARSCAMTTTSGDFWLO--CEGIVODLDDRROELPPGVKQLHTRMLFILLRCTRLLQ  427
          +R  +  TT  +  LO  E  ++  OD  +R  +  L  +  OL  ++  L  I  ++  R  RLL  +
MAST1  233  TKSRDGLITTVYFYELQENLEKLLQDAYERSESELEVAFVTVLVKKLMIILSRPARLLE  290
          +R  +  TT  +  LO  E  ++  OD  +R  +  L  +  OL  ++  L  I  ++  R  RLL  +

```

**Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 OS=Homo sapiens
GN=MAST2 PE=1 SV=2 CRC64=DF5C92078A3451AF**

Length=1798

Score = 33.1 bits (74), Expect = 3.3, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 31/111 (28%), Positives = 53/111 (48%), Gaps = 8/111 (7%)

```

IREH1  325  NLIRAKFEKAKEEVNSDLAVFAA----DLVGVLEKNAES--HPEWEETFEDLLILARSCA  378
          ++  +  +F  KA  ++  LA  F  +  D  V  L  L  A  S  H  +  E  D  L  +  RS
MAST2  318  HVYKERFPKATAQMEERLAEFISNTTPDSVLPADGALSFIHQVIEMARDCLDKRSRGL  377
          +R  +  TT  +  LO  E  ++  OD  +R  +  L  +  OL  ++  L  I  ++  R  RLL  +
IREH1  379  MTTTSGDFWLO--CEGIVODLDDRROELPPGVKQLHTRMLFILLRCTRLLQ  427
          +T  +  +  LO  E  ++  OD  +R  +  L  +  OL  +++  I  +  R  RLL  +
MAST2  378  TTSQYFYELQDNLEKLLQDAHERSESESEVAFVMQLVKKLMIILARPARLLE  428
          +T  +  +  LO  E  ++  OD  +R  +  L  +  OL  +++  I  +  R  RLL  +

```

Цей домен раніше було знайдено винятково у серин-треонінових протеїнкіназ, що асоційовані з мікротрубочками. Зокрема, у складі протеїнкіназ MAST1 (61-336 а.к.), MAST2 (201-476 а.к.), MAST3 (80-354 а.к.), MAST4 (258-535 а.к.) людини, а також у гомолога «drop out» (dop) кінази з *Drosophila melanogaster* (421-690 aa) (рис. 5.21b). Слід зазначити, що ця ділянка відсутня у іншій атиповій MAST-кінази - MAST-L / Greatwall (GW, Gwl), для якої доведена участь в регуляції клітинного циклу і поділу клітин [9, 77]. Слід зазначити, що багато з представників тваринних MAST мають у С-кінцевих ділянках домену PDZ [554]. PDZ-домени містяться в різних білках, але всі вони допомагають локалізувати клітинні елементи. В більшості випадків, PDZ-домени беруть участь саме у забезпеченні взаємодії рецепторних білків і цитоскелету [338]. Але у випадку рослинних IREN1 домен PDZ відсутній.

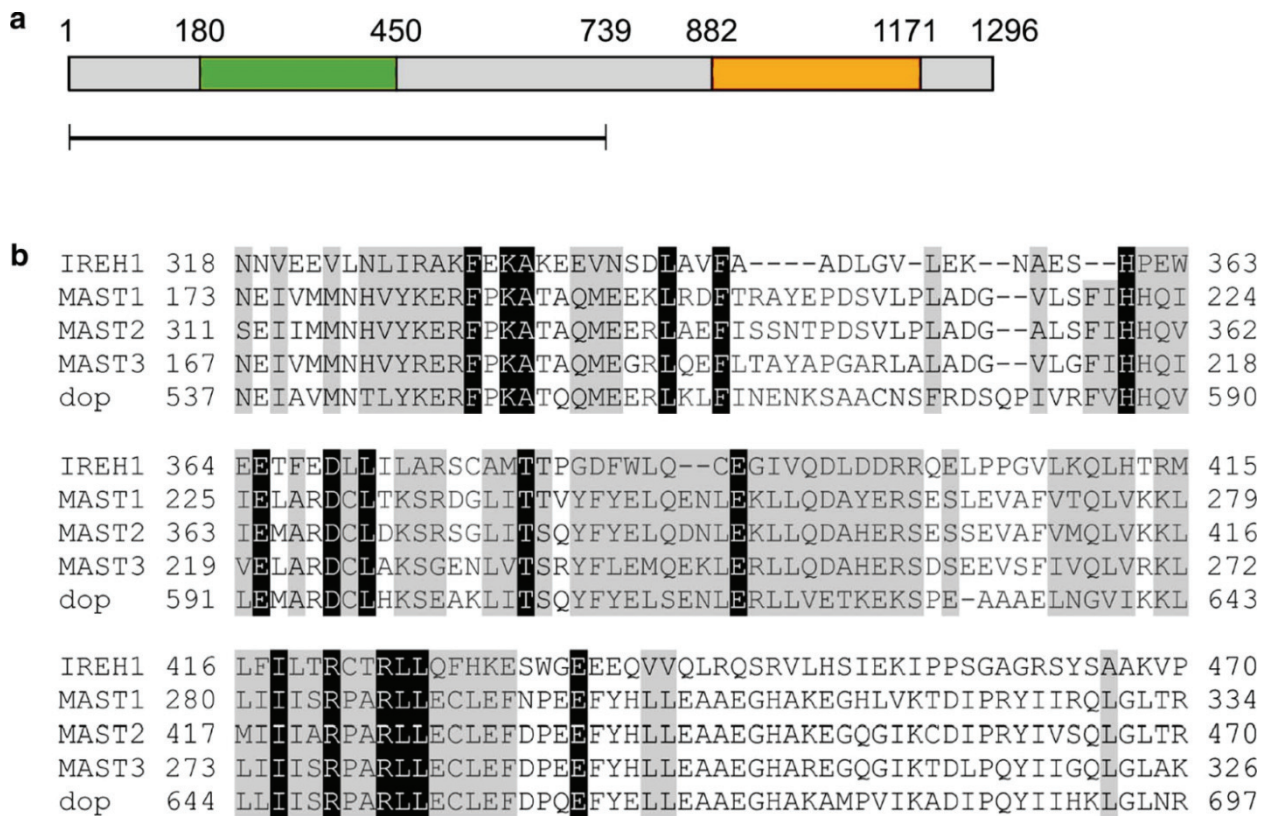


Рис. 5.21. Особливості молекули IREN1. а) Доменна організація молекули IREN1. Зеленим кольором позначено MA_Ser/Thr_Kinase_dom (домен серин / треонін-специфічної протеїнкіназ, що відповідає за асоціацію з мікротрубочками), характерний для протеїнкіназ MAST. Помаранчевим кольором позначено каталітичний домен. Підкреслення позначає продукт конструкту *pEGFP-IREH1-tr*. Цифри вказують на номери амінокислотних залишків границь вищезазначених функціональних доменів і фрагментів. б) Вирівнювання фрагментів, що відповідають домену MA_Ser/Thr_Kinase з MAST1 (NP_055790.1), MAST2 isoform 2 (NP_001306174.1) і MAST3 (NP_055831.1) людини, а також, dop («drop out») (NP_648778.1) з *Drosophila melanogaster*.

Для оцінки структурної подібності була виконана реконструкція каталітичного домену найближчого гомологу тваринних MAST2 з *A. thaliana* - IREN1 (At3g17850). Також було побудовано 3D-моделі каталітичних доменів MAST2 людини і миші. Отримані моделі були сольватовані і пройшли етап молекулярної динаміки в програмі Gromacs із застосуванням силового поля G53аб. Подальше структурне порівняння з отриманими

моделями каталітичних доменів тваринних протеїнкіназ MAST2 та з раніше побудованою моделлю гомолога з винограду - GMLK (VIT_17s0000g02000, F6GSP4_VITVI) [275] підтвердило значну подібність їх структур (рис. 5.22а).

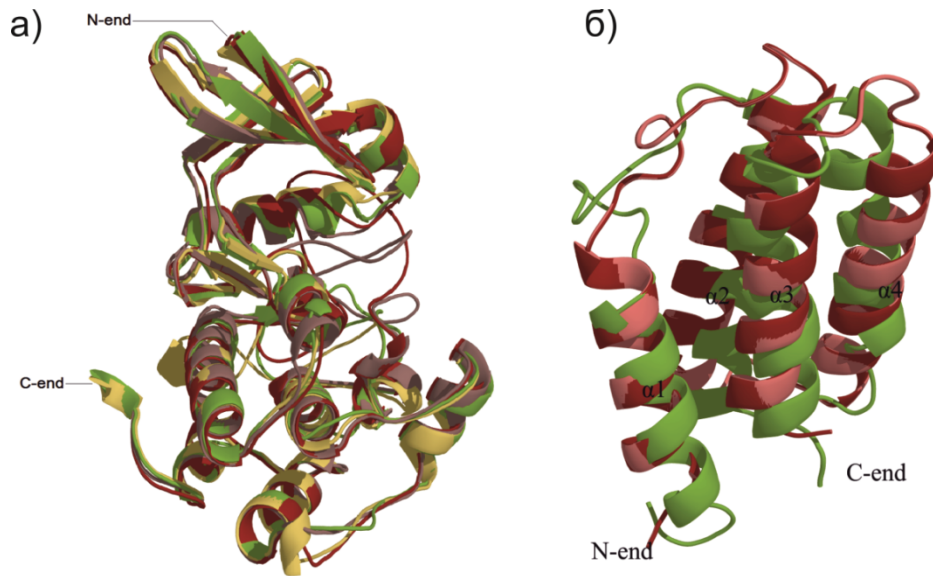


Рис. 5.22. Результати структурного порівняння каталітичних доменів (а) і доменів, що відповідають за взаємодію з мікротрубочками у тваринних протеїнкіназ MAST і рослинних IREN1. Моделі пройшли попередню оптимізацію в програмі Gromacs, із використанням силового поля G53а6.

а) Результати вирівнювання моделей просторової структури каталітичних доменів MAST2 людини (червоний), MAST2 миші (рожевий) і двох рослинних гомологів: GMLK з винограду[275, 73] (жовтий) і IREN1 з арабідопсису (зелений).

б) Результати структурного вирівнювання моделей просторових структур фрагментів, які відповідають домену асоціації з мікротрубочками (MA_Ser / Thr_Kinase_dom): MAST1 (187-287 а.к., червоний), MAST2 (325-425 а.к., рожевий) людини і IREN1 (332-424 а.к., зелений) арабідопсису.

При вирівнюванні структур IREN1 і тваринних гомологів показник RMS склав 0,878 у MAST2_HUMAN (Q6P0Q8) і 0,663 – у MAST2_MOUSE

(Q60592). При порівнянні з GMLK винограду і IREN1, RMS = 0,463, що, разом із значною подібністю елементів вторинної структури, підтверджує висновки щодо гомології цих білків. Наступна структурна реконструкція і вирівнювання фрагментів N-кінцевої ділянки домену асоціації з мікротрубочками (MA_Ser / Thr_Kinase_dom) протеїнкіназ MAST1 (187-287 а.к., червоний), MAST2 (325-425 а.к., рожевий) людини і рослинної IREN1 (332-424 а.к., зелений) з арабідопсису, також підтвердили їх значну структурну подібність (рис. 5.22б).

5.7.2. Локалізація продукту експресії GFP-конструкту рослинної протеїнкінази IREN1 в клітинах тварин.

Клони рекомбінантних ДНК-конструкцій протеїнкінази IREN1, повнорозмірного конструкту *pEGFP-IREN1* і скороченого мутантного конструкту *pEGFP-IREN1-tr*, було перевірено і підтверджено результатами секвенування. Мутантному *pEGFP-IREN1-tr* бракувало ділянки 2319-2356 bp, яка кодує каталітичний домен, що досягалось шляхом вставки в ORF передчасного стоп-кодону (TAA). *pEGFP-IREN1-tr* кодував лише перші 773 амінокислоти N-кінцевої частини IREN1 (рис. 5.23).

Під час експресії контрольного конструкту *pEGFP-C3* в клітинах *Chlorocebus pygerythrus* 'Vero' розподіл GFP-флуоресценції був випадковим і в цитоплазмі, і в ядрах клітин (рис. 5.24а). В свою чергу, в клітинах, що були трансфековані повнорозмірним конструктом *pEGFP-IREN1*, флуоресценція химерного продукту GFP-IREN1 також відбувалась в цитоплазмі, але явно домінувала її центросомальна локалізація (рис. 5.24f). Візуалізація центросом здійснювалась за методом імунологічного фарбування антитілами до γ -тубуліну. На локалізацію центросом вказували осередки підвищеної концентрації мікротрубочок (рис. 5.24b–d, g–i). Для підтвердження спільної локалізації GFP-IREN1 і центросом було виконано профілювання інтенсивності флуоресценції вздовж центросомального вектору (рис. 5.24e, j).

Таким чином, центросомна колокалізація була підтверджена збігом максимумів піку червоного каналу, що відповідав γ -тубуліну, і піку зеленої

флуоресценції, яка відповідає GFP-IREH1 (рис. 5.24j). При цьому, у контрольних клітин, що експресували вільний GFP (продукт конструкту *pEGFP-C3*), центросомальний пік не спостерігався (рис. 5.24e). Кореляція піків флуоресценції GFP-IREH1 і γ -тубуліну була значно вище, ніж у α -тубуліну. Цей факт підтверджує, що N-кінцевий фрагмент GFP-IREH1, в першу чергу, проявляє центросомальну локалізацію, ніж асоціацію з кортикальними мікротрубочками. Слід зазначити, що під час експресії GFP-IREH1 не зареєстровано жодних змін морфології клітин або розташування інтерфазних мікротрубочок (рис. 5.24h, i; порівняння трансфікованих і нетрансфікованих клітин).

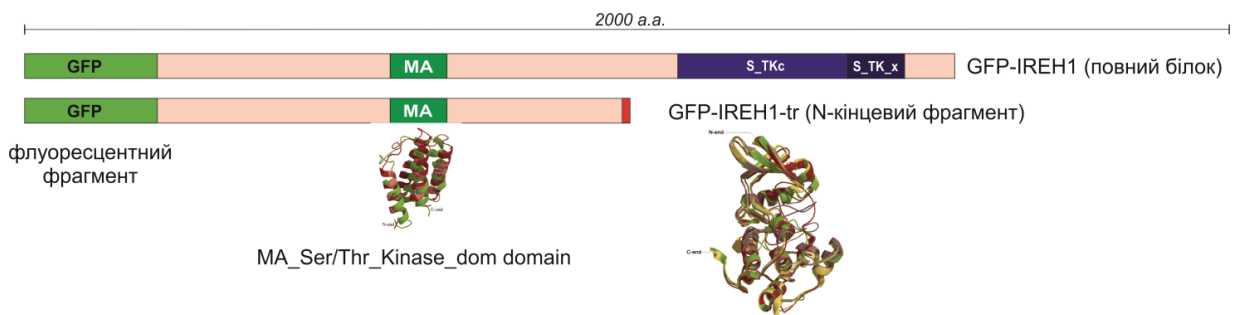


Рис. 5.23. Схематичне зображення химерних флуоресцентних продуктів GFP-IREH1 і GFP-IREH1-tr конструктів *pEGFP-IREH1* і *pEGFP-IREH1-tr* рослинної протеїнкінази IREH1, що використовувалися для дослідження її внутрішньоклітинної локалізації в клітинах HEK293.

При визначенні локалізації каталітичного домену аналогічної IRE-подібної кінази GMLK з винограду (рис.5.17) в системі тваринних клітин 'Vero', колокалізація фрагменту каталітичного домену і центросом була відсутня [73]. Це дозволило припустити, що домен взаємодії IREH1 з центросомою має знаходитися за межами каталітичного домену. Для перевірки цього припущення було виконано трансфекцію клітин HEK293 із використанням конструкту *pEGFP-IREH1-tr*, у якого не має С-кінцевої ділянки, що містить каталітичний домен (рис. 5.23. і рис. 5.24k–o).

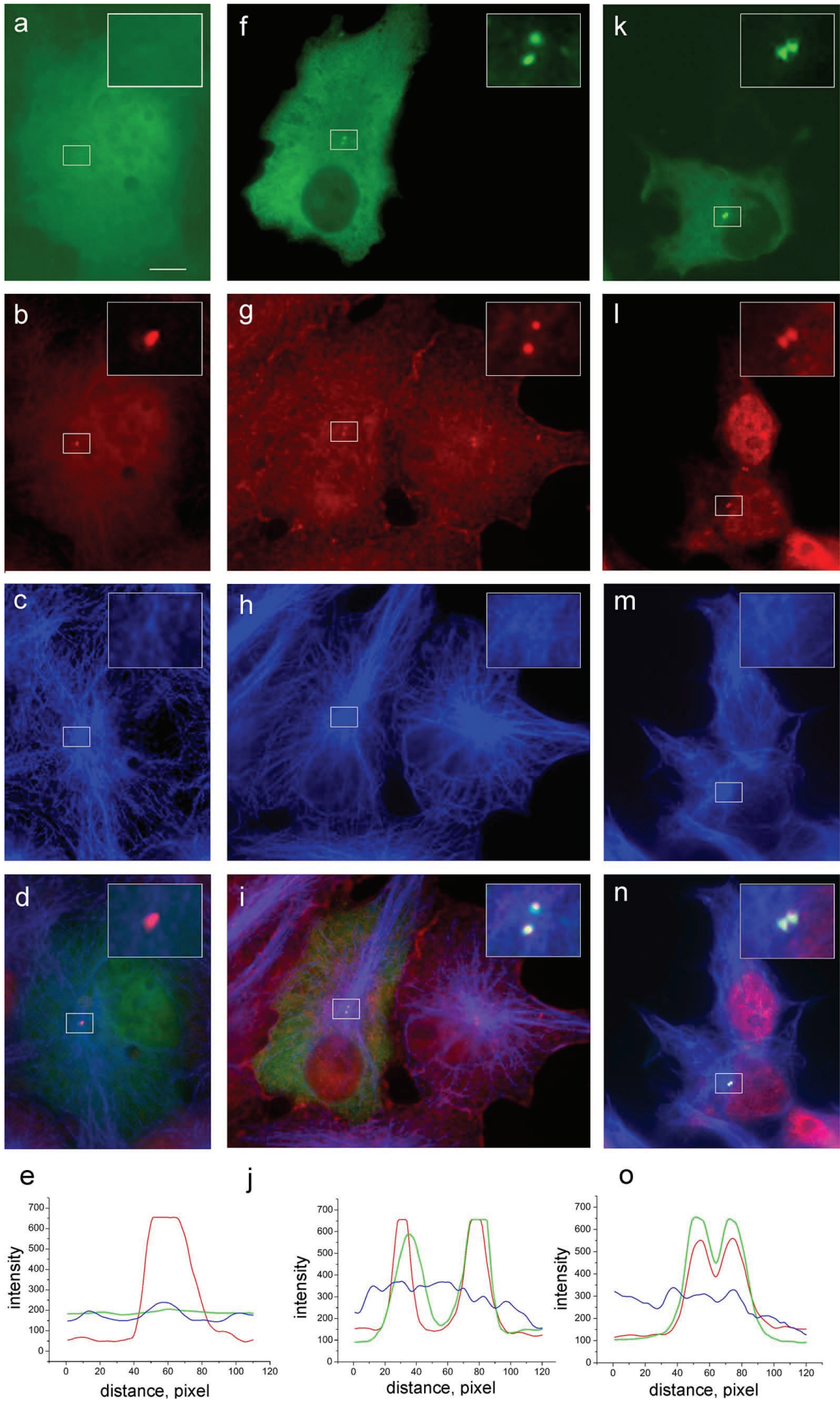


Рис. 5.24. Експресія рослинних рEGFP-C3, рEGFP-IREN1 і рEGFP-cIREN1-tr в клітинах тваринного походження. Визначено, що продукти експресії рEGFP-IREN1 і рEGFP-IREN1-tr проявляють центросомальну колокалізацію:

- a–e** - Експресія рEGFP-C3 у клітинах 'Vero'.
- f–j** - Експресія рEGFP-IREN1 у клітинах 'Vero'.
- k–o** - Експресія рEGFP-IREN1-tr у клітинах HEK293.
- a, f, k** - Локалізація продукту експресії (флуоресценція GFP).
- b, g, l** - Імунологічне визначення γ -тубуліну (центросомальний маркер).
- c, h, m** - Імунологічне маркерування α -тубуліну (мікротрубочки).
- d, i, n** - Поєднання наведених вище зображень. Ділянки відмічені контуром відповідають збільшеним зображенням у виносках. Масштаб 10 мкм.
- e, j, o** - Інтенсивність флуоресценції ділянок центросом. Визначено співпадання зелених (GFP) і червоних (γ -тубулін) піків ("j" і "o")

Для підтвердження автентичності продукту експресії було виконано імуноблотинг трансфектованих клітин лінії HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) з антитілами до GFP. Визначена відносна молекулярна маса продукту експресії відповідала прогнозу і складала ~ 170 кДа (~ 143 кДа - кіназна частина і ~ 27 - 28 кДа - фрагмент GFP). Фрагменти із значно меншою молекулярною масою відповідали продуктам часткового протеолізу або абортивного біосинтезу білку (рис. 5.25а, 1).

Водночас, актуальне дослідження визначило, що GFP-IREN1-tr поширюється в цитоплазмі, аналогічно до GFP-IREN1 (рис. 5.24к), і колокалізується з центросомами, аналогічно повнорозмірному білку (рис. 5.24о). Контрольний маркер (Mr) продукту експресії GFP-IREN1-tr також відповідав очікуваному показнику молекулярної маси (рис. 5.25а, 2).

Необхідно зауважити, що протеїнкіназа родини MAST "Drop out" (Dop) з *Drosophila melanogaster* здатна (безпосередньо або опосередковано) фосфорилувати проміжний ланцюг динеїну і регулювати динеїн-залежну рухливість мембран ембріону [189]. Клітини вищих рослин, ймовірно, не мають динеїну і моторика їх клітинних компонентів підтримується завдяки участі кінезинів і міозинів. Однак рослинна протеїнкіназа IREN1, завдяки

значному рівню подібності, могла зберегти еволюційну спорідненість до динеїну і штучно взаємодіяти з ним при експресії в тваринних клітинах. Динеїн тваринних клітин концентрується на центросомі і досить дифузно поширюється в цитоплазмі, аналогічно IREN1. На прикладі модельної системи культури тваринних клітин було показано, що розташування мікротрубочок значною мірою залежить від динеїну [76]. Оскільки ця система консервативна, і незмінна в клітинах, які експресували GFP-IREN1, було зроблено припущення, що ксеноморфна IREN1 не впливає на активність динеїну; принаймні, не викликає порушень його функціонування. З метою визначення, чи здатна IREN1 безпосередньо взаємодіяти з проміжним ланцюгом динеїну (Cytoplasmic dynein intermediate chain), було виконано імунопреципітацію з антитілами до GFP. Будь-яка експресія GFP-IREN1 або GFP чітко визначалася під час електрофорезу імунопреципітованих білків (рис. 5.25b, 1 і 2) і в імуноблотах їх препаратів з антитілами до GFP (рис. 5.25b, 3, 4). Проте преципітати динеїну були відсутні (рис. 5.26). Також не була підтверджена наявність преципітатів γ -тубуліну (рис. 5.26).

Враховуючи отримані результати, можна стверджувати, що рослинна протеїнкіназа IREN1 і її форма, редукована за каталітичним доменом (IREN1-tr), не утворюють комплексів з тваринним динеїном або γ -тубуліном. Водночас, в тваринних клітинах була цілком очевидна центросомальна локалізація рослинної IREN1. За взаємодію IREN1 з тваринною центросомою відповідає N-кінцевий домен. Слід врахувати надзвичайну складність макромолекулярного комплексу центросом, який, згідно Bauer et al. (2016), складається з понад 400 білків [35]. Будь-який з білків центросомального комплексу може бути платформою для взаємодії з N-кінцевим доменом IREN1. У випадку взаємодії з IREN1, тваринні центросоми і рослинні комплекси первинної нуклеації слід розглядати як цілісні макромолекулярні комплекси. Відповідно, враховуючи будову, розміри протеїнкінази IREN1, дистанцію між доменами (рис. 5.23), пряме MAST / IRE-специфічне фосфорилування γ -тубуліну залишалось цілком можливим [103].

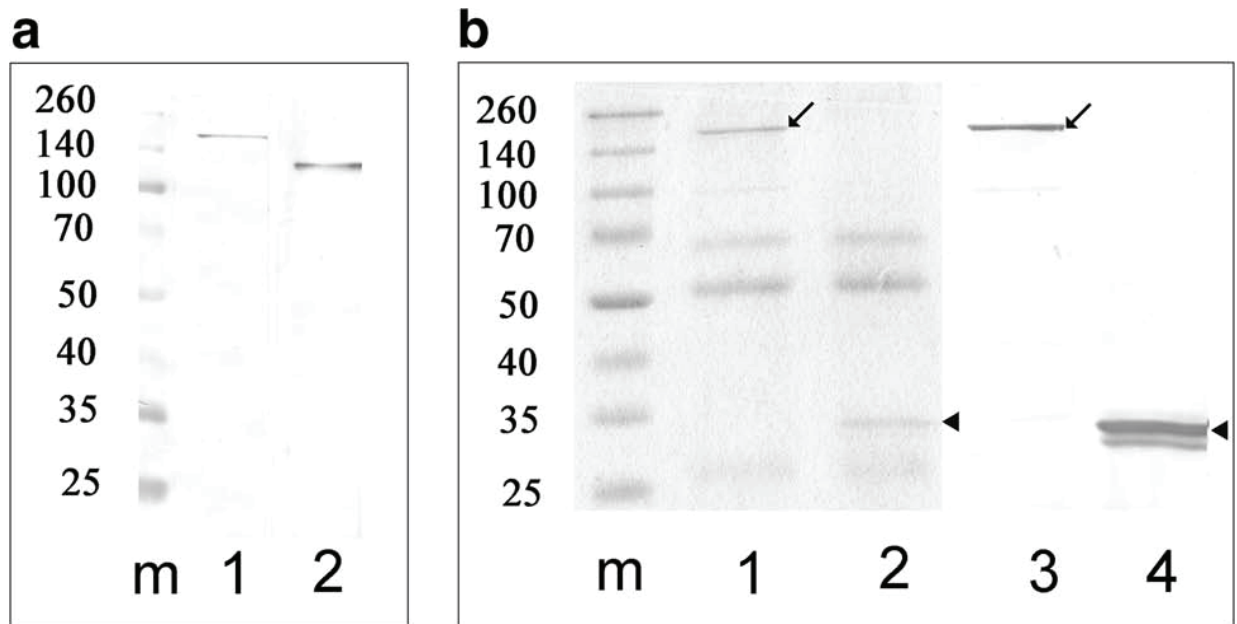


Рис. 5.25. Аналіз молекулярної маси рекомбінантних білків і імунопреципітація GFP-IREN1 і GFP з клітин HEK293 трансфєкованих GFP-специфічними антитілами.

a. Імуноблотинг лізатів клітин HEK293 з антитілами специфічними до GFP. m - маркери молекулярної ваги, 1 - зразки трансфєкції pEGFP-IREN1, 2 - зразки трансфєкції pEGFP-IREN1-tr.

b. Імунопреципітація GFP-IREN1 (1 і 3) і GFP (2 і 4) з трансфєкованих клітин HEK293 з антитілами специфічними до GFP. m – маркери молекулярної ваги, 1 і 2 - фарбування білкового гелю фарбником Кумасі діамантово-блакитним R-250 (Coomassie brilliant blue R250), 3 і 4, Імуноблотинг з використанням антитіл специфічних до GFP. а. Стрілки “↙” вказують на GFP-IREN1, стрілки “◀” вказують на GFP.

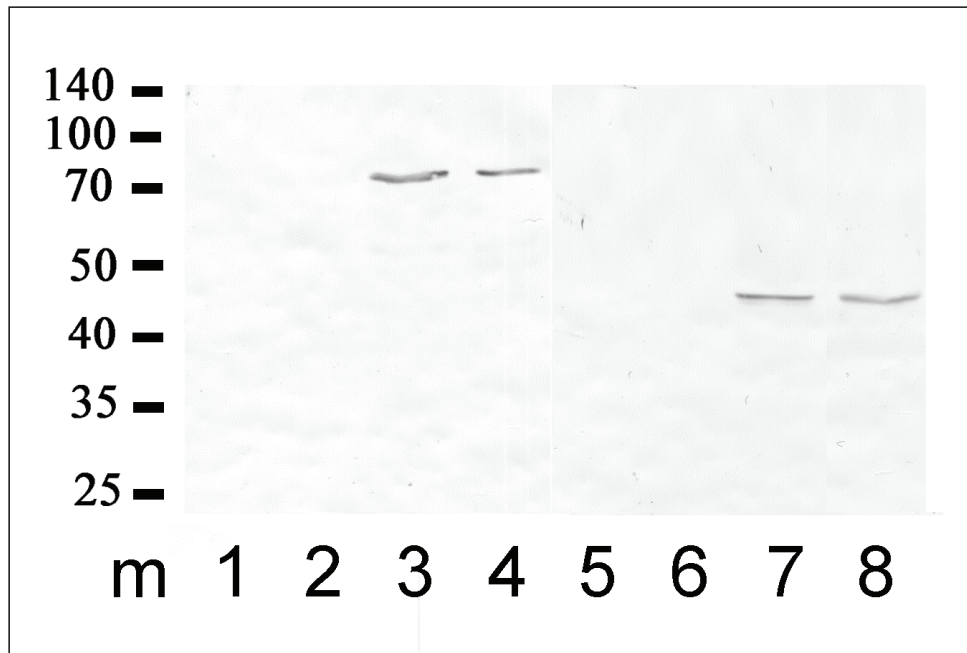


Рис. 5.26. Імунопреципітація GFP-IREN1 і GFP з клітин HEK293 після трансфекції антитілами, що мають специфічність до GFP. 1–4 - імуноблотинг з антитілами до проміжного ланцюгу динеїну. 5–8 - імуноблотинг з антитілом до γ -тубуліну. 3, 4, 7 і 8 - інтактні клітинні лізати. 1, 2, 5 і 6 - імунопреципітовані білки. 1, 3, 5 і 7 - трансфекція GFP-IREN1. 2, 4, 6 і 8 - трансфекція GFP.

Згодом, X. Yue et al. (2019) повідомили, що у рослин *A. thaliana* з мутацією за геном *ireh1* спостерігається фенотипова відповідь, яка виражається в асиметрії коріння проростку. У рослин з подвійною мутацією *ireh1+ire3* ця асиметрія була значно вище [618]. Автори підтвердили значний рівень експресії *ireh1* і *ire3* в корені *A. thaliana* і довели їх зв'язок з вищезазначеною морфофізіологічною відповіддю. Крім того, інтенсивність флуоресценції маркера мікротрубочок (KNpro: EGFP-MBD) у *ireh1*- і *ire3*-дефектних мутантів була значно нижче ніж у рослин дикого типу. Показано, що *ireh1*- і *ireh1+ire3*-мутанти характеризуються помітними відхиленнями в орієнтації кортикальних мікротрубочок в клітинах коріння. Авторами було

підтверджено пряму взаємодію IREH1 і IRE3, що, відповідно, зобов'язує розглядати ці протеїнкінази як складові частини єдиної регуляторної системи. X. Yue et al. (2019) підтвердили внесок IRE-кіназ в контроль коректної морфології кореня і реалізацію внеску через вплив на систему кортикальних мікротрубочок. Таким чином, внесок IREH1 і IRE3 в тубуліновий код і/або опосередковану регуляцію мікротрубочок є очевидним. Домінуюча роль в цій регуляції, поза сумнівом, належить IREH1 [618].

Співставляючи наші дані і результати Yue et al. (2019), стає безумовною фундаментальна роль IRE-залежного фосфорилування не лише в регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок, але і в регуляції системи кортикальних мікротрубочок [103, 618]. Досить схожі перебудови кортикальних мікротрубочок спостерігалися під впливом індукованої депресії активності СК1-подібних протеїнкіназ, для яких доведена участь в тубуліновому коді і вже з'ясовано сайт СК1-специфічного фосфорилування β -тубуліну [280, 281, 43]. Стосовно MAST / IRE-кіназ існування сайтів специфічного фосфорилування молекул α -, β - і γ -тубуліну залишалось відкритим питанням як у випадку тваринних MAST, так і у випадку рослинних IRE.

5.7.3. Визначення сайтів MAST / IREH1-специфічного фосфорилування ізотипів α -, β - і γ -тубуліну.

Для роз'язання завдання необхідно було створити узагальнений мотив (партерн), що описує сайти MAST/IRE-специфічного фосфорилування, його практичне застосування для визначення сайтів специфічного фосфорилування різних ізотипів α -/ β -/ γ -тубуліну у *H. sapiens* і *A. thaliana*.

Первинна вибірка об'єднувала експериментально підтверджені сайти MAST/IRE-специфічного фосфорилування ARP19 (cAMP-regulated

phosphoprotein 19) і ENSA (Alpha-endosulfine) протеїнкіназою GWL (GreatWall / MASTL). (рис. 5.27) Крім того, до цієї вибірки було додано сайти, які, за даними проекту PhosphoNetworks (www.phosphonetworks.org), асоційовані з протеїнкіназами MAST1 і MAST2 людини [408, 226, 227]. Повна вибірка містила 77 сайтів фосфорилування: 31 для GWL, 33 для MAST1 і 12 для MAST2. На підставі негепованого вирівнювання амінокислотних послідовностей вищезгаданих сайтів, було сформовано узагальнений пошуковий патерн (відповідно до рекомендацій PROSITE):

{CHNRWY} - {NRY} - {CHQWY} - {CWY} - {CFHV} - {CGMWY} -
 {MQRWY} - [ST] - {CIMWY} - {CFMQWY} - [DEGHKNSTY] - {MPW} -
 {NPTW} - {CMY} - {FMNRWY}. (Додаток 6.1)

На наступному етапі, вищезазначений мотив було застосовано для пошуку перспективних сайтів фосфорилування у об'єднаній бібліотеці послідовностей відомих ізотипів α -, β - і γ -тубулінів з *H. sapiens* і *A. thaliana*. Сканування цієї вибірки за допомогою web-сервісу ScanProsite tool визначило 51 потенційний сайт MAST-Like кіназ у молекул тубуліну з *H. sapiens* і 66 - у молекул тубуліну з *A. thaliana*. Для ізотипів тубуліну людини порівняння теоретичних сайтів з даними ресурсу PhosphoSitePlus (www.phosphosite.org) засвідчило їх відповідність результатам мас-спектрометрії, що підтверджує факт фосфорилування цих амінокислотних залишків. Оскільки складений пошуковий мотив, безсумнівно, має деградований характер і кількість знайдених потенційних сайтів була надмірною, наступний етап відбору полягав у спільній кластеризації відібраних хітів і вибірки експериментально підтверджених сайтів GWL. Оскільки послідовності всіх сайтів GWL з ARP19 і ENSA ідентичні (рис. 5.27), наступна кластеризація виконувалась проти лише однієї послідовності KGQKYFD GDYNMAK (55-KGQKYFD GDYNMAK-69 з ARP19 / UniProtKB: P56211 людини і 60-KGQKYFD GDYNMAK-74 з ENSA / UniProtKB: O43768 людини).

ARP19 HUMAN	(P56211)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 HUMAN	(P56211-2)	39-KGQKYFDS	SGDYNMAK-53
ARP19 MOUSE	(P56212)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 MOUSE	(P56212-2)	39-KGQKYFDS	SGDYNMAK-53
ARP19 PIG	(Q712U6)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 PIG	(Q712U6-2)	39-KGQKYFDS	SGDYNMAK-53
ARP19 RAT	(Q712U5)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 RAT	(Q712U5-2)	39-KGQKYFDS	SGDYNMAK-53
AR19A XENLA	(Q6DEB4)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
AR19B XENLA	(Q6GQG3)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ARP19 BOVIN	(Q28055)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 BOVIN	(Q28055-2)	39-KGQKYFDS	SGDYNMAK-53
ARP19 CHICK	(Q5ZLY8)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 TAEGU	(B5G1C4)	55-KGQKYFDS	SGDYNMAK-69
ARP19 TAEGU	(B5G1C4-2)	39-KGQKYFDS	SGDYNMAK-53
ENSA HUMAN	(O43768)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA HUMAN	(O43768-2)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA HUMAN	(O43768-5)	56-KGQKYFDS	SGDYNMAK-70
ENSA HUMAN	(O43768-6)	56-KGQKYFDS	SGDYNMAK-70
ENSA MOUSE	(P60840)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA MOUSE	(P60840-2)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA PIG	(P68211)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA RAT	(P60841)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA RAT	(P60841-2)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA BOVIN	(P68210)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA BOVIN	(P68210-2)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA CHICK	(Q5ZIF8)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA DANRE	(Q1L8X2)	67-KGQKYFDS	SGDYNMAK-81
ENSA DANRE	(Q1L8X2-2)	56-KGQKYFDS	SGDYNMAK-70
ENSA SALSA	(B5XE27)	58-KGQKYFDS	SGDYNMAK-72
ENSA XENLA	(Q7ZXH9)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74
ENSA XENTR	(Q6NVR1)	60-KGQKYFDS	SGDYNMAK-74

Рис. 5.27. Експериментально підтверджені сайти MAST-специфічного фосфорилування протеїнкіназою GWL (GreatWall / MASTL) білків: ARP19 (сAMP-regulated phosphoprotein 19) і ENSA (Alpha-endosulfine), офіційно зареєстровані в репозиторії UniProtKB.

Аналогічно, для спільної кластеризації, усі сайти у вибірці було підготовлено в загально прийнятому стандарті (S/T±7) і збережено у форматі *.fasta. Оскільки, при порівнянні сайтів посттрансляційних модифікацій вставка гепів є неприпустимою, було виконано кластеризацію (алгоритм UPGMA і бутстреппінг) із заборонаю відкриття гепів на стадії вирівнювання в програмі ClustalX (рис. 5.28).

Візуалізація побудованого дерева дозволила ідентифікувати групу сайтів, які утворюють спільний кластер з контрольною послідовністю (рис. 5.28). Сайти, подібні до контрольних послідовностей сайтів GWL, були виявленні у ізотипів α -, β - і γ -тубуліну. Було відібрано по одному сайту для молекул α - і одному для молекул β -тубуліну, які є консервативними для більшої частини однойменних ізотипів тубуліну у *H. sapiens* і *A. thaliana* (рис. 5.29).

Для α -тубуліну найближчим кластером виявилась група, яка відповідала сайту Thr73 (Thr81 у випадку TBAL3 (A6NHL2) з *H. sapiens*): присутнього практично у всіх молекул α -тубуліну людини (TBA1A, TBA1B, TBA3C, TBA3E, TBA8 і TBAL3) і у всіх α -ізотипів арабідопсису (TBA1, TBA2, TBA3, TBA4, TBA5 і TBA6). Єдиною молекулою α -тубуліну, яка не має цього сайту, є ізотип TBA4A з *H. sapiens*. (рис. 5.28 і рис. 5.29)

Аналіз топології визначеного сайту із застосуванням структурних моделей фрагментів протофіламентів мікротрубочок з *H. sapiens* і *A. thaliana* (рис. 5.30a) засвідчив, що відібраний амінокислотний залишок знаходиться в зоні внутрішнього контакту гетеродимеру $\alpha\beta$ -тубуліну (рис. 5.30b). Ця модифікація може впливати на процес збірки і регулювання цілісності гетеродимеру тубуліну. (Додаток 5)

Для β -тубуліну найближчим кластером виявилась група, яка відповідає сайту Ser115 і об'єднує більшу частину β -ізотипів з *A. thaliana* (TBV2, TBV3, TBV4, TBV7, TBV8 і TBV9) і *H. sapiens* (TBV5, TBV3, TBV4B, TBV2B і TBV2A). У β -ізотипів TBV1, TBV5 і TBV6 з *A. thaliana*, TBV4A, TBV6, TBV8 і TBV1 з *H. sapiens* цей сайт відсутній. Згідно топології залишку S115, зміни в цьому положенні можуть впливати на взаємодію сусідніх протофіламентів мікротрубочки (рис. 5.30a, 5.31).

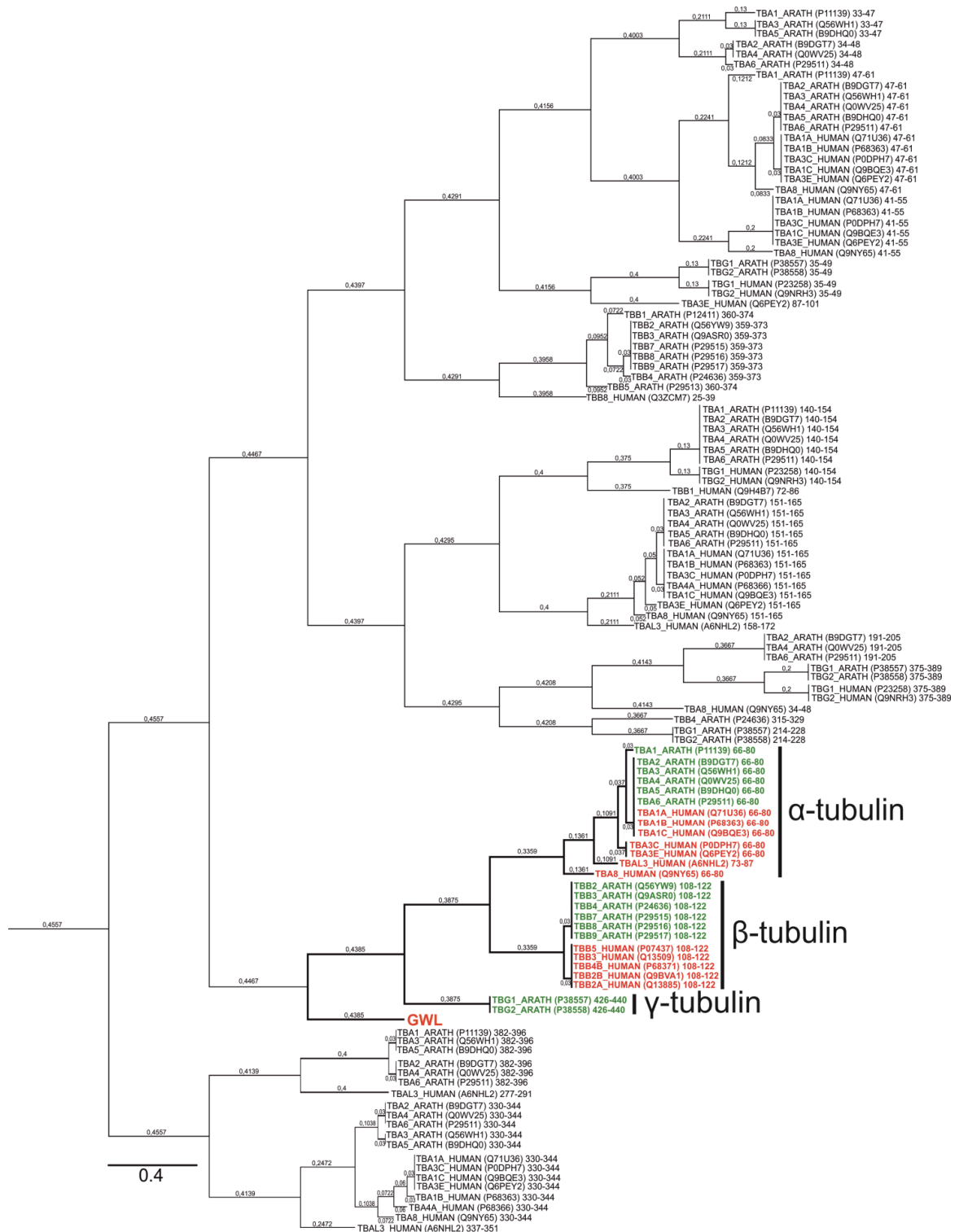


Рис. 5.28. Результати спільної кластеризації MAST/IRE-специфічних сайтів, передбачені методом профільного пошуку і отримані з різних ізотипів молекул тубуліну людини і арабідопсису, експериментально підтвердженого консервативного сайту протеїнкінази MASTL (GWL - Serine/threonine-protein kinase greatwall) з ARP19 (cAMP-regulated phosphoprotein 19) і ENSA (Alpha-endosulfine).

CONTROL:

>ARP19/ENSA (GWL)

KGQKYFDSGDYNMAK

α-tubulin**Thr73 (81)**

```

>TBA1 ARATH (P11139) : 66-VFLDLEPTVIDEVRT-80
>TBA2 ARATH (B9DGT7) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA3 ARATH (Q56WH1) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA4 ARATH (Q0WV25) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA5 ARATH (B9DHQ0) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA6 ARATH (P29511) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA1A HUMAN (Q71U36) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA1B HUMAN (P68363) : 66-VFVDLEPTVIDEVRT-80
>TBA3C HUMAN (P0DPH7) : 66-VFVDLEPTVVDEVRT-80
>TBA3E HUMAN (Q6PEY2) : 66-VFVDLEPTVVDEVRT-80
>TBA8 HUMAN (Q9NY65) : 66-VMIDLEPTVVDEVRA-80
>TBAL3 HUMAN (A6NHL2) : 73-LFVDLEPTVIDGIRT-87
::*****:*:*:*:

```

No hit: TBA4A_HUMAN

β-tubulin**Ser115**

```

>TBB2 ARATH (Q56YW9) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB3 ARATH (Q9ASR0) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB4 ARATH (P24636) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB7 ARATH (P29515) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB8 ARATH (P29516) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB9 ARATH (P29517) : 108-EGAELIDSVLDVVRK-122
>TBB5 HUMAN (P07437) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB3 HUMAN (Q13509) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB4B HUMAN (P68371) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB2B HUMAN (Q9BVA1) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
>TBB2A HUMAN (Q13885) : 108-EGAELVDSVLDVVRK-122
*****:*****

```

No hit: TBB1_ARATH, TBB5_ARATH and TBB6_ARATH

No hit: TBB4A_HUMAN, TBB6_HUMAN, TBB8_HUMAN and TBB1_HUMAN

γ-tubulin**Ser433**

```

>TBG1 ARATH (P38557) : 426-ESRDIIESLVDEYKA-440
>TBG2 ARATH (P38558) : 426-ESRDIIESLVDEYKA-440
*****

```

No hit: TBG1_HUMAN and TBG2_HUMAN

Рис. 5.29. Сайти з найбільшим збігом з контрольною послідовністю сайту GWL у різних ізотипів α-, β- і γ-тубуліну, визначені на підставі результатів профільного пошуку і спільної кластеризації.

Для γ-тубуліну було знайдено кладу, яка чітко відокремилась і відповідала кластеру залишку Ser433. Примітно, що ця клада не лише мала найменшу дистанцію щодо послідовності контрольного сайту протеїнкінази GWL, але також була представлена лише двома ідентичними сайтами, які існують лише у γ-тубулінів (TBG1 і TBG2) з *A. thaliana*. Аналогічний сайт у випадку γ-тубуліну *H. sapiens* був відсутній. Таким чином, мова може йти про механізм регуляції, характерний виключно для вищих рослин.

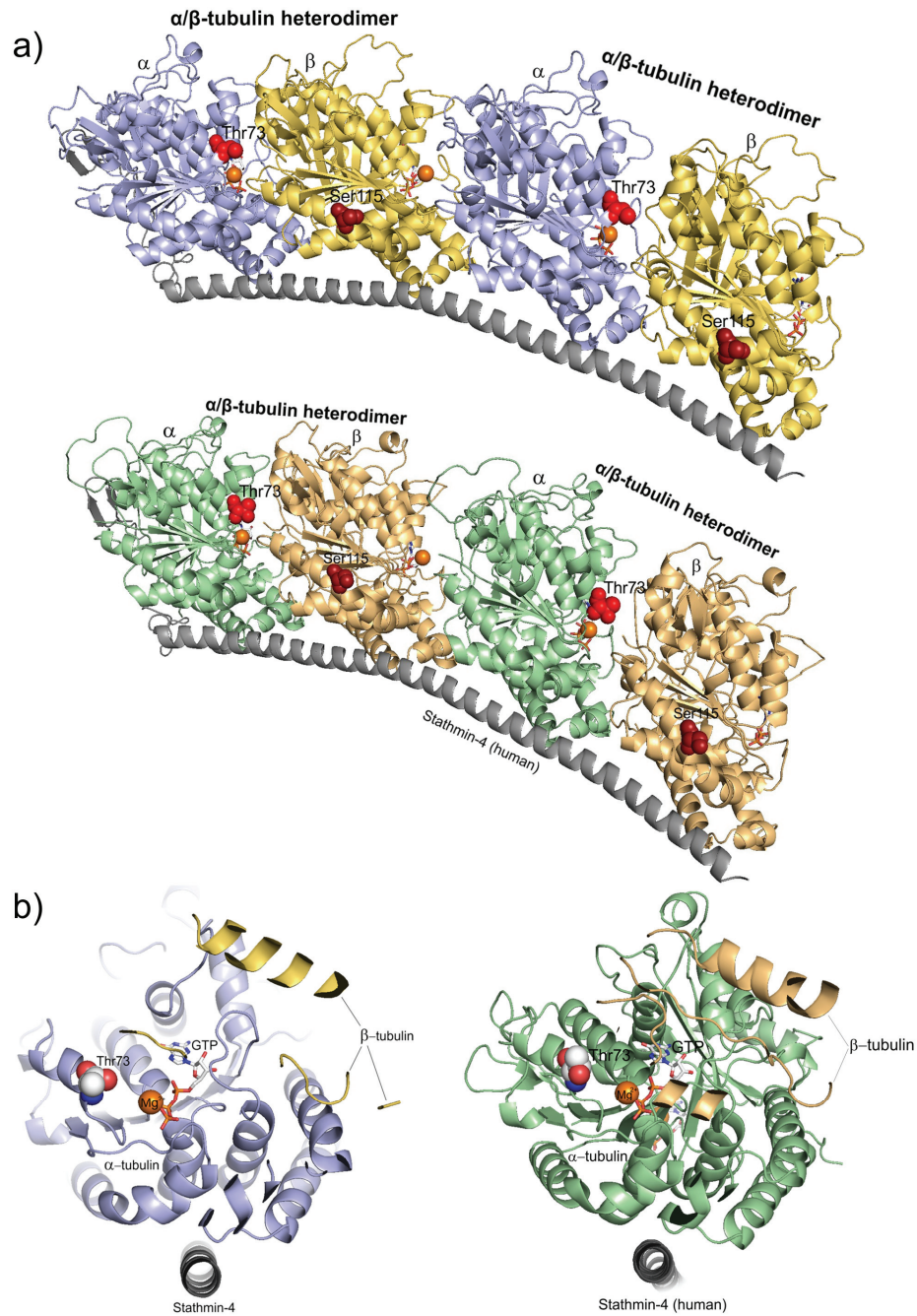


Рис. 5.30. Аналіз структурної топології перспективних сайтів MAST/IREN1-специфічного фосфорилування тубуліну мікротрубочок *H. sapiens* і *A. thaliana*: **a)** топологія Thr73 (81) α -тубуліну і Ser115 β -тубуліну з проекцією на протофіламент мікротрубочок *H. sapiens* (зверху) і *A. thaliana* (знизу); **b)** топологія залишку Thr73 α -тубуліну у внутрішньодимерному контакті молекул α - і β -тубуліну людини (із використанням PDB-структури 6BR1 - зліва) і аналогічної рослинної моделі (праворуч).

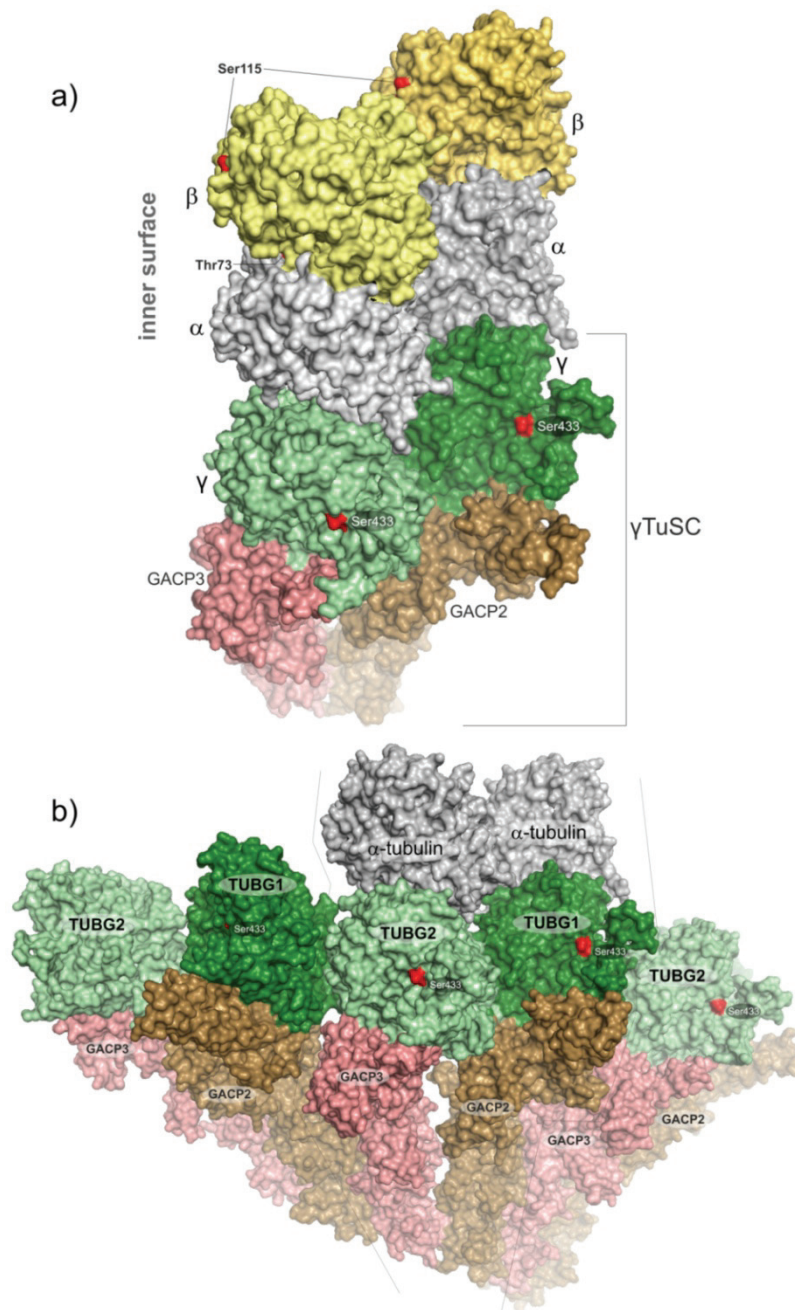


Рис. 5.31. Аналіз топології Ser115 β -тубуліну і Ser433 γ -тубуліну.

Положення Ser115 β -тубуліну свідчить, що фосфорилювання в цьому положенні може впливати на взаємодію із сусідніми протофіламентами мікротрубочки (a). Топологія Ser433 γ -тубуліну передбачає, що цей залишок не впливає на контактні поверхні малого комплексу γ -тубуліну (γ TuSC) або на структуру малого кільця (γ TuSC кільце). (a, b) Зовнішня локалізація Ser433 допускає, що у вищих рослин фосфорилювання цієї амінокислоти може впливати на формування структури великого кільця рослинного γ -тубулінового комплексу первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuRC).

Так, blastp-пошук гомологічних послідовностей для цього сайту в повній базі анотованих послідовностей UniProtKB показав, що перші 100 хітів представлені виключно послідовностями γ -тубуліну з 71-го представника відділу вищих квіткових рослин (Magnoliophyta). Для аналізу топології цього залишку була побудована раніше створена модель фрагменту центру первинної нуклеації мікротрубочок у *A. thaliana*, представлена трьома комплексами γ TuSC [265]. Для отримання повної картини до моделі центрального комплексу γ TuSC було додано два гетеродимера $\alpha\beta$ -тубуліну. Аналіз топології Ser433 із застосуванням зазначеної моделі показав, що амінокислотний залишок Ser433 не зачіпає контактні поверхні γ TuSC кільця (мале кільце). (рис. 5.31) Проте, зовнішня локалізація S433 не виключає можливої участі цієї модифікації в регуляції структури на рівні повної структури рослинного комплексу γ TuRC.

5.8. Узагальнення результатів пошуку сайтів MAST/IREH1-специфічного фосфорилування ізотипів α -, β - і γ -тубуліну і їх кореляція з результатами попередніх досліджень

Таким чином, за результатами профільного пошуку було знайдено два перспективні сайти MAST/IRE-специфічного фосфорилування, консервативні як у людини, так і у арабідопсису: Thr73 (80), існуючий у більшості ізотипів α -тубуліну, і Ser115, виявлений у більшій частині ізотипів тваринного і рослинного β -тубуліну. Третій сайт Ser433 присутній у обох ізотипів γ -тубуліну *A. thaliana*, проте відсутній у ізотипів γ -тубуліну ссавців. Слід зазначити, що залишок Ser433 і його амінокислотне оточення надзвичайно консервативні у різних представників *Magnoliophyta*. Оточення відібраних амінокислот відповідає канонічним мотивам сайтів фосфорилування, а їх топологія підтверджує доступність Ser433 для модифікацій.

Функціональна значущість Thr73 підтверджується тим, що цей залишок α -тубуліну входить до складу сайту зв'язування колхіцину [561].

За даними PhosphoSitePlus, фосфорилування α -тубуліну людини за Thr73 було підтверджено *in vitro* методом мас-спектрометрії (ID: 14582260) [386, 220], а на його важливу роль неодноразово вказували експерименти на різних лініях пухлинних клітин (breast, HeLa, Jurkat and K562) [386, 292, 220].

Було встановлено, що Ser115 β -тубуліну належить до ділянки латерального контакту, завдяки якому взаємодіють суміжні протофіламенти мікротрубочки. Факт фосфорилування Ser115 у ссавців підтверджено результатами фосфопротеомного аналізу клітин HeLa [524], результатами мас-спектрометрії (ID: 4713923) [220, 299, 386] і експериментами на культурах пухлинних клітин (breast, H2009, H2887, HeLa, Jurkat і MKN-45) [220, 292, 299, 386]. Нещодавно було доведено, що Ser115 β -тубуліну з *A. thaliana* може фосфорилуватися протеїнкіназою NEK6 (NIMA-related kinase 6) [533].

Трансфекція рослинного гену *IREH1* з *Vitis vinifera* в клітинну лінію нирок африканської зеленої мавпи (*Vero*) визначила, що продукт експресії гену (фрагмент каталітичного домену) розподілявся в цитоплазмі і колокалізувався з центросомою [73]. Однак наступні експерименти з використанням повного гену *IREH1* з *A. thaliana* продемонстрували відсутність колокалізації IREH1 з центросомами в клітинах із зруйнованою системою кортикальних мікротрубочок та її відновлення після зняття деструктивного впливу і відновлення нативної організації. Отже, взаємодія рослинного IREH1 з центросомою в тваринній клітині залежить від наявності непошкодженої системи мікротрубочок [103]. Водночас, імунопреципітація химерних продуктів конструктів *pEGFP-IREH1* і *pEGFP-C3*, отриманих з лізатів клітин HEK293, не визначила жодної взаємодії з γ -тубуліном ссавців. Рослинний IREH1 у клітинах людини виявляв пряму або опосередковану спорідненість до тваринних центросом, але взаємодії з тваринним γ -тубуліном не відбувалось [103]. Водночас наявність у рослин канонічного сайту MAST / IRE-кіназ знов

повертає нас до питання стосовно автентичності поведінки рослинної IREN1 в рослинній і тваринній клітинах. Результати, отримані під час клонування різних фрагментів і інтактних рослинних IREN1 (GMLK з *Vitis vinifera* і IREN1 з *A. thaliana*) в різних системах тваринних клітин, свідчить, що локалізація в клітині і впізнавання сайтів на поверхні цільових білків, перш за все, залежить від каталітичного домену (N-кінець) і домену асоціації з мікротрубочками (C-кінець). При цьому, каталітичний домен приймає на себе функцію специфічного впізнавання сайту, а домен асоціації з мікротрубочками (MA_Ser / Thr_Kinase_dom) забезпечує первинне позиціонування IREN1 в клітині. Враховуючи розмір рослинної IREN1, віддаленість вищезазначених доменів, результати імунопреципітації, відсутність канонічного сайту у тваринного γ -тубуліну і наявність його у рослинних γ -тубулінів, можна припустити, що фосфорилювання рослинного γ -тубуліну цілком можливо. Первинне позиціонування IREN1, а саме, взаємодія N-кінцевого домену, реалізується не через безпосереднє зв'язування з γ -тубуліном, а через інший, ще невідомий білок центросомального комплексу, консервативний у тварин і вищих рослин. Це співпадає з отриманими раніше результатами прижиттєвого спостереження колокалізації флуоресцентних конструктів pEGFP-IREN1-tr і GFP-IREN1 з тваринною центросомою та пояснює негативні результати імуноблотінгу GFP-IREN1 і IREN1-tr з антитілами до γ -тубуліну. У вищих рослин фосфорилювання γ -тубуліну протеїнкіназою IREN1 найімовірніше має місце. Саме Ser433 рослинного γ -тубуліну проявляє найбільшу подібність до експериментально доведених сайтів MAST-специфічного фосфорилювання (рис. 5.27 і рис. 5.29).

Порівнюючи дані експериментів і результати біоінформатичного дослідження, можна зробити висновок, що Thr73 (80) α -тубуліну і Ser115 β -тубуліну є також цілком можливими мішенями рослинних IREN1 і тваринних MAST. Незважаючи на те, що раніше експериментально було

доведено, що ці сайти є частиною «тубулінового коду» і фосфорилуються *in vitro* [220, 299, 386], їх асоціація з протеїнкіназами IREN1 та MAST пропонується вперше. Консерватизм цих сайтів у тубуліну рослин і тварин підтримує теорію щодо існування не лише структурної, але і певної функціональної подібності рослинних IREN1 і тваринних MAST [73, 103, 265, 275, 277].

Отримані експериментальні дані і результати структурного моделювання дозволяють стверджувати, що механізм центросомального позиціонування і впізнавання субстратів фосфорилування рослинною протеїнкіназою IREN1 має дуальну природу, а саме: N-кінцевій домен відповідає за внутрішньоклітинну локалізацію IREN1, але впізнавання сайту фосфорилування залежить від специфічності каталітичного домену, який розташовано в С-кінцевій частині молекули.

Доведено, що протеїнкінази групи AGC є важливими регуляторами цитоскелету вищих рослин. Дані актуального дослідження, результати аналізу літератури, свідчать, що у рослин роль агентів безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну належить протеїнкіназі IREN1 і протеїнкіназам родини S6K (KPK1 і KPK2).

Порівняння послідовностей, структур і макромолекулярних комплексів α -, β - і γ -тубуліну тваринного і рослинного походження, підтвердило консервативність більшості експериментально-доведених і прогнозованих сайтів AGC-залежного фосфорилування молекул тубуліну. Єдиною відмінністю є присутність у рослин унікального MAST/IRE-специфічного сайту фосфорилування γ -тубуліну за залишком Ser433.

Унікальний для рослин амінокислотний залишок Ser433 γ -тубуліну є найбільш вірогідним сайтом IRE-специфічного фосфорилування, а його топологія дає підстави припустити, що зазначена модифікація може впливати на структуру повного комплексу γ TuRC. Водночас, вплив IRE-специфічного фосфорилування на комплекс малого кільця γ TuSC є

малоймовірним. Відсутність аналогічного сайту у ссавців пояснює експериментальні дані стосовно центросомальної локалізації GFP-конструктів рослинної IREH1 в клітинах лінії 'Vero' і відсутність взаємодії з тваринним γ -тубуліном за результатами імуноблотінгу.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, які відображають результати розділі 5:

1. Chudinova EM, Karpov PA, Fokin AI, Yemets AI, Lytvyn DI, Nadezhkina 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.
2. Karpov PA, Nadezhkina 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.
3. Bryantseva SA, Gavryushina ES, Yemets AI, Karpov PA, Blume YB, Drygin YF, Nadezhkina ES. MAST2-like proteinkinase from grape *Vitis vinifera*: Cloning of catalytic domain cDNA. *Cytol. Genetics*. 2010; 44 (4): 227–232.
4. Karpov PA, Nadezhkina 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).
5. 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.

6. Karpov 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.

Тези:

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. Karpov 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.

12. 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.

13. Karpov 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.

14. Karpov 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.

15. 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

РОЗДІЛ 6

ВКЛАД CMGC-СПЕЦИФІЧНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ В ТУБУЛІНОВИЙ КОД ВИЩИХ РОСЛИН

6.1. Зв'язок CMGC і CMGC-подібних протеїнкіназ з регуляцією системи мікротрубочок і фосфорилюванням тубуліну

На підставі аналізу інформації відповідних статей ресурсу UniProtKB було встановлено, що з 62 канонічних CMGC-кіназ людини спільну локалізацію з мікротрубочками проявляють лише циклін-залежні протеїнкінази 1 (CDC2/CDK1) і 2 (CDK2), мітоген-активована протеїнкіназа 1 (MAPK1/ERK2) і глікогенсинтаза кіназа-3 альфа (GSK3 α) [376]. Раніше було визначено, що протеїнкіназа MNB дрогофіли здатна фосфорилювати β -тубулін за залишком Ser172. Фундаментальна роль фосфорилювання суперконсервативного залишку Ser172 β -тубуліну на інтеграцію гетеродимеру тубуліну в структуру мікротрубочки відома досить давно [153, 271]. Фосфорилювання за цим залишком було доведено для протеїнкінази CDK1 [129, 153], але нещодавно також з'явилися докази причетності до зазначеної модифікації і протеїнкіназ MNB/Dyrk1A [13, 340, 276, 452, 285, 264, 271]. Виходячи з даних літератури, лише рослинні гомологи п'яти з 62 канонічних протеїнкіназ CMGC можуть розглядатися як потенційні регулятори системи мікротрубочок і лише гомологи MNB/Dyrk1A і CDK1 можуть бути причетні до безпосереднього фосфорилювання тубуліну (рис. 6.1). Нещодавно з'явилися докази того, що безпосереднє фосфорилювання α -тубуліну *Trypanosoma equiperdum* може здійснюватися протеїнкіназами CK2 [201], каталітичні субодиниці яких (CK2 α 1 і CK2 α 2) займають найближче філогенетичне положення до канонічних протеїнкіназ CMGC кіному людини [376] (рис.6.1).

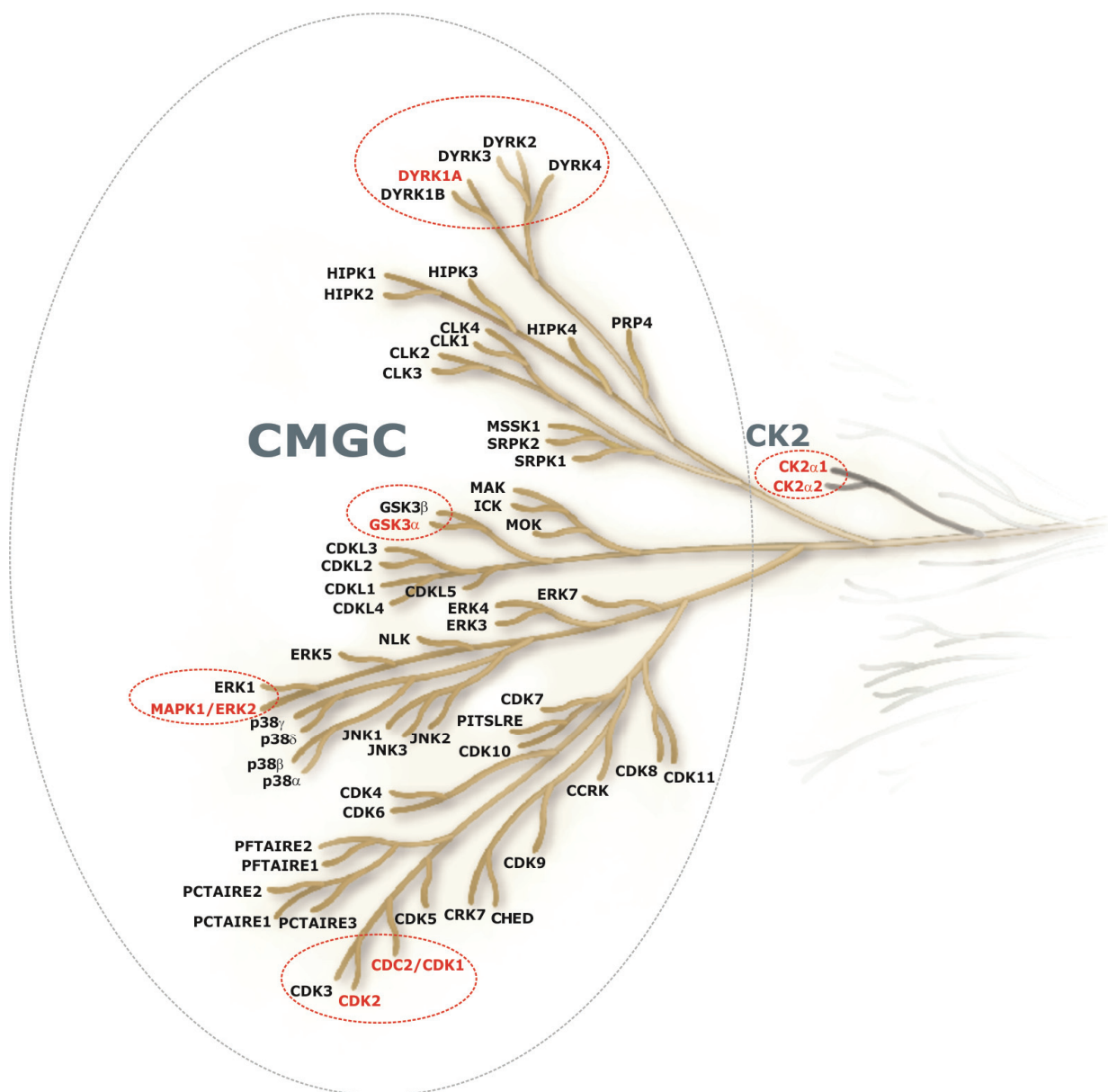


Рис. 6.1. Група CMGC-кіназ і людини і філогенетично близьких каталітичних субодиниць протеїнкінази CK2 (Casein kinase 2), згідно Manning et al. (2002) [376]. Червоним кольором позначено протеїнкінази, для яких, відповідно до даних літератури і UniProtKB [552], існує підтвердження асоціації з системою мікротрубочок: CDC2 (CDK1), CDK2, MAPK1 / ERK2, GSK, MNB / DYRK і CK2 (CK2 α 1 і CK2 α 2).

6.2. Результати пошуку рослинних DYRK-подібних протеїнкіназ на підставі гомології амінокислотних послідовностей

Перш за все, на початку дослідження, було виконано пошук еталонних анотованих послідовностей протеїнкіназ під родини MNB/DYRK. На час дослідження, пошук в базі даних UniProtKB (www.expasy.org) визначив 18 анотованих («Reviewed») послідовностей тваринних DYRK з *Homo sapiens* (Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3, Dyrk4), *Macaca fascicularis* (Dyrk3), *Mus musculus* (Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3, Dyrk4), *Rattus norvegicus* (Dyrk1A, Dyrk3), *Xenopus laevis* (Dyrk1A), *X. tropicalis* (Dyrk1A), *Gallus gallus* (Dyrk2), *Drosophila melanogaster* (Dyrk2 (smi35A), Dyrk3), а також, 2 протеїнкінази (Dyrk1 і Dyrk2) з *Dictyostelium discoideum* (Mycetozoa) [285, 452, 264].

Для первинного визначення наявності потенційних рослинних гомологів Dyrk1A було виконано пошук за допомогою мережевого сервісу SIB BLAST з обмеженням пошуку за групою депонованих в UniProtKB послідовностей рослинного походження («Viridiplantae»). Еталонною послідовністю пошукового запиту була послідовність каталітичного домену Dyrk1A (UniProt ID: Q13627) людини. Первинна вибірка рослинних гомологів нараховувала 90 потенційних протеїнкіназ для яких була визначена наявність інтактного каталітичного домену (за результатами профільного аналізу в SMART). Основні ознаки подібності каталітичних доменів Dyrk1A людини і знайдених рослинних гомологів були на рівні 35-51 % ідентичності і 55-70 % подібності. При цьому, кількість гепів парних вирівнювань складала 1-10 %. Слід зазначити, що на момент дослідження усі рослинні послідовності були депоновані як протеїни з ще невідомою функцією, і, відповідно, мали в UniProtKB статус «Unreviewed». Наступна кластеризація каталітичних доменів знайдених не анотованих рослинних гомологів і анотованих протеїнкіназ MNB / DYRK тварин (Animalia), грибів (Fungi), найпростіших (Protista) і слизивіків (Mycetozoa) була виконана за методом зв'язування найближчих сусідів (NJ). На отриманому філогенетичному

дереві раніше зазначені анотовані DYRK формували спільну кладу, до якої також увійшло 34 рослинні послідовності. З них лише 14 білків було депоновано в UniProtKB як повні послідовності (табл. 6.1, рис. 6.1) [285, 264].

Слід зазначити, що, незважаючи на подібність каталітичних доменів, тваринні протеїнкінази Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk2, Dyrk3 та Dyrk4 мають значні відмінності повних послідовностей, функціонально важливих мотивів, просторових структур і субстратів фосфорилування [170, 193, 187]. Відповідно, зазначені протеїнкінази демонструють значні відмінності у спектрі і характері профілю білок-білкових взаємодій. Для підсилення теорії стосовно можливої функціональної подібності знайдених рослинних гомологів і еталонних тваринних DYRK, було застосовано підхід, коли повні послідовності рослинних гомологів додавались до бази еталонного (анотованого) протеому з метою моделювання можливих білок-білкових взаємодій ксенологічного білку. Подібна реконструкція була виконана за допомогою інструменту STRING v.11 (<http://string-db.org>) із використанням референсного протеому людини ("organism: *Homo sapiens*"). Таке моделювання білок-білкових взаємодій підтвердило відібрані рослинні гомологи як YAK1-подібні протеїнкінази подвійної специфічності (Dual Specificity YAK1-Related Kinases: Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk3, Dyrk4)(рис. 6.1)[588, 264].

Таким чином, на підставі біоінформатичного аналізу було відібрано рослинні гомологи протеїнкіназ DYRK, які на момент дослідження мали статус протеїнів з ще невідомою функцією. Зокрема, за результатами прогнозу білок-білкових взаємодій була визначена можлива функціональна специфікація рослинних YAK1-подібних протеїнкіназ подвійної специфічності: A9U0E5 з *Physcomitrella patens* subsp. *patens*, D7MHY5 з *A. lyrata* subsp. *lyrata*, Q8RWH3 з *A. thaliana* і Q00ZG2 з *Ostreococcus tauri* як потенційні функціональні еквіваленти Dyrk1A; C1MRI0 з *Micromonas pusilla* як потенційний функціональний еквівалент Dyrk1B; A4RXI5 з *Ostreococcus lucimarinus* і Q019C0 з *O. tauri* як потенційні функціональні еквіваленти

Dyrk3; і A9RDR5, A9TA59 з *P. patens* subsp. *patens*, C0PR87 з *Picea sitchensis*, B9SDF7 з *Ricinus communis*, D8RDP5 з *Selaginella moellendorffii*, A9TKQ3 з *P. patens* subsp. *patens* і D8RRY9 з *S. moellendorffii*, як потенційні функціональні еквіваленти Dyrk4 (див. рис. 6.2). Потенційні рослинні гомологи протеїнкінази Dyrk1A - A9U0E5 з *P. patens* subsp. *patens* і Q8RWH3 з *A. thaliana* були відібрані для подальшого моделювання просторової структури і підтвердження структурної гомології.

Таблиця 6.1

Потенціальні рослинні DYRK-подібні протеїнкінази, відібрані на підставі результатів Blastp-сканування бази даних UniProtKB*

UniProt KB	GenBank	Віди рослин	Score	E-value	Ідентичність (%)	Подібність (%)	Гені (%)
A9U0E5	EDQ50859.1	<i>P. patens</i>	238	6e-62	50	66	1
A9RDR5	EDQ82910.1	<i>P. patens</i>	225	4e-58	48	65	2
A9TA59	EDQ59662.1	<i>P. patens</i>	220	1e-56	46	64	1
C0PR87	ACN40327.1	<i>P. sitchensis</i>	238	6e-62	50	69	2
D7MHY5	EFH44710.1	<i>A. lyrata</i>	228	4e-59	47	68	2
Q8RWH3	AED94035.1	<i>A. thaliana</i>	228	5e-59	47	68	2
B9SDF7	EEF38394.1	<i>R. communis</i>	229	2e-59	47	68	2
C1MRI0	EEH57881.1	<i>M. pusilla</i>	226	1e-58	45	68	1
Q00ZG2	CAL56320.1	<i>O. tauri</i>	574	3e-58	45	63	1
A4RXI5	ABO96297.1	<i>O. lucimarinus</i>	199	4e-50	35	55	10
Q019C0	CAL54005.1	<i>O. tauri</i>	196	3e-49	42	62	2
D8RDP5	EFJ29536.1	<i>S. moellendorffii</i>	248	6e-65	51	70	1
A9TKQ3	EDQ56037.1	<i>P. patens</i>	238	6e-62	45	66	3
D8RRY9	EFJ15377.1	<i>S. moellendorffii</i>	230	1e-59	48	64	4

*- було відібрано лише рослинні гомологи, які на час дослідження було депоновано як повні послідовності.

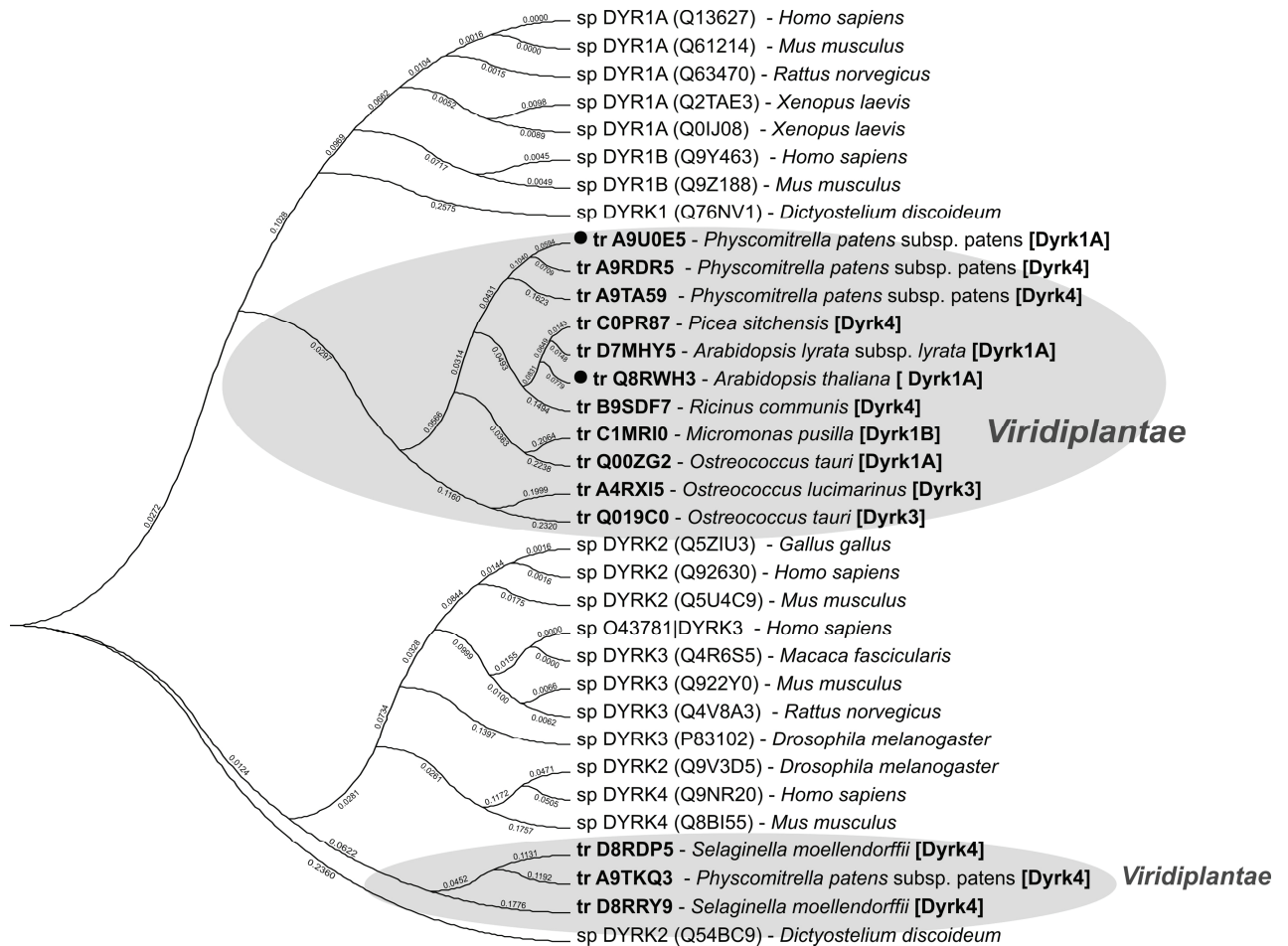


Рис 6.2: Результати спільної кластеризації анотованих YAK1-подібних протеїнкіназ подвійної специфічності (DYRK) і знайдених рослинних гомологів на підставі NJ-кластеризації повних послідовностей і моделювання білок білкових взаємодій: sp і tr - анотовані («Reviewed») і не анотовані («Unreviewed») депонування ресурсу UniProtKB відповідно; Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk3 і Dyrk4 - відповідність рослинного гомологу певним моделям білкових взаємодій, що були встановлені за допомогою сервісу STRING v.11 (із використанням бібліотеки протеому людини); ● - рослинні гомологи тваринної протеїнкінази Dyrk1A, які було відібрано для подальшої реконструкції просторової структури і структурно-функціонального порівняння.

6.2.1. Структурне порівняння каталітичних доменів рослинних Yak1-подібних протеїнкіназ і зв'язаної з цитоскелетом протеїнкінази DYRK1A людини

Для реконструкції моделей просторової структури Dyrk1A людини і її рослинних гомологів з *P. patens* (UniProtKB: A9U0E5) і *A. thaliana* (UniProtKB: Q8RWH3) було виконано шаблонне моделювання із використанням програми MODELLER. Оптимальні шаблонні структури було відібрано на підставі PDB-BLAST пошуку в RCSB Protein Data Bank. За результатами пошуку, PDB-структура 3ANQ протеїнкінази DyrK1A людини було відібрано як оптимальну матрицю згортки для обох рослинних гомологів (A9U0E5 and Q8RWH3). Первинна релаксація отриманих моделей була виконана шляхом мінімізації енергії в вакуумі. Вирішальна оптимізація здійснювалась шляхом моделювання молекулярної динаміки із застосуванням фізіологічної моделі розчиннику Tip3p і силового поля Charmm27 (www.charmm.org). Аналогічний протокол і шаблонну структуру було застосовано для моделювання повноатомної структури каталітичного домену протеїнкінази DyrK1A (UniProtKB: Q13627) людини. Коректність побудованих 3D-моделей Dyrk1A людини і рослинних гомологів була підтверджена за допомогою програми PROCHECK і мережевого сервісу MolProbity. Остаточна перевірка побудованих 3D-моделей була виконана із використанням серверу Verify3D. Структурне порівняння моделей каталітичних доменів рослинних гомологів з *P. patens* (UniProt: A9U0E5) і *A. thaliana* (UniProt: Q8RWH3) з експериментальними x-Ray структурами 3ANQ (2.60 Å, ланцюг A) і 2VX3 (2.40 Å, ланцюг A) протеїнкінази DyrK1A людини підтвердило безсумнівну структурну подібність каталітичних доменів рослинних гомологів і DyrK1A людини (RMS < 1) (рис. 6.3)[452, 264].

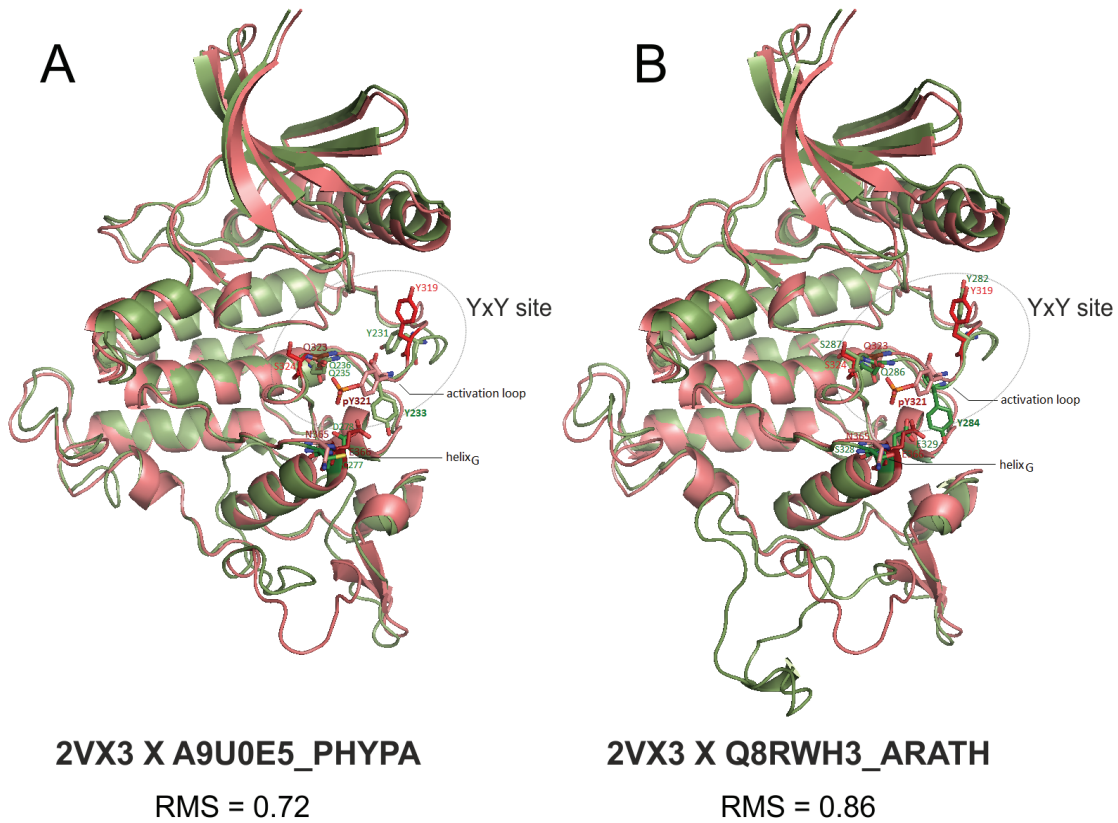


Рис. 6.3. Результати реконструкції просторової структури каталітичних доменів рослинних гомологів (зелений) протеїнкінази Dyrk1A з *P. patens* (A) і *A. thaliana* (B) та їх структурного вирівнювання з експериментальною PDB-структурою 2VX3 (ланцюг A), яка належить протеїнкіназі Dyrk1A людини (рожевий).

6.2.2. Визначення у рослинних Yak1-подібних протеїнкіназ функціонально-важливих елементів структури, які притаманні канонічним представникам MNB/DYRK

Перш за все, у рослинних гомологів була підтверджена наявність мотиву YxY (YxYxxS), розташований в активаційній петлі (також відомої як петля T - «T-loop») каталітичного домену і є характерною рисою протеїнкіназ DYRK. Відомо, що зазначений мотив грає ключову роль в процесі активації протеїнкіназ MNB/DYRK, що пов'язано з процесом аутофосфорилування залишку тирозину активаційної петлі T (Y321 у Dyrk1A людини, Y233 у гомологу з *Physcomitrella* і Y284 у гомолога з *Arabidopsis*) [13, 264]. Також відомо, що перший залишок (глутамін) спіралі G є висококонсервативною

рису, яка дуже рідко зустрічається у протеїніназ інших родин [592]. У Dyrk1A людини, E336 спіралі G співпадає за топологією залишку E329 гомолога з *A. thaliana*. У гомолога з *P. patens* (A9U0E5) у вищезазначеній позиції знаходиться залишок аспарагінової кислоти (D278). Подальший аналіз визначив, що цей залишок аспарагінової кислоти співпадає з першим залишком спіралі_G протеїнінази ImDYRK з *Leishmania mansonii*, яка є підтвердженим ортологом тваринної Dyrk1A (рис.6.4)[592, 264].

Зараз відомо, що представники родини MNB/DYRK відрізняються від інших гомологічних протеїніназ за механізмом активації [194, 592]. Їх перехід у активний стан залежить від тирозин-специфічного автофосфорилування консервативного сайту YxY ($Y^{319}xY^{321}$ у Dyrk1A людини), розташованого у каталітичному домені [194, 13]. Вищезазначене інтрамолекулярне фосфорилування відбувається ще на стадії трансляції, після чого Y-фосфорильовані форми протеїніназ родини DYRK набувають виключно серин/треонінову-специфічність активності [157]. Таким чином, фосфорилування залишку Tyr321 ($Y321 > pY321$) є обов'язковою умовою процесу остаточної активації Dyrk1A (PDB: 2VX3) [38, 39]. Наступне структурне вирівнювання підтвердило ідентичність положення мотиву YxY ($YxYxxS$) в активаційній петлі Dyrk1A людини і відібраних рослинних гомологах, що також слугує аргументом на користь припущення щодо ідентичності механізмів їх активації за механізмом аутофосфорилування залишків тирозину ($Y321$ у Dyrk1A людини, $Y233$ у гомолога з *Physcomitrella* і $Y284$ у гомолога з *Arabidopsis*) [13] (рис. 6.3 і 6.4). Слід зазначити, що мотив YxY було ідентифіковано в активаційних петлях всіх досліджених рослинних гомологів, за виключенням Q019C0 (Ot05g02500) з зеленої водорості *Ostreococcus tauri*, у якій перший залишок тирозину заміщений на фенілаланін (sFtYiqSr). Ця заміна відома і ідентична за мотивом і топологією сайту аутофосфорилування Yak1-подібних протеїніназ, який зустрічається у представників *Saccharomycetes*, зокрема у *Candida albicans* (acYak1, Q5A3L7_CANAL) (рис. 6.4) [264].

	321	323	VIII	365	366
	↓	↓		↓	↓
				helix _G	
DYRK1A HUMAN	317-RIVYQYIQSRFYRSPE-331	<30>	362-SGANEVVDQ-369		
DYRK2 HUMAN	378-RVYTYIQSRFYRAPE-392	<30>	423-PGEDEGDQ-430		
DYRK3 HUMAN	365-KLYTYIQSRFYRAPE-379	<30>	410-PGEDEGDQ-417		
DYRK4 HUMAN	260-KVYTYIQSRFYRSPE-274	<30>	305-PGENEVEQ-312		
dmMNB (MNB DROME)	322-RIVYTYIQSRFYRSPE-336	<30>	367-SGCNEVDQ-374		
scYAK1 YAK1 YEAST	526-TVYTYIQSRFYRAPE-540	<30>	571-PGASEYNQ-578		
acYak1 (Q5A3L7 CANAL)	541-TSETTYIQSRYYRAPE-555	<30>	586-PGKNEYDQ-593		
ddYakA (YAKA DICDI)	362-TLYTYIQSRHYRSPE-376	<30>	407-PGNSEYNQ-414		
ehDYRK (C4LTI6 ENTHI)	267-TLYTYVQSRHYRAPE-281	<30>	312-PGSEFNFQ-319		
lmDYRK (Q4QDI5 LEIMA)	1623-PFYQYIQSRYYRAPE-1637	<30>	1668-PGCNDHHQ-1675		
HIPK1 HUMAN	348-VCSTYIQSRYYRAPE-362	<30>	393-PGASEYDQ-400		
HIPK2 HUMAN	357-VCSTYVQSRYYRAPE-371	<30>	402-PGASEYDQ-409		
MK01 HUMAN (MAPK1)	185-FLTEYVATRWYRAPE-197	<31>	229-PGKHYLDQ-236		
FUS3 YEAST	178-GMTEYVATRWYRAPE-192	<31>	224-PGRDYRHQ-231		
PKR (E2AK2 HUMAN)	444-KRTRSKGTLRYMSPE-458	<28>	487-TAFETSKF-494		
A9U0E5 PHYPA	229-TVYTYIQSRFYRSPE-243	<30>	274-PGACDFDM-281		
Q8RWH3 ARATH	282-TVYSYIQSRYYRSPE-294	<30>	325-PGGSEFDI-332		
A9RDR5 PHYPA	231-TVYTYIQSRFYRSPE-236	<30>	274-PGACDFDM-281		
A9TA59 PHYPA	236-TVYSYIQSRFYRSPE-250	<30>	281-PGQCAAYDL-288		
COPR87 PICSI	295-TVYSYIQSRFYRSPE-309	<30>	340-PGASEYDL-347		
D7MHY5 ARALL	280-TVYSYIQSRYYRSPE-294	<30>	325-PGGSEFDI-332		
B9SDF7 RICCO	174-TVYSYIQSRYYRSPE-186	<30>	217-PGASEYDL-225		
C1MRI0 MICPC	267-TVYQYIQSRFYRSPE-279	<30>	310-PGASEYNL-317		
Q00ZG2 OSTTA	242-TVYQYIQSRFYRSPE-254	<30>	285-PGSEYDL-292		
A4RXI5 OSTLU	225-QVYTYIQSRFYRAPE-237	<30>	268-VGDDEARQ-275		
Q019C0 OSTTA	309-SSETTYIQSRFYRAPE-321	<30>	352-VGDDEARQ-359		
D8RDP5 SELML	645-KIVTYIQSRFYRSPE-657	<30>	688-PGENEVEQ-695		
A9TKQ3 PHYPA	235-KVYTYIQSRFYRSPE-247	<30>	278-PGENEVEQ-285		
D8RRY9 SELML	247-RIVTYIQSRFYRAPE-252	<30>	290-PGEDEVEQ-297		

Рис. 6.4. Порівняння амінокислотного складу ділянок петель активації (P+1 site) і зв'язування з субстратом (helix_G) у канонічних представників MNB/DYRK/YAK1-кіназ, знайдених рослинних гомологів і деяких інших протеїнкіназ групи CMGC (негативний контроль).

Субдомен VIII було визначено згідно Hanks and Hunter (1995)[199]. Консервативний залишок Tyr321 – характерна риса DYRK-подібних протеїнкіназ тварин, дріжджів, слизовиків, найпростіших і рослинних гомологів (за виключенням Q019C0_OSTTA з *O. tauri* і acYak1 з *C. albicans*). Gln323 залишок активаційної петлі, безпосередньо пов'язаний з активацією DYRK-подібних протеїнкіназ і який майже не зустрічається у інших протеїнкіназ. Доведено, що мутації Gln323 і Tyr321 є критичними для каталітичної активності DyrK1A [592]. Glu366-перший залишок спіраліG каталітичного домену також консервативна риса представників DYRK, що рідко зустрічається у інших протеїнкіназ. Проте, мутації Glu366 або менш консервативного Asn365 не впливають на каталітичні властивості DYRK1A [592].

DYRK1A, DYRK2, DYRK3 і DYRK4 – MNB/DYRK кінази з *H. sapiens*; HIPK1 і HIPK2 – гомеодомен-взаємодіючі протеїнкінази 1 і 2 з *H. sapiens*; dmMNB – протеїнкіназа MNB з *D. melanogaster*; scYAK1 – MNB/DYRK-подібна протеїнкіназа YAK1 з *Saccharomyces cerevisiae*; acYak1 – MNB/DYRK-подібна протеїнкіназа YAK1 з *C. albicans*; ddYakA – MNB / DYRK-подібна протеїнкіназа YAK1 (dagB) з *D. discoideum*; ehDYRK – DYRK-подібна протеїнкіназа з *Entamoeba histolytica*; lmDYRK – DYRK-подібна протеїнкіназа з *Leishmania mansonii*; MK01 – мітоген-активована протеїнкіназа 1 (підродина протеїнкіназ MAP) з *H. sapiens*; FUS3 – мітоген-активована протеїнкіназа 1 FUS3 (MAP kinase subfamily) з *S. cerevisiae*; PKR – протеїнкіназа, яка індукується інтерфероном і активується дволанцюговою РНК (родина GCN2) з *H. sapiens*.

Рослинні гомологи: A9U0E5_PHYPA, A9RDR5_PHYPA, A9TA59_PHYPA і A9TKQ3_PHYPA з *P. patens*; Q8RWH3_ARATH з *A. thaliana*; D7MHY5_ARALL з *A. lyrata*; C0PR87_PICSI з *Picea sitchensis*; B9SDF7_RICCO з *Ricinus communis*; C1MRI0_MICPC з *Micromonas pusilla*; Q00ZG2_OSTTA і Q019C0_OSTTA з *O. tauri*; A4RXI5_OSTLU з *O. lucimarinus*; D8RDP5_SELML і D8RRY9_SELML з *S. moellendorffii* [633].

Також нині відомі інші функціонально важливі амінокислотні залишки протеїнкіназ MNB / DYRK, які є характерні виключно для дуально-специфічних YAK1-подібних протеїнкіназ і відсутні у інших представників групі CMGC: Cys289, Cys312, Tyr319 і Gln323 [261]. Розташований в активаційній петлі DYRK-подібних протеїнкіназ, зокрема Dyrk1A людини, залишок Gln323 причетний до реалізації унікального для цих протеїнкіназ активаційного механізму [592]. У ході актуального дослідження типологічно ідентичні консервативні залишки Gln (Q) було знайдено у всіх досліджених рослинних гомологів (рис. 6.4 і 6.5), зокрема, Q235 у A9U0E5 з *P. patens* і Q286 у Q8RWH3 з *A. thaliana* (рис. 6.4 і 6.5) [264].

Відомо, що консервативний для представників MNB / DYRK перший залишок (глутамін) спіраліG дуже рідко зустрічається у інших протеїнкіназ [592]. У Dyrk1A людини E366 в спіраліG був ідентичним за топологією залишку глутамінової амінокислоти E329 гомолога з *A. thaliana* (рис. 6.4). У A9U0E5 з *P. patens* в зазначеній позиції знаходився залишок цистеїну (D278), ідентичний першому залишку спіраліG ImDYRK з *L. mansonii* (рис. 6.4) [264].

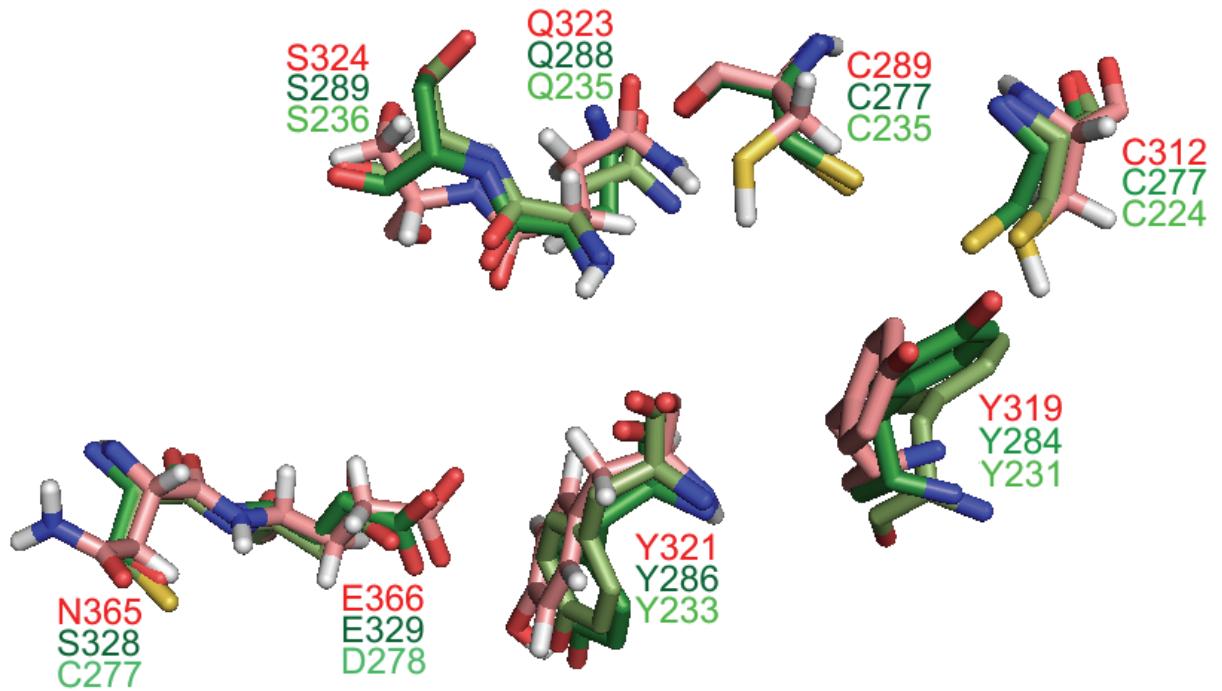


Рис 6.5. Структурне вирівнювання залишків активного сайту Dyrk1A людини і рослинних гомологів з *P. patens* (UniProtKB: A9U0E5; світло-зелений) і *A. thaliana* (UniProtKB: Q8RWH3; зелений).

Як було зазначено, представники родини DYRK мають активаційний механізм, який значно відрізняється від інших протеїнкіназ, що робить його однією з характерних ознак вищезазначеної групи [194, 592]. Каталітичні властивості усіх протеїнкіназ DYRK залежать від аутофосфорилування останнього залишку тирозину консервативного мотиву YxY активаційної петлі каталітичного домену [194, 13]. Таке інтрамолекулярне фосфорилування можливо лише на стадії трансляції, і, незважаючи на відповідність каталітичного домену DYRK-подібних протеїнкіназ профільної моделі кінази дуальної специфічності, «зріла» форма протеїнкіназ DYRK здатна лише до фосфорилування залишків серину і треоніну [157]. У протеїнкінази Dyrk1A (PDB: 2VX3) людини таке аутофосфорилування здійснюється за залишком Tyr321 (Y321>pY321) [38, 40, 39]. З метою визначення наслідків модифікації цього залишку тирозину,

а також для підтвердження подібності зазначеного механізму у канонічних протеїнкіназ DYRK і визначених рослинних гомологів, було виконано структурне порівняння конфірмаційного стану активаційних петель у фосфорильованому і дефосфорильованому станах. Для цього було побудовано повноатомні структурні моделі дефосфорильованих каталітичних доменів (Y321 і типологічно ідентичних амінокислот) і після етапу молекулярної динаміки виконано їх структурне вирівнювання з депонованими у Protein Data Bank автофосфорильованими (pY321) структурами Dyrk1A (2VX3) і Dyrk2 (3K2L і 3KVW). Також, виконувалось порівняння експериментальних структур після видалення фосфату і їх релаксації шляхом молекулярної динаміки в умовах моделі фізіологічного розчину. На рисунку 6.6 (рис. 6.6) наведено результати структурного вирівнювання ділянки, що містить мотив $YxYxxS$ для експериментальних PDB-структур автофосфорильованих «зрілих» DYRKs (рис. 6.6, № 1, 2, 3) і дефосфорильованих (не зрілих) форм Dyrk1A людини (рис. 6.6, № 4) і моделей дефосфорильованих форм рослинних гомологів з *P. patens* (рис. 6.6, № 5) і *A. thaliana* (рис. 6.6, № 6). Положення зазначеного залишку дефосфорильованого тирозину повністю співпадає з положенням Y321 протеїнкінази Dyrk1A у дефосфорильованому стані. Це дає підставу вважати, що молекулярні механізми формування так званої «зрілої» форми Dyrk1A і знайдених рослинних гомологів мають здійснюватись за ідентичним механізмом, шляхом аутофосфорилування залишків тирозину, типологічно ідентичних Y321 Dyrk1A людини. Слід зазначити, що мотив $YxYxxS$ було знайдено в активаційних петлях усіх досліджених рослинних гомологів за виключенням Q019C0 (Ot05g02500) з *Ostreococcus tauri* [264].

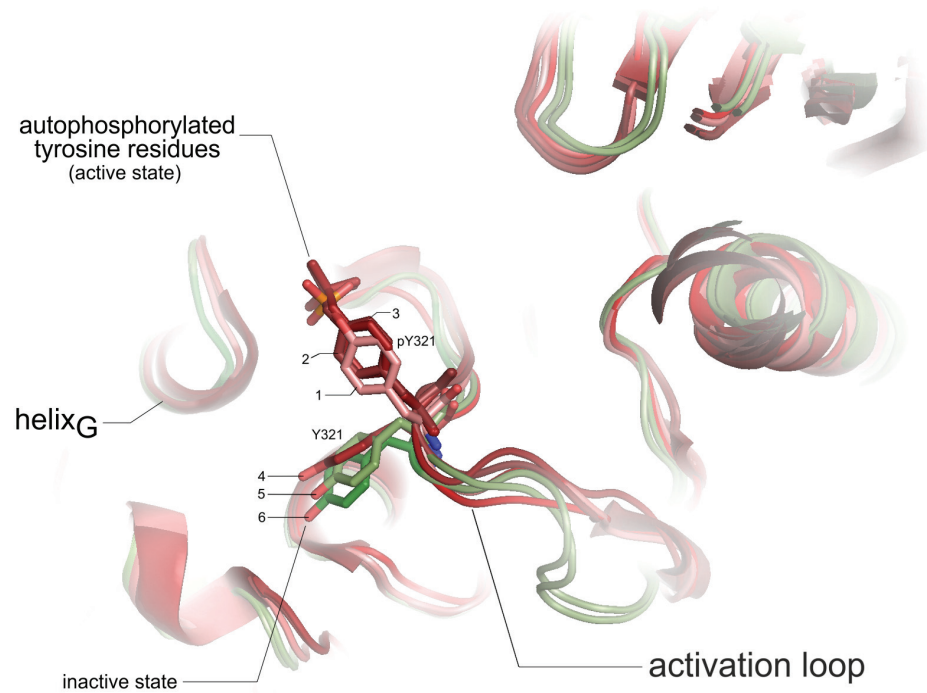


Рис. 6.6. Структурне вирівнювання ділянки активаційної петлі (YxYxxS) у активному (1, 2, 3) - фосфорильованому (pY321), і не активному - не фосфорильованому станах (4, 5, 6), яке визначило ідентичність конформаційних змін активної і не активної форм тваринних DYRK і знайдених рослинних гомологів.

1 - активна форма Dirk1A людини (PDB: 2VX3); 2 (PDB: 3K2L) і 3(PDB: 3KVW) - активні форми Dirk2 людини; 4-неактивна форма Dirk1A людини; 5 - неактивна форма A9U0E5 з *Physcomitrella patens*; 6 - неактивна форма Q8RWH3 з *A. thaliana* (Q8RWH3).

6.2.3. Порівняння АТФ-зв'язуючих карманів і механізмів взаємодії Dirk1A людини і її рослинних гомологів з АТФ-конкурентними інгібіторами

Найбільш поширеним методом експериментального дослідження ролі окремих протеїнкіназ є використання специфічних інгібіторів їх каталітичної активності [413, 622]. Саме тому, наступним логічним кроком було з'ясування і порівняння молекулярних механізмів взаємодії канонічних

інгібіторів Dyrk1A і їх рослинними гомологами. Слід враховувати, що базова активність всіх протеїнкіназ пов'язана з каталізом консервативної реакції переносу залишку фосфату з АТФ на цільовий амінокислотний залишок субстрату. Відповідно, АТФ- конкурентні інгібітори протеїнкіназ, які складають більше 95 % існуючих інгібіторів, діють через зв'язування і блокування саме цієї досить консервативної АТФ- зв'язуючої кишені [622]. Водночас, існує ряд факторів і унікальних особливостей, які обумовлені певними відмінностями амінокислотного оточення сайту АТФ-зв'язуючої ділянки у різних протеїнкіназ, що викликає зміни геометрії кишені і утворює локальні перепони для окремих лігандів [622]. На сьогодні, існує декілька експериментально підтверджених АТР-конкурентних інгібіторів, які проявляють досить селективну дію відносно тваринних Dyrk1A [520, 530]. З метою первинного оцінювання функціональної подібності АТФ-зв'язуючої кишені Dyrk1A людини і рослинних гомологів, а також для розуміння ключової ролі окремих амінокислотних залишків зазначеного сайту, було виконано вирівнювання експериментальних PDB-структур DyrK1A (PDB ID: 2VX3, 3KVV, 3ANQ, 1Q8Y) зв'язаних з інгібіторами: ЕНВ ((1z)-1-(3-етил-5-гідрокси-1,3-бензотіазол-2 (3H)-іліден)пропан-2-он), d15 (N-(5-{{(2S)-4-аміно-2-(3-хлорфеніл)бутаноіл]аміно}-1H-індазол-3-іл)бензамід) [520], IRB ((2Z,3E)-7'-бром-3-(гідроксиіміно)-2'-оксо-1,1',2',3'-тетрагідро-2,3'-бііндол-5-карбонової кислоти) [39] і АДФ [414].

Це дозволило установити спільні риси гетероциклічного ядра зазначених лігандів (рис. 6.7) і визначити найбільш важливі для взаємодії атоми лігандів і біологічно-активні конформації (зокрема, АДФ і інгібітору d15), що було необхідно для наступного докінгу і коректної реконструкції ліганд-білкових комплексів. Отримана інформація враховувалась під час відпрацювання протоколу докінгу на моделі взаємодії Dyrk1A людини з ADP і d15 засобами CCDC Gold. [264] Аналіз взаємодії лігандів з цільовими білками виконувався із використанням програми LigandScout (www.inteligand.com), що дозволило визначити фармакофори, функціонально

важливі групи і атоми ліганду і мішені, які приймають участь у формуванні комплексу. Зазначений аналіз, виконувався в автоматичному режимі на підставі показників дистанції і відповідних конформаційних кутів (рис. 6.7) [264].

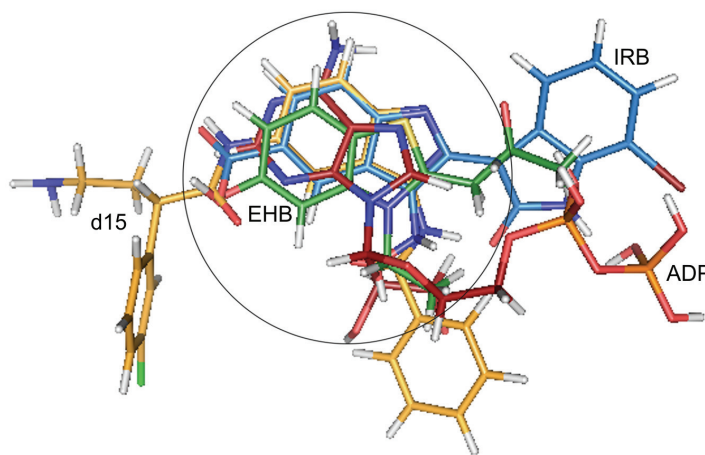


Рис. 6.7. Вирівнювання біологічно-активних конформацій Dugk1A-специфічних інгібіторів (EHB, d15 і IRB) і АДФ, отримане шляхом ліганд-орієнтованого структурного вирівнювання ліганд-білкових комплексів, що дозволило визначити їх спільні властивості і подібність гетероциклічного ядра.

Було визначено амінокислотні залишки Dugk1A людини, які приймають участь у формуванні сайту зв'язування цільових лігандів: Gly166, Gly168, Phe170, Gly171, Gln172, Val173, Ala186, Val222, Phe238, Glu239, Leu241, Asn244, Leu245, Lys289, Glu291, Asn292, Leu294 і Asp307. Наступне структурне вирівнювання Dugk1A людини і побудованих структурних моделей рослинних гомологів з *A. thaliana* і *P. patens* підтвердило ідентичність положення амінокислотних залишків, які приймають участь у формуванні інтерфейсів і структурі сайту. В свою чергу, аналіз позицій лігандів (рис. 6.8) дозволив визначити і порівняти основні фактори, що обумовлюють їх взаємодію (водневі зв'язки, гідрофобність, центри негативних і позитивних зарядів та ін.) і виключити з подальшого дослідження сполуки EHB і IRB.

Аналіз сайту зв'язування гомологічної дріжджової (*S. cerevisiae*) SR протеїнкінази Sky1p (PDB: 1Q8Y) дозволив визначити додаткову групу амінокислот, які також приймають участь в формуванні фосфат-зв'язуючої кішени і можуть бути залученні до взаємодії з АДФ (Lys187, Phe169, Ser170, Glu247, Leu249, Asn252, Glu298 і Asp550) та зв'язування d15 в структурі 2VX3 з *H. sapiens* (Glu239, Leu241 та Asn292) (рис. 6.8).

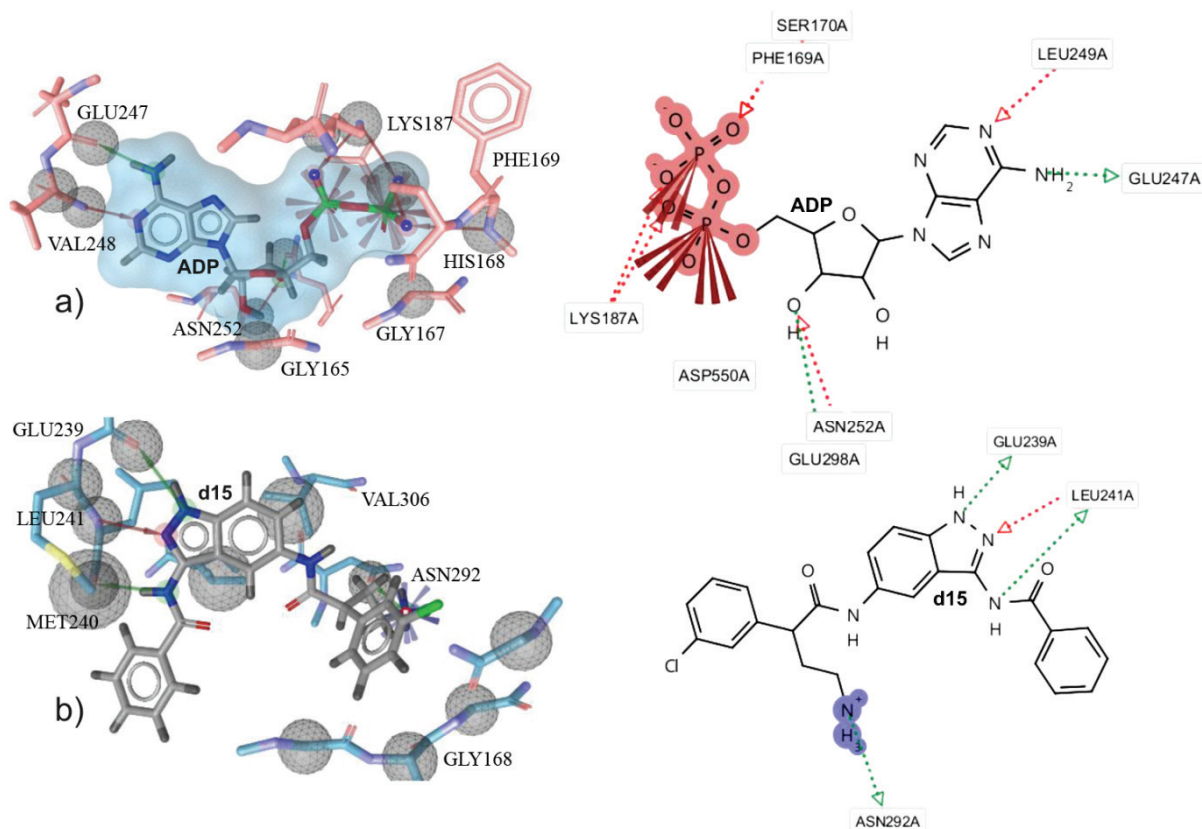


Рис. 6.8. Фармакофорні 3D-моделі і планарні карти взаємодії АДФ (а) і d15 (б) з активними сайтами цільових протеїнкіназ, які визначили активні конформації лігандів і амінокислотні залишки, що приймають участь у взаємодії на прикладі експериментальних x-Ray структур:

а) 1Q8Y - PDB-структура дріждевої (*S. cerevisiae*) протеїнкінази Sky1p в комплексі з АДФ (ADP);

б) 2VX3 - PDB-структура Dyrk1A людини в комплексі з специфічним інгібітором d15.

6.2.4. Підтвердження взаємодії тваринних і рослинних DYRK-подібних протеїнкіназ з лігандами на підставі результатів обрахунку молекулярної динаміки

Для визначення консервативних залишків АТР-зв'язуючої кишені було виконано вирівнювання PDB-структур гомологічних комплексів Dyrk1A людини (PDB: 2VX3, 3ANQ), Dirk2 (PDB: 3KVV) і Sky1p дріжджового (*S. cerevisiae*) походження (PDB: 1Q8Y - найбільш близька CMGC структура до Yak1). За результатами вирівнювання було визначено амінокислотні залишки, потенційно важливі для формування структури сайту і зв'язування лігандів (рис. 6.9, a, b, c, d). Це дозволило визначити d15 як найбільш перспективний інгібітор Dyrk1A і відібрати його як найбільш оптимального кандидата для подальшого молекулярного докінгу і підтвердження взаємодії на підставі результатів молекулярної динаміки. Слід зазначити, що з усіх досліджених сполук лише d15 в активній конформації (дані комплексу 2VX3) мав розмір і об'єм близький до АДФ у складі комплексу 1Q8Y з *S. cerevisiae*. Тому для наступного докінгу було відібрано саме d15. У якості мішені було використано структуру Dyrk1A людини (контроль) і моделі двох раніше відібраних рослинних MNB/DYRK-подібних протеїнкіназ з *P. patens* і *A. thaliana*. Рухливість і властивості латеральних груп ліганду і амінокислот цільового сайту було задано згідно до результатів попереднього фармакофорного аналізу (рис. 6.8).

Як було згадано раніше, мотив $YxYxxS$ активаційної петлі протеїнкінази Dyrk1A людини і рослинних гомологів цілком співпадає, що передбачає подібність механізму їх активації через фосфорилування відповідного залишку тирозину (Y321 у Dyrk1A людини, Y233 у гомологу з *Physcomitrella* і Y284 у гомологу з *Arabidopsis*): $YxYxxS \rightarrow YxP(Y)xxS$ (рис. 6.3 і 6.6) [13]. Це передбачало врахування зазначеного фактору під час підготовки систем для моделювання молекулярної динаміки. Враховуючи те, що функціонально-активними протеїнкінази DYRK стають лише після аутофосфорилування

зазначеного сайту, було виконано моделювання фосфорильованного стану зазначених залишків тирозину (pY) рослинних гомологів з *Physcomitrella* і *Arabidopsis*. Моделювання фосфорильованного стану було виконано за допомогою редактору Marvin Sketch (<https://docs.chemaxon.com>). Відповідний електростатичний потенціал (ESP) було розраховано за допомогою інструменту RESP ESP charge Derive (<http://q4md-forcefieldtools.org>). Побудовані моделі було занурено у водні бокси з імітацією фізіологічного розчину з шаром покриття = 5 Å. Наступна структурна оптимізація була виконана згідно протоколу мінімізації енергії за алгоритмом методу найшвидшого спуску (20000 кроків). Після чого атоми головного ланцюгу кожного з білків «заморожувались», а молекулярна динаміка з обмеженням часу в 100 пс. виконувалась за умов рухливості лише латеральних груп і молекул розчинника. Розрахунки молекулярної динаміки було виконано за періодичних граничних умов (PBC) із використанням ізотермічно-ізобарного ансамблю NPT, що досягалося за допомогою термостату Берендсена (за умов статичних показників $T = 310 \text{ K}$ і $P = 1 \text{ бар}$) з кроком фреймів в 2 фс. Електростатичні взаємодії було визначено за допомогою алгоритму PME [150] з розміром вічка = 0.12 nm і врахуванням інтерполяції. Ван-дер-Ваальсові взаємодії розраховувались з відсіканням в 10 Å і кроком збереження нових координат = 100 пс. На фінальному етапі було виконано моделювання 5 нс вільної молекулярної динаміки за умов температури = 310 K. (рис. 6.9)

Середньоквадратичне відхилення зміщень атомів ліганду (RMSD) і поверхневий питомий опір сил кулонівської взаємодії (Coulomb-SR) між сайтом зв'язування і d15 становили приблизно 0,1 нм і -221,4 кДж/моль відповідно (рис. 6.9). Загалом, за результатами обчислень було відзначено лише незначну відмінність у показнику середньої кількості динамічного формування водневих зв'язків між лігандом і сайтом зв'язування. У випадку моделювання взаємодії d15 з Dyrk1A людини і його взаємодії з рослинними гомологами з *A. thaliana* (UniProt: Q8RWH3 / AtYAK1) і *P. patens* (UniProt: A9U0E5), середня кількість водневих зв'язків була однакою і складала 4.1.

Результати обрахунків цілком підтверджують не лише ідентичність структурної, але і біофізичної складової взаємодії Dyrk1A людини і відібраних рослинних гомологів. Таким чином, отримані дані підтверджують можливість використання інгібіторів тваринної протеїнкінази Dyrk1A для прижиттєвого дослідження функціональної ролі рослинних MNB/DYRK-подібних протеїнкіназ. На рисунку 6.10 наведено останні фрейми молекулярної динаміки досліджених комплексів (рис. 6.10a, b, c).

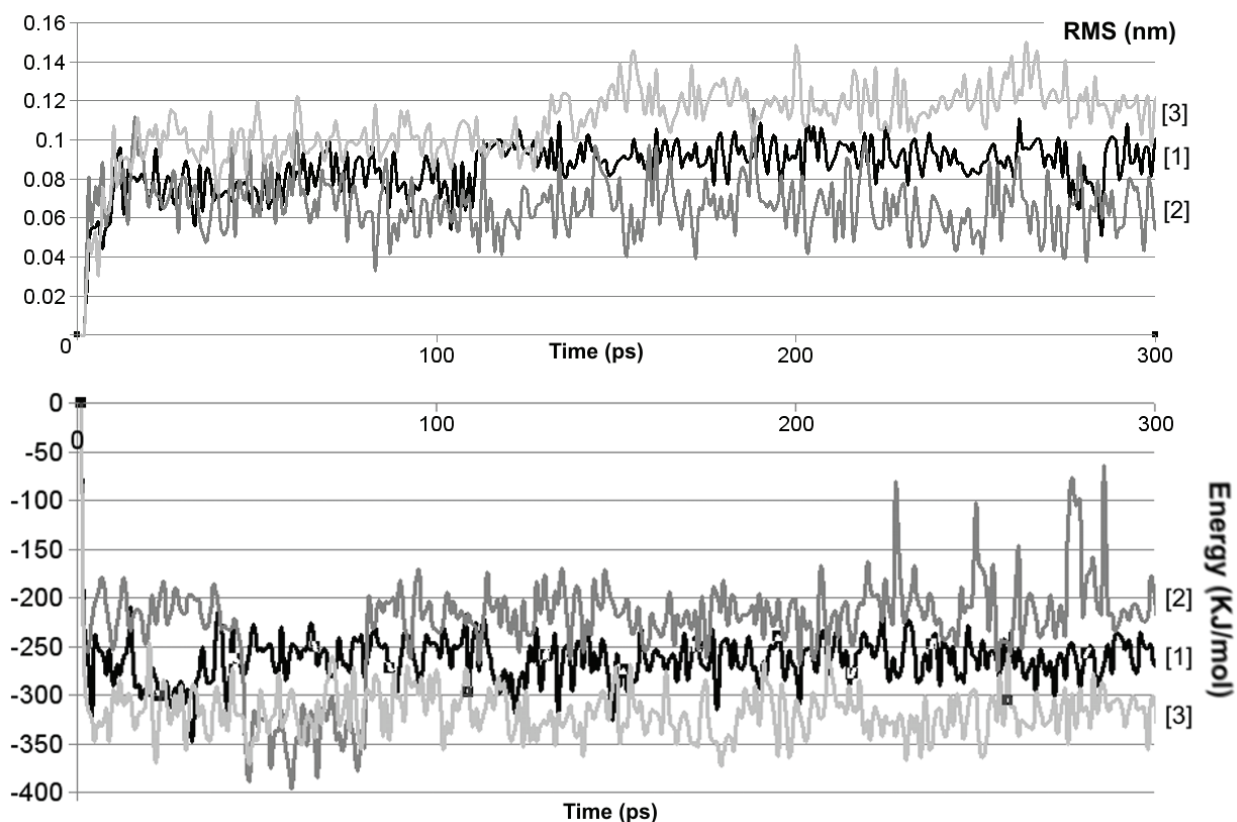


Рис. 6.9: Результати розрахунку коливань RMS (a) і кулонівських енергій електростатичних взаємодій (b) інгібітору d15 з сайтом мішені на протязі 6 нс моделювання молекулярної динаміки: 1) Dyrk1A людини, 2) рослинний гомолог (Q8RWH3) з *A. thaliana*, 3) рослинний гомолог (A9U0E5) з *P. patens*.

Молекулярна динаміка Dyrk1A і рослинних гомологів в комплексі з d15 підтвердила ідентичність механізму їх ліганд-білкової взаємодії. Вирішальним фактором, що визначав положення і конформацію лігандів в

цільових сайтах, було динамічне утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками мішені: комплекс d15 з Dyrk1A людини (рис. 6.10a); комплекс d15 і AtYAK1 (Q8RWH3) з *A. thaliana* (рис. 6.10b); комплекс d15 і A9U0E5 з *P. patens* (рис. 6.10c).

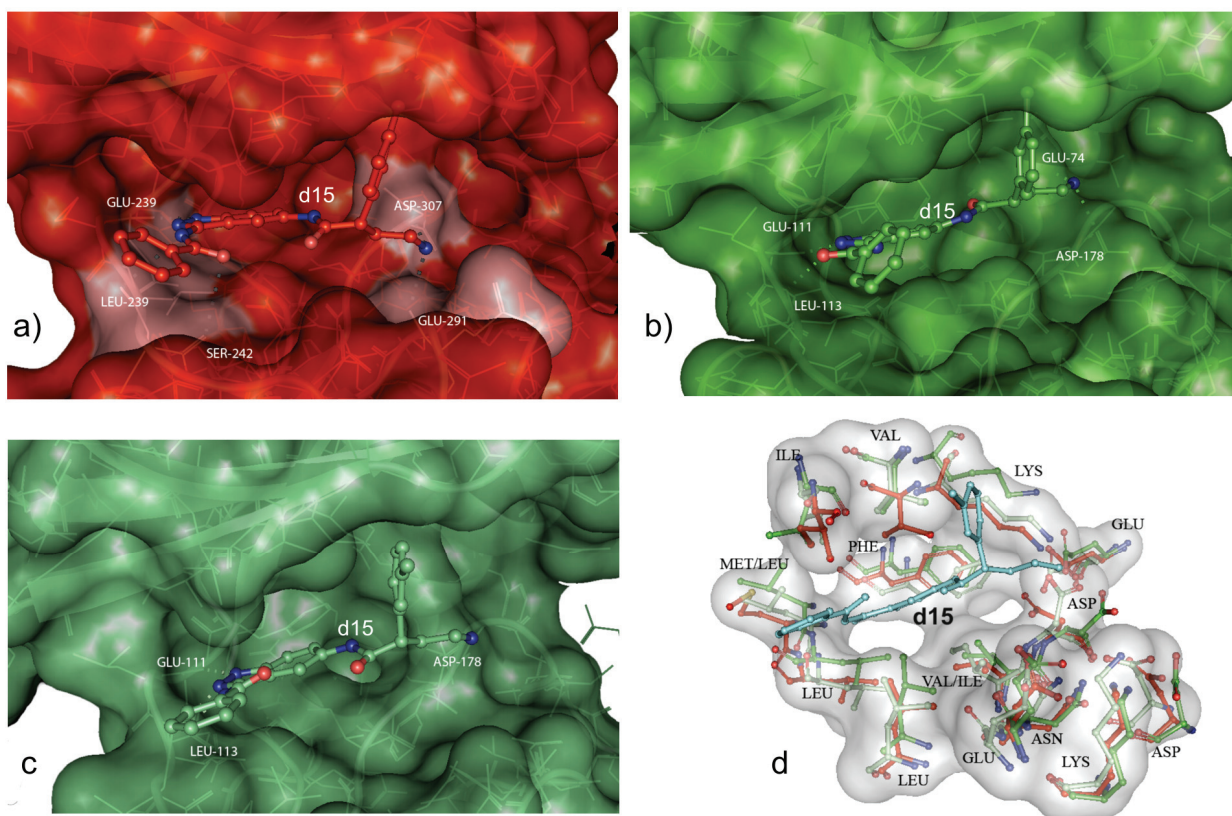


Рис. 6.10. Останні фрейми молекулярної динаміки комплексів Dyrk1A і рослинних гомологів з селективним інгібітором d15. Положення і конформації лігандів в цільових сайтах були обумовлені динамікою утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками мішені: **a)** комплекс d15 з Dyrk1A людини; **b)** комплекс d15 і AtYAK1 (Q8RWH3) з *A. thaliana*; **c)** комплекс d15 і A9U0E5 з *P. patens*; **d)** всі амінокислотні залишки, які були здатні утворювати зв'язки з лігандом.

Також перед початком обрахунку молекулярної динаміки, було визначено всі амінокислотні залишки, які були потенційно здатні утворювати зв'язки з лігандом (рис. 6.10d). Проведене структурне вирівнювання зазначених амінокислот сайту (рис. 6.10d) підтверджує його подібність у

Dyrk1A і рослинних гомологів. Світлими поверхнями активного сайту моделі Dyrk1A людини позначено положення амінокислот Leu239, Glu239, Ser242, Glu291 і Asp307, які грали ключову роль у формуванні водневих зв'язків з d15 за результатами обрахунку (рис. 6.10а). За результатами молекулярної динаміки була підтверджена ідентичність топології і функціонального навантаження гомологічних амінокислотних залишків у рослинних гомологів з *A. thaliana* і *P. patens*.

Таким чином, спираючись на результатів актуального дослідження, використання Dyrk1A-специфічного інгібітору d15 для прижиттєвого дослідження функціональної ролі рослинних протеїнкіназ YAK1 (Q8RWH3 і A9U0E5) цілком обгрунтоване.

6.3. Роль MNB/DYRK-подібних протеїнкіназ в регуляції цитоскелету і вклад Dyrk1A в тубуліновий код

Найближчі рослинні гомологи тваринної Dyrk1A (Q8RWH3 з *A. thaliana* і A9U0E5 з *P. patens*) проявляють очевидну подібність послідовностей, просторової структури, механізму активації каталітичного домену і механізму взаємодії з MNB/DYRK-специфічним інгібітором d15. Отримані дані дозволяють стверджувати, що зазначені білки дійсно належать до YAK1-подібних протеїнкіназ і тому можуть вважатися рослинними еквівалентами тваринних протеїнкіназ DYRK, MNB з *D. melanogaster* і YAK1 з *S. cerevisiae* [264, 457, 276]. Слід зазначити, що на момент публікації результатів дисертаційного дослідження, рослинні Dyrk1A-подібні гомологи були ще невідомі і їх існування було показано вперше [264, 457, 276]. Через рік, у 2015 році, з'явилося ще декілька робіт і на сьогодні основний рослинний об'єкт – білок з невідомою функцією Q8RWH3 з *A. thaliana* має статус анотованого білка, який депоновано в UniProtKB як Dual specificity protein kinase YAK1 (UniProtKB: Q8RWH3 / YAK1_ARATH) homolog або

AtYak1 [295, 230, 552, 271]. Таким чином, функціональна автентичність AtYak1 і тваринної Dirk1A є офіційно визнаним фактом [552, 271].

Вплив протеїнкіназ MNB/DYRK1A на систему мікротрубочок було показано досить давно, проте їх здатність до безпосереднього фосфорилування тубуліну залишалась гіпотетичною аж до середини другого десятиріччя цього сторіччя [420, 271]. Лише в 2016 році з'явилася перша робота, в якій на прикладі нейронів *Drosophila melanogaster* було доведено, що MNB фосфорилує Ser172 β -тубуліну [420, 271]. Авторами була доведена ідентичність механізму фосфорилування цього сайту β -тубуліну і тваринного гомолога – протеїнкінази DYRK1A [420]. Зараз відомо, що Ser172 β -тубуліну є одним з ключових сайтів регуляції росту мікротрубочок. Так, фосфорилування Ser172 іншою протеїнкіназою групи CMGC – CDK1 запобігає інтеграції гетеродимерів $\alpha\beta$ -тубуліну в структуру протофіламенту, що контролює ріст мікротрубочки під час клітинного циклу [153]. Таким чином, модифікація Ser172 є прикладом безпосередньої участі фосфорилування у модуляції тубулінового коду і контролі динамічної нестабільності мікротрубочок.

Ser172 розташовано всередині петлі T5 β -тубуліну, яка топологічно межує з сайтом гідролізу GTP, входить до контактному інтерфейсу плюс-кінця мікротрубочки і впливає на збирання гетеродимерів в протофіламенти [412, 239, 271]. Спираючись на цю інформацію і враховуючи подібність послідовностей, було виконано порівняння Ser172-фрагментів ($S172 \pm 10$) всіх відомих ізотипів β -тубуліну з *H. sapiens*, *S. scrofa*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* і *A. thaliana* [271]. Незважаючи на консервативність цільового залишку і значну подібність послідовностей, існують певні внутрішньо- і міжвидові відмінності у амінокислотному оточенні зазначеного сайту (рис. 6.11). Оскільки, специфічність взаємодії з субстратом фосфорилування в значній мірі визначається амінокислотним оточенням сайту [519], для констатації консервативності CMGC-специфічного фосфорилування Ser172 у рослин необхідно було оцінити консервативність цього сайту. Тому було

виконано вирівнювання вищезазначених фрагментів послідовностей β -тубуліну з *A. thaliana* і контрольних послідовностей з *H. sapiens*, *S. scrofa*, *S. cerevisiae* і *D. melanogaster*. Для візуального оцінювання подібності виконали кластеризацію на підставі результатів попереднього вирівнювання фрагментів.

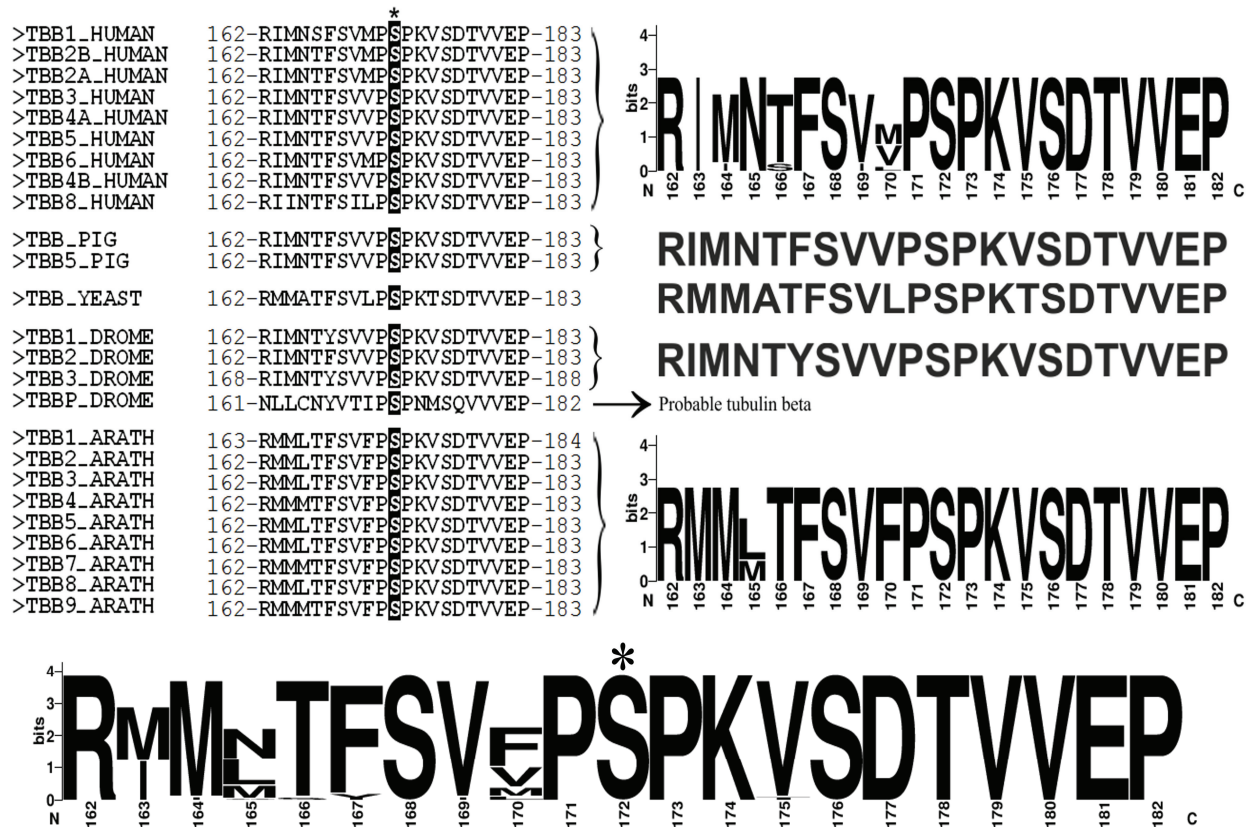


Рис. 6.11. Порівняння ділянок сайту Ser172 ізотипів β -тубуліну з *H. sapiens* (HUMAN), *S. scrofa* (PIG), *S. cerevisiae* (YEAST), *D. melanogaster* (DROME) і *A. thaliana* (ARATH). Результуючий лог об'єднує всі сайти, за винятком нетипової послідовності потенційного β -тубуліну – TBBP_DROME з *D. melanogaster*.

Результати спільної кластеризації (рис. 6.12) свідчать, що фрагменти з *A. thaliana* утворили окрему компакту кладу, що підтверджує подібність сайту Ser172 у всіх ізотипів β -тубуліну арабідопсису. Водночас, найбільшу

подібність ця група проявила до відповідних фрагментів β -тубуліну з *S. cerevisiae*, ніж до сайтів з *H. sapiens*, *S. scrofa* і *D. melanogaster*.

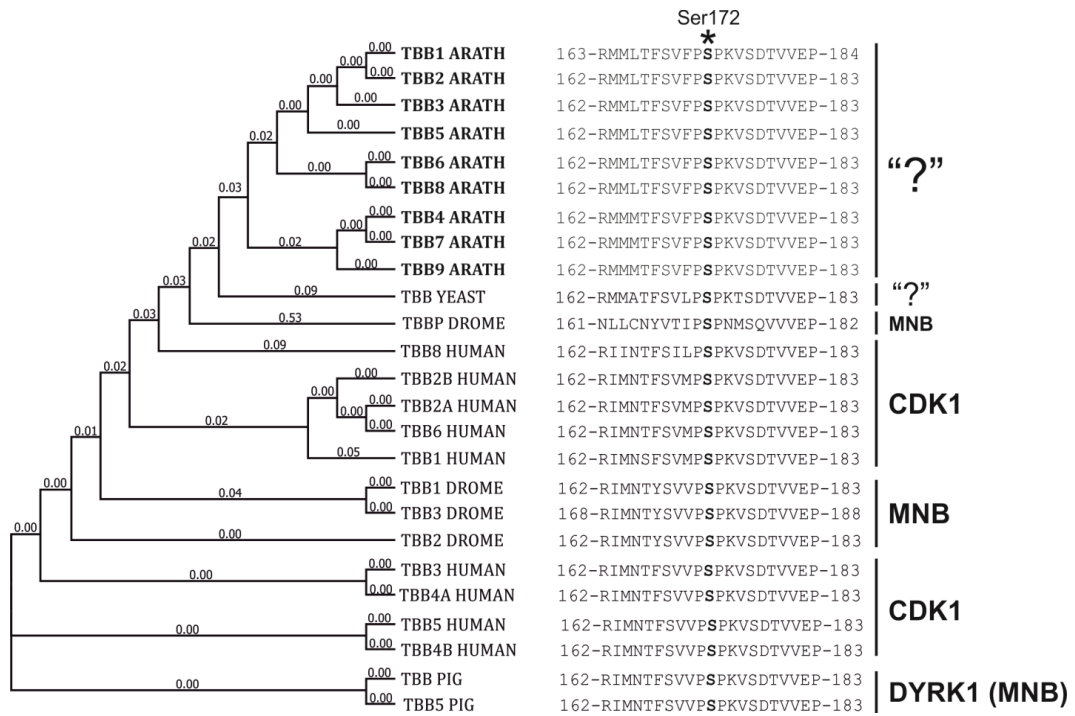


Рис. 6.12. Результати спільної кластеризації фрагментів, які відповідають сайту Ser172 у різних ізотипів β -тубуліну *H. sapiens* (HUMAN), *S. scrofa* (PIG), *S. cerevisiae* (YEAST), *D. melanogaster* (DROME) і *A. thaliana* (ARATH).

Примітка: Праворуч, вказано назви асоційованих з сайтом протеїнкіназ згідно із даними експериментів [153, 420]. “?” – сайт було визначено на підставі гомології.

На сьогодні, у випадку як CDK1-залежного, так і у Dyrk1A-залежного фосфорилування Ser172, експериментально підтверджена участь зазначених протеїнкіназ в регуляції росту мікротрубочок під час клітинного циклу і морфогенезу нейронів [153, 420, 454]. Спираючись на дані літератури, інформацію з UniProtKB і гомологію послідовностей, було відібрано найбільш близькі циклін-залежні кінази 1 (CDK1) і YAK1-подібні протеїнкінази подвійної специфічності (Dyrk1/Dyrk1A/MNB/Yak1) з *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* і *A. thaliana* (Табл. 6.2). Як

зазначалось раніше, загальноприйнятим критерієм оцінки подібності протеїнкіназ була спільна кластеризація послідовностей їх каталітичних доменів [376, 133]. Кластеризація каталітичних доменів відібраних циклін-залежних протеїнкіназ 1 (рис. 6.13а) і YAK1-подібних протеїнкіназ подвійної специфічності (рис. 6.13б) засвідчила, що в обох випадках найбільшу подібність рослинні протеїнкінази з *A. thaliana* проявляли по відношенню до гомологів (CDK1 і YAK1) з *S. cerevisiae* (рис. 6.13).

Таблиця 6.2

Циклін-залежні протеїнкінази 1 і YAK1-подібні протеїнкінази подвійної специфічності, асоційовані з фосфорилуванням Ser172 β -тубуліну
(за результатами лабораторних експериментів і біоінформатичного аналізу)

Вид	CDK1	Dyrk1A/MNB/Yak1	Джерело інформації
<i>H. sapiens</i>	CDK1 (P06493)	Dyrk1* (Q13627)	[153] (for CDK1), [420] (for Dyrk1)
<i>S. cerevisiae</i>	CDK1 (P00546)	YAK1 (P14680)	[89] опосередковані дані у випадку CDK1 і прогнозування у випадку YAK1
<i>D. melanogaster</i>	CDK1 (P23572)	MNB (P49657)	Прогнозування (у випадку CDK1), [420] (у випадку MNB)
<i>A. thaliana</i>	CDKA1 (P24100)	AtYAK1 (Q8RWH3)	Біоінформатичне прогнозування

* - на підставі гомології з Dyrk1 / MNB-протеїнкіназою свині (*S. scrofa*, UniProtKB: I3L9V1)

Наступне структурне моделювання каталітичних доменів і порівняння їх координат (після оптимізації за допомогою силового поля AMBER94) підтвердило значну подібність структурної організації циклін-залежних і MNB/DYRK1A/YAK1-кіназ *A. thaliana* і *S. cerevisiae* (рис. 6.13а, б). У циклін-залежних кіназ 1 (рис. 4а) показник RMS становив 0,763, а у протеїнкіназ AtYAK1 і YAK1 показник RMS становив 0,585 (рис. 4б), що істотно менше граничного показнику (RMS=1), і, як і випадку порівняння з тваринними

CDK1 і Dyrk1A, підтверджує належність рослинних гомологів до зазначених родин.

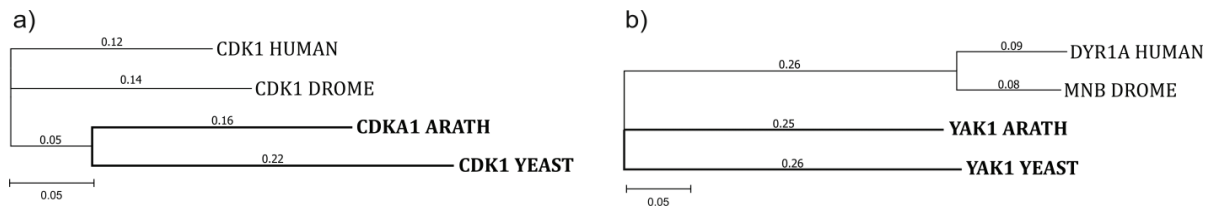


Рис. 6.13. Результати NJ-кластеризації каталітичних доменів циклін-залежних протеїнкіназ 1 (CDK/CDKA1) (a) і YAK1-подібних протеїнкіназ (MNB/DYRK1A/YAK1) (b) з *H. sapiens* (HUMAN), *S. cerevisiae* (YEAST), *D. melanogaster* (DROME) и *A. thaliana* (ARATH).

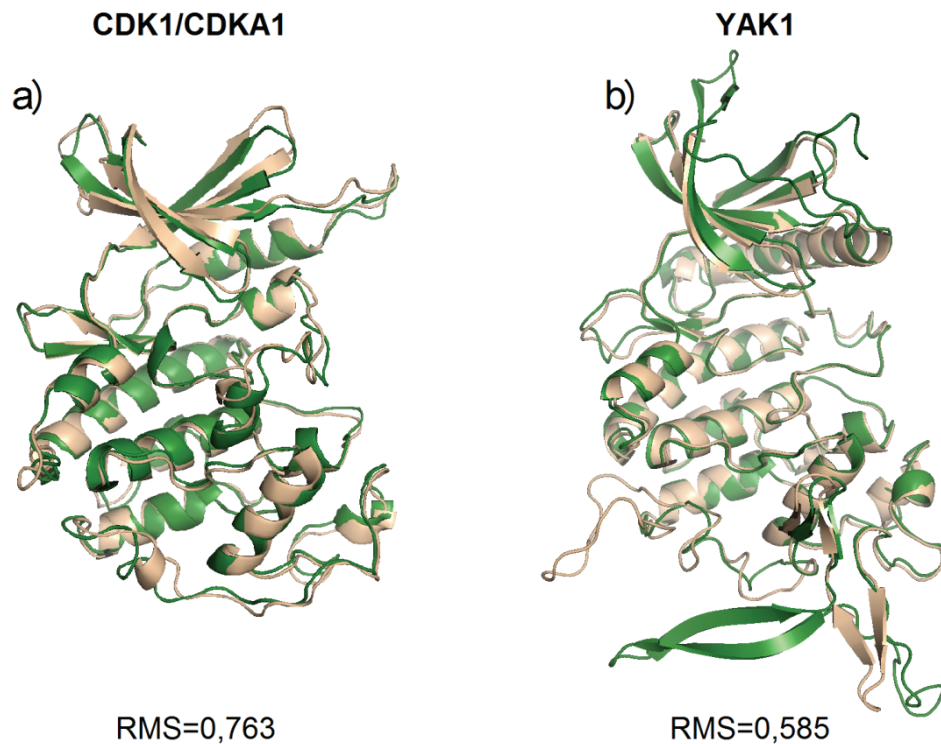


Рис. 14. Результати структурного порівняння каталітичних доменів циклін-залежних протеїнкіназ 1 (a) і YAK1-подібних протеїнкіназ дуальної специфічності (b) з *A. thaliana* (відображено зеленим кольором) і *S. cerevisiae* (відображено бежевим кольором).

6.4. Аналіз енергетичної складової CMGC - специфічного фосфорилювання Ser172 рослинного β -тубуліну

Для дослідження енергетичного впливу фосфорилювання Ser172 β -тубуліну, за допомогою програмного пакету PyMOL була виконана

реконструкція зазначеної модифікації (pSer172). Ми використали модель взаємодії молекул α - і β -тубуліну, в якій фосфорильований залишок Ser172 (pSer172, β -тубулін) знаходиться в ділянці їх контактної інтерфейсу.

Для вияву впливу модифікації Ser172 β -тубуліну на властивості контактних поверхонь протофіламентів мікротрубочок було виконано симуляцію молекулярної динаміки модифікованих і контрольних комплексів за умов занурення у фізіологічний розчин. За результатами молекулярної динаміки було досліджено зміни густоти заряду, напруги і потенціалу, що формувались під впливом фосфорилування Ser172 (рис. 6.15).

Слід зауважити, що інструмент `g_potential` програми Gromacs дозволяє ділити комірку, яка охоплює задану область, на шари і підсумує всі заряди атомів в кожному такому шарі. За допомогою інтегрування густини заряду було встановлено значення напруги електричного поля, що дозволяло розрахувати відповідний потенціал. За результатами молекулярної динаміки було визначено, що порівняно з контролем (SER) істотні зміни в розподілі густини заряду, напруги та потенціалу в ділянці модифікації (SEP) спостерігаються для всіх досліджених моделей молекул β -тубуліну. Найбільш значні зміни густини заряду були характерні для тубуліну людини, тоді як максимальна зміна потенціалу спостерігалась у комплексу дріжджового походження з *S.cerevisiae*.

Таким чином, для всіх досліджених організмів, включаючи побудовану для *A.thaliana* модель, було підтверджено, що фосфорилування залишку Ser172 (173) β -тубуліну має вагомий вплив на властивості ділянки міждимерного контакту протофіламентів. Це свідчить про роль CMGC-залежного фосфорилування β -тубуліну у рослин і дозволяє розглядати фосфорилування Ser172 рослинними протеїнкіназами CDK1 і Dyrk1A як типовий приклад консервативного молекулярного механізму модуляції тубулінового коду зі збереженою консервативністю у тварин, дріжджів, комах і вищих рослин (рис. 6.15).

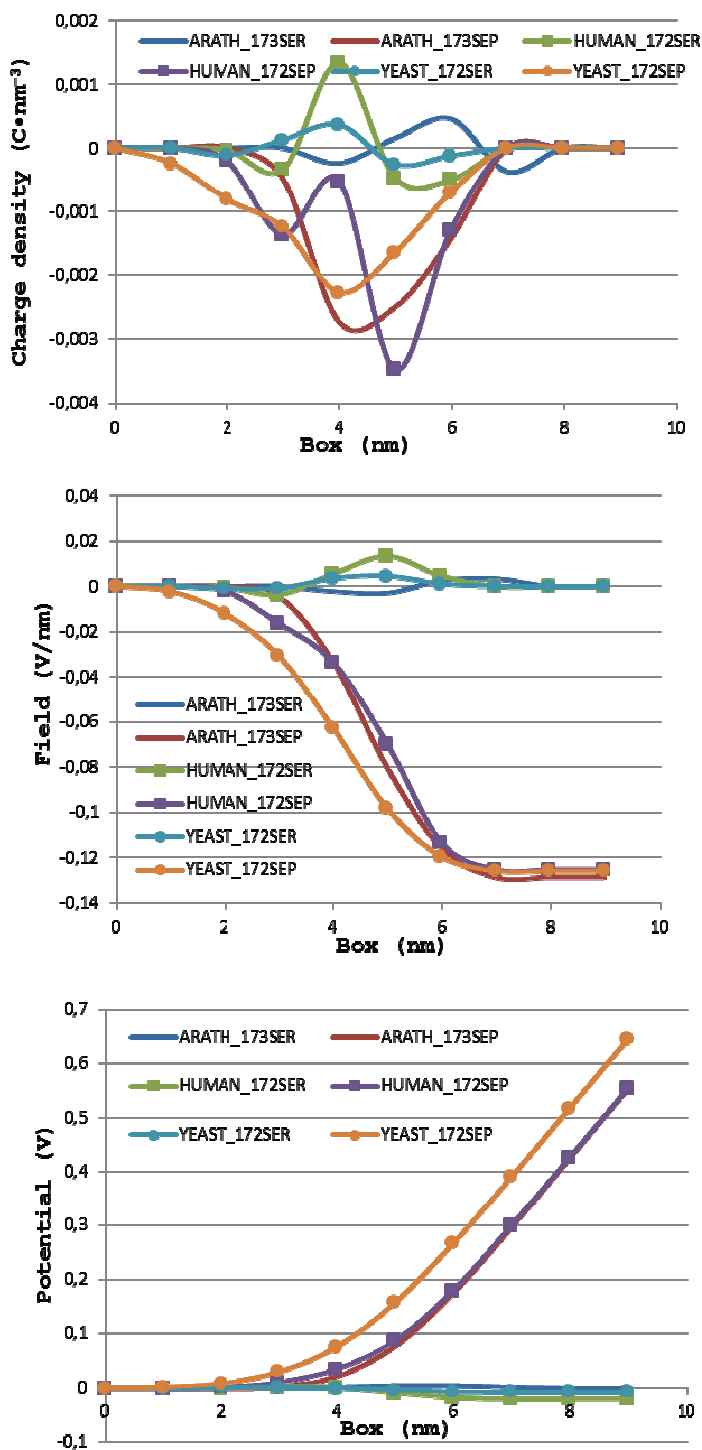


Рис. 6.15 Зміни густини заряду, напруги та потенціалу при фосфорилуванні Ser172/173 β -тубуліну *A.thaliana* (ARATH), *H. sapiens* (HUMAN) та *S.cerevisiae* (YEAST).

Примітка: **SER** – нефосфорильований залишок серину (Ser172/173), **SEP** – залишок серину у фосфорильованому стані (pSer172/173).

6.5. Внесок протеїнкінази СК2 в тубуліновий код вищих рослин на прикладі гомологів з *Arabidopsis thaliana*

6.5.1. Ізотипи α - і β -субодиниць комплексу СК2 *Arabidopsis thaliana*.

Аналіз літератури і бази даних UniProtKB виявив 12 СК2 і СК2-подібних протеїнкіназ модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (табл. 6.3). Всі знайдені послідовності мають статус анотованих [552].

Таблиця 6.3

Послідовності СК2 і СК2-подібних протеїнкіназ з *Arabidopsis thaliana*, депоновані в UniProtKB станом на 2021 рік

№	Ім'я білку	Локус гену	Ген	Номер в UniProtKB	Статус депонування	Офіційна назва
Субодиниці альфа (каталітичні), СК2 α						
1.	CSK21	At5g67380	<i>CKA1</i>	Q08467	sp	Casein kinase II subunit alpha-1
2.	CSK22	At3g50000	<i>CKA2</i>	Q08466	sp	Casein kinase II subunit alpha-2
3.	CSK23	At2g23080	<i>CKA3</i>	O64817	sp	Casein kinase II subunit alpha-3
4.	CSK2P	At2g23070	<i>CKA4</i>	O64816	sp	Casein kinase II subunit alpha-4
Субодиниці бета, СК2 β						
5.	CSK2B	At5g47080	<i>CKB1</i>	P40228	sp	Casein kinase II subunit beta-1
6.	CSK2C	At4g17640	<i>CKB2</i>	P40229	sp	Casein kinase II subunit beta-2
7.	CSK2D	At3g60250	<i>CKB3</i>	O81275	sp	Casein kinase II subunit beta-3
8.	CSK2E	At2g44680	<i>CKB4</i>	O80507	sp	Putative casein kinase II subunit beta-4
СК2-подібні білки						
9.	HMGB1	At3g51880	<i>HMGB1</i>	O49595	sp	High mobility group B protein 1
10.	HMGB2	At1g20693	<i>HMGB2</i>	O49596	sp	High mobility group B protein 2
11.	HMGB3	At1g20696	<i>HMGB3</i>	P93047	sp	High mobility group B protein 3
12.	HMGB4	At2g17560	<i>HMGB4</i>	Q42344	sp	High mobility group B protein 4

Спільна кластеризація засвідчила, що білки, депоновані в UniProtKB як рослинні СК2-подібні протеїнкінази утворюють окрему відособлену кладу і в дійсності є білками групи HMGB - High mobility group B proteins (1-4): HMGB1 (O49595, At3g51880), HMGB2 (O49596, At1g20693), HMGB4 (Q42344, At2g17560), HMGB3 (P93047, At1g20696). Тобто їх первинне депонування як СК2-подібних протеїнкіназ є помилковим, що підтверджується відмінністю їх доменного складу, актуальною анотацією UniProtKB і функцією їх основного домену HMG (High mobility group box domain).

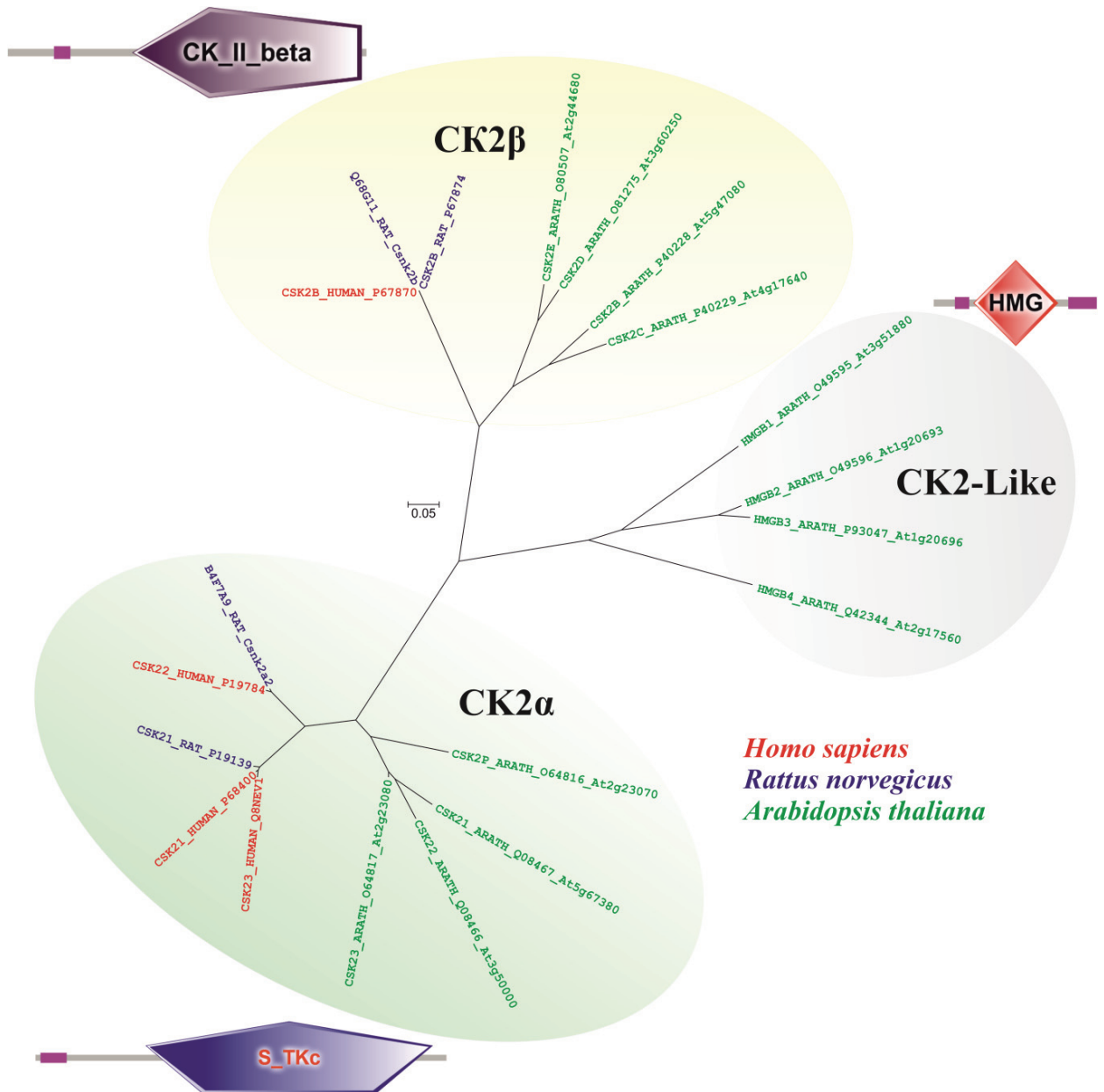


Рис. 6.16. Результати спільної NJ-кластеризації CK2 і CK2-подібних протеїнкіназ людини, пацюка та *Arabidopsis thaliana*. Для представників кожної з клад наведено приклад типової доменної архітектури (згідно з даними SMART): S_TKc – каталітичний кіназний домен, CK_II_beta – металвмістний домен регуляторної субодиниці β; (InterPro - IPR000704; SMART - SM01085), HMG (High mobility group box domen) – високомобільний «бокс» - домен, який відповідає за взаємодію з ДНК і іншими білками (InterPro - IPR036910).

Таким чином, у арабідопсиса в утворенні четвертинної структури СК2 можуть брати участь чотири каталітичні (СК2 α) і чотири допоміжні (СК2 β) субодиниці (табл. 6.3, рис. 6.16). Крім того, слід відмітити, що каталітична субодиниця CSK2P зустрічається винятково в хлоропластах [400], а допоміжна субодиниця CSK2E, на сьогодні, має статус гіпотетичної субодиниці СК2 β [122].

Для оцінювання рівня структурної подібності комплексів СК2 тваринного і рослинного походження необхідно було виконати реконструкцію рослинного комплексу. Для коректного вибору α - і β -субодиниць протеїнкінази СК2 *A. thaliana*, було виконано аналіз білок-білкових взаємодій за допомогою інструменту STRING v.11 (рис. 6.17). За результатами об'єктами наступного моделювання було обрано СКА1 (CSK21, At5g67380), СКА2 (CSK22, At3g50000), СКБ1 (CSK2B, At547080) і СКБ2 (CSK2C, At4g17640).

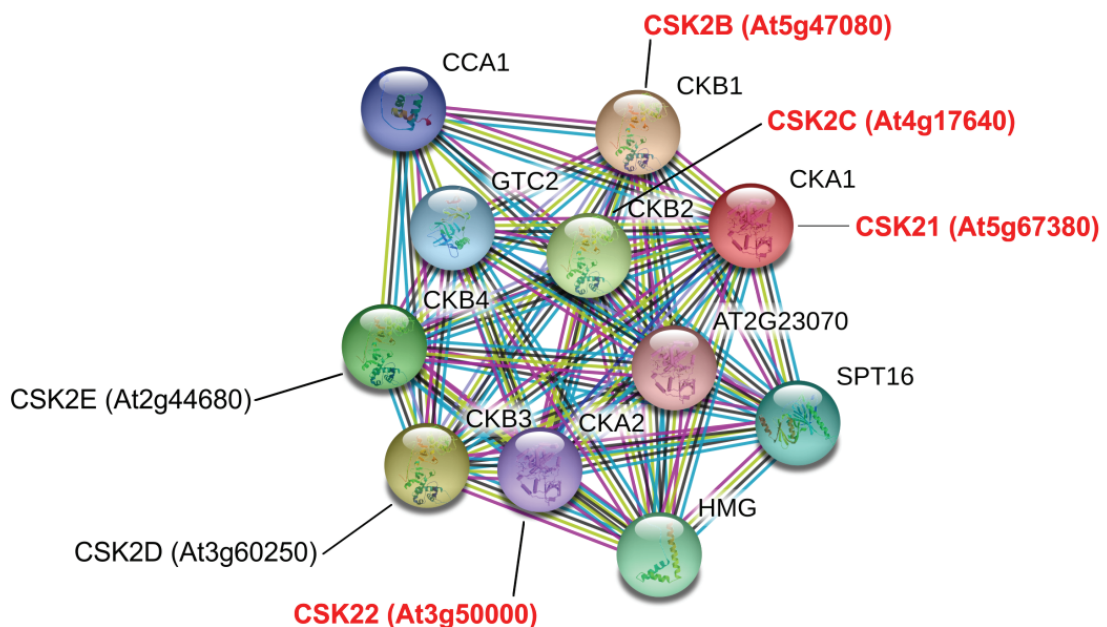


Рис 6.17. Аналіз білок-білкових взаємодій α - і β -субодиниць, які беруть участь у формуванні комплексу СК2 *A. thaliana*. α - і β -субодиниці для подальшої реконструкції просторової структури комплексу рослинної СК2 (відзначено червоним кольором).

Первинним шаблоном для моделювання комплексу рослинної СК2 була PDB-структура 1JWH комплексу СК2 людини (рис. 6.18) [411]. Реконструкцію субодиниць α (СКА1 и СКА2) и β (СКВ1 и СКВ2) СК2 *A. thaliana*, було виконано окремо, а остаточне зібрання комплексу виконувалось за допомогою білок-білкового докінгу в програмі HADDOCK з наступною оптимізацією отриманого комплексу методом молекулярної динаміки (20 нс).

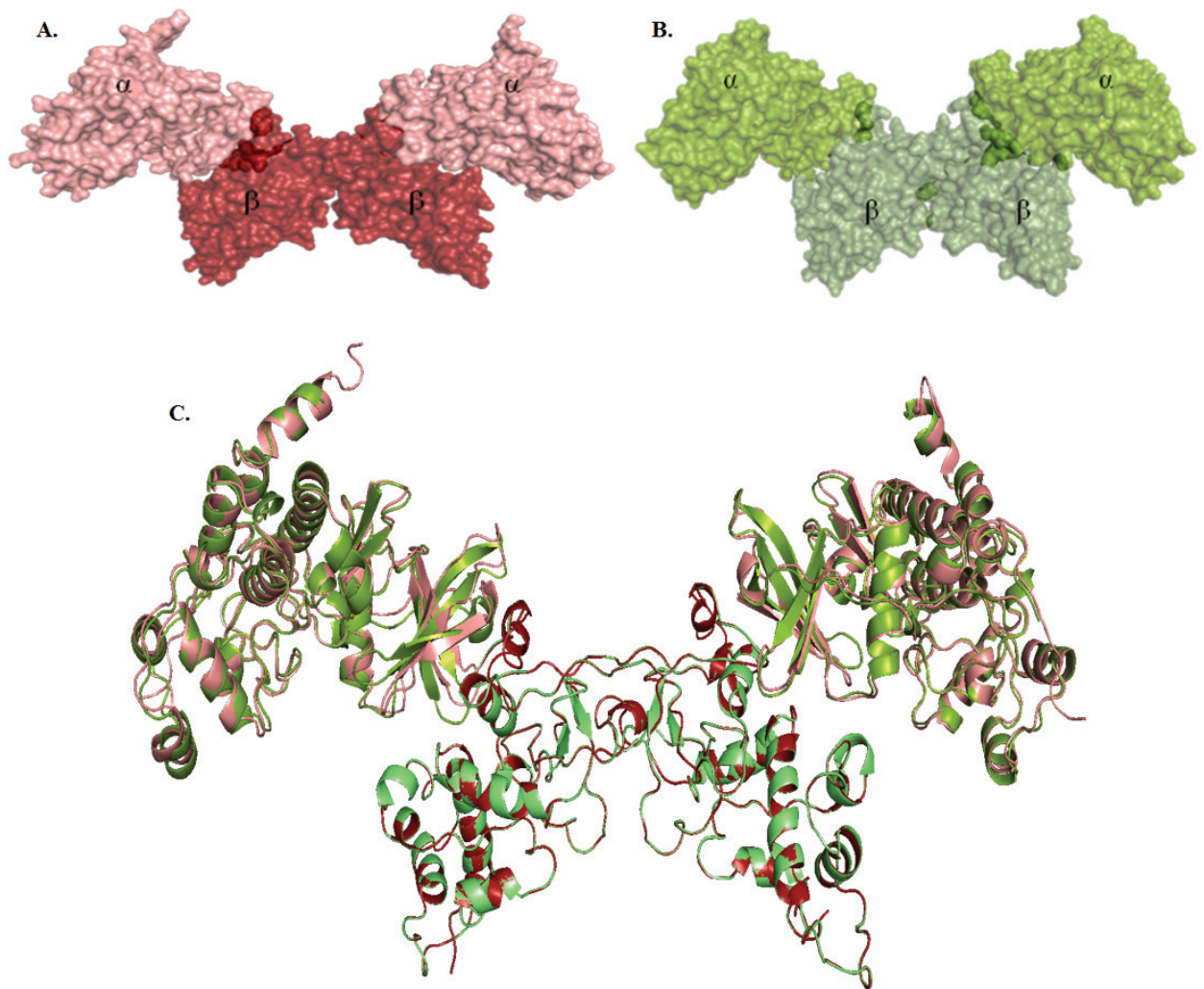


Рис. 6.18. Будова гетеротетрамеру СК2 *H. sapiens* (pdbid:1JWH) (А) та модель гетеротетрамеру СК2 *A. thaliana* (В), реконструйована за гомологією до x-Ray структури 1JWH (RCSB Protein Data Bank), та порівняння їх структур після етапу оптимізації методом молекулярної динаміки (С).

Структурне порівняння моделі рослинного комплексу СК2 *A. thaliana* і контрольної PDB-структури (1JWH) протеїнкінази СК2 людини продемонструвало значну подібність цих комплексів у ссавців і вищих рослин. Така консервативність амінокислотних послідовностей і просторових структур дала підстави очікувати певну подібність їхніх каталітичних властивостей та існуючих модифікацій у випадку консервативних субстратів. Характерним прикладом таких еволюційно-консервативних субстратів фосфорилування є молекули тубуліну [479]. Якщо дійсно СК2 здатна до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну, можна очікувати і подібність їх вкладу в тубуліновий код у представників різних царств еукаріот.

6.5.2. Пошук СК2-специфічних сайтів фосфорилування молекул тубуліна

Відправною точкою був пошук послідовності α -тубуліну *T. equiperdum*. Використовуючи дані Boscán et al. (2017) [64], з бази даних UniProtKB було отримано актуальну редакцію послідовності α -тубуліну, депоновану як не анотована послідовність A0A1G4I5D2 (A0A1G4I5D2_TRYEQ, редакція від 07.06.2017 р.).

Для визначення можливих сайтів СК2-специфічного фосфорилування було застосовано профільний пошук з використанням локальної версії інструменту GPS 3.0 з обмеженням пошуку по групі профілів СК2a1. Було застосовано два режими сканування: із середнім і високим порогом достовірності хітів (табл. 6.4).

Всього при середньому порозі обмеження було виявлено три можливих сайти фосфорилування α -тубуліну, які відповідали п'яти різним профілям протеїнкінази СК2 (бібліотека програми GPS 3.0). Подальше збільшення порогу до максимального скоротило кількість можливих сайтів до двох (Ser94 і Ser419), які відповідали двом альтернативним профілям СК2-специфічного фосфорилування (табл. 6.4, рис. 6.19).

Потенційні сайти фосфорилювання α -тубуліну *T. equiperdum*

(за результатами профільного аналізу в програмі GPS 3.0)

№	Сайт	Відповідність профілю	Консенсусний пептид	Score*	Cutoff**
Середній поріг					
1.	Ser94	CMGC/CK2/CK2a1	FHPEQLISGKEDAAN	3,056	1,947
2.	Ser419	CMGC/CK2	GMEEGEFSEAREDLA	11,121	7,389
		CMGC/CK2/CK2a1	GMEEGEFSEAREDLA	2,583	1,947
3.	Ser439	CMGC/CK2	YEEVGAEESADMDGEE	7,628	7,389
		CMGC/CK2/CK2a1	YEEVGAEESADMDGEE	2,104	1,947
Високий поріг					
1.	Ser94	CMGC/CK2/CK2a1	FHPEQLISGKEDAAN	3,056	2,848
2.	Ser419	CMGC/CK2	GMEEGEFSEAREDLA	11,121	9,894
Положення сайтів в повної послідовності					
<pre>>tr A0A1G4I5D2 A0A1G4I5D2_TRYEQ Tubulin alpha chain OS=Trypanosoma equiperdum GN=TEOVI_000891200 PE=3 SV=1 MREAICIHIGQAGCQVGNACWELFCLEHGIQPDGAMP SDKTIGVEDDAFN TFFSETGAGKHVPRAVFLDLEPT VVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLDNCTGLQGFLVYHAVGGGTG SGLGALLLERLSVDYGKSKLGYTVYPSQVSTAVVEPYNSVLSTHSLLEHTDVAAML DNEAIYDLTRRNLDI ERPTYPTLNRLIGQVVSSLTASLRFDGALNVDLTEFQTNLVYPRIHFVLT SYAPVISA EKAYNEQLSVSEIS TAVFEPASMMTKCDPRHGKYM ACCCLMYRGDVV PKDVNAAVATI KTKRTIQFVDWSPTGFKCGINYPPTVVP GDLAKVQRAVCMIANSTAI AEV FARIDHKFDLMYSKRAFVHWYVGE GMEEGEFSEAREDLA ALEKDYEEVGAE SADMDGEE DVVEEY</pre>					

Примітка: Score - показник, розрахований відповідно до алгоритму GPS і призначений для оцінювання вірогідності фосфорилювання. Вище значення відповідає більшій ймовірності модифікації. Cutoff - поріг відсікання. Різний поріг означає різну точність, чутливість і специфічність.

Результати Blastp-пошуку рослинних гомологів A0A1G4I5D2_TRYEQ проти повної колекції амінокислотних послідовностей *A. thaliana* в базі UniProtKB підтвердили майже повну ідентичність α -тубуліну *T. equiperdum* і шести ізотипів α -тубуліну *A. thaliana* (табл. 6.5). Найбільш близькими рослинними гомологами виявились TBA4_ARATH (Tubulin alpha-4 chain) і TBA2_ARATH (Tubulin alpha-2 chain). Парне вирівнювання амінокислотних послідовностей A0A1G4I5D2_TRYEQ і TBA4_ARATH підтвердило їх значну подібність і повну ідентичність ділянок, що оточують амінокислотні залишки Ser94 і Ser419 (рис. 6.19). Таким чином, зазначені амінокислотні залишки було визначено як найбільш перспективні сайти CK2-залежного фосфорилювання рослинного α -тубуліну.

```

A0A1G4I5D2_TRYEQ      MREAICIHIGQAGCQVGNACWELFCLEHGIQPDGAMP SDKTIGVEDDAFN TFFSETGAGK
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  MRECISIHIGQAGIQVGNACWELCYCLEHGIQPDGQMP SDKTVGGDDAFN TFFSETGAGK
                        ***.*.*****.*****.*****.*****.*.*****.*****
                        S94
A0A1G4I5D2_TRYEQ      HVPRAVFLDLEPTVVDEVRTGT YRQLFHPEQLISGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLCLD
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGT YRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEIVDLCLD
                        *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
A0A1G4I5D2_TRYEQ      RIRKLADNCTGLQGFLVYH AVGGGTGSGLGALLLERLSVDYGKKS KLGTVYPSPQVSTA
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  RIRKLADNCTGLQGFLVFN AVGGGTGSGLGSLLLERLSVDYGKKS KLGFTVYPSPQVSTS
                        *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
A0A1G4I5D2_TRYEQ      VVEPYNSVLS THSLEHTDVAAML DNEAIYDLTRRNLDIERPTYPTLNRLIGQVVS SLTA
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  VVEPYNSVLS THSLEHTDVS ILLDNEAIYDICRRSLSIERPTYTNLNRLV SQVISLTA
                        *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
A0A1G4I5D2_TRYEQ      SLRFDGALNVDL TEFQTNLVPYPR IHFVLT SYAPVISA EKAYHEQLSVSEI STAVFEPAS
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  SLRFDGALNVDVTEFQTNL VPPYPR IHFMLS SYAPVISA EKAFHEQLSVAEITNSAFEPAS
                        *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
A0A1G4I5D2_TRYEQ      MMTKCDPRHGK YMACCLMYR G DVVPKDVNAAVATIKTKRTIQ FVDWSP TGFKCGIN YQPP
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  MMAKCDPRHGK YMACCLMYR G DVVPKDVNAAVGTIKTKRTIQ FVDCPTGFKCGIN YQPP
                        **.*.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
                        S419
A0A1G4I5D2_TRYEQ      TVVPGGDLAKVQRAVCM IANSTAI AEV FARI DHKFDLMY SKRA FVHWYVGE GMEEGEFSE
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  TVVPGGDLAKVQRAVCM I SNSTVAE VFSRIDHKFDLMY AKRA FVHWYVGE GMEEGEFSE
                        *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
A0A1G4I5D2_TRYEQ      AREDLA ALEKDYEEVGAESADMDGEEDVVEEY
sp|Q0WV25|TBA4_ARATH  AREDLA ALEKDYEEVGAEGGDDEDEGE EY-
                        *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Рис. 6.19. Вирівнювання послідовностей α -тубуліну *Trypanosoma equiperdum* (A0A1G4I5D2_TRYEQ) і одного з найближчих гомологів з *Arabidopsis thaliana* (TBA4_ARATH, Q0WV25). Відмічено положення двох найбільш ймовірних сайтів СК2-специфічного фосфорилування, які були визначені на підставі результатів профільного пошуку.

Для аналізу топології залишків Ser94 і Ser419 в молекулах ізотипів α -тубуліну *T. equiperdum* і *A. thaliana* була виконана реконструкція їх просторової структури з використанням амінокислотних послідовностей A0A1G4I5D2_TRYEQ і TBA4_ARATH. Структурне вирівнювання побудованих моделей і подальша візуалізація потенційних сайтів фосфорилування свідчать, що Ser94 входить до складу складки $\beta 5$, а Ser419 входить до складу спіралі $\alpha 17$. Обидва залишки розташовані на поверхні глобули, мають зовнішню орієнтацію і доступні для посттрансляційних модифікацій (рис. 6.20).

Для уточнення функціонального значення модифікацій молекул α -тубуліну за залишками Ser94 і Ser419 було виконано молекулярне моделювання з використанням експериментально доведеного комплексу 5KX5 (Crystal structure of tubulin-stathmin-TTL-Compound 11 complex) з RCSB Protein Data Bank. Структура комплексу 5KX5 – химерна і включала дві

субодиниці α -тубуліну (UniProtKB: D0VWZ0) і дві субодиниці β -тубуліну *O. aries* (UniProtKB: D0VWY9), статмін-4 *R. norvegicus* (UniProtKB: P63043) і тубулін-тірозинлігазу (TTL) *Gallus gallus* (UniProtKB: E1BQ43) [344]. На наступному етапі було виконано структурне накладання раніше побудованих 3D-моделей A0A1G4I5D2_TRYEQ *T. equiperdum* і TBA4_ARATH *A. thaliana* на структуру α -тубуліну комплексу 5KX5. В обох випадках значення їх середньоквадратичного відхилення (RMS) було менше 1, що свідчить про подібність просторових координат побудованих моделей і коректну реконструкцію комплексу.

Таблиця 6.5

Результати пошуку гомологів A0A1G4I5D2_TRYEQ *T. equiperdum* у *A. thaliana* за допомогою інструменту SIB BLASTP

n.	UniProtKB			BLASTP	
	Номер	Ім'я	Рекомендована назва	Вага вирівнювання	E-value
1	Q0WV25	TBA4_ARATH	Tubulin alpha-4 chain	807	0.0
2	B9DGT7	TBA2_ARATH	Tubulin alpha-2 chain	807	0.0
3	P29511	TBA6_ARATH	Tubulin alpha-6 chain	806	0.0
4	B9DHQ0	TBA5_ARATH	Tubulin alpha-5 chain	806	0.0
5	Q56WH1	TBA3_ARATH	Tubulin alpha-3 chain	806	0.0
6	P11139	TBA1_ARATH	Tubulin alpha-1 chain	784	0.0
7	P12411	TBB1_ARATH	Tubulin beta-1 chain	365	2e-121
8	Q9ASR0	TBB3_ARATH	Tubulin beta-3 chain	361	4e-120
9	Q56YW9	TBB2_ARATH	Tubulin beta-2 chain	361	4e-120
10	P29515	TBB7_ARATH	Tubulin beta-7 chain	361	5e-120
11	P29513	TBB5_ARATH	Tubulin beta-5 chain	360	1e-119
12	P29514	TBB6_ARATH	Tubulin beta-6 chain	359	3e-119
13	P29516	TBB8_ARATH	Tubulin beta-8 chain	358	8e-119
14	P29517	TBB9_ARATH	Tubulin beta-9 chain	357	1e-118
15	P24636	TBB4_ARATH	Tubulin beta-4 chain	352	1e-116
16	P38558	TBG2_ARATH	Tubulin gamma-2 chain	223	9e-67
17	P38557	TBG1_ARATH	Tubulin gamma-1 chain	221	5e-66

Результати аналізу комплексу показали, що залишки Ser94 і Ser419 локалізовані біля контакту з молекулою β -тубуліну (внутрішній контакт гетеродимеру α -/ β -тубуліну) (рис. 6.21). Згідно топології, модифікації в зазначених сайтах можуть впливати на цілісність гетеродимеру.

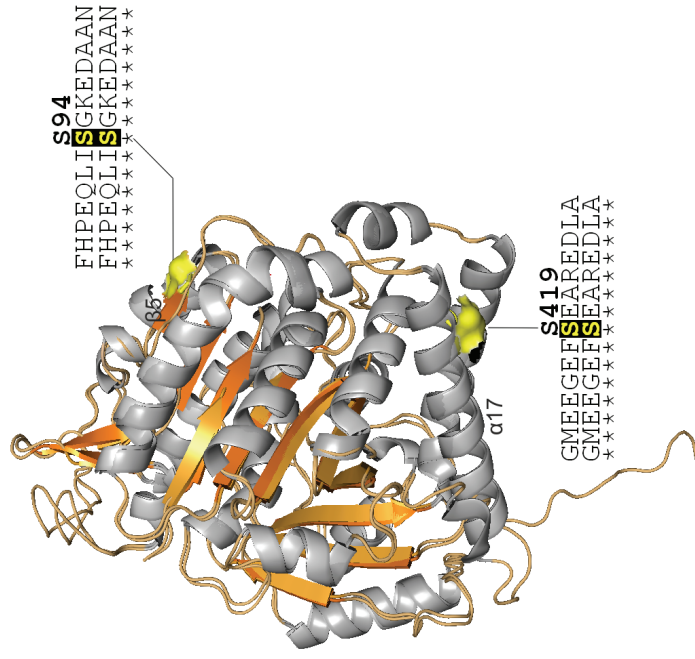


Рис. 6.20. Накладання структурних моделей A0A1G4I5D2_TRYEQ і TBA4_ARATH. Жовті поверхні позначають поверхневе розташування консервативних залишків Ser94 і Ser419 у гомологів з трипаносоми і арабідопсису.

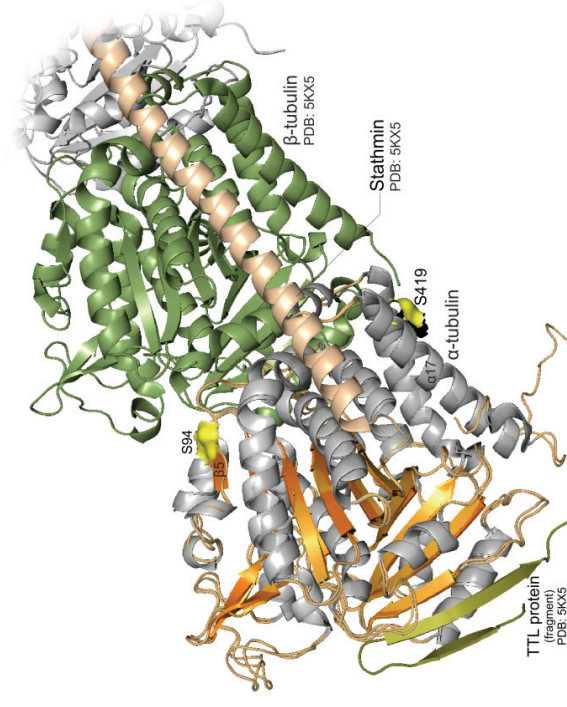


Рис. 6.21. Топологія амінокислотних залишків Ser94 і Ser419 за результатами структурного вирівнювання молекул α -тубуліна *T. equiperdum* і *A. thaliana* з химерним комплексом 5KX5, депонованим в Protein Data Bank [344]. Топологія зазначених сайтів свідчить про локалізацію СК2-специфічних сайтів в ділянці внутрішнього контакту димеру α - β -тубуліну.

Примітка: α -tubulin - моделі α -тубуліну *T. equiperdum* і *A. thaliana* (результат структурного накладання на структуру ланцюга α -тубуліну комплексу 5KX5), β -tubulin - β -тубулін *Ovis aries*, Stathmin - статмін-4 *Rattus norvegicus*, TTL protein - фрагмент тубулін тирозин лігази (TTL) *Gallus gallus*.

Загалом, на підставі профільного пошуку для 17 ізотипів тубуліну *A. thaliana* було знайдено 90 потенційних сайтів, які, в певній мірі, відповідали профілям сайтів СК2-залежного фосфорилування. Для остаточного висновку щодо ізотипової специфічності сайтів фосфорилування за залишками Ser94 і Ser419 було виокремлено послідовності всіх знайдених сайтів в контексті S/T \pm 7 і збережено у вигляді окремих файлів в форматі *.fasta. (рис. 6.22).

```

>TBG1_ARATH_S422
MFADNDLSEFDES RD
>TBG1_ARATH_S129
IDREADGSDSLEGFV
>TBB2_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB2_ARATH_T429
YQQYQDATADEEGDY
>TBB2_ARATH_S40
TGRYTGDSLQLERI
>TBB2_ARATH_S322
AMFRGKMSSTKEVDEQ
>TBB8_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB8_ARATH_T429
YQQYQDATADEEEGY
>TBB8_ARATH_S322
AMFRGKMSSTKEVDEQ
>TBG2_ARATH_S422
MFADNDLSEFDES RD
>TBA5_ARATH_S419
GMEEGEFSEAREDLA
>TBA5_ARATH_S94
FHPEQLISGKEDAAN
>TBB5_ARATH_S323
AIFRGQMSSTKEVDEQ
>TBB5_ARATH_T410
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB5_ARATH_T430
YQQYQDATADEEGEY
>TBB5_ARATH_S323
AIFRGQMSSTKEVDEQ
>TBB9_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB9_ARATH_T40
TGQSCGDTDLQLERI
>TBB9_ARATH_T429
YQQYQDATVGE EYE
>TBB9_ARATH_S322
AVFRGKMSSTKEVDEQ
>TBA1_ARATH_S419
GMEEGEFSEAREDLA
>TBA1_ARATH_S94
FHPEQLISGKEDAAN
>TBA6_ARATH_S419
GMEEGEFSEAREDLA
>TBA6_ARATH_S94
FHPEQLISGKEDAAN
>TBB4_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB4_ARATH_T429
YQQYQDATAGE EYE
>TBB6_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB6_ARATH_T429
YQQYQDATADEEGEY
>TBB6_ARATH_S322
AMFRGKMSSTKEVDEQ
>TBB7_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB7_ARATH_T429
YQQYQDATADEEGEY
>TBB7_ARATH_S322
AMFRGKMSSTKEVDEQ
>TBA2_ARATH_S419
GMEEGEFSEAREDLA
>TBA2_ARATH_S94
FHPEQLISGKEDAAN
>TBA3_ARATH_S419
GMEEGEFSEAREDLA
>TBA3_ARATH_S94
FHPEQLISGKEDAAN
>TBA4_ARATH_S419
GMEEGEFSEAREDLA
>TBA4_ARATH_S94
FHPEQLISGKEDAAN
>TBB1_ARATH_T410
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB1_ARATH_T430
YQQYQDATADEEDEY
>TBB1_ARATH_S323
AMFRGKMSSTKEVDEQ
>TBB3_ARATH_S40
TGRYTGDSLQLERI
>TBB3_ARATH_S322
AMFRGKMSSTKEVDEQ
>TBB3_ARATH_T409
GMDEMEFTEAESNMN
>TBB3_ARATH_T429
YQQYQDATADEEGDY

```

Рис. 6.22. Потенційні сайти СК2-залежного фосфорилування ізотипів тубуліну арабідопсису (*.fasta формат). Фрагменти послідовностей з всіх ізотипів тубуліну *A. thaliana*, які виявили різну ступінь подібності до профілів канонічних сайтів протеїнкінази СК2. Фрагменти зберігалися в контексті S/T \pm 7.

Це дозволило виконати кластеризацію отриманих фрагментів. Як контроль використовували фрагменти послідовностей α -тубуліну *T. equiperdum*, які відповідають сайтам фосфорилування за залишками Ser94 і Ser419. В результаті кластеризації послідовностей було отримано дві чітко відокремлені клади, які включили контрольні послідовності (рис. 6.23). І у Ser94, і у Ser419, кластеризація здійснилася виключно з шістьма ізо типами α -тубуліну: TBA1, TBA2, TBA3, TBA4, TBA5 і TBA6. При цьому філогенетична дистанція між контрольними послідовностями *T. equiperdum* і потенційними сайтами з ізо типів α -тубуліну *A. thaliana* дорівнювала нулю (рис. 6.23).

Вирівнювання послідовностей пептидів з цих клад підтвердило їх повну ідентичність (рис. 6.24). Можна припустити, що фосфорилування за залишками Ser94 і Ser419 притаманно для всіх існуючих ізо типів α -тубуліну.

Пошук за пептидом GMEEGEFSEAREDLA в бібліотеках ресурсу PhosphoSitePlus засвідчив, що фосфорилування S419-p було доведено для деяких ізо типів α -тубуліну (TUBA8, TUBA3C, TUBA3E) людини. Фосфорилування цього сайту було анотовано і підтверджено рядом експериментів [220]. Але вивчення впливу ряду мутацій TUBA1A (I188L, I238V, P263T, L286F, V303G, R402C, R402H і S419L) показало, що заміна S419L не призводить до появи помітних аномалій в формуванні гетеродимеру α -/ β -тубуліну і відхилення від дикого типу відсутні. Клітинні лінії, що несуть мутацію S419L α -тубуліну, без жодних видимих аномалій формують мережу інтерфазних мікротрубочок, ідентичну дикому типу [547]. Проте, існують дані, що S419 є важливим для взаємодії з кінезином, а мутації або модифікації в цьому положенні можуть впливати на утворення комплексу α -тубулін-кінезин [547, 551].

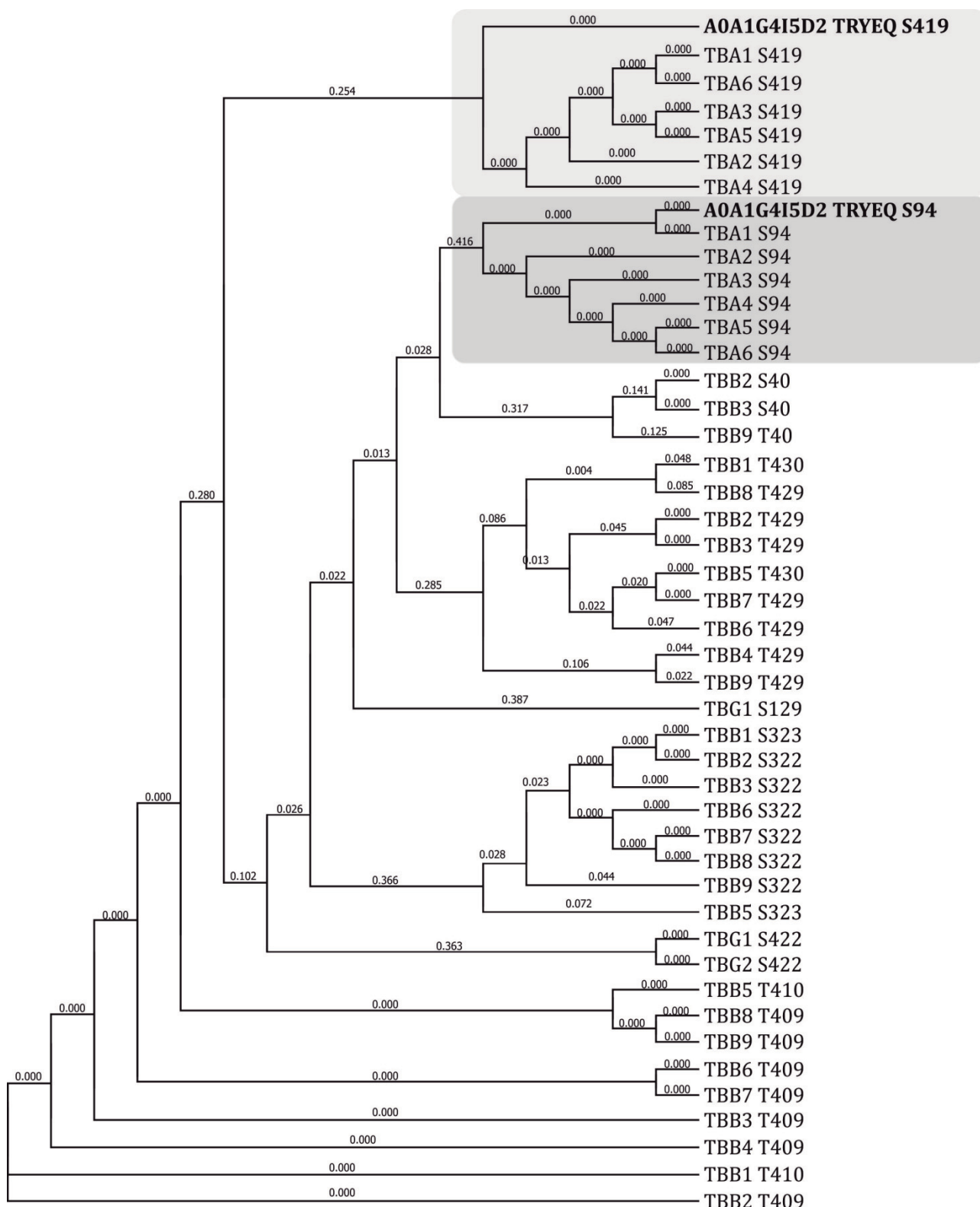


Рис. 6.23. Підсумки кластеризації потенційних SK2-залежних сайтів фосфорилювання рослинних тубулінів, визначені за допомогою профільного аналізу і подібності до контрольних фрагментів послідовностей з α -тубуліну *T. equiperdum*.

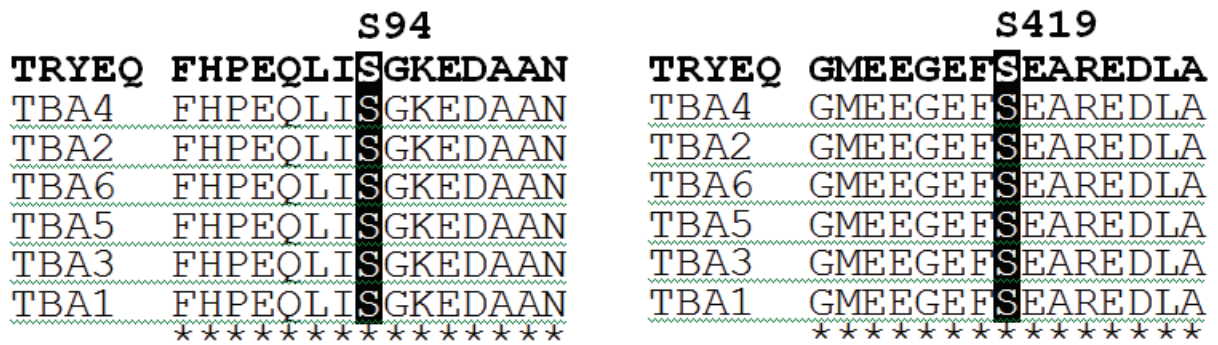


Рис. 6.24. Вирівнювання контрольних послідовностей сайтів Ser94 і Ser419 α -тубуліну *T. equiperdum* і ізотипів α -тубуліну *A. thaliana*.

Водночас, мотив FHPEQLIS**S**GKEDAAN (S94-p) співпадає з консервативним сайтом T94-p (FHPEQLI**T**GKEDAAN) α -тубуліну людини (TUBA1A, TUBA1B, TUBA1C, TUBA3C, TUBA4A, TUBA4B, TUBA8). Модифікація цього сайту була неодноразово доведена методами мас-спектрометрії і анотована як сайт СК2-специфічного фосфорилування (дані PhosphoSitePlus) [220, 386, 549]. Відомо, що фосфорилування серину переважає. Зазвичай, на будь-яку серин/треонін-специфічну протеїнкіназу, припадає більша кількість фосфорильованих залишків серину, ніж треоніну [357]. Тому заміна Ser/Thr 94-го амінокислотного залишку α -тубуліну *T. equiperdum* і *A. thaliana* є цілком прийнятною в аспекті патерну впізнавання СК2-специфічного сайту.

Результати біоінформатичного аналізу дозволили припустити, що фосфорилування залишку Ser/Thr94 може впливати на формування димеру α/β -тубуліну у *T. equiperdum* і *A. thaliana*. Окрім того, що у ссавців у цьому сайті замість залишку серину знаходиться треонін, його амінокислотне оточення надзвичайно консервативне і незмінне у більшості анотованих послідовностей α -тубуліну еукаріотичних організмів. Було висунуто припущення, що пряме фосфорилування α -тубуліну *T. equiperdum* [64] і *A. thaliana* протеїнкіназою СК2 зв'язане саме з амінокислотним залишком S94. Не можна виключати імовірність фосфорилування залишку S419, проте

ця модифікація, ймовірно, не може мати прямого впливу на структуру мікротрубочки і належить до сфери регуляції взаємодії з асоційованими білками [266].

6.5.3. Дослідження впливу фосфорилування α -тубуліну казеїнкіназою 2 (СК2) на властивості структури α/β -тубулінового димеру

Для дослідження структурних наслідків фосфорилування Ser94 і Ser419 α -тубуліну побудували тривимірні моделі гетеродимерів α/β -тубуліну *A. thaliana* і *T. equiperdum*. Відповідні фосфорильовані залишки pSer94 і pSer419 реконструювали в програмі PyMOL за допомогою плагіну PyTMs [584].

Наступні симуляції молекулярної динаміки в фізіологічному оточенні (імітація фізіологічного розчину) виконувались як для модифікованих, так і контрольних комплексів (без додавання фосфату). Результати обчислень дозволили оцінити зміни густини заряду, напруги та потенціалу, які були наслідком фосфорилування зазначених сайтів. Істотні локальні зміни показників було визначено при модифікації pSer419 α -тубуліну *A. thaliana* (рис. 6.25, А). За умови фосфорилування рослинного α -тубуліну за Ser94, топологічно розташованого на латеральній поверхні філаменту мікротрубочки, навпаки, результати свідчили про суттєві електростатичні флуктуації. Аналогічні обчислення для α -тубуліну *T. equiperdum* значно поступалися рослинному гомологу за показниками густини заряду, напруги і потенціалу (рис. 6.25, В).

Таким чином, отримані результати підтверджують вклад протеїнкіназ СК2 в тубуліновий код вищих рослин. Методами класичної та структурної біоінформатики було передбачено, що казеїн кіназа 2 здатна до фосфорилування α -тубуліну *Arabidopsis* за консервативними сайтами Ser94 і Ser419. Було доведено локалізацію цих залишків в області внутрішнього контакту гетеродимеру α/β -тубуліну. Топологія амінокислотного залишку передбачає, що Ser94 може впливати на формування димеру α/β -тубуліну, а

фосфорилування за Ser419, ймовірно, впливає на взаємодію мікротрубочки з асоційованими білками. При моделюванні фосфорильованого стану Ser94 і Ser419 найбільш суттєвий вплив від додавання фосфату було визначено лише для амінокислотного залишку pSer419. Це дозволяє припустити, що СК2-залежне фосфорилування мікротрубочок у вищих рослин, головним чином, впливає на зв'язування асоційованих білків і, в першу чергу, на взаємодію рослинної мікротрубочки з моторними білками родини кінезинів.

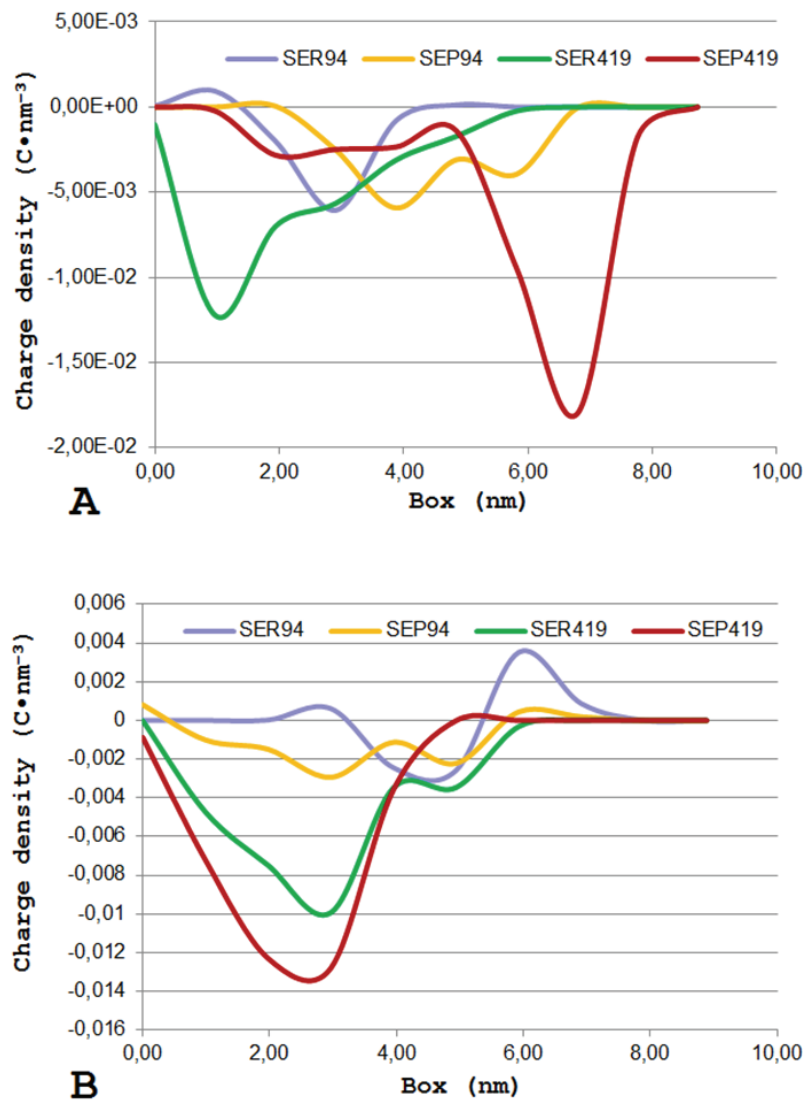


Рис. 6.25. Зміни густини заряду в області відповідної модифікації α -тубуліну *A. thaliana* (A) та *T. euphratica* (B).

Зауваження: SER – не фосфорильований серин SEP – фосфорильований серин

6.6. Внесок CMGC-подібних протеїнкіназ в тубуліновий код вищих рослин

За результатами проведених досліджень було реконструйовано загальну картину CMGC-залежної регуляції тубулінового коду вищих рослин. Безпосередній внесок в тубуліновий код вищих рослин можуть здійснювати три протеїнкінази CDK1 (CDK), Yak1 (MNB / DYRK) та близька до групи CMGC протеїнкіназа СК2 [282, 287, 629, 276, 286, 284, 285, 452, 633, 264, 271, 271, 121]. Функціонуюча переважно як тетраметр ($\alpha\beta\beta$) протеїнкіназа СК2 раніше розглядалась як представник окремої підродини протеїнкіназ CMGC [261, 411]. На сьогодні, протеїнкіназа СК2 відокремлена у самостійну родину (PhosphoSitePlus®), проте філогенетично вона дуже близька до канонічних CMGC [220].

Відповідно до результатів актуального дослідження і даних літератури стосовно групи CMGC, ми маємо справу з еволюційно-архаїчною групою протеїнкіназ, які зберегли значну структурну і функціональну консервативність у представників різних царств [376, 26]. Зокрема, це стосується одного з фундаментальних механізмів, що регулює інтеграцію гетеродимерів $\alpha\beta$ -тубуліну до структури мікротрубочки через фосфорилування Ser172 β -тубуліну (рис. 6.26). Доведено, що перехід гетеродимеру в фосфорильований стан α -тубулін / β -тубулін (pSer172) змінює електростатичні показники контактної поверхні гетеродимеру, що зумовлює його відокремлення від мікротрубочки [271, 420]. Примітно, що цей сайт суперконсервативний, а обидві канонічні CMGC-кінази, визначені в ході актуального дослідження, здійснюють безпосереднє фосфорилування тубуліну виключно за Ser172 β -тубуліну. Цей молекулярний механізм спільний для рослин, тварин, дріжджів і дрозофіли [271, 246]. Таким чином, CDK1- і YAK1-залежне фосфорилування β -тубуліну рослин є фактором негативної регуляції динамічної нестабільності мікротрубочок і відповідає за їх розбирання.

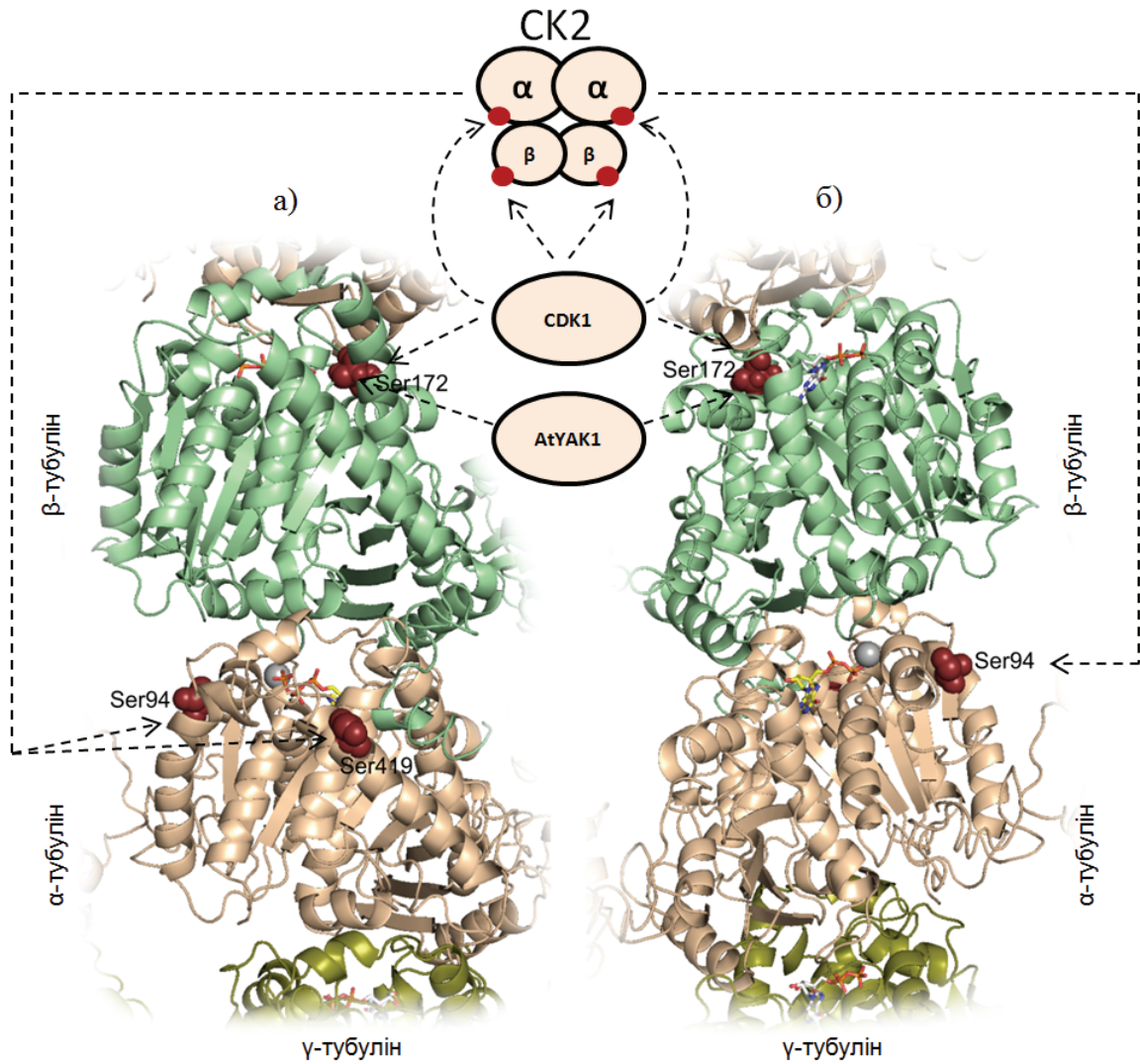


Рис. 6.26. Узагальнена схема участі рослинних SMGC-кіназ CDK1 і YAK1 та філогенетично близької протеїнкінази CK2 в регуляції рослинних мікротрубочок через безпосереднє фосфорилування молекул α - і β -тубуліну *Arabidopsis thaliana*. а) зовнішня; б) внутрішня проекції фрагментів мікротрубочки.

Для протеїнкінази CK2 визначено два сайти безпосереднього фосфорилування α -тубуліну Ser94 і Ser419 [266]. Аналіз топології цих амінокислот, дані молекулярної динаміки свідчать, що фосфорилування Ser94 впливає на цілісність димеру $\alpha\beta$ -тубуліну (рис. 6.26). У свою чергу, фосфорилування розташованого на зовнішньому боці мікротрубочки амінокислотного залишку Ser419 малоймовірно впливає на її структуру. Ймовірно, у вищих рослин CK2-залежне фосфорилування α -тубуліну за

залишком Ser419 впливає на зв'язування асоційованих білків і, в першу чергу, на взаємодію рослинної мікротрубочки з моторними білками родини кінезинів [266].

Заслуговує на увагу існування взаємної регуляції на рівні зазначеної групи протеїнкіназ. Наразі доведено, що протеїнкіназа СК2 є об'єктом CMGC-залежної регуляції. Було підтверджено, що CDK1 (CDK1+Cyclin B) фосфорилує як α -, так і β -субодиниці комплексу казеїн-кінази 2 [607, 153], що може впливати на здатність СК2 взаємодіяти з мікротрубочкою [607].

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, викладених у розділі 6:

1. 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.
2. Karpov PA, Blume YB. Is it really that Casein kinase 2 is able to phosphorylate α -tubulin in plants? *Cytol. Genetics.* 2018; 52 (2): 103-111. DOI: 10.3103/S0095452718020044
3. 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.
4. Karpov P, 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).
5. Karpov PA, 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.org/10.3103/S0096392510040267

Тези конференцій:

Demchuk O, Karpov P, Blume YB. Potential sites of posttranslational modifications of plant α/β -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.

Кораблев МД, Карпов ПА, Раевский АВ, Блюм ЯБ. Поиск и предсказание трехмерной структуры вероятных партнеров растительных гомологов протеинкиназы Dyk1A. Биология растений и биотехнология. 2011, 5-7 октября, Белая Церковь, Украина. с.73.

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.

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.

Karpov 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.

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.

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.

РОЗДІЛ 7

ВНЕСОК СК1-СПЕЦИФІЧНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ В ТУБУЛІНОВИЙ КОД ВИЩИХ РОСЛИН

7.1. Дослідження внеску протеїнкіназ СК1 в тубуліновий код вищих рослин на прикладі *Arabidopsis thaliana*

7.1.1. Морфологічна відповідь первинного кореня проростків *Arabidopsis thaliana* на обробку СК1-специфічним інгібітором D4476

Першим кроком дослідження внеску СК1-специфічного фосфорилювання в тубуліновий код *A. thaliana* було експериментальне підтвердження зв'язку СК1-специфічного інгібування, перебудов тубулінового цитоскелету (мікротрубочок) і морфологічної відповіді модельних рослин. Інструментом такого дослідження був СК1-специфічний інгібітор D4476, а об'єктом – корені рослин *A. thaliana*, що експресують флуоресцентний маркер мікротрубочок - химерний конструкт *GFP-MAP4*.

Для первинної оцінки впливу D4476 на розвиток і морфологію первинних коренів *A. thaliana* було виконано ряд експериментів, спрямованих на з'ясування взаємозв'язку інгібування рослинних СК1 і наявності специфічної морфологічної відповіді. Контролем служили проростки *A. thaliana*, не оброблені інгібітором. Умови вирощування оброблених і контрольних рослин були ідентичні. Застосування різних концентрацій (0.1, 1.0, 10 and 50 мкМ) і експозицій (6, 24 і 48 ч.) D4476 засвідчило існування дозозалежної морфологічної відповіді. Дія D4476 на рослини *A. thaliana* цілком узгоджується з раніше описаним ефектом, що спостерігався на клітинах тварин [459, 304, 317, 87]. Цей факт підтверджує первинне припущення стосовно консервативності тваринних і рослинних СК1 [428]. Ріст первинних коренів *A. thaliana*, оброблених 0,1 і 1 мкМ D4476 з експозицією 6 і 24 годин, практично не відрізнявся від контролю. У той же час, застосування D4476 у більших концентраціях (10 і 50 мкМ) викликало візуально помітне пригнічення росту первинних коренів і після 24-х годин

цей показник був менше контрольного в 1,3 і 2,2 рази відповідно (рис. 7.1). При 24-х годинній експозиції спостерігалось помітне зниження росту оброблених коренів незалежно від концентрації розчину інгібітору. Можна зробити припущення про кумулятивний характер дії D4476 на процеси росту, що цілком узгоджується з раніше описаними особливостями дії цього інгібітору [459, 375].

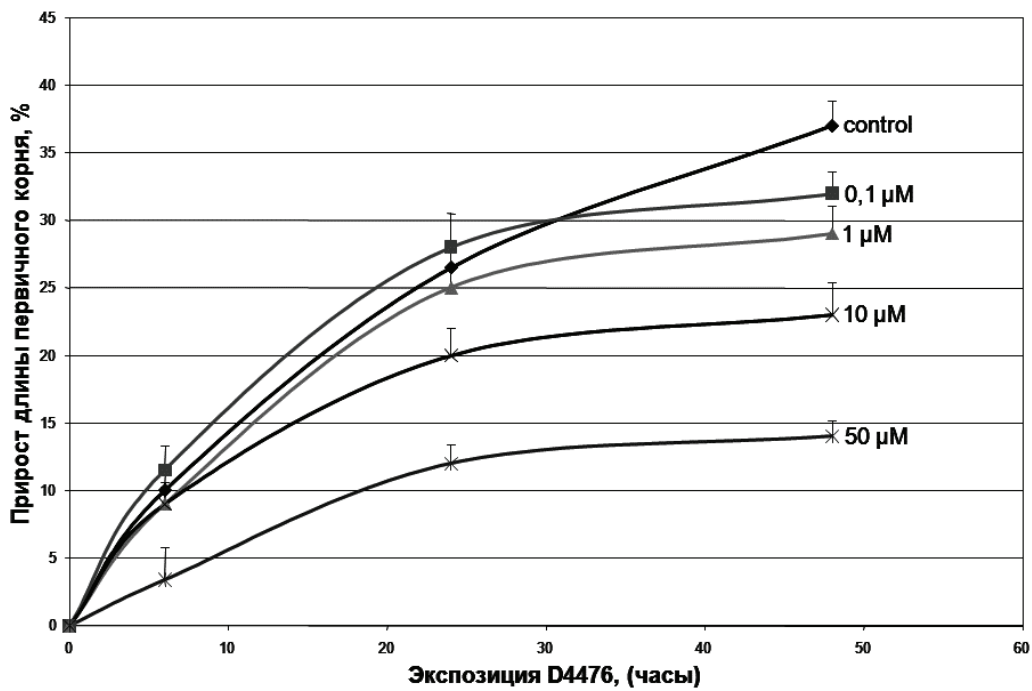


Рис. 7.1. Вплив D4476 на ріст первинних коренів *A. thaliana*.

Окрім безпосереднього впливу на процеси росту, обробка різними концентраціями D4476 призводила до порушення морфології первинних коренів. Найбільш помітна морфологічна відповідь на дію D4476 спостерігалась у процесі формування трихобластів. Подальші експерименти підтвердили, що найбільш чутливим морфологічним індикатором дії D4476 слугують ріст первинних коренів і морфологія кореневих волосків. Морфофізіологічна відповідь трихобластів залежала від концентрації інгібітора і часу експозиції (рис. 7.2). Зазначені дані корелюють з результатами отриманими раніше на прикладі Трипаносоматид роду *Leishmania* [451].

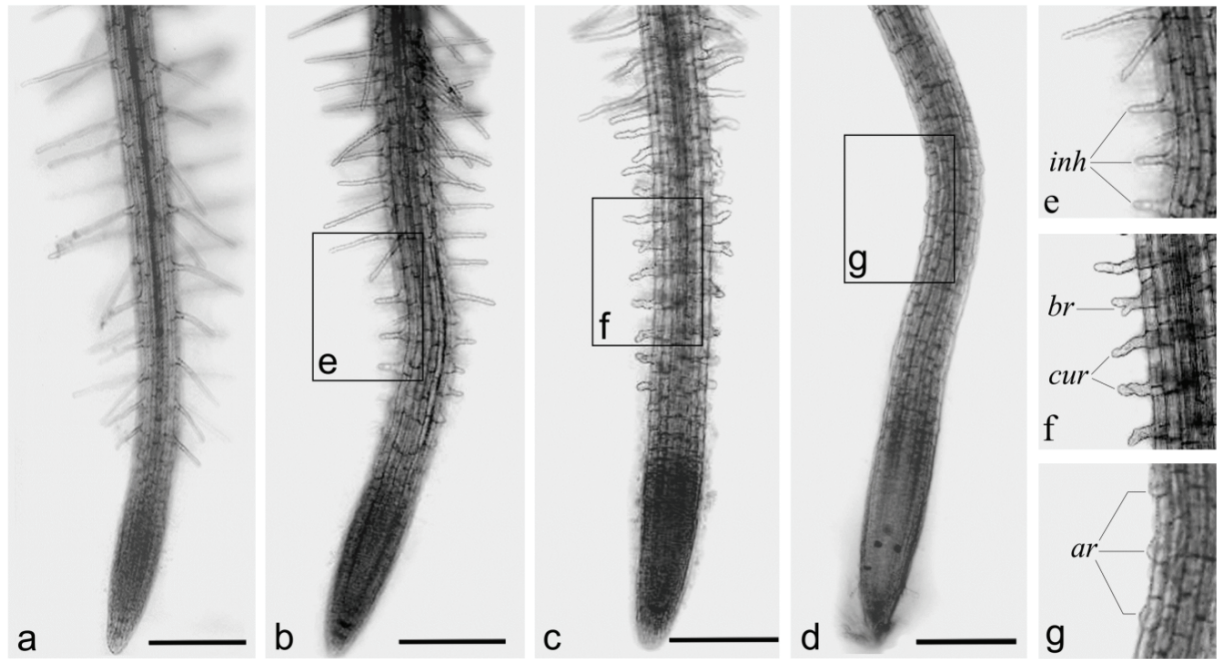


Рис. 7.2. Морфологія первинних коренів *A. thaliana* після 24-х годинної обробки різними концентраціями D4476:

a) контроль; **b, e)** пригнічення росту кореневих волосків під впливом D4476 (1 мкМ) (*inh*); **c, f)** інгібування росту первинного кореня під впливом D4476 (10 мкМ): закручування (*cur*) і галуження (*br*) трихобластів; **d, g)** інгібування росту первинного кореня D4476 (50 мкМ) з зупинкою росту («арештом») кореневих волосків (*ar*). Масштаб = 200 мкм.

24-годинний вплив 0,1 мкМ D4476 не викликав явних змін загальної морфології коренів проростків *A. thaliana*. Проте, при використанні 1 мкМ D4476 і аналогічній двадцятичотирьохгодинній експозиції спостерігалась поява перших візуально помітних ознак пригнічення росту кореневих волосків (рис. 7.2b; 7.2e). Коли концентрація інгібітору становила 10 мкМ і витримувалась аналогічна експозиція, відбувалась поява помітних відхилень в морфології трихобластів, які з'явилися протягом 24-х годин. Серед найбільш помітних проявів морфологічної відповіді тестової системи слід зазначити схильність трихобластів до вигинання і галуження (рис. 7. 2c; 7.2f). Найбільша концентрація D4476 (50 мкМ) виявилась критичною для генезису трихобластів. Вже в перші години обробки 50 мкМ D4476 спостерігалось

повне пригнічення росту і критичне порушення морфогенезу корневих волосків, хоча відзначалась первинна ініціація спеціалізації клітин епіблеми (рис. 7.2d, 7.2g). Також, не було виявлено змін за таким показником як співвідношення трихобластів і атрихобластів епіблеми [46]. Це дає підставу пов'язувати «арешт» трихобластів безпосередньо з СК1-специфічним інгібуванням. За такої умови дія D4476 не викликає зміни цитогенетичної програми онтогенезу клітин епіблеми, а вищезгадані відповідні реакції носять виключно морфофізіологічний характер.

7.1.2. Зв'язок морфофізіологічних реакцій первинного кореня *Arabidopsis thaliana* і перебудов тубулінового цитоскелету під впливом специфічного інгібування рослинних протеїнкіназ СК1

Для підтвердження взаємозв'язку морфофізіологічних реакцій з перебудовою тубулінового цитоскелету було досліджено вплив D4476 на поведінку мікротрубочок. Прижиттєве спостереження за організацією і динамікою мікротрубочок в клітинах первинних коренів проростків *A. thaliana* було здійснено методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Контролем була організація мікротрубочок в клітинах різних зон коренів проростків *A. thaliana*, не оброблених інгібітором. Актуальне дослідження ґрунтувалось на попередніх напрацюваннях і вихідною точкою були отримані раніше результати [608]. Організація системи кортикальних мікротрубочок в клітинах контрольних рослин, що несуть флуоресцентний GFP-МТ (GFP-MAP4) маркер і використовувалися у нашому дослідженні, представлено на рис. 7.3 (а, б). Отримані результати підтвердили валідність вищезгаданої тестової системи [608, 280].

Під впливом D4476 в рослинах *A. thaliana*, що експресують флуоресцентний маркерний конструкт *GFP-MAP4*, спостерігалась чітка кореляція інгібування протеїнкіназ СК1 з перебудовою системи кортикальних мікротрубочок. Як і при вивченні морфофізіологічних реакцій, найбільш чутливою моделлю для дослідження дії D4476 була визначена

система мікротрубочок трихобластів і атрихобластів епіблеми проростка в зоні диференціації кореня.

Таблиця 7.1

Орієнтація кортикальних мікротрубочок в клітинах первинних коренів *A. thaliana* під впливом СК1-специфічного інгібування, викликаного інгібітором D4476

D4476		Кореневі апекси			Зона переходу		Зона розтягування		Зона диференціації / провідна		
концентрація, мкМ	експозиція, ч.	кореневий чохлак	епідерміс	меристема	епідерміс	кортекс	епідерміс	кортекс	епідерміс	кортекс	трихобласти
-	-										
0.1	6										
	24										
	48										
1	6										
	24										
	48										
10	6										
	24										
	48										
50	6										
	24										
	48										

Примітка: схематичні позначення орієнтації мікротрубочок відносно головної осі (ось 1) первинного кореня: - хаотична; - поперечна; , - похила; - випадкова; - поздовжня; - деполімеризація.

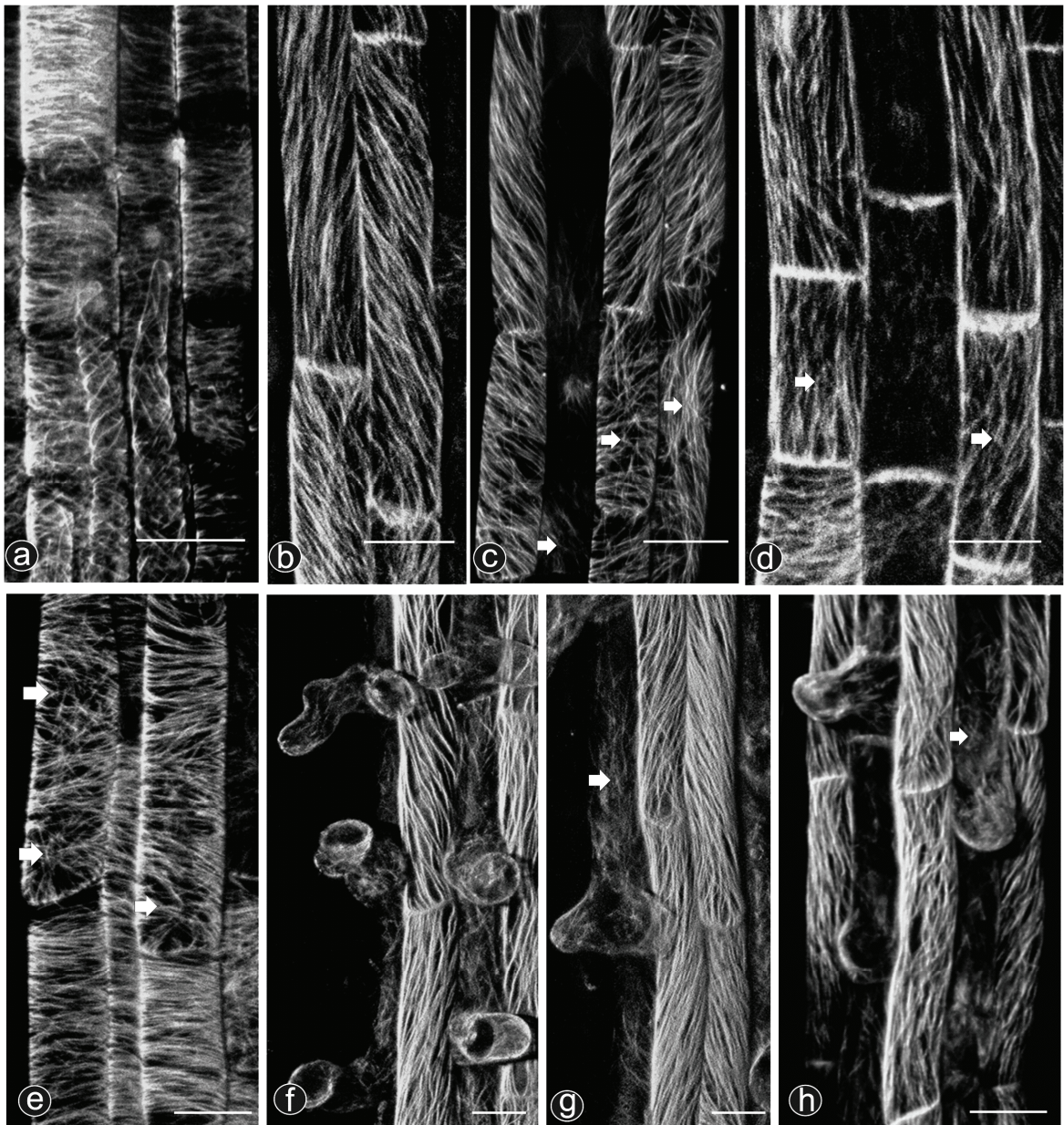


Рис. 7.3. Організація кортикальних мікротрубочок в клітинах первинних коренів контрольних (**a, b**) і оброблених інгібітором D4476 (**c-h**) проростків *A. thaliana* (лінія, що експресує флуоресцентний химерний продукт GFP-MAP4):

a) зона переходу/розтягнення; **b)** зона диференціації; **c)** зона диференціації (обробка 1 мкМ D4476/24 год.) - незначна дезорганізація мікротрубочок в окремих клітинах; **d)** зона розтягування (обробка 1 мкМ D4476/48 год.) - зміна орієнтації мікротрубочок з поперечно-похилого типу на подовжній; **e)** зона диференціації (обробка 10 мкМ D4476/6 год.) - дезорієнтація мікротрубочок; **f)** зона диференціації (обробка 10 мкМ D4476 / 24 год.) - хаотична і подовжня орієнтація мікротрубочок в окремих клітинах; **g)** зона диференціації (обробка 50 мкМ D4476/6 год.) - дезорієнтація мікротрубочок в трихобластах; **h)** зона диференціації (обробка 50 мкМ D4476 /24 год.) - дезорієнтація мікротрубочок в трихобластах і в клітинах зони елонгації. Масштаб = 20 мкм.

Обробка проростків *A. thaliana* 0,1 мкМ D4476 не викликала помітних змін в організації мікротрубочок (табл. 7.1). Аналіз проростків, оброблених 1 мкМ D4476 протягом 24 і 48 годин, виявив окремі клітини зони диференціації коренів, що вирізнялися значною хаотичністю розташування мікротрубочок (рис. 7.3с). Крім того, у проростків оброблених 1 мкМ D4476 з 48-годинною експозицією відзначалась переорієнтація мікротрубочок з поперечно-похилої на поздовжню в окремих клітинах провідної зони та зони розтягування (рис. 7.3d). Це чітко видно при порівнянні з клітинами контрольних рослин (рис. 7.3а).

Було встановлено, що інгібітор в концентрації 10 мкМ при 6-годинній експозиції змінює впорядковану похилу орієнтацію мікротрубочок на хаотичну в окремих клітинах провідної зони первинного кореня (рис. 7.3е). Подальше збільшення експозиції інгібітору до 24 і 48 годин призводило до виникнення аналогічних порушень і в клітинах зон переходу/розтягнення. Водночас, відбувалась поява окремих клітин провідної зони, де змінювалась орієнтація мікротрубочок з поперечно-похилої на хаотичну або поздовжню (табл. 7.1, рис. 7.3f).

У всіх досліджених типів клітин коренів *A. thaliana* дестабілізуючий ефект 50 мкМ D4476 на систему мікротрубочок був значно більш вираженим, ніж у випадку обробки 1 і 10 мкМ розчином D4476. Вже після 6 годин обробки 50 мкМ D4476, система мікротрубочок трихобластів дестабілізувалась і набувала ознак хаотичності (рис. 7.3g), а мікротрубочки клітин зон переходу і розтягування змінювали поперечно-похилу орієнтацію на хаотичну. При збільшенні експозиції до 24 і 48 годин, клітини з хаотичною або подовжньою орієнтацією мікротрубочок також з'являлися і в менш чутливих клітинах епідермісу, і кортексу зон переходу, розтягування і диференціації первинного кореня.

В таблиці 7.1 наведено узагальнену інформацію стосовно ефектів, що виникали під впливом різних концентрацій і експозицій СК1-специфічного інгібітору D4476 на організацію і орієнтацію мікротрубочок в клітинах

первинного кореня *A. thaliana* (табл. 7.1). Результати наочно підтверджують, що відповідь системи мікротрубочок оброблених клітин кардинально відрізняється від контролю (табл. 7.1, рис. 7.3h). Отримані дані дозволяють стверджувати, що система мікротрубочок трихобластів виявляла найбільшу чутливість до всіх застосованих концентрацій інгібітору D4476 (рис. 7.4). Обробка проростків *A. thaliana* розчином D4476 в концентраціях від 1 до 10 мкМ викликала очевидну дезорієнтацію і стабілізацію мікротрубочок в клітинах корневих волосків (рис. 7.4b и 7.4c), а наступне збільшення концентрації до 50 мкМ викликала їх часткову деполімеризацію (рис. 7.4d).

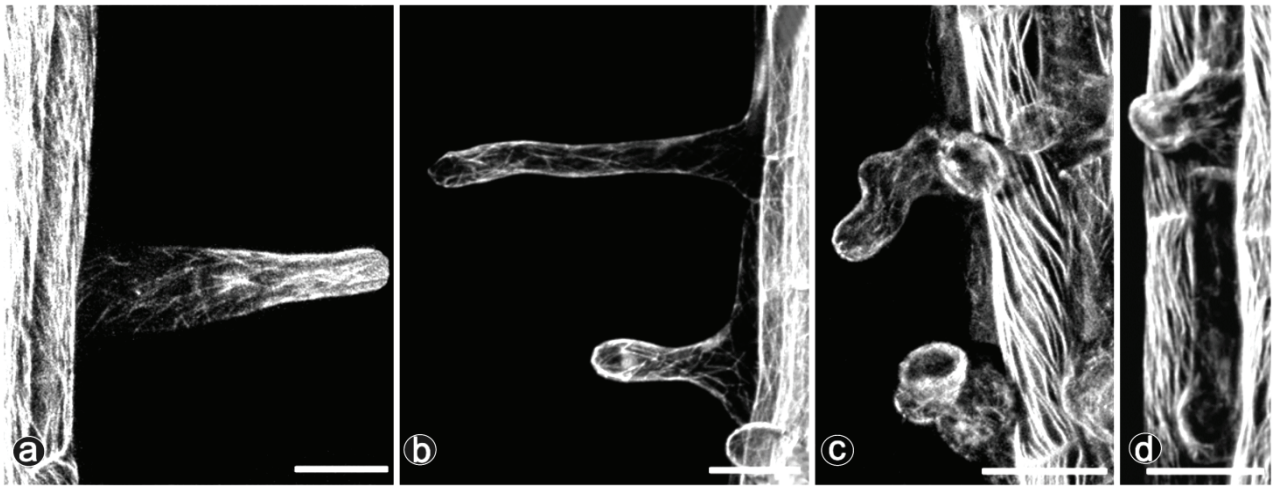


Рис. 7.4. Організація мікротрубочок в трихобластах первинного кореня проростків *A. thaliana* (лінія, що експресує GFP-MAP4) після 24-годинної обробки СК1-специфічним інгібітором D4476:

a) контроль; **b)** 1 мкМ D4476; **c)** 10 мкМ D4476: дезорієнтація і стабілізація мікротрубочок; **d)** 50 мкМ D4476: ініціація деполімеризації мікротрубочок.

Отримані результати підтверджують, що дія СК1-специфічного інгібітору D4476 має значний ефект на морфологію і ріст первинного кореня проростків *A. thaliana*. Виражене пригнічення росту кореня спостерігалось у всіх проростків, оброблених 10 і 50 мкМ D4476. Візуально помітні відмінності були зареєстровані на всіх контрольних точках обробки: 6, 24 і 48

годин. Таким чином, дія D4476 мала очевидний дозозалежний ефект. Аналогічні ефекти спостерігались під впливом D4476 на пухлинних клітинах людини штамів RAS (HCT-116, T24, і NCI-H1299) і LSC (leukemia stem cells) [248, 97]. Використання рослин, що експресують асоційований з мікротрубочками химерний білок GFP-MAP4, підтверджує, що викликане D4476 інгібування протеїнкіназ СК1 призводить до значних перебудов тубулінового цитоскелету. Це підтверджується результатами прижиттєвих спостережень, можливими завдяки флуоресценції MT-асоційованого маркеру (GFP-MAP4) і використанню конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Отримані дані дозволяють стверджувати, що інгібування протеїнкіназ СК1 призводить до зміни орієнтації мікротрубочок (від похилої до хаотичної або поздовжньої) в клітинах зони диференціації коріння. Було підтверджено, що переорієнтація мікротрубочок залежить від концентрації і часу впливу інгібітору, а найбільш чутливою до дії D4476 є система кортикальних мікротрубочок трихобластів. Так, під впливом СК1-специфічного інгібування, мікротрубочки корневих волосків дезорієнтуються, стабілізуються або повністю деполімеризуються. Слід зазначити, що всі перебудови тубулінового цитоскелету корелювали з відповідними морфологічними реакціями, які спостерігалися під впливом D4476.

Раніше Ven-Nissan et al. (2008) було показано, що рослинна протеїнкіназа СК1-like 6 (SKL6) фосфорилує β -тубулін, а порушення її експресії викликає перебудови мікротрубочок в клітинах *A. thaliana* та збільшує тотальну гетерогенність клітин [43]. Як відомо, система мікротрубочок грає фундаментальну роль в контролі морфогенезу вищих рослин [364]. Мікротрубочки рослин приймають безпосередню участь у формуванні корневих волосків і детермінують їх апікальний ріст [30, 532, 556]. Зниження експресії генів α -тубуліну спричиняє галуження корневих волосків трихобластів, аномальне формування корневих волосків клітинами тканин, для яких в нормі це не властиво [27]. Показано, що деполімеризація або стабілізація мікротрубочок може порушувати полярність росту

трихобластів. У свою чергу, така зміна полярності і зумовлює формування множинних точок незалежного росту в межах окремого кореневого волоска [51]. Все вищезазначене дозволяє висунути гіпотезу, що зміни в орієнтації мікротрубочок, а також супутня морфофізіологічна відповідь клітин трихобластів і атрихобластів безпосередньо пов'язані з цільовим пригніченням СК1-подібних протеїназ. Отримані результати підтверджують участь протеїназ СК1 в функціональній спеціалізації мікротрубочок рослин та їх внесок в «тубуліновий код». Зрозуміло, що зазначені ефекти можуть носити комплексний характер. D4476 належить до АТФ-конкурентних інгібіторів і, незважаючи на досить високу СК1-спрямовану специфічність, його селективність на рівні ізотипів СК1 досить низька [459]. Кількість ізотипів СК1-подібних протеїназ у вищих рослин значно перевищує кількість СК1 у ссавців або дріжджів. Попередній аналіз депонувань GeneBank [45] і UniProtKB [552] виявив щонайменше 18 протеїназ, які належать до СК1 і СК1-подібних (СК1-Like) протеїназ. Згідно з даними Ben-Nissan et al. (2008) у *A. thaliana* взаємодія SKL6 з мікротрубочками відбувається завдяки домену, який знаходиться в С-кінцевій ділянці. Ця ділянка функціонує окремо і структурно не перекривається з каталітичним (кіназним) доменом [43]. З цього випливає, що остаточну відповідь на питання «Які саме ізотипи рослинних СК1-подібних протеїназ, крім SKL6, можуть приймати участь у вищеописаних відповідях на дію D4476?» можна дати на підставі комплексного аналізу ліганд-білкових взаємодій, аналізу С-кінцевих доменів і відбору ізотипів, які експресуються в тканинах первинного кореня. Крім того, має враховуватись фактор опосередкованої дії, яка може бути реалізована завдяки фосфорилуванню білків асоційованих з мікротрубочками (БМ). Отримані на цьому етапі результати дозволили стверджувати важливість рослинних гомологів СК1 як «агентів впливу» на структуру і динаміку тубулінового цитоскелету.

7.1.3. Біоінформатичне визначення рослинних СК1-подібних протеїнкіназ, причетних до регуляції тубулінового коду і системи мікротрубочок

Експерименти на клітинах тварин і *Schizosaccharomyces pombe* засвідчили значну специфічність інгібітора D4476 по відношенню до протеїнкіназ родини СК1 [459]. У *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* та інших ссавців родина СК1 складається з семи протеїнкіназ: KC1A (UniProt: P48729), KC1AL (UniProt: Q8N752), KC1D (UniProt: P48730), KC1E (UniProt: P49674), KC1G1 (UniProt: Q9HCP0), KC1G2 (UniProt: P78368) і KC1G3 (UniProt: Q9Y6M4). Ізотипи СК1-подібних протеїнкіназ вищих рослин характеризуються більшим різноманіттям. blastp-сканування протеому *A. thaliana* (UniProtKB) проти каталітичних доменів протеїнкіназ KC1D (*H. sapiens* (UniProt: P48730), *R. norvegicus* (Q06486), *M. musculus* (Q9DC28), *B. taurus* (P35508) і *P. abelii* (Q5RC72)) виявило 33 рослинних гомолога СК1. Наступне порівняння координат локусів відповідних генів (дані Tair) виявило багаторазові депонування, що дозволило скоротити первинну вибірку до 18 унікальних послідовностей СК1 і СК1-подібних (СКЛ) протеїнкіназ (табл. 7.2).

Оскільки D4476 є АТФ-конкурентним інгібітором, механізм його дії ґрунтується на зв'язуванні цього ліганду в фосфат-зв'язуючій кишені ферменту [459]. Тож виникає логічне питання стосовно ступеня консервативності амінокислотного складу цього сайту у СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana*. Незважаючи на загальну подібність, результати вирівнювання ділянок послідовностей фосфат-зв'язуючої кишені протеїнкіназ СК1 (α , $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, δ , and ϵ) *H.sapiens* і 18-ти СКЛ кіназ *A. thaliana* виявили помітну гетерогенність цього сайту навіть на рівні видоспецифічних груп (рис. 7.6).

Таблиця 7.2

**Ізотипи казеїн-кінази 1 (СК1) і казеїн-кіназа 1 - подібних (СКЛ)
протеїнкіназ *A. thaliana*, відібрані на підставі аналізу баз даних і
гомології до тваринних протеїнкіназ СК1**

N	Протеїнкінази СК1/СКЛ <i>A. thaliana</i>	Ген	UniProt	Локус гена	
				координати (bp)	напрямок
1	CKL2	At1g72710	Q9CAI5	27372271-27376584 bp	forward
2	CKL9	At1g03930	Q9ZWB3	1004769-1008370 bp	forward
3	CKL13	At1g04440	Q5XF24	1202255-1205803 bp	forward
4	CKL5	At2g19470	Q9ZUP4	8433611-8436553 bp	reverse
5	F17H15.21	At2g25760	O82321	10984808-10988924 bp	reverse
6	CKL10	At3g23340	Q9LW62	8350803-8353959 bp	forward
7	F20H23.1 / T11I18.5	At3g03940	Q9SRW8	1014025-1019224 bp	reverse
8	At3g13670 / MMM17.17	At3g13670	Q9LID3	4469222-4473547 bp	forward
9	CKL1 (CKI8)	At4g26100	P42158	13227450-13230797 bp	reverse
10	At4g08800 / T32A17.110	At4g08800	Q9LDY6 Q1PEB0	5614134-5615919 bp	forward
11	CKL11	At4g14340	Q39050	8248286-8251998 bp	reverse
12	CKL6	At4g28540	Q8LPJ1	14106959-14110706 bp	forward
13	CKL3	At4g28880	Q93Z18	14251214-14254432 bp	forward
14	CKL4	At4g28860	Q8LPI7	14246283-14249544 bp	forward
15	CKL12	At5g57015	Q8VYK9	23071097-23074843 bp	forward
16	CKL7	At5g44100	Q9FFH8	17749118-17752716 bp	reverse
17	CKL8	At5g43320	Q9LSX4	17385867-17389527 bp	reverse
18	MRG7.15	At5g18190	Q9FK52	6009967-6014689 bp	reverse

Відбір рослинних гомологів додатково контролювався результатами NJ-кластеризації (рис. 7.5). На сьогодні з 18 рослинних гомологів 13 вже надано статус анотованих послідовностей. Водночас, вирівнювання послідовностей і NJ-кластеризація підтвердили неоднорідність каталітичних доменів СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana*.

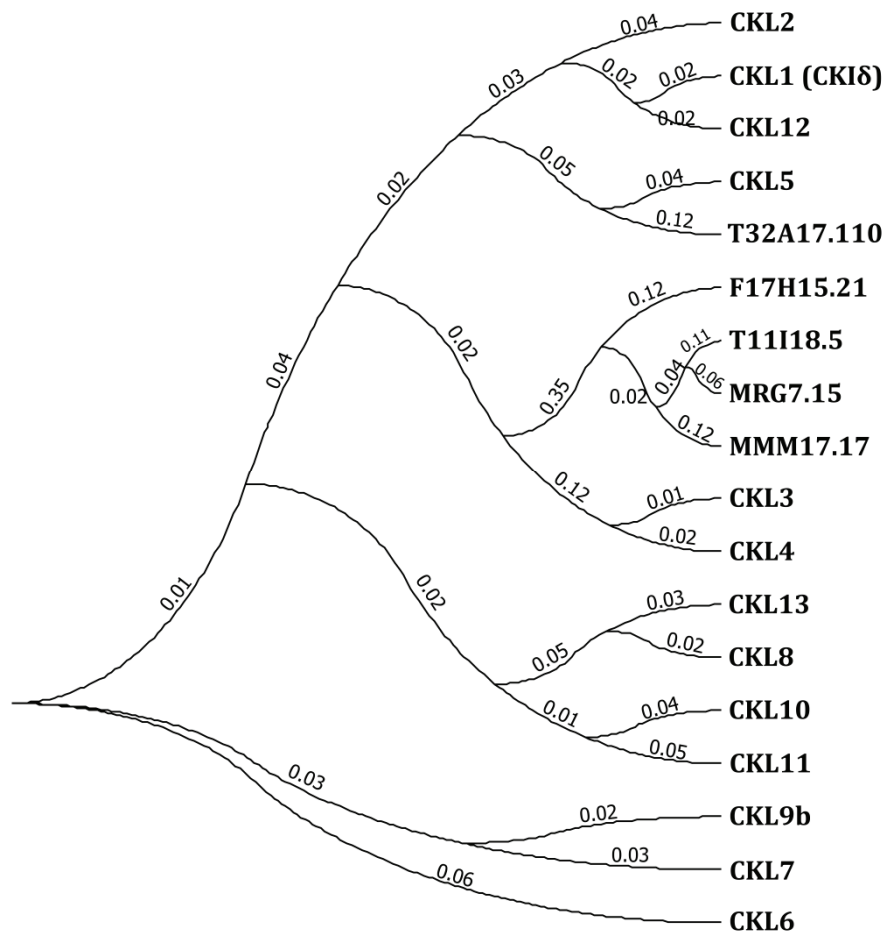


Рис. 7.5. Гетерогенність послідовностей каталітичних доменів СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* відповідно до результатів NJ-кластеризації:

СКЛ11 - СК1-подібна протеїнкіназа 11; СКЛ2 - СК1-подібна протеїнкіназа 2; СКЛ3 - СК1-подібна протеїнкіназа 3; СКЛ4 - СК1-подібна протеїнкіназа 4; СКЛ5 - СК1-подібна протеїнкіназа 5; СКЛ6 - СК1-подібна протеїнкіназа 6; СКЛ7 - СК1-подібна протеїнкіназа 7; СКЛ8 - СК1-подібна протеїнкіназа 8; СКЛ9b (СКЛ9 / ADK1) - СК1-подібна протеїнкіназа 9; СКЛ10 - СК1-подібна протеїнкіназа 10; СКЛ12 - СК1-подібна протеїнкіназа 12; СКЛ13 - СК1-подібна протеїнкіназа 13; КС1D (СКЛ1 / СК1δ) - Казеїнкіназа 1 δ-подібний ізотип; F17H15.21 - СК1-подібна протеїнкіназа At2g25760; T11I18.5 - СК1-подібний продукт гену At3g03940; MMM17.17 - подібний продукт гену At3g13670; T32A17.110 - подібний продукт гену AT4g08800; MRG7.15 - подібний продукт гену At5g18190.

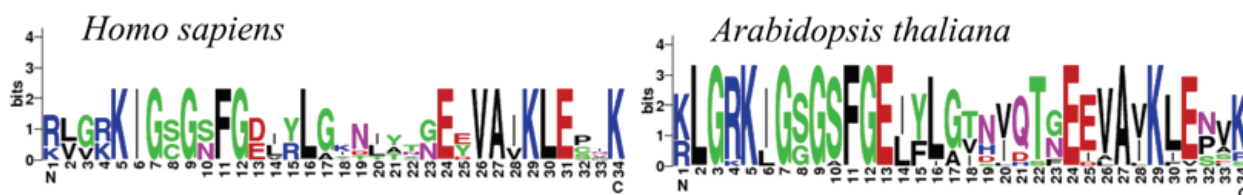


Рис. 7.6. Логи, складені за результатами вирівнювання ділянок, формуючих АТФ-зв'язуючу кишеню всіх відомих ізотипів протеїнкіназ СК1 *H. sapiens* (ліворуч) і протеїнкіназ СКЛ *A. thaliana* (праворуч).

З іншого боку, аналіз ортологічних СК1, що належать різним видам ссавців, показав значну консервативність цього сайту. Вирівнювання ділянок фосфат-зв'язуючого сайту KC1D представників ссавців засвідчило їх повну ідентичність (рис. 7.7).

<i>Homo sapiens</i>	RLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECVK
<i>Bos taurus</i>	RLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECVK
<i>Rattus norvegicus</i>	RLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECVK
<i>Pongo abelii</i>	RLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECVK
<i>Mus musculus</i>	RLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAAGEEVAIKLECVK

Рис. 7.7. Множинне вирівнювання фрагменту фосфат-зв'язуючої ділянки сайту тваринних протеїнкіназ KC1D (*H. sapiens* - P48730, *B. taurus* - P35508, *R. norvegicus* - Q06486, *P. abelii* - Q5RC72 і *M. musculus* - Q9DC28).

Раніше, Rena et al. показали, що D4476 в концентрації 10 мкМ викликав 90% інгібуючий ефект на KC1D (СК1δ) і практично не впливав на інші протеїнкінази тестової панелі [459]. Тому для подальшого порівняльного дослідження ліганд-білкової взаємодії було вирішено використовувати каталітичний домен KC1D *R. norvegicus* і найближчого рослинного гомолога з *A. thaliana*.

Таблиця 7.3

Рівень подібності рослинних протеїнкіназ СКЛ *A. thaliana* і еталонної послідовності ізо типу KC1D казеїн-кінази 1 (Csnk1d) *R. norvegicus*

Протеїнкіназа	Вага вирівнювання	E-value	Ідентичність (%)	Подібність (%)	Гепи (%)
СКЛ1 (СК1δ)	456	e-129	78	92	-
СКЛ12	455	e-128	79	90	-
СКЛ10	451	e-127	75	91	-
СКЛ9 (ADK1)	451	e-127	75	91	-
СКЛ7	449	e-126	75	91	-
СКЛ2	448	e-126	77	91	0
СКЛ6	442	e-124	74	89	-
СКЛ11	432	e-121	73	88	-
СКЛ8	431	e-121	71	88	-
СКЛ13	428	e-120	71	88	-
СКЛ5	428	e-120	71	88	-
СКЛ3	405	e-113	69	85	-
СКЛ4	405	e-113	69	85	-
T32A17.110	348	4e-96	63	78	11
F17H15.21	196	1e-50	37	58	5
MMM17.17	194	5e-50	37	60	6
MRG7.15	193	1e-49	37	58	5
T11I18.5	134	8e-32	39	59	3

Крім того, було вирішено здійснити порівняння просторових структур всіх СК1 *R. norvegicus* і їхніх рослинних гомологів з *A. thaliana*. Результати blastp-пошуку в UniProtKB дозволили оцінити рівень подібності СКЛ-кіназ *A. thaliana* і еталонної послідовності KC1D (P42158) *R. norvegicus*.

Відповідно до звіту SIB-BLAST, максимальна вага вирівнювання "Score" (456) належала рослинній протеїнкіназі, визначенній раніше як СК1 δ (СКL1) (UniProt: P42158 - ідентичність = 78%, подібність = 92%, кількість гепів = 0). Основні показники для всієї групи рослинних гомологів також мали досить високі значення: вага вирівнювання = $324,5 \pm 131,5$, ідентичність = 37-79%, подібність = 58-92%, гепи = 0-11% (табл. 7.3).

Для подальшої оцінки структурних відмінностей каталітичних доменів було виконано реконструкцію 3D-моделей каталітичних доменів. Моделювання виконувалось для всіх ізотипів СК1 *R. norvegicus* (UniProt: P97633 Isoform 1), KC1AL (UniProt: P97633 Isoform 2), KC1D (UniProt: Q06486), KC1E (UniProt: Q9JJ76), KC1G1 (UniProt: Q62761), KC1G2 (UniProt: Q62762), KC1G3 (UniProt: Q62763) і відібраних рослинних гомологів з *A. thaliana* (табл. 7.2, 7.3). Шаблонне моделювання, первинну оптимізацію геометрії і молекулярну динаміку тривимірних моделей каталітичних доменів було виконано відповідно до протоколу. Результати структурного накладання координат атомів отриманих моделей підтвердили значну подібність всіх ізотипів СК1 *R. norvegicus*. (рис. 7.8a) У *A. thaliana* деякі з гомологів (T11I18.5, MRG7.15 MMM17.17) були виключені з подальшого дослідження, оскільки мали значні структурні відмінності. Рослинні F17H15.21 і T32A17.110 було виключено з подальшого дослідження, оскільки наразі їх повні послідовності відсутні. Таким чином, всього було відібрано 13 рослинних СКL, які показали найбільшу структурну подібність до тваринних СК1 (рис. 7.8б) Крім того, структурне накладання PDB-структури каталітичного домену СК1D (PDB: 1CKI 2.30 Å) *R. norvegicus* і моделі СКL1 (СК1 δ , UniProt: P42158) *A. thaliana* остаточно підтвердило їх значну структурну подібність (RMS=0.915) (рис.7.8С). Це остаточно визначило вищезгадані протеїнкінази як пріоритетні мішені подальшого молекулярного докінгу інгібітору D4476.

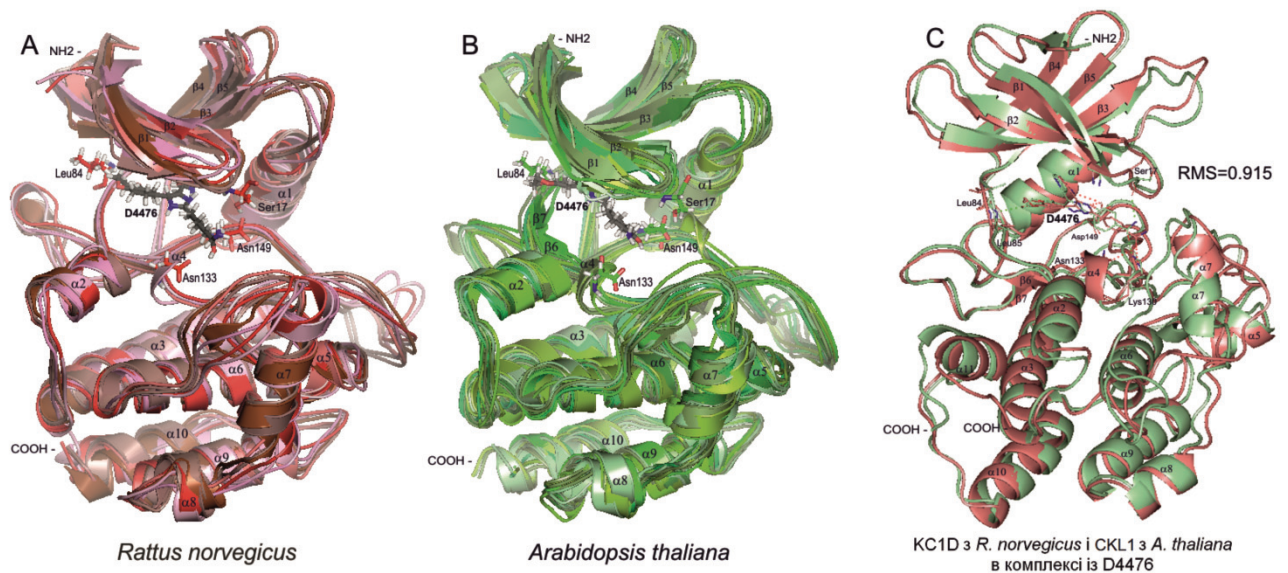


Рис. 7.8. Результати структурного вирівнювання координат $\text{C}\alpha$ -атомів CK1-подібних протеїнкіназ *R. norvegicus* (A: KC1A, KC1AL, KC1D, KC1E, KC1G1, KC1G2 і KC1G3) і *A. thaliana* (B: CKL1 (CK1 δ), CKI1, CKL2, CKL3, CKL4, CKL5, CKL6, CKL7, CKL8, CKL9b, CKL10, CKL12, CKL13). Порівняння тваринного і рослинного ізотипів протеїнкіназ KC1D / CKL1 (CK1 δ) в комплексі із CK1-специфічним інгібітором D4476 (C).

Протокол ліганд-білкового докінгу та верифікація його результатів детально викладені розділі «Матеріали і методи». Для додаткової верифікації результатів докінгу і контрольного калібрування оціночних функцій програми CCDC Gold було виконано докінг з використанням експериментально підтверджених структур комплексів CK1 з *Schizosaccharomyces pombe* (PDB ID: 1CSN і 1EH4), що містили у своєму складі АТР і ІС261 відповідно. Отримані моделі комплексів підтвердили відсутність стеричних бар'єрів для зв'язування D4476 (рис. 7.9). Критеріями відбору оптимальних активних конформацій D4476 в сайті CK1D *R. norvegicus* і CKL1 (KC1 δ), *A. thaliana* були кількість водневих зв'язків і наявність коротких контактів. Побудовані комплекси було порівняно між собою і з експериментально підтвердженими структурами 1CSN і 1EH4 (рис. 7.9, и 7.10)

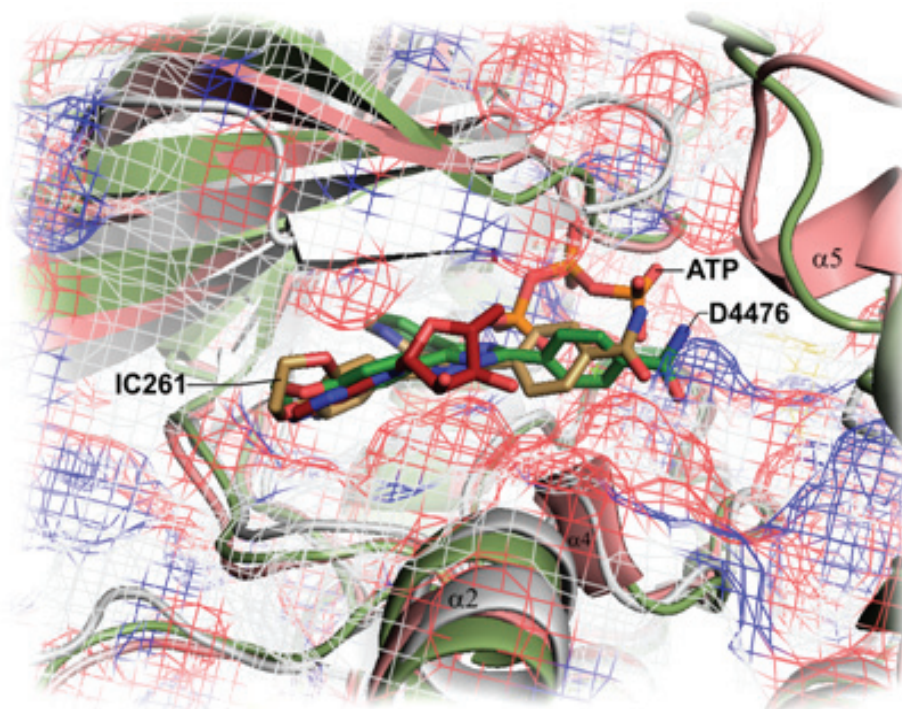


Рис. 7.9. Структурне вирівнювання СК1 і СК1-подібних протеїнкіназ *R. norvegicus* (червоний), *A. thaliana* (зелений) і *S. pombe* (сірий) в комплексі з лігандами: АТФ (АТФ), D4476 і IC261. Таке структурне порівняння АТФ-зв'язуючих кишень дозволило визначити позиції і орієнтації лігандів (АТФ (АТФ), IC261 і D4476) в сайті зв'язування і підтвердити відсутність структурних перепон для зв'язування цільового ліганду - D4476.

Наступна молекулярна динаміка комплексів виконувалась в програмі GROMACS із застосуванням силового поля charmm27. Головною метою обрахунку молекулярної динаміки було визначення амінокислотних залишків, що безпосередньо беруть участь в зв'язуванні ліганду. Раніше побудовані комплекси KC1D-D4476 для *R. norvegicus* і СК1δ-D4476 для *A. thaliana* були використані як джерела інформації стосовно вихідних координат. За результатами розрахунку молекулярної динаміки комплексів було встановлено, що впродовж 5 нс середня кількість водневих зв'язків складала 3,9 для комплексу з *R. norvegicus* і 2,9 для комплексу з *A. thaliana*.

Відповідно до результатів докінгу, для обох комплексів водневі зв'язки і короткі контакти з D4476 утворювали 5 амінокислот сайту Ser17, Lys130, Asn133, Asp149 і Leu84 (рис. 7.10).

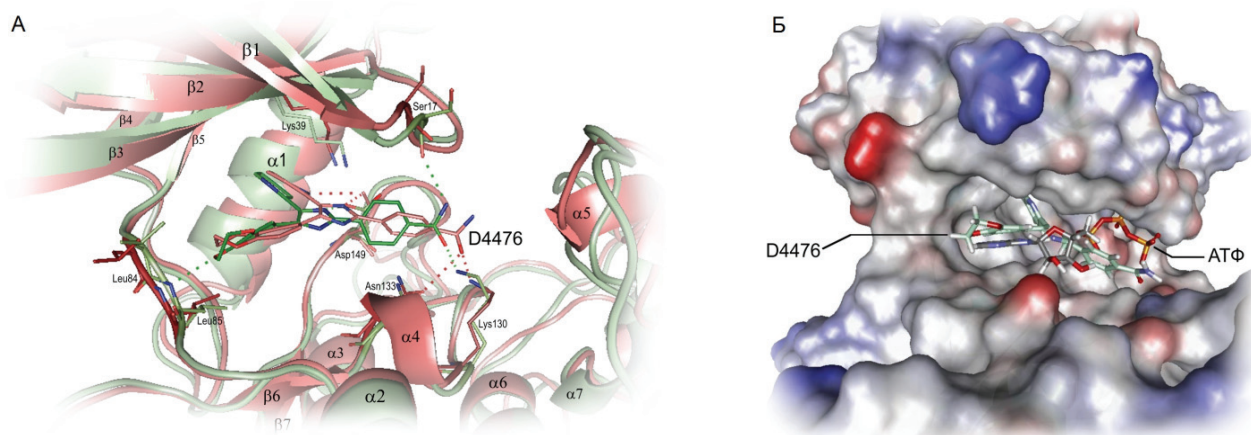


Рис. 7.10. Порівняння результатів молекулярного докінгу D4476 (4-[4-(2,3-дигідро-1,4-бензодіоксін-6-іл)-5-(2-піридиніл)-1H-імідазол-2-іл]бензамід) в АТФ-зв'язуючу кишеню KC1D з *R. norvegicus* (червоний) і SKL1 (СК1δ) з *A. thaliana* (зелений):

А) Порівняння результатів докінгу D4476 в цільовому сайті тваринної KC1D і рослинної SKL1. На малюнку позначено амінокислоти, які утворюють водневі зв'язки з лігандом;

Б) Порівняння позицій D4476 і нативного АТФ в цільовому сайті SKL1 *A. thaliana*.

Результати розрахунку молекулярної динаміки (SD, RMSD, локальні потенціали Леннарда-Джонса, середні показники кулонівської взаємодії (120.915 kJ / mol у KC1D *R. norvegicus* і 101.475 kJ / mol у SKL1 *A. thaliana*), цілком підтвердили попередні висновки стосовно ключової ролі цих амінокислотних залишків в зв'язуванні D4476 (рис. 7.11 і 7.12).

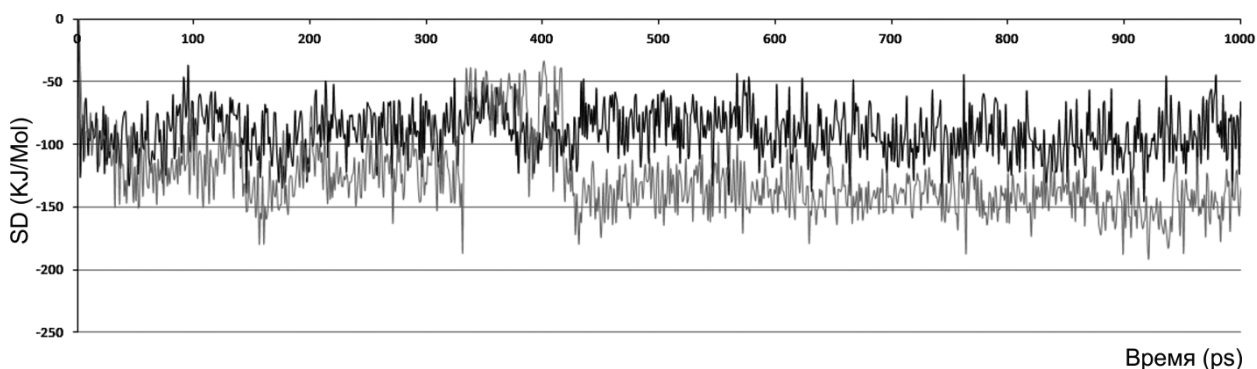


Рис. 7.11. Аналіз динаміки кулонівських взаємодій D4476 з цільовими сайтами KC1D *R. norvegicus* і SKL1 (SK1 δ) *A. thaliana*.

Примітка: сірим кольором позначено траєкторію KC1D *R. norvegicus*; чорним кольором - SKL1 (SK1 δ) *A. thaliana*.

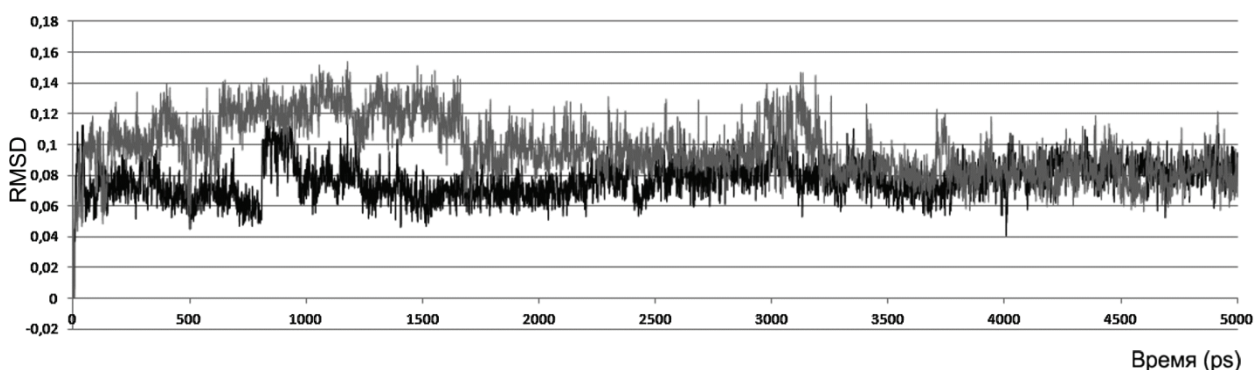


Рис. 7.12. Результати розрахунку флуктуацій середньоквадратичного відхилення (RMSD) D4476 в комплексі з KC1D *R. norvegicus* і SKL1 (SK1 δ) *A. thaliana*.

Примітка: сірим кольором позначено траєкторію KC1D *R. norvegicus*; чорним кольором - SKL1 (SK1 δ) *A. thaliana*.

Значна внутрішньо- і міжвидова подібність SKL рослин і SK1 тварин дозволила застосувати кластеризацію фрагментів, які беруть безпосередню участь у формуванні АТФ-зв'язуючої кишені. З огляду на структурну подібність групи, така кластеризація була оптимальним методом експрес-оцінки подібності амінокислотного складу сайтів і виявлення можливих альтернативних мішеней інгібітору. Досліджувана група містила фрагменти АТФ-зв'язуючої кишені KC1D пацюка, а також, SK1 - α , δ , γ 1, γ 2, і ϵ (KC1A, KC1D, KC1G1, KC1G2, KC1E) людини, оскільки для цих протеїнкіназ

існують біохімічні докази прямого інгібуючого ефекту D4476 (позитивний контроль - СК1 α , δ і ϵ) або, навпаки, його відсутності (негативний контроль: СК1 γ 1 і γ 2) [459, 18, 435]. Для кожної протеїнкінази було отримано профіль, який складався з семи фрагментів, що формують АТФ-зв'язуючу кишеню ферменту. (рис. 7.13)

	1	2	3	4	5	6	7
CKL1 ARATH (CK1 δ , P42158)	KIGSGSFGEIYLG	LAIKL	LYR	NVK	VLVMDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDFGLA
CKL12 ARATH (Q8VYK9)	KIGSGSFGEIYLG	VAIKL	LYR	NIK	TLVMDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDFGLA
CKL2 ARATH (Q9CAI5)	KIGSGSFGEIYLG	VAIKL	LYK	NVK	VLVIDL	GPSLEDL	LKPDNFLM VIDFGLA
CKL5 ARATH (Q9ZUP4)	KIGSGSFGEIYLG	VAIKL	IYR	NMK	VLVMDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDYGLA
CKL9 ARATH (Q9ZWB3)	KIGSGSFGELYLG	VAVKL	LYM	NLK	VMVIDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDFGLG
CKL7 ARATH (Q9FFH8)	KIGSGSFGELYLG	VAVKL	LYM	NIK	VMVIDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDFGLG
CKL6 ARATH (Q8LPJ1)	KIGSGSFGELFLA	AAVKL	IYM	SLK	AMVIDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDFGLA
CKL13 ARATH (Q5XF24)	KLGSFSFGELFLG	VAVKL	LYM	HLK	CMVIDL	GPSMEEF	LKPDNFLM IIDYGLA
CKL8 ARATH (Q9LSX4)	KLGSFSFGELFLG	VAVKL	LYM	HLK	CMVIDL	GPSMEDL	LKPDNFLM IIDYGLA
CKL10 ARATH (Q9LW62)	KIGSGSFGELYIG	VALKL	VYM	HFK	CMAIDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDYGLA
CKL11 ARATH (Q39050)	KLGSFSFGELYLG	VAVKL	IYM	HLK	CMVIDL	GPSLEDL	LKPDNFLM IIDYGLA
CKL3 ARATH (Q93Z18)	KIGSGSFGEIFLA	VAVKI	LYR	RIK	ALVMDL	GPSLEDL	LKPDNFLM LIIDFGLA
CKL4 ARATH (Q8LPI7)	KIGSGSFGEIFLA	VAVKI	LYR	RIR	ALVMDL	GPSLEDL	LKPDNFLM LIIDFGLA
KC1D RAT (1CKI, 1CKJ)	KIGSGSFGDIYLG	VAIKL	IYK	TIR	VMVMEL	GPSLEDL	VKPDNFLM IIDFGLA
KC1D HUMAN (P48730)	KIGSGSFGDIYLG	VAIKL	IYK	TIR	VMVMEL	GPSLEDL	VKPDNFLM IIDFGLA
KC1E HUMAN (P49674)	KIGSGSFGDIYLG	VAIKL	FYK	SIK	VMVMEL	GPSLEDL	VKPDNFLM IIDFGLA
KC1A HUMAN (P48729)	KIGSGSFGDIYLA	VAVKL	LYK	HIR	VLVMDL	GPSLEDL	LKPDNFLM LIIDFGLA
KC1G1 HUMAN (Q9HCP0)	KIGCGNFGELRLG	VAIKL	FYK	QVY	AMVLEL	GPSLEDL	VKPDNFLI IIDFGLA
KC1G2 HUMAN (P78368)	KIGCGNFGELRLG	VAIKL	FYK	QVY	AMVLEL	GPSLEDL	VKPDNFLV IIDFGLA
	* #* **	* *	*		*#***	#* #**	*# **

Рис. 7.13. Вирівнювання амінокислотних фрагментів, утворюючих АТФ-зв'язуючу кишеню тваринних протеїнкіназ СК1 і їх рослинних гомологів з *A. thaliana*:

"*" - консервативні амінокислоти, "#" - амінокислотні залишки, безпосередньо залучені у зв'язування D4476 з KC1D *R. norvegicus* і CKL1 (СК1 δ) *A. thaliana* (рис. 7.9 и 7.10a).

Було застосовано два види кластеризації:

1) з видаленням усіх консервативних стовпців після первинного вирівнювання - "*" (за винятком стовпців амінокислотних залишків, які беруть участь у зв'язуванні ліганду - "#");

2) з використанням виключно стовпців амінокислот, які беруть участь у формуванні комплексу з молекулою D4476 (рис. 14a і 14b).

В обох випадках спостерігалось формування спільної клади всіх СК1-подібних протеїнкіназ рослин з СК1 α , δ і ϵ тварин, здатними взаємодіяти з D4476: KC1D_RAT (Q06486), KC1D_HUMAN (P48730), KC1E_HUMAN (P49674), KC1A_HUMAN (P48729). Водночас, протеїнкінази негативного

контролю KC1G1_HUMAN (Q9HCP0) і KC1G2_HUMAN (P78368) формували окрему кладу (рис. 7.14a і 7.14b).

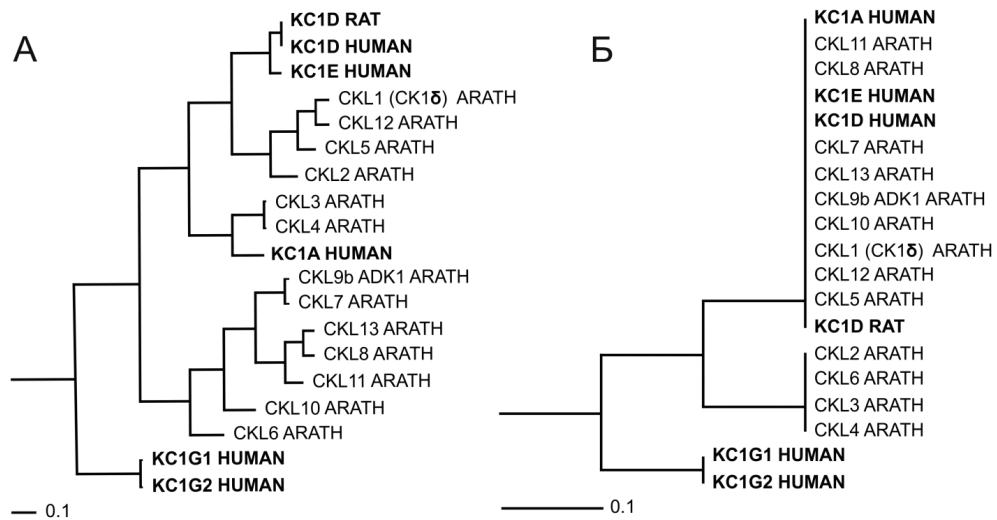


Рис. 7.14. Результати хомогеномної кластеризації цільових сайтів потенціального зв'язування інгібітору з метою визначення СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana*, які є пріоритетними молекулярними мішенями інгібітору D4476. Аналіз ґрунтувався на UPGMA-кластеризації фрагментів послідовностей, які формують АТФ-зв'язуючий сайт:

А - з використанням амінокислотних фрагментів, що формують АТФ-зв'язуючу кишеню (з попереднім видаленням всіх консервативних колонок амінокислот, які беруть участь у зв'язуванні D4476);

Б - з використанням кластеризації амінокислотних залишків, що відповідають колонкам амінокислот, безпосередньо задіяним у зв'язуванні АТФ-конкурентного інгібітору D4476. Профілі сайтів тваринних KC1D_RAT (Q06486), KC1D_HUMAN (P48730), KC1E_HUMAN (P49674) і KC1A_HUMAN (P48729) було використано як позитивний контроль, а KC1G1_HUMAN (Q9HCP0) і KC1G2_HUMAN (P78368) - як негативний контроль [435, 459, 18].

З п'яти залишків, які безпосередньо взаємодіють з D4476, заміни були присутні лише в позиціях, еквівалентних Ser17 KC1D пацюка. У CKL1_ARATH (CK1δ, P42158), CKL12_ARATH (Q8VYK9), CKL5_ARATH (Q9ZUP4), CKL9_ARATH (Q9ZWB3), CKL7_ARATH (Q9FFH8), CKL13_ARATH (Q5XF24), CKL8_ARATH (Q9LSX4), CKL10_ARATH

(Q9LW62) і SKI1_ARATH (Q39050) серин в даній позиції був консервативним. У SKL2_ARATH, SKL6_ARATH (Q8LPJ1), SKL3_ARATH (Q93Z18) і SKL4_ARATH (Q8LPI7) в цьому положенні замість серину (гідрофобний момент (НМ) = - 1.1; ізоелектрична точка (pI) = 5,7; індекс гідрофобності для SKL1 *A. thaliana* = - 0.8) був гліцин (гідрофобний момент (НМ) = 0.7; ізоелектрична точка (pI) = 6,0; індекс гідрофобності для SKL6 *Arabidopsis* = - 0.4) [55]. Обидві амінокислоти невеликі, полярні, що дає нам підставу вважати ці заміни не критичними для взаємодії з D4476. Інгібуючу дію D4476 раніше експериментально підтвердили для SKL6 *Arabidopsis* [43], для KC1D пацюка і людини. На наступному етапі було виконано порівняння амінокислотного складу фосфатзв'язуючих ділянок SKL1 (At4g26100.1) і SKL6 (At4g28540.1) *A. thaliana* (рис. 7.15). З огляду на схожість просторових структур і значну подібність послідовностей (ідентичність = 78%, схожість = 92%) порівнюваних ділянок (рис. 7.15), було зроблено припущення, що механізм взаємодії цих протеїназ з інгібітором D4476 також має бути подібним. Відповідно всі 13 SK1-подібні протеїнази *A. thaliana* повинні взаємодіяти з D4476 і мати схожий коефіцієнт інгібування.

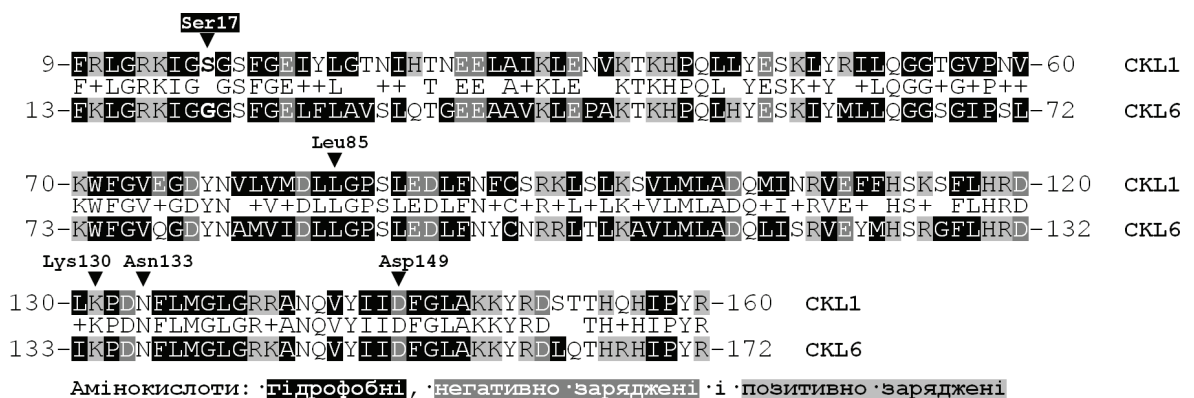


Рис. 7.15. Порівняння амінокислотного складу фосфатзв'язуючих ділянок SKL1 (At4g26100.1) і SKL6 (At4g28540.1) *A. thaliana*:

Leu85, Lys130, Asn133, Asp149 - консервативні амінокислотні залишки безпосередньо залучені у взаємодію з D4476. Встановлено, що в положенні, яке відповідає Ser17 (індекс гідрофобності = - 0.8) протеїнази SKL1, рослинна SKL6 має гліцин - Gly21 (індекс гідрофобності = - 0.4).

7.1.4. СК1-подібні протеїнкінази *A. thaliana*, здатні взаємодіяти з мікротрубочками

Аналіз С-кінцевих ділянок. Біоінформатичне дослідження підтвердило ймовірність однакової взаємодії з D4476 всіх 13 ізотипів СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* (рис. 7.14). Тобто здатність індивідуальних ізотипів СКL впливати на динаміку мікротрубочок рослин повинна залежати від їх здатності взаємодіяти з тубуліном мікротрубочок або з асоційованими БАМ. Відомо, що С-кінцевий домен СКL6 з *A. thaliana* здатен колокалізуватися з кортикальними мікротрубочками [43]. Ben-Nissan et al. (2008) було встановлено, що фрагмент (351-RRNVRGSPHQNHTRHRTLDEIPSMKPAVNMVSEKGRNTSRYGSASR-397) асоціюється з мікротрубочками *in vivo* і взаємодіє з тубуліном *in vitro* [43]. blastp-пошук засвідчив відсутність гомологічних ділянок у будь-якого з ізотипів СК1 представників *Mammalia* и *Fungi*. Водночас, гомологічні ділянки були знайдені у деяких СК1-подібних протеїнкіназ рослин: I1N9S4 *Glycine max*, B9SS69 (RCOM_1169490) *Ricinus communis*, G7I5I9 (MTR_1g076040) *Medicago truncatula*, B9HKH5 (POPTRDRAFT_803757) *Populus trichocarpa*, F6HZM0 (VIT_07s0005g03710) *Vitis vinifera* та ін. Стало очевидним, що зазначений домен притаманний виключно рослинним гомологам СКL6 *A. thaliana*. Ще одним аргументом на користь ролі вищезгаданого домену у взаємодії СКL6 з тубуліном мікротрубочок став факт наявності ділянок гомологічних мотиву 383-VSEKGRNTSRYG-394 С-кінцевого домену в послідовностях EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) людини (B5MCW9_HUMAN, F2Z2U0_HUMAN, B5MBZ0_HUMAN, A6P4V4_HUMAN) і пацюка (F1M356_RAT, F1LZC1_RAT, F1LTB2_RAT, F1LT71_RAT) (Рис. 7.16).

Крім безпосереднього фосфорилування тубуліну, іншим можливим шляхом регуляції динаміки мікротрубочок в клітинах тварин є фосфорилування асоційованих білків: MAP1 (EB1), MAP2 і MAP4 [628, 599,

369]. Раніше зазначалось, що у рослин існують виключно гомологи MAP1 (EB1) [192, 456]. Є експериментальні підтвердження фосфорилування тваринних EB1 протеїнкіназою SKI δ , яке безпосередньо залежить від невеликого мотиву Ser-x-Ile-Pro (SxIP), який специфічно впізнає ділянку EBH домену EB1 [216, 628]. Аналіз С-кінцевих доменів СК1-подібних протеїнкіназ *A. thaliana* виявив канонічні SxIP мотиви у двох ізотипах - SKL1 (367-SmlP-370) і SKL2 (340-SgIP-343; 421-SkIP-424). В С-кінцевій ділянці SKL2 також було знайдено подібний мотив, що містить близьку заміну 315-SalP-318, (I \rightarrow L317).

```

351-VSEKGRNTSRYG-394 - SKL6 Arabidopsis thaliana
      |||  |||  |||  |||
646-VSENGRKY SRYG-657 - B5MCW9_HUMAN (EML4)
491-VSENGRKY SRYG-502 - F2Z2U0_HUMAN (EML4)
715-VSENGRKY SRYG-726 - B5MBZ0_HUMAN (EML4)
704-VSENGRKY SRYG-715 - A6P4V4_HUMAN (EML4)
596-VSENGRKY SRYG-607 - F1M356_RAT (EML4)
708-VSENGRKY SRYG-719 - F1LZC1_RAT (EML4)
639-VSENGRKY SRYG-650 - F1LTB2_RAT (EML4)
649-VSENGRKY SRYG-660 - F1LT71_RAT (EML4)
      ***:***: *****

```

Рис. 7.16. Порівняння мотиву 383-VSEKGRNTSRYG-394 тубулін-зв'язуючого домену протеїнкінази SKL6 *A. thaliana* і гомологічних ділянок з EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) людини (B5MCW9, F2Z2U0, B5MBZ0, A6P4V4) і пацюка (F1M356, F1LZC1, F1LTB2, F1LT71).

Таким чином, отримані результати [280, 281] і дані літератури підтверджують важливу роль рослинних СК1-подібних протеїнкіназ в регуляції системи мікротрубочок вищих рослин. Така регуляція може відбуватися як шляхом прямого фосфорилування молекул тубуліну протеїнкіназою SKL6, так і завдяки фосфорилуванню асоційованих білків EB1 протеїнкіназами SKL1 і SKL2. Це узгоджується з даними GeneVestigator (www.genevestigator.ethz.ch) стосовно вираженої експресії SKL6, SKL1 і SKL2 в різних зонах і тканинах кореня *A. thaliana* і з результатами експериментальних досліджень [280, 280, 43].

Таким чином, показані ефекти прижиттєвого впливу D4476 на систему мікротрубочок *A. thaliana* не є наслідком інгібування одного ізо типу СК1-подібних протеїнкіназ. Без сумніву, описані реакції мають більш складний і комплексний характер. Актуальне дослідження показало, що до регулювання тубулінового цитоскелету *A. thaliana* причетні ізо типи СКЛ6, СКЛ1 і СКЛ2. Відповідно до отриманих даних, лише ізо тип СКЛ6 впливає на мікротрубочки безпосередньо через модуляцію тубулінового коду (фосфорилування Ser413 і Ser420 β -тубуліну), а вплив СКЛ1 і СКЛ2 можна розглядати як опосередковану дію, яка реалізується через фосфорилування структурних БАМ.

7.2.1. Біоінформаційний пошук рослинних гомологів протеїнкінази BUB1

BUB1 інколи визначають як протеїнкіназу, філогенетично наближену до родини СК1. Проте, виконана в межах актуального дослідження кластеризація повного кіному *A. thaliana* визначила BUB1 окремою протеїнкіназою, наближеною до протеїнкіназ HASP (HASPIN-Related) і ABIL (ABI-1-like) (рис. 4.1).

За результатами первинного BLASTp сканування баз даних UniProt і GenBank (RefSeq включно) проти послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ BUB1 з *Homo sapiens* (UniProt: O43683), *Mus musculus* (UniProt: O08901), *Saccharomyces cerevisia* (UniProt: P41695), *Schizosaccharomyces pombe* (UniProt: O94751) і *Dictyostelium discoideum* (UniProt: Q54CV5) було відібрано 14 рослинних гомологів (Табл. 7.4 і 7.6). Послідовності рослинних гомологів і тваринних протеїнкіназ Bub1 мали ідентичність 30-37% при 49-57% подібності (Табл. 7.4); рослинних гомологів і Bub1 грибів – 31-38% при 50-56% подібності (Табл. 7.5); рослинних гомологів і Bub1 подібної протеїнкінази з *D. discoideum* – 25-41% при 45-51% подібності (Табл. 7.6). Відсоток гепів вирівнювань послідовностей складав 5-13% у випадку порівняння з тваринними (Табл. 7.4), 3-11% – у порівнянні з грибними (Табл. 7.5) і 8-11% – при вирівнюванні з Bub1-подібною протеїнкіназою міксоміцетів (Табл. 7.6).

Рослинні гомологи BUB1 за результатами BLASTr-сканування із використанням послідовностей каталітичних доменів протейніназ Bub1 з *Нomo sapiens* (UniProt: O43683, BUB1_HUMAN) і *Mus musculus* (UniProt: O08901, BUB1_MOUSE)

GenBank / UniProt	Вид	Вага вирівнювання		E-value		Ідентичність (%)		Подібність (%)		Геми (%)	
		BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE	BUB1_HUMAN	BUB1_MOUSE
EDQ61453.1 A9T515	<i>Physcomitrella patens</i>	178	182	2e-44	3e-44	33	33	52	55	5	7
NP_179656.4 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173	177	2e-41	2e-42	37	36	54	55	7	6
XP_002884213. 1 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	169	175	3e-40	6e-42	36	36	54	55	9	9
XP_002274770.1 / CBI21878.1	<i>Vitis vinifera</i>	171	177	1e-40	9e-43	35	37	54	57	8	7
ACF81779.1 B4F136	<i>Zea mays</i>	165	170	5e-39	2e-40	35	34	54	55	6	7
EEC82122.1 B8B6H5	<i>Oryza sativa Indica</i> Group	162	157	4e-38	2e-36	35	34	53	53	6	7
EEE67244.1 B9FXF7	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group	161	158	7e-38	8e-37	36	35	53	54	6	7
BAG89097.1 Q7XIR5	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group	161	158	7e-38	8e-37	36	35	53	54	6	7
EEF44403.1 B9RVW6	<i>Ricinus communis</i>	160	164	2e-37	1e-38	35	35	52	53	9	6
EEE90855.1 B9HGN9	<i>Populus trichocarpa</i>	162	169	4e-38	4e-40	35	36	53	54	9	7
ACF79918.1 B4FCS5	<i>Zea mays</i>	149	159	4e-34	3e-37	35	35	53	55	6	7
EER97270.1 C5X9D8	<i>Sorghum bicolor</i>	149	153	5e-34	2e-35	36	33	56	54	5	7
CAL57156.1 Q00Y95	<i>Ostreococcus tauri</i>	145	151	7e-33	1e-34	32	33	50	50	10	8
ACO64062.1 C1E7Y9	<i>Micromonas sp.</i> RCC299	134	144	2e-29	2e-32	30	29	49	51	13	10

Примітка: BUB1_HUMAN - протейніназ «checkpoint»-контролю мітозу з *H. sapiens*; BUB1_MOUSE - протейніназ «checkpoint»-контролю мітозу з *M. musculus*.

Рослинні гомологи BUB1 за результатами BLAST-сканування із використанням послідовностей каталітичних доменів протейніназа Bub1 з *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt: P41695 / BUB1_YEAST) і *Schizosaccharomyces pombe* (UniProt: O94751 / BUB1_SCHPO)

GenBank / UniProt	Вид	Вага вирівнювання		E-value		Ідентичність (%)		Подібність (%)		Геї (%)	
		BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO	BUB1_YEAST	BUB1_SCHPO
EDQ61453.1 A9T515	<i>Physcomitrella patens</i>	173	160	3e-41	1e-37	37	35	55	50	5	11
NP_179656.4 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173	177	2e-41	2e-42	37	36	54	55	7	6
XP_002274770.1 /CBI21878.1	<i>Vitis vinifera</i>	171	177	1e-40	9e-43	35	37	54	57	8	7
XP_002884213. 1 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis lyrata</i> <i>subsp. lyrata</i>	169	175	3e-40	6e-42	36	36	54	55	9	9
EEE90855.1 B9HGN9	<i>Populus trichocarpa</i>	169	157	5e-40	2e-36	35	37	55	57	7	3
ACF81779.1 B4FI36	<i>Zea mays</i>	164	166	1e-38	4e-39	35	36	54	54	4	7
BAG89097.1 Q7XIR5	<i>Oryza sativa subsp.</i> <i>japonica</i>	163	170	3e-38	2e-40	35	35	54	52	8	10
EEE67244.1 B9FXF7	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp.japonica</i>	163	170	3e-38	2e-40	35	35	54	52	8	10
EEC82122.1 B8B6H5	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp.indica</i>	163	169	3e-38	4e-40	35	35	54	51	8	14
EEF44403.1 B9RVW6	<i>Ricinus communis</i>	162	165	4e-38	6e-39	33	33	55	53	5	10
CAL57156.1 Q00Y95	<i>Ostreococcus tauri</i>	156	144	3e-36	2e-32	32	33	52	55	11	11
EEB97270.1 C5X9D8	<i>Sorghum bicolor</i>	152	162	5e-35	5e-38	36	36	55	55	4	4
ACE79918.1 B4FCS5	<i>Zea mays</i>	150	159	1e-34	5e-37	35	38	54	56	4	3
ACO64062.1 C1E7Y9	<i>Micromonas sp.</i> <i>RCC299</i>	-	134	-	1e-29	-	31	-	53	-	10

Примітка: BUB1_YEAST – протейніназа «checkpoint»-контролю мітозу з *S. cerevisiae*; BUB1_SCHPO – протейніназа «checkpoint»-контролю мітозу з *S. pombe*.

Таблиця 7.6

Рослинні гомологи протейнкінази BUB1 за результатами BLAST-сканування із використанням послідовності каталітичного домену протейнкінази Bub1 з *Dictyostelium discoideum* (UniProt: Q54CV5)

GenBank / UniProt	Вид	Вага вирівнювання	E-value	Ідентичність (%)	Подібність (%)	Геми (%)
EEE90855.1 B9HGN9	<i>Populus trichocarpa</i>	304	1e-25	28	49	10
EEF44403.1 B9RVW6	<i>Ricinus communis</i>	272	5e-22	26	48	9
NIP_179656.4 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	263	6e-21	27	46	8
XP_002884213.1 / Q8S8D9	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	249	3e-19	29	46	10
XP_002274770.1 / CB121878.1	<i>Vitis vinifera</i>	248	3e-19	27	47	10
EDQ61453.1 A9T515	<i>Physcomitrella patens</i>	233	2e-17	28	46	9
BAG89097.1 Q7XIR5	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	227	9e-17	25	46	9
EEE67244.1 B9FXF7	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	227	9e-17	25	46	9
EEC82122.1 B8B6H5	<i>Oryza sativa subsp. indica</i>	226	1e-16	25	46	9
EER97270.1 C5X9D8	<i>Sorghum bicolor</i>	211	6e-15	26	46	9
ACF81779.1 B4F136	<i>Zea mays</i>	206	2e-14	25	45	8
ACF79918.1 B4FCS5	<i>Zea mays</i>	204	4e-14	26	45	9
CAL57156.1 Q00Y95	<i>Ostreococcus tauri</i>	193	8e-13	30	51	9
ACO64062.1 C1E7Y9	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	178	4e-11	41	46	11

Аналіз із застосуванням сервісу функціонального анотування білок-білкових взаємодій STRING v.11 (<https://string-db.org/>) підтвердив відповідність всіх знайдених рослинних гомологів моделі білок-білкових взаємодій протеїнкіназ Bub1, зокрема, результатами сканування проти сигнальних каскадів ссавців (*H. sapiens*, *M. musculus*), грибів (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) і слизовиків (*D. discoideum*).

Подальша перевірка доменного складу із застосуванням інструменту SMART засвідчила, що лише 5 з 14 потенційних рослинних гомологів мають доменну архітектуру, яка відповідає протеїнкіназам BUB1 тварин, грибів і міксоміцетів (враховуючи наявність каталітичного S_TKc домену та домену Mad3_BUB1_I) [203]: XP_002274770.1 (CBI21878.1, GSVIVT01020577001) з *Vitis vinifera*, EEC82122.1 (B8B6H5; OsI_26148) з *Oryza sativa* Indica Group, EEE67244.1 (B9FXF7; OsJ_24392) з *Oryza sativa* Japonica Group, EEF44403.1 (B9RVW6) з *Ricinus communis* і CAL57156.1 (Q00Y95) з *Ostreococcus tauri*. Інші 9 послідовностей були представлені фрагментами, що охоплювали лише каталітичний домен (S_TKc).

Спільна NJ-кластеризація послідовностей каталітичних доменів п'яти гомологів з водоростей і квіткових рослин (*Embryophyta*), а також контрольної групи Bub1 з ссавців, грибів і слизовиків, підтвердила мінімальні дистанції контрольної групи саме для гомологів з *Embryophyta* (рис. 7.17). При цьому гомолог з водорості *O. tauri* утворював спільну кладу з протеїнкіназами Bub1 *H. sapiens* і *M. musculus*. Гомологи з вищих рослин утворювали окрему кладу, топологічно наближену до тваринних протеїнкіназ Bub1. Найбільш близьке положення виявляли Bub1 *H. sapiens* і неанотовані білки з рису індійської і японської груп: EEC82122.1 (B8B6H5) – *Oryza sativa* Indica Group і EEE67244.1 (B9FXF7) – *O. sativa* Japonica Group. Таким чином, філогенетичні дистанції свідчать, що рослинні гомологи мають більшу подібність до представників Bub1 з ссавців, ніж до ортологів з грибів і слизовиків. Подальший аналіз парних

вирівнювань послідовностей каталітичних доменів гомологів з рису індійської і японської груп засвідчив їх повну ідентичність.

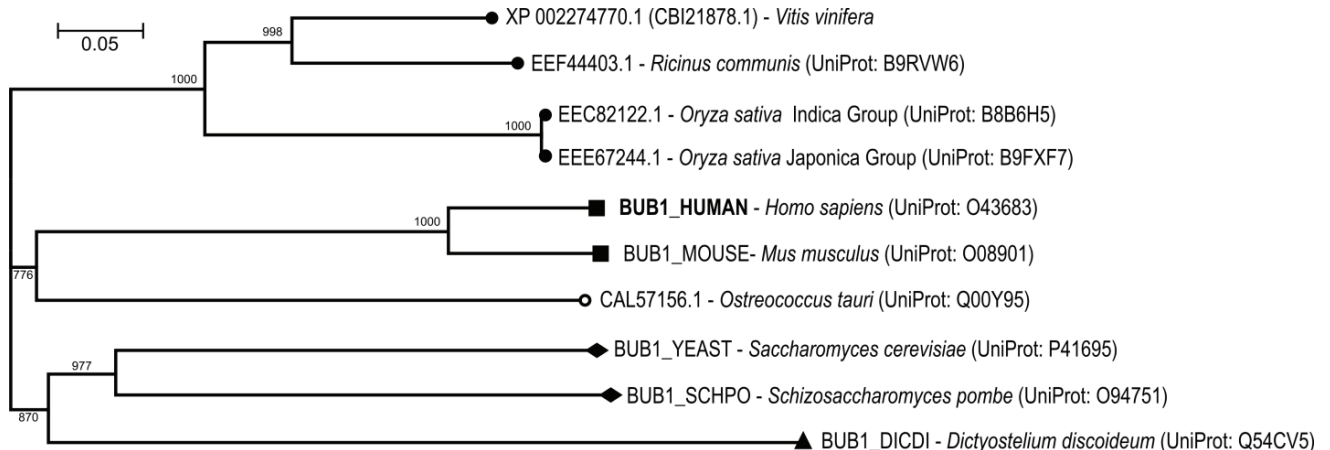


Рис. 7.17. Результати кластеризації потенційних рослинних (*Viridiplantae*: *Embryophyta* (●) і *Algae* (○)) гомологів і контрольних послідовностей Bub1 (*Mammalia* (■), *Fungi* (◆) і *Mycetozoa* (▲)).

Примітка: NJ-дерево побудовано на підставі результатів множинного вирівнювання послідовностей каталітичних доменів.

Для подальшого прогнозу і аналізу просторової структури каталітичних доменів рослинних гомологів були вибрані білки з раніше невідомою функцією:

XP_002274770.1 (CBI21878.1, GSVIVT01020577001) з *V. Vinifera*;

EEC82122.1 (B8B6H5; OsI_26148) з *O. sativa* індійської групи;

EEE67244.1 (B9FXF7; OsJ_24392) з *O. sativa* японської групи.

Оскільки два білка з *O. sativa* мають ідентичні послідовності, завдання зводилося до реконструкції лише двох структур каталітичних доменів гомологів з *V. vinifera* та *O. sativa*.

За результатами аналізу інформації, представлені в RCSB Protein Data Bank (PDB), оптимальною матрицею для гомологічної реконструкції просторової структури рослинних гомологів була PDB-структура 3E7E [260] каталітичного комплексу Bub1C (каталітичний домен і прилегла до нього N-кінцева прибудова)

протеїнкінази BUB1_HUMAN (UniProt: O43683) з *H. sapiens*. Парне вирівнювання ділянки Bub1C з протеїнкінази BUB1 (UniProt: O43683) людини і відповідних фрагментів рослинних гомологів (рис. 7.18, 7.19) продемонструвало значну подібність нуклеотид (АТФ) – зв'язуючих ділянок та консервативність лізину сайту зв'язування АТФ (BUB1_HUMAN: K821) і залишку аспарагінової кислоти активного сайту (BUB1_HUMAN: D917).

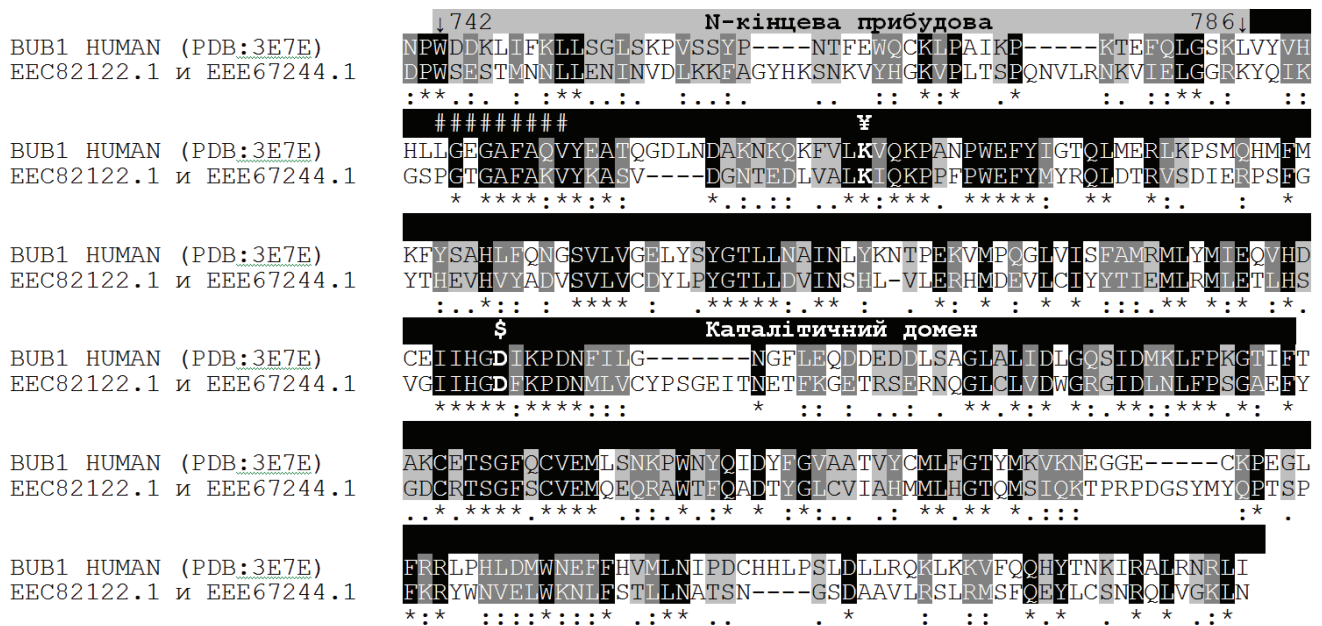


Рис. 7.18. Парне вирівнювання послідовностей каталітичного комплексу Bub1C (каталітичний домен і прилегла до нього N-кінцева) [260] протеїнкінази Bub1 (UniProt: O43683; BUB1_HUMAN) *Homo sapiens* і послідовності, що відповідає рослинним гомологам з екотипів рису: EEC82122.1 – білок з невідомою функцією з *Oryza sativa* індійської групи і EEE67244.1 – білок з невідомою функцією з *Oryza sativa* японської групи).

Примітка: ##### - нуклеотид (АТФ)-зв'язуюча ділянка (BUB1_HUMAN: 793-801); § - активний сайт (BUB1_HUMAN: D917); ¥ - сайт зв'язування АТФ (BUB1_HUMAN: K821)

З врахуванням відсутності двох ділянок каталітичного домену (з Gly932 до Ser939 і з Gly806 до Asn814) у структурі 3E7E каталітичного комплексу (Bub1C) протеїнкінази Bub1 з *H. sapiens*, виконали реконструкцію відсутніх фрагментів

(засобами програми Modeller 9v7) із залученням інформації UniProtKB (O43683) про повну послідовність з подальшою оптимізацією отриманої моделі в силовому полі amber99SB.

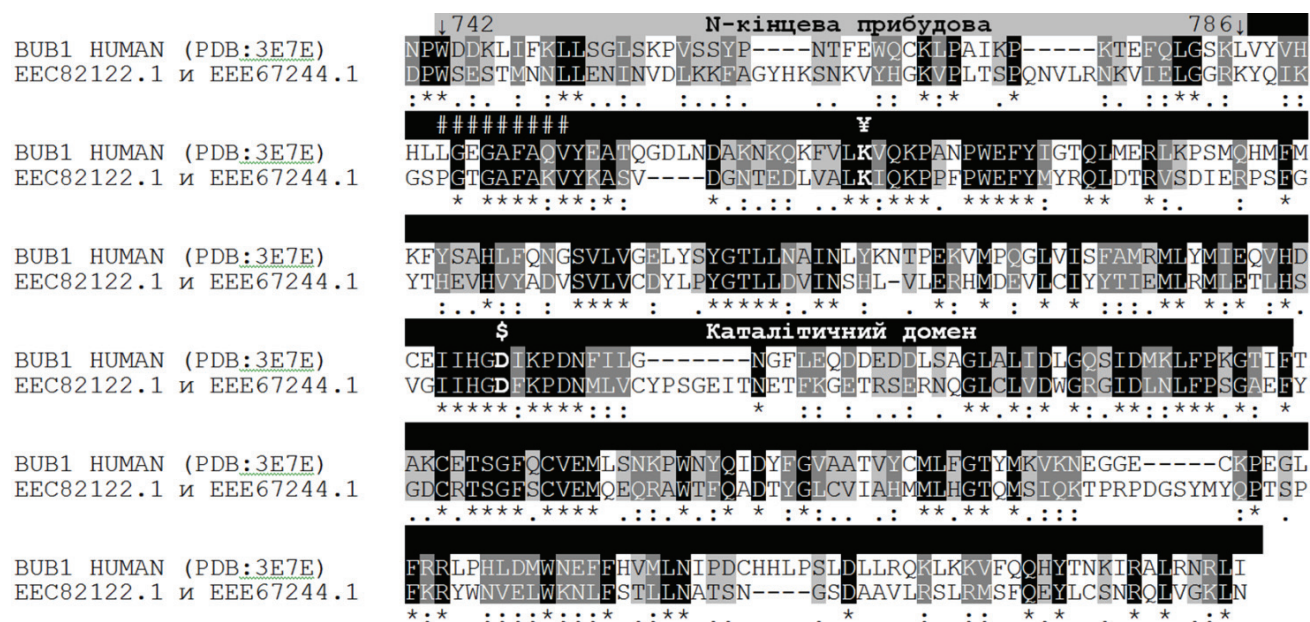


Рис. 7.19. Парне вирівнювання послідовностей каталітичного комплексу Vub1C (каталітичний домен і прилегла до нього N-кінцева прибудова) [260] протеїнкінази Vub1 (UniProt: O43683; BUB1_HUMAN) *Homo sapiens* і рослинного гомолога – білка з невідомою функцією (XP_002274770.1 / CBI21878.1) з *Vitis vinifera*.

Коментар: ##### - нуклеотид (АТФ)-зв'язуюча ділянка (BUB1_HUMAN: 793-801); \$ - активний сайт (BUB1_HUMAN: D917); ¥ - сайт зв'язування АТФ (BUB1_HUMAN: K821)

Оптимізована структура Vub1 (3E7E) людини була використана для подальшого профільного моделювання просторової структури каталітичних доменів цільових білків з рису, винограду, арабідопсису. Для реконструкції проблемних ділянок також було використано додаткові матричні структури 3LAU, 3CON, 3CFA, 3M1I. Якість реконструйованих структурних моделей каталітичних доменів [119, 563] була підтверджена за допомогою серверу MolProbity (Таб. 7.7).

Таблиця 7.7

Показники якості структурних моделей каталітичних доменів протеїнкінази Bub1 з *Homo sapiens* (PDB: 3E7E) і її рослинних гомологів з *Oryza sativa* і *Vitis vinifera*

Критерій оцінювання		Структури каталітичних доменів		
		Bub1 з <i>Homo sapiens</i> (PDB: 3E7E)	Гомологи з рису*	Гомолог з <i>V. vinifera</i> : XP_002274770.1 (CBI21878.1)
Міжатомні контакти	Частота замін	1.42	3.3	0.64
Оцінка якості геометрії білку	Відсоток помилкових ротамерів (%)	1.61	2.31	1.55
	Процент відхилення (за Рамачандреном) (%)	1.45	1.62	1.40
	Відсоток збігу (за Рамачандреном) (%)	91.91	88.22	89.12
	Частота C β -атомів з відхиленням > 0.25Å (C β -відхилення)	7	9	5
	Узагальнений коефіцієнт MolProbity	1.52	1.46	1.43
	Амінокислоти що утворюють некоректні зв'язки (%)	0.00	0.00	0.00
	Амінокислоти що утворюють некоректні кути (%)	0.00	0.00	0.25

Примітка: * - два ідентичних білка - EEC82122.1 з *O. sativa* Indica і EEE67244.1 з *O. sativa* Japonica.

Порівняння методом структурного вирівнювання структур каталітичних доменів протеїнкінази Bub1 з *H. sapiens* (PDB: 3E7E; UniProt: O43683) [260] і рослинних гомологів з рису (ідентичні білки EEC82122.1 з *O. sativa* Indica і EEE67244.1 з *O. sativa* Japonica) і XP_002274770.1 (CBI21878.1) з *V. vinifera* підтвердило високий ступінь подібності (рис. 7.20). Для аналізованих структур рослинних білків були визначені загальні відмінності матричної структури 3E7E і реконструйованих моделей на підставі кумулятивного показнику середньоквадратичного відхилення (RMSD). Загальне RMSD для моделі каталітичного домену протеїнкінази з рису становило 1,28 Å, а для XP_002274770.1 (CBI21878.1) з *V. vinifera* – 1,22Å. Прийнято вважати, що

структури мають достовірну подібність, якщо середньоквадратичне відхилення становить $\leq 3 \text{ \AA}$ [105]. Таким чином, отримані нами показники дозволили зробити висновок про значну подібність просторової організації каталітичних доменів Bub1 *Homo sapiens* і відібраних рослинних гомологів з рису і винограду.

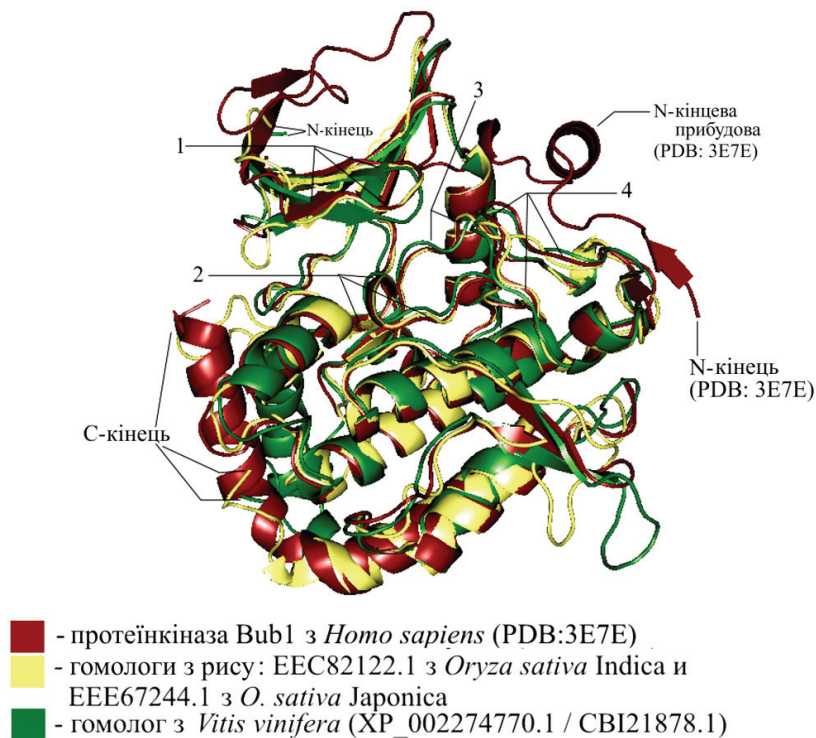


Рис. 7.20. Результат накладання просторової структури каталітичного комплексу Bub1С протеїнкінази Bub1 з *Homo sapiens* (PDB: 3E7E; UniProt: O43683) [260] та її рослинних гомологів з рису (ідентичні білки EEC82122.1 з *Oryza sativa* Indica і EEE67244.1 з *Oryza sativa* Japonica) і XP_002274770.1 (CBI21878.1) з *Vitis vinifera*.

Примітка: 1 – область зв’язування АТФ; 2 – каталітична петля; 3 – активаційна петля; 4 – петля P+1, відповідальна за зв’язування з субстратом.

Враховуючи, що каталітичні властивості і функції протеїнкіназ визначаються не лише фолдингом, а значною мірою амінокислотним складом функціонально важливих мотивів і функціонально важливих амінокислот [541,

277], зокрема, ділянкою зв'язування АТФ, каталітичною петлею, активаційною петлею і субстрат-зв'язуючою петлею (P+1), був виконано аналіз і порівняння вищезазначених елементів структури. Межі мотивів було визначено на підставі даних літератури [260] та інформації з UniProtKB [552]. У рослинних гомологів ці мотиви були: *O. sativa* Indica (EEC82122.1), *O. sativa* Japonica (EEE67244.1), *R. communis* (EEF44403.1), *V. vinifera* (XP_002274770.1) і *O. tauri* (CAL57156.1) (рис. 7.21). Результати вирівнювання зазначених мотивів демонструють не лише високий рівень подібності, але й дозволяють ідентифікувати суперконсервативні амінокислотні залишки, що, ймовірно, несуть основне функціональне навантаження у представників різних царств. До суперконсервативних амінокислот Bub1 з *H. sapiens* належать залишки мотиву фосфатзв'язуючого центру Gly794, Gly796, Ala799 і Val801. У складі каталітичної петлі, крім канонічних консервативних залишків, які зумовлюють каталітичні властивості серин-треонінових протеїнкіназ (Asn917 і Lys919), виявлені суперконсервативні у положеннях Hys915, Gly921 і Asn922. В активаційній петлі, крім обов'язкового консервативного залишку Asn952, визначено суперконсервативні амінокислоти Asn946 і Gly948. У складі субстрат-зв'язуючої петлі (P+1) визначено лише два положення – Phe961 і Cys973.

Додатково виконали структурне вирівнювання просторової моделі протеїнкінази Bub1 (PDB: 3E7E; UniProt: O43683) з *H. sapiens* і моделей каталітичних доменів рослинних гомологів з рису (ідентичні білки EEC82122.1 з *O. sativa* Indica і EEE67244.1 з *O. sativa* Japonica) і *V. vinifera* (XP_002274770.1 / SBI21878.1) та провели аналіз топології функціонально-важливих положень на прикладі цих структур (рис. 7.22А). Як видно з рисунка 7.22 (Б), просторове положення усіх функціонально важливих мотивів в рослинних гомологах повністю співпадає з просторовим положенням аналогічних мотивів (петель) в протеїнкіназі Bub1 людини, а просторова топологія амінокислотних залишків

(включаючи Asp917) повністю підтверджує дані, отримані при вирівнюванні амінокислотних послідовностей.

Мотив фосфат (АТФ) - зв'язуючого центру:

BUB1 HUMAN	793	I	G	G	A	F	A	O	V	-801	-	<i>Homo sapiens</i>	
BUB1 MOUSE	793	I	G	G	A	F	A	O	V	-801	-	<i>Mus musculus</i>	
BUB1 YEAST	711	I	G	G	G	Y	A	T	V	-719	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
BUB1 SCHPO	724	I	G	G	A	F	A	P	V	-732	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
EEC82122.1	263	P	G	T	G	A	F	A	K	V	-271	-	<i>Oryza sativa Indica</i>
EEE67244.1	263	P	G	T	G	A	F	A	K	V	-271	-	<i>Oryza sativa Japonica</i>
EEF44403.1	225	A	G	G	G	F	A	K	V	-233	-	<i>Ricinus communis</i>	
XP 002274770.1	285	A	G	K	G	G	F	A	O	V	-293	-	<i>Vitis vinifera</i>
CAL57156.1	717	I	G	G	A	H	A	E	V	-725	-	<i>Ostreococcus tauri</i>	

* * * *

Каталітична петля:

BUB1 HUMAN	913	I	I	H	G	D	I	K	P	D	N	-922	-	<i>Homo sapiens</i>
BUB1 MOUSE	913	I	I	H	G	D	I	K	P	D	N	-922	-	<i>Mus musculus</i>
BUB1 YEAST	829	I	I	H	G	D	I	K	P	D	N	-838	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BUB1 SCHPO	857	I	I	H	G	D	I	K	A	D	N	-866	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
EEC82122.1	378	I	I	H	G	D	F	K	P	D	N	-387	-	<i>Oryza sativa Indica</i>
EEE67244.1	378	I	I	H	G	D	F	K	P	D	N	-387	-	<i>Oryza sativa Japonica</i>
EEF44403.1	339	I	I	H	G	D	F	K	P	D	N	-348	-	<i>Ricinus communis</i>
XP 002274770.1	400	I	I	H	G	D	F	K	P	D	N	-409	-	<i>Vitis vinifera</i>
CAL57156.1	851	I	V	H	A	D	I	K	P	D	N	-860	-	<i>Ostreococcus tauri</i>

* * * **

Активційна петля:

BUB1 HUMAN	946	D	L	G	S	I	D	M	K	L	F	P	K	G	-959	-	<i>Homo sapiens</i>	
BUB1 MOUSE	946	D	L	G	S	I	D	M	K	L	F	P	K	G	-959	-	<i>Mus musculus</i>	
BUB1 YEAST	871	D	F	G	R	S	E	D	M	T	L	L	P	G	-884	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
BUB1 SCHPO	900	D	F	G	R	G	I	D	L	S	L	F	E	E	K	-913	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
EEC82122.1	418	D	W	G	R	G	I	D	L	N	L	F	P	S	G	-431	-	<i>Oryza sativa Indica</i>
EEE67244.1	418	D	W	G	R	G	I	D	L	N	L	F	P	S	G	-431	-	<i>Oryza sativa Japonica</i>
EEF44403.1	379	D	W	G	K	G	I	D	L	H	L	F	P	D	D	-392	-	<i>Ricinus communis</i>
XP 002274770.1	440	D	W	G	R	G	I	D	L	S	L	F	P	S	N	-453	-	<i>Vitis vinifera</i>
CAL57156.1	890	D	Y	G	R	A	D	L	L	M	F	P	E	E	-903	-	<i>Ostreococcus tauri</i>	

* * * *

R+1 – Петля, що відповідає за зв'язування з субстратом:

BUB1 HUMAN	960	T	I	F	T	A	K	C	E	T	S	G	F	O	C	-973	-	<i>Homo sapiens</i>
BUB1 MOUSE	960	T	I	F	T	A	K	C	E	T	S	G	F	O	C	-973	-	<i>Mus musculus</i>
BUB1 YEAST	885	T	K	E	K	S	N	W	K	A	D	Q	O	D	C	-898	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BUB1 SCHPO	914	V	K	F	I	A	D	W	D	I	D	L	O	D	C	-927	-	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
EEC82122.1	432	A	E	F	Y	G	D	C	R	T	S	G	F	S	C	-445	-	<i>Oryza sativa Indica</i>
EEE67244.1	432	A	E	F	Y	G	D	C	R	T	S	G	F	S	C	-445	-	<i>Oryza sativa Japonica</i>
EEF44403.1	393	I	K	E	G	D	C	R	T	S	G	F	R	C	-406	-	<i>Ricinus communis</i>	
XP 002274770.1	454	T	E	F	K	G	D	C	R	T	S	G	F	R	C	-467	-	<i>Vitis vinifera</i>
CAL57156.1	904	A	A	E	V	G	D	A	G	A	E	A	E	R	C	-917	-	<i>Ostreococcus tauri</i>

* . . : . *

Рис. 7.21. Вирівнювання функціонально-важливих мотивів каталітичних доменів протеїнкіназ Bub1 з представників *Mammalia*, *Fungi*, *Mycetozoa* і їх рослинних гомологів (*Viridiplantae*: *Embryophyta* і *Algae*).

Вірогідність результатів структурного порівняння підтверджували середньоквадратичні відхилення (RMSD) функціонально-важливих мотивів (петель) рослинних гомологів з рису та винограду відносно структури Bub1 людини, які не перевищували 3Å. [563] Зокрема, для мотиву ділянки зв'язування АТФ для гомологів з рису (EEC82122.1 і EEE67244.1) загальні значення RMS

дорівнювали 1,36 Å, для XP_002274770.1 з *V. vinifera* – 2.09Å. Для мотиву каталітичної петлі гомологів з рису (EEC82122.1 і EEE67244.1) загальні значення RMS дорівнювали 0,75 Å, для XP_002274770.1 з *V. vinifera* – 0.97Å. При цьому значення RMS для залишків відповідних Асп917 були 0,76 Å і 0,75 Å відповідно. Для мотиву активаційної петлі гомологів з рису (EEC82122.1 і EEE67244.1) загальні значення RMS дорівнювали 1,09Å, для XP_002274770.1 з *V. vinifera* – 0.82 Å. Для мотиву петлі P+1 гомологів з рису (EEC82122.1 і EEE67244.1) загальні значення RMS дорівнювали 2,0Å, для XP_002274770.1 з *V. vinifera* 1.1 Å у разі – 1.1 Å.

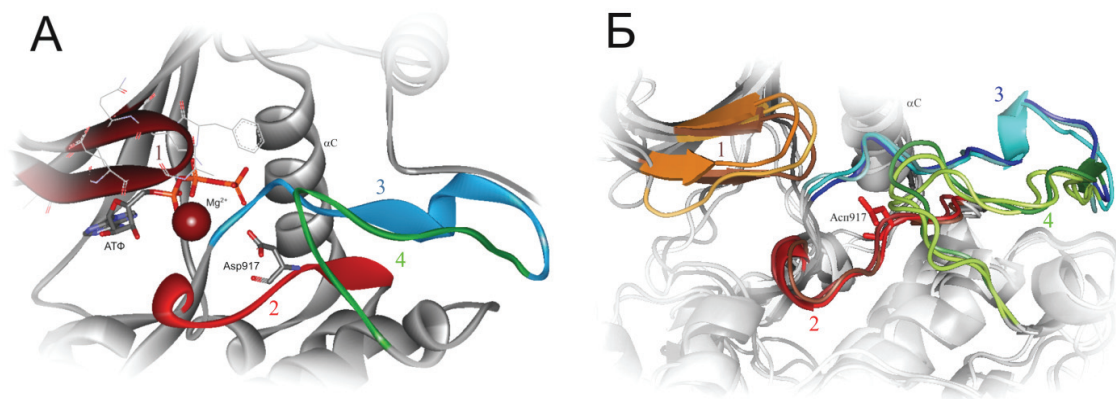


Рис. 7.22. Результати аналізу топології основних функціонально-важливих елементів просторової структури каталітичних доменів протеїнкінази Bub1 з *Homo sapiens* (PDB: 3E7E) та її рослинних гомологів з рису (ідентичні білки EEC82122.1 з *Oryza sativa* Indica і EEE67244.1 з *Oryza sativa* Japonica) і *Vitis vinifera* (XP_002274770.1 / CBI21878.1).

Примітка: **А** – контрольна структура 3E7E протеїнкінази Bub1 (UniProt: O43683) з *Homo sapiens*; **У** – результати накладення структур рослинних гомологів з рису і винограду (область функціонально важливих положень) на еталонну структуру 3E7E протеїнкінази Bub1 з *Homo sapiens*; **1** – область зв'язування АТФ; **2** – каталітична петля (Асп917 відповідає активному сайту Bub1 з *Homo sapiens*); **3** – активаційна петля; **4** – петля P+1, відповідальна за зв'язування з субстратом.

На рисунку 7.23 представлені моделі просторових структур каталітичних доменів протеїнкінази Bub1 з *H. sapiens* та її рослинних гомологів з рису (EEC82122.1 з *O. sativa* Indica і EEE67244.1 з *O. sativa* Japonica) і *V. vinifera* (XP_002274770.1) з урахуванням відображення положень найбільш важливих елементів структури і залишків. (рис. 7.22 і 7.23)

На рисунку 7.23 представлені моделі просторових структур каталітичних доменів протеїнкінази Bub1 з *H. sapiens* та її рослинних гомологів з рису (EEC82122.1 з *O. sativa* Indica і EEE67244.1 з *O. sativa* Japonica) і *V. vinifera* (XP_002274770.1 з урахуванням відображення положень найбільш важливих елементів структури і залишків.

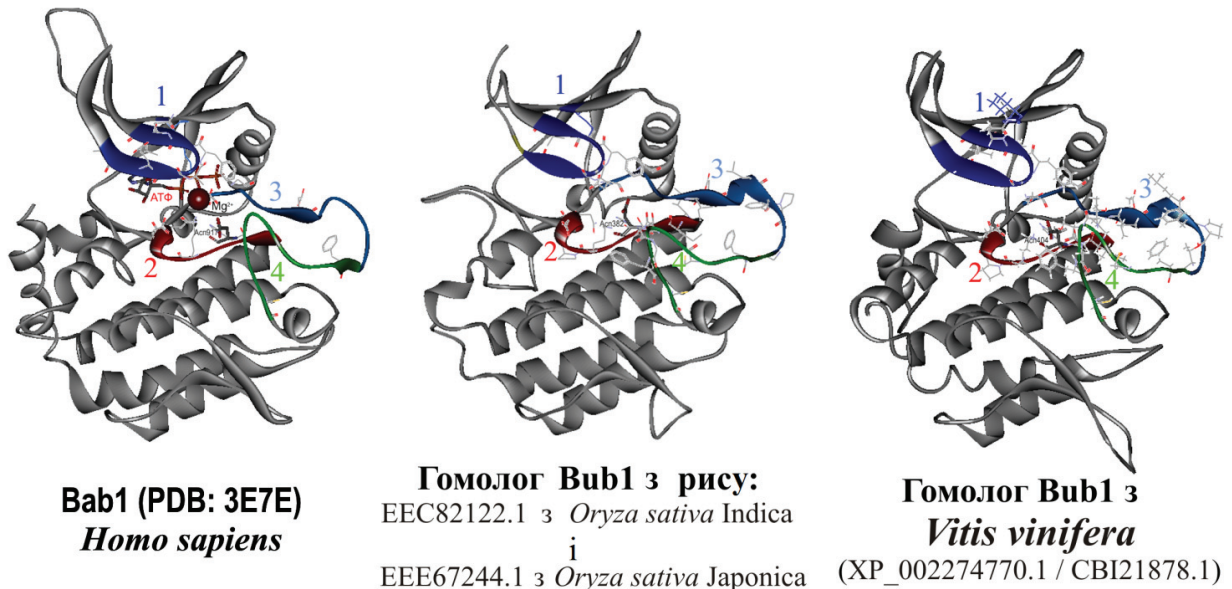


Рис. 7.23. Просторова структура каталітичного домену протеїнкінази «checkpoint»-контролю мітозу Bub1 з *Homo sapiens* (контроль) і її рослинних гомологів з рису (ідентичні білки EEC82122.1 з *Oryza sativa* Indica і EEE67244.1 з *Oryza sativa* Japonica) і XP_002274770.1 (CBI21878.1) з *Vitis vinifera*.

Примітка: 1 –ділянка зв'язування АТФ; 2 –каталітична петля; 3– активаційна петля; 4 – петля P+1, відповідальна за зв'язування з субстратом.

На контрольній структурі каталітичного домена Bub1 з *H. sapiens* скелетні структури амінокислот показують супер-консервативні залишки функціонально-важливих мотивів, обов'язкові для усіх протеїнкіназ Bub1. Аналогічні позначення на

моделях рослинних гомологів вказують на амінокислотні залишки, ідентичні відповідним положенням контрольної структури.

Таким чином, дані біоінформаційного і кладистичного аналізу, подібність доменної архітектури, дані білок-білкових взаємодій і структурної біоінформатики дозволили ідентифікувати рослинні білки з невідомою функцією (EEC82122.1 (B8B6H5; OsI_26148) з *Oryza sativa* Indica Group, EEE67244.1 (B9FXF7; OsJ_24392) з *Oryza sativa* Japonica Group, EEF44403.1 (B9RVW6) з *Ricinus communis*, XP_002274770.1 (CBI21878.1, GSVIVT01020577001) з *Vitis vinifera* та CAL57156.1 (Q00Y95) з *Ostreococcus tauri*) як рослинні ортологи Bub1.



Рис. 7.24. Структурне вирівнювання моделей каталітичних доменів BRK1 з *A. thaliana* (темно-зелений колір) і *O. sativa* (світло-зелений колір) з контрольною PDB-структурою BUB1 (рожевий колір) з *H. sapiens* (PDB: 2E7E) [260].

Не зважаючи на більш значні показники гомології, визначені у гомологів з *V. vinifera* і *O. sativa*, оптимальним об'єктом експериментального дослідження було визначено гомолог Bub1 - BRK1 з *A. thaliana*. Порівняння BRK1 (UniProtKB: F4IVI0 / AT2G20635.1) з *A. thaliana* демонструвало 49% і 61% ідентичності повних послідовностей по відношенню до раніше визначених гомологів з рису і винограду. Структурне порівняння моделей каталітичних доменів рослинних BRK1 з *A. thaliana*, *O. sativa* і контрольної експериментальної моделі BUB1 *H. sapiens* (PDB: 2E7E) [260] засвідчило їх структурну подібність, що додатково підтверджували незначні відхилення RMSD (рис. 7.24).

Показник відхилення RMS для каталітичних доменів BRK1 з *A. thaliana* і BUB1 *H. sapiens* був низьким порівняно з BRK1 з *O. sativa* і складав близько 1.1 Å, що підтверджувало коректність використання BRK1 *A. thaliana* як об'єкту подальших молекулярно-біологічних досліджень. [279]

7.2.2. Експериментальне підтвердження протеїнкінази BUB1 як частини комплексу контролю збирання мітотичного веретена (SAC) та її необхідності для коректного проходження мітозу у *A. thaliana*

Гомологія з тваринними протеїнкіназами BUB1 (підродина BUB1 = Budding Uninhibited by Benzimidazol 1) позиціонувала рослинні BRK1 як потенційних учасників рослинного комплексу SAC (spindle assembly checkpoint) [279]. Caillaud et al. (2009) було визначено BUBR1, BUB3 та MAD2 білками рослинного комплексу SAC [81, 296]. Результати цих досліджень стали підґрунтям для поєднання спільних зусиль дослідницьких груп у визначенні рослинної BRK1 функціональним гомологом тваринної BUB1 і частини рослинного комплексу SAC [423].

Гістологічний патерн GUS-експресії BRK1 на прикладі A. thaliana. 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 вперше було встановлено існування рослинних гомологів BUB1 (=BRK1, At2g20635) [279] та експериментально підтверджена їх участь у формуванні комплексу SAC [423].

Для підтвердження асоціації експресії *BRK1* з мітотичною активністю клітин *A. thaliana* було досліджено гістохімічний патерн експресії цільового гену з використанням репортерної системи промоторної активності (застосування GUS-промотору). Дослідження виконувалось на рослинах, що експресували химерний GFP-конструкт *BRK1:GFP:GUS* (= *ProBRK1:GFP:GUS*). Для визначення експресії

BRK1 використали 7-денні проростки і фертильні рослини *A. thaliana*. Наявність індукованого β -глюкуронідазою (GUS) специфічного забарвлення підтвердило асоціацію з меристематичними клітинами *A. thaliana* гістологічного патерну експресії *BRK1*, що свідчить про потенційну функціональну роль рослинної протеїнкінази BRK1 як частини комплексу SAC.

Отримані дані свідчать, що експресія BRK1 позитивно корелює з мітотичною активністю меристематичних тканин *A. thaliana*. Найбільш помітна експресія *BRK1:GFP:GUS* визначалась в листках, апікальних кореневих меристемах і меристемах латеральних корневих зачатків 7-денних проростків *A. thaliana*, які знаходились на стадії активного росту, а також, у суцвіттях, квітках, меристемах листків і пиляків фертильних рослин (рис. 7.25).

Розподіл GFP-флуоресценції конструкту BRK1:GFP в залежності від стану мітотичного апарату A. thaliana. Дослідження рослин *A. thaliana*, які експресували флуоресцентний конструкт BRK1:GFP, дозволило визначити зв'язок внутрішньоклітинної локалізації BRK1 з мітотичним апаратом *A. thaliana* (рис. 7.26). Досліджувались клітини кореневого апексу, що знаходились на стадіях інтерфази (G2), профази - метафази, ранньої та пізньої телофази. Отримані дані підтвердили залежність розподілу GFP-флуоресценції конструкту BRK1:GFP від стану мітотичного апарату *A. thaliana* (рис. 7.26, А-Г). Розподіл флуоресценції в клітинах кореня узгоджувався з біоінформатичним прогнозом і позиціонував BRK1 *A. thaliana* як потенційного функціонального гомолога тваринної протеїнкінази BUB1 і компоненту комплексу SAC. Зокрема, флуоресценція BRK1:GFP визначалась на кінетохорах хромосом протягом усього мітозу (рис. 7.26, А-Г). Межі клітин визначались на основі флуоресценції специфічного фарбника FM4-64 (червоний канал), що специфічно зв'язується з плазматичною мембраною. Експресія BRK1:GFP виконувалось під контролем промотору MAP65-3 (зелений канал).

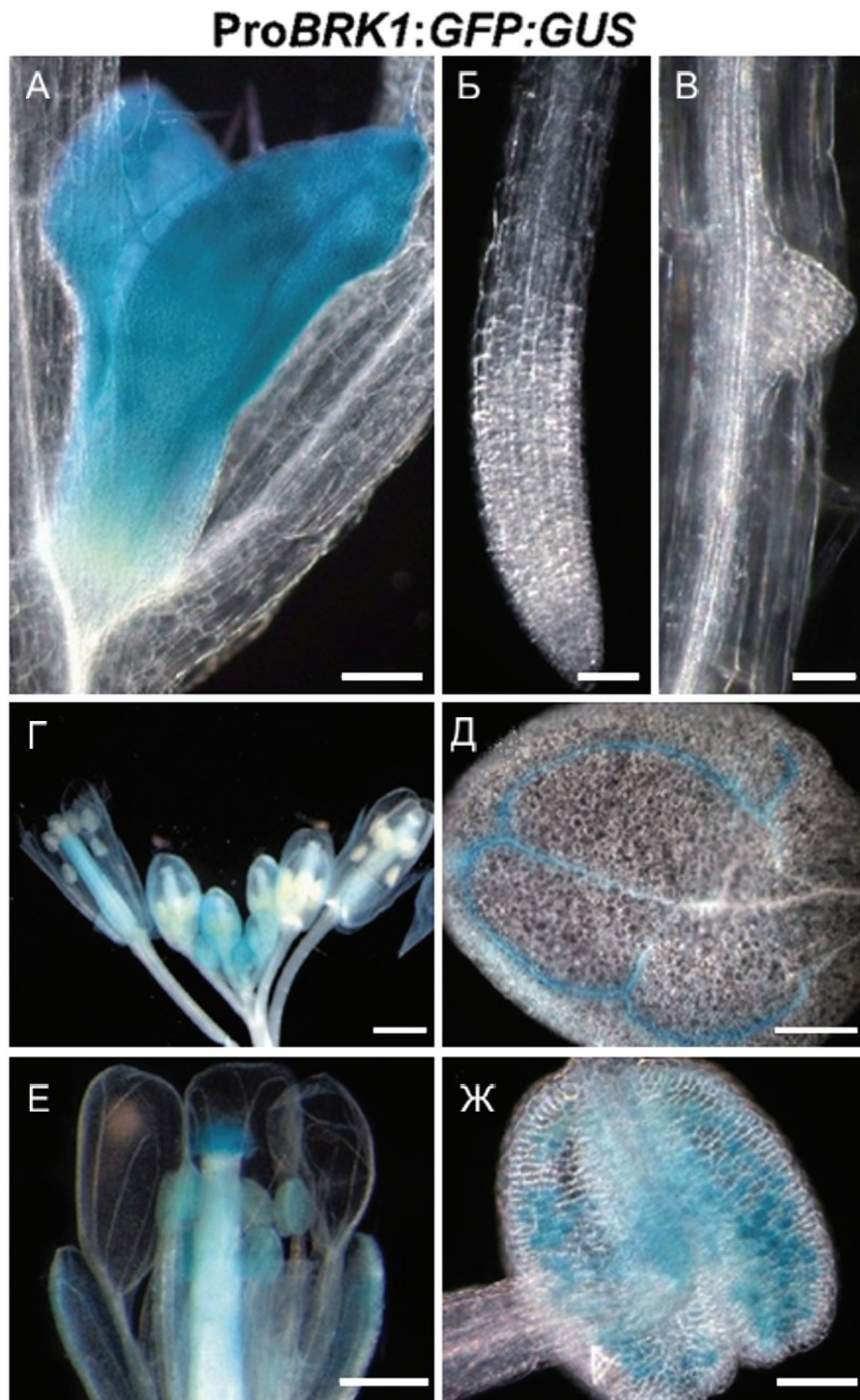


Рис. 7.25. Гістологічний патерн GUS-експресії *BRK1 A. thaliana*, визначений на підставі репортерної активності конструкту *BRK1:GFP:GUS* (= *ProBRK1:GFP:GUS*). Листки 7-денних проростків у фазі активного росту (А), коренева меристема (Б), латеральні кореневі зачатки (В), суцвіття (Г), квітки (Е), листки фертильних рослин (Д), пиляки (Ж).

Маркер масштабу (bar): (А–В, Е, Д) 100 мкм; (Г) 200 мкм; (Ж) 25 мкм.

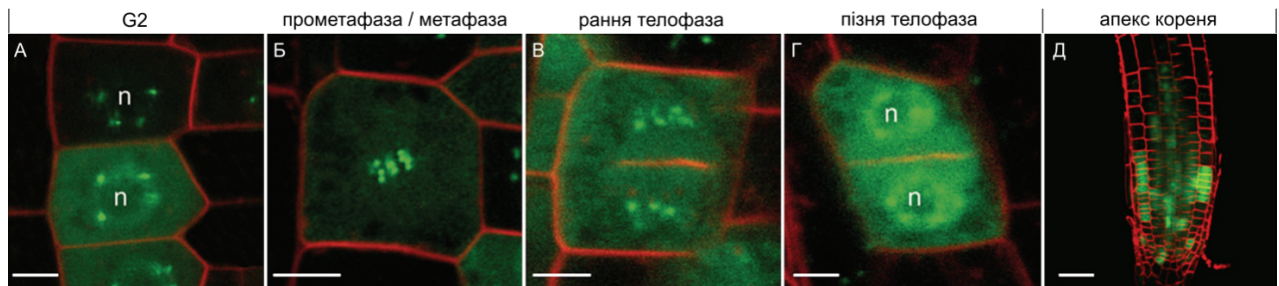


Рис. 7.26. Розподіл GFP-флуоресценції конструкту BRK1:GFP в залежності від стану мітотичного апарату *A. thaliana* (А-Г). Флуоресценція BRK1:GFP на кінетохорах хромосом у інтерфазі та різних фазах мітозу (А-Г). **n** – положення ядер. Д – загальний розподіл флюоресценції BRK1:GFP у кореневому апексі *A. thaliana*. Плазматична мембрана визначалась флюоресценцією специфічного фарбника FM4-64 (червоний канал).

Маркер масштабу (bar): (А-Г) 5 мкм; (Д) 20 мкм.

Вплив дисфункції гену BRK1 на мітотичний апарат рослин A. thaliana. У дослідженні було використано два типи мутантних рослин *A. thaliana*: нокаут-мутанти за геном *BRK1* (AT1G20635) і потрійні мутанти за генами білків комплексу контрольної точки збирання веретена клітинного поділу (SAC) – *BUBR1+MAD3.2+BRK1* (AT2G33560 + AT5G05510 + AT1G20635). Мікроскопічне дослідження мітотичних клітин коріння *A. thaliana*, пофарбованих DAPI (рис. 7.27) засвідчило подібні порушення у розходженні хромосом обох типів мутантів. На нашу думку, це свідчить, що рослинна протеїнкіназа BRK1 дійсно є частиною рослинного комплексу SAC, а ідентичність порушень у обох мутантів дозволяє висунути припущення стосовно ключової ролі саме BRK1. Спостереження морфологічних порушень мітотичних процесів мутантних рослин доводять роль BUB1 (BRK1) як важливого елемента SAC і фактору коректного формування мітотичного веретена у *A. thaliana* [423] (рис. 7.27).

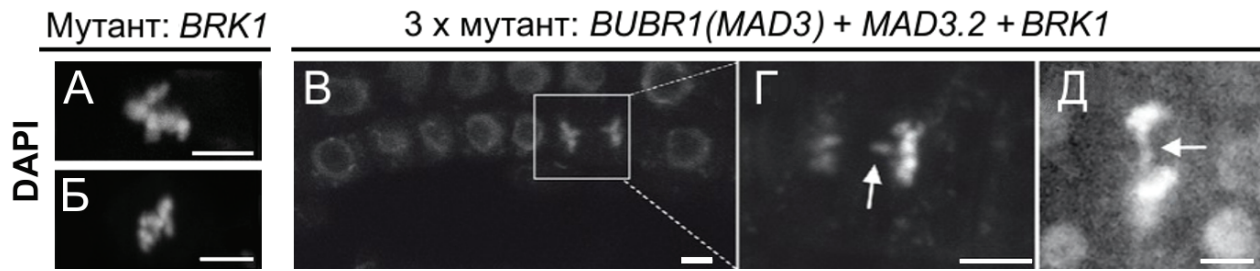


Рис. 7.27. Порушення мітозу в клітинах первинних коренів мутантних рослин *A. thaliana*. **А, Б** – мутація за геном *BUB1* (=BRK1, At2g20635). **В-Д** – потрійний мутант компонентів комплексу SAC (spindle assembly checkpoint): *BUBR1* + *MAD3.2* + *BRK1* (*BUB1* Related Kinase 1 = *BUB1*). Барвник DAPI (4',6'-діамідин-2'-феніліндол-дигідрохлорид). Маркер масштабу (bar) = 5 мкм.

Пошук сайтів *BUB1/BRK1*-специфічного фосфорилування тубуліну. Для з'ясування можливого безпосереднього внеску *BUB1* в тубуліновий код рослин було виконано профільний пошук сайтів специфічного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* і *H. sapiens*. Оскільки пошукові профілі сайтів *BUB1* в репозиторіях спеціалізованих програм і web-сервісів були відсутні, склали відповідний патерн на підставі 21-го сайту, депонованого в PhosphoSitePlus, UniProtKB і даних літератури:

{CDHILTY} - {CDENWY} - [AEIKLPQSVY] - {ACENIPVWY} - {DFHIMWY} -
 {CDFHMPQSWY} - [AEGKLPQRSTY] - [ST] - {CDHMNSTWY} - [AFGHKLMPSV] -
 {CDNVY} - {DFIMNQ} - [ADEFKGKPRSV] - {FHILMQSTW} - {ACFGHLQW}.

Сканування послідовностей ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* і *H. sapiens* визначило лише один потенційний сайт Ser188 (189) β -тубуліну. Проте, відсутність експериментальних даних стосовно фосфорилування Ser188 в PhosphoSitePlus, PhosPhAt і p3db, певні структурні перепони - проєкціювання Ser188 вглиб глобули (рис. 7.28, А) і значне занурення (рис. 7.28, Б), свідчать про низьку імовірність ензиматичної модифікації зазначеної амінокислоти.

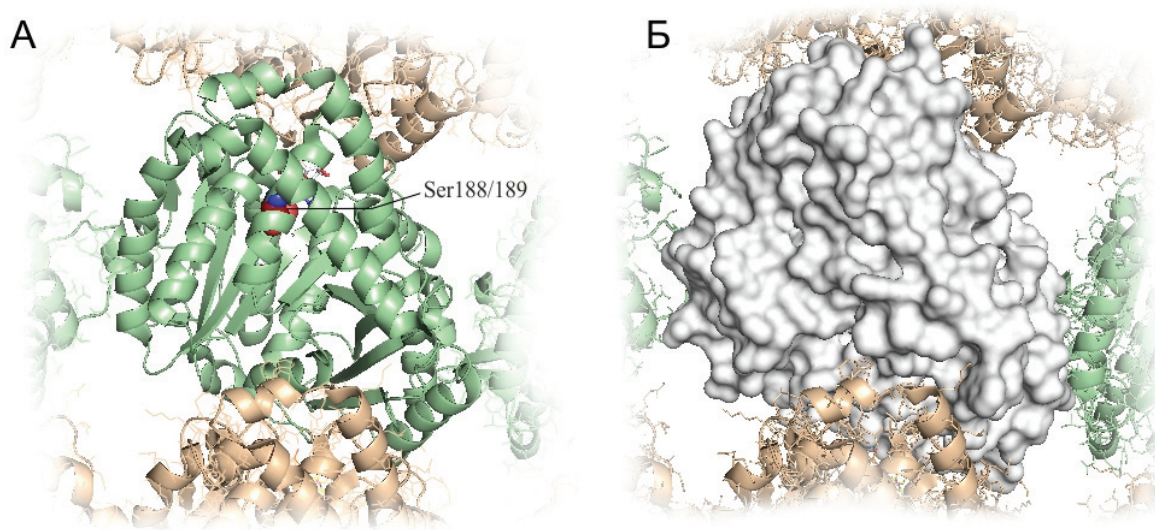


Рис. 7.28. Аналіз структурної топології Ser188 (189) β -тубуліну *A. thaliana*. Зовнішня проекція мікротрубочки: **А** – спіральна інтерпретація, **Б** – моделювання поверхні.

Таким чином, на підставі малої ймовірності BUB1/BRK1-специфічного фосфорилування тубуліну, опосередкованості визначених ефектів протеїнкіназа BRK1 не може вважатися агентом тубулінового коду вищих рослин.

Список публікацій, оприлюднених за результатами досліджень, які відображають результати розділу 7.

Karpov PA, Nadezhdina ES, Yemets AI, Blume YaB. Results of the clusterization of human microtubule and cel-cycle related serine/threonine protein kinases and their plant homologues. Moscow Univ Biol Sci Bulletin. 2010a; 65 (4): 213–216, doi: 10.3103/S0096392510040267.

Karpov 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. BMC Genomics. 2010b; 11 (S.1): S14, doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.

Karpov PA, 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.

Paganelli L, Caillaud M-C, Quentin M, Damiani I, Govetto B, Lecomte P, Karpov PA, 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

Karpov PA, Sheremet YaA, Blume YaB, Yemets AI. Studying the role of protein kinases CK1 in organization of cortical microtubules in *Arabidopsis thaliana* root cells. *Cytol Genet*. 2019; 53 (6): 441–450, doi: 10.3103/S0095452719060033

Karpov PA, Rayevsky AV, Sheremet YA, Yemets AI, Blume YB. Structural pattern of CK1-like protein kinases associated with regulation of plant microtubule cytoskeleton. *Cytol Genet*. 2020; 54 (4): 293-304, doi: 10.3103/S0095452720040052.

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.

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.

Raevsky AV, Karpov PA, Sheremet YA, Blume YB. Molecular docking of inhibitor D4476 in ATP-binding pocket of CK1 δ 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.

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.

Sheremet Ya.A., Karpov P.A., Yemets A.I., Blume Ya.B. 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.

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.

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>

РОЗДІЛ 8

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

За сучасною класифікацією рослинні Ca^{2+} -залежні (CDPK) і SNF-споріднені (SnRK) протеїнкінази утворюють спільну суперродину CDPK-SnRK [225, 283]. Спектр процесів, до регуляції яких причетні протеїнкінази CDPK-SnRK, надзвичайно широкий. Існують опосередковані дані стосовно ролі протеїнкіназ CDPK-SnRK в регуляції цитоскелету. Проте, підтвердження здатності фосфорилювати тубулін з'явилися лише нещодавно [135, 28, 407]. Вважається, що протеїнкінази CDPK-SnRK зв'язують сигнали іонів Ca^{2+} і відповідь клітин на зміни зовнішнього середовища і стрес-фактори [283]. Для взаємодії з іонами Ca^{2+} представники CDPK-SnRK мають домени, які містять мотиви «EF-hand» (Pfam: PF00036, InterPro: IPR002048) або утворюють комплекси з кальмодуліном (CaM) [204, 283]. Застосування CaM-специфічних інгібіторів, зокрема W7, призводить до реорганізації мікротрубочок і появи морфологічних аномалій [504].

8.1. Прогнозування сайтів CaMK2-специфічного фосфорилювання рослинного тубуліну на підставі відповідності канонічним НММ-профілям

На підставі порівняння з НММ-профілями (приховані моделі Маркова) сайтів CaMK2-специфічного фосфорилювання білків тваринного походження (за допомогою програми KinasePhos 2.0) було виконано пошук сайтів Ca^{2+} /CaM-залежного фосфорилювання α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana*. Консенсусні ділянки було визначено у складі різних ізотипів β - і γ -тубуліну. У α -тубуліну консенсусні ділянки були відсутні.

Наступна структурна топологія з використанням моделі фрагмента комплексу γ TuRC *A. thaliana* дозволила виключити з подальшої роботи залишки

амінокислот, не доступні для модифікацій. Було підтверджено доступність 4-х сайтів на поверхні TUBG1/TUBG1 і TUBG2/TUBG2: Ser259 та Ser321 (рис. 8.1) і Ser32 та Ser376 (рис. 8.2). Зазначені залишки консервативні у всіх ізотипів γ -тубуліну *A. thaliana* (TUBG1_ARATH P38557 і TUBG2_ARATH / P38558) і *H. sapiens*. Це дозволило припустити їх функціональну подібність у рослин і тварин та їх зв'язок з активністю Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ (CDPK).

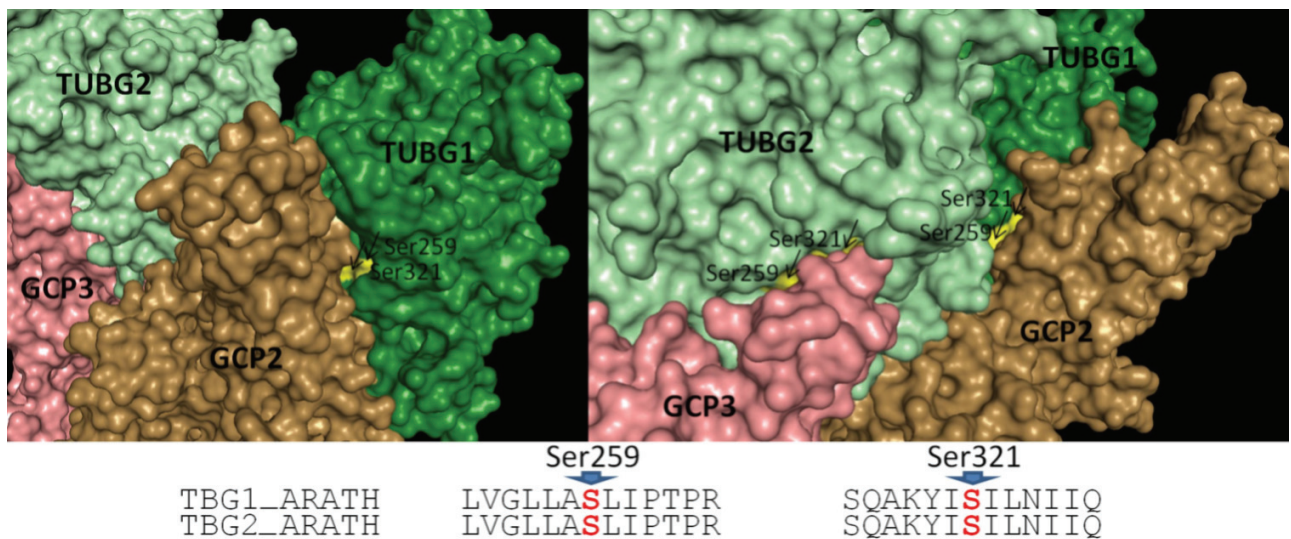


Рис. 8.1. Модель γ -тубулінового комплексу γ TuSC з *A. thaliana*. Жовтим кольором позначено Ser259 і Ser321 γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2), які відповідають НММ-профілям сайтів CaMK2-специфічного фосфорилування.

Розташування Ser259 і Ser321 γ -тубуліну у ділянках контактних інтерфейсів TUBG1/GCP2 і TUBG2/GCP3, дозволяє стверджувати, що фосфорилування у цих положеннях має впливати на первинну нуклеацію мікротрубочок. Ser32 і Ser376 розташовані в ділянках контактних інтерфейсів молекул γ -тубуліну суміжних комплексів γ TuSC. Це свідчить, що фосфорилування Ser32 і Ser376 має впливати на взаємодію мономерів кільця центру первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuRC).

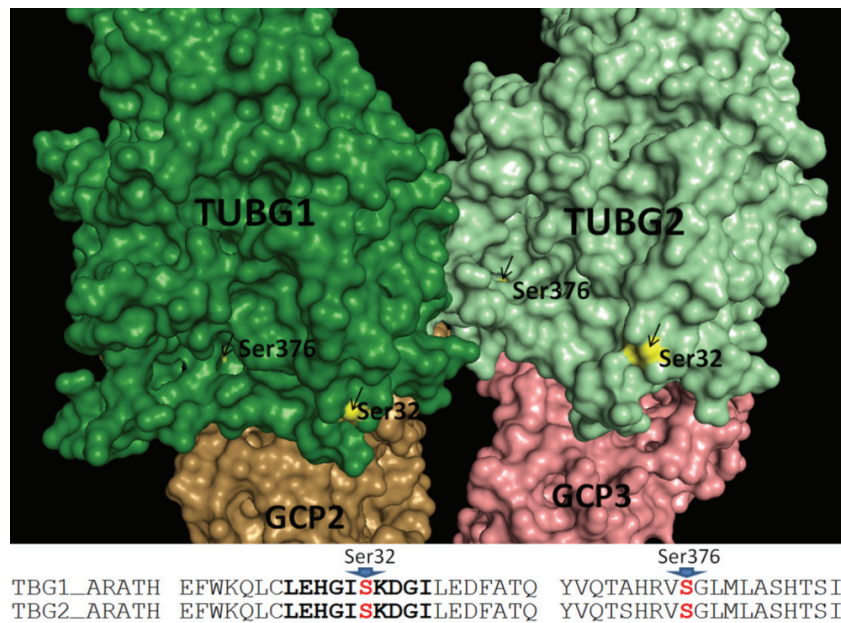


Рис. 8.2. Структурна модель малого комплексу γ TuSC з *A. thaliana*. Стрілки вказують на залишки Ser32 і Ser376 рослинного γ -тубуліну, що відповідають НММ-профілям сайтів Ca^{2+} /CaM-залежного фосфорилування.

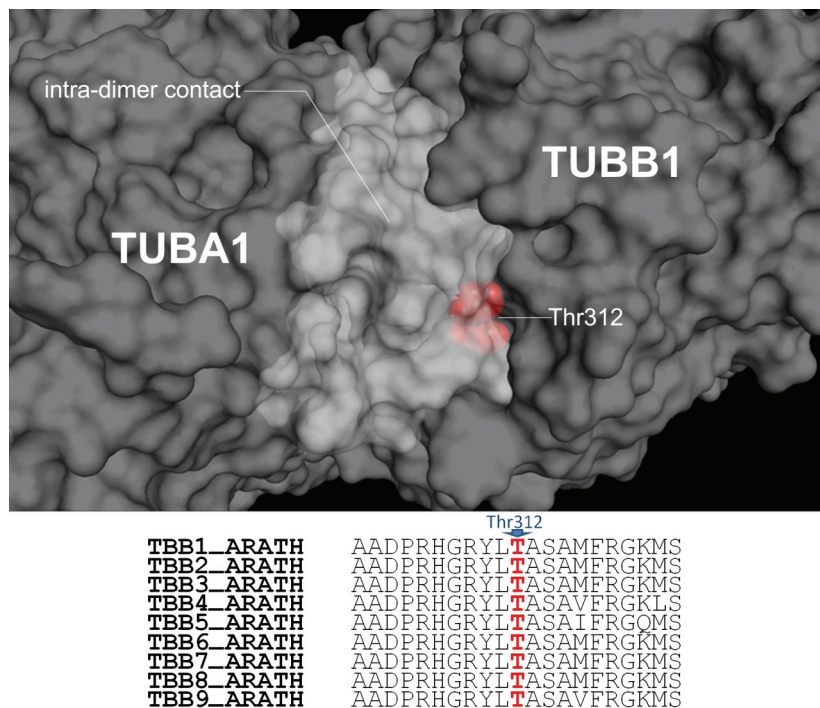


Рис. 8.3. Структурна топологія сайту Ca^{2+} /CaM-залежного фосфорилування Thr312 β -тубуліну на моделі димеру $\alpha\beta$ -тубуліну *A. thaliana*. Світла ділянка позначає інтрадимерний інтерфейс. Порівняння послідовностей підтвердило консервативність сайту всіх ізотипів β -тубуліну *A. thaliana*.

Залишок Thr312 β -тубуліну *A. thaliana* також визначив консенсус профілю Ca^{2+} /CaM-залежного фосфорилування. Thr312 належить до ділянки внутрішнього контакту димеру α/β -тубуліну і його фосфорилування має впливати на цілісність гетеродимеру α/β -тубуліну (рис. 8.3). Thr312 належить до сайту зв'язування колхіцину і його фосфорилування було доведено експериментально для β -тубуліну *H. sapiens* і *M. musculus* [479, 418, 580, 95].

8.2. Аналіз експериментально-підтверджених сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування і визначення їх консервативних профілів

Тваринні CDPK здатні фосфорилувати залишки, амінокислотне оточення яких відповідає трьом характерним мотивам: класичний мотив ϕ - $_5$ -x-R- $_3$ -x-x-S- $_0$ - [331, 21], мотив ACA2 [R- $_9$ -R- $_8$ -x-R- $_6$]- ϕ - $_5$ -x-x-x-x-S- $_0$ -x-R- $_2$ [229] і мотив ACS ϕ -3-R-2- ϕ - $_1$ -S- $_0$ - ϕ - $_1$ -x-K- $_3$ -R- $_4$. (ϕ - гідрофобна амінокислота) [496]. Але у рослин зазначені профілі засвідчили низьку специфічність. Наразі існує велика кількість нових експериментально підтверджених сайтів Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ [220, 637]. Інформацію репозиторію PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) було використано як основу для складання максимально повної вибірки сайтів асоційованих з кальцій-залежними протеїнкіназами і визначення специфічних профілів.

Були відібрані 494 послідовності сайтів у форматі $\text{Xp}\pm 7$ з відомим положенням цільових залишків і протеїнкінази, що здійснюють зазначені модифікації. Складання узагальнених профілів здійснювалось відповідно рекомендаціям PROSITE [513]. Для уникнення зміщення позицій цільових амінокислот за рахунок інтеркаляції гепів послідовності завантажувались в програму ClustalX і конвертувались в формат *.aln без етапу класичного вирівнювання [326].

Узагальнений патерн повної вибірки (494 послідовності) (рис. 8.4) виявив вироджений характер і відповідав мотиву неспецифічного фосфорилування. Це

свідчило про первинну гетерогенність групи послідовностей і необхідність відокремлення більш специфічних підгруп. Критерієм диференціації була подібність фрагментів амінокислотних послідовностей. Водночас необхідно було виключити з подальшої роботи протеїнкінази, не спроможні фосфорилювати рослинний тубулін.

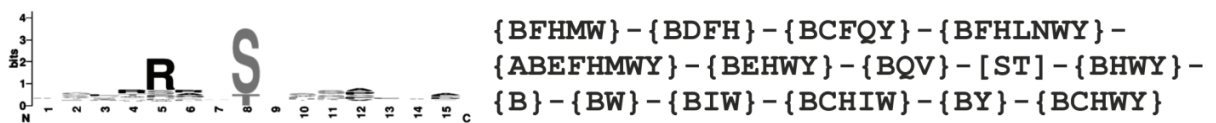


Рис.8.4. Узагальнюючий лог (зліва) і патерн (праворуч), що відповідають 494-м експериментально підтвердженим сайтам фосфорилювання тваринних білків кальцій-залежними протеїнкіназами, які на момент дослідження були депоновані в репозиторії PhosphoSitePlus.

Кластеризація за методом зв'язування найближчих сусідів дозволила виявити клади, які об'єднують подібні сайти, та ідентифікувати відповідні асоційовані протеїнкінази. Це дозволяло скласти профілі окремих клад, і, перш за все, патерни для шести клад першого порядку (Клади I-VI) (рис. 8.5).

Повторне сканування засвідчило, що з шести патернів достатню специфічність мав лише профіль кладу III (Табл. 8.1). Йому відповідав лише один консенсус - Ser147 обох ізотипів γ -тубуліну *A. thaliana*: TBG1 (UniProtKB: P38557) і TBG2 (UniProtKB: P38558). (табл. 8.1, рис. 8.5). Аналогічним чином було складено патерни кладу наступного порядку.

У більшості випадків необхідний рівень специфічності було досягнуто лише на рівні кладу II-го порядку. Винятком була кладу III. Пошук за допомогою побудованих патернів виявив наявність хітів для п'яти з чотирнадцяти профілів (табл. 8.1, рис. 8.5):

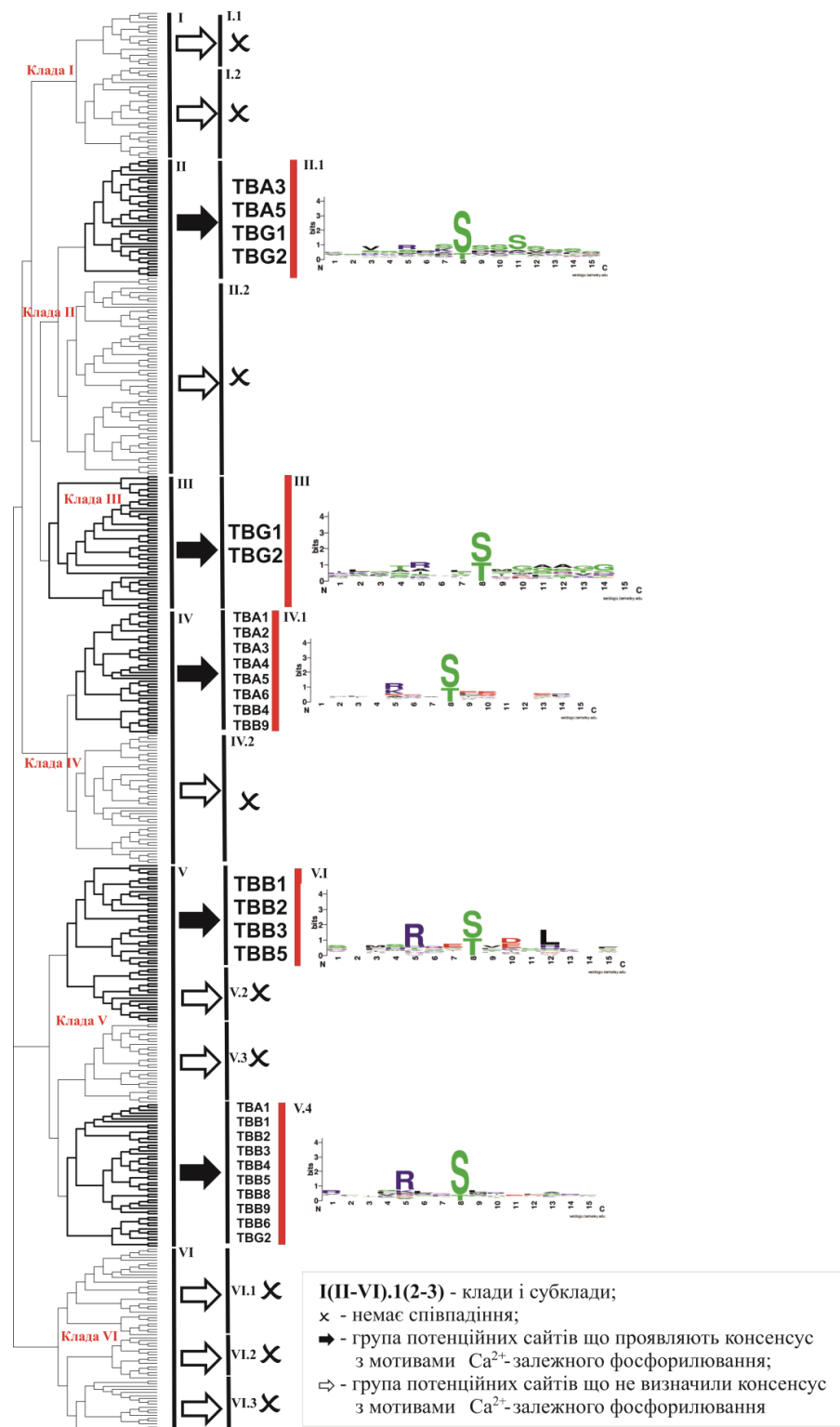


Рис. 8.5. Ранжування експериментально підтверджених сайтів Ca²⁺-залежного фосфорилування і створення профілів окремих підгруп. Позначено групи, для яких існують консенсуси у послідовностях α-, β- і γ-тубулінів *A. thaliana* (TBA1-6, TBB1-9 і TBG1-2).

Результати пошуку сайтів фосфорилування тубуліну *A. thaliana* з використанням експериментально-обгрунтованих профілів Ca^{2+} -залежного фосфорилування

Клада	Експериментально доведені сайти Ca^{2+} -залежного фосфорилування з репозиторія web-ресурсу PhosphoSitePlus		Консенсусні сайти у послідовностях молекул тубуліну з <i>A. thaliana</i>				
	лог	профіль	ізотип	сайт фосфорилування			
II.I		<p>{BEFHNPWY} - {BDEFHQ} - {BCFIMQTWY} - {BEFHLMNWX} - {ABEFHIMWY} - {BDEGHTWY} - {BDEFGHLQTVW} - [ST] - {BDEFHNLNQY} - {BFHLMNTWY} - {BDEFILMNQW} - {BCEFHILNQW} - {BCEFILMNWY} - {BEHIMNQWY} - {BCFHINQWY}</p>	TBA3 (Q56WH1)	330-AAVGTIKKRTVQFV-344			
			TBA5 (B9DHQ0)	330-AAVGTIKKRTVQFV-344			
			TBG1 (P38557)	230-SLVSTVMSASTTTLR-244			
			TBG2 (P38558)	230-SLVSTVMSASTTTLR-244			
III		<p>{BCDEGHPV} - {BCHMPVWY} - {BCDEFIW} - {BCDFIMRW} - [AGHIKMRST] - {BDFHVW} - {BCDEHPWY} - [ST] - {BCDEHLNPWY} - {BCFHILNQWY} - {AFGIKLRST} - {BDEHILNPW} - {BCDFIKLW} - {BCFHKPWV} - {BCHPW}</p>	TBG1 (P38557)	140-SIAGGTGSGMGSYLL-154			
			TBG2 (P38558)	140-SIAGGTGSGMGSYLL-154			
IV.I		<p>{BCHMV} - {BCGHMW} - {BFMOTW} - {BCDFM} - [AEGIKPQRTV] - {BCFHV} - {BCDLMTW} - [ST] - {BCFMNPRWY} - {BCFHMNWY} - {BHTW} - {ABCCK} - {BCFIWY} - {BCFHISW} - {BH}</p>	TBA1 (P11139)	140-AVGGGTGSLGSLLL-154 144-GTSGSLGSLLLERLS-158 171-IYSPQVSTAVVEPY-185 271-SYAPVISAAYHEQ-285 280-KAYHEQFVPEITTS-294 285-QFSVPEITTSVFEP-299 140-AVGGGTGSLGSLLL-154			
			TBA2 (B9DGT7)	144-GTSGSLGSLLLERLS-158 230-LVSQVISTASLRF-244			
			TBA3 (Q56WH1)	140-AVGGGTGSLGSLLL-154 144-GTSGSLGSLLLERLS-158			
			TBA4 (Q0WV25)	171-IYSPQVSTAVVEPY-185 140-AVGGGTGSLGSLLL-154			
			TBA5 (B9DHQ0)	144-GTSGSLGSLLLERLS-158 171-IYSPQVSTAVVEPY-185			
			TBA6 (P29511)	140-AVGGGTGSLGSLLL-154 144-GTSGSLGSLLLERLS-158			
			TBB4 (P24636)	230-LVSQVISTASLRF-244 144-GTSGSLGSLLLERLS-158			
			TBB9 (P29517)	275-SRGSQQYSALVPEL-289			
			V.I		<p>{BDEFHKMY} - {ABFIWY} - {BCDHPQTVW} - {ABCGKLNXY} - [AHKLNQRSTV] - {BCDEFHPW} - {BCKLNQTVW} - [ST] - {ABDGNQRW} - [ADEFGIKMQT] - {BFMRTWY} - [DEHLMQRSV] - {BCMSVWY} - {ABCMR} - {BCGKMRWY}</p>	TBB1 (P12411)	277-RGSQQYISLTVPELT-291
						TBB2 (Q56YW9)	276-RGSQQYRSLTVPELT-290
TBB3 (Q9ASR0)	276-RGSQQYRSLTVPELT-290						
TBB5 (P29513)	277-RGSQQYISLTVPELT-291						
V.4		<p>{BCHMNPY} - {BGRHWY} - {BDFHV} - {BDFHINQW} - [ADKPQRSTV] - {BCDFIWY} - {BCEFWY} - [ST] - {BCFIKNTW} - {BFHKMWY} - {BCDIW} - {ABCFTWY} - {BDIMNTW} - {BFKPWY} - {BCHQWY}</p>				TBA1 (P11139)	229-RLISQTISSLTSLR-243
			TBB1 (P12411)	272-APLTSRGSQQYISLT-286			
			TBB2 (Q56YW9)	271-APLTSRGSQQYRSLT-285			
			TBB3 (Q9ASR0)	271-APLTSRGSQQYRSLT-285			
			TBB4 (P24636)	271-APLTSRGSQQYSALS-285			
			TBB5 (P29513)	272-APLTSRGSQQYISLT-286			
			TBB6 (P29514)	271-APLTSRGSQQYRALT-285			
			TBB8 (P29516)	271-APLTSRGSQQYRALT-285			
			TBB9 (P29517)	271-APLTSRGSQQYSALS-285			
			TBG2 (P38558)	365-KSPYVQTHRVSGLM-379			

Клада II.1

{BEFHNPWY} - {BDEFHQ} - {BCFIMQTWY} - {BEFHLMNWX} - {ABEFHIMWX} -
 {BDEGHTWX} - {BDEFGHLQTVW} - [ST] - {BDEFHLNQY} - {BFHLMNTWX} - {BDEFILMNQW} -
 {CSEFHILNQW} - {CEFILMNWX} - {BEHIMNQWY} - {BCFHINQWY}

Перспективні консенсуси визначено у послідовностях ізотипів: TBA3, TBA5, TBG1 і TBG2.

Клада III

{BCDEGHPV} - {BCHMPVWX} - {BCDEFIW} - {BCDFIMRW} - [AGHIKMQRST] -
 {BDFHVV} - {BCDENPWX} - [ST] - {BCDEHLNPWX} - {BCFHIKQVWX} - [AFGIKLPQRST] -
 {BDEHIKNPW} - {BCDFIKLW} - {BCFHKPVW} - {BCHPW}

Перспективні консенсуси визначено у послідовностях ізотипів: TBG1 і TBG2.

Клада IV.1

{BCHMV} - {BCGHMW} - {BFMQTW} - {BCDFM} - [AEGIKPQRTV] - {BCFHV} -
 {BCDLMTW} - [ST] - {BCFMNPRWX} - {BCFHMNWX} - {BHTW} - {ABCGK} - {BCFIWX} -
 {BCFHISW} - {BH}

Перспективні консенсуси визначено у послідовностях ізотипів: TBA1, TBA2, TBA3, TBA4, TBA5, TBA6, TBB4 і TBB9.

Клада V.1

{BDEFHKMY} - {ABFIWX} - {BCDHPQTVW} - {ABCGKLNTY} - [AHKLNQRSTV] -
 {BCDEFHPW} - {BCKLNQTVW} - [ST] - {ABDGNQRW} - [ADEFGIKMQT] - {BFMRTWX} -
 [DENLMPQRSV] - {BCMSVWX} - {ABCMR} - {BCGKMRWX}

Перспективні консенсуси визначено у послідовностях чотирьох β-тубулінів: TBB1, TBB2, TBB3 і TBB5.

Клада V.4

{BCHMNPY} - {BGHRWX} - {BDFHV} - {BDFHINQW} - [ADKPQRSTV] - {BCDFIWX} -
 {CEFWY} - [ST] - {BCFIKNTW} - {BFHKMWY} - {BCDIW} - {ABCFMWX} - {BDIMNTW} -
 {BFKRWY} - {BCHQWY}

Перспективні консенсуси визначено у послідовностях ізотипів: TBA1, TBB1, TBB2, TBB3, TBB4, TBB5, TBB8, TBB9, TBB6 і TBG2.

Загалом для ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* ідентифіковано 43 потенційних сайти фосфорилування (Табл. 8.1). Хіти вищезгаданих патернів відповідали консенсусам сайтів фосфорилування тваринними протеїнкіназами: SAMK1A (KRT18), SAMK2A (KIF3A), SAMKK2 (KKCC2) і SAMK2A (Chrm4). Для відбору рослинних сайтів найбільш близьких до експериментально підтверджених сайтів тваринних протеїнкіназ, відібрані фрагменти консенсусів з *A. thaliana* було додано (в форматі Xp \pm 7/*.fasta) до контрольної групи. Зведена вибірка склала 537 сайтів. Спільна кластеризація сайтів тваринних Ca²⁺-залежних протеїнкіназ і потенційних сайтів з молекул тубуліну *A. thaliana* дозволила відібрати тваринні протеїнкінази, сайти яких мають найбільшу подібність до визначених у рослин.

Потенційні сайти з α - і γ -тубуліну *A. thaliana*, що відповідають профілю клади II.1, мають найбільшу подібність з сайтами тваринних протеїнкіназ SAMK1A і SAMK2A. Консенсуси профілю клади III з α - і γ -тубуліну *A. thaliana* виявляють подібність до сайтів протеїнкінази SAMK1A *H. sapiens*. Консенсуси профілю клади IV.1 з ізотипів α - і β -тубуліну *A. thaliana* проявляли подібність до сайтів протеїнкінази SAMK2A *H. sapiens*. Консенсуси профілю клади V.1 з ізотипів β -тубуліну *A. thaliana* виявляють найбільшу подібність до сайту фосфорилування протеїнкіназою SAMK2A з *Rattus norvegicus*. Консенсуси профілю клади V.4 з α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* проявляють найбільшу подібність до сайту протеїнкінази SAMKK2 (KKCC2) з *H. sapiens*. Таким чином, потенційні сайти Ca²⁺-залежного фосфорилування тубуліну *A. thaliana*, мали найбільшу подібність до сайтів фосфорилування тваринними протеїнкіназами: KCC1A_HUMAN (Q14012); KCC2A_HUMAN (Q9UQM7); KCC2A_RAT (P11275) і KKCC2_HUMAN (Q96RR4).

NJ-кластеризація каталітичних доменів і пошук засобами blastp визначили рослинні протеїнкінази CPK20 (At2g38910), CPK21 (AT4G04720), GRIK2 (At5g60550) як найбільш ймовірними гомологами вищезазначених тваринних

протеїнкіназ з поміж 1021 протеїнкіназ повного кіному *A. thaliana*. Розташування зазначених сайтів фосфорилування ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* з маркуванням рослинних протеїнкіназ потенційно асоційованих з зазначеними модифікаціями відображено на рис. 8.6.

Ідентифікація протеїнкіназ CPK20 і CPK21 як найближчих гомологів протеїнкіназ САМК1 і САМК2А тваринного походження - досить цікавий факт. Вважається, що протеїнкінази CPK (Calcium-dependent protein kinases) існують у всіх представників вищих рослин (*Streptophyta*) [205], зелених водоростей (*Chlorophyta*) [384, 22], найпростіших (*Protozoa*) [53] і ооміцетів (*Oomycota*) [71], однак відсутні у більшості грибів і тварин [555, 283].

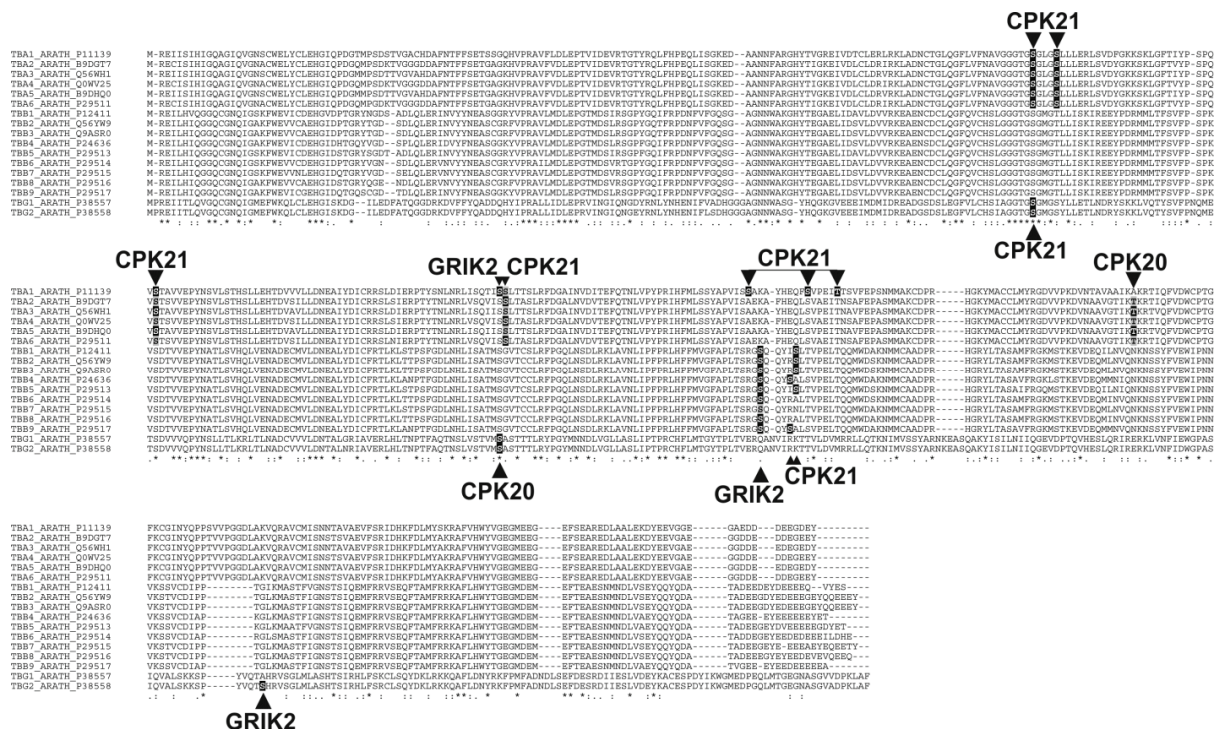


Рис. 8.6. Розташування потенційних сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування, визначених для α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* з маркуванням рослинних протеїнкіназ, які, найбільш ймовірно, здійснюють зазначені модифікації.

Приймаючи до уваги розподіл CPK і актуальні дані молекулярної філогенетики, можна зробити висновок, що дивергенція кальцевих протеїнкіназ відбулась на ранніх етапах еволюції еукаріот [458]. Аргументом цього

припущення слугують суттєві відмінності доменного складу найближчих гомологів з *H. sapiens* і *A. thaliana* (рис. 8.7А). Проте, каталітичні домени тваринних і рослинних гомологів зберегли явну подібність. Так, послідовності каталітичних доменів протеїнкінази СРК20 (CDPKK, UniProtKB: Q9ZV15) з арабідопсису і САМК1 (KCC1A, UniProtKB: Q14012) людини мають ідентичність 44 % при 63 % подібності. Каталітичні домени СРК21 (CDPKL, UniProtKB: Q9ZSA2) з арабідопсису і САМК2А (KCC1A, UniProtKB: Q9UQM7) людини демонструють 44% ідентичність при 66% подібності. При цьому консенсусна ділянка послідовностей цих ферментів під час пошуку засобами SIB BLAST [336] припадає виключно на ділянки їх каталітичних доменів. Структурні вирівнювання моделей каталітичних доменів демонструють ще більш очевидну подібність (рис. 8.7В). При структурному вирівнюванні каталітичних доменів пари СРК20 / САМК1 середньоквадратичне відхилення (RMSD) складає 0,62, а у пари СРК21 / САМК2А зазначений показник дорівнює 0,896, що підтверджує високу подібність порівнюваних структурних моделей.

Зворотне blastp-сканування UniProtKB з використанням повних послідовностей СРК20 і СРК21 *A. thaliana* підтвердило, що найближчими гомологами СРК20, є протеїнкінази САМК1 / КСС1А миші (Q91YS8, KCC1A_MOUSE), пацюка (Q63450, KCC1A_RAT) і людини (Q14012, KCC1A_HUMAN), а у випадку СРК21 - САМК4 пацюка (Q13234, KCC4_RAT), миші (P08414, KCC4_MOUSE) і людини (Q16566, KCC4_HUMAN) (рис. 8.8А і 8.8В). Для рослинної протеїнкінази СРК20 первинний прогноз підтвердився (рис. 8.8А), для СРК21 питання залишається відкритим. Зворотний blastp-пошук і філогенетична кластеризація підтверджують еволюційну спорідненість тваринних кальцієвих протеїнкіназ і рослинних СРК. Проте, у випадку протеїнкінази СРК21 за філогенетичною дистанцією група САМК2А посіла лише третє місце, поступившись групам САМК4 і САМК1 (рис. 8.8В). Незважаючи, що за даними літератури прямі гомологи рослинних протеїнкіназ СРК у тварин відсутні [555,

458], їх еволюційна спорідненість з протеїнкіназами САМК ссавців є очевидною. Достатньо висока подібність цих ферментів і цільових молекул тубуліну дозволяє припускати причетність відібраних протеїнкіназ до регуляції тубулінового коду у вищих рослин.

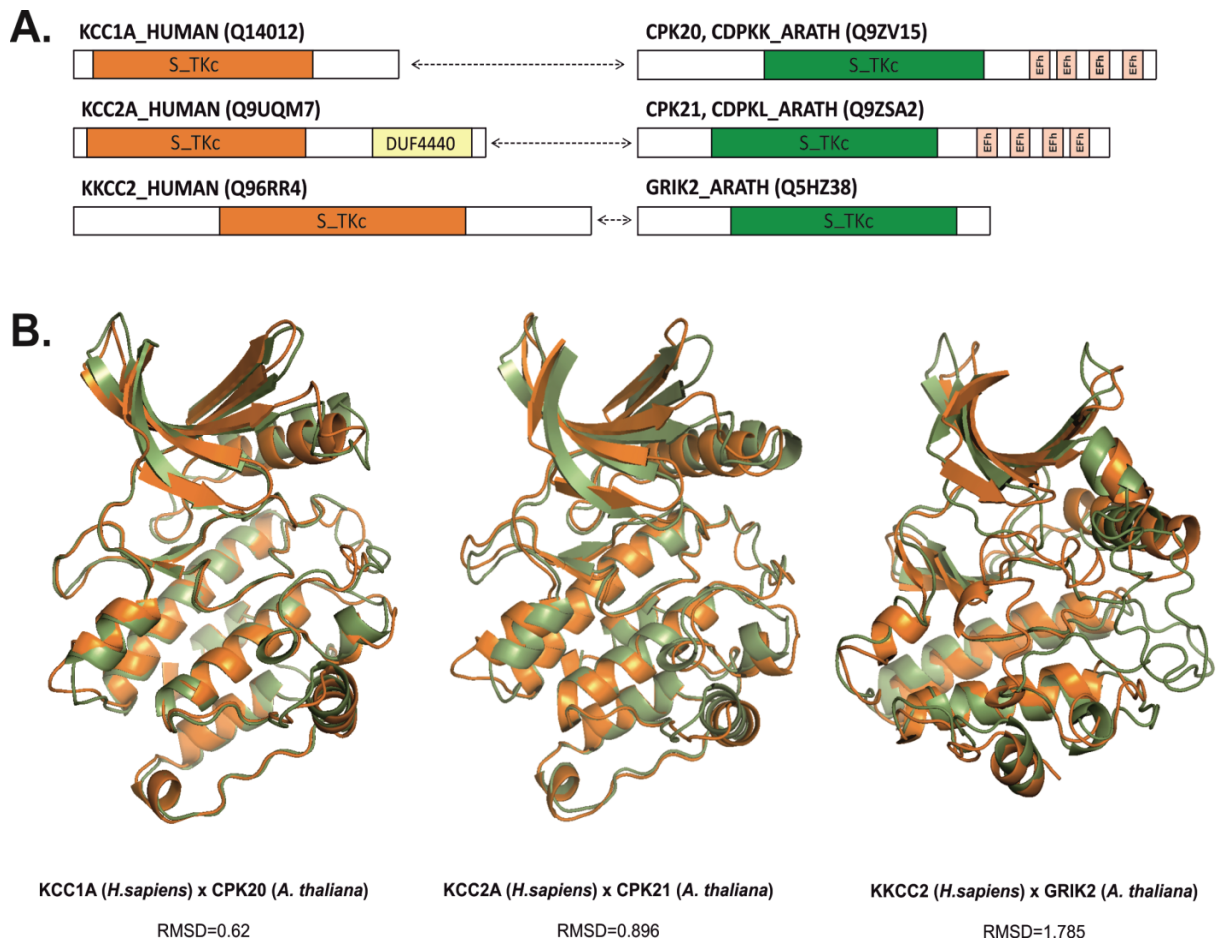
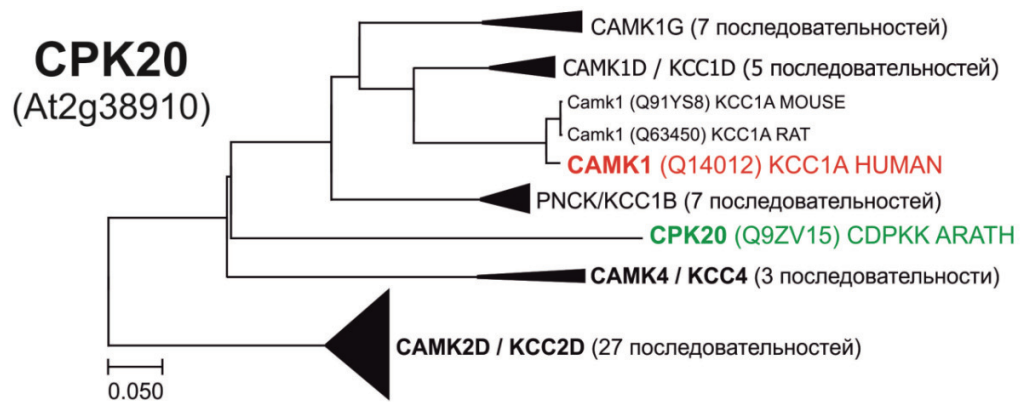


Рис. 8.7. Порівняння доменної архітектури (А) і структур каталітичних доменів (В) гомологічних протеїнкіназ.

Примітка: А) S_TKc - серин/треонін-специфічний каталітичний кіназний домен, DUF4440 - консервативний домен невідомої функції (Pfam: PF14534), EFh (EF-hand domain) - тандемні EFh домени відповідають за зв'язування іонів Ca²⁺ (InterPro: IPR035799; SMART: SM00054);

В) Помаранчевим кольором позначені моделі каталітичних доменів протеїнкіназ людини. Зеленим - рослинні гомологи з арабідопсису.

A. Calcium-dependent protein kinase 20



B. Calcium-dependent protein kinase 21

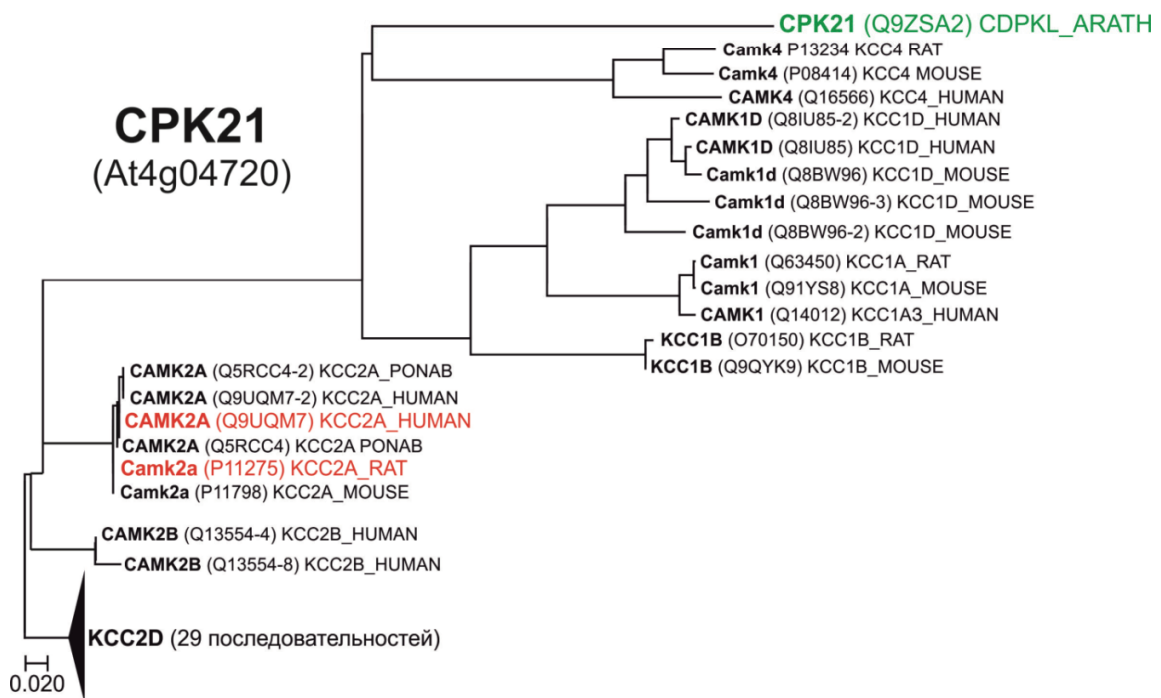


Рис. 8.8. Результати зворотного пошуку тваринних гомологів протеїнкіназ CPK20 (A) і CPK21 (B) з *A. thaliana*. Для Blastp-пошуку в UniProtKB було використано повні амінокислотні послідовності за умов обмеження пошуку за групою анотованих послідовностей *Mammalia*. Кластеризація виконувалась для перших п'ятдесяти хітів.

Рослинна GRIK2 (Geminivirus Rep Interacting Kinase 2, At5g60550, UniProtKB: Q5HZ38) відома, як активатор протеїнкіназ SnRK1.1 / KIN10 і SnRK1.2 / KIN11, що фосфорилує їхні активаційні петлі за залишками Thr198 і Thr176 відповідно [210, 501, 114]. Відомо, що за участю протеїнкіназ SnRK1 відбувається регуляція експресії значної кількості генів, регуляція активності ферментів метаболістичних каскадів, контроль клітинного росту і розвитку [114]. В межах актуального дослідження KIN10 і KIN11 *A. thaliana* визначили як найближчі рослинні гомологи тваринних протеїнкіназ BRSK (1 і 2) і агенти тубулінового коду рослин, що фосфорилують Ser131 γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2). Дослідження показали, що зазначена модифікація впливає на формування рослинних комплексів γ TuSC і γ TuRC [278]. Філогенетично, GRIK2 і 1 близькі до SNF1- і АМПК-активованих кіназ, з якими також демонструють біохімічну подібність [210, 501]. Рослинні GRIK1/2 залишаються відносно маловивченими з невідомою більшістю їх функцій. Так, Shen et al. (2009) припускають, що крім протеїнкіназ SnRK1, GRIK1/2 можуть фосфорилувати інші білки, в тому числі субстрати, не пов'язані з SnRK-залежним сигналінгом [501]. Зазвичай, протеїнкінази GRIK1 і 2 виявляються виключно в апікальних меристемах і дуже молодих листках [501], що свідчить про можливу позитивну кореляцію їх експресії і інтенсивності клітинного поділу.

Зворотний blastp-пошук підтвердив подібність рослинної протеїнкінази GRIK2 з *A. thaliana* і тваринних протеїнкіназ CAMKK1 і CAMKK2 (рис. 8.9). Кластеризація перших п'ятдесяти хітів пошуку визначила найменшу дистанцію між рослинною GRIK2 і CAMKK2 людини (Q96RR4, KKCC2_HUMAN). Отримані результати підтверджували первинні висновки щодо гомології рослинної GRIK2 і KKCC2 (CAMKK2) ссавців.

Serine/threonine-protein kinase GRIK2 (GEMINIVIRUS REP INTERACTING KINASE 2)

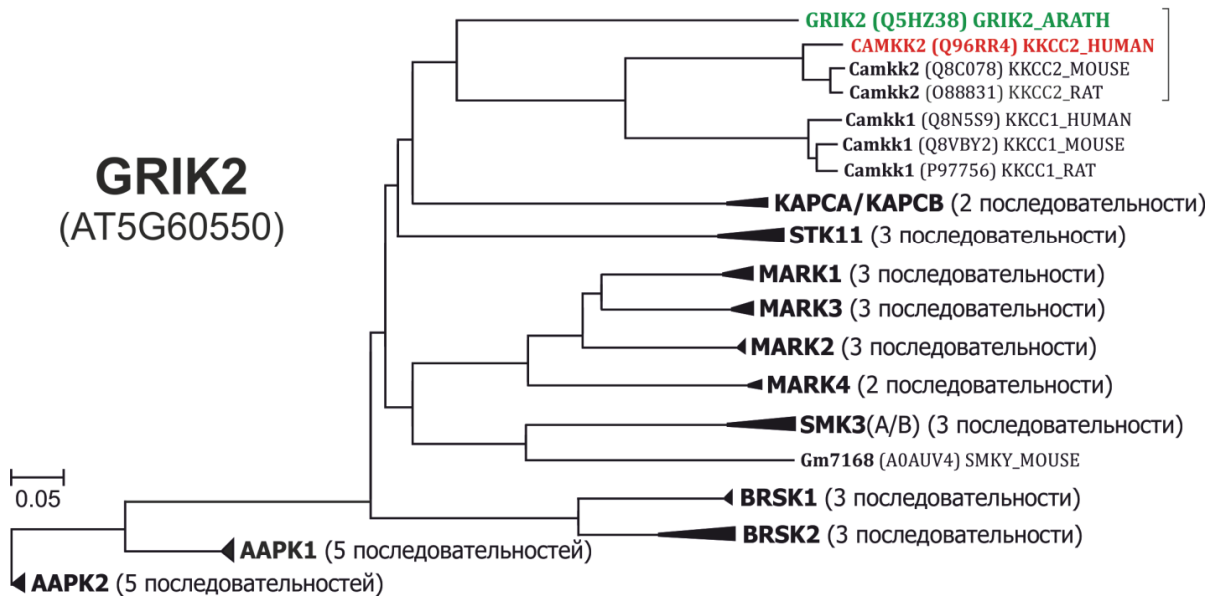


Рис. 8.9. Результати зворотного пошуку тваринних гомологів рослинної протеїнкінази GRIK2 з *A. thaliana*. Blastp-пошук було виконано з використанням повної амінокислотної послідовності і обмеження пошуку за групою анотованих послідовностей UniProtKB з представників *Mammalia*. Кластеризація виконувалась для перших п'ятдесяти хітів (з програмним віддаленням повторів) і рослинної послідовності, яка слугувала пошуковим запитом.

Враховуючи результати аналізу відібраних сайтів фосфорилювання, подібність послідовностей і просторової організації каталітичних доменів протеїнкіназ тваринного і рослинного походження, CPK20 (At2g38910), CPK21 (AT4G04720) і GRIK2 (At5g60550) було визначено як наймовірніші представники Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, асоційовані з безпосереднім фосфорилюванням α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana*.

8.3. Аналіз топології сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну

Для визначення топології сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну і розуміння функціонального вкладу СРК- і GRIK-залежного фосфорилування рослинних мікротрубочок, було виконано аналіз їх топології на прикладі структурної моделі фрагменту рослинної мікротрубочки. Фрагмент мікротрубочки *A. thaliana* було побудовано із використанням повноатомних структурних моделей α -тубуліну (TBA6 / P29511), β -тубуліну (TBB2 / Q56YW9 і TBB7 / P29515) і γ -тубуліну (TBG1 / P38557 і TBG2 / P38558). Використання саме цих ізотипів обумовлювалось наявністю всіх раніше визначених сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування. Шаблоном для моделювання комплексу була ЕМ-структура 3j6f (RCSB Protein Data Bank) із *Sus scrofa* [7]. Позичонування молекул рослинного α - і β -тубуліну було виконано шляхом структурного вирівнювання з відповідними ізотипами шаблону. У випадку γ -тубуліну, вирівнювання структури виконувалось проти β -тубуліну структури 3j6f, що обумовлено філогенетичною дистанцією β - і γ -тубуліну і наявністю спільного інтерфейсу взаємодії з α -тубуліном. Існує думка, що γ -тубулін є продуктом спільної еволюції α -, β - і γ -тубулінів, які походять від спільного предка ще з часів *Prostheco bacter* і відокремлення γ -тубуліну відбулось до події дивергенції α - і β -тубулінів [366; 365]. NJ-кластеризація α -, β - і γ -тубулінів *A. thaliana* підтверджує незначну, але більшу подібність послідовностей саме γ - і β -тубулінів (рис. 8.10).

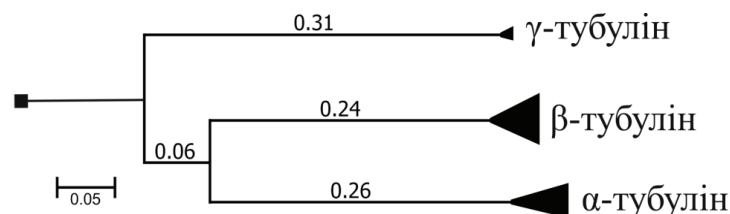


Рис. 8.10. Спільна кластеризація всіх ізотипів α -, β - і γ -тубуліну з *A. thaliana* підтверджує більшу подібність послідовностей представників γ - і β -тубулінів. Для правильного визначення положення коріння (■) і топології дерева було застосовано референсну послідовність FTSZ1 (UniProtKB: Q42545) з *A. thaliana*.

8.3.1. Топологія сайтів СРК20-залежного фосфорилування і їх потенційний вплив на структуру мікротрубочки *A. thaliana*

Знайдений під час актуального дослідження сайт СРК20-залежного фосфорилування Thr337 відповідає аналогічному амінокислотному залишку α -тубуліну *H. sapiens* (рис. 8.11).

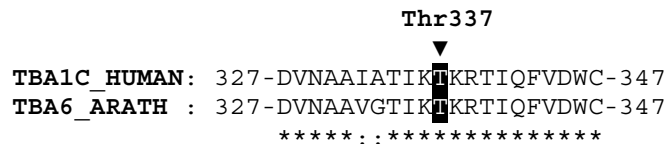


Рис. 8.11. Порівняння сайту СРК20-залежного фосфорилування Thr337 і аналогічної ділянки α -тубуліну *H. sapiens*.

Цей сайт зберігає консервативність у всіх ізотипів α -тубуліну людини і арабідопсису і раніше ідентифікувався як сайт фосфорилування протеїнкіназою Ca (protein kinase Ca (PKCa)) [1]. Аналіз інформації PhoSphositePlus (www.phosphosite.org) підтвердив існування експериментальних доказів фосфорилування Thr337 (зокрема, дані маспектрометрії) [220]. Аналіз топології засвідчив, що модифікація Thr337 α -тубуліну може впливати на інтерфейси латеральної взаємодії суміжних філаментів мікротрубочки (рис. 8.12). Раніше Ayoub et al. (2014) визначили Thr337 як частину інтерфейсу латеральної взаємодії α/α тваринної мікротрубочки на підставі результатів обрахунку енергетичної складової білок-білкової взаємодії [19]. Тому СРК20-залежне фосфорилування Thr337 α -тубуліну може розглядатись як потенційний фактор регуляції структури рослинної мікротрубочки і частина тубулінового коду. Слід зазначити, що, враховуючи гомологію α -тубуліну тваринного і рослинного походження та визначену в межах актуального дослідження гомологію тваринної PKCa і рослинних AGC-кіназ підродині S6K (KPK1/At3g08730 і KPK2/At3g08720), фосфорилування Thr337 може здійснюватись як Ca²⁺-залежними протеїнкіназами

(СРК20), так і протеїнкіназами S6K (КРК1 і КРК2). Хоч припущення і потребує додаткового підтвердження, факт, що фосфорилювання Thr337 має місце як у тваринній, так і у рослинній клітинах не підлягає сумніву, а сайт, безсумнівно, є частиною тубулінового коду і прикладом еволюційно-консервативного механізму регуляції структури мікротрубочок у тварин і вищих рослин.

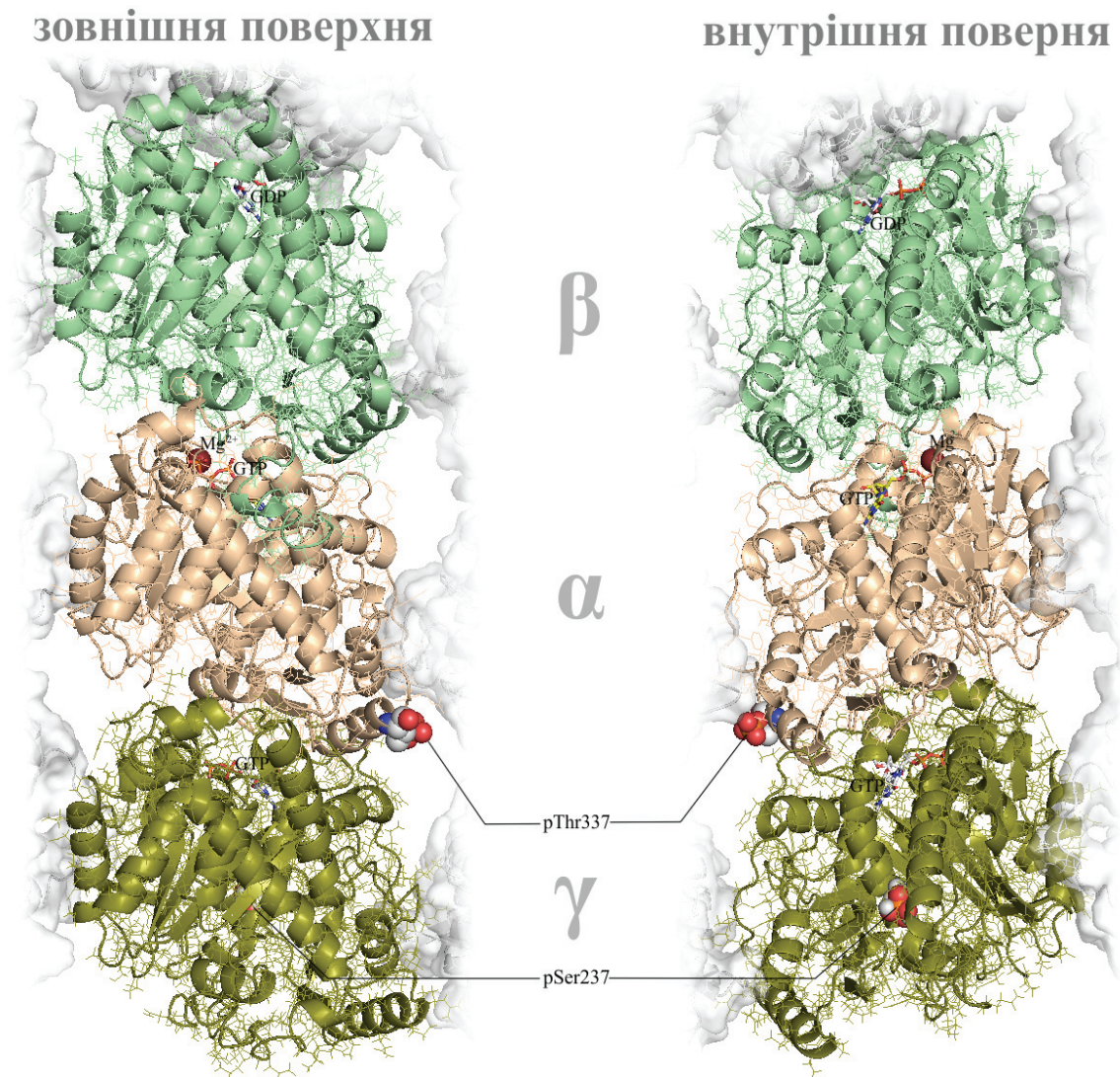


Рис. 8.12. Топологія сайтів СРК20 (At2g38910)-залежного фосфорилювання α - і γ -тубуліну з *A. thaliana*.

Інший потенційний сайт СРК20-залежного фосфорилювання Ser237, ідентичний аналогічному амінокислотному залишку γ -тубуліну людини. Проте,

аналіз структурної топології засвідчив, що ця амінокислота розташована на внутрішній поверхні мікротрубочки і занурена в глобулярну частину молекули, що ускладнює її фосфорилування (рис. 8.13). Аналіз даних маспектрометрії з ресурсу PhoSphositePlus (www.phosphosite.org) для γ -тубуліну (TBG1 і TBG2) ссавців (людина, пацюк і миша) засвідчив відсутність позитивних результатів маспектрометрії щодо фосфорилування Ser237. Таким чином, імовірність модифікації цього сайту у ізотипів γ -тубуліну тварин практично відсутня. За даними бібліотеки сайтів фосфорилування білків *A. thaliana* - PhosPhAt (phosphat.uni-hohenheim.de) для рослинного γ -тубуліну (TBG1 і TBG2) фосфорилування Ser237 також не підтверджено.

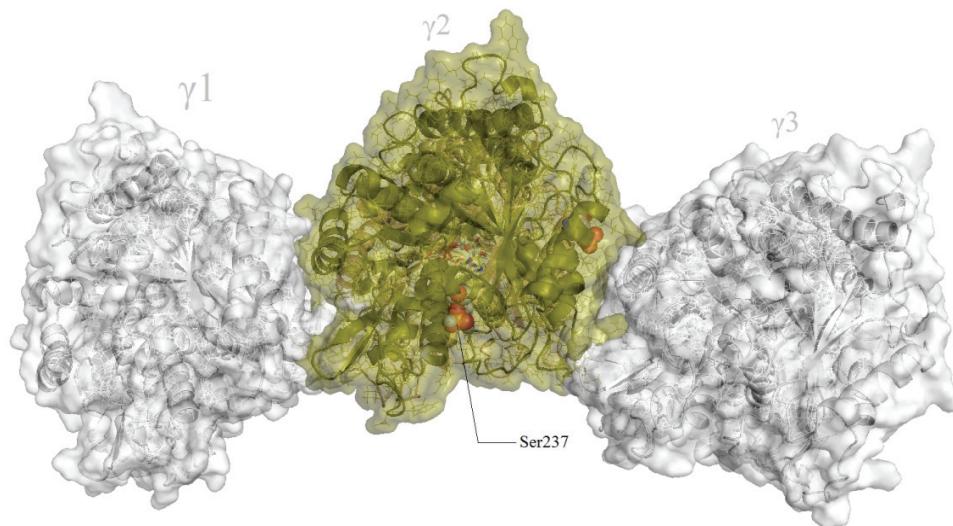


Рис. 8.13. Структурна топологія амінокислотного залишку Ser237 γ -тубуліну *Arabidopsis thaliana*. Локалізація Ser237 на внутрішній стороні мікротрубочки і занурення в глобулярну частину молекули засвідчили існування стеричних перепон для фосфорилування.

Співставлення вищезазначених фактів свідчить про фізичну неможливість фосфорилування Ser237 в обох ізотипах γ -тубуліну *A. thaliana*. Припущення стосовно внеску СРК20-залежного фосфорилування в тубуліновий код вищих

рослин знайшло структурно-біологічне підтвердження виключно для Thr337 α -тубуліну.

8.3.2. Потенційний вклад СРК21-залежного фосфорилування в тубуліновий код *A. thaliana*

У випадку СРК21-залежного фосфорилування α -тубуліну було ідентифіковано п'ять залишків серину (Ser147, Ser151, Ser178, Ser237 і Ser287), що відповідали мотиву Ca^{2+} -специфічного фосфорилування [456]. Порівняння з ізотипами α -тубуліну людини підтвердило консервативність і ідентичність номерів цільових амінокислот у людини і *A. thaliana*. Порівняння з депонованими в PhoSphositePlus (www.phosphosite.org) сайтами для молекул різних ізотипів α -тубуліну ссавців (людина, миша і пацюк) підтвердило, що з п'яти сайтів експериментальне підтвердження фосфорилування існує лише для Ser287. Фосфорилування Ser287 α -тубуліну ссавців зв'язано з апстрім-регуляцією розвитку ішемії [386]. Аналіз структурної топології Ser287 визначив, що у *A. thaliana* фосфорилування Ser287 може впливати на формування інтерфейсів латеральної взаємодії протофіламентів мікротрубочки (рис. 8.14). Це співпадає з експериментальними даними, визначившими Ser287 α -тубуліну як один з амінокислотних залишків, модифікація якого впливає на взаємодію протофіламентів тубуліну і викликає латеральну деформацію мікротрубочок [525].

Аналіз інформації бази даних GPS ресурсу EPSD v.1 (<http://epsd.biocuckoo.cn>) [352] дозволив визначити існування анотації Ser147 α -тубуліну *A. thaliana* як сайту фосфорилування. Експериментального підтвердження цієї модифікації α -тубуліну на сьогодні не існує. Структурна топологія вказує на існування певних структурних перепон для модифікації Ser147, зокрема коли α -тубулін знаходиться у стані гетеродимеру (рис. 8.14). Аналогічна ситуація спостерігається і у випадку Ser237, що дозволяє виключити цей сайт з подальшого дослідження.

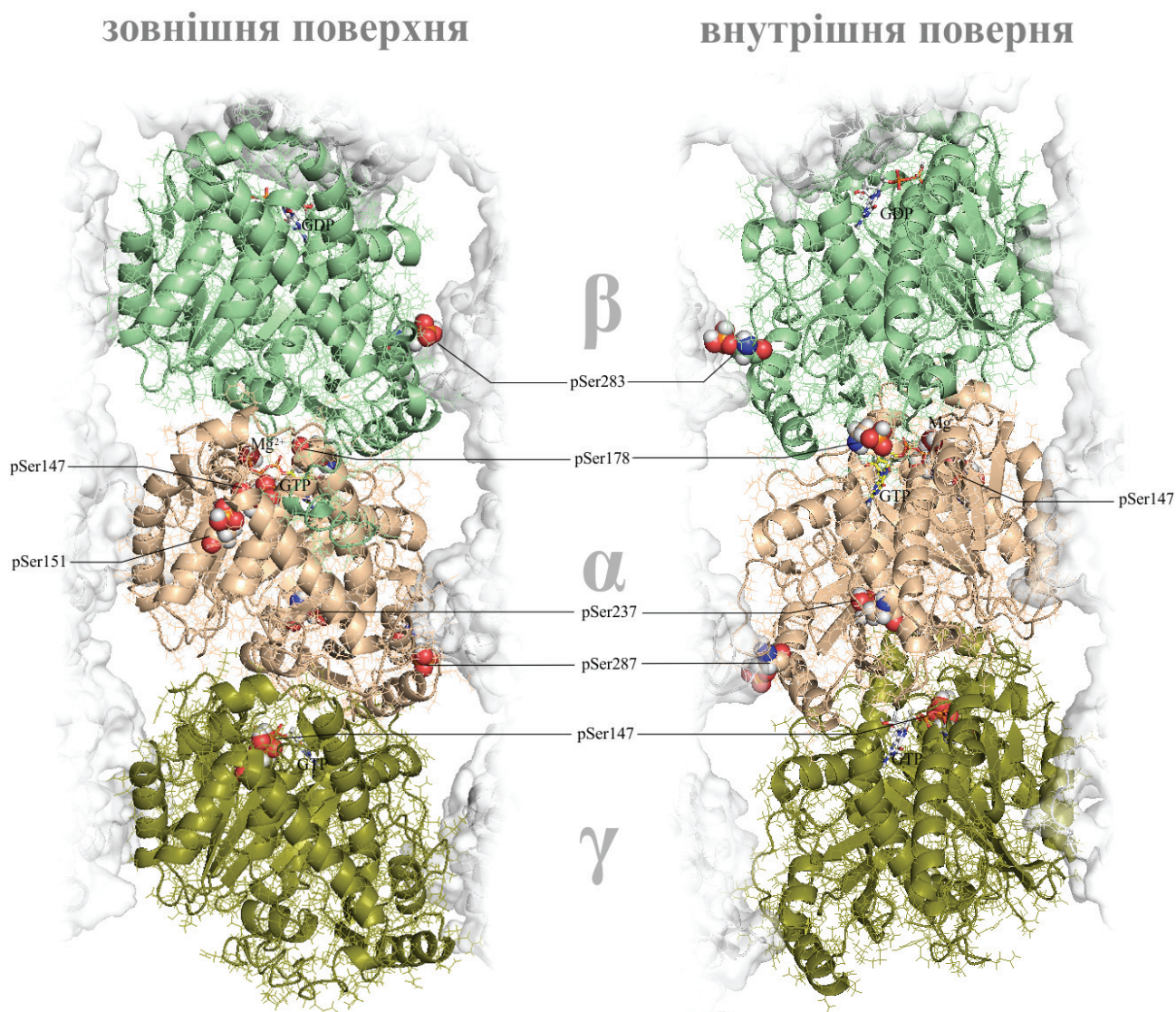


Рис. 8.14. Топологія потенційних сайтів CPK21(AT4G04720) - залежного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну *Arabidopsis thaliana*.

Ще один консервативний сайт Ser151 α -тубуліну знаходиться на зовнішній стороні мікротрубочки і не належить жодній з контактних поверхонь тубулін-тубулінової взаємодії (рис. 8.14). За даними структурного аналізу топологія Ser151 ідентична і для тваринної, і для рослинної мікротрубочки і може впливати виключно на взаємодію з БАМ. Існують відмінності у амінокислотному оточенні рослинного і тваринного сайтів, що може впливати на специфічність впізнавання сайту і спектр асоційованих протеїнкіназ має відрізнятись (рис. 8.15).



Рис. 8.15. Порівняння сайту Ser151 α -тубуліну *A. thaliana* і відповідної ділянки α -тубуліну *H. sapiens*.

Для Ser151 відсутні будь-які дані, що підтверджують фосфорилування. Аналогічний стан справ стосовно фосфорилування Ser151 у ссавців (PhoSphositePlus - www.phosphosite.org). Додаткове сканування послідовностей тваринного і рослинного α -тубуліну за допомогою програми GPS 3.0 визначило значні відмінності тваринного і рослинного сайтів як за профілем специфічного фосфорилування, так і за оціночними функціями, що свідчить про можливість фосфорилування. Для тваринного α -тубуліну найкращій показник ймовірності фосфорилування Ser151 спостерігався у випадку профілю «Other/IKK/IKKe» і мав низькі показники ймовірності (Score=5,7; Cutoff=4,6), що засвідчило практичну неможливість фосфорилування зазначеного сайту. В той же час, для рослинного α -тубуліну показники ймовірності фосфорилування були значно вище (Score=10; Cutoff=5,3), а максимальний показник відмічався у тваринного профілю спільного CDPK/SnRK-специфічного фосфорилування - «CAMK/CAMKL/BRSK/BRSK2». Отримані дані підтримають попередні припущення стосовно можливості специфічного Ca^{2+} -залежного фосфорилування Ser151 рослинного α -тубуліну. Цей механізм регуляції тубулінового коду унікальний для вищих рослин і відсутній у тварин.

Аналіз топології Ser178 α -тубуліну підтвердив його розташування на зовнішній стороні мікротрубочки *A. thaliana* і відсутність перепон для здійснення фосфорилування (рис. 8.14). У випадку α -тубуліну ссавців цей амінокислотний залишок фосфорилується (дані маспектрометрії) і це впливає на GTP-зв'язуючий сайт і, як наслідок, змінює властивості контактної інтерфейсу плюс-кінця та

впливає на цілісність тубулінового гетеродимеру [596]. Для α -тубуліну тварин і рослин наразі не відомі протеїнкінази, здатні здійснювати специфічне фосфорилування Ser178. Не зважаючи на консервативність Ser178 і структурну подібність цих ділянок тваринного і рослинного α -тубуліну, їх амінокислотне оточення має досить помітні відмінності (рис. 8.16).

	Ser178
	▼
TBA6 ARATH:	GFTVYPSQVSTSVVEPYNS
	F++YP+PQVST+VVEPYNS
TBA1B HUMAN:	EFSIYPAPQVSTAVVEPYNS

Рис. 8.16. Порівняння сайту Ser178 α -тубуліну *A. thaliana* і відповідної ділянки α -тубуліну *H. sapiens*.

Вищезазначений факт дозволяє припустити, що, у випадку фосфорилування Ser178 у тварин і рослин, ми можемо мати справу з протеїнкіназами, які не проявляють вираженої подібності каталітичних доменів. Використаний в цьому дослідженні метод пошуку протеїнкіназ на підставі консервативності цільового сайту має певні переваги. Отримані дані дозволяють розглядати протеїнкіназу СРК21 як найбільш ймовірний фермент асоційований з модифікацією Ser178 рослинного α -тубуліну.

Таким чином, з п'яти сайтів рослинного α -тубуліну лише три - Ser151, Ser178 і Ser287, структурно доступні для фосфорилування і можуть розглядатись як частина тубулінового коду.

У випадку Ca^{2+} -залежного фосфорилування β -тубуліну *A. thaliana* було ідентифіковано лише один потенційний сайт (Ser283) СРК21-специфічного фосфорилування (рис. 8.14) [456]. Цей сайт існує лише у чотирьох ізотипів β -тубуліну *A. thaliana*. Порівняння послідовностей β -тубуліну *A. thaliana* і тварин, засвідчило відсутність подібного сайту у будь-якого з ізотипів β -тубуліну людини, миші або пацюка. Водночас, дані Modig et al. (1999) свідчать про існування Ser283 у деяких ізотипів β -тубуліну *Gadus morhua* (тріска атлантична

або північна) і участь цього залишку у формуванні латеральних інтерфейсів суміжних протофіламентів (контакт β/β) [391]. Blastp-пошук з заборонаю амінокислотних замін за фрагментами 'LTSRGSQQYR**S**LTVPELTQQM' з TBB2_ARATH і TBB3_ARATH та 'LTSRGSQQYI**S**LTVPELTQQM' з TBB1_ARATH і TBB5_ARATH визначив в UniProtKB понад 3000 ідентичних послідовностей у складі β -тубуліну різноманітного систематичного походження. У *A. thaliana* аналіз топології Ser283 β -тубуліну TBB2_ARATH (рис. 8.14) підтвердив дані Modig et al. [391]. Значна консервативність сайту підтверджує його фундаментальну роль в регуляції структури і динаміки мікротрубочок. Звертає на увагу факт, що у рослин, як і у представників інших царств, лише деякі з ізотипів β -тубуліну мають зазначений сайт. У *A. thaliana* він присутній лише у чотирьох (TBB1, TBB2, TBB3 і TBB5) з дев'яти ізотипів β -тубуліну. У всіх зазначених ізотипів програма GPS v.3.0 визначила вагомні показники вірогідності фосфорилування Ser283. При цьому, найкращий показник (Score: 18,092; Cutoff: 8,942) було визначено у випадку профілю Ca^{2+} -залежного фосфорилування: SAMK/SAMKL. Отримані дані вказують на можливість участі Ca^{2+} -залежного фосфорилування в регуляції латеральних контактів (α/α і β/β) протофіламентів мікротрубочки у рослин. Тубуліновий код, як фактор функціональної гетерогенності мікротрубочок, має дві складові: 1) фактор використання різних ізотипів тубуліну; 2) фактор посттрансляційних модифікацій [160, 247]. На нашу думку, для рослинного цитоскелету актуальний випадок модуляції тубулінового коду реалізується за рахунок кумулятивного впливу зворотного фосфорилування і використанням різних ізотипів тубуліну.

Водночас, привертає увагу близька топологія і функціональна роль Ser283 β -тубуліну і Ser287 α -тубуліну. Обидва залишки мають майже ідентичну топологію, відповідають близьким профілям СРК-залежного фосфорилування і виконують подібну функцію регуляції латеральної взаємодії тубулінових філаментів рослинної мікротрубочки. Зазначені залишки визначаються як

критичні для Ca^{2+} -залежної регуляції структури мікротрубочок, а протеїнкінази СРК (зокрема СРК20 і СРК21) - як найбільш вірогідні учасники цього механізму посттрансляційної регуляції.

Для γ -тубуліну *A. thaliana* було ідентифіковано лише один потенційний сайт СРК21-специфічного фосфорилування - Ser147 (рис. 8.14) [456]. Порівняння ділянок сайту у ізотипів γ -тубуліну *A. thaliana* і *H. sapiens* підтвердило консервативність цього залишку та подібність амінокислотного оточення (рис. 8.17).

```

                                Ser147
                                ▼
TBG1_HUMAN  LCHSIAGGTGSGLGSYLLERL
TBG2_HUMAN  LCHSIAGGTGSGLGSYLLERL
TBG1_ARATH  LCHSIAGGTGSGMGSYLLETL
TBG2_ARATH  LCHSIAGGTGSGMGSYLLETL
*****:*****

```

Рис. 8.17. Порівняння сайтів Ser147 γ -тубуліну *A. thaliana* і відповідних ділянок ізотипів γ -тубулінів *H. sapiens*.

Аналіз топології з використанням побудованої моделі визначив значне занурення Ser147 вглиб глобулярної частини γ -тубуліну (рис. 8.18). Дані маспектрометрії γ -тубуліну (TBG1 і TBG2) ссавців (людина, пацюк і миша) засвідчили відсутність підтвердження фосфорилування Ser147. За даними бібліотеки сайтів фосфорилування рослинних білків PhosPhAt (phosphat.uni-hohenheim.de) факт фосфорилування Ser147 γ -тубуліну *A. thaliana* також не підтверджено.

Зазначені факти спростували первинні дані стосовно можливого СРК21-специфічного фосфорилування γ -тубуліну. З іншого боку, структурні дані підтверджують первинні припущення стосовно внеску СРК-залежного фосфорилування як ключового фактору регуляції латеральної взаємодії протофіламентів рослинної мікротрубочки.

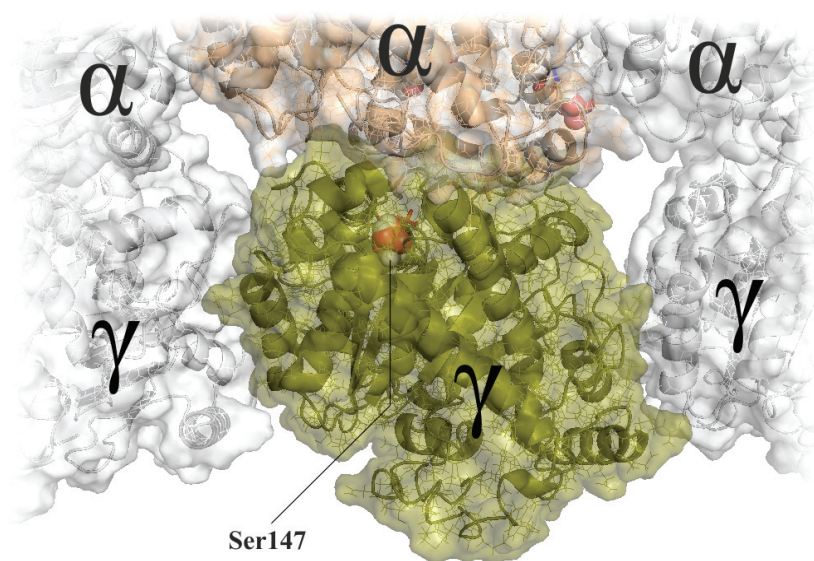


Рис. 8.18. Структурна топологія амінокислотного залишку Ser147 γ -тубуліну *Arabidopsis thaliana*. Ser147 має глибоке занурення у глобулярну частину молекули, що утворює стеричні перешкоди для фосфорилування.

8.3.3. Потенційний внесок GRIK2-залежного фосфорилування в тубуліновий код *A. thaliana*

Хіти GRIK2-залежного фосфорилування були знайдені у ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana*. Проте, лише сайт Ser278/279 β -тубуліну проявляв консервативність і визначався у всіх ізотипів β -тубуліну. Ідентичний залишок було визначено у ізотипів β -тубуліну ссавців (людина, пацюк і миша). Аналіз даних маспектрометрії з PhoSphositePlus (www.phosphosite.org) підтвердив існування численних доказів фосфорилування зазначеного залишку [386, 429, 550]. Водночас, відсутня інформація стосовно функціональної ролі зазначеної модифікації для структури і динаміки тубулінового цитоскелету. Аналіз топології Ser278 визначив, що фосфорилування в цьому положенні швидше впливає на властивості латеральних інтерфейсів β/β -контактів сусідніх філаментів мікротрубочки (рис. 8.19).

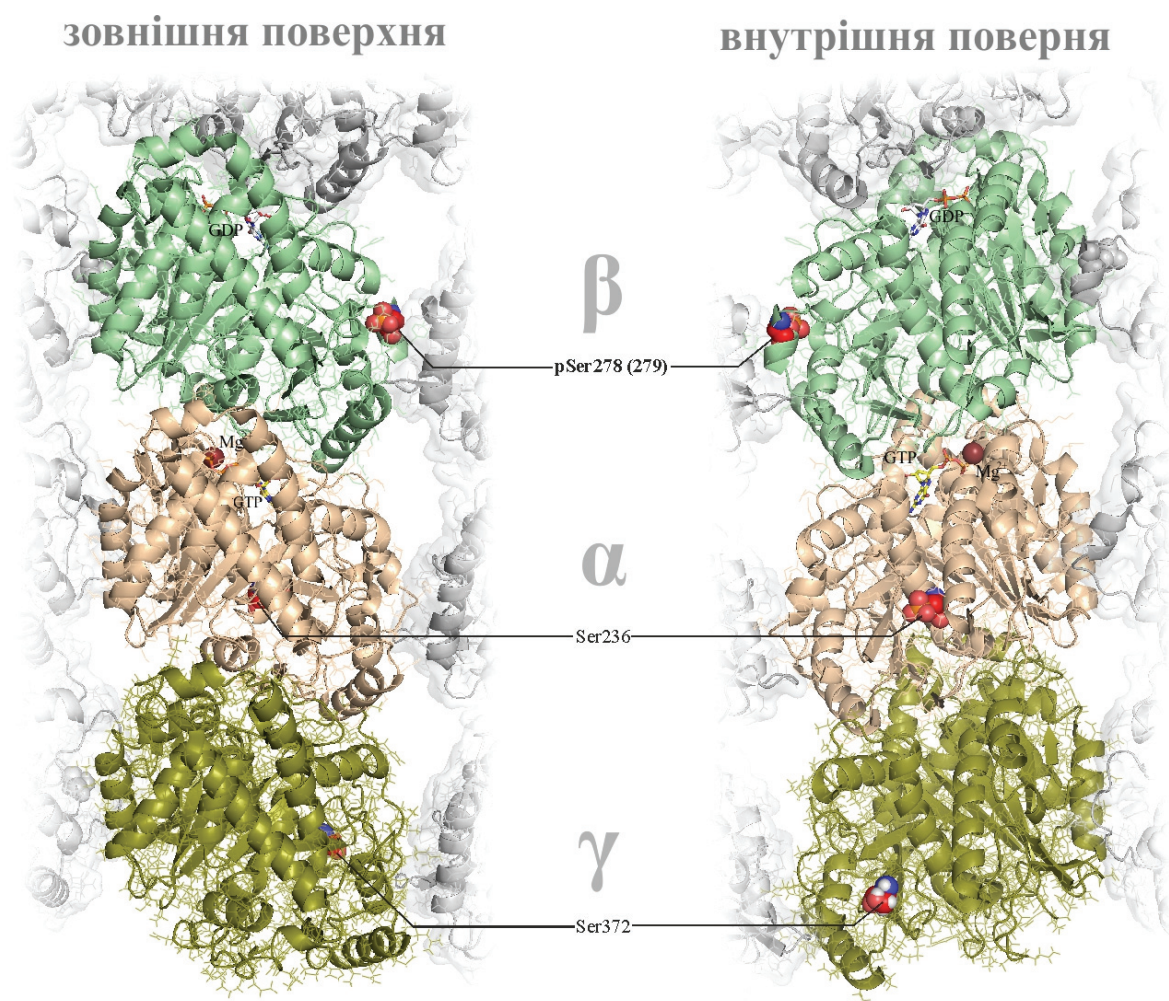


Рис. 8.19. Топологія потенційних сайтів GRIK2 (At5g60550) - специфічного фосфорилування тубуліну *Arabidopsis thaliana*. Результати профільного пошуку визначили відповідні сайти у складі різних ізотипів α -, β - і γ -тубуліну.

Ser278/279 β -тубуліну має наближене положення до сайту зв'язування таксолу, що може впливати на зв'язування таксанів. Це демонструють результати структурного вирівнювання рослинного β -тубуліну з *A. thaliana* і експериментальної PDB-структури β -тубуліну людини в комплексі з таксолем (PDB: 6QUS, позначено червоним кольором). (рис. 8.20.), і результати експериментів на клітинних культурах ссавців [517]

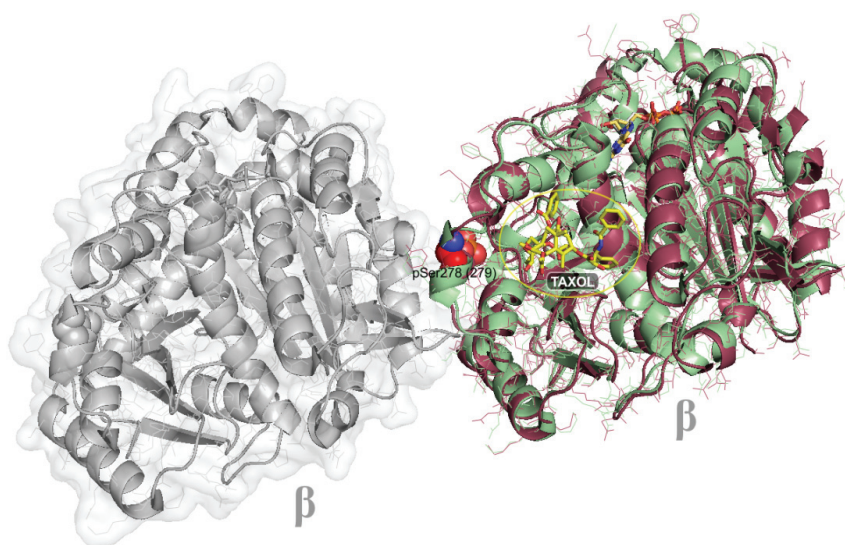


Рис. 8.20. Положення сайту pSer278/279 GRIK2-специфічного фосфорилування β -тубуліну *A. thaliana* (позначено зеленим кольором) відносно сайту зв'язування таксолу PDB-структури 6QUS *H. sapiens* (позначено червоним кольором).

Не має сумніву, що Ca^{2+} -залежне фосфорилування Ser278 є частиною тубулінового коду, а топологія і консервативність зазначеного сайту вказують на фундаментальну роль даної модифікації. Осмислення впливу зворотного фосфорилування Ser278 β -тубуліну на структуру мікротрубочки ще належить зробити. Зараз можливо лише припустити, що фосфорилування Ser278 викликає послаблення взаємодії протофіламентів, що, у свою чергу, впливає на процес розбирання мікротрубочок. Цей механізм, ймовірно, консервативний у ссавців і вищих рослин.

Потенційний сайт GRIK2-специфічного фосфорилування α -тубуліну Ser236 демонструє консервативність у рослин і ссавців. Проте, у разі Ser236 дані маспектрометрії з ресурсу PhosphoSitePlus (www.phosphosite.org) не підтверджують факт фосфорилування. Цікаво, що Ser236 типологічно близький до сайту Ca^{2+} -залежного фосфорилування Ser237 α -тубуліну ссавців, для якого існують експериментальні докази фосфорилування (www.phosphosite.org). Слід зауважити, що Ser236 консервативний у всіх ізотипів рослинного α -тубуліну,

проте амінокислотне оточення у різних ізотипів має незначні відмінності, а відповідність профілю Ca^{2+} -залежного фосфорилування спостерігається лише у випадку ізотипу TBA1 (TBA1_ARATH, P11139). Таким чином, внесок GRIK2-специфічного фосфорилування в спеціалізацію рослинного α -тубуліну здається сумнівним. Хоча повністю відкидати можливість фосфорилування цього залишку наразі не можна.

Останнім потенційним сайтом GRIK2-специфічного фосфорилування тубуліну у *A. thaliana* було визначено Ser372 γ -тубуліну iso. 2 (TBG2_ARATH, P38558). Найбільш близьким з позиції топології у γ -тубуліну людини (TBG1_HUMAN, P23258 і TBG2_HUMAN, Q9NRH3) було визначено Ser369. Проте, дані PhosphoSitePlus (www.phosphosite.org) факт фосфорилування не підтверджують.

Таким чином, з трьох потенційних сайтів GRIK2-специфічного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana*, визначених на підставі профільного пошуку, лише для pSer278/279 β -тубуліну існують достатні підтвердження первинного прогнозу Ca^{2+} -залежного фосфорилування.

Підсумовуючи результати профільного пошуку і структурної топології виявлених сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування було підтверджено, що СРК- (СРК20 і СРК21) і GRIK2-залежне фосфорилування причетне до регуляції структури і функціональної спеціалізації мікротрубочок вищих рослин (рис. 8.20). Ca^{2+} -залежне фосфорилування задіяне в регуляції латеральних контактів « α/α » і « β/β » суміжних протофіламентів мікротрубочок (рис. 8.20). СРК-залежне фосфорилування Ser287 і Thr337, СРК/GRIK2-залежне фосфорилування Ser283 і Ser278 (279) впливає на процес розходження протофіламентів мікротрубочок на етапі «катастрофи». З огляду, що чинники «порятунку» (збірки) і «катастрофи» (розібрання) детермінують динамічну нестабільність мікротрубочок [91], можна припустити, що цей механізм є однією з безпосередніх ланок впливу іонів Ca^{2+} і відповіді тубулінового цитоскелету [283].

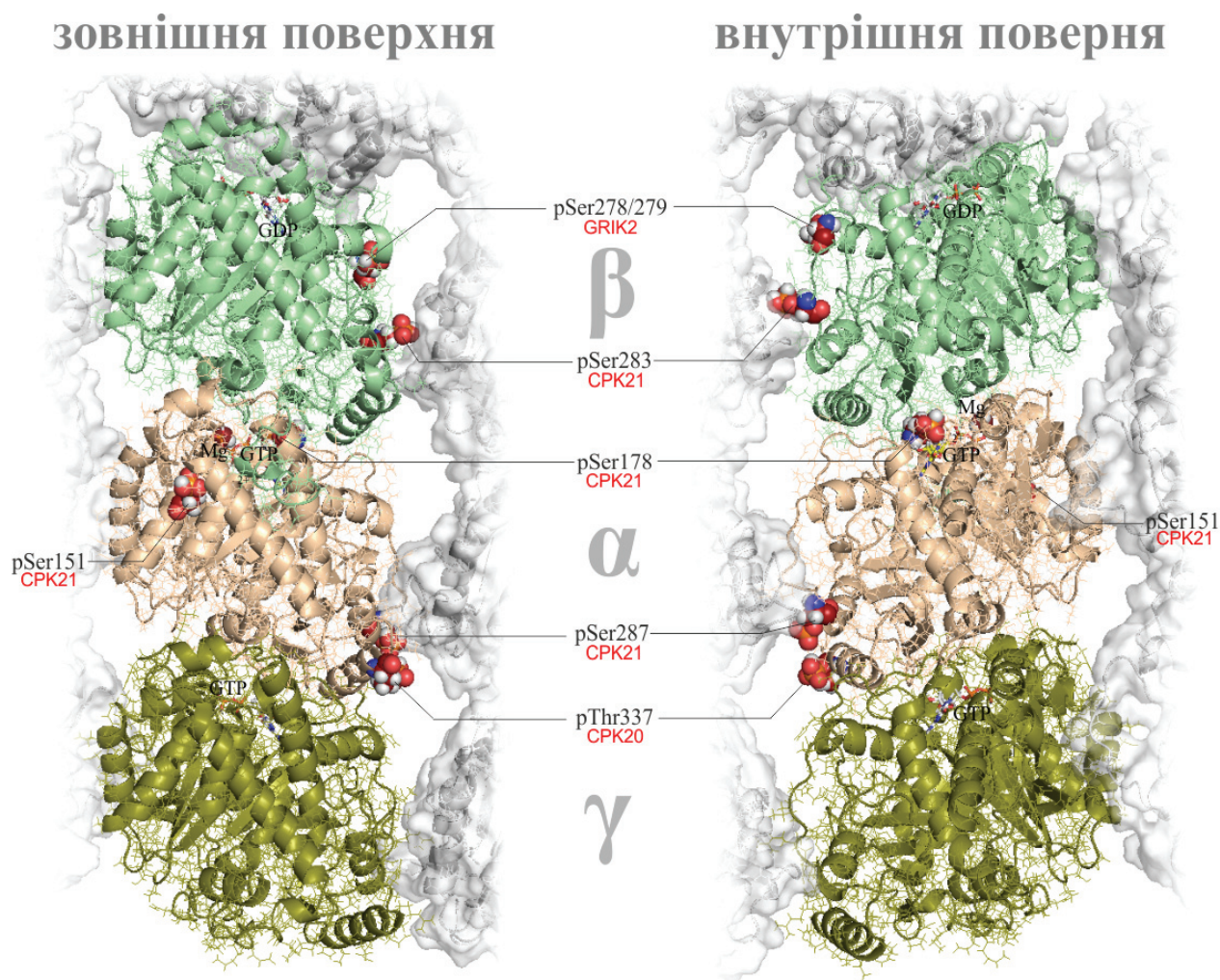


Рис. 8.21. Внесок Ca^{2+} -залежного фосфорилування в регуляцію тубулінового коду *A. thaliana*: сайти фосфорилування і їх асоціація з відповідними протеїнкіназами (CPK20, CPK21 і GRIK2).

Відповідно до зовнішньої локалізації, фосфорилування Ser151 рослинного α -тубуліну не впливає на структуру мікротрубочки, проте, скоріш за все, є важливим для взаємодії з асоційованими білками. Незважаючи на консервативність Ser151 α -тубуліну вищих рослин і ссавців, дані маспектрометрії спростовують його фосфорилування, а різноманітні методи профільного аналізу свідчать про можливість Ca^{2+} -залежного фосфорилування зазначеного залишку, що підтверджується відповідністю профілю сайту тваринних протеїнкіназ CDPK/SnRK (профіль - «CAMK/CAMKL/BR SK/BR SK2»), результатами спільної

кластеризації потенційних і експериментально підтверджених сайтів. Ser151 рослинного α -тубуліну було визначено як сайт СРК (СРК21)-залежного фосфорилування. Тобто, у цьому випадку ми маємо механізм регуляції тубулінового коду унікальний для вищих рослин і відсутній у тварин.

Крім того, сайт Ser178 має високі показники відповідності профілям сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування як у тваринного, так і у рослинного α -тубуліну. У тваринного α -тубуліну існують численні експериментальні підтвердження факту фосфорилування Ser178 (PhoSphositePlus - www.phosphosite.org). На прикладі тваринного α -тубуліну Wloga et al. (2017) довели, що фосфорилування в цьому положенні впливає на GTP-зв'язуючий сайт молекули, що, у свою чергу, змінює властивості контактної інтерфейсу плюс-кінця, викликає деградацію тубулінового гетеродимеру на дискретний α - і β -тубулін. [596] Отримані дані підтверджують ідентичність положень Ser178 α -тубуліну ссавців і рослин, а значні відмінності у амінокислотному оточенні вказують, що асоційовані з зазначеною модифікацією протеїнкінази мають значні відмінності каталітичних доменів. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що у рослинного α -тубуліну найімовірніші кандидати на здійснення зазначеної модифікації - протеїнкінази СРК, а фосфорилування Ser178 пов'язано з активністю протеїнкінази СРК21.

Таким чином, протеїнкінази СРК20, СРК21 і GRIK2 найбільш імовірні агенти Ca^{2+} -залежної регуляції тубулінового коду вищих рослин. Проте їх участь у фосфорилуванні γ -тубуліну не підтверджена.

8.4. Структурна топологія сайтів CDPK/CRK-специфічного фосфорилування залишків тирозину β -тубуліну *A. thaliana*

Nemoto et al. (2015) довели здатність протеїнкіназ CDPK/CRK (CDPK-related kinases) фосфорилувати окремі ізотипи β -тубуліну *A. thaliana* за залишками тирозину [407]. Експериментально встановлено, що зазначене фосфорилування відбувається у С-кінцевій ділянці і притаманне лише трьом ізотипам β -тубуліну:

ідентичним TBB2 (Q56YW9/At5g62690) і TBB3 (Q9ASR0 /At5g62700) за залишками pTyr444 і pTyr450 та TBB7 (P29515/At2g29550) за залишками pTyr443 і pTyr449 [407]. У інших ізотипів β -тубуліну зазначене фосфорилування не відбувалось. Автори встановили, що всі 8 протеїнкіназ CDPK/CRK *A. thaliana* здатні здійснювати Tyr-специфічне автофосфорилування, але у зазначених модифікацій β -тубуліну як зовнішнього субстрату, ключова роль належить CRK2 (CAMK2 / Q9LJL9, At3g19100), CRK3 (CAMK3 / Q9ZUZ2, At2g46700) і CRK8 (CAMK8 / Q9FX86, At1g49580) з домінуванням двох перших ізотипів [407].

Як засвідчили результати множинного вирівнювання С-кінцевих ділянок існуючих ізотипів β -тубуліну *A. thaliana*, TBB2, TBB3 і TBB7 помітно відрізняються і під час кластеризації утворюють окрему кладу (рис. 8.21 і 8.22). Існують значні відмінності у амінокислотному оточенні цільових залишків тирозину, які близькі за положенням до сайту pTyr443/444. Це пояснює відсутність CDPK/CRK-специфічного фосфорилування залишків тирозину у цих положеннях ізотипів TBB1, TBB4 і TBB5.

Функціональне значення вищезазначених модифікацій наразі не відомо, проте фосфорилування близького за топологією Ser444, як і наступного Ser446, у β (type III)-тубуліну *Sus scrofa* не впливає на збирання або цілісність мікротрубочки [454, 166, 367, 498]. Автори висловили припущення, що ця модифікація важлива для формування інтерфейсів взаємодії з БАМ [454, 367].

Приймаючи до уваги аналогію структурної топології Tyr444 (Tyr443) та факт, що інші залишки (Tyr450 і Tyr449) є термінальними амінокислотами С-кінця TBB2, TBB3 і TBB7, їх вплив на структуру гетеродимеру тубуліну, як і на збирання мікротрубочки неможливий. Найімовірнішим функціональним призначенням зазначених модифікацій рослинного β -тубуліну є формування унікальних інтерфейсів взаємодії з БАМ.

A.

```

TBB1_ARATH: 421-SEYQQYQDATAD-EEDEYDEEEEEQVYES-----447
TBB2_ARATH: 420-SEYQQYQDATAD-EEGDYEDEEEEEGEYQQEEEY-450
TBB3_ARATH: 420-SEYQQYQDATAD-EEGDYEDEEEEEGEYQQEEEY-450
TBB4_ARATH: 420-AEYQQYQDATAG-EE-EYEEEEE-EY---ET--444
TBB5_ARATH: 421-AEYQQYQDATAD-EEGEYDVEEEEEEGD-YET--449
TBB6_ARATH: 420-SEYQQYQDATADE-GEYEEDEDEEEEILDHE--449
TBB7_ARATH: 420-SEYQQYQDATAD-EEGEYEEEEEA-EYEQEETY-449
TBB8_ARATH: 420-SEYQQYQDATAD-EEEGYEYEED-EVEVQEEQ-449
TBB9_ARATH: 420-AEYQQYQDATVG-EE-EYEEDEEEEEA-----444
    
```

B.

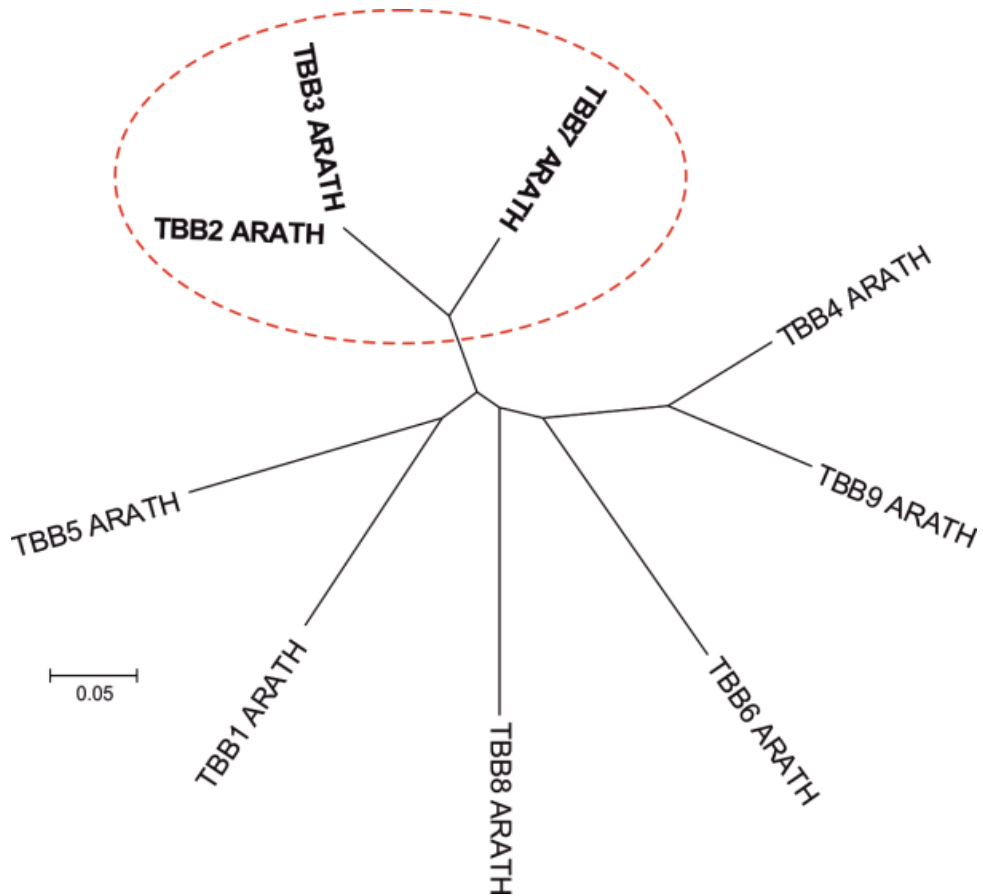


Рис. 8.21. Порівняння С-кінцевих фрагментів основних ізотипів β -тубуліну *A. thaliana*. **A.** Вирівнювання амінокислотних фрагментів (підтверджена подібність цільових сайтів фосфорилування (▼, позначено червоним кольором) для ізотипів TBB2, TBB3 і TBB7); **B.** Результат кластеризації за методом зв'язування найближчих сусідів: зазначені ізоטיפи формують окрему кладу, що підтверджує їх унікальність.

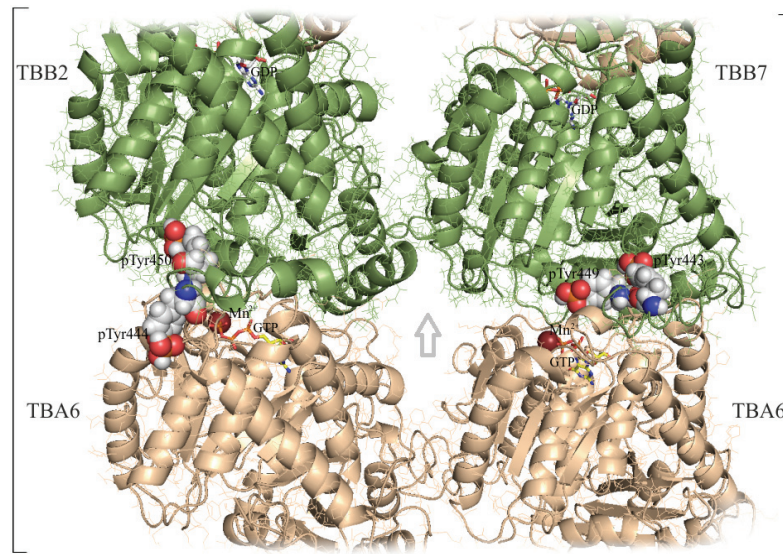


Рис. 8.22. Фрагмент структурної моделі CDPK/CRK-фосфорильованої мікротрубочки *A. thaliana*, що охоплює два гетеродимери $\alpha\beta$ -тубуліну, побудовано з використанням ізо типу TBA6 α -тубуліну і ізо типів TBB2 і TBB7 β -тубуліну. Реконструкція моделі виконана із використанням шаблонної ЕМ-структури 3j6f (RCSB Protein Data Bank), отриманої з *Sus scrofa* [7]. Кульові моделі означають CDPK/CRK-специфічно фосфорильовані залишки тирозину (pTyr443/444 і pTyr449/450) рослинного β -тубуліну. Топологія зазначених сайтів підтверджує відсутність їх впливу на внутрішню контактну поверхню гетеродимеру рослинного $\alpha\beta$ -тубуліну.

8.5. Внесок SNF1-залежного фосфорильовання в регуляцію рослинного цитоскелету

Тваринні протеїнкінази підродини SNF1 причетні до регуляції цитоскелету і клітинного поділу [360, 362, 401, 614, 93, 8, 139]. Тваринні BRSK1 (SAD1) і 2 (SAD2) причетні до позитивної регуляції подвоєння centrosом через фосфорильовання γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) за залишком Ser131 [401, 93, 8].

8.5.1. Положення рослинних Snf1-кіназ в кіномі *A. thaliana*

Тваринні протеїнкінази Snf1/AMPK утворюють окрему надродину, яка тісно пов'язана з групою Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ CDPK [201]. Для уточнення

положення Snf1-подібних протеїнкіназ у рослин було виконано NJ-кластеризацію каталітичних доменів тотального кіному *A. thaliana* (рис. 8.23).

Аналогічно тваринним Snf1/AMPK [201], рослинні SnRK1 (SNF1-related protein kinases 1, 3 протеїнкінази) і SnRK2 (SNF1-related protein kinases 2, 11 протеїнкіназ) виявляють найбільшу подібність до групи Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ родини CDPK (26 протеїнкіназ), з якими утворюють спільну кладу. Найменшу дистанцію відносно класу протеїнкіназ CDPK має група SnRK1 (SnRK1 α), яка включає протеїнкінази KIN10 (SnRK1.1, At3g01090, UniProtKB: Q38997), KIN11 (SnRK1.2, At3g29160, UniProtKB: P92958) і AKin11 (SNRK1.3, At5g39440, UniProtKB: Q9FLZ3).[276, 278, 634]

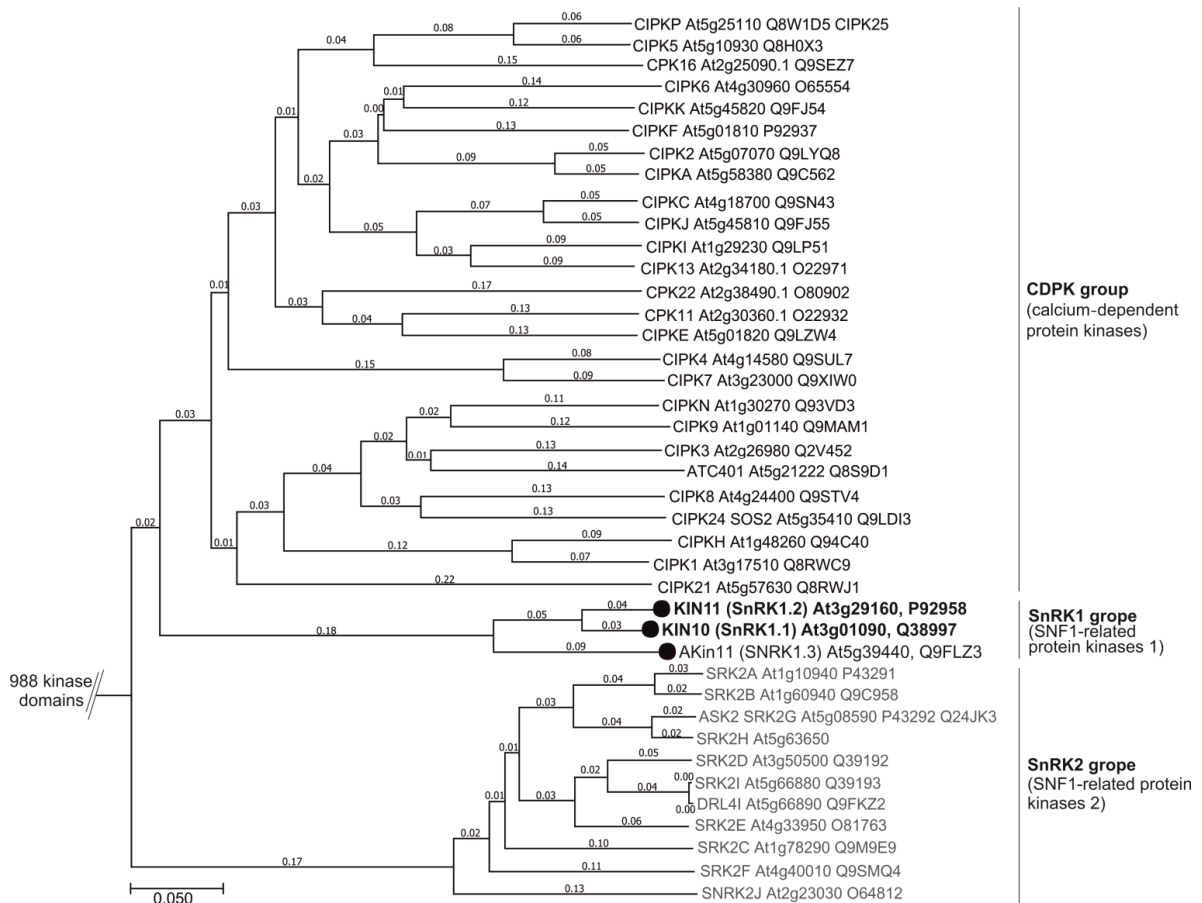


Рис. 8.23. Спільна класа протеїнкіназ CDPK/SnRK1/SnRK2, визначена за результатами кластеризації каталітичних доменів повного кіному *A. thaliana*.

8.5.2. Пошук рослинних гомологів тваринної протеїнкінази BRSK1

Тваринна протеїнкіназа BRSK1 є експериментально підтвердженим агентом SNF1-залежного фосфорилування тубуліну [8], тому логічне використання її послідовності для BLASTp-сканування повного протеому *A. thaliana*. За результатами сканування UniProtKB із використанням повної послідовності та послідовності каталітичного домену BRSK1 (Q8TDC3) людини було відібрано 10 найближчих рослинних гомологів з *A. thaliana* (Blast-Score \geq 250): At1g30270, At3g01090, At3g29160, At5g45820, At4g24400, At5g25110, At5g01810, At2g26980, At5g21326 і At5g39440. Найбільшу подібність послідовності каталітичного домену виявлено у рослинної KIN10, відомої як SnRK1.1 (At3g01090, UniProtKB - Q38997: Iso.1 - Q38997-1 и Iso.2 - Q38997-2). Ідентичність послідовностей каталітичних доменів BRSK1 *H. sapiens* і KIN10 *A. thaliana* склала 51 %, при 73% подібності і відсутності гепів вирівнювання (0 %). Для повних послідовностей показник ідентичності був 45 %, подібність дорівнювала 66 %, а відсоток гепів не перевищував 3 %.

Повторна кластеризація каталітичних доменів BRSK1 (Q8TDC3, BRSK1_HUMAN) і повного кіному *A. thaliana* (1022 каталітичних доменів) підтвердила існування спільної класи, яка об'єднує контрольну послідовність і рослинні SnRK1: KIN10 (At3g01090), KIN11 (At3g29160) и AKin11/SNRK1.3 (AT5G39440) (рис. 8.4). Філогенетичні дистанції і подібність доменної архітектури (рис. 8.25) підтверджують KIN10 (Q38997, KIN10_ARATH: AK21, SKIN10, SNR2, SNRK1.1) як найближчого гомолога BRSK1 *H. sapiens*.

Аналіз доменної архітектури дозволяє зробити висновок, що дві з трьох існуючих ізоформ KIN10 (Q38993-1 / 2), окрім каталітичного домену (S_TKc), містять убіквітин-асоційований домен UBA (*Ubiquitin associated domain*), присутній і у двох ізоформ протеїнкінази BRSK1 (Q8TDC3-1 і Q8TDC3-2). Відомо, що домен UBA виконує функції інгібування, активації або стабілізації

каталітичного домену, що детермінується станом фосфорилування або взаємодією з кофактором [381, 405].

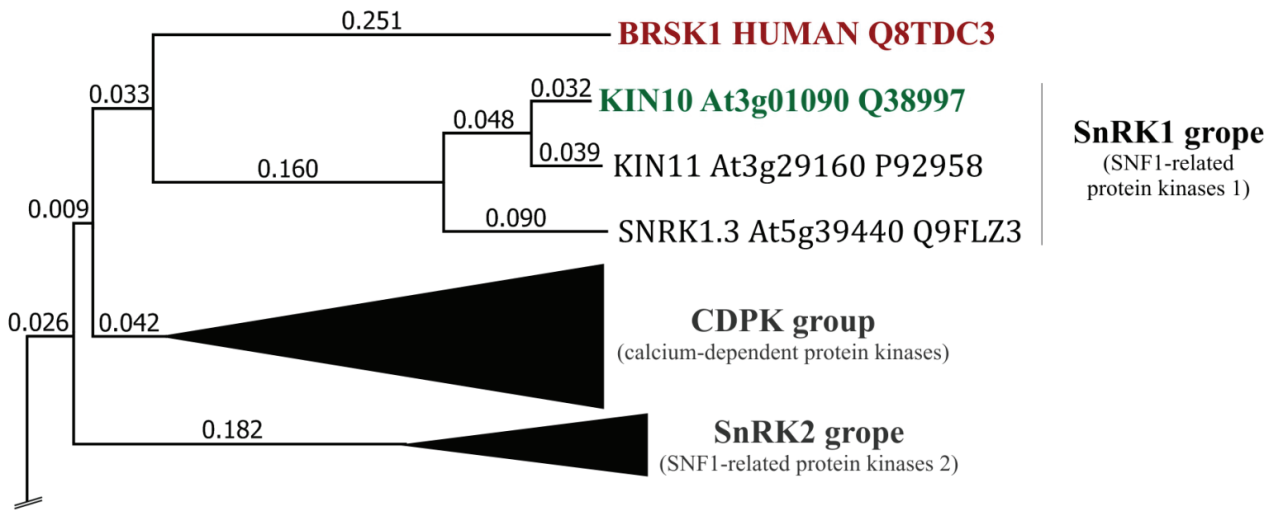


Рис. 8.24. Спільна NJ-кластеризація каталітичних доменів протеїнкінази BRSK1 *H. sapiens* (Iso. I, Q8TDC3-1) і повного кіному *A. thaliana* - 1022 послідовностей (Фрагмент філогенетичного дерева).

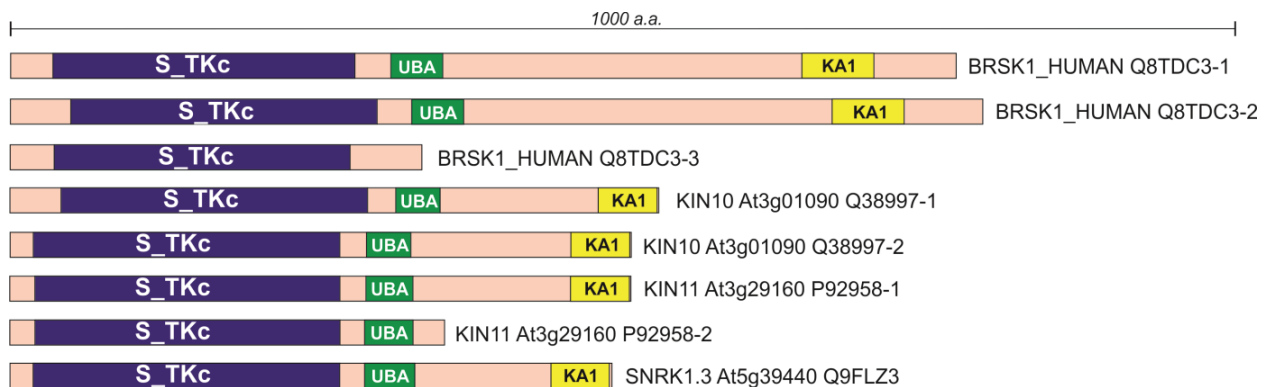


Рис. 8.25. Порівняння доменної архітектури трьох ізоформ протеїнкінази BRSK1 *H. sapiens* і найближчих гомологів з *A. thaliana* за результатами комплексного аналізу із використанням інструментів SMART (HAMMER2, HAMMER3), Pfam і PROSITE.

S_TKc - каталітичний домен серин / треонінових протеїнкіназ, (SM000220, HAMMER2), UBA - убіквітин асоційований домен (SM000165, HAMMER2 / PROSITE), KA1 - С-кінцева ділянка регуляції активності кіназного домену 1 (PF02149, HAMMER3 - Pfam, InterPro - IPR001772).

Така ідентичність вказує на подібність регуляторного механізму тваринної BRSK1 (Iso.1 і Iso.2) *H. sapiens* і двох ізоформ рослинної протеїнкінази KIN10 (Q38997-1 і Q38997-2) *A. thaliana*. Протеїнкінази, які містять UBA домен, причетні до регуляції процесів пов'язаних з системою мікротрубочок, а зазначений домен є специфічною рисою протеїнкіназ, асоційованих з центрами їх первинної нуклеації [405].

Водночас, ізоформа BRSK1-3 у ссавців не містить домену UBA, що вказує на її функціональну відмінність від рослинної KIN10. Рослинні KIN10 і KIN11, як ізоформи 1 і 2 (Iso.1 і Iso.2) BRSK1 людини, мають С-кінцеву ділянку, яка відповідає за авторегуляцію кіназного домену - KA1 (C-terminal kinase associated domain 1). Домен KA1 є консервативною рисою протеїнкіназ регуляції цитоскелету (MARK 1, 2, 3) і поділу клітин (MELK) [538]. Активна конформація домену KA1 утворює ввігнуту гідрофобну поверхню, яку оточує група позитивно заряджених амінокислот [405, 140]. Саме ця контактна поверхня домену KA1 формує інтерфейс взаємодії з негативно зарядженими ділянками білків цитоскелету і визначає субклітинну локалізацію ферменту [405]. Наявність домену KA1 і загальна подібність доменної архітектури ще раз засвідчують зв'язок рослинних SnRK1 α з регуляцією цитоскелету.

Структурне вирівнювання оптимізованих 3D-моделей BRSK1 і KIN10 було використано як вирішальний аргумент підтвердження гомології каталітичних доменів BRSK1 *H. sapiens* і KIN10 з *A. thaliana* (RMSD = 0,173) і їх відбір як основних об'єктів подальшого дослідження (рис. 8.26).

Структурна консервативність тубуліну, гомологія тваринної BRSK1 і рослинних SnRK1 α допускали можливість існування консервативних сайтів SNF1-специфічного фосфорилування тубуліну. За допомогою канонічного НММ-профілю сайту BRSK1-специфічного фосфорилування було виконано сканування всіх ізотипів α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana* і визначено консенсусну ділянку лише Ser131 γ -тубуліну -TUBG1 (P38557) і TUBG2 (P38558) (рис. 8.27).

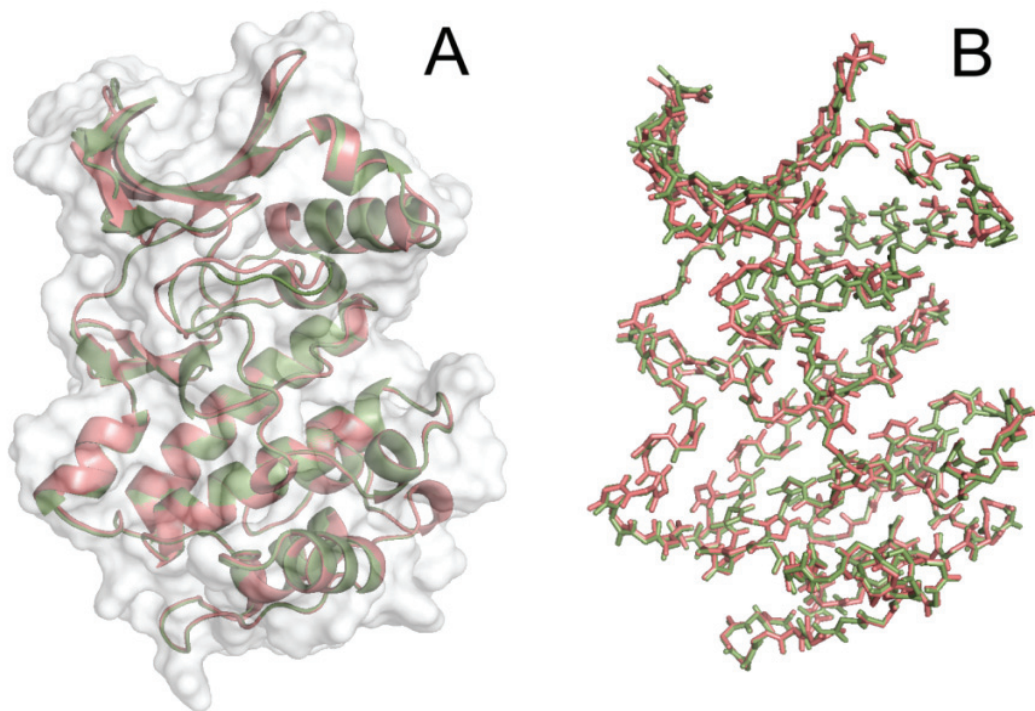


Рис. 8.26. Структурне вирівнювання каталітичних доменів BRSK1 *H. sapiens* (позначено рожевим кольором) і KIN10 з *A. thaliana* (позначено зеленим кольором):

A. - репрезентація у вигляді стрічкових діаграм;

B. - вирівнювання головних ланцюгів. (RMS = 0,173)

Експериментально підтверджено, що BRSK 1 і 2 фосфорилують Ser385 і Ser131 γ -тубуліну, зумовлюючи його ядерну рекрутизацію під час переходу до S-фази клітинного циклу [139]. Фосфорилування Ser385 індукує конформаційні зміни γ -тубуліну, що зумовлює його накопичення в компартменті ядра, але ініціація реплікації центросом і перехід до S-фази вимагає одночасного фосфорилування Ser131 і Ser385 γ -тубуліну [139, 8]. Наші дослідження довели відсутність у рослин сайту, еквівалентного Ser385. Таким чином, у *A. thaliana*

взаємодія BRSK-подібних протеїнкіназ і тубулінового цитоскелету можлива лише через фосфорилування Ser131.

				Kin10
TBA1	ARATH	P11139	121	-RLRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA2	ARATH	B9DGT7	121	-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA3	ARATH	Q56WH1	121	-RVRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA4	ARATH	Q0WV25	121	-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA5	ARATH	B9DHQ0	121	-RVRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBA6	ARATH	P29511	121	-RIRKLADNCTGLQGFLVFNAV-142
TBB1	ARATH	P12411	120	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-141
TBB2	ARATH	Q56YW9	119	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB3	ARATH	Q9ASR0	119	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB4	ARATH	P24636	119	-VVRKEAENSDCLOGFOVCHSL-140
TBB5	ARATH	P29513	120	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-141
TBB6	ARATH	P29514	119	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB7	ARATH	P29515	119	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB8	ARATH	P29516	119	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBB9	ARATH	P29517	119	-VVRKEAENCDCLOGFQVCHSL-140
TBG1	ARATH	P38557	121	-MIDREADGSDSLEGFVLCHSI-142
TBG2	ARATH	P38558	121	-MIDREADGSDSLEGFVLCHSI-142
				: : * : : : * : * * : : :

Рис. 8.27. Фрагмент вирівнювання всіх ізотипів тубуліну *A. thaliana*, що відповідає сайту фосфорилування (Xp±10) за залишком Ser131 (TUBG1 і TUBG2). Відповідні фрагменти молекул α - і β -тубуліну ідентифіковані за результатами вирівнювання послідовностей і моделей відповідних 3D-структур.

Для визначення топології Ser131 γ -тубуліну була використана модель комплексу γ TuSC (TUBG1 / TUBG2 / GACP2 / GACP3) *A. thaliana*. Ser131 виявився доступним для фосфорилування у обох ізотипів γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) (рис. 8.27). Згідно топології, фосфорилування Ser131 має впливати на інтерфейс взаємодії γ -тубулін/ γ -тубулін, що має впливати на структуру рослинних комплексів γ TuSC і γ TuRC. За нашою гіпотезою у рослин SnRK1-залежне фосфорилування може бути причетне до регуляції структури і функціонування центрів первинної нуклеації мікротрубочок. Згідно топології, фосфорилування Ser131 також здатне впливати на інтерфейс взаємодії TUBG1(2) / GACP2(3). Blast-пошук в UniProtKB за фрагментом - MIDREADGSDSLEGFVLCHSI (SIB BLAST, "Viridiplantae") підтвердив консервативність Ser131 рослинного γ -тубуліну та відповідного амінокислотного оточення. Ідентичні фрагменти знайшли у 236 депонуваннях UniProtKB і всі вони належали рослинному γ -тубуліну.

Враховуючи безсумнівну гомологію рослинної протеїнкінази KIN10 і тваринної BRSK1, можемо стверджувати, що зазначена протеїнкіназа має грати ключову роль в регуляції структури і функції центрів первинної нуклеації мікротрубочок вищих рослин. Водночас, подібність KIN10 (SnRK1.1) і KIN11 (SnRK1.2) дозволяє передбачити певну схожість цільових субстратів обох рослинних SnRK1 α .

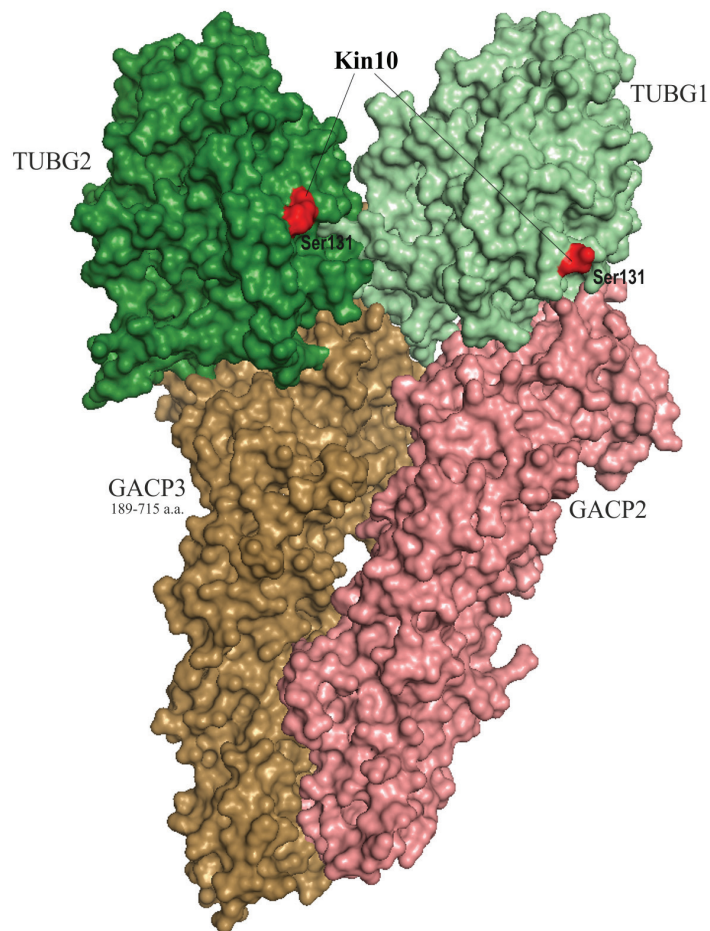


Рис. 8.27. Структурна модель комплексу γ TuSC з *A. thaliana*. Червоним кольором позначено розташування амінокислотного залишку pSer131 на поверхні γ -тубуліну (TUBG1 і TUBG2) - найбільш ймовірного сайту SNF1-специфічного фосфорилування молекули рослинного γ -тубуліну.

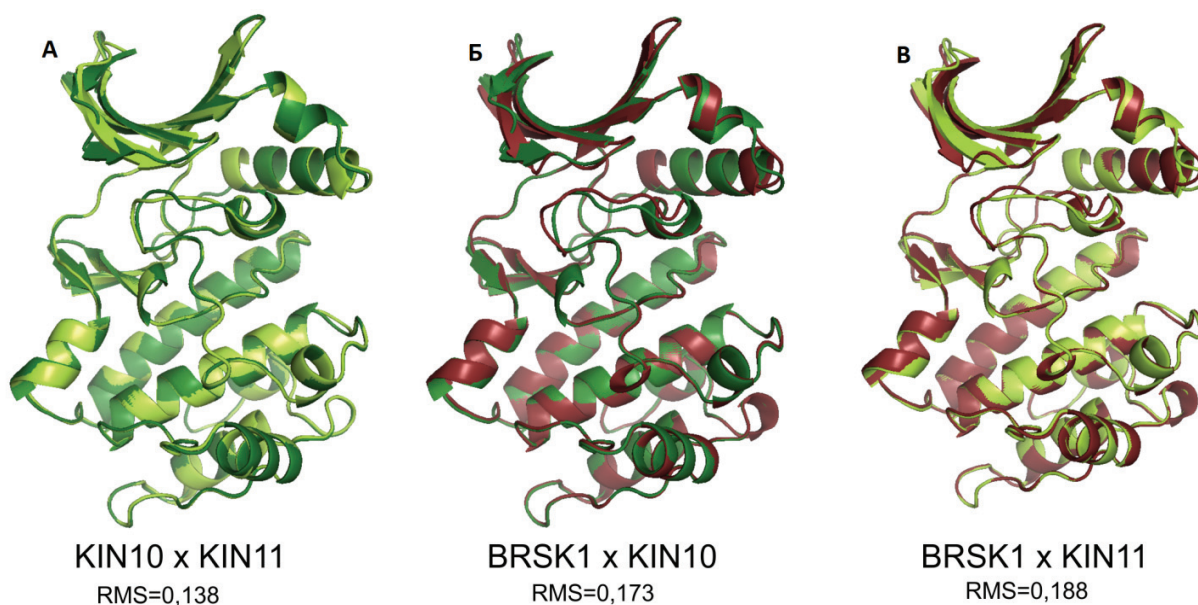


Рис. 8.29. Структурне вирівнювання каталітичних доменів протеїнкіназ КІН10 і КІН11 *A. thaliana* (А) та їх порівняння з каталітичним доменом протеїнкінази ВРСК1 *H. sapiens*: ВРСК1 / КІН10 (Б) і ВРСК1 / КІН11 (В)

8.5.3. Створення генетичних конструкцій *KIN10-His* і *KIN11-His* для імунологічного дослідження локалізації рослинних протеїнкіназ *SnRK1α*

Результати біоінформатичного порівняння засвідчили, що КІН10 і КІН11 є найближчими гомологами протеїнкінази ВРСК1 *H. sapiens* (рис. 8.24, 8.25, 8.26, 8.29). Це дозволило зробити припущення, що обидві рослинні протеїнкінази *SnRK1α* функціонально подібні ВРСК-кіназам ссавців [604] і є потенційними агентами тубулінового коду вищих рослин [278].

Для підтвердження або спростування зв'язку КІН10 та КІН11 з регуляцією рослинного цитоскелету створили на основі відповідних бінарних векторів генетичні конструкції, які містили у своїй послідовності полігістидиновий тег (His-tag - тандем з шести залишків гістидину): pGWB8-*KIN10:His* та pGWB8-*KIN11:His* (рис. 8.30.). Отримані конструкти було трансформовано в клітини штаму *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (*Agrobacterium* Electrocompetent Cells). Отриманий штам *A. tumefaciens* був придатний для трансдукції pGWB8-*KIN10:His*

та pGWB8-*KIN11:His* у цільовий генوم *A. thaliana*. Таким чином отримали експериментальну систему, що дозволяла візуально досліджувати локалізацію KIN10 і KIN11 відносно тубулінового цитоскелету на підставі гібридизації з His-специфічними антитілами [635].

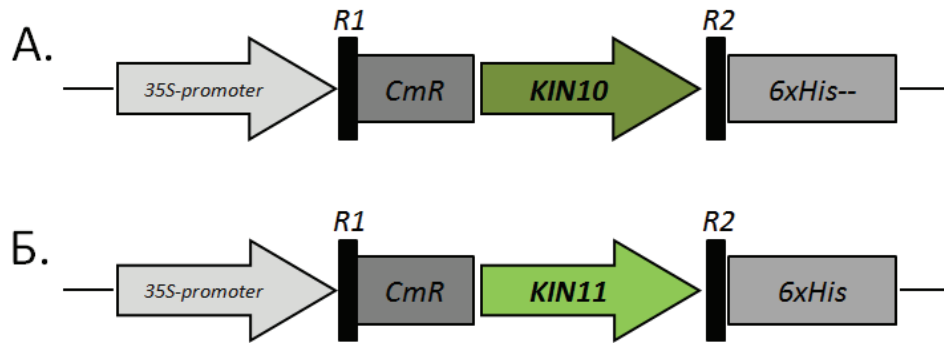


Рис. 8.30. Схематична будова His-тег конструктів pGWB8-*KIN10:His* (А) та pGWB8-*KIN11:His* (Б), створених для агробактеріальної генетичної трансформації клітин *A. thaliana* з метою імунологічного визначення локалізації їх продуктів відносно тубулінового цитоскелету.

8.5.4. Органоспецифічна експресія *KIN10* на прикладі *A. thaliana*

Протеїнкіназа KIN10 (SnRK1.1/SnRK α 1) необхідна для підтримки нормального росту, розвитку і життєдіяльності рослинної клітини, а її експресія спостерігається на всіх стадіях клітинного циклу [518]. Експресія *KIN10* (At3g01090.2) була підтверджена в усіх досліджених тканинах кореня, стебла, листка і квітки *A. thaliana*. Найвищий рівень експресії зареєстрували в клітинах листка (рис. 8.31). Експериментальні докази високої експресії KIN10 в листках *A. thaliana* отримані вперше і цілком узгоджуються з попереднім прогнозом ресурсу Tair (www.arabidopsis.org - locus:2102132 / At3g01090.2) [300]. Мінімальна експресія *KIN10* (в сім разів нижча порівняно з експресією у листку) спостерігалась в клітинах кореня. Разом з тим, експресія *KIN10* у стеблі майже

удвічі, а в квітках – вп'ятеро перевищувала кореневу (рис. 8.31), що, згідно даним ресурсу Tair (www.arabidopsis.org - locus:2102132 / At3g01090.2), підтверджує попередні дані [300].

Одним із головних компартментів клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 в листках *A. thaliana* визначено хлоропласти [154]. Комплекси SnRK1 складаються з трьох субодиниць: каталітичної - SnRK1 α (KIN10 і KIN11) та двох допоміжних - SnRK1 β та SnRK1 γ [154]. Функціональна спеціалізація каталітичних субодиниць в значній мірі залежить від їх здатності утворювати різноманітні комплекси з різними допоміжними субодиницями. Існує припущення, що внутрішньохлоропластна локалізація комплексів SnRK1 детермінується β - і γ -субодиницями, які мають хлоропластспецифічний транзитний пептид. Таким чином, компартаментация і активність KIN10 і KIN11 в значній мірі регламентується кінцевим складом комплексу і типом допоміжних субодиниць [154, 635].

Мінімальна експресія KIN10 у корені свідчить про роль SnRK1-кіназ в біосинтетичних процесах фотосинтезу і метаболізму вуглеводів. Цей факт не суперечить можливій участі рослинних SnRK1-кіназ в регуляції тубулінового коду, що підтверджується різноманітним процесів, які аналогічно регулюються тваринними BRSK1 (SAD-B) і BRSK2 (SAD-A) [535]. Функціональна спеціалізація BRSK1 і BRSK2 ссавців в значній мірі реалізується через утворення комплексів з допоміжними субодиницями. Незважаючи на роль у фосфорилуванні γ -тубуліну, подібно хлоропластній локалізації KIN10, BRSK присутні і проявляють активність в мітохондріях тваринних клітин [485, 70]. BRSK1 і BRSK2 асоційовані з різноманітними каскадами, що відбуваються екстрацелюлярно в цитозолі, ендоплазматичному ретикулумі, мітохондріях, ядрі і пероксисомах тваринної клітини (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160469-BRSK1/tissue>).

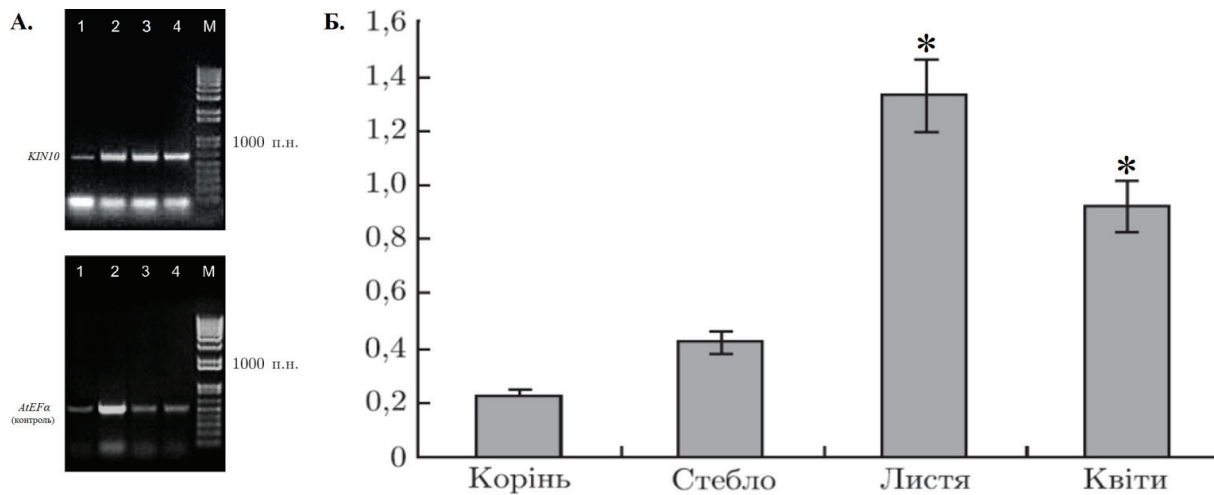


Рис. 8.31. Експресія *KIN10* в корені (1), стеблі (2), листку (3) і квітах (4) *A. thaliana* дикого генотипу Col-0:

А. Електрофоретичне визначення ампліфікатів гену *KIN10* підтверджує відмінності експресії в залежності від органу рослин *A. thaliana*;

Б. Органоспецифічна експресія (умовні одиниці) гену *KIN10*.

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

8.5.5. Вплив дисфункції генів *kin10* та *kin11* на мітотичний індекс проростків *A. thaliana*

З метою підтвердження або спростування участі рослинних протеїнкіназ SnRK1 в регуляції клітинного поділу, визначався мітотичний індекс кореневої апікальної меристеми рослин дикого генотипу (Col-0) і рослин *A. thaliana* з нокаутом ("knocked out"/KO) за *SnRK1*-генами: *kin10*^{KO} або *kin11*^{KO}. Дослідження виконувалось за стандартним протоколом пророщування насіння *A. thaliana* [506] і в умовах моделювання енергетичного дефіциту (вилучення сахарози з живильного середовища).

Мітотичний індекс апікальної меристеми коренів проростків обох КО-ліній (*kin10*^{KO} та *kin11*^{KO}) значно поступався контрольним рослинам генотипу «Col-0»

(рис. 8.32). При вирощуванні проростків на середовищі з 10 г/л сахарози показник мітотичного індексу мутантних рослин був майже втричі нижчим. Під впливом дефіциту сахарози мітотичний індекс мутантів поступався дикому типу майже у п'ять разів. В усіх варіантах в умовах дефіциту сахарози показники мітотичного індексу КО і контрольних рослин помітно поступалися рослинам, які не зазнавали дефіциту доступних форм цукрів [314].

Для перевірки первинних даних щодо зниження рівня клітинної проліферації в КО-лініях *A. thaliana* (*kin10^{KO}* і *kin11^{KO}*), було досліджено кореляцію експресії цільових КО-генів та канонічних маркерних генів клітинної проліферації: *CYCB1-1* і *AtBRCA1*. Аналіз враховував наявність або відсутність сахарози у живильному середовищі (рис. 8.33) [314, 315].

Циклін-залежні серин-треонінова протеїнкіназа Cyclin-B1-1 або *CYCB1-1* (*CYCB1-1* / AT4G37490) виконує функцію регуляції клітинного поділу і впливає на зміну фаз клітинного циклу. Інший маркер - *AtBRCA1* (BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY 1 homolog, AT4G21070), є рослинним гомологом тваринного гену *BRCA1*, який входить до систем регуляції клітинного циклу, репарації ДНК і, зокрема, приймає участь у відновленні дволанцюжкових розривів ДНК. Пригнічення експресії *AtBRCA1* має негативний вплив на функціонування комплексів γ -тубуліну. Знижена експресія *CYCB1-1* і *AtBRCA1* свідчить про гальмування процесів клітинної проліферації та/або порушення центрів первинної нуклеації мікротрубочок [111, 546, 506]. Наші дослідження підтвердили, що КО-лінії *A. thaliana* з нокаутом *kin10^{KO}* та *kin11^{KO}* також мають знижену експресію генів *CYCB1-1* та *AtBRCA1* порівняно з генотипом «Col-0».

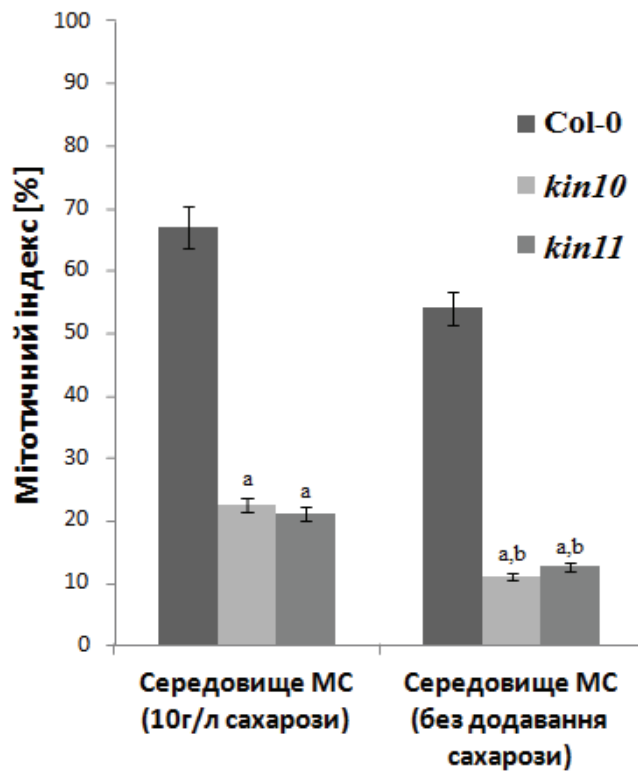


Рис. 8.32. Порівняння мітотичного індексу апікальної меристеми контрольних рослин *A. thaliana* дикого генотипу (Col-0) і рослин з нокаут $KIN10^{KO}$ або $KIN11^{KO}$.

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

Незважаючи на численні функції в рослинній клітині, протеїнкінази SnRK1 відомі і як центральні інтегратори енергетичних сигналів, що зв'язують різноманітні компартменти і органели клітини, та забезпечують їх зв'язок з метаболізмом фітогормонів [601]. SnRK1 причетні до магістральних сигнальних каскадів енергетичного дефіциту клітини [190]. Енергетичне голодування клітини призводить до зростання активності KIN10 та KIN11, що, у свою чергу, уповільнює катаболізм через адаптивне вимикання енергозатратних процесів [601, 190]. КО-рослини ($kin10^{KO}$ та $kin11^{KO}$), вирощені в умовах вуглеводного голодування, були більш чутливими до стресів, ніж рослини, вирощені на

повноцінному живильному середовище. Характерно, що клітини КО-рослини рослин мали низький рівень проліферації, що може бути опосередковано зв'язано з регуляцією клітинного поділу протеїнкіназами SnRK1 α .

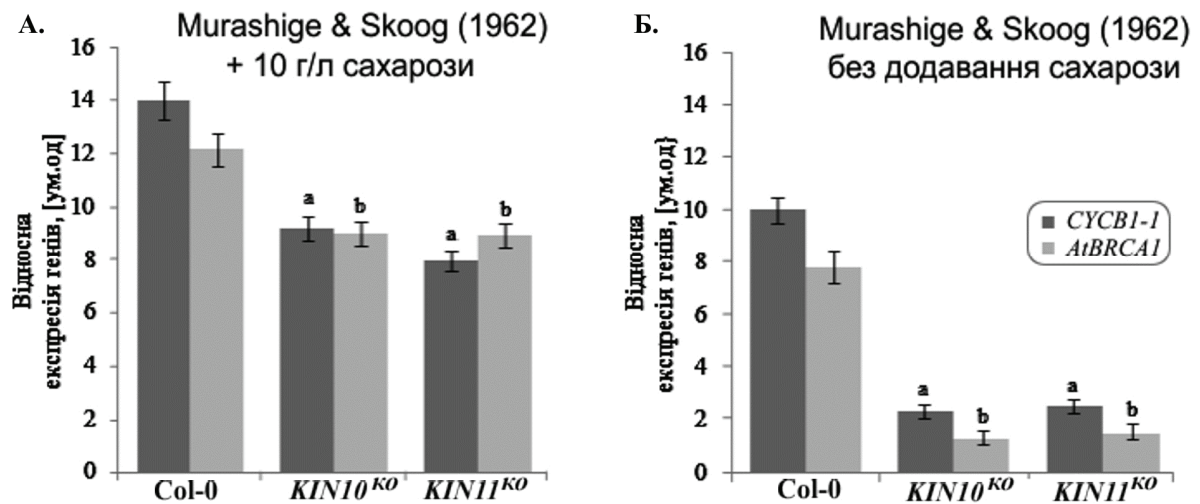


Рис. 8.33. Експресія маркерних генів *CYCB1-1* та *AtBRCA1* у 7-денних рослин *A. thaliana* генотипу «Col-0» (контроль) та «knocked out» лініях (КО) з дефектними генами *KIN10*^{KO} та *KIN11*^{KO}: **А** - вирощування на модифікованому живильному середовище за Murashige & Skoog (1962) [404] + 10 г/л сахарози; **Б** - вирощування на модифікованому живильному середовище за Murashige & Skoog (1962) без додавання сахарози.

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

Для підтвердження позитивної кореляції клітинного поділу і експресії генів *KIN10* та *KIN11* було виконано порівняння зазначених показників у клітинах суспензійної культури і проростках *A. thaliana*. У стані суспензійної культури кожна рослинна клітина реалізує індивідуальну генетичну програму, наслідком чого є значне зростання тотального мітотичного індексу культури (наближеного до клітин меристеми), що значно перевищує показник інтактних рослин [385]. Ми припустили, що кількість мітозів має позитивно корелювати з експресією генів *KIN10* і *KIN11*. Експресія *KIN10* і *KIN11* в клітинах суспензійної культури майже в 2,5 рази перевищувала аналогічні показники інтактних проростків (рис. 8.34), що

опосередковано свідчить про причетність SnRK1 до регуляції мітотичних процесів.

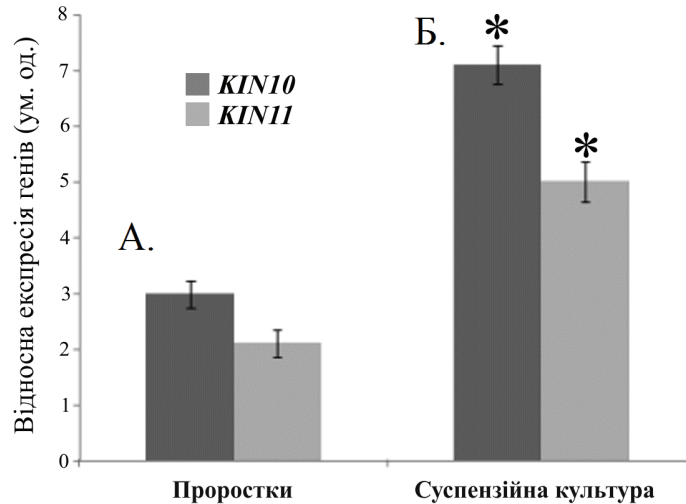


Рис. 8.34. Показники експресії генів *KIN10* та *KIN11*, розраховані на підставі співвідношення до рівня конститутивної експресії гену актину (*AtActin*): **А**) 7-денні проростки *A. thaliana* генотипу «Col-0», **Б**) 7-денні клітини суспензійної культури *A. thaliana* (з моменту пасажу).

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

У проростків і суспензійній культурі експресія *KIN10* домінувала, що свідчило про більш активну участь в мітотичних процесах саме *KIN10*.

Більша мітотична активність суспензійної культури була підтверджена експресією маркерних генів *CYCB1-1* і *AtBRCA1*. Відповідне вимірювання відбувалось аналогічним чином для інтактних проростків і зразків біомаси суспензійної культури клітин *A. thaliana* (рис. 8.35). Отримані дані підтвердили попередні припущення: рівень експресії *CYCB1-1* та *AtBRCA1* у суспензійній культурі був значно вищий, що беззаперечно підтверджує більшу мітотичну активність саме клітин суспензійної культури. Таким чином, позитивна кореляція експресії *SnRK1α* (*KIN10* та *KIN11*) і мітотичної активності цілком підтверджують

попередні припущення стосовно їх ролі в регуляції мітотичних процесів вищих рослин.

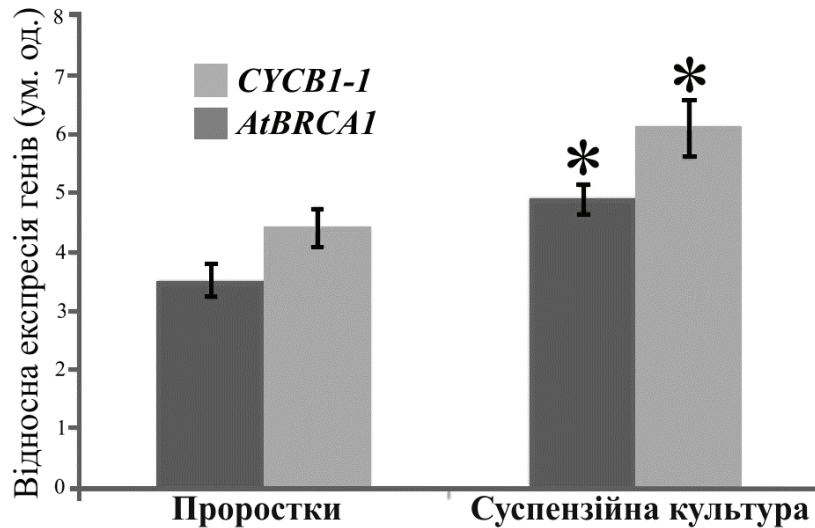


Рис. 8.35. Порівняння експресії маркерних генів мітотичної активності (*CYCB1-1* і *AtBRCA1*) *A. thaliana*, встановленої на підставі співвідношення конститутивної експресії гена актину (*AtActin*): А) 7-денні проростки генотипу «Col-0», Б) 7-денні клітини суспензійної культури *A. thaliana* (з моменту пасажу).

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

Отримані дані засвідчили, що мітотичний індекс і експресія генів-маркерів клітинної проліферації (*CYCB1-1* і *AtBRCA1*) нокаутних ліній *A. thaliana* (SALK_139618C і SALK_127939C) значно поступається контрольним рослинам лінії «Col-0». За умов вуглеводного дефіциту експресія цих генів також знижувалась у мутантних і контрольних рослин. Суспензійна культура *A. thaliana* характеризувалась одночасним підвищенням рівня експресії маркерних генів мітотичної активності (*CYCB1-1* і *AtBRCA1*) і генів SnRK1 (*KIN10* і *KIN11*). Отримані дані підтвердили причетність протеїнкіназ SnRK1 α (*KIN10* і *KIN11*) до регуляції мітотичного апарату в умовах стандартного культивування і за умов моделювання вуглеводного голодування.

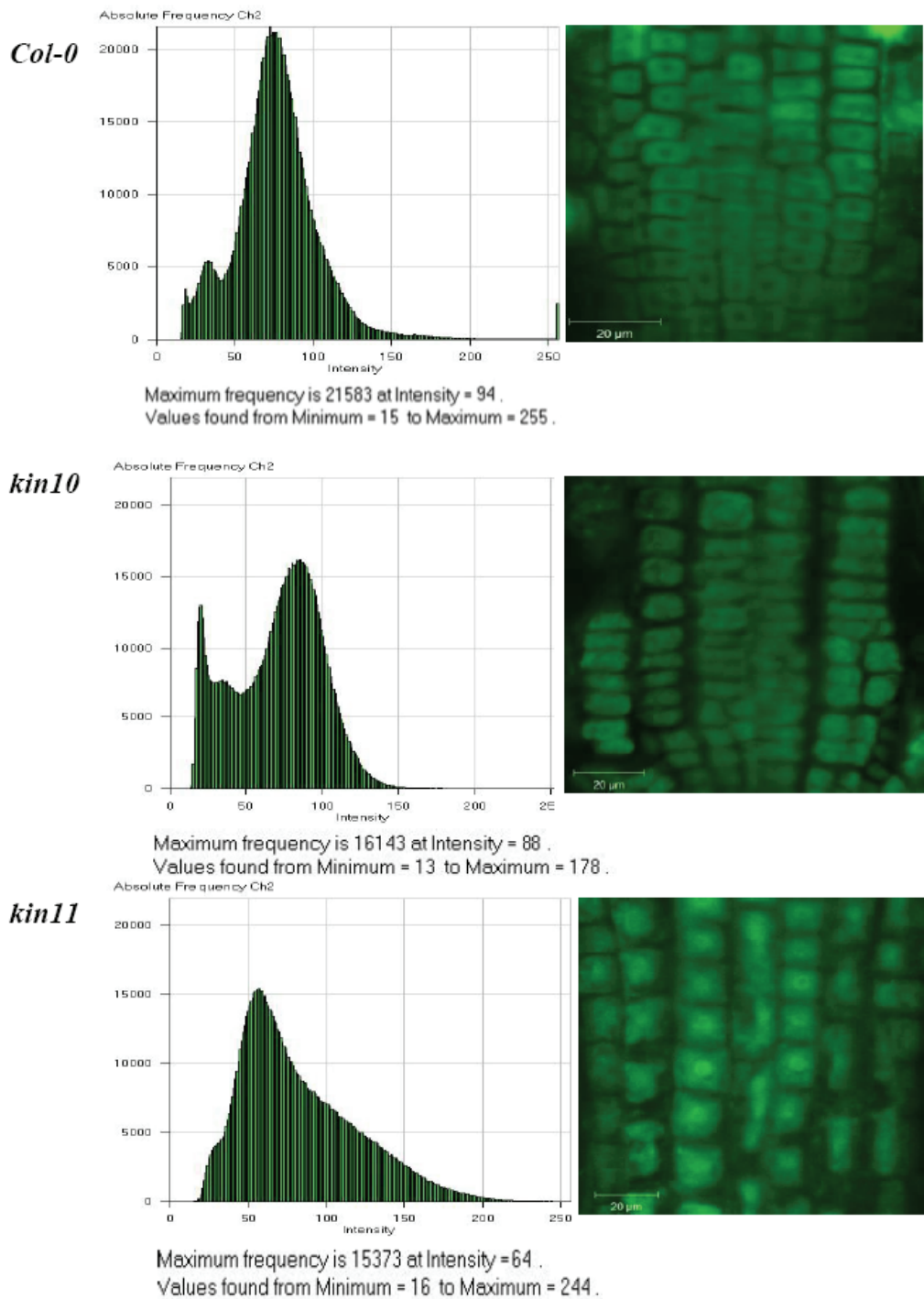


Рис. 8.36. Розподіл флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів контрольних (генотип Col-0) і мутантних ($KIN10^{KO}$ та $KIN11^{KO}$) рослин *A. thaliana*, вирощених на стандартному живильному середовищі Murashige & Skoog (1962) з додаванням 10 г/л сахарози.

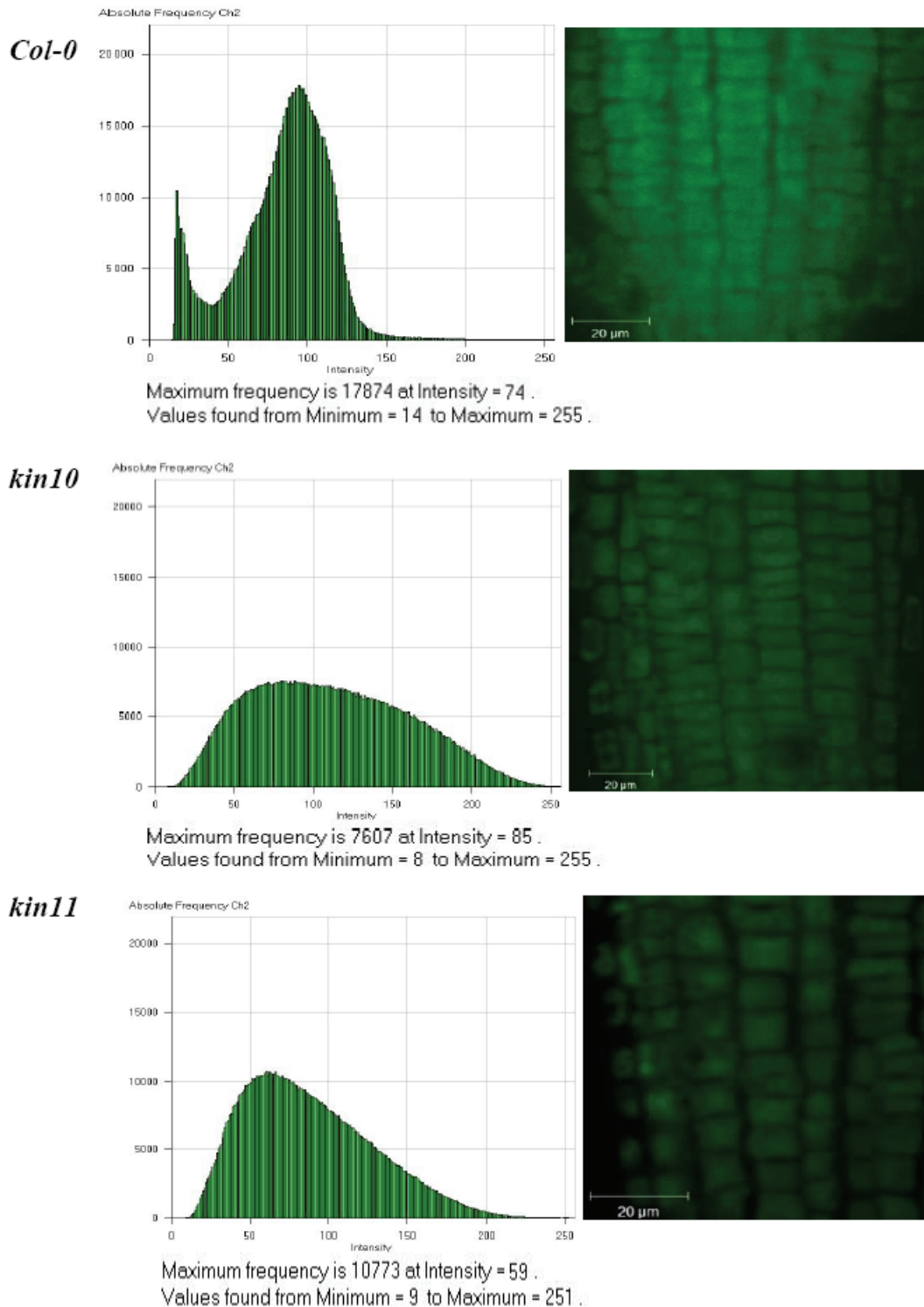


Рис. 8.37. Розподіл флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів контрольних (генотип Col-0) і мутантних ($KIN10^{KO}$ та $KIN11^{KO}$) рослин *A. thaliana*, вирощених на живильному середовищі Murashige & Skoog (1962) без додавання сахарози.

8.5.6. Вплив дисфункції генів *SnRK1α* на внутрішньоклітинну флуоресценцію γ -тубуліну та колокалізація KIN10 і γ -тубуліну в клітинах *A. thaliana*

Для доказу зв'язку протеїнкіназ SnRK1 α (KIN10 і KIN11) і γ -тубуліну було досліджено вплив нокауту *KIN10* і *KIN11* на загальну інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну і їх внутрішньоклітинну колокалізацію (SnRK1 α / γ -тубулін). Інтенсивність флуоресценції маркерних комплексів γ -тубуліну із специфічними моноклональними антитілами визначалась за методом імунофлуоресцентної мікроскопії. Визначали розбіжності у розподілі інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів контрольних рослин *A. thaliana* дикого генотипу «Col-0» і рослин, що мали нокаут за генами *kin10* (*KIN10*^{KO} - лінія SALK_139618C) та *kin11* (*KIN11*^{KO} - лінія SALK_127939C).

Функціональна роль рослинних SnRK1 α найбільше досліджена у аспекті їх причетності до регуляції енергетичного обміну клітин, адаптації рослин до енергетичного голодування і інших стресових факторів [101, 467]. Ключова роль KIN10 і KIN11 у відповіді на енергетичний стрес була підтверджена на прикладі експериментальної моделі дефіциту цукрів [233]. Саме тому визначення інтенсивності флуоресценції γ -тубуліну в меристематичних клітинах проростків контрольних «Col-0» і мутантних (*KIN10*^{KO} та *KIN11*^{KO}) рослин визначали у рослин, вирощених *in vitro* на живильному середовищі Murashige & Skoog (1962) з додаванням 10 г/л сахарози (рис. 8.36.) і без сахарози (рис. 8.37).

Результати засвідчили, що флуоресценція γ -тубулін-специфічного маркеру у обох мутантних лініях (*KIN10*^{KO} і *KIN11*^{KO}) значно поступається контрольним зразкам рослин генотипу «Col-0». Така різниця спостерігалась у рослин на живильному середовищі MS з додаванням 10 г/л сахарози і у рослин з використанням моделі вуглеводного голодування. Наше дослідження підтвердило існування синергійного ефекту дисфункції генів *SnRK1α* (*KIN10* або *KIN11*) і

вуглеводного дефіциту. Одночасний вплив обох факторів забезпечував найнижчі показники внутрішньоклітинної флуоресценції γ -тубуліну [315]. Порівняно з контролем, на фоні вуглеводного голодування флуоресценція γ -тубуліну була нижчою майже в 2 рази у мутантної лінії SALK_139618C ($KIN10^{KO}$) і в 0,5 рази у мутантної лінії SALK_127939C ($KIN11^{KO}$) (рис. 8.38). Це підтверджує існування безпосереднього зв'язку між SnRK1-залежним фосфорилуванням і центрами первинної нуклеації мікротрубочок вищих рослин.

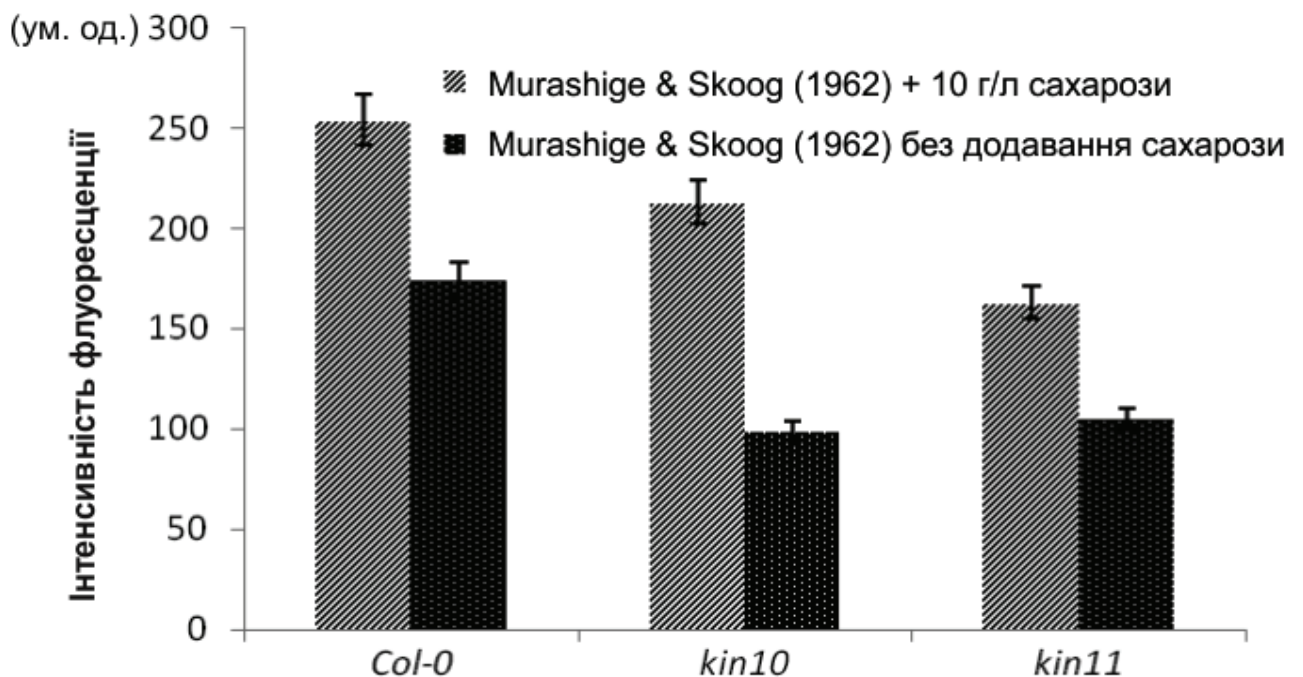


Рис. 8.38. Інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну ($M \pm m$; $p \leq 0,05$) в клітинах коренів рослин мутантних ліній $KIN10^{KO}$ (*kin10*) та $KIN11^{KO}$ (*kin11*) і рослин контрольного генотипу «Col-0» *A. thaliana*.

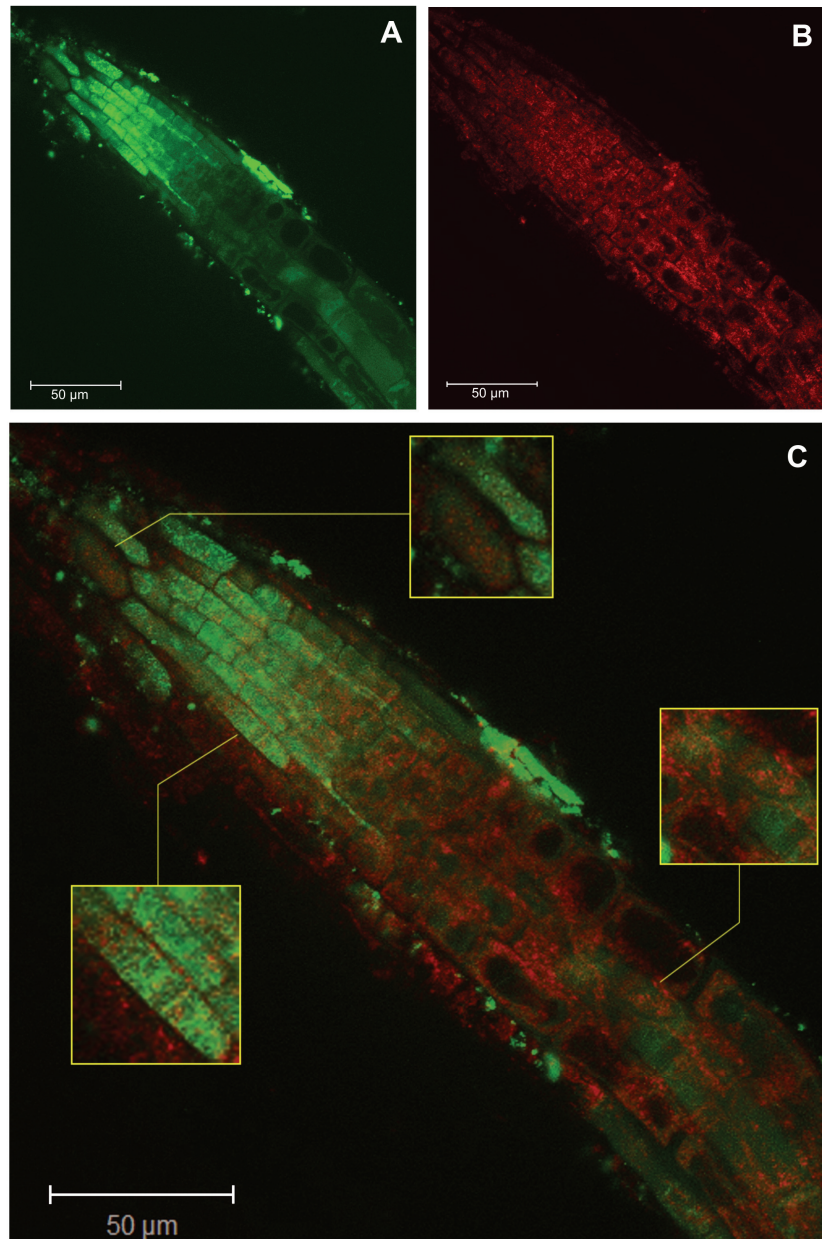


Рис. 8.39. Результати імунофлуоресцентної мікроскопії клітин коренів *A. thaliana* дикого генотипу «Col-0», отримані з використанням моноклональних антитіл компетентних до рослинного γ -тубуліну і протеїнкінази KIN10:

А – флуоресценція γ -тубуліну (зелений сигнал, FITC-канал); **Б** – флуоресценція KIN10 (червоний сигнал, TRITC-канал); **В** – колокалізація флуоресценції γ -тубуліну та KIN10.

Масштаб – 50 мкм

З метою оцінки можливої взаємодії каталітичних субодиниць SnRK1 α з γ -тубуліном було досліджено колокалізацію KIN10 і γ -тубуліну в клітинах коренів проростків *A. thaliana* (рис. 8.39). Результати імунофлуоресцентного аналізу підтвердили цитоплазматичну колокалізацію сигналів від зв'язаних з специфічними антитілами молекул γ -тубуліну і KIN10 та попередні дані, отримані з використанням γ -тубулін-специфічних моноклональних антитіл TU-31 [610, 611]. Колокалізація флуоресцентних сигналів імунологічних маркерів γ -тубуліну і KIN10 підтверджує можливість безпосередньої взаємодії цільових білків та їх функціональний зв'язок.

Знижена флуоресценція γ -тубуліну в меристематичних клітинах коренів рослин *KIN10^{KO}* та *KIN11^{KO}* підтверджує зниження їх мітотичної активності. Інтенсивність флуоресценції γ -тубуліну та мітотичний індекс рослин *KIN10^{KO}* були нижчими, ніж у рослин *KIN11^{KO}*, що доводить правильність припущення стосовно домінуючої ролі саме KIN10. В цілому, отримані дані свідчать про участь KIN10 і KIN11 в процесах клітинного поділу, підтверджують біоінформатичні дані стосовно участі SnRK1 α в регуляції системи мікротрубочок, їх роль як агентів тубулінового коду вищих рослин.

8.5.7. Роль SNF1/SnRK-специфічного фосфорилування в регуляції системи мікротрубочок *A. thaliana*

Рослинні протеїнкінази SnRK1 α (KIN10 і KIN11) причетні до процесів регуляції системи мікротрубочок і клітинного поділу.[278] Найбільш вірогідний механізм SnRK1 α -залежної регуляції системи мікротрубочок у рослин здійснюється за механізмом, аналогічним BRSK-залежному фосфорилуванню γ -тубуліну за залишком Ser131. Консервативність вищезазначеного залишку дозволяє припустити існування подібного Snf1-залежного механізму регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок у тварин і вищих рослин [278, 313, 314, 315]. BRSK-залежне фосфорилування Ser131 γ -тубуліну в тваринній клітині сприяє збільшенню ядерного γ -тубуліну, запускає реплікацію центросом і забезпечує перехід до S-фази клітинного циклу [139, 8]. Отримані дані

підтверджують існування у рослин SnRK1 α -залежної регуляції тубулінового цитоскелету. Проте, не зважаючи на спільні риси з BRSK-залежною регуляцією у тварин, відмінності процесів також очевидні. Вплив BRSK1 і BRSK2 на систему мікротрубочок у тварин реалізується через безпосереднє фосфорилування γ -тубуліну і через фосфорилування інших асоційованих білків: MAPT/TAU, Cdc25B, Cdc25C та ін.[552]

Для визначення альтернативних шляхів SnRK1 α -залежної регуляції системи мікротрубочок рослин було виконано профільний пошук цільових білків і сайтів, що можуть впливати на тубуліновий цитоскелет. Для створення пошукового мотиву провели ревізію експериментально підтверджених субстратів и сайтів BRSK1 і BRSK2. Відповідні дані отримали з ресурсів UniProtKB, PhosphoSitePlus і PhosphoNET [552, 220, 219, 489]. Було визначено 43 експериментально підтверджених сайти BRSK1- і BRSK2-залежного фосфорилування, для яких відомі і сайти фосфорилування, і протейнінази, що здійснювали зазначені модифікації (табл. 8.2).

Ревізія бази даних UniProtKB дозволила визначити 718 депонувань білків *A. thaliana*, що відповідали пошуковому запиту “*microtubule + ARATH*”. 287 білків мали статус анотованих послідовностей, а 431 належали не анотованим депонуванням. Подальший аналіз результатів автоматизованого пошуку дозволив зменшити вихідну вибірку до 216 цільових білків. Перевірка за локусами генів (дані ресурсу Taig) і виключення багаторазових депонувань послідовностей ідентичних білків скоротила остаточну вибірку до 204 унікальні послідовностей, що мають відношення до системи мікротрубочок *A. thaliana* (Додаток 6.2).

За допомогою створеного патерну і інструменту Prosite було виконано сканування відібраної групи і знайдено відповідні хіти у послідовностях семи білків: двох ізотипів γ -тубуліну (TBG1 / P38557 - Ser131 і TBG2 / P38558 - Ser131), структурного БАМ - WDL2 (Q9ASW8 - Ser87), відповідального за регуляцію орієнтації кортикальних мікротрубочок під час інтерфази та чотирьох кінезинів - KN7M (Q9SJU0 - Ser44), KN7H (F4JZ68 - Thr686), KN7F (F4JU19 - Thr558) і KN14I (F4IL57 - Ser229).

Таблиця 8.2

Сайти BRSK1 / BRSK2-залежного фосфорилювання, використані для складання узагальненого мотиву сайту Snf1-залежного фосфорилювання

Цільовий блок	Назва UniProtKB	Номер UniProtKB	Цільова амінокислота	Сайт фосфорилювання	Протеїнкіназа (BRSK1/2)	Дані літератури
CDC25C	MPIP3_HUMAN	P30307	Ser216	LYRSPSPENL	BRSK1	[362]
CDC25C	MPIP3_PIG	Q29029	S245	LYRSFSLPDSL	BRSK1	[362]
CDC25C	MPIP3_BOVIN	A5D7P0	S220	LYRSSSLPDSL	BRSK1	[362]
CDC25B	MPIP2_HUMAN	P30305	S375	VLRKSLCHDE	BRSK1	[362]
CDC25B	MPIP2_MOUSE	P30306	S372	VFRKSLCHEI	BRSK1	[362]
CDC25B	MPIP2_RAT	P48966	S370	VFRKSLCHEI	BRSK1	[362]
MAPT	TAU_HUMAN	P10636	T529	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_HUMAN	P10636	S579	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_MOUSE	P10637	S554	RSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[31, 297]
MAPT	TAU_RAT	P19332	T523	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_RAT	P19332	S579	RSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[110]
MAPT	TAU_BOVIN	P29172	T219	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_BOVIN	P29172	S269	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_PANTR	Q5YCW1	T547	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_PANTR	Q5YCW1	S597	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_MACMU	P57786	T230	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_MACMU	P57786	S280	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_SPECI	Q6TS35	T201	YSSPGSPGTPG	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_SPECI	Q6TS35	S251	RSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_CAPHI	O02828	T174	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_CAPHI	O02828	S224	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_PAPHA	Q9MYX8	T154	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_PAPHA	Q9MYX8	S204	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_GORGO	Q5YCW0	T547	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_GORGO	Q5YCW0	S597	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_PONPY	Q5S6V2	T529	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_PONPY	Q5S6V2	S579	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_HYLLA	Q5YCV9	T547	GSRSRTPSLPT	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
MAPT	TAU_HYLLA	Q5YCV9	S597	KSKIGSTENLK	BRSK1, BRSK2	[237, 357]
RIMS1	RIMS1_HUMAN	Q86UR5	S1571	KPGSKSTPAPY	BRSK1	[552]
RIMS1	RIMS1_MOUSE	Q99NE5	S1342	KPGSKSTPAPY	BRSK1	[552]
TUBG1	TBG1_HUMAN	P23258	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG1	TBG1_MOUSE	P83887	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG1	TBG2_HUMAN	Q9NRH3	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG1	TBG2_MOUSE	Q8VCK3	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG1	TBG1_RAT	P83888	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG1	TBG1_BOVIN	Q0VCD2	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG1	TBG1_CANLF	Q9GKK5	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG2	TBG2_BOVIN	Q32KM1	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
TUBG2	TBG2_MOUSE	Q8VCK3	S131	ADGSDSLEGFV	BRSK1	[8]
Wee1	WEE1_HUMAN	P30291	S642	MNRSVSLTIY_	BRSK1, BRSK2	[362, 401]
Wee1	WEE1_MOUSE	P47810	S642	MNRSVSLTIY_	BRSK1, BRSK2	[362, 401]
Wee1	WEE1_RAT	Q63802	S642	MNRSVSLTIY_	BRSK1, BRSK2	[362, 401]

На підставі аналізу відібраних сайтів BRSK1/BRSK2-залежного фосфорилування було складено пошуковий мотив, що відповідав вимогам web-інструменту Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) (рис. 8.40.).

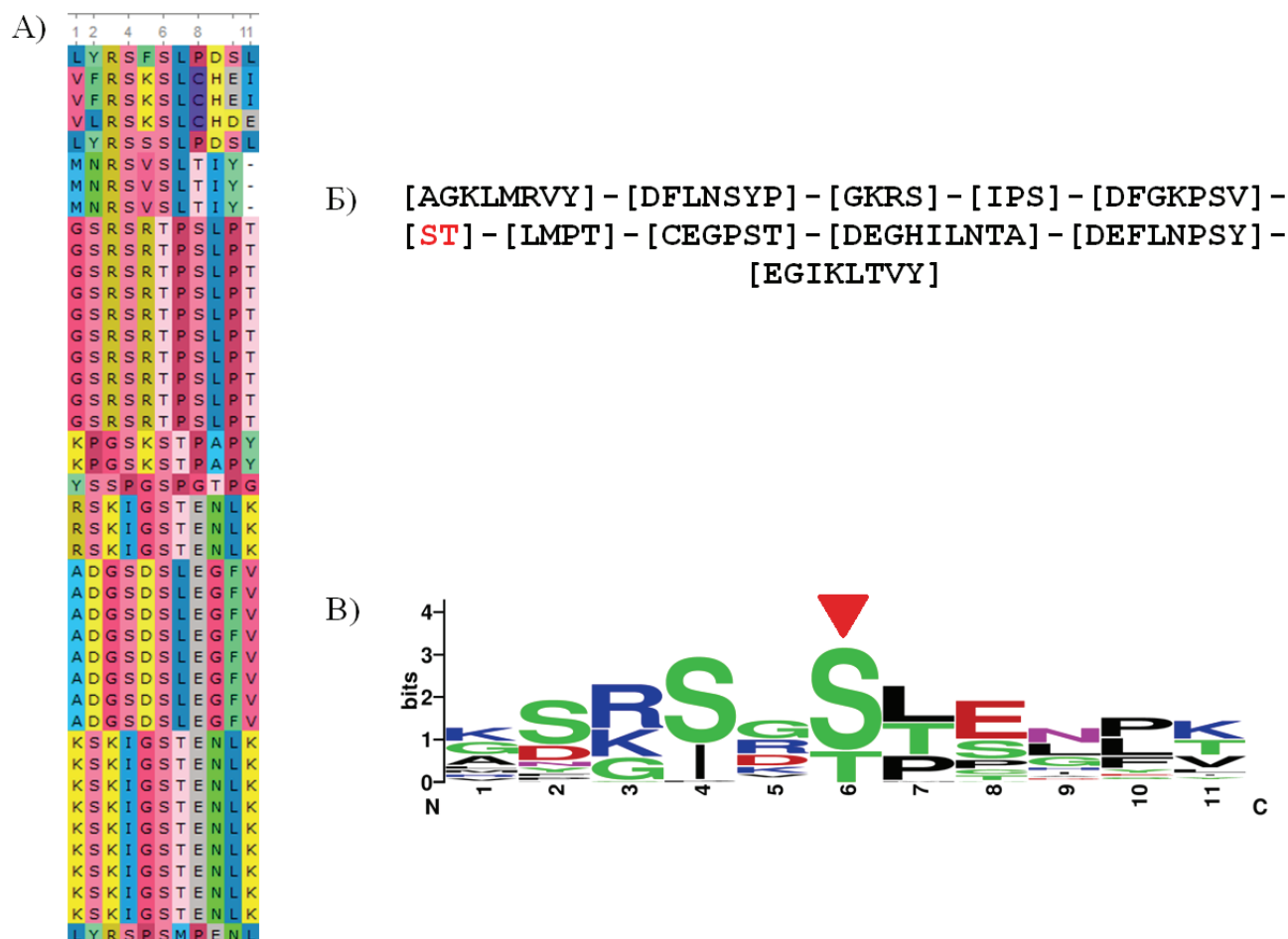


Рис. 8.40. Визначення узагальненого мотиву сайтів BRSK1/BRSK2-залежного фосфорилування на підставі аналізу експериментально доведених сайтів:

А) вирівнювання ділянок сайтів (у форматі ST±5); Б) узагальнений патерн BRSK1 / BRSK2-залежного фосфорилування у форматі web-сервісу Prosite; В) узагальнюючий лог сайту BRSK1 / BRSK2-залежного фосфорилування.

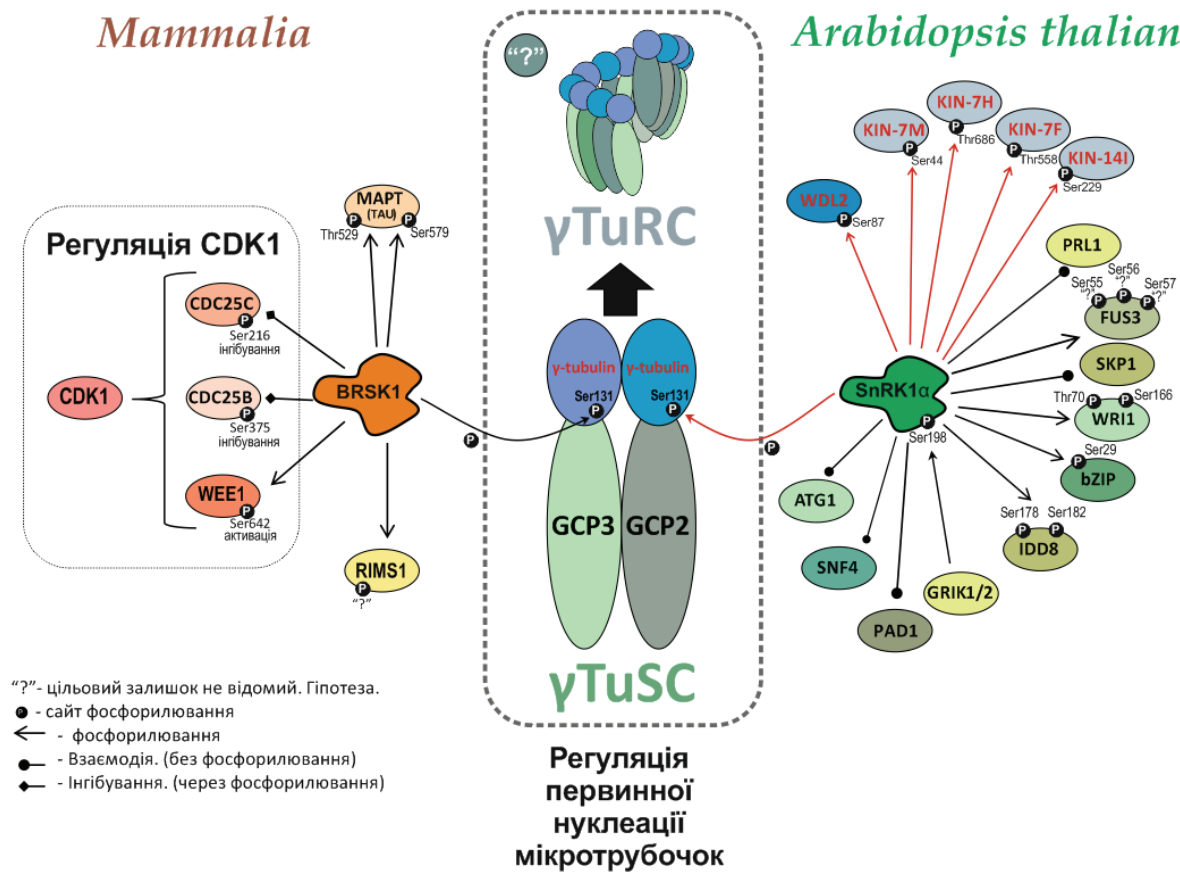


Рис. 8.41. Схема функціональної активності рослинних протеїнкіназ SnRK1 ($\text{SnRK}\alpha$) у порівнянні з канонічними функціями протеїнкінази BRSK1 ссавців. Стрілки і шрифт червоного кольору вказують на молекулярні мішені $\text{SnRK}\alpha$ -залежного фосфорилування білків рослинного цитоскелету, визначені в межах актуального дисертаційного дослідження.

Примітки: PRL1 – білок плейотропного регуляторного локусу; FUS3 – фактор транскрипції з доменом B3; SKP1 - білок, асоційований з S-фазою кінази 1; WRI1 – фактор транскрипції WRINKLED1; bZIP – основний домен «лейцинової блискавки»; IDD8 – фактор транскрипції IDD8; GRIK1/2 – субодиниця 1/2 глутаматного іонотропного рецептора кайнатного типу; PAD1 – субодиниця протеасоми альфа типу-7-A; SNF4 – SNF1-протеїнкіназа асоційована регуляторна субодиниця β 2; AT4G1 – SNF1-протеїнкіназа асоційована регуляторна субодиниця β 2; CDK1 – циклін-залежна протеїнкіназа 1; RIMS1 – регулятор екзоцитозу синапатичної мембрани 1, WEE1 – Well-подібна протеїнкіназа; WDL2 - структурний BAM WDL2; KIN-7M/-7H/-7F/-14I - білки родини кінезинів.

Таким чином, безпосередній вплив на систему мікротрубочок *A. thaliana* можливий лише як результат SnRK1 α -залежного фосфорилування двох ізотипів γ -тубуліну і структурного БАМ - WDL2. За нашими результатами, лише фосфорилування Ser131 (TBG1 і TBG2) має відношення до модуляції тубулінового коду вищих рослин, всі інші сайти належать моторним білкам і не мають безпосереднього впливу на систему мікротрубочок. В свою чергу, фосфорилування структурного БАМ WDL2 може впливати на орієнтацію кортикальних мікротрубочок під час інтерфази. Зокрема, WDL2 визначає зміну орієнтації кортикальних мікротрубочок під впливом фотоінгібування елонгації клітин гіпокотилу [358].

Отримані дані відкрили нові функціональні аспекти посттрансляційної регуляції тубулінового цитоскелету вищих рослин, що відбуваються за участю протеїнкіназ SnRK1. Це дозволило доповнити дані стосовно SnRK1 α -залежної регуляції у вищих рослин і запропонувати удосконалену схему функціональної ролі протеїнкіназ KIN10 і KIN11 в клітинах вищих рослин (рис. 8.41).

Список публікацій, які відображають результати розділу 8.

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* γ -Tubulin. Cytol. Genetics. 2019. 53(5): 349-356. doi.org/10.3103/S0095452719050104.

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.org/10.3103/S0095452719030022.

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.org/10.3103/S0095452718060038.

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.org/10.3103/S0095452717060056.

Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for Ca^{2+} - and Calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. Cytol. Genetics. 2017; 51 (4): 239–246. doi.org/10.3103/S0095452717040053.

Новожилов ДО, Карпов ПА, Раевский АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ. Ca^{2+} - та Ca^{2+} -Кальмодулін-залежні протеїнкінази - потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 323–328. doi.org/10.7124/FEEO.v20.788 .

Краснопьорова 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.org/10.7124/FEEO.v20.736.

Краснопьорова 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 НАН України. 2016; 1: 81-91. doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.081.

Karpov PA, 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.org/10.3103/S0096392510040267.

Karpov 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.

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.

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.

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.

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. p. 1348.

Karpov 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.

Karpov 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.

Karpov 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.

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.

Karpov 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).

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 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

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

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” (Збірник наукових статей), 2008, 13-16 жовтня, Одеса, Україна. с.162–164.

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.

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. Ed. A.I Atanassov, N.K. Christov, K. Rusanov and E.G. Todorovska. Sofia 2008. p.79.

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. Ed. A.I Atanassov, N.K. Christov, K. Rusanov and E.G. Todorovska. Sofia 2008. p.80.

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. Ed. A.I Atanassov, N.K. Christov, K. Rusanov and E.G. Todorovska. Sofia 2008. p.78.

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.

Карпов ПА, Ємець 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.

Карпов ПА, 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.

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведений аналіз повного кіному модельного об'єкту *Arabidopsis thaliana* дозволив уточнити, виявити і максимально повно охарактеризувати особливості процесу фосфорилування тубуліну. Дослідження протеїнказ, здатних фосфорилувати молекули α -, β - і γ -тубуліну, дозволило окреслити коло причетних до основних шляхів ензиматичного фосфорилування тубуліну, визначити їх сайти фосфорилування, внести уточнення в поняття тубуліновий код вищих рослин.

Зворотне фосфорилування - це універсальний механізм модуляції властивостей білків, який охоплює майже усі клітинні процеси. Вперше в еволюції, як модифікація залишків гістидину (His/H), фосфорилування з'явилося у прокаріотичних організмів [222, 328, 583], але остаточне становлення фосфорилування як ключового механізму посттрансляційної регуляції відбулося вже в клітинах еукаріот [539, 540]. Наразі домінуючими типами є фосфорилування за амінокислотними залишками серину, треоніну і тирозину [219, 376, 377]. Надаючи негативний заряд залишкам цільових амінокислот, фосфорилування забезпечує механізм швидкого і зворотного контролю структурних і функціональних властивостей білка [540]. З функціонально-механістичної точки зору, фосфорилування може розглядатись як еквівалент заміни залишків серину, треоніну або тирозину на залишок аспарагінової (Asp/D) або глутамінової (Glu/E) кислот [583].

Враховуючи факт існування повністю функціональних білків ще до виникнення зазначеного типу модифікації, тривалий час існувала думка, що фосфорилування виконує функцію негативної регуляції функціонального стану білка. Проте, на сьогодні існують докази як негативної так і позитивної регуляції [540, 583].

Згідно філогенетичним дистанціям каталітичних доменів, сучасні тирозинові протеїнкази представляють собою найбільш молоду групу протеїнказ, що

еволюціонувала від Ser/Thr-кіназ, які, в свою чергу, походять безпосередньо від первинних низькомолекулярних протеїнкіназ бактерій [262, 341]. Тирозинові протеїнкінази зараз проявляють лише віддалену структурну подібність каталітичних доменів з бактеріальними попередниками [262, 341]. Протеїнкінази подвійної специфічності (STYKc), здатні фосфорилювати Ser, Thr та Tyr, зараз вважаються проміжним етапом еволюції, що саме і привів до виникнення первинних «архаїчних» тирозин-специфічних протеїнкіназ (TyrKc) [57, 58, 59, 60, 231]. Відсутність канонічних тирозин-специфічних протеїнкіназ у вищих рослин з найбільшою вірогідністю можна пояснити не втратою генів, а первинними відмінностями у сценаріях еволюції кіномів представників різних царств. Залежність життєдіяльності рослин від субстрату і умов навколишнього середовища призвели до значного збільшення кіномів рослин, що в значній мірі є результатом дуплікацій генів рецепторних протеїнкіназ (RLKs) (рис.4.1) [281]. Таким чином, існуюча теорія логічно ділить кіном представників сучасних Eukaryota на дві складові:

- 1) успадковану на етапі дивергенції від спільних прокаріотичних предків;
- 2) придбану внаслідок незалежної еволюції кожного з царств.

З іншого боку, споріднені між собою елементи цитоскелету було знайдено у переважної більшості представників усіх трьох доменів живих організмів еукаріот, бактерій та архей. Це свідчить, що білки цитоскелету виникли ще до подій дивергенції [80, 340]. Показник частоти зустрічальності амінокислот визначає знижений вміст аргініну, лізину, фенілаланіну, тирозину, гістидину і триптофану у всіх білків родини Tubulin/FtsZ [69]. Зазначений факт слугує підтвердженням архаїчності цієї групи. Консервативність сучасних ізотипів α -, β - і γ -тубуліну [365, 366] свідчить, що фундаментальні молекулярні механізми посттрансляційної регуляції мікротрубочок мали зберегти спільні риси. Відповідно, ми розраховували на консервативність сайтів фосфорилювання тубуліну і на те, що асоційовані протеїнкінази мають відноситись до архаїчної частини кіному і також

бути консервативними.

Отримані результати цілком підтвердили наше первинне припущення стосовно того, що протеїнкази тубулінового коду рослин мають належати до консервативного пулу регуляторів базових функцій «домашнього господарства» клітини. Екстраполяція даних анотації на побудоване в межах виконаного дослідження філогенетичне дерево повного кіному *A. thaliana* (рис.4.1) підтверджує, що усі визначені протеїнкази тубулінового коду належать саме до цієї групи. До зазначеної групи протеїнказ також приєдналися всі без виключення рослинні гомологи 109 протеїнказ людини, які, за даними літератури, належать до групи регуляції системи мікротрубочок і клітинного поділу (рис. 4.2 «А» і «V»). Отримані результати підтверджують певну консервативність і еволюційну архаїчність протеїнказ «домашнього господарства», серед яких і протеїнкази, асоційовані з регуляцією тубулінового коду, у представників різних царств.

Незважаючи на очевидні спільні риси, кіноми мікротрубочок у ссавців і вищих рослин проявляють певні відмінності, що виникли у часи незалежної еволюції видів. Найбільш помітна різниця стосується відсутності у рослин виключно тирозин-специфічних протеїнказ, наявності критичних відмінностей в структурній організації кальцій-залежних протеїнказ, особливостей доменної архітектури гомологів рослинного, тваринного і дріжджового походження.

На початок актуального дослідження питання існування у рослин тирозин-специфічних протеїнказ ще не було вирішено остаточно. Саме тому первинний біоінформатичний пошук рослинних гомологів виконувався із використанням послідовностей тваринних тирозин-специфічних протеїнказ [630]. Проте, наступна анотація повного кіному *A. thaliana* остаточно підтвердила їх відсутність у вищих рослин. Таким чином, значний рівень фосфорилування за тирозином у рослин забезпечується за рахунок протеїнказ дуальної специфічності і атипової активності серин/треонин-специфічних протеїнказ.

Рослинний тубулін також зазнає фосфорилування за залишками тирозину [57, 502]. Дослідження топології експериментально-визначених сайтів атипового CDPK/CRK-залежного фосфорилування Tyr444/443 і Tyr450/449 ізотипів TBB2, TBB3 і TBB7 β -тубуліну дозволило визначити розташування сайтів атипового CDPK/CRK-залежного фосфорилування Tyr444/443 і Tyr450/449 ізотипів TBB2, TBB3 і TBB7 β -тубуліну на зовнішній поверхні мікротрубочок. С-кінцева локалізація і позаглобулярне розташування свідчать про відсутність безпосереднього впливу цих сайтів на структуру мікротрубочок. Найбільш імовірним призначенням зазначених модифікацій є формування унікальних інтерфейсів взаємодії з БАМ. Зазначені модифікації можуть впливати на динаміку кортикальних мікротрубочок за рахунок впливу на динамічні властивості С-кінця цільових молекул β -тубуліну [407]. Зазначені факти визначають рослинні Ca^{2+} -залежні протеїнкінази CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) як агентів тубулінового коду вищих рослин (табл. 9.1). Загалом, під час анотації кіному мікротрубочок вищих рослин інші випадки тирозин-специфічного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну не визначені.

Проведені нами дослідження дозволили визначити 22 сайти фосфорилування: 17 – за залишками серину, 3 – за залишками треоніну, 2 – за залишками тирозину. Тобто, у молекул тубуліну зберігається загальна тенденція домінування серин-специфічного фосфорилування, яке здійснюють 18 протеїнкіназ серин-треонінової специфічності.

Аналіз топології визначених сайтів дозволив поділити визначені сайти фосфорилування на 2 групи:

- 1) модифікації, які впливають на структуру і морфологічно-функціональний стан мікротрубочки (інтерфейси тубулін-тубулінової взаємодії, сайт GTP/GDP);
- 2) модифікації, які не впливають на структуру мікротрубочки, але регулюють інтерфейси взаємодії з асоційованими білками.

Відповідно, визначені під час актуального дослідження протеїнкінази

тубулінового коду можна розглядати як:

- агентів регуляції структури мікротрубочок;
- регуляторів динамічного стану і полімеризації мікротрубочок;
- протеїнкінази, причетні до регуляції інтерфейсів взаємодії мікротрубочок з асоційованими білками.

Двадцять із двадцяти двох знайдених сайтів фосфорилування рослинного α -, β -, γ -тубуліну певною мірою впливають на структуру і морфо-функціональний стан мікротрубочки. Фосфорилування Ser166, Ser172 β -тубуліну і Ser165, Ser178 α -тубуліну впливає на сайт GTP і змінює динамічні властивості мікротрубочки, що у β -тубуліну пов'язано з активністю CMGC-кіназ (CDK1 і YAK1), NIMA-кінази NEK6, а у α -тубуліну залежить від активності AGC кіназ (KPK1, KPK2 і PKC α) і Ca²⁺-залежної протеїнкінази CPK21. Структурна топологія передбачає, що фосфорилування Thr312 β -тубуліну Ca²⁺-залежними протеїнкіназами CPK7, CPK14 і CPK32, певний чином впливає на динаміку мікротрубочки, оскільки Thr312 належить до сайту зв'язування колхіцину [479, 418, 580, 95].

На організацію кортикальних мікротрубочок впливає фосфорилування С-кінцевих залишків α -тубуліну: Thr409 –протеїнкіназами KPK1 і KPK2 (група AGC, родина S6K), Ser413 – СК1-подібною протеїнкіназою SKL6 і Ser420, що фосфорилується протеїнкіназами різних груп: SKL6 (СК1-Like), CRK2, 3 і 8 (група CDPK-SNRK, родина CPK) та KPK1 і KPK2 (Група AGC, родина S6K). Вплив на динаміку кортикальних мікротрубочок через фосфорилування С-кінця мають два унікальні сайти фосфорилування за залишками тирозину: Tyr444/443 і Tyr450/449 окремих ізотипів β -тубуліну, модифікації яких є наслідком атипової активності Ca²⁺-залежних протеїнкіназ CRK2, CRK3 і CRK8 (CAMK2/3/8). У цьому випадку ми мали справу відразу з двома факторами тубулінового коду: фактором посттрансляційної регуляції і фактором залучення в структуру мікротрубочки різних ізотипів тубуліну.

Нами досліджувалась ще одна група сайтів, пов'язана з регуляцією

інтерфейсів гетеродимеру тубуліну і структури протофіламенту. Крім впливу на сайт зв'язування колхіцину, фосфорилування Thr312 β -тубуліну регулює внутрішній контакт $\alpha\beta$ -гетеродимеру тубуліну, що здійснюється за участю Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ СРК7, СРК14 і СРК32. Вірогідно, що фосфорилування Ser433 γ -тубуліну АGC-кіназою IREN1 здатне впливати на критично важливий інтерфейс γ/α ініціації мікротрубочки.

Було визначено, що значна кількість сайтів фосфорилування рослинних мікротрубочок контролює розходження протофіламентів мікротрубочки на стадії «катастрофи». Ключова роль у цьому процесі належить протеїнкіназам групи CDPK-SnRK (СРК і SnAK1).

При фосфорилуванні Thr337 α -тубуліну (інтерфейс α/α) вищих рослин Ca^{2+} -залежні протеїнкінази можуть конкурувати з протеїнкіназою С (РКС α) і представниками родини родина S6K - КРК1 і КРК2 групи АGC.

Більшість сайтів латеральної взаємодії регулюють представники групи CDPK-SNRK, що належать родинам СРК (= CDPK - Calcium-dependent protein kinases) і SnAK (=SnRK1-activating protein kinases). Найбільш вірогідними агентами зазначених модифікацій виступають протеїнкінази СРК20 (Thr337 α -тубуліну), СРК21 (Ser287 α -тубуліну і Ser283 β -тубуліну) і GRIK2 (Ser278/279 β -тубуліну).

Функціональна роль мікротрубочок значною мірою реалізується через їх взаємодію з асоційованими білками (БАМ) [270]. У тварин і дріжджів фосфорилування вважається одним з ключових факторів модуляції поверхневих інтерфейсів взаємодії з БАМ. У мікротрубочок рослин нами було визначено кілька сайтів фосфорилування молекул тубуліну, що впливають на взаємодію з структурними БАМ і регулюють МТ-залежний транспорт. Крім впливу на організацію кортикальних мікротрубочок атипове фосфорилування β -тубуліну за Tyr444/443 і Tyr450/449, імовірно, також регулює взаємодію з асоційованими білками. У α -тубуліну було визначено два сайти модуляції поверхневих інтерфейсів

мікротрубочки. Перший - Ser151, який за проведеними дослідженнями, фосфорилується протеїнкіназою СРК21. Інший сайт - Ser419, асоційований з активністю казеїн-кінази 2 (СК2) і визначається як консервативний сайт, що регулює взаємодію з білками родини кінезинів [266, 121].

Крім згаданого сайту регуляції інтерфейсу γ/α -тубуліну Ser433, у ході досліджень було визначено ще п'ять сайтів фосфорилування γ -тубуліну, причетних до регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuRC) рослин.

Результати біоінформатичного пошуку і лабораторних досліджень підтвердили причетність SNF1-залежного фосфорилування до регуляції рослинного цитоскелету і визначили рослинні SnRK1-кінази KIN10 і KIN11 функціональними гомологами тваринних протеїнкіназ BRSK (1 і 2) [278]. Було підтверджено, що SNF1-залежне фосфорилування Ser131 γ -тубуліну рослин і ссавців має спільні риси і належить до ключових молекулярних механізмів регуляції структури комплексів первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuSC / γ TuRC) у рослин. Дані аналізу структурної топології вказують на вплив цієї модифікації на інтерфейси TUBG1(2)-GACP(2)3[278]. Використання референтних генетичних конструкцій KIN10 і KIN11, експерименти із застосуванням нокаутних ліній KIN10KO і KIN11KO рослин *A. thaliana* дикого генотипу «Col-0», та модельних систем з різним рівнем мітотичної активності (інтактні рослини і суспензійна культура) довели, що дисфункція генів KIN10 і KIN11 призводить до значного спаду мітотичної активності [278, 313, 314, 315].

Ще чотири сайти безпосереднього фосфорилування рослинного γ -тубуліну (Ser32, Ser259, Ser321 і Ser376) зв'язані з регуляцією внутрішніх інтерфейсів комплексу γ TuSC і з активністю Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ родини СРК (СРК7, СРК14 і СРК32) [416, 637].

Узагальнені дані стосовно ролі вищезазначених сайтів фосфорилування молекул α -, β - і γ -тубуліну і участі визначених протеїнкіназ тубулінового коду наведено в таблиці 9.1.

Таблиця 9.1

Внесок фосфорилування в тубуліновий код *Arabidopsis thaliana*

Цільовий залишок	Структурно-функціональна відповідь на фосфорилування	Протеїнкінази
1	2	3
β-тубулін		
Ser166	Викликає деполімеризацію мікротрубочки [533]	NEK6 (родина NEK, підродина NIMA)
Ser172	Впливає на властивості сайту GTP. Один з ключових сайтів регуляції росту мікротрубочок.	CDK1 і YAK1 (група CMGC)
Ser278/279	Латеральна взаємодія протофіламентів мікротрубочки (β/β)	GRIK2 (родина SnAK1)
Ser283	Латеральна взаємодія протофіламентів мікротрубочки (β/β)	CPK21 (група CDPK-SNRK, родина CPK)
Thr312	Регуляція внутрішнього контакту димеру α/β -тубуліну. Належить до сайту зв'язування колхіцину [479, 418, 580, 95].	CPK7/14/32 (група CDPK-SNRK, родина CPK)
Thr409	Регуляція структури мікротрубочки - змінює конформаційну рухливість С-хвоста. Впливає на організацію кортикальних мікротрубочок.	KPK1 і KPK2 (Група AGC, родина S6K)
Ser413		CKL6 (CK1-Like)
Ser420		CKL6 (CK1-Like) CRK2/3/8 (CAMK2/3/8) KPK1 і KPK2 (Група AGC, родина S6K)
Tyr444/443	Взаємодія з БАМ. Змінює конформаційну рухливість С-хвоста. Впливає на організацію кортикальних мікротрубочок.	CRK2/3/8 (CAMK2/3/8)
Tyr450/449		CRK2/3/8 (CAMK2/3/8)

Таблиця 9.1 (продовження)

1	2	3
α-тубулін		
Ser151	Взаємодія з БАМ	СРК21 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Ser165	Впливає на довжину мікротрубочок і підвищення їх рухливості	РКСα (protein kinase Ca) КРК1 і КРК2 (Група AGC, родина S6K)
Ser178	Впливає на GTP-зв'язуючий сайт - змінює властивості контактної інтерфейсу плюс-кінця та впливає на цілісність тубулінового гетеродимеру, можливий вплив на рост мікротрубочок.	СРК21 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Ser287	Формування інтерфейсів латеральної взаємодії протофіламентів мікротрубочки.	СРК21 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Thr337	Формування інтерфейсів латеральної взаємодії протофіламентів мікротрубочки. Розходження протофіламентів мікротрубочок на етапі «катастрофи».	РКСα (protein kinase Ca) СРК20 (група CDPK-SNRK, родина СРК) КРК1 і КРК2 (Група AGC, родина S6K)
Ser419	Регулює взаємодію мікротрубочки з білками родини кінезинів.	СК2 (CMGC-Like)
γ-тубулін		
Ser32	Впливає на структуру центрів первинної нуклеації мікротрубочок.	СРК7/14/32 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Ser131	Регуляція структури комплексу γ TuRC.	KIN10 / KIN11 (SnRK1 α)
Ser259		СРК7/14/32 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Ser321		СРК7/14/32 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Ser376		СРК7/14/32 (група CDPK-SNRK, родина СРК)
Ser433	Впливає на структуру мікротрубочки (γ/α).	IREH1 (група AGC)

Результати біоінформатичного і експериментального дослідження з наступною їх екстраполяцією на філогенетичне дерево кіному *A. thaliana*, підтвердили, що всі 18 протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин належать до класу еволюційно-консервативних суперродин: AGC (AGC Ser/Thr protein kinase family), CMGC (CMGC / CMGC-like), CK1 (CK1 Ser/Thr protein kinase family. Casein kinase I subfamily.) і CDPK-SNRK (Calcium-dependent protein kinase/Snf1-related protein kinase).

Остаточний перелік протеїнкіназ, здатних до безпосереднього фосфорилування молекул α -, β - і γ -тубуліну на прикладі *A. thaliana*, включає:

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*: SKA1 (CSK21 / At5g67380), SKA2 (CSK22 / At3g50000), SKB1 (CSK2B / At5g47080), SKB2(CSK2C / At4g17640));

ізотип SKL6 (At4g28540) кazeїнкінази 1;

SNF1-споріднені протеїнкінази SnRK1 α – KIN10 (At3g01090) і KIN11 (At3g29160);

NIMA-кіназу NEK6 (At3g20860);

дев'ять Ca^{2+} -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 CDPK/CRK (CRK2 / CAMK2 (At3g19100), CRK3 / CAMK3 (At2g46700) і CRK8 / CAMK8 (At1g49580)) і представника SnAK1-кіназ – GRIK2 (At5g60550).

Узагальнена інформація стосовно визначених протеїнкіназ, що здатні до безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну вищих рослин, представлено в таблиці 9.2 (табл. 9.2, Додаток 7).

Протеїнкінази що були визначені як агенти тубулінового коду рослин на прикладі *Arabidopsis thaliana*

AGC Ser/Thr protein kinase family		
1. IREH1	At3g17850	Protein IRE homolog 1
2. KPK1 / ATPK1 / ATPK6 / S6K1	At3g08730	Serine/threonine-protein kinase AtPK1/AtPK6
3. KPK2 / ATPK2 / ATPK19 / S6K2	At3g08720	Serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19
CMGC/ CMGC-like		
4. CDKA1 / CDC2 / CDKA-1	At3g48750	Cyclin-dependent kinase A-1
5. Yak1 / AtYak1	At5g35980	Dual specificity protein kinase YAK1 homolog
6. CK2	CKA1 (CSK21, At5g67380) CKA2 (CSK22, At3g50000) CKB1 (CSK2B, At5g47080) CKB2 (CSK2C, At4g17640)	Casein kinase II: Casein kinase II subunit alpha-1; Casein kinase II subunit alpha-2; Casein kinase II subunit beta-1; Casein kinase II subunit beta-2
CK1 Ser/Thr protein kinase family. Casein kinase I subfamily.		
7. CKL6 / PAPK1	At4g28540	Casein kinase 1-like protein 6
NEK Ser/Thr protein kinase family. NIMA subfamily.		
8. NEK6	At3g20860	NIMA-kinase Nek6 [533]
CDPK-SnRK Ser/Thr protein kinase family		
9. CPK7 / CDPK7	At5g12480	Calcium-dependent protein kinase 7
10. CPK14 / CDPKE	At2g41860	Calcium-dependent protein kinase 14
11. CPK20 / CDPKK	At2g38910	Calcium-dependent protein kinase 20
12. CPK21 / CDPKL	At4g04720	Calcium-dependent protein kinase 21
13. CPK32/ CDPKW	At3g57530	Calcium-dependent protein kinase 32
14. CRK2	At1g70520	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 2
15. CRK3	At1g70530	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3
16. CRK8	At4g23160	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 8
17. GRIK2	At5g60550	Geminivirus Rep Interacting Kinase 2
18. SNRK1.1 / KIN10	At3g01090	SNF1-related protein kinase SnRK α 1.1
19. SNRK1.2 / KIN11	At3g29160	SNF1-related protein kinase SnRK α 1.2

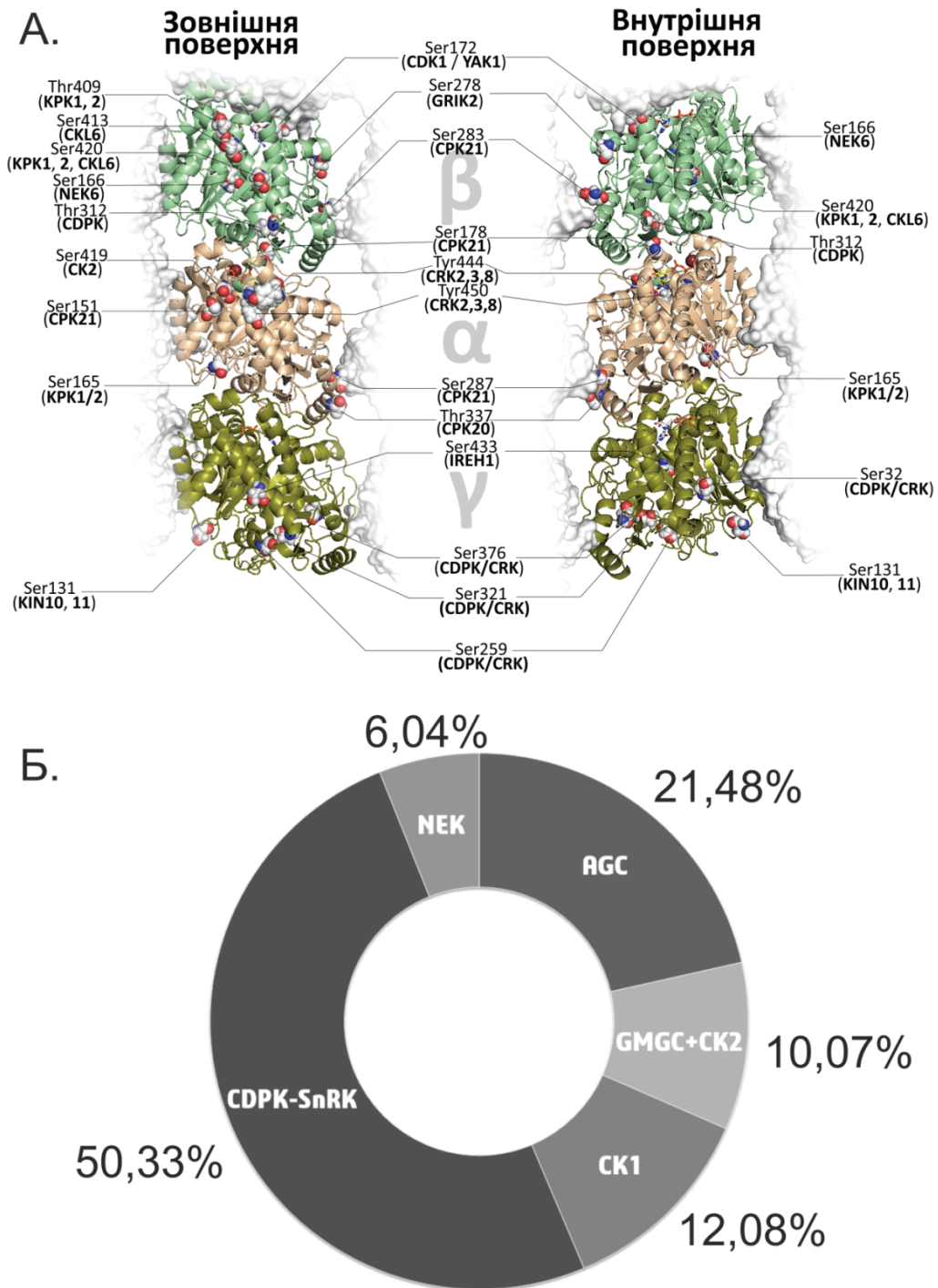


Рис.9.1 Узагальнення внеску фосфорилування в тубуліновий код *A. thaliana*. **А.** Схема розташування сайтів фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну рослин на прикладі структурної моделі фрагменту мікротрубочки *A. thaliana* (зовнішня і внутрішня проекції) і дані стосовно протеїнкіназ, асоційованих із зазначеними модифікаціями. **Б.** Відсоткове співвідношення внеску протеїнкіназ різних груп в тубуліновий код *A. thaliana* з урахуванням кількості сайтів і кількості ізотипів α -, β - і γ -тубуліну.

Узагальнення інформації стосовно цільових сайтів фосфорилування, їх наявність у різних ізотипів рослинного α -, β - і γ -тубуліну і даних стосовно протеїнкіназ, асоційованих із зазначеними модифікаціями, дозволили зробити загальне оцінювання потенційного процентного внеску протеїнкіназ груп AGC, CMGC (CMGC / CMGC-like), CK1, CDPK-SnRK і NEK в регуляцію тубулінового коду вищих рослин (рис. 9.1). Зрозуміло, що наведене узагальнення не враховує низку факторів (рівень експресії, її флуктуації, органоспецифічність та ін.), проте корелює з даними стосовно домінуючої ролі в регуляції рослинних мікротрубочок саме протеїнкіназ супер-родини CDPK-SnRK і Ca^{2+} -залежного фосфорилування [283]. Таким чином, отримані нами дані дозволили виконати найбільш актуальну на початок 2021 року ревізію кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana*, та встановити наявність 1021 протеїнкінази (1022 каталітичних домени) серин-треонінової і дуальної специфічності.

Вперше на прикладі *A. thaliana* встановлено, що у фосфорилуванні рослинного α -, β - і γ -тубуліну беруть участь безпосередньо три протеїнкінази групи AGC (IREN1 / At3g17850, KPK1 / At3g08730 і KPK2 / At3g08720), дві протеїнкінази групи CMGC (CDK1 / At3g48750 і YAK1 / At5g35980) і філогенетично близький гетеротетрамерий холоензим СК2 (субодиниці: СКА1 / At5g67380), СКА2 / At3g50000, СКВ1 CSK2B / At5g47080, СКВ2 / At4g17640), ізотип СКЛ6 (At4g28540) казеїнкінази 1, SNF1-споріднені протеїнкінази KIN10 / At3g01090 і KIN11 / At3g29160, NIMA-протеїнкіназа NEK6 (At3g20860) і дев'ять Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ: 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)), протеїнкіназа CRK8/CAMK8 (At1g49580)) і SnAK1-кіназа GRIK2 (At5g60550).

Надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі вищезазначених протеїнкіназ і цільових сайтів фосфорилування у формуванні

тубулінового коду вищих рослин.

Порівняння отриманих результатів, даних літератури і інформації спеціалізованих баз даних дозволяють стверджувати, що на сьогодні, актуальна ревізія сайтів фосфорилювання рослинного тубуліну і протеїнази, що здійснюють зазначені модифікації, є найбільш повною і не має аналогів у світі.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено вклад фосфорилування у формування тубулінового коду вищих рослин. Під час дослідження була виконана реконструкція повного кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana*, визначено протеїнкінази, які приймають участь у регуляції цитоскелету і клітинного поділу вищих рослин. За результатами комплексного дослідження доведено значний внесок фосфорилування у формування тубулінового коду вищих рослин, як фактору функціональної спеціалізації мікротрубочок. Визначено коло протеїнкіназ, що здійснюють безпосереднє фосфорилування молекул α -, β - і γ -тубуліну, їх сайти і надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі визначених протеїнкіназ і модифікацій молекул тубуліну.

1. Ревізія баз даних і біоінформатичне сканування геному *Arabidopsis thaliana*, визначили, що без врахування продуктів альтернативного сплайсінгу повний кіном *A. thaliana* представлено 1021 (1022 каталітичних домена) протеїнкіназою серин-треонинової і дуальної специфічності, що складає порядку 3.7 % всіх білок-кодуючих генів.

2. Гомологія послідовностей і дані філогенетичного дослідження засвідчили існування рослинних гомологів для 105-ти 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 α), CMGC (родини CDC/CDKX і MNB/DYRK), близької до CMGC підродини SK2, самостійної родини казеїнкінази 1 (підродина SK1), самостійної підродини BUB1, а також, Ca²⁺-залежних (CDPK) і SNF-споріднених (SnRK) протеїнкіназ суперродини 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 (Dyrk1A / MNB / Yak1), які у тварин, дріжджів і комах причетні до регуляції цитоскелету і здатні до безпосереднього фосфорилування тубуліну. Доведено, що протеїнкінази CDKA1 (AT3G48750) і AtYAK1 (AT5G35980) *A. thaliana* конкурують за спільний сайт фосфорилування β -тубуліну за залишком Ser172

4. Підтверджена ідентичність фосфорилування β -тубуліну за залишком Ser172 у ссавців, комах, грибів і вищих рослин, що 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 пов'язаних 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 СК2-залежне фосфорилування α -тубуліну *T. equiperdum* і *A. thaliana* має ідентичний характер і може відбуватися за залишками Ser94 і Ser419. Проте, молекулярна динаміка і показники густини заряду свідчать про те, 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 С-кінцевій частини молекули.

8. Унікальний для рослин амінокислотний залишок Ser433 γ -тубуліну є найбільш вірогідним сайтом IRE-специфічного фосфорилування тубуліну. Ser433 належить до зовнішніх інтерфейсів комплексу γ TuSC і не зачіпляє внутрішні контакти, що зумовлює відсутність впливу на структуру малого кільця. Відсутність аналогічного сайту у ссавців, пояснює, чому, незважаючи на центросомальну локалізацію рослинної IREN1 в клітинах “Vero”, імуноблотінг не визначає взаємодії рослинної протеїнкінази і тваринного γ -тубуліну.

9. Застосування СК1-специфічного інгібітору 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 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 (СКЛ1 δ), 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)-1Н-імідазол-2-іл]бензамід), але при цьому, ефект 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 β -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 підтверджено існування канонічних сайтів CaMK2-залежного фосфорилування β - і γ -тубуліну *A. thaliana*: Ser32, Ser259, Ser321 і Ser376 у випадку γ -тубуліну і Thr312 у випадку β -тубуліну. Топологія Thr312 підтверджує участь зазначеної амінокислоти β -тубуліну в формуванні інтрадимерного контакту гетеродимеру α/β -тубуліну, а сайти фосфорилування γ -тубуліну причетні до регуляції міжмолекулярної взаємодії гетеротетрамерного комплексу γ TuSC рослинного центра первинної нуклеації мікротрубочок.

12. Профільний пошук, структурна топологія і спільна кластеризація 494-х експериментально-підтверджених сайтів і потенційних сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну *A. thaliana*, визначили Thr337, Ser287, Ser178 α -тубуліну і Ser283 β -тубуліну, як сайти Ca^{2+} -залежної регуляції латеральної взаємодії протофіламентів мікротрубочки, а протеїнкінази CPK20 (At2g38910) і CPK21 (AT4G04720) як найбільш імовірних агентів зазначених модифікацій. Водночас, Ser251 α -тубуліну визначено як сайт CPK-залежної регуляції взаємодії з асоційованими білками, а Ser278/279 β -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 атипового CDPK/CRK-залежного фосфорилування Tyr444/443 і Tyr450/449 ізотипів TBB2, TBB3 і TBB7 β -тубуліну, визначив їх розташування на зовнішньої поверхні мікротрубочок. С-кінцева локалізація і позаглобулярне розташування підтверджують відсутність безпосереднього впливу цих сайтів на структуру мікротрубочок, що вказує на те, що найбільш імовірним функціональним призначенням зазначених модифікацій є формування унікальних інтерфейсів взаємодії з БАМ. Це визначає рослинні Ca^{2+} -залежні протеїнкінази CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) як агентів тубулінового коду віщих рослин.

14. Біоінформатичне дослідження, молекулярно-генетичний аналіз, дані флуоресцентної мікроскопії, а також, 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 γ -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 α (KIN10 і KIN11), експериментів із застосуванням нокаутних ліній *KIN10^{KO}* і *KIN11^{KO}* і рослин *A. thaliana* дикого генотипу «Col-0», а також модельних систем с 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 γ -тубуліну і KIN10.

16. Узагальнений мотив, що було складено на підставі 42-х експериментально підтверджених сайтів BRSK1/2-специфічного фосфорилування, дозволив визначити сайти Snf1-специфічного фосфорилування у 204-х цитоскелетних білків *A. thaliana*. Консенсусні ділянки було знайдено у випадку сайту Ser131 γ -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 вклад SnRK1 α -специфічного фосфорилування в регуляцію системи мікротрубочок вищих рослин і визначає рослинні протеїнкінази KIN10 і KIN11 як агентів тубулінового коду.

17. На прикладі *A. thaliana* встановлено, що безпосередня участь у фосфорилуванні рослинного α -, β - і γ -тубуліну, належить трьом протеїнкіназам групи AGC: родина IRE - IREN1 (At3g17850) і родина S6K - KPK1 (S6K1 / At3g08730) і KPK2 (S6K2 / At3g08720); двом протеїнкіназам групи CMGC - CDK1 (CDKA1 / At3g48750) і YAK1 (At5g35980) і філогенетично близькому гетеротетрамерному холоензиму СК2 (субодиниці: СКА1 (CSK21 / At5g67380), СКА2 (CSK22 / At3g50000), СКВ1 (CSK2B / At5g47080), СКВ2(CSK2C / At4g17640)); ізотипу СКЛ6 (At4g28540) казеїнкінази 1; SNF1-спорідненим протеїнкіназам SnRK1 α - KIN10 (At3g01090) і KIN11 (At3g29160); NIMA-кіназі НЕК6 (At3g20860); дев'яти Са²⁺-залежним протеїнкіназам, що були визначені на підставі біоінформатичного дослідження - п'яти представникам родини СРК (СРК7 / At5g12480, СРК14 / At2g41860, СРК20 / At2g38910, СРК21 / AT4G04720, СРК32 / At3g57530), трьом представникам родини СДПК/СРК (СРК2 / САМК2 (At3g19100), СРК3 / САМК3 (At2g46700) і СРК8 / САМК8 (At1g49580)) і SnAK1-кіназі GRIK2 (At5g60550).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abeyweera TP, Chen X, Rotenberg SA. Phosphorylation of alpha6-tubulin by protein kinase Calpha activates motility of human breast cells. *J Biol Chem* 2009; 284 (26): 17648-17656.
2. Adachi S, Minamisawa K, Okushima Y, Inagaki S, Yoshiyama K, Kondou Y, Kaminuma E, Kawashima M, Toyoda T, Matsui M, Kurihara D, Matsunaga S, Umeda M. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 10004–10009.
3. Albornoz A, Yáñez JM, Foerster C, Aguirre C, Pereiro L, Burzio V, Moraga M, Reyes AE, Antonelli M. The CK1 gene family: expression patterning in zebrafish development. *Biol Res*. 2007; 40: 251–266.
4. Aletta JM. Phosphorylation of type III beta-tubulin PC12 cell neurites during NGF-induced process outgrowth. *J Neurobiol*. 1996; 31: 461–475.
5. Allimuthu E, Dalal M, Kumar KG, Sellathurai D, Kumar RR, Sathee L, Chinnusamy V. Characterization of Atypical Protein Tyrosine Kinase (PTK) Genes and Their Role in Abiotic Stress Response in Rice. *Plants (Basel)*. 2020 May 23;9(5):664.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215 (3): 403-410.
7. Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, Zhang R, Baker D, Nogales E. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell*. 2014; 157 (5): 1117-1129.
8. Alvarado-Kristensson M, Rodríguez MJ, Silió V, Valpuesta JM, Carrera AC. SADB phosphorylation of γ -tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell Biol*. 2009; 11: 1081–1092.

9. Alvarez-Fernandez M, Sanchez-Martinez R, Sanz-Castillo B. et al. Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 17374–17379.
10. Andreeva A, Howorth D, Chandonia J-M, Brenner SE, Hubbard TJP, Chothia C, Murzin AG. Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: 419–425.
11. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9 (10): 747-58
12. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2000; 408 (6814): 796-815.
13. Aranda S, Laguna A, de la Luna S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J*. 2011; 25 (2): 449-462.
14. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2017; 40 (2): 271-280.
15. Arencibia JM, Pastor-Flores D, Bauer AF, Schulze JO, Biondi RM. AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1834: 1302–1321.
16. Arkun Y, Yasemi M. Dynamics and control of the ERK signaling pathway: Sensitivity, bistability, and oscillations. *PLoS One*. 2018; 13 (4): e0195513.
17. Telles GP, Araújo GS, Walter MEMT, Brigido MM, Almeida NF. Live neighbor-joining. *BMC Bioinformatics*. 2018 May 16;19 (1):172.
18. Aud DE, Peng SL-Y. Methods of treating inflammatory diseases. 2008 (Jun.19, 2008); US 2008/0146617 A1.

19. Ayoub AT, Craddock TJA, Klobukowski M, Tuszynski J. Analysis of the strength of interfacial hydrogen bonds between tubulin dimers using quantum theory of atoms in molecules. *Biophys J*. 2014; 107 (3): 740-750.
20. Baba AI, Rigó G, Ayaydin F, Rehman AU, András N, Zsigmond L, Valkai I, Urbancsok J, Vass I, Pasternak T, Palme K, Szabados L, Cséplő Á. Functional Analysis of the *Arabidopsis thaliana* CDPK-Related Kinase Family: AtCRK1 Regulates Responses to Continuous Light. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (5): 1282.
21. Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo B-C, Harmon AC, Huber SC. Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cel*. 1996; 8 (3): 505–517.
22. Baillie BK, Belda-Baillie CA, Maruyama T. A calcium-dependent protein kinase functions in wound healing in *Ventricaria ventricosa* (Chlorophyta). *J Phycol*. 2000; 36: 1145-1152.
23. Bairoch A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28 (1): 304-305.
24. Balcells L. Tair «Protocol:501683666»: A METHOD FOR STERILISING ARABIDOPSIS SEED. 2002: ftp://ftp.arabidopsis.org/Protocols/compleat_guide/1_seed-steri_hand.pdf.
25. Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294 (3): 997-1008.
26. Bandyopadhyay M, Bishop CP, Bidwai AP. The Conserved MAPK Site in E(spl)-M8, an Effector of *Drosophila* Notch Signaling, Controls Repressor Activity during Eye Development. *PLoS One*. 2016; 11 (7): e0159508.
27. Bao Y, Kost B, Chua NH. Reduced expression of alpha-tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J*. 2001; 28: 145–157.

28. Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Fauré S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase I. *J Biol Chem.* 2006; 281 (28): 19561-19569.
29. Barisic M, Maiato H. The Tubulin Code: A Navigation System for Chromosomes during Mitosis. *Trends Cell Biol.* 2016; 26 (10): 766-775.
30. Barlow PW, Baluska F. Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 2000; 51: 289-322.
31. Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, Plummer LJ, Powell AW, Raines AN, Sanes JR, Polleux F. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell.* 2007; 129 (3): 549-63
32. Baron R, Computational Drug Discovery and Design. *Meth Mol. Biol.* Springer, 2012; 819: 628p.
33. Barra HS, Rodriguez JA, Arce CA, Caputto R. A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem.* 1973; 20 (1): 97-108.
34. Barrada A, Montané MH, Robaglia C, Menand B. Spatial regulation of root growth: placing the plant TOR pathway in a developmental perspective. *Int J Mol Sci.* 2015; 16 (8): 19671-19697.
35. Bauer M, Cubizolles F, Schmidt A, Nigg EA. Quantitative analysis of human centrosome architecture by targeted proteomics and fluorescence imaging. *EMBOJ.* 2016; 35: 2152–2166.
36. Bayascas JR. PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 346: 9-29.
37. Becker W, Weber Y, Wetzelschöffer K, Eirambter K, Tejedor FJ, Joost HG. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-

related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem*. 1998; 273 (40): 25893-902.

38. Becker W, Joost HG. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1999; 62:1-17.

39. Becker W, Sippl W. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J*. 2011; 278 (2): 246-56.

40. Becker W. Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle*. 2012; 11 (18): 3389-94.

41. Xu P, Ianes C, Gärtner F, Liu C, Burster T, Bakulev V, Rachidi N, Knippschild U, Bischof J. Structure, regulation, and (patho-)physiological functions of the stress-induced protein kinase CK1 delta (CSNK1D). *Gene*. 2019; 715:144005.

42. Benkert P, Künzli M, Schwede T. QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucl Acids Res*. 2009; 37: 510-514.

43. Ben-Nissan G, Cui W, Kim D-J, Yang Y, Yoo B-C, Lee J-Y. Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. *Plant Physiol*. 2008; 148: 1897-1907.

44. Ben-Nissan G, Yang Y, Lee JY. Partitioning of casein kinase 1-like 6 to late endosome-like vesicles. *Protoplasma*. 2010; 240: 45–56.

45. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(Database issue): D36-D42.

46. Berger F, Hung C-Y, Dolan L, Schiefelbein J. Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Developm Biol*. 1998; 194 (2): 235-245.

47. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (Web Server issue): W252-8.

48. Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol.* 2004; 186 (3): 595-600.
49. Bharucha N, Ma J, Dobry CJ, Lawson SK, Yang Z, Kumar A. Analysis of the yeast kinome reveals a network of regulated protein localization during filamentous growth. *Mol Biol Cell.* 2008 Jul; 19(7): 2708-17. DOI: 10.1091/mbc.e07-11-1199.
50. Bianchi MW, Guivarc'h D, Thomas M, Woodgett JR, Kreis M. Arabidopsis homologs of the shaggy and GSK-3 protein kinases: molecular cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1994; 242 (3): 337-45.
51. Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1999; 17: 657-665.
52. Bienert S, Waterhouse A, de Beer TA, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL repository - new features and functionality. *Nucl. Acids Res.* 2017; 45 (D1): D313-D319.
53. Billker O, Lourido S, Sibley LD. Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites. *Cell Host and Microbe.* 2009; 5: 612-622.
54. Binder JX, Pletscher-Frankild S, Tsafou K, Stolte C, O'Donoghue SI, Schneider R, Jensen LJ. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database (Oxford).* 2014; 2014: bau012.
55. Biro JC. Amino acid size, charge, hydropathy indices and matrices for protein structure analysis. *Theor Biol and Med Model.* 2006; 3 (15): doi: 10.1186/1742-4682-3-15.
56. Black MM, Keyser P. Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor. *J Neurosci.* 1987; 7 (6): 1833-42
57. Blume Y, Yemets A, Sheremet Y, Nyporko A, Sulimenko V, Sulimenko T, Dráber P. Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on an *Arabidopsis*

thaliana microtubule protofilament model and in the cells. BMC Plant Biol. 2010; 10: 29.

58. Blume Y, Yemets A, Sulimenko V, Sulimenko T, Chan J, Lloyd C, Dráber P. Tyrosine phosphorylation of plant tubulin. Planta. 2008; 229 (1): 143-50.

59. Blume YB, Lloyd CW, Yemets AI. Plant Tubulin Phosphorylation And Its Role In Cell Cycle Progression. In: Blume YB, Baird WV, Yemets AI, Breviaro D. (eds) The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer, Dordrecht. 2008: 145-159.

60. Blume Ya, Smertenko A, Ostapets NN, Viklicky V, Draber P. Post-translational modifications of plant tubulin. Cell Biol. Int. 1997; 21: 918-920.

61. Blume YB, Krasylenko YA, Demchuk OM, Yemets AI. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. Front Plant Sci. 2013; 4: 530.

62. Bögre L, Ökrész L, Henriques R, Anthony RG. Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. Trends Plant Sci. 2003; 8: 424-431.

63. Bolanos-Garcia VM, Kiyomitsu T, D'Arcy S, Chirgadze DY, Grossmann JG, Matak-Vinkovic D, Venkitaraman AR, Yanagida M, Robinson CV, Blundell TL. The Crystal Structure of the N-Terminal Region of BUB1 Provides Insight into the Mechanism of BUB1 Recruitment to Kinetochores. 2009; Structure 17: 105–116.

64. Boscán BE, Uzcanga GL, Calabokis M, Camargo R, Aponte F, Bubis J. Interaction of tubulin and protein kinase CK2 in *Trypanosoma equiperdum*, *Z Naturforsch C*. 2017: pii:/j/znc.ahead-of-print/znc-2017-0019/znc-2017-0019.xml.

65. Bossemeyer D, Engh RA, Kinzel V, Ponstingl H, Huber R. Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). EMBO J. 1993; 12 (3): 849-859.

66. Boucher D, Larcher JC, Gros F, Denoulet P. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry*. 1994; 33 (41): 12471-12477.
67. Bradley D, Beltrao P. Evolution of protein kinase substrate recognition at the active site. *PLoS Biol*. 2019; 17 (6): e3000341.
68. Bré MH, Redeker V, Vinh J, Rossier J, Levilliers N. Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in paramecium. *Mol Biol Cell*. 1998; 9 (9): 2655-2665.
69. Breviario D. Tubulin genes and promoters. In: *Microtubular and cytoskeleton mutants* / D. Breviario // In: Nick, P. (Ed). *Plant Microtubules*. 2000: 137–157.
70. Bright NJ, Carling D, Thornton C. Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008;283(22):14946-54.
71. Broad Institute of Harvard and MIT, *Phytophthora infestans* Sequencing Project. 2010; <http://www.broadinstitute.org>.
72. Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009; 30: 1545-1614.
73. Bryantseva SA, Gavryushina ES, Yemets AI, Karpov PA, YaB Blume, Drygin YuF, Nadezhdina ES. MAST2-like protein kinase from grape *Vitis vinifera*: cloning of catalytic domain cDNA. *Cytol Genet*. 2010; 44: 227–232.
74. Bu Q, Zhu L, Dennis MD, Yu L, Lu SX, Person MD, Tobin EM, Browning KS, Huq E. Phosphorylation by CK2 enhances the rapid light-induced degradation of

phytochrome interacting factor 1 in Arabidopsis. *J Biol Chem*. 2011; 286 (14): 12066-12074.

75. Bullock AN, Das S, Debreczeni JE, Rellos P, Fedorov O, Niesen FH, Guo K, Papagrigoriou E, Amos AL, Cho S, Turk BE, Ghosh G, Knapp S. Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation. *Structure*. 2009; 17 (3): 352-62.

76. Burakov A, Kovalenko O, Semenova I, Zhapparova O, Nadezhkina E, Rodionov V. Cytoplasmic dynein is involved in the retention of microtubules at the centrosome in interphase cells. *Traffic*. 2008; 9: 472–480.

77. Burgess A, Vigneron S, Brioudes E, Labbe JC, Lorca T, Castro A. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 12564–12569.

78. Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, Markley JL, Nakamura H, Velankar S. Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Methods Mol Biol*. 2017; 1607: 627-641.

79. Buxbaum E. *Fundamentals of Protein Structure and Function* (2nd edition). Basel: Springer; 2015. 537 p.

80. Cabral D, Banora MY, Antonino JD, Rodiuc N, Vieira P, Coelho RR, Chevalier C, Eekhout T, Engler G, De Veylder L, Grossi-de-Sa MF, de Almeida Engler J. The plant WEE1 kinase is involved in checkpoint control activation in nematode-induced galls. *New Phytol*. 2020; 225 (1): 430-447.

81. Caillaud MC, Paganelli L, Lecomte P, Deslandes L, Quentin M, Pecrix Y, Le Bris M, Marfaing N, Abad P, Favery B. Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. *PLoS One*. 2009; 4 (8): e6757.

82. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998; 392 (6673): 300-303.
83. Carman CV, Som T, Kim CM, Benovic JL. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem*. 1998; 273 (32): 20308-20316.
84. Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21 (6): 796-805.
85. Carneiro AC, Fragel-Madeira L, Silva-Neto MA, Linden R. A role for CK2 upon interkinetic nuclear migration in the cell cycle of retinal progenitor cells. *Dev Neurobiol*. 2008; 68 (5): 620-31.
86. Carrera P, Moshkin YM, Gronke S, Sillje HH, Nigg EA, Jackle H, Karch F. Tousled-like kinase functions with the chromatin assembly pathway regulating nuclear divisions. *Genes Dev*. 2003; 17 (20): 2578-90.
87. Carrino M, Quotti Tubi L, Fregnani A, Canovas Nunes S, Barilà G, Trentin L, Zambello R, Semenzato G, Manni S, Piazza F. Prosurvival autophagy is regulated by protein kinase CK1 alpha in multiple myeloma. *Cell Death Discov*. 2019; 5: # 98.
88. Castilho PV, Williams BC, Mochida S, Zhao Y, Goldberg ML. The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Mol Biol Cell*. 2009; 20: 4777-4789.
89. Caudron F, Denarier E, Thibout-Quintana JC, Brocard J, Andrieux A, Fourest-Lieuvin A. Mutation of Ser172 in yeast β tubulin induces defects in microtubule dynamics and cell division. *PLoS One*. 2010 Oct 21;5(10):e13553.
90. Cegielska A, Gietzen KF, Rivers A, Virshup DM. Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J Biol Chem*. 1998; 273: 1357–1364.

91. Chaffey N, Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. Molecular biology of the cell. 4th edn. Ann Bot. 2003; 91 (3): 401. DOI: 10.1093/aob/mcg023.
92. Champion A, Kreis M, Mockaitis K, Picaud A, Henry Y. *Arabidopsis* kinome: after the casting. // *Funct. Integr. Genomics*. 2004; 4: 163-187.
93. Chen D, Vogel J. SAD kinase keeps centrosomes lonely. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11 (9): 1047–1048.
94. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010; 66 (Pt 1): 12-21.
95. Chen Y, Choong LY, Lin Q, Philp R, Wong CH, Ang BK, Tan YL, Loh MC, Hew CL, Shah N, Druker BJ, Chong PK, Lim YP. Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6 (12): 2072-2087.
96. Cheong JK, Virshup DM. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 201; 43 (4): 465-469.
97. Cheong JK, Zhang F, Chua PJ, Bay BH, Thorburn A, Virshup DM. Casein kinase 1 α -dependent feedback loop controls autophagy in RAS-driven cancers. *J Clin Invest.* 2015; 125 (4): 1401-1418.
98. Chevrier V, Piel M, Collomb N, Saoudi Y, Frank R, Paintrand M, Narumiya S, Bornens M, Job D. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J Cell Biol.* 2002; 157: 807–817.
99. Chiang CP, Li CH, Jou Y, Chen YC, Lin YC, Yang FY, Huang NC, Yen HE. Suppressor of K⁺ transport growth defect 1 (SKD1) interacts with RING-type ubiquitin ligase and sucrose non-fermenting 1-related protein kinase (SnRK1) in the halophyte ice plant. *J Exp Bot.* 2013; 64 (8): 2385–2400.

100. Cho H.Y., Wen T.N., Wang Y.T., Shih M.C. Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in *Arabidopsis* under submergence // J. Exp. Bot. – 2016. – 67, № 9. – P. 2745–2760.

101. Cho YH, Hong JW, Kim EC, Yoo SD. Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. Plant Physiol. 2012 Apr;158(4):1955-64.

102. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987; 162 (1): 156-159.

103. Chudinova EM, Karpov PA, Fokin AI, Yemets AI, Lytvyn DI, Nadezhdina ES, Blume YB. MAST-like protein kinase IREH1 from *Arabidopsis thaliana* co-localizes with the centrosome when expressed in animal cells. Planta. 2017; 246 (5): 959–969.

104. Chudinova EM, Nadezhdina ES, Ivanov PA. Cellular acidosis inhibits assembly, disassembly, and motility of stress granules. Biochemistry (Mosc). 2012; 77: 1277–1284.

105. Claverie J-M, Notredame C. Bioinformatics for dummies, 2nd Ed. New York: Wiley Publishing, 2007; 457p.

106. Collins TJ. ImageJ for microscopy. Biotechniques. 2007; 43 (1): 25–30.

107. Cormier A, Marchand M, Ravelli RB, Knossow M, Gigant B. Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands. EMBO Rep. 2008; 9 (11): 1101–1106.

108. Cozza G, Gianoncelli A, Montopoli M, Caparrotta L, Venerando A, Meggio F, Pinna LA, Zagotto G, Moro S. Identification of novel protein kinase CK1 delta (CK1delta) inhibitors through structure-based virtual screening. Bioorg Med Chem Lett. 2008; 18: 5672–5675.

109. Craddock TJ, Tuszynski JA, Hameroff S. Cytoskeletal signaling: is memory encoded in microtubule lattices by CaMKII phosphorylation? *PLoS Comput Biol.* 2012;8(3):e1002421.

110. Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem.* 2006 Apr 21; 281 (16): 10825-38.

111. Crisanto G. The *Arabidopsis* cell division cycle. *Arabidopsis Book,* 2009;7:e0120.

112. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* 2004; 14: 1188-1190.

113. Crozet P., Margalha L., Butowt R., Fernandes N., Elias C.A., Orosa B., Tomanov K., Teige M., Bachmair A., Sadanandom A., Baena-González E. SUMOylation represses SnRK1 signaling in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2016; 85 (1): 120–133.

114. Crozet P, Jammes F, Valot B, Ambard-Bretteville F, Nessler S, Hodges M, Vidal J, Thomas M. Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J Biol Chem.* 2010; 285: 12071-12077.

115. Cui W., Liu W., Wu G. A simple method for the transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by foreign DNA // *Chin. J. Biotechnol.* – 1995. – 11, № 4. – P. 267–274.

116. Dai C, Xue H-W. Rice EARLY FLOWERING1, a CKI, Phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signaling. *EMBO J.* 2010; 29: 1916–1927.

117. Dardick C, Chen J, Richter T, Ouyang S, Ronald P. The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol.* 2007 Feb;143(2):579-86.

118. Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery studio modeling environment, release 2017. San Diego: Dassault Systèmes; 2016.

119. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB III, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucl Acids Res.* 2007; 35: ww.375-383.

120. De S, Tsimounis A, Chen X, Rotenberg SA. Phosphorylation of α -tubulin by protein kinase C stimulates microtubule dynamics in human breast cells. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2014 Apr; 71 (4): 257-72.

121. 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.

122. Dennis MD, Browning KS. Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by *Arabidopsis thaliana* CK2 holoenzymes. *J Biol Chem.* 2009; 284 (31): 20602-14.

123. Dhillon N, Hoekstra MF. Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J.* 1994; 13: 2777–2788.

124. Di Blasio L, Gagliardi PA, Puliafito A, Primo L. Serine/Threonine Kinase 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 (PDK1) as a Key Regulator of Cell Migration and Cancer Dissemination. *Cancers (Basel).* 2017; 9 (3): 25.

125. Díaz-Nido J, Armas-Portela R, Avila J. Increase in cytoplasmic casein kinase II-type activity accompanies neurite outgrowth after DNA synthesis inhibition in NIA-103 neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 1992; 58 (5): 1820-8.

126. Diella F, Gould CM, Chica C, Via A, Gibson T. Phospho. ELM: a database of phosphorylation sites – update. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: 240–254.
127. Dobles M, Liberal V, Scott ML, Benezra R, Sorger PK. 2000. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101: 635–645.
128. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J Am Chem Soc.* 2003; 125 (7): 1731-1737.
129. Doerner PW. Cell Cycle Regulation in Plants. *Plant Physiol.* 1994; 106 (3): 823-827.
130. Doonan JH, Kitsios G. Functional evolution of cyclin-dependent kinases. *Mol Biotechnol.* 2009 May;42(1):14-29.
131. Drewes G, Ebneith A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 1997 Apr 18;89(2):297-308.
132. Duckett, C. M. and C. Lloyd. Gibberellic acid-induced microtubule reorientation in dwarf peas is accompanied by rapid modification of an α -tubulin isotype. *Plant Journal.* 1994; 5: 363-372.
133. Duong-Ly KC, Peterson JR. The human kinome and kinase inhibition. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013 Mar;Chapter 2:Unit2.9.
134. Durek P, Schmidt R, Heazlewood JL, Jones A, MacLean D, Nagel A, Kersten B, Schulze WX. PhosPhAt: the *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D828-34.
135. Easley CA, Faison MO, Kirsch TL, Lee JA, Seward ME, Tombes RM. Laminin activates CaMK-II to stabilize nascent embryonic axons. *Brain Res.* 2006; 1092 (1): 59–68.

136. Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (23): 13429-13434.

137. Eipper BA. Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972; 69 (8): 2283-2287.

138. Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Meth. Enzymol*. 1997; 277: 396-404.

139. Eklund G, Lang S, Glindre J, Ehlén Å, Alvarado-Kristensson M. The nuclear localization of γ -tubulin is regulated by SadB-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 2014; 289 (31): 21360–21373.

140. Elbert M, Rossi G, Brennwald P. The yeast par-1 homologs kin1 and kin2 show genetic and physical interactions with components of the exocytic machinery. *Mol Biol Cell*. 2005; 16 (2): 532–549.

141. Elmore ZC, Guillen RX, Gould KL The kinase domain of CK1 enzymes contains the localization cue essential for compartmentalized signaling at the spindle pole. *Mol. Biol. Cell*. 2018; 29 (13): 1664-1674.

142. Eramian D, Shen MY, Devos D, Melo F, Sali A, Marti-Renom MA. A composite score for predicting errors in protein structure models. *Protein Sci*. 2006; 15 (7): 1653-66.

143. Eswar, N., Marti-Renom, M.A., Webb, B., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., et al. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Cur. Prot. in Bioinform.*, John Wiley & Sons, Inc., 2006, Sup. 15, 5.6.1-5.6.30.

144. Faruki S, Geahlen RL, Asai DJ. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci*. 2000 Jul;113 (Pt 14):2557-65.

145. Faust RA, Niehans G, Gapany M, Hoistad D, Knapp D, Cherwitz D, Davis A, Adams GL, Ahmed K. Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in normal and carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999; 31 (9): 941-9.

146. Fernandez-Fuentes N, Zhai J, Fiser A. ArchPRED: a template based loop structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34 (Web Server issue): W173-6.

147. Fernandez JA, Keshvara LM, Peters JD, Furlong MT, Harrison ML, Geahlen RL. Phosphorylation- and activation-independent association of the tyrosine kinase Syk and the tyrosine kinase substrates Cbl and Vav with tubulin in B-cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 1401–1406.

148. Ferreira LT, Figueiredo AC, Orr B, Lopes D, Maiato H. Dissecting the role of the tubulin code in mitosis. *Methods Cell Biol.* 2018; 144: 33-74.

149. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, et al. InterPro in 2017 - beyond protein family and domain annotations. *Nucl. Acids Res.* 2017; 45 (D 1): 190-199.

150. Fischer NM, van Maaren PJ, Ditz JC, Yildirim A, van der Spoel D. Properties of Organic Liquids when Simulated with Long-Range Lennard-Jones Interactions. *J Chem Theory Comput.* 2015; 11 (7): 2938-44.

151. Flaherty DB, Soria JP, Tomasiewicz HG, Wood JG. Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3b and cdk5 are key participants. *J Neurosci Res.* 2000; 62: 463–472.

152. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 2010; 463 (7280): 485–492.

153. Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantez V, Job D. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell.* 2006 Mar;17(3):1041-50.

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

155. Franker MA, Hoogenraad CC. Microtubule-based transport - basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 11):2319-29.
156. Friedman DB, Kern JW, Huneycutt BJ, Vinh DB, Crawford DK, Steiner E, Scheiltz D, Yates J 3rd, Resing KA, Ahn NG, Winey M, Davis TN. Yeast Mps1p phosphorylates the spindle pole component Spc110p in the N-terminal domain. *J Biol Chem.* 2001; 276 (21): 17958-67.
157. Friedman E. Mirk/Dyrk1B in cancer. *J Cell Biochem.* 2007 Oct 1;102(2):274-9.
158. Fujita S, Pytela J, Hotta T, Kato T, Hamada T, Akamatsu R, Ishida Y, Kutsuna N, Hasezawa S, Nomura Y, Nakagami H, Hashimoto T. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2013; 23 (20): 1969-78.
159. Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem.* 2009 May; 109(3): 683-93.
160. Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci.* 2017; 130 (8): 1347-1353.
161. Gambino G, Perrone I, Gribaudo I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal.* 2008; 19 (6): 520-525.
162. Gamburg OL, Eveleigh DE. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968; 46: 417-421.
163. Gandhi MJ, Cummings CL, Drachman JG. FLJ14813 missense mutation: a candidate for autosomal dominant thrombocytopenia on human chromosome 10. *Hum. Hered.* 2003; 55: 66-70.

164. Gao J, Agrawal GK, Thelen JJ, Xu D. P3DB: a plant protein phosphorylation database. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue): D960-2.
165. Garcia AV, Al-Yousif M, Hirt H. Role of AGC kinases in plant growth and stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69 (19): 3259-3267.
166. Gard DL, Kirschner MW. A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol.* 1985 Mar;100(3):764-74.
167. Gardiner J, Barton D, Marc J, Overall R. Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia. *Traffic.* 2007 Sep;8(9):1145-9.
168. Gardiner J, Overall R, Marc J. PDZ domain proteins: 'dark matter' of the plant proteome? *Mol Plant.* 2011; 4 (6): 933-937.
169. Garland P, Quraishe S, French P, O'Connor V. Expression of the MAST family of serine/threonine kinases. *Brain Res.* 2008; 1195: 12-19.
170. Garrett S, Broach J. Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAKI, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 1989; 3 (9): 1336-48.
171. Geue S, Aurbach K, Manke MC, Manukjan G, Münzer P, Stegner D, Brähler C, Walker-Allgaier B, Märklin M, Borst CE, Quintanilla-Fend L, Rath D, Geisler T, Salih HR, Seizer P, Lang F, Nieswandt B, Gawaz M, Schulze H, Pleines I, Borst O. Pivotal role of PDK1 in megakaryocyte cytoskeletal dynamics and polarization during platelet biogenesis. *Blood.* 2019; 134 (21): 1847-1858.
172. Gfeller D, Michielin O, Zoete V. SwissSidechain: a molecular and structural database of non-natural sidechains. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (Database issue): D327-32.
173. Ghelis T. Signal processing by protein tyrosine phosphorylation in plants. *Plant Signal Behav.* 2011; 6 (7): 942-51.

174. Goldberg JM, Manning G, Liu A, Fey P, Pilcher KE, Xu Y, Smith JL. The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS Genet.* 2006 Mar;2(3):e38.

175. Gonzalez D, Bowen AJ, Carroll TS, Conlan RS. The transcription corepressor LEUNIG interacts with the histone deacetylase HDA19 and mediator components MED14 (SWP) and CDK8 (HEN3) to repress transcription. *Mol Cell Biol.* 2007;27(15):5306-15.

176. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977; 36 (1): 59-74.

177. Grant TJ, Mehta AK, Gupta A, Sharif AAD, Arora KS, Deshpande V, Ting DT, Bardeesy N, Ganem NJ, Hergovich A, Singh A. STK38L kinase ablation promotes loss of cell viability in a subset of KRAS-dependent pancreatic cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017; 8 (45): 78556-78572.

178. Graves PR, Haas DW, Hagerdon CH, DePaoli-Roach AA, Roach PJ. Molecular cloning, expression and characterization of a 49 kDa casein kinase I isoform from rat testis. *J Biol Chem.* 1993; 268: 6394–6401.

179. Graves PR, Roach PJ. Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase Id. *J Biol Chem.* 1995; 270: 21689–21694.

180. Gross C, Heumann R, Erdmann KS. The protein kinase C-related kinase PRK2 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via a novel PDZ domain binding motif. *FEBS Lett.* 2001; 496 (2-3): 101-104.

181. Gross SD, Anderson RA. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal.* 1998; 10: 699–711.

182. Gu J, Bourne PE. *Structural Bioinformatics*, 2nd Ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2009; 1035p.

183. Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scharfe C, Davis RW, Li WH. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*. 2003 Jan 2; 421 (6918):63-6.
184. Guen VJ, Gamble C, Perez DE, Bourassa S, Zappel H, Gärtner J, Lees JA, Colas P. STAR syndrome-associated CDK10/Cyclin M regulates actin network architecture and ciliogenesis. *Cell Cycle*. 2016; 15 (5): 678-88.
185. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997; 18: 2714-2723.
186. Guo L, Ho CM, Kong Z, Lee YR, Qian Q, Liu B. Evaluating the microtubule cytoskeleton and its interacting proteins in monocots by mining the rice genome. *Ann Bot*. 2009 Feb;103(3):387-402.
187. Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A. A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*. 2006; 441 (7093): 646-50.
188. Haga K, Ogawa H, Haga T, Murofushi H. GTPbinding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin. *Eur J Biochem*. 1998; 255: 363–368.
189. Hain D, Langlands A, Sonnenberg HC, Bailey C, Bullock SL, Müller HA. The *Drosophila* MAST kinase drop out is required to initiate membrane compartmentalisation during cellularisation and regulates dynein-based transport. *Development*. 2014; 141: 2119–2130.
190. Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang YH. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Botany*. 2003; 54: 467–475.

191. Halford NG, Hey SJ. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J.* 2009;419(2):247-59.

192. Hamada T. Microtubule-associated proteins in higher plants. *J Plant Res.* 2007; 120: 79-98.

193. Hämmerle B, Elizalde C, Galceran J, Becker W, Tejedor FJ. The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J Neural Transm Suppl.* 2003; (67): 129-37.

194. Han J, Miranda-Saavedra D, Luebbering N, Singh A, Sibbet G, Ferguson MA, Cleghon V. Deep evolutionary conservation of an intramolecular protein kinase activation mechanism. *PLoS One.* 2012; 7 (1): e29702.

195. Hanada K, Zou C, Lehti-Shiu MD, Shinozaki K, Shiu SH. Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant Physiol.* 2008 Oct; 148(2): 993-1003.

196. Hanif IM, Hanif IM, Shazib MA, Ahmad KA, Pervaiz S. Casein Kinase II: an attractive target for anti-cancer drug design. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42 (10): 1602-5.

197. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):42-52.

198. Hanks, S.K., Quinn, A.M. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members, *Meth. Enzymol.*, 1991, vol. 200, pp. 38–62.

199. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995; 9 (8): 576-96.

200. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* 2011 Sep 15;25(18):1895-908.
201. Hardie DG. Peptide assay of protein kinases and use of variant peptides to determine recognition motifs. *Methods Mol Biol.* 2000; 99: 191-201.
202. Hardie DG. PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 Jun;50:97-131.
203. Hardwick KG, Johnston RC, Smith DL, Murray AW. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol.* 2000; 148 (5): 871-82.
204. Harmon AC. Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravitat. Space Biol. Bulletin.* 2003; 16 (2): 83-90.
205. Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF. The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist.* 2001; 151: 175-183.
206. Hendrickx JO, van Gastel J, Leysen H, Santos-Otte P, Premont RT, Martin B, Maudsley S. GRK5 - A Functional Bridge Between Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1484.
207. Hettenhausen C, Schuman MC, Wu J. MAPK signaling: a key element in plant defense response to insects. *Insect Sci.* 2015; 22 (2): 157-64.
208. Henriques R, Magyar Z, Monardes A, Khan S, Zalejski C, Orellana J, Szabados L, de la Torre C, Koncz C, Bögre L. Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO J.* 2010; 29 (17): 2979-2993.
209. Hess B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput.* 2008; 4(1): 116-22.

210. Hey SJ, Mayerhofer H, Halford NG, Dickinson JR. DNA sequences from *Arabidopsis*, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J Biol Chem.* 2007; 282: 10472-10479.

211. Hildebrand PW, Goede A, Bauer RA, Gruening B, Ismer J, Michalsky E, Preissner R. SuperLooper - a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins. *Nucl Acids Res.* 2009; 37: 571–574.

212. Ho BK, Brasseur R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. *BMC Structural Biology.* 2005; 5: 14-20.

213. Hoffman, L., Farley, M.M., and Waxham, M.N., Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II isoforms differentially impact the dynamics and structure of the actin cytoskeleton, *Biochemistry*, 2013, vol. 52, no. 7, pp. 1198–1207.

214. Holmfeldt, P., Zhang, X., Stenmark, S., Walczak, C.E., and Gullberg, M. CaMKIIgamma-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation, *EMBO J.*, 2005, vol. 24, no. 6, pp. 1255–1266.

215. Homan KT, Wu E, Wilson MW, Singh P, Larsen SD, Tesmer JJ. Structural and functional analysis of g protein-coupled receptor kinase inhibition by paroxetine and a rationally designed analog. *Mol Pharmacol.* 2014; 85 (2): 237-248.

216. Honnappa S, Gouveia SM, Weisbrich A, Damberger FF, Bhavesh NS, Jawhari H, Grigoriev I, van Rijssel FJ, Buey RM, Lawera A, Jelesarov I, Winkler FK, Wüthrich K, Akhmanova A, Steinmetz MO. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell.* 2009; 138: 366-376.

217. Hon WC, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DS, Wright GD, Berghuis AM. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell.* 1997; 89 (6): 887-95.

218. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins.* 2006; 65 (3): 712-725.

219. Hornbeck PV, Kornhauser JM, Latham V, Murray B, Nandhikonda V, Nord A, Skrzypek E, Wheeler T, Zhang B, Gnad F. 15 years of PhosphoSitePlus®: integrating post-translationally modified sites, disease variants and isoforms. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D433-D441.

220. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D512-20.

221. Hossen MJ, Kim SC, Yang S, Kim HG, Jeong D, Yi YS, Sung NY, Lee JO, Kim JH, Cho JY. PDK1 disruptors and modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25 (5): 513-537.

222. Howard CJ, Hanson-Smith V, Kennedy KJ, Miller CJ, Lou HJ, Johnson AD, Turk BE, Holt LJ. Ancestral resurrection reveals evolutionary mechanisms of kinase plasticity. *Elife.* 2014; 3: e04126.

223. Howell BJ, Hoffman DB, Fang G, Murray AW, Salmon ED. 2000. Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *The Journal of cell biology* 150: 1233–1250.

224. Howell BJ, Moree B, Farrar EM, Stewart S, Fang G, Salmon ED. 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Current biology* 14: 953–964.

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

226. Hu J, Rho HS, Newman RH, Hwang W, Neiswinger J, Zhu H, Zhang J, Qian J. Global analysis of phosphorylation networks in humans. *Biochim Biophys Acta.* 2014a; 1844 (1 Pt. B): 224-231.

227. Hu J, Rho HS, Newman RH, Zhang J, Zhu H, Qian J. PhosphoNetworks: a database for human phosphorylation networks. *Bioinformatics*. 2014b; 30 (1):141-142.
228. Huang HD, Lee TY, Tzeng SW, Horng JT. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(Web Server issue):W226-9.
229. Huang JZ, Hardin SC, Huber SC. Identification of a novel phosphorylation motif for CDPKs: phosphorylation of synthetic peptides lacking basic residues at P-3/P-4. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Sep 1;393(1):61-6.
230. Huang WY, Wu YC, Pu HY, Wang Y, Jang GJ, Wu SH. Plant dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase optimizes light-regulated growth and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*. 2017 Sep;40(9):1735-1747.
231. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 1994; 372 (6508): 746-54.
232. Huisman SM, Smeets MF, Segal M. Phosphorylation of Spc110p by Cdc28p-Clb5p kinase contributes to correct spindle morphogenesis in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*. 2007 Feb 1;120(Pt 3):435-46.
233. Hulsmans S, Rodriguez M, De Coninck B, Rolland F. The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions. *Trends Plant Sci*. 2016; 21: 648–661.
234. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph*. 1996; 14 (1): 33-38.
235. Iizuka M, Kimura K, Wang S, Kato K, Amano M, Kaibuchi, Mizoguchi A. Distinct Distribution and Localization of Rho-kinase in Mouse Epithelial, Muscle and Neural Tissues. *Cell Structure and Function (J-STAGE)*. 2012; 37 (2): 155-175.
236. Ikeda K, Zhapparova O, Brodsky I, Semenova I, Tirnauer JS, Zaliapin I, Rodionov V. CK1 activates minus-end-directed transport of membrane organelles along microtubules. *Mol Biol Cell*. 2011; 22: 1321–1329.

237. Illenberger S, Zheng-Fischhöfer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E. The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell*. 1998; 9 (6): 1495-512.

238. Im S, Yoo C, Jung JH, Jeon YW, Suh YJ, Lee YS, Choi HJ. Microtubule-Associated Protein Tau, α -Tubulin and β III-Tubulin Expression in Breast Cancer. *Korean J Pathol*. 2013; 47 (6): 534-540.

239. Inclán YF, Nogales E. Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. *J Cell Sci*. 2001 Jan; 114(Pt 2):413-22.

240. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990 Nov 30;96(1):23-8.

241. Itoh Y, Higuchi M, Oishi K, Kishi Y, Okazaki T, Sakai H, Miyata T, Nakajima K, Gotoh Y. PDK1-Akt pathway regulates radial neuronal migration and microtubules in the developing mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (21): E2955- E2964.

242. Iwabata H, Yoshida M, Komatsu Y. Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies. *Proteomics*. 2005 Dec; 5 (18): 4653-64.

243. Jacoby E. Chemogenomics, methods and applications. *Meth Mol Biol*. Springer, Humana Press, 2009; 575: 315.

244. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12 (12): 773-786.

245. Janke C, Kneussel M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 2010 Aug; 33(8):362-72.
246. Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21: 307–326.
247. Janke C. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* 2014; 206 (4): 461–472.
248. Järås M, Miller PG, Chu LP, Puram RV, Fink EC, Schneider RK, Al-Shahrour F, Peña P, Breyfogle LJ, Hartwell KA, McConkey ME, Cowley GS, Root DE, Kharas MG, Mullally A, Ebert BL. Csnk1a1 inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2014; 211 (4): 605-612.
249. Jha SK, Malik S, Sharma M, Pandey A, Pandey GK. Recent Advances in Substrate Identification of Protein Kinases in Plants and Their Role in Stress Management. *Curr Genomics.* 2017; 18 (6): 523-541.
250. Johansson MU, Zoete V, Michielin O, Guex N. Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 173.
251. Johnson VL, Scott MI, Holt SV, Hussein D, Taylor SS. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci.* 2004;117 (Pt 8): 1577-89.
252. Johmura Y, Soung NK, Park JE, Yu LR, Zhou M, Bang JK, Kim BY, Veenstra TD, Erikson RL, Lee KS. Regulation of microtubule-based microtubule nucleation by mammalian polo-like kinase 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(28):11446-51.
253. Jonak C, Okrész L, Bögre L, Hirt H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 2002; 5 (5): 415-24.

254. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R, Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J Mol Biol.* 1997; 267: 727-748.
255. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* 1983; 79 (926): doi: 10.1063/1.445869.
256. Jovanović AM, Durst S, Nick P. Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *J Exp Bot.* 2010 Mar;61(3):901-9.
257. Kaldis P. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(2):284-96.
258. Kameyama K, Kishi Y, Yoshimura M, Kanzawa N, Sameshima M, Tsuchiya T. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature.* 2000 Sep 7;407(6800):37.
259. Kanai M, Crowe MS, Zheng Y, Vande Woude GF, Fukasawa K. RhoA and RhoC are both required for the ROCK II-dependent promotion of centrosome duplication. *Oncogene.* 2010; 29: 6040–6050.
260. Kang J, Yang M, Li B, Qi W, Zhang C, Shokat KM, Tomchick DR, Machius M, Yu H. Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1. *Mol Cell.* 2008; 32(3):394-405.
261. Kannan N, Neuwald AF. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci.* 2004; 13(8): 2059-77.
262. Kannan N, Taylor SS, Zhai Y, Venter JC, Manning G. Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol.* 2007; 5 (3): e17.
263. Karimi M, Inzé D, Depicker A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002; 7 (5): 193-5.

264. Karpov P, 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.

265. 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.

266. Karpov PA, Blume YB. Is it really that Casein kinase 2 is able to phosphorylate α -tubulin in plants? *Cytol. Genetics.* 2018; 52 (2): 103-111.

267. 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.

268. Karpov P.A., Brytsun V.M., Rayevsky A.V., Demchuk O.M., Pydiura N.O., Ozheredov S.P., Samofalova D.A., Spivak S.I., Yemets A.I., Kalchenko V.I., Blume Ya.B. High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on potential of virtual organization CSLabGrid. *Sci. Innov.* 2015. 11 (1): 85-93.

269. Karpov PA, Blume YaB. Efficiency and perspectives of high-throughput screening in Grid - CSLabGrid experience in effective searching for new biologically active compounds. *Visn Nac Akad Nauk Ukr.* 2016; (8): 68-72.

270. 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.

271. Karpov PA, Blume YB. Plant β -tubulin phosphorylation on Ser172 as canonical suppressing factor of microtubule growth. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2019; 24: 321-326.

272. Karpov PA, Emets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Nadezhdina ES, Blume YaB. Bioinformatics search for plant homologues of STE20-like serine/threonine protein kinases. *Cytol Genetics*. 2009a; 43 (6): 419–428.

273. Karpov 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*. 2009b; 43 (3): 201-215.

274. Karpov 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.

275. Karpov PA, Yemets AI, Matusov VG, Nyporko AY, Nadezhdina ES, Shashina NY, Blume YaB. Bioinformatic search of plant homologs of microtubule associated protein kinase MAST2. In: Ezhov VN, Mitrofanova IV (eds) Actual problems of applied genetics breeding and biotechnology of plants. / Collected scientific works of Nikit Botan Gard. 2009c; 131: 181–187.

276. Karpov PA, 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.

277. Karpov 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. *BMC Genomics*. 2010 Feb 10;11 Suppl 1(Suppl 1):S14.

278. 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.

279. Karpov PA, 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.

280. 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.

281. 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.

282. 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

283. Karpov 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.

284. 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), 2010a, Philadelphia, USA. ID: #1947

285. 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.

286. Karpov 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.

287. 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.

288. Kemmish H, Fasnacht M, Yan L. Fully automated antibody structure prediction using BIOVIA tools: Validation study. PLoS One. 2017; 12 (5): e0177923.

289. Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schürmann A, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG. Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. J Biol Chem. 1996; 271 (7): 3488-95.

290. Kassis S, Melhuish T, Annan RS, Chen SL, Lee JC, Livi GP, Creasy CL. *Saccharomyces cerevisiae* Yak1p protein kinase autophosphorylates on tyrosine residues and phosphorylates myelin basic protein on a C-terminal serine residue. Biochem J. 2000; 348 Pt 2 (Pt 2): 263-72.

291. Kerscher O, Crotti LB, Basrai MA. 2003. Recognizing chromosomes in trouble: association of the spindle checkpoint protein Bub3p with altered kinetochores and a unique defective centromere. Molecular and cellular biology 23: 6406–6418.

292. Kettenbach AN, Schweppe DK, Faherty BK, Pechenick D, Pletnev AA, Gerber SA. Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. Sci. Signal. 2011; 4 (179): rs5.

293. Kim YH, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. J Biol Chem. 1998 Oct 2;273(40):25875-9.

294. Kim K, Cha JS, Cho YS, Kim H, Chang N, Kim HJ, Cho HS. Crystal Structure of Human Dual-Specificity Tyrosine-Regulated Kinase 3 Reveals New Structural Features and Insights into its Auto-phosphorylation. *J Mol Biol.* 2018 May 11; 430 (10): 1521-1530.

295. Kim D, Ntui VO, Zhang N, Xiong L. Arabidopsis Yak1 protein (AtYak1) is a dual specificity protein kinase. *FEBS Lett.* 2015 Oct 24; 589 (21): 3321-7.

296. Kimbara J, Endo TR, Nasuda S. 2004. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome research* 12: 703–714.

297. Kishi M, Pan YA, Crump JG, Sanes JR. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science.* 2005; 307 (5711): 929-32.

298. Kiyomitsu T, Murakami H, Yanagida M. 2011. Protein interaction domain mapping of human kinetochore protein Blinkin reveals a consensus motif for binding of spindle assembly checkpoint proteins Bub1 and BubR1. *Molecular and cellular biology* 31: 998–1011.

299. Klammer M, Kaminski M, Zedler A, Oppermann F, Blencke S, Marx S, Müller S, Tebbe A, Godl K, Schaab C. Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11 (9): 651-668.

300. Klepikova AV, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD, Penin AA. A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* 2016 Dec; 88 (6): 1058-1070.

301. Klimczak LJ, Collinge MA, Farani D, Giuliano G, Walker JC, Cashmore AR. Reconstitution of Arabidopsis casein kinase II from recombinant subunits and phosphorylation of transcription factor GBF1. *Plant Cell.* 1995; 7: 105–115.

302. Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS, Young MW. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell.* 1998; 94: 97–107.

303. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes, *Cell Signal*. 2005; 17 (6): 675–689.

304. Knippschild U, Krüger M, Richter J, Xu P, García-Reyes B, Peifer C, Halekotte J, Bakulev V, Bischof J. The CK1 family: contribution to cellular stress response and its role in carcinogenesis. *Front. Oncol*. 2014; 4, # 96 (eCollection 2014).

305. Kobe B, Kemp BE. Principles of Kinase Regulation. In *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier Inc. 2003;. 539-542.

306. Koizumi N, Martinez IM, Kimata Y, Kohno K, Sano H, Chrispeels MJ. Molecular characterization of two *Arabidopsis* Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol*. 2001 Nov; 127 (3): 949-62.

307. Kollman JM, Greenberg CH, Li S, Moritz M, Zelter A, Fong KK, Fernandez JJ, Sali A, Kilmartin J, Davis TN, Agard DA. Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation. *Nat Struct Mol Biol*. 2015; 22 (2): 132-7.

308. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Oct 12;12(11):709-21.

309. Komolov KE, Bhardwaj A, Benovic JL. Atomic Structure of GRK5 Reveals Distinct Structural Features Novel for G Protein-coupled Receptor Kinases. *J Biol Chem*. 2015; 290 (34): 20629-20647.

310. Korf I, Yandell M, Bedell J. BLAST. Sebastopol: O'Reilly and Associates, 2003; 368 p.

311. Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, Colcombet J, Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Hirt H, Machida Y. 2010. The MAP Kinase MPK4 Is Required for Cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 22: 3778–3790.

312. Kramerov AA, Golub AG, Bdzhola VG, Yarmoluk SM, Ahmed K, Bretner M, Ljubimov AV. Treatment of cultured human astrocytes and vascular endothelial cells

with protein kinase CK2 inhibitors induces early changes in cell shape and cytoskeleton. *Mol Cell Biochem.* 2011; 349 (1-2): 125-37.

313. Krasnoperova EE, Buy DD, Goriunova II, Isayenkov SV, Karpov PA, Blume Ya.B, Yemets AI. The potential role of SnRK1 protein kinases in the regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol. Genet.* 2019; 53 (3): 185–191.

314. 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* γ -Tubulin. *Cytol. Genetics.* 2019. 53(5): 349-356.

315. 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.

316. Krieger E, Nabuurs SB, Vriend G. Homology modeling. In: *Structural Bioinformatics*. Ed. by Bourne PE, Weissig H: John Wiley & Sons; 2003: 509–524.

317. Krüger M, Kalbacher H, Kastritis PL, Bischof J, Barth H, Henne-Bruns D, Vorgias C, Sarno S, Pinna LA, Knippschild U. New potential peptide therapeutics perturbing CK1 δ / α -tubulin interaction. *Cancer Lett.* 2016; 375 (2): 375-383.

318. Kudla J, Batistic O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell.* 2010; 22 (3): 541-63.

319. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol.* 2012; 857: 231-257.

320. Kufer TA, Nigg EA, Silljé HH. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. *Chromosoma.* 2003; 112 (4): 159-163.

321. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33 (7): 1870–1874.

322. Kuntal BK, Aparoy P, Reddanna P. EasyModeller: a graphical interface to modeller. *BMC Res Notes.* 2010; 3: 226.

323. Lafanechère L, Job D. The third tubulin pool. *Neurochem Res.* 2000 Jan;25(1):11-8.
324. Lampson MA, Kapoor TM. 2005. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nature cell biology* 7: 93–98.
325. Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol.* 1996 Dec;135(6 Pt 2):1701-13.
326. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol.* 2014; 1079: 105-16.
327. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.* 1993; 26: 283-291.
328. Laub MT, Goulian M. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet.* 2007; 41: 121-45.
329. Laurent CE, Delfino FJ, Cheng HY, Smithgall TE. The human c-Fes tyrosine kinase binds tubulin and microtubules through separate domains and promotes microtubule assembly. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov;24(21):9351-8.
330. Leclerc V, Léopold P. The cyclin C/Cdk8 kinase. *Prog Cell Cycle Res.* 1996; 2: 197-204.
331. Lee J.-Y., Yoo B.-C., Harmon A.C. Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. // *Biochemistry* - V.37, N.19. - 1998. - P. 6801–6809.
332. Lee JY, Taoka K, Yoo BC, Ben-Nissan G, Kim DJ, Lucas WJ. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell.* 2005; 17: 2817–2831.
333. Lee J-Y. Versatile casein kinase 1, *Plant Sign. Behav.* 2009; 4: 652–654.

334. Lee SJ, Cho DI, Kang JY, Kim MD, Kim SY. AtNEK6 interacts with ARIA and is involved in ABA response during seed germination. *Mol Cells*. 2010; 29 (6): 559-66.
335. Lee YJ, Liu B. Microtubule nucleation for the assembly of acentrosomal microtubule arrays in plant cells. *New Phytol*. 2019; 222 (4): 1705-1718. DOI: 10.1111/nph.15705.
336. Lee, M.M., Chan, M.K., and Bundschuh, R., SIB-BLAST: a web server for improved delineation of true and false positives in PSI-BLAST searches, *Nucl. Acids Res.*, 2009, iss. 37(Web Server issue), W53-56.
337. Lee JY, Taoka K, Yoo BC, Ben-Nissan G, Kim DJ, Lucas WJ. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*. 2005; 17: 2817–2831.
338. Lee HJ, Zheng JJ. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal*. 2010;8:8. Published 2010 May 28. doi:10.1186/1478-811X-8-8
339. Lefèvre J, Chernov KG, Joshi V, Delga S, Toma F, Pastré D, Curmi PA, Savarin P. The C terminus of tubulin, a versatile partner for cationic molecules: binding of Tau, polyamines, and calcium. *J Biol Chem*. 2011; 286 (4): 3065–3078.
340. Lehti-Shiu MD, Shiu SH. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Sep 19;367(1602):2619-39.
341. Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res*. 1998; 8 (10): 1038-47.
342. Lehti-Shiu MD, Zou C, Hanada K, Shiu SH. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol*. 2009 May; 150 (1): 12-26.

343. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49 (D1): D458–D460.

344. Leverett CA, Sukuru SC, Vetelino BC, Musto S, Parris K, Pandit J, Loganzo F, Varghese AH, Bai G, Liu B, Liu D, Hudson S, Doppalapudi VR, Stock J, O'Donnell CJ, Subramanyam C. Design, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of Novel Tubulysin Analogues as ADC Payloads. *ACS Med Chem Lett.* 2016; 7 (11): 999-1004.

345. Ley SC, Verbi W, Pappin DJ, Druker B, Davies AA, Crumpton MJ. Tyrosine phosphorylation of alpha tubulin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1994; 24 (1): 99-106.

346. Li G, Yin H, Kuret J. Casein kinase 1 δ phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules, *J Biol Chem.* 2004; 279: 15938–15945.

347. Li H, Zeng X, Liu ZQ, Meng QT, Yuan M, Mao TL. *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol Biol* 2009; 69 (3): 313–324.

348. Li Y, DeFatta R, Anthony C, Sunavala G, De Benedetti A. A translationally regulated Tousled kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed. *Oncogene.* 2001 Feb 8;20(6):726-38.

349. Li Y, Yang KJ, Park J. Multiple implications of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in human cancer. *World J Biol Chem.* 2010; 1(8): 239-247.

350. Lim A.C., Tiu S.Y., Li Q., Qi R.Z. Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 4433–4439.

351. Lin TC, Gombos L, Neuner A, Sebastian D, Olsen JV, Hrle A, Benda C, Schiebel E. Phosphorylation of the yeast gamma-tubulin Tub4 regulates microtubule function. *PloS one* 2011; 6 (5): e19700.

352. Lin S, Wang C, Zhou J, Shi Y, Ruan C, Tu Y, Yao L, Peng D, Xue Y. EPSPD: a well-annotated data resource of protein phosphorylation sites in eukaryotes. *Brief Bioinform.* 2020 Feb 2:bbz169.

353. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Tod Technol.* 2004; 1 (4): 337-341.
354. Litchfield DW. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 2003; 369 (Pt 1): 1-15.
355. Liu B-Q, Jin L, Zhu L, Li J, Huang S, Yuan M. Phosphorylation of microtubule-associated protein SB401 from *Solanum berthaultii* regulates its effect on microtubules. *J Integrative Plant Biol.* 2009; 51 (3): 235–242.
356. Liu W, Xu ZH, Luo D, Xue HW. Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J.* 2003; 36: 189–202.
357. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Rossie S, Gong CX. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2005; 280 (3): 1790-6.
358. Liu X, Qin T, Ma Q, Sun J, Liu Z, Yuan M, Mao T. Light-regulated hypocotyl elongation involves proteasome-dependent degradation of the microtubule regulatory protein WDL3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2013; 25 (5): 1740-55.
359. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25: 402–408.
360. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Mäkelä TP, Hardie DG, Alessi DR. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 2004; 23 (4): 833-843.
361. Lu SX, Liu H, Knowles SM, Li J, Ma L, Tobin EM, Lin C. A role for protein kinase casein kinase2 alpha-subunits in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Physiol.* 2011; 157: 1537-1545.
362. Lu R, Niida H, Nakanishi M. Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. *J Biol Chem.* 2004; 279 (30): 31164-31170.

363. Luan S. Signalling drought in guard cells. *Plant Cell Environ.* 2002; 25 (2): 229-237.
364. Lucas J, Shaw SL. Cortical microtubule arrays in the *Arabidopsis* seedling. *Curr Opin Plant Biol.* 2008; 11: 94–98.
365. Ludueña R.F., Banerjee A. The Tubulin Superfamily. *Cancer Drug Discovery and Development: The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology.* Ed: Fojo T. Humana Press, Totowa, NJ: 2008. P. 177-191.
366. Ludueña RF. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013; 302: 41-185.
367. Ludueña RF, Zimmermann HP, Little M. Identification of the phosphorylated beta-tubulin isotype in differentiated neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 1988;230(1-2):142-6.
368. Luo M, Cao M, Kan Y, Li G, Snell W, Pan J. The phosphorylation state of an aurora-like kinase marks the length of growing flagella in *Chlamydomonas*. *Curr Biol.* 2011;21(7):586-91.
369. Löhler J, Hirner H, Schmidt B, Kramer K, Fischer D, Thal DR, Leithäuser F, Knippschild U. Immunohistochemical characterisation of cell-type specific expression of CK1delta in various tissues of young adult BALB/c mice. *PLoS One.* 2009; 4: e4174.
370. Ma X, Sayeski PP. Identification of tubulin as a substrate of Jak2 tyrosine kinase and its role in Jak2-dependent signaling. *Biochemistry.* 2007 Jun 19;46(24):7153-62.
371. Ma Z, Kanai M, Kawamura K, Kaibuchi K, Ye K, Fukasawa K. Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Mol Cell Biol.* 2006. 26: 9016–9034.
372. MacRae TH. Tubulin post-translational modifications-enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem.* 1997 Mar 1;244(2):265-78.

373. MacRobbie EA. Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 3;99(18):11963-8.

374. Magiera MM, Janke C. Post-translational modifications of tubulin. *Curr. Biol*. 2014; 24 (9): R351-R354.

375. Manni S, Carrino M, Manzoni M, Giancesin K, Nunes SC, Costacurta M, Tubi LQ, Macaccaro P, Taiana E, Cabrelle A, Barilà G, Martines A, Zambello R, Bonaldi L, Trentin L, Neri A, Semenzato G, Piazza F. Inactivation of CK1 α in multiple myeloma empowers drug cytotoxicity by affecting AKT and β -catenin survival signaling pathways. *Oncotarget*. 2017; 8 (9): 14604–14619.

376. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6; 298 (5600): 1912-34.

377. Manning G. Genomic overview of protein kinases. *WormBook*. 2005 Dec 13:1-19.

378. Mariani M, Karki R, Spennato M, Pandya D, He S, Andreoli M, Fiedler P, Ferlini C. Class III β -tubulin in normal and cancer tissues. *Gene*. 2015; 563 (2): 109-114.

379. Markovsky E, de Stanchina E, Itzkowitz A, Haimovitz-Friedman A, Rotenberg SA. Phosphorylation state of Ser165 in α -tubulin is a toggle switch that controls proliferating human breast tumors. *Cell Signal*. 2018; 52: 74-82.

380. Martin J, Anamika K, Srinivasan N. Classification of protein kinases on the basis of both kinase and non-kinase regions. *PLoS One*. 2010 Sep 15;5(9):e12460.

381. Marx, A., Nugoor, C., Panneerselvam, S., Mandelkow, E. Structure and function of polarity-inducing kinase family MARK/Par-1 within the branch of AMPK/Snf1-related kinases, *The FASEB J.*, 2010, vol. 24, no 6, pp. 1637–1648.

382. Mathur M, Chua N-H. Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell*. 2000; 12: 465–477.

383. Matten WT, Aubry M, West J, Maness PF. Tubulin is phosphorylated at tyrosine by pp60c-src in nerve growth cone membranes. *J Cell Biol.* 1990 Nov;111(5 Pt 1):1959-70.
384. McCurdy DW, Harmon AC. Calcium-dependent protein kinase in the green alga *Chara*. *Planta.* 1992; 188: 54-61.
385. Menges M, Murray JA, Murray synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* 2002; 30: 203–212.
386. Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petralia F, Kawaler E, Mundt F, Krug K, Tu Z, Lei JT, Gatza ML, Wilkerson M, Perou CM, Yellapantula V, Huang KL, Lin C, McLellan MD, Yan P, Davies SR, Townsend RR, Skates SJ, Wang J, Zhang B, Kinsinger CR, Mesri M, Rodriguez H, Ding L, Paulovich AG, Fenyö D, Ellis MJ, Carr SA; NCI CPTAC. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature.* 2016; 534 (7605): 55-62.
387. Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, Tosatto SCE, Paladin L, Raj S, Richardson LJ, Finn RD, Bateman A. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49 (D1): D412-D419.
388. Mitsopoulos C, Zihni C, Garg R, Ridley AJ, Morris JD. The prostate-derived sterile 20-like kinase (PSK) regulates microtubule organization and stability. *J Biol Chem.* 2003; 278 (20): 18085-91.
389. Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Kamada H, Shinozaki K. Cloning and characterization of two cDNAs encoding casein kinase II catalytic subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 1993; 21 (2): 279-89.
390. Mochida S, Hida Y, Tanifuji S, Hagiwara A, Hamada S, Abe M, Ma H, Yasumura M, Kitajima I, Sakimura K, Ohtsuka T. SAD-B Phosphorylation of CAST

Controls Active Zone Vesicle Recycling for Synaptic Depression. *Cell Rep.* 2016; 16 (11): 2901-2913.

391. Modig C, Olsson P-E, Barasoain I, de Ines C, Andreu JM, Roach MC, Ludueña RF, Wallin M. Identification of β III- and β IV-tubulin isotypes in cold-adapted microtubules from Atlantic cod (*Gadus morhua*): Antibody mapping and cDNA sequencing. *Cytoskeleton.* 1999; 42 (4): 257-343.

392. Moniz L, Dutt P, Haider N, Stambolic V. Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. *Cell Div.* 2011 Oct 31;6:18.

393. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15 (2): 161-70.

394. Moreno-Romero J, Armengot L, Mar Marquès-Bueno M, Britt A, Carmen Martínez M. CK2-defective Arabidopsis plants exhibit enhanced double-strand break repair rates and reduced survival after exposure to ionizing radiation. *Plant J.* 2012; 71 (4): 627-38.

395. Morrow CJ, Tighe A, Johnson VL, Scott MI, Ditchfield C, Taylor SS. Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci.* 2005; 118 (Pt 16): 3639-52.

396. Moser C, Gatto P, Moser M, Pindo M, Velasco R. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues. *Mol Biotechnol.* 2004. 26 (2): 295-299.

397. Motose H, Tominaga R, Wada T, Sugiyama M, Watanabe Y. A NIMA-related protein kinase suppresses ectopic outgrowth of epidermal cells through its kinase activity and the association with microtubules. *Plant J.* 2008 Jun;54(5):829-44.

398. Möller RS, Kübart S, Hoeltzenbein M, Heye B, Vogel I, Hansen CP, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Ropers HH, Tümer Z, Kalscheuer VM. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *Am J Hum Genet.* 2008 May;82(5):1165-70.

399. Mukai S, Yabuta N, Yoshida K, Okamoto A, Miura D, Furuta Y, Abe T, Nojima H. Lats1 suppresses centrosome overduplication by modulating the stability of Cdc25B. *Sci Rep.* 2015; 5: 16173.

400. Mulekar JJ, Huq E. Arabidopsis casein kinase 2 $\alpha 4$ subunit regulates various developmental pathways in a functionally overlapping manner. *Plant Sci.* 2015; 236: 295-303.

401. Müller S, Smertenko A, Wagner V, Heinrich M, Hussey PJ, Hauser M-T. 2004. The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current biology* 14: 412–417.

402. Murakami A, Kimura K, Nakano A. The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1999; 274: 3804–3810.

403. Murakami N, Bolton DC, Kida E, Xie W, Hwang YW. Phosphorylation by Dyrk1A of clathrin coated vesicle-associated proteins: identification of the substrate proteins and the effects of phosphorylation. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e34845.

404. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962; 15 (3): 473-497.

405. Naz F, Anjum F, Islam A, Ahmad F, Hassan MI. Microtubule affinity-regulating kinase 4: structure, function, and regulation. *Cell Biochem. Biophys.* 2013; 67 (2): 485-499.

406. Nazarova E, O'Toole E, Kaitna S, Francois P, Winey M, Vogel J. Distinct roles for antiparallel microtubule pairing and overlap during early spindle assembly. *Mol Biol Cell.* 2013; 24 (20): 3238-50.

407. Nemoto K, Takemori N, Seki M, Shinozaki K, Sawasaki T. Members of the Plant CRK Superfamily Are Capable of Trans- and Autophosphorylation of Tyrosine Residues. *J Biol Chem.* 2015; 290 (27): 16665-16677.

408. Newman RH, Hu J, Rho HS, Xie Z, Woodard C, Neiswinger J, Cooper C, Shirley M, Clark HM, Hu S, Hwang W, Jeong JS, Wu G, Lin J, Gao X, Ni Q, Goel R, Xia S, Ji H, Dalby KN, Birnbaum MJ, Cole PA, Knapp S, Ryazanov AG, Zack DJ, Blackshaw S, Pawson T, Gingras AC, Desiderio S, Pandey A, Turk BE, Zhang J, Zhu H, Qian J. Construction of human activity-based phosphorylation networks. *Mol Syst Biol.* 2013; 9: 655.

409. Newton PM, Messing RO. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *Biochem J.* 2010; 427 (2): 189-196.

410. Nietzsche M, Schießl I, Börnke F. The complex becomes more complex: protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell- and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants. *Front. Plant Sci.* 2014; 5: #54.

411. Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger OG. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* 2001; 20 (19): 5320-31.

412. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 1999; 96: 79–88.

413. Nguyen TL, Fruit C, Héroult Y, Meijer L, Besson T. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin Ther Pat.* 2017; 27 (11): 1183-1199.

414. Nolen B, Ngo J, Chakrabarti S, Vu D, Adams JA, Ghosh G. Nucleotide-induced conformational changes in the *Saccharomyces cerevisiae* SR protein kinase, Sky1p, revealed by X-ray crystallography. *Biochemistry.* 2003; 42 (32): 9575-85.

415. Noll C, Planque C, Ripoll C, Guedj F, Diez A, Ducros V, Belin N, Duchon A, Paul JL, Badel A, de Freminville B, Grattau Y, Bléhaut H, Héroult Y, Janel N, Delabar JM. DYRK1A, a novel determinant of the methionine-homocysteine cycle in

different mouse models overexpressing this Down-syndrome-associated kinase. PLoS One. 2009; 4 (10): e7540.

416. Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for Ca²⁺- and Calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. Cytol. Genetics. 2017; 51 (4): 239–246.

417. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. - 2012. - 28. - P.1166-1167.

418. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnad F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S, Mann M. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. Sci Signal. 2010 Jan 12;3(104):ra3.

419. Oostenbrink C, Soares TA, van der Vegt NF, van Gunsteren WF. Validation of the 53A6 GROMOS force field. Eur Biophys J. 2005; 34 (4): 273-284.

420. Ori-McKenney KM, McKenney RJ, Huang HH, Li T, Meltzer S, Jan LY, Vale RD, Wiita AP, Jan YN. Phosphorylation of β -Tubulin by the Down Syndrome Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis. Neuron. 2016 May 4;90(3):551-63.

421. Otto SP, Whitton J. Polyploid incidence and evolution. Annu Rev Genet. 2000;34:401-437.

422. Ouyang B, Lan Z, Meadows J, Pan H, Fukasawa K, Li W, Dai W. Human Bub1: a putative spindle checkpoint kinase closely linked to cell proliferation. Cell Growth Differ. 1998; 9 (10): 877-85.

423. Paganelli L, Caillaud M-C, Quentin M, Damiani I, Govetto B, Lecomte P, Karpov PA, 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.

424. Pangilinan F, Li Q, Weaver T, Lewis BC, Dang CV, Spencer F. Mammalian BUB1 protein kinases: map positions and in vivo expression. *Genomics*. 1997; 46 (3): 379-88.

425. Page R.D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*. 1996; 12 (4): 357-358.

426. Panek HR, Stepp JD, Engle HM, Marks KM, Tan PK, Lemmon SK, Robinson LC. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J*. 1997; 16: 4194–4204.

427. Park M, Venkatesh TV, Bodmer R. Dual role for the zeste-white3/shaggy-encoded kinase in mesoderm and heart development of *Drosophila*. *Dev Genet*. 1998; 22 (3): 201-211.

428. Park HH. Casein kinase I-like protein linked to lipase in plant. *Plant Signal Behav*. 2012; 7 (7): 719–721.

429. Park Y-I, Yang H-S, Oh M-H. Tyrosine phosphorylation as a signaling component for plant improvement. *Journal of Plant Biotechnology*. 2015; 42 (4): 277-83.

430. Parrotta L, Cai G, Cresti M. Changes in the accumulation of alpha- and beta-tubulin during bud development in *Vitis vinifera* L. *Planta*. 2010 Jan;231(2):277-91.

431. Parrotta L, Cresti M, Cai G. Accumulation and post-translational modifications of plant tubulins. *Plant Biol (Stuttg)*. 2014; 16 (3): 521-7.

432. Pastuglia M, Azimzadeh J, Goussot M, Camilleri C, Belcram K, Evrard JL, Schmit AC, Guerche P, Bouchez D. Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2006 Jun;18(6):1412-25.

433. Pay A, Jonak C, Bögre L, Meskiene I, Mairinger T, Szalay A, Heberle-Bors E, Hirt H. The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of shaggy/glycogen synthase kinase-3 and shows differential expression patterns in plant organs and development. *Plant J*. 1993; 3(6): 847-56.

434. Pereira G, Knop M, Schiebel E. Spc98p directs the yeast gamma-tubulin complex into the nucleus and is subject to cell cycle-dependent phosphorylation on the nuclear side of the spindle pole body. *Mol Biol Cell*. 1998; 9 (4): 775-93.

435. Perez DI, Gil C, Martinez A. Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. *Med Res Rev*. 2011; 31: 924–954.

436. Perrière G, Gouy M. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*. 1996; 78 (5): 364-9.

437. Peters JD, Furlong MT, Asai DJ, Harrison ML, Geahlen RL. Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *J Biol Chem*. 1996; 271 (9): 4755-62.

438. Peters JM, McKay RM, McKay JP, Graff JM. Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature*. 1999; 401: 345–350.

439. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25 (13): 1605-1612.

440. Phung AD, Soucek K, Kubala L, Harper RW, Chloë Bulinski J, Eiserich JP. Posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol*. 2006 Dec;85(12):1241-52.

441. Pilyugin M, Demmers J, Verrijzer CP, Karch F, Moshkin YM. Phosphorylation-mediated control of histone chaperone ASF1 levels by Tousled-like kinases. *PLoS One*. 2009 Dec 16;4(12):e8328.

442. Pitcher JA, Hall RA, Daaka Y, Zhang J, Ferguson SS, Hester S, Miller S, Caron MG, Lefkowitz RJ, Barak, LS. The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 12316–12324.

443. Polge C, Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends. Plant Sci.* 2007; 21 (1): 20–28.

444. Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM. Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol.* 1996; 132: 77–90.

445. Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL. Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem.* 2000; 275 (34): 26515-26522.

446. Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 2013; 29 (7): 845-854.

447. Provost P, Doucet J, Hammarberg T, Gerisch G, Samuelsson B, Radmark O. 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem.* 2001; 276: 16520-16527.

448. Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature.* 2005;438(7068):679-84.

449. Qi W, Tang Z, Yu H. Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol Biol Cell.* 2006;17 (8): 3705-16.

450. Quétier I, Marshall JJT, Spencer-Dene B, Lachmann S, Casamassima A, Franco C, Escuin S, Worrall JT, Baskaran P, Rajeeve V, Howell M, Copp AJ, Stamp G, Rosewell I, Cutillas P, Gerhardt H, Parker PJ, Cameron AJM. Knockout of the PKN

Family of Rho Effector Kinases Reveals a Non-redundant Role for PKN2 in Developmental Mesoderm Expansion. *Cell Rep.* 2016; 14 (3): 440-448.

451. Rachidi N, Taly JF, Durieu E, Leclercq O, Aulner N, Prina E, Pescher P, Notredame C, Meijer L, Späth GF. Pharmacological assessment defines *Leishmania donovani* casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (3): 1501-1515.

452. 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: 308-309.

453. Ramachandran KI, Deepa G, Namboori K. Computational chemistry and molecular modeling: principles and application. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. 398 p.

454. Ramkumar A, Jong BY, Ori-McKenney KM. ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. *Dev Dyn.* 2018; 247 (1): 138-155.

455. Rédei GP. UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means). In: Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics, 3-rd Ed. Dordrecht: Springer; 2008.

456. Redeker V. Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. *Methods Cell Biol.* 2010; 95: 77-103.

457. Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin Binds to α/β Tubulin and Increases their Ubiquitination and Degradation. *Journal of Neuroscience.* 2003; 23 (8): 3316-3324.

458. Ren R, Sun Y, Zhao Y, Geiser D, Ma H, Zhou X. Phylogenetic resolution of deep eukaryotic and fungal relationships using highly conserved low-copy nuclear genes, *Genome Biol. Evol.* 2016; 8 (9): 2683–2701.

459. Rena G, Bain J, Elliot M, Cohen P. D4476, a cell-permeant inhibitor of CK1, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a. *EMBO Rept.* 2004; 5: 60–65.
460. Richard GF. Eukaryotic Pangenomes. 2020 May 1. In: Tettelin H, Medini D, editors. *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2020. PMID: 32633916.
461. Rigsby RE, Parker AB. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochem Mol Biol Educ.* 2016; 44 (5): 433-7.
462. Roberts BT, Farr KA, Hoyt MA. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1994; 14 (12): 8282-91.
463. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000;19(49):5548-57.
464. Robinson LC, Menold MM, Garrett S, Culbertson MR. Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 2870–2881.
465. Robison A.J., Bass M.A., Jiao Y., MacMillan L.B., Carmody L.C., Bartlett R.K., Colbran R.J. Multivalent interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic density proteins NR2B, densin-180, and alpha-actinin-2. *J Biol Chem.* 2005; 280 (42): 35329–35336.
466. Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2010; 61: 621-49.
467. Rodriguez M, Parola R, Andreola S, Pereyra C, Martínez-Noël G. TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the "yin-yang" model? *Plant Sci.* 2019; 288: 110220.
468. Roe JL, Rivin CJ, Sessions RA, Feldmann KA, Zambryski PC. The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell.* 1993; 75 (5): 939-50.

469. Roll-Mecak A. The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding. *Dev Cell*. 2020; 54 (1): 7-20.

470. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (7): 519-29.

471. Rosas-Acosta G, Russell WK, Deyrieux A, Russell DH, Wilson VG. A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4 (1): 56-72.

472. Rose PW, Prlić A, Altunkaya A, Bi C, Bradley AR, Christie CH, Costanzo LD, Duarte JM, Dutta S, Feng Z, Green RK, Goodsell DS, Hudson B, Kalro T, Lowe R, Peisach E, Randle C, Rose AS, Shao C, Tao YP, Valasatava Y, Voigt M, Westbrook JD, Woo J, Yang H, Young JY, Zardecki C, Berman HM, Burley SK. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45 (1): 271–281.

473. Rose R, Golosova O, Sukhomlinov D, Tiunov A, Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*. 2019; 35 (11): 1963-1965.

474. Rosenbaum J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol*. 2000; 10 (21): R801- R803.

475. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 2000: 365-386.

476. Ruiz-Gomez A, Humrich J, Murga C, Quitterer U, Lohse MJ, Mayor F Jr. Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*. 2000; 275: 29724–29730.

477. Russell J., Fuller J., Wilson Z., Mulligan B. PROTOCOL FOR GROWING ARABIDOPSIS. 2002; ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Protocols/compleat_guide/1_growing_arabidopsis.pdf

478. Ryoo SR, Jeong HK, Radnaabazar C, Yoo JJ, Cho HJ, Lee HW, Kim IS, Cheon YH, Ahn YS, Chung SH, Song WJ. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2007; 282 (48): 34850-7.

479. Sackett DL, Werbovetz KA, Morrissette NS. Isolating tubulin from nonneural sources. *Methods Cell Biol.* 2010; 95: 17-32.

480. Sahakyan H, Abelyan N, Arakelov V, Arakelov G, Nazaryan K. In silico study of colchicine resistance molecular mechanisms caused by tubulin structural polymorphism. *PLoS One.* 2019; 14 (8): e0221532.

481. Saidi Y, Hearn TJ, Coates JC. Function and evolution of 'green' GSK3/Shaggy-like kinases. *Trends Plant Sci.* 2012; 17 (1): 39-46.

482. Sakai T, Honing Hv, Nishioka M, Uehara Y, Takahashi M, Fujisawa N, Saji K, Seki M, Shinozaki K, Jones MA, Smirnov N, Okada K, Wasteneys GO. Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in Arabidopsis. *Plant J.* 2008; 53 (1): 157-71.

483. Salnikov A, Sliusar I, Sudakov O, Savytskyi O, Kornelyuk A. Virtual laboratory MolDynGrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations. *International Journal of Computing.* 2010; 9 (4): 294-300.

484. Samaj J, Baluska F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D, Menzel D. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol.* 2004; 135 (3): 1150-61.

485. Samikkannu T, Atluri VS, Nair MP. HIV and Cocaine Impact Glial Metabolism: Energy Sensor AMP-activated protein kinase Role in Mitochondrial Biogenesis and Epigenetic Remodeling. *Sci Rep.* 2016; 6: 31784.

486. Sanchez-Ponce D, Muñoz A, Garrido JJ. Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 46 (1): 222-34.

487. Sanz P. Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast, *Biochem Soc Trans.* 2003; 31 (Pt 1): 178–181.

488. Sathyanarayanan P, Poovaiah B. Decoding Ca²⁺ signals in plants. *Crit Rev Plant Sci.* 2004; 23: 1–11.

489. Savage SR, Zhang B. Using phosphoproteomics data to understand cellular signaling: a comprehensive guide to bioinformatics resources. *Clin Proteomics.* 2020; 17: 27.

490. Schappi JM, Krbanjevic A, Rasenick MM. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1838 (2): 674-681.

491. Scheeff ED, Bourne PE. Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput Biol.* 2005; 1 (5): e49.

492. Schitteck B, Sinnberg T. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2014; 13: 231.

493. Scholz S, Pleßmann J, Enugutti B, Hüttl R, Wassmer K, Schneitz K. The AGC protein kinase UNICORN controls planar growth by attenuating PDK1 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 2019; 15 (2): e1007927.

494. Schüttelkopf AW, van Aalten DM. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004; 60 (Pt 8): 1355-1363.

495. Schwab C, DeMaggio AJ, Ghoshal N, Binder LI, Kuret J, McGeer PL. Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 2000; 21: 503–510.

496. Sebastia CH, Hardin SC, Clouse SD, Kieber JJ, Huber SC. Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2004; 428: 81–91.

497. Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Oono Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Kawai J, Carninci P, Itoh M, Ishii Y, Arakawa T, Shibata K, Shinagawa A, Shinozaki K. Functional

annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science*. 2002; 296 (5565): 141-145.

498. Serrano L, Díaz-Nido J, Wandosell F, Avila J. Tubulin phosphorylation by casein kinase II is similar to that found in vivo. *J Cell Biol*. 1987; 105 (4): 1731-1739.

499. Shankar A, Agrawal N, Sharma M, Pandey A, Girdhar K, Pandey M. Role of Protein Tyrosine Phosphatases in Plants. *Curr Genomics*. 2015; 16 (4): 224-36. DOI: 10.2174/1389202916666150424234300.

500. Shen K., Teruel M.N., Subramanian K., Meyer T. CaMKII β functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII α/β heterooligomers to dendritic spines. *Neuron*. 1998; 21 (3): 593–606.

501. Shen W, Reyes M, Hanley-Bowdoin L. *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol*. 2009; 150 (2): 996-1005.

502. Sheremet YA, Yemets AI, Azmi A, Vissenberg K, Verbelen JP, Blume YB. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on mitosis progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Tsitol Genet*. 2012; 46 (5): 3-11.

503. Sheremet YaA, Yemets AI, Verbelen J-P, Blume YaB. The effect of okadaic acid on root morphology of *Arabidopsis thaliana* and microtubule organization in its cells. *Tsitol Genet*. 2009; 43 (1): 3-10.

504. Sheremet YaA, Yemets AI, Vissenberg K, Verbelen J-P, Blume YaB. The effect of inhibitors of serine threonine protein kinases on *Arabidopsis thaliana* root morphology and microtubules organization in its cells. *Tsitologiya*. 2010; 52 (5): 389-398.

505. Sheremet YaA, Yemets AI, Vissenberg K, Verbelen JP, Blume YaB, Effects of Inhibitors of Serine/Threonine Protein Kinases on *Arabidopsis thaliana* Root Morphology and Microtubule Organization in Its Cells. *Cell Tissue Biol*. 2010; 4 (4): 399–409.

506. Shevchenko GV, Talaliev AS, Doonan J. Arabidopsis thaliana seedlings from the Chernobyl NPP zone are tolerant to DNA-damaging agents, Reports NAS Ukraine. 2012; 12: 157–162.

507. Shi J, Wu X, Surma M, Vemula S, Zhang L, Yang Y, Kapur R, Wei L. Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. Cell Death Dis. 2013; 4 (2): e483.

508. Shi J, Surma M, Yang Y, Wei L. Disruption of both ROCK1 and ROCK2 genes in cardiomyocytes promotes autophagy and reduces cardiac fibrosis during aging. FASEB J. 2019; 33 (6): 7348-7362.

509. Shi X, Potvin B, Huang T, Hilgard P, Spray DC, Suadicani SO, Wolkoff AW, Stanley P, Stockert RJ. A novel casein kinase 2 alpha-subunit regulates membrane protein traffic in the human hepatoma cell line HuH-7. J. Biol. Chem. 2001; 276: 2075-2082.

510. Shin J, Sánchez-Villarreal A, Davis AM, Du SX, Berendzen KW, Koncz C, Ding Z, Li C, Davis SJ. The metabolic sensor AKIN10 modulates the Arabidopsis circadian clock in a light-dependent manner. Plant Cell Environ. 2017; 40 (7): 997-1008.

511. Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Mayer KF, Li WH. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. Plant Cell. 2004 May;16(5):1220-34.

512. Shiu SH, Bleecker AB. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98 (19): 10763-8.

513. Sigrist CJ, de Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. New and continuing developments at PROSITE. Nucleic Acids Res. 2013; 41(Database issue): D344-7.

514. Simard JR, Rauh D. FLiK: A Direct-Binding Assay for the Identification and Kinetic Characterization of Stabilizers of Inactive Kinase Conformations (Chapter

18). In book: Protein Kinase Inhibitors in Research and Medicine. Ed. by Shokat KM, Methods in Enzymology (ISBN: 978-0-12-397918-6); 2014; 548: 147-171.

515. Siu SW, Pluhackova K, Böckmann RA. Optimization of the OPLS-AA force field for long hydrocarbons. *J Chem Theory Comput.* 2012; 8 (4): 1459-1470.

516. Smertenko A, Blume Y, Viklický V, Opatrný Z, Dráber P. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta.* 1997;201(3):349-58.

517. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98 (9): 5312-5316.

518. Son S, Oh CJ, An CS. Arabidopsis thaliana remorins interact with SnRK1 and play a role in susceptibility to beet curly top virus and beet severe curly top virus. *Plant Pathol. J.* 2014; 30: 269–278.

519. Song Y, Brady ST. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* 2015; 25 (3): 125-36.

520. Soundararajan M, Roos AK, Savitsky P, Filippakopoulos P, Kettenbach AN, Olsen JV, Gerber SA, Eswaran J, Knapp S, Elkins JM. Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure.* 2013; 21 (6): 986-96.

521. Stacklies W, Seifert C, Graeter F. Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations. *BMC Bioinformatics.* 2011; 12 (101): 1-5.

522. Stroehlein AJ, Young ND, Gasser RB. Improved strategy for the curation and classification of kinases, with broad applicability to other eukaryotic protein groups. *Sci Rep* 8, 6808 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25020-8>.

523. Stone JM, Walker JC. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 1995; 108 (2): 451-457.

524. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*. 2001; 154: 925–936.
525. Sui H, Downing KH. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. *Structure*. 2010; 18 (8): 1022-1031.
526. Swulius MT, Waxham MN. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65 (17): 2637-2657.
527. Szechyńska-Hebda M, Wedzony M, Dubas E, Kieft H, van Lammeren A. Visualisation of microtubules and actin filaments in fixed BY-2 suspension cells using an optimised whole mount immunolabelling protocol. *Plant Cell Rep*. 2006; 25 (8): 758-766.
528. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, Doncheva NT, Legeay M, Fang T, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (D1): D605-D612.
529. Tagliabracci VS, Pinna LA, Dixon JE. Secreted protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 2013; 38 (3): 121-30.
530. Tahtouh T, Elkins JM, Filippakopoulos P, Soundararajan M, Burgy G, Durieu E, Cochet C, Schmid RS, Lo DC, Delhommel F, Oberholzer AE, Pearl LH, Carreaux F, Bazureau JP, Knapp S, Meijer L. Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B. *J Med Chem*. 2012; 55 (21): 9312-30.
531. Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A. MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav*. 2010; 5 (11): 1370-1378.

532. Takahashi H, Hirota K, Kawahara A, Hayakawa E, Inoue Y. Randomization of cortical microtubules in root epidermal cells induces root hair initiation in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol.* 2003; 44: 350–359.

533. Takatani S, Ozawa S, Yagi N, Hotta T, Hashimoto T, Takahashi Y, Takahashi T, Motose H. Directional cell expansion requires NIMA-related kinase 6 (NEK6)-mediated cortical microtubule destabilization. *Sci. Repts.* 2017; 7 (1): #7826.

534. Takatsuka H, Ohno R, Umeda M. The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF;1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant J.* 2009; 59 (3): 475-87.

535. Tamir TY, Bowman BM, Agajanian MJ, Goldfarb D, Schrank TP, Stohrer T, Hale AE, Siesser PF, Weir SJ, Murphy RM, LaPak KM, Weissman BE, Moorman NJ, Major MB. Gain-of-function genetic screen of the kinome reveals BRSK2 as an inhibitor of the NRF2 transcription factor. *J Cell Sci.* 2020; 133 (14): jcs241356.

536. Tang Z, Shu H, Oncel D, Chen S, Yu H. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell.* 2004; 16 (3): 387-97.

537. Tarrant MK, Cole PA. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 797-825.

538. Tassan JP, Le Goff X. An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. *Biol. Cell.* 2004; 96 (3): 193-199.

539. Taylor SS, Keshwani MM, Steichen JM, Kornev AP. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2012, 367 (1602), 2517–2528.

540. Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36 (2): 65-77.

541. Taylor SS, Ha E, McKeon F. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *The Journal of cell biology* 142: 1–11.

542. Terrien E, Chaffotte A, Lafage M, Khan Z, Préhaud C, Cordier F, Simenel C, Delepierre M, Buc H, Lafon M, Wolff N. Interference with the PTEN-MAST2 interaction by a viral protein leads to cellular relocalization of PTEN. *Sci Signal*. 2012; 5 (237): ra58.

543. Tesmer JJ, Tesmer VM, Lodowski DT, Steinhagen H, Huber J. Structure of human G protein-coupled receptor kinase 2 in complex with the kinase inhibitor balanol. *J Med Chem*. 2010; 53 (4): 1867-1870.

544. Tomé F, Nägele T, Adamo M, Garg A, Marco-Llorca C, Nukarinen E, Pedrotti L, Peviani A, Simeunovic A, Tatkiewicz A, Tomar M, Gamm M. The low energy signaling network. *Front Plant Sci*. 2014; 5: 353.

545. Tosatto SC, Bindewald E, Hesser J, Männer R. A divide and conquer approach to fast loop modeling. *Protein Eng*. 2002; 15 (4): 279-86.

546. Trapp O, Seeliger K, Puchta H. Homologs of breast cancer genes in plants. *Front Plant Sci*. 2011 Jun 20;2:19.

547. Tian G, Jaglin XH, Keays DA, Francis F, Chelly J, Cowan NJ. Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. *Hum Mol Genet*. 2010; 19 (18): 3599-613.

548. Tsai AY-L, Gazzarrini S. Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front. Plant Sci*. 2014; 5: 119.

549. Tsai CF, Wang YT, Yen HY, Tsou CC, Ku WC, Lin PY, Chen HY, Nesvizhskii AI, Ishihama Y, Chen YJ. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. *Nat Commun*. 2015; 6: 6622.

550. Tweedie-Cullen RY, Reck JM, Mansuy IM. Comprehensive mapping of post-translational modifications on synaptic, nuclear, and histone proteins in the adult mouse brain. *J Proteome Res.* 2009; 8 (11): 4966-82.

551. Uchimura S, Oguchi Y, Hachikubo Y, Ishiwata S, Muto E. Key residues on microtubule responsible for activation of kinesin ATPase. *EMBO J.* 2010; 29 (7): 1167-1175.

552. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D506-D515.

553. Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, Li F, Balasenthil S, Marcus S, Goodson HV, Sahin AA, Kumar R. p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B. *Mol Cell Biol.* 2005; 25 (9): 3726-3736.

554. Valiente M, Andrés-Pons A, Gomar B, Torres J, Gil A, Tapparel C, Antonarakis SE, Pulido R. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J Biol Chem.* 2005; 280 (32): 28936-28943.

555. Valmonte GR, Arthur K, Higgins CM, MacDiarmid RM. Calcium-dependent protein kinases in plants: evolution, expression and function. *Plant Cell Physiol.* 2014; 55 (3): 551-569.

556. Van Bruaene N, Joss Gvan Oostveldt P. Reorganization and *in vivo* dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development. *Plant Physiol.* 2004; 136: 3905–3919.

557. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005; 26 (16): 1701-1718.

558. Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, et al. 2010. Targeted interactomics

reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular systems biology* 6: 397.

559. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, Darian E, Guvench O, Lopes P, Vorobyov I, Mackerell AD Jr. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comp Chem*. 2010; 31: 671–690.

560. Varjosalo M, Keskitalo S, Van Drogen A, Nurkkala H, Vichalkovski A, Aebersold R, Gstaiger M. The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Rep*. 2013; 3 (4): 1306-20.

561. Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A, Pérez-García A. Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Sci Repts*. 2018; 8 (1): #7161.

562. Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One*. 2007; 2 (12): e1326.

563. Venselaar H., Krieger E., Vriend G. Homology modeling. *Structural Bioinformatics*. Second Edition. Eds. Bourne P.E., Weissig H. John Wiley & Sons. Hoboken NJ. 2009: 715-732.

564. Verde F, Labbé JC, Dorée M, Karsenti E. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*. 1990; 343(6255):233-8.

565. Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle*. 2007; 6 (17): 2152-60.

566. Volodina IuL, Shtil' AA. [Casein kinase 2, the versatile regulator of cell survival]. *Mol Biol (Mosk)*. 2012 May-Jun;46(3):423-33.

567. Vigneron S, Brioudes E, Burgess A, Labbe JC, Lorca T, Castro A. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J*. 2009; 28: 2786-2793.

568. Vincent S, Settleman J. The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol*. 1997; 17 (4): 2247-2256.

569. Voets E, Wolthuis RM. MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell Cycle*. 2010; 9 (17): 3591-3601.

570. Vogel J, Drapkin B, Oomen J, Beach D, Bloom K, Snyder M. Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev Cell*. 2001 Nov;1(5):621-31.

571. Wade RH. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol*. 2009; 43 (2): 177-191.

572. Wagner J, von Matt P, Sedrani R, Albert R, Cooke N, Ehrhardt C, Geiser M, Rummel G, Stark W, Strauss A, Cowan-Jacob SW, Beerli C, Weckbecker G, Evenou JP, Zenke G, Cottens S. Discovery of 3-(1H-indol-3-yl)-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-yl]pyrrole-2,5-dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isotypes. *J Med Chem*. 2009; 52 (20): 6193-6196.

573. Waldschmidt HV, Homan KT, Cato MC, Cruz-Rodríguez O, Cannavo A, Wilson MW, Song J, Cheung JY, Koch WJ, Tesmer JJ, Larsen SD. Structure-Based

Design of Highly Selective and Potent G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Inhibitors Based on Paroxetine. *J Med Chem.* 2017; 60 (7): 3052-3069.

574. Wandosell F, Serrano L, Avila J. Phosphorylation of alpha-tubulin carboxyl-terminal tyrosine prevents its incorporation into microtubules. *J Biol Chem.* 1987 Jun 15;262(17):8268-73.

575. Wandosell F, Serrano L, Hernández MA, Avila J. Phosphorylation of tubulin by a calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1986; 261 (22): 10332-10339.

576. Wang W, Chen X. HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development.* 2004; 131 (13): 3147-3156.

577. Wang H, Chevalier D, Larue C, Ki Cho S, Walker JC. The Protein Phosphatases and Protein Kinases of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book.* 2007; 5: e0106.

578. Wang Z, Cole PA. Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol.* 2014; 548: 1-21.

579. Wang M, Yu D, Guo X, Cui Y, Li X, Zhang J, Zhao L, Chang H, Hu S, Zhang C, Shi J, Liu X. Casein kinase 1-Like 3 is required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *African J Biotech.* 2011; 10 (61): 13219–13229.

580. Wang X, Yang Y, Duan Q, Jiang N, Huang Y, Darzynkiewicz Z, Dai W. sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev Cell.* 2008; 14 (3): 331-41.

581. Wang D, Harper JF, Gribskov M. Systematic Trans-Genomic Comparison of Protein Kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 2003; 1325 (1): 2152–2165.

582. Wang H, Chevalier D, Larue C, Ki Cho S, Walker JC. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*. 2007; 5: e0106.

583. Wang Z, Ding G, Geistlinger L, Li H, Liu L, Zeng R, Tateno Y, Li Y. Evolution of protein phosphorylation for distinct functional modules in vertebrate genomes. *Mol Biol Evol*. 2011; 28 (3): 1131-40.

584. Warnecke A, Sandalova T, Achour A, Harris RA. PyTMs: a useful PyMOL plugin for modeling common post-translational modifications. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15: 370.

585. Wasteneys GO. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr Opin Plant Biol*. 2004; 7 (6): 651-660.

586. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016; 54: 5.6.1-5.6.37.

587. Wei C, Wang Y, Li X. The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis. *Onco Targets Ther*. 2018; 11: 2185-2193.

588. Wei L, Hubbard SR, Smith RF, Ellis L. Protein kinase superfamily comparisons of sequence data with three-dimensional structures. *Current Opinion in Structural Biology*. 1994; 4: 450-455.

589. Weingartner M, Binarova P, Drykova D, Schweighofer A, David JP, Heberle-Bors E, Doonan J, Bögre L. Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell*. 2001; 13 (8): 1929-43.

590. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34 (Pt 1): 7-11.

591. Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Dec;4(12): 938-47.

592. Wiechmann S, Czajkowska H, de Graaf K, Grötzinger J, Joost HG, Becker W. Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302 (2): 403-408.

593. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB 3rd, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 2018; 27 (1): 293-315.

594. Witzcak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65: 3737.

595. Wittau M, Wolff S, Xiao Z, Henne-Bruns D, Knippschild U. Die stressinduzierte Casein Kinase 1 delta kann die Spindeldynamik durch direkte Interaktion mit dem Mikrotubuli assoziierten Protein MAP1A beeinflussen. In: Rothmund M, Jauch KW, Bauer H. (eds) *Chirurgisches Forum 2005*. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, 34, ch. 13, Springer, Berlin, Heidelberg, 2005: 37-39.

596. Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (10): 2207.

597. Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci.* 2010; 123 (Pt 20): 3447-3455.

598. Wolber G, Langer T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J Chem Inf Model.* 2005; 45 (1): 160-169.

599. Wolff S, Xiao Z, Wittau M, Süssner N, Stöter M, Knippschild U. Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 delta) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A). *Biochem Biophys Acta.* 2005; 1745: 196–206.

600. Wu D, Wallen HD, Nuñez G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science*. 1997; 275 (5303): 1126-1129.

601. Wurzinger B, Nukarinen E, Nägele T, Weckwerth W, Teige M. The SnRK1 Kinase as Central Mediator of Energy Signaling between Different Organelles. *Plant Physiol*. 2018; 176 (2): 1085-1094.

602. Xu Q, Fu HH, Gupta R, Luan S. Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998 May;10(5):849-57.

603. Xu W, Zhao Y, Chen S, Xie J, Zhang D. Evolution and Functional Divergence of the Fructokinase Gene Family in *Populus*. *Front Plant Sci*. 2020 May 14;11:484.

604. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015. 12 (1): 7–8.

605. Yuan L, Wang J, Xiao H, Wu W, Wang Y, Liu X. MAPK signaling pathways regulate mitochondrial-mediated apoptosis induced by isoorientin in human hepatoblastoma cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2013; 53: 62-8.

606. Yasumura Y, Kawakita Y. Vero cell line derived from the kidney of a normal, adult, African green monkey (*Cercopithecus*). *Nippon Rinsho*. 1963; 21: 1209.

607. Yde CW, Olsen BB, Meek D, Watanabe N, Guerra B. The regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis. *Oncogene*. 2008; 27 (37): 4986-49897.

608. Yemets A, Krasnylenko Y, Sheremet Y, Blume Y. Nitric oxide donor and scavenger influence on *Arabidopsis thaliana* root development via cortical microtubules reorganization. *Acta Biol. Cracoviensia (Ser. Botanica)*, 2009; 51 (S.2): 122.

609. Yemets A, Sheremet Y, Vissenberg K, Van Orden J, Verbelen J-P, Blume YB. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biol Int*. 2008; 32: 630–637.

610. Yemets A, Stelmakh O, Blume YB. Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action. *Cell Biol Int.* 2008; 32: 623–629.

611. Yemets AI, Lloyd C, Bulmer YaB. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology* / Ed. Bulmer Ya.B. et al. Netherlands: Springer. 2008: 145-159.

612. Yeung B, Khanal P, Mehta V, Trinkle-Mulcahy L, Yang X. Identification of Cdk1-LATS-Pin1 as a novel signaling axis in anti-tubulin drug response of cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2018; 16(6): 1035-1045.

613. Yoshida N, Haga K, Haga T. Identification of sites of phosphorylation by G-protein-coupled receptor kinase 2 in β -tubulin. *Eur J Biochem.* 2003; 270 (6): 1154-63.

614. Yoshida H, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *J Neurochem.* 2012; 120 (1): 165-176.

615. Yu I, Garnham CP, Roll-Mecak A. Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem.* 2015; 290 (28): 17163–17172.

616. Yu Y, Li Y, Li L, Lin J, Zheng C, Zhang L. Overexpression of PwTUA1, a pollen-specific tubulin gene, increases pollen tube elongation by altering the distribution of alpha-tubulin and promoting vesicle transport. *J Exp Bot.* 2009;60(9):2737-49.

617. Yue J, Xie M, Gou X, Lee P, Schneider MD, Wu X. Microtubules regulate focal adhesion dynamics through MAP4K4. *Dev Cell.* 2014 Dec 8;31(5):572-85.

618. Yue X, Guo Z, Shi T, Song L, Cheng Y. Arabidopsis AGC protein kinases IREH1 and IRE3 control root skewing. *J Genet Genomics.* 2019; 46 (5): 259-267.

619. Zambito AM, Wolff J. Palmitoylation of tubulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 239 (3): 650-4.

620. Zelenak C, Eberhard M, Jilani K, Qadri SM, Macek B, Lang F. Protein kinase CK1 α regulates erythrocyte survival. *Cell Physiol Biochem.* 2012, 29: 171–180.

621. Zhang J. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* 2003; 18: 292–8.

622. Zhang X, Chen Q, Feng J, Hou J, Yang F, Liu J, Jiang Q, Zhang C. Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. *J Cell Sci* 2009; 122 (Pt 13): 2240-51.

623. Zhang B, Chen HW, Mu RL, Zhang WK, Zhao MY, Wei W, Wang F, Yu H, Lei G, Zou HF, Ma B, Chen SY, Zhang JS. NIMA-related kinase NEK6 affects plant growth and stress response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2011 Dec;68(5):830-43.

624. Zhang Y, Yao W, Wang F, Su Y, Zhang D, Hu S, Zhang X. AGC protein kinase AGC1-4 mediates seed size in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 2020 Jun;39(6):825-837.

625. Zhao JW, Gao ZL, Ji QY, Wang H, Zhang HY, Yang YD, Xing FJ, Meng LJ, Wang Y. Regulation of cofilin activity by CaMKII and calcineurin. *Am J Med Sci.* 2012; 344 (6): 462-72.

626. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O, SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem.* 2011; 32 (11): 2359-2368.

627. Zulawski M, Braginets R, Schulze WX. PhosPhAt goes kinases--searchable protein kinase target information in the plant phosphorylation site database PhosPhAt. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D1176-84.

628. Zyss D, Ebrahimi H, Gergely F. Casein kinase I delta controls centrosome positioning during T cell activation. *J Cell Biol.* 2011; 195: 781–797.

629. 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.

630. **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.

631. **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.

632. **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.

633. Кораблев МД, **Карпов ПА**, Раевский АВ, Блюм ЯБ. Поиск и предсказание трехмерной структуры вероятных партнеров растительных гомологов протеинкиназы Dugk1A. Биология растений и биотехнология. 2011, 5-7 октября, Белая Церковь, Украина. с.73.

634. Краснопорова О.Є., Ісаєнков С.В., Карпов П.А., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Клади́стический анализ серин-треонінової протеїнкiнази KIN10 та особливості її експресії в різних органах *Arabidopsis thaliana*. Доповіді Національної академії наук України. 2016; 1: С.81-91.

635. Краснопорова ОЄ, Ісаєнков СВ, **Карпов ПА**, Ємець АІ. Нові генетичні конструкції KIN10-His та KIN11-His як інструмент для встановлення функціональної гомології протеїнкiназ SnRK1 та BRSK. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 68-72.

636. Лакін ГФ. Біометрія / Г.Ф. Лакін. М.: Вищашкола. 1980; 3: 293.

637. Новожилов ДО, **Карпов ПА**, Раевский АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ. Ca^{2+} - та Ca^{2+} -Кальмодулін-залежні протеїнкінази - потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 323–328.

ДОДАТОК 1

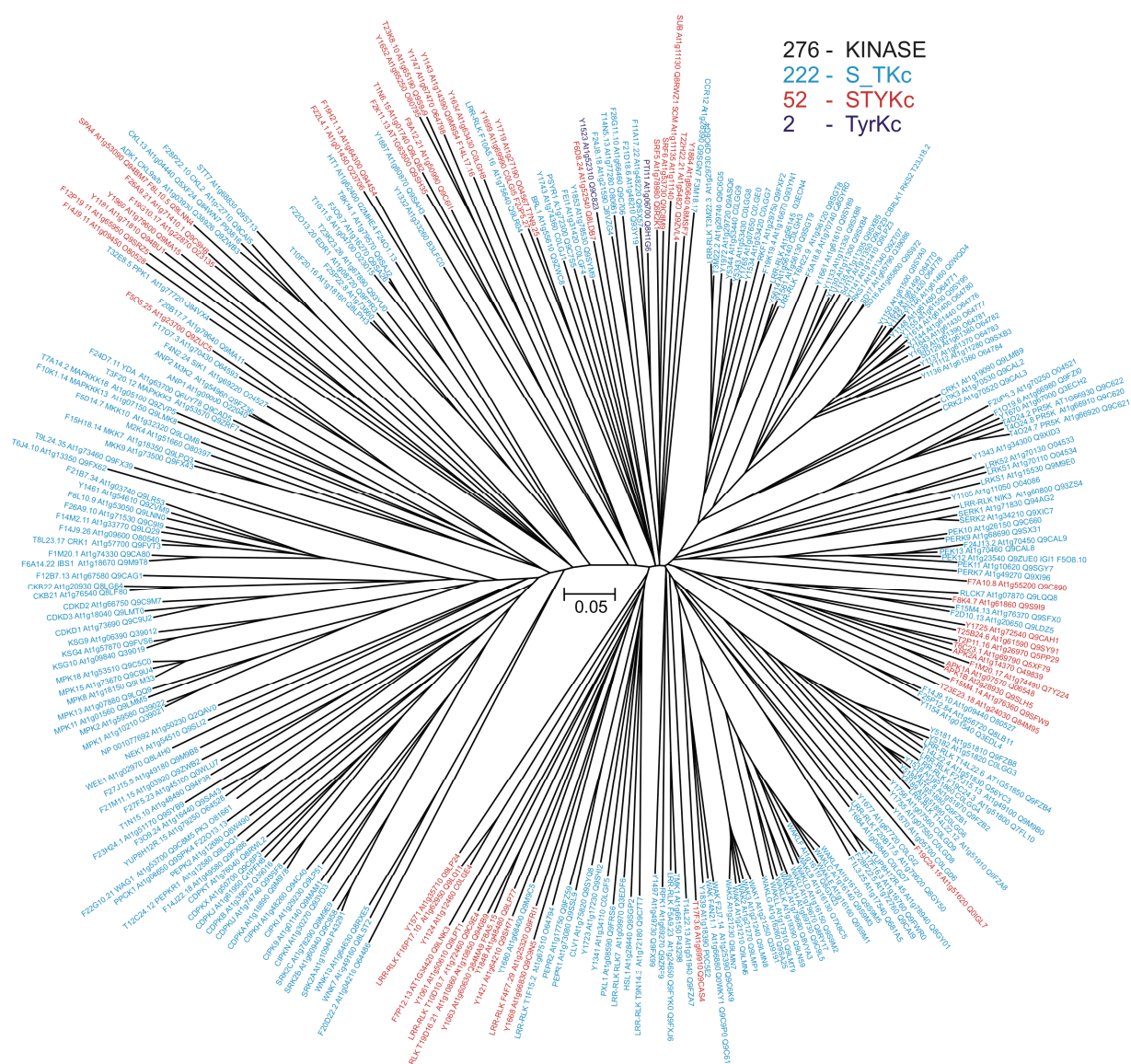
Кіноми I-V хромосом *A. thaliana* (ревізія 2017 року)

Рис. Д1.1. Філогенетичне древо кіному хромосоми I *A. thaliana*, що було побудовано шляхом NJ-кластеризації послідовностей каталітичних доменів.

Примітка: жирний шрифт позначає протеїнкінази, що мають статус «reviewed» в UniProtKB, голубий колір відображує S_TKc-кінази, червоний – протеїнкінази STYKc, синій позначає протеїнкінази, що водночасно відповідають профілям STYKc і TyrKc кіназ.

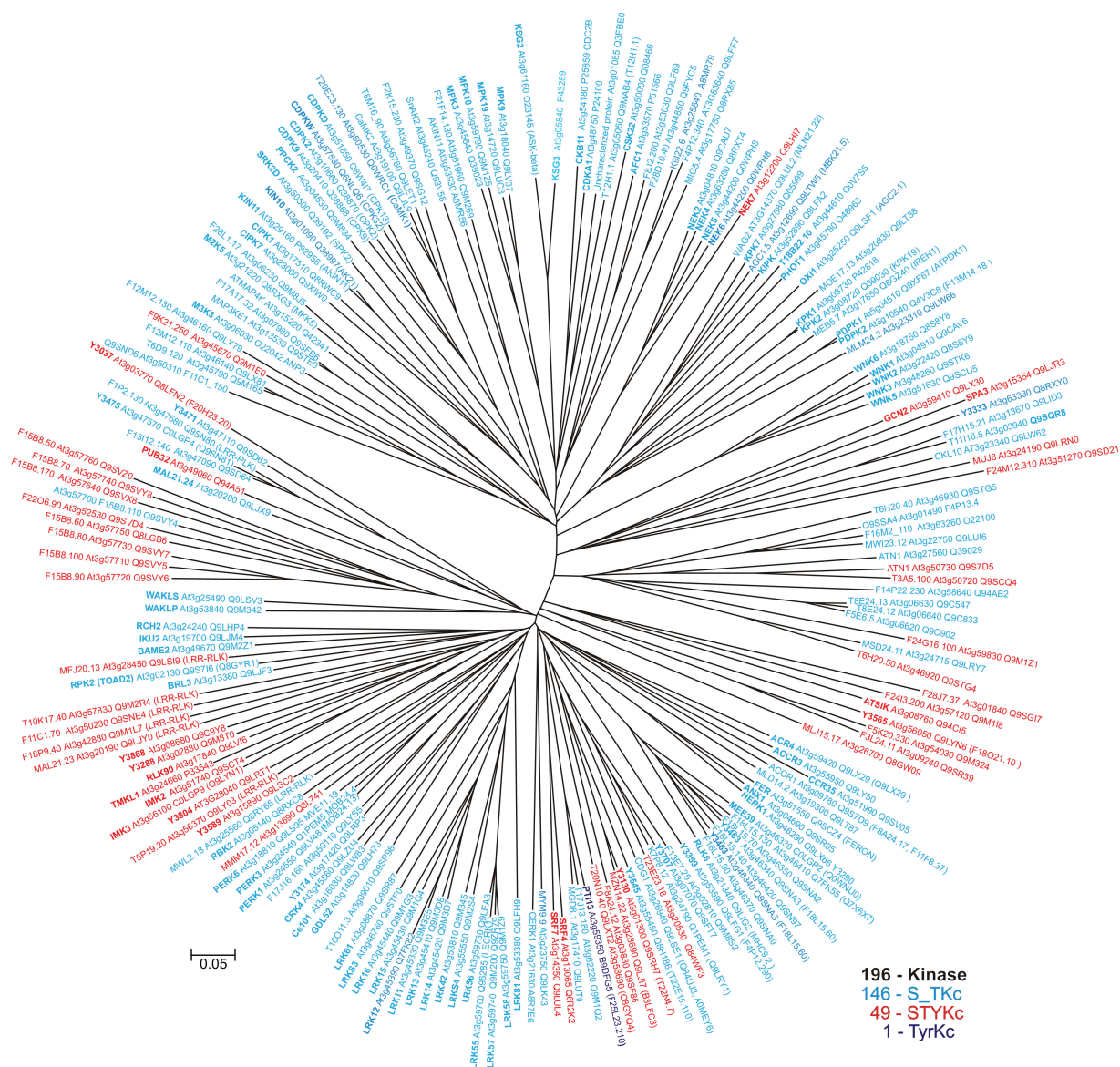


Рис. Д1.3. Філогенетичне древо кіному хромосоми III *A. thaliana*, що було побудовано шляхом NJ-кластеризації послідовностей каталітичних доменів.

Примітка: жирний шрифт позначає протеїнкінази, що мають статус «reviewed» в UniProtKB, голубий колір відображує S_TKc-кінази, червоний – протеїнкінази STYKc, синій позначає протеїнкінази, що водночас відповідають профілям STYKc і TyrKc кіназ.

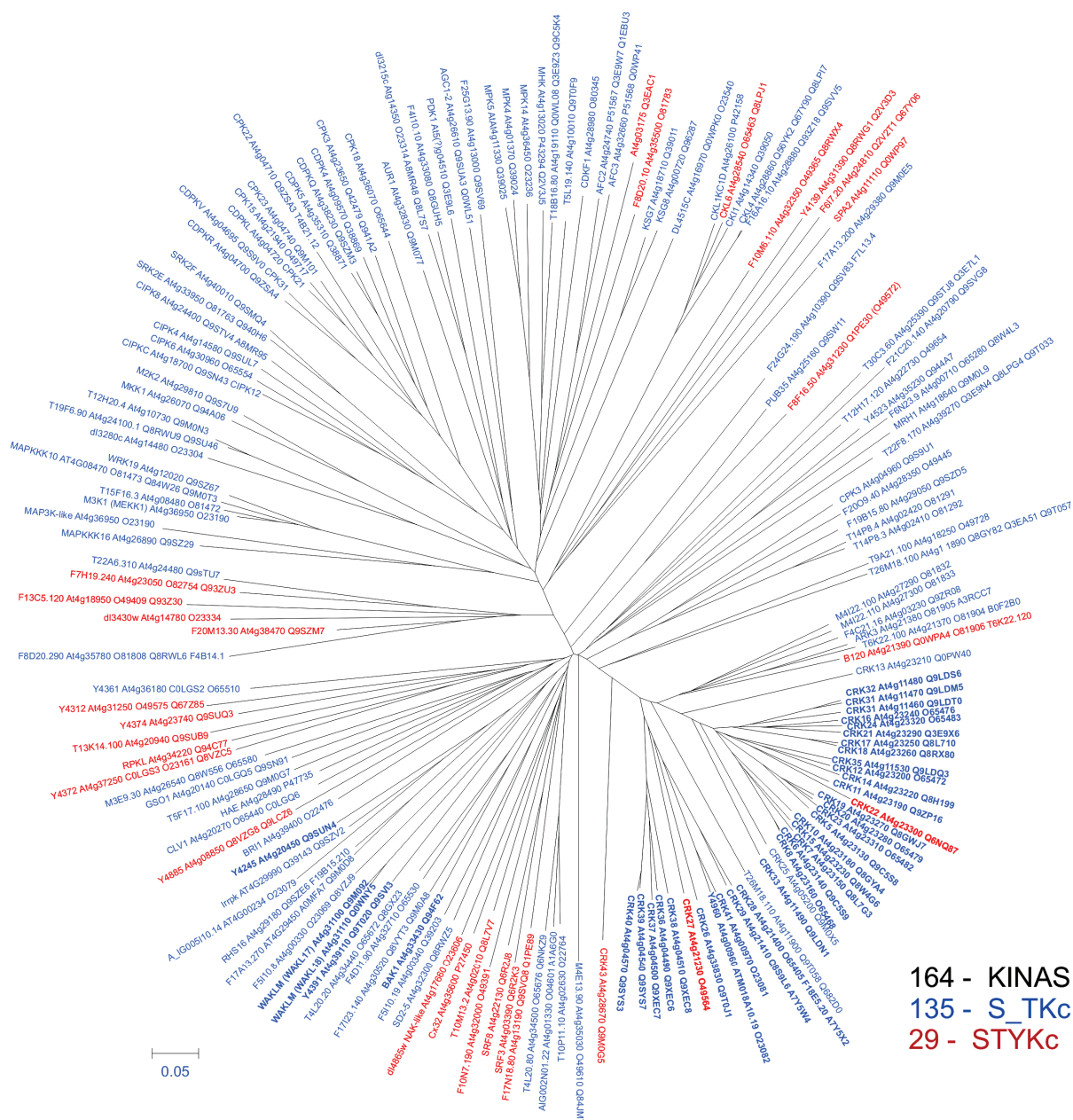


Рис. Д1.4. Філогенетичне древо кіному хромосоми IV *A. thaliana*, що було побудовано шляхом NJ-кластеризації послідовностей каталітичних доменів.

Примітка: жирний шрифт позначає протеїнкінази, що мають статус «reviewed» в UniProtKB, голубий колір відображує S_TKc-кінази, червоний – протеїнкінази STYKc.

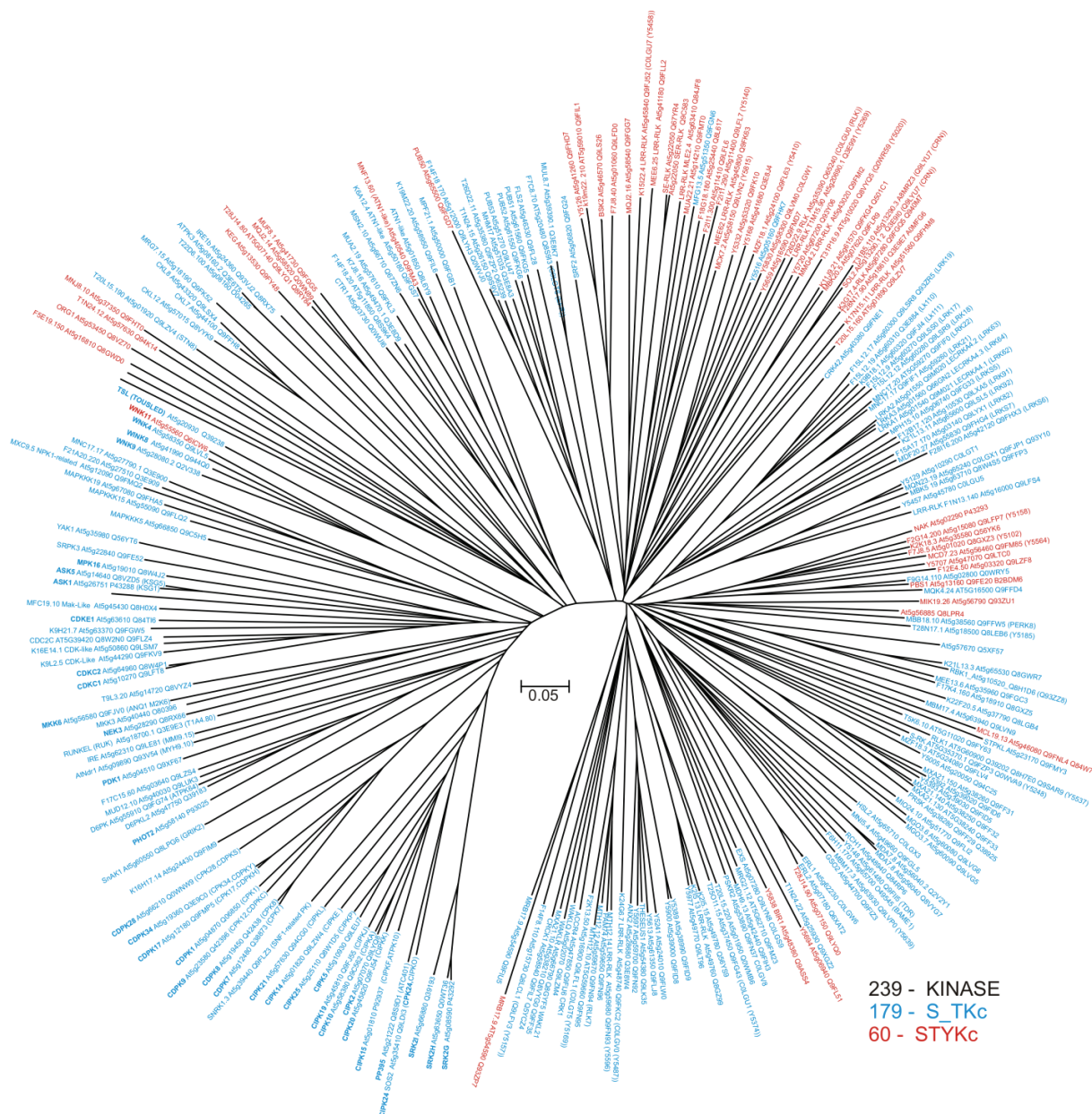
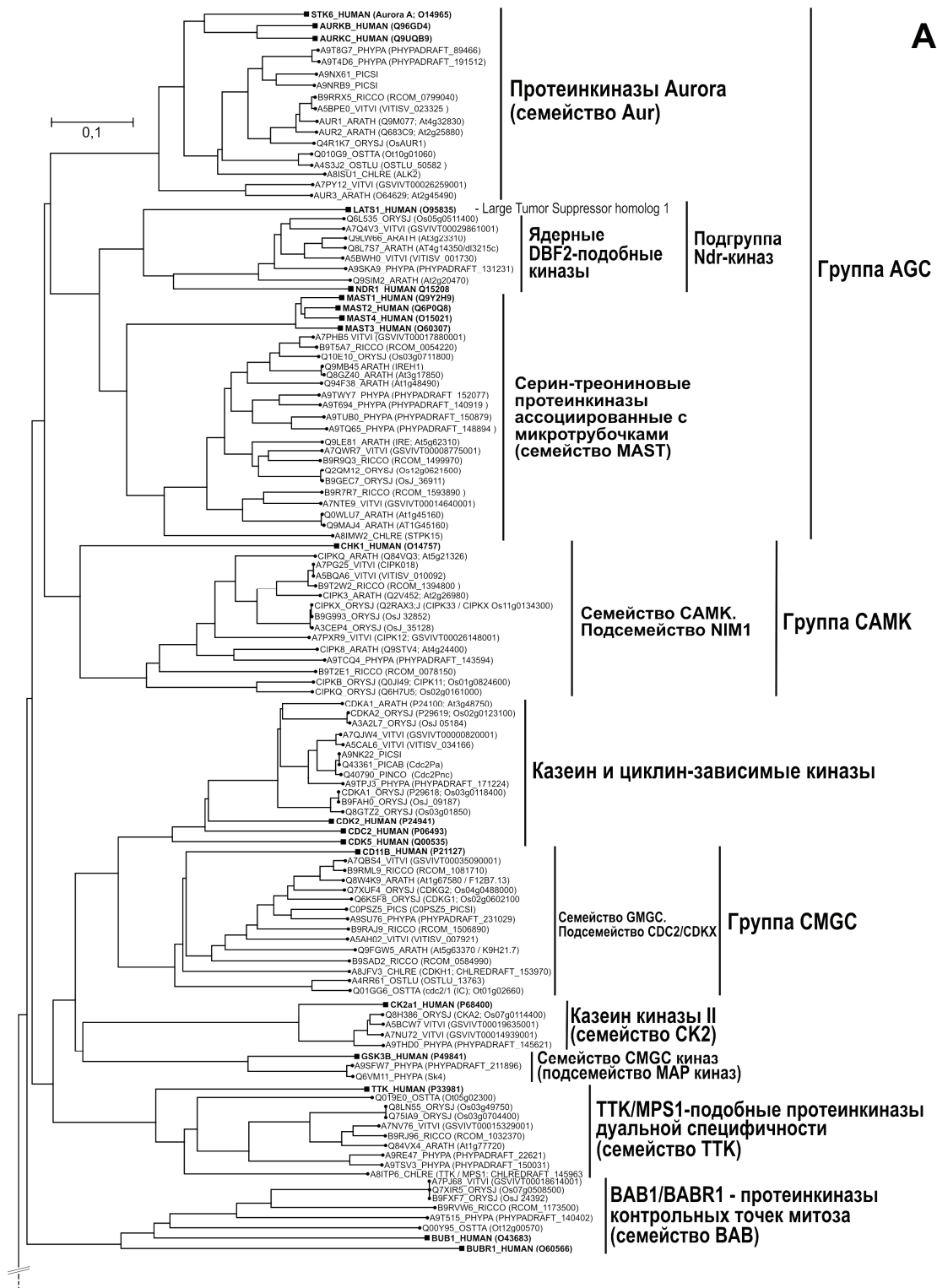


Рис. Д1.5. Філогенетичне древо кіному хромосоми V *A. thaliana*, що було побудовано шляхом NJ-кластеризації послідовностей каталітичних доменів.

Примітка: жирний шрифт позначає протеїнкінази, що мають статус «reviewed» в UniProtKB, голубий колір відображує S_TKc-кінази, червоний – протеїнкінази STYKc.

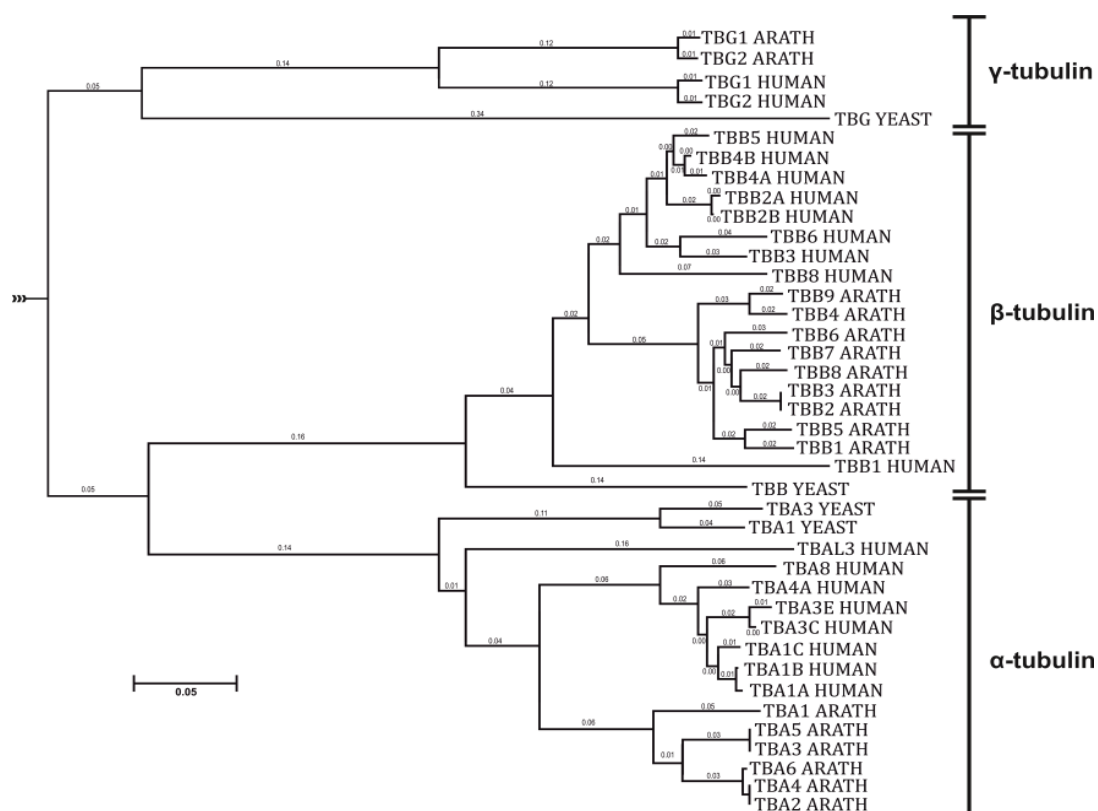
ДОДАТОК 2

Кіноми I-V хромосом *A. thaliana* (ревізія 2017 року)



ДОДАТОК 3

Амінокислотні послідовності ізотипів α -, β - і γ -тубуліну, що були використані в межах актуального дисертаційного дослідження

*Arabidopsis thaliana*

>sp|P11139|TBA1_ARATH Tubulin alpha-1 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBA1 PE=2 SV=1

MREIISIHIGQAGIQVGNWCWELYCLEHGIQPDGTMPSDSTVGACHDAFNTEFFSETSSGQHVPRAVFLD
LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGREIVDTCLERLRKLDNCTGLQGFLVF
NAVGGGTGSGLGSLLLERLSVDFGKSKLGFTIYPSQVSTAVVEPYNSVLSTHSLLEHTDVVLLDNE
AIYDICRRSLDIERPTYSNLNRLISQTISLTTSLRFDGAINVDITEFQTNLVPYPRIFHMLSSYAPVI
SSAKAYHEQFSVPEITTSVFEPNSMMAKCDPRHGKYMALCLMYRGDVPKDVNTAVAAIKAKRTIQFVD
WCPTGFKCGINYQPPSVVPGDLAKVQRAVCMISNNTAVAEVFSRIDHKFDLMYSKRAVHWHYVGE
EGEFSEAREDLAALEKDYEEVGGEGAEDDDEEGDEY

>sp|B9DGT7|TBA2_ARATH Tubulin alpha-2 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBA2 PE=2 SV=2

MRECISIHIGQAGIQVGNACWELYCLEHGIQPDGQMPDSTVGGGDDAFNTEFFSETGAGKHVPRAVFD
LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEIVDLCLDRIRKLDNCTGLQGFLVF
NAVGGGTGSGLGSLLLERLSVDYGGKSKLGFTVYPSQVSTSVVEPYNSVLSTHSLLEHTDVSILLDNE

AIYDICRRSLSIERPTYTNLNRLVSVQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIFHMLSSYAPVI
 SAEKAFHEQLSVAEITNSAFEPASMMMAKCDPRHGKYMALCLMYRGDVVVPKDVNAAVGTIKTKRTIQFVD
 WCPTGFKCGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMISNSTSVAEVFSRIDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDLAALEKDYEEVGAEGGDEDEDEGEEY

**>sp|Q56WH1|TBA3_ARATH Tubulin alpha-3 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBA3 PE=1 SV=2**

MREIISIHIGQAGIQVGNACWELLYCLEHGIQPDGMMPDSTTVGVAHDAFNTEFFSETGAGKHVPRAVFVD
 LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRVRKLADNCTGLQGFLVF
 NAVGGGTGSGLGSLLLERLSVDYGKSKLGFITYPSPQVSTAVVEPYNVSVLSTHSLLEHTDVAVLLDNE
 AIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLISQIISLTTSLRFDGAINVDITEFQTNLVPYPRIFHMLSSYAPVI
 SAAKAYHEQLSVPEITNAVFEPASMMMAKCDPRHGKYMALCLMYRGDVVVPKDVNAAVGTIKTKRTVQFVD
 WCPTGFKCGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMISNNTAVAEVFSRIDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDLAALEKDYEEVGAEGGDEDEDEGEEY

**>sp|Q0WV25|TBA4_ARATH Tubulin alpha-4 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBA4 PE=2 SV=2**

MRECISIHIGQAGIQVGNACWELLYCLEHGIQPDGQMPDSTTVGGDDAFNTEFFSETGAGKHVPRAVFVD
 LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVF
 NAVGGGTGSGLGSLLLERLSVDYGKSKLGFITYPSPQVSTSVVEPYNVSVLSTHSLLEHTDVSILLDNE
 AIYDICRRSLSIERPTYTNLNRLVSVQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIFHMLSSYAPVI
 SAEKAFHEQLSVAEITNSAFEPASMMMAKCDPRHGKYMALCLMYRGDVVVPKDVNAAVGTIKTKRTIQFVD
 WCPTGFKCGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMISNSTSVAEVFSRIDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDLAALEKDYEEVGAEGGDEDEDEGEEY

**>sp|B9DHQ0|TBA5_ARATH Tubulin alpha-5 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBA5 PE=1 SV=2**

MREIISIHIGQAGIQVGNACWELLYCLEHGIQPDGQMPDSTTVGVAHDAFNTEFFSETGAGKHVPRAVFVD
 LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVF
 NAVGGGTGSGLGSLLLERLSVDYGKSKLGFITYPSPQVSTAVVEPYNVSVLSTHSLLEHTDVAVLLDNE
 AIYDICRRSLDIERPTYTNLNRLISQIISLTTSLRFDGAINVDITEFQTNLVPYPRIFHMLSSYAPVI
 SAAKAYHEQLSVPEITNAVFEPASMMMAKCDPRHGKYMALCLMYRGDVVVPKDVNAAVGTIKTKRTVQFVD
 WCPTGFKCGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMISNNTAVAEVFSRIDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDLAALEKDYEEVGAEGGDEDEDEGEEY

**>sp|P29511|TBA6_ARATH Tubulin alpha-6 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBA6 PE=1 SV=1**

MRECISIHIGQAGIQVGNACWELLYCLEHGIQPDGQMPDSTTVGGDDAFNTEFFSETGAGKHVPRAVFVD
 LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTVGKEIVDLCLDRIRKLADNCTGLQGFLVF
 NAVGGGTGSGLGSLLLERLSVDYGKSKLGFITYPSPQVSTSVVEPYNVSVLSTHSLLEHTDVSILLDNE
 AIYDICRRSLNIERPTYTNLNRLVSVQVISSLTASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIFHMLSSYAPVI
 SAEKAFHEQLSVAEITNSAFEPASMMMAKCDPRHGKYMALCLMYRGDVVVPKDVNAAVGTIKTKRTIQFVD
 WCPTGFKCGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMISNSTSVAEVFSRIDHKFDLMYAKRAFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDLAALEKDYEEVGAEGGDEDEDEGEEY

**>sp|P12411|TBB1_ARATH Tubulin beta-1 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBB1 PE=2 SV=1**

MREILHVQGGQCGNQIGSKFWEVICDEHGVDPDPTGRYNGDSADLQLERINVYYNEASGGRYVPRAVLMDL
 EPGTMDSIRSGPYGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDAVLDVVRKEAENCDCLOGFQVCH
 SLGGGTGSGMGTTLLISKIREEYPDRMMLTFSVFPSPKVSVDVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEA
 LYDICFRTLKLSFPGDLNHLISATMSGVTCSLRFPQGLNSDLRKLAVNLI PFPRLHFFMVGFAPLTS
 RGSQQYISLTVPELTQQMWDAKNMCAADPRHGRYLTAAMFRGKMSTKEVDEQILNVQNKNSYFVEW
 IPNNVKSSVCDIPPTGIKMASTFVGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGEEMDEMEFTEAES
 NMNDLVSEYQQYQDATADEEDEYDEEEEQVYES

>sp|Q56YW9|TBB2_ARATH Tubulin beta-2 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBB2 PE=2 SV=2
 MREILHIQGGQCGNQIGAKFWEVVC AEHGIDPTGRYTGDSDLQLERINVYYNEASCGRFVPRAVLMDLE
 PGTMDSLRSGPYGQTFRPNDFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVL DVVRKEAENCDC LQGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMLTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL
 YDICFRTLKLTTPSFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPR LHFFMVG FAPLTSR
 GSQQYRSLTVPELTQQMWDSKNMMCAADPRHGRYL TASAMFRGKMSTKEVDEQMLNVQNKNS SYFVEWI
 PNNVKSTVCDIPPTGLKMASTFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATADEEGDYEDEEEGEYQOQEEY

>sp|Q9ASR0|TBB3_ARATH Tubulin beta-3 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBB3 PE=2 SV=2
 MREILHIQGGQCGNQIGAKFWEVVC AEHGIDPTGRYTGDSDLQLERINVYYNEASCGRFVPRAVLMDLE
 PGTMDSLRSGPYGQTFRPNDFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVL DVVRKEAENCDC LQGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMLTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL
 YDICFRTLKLTTPSFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPR LHFFMVG FAPLTSR
 GSQQYRSLTVPELTQQMWDSKNMMCAADPRHGRYL TASAMFRGKMSTKEVDEQMLNVQNKNS SYFVEWI
 PNNVKSTVCDIPPTGLKMASTFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATADEEGDYEDEEEGEYQOQEEY

>sp|P24636|TBB4_ARATH Tubulin beta-4 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBB4 PE=2 SV=2
 MREILHIQGGQCGNQIGAKFWEVICDEHGIDHTGQYVGDSP LQLERIDVYFNEASGGKYVPRAVLMDLE
 PGTMDSLRSGPFGQIFRPNDFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVL DVVRKEAENS DC LQGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMMTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL
 YDICFRTLKLANPTFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPR LHFFMVG FAPLTSR
 GSQQYSALSVP ELTQQMWDAKNMMCAADPRHGRYL TASAVFRGKLS TKEVDEQMMNIQNKNS SYFVEWI
 PNNVKSSVCDIAPKGLKMASTFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVAEYQQYQDATA GEEYEEEEEEYET

>sp|P29513|TBB5_ARATH Tubulin beta-5 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBB5 PE=2 SV=1
 MREILHIQGGQCGNQIGSKFWEVICDEHGIDSTGRYSGDTADLQLERINVYYNEASGGRYVPRAVLMDL
 EPGTMDSIRSGPFGQIFRPNDFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDAVLDVVRKEAENCDC LQGFQVCH
 SLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMLTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEA
 LYDICFRTLKLTSTPSFGDLNHLISATMSGVTC SLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPR LHFFMVG FAPLTS
 RGSQQYISLTVPELTQQMWDSKNMMCAADPRHGRYL TASAI FRGQMSTKEVDEQILNIQNKNS SYFVEW
 IPNNVKSSVCDIPKGLKMAATFVGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAES
 NMNDLVAEYQQYQDATADEEGEYDVEEEEEEGDYET

>sp|P29514|TBB6_ARATH Tubulin beta-6 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBB6 PE=2 SV=1
 MREILHIQGGQCGNQIGSKFWEVVCDEHGIDPTGRYVGN S DLQLERVNVYYNEASCGRYVPRAILMDLE
 PGTMDSVRTGPYGQIFRPNDFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDAVLDVVRKEAENCDC LQGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMLTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL
 YDICFRTLKLTTPSFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPR LHFFMVG FAPLTSR
 GSQQYRALTVPELTQQMWDSKNMMCAADPRHGRYL TASAMFRGKMSTKEVDEQMINVQNKNS SYFVEWI
 PNNVKSSVCDIAPRGLSMAS TFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATADEGEYEEDEDEEEILDHE

>sp|P29515|TBB7_ARATH Tubulin beta-7 chain OS=Arabidopsis thaliana
OX=3702 GN=TUBB7 PE=2 SV=1
 MREILHIQGGQCGNQIGSKFWEVVNLEHGIDQTGRYVGDSE LQLERVNVYYNEASCGRYVPRAVLMDLE
 PGTMDSVRS GPYGQIFRPNDFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVL DVVRKEAENCDC LQGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMMTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL

YDICFRTLKLLSTPSFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPRHLHFFMVGFAPLTSR
 GSQQYRNLTVPPELTQQMWDANKMMCAADPRHGRYLTAASAMFRGKMSTKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWI
 PNNVKSTVCDIPPTGLKMASTFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATADEEGEYEEEEAEYEQEETY

**>sp|P29516|TBB8_ARATH Tubulin beta-8 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBB8 PE=2 SV=2**

MREILHIQGGQCGNQIGAKFWEVCAEHGIDSTGRYQGENDLQLERVNVYNEASCGRFVPRAVLMDLE
 PGTMDSVRSGPYGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVLDVVRKEAENCDCLOGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMLTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL
 YDICFRTLKLLTTPSFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPRHLHFFMVGFAPLTSR
 GSQQYRALTVPELTQQMWDANKMMCAADPRHGRYLTAASAMFRGKMSTKEVDEQMINVQNKNSSYFVEWI
 PNNVKSTVCDIPPTGLKMASTFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATADEEEGYEYEEDEVEVQEEQ

**>sp|P29517|TBB9_ARATH Tubulin beta-9 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBB9 PE=1 SV=1**

MREILHIQGGQCGNQIGAKFWEVICGEHGIDQTGQSCGDTDLQLERINVFNEASGGKYVPRAVLMDLE
 PGTMDSLRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELIDSVLDVVRKEAENCDCLOGFQVCHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRMMMTFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADECMVLDNEAL
 YDICFRTLKLANPTFGDLNHLISATMSGVTCCLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPRHLHFFMVGFAPLTSR
 GSQQYSALSVPPELTQQMWDANKMMCAADPRHGRYLTAASAVFRGKMSTKEVDEQMMNVQNKNSSYFVEWI
 PNNVKSSVCDIAPTGLKMASTFIGNSTSIQEMFRRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVAEYQQYQDATVGEYEEYEEDEEEEEE

**>sp|P38557|TBG1_ARATH Tubulin gamma-1 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBG1 PE=1 SV=1**

MPREIITLQVGQCGNQIGMEFWKQLCLEHGISKDGILEDFATQGGDRKDVFFYQADDQHYIPRALLIDL
 EPRVINGIQNGDYRNLYNHENIFVADHGGGAGNNWASGYHQKGVVEEIMDMIDREADGSDSLEGFVLC
 HSIAGGTGSGMGSYLLETTLNDRYSKLLVQTYSVFPNQMETSDVVVQPYNSLLTLKRLTLNADCVVVDN
 TALGRIEVERLHLTNPTFAQTNSLSTVMSASTTTLRYPGYMNNDLVGLLASLIPTPRCHFLMTGYTPL
 TVERQANVIRKTTVLDVMRLLQTKNIMVSSYARNKEASQAKYISILNIIQGEVDPTQVHESLQRI RER
 KLVNFI EWGPASIQVALSKKSPYVQTAHRVSGLM LASHTSIRHLFSKCLSQYDKLRKKQAFLDNYRKF
 MFADNDLSEFDESRIIESLVDEYKACESPDYIKWGMEDPEQLMTGEGNASGVVDPKLA F

**>sp|P38558|TBG2_ARATH Tubulin gamma-2 chain OS=Arabidopsis thaliana
 OX=3702 GN=TUBG2 PE=1 SV=1**

MPREIITLQVGQCGNQIGMEFWKQLCLEHGISKDGILEDFATQGGDRKDVFFYQADDQHYIPRALLIDL
 EPRVINGIQNGEYRNLYNHENIFLSDHGGGAGNNWASGYHQKGVVEEIMDMIDREADGSDSLEGFVLC
 HSIAGGTGSGMGSYLLETTLNDRYSKLLVQTYSVFPNQMETSDVVVQPYNSLLTLKRLTLNADCVVVDN
 TALNRIEVERLHLTNPTFAQTNSLSTVMSASTTTLRYPGYMNNDLVGLLASLIPTPRCHFLMTGYTPL
 TVERQANVIRKTTVLDVMRLLQTKNIMVSSYARNKEASQAKYISILNIIQGEVDPTQVHESLQRI RER
 KLVNFIDWGPASIQVALSKKSPYVQTS HRVSGLM LASHTSIRHLFSRCLSQYDKLRKKQAFLDNYRKF
 MFADNDLSEFDESRIIESLVDEYKACESPDYIKWGMEDPGQLMTGEGNASGVADPKLA F

Homo sapiens

**>sp|Q71U36|TBA1A_HUMAN Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBA1A PE=1 SV=1**

MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMP SDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHPRAV FVD
 LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVF
 HSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNE
 AIYDICRRNLDIERPTYTNLNLRLIGQIVSSITASLRFDGALNVDLTFEQTNLVPPYPRIHFPPLATYAPVI
 SAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYM ACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVD

WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAAIEAWARLDHKFDLMYAKRAFFVHWYVGEEM
EGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEEEGEY

>sp|P07437|TBB5_HUMAN Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB PE=1 SV=2

MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGTYHGDSDLQLDRISVYYNEATGGKYVPRAILVDLE
PGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKEAESCDCLQGFQLTHS
LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPPDRIMNTFSVVPSPKVSSTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEAL
YDICFRTLKLTPTTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMPFPRHLHFFMPGFAPLTSR
GSQQYRALTVPELTQQVFDANKMMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVEWI
PNNVKTAVCDIPRGLKMAVTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEEMDEMEFTEAESN
MNDLVSEYQQYQDATAEEEEEDFGEEAEAAA

>sp|P68363|TBA1B_HUMAN Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBA1B PE=1 SV=1

MRECISIHVQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSPDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFVD
LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDLRIRKLAQDCTGLQGFVLF
HSFGGGTSGSFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNE
AIYDICRRNLDIRPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTFQTNLVPPYPRIFHPLATYAPVI
SAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMCCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVD
WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAAIEAWARLDHKFDLMYAKRAFFVHWYVGEEM
EGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEEEGEY

MRECISIHVQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSPDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFVD
LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDLRIRKLAQDCTGLQGFVLF
HSFGGGTSGSFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNE
AIYDICRRNLDIRPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTFQTNLVPPYPRIFHPLATYAPVI
SAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMCCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVD
WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAAIEAWARLDHKFDLMYAKRAFFVHWYVGEEM
EGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEEEGEY

>sp|PODPH7|TBA3C_HUMAN Tubulin alpha-3C chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBA3C PE=1 SV=1

MRECISIHVQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSPDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFVD
LEPTVVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDLRIRKLAQDCTGLQGFVLF
HSFGGGTSGSFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFAIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNE
AIYDICRRNLDIRPTYTNLNRLIGQIVSSITASLRFDGALNVDLTFQTNLVPPYPRIFHPLATYAPVI
SAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMCCMLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVD
WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAAIEAWARLDHKFDLMYAKRAFFVHWYVGEEM
EGEFSEAREDLAALKDYEEVGVDSVEAEAEEGEY

>sp|Q13509|TBB3_HUMAN Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB3 PE=1 SV=2

MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGNYVGDSDLQLERISVYYNEASSHKYVPRAILVDLE
PGTMDSVRSRSGAFGHLFRPDNFIIFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKECENCDCCLQGFQLTHS
LGGGTGSGMGTLLISKVREEYPPDRIMNTFSVVPSPKVSSTVVEPYNATLSIHQLVENTDETYCIDNEAL
YDICFRTLKLTPTTYGDLNHLVSATMSGVTTSLRFPGQLNADLRKLAVNMPFPRHLHFFMPGFAPLTAR
GSQQYRALTVPELTQQMFDANKMMAACDPRHGRYLTVAATVFRGRMSMKEVDEQMLAIQSKNSYFVEWI
PNNVKVAVCDIPRGLKMSSTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEEMDEMEFTEAESN
MNDLVSEYQQYQDATAEEEGEMYEDDEEESEAQGP

>sp|P04350|TBB4A_HUMAN Tubulin beta-4A chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB4A PE=1 SV=2

MREIVHLQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGTYHGDSDLQLERINVYYNEATGGNYVPRAVLVDLE
PGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDAVLDVVRKEAESCDCLQGFQLTHS
LGGGTGSGMGTLLISKIREEFPDRIMNTFSVVPSPKVSSTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEAL

YDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMPFRLHFFMPGFAPLTSR
 GSQQYRALTVPELTQQMFDANKMMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLSVQSKNSSYFVEWI
 PNNVKTAVCDIPRGLKMAATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATAEEGEFEEEEEEVA

**>sp|P68366|TBA4A_HUMAN Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBA4A PE=1 SV=1**

MRECISVHVQGAGVQMGNAWELLYCLEHGIQPDGQMPGSDKTIGGGDDSFSTFFCETGAGKHVPRAVFVD
 LEPTVIDEIRNGPYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDPVLDRIRKLSAQCTGLQGFVLF
 HSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNE
 AIYDICRRNLDIRPTYNLNRLLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTFEQTNLVPYPRIFHPLATYAPVI
 SAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMALCLLYRGDVVVPKDVNAIAAIAIKTKRSIQFVD
 WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLMIYAKRAFFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDMAALEKDYEEVGIIDSYEDEDEGE

**>sp|Q9BQE3|TBA1C_HUMAN Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBA1C PE=1 SV=1**

MRECISVHVQGAGVQIGNACWELLYCLEHGIQPDGQMPGSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFVD
 LEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDLIRKLDQCTGLQGFVLF
 HSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNE
 AIYDICRRNLDIRPTYNLNRLLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTFEQTNLVPYPRIFHPLATYAPVI
 SAEKAYHEQLTVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMALCLLYRGDVVVPKDVNAIAIATIKTKRTIQFVD
 WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAVAEAWARLDHKFDLMIYAKRAFFVHWYVGEEME
 EGEFSEAREDMAALEKDYEEVGADSDADGEDEGE

**>sp|P68371|TBB4B_HUMAN Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBB4B PE=1 SV=1**

MREIVHLQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGTYHGDSDLQLERINVYYNEATGGKYVPRAVLVDLE
 PGTMDSVRSRGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKEAESCDCLQGFQLTHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVVPSPKVSQTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEAL
 YDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMPFRLHFFMPGFAPLTSR
 GSQQYRALTVPELTQQMFDANKMMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWI
 PNNVKTAVCDIPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATAEEGEFEEEEEEVA

**>sp|P23258|TBG1_HUMAN Tubulin gamma-1 chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBG1 PE=1 SV=2**

MPREIITLQLGQCGNQIGFQFQKQCAEHGISPEGIVEEFATEGTDRKDVFFYQADDEHYIPRAVLLDL
 EPRVIHSILNSPYAKLYNPENIYLSEHGGGAGNNWASGFSQGEKIHEDIIDFDIIDREADGSDSLEGFVLC
 HSIAGGTGSGGLGSLYLLERLNDRYPKLLVQTYSVFPNQDEMSDVVVQPYNSLLTLKRLTQNADCVVLDN
 TALNRIATDRLHIQNPSFSQINQLVSTIMSASTTTLRYPGYMNDLIGLIASLIPTPRLHFLMTGYTPL
 TTDQSVASVRKTTVLDVMRLLQPKNVMVSTGRDRQTNHCYIAILNIIQGEVDPTQVHKSQRIRERKL
 ANFIWGPASIQVALSRKSPYLPASHRVSGLMANHTSISSLFERTCRQYDKLRKREAFLEQFRKEDMF
 KDNFDEMDTSREIVQQLIDEYHAATRPDIISWGTQEQ

**>sp|Q3ZCM7|TBB8_HUMAN Tubulin beta-8 chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBB8 PE=1 SV=2**

MREIVLTQIGQCGNQIGAKFWEVISDEHAIDSAGTYHGDSHLQLERINVYYNEASGGRYVPRAVLVDLE
 PGTMDSVRSRGPFGQVFRPDNFIQCGAGNNWAKGHYTEGAELMESVMDVVRKEAESCDCLQGFQLTHS
 LGGGTGSGMGTLLLSKIREEYPDRINTFSILPSPKVSQTVVEPYNATLSVHQLIENADETFCIDNEAL
 YDICSKTLKLPPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMPFRLHFFMPGFAPLTSR
 GSQQYRALTVAEALTQQMFDANKMMAACDPRHGRYLTVAAVFRGRMPREVDEQMFNIQDKNSSYFADWL
 PNNVKTAVCDIPRGLKMSATFIGNNTAIQELFKRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATAEEEEDEEYAEVEVA

>sp|Q9BVA1|TBB2B_HUMAN Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB2B PE=1 SV=1

MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISEDHGIDPTGSYHGSDQLERINVYYNEATGNKYVPRAILVDLE
PGTMDSVRSQPFQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLTHS
LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVMPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEAL
YDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMMVFPRLHFFMPGFAPLTSR
GSQQYRALTVPELTQQMFDSKNMMAACDPRHGRYLTVAEIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWI
PNNVKTAVCDIPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFHWHYTGEDEMDEFTEAESN
MNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA

>sp|Q6PEY2|TBA3E_HUMAN Tubulin alpha-3E chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBA3E PE=1 SV=2

MRECISIHVQGAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSPDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHPRAVFD
LEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAASNYARGHYTIGKEIVDLVLDLRIRKLADLCTGLQGFLLIF
HSFGGGTGSQFASLLMERLSVDYSKSKLEFAIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMDNE
AIYDICRRNLDIRPTYTNLNLRLIGQIVSSITASLRFDGALNVDLTFQTNLVPYPRIFHPLATYAPVI
SAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMCCMLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVD
WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLVHKFDLAMYAKWAFVHWYVGEEME
EGEFSEAREDLAALKDCEEVGVDSVEAEAEEGEAY

>sp|Q13885|TBB2A_HUMAN Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB2A PE=1 SV=1

MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISEDHGIDPTGSYHGSDQLERINVYYNEAAGNKYVPRAILVDLE
PGTMDSVRSQPFQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLTHS
LGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVMPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEAL
YDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMMVFPRLHFFMPGFAPLTSR
GSQQYRALTVPELTQQMFDSKNMMAACDPRHGRYLTVAEIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWI
PNNVKTAVCDIPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFHWHYTGEDEMDEFTEAESN
MNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA

>sp|Q9NY65|TBA8_HUMAN Tubulin alpha-8 chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBA8 PE=1 SV=1

MRECISVHVQGAGVQIGNACWELFCLEHGIQADGTFDAQASKINDDDSFNTFFSETGNGKHPRAVMID
LEPTVVDEVVRAGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTVGKESIDLVLDRIRKLTDACSLQGFLLIF
HSFGGGTGSQFTSLLMERLSLDYGGKSKLEFAIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMDNE
AIYDICRRNLDIRPTYTNLNLRLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTFQTNLVPYPRIFHPLVITYAPII
SAEKAYHEQLSVAEITSSCFEPNSQMVKCDPRHGKYMCCMLYRGDVVPKDVNVAIAAIKTKRTIQFVD
WCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLAMYAKRAFVHWYVGEEME
EGEFSEAREDLAALKDYEEVGTDSFEEENEGEF

>sp|Q9H4B7|TBB1_HUMAN Tubulin beta-1 chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB1 PE=1 SV=1

MREIVHIQIQGCGNQIGAKFWEMIGEEHGIDLASDRGASALQLERISVYYNEAYGRKYVPRAVLDLE
PGTMDSIRSSKLGALFQPDSFVHGNSGAGNNWAKGHYTEGAELIENVLEVVRHESESCDCLQGFQIVHS
LGGGTGSGMGTLLMNKIREEYPDRIMNSFSVMPSPKVSDTVVEPYNAVLSIHQLIENADACFCIDNEAL
YDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSLTMSGITTSRFPQQLNADLRKLAVNMMVFPRLHFFMPGFAPLTAQ
GSQQYRALSVAEELTQQMFDARNTMAACDLRRGRYLTVACIFRGKMSTKEVDQQLLSVQTRNSSCFVEWI
PNNVKVAVCDIPRGLSMAATFIGNNTAIQEIFNRVSEHFSAMFKRKAFVHWYTSEGMDINEFGEAENN
IHDLVSEYQQFQDAKAVLEEDVEVTEEAEMEPEDKGH

>sp|Q9BUF5|TBB6_HUMAN Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens OX=9606
GN=TUBB6 PE=1 SV=1

MREIVHIQAGQCGNQIGTKFWEVISEDHGIDPAGGYVGDLSALQLERINVYYNESSSQKYVPRAAVLDLE
PGTMDSVRSQPFQQLFRPDNFI FGQTGAGNNWAKGHYTEGAELVDAVLDVVRKECEHCDCDCLQGFQLTHS
LGGGTGSGMGTLLISKIREEFPDRIMNTFSVMPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEAL

YDICFRTLKLTPTTYGDLNHLVSATMSGVTTSLRFPQQLNADLRKLAVNMPFPRLHFFMPGFAPLTSR
 GSQQYRALTVPELTQQMFDARNMMAACDPRHGRYLTVATVFRGPMMSMKEVDEQMLAIQSKNSSYFVEWI
 PNNVKVAVCDIPPRGLKMASTFIGNSTAIQELFKRISEQFSAMFRRKAFHLHWFTGEGMDEMEFTEAESN
 MNDLVSEYQQYQDATANDGEEAFEDDEEEIDG

**>sp|Q9NRH3|TBG2_HUMAN Tubulin gamma-2 chain OS=Homo sapiens OX=9606
 GN=TUBG2 PE=2 SV=1**

MPREIITLQLGQCGNQIGFEFWKQLCAEHGISPEGIVEEFATEGTDRKDVFFYQADDEHYIPRAVLLDL
 EPRVIHSILNSPYAKLYNPENIYLSEHGGGAGNNWASGFSQGEKIHEDI FDI IDREADGSDSLEGFVLC
 HSIAGGTGSGGLGSYLLERLNDRYPKKLVQTYSVFPYQDEMSDVVVQPYNSLLTLKRLTQNADCVVLDN
 TALNRIATDRLHIQNPSFSQINQLVSTIMSASTTTLRYPGYMNNDLIGLIASLIPTPRLHFLMTGYTPL
 TTQDSVASVRKTTVLDVMRLLQPKNVMVSTGRDRQTNHCYIAILNIIQGEVDPTQVHKSLQRIRERKL
 ANFIPWGPASIQVALSRKSPYLP SAHRVSGLMANHTSISLFESSCQQFDKLRKRDAFLEQFRKEDMF
 KDNFDEMDSREVQELIDEYHAATQPDYISWGTQEQ

**>sp|A6NHL2|TBAL3_HUMAN Tubulin alpha chain-like 3 OS=Homo sapiens
 OX=9606 GN=TBAL3 PE=1 SV=2**

MRECLSIHIGQAGIQIGDACWELYCLEHGIQPNGVVLDTQQDQLENAKMEHTNASFDFFFCESTRAGKHV
 PRALFVDLEPTVIDGIRTGQHRSLFHPEQLLSGKEDAANNYARGRYSVGSEVIDLVLERTRKLAEQCGG
 LQGFLIFRSFGGGTGSGFTSLMERLTGEYSRKTLEFSVYPAPRISTAVVEPYNSVLTTHSTTEHTDC
 TFMVDNEAVYDICHRKLGVECPHASINRLVVQVSSITASLRFEGPLNVDLIEFQTNLVPPRIHFPM
 TAFAPIVSADKAYHEQFSVSDITTACFESSNQLVKCDPRLGKYMACCLLYRGDVPKEVNAAIAATKSR
 HSVQFVDWCPTGFKVGINNRPPTVMPGGDLAKVHRSICMLSNTTAIVEAWARLDHKFDLMYAKRAFLHW
 YLREGMEEAEFLEAREDLAALERDYEEVAQSF

Saccharomyces cerevisiae

**>sp|P02557|TBB_YEAST Tubulin beta chain OS=Saccharomyces cerevisiae
 (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TUB2 PE=1 SV=2**

MREIIHISTGQCGNQIGAAFWETICGEHGLDFNGTYHGDDIQKERLNVYFNEASSGKWVPRSINVDLE
 PGTIDAVRNSAIGNLFRPDNYIFGQSSAGNVWAKGHYTEGAELVDSVMDVIRREAEGCDSLQGFQITHS
 LGGGTGSGMGTLLISKIREEFPPDRMMATFSVLPSPKTSDTVVEPYNATLSVHQLVEHSDETFCIDNEAL
 YDICQRTLKLNQPSYGDLNLLVSSVMMSGVTTSLRYPGQLNSDLRKLAVNLVFPRLHFFMVGYAPLTAI
 GSQSFRSLTVPELTQQMFDANKMMAAADPRNGRYLTVAAFFRGKVSVKEVEDEMHKVQSKNSDYFVEWI
 PNNVQTAVCSVAPQGLDMAATFIANSTSIQELFKRVGDQFSAMFKRKAFLHWYTSSEGMDELEFSEAESN
 MNDLVSEYQQYQEAATVEDDEEVDENGDFGAPQNQDEPITENFE

**>sp|P09733|TBA1_YEAST Tubulin alpha-1 chain OS=Saccharomyces
 cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TUB1 PE=1 SV=2**

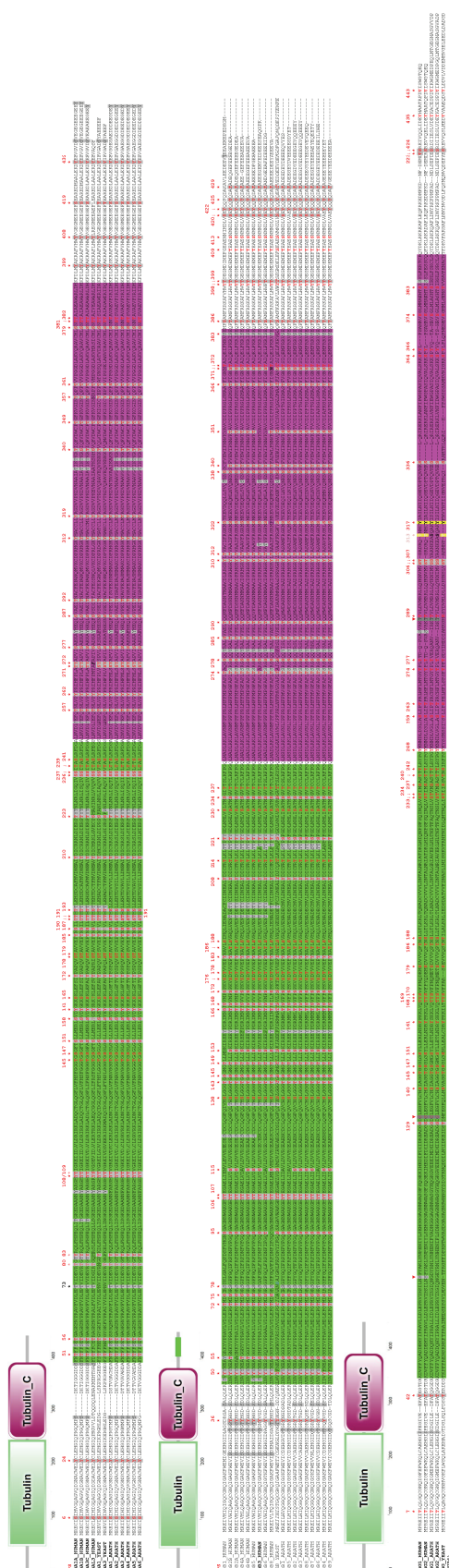
MREVISINVGQAGCQIGNACWELYSLEHGIKPDGHLEDGLSKPKGGEEGFSTFFHETGYGKFPRAIYV
 DLEPNVIDEVRNGPYKDLFHPEQLISGKEDAANNYARGHYTVGREILGDVLDRIKRLADQCDGLQGFLF
 THSLGGGTGSGGLSLLLEELSAEYGKKSLEFAVYPAPQVSTSVVEPYNTVLTTHTTLEHADCTFMVDN
 EAIYDMCKRNLDIRPSFANLNLIQVSSVTASLRFDGSLNVDLNEFQTNLVPPRIHFPLVSYSPV
 LSKSKAFHESNSVSEITNACFEPGNQMVKCDPRDGKYMATCLLYRGDVVTRDVQRAVEQVKNKKTVQLV
 DWCPTGFKIGICYEPPTATPNSQLATVDRAVCMLSNSTTIAEAWKRIDRKFDLMYAKRAFHVHWYVGE
 EEGEFTEAREDLAALERDYIEVGADSYAEFFFF

**>sp|P53378|TBG_YEAST Tubulin gamma chain OS=Saccharomyces cerevisiae
 (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TUB4 PE=1 SV=1**

MGGEIITLQAGQCGNHVGFKFLWSQLAKEHAIGTDGLSQLPDSSTERDDTKPFFRENSRNKFTPRAIMM
 DSEPSVIADVENTFRGFDPDPRNTWVASDGASAGNSWANGYDIGTRNQDDILNKIDKEIDSTDNFEGFQL
 LHSVAGGTGSGGLSNLLEALCDRYPKKILTTYSVFPARSSEVVVQSYNTILALRRLIEDSDATVVFVDFNA
 SLLNISGKVFVRPNIDLQHTNQLISTIISVNTSIRFPSYMYSSMSSIYSTLIPSELHFLSPSFTFPFT
 SDYIHDDIAHKGHSSYDVMLDLLDPSNSLVSTAMNPTYFNVYNTIIGNVEPRQISRAMTKLQQRIKFP

SWSSSAMHVNIGRRSPYLPLQPNENEVSGMMLSNMSTVVNVFENACNTFDKVFAGFLNNYNVGDLEFQ
SMQNVQDEFSAESREVVQSLMEDYVAAEQDSYLDVLDVDDENMVGELEEDLDADGDHKLKLV
>sp|P09734|TBA3_YEAST Tubulin alpha-3 chain OS=*Saccharomyces*
cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TUB3 PE=1 SV=1
MREVISINVGQAGCQIGNACWELYSLEHGKEDGHLEDGLSKPKGGEEGFSTFFHETGYGKFPVPRAIYV
DLEPNVIDEVRTGRFKELFHPEQLINGKEDAANNYARGHYTVGREIVDEVEERIRKMADQCDGLQGFLF
THSLGGGTGSGLSLLENLSYEYGKKSLEFAVYPAPQLSTSVVEPYNTVLTTHTTLEHADCTFMVDN
EAIYDICKRNLGISRPSFSNLNGLIAQVISSVTASLRFDGSLNVDLNEFQTNLVPYPRIHFPLVSYAPI
LSKKRATHESNSVSEITNACFEPGNQMVKCDPTKGKYMANCELLYRGDVVTRDVQRAVEQVKNKKTVMQV
DWCPTGFKIGICYEPPSVIPSELANVDRAVCMLSNTTAIADAWKRIDQKFDLMYAKRAVHVHWYVGEEM
EEGEFTEAREDLAALERDYIEVGADSYAEEF

ДОДАТОК 4
Потенційний консерватизм сайтів
фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну у
тварин, дріжджів і рослин



α -tubulin	β -tubulin	γ -tubulin
S6		S32
Y24		T42
T51	Y36	S129
T56	Y50	S131
T73	Y/T/S55	S140
T80	T72	T145
Y83	S75	S147
Y108	S78	S151
T109	S95	Y161
S151	Y106	T168
S/T158	T107	Y169
Y161	S115	S170
Y172	T143	S179
Y185	S145	Y186
S/T187	T149	S/T188
T/S190	S153	S233
T191	T166	T234
T/S193	S168	S237
Y210	Y183	T240
T/S223	Y208	T/S242
S236	T221	Y248
S237	S234	
T257	T274	S/T259
Y262	S278	T/S263
Y271	Y281	T274
Y272	S285	T277
S277	T290	T289
S287	Y310	S306
T292	T312	T/S307
Y312	S322	Y317
Y319	S338	S336
T/S340	Y340	S364
T349	T351	Y366
Y357	T366	S374
T/S361	S371	S/T383
S379	S383	S424
		Y435
		Y443
Y399	T/S386	
Y408	T399	
S/T419	S420	
Y432	Y422	
	Y425	
	T429	

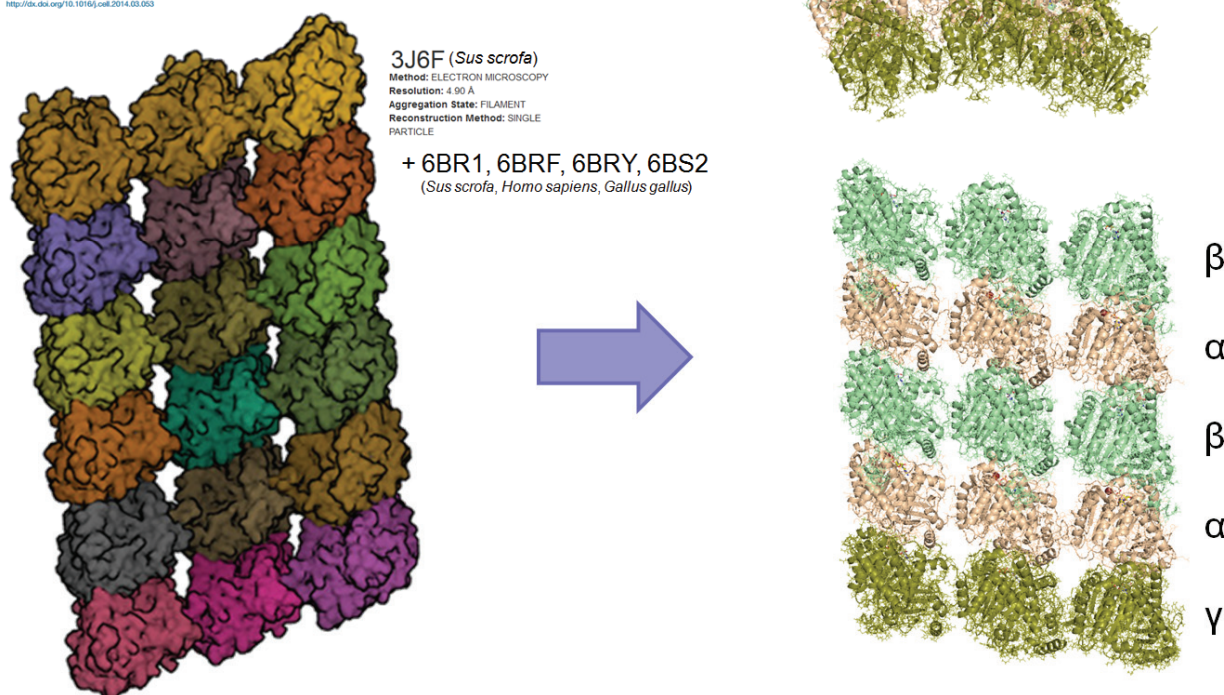
ДОДАТОК 5

Д5.1. Реконструкція макромолекулярних комплексів фрагментів рослинної мікротрубочки *Arabidopsis thaliana*

Cell

High-Resolution Microtubule Structures Reveal the Structural Transitions in $\alpha\beta$ -Tubulin upon GTP Hydrolysis

Gregory M. Alushin,^{1,4,6} Gabriel C. Lander,^{2,5,7} Elizabeth H. Kellogg,^{2,5,8} Rui Zhang,² David Baker,³ and Eva Nogales^{1,4,*}
¹Biophysics Graduate Program, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720, USA
²Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Lab, Berkeley, CA 94720, USA
³Howard Hughes Medical Institute, Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, WA 98105, USA
⁴Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720, USA
⁵Present address: Cell Biology and Physiology Center, National Heart Lung and Blood Institute, Bethesda, MD 20892, USA
⁶Present address: Department of Integrative Structural and Computational Biology, The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA
⁷Present address: Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720, USA
⁸Correspondence: enogales@lbl.gov
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.053>



3J6F Alushin GM, Lander GC, Kellogg EH, Zhang R, Baker D, Nogales E. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell*. 2014 May 22;157(5):1117-29. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.053.

6BR2 Kono M, Ochida A, Oda T, Imada T, Banno Y, Taya N, Masada S, Kawamoto T, Yonemori K, Nara Y, Fukase Y, Yukawa T, Tokuhara H, Skene R, Sang BC, Hoffman ID, Snell GP, Uga K, Shibata A, Igaki K, Nakamura Y, Nakagawa H, Tsuchimori N, Yamasaki M, Shirai J, Yamamoto S. Discovery of [cis-3-((5 R)-5-[(7-Fluoro-1,1-dimethyl-2,3-dihydro-1 H-inden-5-yl)carbamoyl]-2-methoxy-7,8-dihydro-1,6-naphthyridin-6(5 H)-yl) carbonyl)cyclobutyl]acetic Acid (TAK-828F) as a Potent, Selective, and Orally Available Novel Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor γ t Inverse Agonist. *J Med Chem*. 2018 Apr 12;61(7):2973-2988. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00061.

6BR1 Banerjee S, Arnst KE, Wang Y, Kumar G, Deng S, Yang L, Li GB, Yang J, White SW, Li W, Miller DD. Heterocyclic-Fused Pyrimidines as Novel Tubulin Polymerization Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site: Structural Basis and Antitumor Efficacy. *J Med Chem*. 2018 Feb 22;61(4):1704-1718. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01858.

Д5.2. Реконструкція структурних комплексів центрів первинної нуклеації мікротрубочок *Arabidopsis thaliana*

Таблиця

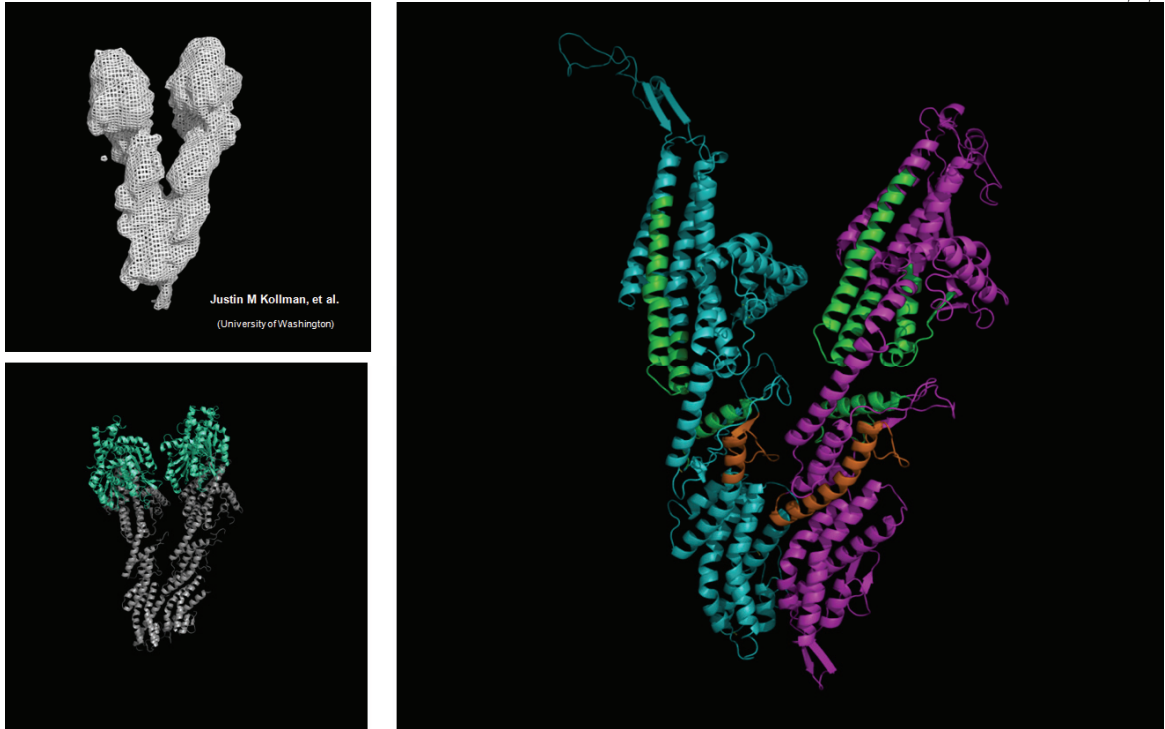
Компоненти комплексів γ TuSC/ γ TuRC з *S. cerevisiae* і *H. sapiens*, а також їх рослинні гомологи у *A. thaliana* і *P. patens*.

Компоненти γ TuSC/ γ TuRC	Депонування послідовностей в UniProtKB				Повна назва
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. patens</i>	
TUBG1 GCP1	P53378 (TUB4)	P23258 (TUBG1)	P38557 (TUBG1)	Q9XFG3(TUBG1) PHYPADRAFT_170153	Tubulin gamma-1 chain
TUBG2, GCP1, TUB4		Q9NRH3 (TUBG2)	P38558 (TUBG2)	A9TMJ1 (TUBG2*) PHYPADRAFT_170860	Tubulin gamma-2 chain
dGrip84/ GCP2 SPC97 (yeast)	P38863 (SPC97)	Q9BSJ2 (TUBGCP2)	Q9C5H9 (GACP2)	A9SUW5 (PHYPADRAFT_135699)	γ -tubulin complex protein 2 (GCP2)
dGrip91/GCP3 SPC98 (yeast)	P53540 (SPC98)	Q96CW5 (TUBGCP3)	Q9FG37 (GACP3)	A9TUB5 (PHYPADRAFT_225555)	Gamma-ring complex protein / Spindle pole body component SPC98
dGrip75/GCP4	-	Q9UGJ1 (TUBGCP4)	Q9M350 (GACP4)	A9RXH9 (PHYPADRAFT_206582)	Gamma-tubulin complex component 4 homolog
dGrip128/GCP 5/Mod21	-	Q96RT8 (TUBGCP5)	Q0WPZ0 (emb1427, At1g80260)	-	Gamma-tubulin complex component 5/ Spc97 / Spc98 family of spindle pole body (SBP) component
dGrip163/GCP 6	-	Q96RT7 (TUBGCP6)	-	-	Gamma-tubulin complex component 6
NEDD1/GCP- WD	-	Q8NHV4 (NEDD1)	B3H5K9 (NEDD1, GCP-WD) Isoforms: B3H5K9-1 B3H5K9-2	A9SPV8 (PHYPADRAFT_16608 3)	Protein NEDD1
GRIP1 (GIP1)	-	Q9Y3R0	-	-	Glutamate receptor- interacting protein 1
GRIP2(GIP2)	-	Q9C0E4	-	-	Glutamate receptor- interacting protein 2
MOZART1 / MZT1	-	Q08AG7 (MZT1)	Q9C9T3 (GIP1a, MZT1A) Q9M0N8 (GIP1b, MZT1B)	A9RBJ3 (PHYPADRAFT_111001) Score: 1,534, Ident.: 45.4% A9SXL3 (PHYPADRAFT_136947) Score: 1,529, Ident.: 44.2%	Mitotic-spindle organizing protein 1
MOZART2A (MZT2A)	-	Q6P582 (MZT2A)	-	-	Mitotic-spindle organizing protein 2A
MOZART2B (MZT2B)	-	Q6NZ67 (MZT2B)	-	-	Mitotic-spindle organizing protein 2B

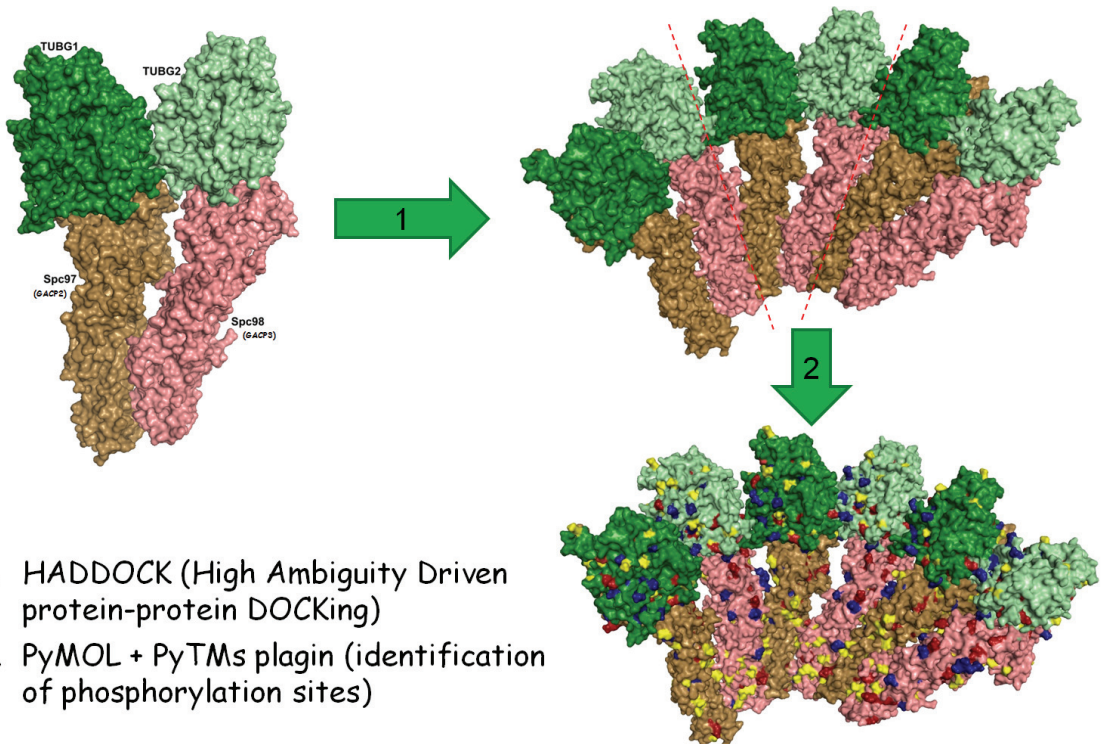
* - на підставі гомології послідовностей.

Реконструкція структурної моделі комплексу центру первинної нуклеації мікротрубочок *Arabidopsis thaliana* [1] і прогнозування сайтів фосфорилювання [2]:

Д5.2.А



Д5.2.Б



D5.2.A

(D7.2.A)

Kollman JM, Greenberg CH, Li S, Moritz M, Zelter A, Fong KK, Fernandez J-J, Sali A, Kilmartin J, Davis TN, Agard DA. Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation. *Nat Struct & Mol Biol* 2015; 22: 132–37. doi: 10.1038/nsmb.2953.

- [1] *(D7.2.A)*
Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biology* 2011; 12: 709-21. doi:10.1038/nrm3209.
-

(D7.2.B.1)

Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J Am Chem Soc* 2003; 125 (7): 1731-7. doi: 10.1021/ja026939x.

- [2] *(D7.2.B.2)*
Warnecke A, Sandalova T., Achour A., Harris RA. PyTMs: a useful PyMOL plugin for modeling common post-translational modifications. *BMC Bioinformatics* 2014 15: 370. doi: 10.1186/s12859-014-0370-6.
-

ДОДАТОК 6

Визначення мотивів специфічного фосфорилювання

Д6.1. Контрольна група сайтів MAST-специфічного фосфорилювання з web-ресурсу з PhosphoNetworks (www.phosphonetworks.org)

MAST1-специфічні сайти фосфорилювання білків людини, що були отримані з ресурсу PhosphoNetworks:

SSBP3 (IDGLPKN**S**PNNISGI), CHEK2 (SHGSSAC**S**QPHGSVT), C14orf106
 (VQGVPLE**S**SNNDIFL), NCL (TPAKAVT**T**PGKKGAT), TFDP1
 (VFIDQNL**S**PGKGVVS), NCL (TPAKKTV**T**PAKAVTT), NOL7
 (SQTNIKK**S**PGKVKEV), RPA2 (VDTDDT**S**SENTVVPP), C14orf106
 (SIVATTK**S**KKDTFVL), EIF4B (SRTGSES**S**QTGTSTT), NOL7
 (VQKVQSV**S**QNKSYLA), CSDE1 (FSNPKT**T**SPNKGKEK), ERCC6L
 (PSGETLS**S**ENKSSWL), ERCC6L (FSSQIP**S**SVNKSMS), EIF4B
 (EKSLENE**T**LNKEEDC), EIF2AK2 (VSPLLL**T**TNSSEGL), GRK5
 (VLDIEQF**S**TVKGVNL), ORC1L (VAFSEIT**S**PSKRSQP), CSDE1
 (VRLGRN**S**NSKRLLG), EIF2AK2 (TLTVWKK**S**PEKNERH), ERAL1
 (LDTPGII**S**PGKQKRH), PHB2 (SFTRGSD**S**LIKGKK-), MTA1
 (SSVLSSL**T**PAKVAPV), CXXC1 (MLARGSA**S**PHKSSPQ), NOC2L
 (SRRKGRAS**S**EHKDQLS), MDM4 (DIPTLPT**S**EHKCIHS), NOC2L
 (PGGSPSA**S**SRRKGRAS), FOXP4 (PKMTGSP**T**LVKNMIS), RPA2
 (QLKHMSV**S**SIKQAVD), EIF4A3 (ATMATSG**S**ARKRLLK), TFDP1
 (LMAMNII**S**KEKKEIK), PPP1R13L (EPFGSRG**S**PRKAATD) i FOXP4
 (GGPARRR**S**SDKFCSP).

MAST2-специфічні сайти фосфорилування білків людини, що були отримані з ресурсу PhosphoNetworks:

SMARCA4 (DDSEGEESEEEEEGE), SMARCA4 (SDSEESGSEEEEEEE),
 NUP133 (DELFSSHDLSDSE), ERCC6L (TCLSWEFSEKDDEPE), ERCC6L
 (DGEDEDDFKDTSSI), CHGB (KGERGEDSEEKHLE), CHGB
 (GERGEDSSEEKHLEE), NUP133 (VVDELFSHSDLDSD), EPHB3
 (SDPTYTSSLGGKIP), NFATC4 (PALSRRGSLGEEGSE), CTTN
 (GKTEKHASQKDYSSG), CTTN (EKLQLHESQKDYSKG).

Д6.2. Протокол сканування цитоскелетних білків *A. thaliana* з метою визначення сайтів SnRK1 α -специфічного фосфорилювання:

Пошуковий патерн:

Hits for USERPAT1 {[AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]} motif on sequences

ARATH 204 цільових білка:

- | | | |
|---------------------|----------------------|--------------------------|
| 1. ABIL1 (Q8S8M5); | 74. KN14F (Q8W1Y3); | 147. PP2A2 (Q07098); |
| 2. ABIL2 (Q9M3A3); | 75. KN14G (O81635); | 148. At1g80245 (Q0V7R8); |
| 3. ABIL3 (Q6NMC6); | 76. KN14H (F4HZF0); | 149. RAC4 (Q38919); |
| 4. ABIL4 (Q9FHY1); | 77. KN14I (F4IL57); | 150. RIC1 (F4IVV0); |
| 5. AIR9 (F4IU4); | 78. KN14J (B3H6Z8); | 151. RUK (F4JY37); |
| 6. ARC5 (Q84N64); | 79. KN14K (F4JX00); | 152. SCAR1 (Q6AWX6); |
| 7. AUG1 (F4IK01); | 80. KN14L (F4J2M6); | 153. SCAR2 (Q5XPJ9); |
| 8. AUG2 (O48767); | 81. KN14M (P46864); | 154. SCAR4 (Q5XPJ6); |
| 9. AUG3 (Q0WQE7); | 82. KN14N (P46875); | 155. SCO3 (Q8GXD9); |
| 10. AUG4 (Q8GYM3); | 83. KN14O (F4IAR2); | 156. SKA1 (Q9LZZ7); |
| 11. AUG5 (Q9FMB4); | 84. KN14P (Q0WN69); | 157. SP1L1 (B3H4F1); |
| 12. AUG6 (Q94BP7); | 85. KN14Q (F4IBQ9); | 158. SP1L2 (Q9LE54); |
| 13. AUG7 (Q0WTP1); | 86. KN14R (F4IJK6); | 159. SP1L3 (Q9S7P8); |
| 14. AUG8 (Q9SUH5); | 87. KN14S (F4K4C5); | 160. SP1L4 (Q9LF22); |
| 15. AUR1 (Q9M077); | 88. KN14T (F4IIT9); | 161. SP1L5 (Q8LGD1); |
| 16. AUR2 (Q683C9); | 89. KN14U (Q8W0Y9); | 162. SPR1 (Q9SJV3); |
| 17. AUR3 (O64629); | 90. KN1 (Q8GW44); | 163. STM (Q38874); |
| 18. BUB31 (Q9LJN8); | 91. KN4A (Q8GS71); | 164. SUN1 (Q9FF75); |
| 19. BUB32 (Q9C701); | 92. KN4C (F4K0J3); | 165. SUN2 (Q9SG79); |
| 20. BUB33 (F4I241); | 93. KN5A (F4IIS5); | 166. TANA (Q197W8); |
| 21. BUBR1 (O22806); | 94. KN5B (Q0WQJ7); | 167. TANB (Q84M91); |
| 22. CDKA1 (P24100); | 95. KN5C (P82266); | 168. TBA1 (P11139); |
| 23. CESA6 (Q94JQ6); | 96. KN5D (Q9LZU5); | 169. TBA2 (B9DGT7); |
| 24. CKL6 (Q8LPI1); | 97. KN6 (F4HR11); | 170. TBA3 (Q56WH1); |
| 25. CLASP (Q8RWY6); | 98. KN7A (Q8S905); | 171. TBA4 (Q0WV25); |
| 26. CSI1 (F4IIM1); | 99. KN7B (Q8LNZ2); | 172. TBA5 (B9DHO0); |
| 27. CSI2 (Q9C6Y4); | 100. KN7C (Q8W5R6); | 173. TBA6 (P29511); |
| 28. CSI3 (F4I718); | 101. KN7D (Q8W5R5); | 174. TBB1 (P12411); |
| 29. CTBP (O23702); | 102. KN7E (F4IGL2); | 175. TBB2 (Q56YW9); |
| 30. DPHS1 (Q75QN6); | 103. KN7F (F4JUJ9); | 176. TBB3 (Q9ASR0); |
| 31. DRP1A (P42697); | 104. KN7G (F4J394); | 177. TBB4 (P24636); |
| 32. DRP1B (Q84XF3); | 105. KN7H (F4JZ68); | 178. TBB5 (P29513); |
| 33. DRP1C (Q8LF21); | 106. KN7I (F4JQ51); | 179. TBB6 (P29514); |
| 34. DRP1D (Q8S3C9); | 107. KN7J (Q9FIG8); | 180. TBB7 (P29515); |
| 35. DRP2A (Q9SE83); | 108. KN7K (F4J8L3); | 181. TBB8 (P29516); |
| 36. DRP2B (Q9LQ55); | 109. KN7L (F4K3X8); | 182. TBB9 (P29517); |
| 37. DRP3A (Q8S944); | 110. KN7M (Q9SJU0); | 183. TBCA (O04350); |
| 38. DRP4C (Q9ZP55); | 111. KN7N (Q9S7P3); | 184. TBCB (Q67Z52); |
| 39. DRP5A (F4HPR5); | 112. KN7O (F4J2K4); | 185. TBCC (Q9SMR2); |
| 40. EB1A (Q7XJ60); | 113. KN8A (F4ICA0); | 186. TBCE (Q8L5R3); |
| 41. EB1B (Q9FJJ5); | 114. KN8B (Q9SCJ4); | 187. TBCE (Q8GRL7); |
| 42. EB1C (Q9FGQ6); | 115. KTNA1 (Q9SEX2); | 188. TBG1 (P38557); |
| 43. EDE1 (O80588); | 116. KTNB1 (Q8H0T9); | 189. TBG2 (P38558); |
| 44. ELP3 (Q93ZR1); | 117. M3K2 (Q9FZ36); | 190. TCTP1 (P31265); |
| 45. ESP1 (Q5IBC5); | 118. M3K3 (O22042); | 191. TON1A (Q9FQ25); |
| 46. FH14 (Q9C6S1); | 119. M3KE1 (Q9LJD8); | 192. TON1B (Q9FQ24); |
| 47. FTSZ1 (Q42545); | 120. MA651 (Q9FLP0); | 193. TON2 (Q9FEE2); |
| 48. GACP2 (Q9C5H9); | 121. MA653 (Q9FHM4); | 194. TOR1 (Q9T041); |
| 49. GACP3 (Q9FG37); | 122. MA654 (Q9LZY0); | 195. TORL1 (F4I6M4); |
| 50. GACP4 (Q9M350); | 123. MA655 (Q9ZVJ3); | 196. TPX2 (F4I2H7); |
| 51. HDA14 (Q941D6); | 124. MA656 (Q9SIS3); | 197. TSA1 (F4ICX9); |
| 52. ICR5 (Q8VYU8); | 125. MA657 (Q8L836); | 198. WDL1 (Q8GYX9); |
| 53. KIC (Q9ZPX9); | 126. MA659 (Q4PSA3); | 199. WDL2 (Q9ASW8); |
| 54. KINUA (Q9FZ06); | 127. MBP2C (Q9LEZ4); | 200. WDL3 (Q84WL6); |
| 55. KINUB (Q9LPC6); | 128. MOR1 (Q94FN2); | 201. WDL4 (Q9SJ62); |
| 56. KINUC (Q9SV36); | 129. MP701 (Q9C9X0); | 202. WDL5 (Q94C48); |
| 57. KLCR1 (O81629); | 130. MP702 (Q8L7S4); | 203. WDL6 (Q0WSZ8); |
| 58. KN10A (Q8VW17); | 131. MP703 (Q9ZUA3); | 204. WDL7 (Q67Y69) |
| 59. KN10B (Q5E913); | 132. MP705 (Q8GYX3); | |
| 60. KN10C (F4KEC6); | 133. MPK18 (Q9C5C0); | |
| 61. KN12A (Q9LDN0); | 134. MPK4 (Q39024); | |
| 62. KN12B (Q8L7Y8); | 135. MZT1A (Q9C9T3); | |
| 63. KN12C (Q27IK7); | 136. MZT1B (Q9M0N8); | |
| 64. KN12D (Q27IK6); | 137. NEDD1 (B3H5K9); | |
| 65. KN12E (F4J1U4); | 138. NEK5 (Q0WPH8); | |
| 66. KN12F (F4JD16); | 139. PANS1 (Q9LJG6); | |
| 67. KN13A (Q940B8); | 140. PCAP1 (Q96262); | |
| 68. KN13B (Q940Y8); | 141. PCAP2 (Q9LU05); | |
| 69. KN14A (Q9LX99); | 142. PIR (Q5S2C3); | |
| 70. KN14B (Q9FKP4); | 143. PLDA1 (Q38882); | |
| 71. KN14C (Q07970); | 144. PLDD1 (Q9C5Y0); | |
| 72. KN14D (F4JGP4); | 145. PLP3A (Q6NPL9); | |
| 73. KN14E (Q9FHN8); | 146. PLP3B (Q8LCV1); | |

found: 7 hits in 7 sequences**TBG1_ARATH_P38557 (474 aa)**

MPREIITLQVGQCGNQIGMEFWKQLCLEHGISKDGILED FATQGGDRKDVFFYQADDQHYIPRALL
 IDLEPRVINGIQNGDYRNLYNHENIFVADHGGGAGNNWASGYHQGKGVVEEIMDMIDREADGSDSL
 EGFVLCHSIAGGTGSGMGSYLLETLNDRYSKKLVTYSVFPNQMETSDVVVQPYNSLLTLKRLTLN
 ADCVVVLDNTALGRIEVERLHLTNPTFAQTNSLSTVMSASTTTLRYPGYMNDLVGLLASLIPTP
 RCHFLMTGYTPLTVERQANVIRKTTVLDVMRRLLOTKNIMVSSYARNKEASQAKYISILNIOGEV
 DPTQVHESLQIRIRERKLVNFI EWGPASIQVALSKKSPYVQTAHRVSGLMLASHTSIRHLFSKCLSQ
 YDKLRKKQAFLDNYRKFPMFADNDLSEFDES RDIIESLVDEYKACESPDYIKWGMEDPEQLMTGEG
 NASGVVDPKLA F

TBG2_ARATH_P38558 (474 aa)

MPREIITLQVGQCGNQIGMEFWKQLCLEHGISKDGILED FATQGGDRKDVFFYQADDQHYIPRALL
 IDLEPRVINGIQNGEYRNLYNHENIFLSDHGGGAGNNWASGYHQGKGVVEEIMDMIDREADGSDSL
 EGFVLCHSIAGGTGSGMGSYLLETLNDRYSKKLVTYSVFPNQMETSDVVVQPYNSLLTLKRLTLN
 ADCVVVLDNTALNRIEVERLHLTNPTFAQTNSLSTVMSASTTTLRYPGYMNDLVGLLASLIPTP
 RCHFLMTGYTPLTVERQANVIRKTTVLDVMRRLLOTKNIMVSSYARNKEASQAKYISILNIOGEV
 DPTQVHESLQIRIRERKLVNFI DWGPASIQVALSKKSPYVQTS HRVSGLMLASHTSIRHLFSRCLSQ
 YDKLRKKQAFLDNYRKFPMFADNDLSEFDES RDIIESLVDEYKACESPDYIKWGMEDPGQLMTGEG
 NASGVADPKLA F

KN7M_ARATH_Q9SJU0 (1058 aa)

MASSSRTRSRSPFSHRPPSPYSSASSTSSSLINRLLPRSSSTPTSTVYNSGGVTGSRSMSITR
 TISDSGPIGGSGTYGAQSYPSSEGLIGESGQITISERDSISVTVRFRPMSEREYQRGDEIVWYPDAD
 KMVRNEYNPLTAYAFDKVFGPQSTTPEVYDVA AKPVVKAAMEGVNGTVFAYGVTSSGKTHTMHGDQ
 DFPGIIPLAIKDVFSIQETTGREFLLRVSYLEIYNEVINDLLDPTGQNLRI REDSQGTVEGIKE
 EVVLSPGHALS FIAAGEEHRHVGSNNFNLMSSRSHTIFTLMI ESSAHGDQYDGVIFSQNLIDL AG
 SESSKTETTGLRRKEGAYINKSLTLGTVIGKLT EGKTTTHVPFRDSKLTRLLQSSLSGHGHVSLIC
 TVTPASSSTEETHNTLKFASRAKRIEINASRNKI IDEKSLIKKYQKEISTLKVELDQLRRGVLVGV
 SHEELLSLKQQQLQEGQVKMQSRLEEEEEAKAALMSRIQKLT KLILVSTKNSIPGYLGDTPAHSRSI
 SAGKDDKLD SLLLDSDNLASPSSTLSLASDARRSSSKFKDENS PVGSR AELTQGVMTPEMDLLVE
 QVKMLAGEIAFGTSTLKR LVDQSMNDPENSKTQIQNLENDIQEKQRQMKSL EQRITESGEASIANA
 SSIEMQEKVMRLMTQCNEKSFELEIISADNRILQEQLQTKCTENNELHEKVHLLLEQRLSSQKATLS
 CCDVVTEEYVDELKKKVQSQEIENEKLEKLEHVQSVEEKSGLRVQNKLAEEASYAKELASAAAIEL
 KNLADEVTKLSLQNAKLEKELVAARDLAAAQKRNNNSMNSAANRNGTRPGRKARISDSWNLNQEN
 LTMELQARKQREAVLEAALAEKEYIEEFRRKKAEEAKRREEALENDLANMWWLVAKLKKANS GAL S
 IQKSDEAEPAKED E VTELDNKNEQNAILKERQLVNGHEEVIVAKAEETPKEEPLVARLKARMQEMK
 EKEMKSQAAAAANADANSHICKVCFESPTATILLPCRHFCLCKSCSLACSECPICRTKISDRLFAP
 PS

KN7H_ARATH_F4JZ68 (1063 aa)

MTTEDDDQMLGPGSGTQEKIYVSVRMRPLNDKEKFRNDVPDWECINNTTIIYRSHLSISERSMYP SA
 YTFDRVFSPECCTRQVYEQGAKEVA FSVVSGVNASVFAYGQTSSGKTYTMSGITDCALVDIYGYID
 KHKEREFILKFSAMEIYNESVRDLLSTDTSP LRLDDPEKGTVVEKLT EETLRDWNHFKELLSVCK
 AQRQIGETALNEVSSRSHQILRLTVESIAREFSTNDKFSTLTATVNFIDL AGSERASQSLSAGTRL
 KEGCHINRSLTLGTVIRKLSKEKTGHI PFRDSKLTRILQSSSLGGNARTAI ICTMSPARIHVEQSR
 NTL LFASCAKEVTTNAQVNVVMSDKALVKHLQRELAKLESELRS PSQASIVSDTTALLTEKDLEVE
 KKKKEVFQLAQOLEQARSEIKDLRRMVEEKNQEKETLSTETEG LNVLMEHQYPKLRVRRTWDS EN
 TTPLSPI SAHRSSISPRSTEYSYEENVFQLSDFRIDSASSSPQQLAFVTPFLKVP LDDIHVTD T VD
 QSHVHKEEAI EEPHVQEERFYEMA EHTDGNSEDNCREVRCIETEKS DISIGPVENMPESPDKYEA
 VTAE E PVS VTEPKNLQHPTEEAVCVTETKNLQHPTEA ENEEEEEERVKEVSGASPEPKQESNLTK
 NPALCDLECS PDEFDTSMSNLSRISTPPALITPSPEKPF SWIMERDSQLFRGMKLTRSRSCRPSLL
 SSPSSSWLEKDADTPPSWYDKEFIKTAERNLTMCDIKNQRLQLQDEFSGRSMPTTWFERSLSDTQTV
 DAASHGVSNE MSPNES PFRPSDASVFELQTSGRASISQDRTEETA AQKDKQI IHRSMEEEREQKFLA
 SNSTKSFKDAAMDPIQDYLD TALNWPVEFKRLQREI IELWHVCKVSMAHRSYFFLLFRGDQKDCLY

LEVELRRLKYIRESFAQNSNDGNNMTLISCTRALTRERYKLSKLMQRKLSKEERENLFLRWGIGLN
 TNHRRVQLARRLWSYKDMGHVRESASLVGKLNQFVDMKLTSTEMFGVNYAFRPPRPKSSLWKRS
 VLSLSFL

KN7F_ARATH_F4JUI9 (836 aa)

MEKTQMPVAREEKILVLRRLRPLNQKEIAANEAADWECINDTTILYRNTLREGSNFSPAYSFDKVI
 RGECPTRQVYEDGTKEIALSVVKGINCISIFAYGQTSSGKTYTMTGITEFAVADIFDYIFQHEERAF
 SVKFSAIEIYNEAIRDLLSSDGTSLRRLRDDPEKGTVVEKATEETLRDWNHLKELLSICEAQRKIGE
 TSLNERSSSRSHQMIRLTVESSAREFLGKENSTTLMASVNFIDLASERASQAMSAGTRLKEGCHIN
 RSLTLTGTVIRKLSKGRQGHINFRDSKLTRILQPCLGGNARTAIICTLSPARSHVELTKNTLLFAC
 CAKEVTTKARINVMSDKALLKQLORELARLETELNPASSPASNCDCAMTVRKKDLQIQMEKEI
 AELRKQRDLAQSRLEDPMRMIEHNVASKPGTPHFGNHTDKWEDGSVSETSGVVSDRRSFI SDGMS
 TPLSISRAYVHSHSDDDDLDLPRRSEDLSEYCREVQCIETEE SVTVYNNKKDKRAEPENVLGC
 GEDANGETSVSQNVVRVRSWNRRET VSGPSTPPENIGTGFLGRPESHKIAFPDLEFGSTVSRNDSMS
 SCGSDSTGTQSIRTPLGEEGGITSIRTFVEGLKEMAKRQGEVSNAEDSGKMRRDIGLDSMDREFER
 QRQEILELWQTCNISLVHRTYFYLLFKGDEADSIYIGVELRLLFMKDSFSQGNQALEGETTLTA
 SSRKELHRERKMLSKLVGKRFSGEERKRIYHKFGIAINSKRRLQLVNELWSNPKDMTQVMESADV
 VAKLVRFAEQGRAMKEMFGLTFTPPSFLTTRRSHSWRKSMPALF

KN14I_ARATH_F4IL57 (983 aa)

MAATATEDGGLSFTVASVMEDVLQOHGNLRDHDLVSRRAEEAASRRYEANWLRRMVGVVGA KDL
 PAEPTTEGLRLGLRSGIILCKVLNKVQPGAVSKVVESPCDAILVADGAPLSAFQYFENVRNFLVAI
 QEMGFPTFEASDLEQGGNASRVVNCVLAIKSYDEWKQSGGIGVWKF GGNIKPPALGKSSFVRKNSE
 PFMNSLSRTSSINNEKAPSENDSNKLSSPSSLSTLVRAVLSDKKPEDVPKLI ESLLSKVVEEFENR
 VTNQYELVRAAPRESTSSQNNRSFLKPLGEREREKSFKAIKKDDHNSQILDEKMKTRQFKQLTIF
 NQQQEDIEGLRQTLTYTTRAGMQFMQKKFQEEFSSLGMHVHGLAHAASGYHRVLEENRKLQYNQVQDL
 KGSIRVYCRVRPFLPGQSSFSSTIGNMEDDTIGINTASRHGKSLKSFTFNKVFGPSATQEEVFSDM
 QPLIRSVLDGYNVICIFAYGQTGSGKTFMTMSGPRDLTEKSQGVNYRALGDLFLLAEQRKDTFRYDIA
 VQMI E IYNEQVRDLLVTDGSNKRL EIRNSSQKGLSVPDASLPVSSTFDVIDLMKTGHKNRAVGST
 ALNDRSSRSHSCLTVHVQGRDLTSGAVLRGCMHLVDLAGSERVDKSEVTGDRLEAQAQHINRSL SAL
 GDVIASLAHKNPVHPYRNSKLTQLLQDSLGGQAKTLMFVHISPEADAVGETISTLKFAERVATVEL
 GAARVNNDTSDVKELKEQIATLKAALARKEAESQONNILKTPGGSEKHKAKTGEVEIHNNNIMTKK
 SESCEVEEITVNSPPWPPVASPGQAYREDDRSFGSSEWVDKVMVNNRQDEMRRVESLWGGATTENG
 IGI LPEDFYRRDLASDTSRIFSEHSYNI FMGNNSSTDDLDAATSDSSEPDLWQFNQSTKI PTRSN
 IESKLLKPKVSKPIRSPQSRNNSNNTVSRPLASQKVGNGPRGMKQFGPADMKRKATNARH

WDL2_ARATH_Q9ASW8 (338 aa) - Microtubule-associated protein (MAP) that regulates the orientation of interphase cortical microtubules.

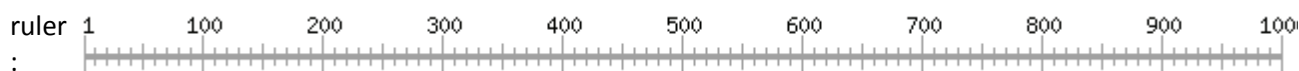
MGRELVDKHMDDKANSLTASSTGSSDDNKVPSPTNEAAEVKECTEQNLVADDARLRQQGITETPG
 SHKSSVKPRVTAKTTPKPFSLSAEKPRRAAVDNNSLGNGASHNSSASRVSQ LNSPLPTRRIPDH
 KMHDEEDSFSVASSATSIRSFKPKITIGVAPTFSSTSRLERRREFYQKLEEKQKALEAEKRENE
 KRLKEEQEAVTKQLRKNMAYKANPVPSFYQEGPPPQPLKKFPLTRPKSPNLNRRKSCSDTVNASY
 QEVKGGKHCARHRH SVGGCKDEVKTNSVPRTPNSSSKDQMRKSKKGT PKSEEVHEMFNSGHGETGE
 NGVGVVEE

Legend:

Please note that the graphical representations of domains displayed hereafter are for illustrative purposes only, and that their colors and shapes are not intended to indicate homology or shared function.

For more information about how these graphical representations are constructed, go to <http://prosite.expasy.org/mydomains/>.

hits by patterns: [7 hits (by 1 pattern) on 7 sequences]

Tubulin gamma-1 chain

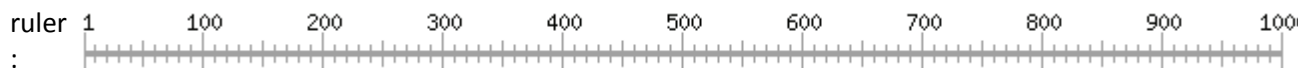
TBG1_ARATH_P38557
(TBG1_ARATH_P38557)
 (474 aa) [View all PROSITE motifs hits on sequence](#)

USERPAT1 :

Pattern: **[AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]**

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11535175/)] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 159

126 - 136: ADGSD█LEGFV

Tubulin gamma-2 chain

TBG2_ARATH_P38558
(TBG2_ARATH_P38558)
 (474 aa) [View all PROSITE motifs hits on sequence](#)

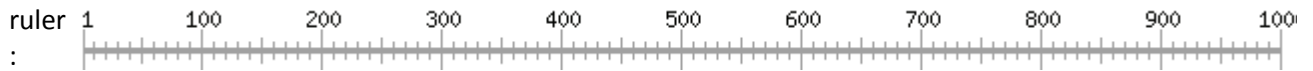
USERPAT1 :

Pattern: **[AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]**

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11535175/)] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 159

126 - 136: ADGSDLEGFV

Kinesin-like protein KIN-7M, chloroplastic



KN7M_ARATH_Q9S
JU0



Ош
ибка!
Недоп
устим
ый
объек
т
гипер
ссылк
и.

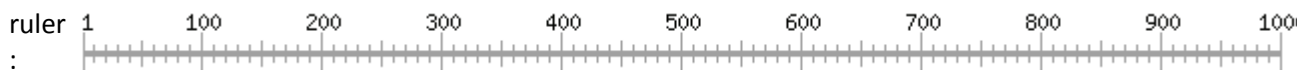
USERPAT1 :

Pattern: [AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-
[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](#)] in ~ 100'000 sequences
(50'000'000 residues): 159

39 - 49: LPRSSPTST

Kinesin-like protein KIN-7H



KN7H_ARATH_
F4JZ68



Ошибка
!
(10 Недопуст
имый
объект
гиперссы
лки.

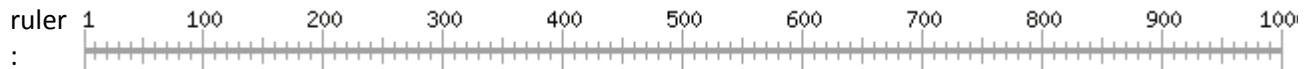
USERPAT1 :

Pattern: [AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-
[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](#)] in ~ 100'000 sequences
(50'000'000 residues): 159

681 - 691: LSRISPPALI

Kinesin-like protein KIN-7F



KN7F_ARATH_F4JUI9

[View all PROSITE motifs hits on sequence](#)
(83 motifs hits on sequence)
6 aa)

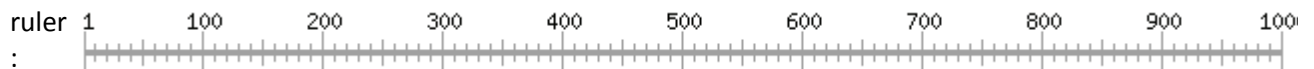
USERPAT1 :

Pattern: **[AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]**

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](#)] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 159

553 - 563: VSGPSPPENI

Kinesin-like protein KIN-14I



KN14I_ARATH_F4IL57

Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.
(9 motifs hits on sequence)
83 aa)

USERPAT1 :

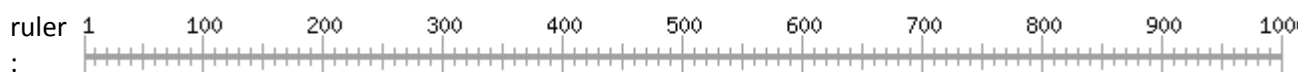
Pattern: **[AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]**

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](#)] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 159

224 - 234: LSSPSLSTLV

Protein WVD2-like 2

Microtubule-associated protein (MAP) that regulates the orientation of interphase cortical microtubules.



WDL2_ARATH_Q9ASW8  (338 aa) [View all PROSITE motifs hits on sequence](#)

USERPAT1 :

Pattern: **[AGKLMRVY]-[DFLNSYP]-[GKRS]-[IPS]-[DFGKPSV]-[ST]-[LMPT]-[CEGPST]-[DEGHILNTA]-[DEFLNPSY]-[EGIKLTVY]**

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](#)] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 159

82 - 92: VPKPF  LSAEK

ДОДАТОК 7

Амінокислотні послідовності протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana*, що за результатами актуального дослідження було визначено як агентів тубулінового коду

Д.7.1. AGC Ser/Thr protein kinase family

```
>sp|F4J6F6|IREH1_ARATH Probable serine/threonine protein kinase
IREH1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=IREH1 PE=1 SV=1
MVFKNKLFSSKKSGLSSSPDSSNSPRSVGSNSPIRSDKKKSKSASKDEPPIPIPGFVGVGCKQTQI
KDGLKKKDGSSKKGKQLSSEVQAHSIGKSNLSPSSEVKKPPPPEVKEGPAFVSPIMASSLGLNRIKT
RSGPLPQERVFNYRNDPATSNLSKMGADGGDLGSGSATSGSGSGNRKKEAGSSKLGLEENMDRTRP
SDNKSDRDSLSPDTGPPRSLSPTLPPSGSRLQNVASSSGTGRSEMSSGRSGPLRNSDFCTPENSYE
WENPKESSEPRYQALLRMTSAPRKRFPDGIKFSHELNSKGVRRPFLWKPRRSNNVEEVLNLIIRAK
FEKAKEEVNSDLAVFAADLVGVLEKNAESHPEWEETFEDLLILARSCAMTTPGDFWLQCEGIVQDL
DDRRQELPPGVLKQLHTRMLFILTRCTRLLOFHKESWGEEEEQVVQLRQSRVLHSIEKIIPPSGAGRS
YSAAKVPSTKKAYSQEQHGLDWKEDAVVRSVPPLAPPENYAIKESESPANIDRMSSWKKLPSALK
TVKEAPASEEQNDSKVEPPNIVGSRQGRDDAAVAAILNFPPAKDSHEHSSKHRHNI SWGYWGEQPLI
SEESSIMCRI CEEVPTTHVEDHSRVCTLADKYDQKGLSVDERLMAVAGTLDKIAETFRHKDSLAA
AESPDMKVSNSHLTEESDVLSRPLSDWSRKGSEDMLDCFPEADNSIFMDDLRLGLPLMSCRTRFGP
KSDQGMTTSSASSMTPRSP IPTPRPDP IEQILGGKGT FHDQDDIPQMSELADI AKCAADAIPGDDQ
SIPFLLSCLEDLRVVIDRRKFDALTVETFGTRIEKLI REKYVHMCELMDDKVDLLSTVIDEDAPL
EDDVVRSRLTSPVHPRDRTSIDDFEIKPISRGA FGRVFLAKKRTTGDLFAIKVLKKADMIRKNAV
ESILAERDILINVRNPFVVRFFYSFTCRDNLVLM EYLNNGDLYSLLRNLGCLEEDIVRVYIAEVV
LAL EYLHSEGVVHRDLKPDNLLIAHDGHIKLTDFGLSKVGLINSTDDL AGPAVSGTSLLDDEESRL
AASEEQLERKKRS AVGTPDYLAPEILLGTGHGATADWWSVGIILFELIVGIPPFNAEHPQQIFDN
ILNRKIPWPHVPEEMSAEAHDIIDRFLTEDPHQRLGARGAAEVKQHIFFKDINWDTLARQKA AFVP
ASESAIDTSYFRSRYSWNTSDEQFFPSGEVPDYSDADSM TNSSGCSSNHHEEGEAEECEGHAEFES
GIPVDYSFSNFSFKNLSQLASINYDLLSKGWKDEPQQIPHHK
```

```
>sp|P42818|KPK1_ARATH Serine/threonine-protein kinase AtPK1/AtPK6
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ATPK1 PE=1 SV=1
MVSSQRVPVPNKIQQKQYLSISPSNSVLKDDVELEFSDVFGPLPEEANDIAYDEPAVVYSRSHSLVG
PCSLDSHSLKLTKLTLLETEDSIDLVECLEGESLKENDDFSGNDDSDNEKALEGLVKVSGVVGID
DFEVMKVVGKGAFGKVYQVRKKTSEIYAMKVMRKDHIMEKNHAEYMKAERDILTKIDHPFIVQLK
YSFQTKYRLLYLVLDFINGHLLFFQLYHQGLFREDLARVYTAEIVSAVSHLHEKGMHRDLKPENIL
MDTDGHVMLTDFGLAKEFEENTRSNSMCGTTEYMAPEIVRGKGDHKAADWWSVGILLYEMLTGKPP
FLGSKGKIQQKIVKDKIKLPQFLSNEAHAILKGLLQKEPERRLGSGLSGAEI IKQHKWFKGINWKK
LEAREVMPSFKPEVSGRQCIANFDKCWTDMSVLDSPASSPSSDPKANPFTNFTYVRRPPPSFLHQST
TTL
```

```
>sp|Q39030|KPK2_ARATH Serine/threonine-protein kinase AtPK2/AtPK19
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=ATPK2 PE=1 SV=2
MVSSQCSVANKNQTKGKPFQKHL SLSISPPKSVLGDNL ELQFSDVFGPMPEANSEEEACDVAYDEPAV
VYSRSHSLVGP SLVSHSLKMNKLTRETEDSVDLVECEGESIKENDEFSGNDDTDSEKSPPEEVS
GVVGI ED FEVLKVVVGQGA FGKVYQVRK KDTSEIYAMKVMRKDKIVEKNHAEYMKAERDILTKIDHP
FIVQLKYSFQTKYRLLYLVLDFINGHLLFFQLYHQGLFREDLARVYTAEIVSAVSHLHEKGMHRDL
KPENILMDVDGHVMLTDFGLAKEFEENTRSNSMCGTTEYMAPEIVRGKGDHKAADWWSVGILLYEM
LTGKPPFLGSKGKIQQKIVKDKIKLPQFLSNEAHALLKGLLQKEPERRLGSGPSGAEI IKKHKWFK
AINWKKLEAREVQPSFKPAVSGRQCIANFDKCWTDMSVLDSPASSPNSDAKANPFTNFTYVRRPPHS
FLHRTTSNL
```

D.7.2. CMGC/ CMGC-like

>sp|P24100|CDKA1_ARATH Cyclin-dependent kinase A-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CDKA-1 PE=1 SV=1

MDQYEKVEKIGEGTYGVVYKARDKVTNETIALKKIRLEQEDEGVPSTAIREISLLKEMQHSNIVKL
QDVVHSEKRLYLVEFYLDLKLKHMDSPTDFSKDLHMIKTYLYQILRGIAYCHSHRVLHRDLKPN
LLIDRRTNSLKLADFLARAFGI PVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSHHYSTPVDIWSVGCIFAEMI
SQKPLFPDSEIDQLFKIFRIMGTPYEDTWRGVTSLPDYKSAFPKWKPTDLETFFVNLDPDGVDDL
SKMLLMDPTKRINARAALHEHEYFKDLGGMP

>sp|Q8RWH3|YAK1_ARATH Dual specificity protein kinase YAK1 homolog OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=YAK1 PE=1 SV=1

MDDIDSSDGAARAGEIGSIGVSTPWKPIQLVFKRYLPQNGSASKVHVAVKPKVVRVLRDLVET
YKICDPQFKYRGELNPKRYLTPPSVGVNNDGFDNVNYDLILAVNDDFCSSDSRQRYIVKDLLGHGT
FGQVAKCWPETNSFVAVKVIKNQLAYYQQALVEVSILTTLNKKYDPEDKNHIVRIYDYFLHQSHL
CICFELLDNLYELIKINQFRGLSLSIVKLFKQILLGLALLKDAGI IHCDLKPENILLCASVKPT
EIKIIDFGSACMEDKTVYSYIQSRYRSPEVLLGYQYTTAIDMWSFGCIVAELFLGLPLFPGGSEF
DILRRMIEILGKQPPDYVLKEAKNTNFKFCVGSVHNLGNGGTYGGLKSAYMALTGEEFEAREKKK
PEIGKEYFNHKNLEEI VKSYPYKINLPEDDVVKETQIRLALIDFLKGLMEFDPAKRWSPFQAAKHP
FITGEPFTCPYNPPPETPRVHVTONIKVDHHPGEGHWFAAGLSPHVSGRTRIPMHNSPHFQMPYS
HANSYGSIGSYGSYNDGTIQDNSYGSYGGTGNMFAYYSPVNHPLGLYMQNQGGVSMGLTSPDARRRV
MQYPHNGNPNGLGTSPSAGNFAPLPLGTSPSQFTPNNTNNQFLAGSPGHGPTSPVRNSCHGSPLGK
MAAFSQINRRMSAGYSGGSQSQDSSLSQAQGHGMDNFYQNEGYSQFSGSPSRRQLDSGVKNRQQT
QGGTTLSTGYSTHNNANSSLRSNMYPNSSTAHHLENPDTALSVPDPGDWDPNYSDDLLEEDSADE
SSLANAFSRGMQLGSTDASSYSRRFNSNASTSSSNPTTQRRYAPNQAFSQVETGSPPSNDPHARFG
QHIPGSQYIPHVSQNSPSRLGQQPPQRYNHGRPNAGR TMDRNHMNAQLPPSNTNSGGQQRSPRSSS
YTNGVPWGRRTNNHVPNPSTSHGRVDYGSIA

>sp|Q08467|CSK21_ARATH Casein kinase II subunit alpha-1 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CKA1 PE=1 SV=3

MIDTLFFLFFLFFDSPLRRLLLLCAVLALRAPTAHSPILRSSIVTPTARAVSEVSGCTTIDPDLV
EISDSNQTRAMSKARVYTEVNVIRPKDYWDYESLIVQWGEQDDYEVVRKVGRGKYSEVFEGINVNS
KEKCI IKILKPVK KIRREIKILQNL CGGNIVKLLDVVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLVPT
LTDYDIRYYIYELLKALDFCHSQGIMHRDVKPHNVMIDHELRLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVA
SRYFKGPELLVDLQDYDYSLDMWSLGC MFAGMIFRKEPFFYGHDNQDQLVKIAKVLGTDELNAYLN
KYQLELDPQLEALVGRHSRKPWSKFINADNQHLVSPEAIDFLDKLLRYDHQDRLTAKEAMAHAYFA
QVRAAETSRMRSQ

>sp|Q08466|CSK22_ARATH Casein kinase II subunit alpha-2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CKA2 PE=1 SV=3

MHLIFFFSYFLRRYLLLLCAILILRAPLAHSLIPPLTCVNTGTVESDVTGIRFDRCLD TDSLAKIS
LSTVMSKARVYTDVNVIRPKDYWDYESLNVQWGEQDDYEVVRKVGRGKYSEVFEGINMNNNEKCI I
KILKPVK KIRREIKILQNL CGGNIVKLLDVVRDQHSKTPSLIFEYVNSTDFKVLVPTLTDYDI
RYYIYELLKALDFCHSQGIMHRDVKPHNVMIDHELRLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVASRYFKG
PELLVDLQDYDYSLDMWSLGC MFAGMIFRKEPFFYGHDNQDQLVKIAKVLGTDELNAYLNKYQLEL
DTQLEALVGRHSRKPWSKFINADNRHLVSPEAIDYLDKLLRYDHQDRLTAKEAMAHYPYFAQVRAAE
SSRMRTQ

>sp|P40228|CSK2B_ARATH Casein kinase II subunit beta-1
 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CKB1 PE=1 SV=1
 MYRDRGTVNSRPEVVDRKRINDALERPSPSTSRQVNGKKGKTVTAATTTANLIGKQQSNNINHRDS
 RSASLSKNNTVSDDESDTDSEESDVSGSDGEDTSWISWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLS
 SLVPYYEYALDLILDVLESSQGEMFTEEQNELIESAAEMLYGLIHARYILTSKGLAAMLDKYKNYDF
 GRCPRVYCCGQPCLPVGQSDLPRSSTVKIYCPKCEDIYYPRSKYQGNIDGAYFGTTFPHLFLMTYG
 HLKPAKATQNYVQRVFGFKLHKP

>sp|P40229|CSK2C_ARATH Casein kinase II subunit beta-2
 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CKB2 PE=1 SV=1
 MYRERGMVGSKSEVVDRKRINEIHDNRPSHMSQPVNGKGVSTSTSVLMGKQQLHDKESSRSGSIS
 KTNISDAVDISDTESESEVSGSDGEDTSWISWFCNLRGNEFFCEVDDDYIQDDFNLCGLSHQVPY
 YDYALDLILDVESHGEMFTEEQNELIESAAEMLYGMIHARFILTSKGLASMLDKYKNYDFGRCPR
 VYCCGQPCLPVGQSDIPRASTVKIYCPKCEDVYYPRSKYQGNIDGAYFGTTFPHLFLMTYGHLKPG
 KASQSYTQRVFGFKLHKP

Д.7.3. CK1 Ser/Thr protein kinase family. Casein kinase I subfamily.

>sp|Q8LPJ1|CKL6_ARATH Casein kinase 1-like protein 6
 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CKL6 PE=1 SV=1
 MDLKMDNVIGGKFKLGRKIGGGSFGELFLAVSLQTEGEEAAVKLEPAKTKHPQLHYESKIYMLLQGG
 SGIPSLKWFVQGDYDYNAMVIDLLGPSLEDLNFYCNRRRLTLKAVLMLADQLISRVEYMHSRGLHRD
 IKPDNFLMGLGRKANQVYIIDFGLAKKYRDLQTHRHI PYRENKNLTGTARYASVNTHLGVESRRD
 DLESGLGYVLMYFLRGLSLPWQGLKAGTKKQKYDRISEKKVSTPIEVLCKSYPPFVSYFQYCRSLRF
 EDKPDYSYLKRLFRDLFIREGYQFDYVFDWTALKHPQSSARSHSSTHERHRTGKPGMGAGPSAEKP
 ERISVGNIRDKFSGAVEAFARRNVRGPPHQNHRHRTLDEIPSMKPAVMVSEKGRNTSRYGSAS
 RRAVASGSRPSSSGEQRESRDSSRVASSGGVVRPSVFQRTQAAAASVSGYESKTASAFNRDRVAASR
 TARDEALRSFELLSIRK

Д.7.4. NEK Ser/Thr protein kinase family. NIMA subfamily.

>sp|Q9LT35|NEK6_ARATH Serine/threonine-protein kinase Nek6
 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=NEK6 PE=3 SV=1
 MDDYEVVEQIGRGAFGSAFLVIHKSERRKYVVKIRLAKQTERCKLAAIQEMSLISKLKSPYIVEY
 KDSWVEKDCVCIIVTSYCEGGDMTQMIKKS RGVFASEEKLCRWMVQLLLAIDYLHNNRVLHRDLKCS
 NIFLTKENEVRLGDFGLAKLLGKDDLASSMVGTPNYMCPPELLADIPYGYKSDIWSLGC CMFEVAAH
 QPAFKAPDMAALINKINRSSLSPLPVMYSSSLKRLIKSMLRKNPEHRPTAAELLRPHLQPYLAQC
 QNLSPVFKPVVSKSEHNTNENRTGLPPKTKSAKTPIKHNQESEETEKKNKDTSSSSKDKERPAKSQ
 EMSVISTLTLLREFQKKS PKSEERAEALESLEL CAGLLRQEKFDELEGVLKPFPGDET VSSRETAI
 WLT KSLMNVKRKQNDDE TN I

Д.7.5. CDPK-SnRK Ser/Thr protein kinase family

>sp|Q38873|CDPK7_ARATH Calcium-dependent protein kinase 7
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPK7 PE=2 SV=1

MGNCCGNPSSATNQSKQGKPKNKNNPFYSNEYATTDRSGAGFKLSVLKDPTGHDISLQYDL
 GREVGRGEFGITYLCTDKETGEKYACKSISKKKLRTAVDIEDVRREVEIMKHMPPKHPNVVS
 LKDSFEDDDAVHIVMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVMKTIVEVVQICHKQGMHRD
 LKPENFLFANKKETSALKAIDFGLSVFFKPGEQFNEIVGSPYYMAPEVLRNRYGPEIDVWS
 AGVILYILLCGVPPFFWAETEQQVAQAIIRSVIDFKRDPWPRVSDSAKDLVRKMLEPDPKKR
 LTAAQVLEHTWILNAKKAPNVSLGETVKARLKQFSVMNKLKKRALRVIAEHLSSVEEAAGIK
 EAFEMMDVNRGKINLEELKYGLQKAGQQIADTDLQILMEATDVGDTLNYSEFVAVSVH
 LKKMANDEHLHKAFNFFDQNSGYIEIDELREALNDELNNTSSEEVIAAIMQDVDTDKDGR
 ISYEEFVAMMKAGTDWRKASRQYSRERFNSLSLKLMRDGSLOLEGET

>sp|P93759|CDPKE_ARATH Calcium-dependent protein kinase 14
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPK14 PE=2 SV=1

MGNCCGTAGSLIQDKQKGFKLPNPFSNEYGNHHDGLKLIVLKEPTGHEIKQKYKLGRELG
 RGEFGVTYLCTEIEETGEIFACKSILKKKLKTSIDIEDVKREVEIMRQMPPEHPNIVTLKETY
 EDDKAVHLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAASVIKTIIEVVQMCHKHGMHRDLKPEN
 FLFANKKETASLKAIDFGLSVFFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLRRSYGQEIDIWSAGVIL
 YILLCGVPPFFWAETEHEGVAKAILKSVIDFKRDPWPKVSDNAKDLIKKMLHPDPRRRLTAQQ
 VLDHPWIQNGKNASNVSLGETVRARLKQFSVMNKLKKRALRVIAEHLSSVEETSICKERFQV
 MDTSNRGKITITELGIGLQKLGIVVPQDDIQILMDAGVDKDGYLVDNEFVAISVHIRKLG
 NDEHLKKAFTFFDKNKSGYIEIEELRDALADDVDTTSEEVVEAII LDVDTNKGKISYDEF
 ATMMKTGTDWRKASRQYSRDLFKCLSLKLMQDGSLSQNGDTK

>sp|Q9ZV15|CDPKK_ARATH Calcium-dependent protein kinase 20
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPK20 PE=3 SV=1

MGNCTCVGNLNPNGFLQSVSAAVWRNQKPDSSI KSSKDESSRKKNDKSVNGDDSNHVSST
 VDPAPSTLPTPSTPPPPVKMANEPPPKPITENKEDPNSKPKQKKEAHMKRMASAGLQIDSV
 LGRKTENLKDIIYSVGRKLGQGQFGTTFCLVDKKTGKEFACTIAKRKLTPEDVEDVRREI
 QIMHHLSGHPNVIQIVGAYEDAVAVHVMEICAGGELFDRIIQRGHYTEKKAELARIIVG
 VIEACHSLGVMHRDLKPENFLFVSGDEEAALKTIDFGLSVFFKPGETF TDVVGSPYYVAPE
 VLRKHYSHECDVWSAGVIIYILLSGVPPFFWDETEQGI FEQVLKGDLDIFI SEPWPSVSESAK
 DLVRRMLIRDPKKRMTTHEVLCHPWAVRVDGVALDKPLDSAVLSRLQQFSAMNKLKKAIAIKV
 IAESLSEEEIAGLKEMFKMIDTDNSGHITLLEELKKGLDRVGADLKDSEILGLMQAADIDNS
 GTIDYGEFIAAMVHLNKIEKEDHLFTAFSYFDQDGSYITRDELQQACKQFGLADVHLDDI
 LREVDKNDGRIDYSEFVDMMQDTGFGKMGLKVS

>sp|Q9ZSA2|CDPKL_ARATH Calcium-dependent protein kinase 21
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPK21 PE=1 SV=1

MGCFSSKHRKTQNDGGEKSIPINPVQTHVVEHRKPQTPTPKPMTQPIHQQISTPSSNPVS
 VRDPDTILGKPFEDIRKIFYSLGKELGRGQFGITYMCKEIGTGNTYACKSILKRKLISKQDK
 EDVKREIQIMQYLSGQPNIVEIKGAYEDRQSIHLVMELCAGGELFDRIIAQGHYSERAAAG
 IIRSI VNVVQICHFMGVVHRDLKPENFLSSKEENAMLKATDFGLSVFIEEGKVYRDIVGS
 AYYVAPEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLSGVPPFWAENEKGI FDEVIKGEIDFVSEPPW
 SISESAKDLVRKMLTKDPKRRITAAQVLEHPWIKGGEAPDKPIDSAVLSRMKQFRAMNKLK
 KLALKVIAESLSEEEIKGLKTMFANIDTDKSGTITYEELKTGLTRLGSRLESETEVKQLMEA
 ADVDGNGTIDYYEFISATMHRYKLDREHVYKAFQHFDKDNSGHITRDELESAMKEYGMGD
 EASIKEVISEVDTDNDGRINFEEFCAMMRSGSTQPQGLLPFH

>sp|Q6NLQ6|CDPKW_ARATH Calcium-dependent protein kinase 32
OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CPK32 PE=1 SV=1

MGNCCGTAGSLAQNDNPKPKGRKKQNPFSIDYGLHHGGDGGGRPLKLI VLN DPTGREIES
 KYTLGRELGRGEFGVTYLC TDKETDDVFACKSILKKKLRTAVDIEDVRREVEIMRHMPEHP
 NVVTLKETYEDEHAVHLMELCEGGELFDRI VARGHYTERAAA VTKTIMEVVQVCHKHGV
 MHRDLKPENFLFGNKKETAPLKAIDFGLSVFFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKRNYGPEV
 DIWSAGVILYILLCGVPPFWAETE QGVAQAIIRSVLDFRRDPWPKVSENAKDLIRKMLDPD
 QKRRLTAQQVLDHPWLQNAKTAPNVSLGETVRARLKQFTVMNKLKKRALRVIAEHLSDDEEA
 SGIREGFQIMDTSQRGKINIDELKIGLQKLGHAI PQDDLQILMDAGDIDRDGYLDCDEFIA
 ISVHLRKMGNDEHLKKAFAFFDQNNNGYIEIEELREALSDELGTSEEVD AII RDVDTDKD
 GRISYEEFVTMMKTGTDWRKASRQYSRERFN S I SLKLMQDASLQVNGDTR

>sp|Q9CAL3|CRK2_ARATH Cysteine-rich receptor-like protein
kinase 2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CRK2 PE=1 SV=1

MKKEPVHILPLYLPCLLMFLLSSLRQITGDARARAVKVTCSPLLEHNETAYVPNFVATMEK
 ISTQVQTSFGFVALTGTGPDANYGLAQCYGDLPLNDCVLCYAEARTMLPQCYPQNGGRIFL
 DGC FMRAENYSFYNEYKGPEDSIVCGNTTRKNKTFGDAVRQGLRNAVTEASGTGGYARASA
 KAGESESESAFVLANCWRTLSPDSCKQCLENASASVVKGCLPWSEGRALHTGCFLRYSDQD
 FLNKIPRNGRSRGSVVVIVVSVLSSVVVFMIGVA VSVYICKRRTIKRKRRGSKDVEKMAKT
 LKDSSLNFKYSTLEKATGSFDNANKLGQGGFGTVYKGVLPDGRDIAVKRLF FNNRHRATDF
 YNEVNMISTVEHKNLVRLLLGCSCSGPESLLVYEYLQNKSLDRFI F DVNRGKTLDWQRRYTI
 IVGTAEGLVYLHEQSSVKI IHRDIKASNILLDSKLQAKIADDFGLARSFQDDKSHI STAIAG
 TLGYMAPEYLAHGQLTEMVDVYSFGVLVLEIVTGKQNTKSKMSDYSDSLITEAWKHFQSGE
 LEKIYDPNLDWKSQYDSHI IKKEIARVVQIGLLCTQEIPSLRPPMSKLLHMLKNKEEVLPL
 PSNPPFMDERVMELRDGSDGDSAGCASLATVSQSSFYGR

>sp|Q9CAL2|CRK3_ARATH Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CRK3 PE=2 SV=1
 MPILTLLLLLILGLFISPSVSDSRGDTVAQICNNR'TTTPQQRSLFVTNFLAAMDAVSPLVEA
 KGYGQVVNGTGNLTVYAYGECIKDLDDKDCDLCFAQIKAKVPRCLPFQKGRGGQVFSDGC
 YIRYDDYNFYNETLSLQDRTVCAPKEITGVNRTVFRDNAELVKNMSVEAVRNGGFYAGFV
 DRHNVTVHGLAQCWETLNRSGCVECLSKASVRI GSCLVNEEGRVLSAGCYMRFSTQKFYNN
 SGNSTSDGNGGHNHLGVILAVTSSVVAFVLLVSAAGFLLKKRHAKKQREKKQLGSLFMLAN
 KSNLCFSYENLERATDYFSDKNKLGQGGSGSVYKGVLTNGKTVAVKRLFFNTKQWVDHFFN
 EVNLI SQVDHKNLVKLLGCSITGPESLLVY EYIANQSLHDYLFVRKDVQPLNWA KRFKIIL
 GTAEGMAYLHEESNLRI IHRDIKLSNILLEDDFTPRIADFG LARLFPEDKTHI STAIAGTL
 GYMAPEYVVRGKLTEKADVVSFGVLMIEVITGKRNNAFVQDAGSILQSVWSLYRTSNVEEA
 VDPILGDNFNKIEASRLQLIGLLCVQAAFDQRPAMSVVVKMMKGSLEIHTPTQPPFLNPGS
 VVEMRKMMPPTTNQSNSSGSRSDYITEGSSFFEPR

>sp|O65468|CRK8_ARATH Cysteine-rich receptor-like protein kinase 8 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=CRK8 PE=3 SV=2
 MYIVSMFGLAGLEALICFIFLFLFSFLTSFKASAQNPFYLNHDCPNRTTYSSNSTYS
 TNLKTLLSSFASRNASYSTGFQNI RAGQTPDRVTGLFLCRGDLSP EVCNSCVA FSVNESLT
 RCPNQREAVFYEECILRYSHKNFLSTV TYEGELIMRNPNNI SSIQNQRDQFIDL VQSNMN
 QAANEAA NSSRKFSTIKTELTSLQ TLYGLVQCTPDLARQDCFSCLTSSINRMMPLFRIGAR
 QFWPSCNSRYELYAFYNETAIGTPSP PPLFPGSTPPLTSPSIPGKSGNSTVLVVAIVVLAV
 LLFIALVGYCFLAQR TKKTFDTASASEVGD DMATADSLQLDYRTIQ TATNDFAESNKIGR
 GFGEVYKGTFSNGKEVAVKRLSKNSRQGEAEFKTEVVVVAKLQHRNLVRL LGFSLQGEERI
 LVYEYMPNKSLDCLLFDPTKQTQLDWMQRYNIIGGIARGILYLHQDSRLTI IHRDLKASNI
 LLDADINPKIADFGMARI FGLDQTQDNTSRIVGTYGYMAPEYAMHGQFSMKSDVYSFGVLV
 LEIISGRKNSSFDES DGAQDLLTHTWRLW TNRTALDLVDPLIANNCQNSEVVR CIHIGLLC
 VQEDPAKRPTISTVFMMLT SNTVTLPVPRQPGFFIQSSPVKDPTDSDQSTTTKSTPASIDD
 ELITDLYPR

>sp|Q5HZ38|GRIK2_ARATH Serine/threonine-protein kinase GRIK2 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=GRIK2 PE=1 SV=1
 MFRDSFLFARTIGCFGCFGSSGSRNQOSP KPYDDDT HSCDSDVTSTARGE EEEEEVEEQK
 SRSKRSEEILKYRLDNGLICRHI PVRETNELIRGEDENGDKTINEYVRVCKIGSGSYGKV
 LYRSTLDGQYYAIKAFHKSHLLRLRVAPSETAMSDVLR EVMIMKILEHPNIVNLI EVIDDP
 ETDHFYMVLEYVDGKWVYD GSGPPGALGEKTARKYLRDI VTGLMYLHAHDVIHGDIKPDNL
 LVTSSGTVKIGDFSVS QVFKDDDDQLRRSPGTPVFTAPECCLVSGITYSGRAADTWAVGVT
 LYCMILGQYPFLADTLQD TYDKIVNNPLIIPDGLNPLLRDLIEGLLCKDPSQRM TLKNVSE
 HPWVIGEDGHVPEYFCWCKRNAASKIEEGEANGISETSDPN

>sp|Q38997|KIN10_ARATH SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha KIN10 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=KIN10 PE=1 SV=3

MDGSGTGSRSGVESILPNYKLGRTLIGSGFGRVKIAEHALTGHKVAIKILNRRKIKNMEME
EKVRREIKILRLFMHPHIIRLYEVIETPTDIYLVMEYVNSGELFDYIVEKGRLQEDEARNF
FQQIISGVEYCHRNMVVHRDLKPENLLLDKCNVKIADFGLSNIMRDGHFLKTSCGSPNYA
APEVISGKLYAGPEVDVWSCGVILYALLCGTLPFDDENIPNLFKKIKGGIYTLPSHLSPGA
RDLIPRMLVVDPMKRVTIPEIRQHWPWFQAHLPRYLAVPPPDTVQQAKKIDEEILQEVINMG
FDRNHLESRLNRNTQNDGTVTYYLILDNRFRASSGYLGAEFQETMEGTPRMHPAESVASPV
SHRLPGLMEYQGVGLRSQYPVERKWALGLQSAHPREIMTEVLKALQDLNVCWKKIGHYNM
KCRWVPNSSADGMLSNSMHDNNYFGDESSI IENEAAVKSPNVVKFEIQLYKTRDDKYLLDL
QRVQGPQFLFLDLCAAFLAQLRVL

>sp|P92958|KIN11_ARATH SNF1-related protein kinase catalytic subunit alpha KIN11 OS=Arabidopsis thaliana OX=3702 GN=KIN11 PE=1 SV=1

MDHSSNRFGNNGVESILPNYKLGKTLGIGSFGKVKIAEHVVTGHKVAIKILNRRKIKNMEM
EEKVRREIKILRLFMHPHIIRQYEVIETTSDIYVMEYVKSGELFDYIVEKGRLQEDEARN
FFQQIISGVEYCHRNMVVHRDLKPENLLLDNRVPSGYLESEFQETTDGSGSNPMRTPEAGAS
AAPEVISGKLYAGPEVDVWSCGVILYALLCGTLPFDDENIPNLFKKIKGGIYTLPSHLSSE
ARDLIPRMLIVDPVKRITITPEIRQHRWFQTHLPRYLAVSPPDTVEQAKKINEEIVQEVVNM
GFDRNQVLESRLNRNTQNDATVTYYLLLDNRFRVPSGYLESEFQETTDGSGSNPMRTPEAGAS
PVGHWI PAHVDHYGLGARSQVPVDRKWALGLQSHAHPREIMNEVLKALQELNVCWKKIGHY
NMKCRWVPGLADGQNTMVNNQLHFRDESSI IEDDCAMTSPTVIKFELQLYKAREEKYLLDI
QRVNGPQFLFLDLCAAFLTELRLVI

ДОДАТОК 8

СПИСОК ОПРИЛЮДНЕНИХ 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
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
3. Karpov PA, Blume YB. Plant β -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
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
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* γ -Tubulin. *Cytol. Genetics.* 2019. 53(5): 349-356. doi.: 10.3103/S0095452719050104
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
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

8. Karpov PA, Blume YB. Is it really that Casein kinase 2 is able to phosphorylate α -tubulin in plants? *Cytol. Genetics*. 2018; 52 (2): 103-111. doi.: 10.3103/S0095452718020044
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
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
11. Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for 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
12. Новожилов ДО, Карпов ПА, Раевский АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ. Ca^{2+} - та 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
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
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

15. Paganelli L, Caillaud M-C, Quentin M, Damiani I, Govetto B, Lecomte P, Karpov PA, 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
16. Karpov P, 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
17. Karpov PA, 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
18. Karpov PA, 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
19. Bryantseva SA, Gavryushina ES, Yemets AI, Karpov PA, Blume YB, Drygin YF, Nadezhdina ES. MAST2-like proteinkinase from grape *Vitis vinifera*: Cloning of catalytic domain cDNA. *Cytol. Genetics*. 2010; 44 (4): 227–232. doi.: 10.3103/S0095452710040079
20. Karpov 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.
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.
22. Karpov 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

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.
24. Karpov 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
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.
26. Karpov 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.
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.
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 γ 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 α/β -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, Kapov 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 δ 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 Dugk1A. 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. Karpov 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. Karpov 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. Karpov 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. Karpov 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. Karpov 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, 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 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

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

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, Емец АИ, 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.