

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

НОВОЖИЛОВ ДМИТРО ОЛЕГОВИЧ

УДК 577.212: 004

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

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

_____ Д. О. Новожилов

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

КИЇВ - 2021

АНОТАЦІЯ

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

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

У клітині регуляція структури та функцій мікротрубочок здійснюється за допомогою низки шляхів, зокрема за участю посттрансляційних модифікацій їх складових білків. Особливе місце серед таких посттрансляційних модифікацій посідає фосфорилування тубуліну як основного білка мікротрубочок. Фосфорилування цього білку за участю різних протеїнкіназ забезпечує тонку регуляцію тубулін-тубулінових взаємодій, взаємодію тубуліну з іншими білками, асоційованими з мікротрубочкам, що призводить до їх реорганізації як у процесі мітозу, так і до регуляції взаємодії мікротрубочок з іншими клітинними структурами.

Існують численні свідчення участі кальцій- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин у процесах прямої і опосередкованої регуляції структури та функцій мікротрубочок. Серед них найбільш вивчено вплив на регуляцію тубулінового цитоскелету Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ II (CaMK2, Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinases type II), здатних фосфорилувати як тубулін безпосередньо, так і білки, асоційовані з мікротрубочками, такі як MAP6. Зокрема, протеїнкіназа CaMK2 γ регулює динамічні властивості мікротрубочок, модифікуючи як тубулін, так і деполімеразу мікротрубочок MCAK (Kif2C, Kinesin-like protein 6). Відомо, що у рослин є декілька груп протеїнкіназ, чутливих безпосередньо до кальцію чи Ca^{2+} -кальмодуліну, проте їх можлива участь у регуляції мікротрубочок практично ще не вивчена.

Головним завданням нашої роботи став пошук Ca^{2+} - і Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ рослин, здатних безпосередньо фосфорилувати тубулін, регулюючи таким чином його структурно-функціональні властивості. Первинний пошук був здійснений на основі гомології рослинних Ca^{2+} -залежних (CDPK, Calcium-dependent protein kinases) і Ca^{2+} -кальмодулін-залежних (CRK, CDPK-related kinases) протеїнкіназ з *A. thaliana* та протеїнкіназ тварин, участь яких у регуляції структури та функцій цитоскелету експериментально вже доведена. Для цього була створена вибірка відповідних протеїнкіназ, проведений аналіз їх доменної архітектури, визначені межі каталітичних доменів. Пошук здійснювали шляхом кластеризації послідовностей каталітичних доменів як найбільш еволюційно консервативних структур за допомогою методу поєднання найближчих сусідів (N-J, Neighbour-Joining).

Встановлено, що протеїнкінази CDPK і CRK при загальній кластеризації утворюють окрему чітко виражену субкладу, яка входить до однієї класифікації з протеїнкіназами CaMK2, DCLK1 та одним з каталітичних доменів RSK-кіназ, що може вказувати на їх загальну функціональну подібність. Субклада, утворена протеїнкіназами CDPK і CRK, виявилася розділеною на дві менші субклади. До однієї з них входять всі 8-м протеїнкіназ CRK, а також протеїнкінази CPK16, CPK18 та CPK28 з групи CDPK-кіназ. До іншої субклади входить 31-на протеїнкіназа CDPK. Такий розподіл свідчить про високий рівень подібності серед протеїнкіназ цих груп.

З метою отримання більш детального розподілу протеїнкіназ за гомологією була проведена серія з 42-х вирівнювань амінокислотних послідовностей каталітичних доменів кожної окремої з протеїнкіназ CDPK і CRK проти вибірки тваринних протеїнкіназ. Згідно отриманих результатів встановлена наявність кількох характерних типів розміщення протеїнкіназ CDPK і CRK на дендрограмі, що свідчить про різну ступінь подібності протеїнкіназ усередині цих груп до протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2. Каталітичні домени рослинних Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ CDPK виявляють більшу подібність до відповідних доменів протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2 тваринного походження, а

такі ж домени кальмодулін-залежних протеїнкіназ CRK – до гомологічних послідовностей протеїнкіназ RSK, DAPK та CHK2, відповідно. Як найближчі гомологи протеїнкіназ CaMK2 нами були ідентифіковані протеїнкінази CPK7, CPK14, CPK32 та CPK21, а як найближчі гомологи тваринних протеїнкіназ RSK - протеїнкінази CPK17, CPK34, CRK2. Найближчими гомологами протеїнкіназ DAPK виявились протеїнкінази CPK20 та CPK27, а найближчими гомологами протеїнкіназ CHK2 – протеїнкінази CPK16, CPK18, CPK28, CPK28 та CRK6. У кожному випадку, базуючись на подібності каталітичних доменів рослинних протеїнкіназ груп CDPK і CRK до послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2, було зроблене припущення про можливу наявність схожих функцій відповідних протеїнкіназ CDPK і CRK у рослинній клітині, зокрема щодо регуляції структури і функцій мікротрубочок. Оскільки серед протеїнкіназ, що кластеризувались з протеїнкіназами CDPK і CRK, лише для протеїнкіназ CaMK2 встановлена можливість безпосереднього фосфорилування тубуліну, на даному етапі саме гомологи саме протеїнкіназ CaMK2, зокрема, протеїнкінази CPK7, CPK14, CPK32 та CPK21 розглядались як протеїнкінази, здатні фосфорилувати білки мікротрубочок у рослин.

Іншим шляхом пошуку Ca²⁺-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних фосфорилувати білки мікротрубочок, був профільний пошук. Для цього була створена вибірка послідовностей сайтів фосфорилування Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців і створені профілі цих сайтів. Це дозволило створити загальний паттерн по повній вибірці послідовностей, однак він характеризувався виродженим характером. Тому була проведена N-J кластеризація ідентифікованих профілів, що дозволило створити низку спільних профілів сайтів фосфорилування білків для фосфорилування різними групами протеїнкіназ ссавців. Таким чином, були визначені клади різного порядку, що поєднують схожі сайти фосфорилування білків та асоційовані з ними протеїнкінази ссавців. У подальшому нами були визначені ті спільні профілі білкового фосфорилування, яким відповідають консенсусні послідовності у складі ізотипів тубуліну *A. thaliana*, та відбраковані ті профілі, яким не

відповідають жодні консенсусні послідовностей тубуліну *A. thaliana*. Потенційні сайти фосфорилування, що відповідають створеним профілям, вдалось знайти у всіх ізотипів тубуліну *A. thaliana*. Спільна кластеризація експериментально встановлених сайтів фосфорилування тваринними протеїнкіназами і сайтів фосфорилування, передбачених для молекул різних субодиниць тубуліну *A. thaliana*, дозволила нам відібрати протеїнкінази тваринного походження, що фосфорилують схожі сайти молекул тубуліну. Таким чином було встановлено, протеїнкінази САМК1А, САМК2А, САМКК2 людини (*Homo sapiens*) та протеїнкіназа САМК2А сірого пацюка (*Rattus norvegicus*) демонструють профілі фосфорилування, які відповідають консенсусним сайтам у структурі тубулінів *A. thaliana*.

Спираючись на еволюційну консервативність каталітичних доменів досліджуваних протеїнкіназ, був проведений пошук гомологів протеїнкіназ САМК1А, САМК2А, САМКК2 з *H. sapiens* та протеїнкінази САМК2А з *R. norvegicus* серед протеїнкіназ *A. thaliana* з використанням бази даних UniProtKB. Як найближчі гомологи біли визначені протеїнкіназа СРК20 для протеїнкінази САМК1А, протеїнкіназа СРК21 для протеїнкінази САМК2А і протеїнкіназа GRIK2 для протеїнкінази САМКК2. Так, протеїнкінази СРК20 і СРК21 були визначені як представники кальцій-залежних протеїнкіназ групи СДРК, котрі найбільш імовірно здатні безпосередньо фосфорилувати тубулін рослинного походження. Також високий рівень подібності каталітичних доменів протеїнкіназ СРК20 і СРК21 *A. thaliana* та протеїнкіназ САМК1А і САМК2А *H. sapiens* був доведений шляхом побудови тривимірних моделей каталітичних доменів цих протеїнкіназ і просторового вирівнювання їх структур. При цьому вирівнюванні показники середньоквадратичного відхилення склали 0,62 для структур каталітичних доменів протеїнкіназ СРК20/САМК1А, 0,896 - для протеїнкіназ СРК21/САМК2А, що свідчить про високий рівень подібності їх структур. Ці результати частково корелюють з результатами пошуку, що базувався на гомології каталітичних доменів Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *A. thaliana* та кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, для яких

продемонстрована участь у фосфорилювання білків цитоскелету. Оскільки профільний пошук у більшій мірі орієнтований на визначення протеїнкіназ, здатних саме безпосередньо фосфорилювати рослинний тубулін, саме тому протеїнкінази СРК20 і СРК21 слід розглядати як Ca^{2+} -залежні протеїнкінази, задіяні у фосфорилюванні білків мікротрубочок рослин.

За допомогою методів класичної та структурної біоінформатики нами була проаналізована можливість фосфорилювання молекул рослинного тубуліну протеїнкіназами СаМК2, для яких така функція вже добре відома у клітинах тварин. В ході цієї роботи була доведена наявність у складі молекул різних субодиниць тубуліну *Arabidopsis thaliana* сайтів, що відповідають паттернам фосфорилювання за допомогою протеїнкіназ СаМК2. Так, залишками тубулінів *A. thaliana*, які імовірно могли би фосфорилюватися кальмодулін-залежними протеїнкіназами тваринного походження, виявилися амінокислотні залишки Ser32, Ser147, Ser151, Ser259, Ser321, Ser376, Ser391 та Ser395 для обох ізотипів γ -тубуліну та залишки Ser146, Ser154, Ser219, Ser222, Ser231, Ser279, Thr312, Ser374, Ser383 для усіх ізотипів β -тубуліну.

У ході подальших досліджень нами були побудовані просторові моделі α/β -тубулінового димеру та малого γ -тубулінового кільця (γ TuSC), за допомогою яких вдалось перевірити просторову доступність для фосфорилювання визначених залишків. Для γ -тубуліну доступними виявились амінокислотні залишки Ser259 і Ser321, а для β -тубуліну – залишок Thr312. Таким чином, нами доведена можливість фосфорилювання тубуліну рослин Ca^{2+} -кальмодулін-залежними протеїнкіназами і визначено потенційні сайти для цієї модифікації. Аналізуючи розташування доступних сайтів фосфорилювання на просторовій моделі малого γ -тубулінового кільця, було визначено, що вони знаходяться у місцях контактів γ -тубуліну суміжних мономерів γ TuSC. Розташування потенційних сайтів фосфорилювання у цих позиціях може бути свідченням імовірної участі такої модифікації у формуванні центрів первинної нуклеації мікротрубочок. На моделі α/β -тубулінового димеру було показано, що сайт, який по аналогії може фосфорилюватися тваринними кальмодулін-залежними

кіназами, знаходиться у зоні контакту субодиниць α - і β -тубуліну. Це може бути свідченням того, що такий потенційний сайт фосфорилування є важливим для утворення тубулінового димеру.

Нами також було проведено пошук можливих інструментів для вивчення функцій рослинних протеїнкіназ групи CDPK. З цією метою були проаналізовані існуючі мутантні лінії *A. thaliana* за генами протеїнкіназ CPK20 і CPK21. Як результат проведеної роботи, були підбрані перспективні лінії knockout-мутантів (SALK_073448C для протеїнкінази CPK20 та SALK_029412C для протеїнкінази CPK21), використання яких, на наш погляд, дозволить експериментально оцінити залучення цих типів протеїнкіназ до фосфорилування білків мікротрубочок рослин та регуляції їх структурно-функціональних властивостей.

Оскільки на сьогодні не існує інгібіторних сполук, специфічних для рослинних Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, також був проведений аналіз можливості використання кальмодулін-спрямованих інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 для пригнічення активності рослинних Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ. Для цього були визначені межі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana* і здійснено пошук гомологічних структур у базі даних PDB. За таким алгоритмом була створена вибірка з експериментально встановлених структур, які на наступному етапі були використані для шаблонного моделювання відповідних доменів протеїнкіназ CDPK рослинного походження. Аналіз контрольної тривимірної структури кальмодуліну з малбранхеамідом, його ефективним інгібітором (алкалоїд з аскоміцета *Malbranchea aurantiaca*), дозволив визначити амінокислотне оточення референсного ліганду. Порівняння амінокислотного оточення референсного ліганду у структурі кальмодуліну 1 людини (Phe101, Leu106, Met125, Met145) з аналогічними залишками у послідовності протеїнкінази CPK1 свідчить про наявність ідентичних залишків у послідовності Ca^{2+} -зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 (амінокислотні залишки Phe543, Leu548, Met585), за виключенням заміни метіоніну Met125 у випадку з

кальмодуліном на лейцин у структурно-відповідному положенні (Leu565) у протеїнкінази СРК1.

Подібність амінокислотного оточення сайту зв'язування ліганду у референсній структурі та кишені у структурі моделі Ca^{2+} -зв'язуючого домену СРК1 дозволила визначити ділянки, за якими було побудовано карту сайту зв'язування лігандів KN-93 і KN-62 для проведення їх молекулярного докінгу до Ca^{2+} -зв'язуючого домену СРК1. Аналіз результатів докінгу референсного інгібітору малбранхеаміду проти всієї поверхні кальмодулінів виявив два енергетично та конформаційно вигідних сайти, навколо яких концентрувалась більшість варіантів розташування конформерів ліганду, при чому, згідно оціночних функцій, енергетично вигідним були варіанти, що відповідали експериментально підтверженому сайту референсної структури малбранхеаміду з кальмодуліном 1. Результати докінгу кальмодулін-спрямованих інгібіторів KN-93 і KN-62 у структурі відповідних кишень кальмодуліну і гомологічної ділянки моделі Ca^{2+} -зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana* також свідчать про високий ступінь спорідненості лігандів до цих кишень. Наявність гомологічних і енергетично вигідних сайтів зв'язування інгібіторів KN-93 і KN-62 у структурах кальмодуліну і протеїнкінази СРК1 свідчить про високу імовірність ефективного використання цих сполук як інгібіторів рослинних протеїнкіназ СДПК.

Таким чином, у ході проведених досліджень були визначені Ca^{2+} -залежні протеїнкінази з *A. thaliana*, які потенційно можуть фосфорилювати тубулін у рослин, визначений ряд сайтів такого фосфорилювання у структурі рослинних тубулінів та запропоновані пояснення щодо можливих функцій таких модифікацій. Також нами були проаналізовані можливі інструменти для подальшого вивчення рослинних протеїнкіназ підродина СДПК: підібрані лінії нокаутних мутантів арабідопсису по генах, що кодують протеїнкінази СРК20 і СРК21, та проаналізована можливість використання кальмодулін-спрямованих інгібіторів тваринної протеїнкінази СаМК2 (KN-93 і KN-62) для пригнічення активності рослинних протеїнкіназ СДПК.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті:

1. Karpov P.A., **Novozhylov D.O.**, Isayenkov S.V., Blume Y.B. Motif-based prediction of plant tubulin phosphorylation sites associated with calcium-dependent protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Cytol Genet.* 2018; 52(6):428–439. doi.org/10.3103/S0095452718060038 (*Особистий внесок здобувача: разом із співавторами проведено дослідження, опрацьовані отримані дані та написано статтю*).
2. **Novozhylov D.O.**, Karpov P.A., Blume Y.B. Bioinformatic search for Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. *Cytol Genet.* 2017; 51(4):239–246. doi.org/10.3103/S0095452717040053 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).
3. **Новожилов Д.О.**, Карпов П.А., Самофалова Д.О., Попітак М.А., Блюм Я.Б. Інгібуючий вплив KN-93 і KN-62 як результат CaM-спрямованого блокування активації протеїнкінази CaMK2 тварин і протеїнкіназ CDPK рослинного походження. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2020; 26:298–304. doi.org/10.7124/FEEO.v26.1283 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).
4. **Новожилов Д.О.**, Карпов П.А., Раєвський А.В., Ожередов С.П., Блюм Я.Б. Ca²⁺- та Ca²⁺/-кальмодулін-залежні протеїнкінази – потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2017; 20:323–328.)

doi.org/10.7124/FEEO.v20.788 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

Тези:

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

SUMMARY

Novozhylov D.O. Search for Ca^{2+} -dependent protein kinases related to plant microtubules and elucidation of their role in tubulin phosphorylation. – Manuscript.

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

In the cell, the regulation of microtubules is carried out in a number of ways, in particular by means of tubulin posttranslational modifications, such as phosphorylation. Phosphorylation of tubulins by protein kinases is associated with the regulation of tubulin-tubulin interactions, tubulin interactions with other cytoskeletal proteins, cytoskeletal rearrangements, tubulin cytoskeleton reorganization processes during mitosis, and regulation of microtubule interactions with cellular structures.

There is a lot of evidence of the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in animals in the processes of direct and indirect regulation of the cytoskeleton. Among them, CaMK2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinases type II), which is able to phosphorylate both tubulin directly and microtubule-associated proteins such as MAP6, have the most studied effect on the regulation of the tubulin cytoskeleton. In particular, CaMK2 γ regulates microtubule dynamics by modifying both tubulin and microtubule depolymerase MCAK (Kif2C, Kinesin-like protein 6). It is known that plants have several groups of protein kinases that are sensitive to calcium / calmodulin or directly to calcium. However, their possible role in the regulation of microtubules has not been studied enough.

The possibility of phosphorylation of plant tubulin molecules by calmodulin-dependent protein kinases CaMK2, for which such a function is known in animal cells, was investigated using the methods of classical and structural bioinformatics. The presence of sites corresponding to CaMK2 phosphorylation patterns in the tubules of *Arabidopsis thaliana* was proved. Thus, residues of *A. thaliana* tubulins that could possibly be phosphorylated by animal calmodulin-dependent protein kinases were

Ser32, Ser147, Ser151, Ser259, Ser321, Ser376, Ser391 and Ser395 for both isotypes of γ -tubulins, Ser142, Ser31, Ser279, Thr312, Ser374, Ser383 for all isotypes of β -tubulins.

Spatial models of α/β -tubulin dimer and small γ -tubulin ring (γ TuSC) were constructed to verify the spatial availability for modification of certain residues. The amino acid residues Ser259 and Ser321 for γ -tubulins, and the residue Thr312 for β -tubulins were spatially available for modifications. Thus, the theoretical possibility of phosphorylation of plant tubulins by calcium/calmodulin-dependent protein kinases was proved and several potential sites for this modification were identified.

Analyzing the location of spatially accessible phosphorylation sites on the spatial model of a small γ -tubulin ring, it was determined that they are located at the points of contact of γ -tubulins of adjacent γ TuSC monomers. The placement of potential phosphorylation sites at these positions may be evidence of the likely involvement of such a modification in the formation of the center of primary nucleation of microtubules. In the α/β -tubulin dimer model, it was shown that a site that is likely to be phosphorylated by animal calmodulin-dependent kinases is in the contact zone of the α - and β -tubulin subunits. This may indicate that this potential phosphorylation site is important for the formation of the tubulin dimer.

The next step was to search for calcium- and calmodulin-dependent protein kinases of plants that are able to regulate and directly phosphorylate tubulins. The initial search was performed based on the homology of *A. thaliana* calcium-dependent protein (CDPK) and calmodulin-dependent kinases (CRK, CDPK-related kinases) and animal protein kinases involved in the regulation of the cytoskeleton according to the literature data. The search was performed by N-J (Neighbor-Joining) clustering of catalytic domain sequences as the most evolutionarily conservative structures.

CDPK and CRK in the general clustering formed a separate distinct subclade, which was part of the same clade of CaMK2, DCLK1 and one of the catalytic domains of RSK kinases, which may indicate their functional similarity. The CDPK and CRK subclades were divided into two smaller subclades. One included all 8 CRK kinases, as well as CPK16, CPK18 and CPK28 from the group of CDPK kinases. Second

subclade included the remaining 31 CDPK-kinases. This distribution indicates a high level of similarity among protein kinases of these groups.

In order to obtain a more detailed distribution of protein kinases by homology, a series of 42 alignments of each individual CDPK and CRK against animal protein kinases involved in the regulation of the cytoskeleton was performed. According to the results, the presence of several types of CDPK and CRK placement on the dendrogram was revealed, which showed different degrees of similarity of protein kinases within these groups to CaMK2, RSK, DAPK and CHK2. The catalytic domains of plant calcium-dependent CDPKs showed greater similarity to animal CaMK2, RSK, DAPK, and CHK2, and calmodulin-dependent CRKs - to RSK, DAPK, and CHK2. The closest homologues of CaMK2 protein kinases were identified CPK7, CPK14, CPK32 and CPK21. The closest homologues of animal protein kinases RSK - CPK17, CPK34, CRK2. The closest DAPK homologues are CPK20 and CPK27. The closest homologues of CHK2 are CPK16, CPK18, CPK28, CPK28 and CRK6. In each case, based on the similarity of the catalytic domains of plant protein kinases of CDPK and CRK groups to the sequences of catalytic domains of CaMK2, RSK, DAPK and CHK2 protein kinases, it was suggested that similar functions of CDPK and CRK in the plant cell may be present, including cytoskeleton regulation. Because among the kinases clustered with CDPK and CRK, according to the literature, only CaMK2 shows the possibility of direct phosphorylation of tubulin, at this stage the homologues of CaMK2 (CPK7, CPK14, CPK32 and CPK21) were considered as protein kinases that potentially phosphorylate microtubules.

Another way to search for calcium-dependent protein kinases of *A. thaliana* that are able to phosphorylate the tubulin cytoskeleton was to conduct a profile search. For this purpose, sequences of 494 phosphorylation sites associated with mammalian calcium/calmodulin-dependent protein kinases were selected and profiles of these sites were created. A general pattern was created, but it was degenerated. N-J clustering of profiles was performed, which allowed to create a several common profiles of phosphorylation sites for profiles of different groups of mammalian protein kinases. Thus, different clades and subclades combining similar phosphorylation sites and

associated to them mammalian protein kinases were identified. The common phosphorylation profiles corresponding to the consensus sequences in the isotypes of *A. thaliana* tubulins were determined and those profiles that did not correspond to any consensus sequences from *A. thaliana* tubulins were rejected. Potential phosphorylation sites corresponding to the established profiles were found in all isotypes of *A. thaliana* tubulins. The joint clustering of experimentally proven animal protein kinase sites and phosphorylation sites predicted for *A. thaliana* tubulin molecules allowed us to select animal protein kinases that phosphorylate similar sites. Thus, protein kinases CAMK1A, CAMK2A, CAMKK2 from *H. sapiens* and CAMK2A from *R. norvegicus* show phosphorylation profiles corresponding to consensus sites in the structure of *A. thaliana* tubulins.

Based on the evolutionary conservatism of catalytic domains, homologs of protein kinases CAMK1A, CAMK2A, CAMKK2 from *H. sapiens* and CAMK2A from *R. norvegicus* were searched by blastp instrument in the UniProtKB database among *A. thaliana* protein kinases. The closest homologues are protein kinases CPK20 for CAMK1A, CPK21 for CAMK2A and GRIK2 for CAMKK2. Thus, the protein kinases CPK20 and CPK21 were identified as representatives of calcium-dependent protein kinases of the CDPK group, which are most likely to be able to directly phosphorylate microtubules. Also, the high level of similarity of the catalytic domains of *A. thaliana* CPK20 and CPK21 and *H. sapiens* CAMK1A and CAMK2A respectively was proved by constructing three-dimensional models of the catalytic domains of these kinases and spatial alignment of their structures. RMSD for the structures of the catalytic domains CPK20/CAMK1A was 0.62, for CPK21/ CAMK2A - 0.896, which indicates a high level of similarity of these structures. These results are partially correlated with the results of the search based on the homology of the catalytic domains of calcium and calmodulin-dependent protein kinases of *A. thaliana* and calmodulin-dependent protein kinases of animals for which participation in cytoskeleton regulation is shown. However, the profile search is more focused on the determination of protein kinases that are able to directly phosphorylate plant tubulins. Therefore, it is CPK20 and

CPK21 that are considered to be calcium-dependent protein kinases capable to phosphorylating plant microtubules.

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

Since there are no inhibitory compounds specific for plant calcium-dependent protein kinases, was analyzed the possibility of using calmodulin-targeted CaMK2 inhibitors to inhibit the activity of plant calcium-dependent protein kinases. To do this, the limits of the calcium-binding domain of *A. thaliana* CPK1 protein kinase were determined, and homologous structures were searched in the PDB database. According to this algorithm, 40 of experimentally established structures was selected, which in the next step were used for template modeling of the calcium-binding domains of plant CDPK. Analysis of the control three-dimensional structure of calmodulin with malbranchamide (6EEW) allowed to determine the amino acid environment of the reference ligand. Comparison of the amino acid environment of the reference ligand in the structure of *H. sapiens* calmodulin 1 (Ile101, Leu106, Met125, Met145) with similar residues in the protein kinase CPK1 sequence indicates the presence of identical residues in the sequence of the calcium-binding domain CPK1 (Ile543, Leu548, Met585) except for the replacement of methionine Met125 in calmodulin by leucine in the structurally corresponding position (Leu565) in CPK1. The similarity of the amino acid environment of the ligand binding site in the reference structure and the pocket in the structure of the calcium binding domain model of CPK1 allowed us to determine the sites on which the site map for subsequent molecular docking was constructed. Analysis of the results of docking the reference inhibitor against the entire surface of calmodulin revealed that the experimentally confirmed site of the reference structure were energetically advantageous. Docking of calmodulin-directed inhibitors KN-93 and KN-62 in the respective structures of the reference pocket in calmodulin and the homologous region of the *A. thaliana* CPK1 calcium-binding domain also showed high affinity of ligands for these pockets. The presence of homologous and energetically

beneficial KN-93 and KN-62 binding sites in calmodulin and CPK1 structures suggests the potential use of these compounds as inhibitors of plant CDPKs.

Therefore, Ca²⁺-dependent protein kinases from *A. thaliana*, which can potentially phosphorylate tubulin in plants, have been identified; several phosphorylation sites in the structure of plant tubulins have been identified, and explanations for possible functions of such modifications have been proposed. We also analyzed possible tools for further study of plant protein kinases of the CDPK subfamily: selected lines of knockout mutants of Arabidopsis by genes encoding protein kinases CPK20 and CPK21, and analyzed the possibility of using calmodulin-targeted inhibitors of animal protein kinase CaMK2 - KN-62 and KN-93 for inhibition of plant CDPK activity.

Key words: protein kinase, CDPK, CRK, CaMK2, homology, phosphorylation site, phosphorylation profile, tubulin, molecular docking.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1. РОЛЬ Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ У РЕГУЛЯЦІЇ МІКРОТРУБОЧОК.....	29
1.1. Структура, роль та функції мікротрубочок як важливої складової цитоскелету клітин еукаріот.....	29
1.1.1. Особливості структурної організації мікротрубочок у тварин і рослин....	34
1.1.2. Посттрансляційні модифікації білків мікротрубочок та їх вплив на регуляцію функціональних процесів в клітині.....	38
1.2. Функціональна роль Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ, їх класифікація та роль у регуляції цитоскелету.....	42
1.2.1. Огляд кальцій- та кальмодулін- залежних протеїнкіназ різного еволюційного походження.....	42
1.2.2. Роль Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ у клітинах тварин і рослин.....	49
1.2.3. Участь кальцій-регульованих протеїнкіназ у регуляції мікротрубочок.....	59
1.3. Модуляція активності кальцій-/кальмодулін-залежних протеїнкіназ.....	61
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	64
2.1. Матеріали дослідження.....	64
2.1.1. Біоінформаційні методи для пошуку і відбору амінокислотних послідовностей кальцій-залежних протеїнкіназ і тубулінів.....	67
2.1.2. Методи, використані для аналізу доменної архітектури та структури кальцій-залежних протеїнкіназ.....	68
2.2. Пошук кальцій-залежних протеїнкіназ <i>A. thaliana</i> , що можуть фосфорилувати мікротрубочки, за допомогою кладистичних методів.....	68

2.2.1. Відбір Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, що беруть участь у регуляції мікротрубочок.....	68
2.2.2. Аналіз доменної архітектури протеїнкіназ вибірки.....	69
2.2.3. Пошук Ca^{2+} залежних протеїнкіназ <i>A. thaliana</i> , що беруть участь у регуляції мікротрубочок на підставі гомології послідовностей їх каталітичних доменів...	69
2.2.4. Пошук профілів сайтів фосфорилювання Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців.....	70
2.2.5. Кластеризація, створення спільних профілів фосфорилювання для різних груп протеїнкіназ.....	70
2.2.6. Кластеризація профілів експериментально доведених сайтів фосфорилювання протеїнкіназ тваринного походження і профілів сайтів фосфорилювання, передбачених для молекул тубуліну <i>A. thaliana</i>	70
2.2.7. Визначення кальцій-залежних протеїнкіназ <i>A. thaliana</i> , здатних до фосфорилювання тубуліну, на основі гомології повних послідовностей до протеїнкіназ, визначених в ході профільного аналізу.....	71
2.3. Визначення потенційних сайтів фосфорилювання рослинних тубулінів.....	72
2.3.1. Ідентифікація сайтів фосфорилювання у структурі послідовностей тубулінів <i>A. thaliana</i>	72
2.3.2. Побудова просторових моделей тубулінового димера та малого γ -тубулінового комплексу <i>A. thaliana</i>	72
2.3.3. Визначення та аналіз просторової доступності передбачених сайтів фосфорилювання тубулінів <i>A. thaliana</i>	73
2.4. Методика підбору нокаутних мутантів CDPK <i>A. thaliana</i>	74
2.5. Підбір потенційних інгібіторів протеїнкіназ CDPK.....	74
2.5.1. Ідентифікація імовірного сайту зв'язування селективних інгібіторів KN-93 та KN-62 на поверхні молекули кальмодуліну.....	74
2.5.2. Побудова 3-вимірної моделі регуляторного домену протеїнкінази CPK1 <i>A. thaliana</i> за допомогою профільного методу реконструкції та встановлення імовірного сайту зв'язування KN-93 та KN-62.....	75

2.5.3. Використання методу молекулярного докінгу для оцінки взаємодії потенційних інгібіторів з протеїнкіназою СРК1.....75

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ Ca^{2+} - ТА Ca^{2+} /КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ *A. thaliana*, ЗДАТНИХ ФОСФОРИЛЮВАТИ ТУБУЛІН.....77

3.1. Аналіз доменної архітектури Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін залежних протеїнкіназ *A. thaliana* та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, що беруть участь у регуляції мікротрубочок.....77

3.2. Результати пошуку за подібністю каталітичних доменів Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін залежних протеїнкіназ *A. thaliana* до каталітичних доменів Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, що беруть участь у регуляції мікротрубочок.....82

3.3. Результати пошуку профілів сайтів фосфорилювання Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців з наступною їх кластеризацією і створенням спільних профілів.....91

3.4. Визначення Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ тварин, профілі фосфорилювання яких відповідають профілям фосфорилювання, передбаченими для послідовностей тубулінів *A. thaliana*.....98

3.5. Визначення Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних фосфорилювати тубуліни, на основі гомології повних послідовностей до протеїнкіназ, визначених в ході профільного аналізу.....102

РОЗДІЛ 4. ПОШУК ТА АНАЛІЗ ЙМОВІРНИХ САЙТІВ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТУБУЛІНІВ.....108

4.1. Пошук сайтів фосфорилювання у послідовностях ізотипів тубулінів *A. thaliana*.....108

4.2. Перевірка просторової доступності ймовірних сайтів фосфорилювання на основі аналізу просторових моделей тубулінових комплексів *A. thaliana*.....108

РОЗДІЛ 5. АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ ФОСФОРИЛЮВАННЯ МІКРОТРУБОЧОК РОСЛИН Ca^{2+} - ТА Ca^{2+} /КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИМИ ПРОТЕЇНКИНАЗАМИ.....	113
5.1. Відбір мутантних ліній <i>A. thaliana</i> , що можуть бути використані у дослідженнях функціональної активності СРК20 і СРК21.....	113
5.2. Підбір перспективних інгібіторів рослинних СДРК.....	114
5.2.1. Ідентифікація імовірного сайту зв'язування KN-93 та KN-62 у структурі СРК1 на основі гомології послідовностей та гомології 3-вимірних структур кальмодуліну 1 людини і моделі кальцій-зв'язуючого домену СРК1 <i>A. thaliana</i>	114
5.2.2. Використання методу молекулярного докінгу для оцінки взаємодії потенційних інгібіторів з СРК1 <i>A. thaliana</i>	116
 РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	 120
 ВИСНОВКИ.....	 128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	131
ДОДАТОК А.....	157
ДОДАТОК Б.....	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АМРК - 5'-АМФ-активована протеїнкіназа (5'-AMP-activated protein kinase)
- САМ – кальмодулін (CALM, Calmodulin)
- СаМК – кальмодулін-залежні протеїнкінази (Calmodulin-dependent protein kinase)
- СаМК2 – Кальцій/кальмодулін-залежна протеїнкіназа тип 2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II)
- ССаМК – Ca^{2+} та кальмодулін-залежні протеїнкінази (Calcium and calmodulin-dependent protein kinase)
- CDPK – Ca^{2+} -залежні протеїнкінази (Calcium-dependent protein kinase)
- ЧЕК2 – чекпоінт-кіназа 2 (Checkpoint kinase 2)
- СРК – кальцій-залежні протеїнкінази підродина CDPK з *A. thaliana*
- CRK – CDPK-споріднені кінази (CDPK-related kinase)
- ДАПК1 – кіназа, асоційована з апоптозом 1 (Death-associated protein kinase 1)
- DCLK1 – даблкортин-подібна кіназа 1 (Doublecortin-like kinase 1)
- GCP – білок γ -тубулінового комплексу (γ -tubulin complex protein)
- GRIK2 – кіназа взаємодії з гемінівірусним Rep 2 (Geminivirus Rep interacting kinase 2)
- KALRN – калірін (Kalirin)
- LKB1 – кіназа печінки B1, серин-треонінова кіназа 11 (Liver kinase B1, STK11, serine/threonine kinase 11)
- МАР – білок, асоційований з мікротрубочками (Microtubule-associated protein)
- МАРТ – тау-білок (Microtubule-associated protein tau)
- МАРК – кіназа, що регулює афінність МАР/мікротрубочок (MAP/microtubule affinity-regulating kinase)
- MLCK – кіназа легких ланцюгів міозину (Myosin light chain kinase)
- NJ – метод приєднання сусідів (Neighbor joining)
- PKD – серин/треонінова протеїнкіназа D (PRKD, Serine/threonine-protein kinase D)

RMSD – показник середньоквадратичного відхилення (Root-mean-square deviation)

RSK - рибосомальна S6 кінза (Ribosomal s6 kinase)

SnRK – SNF-споріднені серин/треонінові протеїнкінази (SNF-related serine/threonine-protein kinase)

TRIO – білок потрійного функціонального домену (Triple functional domain protein)

TTN – тітин (Titin)

ВСТУП

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

На сьогоднішній день відома низка Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, що так чи інакше, прямо і опосередковано взаємодіють і регулюють як актиновий (мікрофіламенти), так і тубуліновий (мікротрубочки) цитоскелет у відповідь на кальцієві стимули. Серед них найбільш вивченим є вплив на структурно-функціональні характеристики мікротрубочок протеїнкіназ СаМК2, здатних фосфорилувати як тубулін безпосередньо, так і білки, асоційовані з мікротрубочками, такі як MAP6 (McVicker et al., 2015; Lu et al., 2002; Holmfeldt et al., 2005). Зокрема, протеїнкіназа СаМК2 γ регулює динамічну структуру мікротрубочок, модифікуючи як тубулін, так і деполімеразу мікротрубочок МСАК (Kif2C, Kinesin-like protein 6), а протеїнкіназа СаМК2 δ ембріональних аксонів мишей асоціюється як з мікротрубочками, так і з мікрофіламентами (Holmfeldt et al., 2005; Hong et al., 1996)

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

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

Саме це визначає актуальність і необхідність вивчення ролі Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежних рослин у регуляції структури і функцій їх мікротрубочок шляхом фосфорилування тубуліну.

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

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було з'ясування можливості фосфорилування тубуліну рослин за участю різних типів кальцій-залежних протеїнкіназ, визначення потенційних сайтів такої модифікації, а також оцінка доцільності використання відомих інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 для вивчення функцій рослинних протеїнкіназ CDPK.

Для досягнення мети роботи були поставлені наступні завдання:

1. Відбір амінокислотних послідовностей Ca²⁺- і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana*, кальмодулін-залежних протеїнкіназ *Homo sapiens* і *Mus musculus*, що беруть участь у регуляції структурно-функціональних властивостей мікротрубочок, та аналіз їх доменної архітектури.
2. Проведення NJ кластеризації послідовностей каталітичних доменів Ca²⁺- і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, кальмодулін-залежних протеїнкіназ *H. sapiens* і *M. musculus*, що беруть участь у регуляції тубулінового цитоскелету.
3. Визначення за результатами кластеризації найближчих гомологів серед вибірки кальцій-регульованих протеїнкіназ рослинного і тваринного походження.
4. Проведення профільного аналізу сайтів фосфорилування тубулінів тваринними протеїнкіназами, визначення спільних профілів сайтів фосфорилування. Відбір протеїнкіназ, профілі фосфорилування яких є характерними для відповідних сайтів тубуліну *A. thaliana*. Визначення кальцій-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, які здатні фосфорилувати різні субодиниці тубуліну, на основі гомології до протеїнкіназ тварин, визначених за допомогою профільного аналізу.
5. Пошук імовірних сайтів фосфорилування різних ізотипів тубуліну *A. thaliana*, базуючись на профілях фосфорилування CaMK2 та перевірка просторової доступності цих сайтів на тривимірних моделях димеру αβ-тубуліну та малого γ-тубулінового комплексу.

6. Відбір перспективних ліній нокаутних мутантів *A. thaliana* по генах Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, які здатні фосфорилувати тубулін.
7. Оцінка можливості використання кальмодулін-спрямованих інгібіторів тваринних протеїнкіназ CaMK2 для пригнічення активності протеїнкіназ CDPK рослинного походження. Визначення потенційного сайту зв'язування інгібіторів KN-93 та KN-62 у структурі протеїнкінази CPK1 з *A. thaliana*.
8. Перевірка спроможності інгібіторів KN-93 та KN-62 взаємодіяти з протеїнкіназами CDPK *A. thaliana* за допомогою молекулярного докінгу.

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

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

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

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено пошук та відібрано кальцій-залежні протеїнкінази *A. thaliana*, здатні регулювати структурно-функціональні властивості цитоскелету, на основі подібності їх каталітичних доменів до тваринних гомологів. За допомогою NJ кластеризації визначені найближчі гомологи тваринних Ca^{2+} - кальмодулін-залежних протеїнкіназ типу 2 (CaMK2), рибосомальних S6 кіназ (RSK), кіназ, асоційованих з апоптозом (DAPK) та чекпоінт-кінази 2 (CHK2) серед кальцій-залежних (CPK) та кальмодулін-залежних (CRK) протеїнкіназ *A. thaliana*. На основі аналізу профілів фосфорилування кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин здійснено пошук протеїнкіназ CDPK *A. thaliana*, здатних фосфорилувати тубуліни. Проведена NJ кластеризація 494-х сайтів фосфорилування тваринних протеїнкіназ, створені спільні профілі фосфорилування, визначені протеїнкінази, профілям фосфорилування яких відповідають консенсусні

послідовності у складі різних ізотипів тубуліну (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 1A (CaMK1A), кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2A (CaMK2A), кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа кіназа 2 (CaMKK2) з *H. sapiens* та кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2A (CaMK2A) з *R. norvegicus*), визначені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana* - кальцій-залежна протеїнкіназа 20 (CPK20), кальцій-залежна протеїнкіназа 21 (CPK21) та кіназа взаємодії з гемінівірусним Rep 2 (GRIK2). Проведений пошук сайтів фосфорилювання, що відповідають профілям протеїнкінази CaMK2 у послідовностях різних тубулінів *A. thaliana* та перевірена доступність цих сайтів на тривимірних моделях димеру α/β -тубуліну та малого γ -тубулінового комплексу (γ TuRC). Визначені потенційні сайти фосфорилювання γ -тубуліну - Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376, а для β -тубуліну - Thr312. Проведений аналіз можливості використання інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 людини для рослинних протеїнкіназ CDPK, визначений потенційний сайт зв'язування інгібіторів KN-93 та KN-62 у структурі моделі кальцій-зв'язуючого домену CPK1 з *A. thaliana*, а також проведений молекулярний докінг лігандів KN-93, KN-62 до CPK1 *A. thaliana*, результати якого підтвердили можливість використання цих інгібіторів у дослідженні вищезгаданих протеїнкіназ у рослин.

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

експериментального вивчення особливостей функціонування протеїніназ підродина CDPK у рослин.

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

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

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

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

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКАЗ У РЕГУЛЯЦІЇ

МІКРОТРУБОЧОК

1.1. Структура, роль та функції мікротрубочок як важливої складової цитоскелету клітин еукаріот

Мікротрубочки – цитоскелтні динамічні полімерні структури, що складаються за гетеродимерів α - і β - тубулінів. Ці структури беруть початок з центру організації мікротрубочок і ростуть до периферії клітини, зазнаючи постійної добудови з одного кінця та вкорочення з іншого, що дістало назву тредмілінгу.

Мікротрубочки являють собою порожнисті циліндри близько 24-25 нм у зовнішньому діаметрі та близько 15 нм у внутрішньому, що у більшості еукаріотичних клітин, у поперечному розрізі складаються з 13 протофіламентів. Кожний протофіламент складається з поздовжньо з'єднаних гетеродимерів α - і β - тубулінів. Протофіламенти розташовані паралельно і утримуються разом завдяки латеральним взаємодіям, формуючи циліндричну полярну структуру. Така структура еукаріотичних мікротрубочок дістала назву В-решітки. α - і β - тубулінові мономери В-решітки одного протофіламенту асоціюються з, відповідно, α - і β - мономерами наступного у спіралі протофіламенту. Сторона, на кінці якої розташований β - тубулін дістала назву плюс-кінця, а α -тубулін – мінус кінця. Виділяють 4 фази росту мікротрубочок: фаза нуклеації, фаза полімеризації, фаза стабільного стану та деполімеризація (Fojo, 2008).

Слід зазначити, що протофіламенти можуть збиратись у мікротрубочки, що різняться кількістю протофіламентів і числом тубулінових мономерів на крок спіралі. Так, відомі організми, що мають неканонічні структури мікротрубочок, такі як суперспіралізовані 11-ти протофіламентні мікротрубочки *C. elegans*. Існують також передбачені моделі мікротрубочок, що можуть включати в себе від 10 до 17 протофіламентів. Такі моделі свідчать про припустимість певної

латеральної деформації у інтерпротофіламентних взаємодіях. Через це мікротрубочки отримують гнучкість та здатність до різких вигинів (Hashimoto, 2015).

α - і β -тубуліни – висококонсервативні білки, що демонструють близько 40% ідентичності. Кожний мономер формується з двох β -листів, оточених α -спіралями та С-термінального тубулінового хвоста. Останній не має жорсткої структури і піддається різноманітним пост-трансляційним модифікаціям. Кожна субодиниця тубуліну зв'язана з молекулою ГТФ. Так, тубуліновий димер має два ГТФ-зв'язуючі сайти: обмінний (Е-сайт) та необмінний (N-сайт). Е-сайт просторово доступний лише на поверхні деполімеризованого димеру і закритий місцем контакту димерів у полімеризованому стані (за виключенням термінального тубуліну на плюс-кінці мікротрубочки). Деполімеризовані тубулінові димери вільно обмінюються нуклеотидом з цитоплазматичним ГТФ, створюючи пул тубулінів, здатних до полімеризації. N-сайт розташовується всередині тубулінового димеру і закритий місцем контакту α - і β -тубуліну в димері. N-сайт містить негідролізований ГТФ і виконує структурну функцію. При елонгації гетеродимери тубуліну зв'язуються з плюс-кінцем мікротрубочки, забезпечуючи її ріст з плюс-кінця. α -тубулін вільного димеру взаємодіє з ГТФ Е-сайт термінального β -тубуліну мікротрубочки з гідролізом ГТФ на кшталт GAP-протеїнів (GTPase-accelerating proteins). Втрата термінального ГТФ-зв'язаного β -тубуліну призводить до розщеплення протофіламентів на плюс-кінці та швидкої деполімеризації мікротрубочки. Характерне розщеплення протофіламентів на кінці мікротрубочки, що деполімеризується вказує на те, що поздовжні зв'язки між тубуліновими димерами в складі протофіламенту сильніші за зв'язки між самими протофіламантами у складі мікротрубочки (Fojo, 2008; Hashimoto, 2015). Для росту мікротрубочки необхідна наявність вільних тубулінових димерів у оточуючому цитозолі у концентрації не менше 1 мкМ (Wieczorek et al., 2015).

Структура та форма плюс-кінця мікротрубочки з точки зору довжини протофіламентів може бути різною. Так, для арабідопсису відомо щонайменше

три типи плюс-кінця мікротрубочок. Мікротрубочки, що ростуть, постійно зазнаючи змін їх динамічного стану між полімеризацією та вкороченням, зазвичай мають конусоподібні плюс-кінці, у яких декілька латерально пов'язаних протофіламентів видаються вперед з однієї сторони мікротрубочки, формуючи листоподібну структуру. Мікротрубочки, що деполімеризуються мають плюс-кінець, що складається з роз'єднаних латерально протофіламентів, вигнутих кінцями назовні. Також зустрічаються мікротрубочки, що мають майже рівну довжину паралельно розташованих протофіламентів на плюс-кінці. Вважається, що такі «тупі» кінці зустрічаються у мікротрубочках, що знаходяться у статичному стані, наприклад, асоційовані з мембраною клітинної пластинки у ході цитокінезу (Hashimoto, 2015).

Через відставання гідролізу ГТФ відносно добудови нового тубуліну у структуру мікротрубочки, формується ГТФ-кеп з 9-18 молекул ГТФ-тубуліну, розмір якого залежить від швидкості гідролізу ГТФ. Кеп стабілізує структуру мікротрубочки і сприяє її подальшому росту, а втрата кепу призводить до деполімеризації мікротрубочки (Roostalu et al, 2020).

Нуклеація мікротрубочок відбувається декількома шляхами. Найбільш вивченою є нуклеація *de novo* на основі γ -тубулінового кільця. Основою такого шляху формування нових мікротрубочок є еволюційно консервативний білковий комплекс γ TuRC. Він складається мінімум з шести протеїнів: GCP2 (γ -tubulin complex protein 2), GCP3, GCP4, GCP5, GCP6 та NEDD1 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1) (Roostalu and Surrey, 2017). Функціональною основою цього комплексу є так званий комплекс γ TuSC, що включає у себе білки GCP2 та GCP3. Так, у *Saccharomyces cerevisiae* відсутні інші компоненти γ TuRC, окрім компонентів γ TuSC. γ TuSC включає у себе дві субодиниці γ -тубулінів та по одному білку GCP2 і GCP3. γ TuRC включає у себе декілька γ TuSC, а також білки GCP4, GCP5 і GCP6. GCP можуть асоціюватися з додатковими факторами, такими як Spc110 (Spindle pole body component 110) у дріжджів, та MZT1 (Mitotic-spindle organizing protein 1) і NEDD1 у ссавців (Tovey and Conduit, 2018). Хоча білки GCP групи мають два гомологічних мотиви

(GRIP1, GRIP2) у своїх послідовностях, ідентичність їх загальних послідовностей знаходиться на відносно низькому рівні (близько 15%), а маса варіюється від близько 70 до 210 кДа (Kollman et al., 2011).

γ TuRC формує стабільний конічний кеп, здатний специфічно зв'язуватись з мінус-кінцем мікротрубочки своїми γ -тубуліновими субодиницями. γ -тубуліни γ TuRC-комплексу формують спіральну структуру та здатні утворювати сильні поздовжні контакти з α -тубулінами тубулінових гетеродимерів, створюючи таким чином основу для формування мікротрубочки. Для створення стабільної основи для формування мікротрубочки необхідно щонайменш три γ -тубулінових субодиниці γ TuRC комплексу, що латерально зв'язані з гетеродимером α/β -тубуліну (Roostalu and Surrey, 2017). Мінімальна концентрація тубулінів для формування мікротрубочки на основі γ -тубулінового кільця – близько 6 μ M (Wieczorek et al., 2015). Активність та локалізація комплексу γ TuRC регулюються низкою факторів, таких як PCNT (Pericentrin), AKAP9 (A-kinase anchor protein 9), CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit-associated protein 2) (Tovey and Conduit, 2018).

Відомо про існування і інших шляхів формування мікротрубочок, у які не задіяні γ TuRC. Спонтанна нуклеація мікротрубочок можлива при концентрації тубулінів більше 20 мкМ. Також відомий механізм нуклеації нових мікротрубочок шляхом розгалуження вже існуючої мікротрубочки. Такий механізм застосовується, зокрема, при збільшенні числа мікротрубочок веретена поділу у тваринних клітинах і для правильної просторової організації цитоскелету рослинних клітин. У цьому процесі задіяні білок TPX2 (Targeting protein for XKLP2) і аугмін, що рекрутують γ TuRC до існуючої мікротрубочки і стимулюють формування відгалужених «бокових» мікротрубочок (Cunha-Ferreira et al., 2018; Alfaro-Aco et al., 2020).

Мінус-кінці мікротрубочок переважно заякорені у структурі центрів організації мікротрубочок, проте у деяких типах клітин (нейрони, клітини епітелію) зустрічаються мікротрубочки з вільними мінус-кінцями. Крім того, значна кількість мікротрубочок веретена поділу не має γ -тубулінового кепу на

мінус кінці (Kollman et al., 2011; Akhmanova and Steinmetz, 2019). Вільні мінус-кінці мікротрубочок регулюються низкою білків. Хроматин-асоційований білковий комплекс KANSL (KAT8 regulatory NSL complex), що складається з KANSL1, KANSL3 та MCRS1 (Microspherule protein 1), стабілізує мінус-кінець мікротрубочок кінетохорних волокон веретена поділу (Meunier et al., 2015). Родина кальмодулін-залежних білків CAMSAP (Calmodulin-regulated spectrin-associated protein) ссавців та Patronin *Drosophila melanogaster*, що мають гомологічний С-термінальний домен, бере участь у стабілізації мінус-кінця. CAMSAP1, CAMSAP2 та CAMSAP3 перешкоджають деполімеризації мінус-кінця мікротрубочки та негативно регулюють інтенсивність її полімеризації. Інший білок – ASPM (Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein), також негативно регулює полімеризацію мінус-кінця. Комплекс ASPM з KATNA1 (Katanin p60 ATPase-containing subunit A1) та KATNB1 (Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1) визначає архітектуру веретена поділу, регулюючи динамічні характеристики мінус-кінця мікротрубочки, а також стимулюючи їх галуження (Jiang et al., 2017). Інший регулятор - NUMA1 (Nuclear mitotic apparatus protein 1), має в своїй структурі домен асоціації з плюс- та мінус-кінцями мікротрубочки. У комплексі з динеїном/динактином є необхідним для правильної орієнтації мікротрубочок веретена поділу (Seldin et al., 2016).

Таким чином, на відміну від інших полімерів, мікротрубочки демонструють явище, яке дістало назву динамічної нестабільності мікротрубочок. Це явище характеризується переходом між станами повільного росту та швидкого вкорочення з обох кінців. Динамічна нестабільність характеризується такими параметрами, як значення росту та вкорочення, та частотою переходів між станами «катастрофи» і «спасіння» (швидкої деполімеризації та відновлення структури). Сам термін «динамічності» визначається як сума дистанцій всіх етапів росту та вкорочення, розділена на час. Інше явище, характерне для мікротрубочок – тредміллінг. Тредміллінг – це явище збірки на плюс-кінці мікротрубочки і деполімеризація її на мінус-кінці, що створює постійне перетікання тубулінових субодиниць від плюс- до мінус-кінця мікротрубочки.

Обидва ці явища потребують гідролізу ГТФ до ГДФ та неорганічного фосфату при приєднанні тубуліну (Fojo, 2008; Hashimoto, 2015).

Складність організації і функціонування мікротрубочок пояснюється специфікою і різноманіттям їх функцій у клітині. Плюс-кінець мікротрубочок часто зв'язані з певними клітинними структурами, що допомагає підтримувати форму клітини та правильне розташування органел. Мікротрубочки забезпечують внутрішньоклітинний транспорт везикул і органел за допомогою моторних білків, формують веретено поділу при мітозі і мейозі, а також формують аксонему джгутиків і війок (Fojo, 2008; Hashimoto, 2015).

1.1.1. Особливості структурної організації мікротрубочок у тварин і рослин

Більшість відмінностей між тубулінами різних ізотипів, а також тубулінами рослинного і тваринного походження полягає у послідовностях їх С-термінальних хвостів. Геном багатоклітинних еукаріотів включає в себе декілька генів тубулінів. Так, *Arabidopsis thaliana* має шість генів α -тубуліну та дев'ять β -тубуліну. Більшість мікротрубочок тваринних клітин складаються з різних ізотипів тубуліну. Рівень експресії різних ізотипів тубуліну є тканиноспецифічним. Відомо, що певні спеціалізовані клітини тварин мають мікротрубочки повністю побудовані з одного ізотипу α -тубуліну і одного ізотипу β -тубуліну (Hashimoto, 2015).

Відмінності організації і регуляції рослинних і тваринних мікротрубочок можна побачити на доволі високому рівні їх функціонування. Так відомо, що фаза стабільного стану, коли мікротрубочка не зазнає росту чи вкорочення, притаманна для мікротрубочок тварин (Rusan et al., 2001), проте рідко зустрічається при інтерфазі клітин *A. thaliana* (Shaw et al., 2003; Nakamura et al., 2004).

Різним чином організовані і центри організації мікротрубочок у тварин і рослин. У тварин функції центрів організації мікротрубочок виконують переважно центросоми. Центросома являє собою безмембранну структуру з пари

центріолей, оточених перицентриолярним матриксом. Перицентриолярний матрикс містить комплекси γ TuRC та білковий апарат, необхідний для його зв'язування, активації та регуляції процесів збірки мікротрубочок, зокрема СКАР5 (Cytoskeleton-associated protein 5). Також перицентриолярний матрикс містить фактори заякорювання мікротрубочок та інші структурні білки центріолей, такі як NEDD1, NIN (Ninein), PCNT, CEP152 (152 kDa centrosomal protein), CEP192 (192 kDa centrosomal protein) (Woodruff et al., 2017; Goldspink et al., 2017). Окрім центросом, що найбільш вивчені, функцію центрів організації мікротрубочок можуть виконувати мембрани деяких органел, перинуклеарний простір та клітинний кортекс (Wu et al., 2016; Nashchekin et al., 2016; Chen et al., 2017; Wang et al., 2015; Januschke et al., 2006; Bugnard et al., 2005). Так, центри організації мікротрубочок на мембранах комплексу Гольджі включають в себе білки родин CLASP (CLIP-associating protein) та EB (EB1 та EB3), необхідні для нуклеації і заякорювання мікротрубочок. Відомий механізм нуклеації мікротрубочок на мембранах комплексу Гольджі за участі γ TuRC у комплексі з АКАР9, CDK5RAP2 та PDE4DIP (Myomegalin), а стабілізація і заякорювання мінус-кінця за допомогою білкового комплексу САМСаР2-АКАР9- PDE4DIP (Wu et al., 2016).

Рослини не мають центріолей, а нуклеація мікротрубочок може відбуватись на мембранах ядра та ендоплазматичного ретикулуму, або в цитоплазмі. Основним механізмом створення нових мікротрубочок у квіткових рослин вважається нуклеація шляхом бічного галуження дочірніх мікротрубочок на основі материнської (Nakamura et al., 2010). У клітинах тварин та дріжджів мінус-кінець мікротрубочок зазвичай асоційований і стабілізований комплексами нуклеації, зазвичай, центросомами і полярними тільцями веретена поділу, проте у високодиференційованих клітинах може бути велика кількість мікротрубочок з вільним мінус-кінцем (Dammermann et al., 2003). Для рослинних клітин, наявність мікротрубочок з вільним мінус-кінцем, що повільно деполімеризується, є характерним явищем. У рослинних клітинах, зокрема у *A. thaliana*, експресується білок TOR1 (SPR2, Microtubule-associated protein

TORTIFOLIA1), що не пов'язаний структурно з білками родини CAMSAP, проте виконує аналогічну функцію стабілізації та сповільнення деполімеризації мінус-кінця мікротрубочки (Fan et al., 2018; Nakamura et al., 2018).

На відміну від тварин, клітини рослин оточені клітинною стінкою і зазвичай містять великі вакуолі, що займають більшу частину об'єму клітини. Цитоплазма у таких клітинах зазвичай обмежена у об'ємі і займає області переважно навколо ядра та у клітинному кортексі, що пов'язані тяжами цитоплазми, а також цитоплазматичних каналах, що поєднують сусідні рослинні клітини. Такі особливості структури рослинних клітин обумовлюють певні відмінності у організації мікротрубочок рослин. Для багатьох клітин характерна наявність рідких, розсіяних перинуклеарних мікротрубочок, що радіально розходяться від ядра. Оскільки рослинні клітини не містять центросом, центрів організації мікротрубочок асоційованих з ядром у тваринних клітинах, нуклеація мікротрубочок відбувається децентралізовано на ядерній мембрані та у клітинному кортексі (Rasmussen et al., 2013). Впродовж інтерфази, мікротрубочки рослин знаходяться переважно у кортикальній цитоплазмі. У клітинах, що не ростуть вони мають нерегулярну поздовжню або косу орієнтацію. Проте, під час активного росту клітини їх орієнтація набуває більшої структурованості. Більшість рослинних клітин розширюються шляхом дифузного росту, що забезпечується тургорним тиском, проте він відбувається, переважно, вздовж однієї осі. При рості клітини, кортикальні мікротрубочки є критичними для правильного визначення полярності клітини. Кортикальні мікротрубочки і таких клітинах фактично приймають поперечну по відношенню до осі орієнтацію. У різних типах рослинних клітин вони приймають орієнтацію, паралельну целюлозним мікрофібрилам клітинної стінки. Порушення правильної орієнтації чи деполімеризація мікротрубочок веде до порушення структури розташування целюлозних мікрофібрил і деполіаризованого розширення клітини (Oda, 2015).

Відмінності у організації мікротрубочкового цитоскелету між рослинами і тваринами спостерігаються і під час мітозу. У претрофази мітозу кортикальні

мікротрубочки у більшості рослинних клітин конденсуються у препрофазне кільце навколо ядра, що визначає площину поділу клітини. Формування препрофазного кільця супроводжується різким збільшенням щільності перинуклеарних мікротрубочок, що згодом реорганізуються у веретено поділу. Препрофазне кільце вважається аналогом центросом, що виражається у їх функціях та гомології білків, необхідних для формування цих структур (Rasmussen et al., 2013). Оскільки тваринні клітини мають центріолі у складі центросом, веретено поділу має області на полюсах клітини у яких сходяться мікротрубочки. Також, навколо полюсів формуються цитастери, сформовані мікротрубочками, що радіально виходять з центросом, але не входять у склад веретена. Такий тип мітотичного веретена дістав назву астрального і характерний для більшості клітин тварин. Для рослин характерний анастральний тип мітотичного веретена, при якому на полюсах клітини формуються полярні шапочки, збагачені γ -тубулінами, а мікротрубочки веретена поділу розходяться по всій ширині цих структур. Анастральне мітотичне веретено найбільш характерне для вищих рослин. (Brown and Lemmon, 2011).

Після анафази веретено поділу розпадається, і на місці фрагмосоми формується фрагмопласт. Фрагмопласт також є специфічною для рослинних клітин (клітин вищих рослин і деяких водоростей) цитоскелетною структурою, що являє собою систему мікротрубочок, мікрофіламентів ендоплазматичної сітки. Фрагмопласт розташовується перпендикулярно осі поділу і у ньому формується пектинова клітинна стінка, що ділить материнську клітину навпіл. Спочатку фрагмопласт розташовується у центрі клітини, що ділиться, і має форму невеликого циліндру. Його основні компоненти – два протилежних масиви паралельних мікротрубочок, що розташовуються вздовж осі циліндру та перекриваються у центральній площині, де і починається формування клітинної пластинки. Вважається, що по цим мікротрубочкам за допомогою кінезин-подібних білків відбувається транспорт секреторних везикул комплексу Гольджі до ростучої клітинної стінки. По мірі росту клітинної стінки фрагмопласт набуває тороїдної форми, мікротрубочки зміщуються до периферії клітини до

повного злиття нової клітинної стінки з клітинною мембраною (Yi and Goshima, 2018; Kost and Chua, 2002).

1.1.2. Посттрансляційні модифікації білків мікротрубочок та їх вплив на регуляцію функціональних процесів в клітині

α -, β - і γ -тубуліни як головні білки мікротрубочок, що відіграють визначальну роль у поділі клітин та залучені до росту і розвитку клітин та внутрішньоклітинного транспорту, є важливими субстратами посттрансляційних модифікацій (Wloga and Gaertig, 2010; Fourest-Lieuvain et al., 2006).

Мікротрубочки піддаються ацетилюванню α -тубулінів по залишку Lys40 (L'Hernault and Rosenbaum, 1985). Ацетилювання Lys40 у тварин відбувається за допомогою ацетилтрансферази MEC-17 (Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1), проте, існують і інші білки, здатні здійснювати цю модифікацію. Колокалізацію з ацетильованими мікротрубочками демонструють ацетилтрансферази NAT1 (N-acetyltransferase 1), NAT10, ELP3 (Elongator complex protein 3). У деацетилюванні приймають участь деацетилази HDAC6 (Histone deacetylase 6) та SIRT2 (NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2). Припускається, що через HDAC6 ця модифікація пов'язана з убіхітинуванням α -тубуліну з його подальшою деградацією. У ссавців процеси ацетилювання та деацетилювання тубулінів важливі для регуляції збірки і розбірки війок. Ацетилювання позитивно регулює зв'язування з мікротрубочками моторних білків, зокрема кінезину-1 (Wloga and Gaertig, 2010). Ацетилюванню також піддається залишок Lys252 β -тубуліну, що перешкоджає його включенню у склад мікротрубочки (Chu et al., 2011).

Детирозинування тубуліну є відщепленням С-кінцевого тирозину α -тубуліну мікротрубочки за допомогою специфічної карбоксипептидази AGTRBP1 (CCP1, NNA1, Cytosolic carboxypeptidase 1). Процес є зворотнім, залишок тирозину може бути знову доданий до α -тубуліну за допомогою тирозин

лігази TTL (tubulin tyrosin ligase). Детирозинований тубулін може піддаватися іншій, вже незворотній, модифікації – відщепленню С-термінального залишку глютамінової кислоти. Детирозинування пов'язують з процесами регуляції динаміки мікротрубочок. Детирозинування α -тубуліну на мінус-кінці мікротрубочки перешкоджає її деполімеризації, опосередкованій кінезином-13. Поряд з цим, така модифікація на плюс-кінці мікротрубочок перешкоджає зв'язуванню з ним білків CLIP1 (CLIP170, CAP-Gly domain-containing linker protein 1), CLIP2 (CLIP115, CAP-Gly domain-containing linker protein 2) та DCTN1 (p150Glued, Dynactin subunit 1), які необхідні для росту мікротрубочки і транспорту везикул (Janke and Bulinski, 2011). Як і у випадку з ацетилюванням, детирозинування позитивно регулює зв'язування кінезинів з мікротрубочками. Відомо, що для мікротрубочок з більшою часткою детирозинованих α -тубулінів характерна нижча швидкість руху по ним кінезину-1 (Dunn et al., 2008).

Тубуліни також піддаються таким посттрансляційним модифікаціям, як глютамінування і гліцилювання. Це пов'язані модифікації, що являють собою приєднання до С-термінального хвоста α - і β -тубуліну бічних ланцюгів з залишків глютамінової кислоти або гліцину (Kann et al., 2003). У реалізації цього типу модифікацій тубуліну беруть участь білки родини тубулін поліглютамілаз TTLL (Tubulin--tyrosine ligase-like proteins). Припускається, що глютамінування і гліцилювання необхідні для розпізнавання стадії розвитку мікротрубочкових органел, таких як базальні тільця. Глютамінування важливе для правильної збірки і рухливості війок. Глютамінування пов'язане з позитивною регуляцією стабільності мікротрубочок через регуляцію зв'язування з ними деяких білків, асоційованих з мікротрубочками, таких як MAP2 (Microtubule-associated protein 2) і MAPT (Microtubule-associated protein tau). З іншого боку, ця модифікація пов'язана з рекрутуванням катаніну (KATN) і спастіну (SPAST), що призводить до розрізання мікротрубочки. Відомо, що гліцилювання і глютамінування починається з модифікації залишків глютамінової коислоти у складі С-термінального хвоста тубулінів і є конкурентним. Вважається, що гліцилювання необхідне для негативної регуляції глютамінування тубулінів. Полімодифікації є

зворотніми. Так, відома участь карбоксипептидази CCP5 (Cytosolic carboxypeptidase-like protein 5) у деглутамінуванні (Wloga and Gaertig, 2010; Janke and Bulinski, 2011).

Нітровані тирозини у складі молекул тубулінів чітко локалізуються у масивах мікротрубочок препрофазного кільця, веретена поділу і фрагмопласті. Крім того, ця модифікація пов'язана з регуляцією морфології і організації мікротрубочок клітин коренів, а також впливає на взаємодію α -тубулінів з кінезином-8. Нітрування залишків тирозину С-кінця зокрема пов'язане з процесами апоптозу. Ця модифікація стимулює деполімеризацію мікротрубочок, імовірно шляхом інгібування тубулін-тирозинкарбоксипептидази, перешкоджаючи глутамінуванню мікротрубочок. Припускається, що через нітрування тирозинів відбувається регуляція орієнтації кортикальних мікротрубочок при реалізації сигнального каскаду оксиду азоту (Blume et al., 2013).

Фосфорилування тубулінів пов'язане з процесами реорганізації тубулінового цитоскелету у процесі мітозу та регуляцією взаємодії мікротрубочок з клітинними структурами, зокрема плазматичною мембраною. Фосфорилування залишків серину/треоніну та тирозину відбувається у численних сайтах по всій довжині молекул тубулінів, результатом чого може бути свідченням участі цієї модифікації у регуляції тубулін-тубулінових взаємодій та взаємодій тубулінів з іншими цитоскеленими білками та структурами клітини. Існують численні свідчення, що вказують на участь циклін-залежних, кальцій- та кальцій-/кальмодулін-залежних серин/треонінових протеїнкіназ, фосфоліпід-стимульованих кальцій-залежних протеїнкіназ (PKC, Protein kinase C), тирозинових та казеїнкіназ у фосфорилуванні структурних білків мікротрубочок (Sheremet et al., 2012). Активність казеїнкінази 2 пов'язана з фосфорилуванням залишків Ser444 та Ser446 β -тубуліну. Також, цій модифікації можуть піддаватись Tyr437 і Ser259. Ізоформи β -тубуліну, що піддаються фосфорилуванню по цим залишкам, демонструють меншу спорідненість до MAP-білків, і, зокрема, інгібують опосередковану MAP2 збірку

мікротрубочок. Рідкісною модифікацією є фосфорилювання β -тубуліну по Ser441 (MacRae, 1997; Redeker, 2010).

Циклін-залежні протеїнкінази тісно пов'язані з регуляцією тубулінового цитоскелету під час мітозу. CDKB2 (Cyclin-dependent kinase B2) з *Oryza sativa* протягом метафази асоціюється з веретеном поділу та пов'язана з процесом вирівнювання хромосом, а у телофазі концентруються у фрагмопласті. Циклін-залежна протеїнкіназа Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1), окрім ядра і мітотичних хромосом, асоціюється з препрофазним кільцем, веретеном поділу та фрагмопластом, а також з кортикальними мікротрубочками вищих рослин. Кіназа Cdk1 контролює розвиток і дестабілізацію препрофазного кільця, а також регулює поведінку інших мітотичних структур, імовірно, через регуляцію функціонального стану MAP та моторних білків та фосфорилювання тубулінів (Sheremet et al., 2012). Більшість посттрансляційних модифікацій тубуліну відбувається після його полімеризації у мікротрубочки. Проте протеїнкіназа Cdk1 здатна фосфорилювати залишок Ser172 вільної молекули β -тубуліну. Ця модифікація перешкоджає утворенню тубулінового димеру (Fourest-Lieuvain et al., 2006).

Фосфорилюванню піддаються і інші амінокислотні залишки молекул γ -тубулінів. Зокрема, це необхідно для регуляції γ -тубулінів протеїнкіназами BRSK (Brain-specific serine/threonine-protein kinase) при проходженні S-фази мітозу. Серин/треонінова протеїнкіназа BRSK1 (SAD-B) фосфорилює γ -тубуліни по залишку Ser131, що імовірно, необхідно для регуляції дуплікації центросом. Ця модифікація посилює полімеризацію γ -тубулінів при формуванні центріолей (Alvarado-Kristensson et al., 2009). Також ця модифікація, імовірно, перешкоджає нуаклеації астральних мікротрубочок в центросомах. BRSK1 також фосфорилює γ -тубулін по Ser385. Ця модифікація призводить до звільнення γ -тубуліну від GCP2, GCP3 і мікротрубочок та накопичення його у ядрі в ході S фази мітозу (Eklund et al., 2014). У процесі фосфорилювання рослинних β -тубулінів залучені серин/треонінові протеїнкінази Nek4 (NimA-related protein kinase 4), Nek5, Nek6 та SKL6 (Casein kinase 1-like protein 6) (Motose et al., 2011; Ben-Nissan et al., 2008;

Lee, 2009). Особливістю рослинної регуляції цитоскелету є фосфорилування залишку Thr349 молекули α -тубуліну (Van et al., 2013). Так, наприклад, у *A.thaliana* цей залишок фосфорилується протеїнофосфатазою PHS1 (Propyzamide-hypersensitive 1) під час осмотичного стресу, що стимулює деполімеризацію мікротрубочок (Fujita et al., 2013).

1.2. Функціональна роль Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїніназ, їх класифікація та роль у регуляції цитоскелету

1.2.1. Огляд кальцій- та кальмодулін- залежних протеїніназ різного еволюційного походження

Кальцій, як важливий вторинний посередник, регулює численні клітинні процеси, такі як транскрипція генів, апоптоз, екзоцитоз, збудливість та інші (Clapham, 2007). Передача кальцієвого сигналу зазвичай відбувається завдяки молекулярним структурам, що дістали назву «EF-hands», або EF-мотиви, які здатні зв'язувати іони кальцію.

У клітинах тварин, основним кальцієвими сенсорами є кальмодуліни. Кальмодулін являє собою білок, що складається з двох частин, з'єднаних гнучкою α -спіральною лінкерною областю. Кожна з двох частин має по два EF-мотиви, кожен з яких здатний зв'язувати один іон кальцію. С-кінцева частина кальмодуліну здатна зв'язувати кальцій з афінністю у шість раз більшою, ніж N-кінцева, що імовірно, дозволяє регулювати активність білку при різних концентраціях внутрішньоклітинного кальцію. Гідрофобні ділянки на внутрішній стороні частин кальмодуліну здатні розпізнавати специфічні мотиви білків-мішеней і, таким чином, полегшувати зв'язування з ними. Зв'язування з іншими білками часто призводить до конформаційних змін кальмодуліну, у результаті яких він «обгортає» кальмодулін-зв'язуючі домени білків-мішеней (Jensen, 2018; Swulius and Waxham, 2008). Так кальмодуліни передають кальцієвий сигнал білкам наступної ланки сигнального каскаду, зокрема

кальмодулін-залежним протеїнкіназам, що беруть участь у регуляції цитоскелету.

Кальмодулін-залежні протеїнкінази людини – численна група філогенетично споріднених протеїнкіназ. Значна частина цих протеїнкіназ бере участь у регуляції цитоскелету: CaMK2 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II), MLCK (Myosin light chain kinase), AMPK (5'-AMP-activated protein kinase), BRSK, CHEK (Checkpoint kinase 2), DAPK (Death-associated protein kinase 1), LKB1 (STK11 serine/threonine kinase 11), MARK (MAP/microtubule affinity-regulating kinase), PKD (PRKD, Serine/threonine-protein kinase D), RSK (RPS6KA, Ribosomal protein S6 kinase alpha), DCLK1 (Doublecortin-like kinase 1), TRIO (Triple functional domain protein), KALRN (Kalirin) та TTN (Titin) (Novozhylov et al., 2017).

У рослин кальцієвими сенсорами можуть виступати як кальмодуліни, так і безпосередньо протеїнкінази, що мають власні структури для зв'язування кальцію. Існує принаймні п'ять класів Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, об'єднаних у суперродину CDPK-SnRK, для молекулярної структури яких характерна наявність доменів здатних зв'язувати іони Ca^{2+} або утворювати комплекси з кальмодуліном. Загалом суперродина протеїнкіназ CDPK-SnRK об'єднує сім типів серин/треонінових протеїнкіназ: Ca^{2+} -залежні протеїнкінази (CDPK, Calcium-dependent protein kinase), CDPK-споріднені кінази (CRK, CDPK-related kinase), фосфоенолпіруват-карбоксилазні кінази (PPCK, Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase), ФЕП-карбоксилаза-залежні кінази (PEPRK, PEP carboxylase kinase-related kinase), кальмодулін-залежні протеїнкінази (CaMK, calmodulin-dependent protein kinase), Ca^{2+} -кальмодулін-залежні протеїнкінази (CCaMK, calcium and calmodulin-dependent protein kinase), а також SNF1-подібні протеїнкінази (SnRK, SNF-related serine/threonine-protein kinase) (Hrabak et al., 2003).

Слід зазначити, що на сьогоднішній день до протеїнкіназ рослин, що сприймають кальцієвий сигнал опосередковано через кальмодулін, відносять CRK, CRCK (calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinases) та кінази групи

LRR-рецепторів: CAMRLK (Calmodulin-binding receptor kinase CaMRLK), SERK (Somatic embryogenesis receptor kinase 1), PSKR (Phytosulfokine receptor 1), BRI1 (Brassinosteroid insensitive 1) та CLV1 (Receptor protein kinase CLAVATA1) (Karpov et al., 2019).

Всі протеїнкінази групи CDPK мають подібну доменну архітектуру. В її склад входить каталітичний домен, автоінгібіторний та кальмодулін-подібний домени. У *A. thaliana* відповідні домени мають приблизно однакові розміри у всіх протеїнкіназ групи, окрім CPK25. Амінокислотна послідовність С-кінцевого кальцій-зв'язуючого домену подібна до послідовності кальмодуліну та аналогічно містить чотири EF-мотиви (Hrabak et al., 2003). Окрім рослин CDPK були знайдені у деяких найпростіших, серед яких парамеції та *Plasmodium falciparum* (Bansal et al., 2018). Більшість CDPK мають сайт міристилювання на N-термінальній ділянці. Сусідній до нього Cys також може служити сайтом для пальмітилювання (Hrabak et al., 2003). Активність CDPK підтримується на низькому рівні завдяки автоінгібіторному домену, що знаходиться між каталітичним та кальмодулін-подібним доменами. Ця частина пептидної послідовності пригнічує активність кінази, виступаючи для неї псевдосубстратом. Аналогічний механізм мають CaMK тварин. У випадку з CaMK зв'язаний з кальцієм кальмодулін взаємодіє з автоінгібіторною послідовністю CaMK, внаслідок чого відбувається звільнення від неї каталітичного сайту. Оскільки CDPK мають і кіназний, і кальмодулін-подібний домени у складі одного поліпептиду, вони безпосередньо зв'язують іони кальцію, кальмодулін-подібний і автоінгібіторний домен зазнають конформаційних змін, які призводять до звільнення каталітичного центру кіназного домену. Таким чином, протеїнкінази CDPK проявляють стимульовану Ca^{2+} кіназну активність без допомоги кальмодулінів (Harper and Harmon, 2005).

Результати філогенетичного аналізу свідчать про те, що протеїнкінази CDPK імовірно з'явилися шляхом злиття генів CaMK та кальмодуліну, полегшеного рекомбінацією в інтронах попередників протеїнкіназ CDPK (Valmonte et al., 2014).

Протеїнкінази ССаМК є менш розповсюдженою групою кальцій-залежних протеїнкіназ, ніж СДПК та є активними лише в деяких типах тканин. Вони також мають каталітичний, автоінгібіторний та кальцій-зв'язуючий домен, проте останній містить три EF-мотиви та має подібність до візініну. Автоінгібіторний домен містить сайт зв'язування кальмодуліну, що стимулює активність цього типу кіназ (Harper and Harmon, 2005). Протеїнкінази цієї групи нехарактерні для *A. thaliana*, проте виявлені у *Lilium longiflorum*, *Nicotiana tabacum* та *Lotus japonicus* (Sathyanarayanan and Poovaiah, 2002; Shimoda et al., 2012; Takeda et al., 2012). СаМК протеїнкінази рослин за своїми амінокислотними послідовностями більшою мірою схожі на рослинні протеїнкінази ССаМК, аніж на протеїнкінази СаМК тварин. Вони мають ідентичний кальмодулін-зв'язуючий мотив у складі автоінгібіторного домену, проте не мають С-термінального домену з EF-петлями (Harmon et al., 2000).

Четвертий клас – CRK-кінази. Вони містять у своїй послідовності каталітичний домен, подібний до такого у протеїнкіназ СДПК, проте амінокислотна послідовність С-кінцевого домену має доволі низьку подібність до кальмодуліну (ідентичність 20%). EF-мотиви С-термінального домену дегенерували і їх послідовності характеризуються низькою консервативністю. CRK є нечутливими до кальцію (Harper and Harmon, 2005). У літературі протеїнкінази CRK і СаМК часто об'єднують в одну групу, виходячи з їх функціональної подібності (відсутності у них структур, здатних безпосередньо зв'язувати кальцій, проте високій спорідненості до СДПК).

З наведених чотирьох груп кальцій- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ рослин, на даний час найбільш повно охарактеризовані протеїнкінази СДПК у *A. thaliana*. Кіназний домен протеїнкіназ СДПК *A. thaliana* має розмір 264-273 амінокислот і містить всі 12 висококонсервативних субдоменів типових для еукаріотичної серін-треонінової протеїнкінази. При цьому активний сайт всіх протеїнкіназ СДПК арабідопсису демонструє майже стовідсоткову ідентичність (Cheng et al., 2002).

Попри значну гомологію, *in vivo* протеїнкінази CDPK проявляють відмінності у субстратній специфічності. Існують різні специфічні мотиви білків-субстратів, що виступають сайтами фосфорилування для тих чи інших кальцій-залежних протеїнкіназ. Протеїнкінази CDPK демонструють наявність кількох різних мотивів фосфорилування. За допомогою цих мотивів було виявлено низку субстратів, що фосфорилуються різними CDPK-кіназами, зокрема аквапорин PM28A плазматичної мембрани *Spinacia oleracea*. Слід зазначити, що один з двох відомих мотивів фосфорилування у *Spinacia oleracea* є спільним для CDPK (PKI, PKII) та SnRK1 (PKIII), а інший - розпізнається тільки CDPK-кіназами (Huang et al., 2001). Таким чином, протеїнкінази CDPK мають і специфічні, і спільні з іншими класами кіназ сайти фосфорилування.

Кальмодулін-подібний домен має розмір 94 - 147 амінокислот та містить чотири Ca^{2+} -зв'язуючі EF мотиви. Кожен з EF-мотивів містить петлю, довжиною в 13 амінокислотних залишків, фланковану двома α -спіралями. Саме ця петля в EF-мотиві зв'язує Ca^{2+} . Хоча для більшості CDPK характерна структура з чотирьма EF-мотивами, існують ізоформи з меншою їх кількістю, що містять від одного до трьох функціональних EF-мотивів. Відомо, що EF-мотиви в позиціях 1 та 2 більш консервативні, ніж EF-мотив в позиції 4. Ці відмінності у кількості та розташуванні EF-мотивів пов'язують з особливостями відповіді різних протеїнкіназ CDPK на Ca^{2+} (Cheng et al., 2002).

N-кінцева ділянка CDPK відрізняється не тільки за амінокислотою послідовністю, але також і за довжиною (від 25 до 200 амінокислот у протеїнкіназ CDPK арабідопсису). Припускається, що цей домен містить інформацію про клітинну локалізацію (Yip Delormel and Boudsocq, 2019). Жодна з відомих протеїнкіназ CDPK арабідопсису не має структури інтегрованого в мембрану білку. Проте відомо, що багато протеїнкіназ CDPK асоційовані з клітинними мембранами (Lu and Hrabak, 2002). Попри варіабельність N-термінальної послідовності, у більшості випадків консервативним є залишок гліцину у другій позиції. Вважається, що він є необхідним для ковалентного

приєднання міристинової кислоти, яка приймає участь зокрема у процесах білок-мембранних взаємодій (Cheng et al., 2002).

Для багатьох протеїнкіназ CDPK визначена їхня клітинна локалізація, як цитозольна, так і мембранна. Однак, структурна основа для асоціації протеїнкіназ CDPK з мембранами невідома, оскільки вони не мають жодного відомого домена мембранної локалізації. Проте можливо, що мірістолювання, яке, як відомо, може впливати на мембранну локалізацію кількох білків, може бути основою для мембранної асоціації певних протеїнкіназ CDPK. Відомо 24 CDPK арабідопсису, що мають сайт мірістилювання на N-термінальному кінці (Cheng et al., 2002). Експериментально доведена можливість мірістоляції деяких CDPK (Boudsocq and Sheen, 2013; Saito et al., 2018; Martín and Busconi, 2000; Raíces et al., 2001; Lu and Hrabak, 2002). Так, відомо, що протеїнкіназа CPK2 з *A. thaliana* може бути мірістильованою по N-термінальному залишку гліцину. При цьому важливими для локалізації у мембрані саме ендоплазматичного ретикулуму є перші 10 амінокислот N-термінальної ділянки кінази (Lu and Hrabak, 2002). Оскільки активність CDPK знайдена і в мембранах, і в цитозолі, існує припущення, що асоціація протеїнкіназ CDPK з мембранами може регулюватись кальцій-залежними процесами мірістилювання, за принципами подібними до рековерину (Harmon et al., 2000). Мутація в N-термінальному залишку гліцину унеможливорює приєднання міристинової кислоти та асоціації з мембраною (Martín and Busconi, 2000). CDPK-кінази, що мають послідовності для мірістилювання, зазвичай також мають потенційні сайти для пальмітилювання (Yip Delormel and Boudsocq, 2019).

Активність протеїнкіназ CDPK підтримується на низькому рівні завдяки автоінгібіторному домену. Ця частина пептидної послідовності пригнічує активність кінази дикого типу та мутантів з конститутивною активністю, що виступає псевдосубстратом для кінази, аналогічно із механізмом роботи, характерним для тваринних протеїнкіназ CaMK. У випадку з CaMK-кіназами зв'язування кальцію з кальмодуліном призводить до взаємодії кальмодуліна та автоінгібіторної послідовності протеїнкіназ CaMK. Як наслідок, відбувається

звільнення кіназного домену від дії інгібуючої послідовності. CDPK-кінази здатні безпосередньо зв'язувати кальцій за допомогою кальмодулін-подібного домену. Активність протеїнкіназ CDPK з видаленим кальцій-зв'язуючим доменом може частково стимулюватись кальмодуліном або ізольованим кальмодулін-подібним доменом (Harmon et al., 2000).

Найбільш вірогідна причина великої кількості рослинних протеїнкіназ CDPK - залежність різних ізоформ від відповіді на зв'язування кальцію та активації кінази. Так, відомо, що ізоформи протеїнкіназ CDPK сої демонструють чутливість до різних рівнів концентрації кальцію. CPK1 з *Plasmodium falciparum*, в свою чергу, потребує концентрації кальцію на порядок вищі, ніж такі для CDPK сої (Harmon et al., 2000). Деякі протеїнкінази CDPK мають дефектні один чи кілька EF-мотивів, що може впливати на їх кальцій-зв'язуючі властивості (Boudsocq et al., 2012). Дослідження протеїнкіназ CPK1 з *P. falciparum*, що мала інактивовані EF-мотиви, мутантні по консервативному залишку глутамінової кислоти показало, що для стимуляції білку достатньо лише першого EF-мотиву. Точніше - чим ближче EF-мотив до автоінгібіторного домену, тим більший його вплив на активність кінази (Zhao et al., 1994).

Інша особливість регуляції протеїнкіназ CDPK - тип та наявність субстрату може впливати на їх чутливість до кальцію. При наявності субстрату чутливість до кальцію зростає у десять і більше разів. Відмінності у чутливості до кальцію можуть означати, що кожна ізоформа CDPK відповідає на специфічний набір кальцієвих сигналів, що відрізняються частотою осциляцій, величиною та тривалістю. Протеїнкінази CDPK можуть зв'язувати і іони кальцію, і зв'язуватись з Ca^{2+} -кальмодуліном. Це доведено, зокрема, на ізольованих автоінгібіторних доменах протеїнкінази CDPK α з *Glycine max* та CPK1 з *A. thaliana*. Але кальмодулінова стимуляція цих білків досить невисока. Оскільки кальмодулін-зв'язуюча послідовність цих CDPK інтрамолекулярно взаємодіє з кальмодулін-подібним доменом білку, вважається, що вона не здатна зв'язувати кальмодулін (Harmon et al., 2000; Yip Delormel and Boudsocq, 2019) Відомо, що активність протеїнкіназ CDPK також може стимулюватись фосфоліпідами,

такими як фосфотидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидилінозитол та фосфатидна кислота (Harmon et al., 2000; Klimecka et al., 2011; Dixit and Jayabaskaran, 2012).

Багато CDPK-кіназ містять потенційний сайт автофосфорилування у автоінгібіторному домені. Проте однозначних даних про роль фосфорилування немає. Так, було показано, що фосфорилування протеїнкінази CDPK α *Glycine max* та CDPK з шпинату не впливає на їх активність. Водночас, автофосфорилування CDPK з крилатих бобів (*Psophocarpus tetragonolobus*) має інгібуючу дію на неї (Harmon et al., 2000). Автофосфорилування CDPK β сої по залишку Tyr24 послаблює її активність, водночас автофосфорилування по залишкам Ser і Thr – посилює (Oh et al., 2012). Автофосфорилування CDPK1 з *N. tabacum* по Ser6 та Thr21 може впливати на субстратну специфічність протеїнкіназ CDPK (Ito et al., 2017).

Певні протеїнкінази CDPK можуть зв'язуватись з 14-3-3 білками. Така взаємодія показна для протеїнкіназ CPK3, CPK6, CPK21 та CPK23 з *A. thaliana*. При цьому показана кальцій-незалежна позитивна регуляція активності протеїнкіназ CPK1, CPK21 та CPK23 (van Kleeff et al., 2018). Для протеїнкіназ CPK1, CPK3, CPK6, CPK8, CPK24 та CPK28 показана можливість фосфорилувати 14-3-3 білки. Амінокислотні послідовності протеїнкіназ CPK1, CPK24 і CPK28 містять в своєму складі фрагменти, що відповідають канонічному мотиву зв'язування для 14-3-3 білків (Swatek et al., 2014).

1.2.2. Роль Ca²⁺- та Ca²⁺/кальмодулін-залежних протеїнкіназ у клітинах тварин і рослин

Ca²⁺- та Ca²⁺/кальмодулін-залежні протеїнкінази клітинах тварин і рослин пов'язані з численними клітинними процесами. У ході роботи були використані амінокислотні послідовності тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ, що беруть участь у регуляції цитоскелету (CaMK2, MLCK, AMPK, BRSK, CHEK, DAPK, LKB1, MARK, PKD, RSK, DCLK1, TRIO, калірін та тітін), а також

послідовності рослинних протеїнкіназ CDPK. У даній частині будуть розглянуті їх загальні функції. Літературні відомості про їх вплив на регуляцію структури та динаміки саме мікротрубочок буде розглянутий у частині 1.2.3.

CaMK2 в першу чергу пов'язують з регуляцією синаптичної пластичності, вивільнення нейромедіаторів та довготривалої потенціації, CaMK2 регулює розвиток дендритного шипику, фосфорилує та активує транскрипційний фактор FOXO3 (Forkhead box protein O3), регулює зв'язаний з саркоплазматичним ретикулумом Ca^{2+} транспорт, фосфорилуючи TRDN (Triadin) та PLN (Cardiac phospholamban), бере активну участь у регуляції актинового цитоскелету та фосфорилує і регулює TRPV1 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), що пов'язаний з детекцією та передачею зовнішніх теплових та хімічних стимулів (Stephenson et al., 2017; Kury et al., 2017; Tao et al., 2013; Rose et al., 2006; Hoffman et al., 2013; Borbiev et al., 2001; Fink et al., 2003; Fink and Meyer, 2002; Waggener et al., 2013; Zhao et al., 2012; Jung et al., 2004). Протеїнкінази CaMK2 можуть безпосередньо зв'язуватись з актином, та регулювати динаміку та структуру актинового цитоскелету шляхом фосфорилування чи зв'язування ряду білків, таких як активатори і супресори кофіліну (регулятора деполімеризації актину) (Zhao et al., 2012). Функції CaMK2 значно відрізняються, в залежності від ізоформи. Так, протеїнкіназа CaMK2 β мишей може безпосередньо зв'язуватись з F-актином та рекрутує до нього CaMK2 α (Shen et al., 1998). CaMK2 та кальцинейрин формують систему регуляції активності кофіліну, у якій CaMK2 пригнічує активність активатора кофіліну SSH1L (Protein phosphatase Slingshot homolog 1) та регулює його локалізацію. CaMK2 зв'язує SSH1L у комплексі з 14-3-3 білками, фосфорилує його по залишкам Ser-937 та Ser-978. CaMK2 фосфорилує по Thr-508 супресор кофіліну LIMK1 (LIM domain kinase 1), активуючи його (Zhao et al., 2012). CaMK2 мишей зв'язуються з α -актиніном (Robison et al., 2005). Ізоформа δ асоціюється та регулює актиновий і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів мишей (Easley et al., 2006).

Протеїнкінази MLCK (MYLK) відомі, в першу чергу, як кінази, що фосфорилують малий ланцюг міозину (MLC, Myosin light chain) по Ser19 та Thr18, що і дало їм назву. Це фосфорилування необхідне для взаємодії міозина з актином під час скорочення м'язів (Getz et al., 2010; Kamm and Stull, 2001). Проте, протеїнкінази цієї групи мають ряд функцій, не пов'язаних з міозином. MLCK регулюють формування стресових волокон у нем'язових клітинах (Кіо et al., 2013). MLCK беруть участь у регуляції актинового цитоскелету як безпосередньо зв'язуючись з ним, так і опосередковано, зв'язуючись з регулятором актинового цитоскелету кортактином (CTTN) (Smith et al., 2002; Brown et al., 2010).

Протеїнкінази АМПК – це білки, що складаються з однієї каталітичної (PRKAA) та двох регуляторних субодиниць (PRKAB, PRKAG) та відіграють важливу роль у енергетичному гомеостазі (Witczak et al., 2008). Протеїнкінази АМПК пов'язують з регуляцією численних клітинних процесів, таких як метаболізм ліпідів та глюкози, синтез білків, аутофагія і біогенез мітохондрій, регуляція окисно-відновних процесів (Jeon, 2016). Протеїнкіназа АМПК фосфорилує та інактивує білки, що беруть участь у метаболізмі ліпідів, зокрема АСАА (Acetyl-CoA carboxylase 1), АСАВ (Acetyl-CoA carboxylase 2), SRBP1 (Sterol regulatory element-binding protein 1), GYS1 (Glycogen synthase 1), HMGCR (HMG-CoA reductase) та LIPE (Hormone-sensitive lipase). Цей фермент бере участь у регуляції метаболізму глюкози у м'язових тканинах, фосфорилуючи ТВС1D1 (TBC1 domain family member 1), що необхідно для регуляції везикул GLUT4 (SLC2A4, Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4), регулює гліколіз, фосфорилуючи та активуючи PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2) та глікоген фосфорилазу (PYG), а також інгібує синтез глікогену, фосфорилуючи глікоген синтазу (GYS). Фосфорилує ТХНІР (Thioredoxin-interacting protein), туберін (TSC2, Tuberin), RPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR) та ЕЕФ2К (Eukaryotic elongation factor 2 kinase). Ця протеїнкіназа інгібує низку транскрипційних факторів, серед яких HNF4 (Hepatocyte nuclear factor 4-alpha), EIF1 (Eukaryotic translation initiation

factor 1), SREBF1 (Sterol regulatory element-binding protein 1), SREBF2, PPARGC1A (PGC-1 alpha, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2), p53 та гістон H2B (Jeon, 2016; Jones et al., 2005; Bungard et al., 2010). Фосфорилує гістон деацетилази HDAC4, HDAC5, HDAC7, що призводить до їх виключення з ядра (Mihaylova et al., 2011), регулює полімеризацію і скорочення актинового цитоскелету, зокрема PRKAA1 (5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1), та перебудови актинового цитоскелету при агрегації тромбоцитів (Onselaer et al., 2014). Крім того, AMPK впливає на фосфорилування кофіліну та безпосередньо фосфорилує регулятор полімеризації актину VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Vazquez-Martinet al., 2009).

Окрім AMPK існує декілька груп AMPK-подібних протеїнів. До них входять, зокрема, протеїнкінази BRSK та MARK-кінази. Протеїнкінази BRSK беруть участь у регуляції поляризації кортикальних нейронів. Також BRSK залучені до процесів регуляції клітинного циклу через фосфорилування WEE1 (Wee1-like protein kinase), CDC25B (M-phase inducer phosphatase 2), CDC25C (M-phase inducer phosphatase 3) (Müller et al., 2010; Bulavin et al., 2001). BRSK регулюють секрецію інсуліну, імовірно, через фосфорилування CDK16 та PAK1 (p21-activated kinase 1) (Chen et al., 2012; Nie et al., 2012). MARK2 і MARK3 фосфорилують деацетилазу гістонів HDAC7, регулюючи її активність та локалізацію (Dequiedt et al., 2006). MARK2 негативно регулює формування стресових волокон шляхом фосфорилування GEF-H1 (ARHGEF2, Rho guanine nucleotide exchange factor 2) по Ser885 та Ser959 (Yamahashi et al., 2011). STK11 є регулятором активності AMPK-кіназ і бере участь у регуляції численних клітинних процесів, пов'язаних з метаболізмом, апоптозом, клітинною поляричністю та репарацією ДНК (Lizcano et al., 2004). Зокрема, фосфорилує PRKAA1, BRSK1, BRSK2, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 та регулює перебудови актинового і тубулінового цитоскелету (Kojima et al., 2007; Lizcano et al., 2004; Vaas et al., 2004; Xu et al., 2010; Barnes et al., 2007).

ЧЕК-кінази пов'язані з регуляцією клітинного циклу. Зокрема, вони регулюють контрольні точки клітинного циклу при переході G_1-S , у S та переході G_2-M . ЧЕК регулюють відповідь на пошкодження ДНК: арест клітинного циклу та запуск систем репарації ДНК (Cai et al., 2009).

ДАРК-кінази є елементами численних сигнальних шляхів, пов'язаних з запрограмованою клітинною смертю (Lin et al., 2010). ДАРК1 може зв'язуватись з MAP1B, асоціюючись таким чином з актиновим і тубуліновим цитоскелетом. ДАРК1 може зв'язуватись з MAP1B, асоціюючись таким чином з актиновим і тубуліновим цитоскелетом. ДАРК1 з MAP1B стимулює автофагію і мембранний блеббінг (Harrison et al., 2008). ДАРК1 впливає на фосфорилування регуляторів динаміки актинового цитоскелету при TNF-опосередкованому апоптозі, зокрема кофіліну по Ser-3 і LIMK по Thr-508 (Ivanovska et al., 2013). Впливає на фосфорилування тропоміозину-1, регулюючи, таким чином, формування стресових фібрил (Houle et al., 2007).

Протеїнкінази типу D (PKD, PRKD) – родина серин-треонінових протеїнкіназ, залучених у численні процеси: внутрішньоклітинних сигналінг, проліферацію і диференціацію клітини, мембранний транспорт, секрецію, регуляцію імунної відповіді та ін. Серед субстратів PKD кортактин, CERT (Ceramide transfer protein), CREB (Cyclic AMP-responsive element-binding protein), DLC1 (Rho GTPase-activating protein 7), HDAC5, HDAC7, HPK1 (MAP4K1, Hematopoietic progenitor kinase 1), HSP27 (HSPB1, Heat shock protein beta-1), MYBPC3 (Myosin-binding protein C), MARK2 (Par-1), Rin1 (Ras and Rab interactor 1), SSH1 (Protein phosphatase Slingshot homolog 1), KIDINS220 (Kinase D-interacting substrate of 220 kDa) та TNNI (cardiac troponin I) (Rozengurt, 2011). Фосфорилування Rin1 призводить до зв'язування його 14-3-3 білками YWHAB (14-3-3 protein beta/alpha), YWHAЕ (14-3-3 protein epsilon) та YWHAZ (14-3-3 protein zeta/delta) у цитозолі, що перешкоджає йому блокувати Ras/Raf-1 взаємодії на плазматичній мембрані. Наслідком цього є позитивна регуляція активності MAPK (Rozengurt, 2007; Sinnott-Smith et al., 2004). Фосфорилування деацетилаз гістонів HDAC також веде до зв'язування їх у комплексах з 14-3-3

білками у цитоплазмі, що є частиною механізмів регуляції експресії генів (Rozengurt, 2011). PKD регулює транскрипційний фактор NF- κ B, що контролює експресію генів імунної відповіді, апоптозу та регулятори клітинного циклу (Rozengurt, 2011). PKD фосфорилує та активує рецептор імунної відповіді TLR5 (Toll-like receptor 5), що розпізнає бактеріальний флагеллін (Iverson, Graham et al., 2007; Iverson, Khan et al., 2007). Фосфорилування KIDINS220 протеїнкіназою D позитивно регулює секрецію нейротенсину (NTS) (Li et al., 2008). Протеїнкіназа PKD бере участь у регуляції Rho ГТФаз через фосфорилування DLC1 (Scholz et al., 2009). PKD1, як і CaMK2, фосфорилує TRPV1, модулюючи його активність (Rozengurt, 2011). PKD регулює чутливість міофіламентів до Ca²⁺, фосфорилуючи TNNI та MYBPC3 (Bardswell et al., 2010). PKD1 та PKD2 регулюють транспорт, опосередкований білками-переносниками TGN (trans-Golgi network) (Yeaman et al., 2004). Як і CaMK2, PKD1 фосфорилує регулятори кофіліну LIMK і SSH, таким чином беручи участь у регуляції перебудов актинового цитоскелету (Spratley et al., 2011; Döppler et al., 2013).

Протеїнкінази RSK беруть участь ряді сигнальних каскадів, зокрема пов'язаних з протеїнкіназами MAPK1 і MAPK3 (Shimamura et al., 2000; Anjum and Blenis, 2008). RSK регулюють низку транскрипційних факторів. Так, RPS6KA1 та RPS6KA5 фосфорилують ETV1 (ETS translocation variant 1), RPS6KA1 та RPS6KA3 фосфорилують NR4A1 (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1), RPS6KA1 фосфорилує СЕБРВ (ССААТ/enhancer-binding protein beta), RPS6KA3 фосфорилує CREB1 (Wu and Janknecht, 2002; Janknecht, 2003; Roux et al., 2007; Buck et al., 2001). Також RSK беруть участь у регуляції білків рибосом. RPS6KA1 та RPS6KA3 фосфорилують RPS6, що полегшує формування преініціаторного комплексу (Roux et al., 2007). Окрім цього, протеїнкінази RPS6KA1 та RPS6KB1 фосфорилують щонайменш один з факторів ініціації трансляції EIF4B, що посилює його афінність до комплексу EIF3 (Raught et al., 2004). Фосфорилування глікоген синтази GSK3B (Glycogen synthase kinase-3 beta) протеїнкіназою RPS6KA3 призводить до конформаційних змін, що перешкоджають доступу субстрату до його активного сайту та,

відповідно, інгібуванню його активності (Frame and Cohen, 2001). RPS6KA1 та RPS6KB1 фосфорилують DAPK1 та BAD (Bcl2-associated agonist of cell death), що негативно регулює їх про-апоптичну функцію. Фосфорилування BAD призводить до його гетеродимеризації з 14-3-3 білками (Shimamura et al., 2000; Anjum et al., 2005; Harada et al., 2001). RSK беруть участь у регуляції клітинного циклу, фосфорилуючи CDKN1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), та залучені у процеси клітинної моторики і фосфорилують EPHA2 (Ephrin type-A receptor 2) (Fujita et al., 2003; Zhou et al., 2015).

TRIO і калірін (KALRN) є мультидоменними білками, що належать до GEF-протеїнів (guanine nucleotide exchange factors), які необхідні для активації Rho ГТФаз. KALRN і TRIO поєднує наявність гомологічних DH (Dbl homology) і PH (Pleckstrin homology) доменів (McPherson et al., 2002; Pengelly et al., 2016; Kawai et al., 1999). Калірін активує ряд Rho-ГТФаз, що беруть участь у численних сигнальних каскадах, які пов'язані, зокрема, у перебудовах актинового цитоскелету (Kawai et al., 1999; Koо et al., 2007). TRIO зв'язується з регулятором росту аксонів NAV1 (Neuron navigator 1) та активує регулятор перебудов актинового цитоскелету у синапсах Rac1 (van Haren et al., 2014).

Тітин (TTN) є важливим компонентом у процесі формування поперечно-посмугованих м'язів, що визначає еластичність м'язів, зв'язуючи мікрофіламенти у складі саркомера. У нем'язових клітинах може приймати участь у процесах конденсації і розходженні хромосом (Mayans et al., 1998; Giganti et al., 2018).

Протеїнкінази DCLK належать до CaMK кіназ, проте їх чутливість до кальцій-/кальмодуліну знижена у порівнянні з іншими представниками субродини. Ізоформи відрізняються доменною архітектурою. DCLK1 та DCLK2, окрім кіназного, мають два даблкортин-подібні домени (Ota et al., 2004). Даблкортин (DCX, Doublecortin) асоціюється з мікротрубочками у незрілих нейронах (Couillard-Despres et al., 2005). DCLK експресуються переважно у тканинах мозку (Tuу et al., 2008). DCLK1 мишей регулює розподіл F-актину у нервових клітинах (Fu et al., 2013).

Рослинні кальцій-залежні протеїнкінази також беруть участь у численних клітинних процесах (Ludwig et al., 2004; Davletova et al., 2001; Yang and Komatsu, 2000; Sheen, 1996; Anil et al., 2000; Li et al., 2018; Yoon et al., 2006; Raíces et al., 2001; Guenther et al., 2003; Hardin et al., 2004; Mori et al., 2006; Zou et al., 2010; Cheng et al., 2002; Berkowitz et al., 2000; Boudsocq and Sheen, 2013; Geiger et al., 2010; Loog et al., 2000; Hardin et al., 2004; Huang and Huber, 2001; Bachmann et al., 1996; Chico et al., 2002; Saijo et al., 2000; Patharkar and Cushman, 2000; Martín and Busconi, 2001; Romeis et al., 2001; Romeis et al., 2000; Grant et al., 2000; Cheng et al., 2002; Camoni et al., 2002). Рівень транскрипції принаймні частини CDPK регулюється рівнем фітогормонів. Вплив гіберелової кислоти, абсцизової кислоти та цитокінінів підвищує рівень експресії мРНК CDPK1 з *N. tabacum*. Рівень експресії CDPK3 з *Cucumis sativus* також зростає під дією цитокінінів, а вплив β -індолілоцтової кислоти підвищує експресію генів деяких CDPK *Vigna radiata* та *Medicago sativa*. Гібериліни та брасиностероїди також підвищують активність CDPK у *Oryza sativa*. Обробка рослин *Solanum tuberosum* жасмоновою кислотою призводить до зниження рівня мРНК CDPK2 у клітинах (Ludwig et al., 2004; Davletova et al., 2001; Yang and Komatsu, 2000). В свою чергу CDPK-кінази, імовірно, можуть брати участь в активації генів гормональної відповіді. Наприклад, мутантні конститутивно активні CDPK30 та CDPK10 з *A. thaliana* активують промотор гена *HVA-1* *Hordeum vulgare*, чутливого до дії таких стресових сигналів, як абсцизова кислота (Sheen, 1996).

Протеїнкінази CDPK залучені у процеси ембріогенезу, розвитку та проростання насіння сандалового дерева (*Santalum album*) (Anil et al., 2000). CDPK залучені до процесів росту і реорієнтації пилкових трубок (Li et al., 2018; Yoon et al., 2006). Також, протеїнкінази CDPK залучені у процеси бульбоутворення *Solanum tuberosum* (Raíces et al., 2001). Протеїнкінази CDPK фосфорилують Nodulin-26 та сахарозо синтазу (SS) *Glycine max*, що синтезуються переважно у підземних частинах рослини (Guenther et al., 2003; Hardin et al., 2004).

Коливання рівня кальцію регулює іонні потоки продихових клітин, що є важливими для процесів закриття/відкриття продихових клітин. Протягом АБК-залежного закриття продихів, Ca^{2+} стимулює відтік K^+ , частково шляхом безпосереднього інгібування калієвих каналів плазматичної мембрани. Існують дані про те, що підвищення концентрації кальцію у продихових клітинах може активувати протеїнкінази CDPK, які в свою чергу фосфорилують вхідні калієві канали, регулюючи їх активність. Зокрема, CDPK продихових клітин бобів *Vicia faba* здатна фосфорилувати інтегрований в плазматичну мембрану калієвий канал KAT1, через який відбувається приток K^+ (Mori et al., 2006; Zou et al., 2010; Cheng et al., 2002; Berkowitz et al., 2000).

Протеїнкінази CDPK, як кальцієві сенсори також важливі і для Ca^{2+} -залежного відкриття продихів. Впродовж відкриття продихів, закачка аніонів у вакуолі важлива для компенсації притоку K^+ . Показана можливість СРК1 *A. thaliana* активувати вакуолярні аніонні канали VCL (Vacuolar chloride channel) продихових клітин *Vicia faba*. Протеїнкіназа СРК1 також залучена в процесі притоку малату в вакуолі продихових клітин *V. faba* та Cl^- у вакуолі клітин кореня *Beta vulgaris*. Протеїнкіназа СРК23 *A. thaliana* здатна безпосередньо взаємодіяти з аніонним каналом SLAC1 (Guard cell S-type anion channel SLAC1) продихових клітин, активуючи його (Boudsocq and Sheen, 2013; Geiger et al., 2010).

Кальцій-залежні протеїнкінази CDPK регулюють декілька ключових ферментів метаболізму карбону та нітрогену. Фосфорилування сахарозо-синтази типу SS протеїнкіназами CDPK знижує асоціацію з мембранами та підвищує кількість сахарозо-синтази в цитозолі (Loog et al., 2000; Hardin et al., 2004). Протеїнкінази CDPK також фосфорилують сахарозо-фосфат-синтазу SPS1 (Sucrose-phosphate synthase 1) *Spinacia oleracea* по залишку Ser158, призводячи до її інактивації в темряві (Huang and Huber, 2001). CDPK-опосередковане фосфорилування залишку Ser543 нітратредуктази (NIA) *S. oleracea* призводить до її інактивації (Bachmann et al., 1996).

Протеїнкінази CDPK є учасниками стресових сигнальних каскадів (Ludwig et al., 2004; Chico et al., 2002; Saijo et al., 2000; Patharkar and Cushman, 2000). Зокрема, активність асоційованої з мембраною протеїнкінази CDPK *O. sativa* посилюється при низьких температурах (Martín and Busconi, 2001). СРК10 та AtСРК *A. thaliana* здатні активувати АБК-індуцибельний промотор гена *HVA-1* (Sheen, 1996). Показано, що надекспресія протеїнкінази СРК7 *O. sativa* в судинно-волокнистих пучках рису призводить до підвищення толерантності рослини до холодowego, сольового стресу та засухи (Romeis et al., 2001).

Протеїнкінази CDPK виступають кальцієвими сенсорами у патоген-індукованих сигнальних каскадах. Сигнальні каскади відповіді на дію патогену часто запускаються взаємодією між патогенним еліситором та відповідним рослинним рецептором. Наприклад, Avr9 (Race-specific elicitor A9) та Cf-9 (Receptor-like protein Cf-9) з *Cladosporium fulvum*. Було показано активацію зв'язаної з мембраною протеїнкінази CDPK після їх взаємодії, при чому спостерігається від 10- до 200-кратне зростання активності кінази. CDPK можуть бути посередниками у процесах утворення активних форм кисню НАДФН-оксидазою при відповіді на дію патогена. Ектопічна експресія протеїнкінази СРК1 *A. thaliana* може збільшувати активність НАДФН-оксидази (Romeis et al., 2001; Romeis et al., 2000; Grant et al., 2000).

CDPK, активовані дією патогенного еліситора можуть приймати участь у залежній від кальцію регуляції протонних АТФаз плазматичної мембрани. В залежності від еліситора, може здійснюватись збільшення притоку H^+ шляхом негативної регуляції протонних АТФаз, або збільшуватись відтік H^+ шляхом позитивної регуляції протонних насосів (Cheng et al., 2002). CDPK *Zea mays* фосфорилує С-термінальну ділянку протонної АТФази (Camoni et al., 2002), що необхідно для її активації, опосередкованої 14-3-3 білками (Morsomme and Boutry, 2000). Таким чином протеїнкінази CDPK можуть впливати на зміни концентрації H^+ .

1.2.3. Участь кальцій-регульованих протеїнкіназ у регуляції мікротрубочок

CaMK2 можуть регулювати мікротрубочки (McVicker et al., 2015; Huang et al., 2001; Holmfeldt et al., 2005; Lu et al., 2002; Hong et al., 1996;). Так, CaMK2 γ регулює динаміку мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок MCAK (Holmfeldt et al., 2005). Ізоформа δ асоціюється та регулює актиновий і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів мишей (Hong et al., 1996). Також відомо, що CaMK2 фосфорилують MAP-протеїни, такі як MAP2 і MAP6, що приймають участь у стабілізації мікротрубочок (McVicker et al., 2015; Lu et al., 2002).

Протеїнкінази AMPK, як і MLCK, здатні фосфорилувати малий ланцюг міозину по залишкам Ser-19, або по Thr-18, що необхідно для регуляції взаємодії кортексу і мікротрубочок веретена поділу для правильної орієнтації веретена поділу при мітозі (Thaiparambil et al., 2012).

Протеїнкінази BRSK фосфорилують MAPT, який сприяє збірці, стабілізації мікротрубочок, виступає лінкерним протеїном між мікротрубочками і плазматичною мембраною нейронів, бере участь у регуляції поляризації нейрону. Протеїнкінази BRSK1 та BRSK2 фосфорилують MAPT по залишкам Thr-529 і Ser-579, що перешкоджає його асоціації з мікротрубочками (Yoshida and Goedert, 2012). Також, протеїнкінази BRSK регулюють транспорт γ -тубулінів при дуплікації центросом. зокрема BRSK1 фосфорилує γ -тубулін по Ser-131 (Alvarado-Kristensson et al., 2009).

Протеїнкінази MARK залучені у процеси регуляції динаміки цитоскелету (Yamahashi et al., 2011; Kojima et al., 2007; Rovina et al., 2014; Trinczek et al., 2004; Reiner and Sapir, 2014; Biernat et al., 2002; Timm et al., 2008; Yoshimura et al., 2010). MARK-кінази, зокрема MARK4, фосфорилують домени асоціації з мікротрубочками MAPT, MAP2 та MAP4, що викликає їх дисоціацію від мікротрубочок (Rovina et al., 2014; Trinczek et al., 2004). Протеїнкіназа MARK1 визначає поляриність нейронів (Reiner and Sapir, 2014; Biernat et al., 2002). Також MARK1, окрім MAPT, фосфорилує даблкортин (DCX), що регулює стабільність

мікротрубочок впродовж морфогенезу нейронів (Reiner and Sapir, 2014; Timm et al., 2008). MARK2 регулює полімеризацію тубуліну шляхом фосфорилування MAPT по KXGS-мотиву (Kojima et al., 2007). Протеїнкіназа MARK2 фосфорилує GAKIN (KIF13B, Kinesin-like protein KIF13B), що залучений у процеси реорганізації кортикального цитоскелету і формування нових аксонів (Yoshimura et al., 2010).

Протеїнкіназа CHEK1 фосфорилує CDC25A, CDC25B та CDC25C по низці сайтів, що призводить до інгібування їх активності або протеолізу (Jin et al., 2003; Hasepass et al., 2003; Chen et al., 2003; Falck et al., 2001; Zhao et al., 2002). CDC25A, CDC25B та CDC25C дефосфорилують та активують циклін-залежну кіназу Cdk1 (Timofeev et al., 2010). CHEK1, таким чином, перешкоджає активації centrosомної Cdk1, що необхідно для правильного формування веретена поділу (Krämer et al., 2004). Для CHEK2 ооцитів мишей показана його участь у регуляції організації веретена поділу, метафазної пластинки та прогресії клітинного циклу. Інгібування CHEK2 призводить до порушення локалізації γ -тубуліну у centrosомах і порушень веретена поділу (Dai et al., 2014). CHEK2 регулює локалізацію PLK1 (Serine/threonine-protein kinase PLK1), регулятором збірки веретна поділу, сергегації хромосом та виходу з мітозу. CHEK1 фосфорилує RASSF1A (Ras association domain-containing protein 1), що є важливим регулятором клітинного циклу, по Ser-184. Це фосфорилування перешкоджає можливості RASSF1A асоціюватись і стабілізувати мікротрубочки, що призводить до припинення аресту клітинного циклу (Jiang et al., 2014).

Протеїнкіназа DAPK1 регулює активність MAPT та динаміку мікротрубочок (Kim et al., 2014; Duan et al., 2013). Окрім прямого фосфорилування MAPT по Thr-231, DAPK1 інгібує регулятор MAPT – Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1), фосфорилуванням його по залишку Ser-71 (Kim et al., 2014). DAPK1 може зв'язуватись з MAP1B, асоціюючись таким чином з актиновим і тубуліновим цитоскелетом. DAPK1 мишей фосфорилує MARK1 і MARK2, що призводить до фосфорилування MAPT, MAP2, MAP4 та дестабілізації мікротрубочок (Wu et al., 2011).

Протеїнкіназа типу D (PKD) є учасником численних сигнальних каскадів та регулює MAPK1, MAPK3 та MAPK8, що опосередковано впливає на перебудови і динаміку актинового і тубулінового цитоскелету (Bagowski et al., 1999). PRKD3 фосфорилує GIT1 (ARF GTPase-activating protein GIT1) по залишку Ser46 та DLC1 по залишкам Ser327 та Ser431, що регулює їх клітинну локалізацію і пов'язані з ними цитоскелетні перебудови (Scholz et al., 2009; Huck et al., 2012).

Протеїнкінази RSK пов'язані з мітотичними процесами і асоціюються з тубуліновим цитоскелетом під час мітозу (Willard and Crouch, 2001). RSK беруть участь у регуляції розподілу мікротрубочок веретена поділу та стабілізації взаємодій кінетохора з мікротрубочками (Park et al., 2016).

Тітин асоціюється з мікротрубочками, переважно кінетохорними, у нем'язових клітинах (Pizon et al., 2002; Fabian et al., 2007). TRIO є необхідним для правильного росту аксонів. Рекрутується EB-1 (MAPRE1, Microtubule-associated protein RP/EB family member 1) до плюс-кінця мікротрубочок. Зв'язується з NAV1, який є позитивним регулятором росту аксонів, активує Rac1 (van Naren et al., 2014). Ця взаємодія, імовірно, є ланкою сигнального шляху, що пов'язаний з стимуляцією збірки периферійних мікротрубочок та перебудовах периферійного цитоскелету у ендотеліальних клітинах (Tian et al., 2014). Калірин опосередковано регулює динаміку мікротрубочок, пов'язану з формуванням агресом і агресомним транспортом. Калірин позитивно регулює HDAC6, що призводить до деацетилювання мікротрубочок (Tsai et al., 2012).

Протеїнкіназа DCLK1 впливає на динаміку мікротрубочок, стимулює їх полімеризацію *in vitro* (Lin et al., 2000).

1.3. Модуляція активності кальцій-/кальмодулін-залежних протеїнкіназ

Штучна модуляція активності білків є важливим інструментом вивчення їх функцій і властивостей. Зміни у активності досягаються різними методами, молекулярними (використання інгібіторів різного ступеня специфічності) і

молекулярно генетичними (наприклад, нокаут генів). В ході роботи були встановлені рослинні кальцій-залежні протеїнкінази, що можуть мати функції, аналогічні до їх тваринних гомоогів, у першу чергу протеїнкіназ CaMK2. Оскільки на даний момент бракує специфічних інгібіторів для рослинних CDPK, постає питання про можливість використання інгібіторів CaMK2 для пригнічення активності протеїнкіназ CDPK.

Існує доволі широкий спектр інгібіторів протеїнкіназ CaMK2, які відрізняються як специфічністю, так і принципом дії. Так, AIP (Autocamtide-2 inhibitor proteins) і AC3-I (Autocamtide-3 inhibitor) схожі за типом дії до автоінгібіторного домену CaMK2, що дозволяє їм блокувати роботу каталітичного домену (Picht et al., 2007). Ця група інгібіторів демонструє високу селективність до протеїнкінази CaMK2 і у більшості випадків їх інгібіторний ефект для цієї протеїнкінази більше, ніж у 100 разів перевищує дію на інші протеїнкінази, такі як PKC, PKA і CaMKIV (Pellicena and Schulman, 2014).

Інгібітори групи CaMKIIN мають пептидну природу і побудовані на основі фрагмента Camk2n1, ендogenousного інгібітора CaMK2, що експерсується у мозку ссавців (Gouet et al., 2012; Chang et al., 2001). У деяких випадках послідовності цих інгібіторів скорочені або модифіковані з метою підвищення специфічності (Pellicena and Schulman, 2014).

До іншої групи відносяться класичні інгібітори протеїнкіназ, які діють за механізмом блокування АТФ-зв'язуючої кишені протеїнкінази CaMK2. Така АТФ-конкурентна дія притаманна ряду сполук, зокрема SMP-114 і бербаміну (BBM) (Neef et al., 2017; Gu et al., 2012). Але незважаючи на потужний ефект, їх дія відрізняється значно нижчою специфічністю, і у випадку наукових досліджень протеїнкінази CaMK2 все більша увага надається інгібіторам, дія яких спрямована на порушення взаємодії кальмодулін-зв'язуючого домену з кальмодуліном, таким як KN-62 та KN-93.

Конкурентно зв'язуючись з кальмодуліном, KN-62 та KN-93 блокують його «обгортання» навколо кальмодулін-зв'язуючого домену протеїнкінази CaMK2 (Swulius and Waxham, 2008). KN-93 та KN-62 демонструють високу

специфічність до протеїнкінази CaMK2 з $IC_{50} = 0,37$ мкМ для KN-93 та $IC_{50} = 0,9$ мкМ для KN-62, проте мають низку інших мішеней, активність яких пригнічується при вищих концентраціях. Серед них - протеїнкінази PKA (Protein kinase A), PKC (Protein kinase C), MLCK, CaMKI, CaMKIV, Fyn (Tyrosine-protein kinase Fyn, Src-like kinase), HASPIN, HCK (Hematopoietic cell kinase), LCK (Leukocyte C-terminal Src kinase), TEC та TrkA (NTRK1, High affinity nerve growth factor receptor, Tropomyosin-related kinase A) (Pellicena and Schulman, 2014; Rezazadeh et al., 2006; Hübner and Phi-van, 2004). Розуміння принципів дії різних типів інгібіторів CaMK2 важливе визначення, які саме з них можна розглядати у контексті дослідження рослинних CDPK.

Зважаючи наведені у розділі 1 факти, можна стверджувати, що існують численні підтвердження регуляції мікротрубочок та безпосереднього фосфорилювання їх білків тваринними кальмодулін-залежними протеїнкіназами з відповідним впливом на структуру та динамічні властивості тубулінового цитоскелету. Проте роль Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ у регуляції цитоскелету рослин залишається практично не вивченою. Також, на відміну від тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ, наразі не існує специфічних інгібіторів для рослинних CDPK, що також ускладнює процес вивчення особливостей їх функціонування.

Сучасні біоінформаційні методи можуть допомогти у вивченні ролі CDPK. Зважаючи на особливості структури, еволюційне походження досліджуваних кіназ та консервативність основних цільових білків, можна припустити, що біоінформаційні методи можуть з високою вірогідністю спрогнозувати можливість фосфорилювання рослинних тубулінів кальцій-залежними протеїнкіназами та визначити, які саме з них здатні реалізовувати таку модифікацію. Використання біоінформаційних методів також може допомогти визначити можливість використання деяких сполук, що мають інгібуючий вплив на тваринні кальмодулін-залежні протеїнкінази, для пригнічення активності CDPK рослин, що може стати вагомим підґрунтям для вивчення особливостей їх функціонування та ролі у рослинній клітині.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали дослідження

В ході роботи був використаний ряд біоінформатичних інструментів: Pfam (Finn et al., 2016), PROSITE (Sigrist et al., 2013), InterPro (Finn et al., 2017), KinasePhos (Huang et al., 2005), PDB-BLAST (www.rcsb.org), SIB BLAST (Lee et al., 2009), I-Tasser (Yang et al., 2015), SuperLooper (Hildebrand et al., 2009), MolProbity (Davis et al., 2007), QMEAN (Benkert et al., 2009), PhosphoSitePlus (Hornbeck et al., 2015), SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), OpenBabel (O'Boyle et al., 2011), SIGnAL T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), SMART (Letunic et al., 2015), а також ряд програм і програмних пакетів: ClustalX (v. 2.1) (Larkin et al., 2007), MEGA7 (Kumar et al., 2016), Modeller 9v8 (Eswar et al., 2006), EasyModeller (Kuntal et al., 2010), 4.0 HADDOCK (Dominguez et al., 2003), GROMACS 4.5.3 (Pronk et al., 2013), UCSF Chimera 1.8 (Pettersen et al., 2004), CCDC GOLD Suite 5.3 (Verdonk et al., 2003), CCDC HERMES (Verdonk et al., 2003), PyMol 1.5 (www.schrodinger.com/pymol). Були використані бази даних UniProtKB (UniProt Consortium, 2018), RCSB Protein Data Bank (Burley et al., 2017), ChEMBL (Gaulton et al., 2012).

Таблиця 2.1

Амінокислотні послідовності молекул тубуліну та компонентів γ-тубулінового комплексу із *Arabidopsis thaliana*, використані у роботі

Назва	Номер UniProt	Назва	Номер UniProt
TBA1	P11139	TBB5	P29513
TBA2	B9DGT7	TBB6	P29514
TBA3	Q56WH1	TBB7	P29515
TBA4	Q0WV25	TBB8	P29516
TBA5	B9DHQ0	TBB9	P29517
TBA6	P29511	TBG1	P38557
TBB1	P12411	TBG2	P38558

Продовж. табл. 2.1

TBB2	Q56YW9	GCP2	Q9C5H9
TBB3	Q9ASR0	GCP3	Q9FG37
TBB4	P24636		

Таблиця 2.2

Амінокислотні послідовності Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ із *Arabidopsis thaliana*, використані у роботі

Назва	Номер UniProt	Назва	Номер UniProt
CDPK1 (CPK1)	Q06850 (At5g04870)	CDPKM (CPK22)	Q9ZSA3 (At4g04710)
CDPK2 (CPK2)	Q38870 (At3g10660)	CDPKN (CPK23)	Q9M101 (At4g04740)
CDPK3 (CPK3)	Q42479 (At4g23650)	CDPKO (CPK24)	Q9SIQ7 (At2g31500)
CDPK4 (CPK4)	Q38869 (At4g09570)	CDPKP (CPK25)	Q9SJ61 (At2g35890)
CDPK5 (CPK5)	Q38871 (At4g35310)	CDPKQ (CPK26)	Q9SZM3 (At4g38230)
CDPK6 (CPK6)	Q38872 (At2g17290)	CDPKR (CPK27)	Q9ZSA4 (At4g04700)
CDPK7 (CPK7)	Q38873 (At5g12480)	CDPKS (CPK28)	Q9FKW4 (At5g66210)
CDPK8 (CPK8)	Q42438 (At5g19450)	CDPKT (CPK29)	Q8RWL2 (At1g76040)
CDPK9 (CPK9)	Q38868 (At3g20410)	CDPKU (CPK30)	Q9SSF8 (At1g74740)
CDPKA (CPK10)	Q9M9V8 (At1g18890)	CDPKV (CPK31)	Q9S9V0 (At4g04695)
CDPKB (CPK11)	Q39016 (At1g35670)	CDPKW (CPK32)	Q6NLQ6 (At3g57530)
CDPKC (CPK12)	Q42396 (At5g23580)	CDPKX (CPK33)	Q9C6P3 (At1g50700)
CDPKD (CPK13)	Q8W4I7 (At3g51850)	CDPKY (CPK34)	Q3E9C0 (At5g19360)

Продовж. табл. 2.2

CDPKE (CPK14)	P93759 (At2g41860)	CAMK1 (CRK1)	O80673 (At2g41140)
CDPKF (CPK15)	O49717 (At4g21940)	CAMK2 (CRK2)	Q9LJL9 (At3g19100)
CDPKG (CPK16)	Q7XJR9 (At2g17890)	CAMK3 (CRK3)	Q9ZUZ2 (At2g46700)
CDPKH (CPK17)	Q9FMP5 (At5g12180)	CAMK4 (CRK4)	Q9FIM9 (At5g24430)
CDPKI (CPK18)	Q1PE17 (At4g36070)	CAMK5 (CRK5)	Q9SCS2 (At3g50530)
CDPKJ (CPK19)	Q1PFH8 (At1g61950)	CAMK6 (CRK6)	Q9SG12 (At3g49370)
CDPKK (CPK20)	Q9ZV15 (At2g38910)	CAMK7 (CRK7)	Q9LET1 (At3g56760)
CDPKL (CPK21)	Q9ZSA2 (At4g04720)	CAMK8 (CRK8)	Q9FX86 (At1g49580)

Таблиця 2.3

**Амінокислотні послідовності кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин,
використані у роботі**

Назва	Номер UniProt	Організм
KCC2A (CAMK2A)	Q9UQM7	<i>Homo sapiens</i>
KCC2B (CAMK2B)	Q13554	<i>Homo sapiens</i>
KCC2D (CAMK2D)	Q13557	<i>Homo sapiens</i>
KCC2G (CAMK2G)	Q13555	<i>Homo sapiens</i>
MYLK3	Q32MK0	<i>Homo sapiens</i>
AAPK1 (AMPK1)	Q13131	<i>Homo sapiens</i>
BRSK1	Q8TDC3	<i>Homo sapiens</i>
BRSK2	Q8IWQ3	<i>Homo sapiens</i>
CHK1 (CHEK1)	O14757	<i>Homo sapiens</i>
CHK2 (CHEK2)	O96017	<i>Homo sapiens</i>
DAPK1	P53355	<i>Homo sapiens</i>
DAPK3	O43293	<i>Homo sapiens</i>
STK11 (LKB1)	Q15831	<i>Homo sapiens</i>
MARK1	Q9P0L2	<i>Homo sapiens</i>

Продовж. табл. 2.3

MARK2	Q7KZI7	<i>Homo sapiens</i>
MARK3	P27448	<i>Homo sapiens</i>
MARK4	Q96L34	<i>Homo sapiens</i>
KPCD1 (PKD1)	Q15139	<i>Homo sapiens</i>
KPCD2 (PKD2)	Q9BZL6	<i>Homo sapiens</i>
KPCD3 (PKD3)	O94806	<i>Homo sapiens</i>
KS6A2 (RSK2)	Q15418	<i>Homo sapiens</i>
KS6A3 (RSK3)	P51812	<i>Homo sapiens</i>
KS6A4 (RSK4)	O75676	<i>Homo sapiens</i>
MYLK (MLCK1)	Q15746	<i>Homo sapiens</i>
MYLK2 (MLCK2)	Q9H1R3	<i>Homo sapiens</i>
MYLK3 (MLCK3)	Q32MK0	<i>Homo sapiens</i>
KALRN	O60229	<i>Homo sapiens</i>
TTN	Q8WZ42	<i>Homo sapiens</i>
TRIO	O75962	<i>Homo sapiens</i>
DCLK1	O15075	<i>Homo sapiens</i>
KCC2A (CAMK2A)	P11798	<i>Mus musculus</i>
KCC2B (CAMK2B)	P28652	<i>Mus musculus</i>
KCC2D (CAMK2D)	Q6PHZ2	<i>Mus musculus</i>
KCC2G (CAMK2G)	Q923T9	<i>Mus musculus</i>
AAPK1 (AMPK1)	Q5EG47	<i>Mus musculus</i>
BRSK1	Q5RJI5	<i>Mus musculus</i>
BRSK2	Q69Z98	<i>Mus musculus</i>
CHK2 (CHEK2)	Q9Z265	<i>Mus musculus</i>
DAPK1	Q80YE7	<i>Mus musculus</i>
STK11 (LKB1)	Q9WTK7	<i>Mus musculus</i>
DCLK1	Q9JLM8	<i>Mus musculus</i>

2.1.1. Біоінформаційні методи для пошуку і відбору амінокислотних послідовностей кальцій-залежних протеїнкіназ і тубулінів

Послідовності α -, β - та γ -тубулінів, компонентів γ -тубулінових комплексів 2 (GCP2/SPC97) та 3 (GCP3/SPC98), протеїнкіназ підродин CDPK та CRK із *A. thaliana*, а також послідовності α -, β - та γ -тубулінів, CaMK2, MLCK, AMPK,

BRSK, CHEK, DAPK, LKB1, MARK, PKD, RSK, DCLK1, TRIO, KLRN та TTN із *H. sapiens* та *M. musculus* були відібрані з бази даних UniProtKB (UniProt Consortium, 2018). Відбирались лише анотовані послідовності у форматі FASTA. Депоновані в UniProtKB білки *A. thaliana* ідентифікували шляхом порівняння їх локусу генів з координатами, представленими в інформаційному ресурсі Arabidopsis (TAIR – www.arabidopsis.org).

2.1.2. Методи, використані для аналізу доменної архітектури та структури кальцій-залежних протеїнкіназ

Доменну архітектуру білків визначали на основі результатів профільного аналізу з використанням інструментів SMART, Pfam, PROSITE та InterPro (Finn et al., 2016; Finn et al., 2017; Sigrist et al., 2013; Letunic et al., 2015).

2.2. Пошук кальцій-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, що можуть фосфорилувати мікротрубочки, за допомогою кладистичних методів

2.2.1. Відбір Ca²⁺/кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, що беруть участь у регуляції мікротрубочок

Контрольні послідовності кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини (*H. sapiens*) і миші (*M. musculus*), що беруть участь у регуляції цитоскелету, були відібрані на підставі аналізу даних літератури. При створенні вибірки враховувались не лише кальмодулін-залежні протеїнкінази, що здатні фосфорилувати мікротрубочки, а і ті, що приймають участь у регуляції актинового і тубулінового цитоскелету опосередковано, або механізм їх дії не вивчений досконало. У випадку *A. thaliana*, намі була використана повна вибірка Ca²⁺- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ, що зараз відомі згідно із даними літератури, а також, депоновані у базах даних UniProtKB (www.uniprot.org) і Tair (www.arabidopsis.org). Останні редакції амінокислотних послідовностей було

отримано з бази даних UniProtKB (UniProt Consortium, 2018) і збережені у FASTA-форматі. Унікальність послідовностей доводилась на основі порівняння локусів генів і літературних даних.

2.2.2. Аналіз доменної архітектури протеїназ вибірки

Аналіз доменної архітектури досліджуваних протеїназ здійснювався за допомогою інструментів SMART, Pfam, PROSITE та InterPro (Finn et al., 2016; Sigrist et al., 2013; Finn et al., 2017; Letunic et al., 2015), з урахуванням даних ExPASy Proteomics Server (www.expasy.org). а також даних літератури.

2.2.3. Пошук Ca²⁺залежних протеїназ *A. thaliana*, що беруть участь у регуляції мікротрубочок на підставі гомології послідовностей їх каталітичних доменів

Ступінь подібності досліджених послідовностей і філогенетична ідентифікація найближчих гомологів встановлювались на підставі N-J(Neighbor-Joining)-кластеризації послідовностей каталітичних доменів (Gascuel and Steel, 2006). Межі послідовностей каталітичних доменів досліджених протеїназ були визначені в ході аналізу їх доменної архітектури за допомогою інструментів SMART, Pfam, PROSITE, InterPro та збережені у FASTA-форматі (Finn et al., 2016; Sigrist et al., 2013; Finn et al., 2017; Letunic et al., 2015). Вирівнювання загальної вибірки послідовностей каталітичних доменів та серія вирівнювань послідовностей каталітичних доменів кальцій- та кальмодулін-залежних протеїназ *A. thaliana* проти послідовностей каталітичних доменів тваринних кальмодулін-залежних протеїназ було виконано за допомогою програми ClustalX (v. 2.1) (Larkin et al., 2007) з використанням вагових матриць BLOSSUM (Styczynski et al., 2008).

Візуалізацію та аналіз побудованих дендрограм було виконано із використанням програми MEGA7 (v. 7.0.14) (Kumar et al., 2016).

2.2.4. Пошук профілів сайтів фосфорилювання Ca²⁺/кальмодулін-залежних протеїназ ссавців

Вибірка послідовностей експериментально підтверджених сайтів фосфорилювання, що відповідають протеїназам ссавців були відібрані за допомогою ресурса PhosphoSitePlus у форматі Xp±7 (Hornbeck et al., 2015).

2.2.5. Кластеризація, створення спільних профілів фосфорилювання для різних груп протеїназ

Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей вибірки експериментально підтверджених сайтів фосфорилювання проводилось з використанням програми ClustalX (V. 2.0.10) (Larkin et al., 2007). При вирівнюванні була використані вагові матриці BLOSSUM, а також застосована опція заборони вставки гепів.

Кластичний аналіз сайтів зв'язування і ідентифікація найближчих гомологів встановлювалась на підставі спільної кластеризації амінокислотних послідовностей методом спільної N-J кластеризації. Візуалізація і аналіз дендрограм проводилась у програмі MEGA7 (v. 7.0.14) (Kumar et al., 2016). Паттерни сайтів фосфорилювання складались відповідно до протоколу інструмента PROSITE (Sigrist et al., 2013).

2.2.6. Кластеризація профілів експериментально доведених сайтів фосфорилювання протеїназ тваринного походження і профілів сайтів фосфорилювання, передбачених для молекул тубуліну *A. thaliana*

Для визначення профілів фосфорилювання, що відповідають тубулінам *A. thaliana* був використаний інструмент PROSITE (Sigrist et al., 2013). При скануванні засобами “ScanProsit tool” була використана опція, що дозволяє

сканування колекцій профілей і цільових білків користувачів. У якості цільових білків для пошуку PROSITE були використані послідовності молекул тубулінів *A. thaliana*, відібрані з бази даних UniProtKB: α -тубуліни - TBA1 (P11139), TBA2 (B9DGT7), TBA3 (Q56WH1), TBA4 (Q0WV25), TBA5 (B9DNQ0), TBA6 (P29511); β -тубуліни - TBB1 (P12411), TBB2 (Q56YW9), TBB3 (Q9ASR0), TBB4 (P24636), TBB5 (P29513), TBB6 (P29514), TBB7 (P29515), TBB8 (P29516), TBB9 (P29517); γ -тубуліни - TBG1 (P38557), TBG2 (P38558). У якості мотивів були використані спільні паттерни послідовностей, що відповідають кладам і субкладам, які були отримані при кластеризації послідовностей сайтів фосфорилування.

Для визначення найближчих гомологів серед послідовностей сайтів, які фосфорилуються протеїнкіназами тварин, і потенційних сайтів фосфорилування тубулінів була створена нова вибірка послідовностей, що об'єднувала загальну вибірку фрагментів послідовностей сайтів фосфорилування та сайти фосфорилування у форматі $Xp\pm 7$, визначені для тубулінів *A. thaliana* за допомогою PROSITE (Sigrist et al., 2013).

За допомогою ClustalX, з використанням вагових матриць BLOSSUM та заборною гепів, було проведене повторне множинне вирівнювання сайтів фосфорилування та ідентифікація найближчих гомологів шляхом N-J кластеризації у програмі MEGA7 (Larkin et al., 2007; Kumar et al., 2016; Styczynski et al., 2008).

2.2.7. Визначення кальцій-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних до фосфорилування тубуліну, на основі гомології повних послідовностей до протеїнкіназ, визначених в ході профільного аналізу

Для визначення найближчих рослинних гомологів протеїнкіназ, чий профілі фосфорилування найбільш споріднені до профілів фосфорилування тубулінів, з бази даних UniProtKB були взяті їх послідовності у форматі FASTA. Пошук гомологічних послідовностей здійснювали з використанням сервісу SIB BLAST

Network Service (Lee et al., 2009). Вирівнювання послідовностей досліджуваних протеїніназ проти бази даних UniProtKB здійснювали за допомогою алгоритму BLASTp (BLASTP ver. 2.2.31+) (Lee et al., 2009). Сканування проводили з використанням вагової матриці BLOSUM62 з пороговим значенням числа співпадінь у випадковій вибірці (E-Value) 10 (Styczynski et al., 2008). Також була задіяна активна фільтрація ділянок низької організації (Low-complexity regions) чи ділянок, що містять мелику кількість гепів. Потенційні гомологи були відібрані на основі відсоткових показників ідентичності і подібності послідовностей, відсотка гепів і значенні E-value.

2.3. Визначення потенційних сайтів фосфорилювання рослинних тубулінів

2.3.1. Ідентифікація сайтів фосфорилювання у структурі послідовностей тубулінів *A. thaliana*

Визначення потенційних серин-/треонінових-сайтів фосфорилювання у послідовностях різних ізоформ α -, β - та γ -тубулінів із *A. thaliana*, що співпадають з профілями тваринних протеїніназ CaMK2 було виконане за допомогою сервісу KinasePhos (Huang et al., 2005).

2.3.2. Побудова просторових моделей тубулінового димера та малого γ -тубулінового комплексу *A. thaliana*

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

моделей білків була виконана з використанням програми EasyModeller 4.0 (Kuntal et al., 2010).

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

Релаксацію структур побудованих моделей здійснювали шляхом короткочасної молекулярної динаміки (10 нс) в силовому полі G53a6 за допомогою програмного пакету GROMACS 4.5.3 (Pronk et al., 2013) та верифікували на підставі показників RMSD, розрахунків енергії та критеріїв якості білкових структур (Stacklies et al., 2011). Стабільність 3D-моделей перевіряли за допомогою методу молекулярної динаміки в програмі GROMACS з використанням повноатомного силового поля charmm27 та водної моделі SPC (Nei and Kumar, 2000). Якість отриманих моделей перевіряли за допомогою сервісів MolProbity (Davis et al., 2007) та QMEAN (Benkert et al., 2009).

2.3.3. Визначення та аналіз просторової доступності передбачених сайтів фосфорилування тубулінів *A. thaliana*

Для аналізу просторової доступності передбачених сайтів фосфорилування побудовані моделі тубулінових комплексів і залишки, що є імовірними сайтами фосфорилування були візуалізовані за допомогою програмних пакетів PyMol 1.5

(www.pymol.org) та UCSF Chimera 1.8 (Pettersen et al., 2004). Визначення доступних для фосфорилювання амінокислотних залишків здійснювали на підставі їх розташування на поверхні структурних моделей тубулінових комплексів.

2.4. Методика відбору нокаутних мутантів CDPK *A. thaliana*

Пошук мутантних ліній CPK20 та CPK21 проводився у бібліотеках мутантних ліній *A. thaliana* NASC (The Nottingham Arabidopsis Stock Centre) (<http://arabidopsis.info>) та ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) (<https://abrc.osu.edu>). Для визначення інтронно-екзонної структури мутантів був використаний інструмент SIGnAL T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

2.5. Підбір потенційних інгібіторів протеїнкіназ CDPK

2.5.1. Ідентифікація імовірного сайту зв'язування селективних інгібіторів KN-93 та KN-62 на поверхні молекули кальмодуліну

Амінокислотні послідовності були взяті з бази даних UniprotKB (UniProt Consortium, 2018) у форматі FASTA. Доменна архітектура і межі кальцій-зв'язуючого домена протеїнкінази CPK1 з *A. thaliana* були визначені за допомогою сервісу SMART (Letunic et al., 2015). Пошук та аналіз гомологічних білкових структур було здійснено в репозиторії RCSB Protein Data Bank, за допомогою вбудованих пошукових і аналітичних інструментів (Burley et al., 2017). 1.96 Å референсна кристалічна структура кальмодуліну за лігандом у (PDB ID: 6EEB) була взята з бази даних PDB у форматі .pdb.

2.5.2. Побудова 3-вимірної моделі регуляторного домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana* за допомогою профільного методу реконструкції та встановлення імовірного сайту зв'язування KN-93 та KN-62

За допомогою он-лайн сервісу SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), на основі профільної реконструкції, було побудовано модель кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana*. Засобами сервісу SWISS-MODEL здійснено пошук гомологічних структур у базі даних PDB, була створена вибірка з 50-ти експериментально встановлених структур, які на наступному етапі були використані для шаблонного моделювання відповідних доменів рослинних СРК. У якості найкращої шаблонної структури для модкування, спираючись на оціночні функції сервісу, серед 50 гомологічних темплатів була обрана 2.0Å кристалічна структура регуляторного апарату кальцій-залежної протеїнкінази 1 з *A. thaliana* (PDB ID: 2AAO). Просторове вирівнювання та аналіз структури проводили за допомогою програмного пакету PyMol (www.pymol.org). Для порівняння амінокислотного оточення також було використане профільне вирівнювання послідовностей за допомогою програми ClustalX (Larkin et al., 2007) з використанням вагових матриць BLOSUM (Styczynski et al., 2008).

2.5.3. Використання методу молекулярного докінгу для оцінки взаємодії потенційних інгібіторів з протеїнкіназою СРК1

Структури KN93 і KN62 були взяті з бази даних ChEMBL (Gaulton et al., 2012) у форматі SMILE. Конвертація структур лігандів у повноатомний формат *.mol2 була виконана за допомогою інструменту OpenBabel (O'Boyle et al., 2011).

Молекулярний докінг було проведено в програмі CCDC GOLD Suite 5.3 з урахуванням повної рухливості лігандів за умови статичності амінокислотних залишків активного центру (Verdonk et al., 2003). При визначенні енергетично вигідних сайтів зв'язування на поверхні кальмодуліну 1, була проведена серія молекулярних докінгів референсного ліганда проти поверхні структури

кальмодуліну 1 із зоною для проведення докінгу, радіусом у 20 Å. При докуванні у специфічний сайт зв'язування, діаметр був зменшений до 16 Å. У кожному випадку здійснювали 100 циклів генетичного алгоритму. Оцінювання результатів докінгу спиралось на показники оціночних функцій програми CCDC GOLD: GoldScore і ASPScore. Візуалізацію структур і аналіз результатів докінгу виконували в програмах CCDC HERMES (Verdonk et al., 2003) та PyMol (www.pymol.org).

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ Ca^{2+} - ТА Ca^{2+} /КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ *A. thaliana*, ЗДАТНИХ ФОСФОРИЛЮВАТИ ТУБУЛІН

3.1. Аналіз доменної архітектури Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін залежних протеїнказ *A. thaliana* та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїнказ людини і миші, що беруть участь у регуляції мікротрубочок

За результатами аналізу літератури і баз даних нами було відібрано амінокислотні послідовності 34-х CDPK і 8-ми протеїнказ CRK з *A. thaliana*, а також, послідовності кальмодулін-залежних протеїнказ людини і миші, для яких існують експериментальні докази їх зв'язку з регуляцією цитоскелету. Так, до вибірки протеїнказ з *A. thaliana* увійшли: CPK1 (Q06850), CPK2 (Q38870), CPK3 (Q38872), CPK4 (Q38869), CPK5 (Q38871), CPK6 (Q42479), CPK7 (Q38873), CPK8 (Q42438), CPK9 (Q38868), CPK10 (Q9M9V8), CPK11 (Q39016), CPK12 (Q42396), CPK13 (Q8W4I7), CPK14 (P93759), CPK15 (O49717), CPK16 (Q7XJR9), CPK17 (Q9FMP5), CPK18 (Q1PE17), CPK19 (Q1PFH8), CPK20 (Q9ZV15), CPK21 (Q9ZSA2), CPK22 (Q9ZSA3), CPK23 (Q9M101), CPK24 (Q9SIQ7), CPK25 (Q9SJ61), CPK26 (Q9SZM3), CPK27 (Q9ZSA4), CPK28 (Q9FKW4), CPK29 (Q8RWL2), CPK30 (Q9SSF8), CPK31 (Q9S9V0), CPK32 (Q6NLQ6), CPK33 (Q9C6P3), CPK34 (Q3E9C0), CRK1 (O80673), CRK2 (Q9LJL9), CRK3 (Q9ZUZ2), CRK4 (Q9FIM9), CRK5 (Q9SCS2), CRK6 (Q9SG12), CRK7 (Q9LET1) і CRK8 (Q9FX86).

До вибірки протеїнказ тварин, що, згідно літературних даних, регулюють цитоскелет, увійшли послідовності протеїнказ з *H. sapiens*: CaMK2A (Q9UQM7), CaMK2B (Q13554), CaMK2D (Q13557), CaMK2G (Q13555), PRKAA1 (Q13131), BRSK1 (Q8TDC3), BRSK2 (Q8IYWQ3), CHK1 (O14757), CHK2 (O96017), DAPK1 (P53355), DAPK2 (Q9UIK4), DAPK3 (O43293), MLCK1 (Q15746), MLCK2 (Q9H1R3), MLCK3 (Q32MK0), STK11 (Q15831), MARK1 (Q9P0L2), MARK2 (Q7KZI7), MARK3 (P27448), MARK4 (Q96L34), PKD1

(Q15139), PKD2 (Q9BZL6), PKD3 (O94806), RSK1 (Q15418), RSK2 (P51812), RSK3 (Q15349), RSK4 (Q9UK32), KALRN (O60229), TTN (Q8WZ42), TRIO (O75962), DCLK1 (O15075) та послідовності протеїнкіназ з *M. musculus*: CaMK2A (P11798), CaMK2B (P28652), CaMK2D (Q6PHZ2), CaMK2G (Q923T9), PRKAA1 (Q5EG47), BRSK1 (Q5RJI5), CHK2 (Q9Z265), DAPK1 (Q80YE7), STK11 (Q9WTK7), DCLK1 (Q9JLM8).

За допомогою спеціалізованих інструментів (SMART, Pfam, PROSITE та InterPro) була визначена доменна архітектура досліджуваних протеїнкіназ. CDPK-кінази з *A. thaliana* показали спільний шаблон доменної архітектури, найбільш варіабельною частиною якого є N-термінальний сегмент (Рис. 3.1.). Для цього сегменту характерні регіони з низьким ступенем складності (LCR, Low complexity region) і неупорядковані ділянки (IDPR, Disordered Protein Regions). Поряд з варіабельною N-термінальною ділянкою розташований каталітичний домен. Інша частина кінази являє собою регуляторний сегмент, що складається з автоінгіботорної ділянки та Ca²⁺-зв'язуючого кальмодулін-подібного домену. Як і кальмодулін, останній містить чотири специфічні EF-мотиви (EF-hands), що відповідають за зв'язування іонів кальцію. Така архітектура характерна для всіх протеїнкіназ підродини, за виключанням СРК25, частина EF-мотивів якої має вироджений характер.

СРК-кінази з *A. thaliana* також показують спільний шаблон доменної архітектури. N-термінальна варіабельна ділянка, каталітичний та регуляторний домен. Головна відмінність від протеїнкіназ CDPK – вироджені EF-мотиви (Рис. 3.1.). Серед тваринних протеїнкіназ вибірки, гомологічні кінази *H. sapiens* і *M. musculus* показали аналогічну доменну архітектуру.

Протеїнкіназа CaMK2 складається з трьох основних частин – каталітичного домену, регуляторного сегменту та домену асоціації. Регуляторний сегмент представлений автоінгіботорною та кальмодулін-за'язуючою ділянками, що частково перекриваються (Hudmon and Schulman, 2002). Домен асоціації – специфічна структура CaMK2, що необхідна для збірки субодиниць у холоензим. Між регуляторним сегментом і доменом асоціації знаходиться варіабельний

сегмент, довжина і послідовність якого варіюють у різних ізоформ CaMK2. Для цього сегменту характерні регіони з низьким ступенем складності і невпорядковані ділянки (Рис. 3.1.).

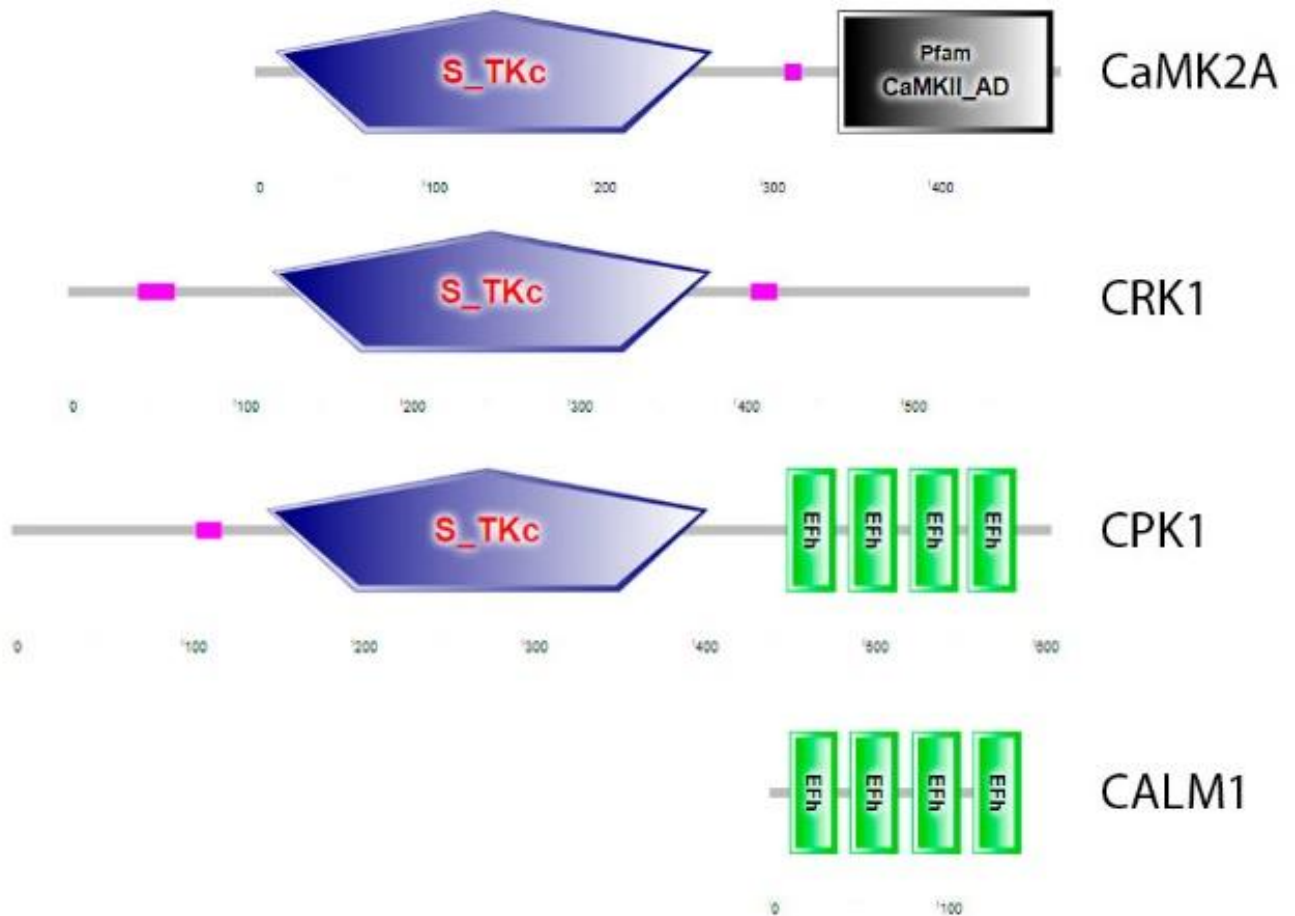


Рис. 3.1. Доменна архітектура CDPK- і CRK-протеїнкіназ з *A. thaliana* на прикладі CPK1 і CRK1 та тваринних CaMK2 і кальмодуліну 1. Синім п'ятикутником позначений серин/треоніновий кіназний домен, зеленими прямокутниками позначені Ca²⁺-зв'язуючі EF-мотиви, чорний прямокутник – домен асоціації CaMK2, рожеві ділянки - регіони з низьким ступенем складності (LCR).

Інші тваринні протеїнкінази вибірки продемонстрували доменну архітектуру, що у значній мірі відрізнялась від доменної архітектури Ca²⁺- та Ca²⁺/кальмодулін залежних протеїнкіназ *A. thaliana*. Так, протеїнкінази BRSK, окрім каталітичного домену, мають варіабельні N- та С-термінальні сегменти.

Останній містить домен асоціації з убіквітином. STK11 також складається з каталітичного домену, N- та C-термінальних сегментів. Для C-термінального сегмента характерні регіони з низьким ступенем складності і невпорядковані ділянки.

Амінокислотні послідовності протеїнкіназ CHK1 та CHK2 демонструють значні відмінності у своїй структурі. Протеїнкіназа CHK1 містить каталітичний домен та C-термінальний сегмент. До складу цього сегменту входить автоінгібіторний регуляторний домен. У випадку протеїнкінази CHK2, регуляторний домен знаходиться у N-кінцевому сегменті (Ng et al., 2004). Між регуляторним і каталітичним доменом у CHK2 знаходиться домен розпізнавання фосфопептидів FHA (forkhead-associated domain).

Протеїнкінази DAPK показують значні відмінності як у довжині послідовності, так і у доменній структурі. Варіабельною є C-кінцева область. DAPK1, на відміну від DAPK2 та DAPK3 має чітко виражений регіон анкіринових повторів та Ros-домен, характерний для малих ГТФаз. Також, DAPK1 містить так званий домен смерті (DD, Death domain), пов'язаний з сигнальними процесами при апоптозі.

Протеїнкінази MYLK2 і MYLK3 складаються з трьох частин – каталітичного домену, короткого C-термінального і варіабельного N-термінального сегменту, для якого характерні регіони з низьким ступенем складності і невпорядковані ділянки, що чергуються. MYLK1 має складнішу доменну архітектуру. Варіабельний N-термінальний сегмент MYLK1 містить шість імуноглобулін-подібних (Immunoglobulin I-set domain) і один FN3-домен (Fibronectin type III repeat). Між другим і третім імуноглобулін-подібними доменами є неструктурований регіон, специфічний для MYLK-кіназ. Також, MYLK1 містить один імуноглобулін-подібний домен у C-термінальному сегменті.

MARK-кінази показують спільний шаблон доменної архітектури, що складається з короткого N-термінального сегменту, каталітичного домену, домену асоціації з убіквітином та C-термінального варіабельного сегмента. Для

С-термінального сермента характерне чергування ділянок з низьким ступенем складності і невпорядкованих ділянок, а також наявність кіназо-асоційованого домену 1 (KA1, kinase associated domain 1) на С-кінці білка.

Протеїнкінази PKD1, PKD2, PKD3 також показують спільний шаблон доменної архітектури. N-термінальний сегмент протеїнкіназ містить два домени зв'язування діацилгліцеролу та ефірів форболу C1 та плекстрин-подібний домен (PH, Pleckstrin homology domain). N-термінальний сегмент протеїнкіназ типу D є варіабельним по структурі невпорядкованих ділянок і ділянок з низьким ступенем складності. Також до складу PKD входить каталітичний домен та короткий С-термінальний сегмент.

Характерною особливістю RSK-кіназ є наявність двох серин/треонінових кіназних доменів. Центральний сегмент містить регуляторний домен, характерний для протеїнкіназ підродини AGC (AGC-kinase C-terminal domain). N- та С-термінальні сегменти містять ділянки з низьким ступенем складності.

Протеїнкіназа DCLK1 складається з кіназного домену, короткого С-кінцевого сегменту та N-термінального сегменту, що містить два даблкортинових домени (DC, DCX, Doublecortin domain). DC-домени зв'язують тубуліни і стимулюють полімеризацію мікротрубочок (Manka and Moores, 2020). Для С-термінального сегменту та регіону між каталітичним та другим даблкортиновим доменом характерне чергування невпорядкованих ділянок і ділянок з низьким ступенем складності.

KALRN і TRIO мають складну, але схожу доменну архітертуру. Кіназний домен знаходиться у С-термінальній частині цих протеїнів. Поряд з каталітичним, у TRIO знаходиться імуноглобулін-подібний домен, а у KALRN - імуноглобулін-подібний домен та фібронектин-подібний домен FN3 (Fibronectin type 3 domain). У N-термінальній частині KALRN і TRIO знаходиться ліпід-вз'язуючий домен CRAL/TRIO і декілька спектринових повторів. Також для цих білків характерна наявність доменів, гомологічних до родини факторів обміну гуаніну Dbl (DH, Dbl-homologous domain) та доменів, гомологічних плекстрину (PH, Pleckstrin homology domains). Між парами DH/PH-доменів знаходиться (Src

homology 3 domain), домен гомологічний до родини кіназ Src. SH3 пов'язаний з другим DH доменом неструктурованою лінкерною ділянкою. KALRN, на відміну від TRIO не має другого PH домена. Для сегменту, що пов'язує другу пару DH/PH-доменів у TRIO і другий DH-домен у KALRN та імуноглобулін-подібний домен характерна наявність ділянок з низьким ступенем складності.

TTN – великий білок, що містить у своїй структурі 244 домени, пов'язані неструктурованими ділянками. N-термінальна частина білка містить два імуноглобулін-подібні домени та сім Z-повторів (Titin Z domain), що необхідні для зв'язування з актиніном, серію з 77 імуноглобулін-подібних доменів та закінчується ділянкою, що містить PEVK-мотиви. Середній сегмент білка складається з серії FN3-доменів (Fibronectin type III repeat) і імуноглобулін-подібних доменів. Більша частина цієї серії має паттерн чергування доменів FN3-FN3-FN3-Ig-FN3-FN3-FN3-Ig-FN3-FN3-Ig. С-термінальна частина TTN представлена серин/треоніновим кіназним доменом та сектором, що містить десять імуноглобулін-подібних доменів.

Виходячи з результатів аналізу доменної архітектури протеїнкіназ вибірки, можна сказати, що CDPK- і CRK-кінази з *A. thaliana* мають спільні риси у своїй доменній структурі з тваринними CaMK2, що корелює з гіпотезою про їх спільне еволюційне походження (Valmonte et al., 2014). Враховуючи гетерогенність доменної архітектури тваринних протеїнкіназ вибірки, для наступного дослідження були використані послідовності каталітичних доменів, як єдиних консервативних структур, що присутні у всіх протеїнкіназ вибірки.

3.2. Результати пошуку за подібністю каталітичних доменів Ca²⁺- та Ca²⁺/кальмодулін залежних протеїнкіназ *A. thaliana* до каталітичних доменів Ca²⁺/кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, що беруть участь у регуляції мікротрубочок

Для визначення рослинних протеїнкіназ CDPK та CRK кіназ, здатних регулювати мікротрубочки, був проведений пошук, що базується на гомології до

амінокислотних послідовностей тваринних протеїнкіназ, які регулюють цитоскелет. З огляду на доменну архітектуру, ступінь спорідненості визначався на основі подібності послідовностей каталітичних доменів досліджуваних кіназ, як найбільш консервативних структур у складі цих білків. За допомогою спеціалізованих інструментів (SMART, Pfam, PROSITE та InterPro) були визначені межі каталітичних доменів 34-х CDPK і 8-ми CRK з *A. thaliana* та межі каталітичних доменів кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, для яких існують експериментальні докази їх зв'язку з регуляцією цитоскелету. (Додаток Б). Було проведене множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей спільної групи каталітичних доменів рослинних і тваринних протеїнкіназ, що дозволило виконати їх кластеризацію за алгоритмом зв'язування найближчих сусідів (N-J). Загалом вибірка нараховувала 83 протеїнкінази: 42 рослинного і 41 тваринного походження.

Як видно з дендрограми (Рис. 4.2), CDPK та CRK протеїнкінази арабідопсису утворюють окрему, чітко виражену субкладу, що свідчить про високий рівень їх подібності між собою. Ця субклада входить до спільної групи з протеїнкіназами людини і миші CaMK2, DCLK1 та одним з каталітичних доменів RSK. Таким чином, вищевказані групи тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ, що регулюють цитоскелет, виявилися найближчими гомологами рослинних CDPK і CRK. Це потенційно може вказувати на їх функціональну подібність. Субклада що поєднала CDPK і CRK з арабідопсису в свою чергу поділяється на дві менші субклади: до однієї входить група CRK протеїнкіназ та протеїнкіназ CPK16, CPK18 та CPK28, до іншої – решта CDPK-протеїнкіназ. Слід зазначити, що каталітичні домени гомологічних контрольних послідовностей з людини і миші виявили значний рівень спорідненості і у всіх випадках утворювали пари під час кластеризації послідовностей.

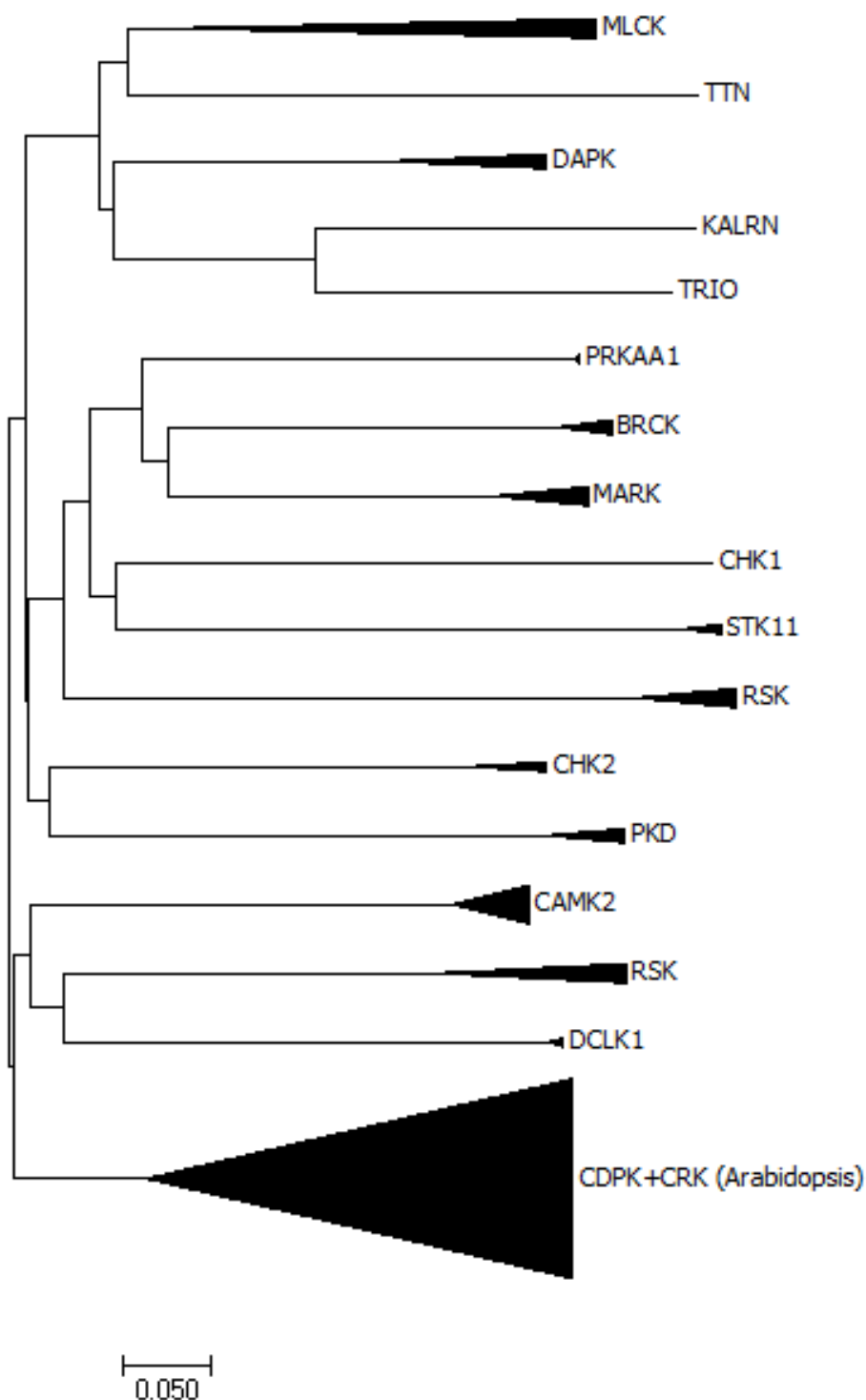


Рис. 4.2. Результати NJ-кластеризації каталітичних доменів тваринних кальмодулін-залежних і рослинних Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ.

З метою більш точного визначення положення рослинних протеїнкіназ CDPK і CRK нами було виконано індивідуальне вирівнювання послідовностей окремих рослинних протеїнкіназ проти загальної вибірки контрольних

послідовностей тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ. Результати кластеризації з використанням методу поєднання найближчих сусідів виявили, що не всі представники рослинних Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ утворюють спільні клади з DCLK1, RSK домен 1, CaMK2. Загалом було виявлено 3 типи розташування протеїнкіназ у кладистичному дереві (Рис. 4.3).

До першого і найпоширенішого типу ввійшли протеїнкінази з *A. thaliana*, найбільш подібні до тваринних протеїнкіназ клади DCLK1, RSK домен 1, CaMK2. При цьому нами також було визначено певні особливості у їх об'єднанні. Так, послідовності кіназних доменів СРК14, СРК32 та СРК7 виявили найбільшу спорідненість до кіназних доменів тваринних протеїнкіназ CaMK2. Група протеїнкіназ, що включає СРК11, СРК4, СРК12, СРК6, СРК5, СРК26, СРК21, СРК15, СРК23, СРК22, СРК10, СРК8, СРК13 і СРК24, виявилась найбільш близькою до тваринних протеїнкіназ CaMK2 і DCLK1. За філогенетичною дистанцією, протеїнкіназа СРК21 має дещо більшу подібність до CaMK2, ніж до протеїнкінази DCLK1. Протеїнкінази СРК34 та СРК17 виявили найбільшу подібність до тваринних протеїнкіназ RSK. Ca^{2+} -залежні протеїнкінази СРК30, СРК1, СРК2, СРК25, СРК3, СРК19, СРК31, СРК33, СРК9, СРК29 виявили подібність до протеїнкіназ клади, що включає DCLK1, RSK домен 1, CaMK2. Слід зазначити, що згідно філогенетичних дистанцій, ця група наближається до тваринних протеїнкіназ CaMK2 та DCLK1, але не до протеїнкіназ RSK.

До другого типу розташування у N-J дереві належать протеїнкінази, що опинилися у кладі, котра об'єднала тваринні протеїнкінази MLCK, TTN, DAPK, KALRN та TRIO. Подібність до цієї субклади виявили протеїнкінази СРК20 і СРК27, з найбільшим наближенням до тваринних DAPK.

Також три кальцій-залежні протеїнкінази з арабідопсису кластеризувалися за третім типом. Це протеїнкінази СРК16, СРК18 і СРК28, що виявили подібність до тваринних протеїнкіназ PKD і СНК2. При цьому, всі три протеїнкінази мали найбільшу подібність до протеїнкінази СНК2.

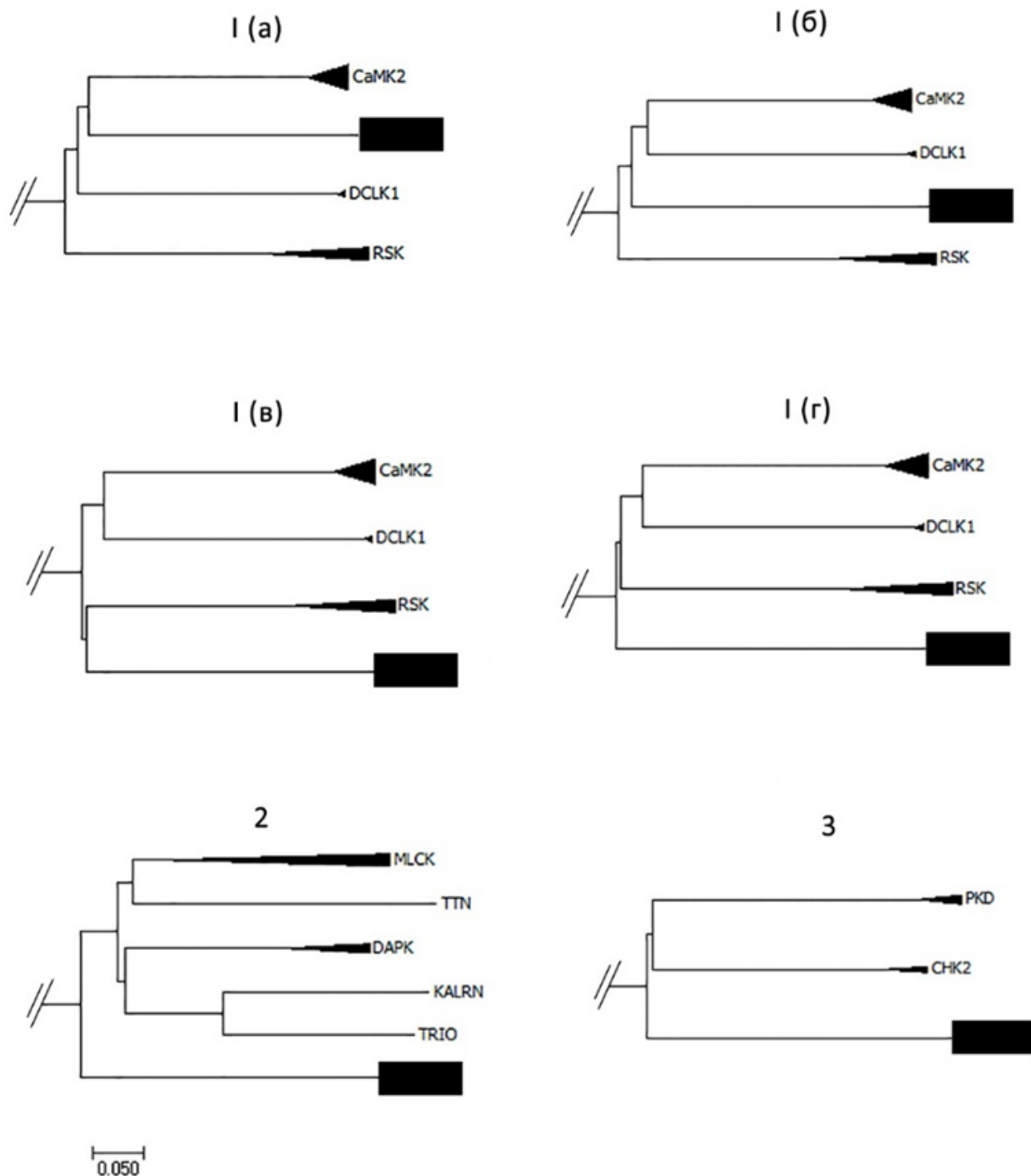


Рис. 4.3. Результати поєднання шляхом індивідуальної кластеризації CDPK і CRK з арабідопсису і тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ.

Трикутниками позначені субклади, які поєднують однотипні протеїнкінази (CaMK2, RSK, DCLK1, MLCK, DAPK, PKD, CHK2). Прямокутниками позначені протеїнкінази *A. thaliana*, що утворюють клади за відповідним типом.

Під час спільної кластеризації усіх тваринних кальмодулін-залежних та рослинних Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїназ протеїнкінази СРК16, СРК18 і СРК28, тобто протеїнкінази, що об'єднуються за третім типом, утворюють окрему субкладу з СРК протеїнкіназами. Проте індивідуальна кластеризація СРК з контрольними послідовностями виявила значні відмінності у їх філогенетичних дистанціях по відношенню до різних тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ. Так, з 8-ми протеїнкіназ СРК арабідопсису лише дві, а саме протеїнкінази СРК4 і СРК6, кластеризуються за третім типом. Протеїнкінази СРК3 і СРК8 входять до другого типу, як і протеїнкінази СРК20 і СРК27. Проте, на відміну від СРК20 і СРК27, вони не виявляють чітко вираженої спорідненості саме до протеїнкіназ DАРК. Протеїнкінази СРК1, СРК2, СРК5 і СРК7 увійшли до першого типу. При цьому вони виявляють найбільшу подібність до клади, що об'єднує тваринні протеїнкінази DСLК1, RSK домен 1, СаМК2, а протеїнкіназа СРК2 – до протеїнкіназ RSK.

Отримані результати кладистичного аналізу дозволяють зробити припущення, що протеїнкінази СРК14, СРК32, СРК7, СРК21 з *A. thaliana* та протеїнкінази СаМК2 з *H. sapiens* і *M. musculus* можуть виконувати у клітині подібні функції. Встановлено, що СаМК2 приймає участь у фосфорилуванні мікротрубочок (Huang et al., 2001; Holmfeldt et al., 2005; Hong et al., 1996; Lu et al., 2002). Так, СаМК2 γ впливає на динаміку мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок МСАК (Holmfeldt et al., 2005). Ізоформа протеїнкінази СаМК2 δ регулює актиновий і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів миші (Hong et al., 1996). Протеїнкінази СаМК2 фосфорилують MAP білки, такі як MAP2 і MAP6 (Lu et al., 2002). Таким чином, враховуючи значну гомологію, подібні функції тваринної протеїнкінази СаМК2 також можуть бути притаманні і рослинним гомологам з *A. thaliana*, а саме: СРК14, СРК32 і СРК7.

Протеїнкінази СРК17, СРК34 та СРК2 рослинного походження виявилися найближчими гомологами протеїнкіназ RSK з *H. sapiens* про що свідчать результати спільної кластеризації з групами CDPK і СРК протеїнкіназ з

A. thaliana. RSK беруть участь уряді сигнальних каскадів і безпосередньо регулюються протеїнкіназами MAPK1 і MAPK3 (Shimamura et al., 2000). Вони також фосфорилують β -субодиницю шапероніна CCT (CCT2) по залишку Ser260, який впливає на організацію актинового і тубулінового цитоскелету (Abe et al., 2009). Враховуючи подібність послідовностей, можна припустити, що протеїнкінази CPK17, CPK34 та CRK2 також можуть бути залучені до регуляції структури актинового і тубулінового цитоскелету рослин.

Протеїнкінази CPK20 і CPK27 виявили досить високий рівень подібності до DAPK (Death Associated Protein Kinases) людини і миші. Останні є елементами численних сигнальних шляхів, пов'язаних з запрограмованою клітинною смертю. Протеїнкіназа DAPK1 (Death Associated Protein Kinase 1) регулює активність білку MART та, відповідно, динаміку мікротрубочок (Kim et al., 2014; Duan et al., 2013). Окрім прямого фосфорилування білку MART за залишком Thr231, DAPK1 інгібує регулятор MART – Pin1 завдяки фосфорилуванню його залишку Ser71 (Kim et al., 2014). Тваринна DAPK1 може зв'язуватись з MAP1B, асоціюючись таким чином з актиновим і тубуліновим цитоскелетом. Протеїнкіназа DAPK1 фосфорилує білок MAP1B, що стимулює автофагію і мембранний блеббінг (Harrison et al., 2008). Також DAPK1 має зв'язок з фосфорилуванням регуляторів динаміки актинового цитоскелету при TNF-опосередкованому апоптозі, зокрема фосфорилує кофілін по Ser3 і LIMK по Thr508 (Ivanovska et al., 2013). DAPK1 впливає на фосфорилування тропоміозину-1, регулюючи, таким чином, формування стресових фібрил (Houle et al., 2007). Фосфорилуючи MARK1 і MARK2, DAPK1 також впливає на фосфорилування MART, MAP2, MAP4, що у свою чергу, призводить до дестабілізації мікротрубочок (Wu et al., 2011). Ґрунтуючись на виявленій гомології, можна зробити припущення, що рослинні протеїнкінази CPK20 і CPK27 також можуть бути залучені у процеси регуляції актинового і тубулінового цитоскелету.

Найближчими рослинними гомологами СНК2 людини і миші серед CPK і CRK кіназ арабідопсису виявились протеїнкінази CPK16, CPK18, CPK28, CRK4

та CRK6. На нашу думку, це може бути свідченням того, що дані Ca^{2+} - та кальмодулін-залежні протеїнкінази *A. thaliana* також можуть розглядатись з позиції потенційних регуляторів структурно-функціональних властивостей мікротрубочок. Відомо, що тваринні протеїнкінази СНК регулюють контрольні точки клітинного циклу при переході G_1 -S, у S та переході G_2 -M. За даними літератури, тваринні СНК беруть участь у регуляції організації веретена поділу, метафазної пластинки та прогресії клітинного циклу. Інгібування протеїнкінази СНК2 призводить до порушення локалізації γ -тубуліну у центросомах і веретена поділу (Dai et al., 2014). Тваринна СНК2 колокалізується і взаємодіє з PLK1 - важливим регулятором збірки веретена поділу, сергегації хромосом, та виходу з мітозу. Вважається, що саме протеїнкіназа СНК2 регулює локалізацію PLK1 в контрольній точці організації веретена поділу (Dai et al., 2014).

Узагальнені результати визначення можливої участі Ca^{2+} і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *A. thaliana* у регуляції цитоскелету на підставі їх гомології до кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, наведено у Табл. 3.1.

Таблиця. 3.1

Кальмодулін-залежні протеїнкінази людини і миші, що пов'язані з регуляцією цитоскелету та найбільш споріднені до них СРК і СРК арабідопсису

№ з/п	Кальмодулін-залежні протеїнкінази з <i>H. sapiens</i> і <i>M. musculus</i>	Найближчі гомологи з <i>A. thaliana</i> *
1.	CaMK2 CaMK2A_HUMAN (Q9UQM7) CaMK2B_HUMAN (Q13554) CaMK2D_HUMAN (Q13557) CaMK2G_HUMAN (Q13555) CaMK2A_MOUSE (P11798)	СРК7 (At5g12480, Q38873) СРК14 (At2g41860, P93759) СРК32 (At3g57530, Q6NLQ6) СРК21 (At4g04720, Q9ZSA2)

	CaMK2B_MOUSE (P28652) CaMK2D_MOUSE (Q6PHZ2) CaMK2G_MOUSE (Q923T9)	
2.	RSK RSK1_HUMAN (Q15418) RSK2_HUMAN (P51812) RSK3_HUMAN (Q15349) RSK4_HUMAN (Q9UK32)	CPK17 (At5g12180, Q9FMP5) CPK34 (At5g19360, Q3E9C0) CRK2 (At3g19100, Q9LJL9)
3.	DAPK DAPK1_HUMAN (P53355) DAPK2_HUMAN (Q9UIK4) DAPK3_HUMAN (O43293) DAPK1_MOUSE (Q80YE7)	CPK20 (At2g38910, Q9ZV15) CPK27 (At4g04700, Q9ZSA4)
4.	CHK2 CHK2_HUMAN (O96017) CHK2_MOUSE (Q9Z265)	CPK16 (At2g17890, Q7XJR9) CPK18 (At4g36070, Q1PE17) CPK28 (At5g66210, Q9FKW4) CRK4 (At5g24430, Q9FIM9) CRK6 (At3g49370, Q9SG12)

* - найближчі гомологи було встановлено за результатами кластеризації послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ CDPK і CRK з *A. thaliana*.

Таким чином, нами визначено групу рослинних гомологів, філогенетично близьких до контрольної групі тваринних протеїнкіназ, для яких експериментально доведена участь у регуляції цитоскелету. Було проаналізовано філогенетичні дистанції між послідовностями кіназних доменів та знайдені найближчі гомологи серед протеїнкіназ CPK і CRK з *A. thaliana*. Згідно результатами N-J кластеризації, найбільшу подібність до контрольних протеїнкіназ ссавців мають наступні протеїнкінази *A. thaliana*: CPK7, CPK14, CPK21 і CPK32 до тваринних CaMK2; CPK17, CPK34 і CRK2 до тваринних RSK;

СРК20 і СРК27 до тваринних DАРК, а також, СРК16, СРК18, СРК28, СРК4 і СРК6 до тваринних СНК2. Таким чином, використовуючи методи класичної біоінформатики, нами було ідентифіковано групу рослинних гомологів, що потенційно можуть брати участь у регуляції цитоскелету (як мікротрубочок, так і мікрофіламентів). У подальшому саме ці протеїнкінази будуть використані як об'єкти експериментальних досліджень з метою отримання доказів, їх зв'язку з регуляцією структури, функції та динаміки рослинного цитоскелету.

3.3. Результати пошуку профілів сайтів фосфорилування Са²⁺/кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців з наступною їх кластеризацією і створенням спільних профілів

Відомо, що кальмодулін-залежні протеїнкінази тварин здатні фосфорилувати амінокислотні залишки по трьох характерних мотивах: 1) класичний мотив - ϕ -₅-x-R-₃-x-x-S₀-, мотив АСА2 - [R-₉-R-₈-x-R-₆]- ϕ -₅-x-x-x-x-S₀-x-R-₊₂ і мотив АСS - ϕ -₃-R-₂- ϕ -₁-S₀- ϕ -₊₁-x-K-₊₃-R-₊₄. (ϕ - гідрофобний амінокислотний залишок). Однак, для рослинних об'єктів, дані профілі показали достатньо низьку специфічність. Тим не менш, в останні роки, було ідентифіковано значну частину нових експериментально підтверджених сайтів фосфорилування, включно з сайтами, що асоціюються з кальцій-залежними протеїнкіназами.

Одним з спеціалізованих репозиторіїв посттрансляційних модифікацій є ресурс PhosphoSitePlus, основою якого є колекція експериментально доведених сайтів фосфорилування. Інформація з даного репозиторію була використана як основа для створення максимально повної вибірки сайтів, що асоційовані з кальмодулін-залежними протеїнкіназами і створення відповідних пошукових профілей. Загалом було відібрано 494 послідовності сайтів кальцій-залежних протеїнкіназ ссавців (у форматі Xp±7). Для цих сайтів було точно встановлено, як положення сайтів, що модифікуються, так і протеїнкінази, що реалізують ці модифікації.

Таким чином, для CaMK1A було відібрано 44-ри сайти фосфорилювання, з них 14-ть у послідовностях білків *H. sapiens* (Ser332 CAMK2A_iso2, Ser1156 EIF4G3, Ser47 GCM1, Ser259 HDAC5, Ser498 HDAC5, Ser178 HDAC7, Ser220 HDAC9, Ser451 HDAC9, Ser855 HSL, Ser53 K18, Ser20 MRLC1, Ser276 NUMB, Thr157 p27Kip1, Thr198 p27Kip1, Ser59 RPS19, Ser1156 EIF4G3, Ser391 HSP90A, Thr624 HSP90A, Thr89 HSP90B).

22-а сайти фосфорилювання для CaMK1A були знайдені у *R. norvegicus* (Ser516 ARHGEF7, Thr108 CAMKK1, Ser133 CREB, Ser656 DRP1, Ser871 HMGCR, Ser91 MARK2, Ser92 MARK2, Thr294 MARK2, Ser741 nNOS, Ser275 NUMB, Ser294 NUMB, Ser304 NUMBL, Thr48 PKLR, Thr53 PKLR, Thr17 PKLR_iso2, Thr22 PKLR_iso2, Thr484 QIK, Ser59 RPS19, Thr322 SIK, Ser9 SYN1, Ser19 TH, Ser40 TH)

6-ть сайтів знайдено у *M. musculus* (Ser178 HDAC7, Ser344 HDAC7, Ser479 HDAC7, Thr170 p27Kip1, Thr197 p27Kip1, Ser59 RPS19), 1-н сайт у *Oryctolagus cuniculus* (Ser2843 RYR1) та 1 у *Bos taurus* (Ser9 SYN1).

Також було відібрано 4-и сайти фосфорилювання для CaMK1B: S1156 EIF4G3, S391 HSP90AA1, T624 HSP90AA1 та T89 HSP90AB1 з *H. sapiens*. Для CaMK1D і CAMK1G були визначено по 1-му сайту фосфорилювання. Це Ser176 TPD52 з *H. sapiens* для CaMK1D і S1156 EIF4G3 *H. sapiens* для CAMK1G.

Найбільше було відібрано підтверджених сайтів фосфорилювання для для CaMK2A - їх кількість становила 341. З них 109-ть у послідовностях білків *H. Sapiens* (Ser272 5-LO, Thr218 APOBEC3G, Ser325 C/EBP-beta, Thr286 CAMK2A, Thr305 CAMK2A, Thr306 CAMK2A, Ser116 CARD11, Ser706 CD44, Thr456 CHAT_iso3, Ser109 CLCN3, Ser515 cPLA2, Thr332 CTNNB1, Thr472 CTNNB1, Ser552 CTNNB1, Ser2 DAT, Ser4 DAT, Ser7 DAT, Ser12 DAT, Ser13 DAT, Ser768 EGFR, Ser1070 EGFR, Ser1071 EGFR, Ser1081 EGFR, Ser1166 EGFR, Ser251 Ets-1, Ser257 Ets-1, Ser282 Ets-1, Ser285 Ets-1, Ser246 Ets-2, Ser310 Ets-2, Ser313 Ets-2, Thr234 FBX43, Ser2523 FLNA, Ser261 GFAT_HUMAN, Thr107 GLO1, Ser567 GluR1, Thr140 H1R, Thr142 H1R, Ser396 H1R, Ser398 H1R, Ser259 HDAC5, Ser498 HDAC5, Thr1172 HER2, Ser230 HSF1, Thr38 ICAP1, Thr788 ITGB1, Thr789

ITGB1, Thr311 ITPKA, Ser687 KIF3A, Thr180 Kir6.2, Thr224 Kir6.2, Ser426 LXR-beta, Thr145 mAChR, Ser268 MOR-1, Ser1303 NMDAR2B, Ser475 NOX5_iso4, Ser782 NSDDR, Ser808 NSDDR, Ser276 NUMB, Ser10 p27Kip1, Thr17 PLB, Ser537 PLCB3, Ser130 PPP1R14A, Thr154 RCHY1, Ser155 RCHY1, Ser273 RRAD, Ser2808 RYR2, Ser2814 RYR2, Ser44 SAPAP1iso2, Thr5 SARCO, Ser1501 separase, Ser13 SERT, Ser110 SMAD2, Ser240 SMAD2, Ser260 SMAD2, Ser2437 SMRT, Ser2464 SMRT, Ser129 SNCA, Ser213 SPR, Ser103 SRF, Ser16 STMN1, Ser307 Tau_iso2, Ser315 Tau_iso2, Thr231 Tau_iso5, Ser235 Tau_iso5, Ser365 Tau_iso5, Ser373 Tau_iso5, Thr173 Tau_iso6, Ser177 Tau_iso6, Ser338 Tau_iso6, Ser346 Tau_iso6, Thr231 Tau_iso8, Ser235 Tau_iso8, Ser262 Tau_iso8, Ser396 Tau_iso8, Ser404 Tau_iso8, Ser416 Tau_iso8, Ser157 Telethonin, Ser161 Telethonin, Ser19 TH, Ser71 TH, Ser19 TH_iso2, Ser67 TH_iso2, Ser19 TH_iso3, Ser40 TH_iso3, Ser19 TH_iso4, Ser35 TH_iso4, Ser44 TH_iso4, Ser19 TPH2, Ser83 Vimentin).

119-ть сайтів було відібрано у послідовностях білків *R. norvegicus* (Ser60 14-3-3 beta, Ser65 14-3-3 beta, Thr729 APP, Ser476 ASIC1, Ser477 ASIC1, Thr189 BRSK1, Ser784 CACNA1B, Ser896 CACNA1B, Ser2126 CACNA1B, Thr549 CACNB2, Thr253 CAMK2A, Ser279 CAMK2A, Thr286 CAMK2A, Thr305 CAMK2A, Thr306 CAMK2A, Thr310 CAMK2A, Ser314 CAMK2A, Thr254 CAMK2B, Thr287 CAMK2B, Ser315 CAMK2B, Ser332 CAMK4, Ser333 CAMK4, Ser337 CAMK4, Ser341 CAMK4, Ser91 CDK5R1, Thr171 CPEB, Ser133 CREB, Ser142 CREB, Ser13 DAT, Ser39 DLG1, Ser232 DLG1, Ser229 DRD3, Ser244 GJA1, Ser255 GJA1, Ser257 GJA1, Ser296 GJA1, Ser297 GJA1, Ser306 GJA1, Ser314 GJA1, Ser325 GJA1, Ser328 GJA1, Ser330 GJA1, Ser364 GJA1, Ser365 GJA1, Ser369 GJA1, Ser372 GJA1, Ser373 GJA1, Ser859 GluR KA2, Ser892 GluR KA2, Thr976 GluR KA2, Ser645 GluR1, Ser849 GluR1, Ser862 GluR4, Ser865 HSL, Ser150 IP3R2, Thr77 kalirin, Ser438 Kv4.2, Ser459 Kv4.2, Ser569 Kv4.3, Ser1887 LRP4, Ser1900 LRP4, Ser826 LRRC7, Thr827 LRRC7, Thr145 mAChR M4, Ser421 MECP2, Thr871 mGluR1, Ser261 MOR-1, Ser266 MOR-1, Thr370 MOR-1, Thr1940 MYH9, Ser336 NEUROD1, Ser1303 NMDAR2B, Ser847 nNOS, Ser304 NUMBL, Ser6 PHOS, Ser36 PHOS, Ser54 PHOS, Ser73 PHOS, Ser106 PHOS, Ser411 PPP3CA,

Ser73 PSD-95, Ser274 RP3A, Ser241 RIMS1, Ser287 RIMS1, Ser120 RPT6, Ser2798 RYR2, Ser2804 RYR2, Ser389 SAPAP1, Ser691 SAPAP1, Ser947 SAPAP1, Ser1012 SAPAP2, Ser930 SAPAP3, Thr5 sarcolipin, Ser38 SERCA2, Ser783 SHANK1, Ser694 SHANK3, Ser1511 SHANK3, Ser99 Spinophilin, Ser100 Spinophilin, Ser46 SPR, Ser196 SPR, Ser214 SPR, Ser16 STMN1, Ser566 SYN1, Ser603 SYN1, Ser765 SynGAP, Ser766 SynGAP, Ser780 SynGAP, Ser1073 SynGAP, Ser1114 SynGAP, Ser1118 SynGAP, Ser1121 SynGAP, Ser1138 SynGAP, Thr112 SYT1, Ser19 TH, Ser40 TH, Ser502 TRPV1, Thr704 TRPV1).

76-ть було відібрано у послідовностях білків у *M. musculus* (Ser88 Abi-1, Ser1077 ADCY3, Ser1487 CACNA1C, Ser1545 CACNA1C, Thr286 CAMK2A, Thr305 CAMK2A, Thr306 CAMK2A, Ser291 CPEB3, Ser298 CPEB3, Ser299 CPEB3, Ser419 CPEB3, Ser420 CPEB3, Ser443 CPEB3, Thr446 CPEB3, Ser133 CREM_iso3, Thr555 CRMP-2, Ser843 FAK_iso3, Ser27 FosB, Thr149 FosB, Thr180 FosB, Ser867 GABBR1, Ser409 GABRB1, Ser434 GABRB1, Ser406 GABRB3, Ser381 GABRG2, Ser393 GABRG2, Thr395 GABRG2, Ser326 GJC1, Thr337 GJC1, Ser381 GJC1, Ser382 GJC1, Ser384 GJC1, Ser385 GJC1, Ser387 GJC1, Ser393 GJC1, Ser849 GluR1, Ser780 gp130, Ser117 HOMER1, Ser216 HOMER2, Ser1029 KIF17, Thr694 KIF3A, Ser698 KIF3A, Ser56 MCU, Ser91 MCU, Ser25 MYBPC3, Ser47 MYBPC3, Thr50 MYBPC3, Ser105 MYBPC3, Ser210 MYBPC3, Ser273 MYBPC3, Ser282 MYBPC3, Thr290 MYBPC3, Ser302 MYBPC3, Ser307 MYBPC3, Thr380 MYBPC3, Ser410 MYBPC3, Thr87 MYOG, Ser58 NFL, Thr739 NLGN1, Ser116 PEA-15, Ser54 PHOS, Ser16 PLB, Thr17 PLB, Ser180 PTPRA, Ser204 PTPRA, Ser2807 RYR2, Ser2813 RYR2, Thr5 sarcolipin, Ser16 STMN1, Ser605 SYN1, Ser19 TPH2, Thr487 TRPC6, Ser61 VAMP2, Ser39 Vimentin, Ser83 Vimentin, Ser15 WEE1B).

Окрім *H. sapiens*, *R. norvegicus* і *M. musculus*, були відібрані сайти фосфорилування білків: 15 у *B. taurus* (Thr139 KCNMA1, Ser210 MYP0, Ser233 myelin P0, Ser58 NFL, Ser67 NFL, Ser70 NFL, Ser568 SYN1, Ser605 SYN1, Ser423 Tau, Thr191 TNNT2, Ser26 Vimentin, Ser39 Vimentin, Ser66 Vimentin, Ser72 Vimentin, Ser412 Vimentin), 10 у *Gallus gallus* (Ser26 Caldesmon, Ser59 Caldesmon,

Ser73 Caldesmon, Thr484 Caldesmon, Ser490 Caldesmon, Ser602 Caldesmon, Ser635 Caldesmon, Ser741 Caldesmon, smMLCK_CHICK, smMLCK_CHICK), 8 у *O. cuniculus* (Ser439 CACNA1C, Ser1517 CACNA1C, Ser1575 CACNA1C, Ser1700 CACNA1C, Ser1512 CACNA1C_iso4, Ser1570 CACNA1C_iso4, Ser1575 CACNA1S, Ser48 PPP1R3A), 2 у *Canis familiaris* (Ser16 PLB, Thr17 PLB), 1 у *Cavia porcellus* (Thr1603 CACNA1C), 1 у *Cricetulus griseus* (Ser116 PEA-15)

Для CaMK2B було відібрано 55-ть сайтів фосфорилювання:

5-ть для білків *H. sapiens* (Thr183 AMPKA1, Ser471 Occludin, Ser349 SAPAP1 iso2, Ser393 SAPAP1 iso2, Ser16 STMN1) та 50 для *R. norvegicus* (Thr183 AMPKA1, Thr253 CAMK2A, Thr286 CAMK2A, Ser314 CAMK2A, Thr254 CAMK2B, Ser280 CAMK2B, Thr287 CAMK2B, Thr306 CAMK2B, Thr307 CAMK2B, Thr311 CAMK2B, Ser315 CAMK2B, Thr320 CAMK2B, Thr321 CAMK2B, Thr325 CAMK2B, Ser327 CAMK2B, Thr328 CAMK2B, Ser331 CAMK2B, Thr333 CAMK2B, Thr334 CAMK2B, Ser343 CAMK2B, Ser358 CAMK2B, Ser363 CAMK2B, Ser367 CAMK2B, Ser371 CAMK2B, Thr381 CAMK2B, Thr382 CAMK2B, Ser397 CAMK2B, Thr400 CAMK2B, Thr401 CAMK2B, Ser21 GSK3A, Ser9 GSK3B, Ser826 LRRC7, Thr827 LRRC7, Ser1392 LRRC7, Ser389 SAPAP1, Ser691 SAPAP1, Ser947 SAPAP1, Ser1012 SAPAP2, Ser930 SAPAP3, Ser783 SHANK1, Ser694 SHANK3, Ser1511 SHANK3, Ser99 Spinophilin, Ser100 Spinophilin, Ser765 SynGAP, Ser766 SynGAP, Ser1073 SynGAP, Ser1114 SynGAP, Ser1118 SynGAP, Ser1121 SynGAP).

Для CaMK2G відібрано 5-ть сайтів фосфорилювання: 2 для *H. sapiens* (Ser91 BAP37, Ser332 CAMK2A iso2), 2 для *B. taurus* (Ser545 ADCY1, Ser552 ADCY1) та 1 для *R. Norvegicus* (Thr45 Calmodulin)

Для CaMK4 було відібрано 20-ть підтверджених сайтів фосфорилювання, що включали 9-ть сайтів з послідовностей білків *H. sapiens* (Ser133 CREB, Ser259 HDAC5, Ser498 HDAC5, Ser544 hnRNP L, Ser536 NFkB-p65, Ser276 NUMB, Ser16 STMN1, Ser91 BAP37, Ser332 CAMK2A iso2), 7 з *R. norvegicus* (Ser133 CREB, Ser259 HDAC5, Ser498 HDAC5, Ser544 hnRNP L, Ser536 NFkB-p65, Ser276

NUMB, Ser16 STMN1, Ser91 BAP37, Ser332 CAMK2A iso2), 2 з *M. musculus* (Ser301 CBP, Ser780 gp130) і 2 з *B. taurus* (Ser545 ADCY1, Ser552 ADCY1)

Для CaMKK1 було відібрано 14-ть підтверджених сайтів фосфорилування, куди входили 7-м сайтів для білків *H. sapiens* (Thr183 AMPKA1, Thr205 BRSK1 iso2, Thr177 CAMK1A, Thr180 CAMK1D, Ser12 CAMK4, Ser13 CAMK4, Thr200 CAMK4), 6 з *R. norvegicus* (Thr183 AMPKA1, Thr205 BRSK1 iso2, Thr177 CAMK1A, Thr180 CAMK1D, Ser12 CAMK4, Ser13 CAMK4, Thr200 CAMK4) та 1 з *M. musculus* (Thr177 CAMK1A).

Для CaMKK2 було відібрано 9-ть підтверджених сайтів фосфорилування, з яких 6 було знайдено у послідовностях білків *R. norvegicus* (Thr183 AMPKA1, Ser8 CAMK4, Ser11 CAMK4, Ser15 CAMK4, Ser353 CAMK4, Thr355 PACSIN1), 2 у *H. sapiens* (Thr183 AMPKA1, Thr85 CAMKK2) і 1 у *M. musculus* (Thr183 AMPKA1).

Відібрані послідовності були використані для створення профілів сайтів фосфорилування згідно протоколу PROSITE. У зв'язку з неприпустимістю зміщення позицій амінокислотних залишків у профілях сайтів фосфорилування (що є наслідком вставки гепів), послідовності завантажувались у програму ClustalX і конвертувались у формат *.aln без етапа вирівнювання.

Базуючись на аналізі колонок, був створений загальний паттерн по повній вибірці послідовностей. Однак, тестове сканування виявило вироджений характер такого глобального паттерну. Так, для вибірки з 17 ізотипів тубулінів *Arabidopsis thaliana* було ідентифіковано 70 можливих сайтів. У цілому, це відповідає усім теоретично можливим сайтам фосфорилування молекул тубуліна. Побудований профіль добре ідентифікував відомі (контрольні) сайти модифікацій, однак не дозволяв здійснити селективний пошук сайтів саме для кальцій-залежних протеїнкіназ. Через початкову гетерогенність групи кальцій-залежних протеїнкіназ виникла необхідність у розділенні повної вибірки (494 сайти) на більш специфічні групи. Критерієм такого розділення була подібність амінокислотних послідовностей сайтів фосфорилування, що

використовувались. Також це дозволило виключити ті протеїнкінази, що явно не здатні фосфорилувати рослинні тубуліни.

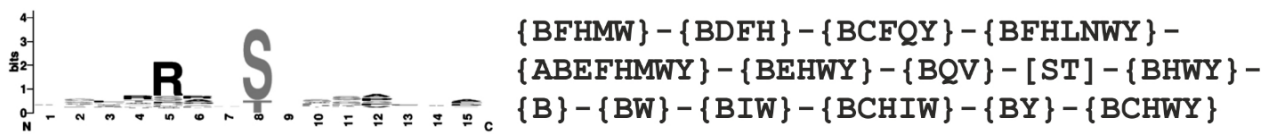


Рис. 3.4. Узагальнюючий лог і паттерн, що відповідають 494 депонованим в PhosphoSitePlus експериментально підтвердженим сайтам, що фосфорилуються тваринними кальцій-залежними протеїнкіназами.

Результати кластеризації за допомогою методу поєднання найближчих сусідів (метод N-J) дозволила визначити клади, що поєднують схожі сайти фосфорилування та асоційовані з ними протеїнкінази ссавців. Таким чином були отримані кластери різного порядку. Наступна робота полягала у створенні профілей окремих клад. В першу чергу були побудовані паттерни для шести клад першого порядку (Клада I-VI). Профілі створені за допомогою однолітерних аббревіатур амінокислот IUPAC, квадратними дужками позначена «будь-яка» з наведених, фігурними – «будь-яка, окрім наведених».

Клада I

{HIMY}-{CGMPWY}-{ACHMPWY}-{NCHIMVX}-{RDCQEHFWY}-
 {CEMW}-{ACMW}-[ST]-{BGHNR}-{BFHMQSWY}-{BCFHMWY}-
 {BHLNRVWY}-{BHMNQWY}-{BCFHIMW}-{BCFHMW}

Клада II

{BFHMQ}-{BDFH}-{BCFQY}-{BFHNLNMY}-{ABEFHMQY}-{BEHWY}-
 {BQV}-[ST]-{BHWY}-{B}-{BW}-{BIW}-{BCHIW}-{BY}-{BCHMY}

Клада III

{BCDEGHPV}-{BCHMPVWY}-{BCDEFIW}-{BCDFIMRW}-
 {AGHIKMRST}-{BDFHVV}-{BCDEHPWY}-[ST]-{BCDEHLNPWY}-
 {BCFHKQVWY}-[AFGIKLPST]-{BDEHIKNPW}-{BCDFIKLW}-
 {BCFHKPVW}-{BCHPW}

Клада IV

{CMV}-{BMV}-{BQW}-{BCFM}-{BCDFHMSWY}-{BCFHV}-{BCW}-
[ST]-{BCNPRWY}-{BCHMY}-{BHTW}-{BC}-{BCWY}-{BCHIW}-{BH}

Клада V

{BDEFHKMY}-{ABFIWY}-{BCDHPQTVW}-{ABCGKLNTY}-
[AHKLNQRSTV]-{BCDEFHPW}-{BCKLNQTVW}-[ST]-{ABDGNQRW}-
[ADEFGIKMQT]-{BFMRTWY}-[DEHLMQRSV]-{BCMSVWY}-{ABCMR}-
{BCGKMRWY}

Клада VI

{BCIQW}-{BCEFRWY}-{BCFHNSWY}-{BCHIMWY}-{ABCHIMQTWY}-
{ABDHIKY}-{BCHW}-[ST]-{BDGWY}-{BFTWY}-{BPQSW}-{BFMRWY}-
{BEFHM}-{BCDKQWY}-{BCGHLNQW}

3.4. Визначення Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ тварин, профілі фосфорилювання яких відповідають профілям фосфорилювання, передбаченими для послідовностей тубулінів *A. thaliana*

Результати повторного сканування виявили, що спільні паттерни п'яти клад з шести не показують достанього рівня специфічності. Лише профілю кладу III відповідав один консенсус (Ser147), присутній у обох ізотипів γ -тубуліна *A. thaliana* - TBG1 і TBG2. Тому були створені паттерни клад різних порядків. У більшості випадків (окрім кладу III) необхідний рівень специфічності був досягнутий лише на рівні кладу II порядку.

Клада I складається з двох кладу II порядку.

Клада I.1

{BDFHIMNSY}-[AFIKNQSTV]-[EGKLNQRST]-[AEPRSTWY]-
[AIKLMRSTV]-[FGIKNRVY]-S-[AFLMPSVW]-[ADEGIKPRV]-
{BCFHMQRSWY}-[AEGIKMQS]-[ADEGKLPRSV]-{BCDFGHIMWY}-
[ADEGILNP]

Клада I.2

{BHIKMTVWY}-{BCGMPQWY}-{ABCGHMPTWY}-[DEFGKLPQST]-
 [GKLNPNRST]-{BCEGMW}-[DENKLNPNSTY]-[ST]-{BGHMNPRVW}-
 {ABFHMQWY}-[ADEKNPQRST]-{BHLMNQRVWY}-{BHMNQWY}-
 {BCFHIMPWTW}-{BCFHMW}

Профілям клад I.1 та I.2 не відповідають жодні консенсусні послідовності з тубулінів *A. thaliana*.

Клада II.1

{BEFHNPWY}-{BDEFHQ}-{BCFIMQTWY}-{BEFHLMNWX}-
 {ABEFHIMWY}-{BDEGHTWY}-{BDEFGHLQTVW}-[ST]-{BDEFHLNQY}-
 {BFHLMNTWY}-{BDEFILMNQW}-{BCEFHLNQW}-{BCEFILMNWY}-
 {BEHIMNQWY}-{BCFHINQWY}

Перспективні консенсуси були знайдені у складі послідовностей ізотипів TBA3, TBA5, TBG1 і TBG2.

Клада II.2

{BFHLMW}-{BCDFHILMV}-{BCKNQVY}-{BCDHKLNSWY}-
 [DGILQRS]-[ADFGQRSTV]-{BCKMPQ}-[ST]-{BCMRW}-{BCHKWY}-
 {BCRWY}-{BCHIRWY}-{BIW}-{BSTVY}-{ADEFGIKLNPNQRS}-
 {BCHMTVWY}

Профілю клад II.2 не відповідають жодні консенсусні послідовності з тубулінів *A. thaliana*.

Клада IV.1

{BCHMV}-{BCGHMW}-{BFMQTW}-{BCDFM}-[AEGIKPQRTV]-
 {BCFHV}-{BCDLMTW}-[ST]-{BCFMNPRWY}-{BCFHMNWY}-{BHTW}-
 {ABCGK}-{BCFIWY}-{BCFHISW}-{BH}

Перспективні консенсуси були знайдені у складі послідовностей ізотипів TBA1, TBA2, TBA3, TBA4, TBA5, TBA6, TBB4 і TBB9.

Клада IV.2

{BCHLMPVW}-{BHIMSTWY}-[AFGIKLMPT]-{BCFGPRY}-
 [AEGKLNQRT]-{BCDFHPSTV}-{BCFHIVWY}-[ST]-{BCDHKNPTWY}-
 {ABCGHIMPVY}-[ADEFIKLPQS]-{BCHRW}

Профілю клади IV.2 не відповідають жодні консенсусні послідовності з тубулінів *A. thaliana*.

Клада V.1

{BDEFHKMY}-{ABFIWY}-{BCDHPQTVW}-{ABCGKLNTY}-
 [AHKLNQRSTV]-{BCDEFHPW}-{BCKLNQTVW}-[ST]-{ABDGNQRW}-
 [ADEFGIKMQT]-{BFMRTWY}-[DEHLMPQRSV]-{BCMSVWY}-{ABCMR}-
 {BCGKMRWY}

Перспективні консенсуси були знайдені у складі послідовностей ізотипів TBB1, TBB2, TBB3 и TBB5.

Клада V.2

[CEGILMPQV]-{BDEFGKMPSW}-[AEGKLTVY]-[DEIKPQSV]-
 [ADGIKRSV]-[ADEHIKLVY]-[DHKLTV]-[ST]-[EKNPRSTV]-[EHPRV]-
 [EHIKNRSV]-[AGLNPSVY]-[ADEFHGKMP]-[DEGHKNQSVY]-[ELRTVWY]

Профілю клади V.2 не відповідають жодні консенсусні послідовності з тубулінів *A. thaliana*.

Клада V.3

{BCDFIMPVY}-{ABCFHIMWY}-{BCFINTY}-{BFHIMTVWY}-
 [ADEIKLNPR]-{BCDFGPWY}-{BCHKMPQTWY}-[ST]-{BDHKNQW}-
 [CEFIKLNQR]-[ACDELNRS]-{BCFGHMPW}-{BCGHMPQT}-
 {ABCGILMQWY}-{ABFINPTWY}

Профілю клади V.3 не відповідають жодні консенсусні послідовності з тубулінів *A. thaliana*.

Клада V.4

{BCHMNPY}-{BGHRWY}-{BDFHV}-{BDFHINQW}-[ADKPQRSTV]-
 {BCDFIWY}-{BCEFWY}-[ST]-{BCFIKNTW}-{BFHKMWY}-{BCDIW}-
 {ABCFMWY}-{BDIMNTW}-{BFKPWY}-{BCHQWY}

Перспективні консенсуси були знайдені у складі послідовностей ізотипів TBA1, TBB1, TBB2, TBB3, TBB4, TBB5, TBB8, TBB9, TBB6 і TBG2 із *A. thaliana*.

Клада VI.1

{BCDHIKQWY}-[AGILMNPQSY]-[AEKLP]-{BCDGHIPVWY}-
[EKLNPR]-[EFGMLPQRST]-{BCDEGHW}-[ST]-{BDGIMWY}-{BDFGTWY}-
{BCDGPQSWY}-{BCDEFMRVWY}-{BCDEFHM}-{ABCDHKNQWY}

Клада VI.2

[DFGHMSTY]-[ADILMNTV]-[GMQRTV]-[DGLPQRST]-[DGLPSV]-
[LNPQRSTV]-[DGLNPQS]-S-[EHIKMPSV]-[DIS]-[CDFGKLMRT]-
[ADEGLPQSV]-[CDLQRS]-[AFGLNPS]-[ADFIKMPS]

Клада VI.3

[DEGKLNRSV]-[DGHKLMPSV]-[DGIKQR]-[DERSTV]-[FGLRSV]-
[CLMNSW]-[EGKPRS]-[ST]-[ALNPSV]-[CEGHS]-[AGLY]-[CEPSTV]-[ALPR]-
[EGHMNP]-[DERY]

Профілям клад VI.1, VI.2 та VI.3 не відповідають жодні консенсусні послідовності з тубулінів *A. thaliana*.

Усього було ідентифіковано 43 потенційних сайти фосфорилування для всіх ізотипів α -, β - и γ -тубуліну *A. thaliana*. Хіти цих паттернів відповідали консенсусам сайтів, по яким відбувається фосфорилування тваринних протеїнкіназ: KRT18 протеїнкіназою CAMK1A у *H. sapiens*, KIF3A протеїнкіназою CAMK2A у *H. sapiens*, KKCC2 протеїнкіназою CAMKK2 у *H. sapiens* і Chrm4 протеїнкіназою CAMK2A у *R. norvegicus*. Для визначення сайтів найбільш близьких до відомих сайтів тваринних протеїнкіназ, відібрані консенсусні послідовності з молекул тубулінів *A. thaliana* були додані (у форматі $X_{\pm 7} / *.fasta$) до існуючої контрольної вибірки 494 послідовності сайтів кальцій-залежних протеїнкіназ ссавців. Таким чином була створена зведена вибірка з 537 послідовностей.

Спільна кластеризація експериментально доведених сайтів тваринних протеїнкіназ і сайтів фосфорилування, передбачених для молекул тубуліну

A. thaliana, дозволила нам відібрати тваринні протеїнкінази, що фосфорилують схожі сайти. Кластеризація консенсусів профіля клади II.1 з сайтів α - і γ -тубулінів *A. thaliana* і сайтів контрольної вибірки показала їх подібність до сайтів тваринних протеїнкіназ CaMK1A і CaMK2A. Кластеризація консенсусів профіля клади III з сайтів α - і γ -тубулінів *A. thaliana* і контрольної вибірки показала їх подібність до сайтів протеїнкіназ CaMK1A людини. Консенсуси профіля клади IV.1 з α - і γ -тубулінів *A. thaliana* мали подібність до сайтів протеїнкінази CaMK2A людини. Консенсуси профіля клади V.1 з β -тубулінів *A. thaliana* і контрольної вибірки PhosphoSitePlus демонстрували максимальну подібність до сайту протеїнкінази CaMK2A *Rattus norvegicus*. Консенсуси профіля клади V.4 з α -, β - і γ -тубулінів *A. thaliana* і контрольної вибірки з PhosphoSitePlus мали максимальну подібність до експериментально підтверджених сайтів протеїнкінази CaMKK2 (KKCC2) з *H. sapiens*.

Таким чином, потенційні сайти для фосфорилування, що виявлені у *A. thaliana* мали найбільшу подібність до сайтів, що фосфорилують тваринні протеїнкінази KCC1A_HUMAN (Q14012), KCC2A_HUMAN (Q9UQM7), KCC2A_RAT (P11275) і KKCC2_HUMAN (Q96RR4).

3.5. Визначення Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних фосфорилувати тубуліни, на основі гомології повних послідовностей до протеїнкіназ, визначених в ході профільного аналізу

Найближчі гомологи протеїнкінази CaMK1A (KCC1A_HUMAN), CaMK2A (KCC2A_HUMAN та KCC2A_RAT) та CaMKK2 (KKCC2_HUMAN) визначались за гомологією послідовностей каталітичних доменів. Для цього були визначені межі каталітичних доменів.

CaMK1A з *H. sapiens*

YDFRDVLTGTGAFSEVILAEDKRTQKLVAIKCIAKEALEGKEGSMENEIAV
LHKIKHPNIVALDDIYESGGHLYLIMQLVSGGELFDRIVEKGFYTERDASRLIF
QVLDAVKYLHDLGIVHRDLKPENLLYYSLDEDSKIMISDFGLSKMEDPGSVL

STACGTPGYVAPEVLAQKPYSKAVDCWSIGVIA YILLCGYPPFYDENDAKLF
EQILKAEYEFDSPYWDDISDS AKDFIRHLM EKDP EKRFTCEQALQHPWI

CaMK2A з *H. sapiens*

YQLFEELGKGAFSVVRRVCVKVLAGQEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
RICRLLKHPNIVRLHDSISEEGHHYLIFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
IQQILEAVLHCHQMGVVHRDLKPENLLLASKLKGAAVKLADFGLAIEVEGEQ
QAWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVDLWACGVILYILLVGYPFWDEDQ
HRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINPSKRITAAEALKHPWI

CaMK2A з *R. norvegicus*

YQLFEELGKGAFSVVRRVCVKVLAGQEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
RICRLLKHPNIVRLHDSISEEGHHYLIFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
IQQILEAVLHCHQMGVVHRDLKPENLLLASKLKGAAVKLADFGLAIEVEGEQ
QAWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVDLWACGVILYILLVGYPFWDEDQ
HRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINPSKRITAAEALKHPWI

CaMKK2 з *H. sapiens*

YTLKDEIGKGSYGVVKLAYNENDNTYYAMKVLSSKKLIRQAGFPRRPPP
RGTRPAPGGCIQPRGPIEQVYQEIAILKKLDHPNVVKLVEVLDDPNEDHLYM
VFELVNQGPVMEVPTLKPLSEDQARFYFQDLIKGIEYLHYQKIIHRDIKPSNLL
VGEDGHIKIADFGVSNEFKGSDALLSNTVGTAFMAPESLSETRKIFSGKALD
VWAMGVTLYCFVFGQCPFMDERIMCLHSHKIKSQALEFPDQPDAEDLKDLIT
RMLDKNPESRIVVPEIKLHPWV

Наступна NJ-кластеризація каталітичних доменів і пошук за допомогою засобів blastp виявили CPK20 (At2g38910), CPK21 (AT4G04720), GRIK2 (At5g60550), як найбільш вірогідних гомологів серед 1024-х протеїнкіназ *A. thaliana*. Схема розміщення поерспективних сайтів фосфорилування для кальцій-залежних протеїнкіназ у різних ізоформ α -, β - и γ -тубуліну *A. thaliana* представлена на Рис 4.4.

Послідовності каталітичних доменів протеїнкіназ CPK20 (CDPKK, UniProtKB: Q9ZV15) арабідопсису і CAMK1 (KCC1A, UniProtKB: Q14012) людини мають ідентичність 44% при 63% подібності. Відповідно, послідовності

каталітичних доменів CPK21 (CDPKL, UniProtKB: Q9ZSA2) арабідопсиса і CAMK2A (KCC1A, UniProtKB: Q9UQM7) людини демонструють 44% ідентичність при 66% подібності. При цьому, консенсусна область даних ферментів при пошуку в SIB BLAST приходиться виключно на їх каталітичні домени.

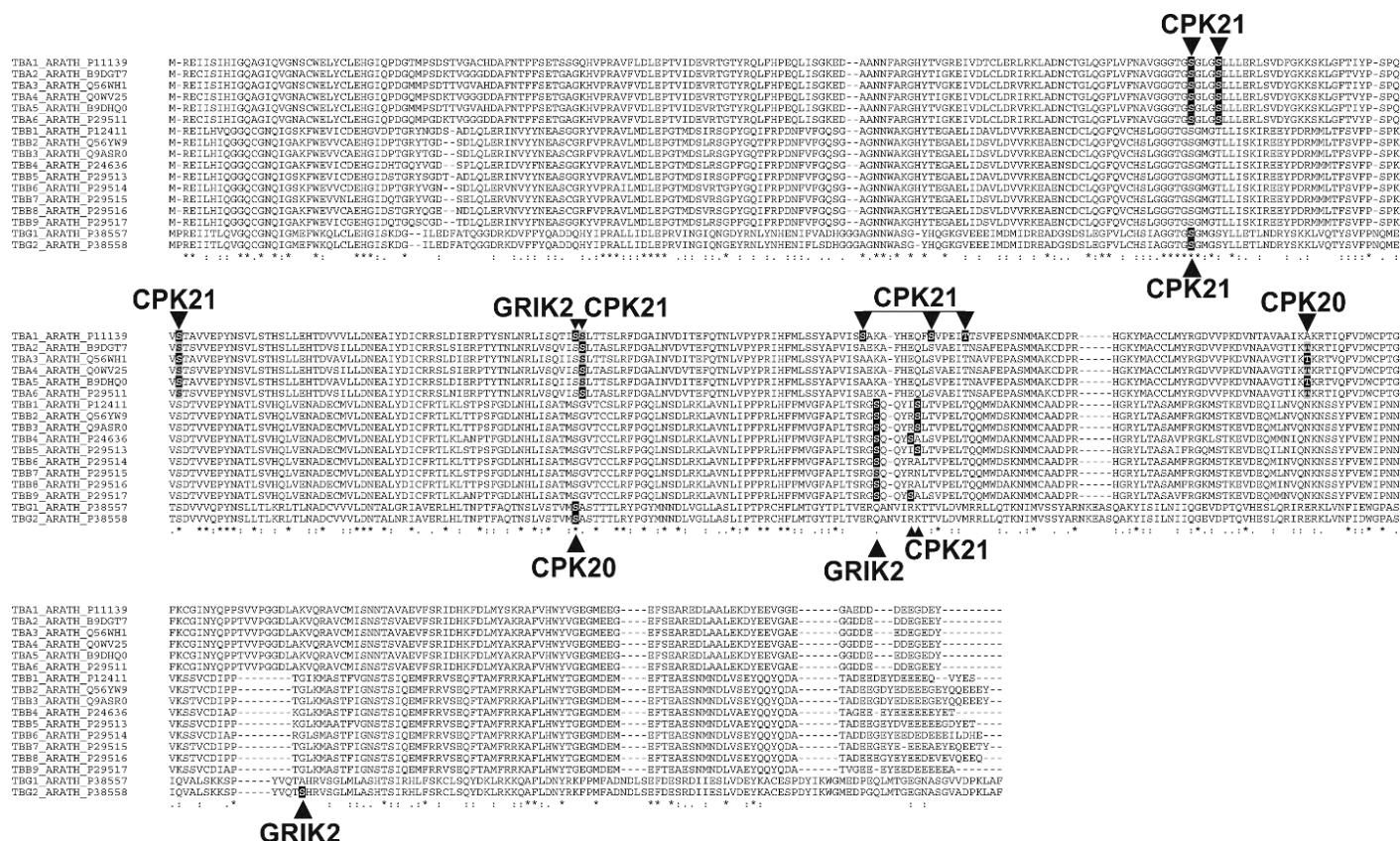


Рис. 3.5. Розташування потенційних сайтів фосфорилювання для Ca²⁺-залежних протеїнкіназ у складі різних ізоформ α -, β - і γ -тубулінів *A. thaliana* із маркуванням рослинних протеїнкіназ, що найбільш вірогідно здійснюють вищезазначені модифікації.

Структурне вирівнювання тривимірних моделей кіназних доменів, побудованих за допомогою сервісу i-Tasser, демонструє ще більш очевидну схожість. У цьому випадку для пари CPK20/CAMK1 середньоквадратичне відхилення (RMSD) склало 0.62, а у випадку пари CPK21/CAMK2A, воно

складало 0.896, що підтверджує високу схожість структурних моделей, що порівнюються.

Зворотнє blastp сканування з використанням повних послідовностей з UniProtKB/Swiss-Prot, підтвердило, що найближчими гомологами СРК20 у ссавців є протеїнкінази САМК1/КСС1А миші (Q91YS8, КСС1А_MOUSE), щура (Q63450, КСС1А_RAT) і людини (Q14012, КСС1А_HUMAN), а СРК21 - САМК4 щура (Q13234, КСС4_RAT), миші (P08414, КСС4_MOUSE) і людини (Q16566, КСС4_HUMAN). Таким чином, якщо у випадку рослинної протеїнкінази СРК20 первинний прогноз підтвердився, то у випадку протеїнкінази СРК21 питання залишається дискусійним. Зворотній blastp пошук і кластеризація підтверджують еволюційну спорідненість тваринних кальцієвих кіназ і рослинних протеїнкіназ СДРК. Однак, у випадку СРК21, група САМК2А, відповідно філогенетичній дистанції зайняла лише троє місце серед можливих гомологів, поступаючись групі САМК4 і САМК1. Слід зазначити, що обидві кінази проявляють спорідненість до груп протеїнкіназ СаМК1, СаМК2 і СаМК4.

Не дивлячись на те, що згідно даних літератури прямі гомологи рослинних протеїнкіназ СДРК у тварин відсутні (Valmonte, et al, 2014), їх еволюційна спорідненість з САМК ссавців очевидна. У свою чергу, є підстави вважати, що достатньо висока консервативність даних ферментів і молекул тубуліна є основою для припущення їх функціональної консервативності.

Третя з відібраних рослинних протеїнкіназ - GRIK2 (Geminivirus Rep Interacting Kinase 2, At5g60550, UniProtKB: Q5HZ38). Відомо, що вона активує SnRK1.1/KIN10 і SnRK1.2/KIN11, фосфорилуючи їх активаційні петлі по Thr198 і Thr176 відповідно (Hey et al., 2007; Shen and Hanley-Bowdoin, 2006; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). В свою чергу, через SnRK1-кінази відбувається регуляція експерсії великої кількості генів, регуляція активності ферментів, що відповідають за метаболізм і контроль різноманітних факторів клітинного росту і розвитку (Crozet et al., 2010). Біоінформаційні дослідження демонструють можливу участь SnRK1.1/KIN10 з *A. thaliana* у прямому фосфорилуванні γ -

тубуліна (TUBG1 и TUBG2) по Ser131, що може впливати на структуру мономера γ TuSC і збірку комплексу γ TuRC (Karpov et al., 2017).

Філогенетично протеїнкіназа GRIK2 і споріднена до неї GRIK1 близькі до SNF1- і AMPK-активуючим протеїнкіназам, демонструючи біохімічну подібність до останніх (Hey et al., 2007; Shen and Hanley-Bowdoin, 2006; Shen et al., 2009). Тим не менш, рослинні GRIK1/2 є відносно маловивченими ферментами і багато їх функцій на даний час невідомі. Припускається, що, окрім SnRK1, GRIK1/2 здатні фосфорилувати інші білки, у тому числі не пов'язані з SnRK1-залежним сигналінгом. Показово те, що у нормі GRIK1 і GRIK2 можна виявити лише в апікальних меристемах та дуже молодому листі. Це наводить на думку про можливу позитивну кореляцію експресії GRIK1/2 та клітинного поділу. Також, високий пул GRIK1/2 був виявлений у клітинах, що заражені герміновірусом при умові його активної реплікації (Shen and Hanley-Bowdoin, 2006; Hey et al., 2007).

Був здійснений зворотній blastp-пошук тваринних гомологів рослинної протеїнкінази GRIK2 з *A. thaliana*. Використовуючи повну амінокислотну послідовність і обмеження пошуку по групі анотованих послідовностей UniProtKB, було показана подібність рослинної GRIK2 з тваринними протеїнкіназами CAMKK1 і CAMKK2. При кластеризації перших п'ятидесяти хітів, найближче положення до GRIK2 зайняла протеїнкіназа CAMKK2 (Q96RR4, KKCC2_HUMAN). Таким чином, це підтверджує наші первинні висновки про гомологію GRIK2 рослин з KKCC2 (CAMKK2) ссавців.

Враховуючи результати аналізу відібраних сайтів, схожість послідовностей і просторової організації каталітичних доменів тваринних і рослинних протеїнкіназ, можна припустити, що протеїнкінази CPK20 (At2g38910), CPK21 (AT4G04720) і GRIK2 (At5g60550) є найбільш вірогідними представниками кальцій-залежних протеїнкіназ, що здатні фосфорилувати α -, β - і γ -тубуліни у *A. thaliana*.

Результати досліджень розділу 3 наведено в публікаціях:

1. 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 Genet.* 2018;52(6):428–439. doi.org/10.3103/S0095452718060038 (*Особистий внесок здобувача: разом із співавторами проведено дослідження, опрацьовані отримані дані та написано статтю*).
2. Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. *Cytol Genet.* 2017;51(4):239–246. doi.org/10.3103/S0095452717040053 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

РОЗДІЛ 4 ПОШУК ТА АНАЛІЗ ЙМОВІРНИХ САЙТІВ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТУБУЛІНІВ

4.1. Пошук сайтів фосфорилювання у послідовностях ізотипів тубулінів *A. thaliana*

Першочерговим завданням було визначення існування у молекулах рослинних тубулінів сайтів, які відповідали б паттернам фосфорилювання кальцій-залежних протеїнкіназ. На основі порівняння з прихованими моделями Маркова (НММ-профілі) сайтів фосфорилювання специфічних для тваринних протеїнкіназ СаМК2 було проведено відбір можливих сайтів фосфорилювання для Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ у складі усіх відомих ізотипів α -, β - і γ - тубуліну з *A. thaliana*. Результати профільного пошуку свідчать про наявність імовірних сайтів фосфорилювання у складі різних ізотипів β - та γ - тубуліну. На відміну від β - і γ -тубулінів, у послідовностях α -тубулінів консенсусні сайти фосфорилювання були відсутні.

Для тубуліну ТВG1 і ТВG2 були визначені амінокислотні залишки, що можуть піддаватись фосфорилюванню: Ser32, Ser147, Ser151, Ser259, Ser321, Ser376, Ser391 та Ser395. Для ТВB1, ТВB2, ТВB3, ТВB4, ТВB5, ТВB6, ТВB7, ТВB8, ТВB9 були визначені сайти фосфорилювання: Ser146, Ser154, Ser219, Ser222, Ser231, Ser279, Thr312, Ser374, Ser383.

4.2. Перевірка просторової доступності ймовірних сайтів фосфорилювання на основі аналізу просторових моделей тубулінових комплексів *A. thaliana*

Для модифікації певних амінокислотних залишків білку важлива не тільки амінокислотна послідовність, але і просторова доступність сайту для протеїнкіназ. Тому наступним важливим кроком було визначення, які зі знайдених сайтів знаходяться на поверхні білкової глобули.

З метою визначення залишків серину та треоніну, доступних для фосфорилювання, було перевірено положення потенційних сайтів для Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ з використанням побудованого фрагменту протофіламенту ($\alpha/\beta/\alpha/\beta$), а також моделі фрагменту центру первинної нуклеації мікротрубочок (фрагмент з трьох мономерів γTuSC) з *A. thaliana*. На підставі результатів аналізу розташування потенційних сайтів фосфорилювання для Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ на поверхні молекул тубулінів було виключено залишки, що, згідно їх топології, не можуть бути доступними для ферментів. За результатами профільного пошуку і їх екстраполяції на побудовані моделі рослинних γ -тубулінових комплексів (γTuSC), було відібрано 4 доступних сайти на поверхні TBG1/TUBG1 і TBG2/TUBG2: Ser259 та Ser321 (Рис. 4.1) і Ser32 та Ser376 (Рис. 4.2). Всі 4 сайти виявилися консервативними для обох ізотипів γ -тубулінів арабідопсису. Також була підтверджена їх консервативність при порівнянні послідовностей γ -тубулінів людини та арабідопсису, що дозволяє припустити схожість функціонального навантаження на ці сайти у рослинних і тваринних γ -тубулінів.

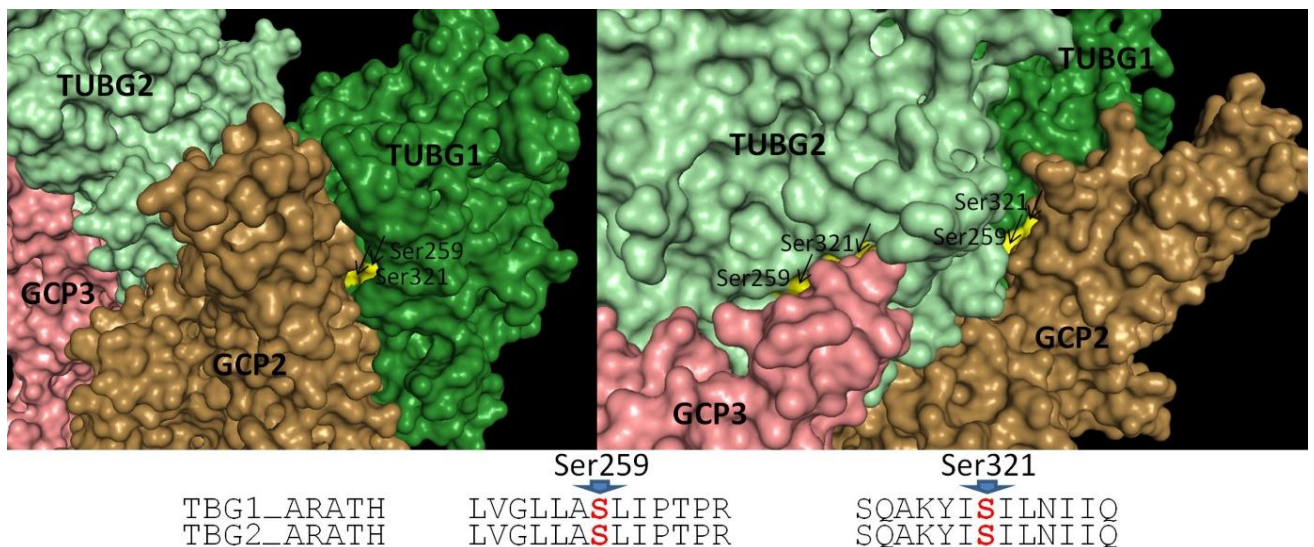


Рис. 4.1. 3D-модель малого γ -тубулінового комплексу γTuSC з *A. thaliana*. Показана топологія потенційних сайтів фосфорилювання γ -тубулінів (TUBG1 і TUBG2) по залишках Ser259 і Ser321 (позначено жовтим кольором), що відповідають канонічному профілю протеїнкіназ CaMK2.

На просторовій структурі димеру α - і β -тубуліна (Рис. 4.3) видно, що цей залишок знаходиться у зоні контакту субодиниць α - і β -тубуліну. Це може бути свідченням того, що цей потенційний сайт фосфорилування важливий для утворення тубулінового димеру.

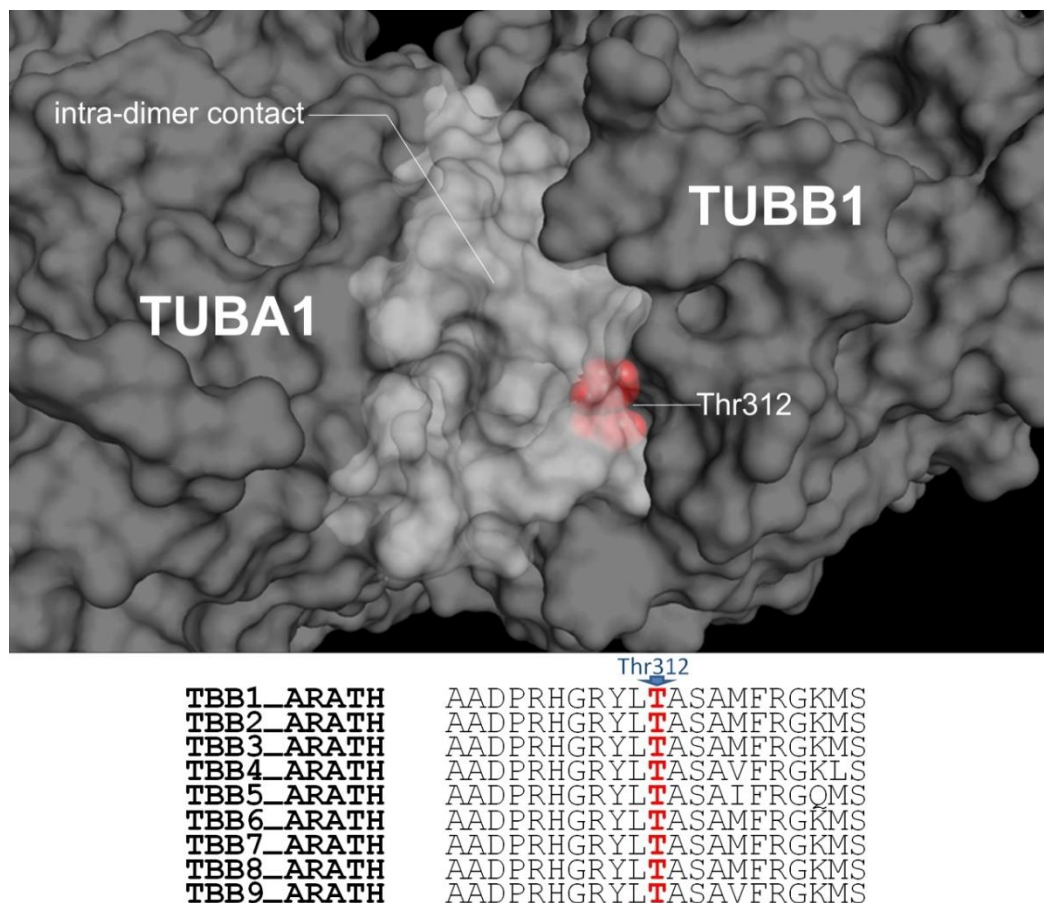


Рис. 4.3. Потенційний сайт фосфорилування Thr312 на 3D-моделі димеру β -тубуліну з *A. thaliana*. Світліша область позначає зону інтрадимерного контакту.

Таким чином, встановлено існування на поверхні усіх ізотипів β - і γ -тубулінів *A. thaliana* потенційних сайтів, що відповідають консервативним профілям для фосфорилування за участю Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ 2 (CaMK2) – це амінокислотні залишки Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376 для обох ізотипів γ -тубуліну (TBG1 і TBG2) і залишок Thr312, консервативний у всіх ізотипів β -тубуліну (TBB1-TBB9). Враховуючи

розташування визначених амінокислотних залишків, можна припустити участь Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїніназ у регуляції структурно-динамічних властивостей мікротрубочок рослин. Очевидно, що фосфорилування амінокислотних залишків у цих положеннях може мати значний вплив як на формування α/β -тубулінового димеру і формування центрів первинної нуклеації мікротрубочок, так і на їх динамічні характеристики.

Проте, для відповіді на запитання «Чи можуть рослинні кальцій-залежні протеїнінази фосфорилувати білки тубулінового цитоскелету?» важливим є визначення імовірних учасників цього процесу серед усього масиву рослинних кальцій- та кальмодулін-залежних протеїніназ. Для їх визначення, ми можемо базуватись у своїх припущеннях, зокрема, на подібність каталітичних доменів тваринних і рослинних кальцій-залежних протеїніназ і визначення найближчих гомологів серед них.

Результати досліджень розділу 4 наведено в публікації:

1. Новожилов ДО, Карпов ПА, Раєвський АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ. Ca^{2+} - та Ca^{2+} -кальмодулін-залежні протеїнінази – потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:323–328.) doi.org/10.7124/FEEO.v20.788 (*Особистий внесок здобувача: проведено дослідження, разом із співавторами опрацьовані отримані дані та написано статтю*).

РОЗДІЛ 5

АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ ФОСФОРИЛЮВАННЯ МІКРОТРУБОЧОК РОСЛИН Ca^{2+} - ТА Ca^{2+} /КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИМИ ПРОТЕЇНКІАЗАМИ

5.1. Відбір мутантних ліній *A. thaliana*, що можуть бути використані у дослідженнях функціональної активності *CPK20* і *CPK21*

Вивчення рослинних кальцій-залежних протеїнкіназ, що здатні фосфорилувати тубуліновий цитоскелет є важливим етапом вивчення механізмів його регуляції. Одним з можливих підходів для вирішення цієї задачі є дослідження особливостей розвитку мутантних ліній рослин, у яких знижена експресія, чи активність кальцій-залежних протеїнкіназ, що здатні фосфорилувати тубуліни. Зокрема *CPK20* і *CPK21* *A. thaliana*, що були визначені, як ферменти, що потенційно можуть виконувати таку функцію.

Серед доступних мутантів *CPK20* відбір проводили з наступних: GABI_051C11, GABI_620F08, GABI_636G01, SAIL_351_D04, SALK_044320, SALK_045192, SALK_073448, SALK_120546, SALK_073570 та SALK_120235 а серед мутантів *CPK21* з GABI_322A03, GABI_677D01, SAIL_729_A02, SALK_029412, SALK_043765, SALK_072624, SALK_072624, SALK_092880, SALKseq_49558, SALK_096400, SALK_043765, SALK_139723 та SALK_139721. Серед існуючих нокаутних мутантів *A. thaliana* по генах *CPK20* і *CPK21* були відібрані ті, що мають інсерцію у кодуєчій послідовності та доступні для замовлення гомозиготні лінії. Оптимальним вибором виявилися SALK_073448C для *CPK20* та SALK_029412C для *CPK21*.

Лінії SALK_073448 та SALK_029412 створені шляхом агробактеріальної трансформації з використанням вектору pROK2 і містять вставку Т-ДНК у шостий екзон гену *CPK20* та перший екзон гену *CPK21* відповідно (Alonso et al., 2003). Відомо, що рослини мутантної лінії SALK_029412 демонструють підвищену стійкість до гіперосмотичного та посухового стресу (Franz et al, 2011).

5.2. Підбір перспективних інгібіторів рослинних CDPK

5.2.1. Ідентифікація імовірного сайту зв'язування KN-93 та KN-62 у структурі СРК1 на основі гомології послідовностей та гомології 3-вимірних структур кальмодуліну 1 людини і моделі кальцій-зв'язуючого домену СРК1 *A. thaliana*

Важливість вивчення особливостей функціонування, регуляції та ролі протеїнкінази СаМК2 людини призвела до створення декількох класів відповідних інгібіторів. Однак попри велику кількість існуючих інгібіторів кальцій-залежних протеїнкіназ, питання визначення їх селективності у рослинних клітинах залишається актуальним. Значний прогрес в даному напрямку може бути досягнутий шляхом поєднання традиційних методів пошуку активних селективних сполук з методами молекулярного моделювання. Тому важливо було з'ясувати здатність з молекулярної точки зору найвідоміших кальмодулін-спрямованих інгібіторів СаМК2 - KN-93 та KN-62 порушувати функціонування рослинних гомологів протеїнкінази СаМК2 і бути залученими як інструменти експериментального дослідження Са²⁺-залежного фосфорилування у рослин. Слід зазначити, що інгібітори KN-93 та KN-62 у тваринній клітині мають низку вторинних мішеней, серед яких СаМК1, СаМК4, МЛСК, протеїнкіназа А та протеїнкіназа С, активність яких вони пригнічують у вищих концентраціях (Pellicena and Schulman, 2014). Оскільки протеїнкінази *A. thaliana* СРК20 і СРК21, що були визначені як такі, що найбільш імовірно фосфорилують тубулін, є найближчими гомологами протеїнкіназ СаМК1 і СаМК2 відповідно (а згідно результатів зворотнього blastp сканування вияляють високу спорідненість і до протеїнкінази СаМК4), для цілей роботи представляє інтерес теоретична можливість використання KN-93 та KN-62 для дослідження Са²⁺-залежного фосфорилування мікротрубочок.

Першочерговим завданням для визначення потенційної здатності інгібіторів KN-93 та KN-62 взаємодіяти з ферментами рослинного походження було

встановлення подібності просторових структур молекул кальмодуліну і кальцій-зв'язуючих доменів протеїнази CDPK. Також, було необхідно оцінити подібність експериментально підтверджених ділянок сайтів зв'язування інгібіторів. Для цього за допомогою сервісу SMART були визначені межі кальцій-зв'язуючого домену протеїнази CPK1 *A. thaliana*, і засобами сервісу SWISS-MODEL здійснено пошук гомологічних структур у базі даних PDB. За таким алгоритмом була створена вибірка з 50-ти експериментально встановлених структур, які на наступному етапі були використані для шаблонного моделювання відповідних доменів рослинних протеїназ CPK. За критеріями подібності структура комплексу кальмодуліну (ізотип 1) людини з референсним інгібітором мелбранкамідом (PDB: 6EEW, CALM1, malbrancheamide) була обрана як контроль (Coverage 0.87; Identity 38.62).

Результати профільного вирівнювання послідовностей протеїнази CALM1 людини та кальцій-зв'язуючого домену протеїнази CPK1 арабідопсису підтвердили подібність їх амінокислотних послідовностей. Аналіз контрольної тривимірної структури (6EEW) дозволив визначити амінокислотне оточення референсного ліганду. Порівняння амінокислотного оточення референсного ліганду (CALM1: Ile101, Leu106, Met125, Met145) з аналогічними залишками у послідовності протеїнази CPK1 свідчить про наявність ідентичних залишків у послідовності протеїнази CPK1: Ile543, Leu548, Met585. У випадку кальмодулін-подібного домену рослинної протеїнази CPK1 спостерігається заміна метіоніну Met125 на лейцин у структурно-відповідному положенні Leu565 (Рис.5.1). Наявність аналогічних залишків говорить про імовірну наявність кишені у структурі протеїнази CPK1, гомологічної до такої у кальмодуліну.

```
CALM1_HUMAN 92-FDKDGNNGYISAAELRHVMTNLGKELTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK
CPK1_ARATH 534-FDKDGSYITPDELQQACEEFG--VEDVRIEELMRDQDNDGRIDYNEFVAMMQKG-590
*****.***:. **:::  :*:  : *  :*****.* **:::*** **
```

Рис. 5. 1. Фрагмент профільного вирівнювання послідовностей CALM1 *H. sapiens* (UniprotKB: P0DP23) та CPK1 *A. thaliana* (UniprotKB: Q06850).

5.2.2. Використання методу молекулярного докінгу для оцінки взаємодії потенційних інгібіторів з CPK1 *A. thaliana*

Після реконструкції моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 за допомогою он-лайн сервісу SWISS-MODEL та оптимізації просторової структури в повноатомному силовому полі була підтверджена достатня подібність структур за середньоквадратичним відхиленням атомів (RMSD - 0.93). Також було встановлено потенційний сайт зв'язування мелбранкаміду на поверхні моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana*.

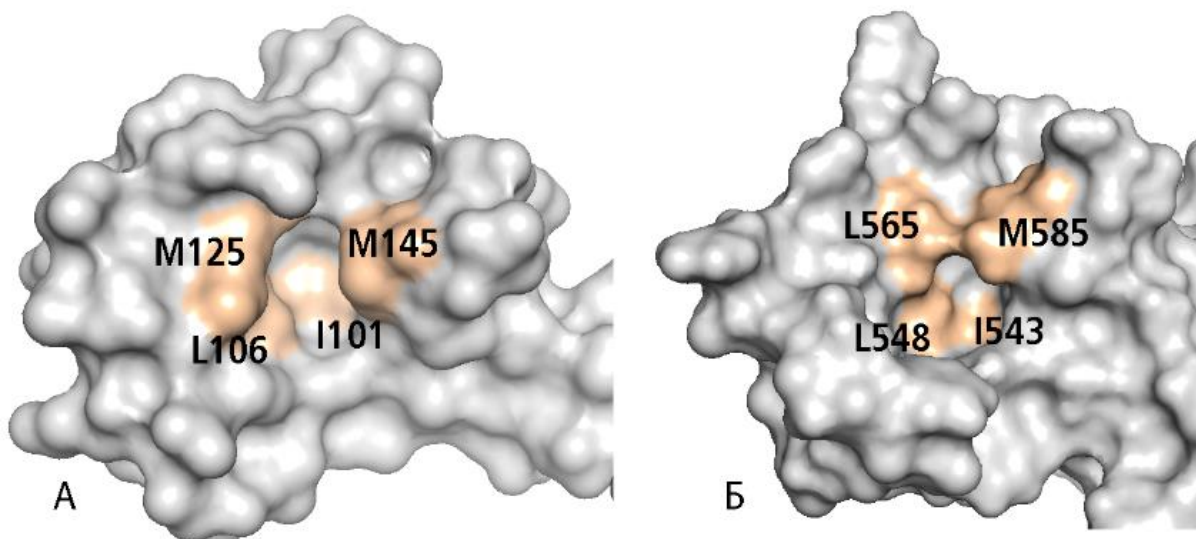


Рис 5.2. Фрагмент структури молекули кальмодуліну CALM1 з *H. sapiens* (PDB: 6EEW) (А) та моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana* (Б). Темним кольором відмічено амінокислоти сайту зв'язування мелбранкаміду на поверхні CALM1, та відповідні залишки гомологічної ділянки протеїнкінази CPK1.

Таким чином, на основі експериментально доведеного сайту зв'язування кальмодулінового інгібітору мелбранкаміду були визначені ділянки CALM1 (Ile101, Leu106, Met125, Met145) і CPK1 (Ile543, Leu548, Leu565, Met585), за якими було побудовано карту сайту для наступного молекулярного докінгу.

Аналіз результатів докінгу референсного інгібітору проти всієї поверхні кальмодулінів виявив закономірності у розподілі енергетично вигідних розташувань ліганду на білковій молекулі. Загалом було виявлено два енергетично та конформаційно вигідних сайти, навколо яких концентрувалась більшість варіантів розташування конформерів. Згідно оціночних функцій GoldScore і ASPScore, найбільш енергетично вигідним були варіанти, що відповідали експериментально підтвердженому сайту структури 6EEW (Рис. 5.3). Результати повторного докінгу ліганду у цей сайт зі зменшенням діаметру у 16 Å також засвідчили, що усі конформаційні позиції ліганду усередині зазначеної кишені мають вигіднішу енергію зв'язування, ніж сайти на поверхні білкової глобули.

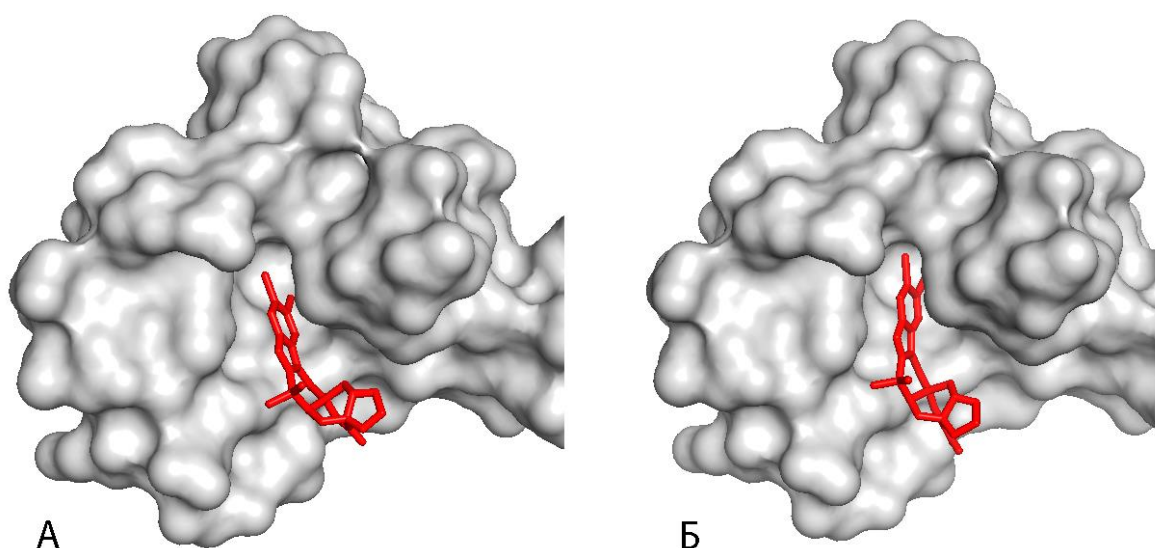


Рис. 5.3. Фрагмент структури експериментального комплексу CALM1 *H. sapiens* з канонічним інгібітором мелбранкамідом (PDB: 6EEW) (А) і приклад результату контрольного молекулярного докінгу мелбранкаміду у зазначений сайт CALM1 *H. sapiens* (Б).

Після калібрування системи, спираючись на аналогічні параметри докінгу була перевірена можливість зв'язування кальмодулін-спрямованих інгібіторів CaMK2 саме з цією кишенею на поверхні CALM1. При проведенні молекулярного докінгу інгібітори KN-93 та KN-62 також проявили аналогічно

високу спорідненість до цієї кишені. Водночас, аналогічні результати було отримано і у випадку докінгу KN-93 та KN-62 у гомологічні ділянки моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana*.

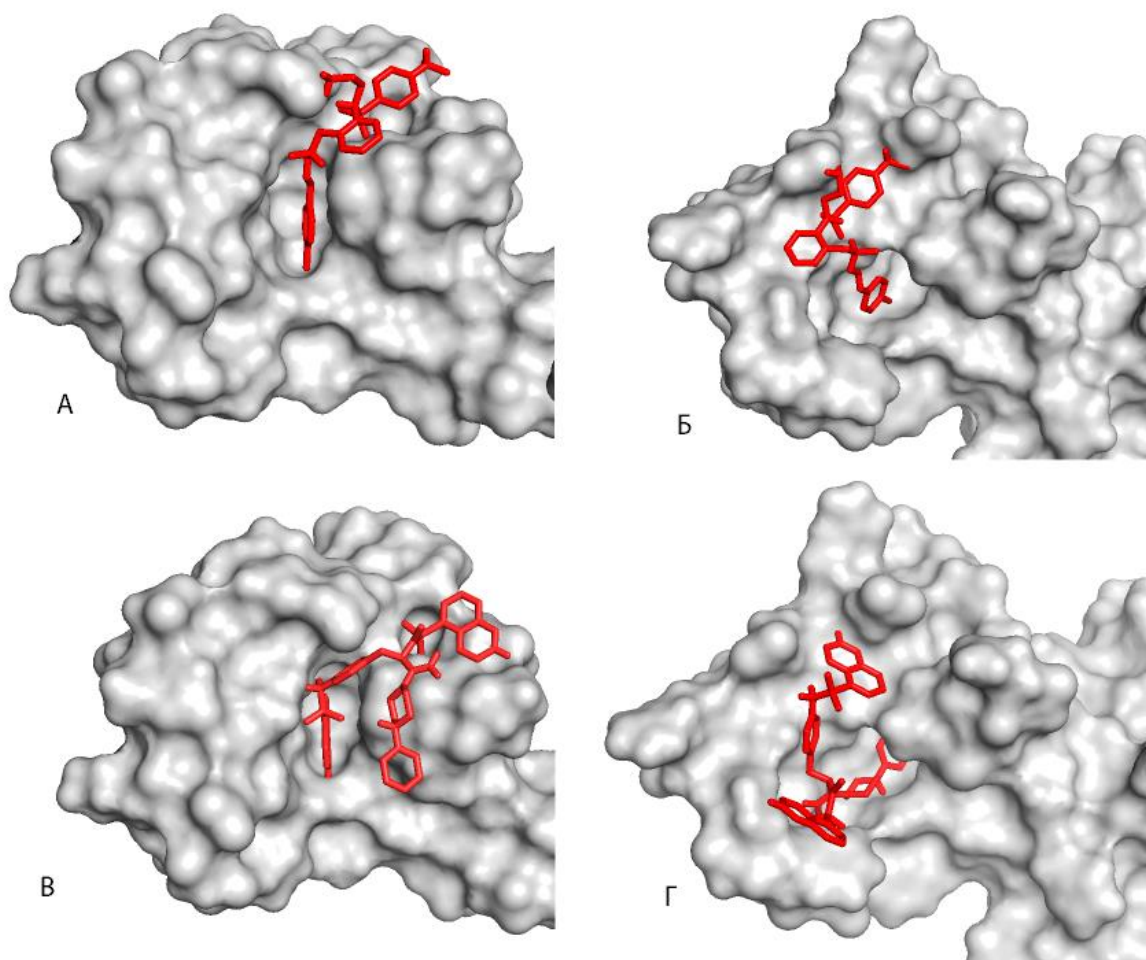


Рис. 5.4. Приклади результатів молекулярного докінгу. А - CALM1 *H. sapiens* з KN-93; Б - СРК1 *A. thaliana* з KN-93; В - CALM1 *H. sapiens* з KN-62; СРК1 *A. thaliana* з KN-62.

На Рис. 5.4 приведені приклади найбільш енергетично вигідних (згідно оціночних функцій) конформацій білок-лігандних комплексів. Так, кращий варіант розташування KN-93 у структурі кишені CALM1 був оцінений скорінговими функціями Goldscore: 53.95, ASP: 19,23, що є вищими показниками, ніж кращий варіант розташування для референсного ліганду малбранхеаміду (Goldscore: 32.26, ASP: 20.54). Подібні результати отримано у

випадку з докінгом KN-93 до кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 - показники кращого результату Goldscore: 54,58; ASP: 21,26 (для порівняння, у випадку з мелбранкамідом і СРК1 Goldscore: 42,55; ASP: 18,54 відповідно).

Найбільш енергетично вигідні варіанти розташування KN-62 при докінгу проти CALM1 і кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 продемонстрували наступні результати: KN-62 та CALM1 - Goldscore: 73,93; ASP: 20,83; KN-62 та СРК1 - Goldscore: 63,79; ASP: 24,53.

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

Результати досліджень розділу 5 наведено в публікації:

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

РОЗДІЛ 6

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для визначення рослинних кальцій- та кальмодулін-залежних протеїнкіназ, здатних регулювати мікротрубочки, був проведений пошук, який базується на гомології до амінокислотних послідовностей тваринних протеїнкіназ, що регулюють цитоскелет. За результатами аналізу літератури і баз даних було відібрано амінокислотні послідовності 34-х протеїнкіназ CDPK і 8-ми протеїнкіназ CRK з *A. thaliana*, а також, 41-на послідовність кальмодулін-залежних протеїнкіназ людини і миші, для яких існують експериментальні докази їх зв'язку з регуляцією цитоскелету. Була проаналізована їх доменна архітектура і визначені межі каталітичних доменів.

За допомогою N-J кластеризації послідовностей каталітичних доменів даних протеїнкіназ були ідентифіковані найближчі гомологи між тваринними кальмодулін-залежними кіназами, що регулюють цитоскелет та протеїнкіназами CDPK і CRK-кіназами *A. thaliana*. Рослинні протеїнкінази CDPK і CRK-протеїнкінази вибірки утворювали окрему субкладу, що входить до спільної класи з протеїнкіназами людини і миші CaMK2, DCLK1 та одним з каталітичних доменів протеїнкіназ RSK. Проте результати такого вирівнювання спільної групи каталітичних доменів рослинних і тваринних кіназ демонструють лише дуже загальну картину. З метою отримання більш детального розподілу протеїнкіназ за гомологією була проведена серія з 42 вирівнювань кожної окремої CDPK і CRK проти вибірки тваринних кіназ. Згідно отриманих результатів була виявлена наявність кількох характерних типів розміщення протеїнкіназ CDPK і CRK на дендрограмі, що вказують на різну ступінь подібності протеїнкіназ усередині цих груп до протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2.

Каталітичні домени рослинних кальцій-залежних протеїнкіназ CDPK виявили більшу подібність до тваринних протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2, а такі ж домени кальмодулін-залежних протеїнкіназ CRK – до RSK, DAPK

та СНК2. Найближчими гомологами протеїнкіназ СаМК2 були ідентифіковані протеїнкінази СРК7, СРК14, СРК32 та СРК21. Тваринні протеїнкінази СаМК2 беруть активну участь у регуляції, як актинового, так і тубулінового цитоскелету (Zhao et al., 2012; Jung et al., 2004; Shen et al., 1998; Robison et al., 2005; Easley et al., 2006; Huang et al., 2001; Holmfeldt et al., 2005; Hong et al., 1996; Lu et al., 2002). При цьому, функції протеїнкіназ СаМК2 також значно відрізняються в залежності від ізоформи. Так, протеїнкіназа СаМК2 β миші може безпосередньо зв'язуватись з F-актином та рекрутує до актину протеїнкіназу СаМК2 α (Shen et al., 1998). Протеїнкіназа СаМК2 та кальцинейрин формують систему регуляції активності кофіліну, у якій сама протеїнкіназа пригнічує активність активатора кофіліну SSH1L та регулює його локалізацію. СаМК2 зв'язує SSH1L у комплексі з 14-3-3 білками, фосфорилує його за залишками Ser-937 та Ser-978. Також, вона фосфорилує залишок Thr-508 супресора кофіліну LIMK1, тим самим активуючи його (Zhao et al., 2012). Протеїнкіназа СаМК2 γ впливає на динаміку мікротрубочок, виступаючи інгібітором деполімерази мікротрубочок МСАК (Holmfeldt et al., 2005). Ізоформа СаМК2 δ асоціюється та регулює актиновий і тубуліновий цитоскелет ембріональних аксонів миші (Hong et al., 1996). Доведено, що тваринні протеїнкінази СаМК2 фосфорилують MAP білки (MAP2 і MAP6), що беруть участь у стабілізації мікротрубочок (Lu et al., 2002). Таким чином, враховуючи значну гомологію, подібні функції тваринної протеїнкінази СаМК2 також можуть бути притаманні і рослинним гомологам з *A. thaliana* - протеїнкіназам СРК14, СРК32, СРК7 і СРК21.

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

Найближчі гомологи протеїнкіназ DAPK - протеїнкінази СРК20 та СРК27. Протеїнкіназа DAPK1 регулює активність білку MAPT (tau) та, відповідно,

динаміку мікротрубочок (Kim et al., 2014; Duan et al., 2013). Окрім прямого фосфорилювання білку MART за залишком Thr231, DAPK1 інгібує регулятор MART – Pin1 завдяки фосфорилюванню його залишку Ser71 (Kim et al., 2014). Тваринна протеїнкіназа DAPK1 може зв'язуватись з MAP1B, асоціюючись таким чином з актиновим і тубуліновим цитоскелетом (Harrison et al., 2008). Також протеїнкіназа DAPK1 має зв'язок з фосфорилюванням регуляторів динаміки актинового цитоскелету при TNF-опосередкованому апоптозі, зокрема фосфорилює кофілін по Ser3 і LIMK по Thr508 (Ivanovska et al., 2013). Протеїнкіназа DAPK1 впливає на фосфорилювання тропоміозину-1, регулюючи, таким чином, формування стресових фібрил (Houle et al., 2007). Фосфорилюючи MARK1 і MARK2, DAPK1 також опосередковано впливає на фосфорилювання MART, MAP2, MAP4, що у свою чергу, призводить до дестабілізації мікротрубочок (Wu et al., 2011).

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

У кожному випадку, базуючись на подібності каталітичних доменів рослинних протеїнкіназ груп CDPK і CRK до послідовностей каталітичних доменів протеїнкіназ CaMK2, RSK, DAPK та CHK2, було зроблене припущення про можливу наявність схожих функцій відповідних протеїнкіназ CDPK і CRK у рослинній клітині. Так, отримані результати дозволили визначити, які саме групи кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, що регулюють цитоскелет, є спорідненими до рослинних протеїнкіназ CDPK і CRK, та припустити наявність у різних представників рослинних кальцій- і кальмодулін- залежних протеїнкіназ

функцій, аналогічних їх тваринним гомологам. Також розподіл рослинних протеїнкіназ за ступенем подібності між декількома групами тваринних протеїнкіназ може свідчити про значну функціональну гетерогенність усередині груп CDPK і CRK.

Для більш точного визначення, які саме з кальцій-залежних протеїнкіназ рослин можуть фосфорилювати тубуліновий цитоскелет, був проведений аналіз на основі створення спільних профілей фосфорилювання. Була створена вибірка послідовності сайтів фосфорилювання кальцій-/кальмодулін-залежних протеїнкіназ ссавців та створені профілі цих сайтів, а також загальний паттерн по повній вибірці послідовностей. Однак тестове сканування виявило вироджений характер такого глобального паттерну. Побудований профіль добре ідентифікував відомі сайти модифікацій, не дозволяючи при цьому здійснити селективний пошук сайтів саме для кальцій-залежних протеїнкіназ.

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

Для профіля клади II.1 {BEFHNPWY}-{BDEFHQ}-{BCFIMQTWY}-{BEFHLMNWX}-{ABEFHIMWY}-{BDEGHTWY}-{BDEFGHLQTVW}-[ST]-{BDEFHLNQY}-{BFHLMNTWY}-{BDEFILMNQW}-{BCEFHILNQW}-{BCEFILMNWY}-{VENIMNQWY}-{BCFHINQWY} були знайдені консенсуси у складі послідовностей ізотипів TBA3, TBA5, TBG1 і TBG2.

Для профіля клади III {BCDEGHPV}-{BCHMPVWY}-{BCDEFIW}-
{BCDFIMRW}-{AGHIKMQRST}-{BDFHVVW}-{BCDEHPWY}-{ST}-
{BCDEHLNPWY}-{BCFHVKQVWY}-{AFGIKLPQRST}-{BDEHIKNPW}-
{BCDFIKLW}-{BCFHKPVW}-{BCHPW} знайдені консенсуси у складі
послідовностей ізотипів TBG1 і TBG2.

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

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

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

Спільна кластеризація експериментально доведених сайтів тваринних
протеїнкіназ і сайтів фосфорилування, що передбачені для молекул тубуліна
A. thaliana дозволила нам відібрати тваринні протеїнкінази, що фосфорилують
схожі сайти. Таким чином, потенційні сайти для фосфорилування, що виявлені
у *A. thaliana* мали найбільшу подібність до сайтів, що фосфорилують тваринні
протеїнкінази CaMK1A і CaMK2A *H. sapiens*, CaMK2A *R. norvegicus*, а також
CaMKK2 з *H. sapiens*.

Базуючись на отриманих даних, був проведений пошук протеїнкіназ
A. thaliana, що є найближчими гомологами протеїнкіназ CaMK1, CaMK2 та
CaMKK2 відповідних ізотипів. Для цього були визначені межі каталітичних

доменів протеїнкіназ CaMK1A, CaMK2A, CaMKK2 *H. sapiens* та CaMK2A *R. norvegicus*. Проведена NJ-кластеризація послідовностей каталітичних доменів і пошук засобами blastp дозволили виявити протеїнкінази CPK20, CPK21, GRIK2 як найбільш вірогідні гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana*. Таким чином, протеїнкінази CPK20 і CPK21 були визначені як представники кальцій-залежних протеїнкіназ групи CDPK, найбільш імовірно здатних безпосередньо фосфорилувати тубулін. Також високий рівень подібності протеїнкіназ CPK20 і CPK21 до своїх тваринних гомологів був підтверджений шляхом просторового вирівнювання структур моделей каталітичних доменів цих протеїнкіназ (RMSD для CPK20/CaMK1 склав 0,62, а для CPK21/CaMK2A – 0,896).

Надалі був проведений пошук імовірних сайтів фосфорилування на основі порівняння з НММ-профілями сайтів фосфорилування, специфічних для тваринних протеїнкіназ CaMK2 у складі усіх відомих ізотипів α -, β - і γ - тубуліну з *A. thaliana*. Було встановлено існування у складі послідовностей усіх ізотипів β - і γ -тубуліну *A. thaliana* потенційних сайтів, що відповідають консервативним профілям для фосфорилування за участю Ca^{2+} - та кальмодулін-залежних протеїнкіназ 2 (CaMK2). Для TBG1 і TBG2 це залишки Ser32, Ser147, Ser151, Ser259, Ser321, Ser376, Ser391 та Ser395. Для TBB1, TBB2, TBB3, TBB4, TBB5, TBB6, TBB7, TBB8, TBB9 – це залишки Ser146, Ser154, Ser219, Ser222, Ser231, Ser279, Thr312, Ser374, Ser383. У послідовностях α -тубулінів консенсусні сайти фосфорилування були відсутні.

Були також побудовані тривимірні моделі фрагменту центру первинної нуклеації мікротрубочок та димеру α/β -тубуліну, за допомогою яких була визначена просторова доступність для модифікації визначених залишків. TUBG1 і TUBG2 доступними для фосфорилування виявились залишки Ser259 і Ser321, що знаходяться у місцях контактів з білками Spc98 і Spc97 відповідно, а також Ser32 та Ser376, що знаходяться у місцях можливих контактів γ -тубулінів суміжних мономерів γ TuSC. Розміщення потенційних сайтів фосфорилування у цих позиціях може бути свідченням імовірної участі такої модифікації у формуванні центрів первинної нуклеації мікротрубочок. Серед потенційних

сайтів фосфорилування β -тубуліну на поверхні білкової глобули був Thr312. За допомогою моделі димеру α/β -тубуліну вдалось визначити, що він знаходиться у зоні контакту субодиниць α - і β -тубуліну. Це може бути свідченням того, що цей потенційний сайт фосфорилування важливий для утворення димеру тубуліну.

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

Також було проведено пошук можливих інструментів для вивчення функцій рослинних протеїнкіназ CDPK. Для CPK20 та CPK21, як протеїнкіназ, що найбільш імовірно залучені до фосфорилування тубуліну, були підбрані перспективні лінії нокаутних мутантів (SALK_073448C для CPK20 та SALK_029412C для CPK21). Також було проведено аналіз можливості використання інгібіторів протеїнкінази CAMK2 для пригнічення активності її рослинних гомологів серед протеїнкіназ CDPK. Для цього були визначені межі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази CPK1 *A. thaliana* і здійснено пошук гомологічних структур у базі даних PDB. За таким алгоритмом була створена вибірка з експериментально встановлених структур, які на наступному етапі були використані для шаблонного моделювання відповідних доменів рослинних протеїнкіназ CPK.

Результати аналізу контрольної тривимірної структури кальмодуліну з малбранхеамідом (6EEW) дозволили визначити амінокислотне оточення референсного ліганду. Порівняння амінокислотного оточення референсного ліганду (CALM1: Ile101, Leu106, Met125, Met145) з аналогічними залишками у послідовності протеїнкінази CPK1 свідчить про наявність ідентичних залишків у

послідовності протеїнкінази СРК1: Ile543, Leu548, Met585. У випадку кальмодулін-подібного домену рослинної протеїнкінази СРК1 спостерігається заміна залишку Met125 на лейцин у структурно-відповідному положенні Leu565. Таким чином, на основі експериментально встановленого сайту зв'язування кальмодулінового інгібітору малбранхеаміду були визначені ділянки CALM1 і СРК1, за якими було побудовано карту сайту для наступного молекулярного докінгу.

Результати аналізу докінгу референсного інгібітору проти всієї поверхні молекули кальмодуліну дозволили виявити два енергетично та конформаційно вигідних сайти, навколо яких концентрувалась більшість варіантів розташування конформерів, при чому, згідно оціночних функцій, енергетично вигідним були варіанти, що відповідають експериментально підтверженому сайту референсної структури. Після цього було проведено молекулярний докінг KN-93 і KN-62 у структури відповідних кишень кальмодуліну у гомологічної ділянки моделі кальцій-зв'язуючого домену протеїнкінази СРК1 *A. thaliana*. Результати оціночних функцій свідчать про те, що KN-93 та KN-62 мають гомологічні і енергетично вигідні сайти зв'язування у структурах кальмодуліну людини та кальцій-залежної протеїнкінази арабідопсису. Таким чином, була показана висока імовірність того, що кальмодулін-спрямовані інгібітори СаМК2 можуть мати аналогічну дію на її рослинні гомологи, а саме СДРК-кінази.

ВИСНОВКИ

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

1. Проаналізовано доменну архітектуру Ca^{2+} - і кальмодулін-залежних протеїнкіназ *Arabidopsis thaliana* та вибірки тваринних кальмодулін-залежних протеїнкіназ, що регулюють структурно-функціональні властивості мікротрубочок за рахунок фосфорилування тубуліну. Визначено каталітичні домени як єдині консервативні структури, наявні у всіх протеїнкіназ вибірки, послідовності котрих можуть бути використані для кластеризації з метою визначення найближчих гомологів.
2. За допомогою методу приєднання сусідів (NJ, Neighbor joining) проведена кластеризація послідовностей каталітичних доменів кальцій-залежних (CPK) та кальмодулін-залежних (CRK) протеїнкіназ *A. thaliana* та каталітичних доменів кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, залучених до фосфорилування білків мікротрубочок.
3. За результатами NJ кластеризації встановлено, що найближчими гомологами рослинного походження для протеїнкіназ CaMK2 є протеїнкінази CPK7, CPK14, CPK32 та CPK21; для протеїнкіназ RSK (рибосомальні S6 кінази) – протеїнкінази CPK17, CPK34, CRK2; для протеїнкіназ DAPK (кінази, асоційовані з апоптозом) – протеїнкінази CPK20 та CPK27, а для CHK2 (чек-поінт кіназа 2) – протеїнкінази CPK16, CPK18, CPK28, CRK4 та CRK6.

4. За допомогою профільного методу встановлені протеїнкінази тварин, здатні фосфорилувати тубулін: CaMK1A (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 1A), CaMK2A (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2A), CaMKK2 (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа кіназа 2) з *H. sapiens* та CaMK2A з *R. norvegicus*. Визначені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana*: CPK20, CPK21 та GRIK2 (протеїнкіназа взаємодії з гемінівiрусним Rep 2). Це дозволяє припустити, що серед протеїнкіназ CDPK *A. thaliana* саме CPK20 та CPK21 можуть фосфорилувати білки мікротрубочок.
5. Встановлено існування на поверхні молекул усіх ізотипів β - і γ -тубуліну *A. thaliana* потенційних сайтів, що відповідають консервативним профілям для фосфорилування за участю протеїнкіназ CaMK2, які формуються амінокислотними залишками Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376 у обох ізотипів γ -тубуліну (TBG1 і TBG2) і залишком Thr312, консервативним для всіх ізотипів β -тубуліну (TBV1-TBV9). Виходячи з локалізації визначених сайтів фосфорилування запропонована їх можлива участь у формуванні кільця центрів первинної нуклеації мікротрубочок (γ TuRC) та димеру α/β тубуліну.
6. На підставі встановлених закономірностей фосфорилування тубуліну рослин протеїнкіназами CPK20 та CPK21 проведено відбір існуючих мутантних ліній *A. thaliana* по генах, що кодують ці протеїнкінази. Відібрано найбільш перспективні для досліджень функціональної ролі протеїнкіназ CPK20 та CPK21 нокаутні мутанти *A. thaliana* - SALK_073448C та SALK_029412C.
7. Показана наявність просторово гомологічних ділянок у структурі тваринного кальмодуліну та Ca²⁺-зв'язуючого домену рослинних протеїнкіназ CDPK як потенційних сайтів зв'язування кальмодулін-спрямованих інгібіторних сполук протеїнкінази CaMK2 - KN-93 та KN-62. Продемонстрована подібність амінокислотного оточення цих сайтів у структурах кальмодуліну 1 з *H. sapiens* та Ca²⁺-зв'язуючого домену Ca²⁺-залежної протеїнкінази 1 (CPK1) з *A. thaliana* для потенційного ліганду.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abe Y, Yoon SO, Kubota K, Mendoza MC, Gygi SP, Blenis J. p90 ribosomal S6 kinase and p70 ribosomal S6 kinase link phosphorylation of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 to growth factor, insulin, and nutrient signaling. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14939-14948.
2. Akhmanova A, Steinmetz MO. Microtubule minus-end regulation at a glance. *J Cell Sci.* 2019;132(11):jcs227850
3. Alfaro-Aco, R., Thawani, A., & Petry, S. (2020). Biochemical reconstitution of branching microtubule nucleation. *eLife*, 9, e49797.
4. Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [published correction appears in *Science*. 2003 Sep;301(5641):1849]. *Science.* 2003;301(5633):653-657.
5. Alvarado-Kristensson M, Rodríguez MJ, Silió V, Valpuesta JM, Carrera AC. SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat Cell Biol.* 2009;11(9):1081-1092.
6. Anil VS, Harmon AC, Rao KS. Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. *Plant Physiol.* 2000;122(4):1035-1043.
7. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(10):747-758.
8. Anjum R, Roux PP, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. *Curr Biol.* 2005;15(19):1762-1767.
9. Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell.* 2004;116(3):457-466.
10. Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo BC, Harmon AC, Huber SC. Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell.* 1996;8(3):505-517.

11. Bagowski CP, Stein-Gerlach M, Choidas A, Ullrich A. Cell-type specific phosphorylation of threonines T654 and T669 by PKD defines the signal capacity of the EGF receptor. *EMBO J.* 1999;18(20):5567-5576.
12. Ban Y, Kobayashi Y, Hara T, et al. α -tubulin is rapidly phosphorylated in response to hyperosmotic stress in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2013;54(6):848-858.
13. Bansal A, Molina-Cruz A, Brzostowski J, et al. PfCDPK1 is critical for malaria parasite gametogenesis and mosquito infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(4):774-779.
14. Bardswell SC, Cuello F, Rowland AJ, et al. Distinct sarcomeric substrates are responsible for protein kinase D-mediated regulation of cardiac myofilament Ca^{2+} sensitivity and cross-bridge cycling. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5674-5682.
15. Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, et al. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell.* 2007;129(3):549-563.
16. Benkert P, Künzli M, Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W510-W514.
17. Ben-Nissan G, Cui W, Kim DJ, Yang Y, Yoo BC, Lee JY. Arabidopsis casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules,. *Plant Physiol.* 2008;148(4):1897-1907.
18. Berkowitz G, Zhang X, Mercie R, Leng Q, Lawton M. Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K^{+} channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Cell Physiol.* 2000;41(6):785-790.
19. Biernat J, Wu YZ, Timm T, et al. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell.* 2002;13(11):4013-4028.
20. Blume YB, Krasnylenko YA, Demchuk OM, Yemets AI. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front Plant Sci.* 2013;4:530.

21. Borbiev T, Verin AD, Shi S, Liu F, Garcia JG. Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(5):L983-L990.
22. Boudsocq M, Droillard MJ, Regad L, Laurière C. Characterization of Arabidopsis calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium?. *Biochem J*. 2012;447(2):291-299.
23. Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci*. 2013;18(1):30-40.
24. Brown M, Adyshev D, Bindokas V, Moitra J, Garcia JG, Dudek SM. Quantitative distribution and colocalization of non-muscle myosin light chain kinase isoforms and cortactin in human lung endothelium. *Microvasc Res*. 2010;80(1):75-88.
25. Brown RC, Lemmon BE. Dividing without centrioles: innovative plant microtubule organizing centres organize mitotic spindles in bryophytes, the earliest extant lineages of land plants. *AoB Plants*. 2011;2011:plr028.
26. Buck M, Poli V, Hunter T, Chojkier M. C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell*. 2001;8(4):807-816.
27. Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60(1):1-13.
28. Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, et al. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*. 2001;411(6833):102-107.
29. Bungard D, Fuerth BJ, Zeng PY, et al. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science*. 2010;329(5996):1201-1205.
30. 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.
31. Cai Z, Chehab NH, Pavletich NP. Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol Cell*. 2009;35(6):818-829.

32. Camoni L, Harper JF, Palmgren MG. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett.* 1998;430(3):381-384.
33. Chang BH, Mukherji S, Soderling TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: localization of isoforms in rat brain. *Neuroscience.* 2001;102(4):767-777.
34. Chen JV, Buchwalter RA, Kao LR, Megraw TL. A splice variant of centrosomin converts mitochondria to microtubule-organizing centers. *Curr Biol.* 2017;27(13):1928-1940.e6.
35. Chen MS, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7488-97.
36. Chen XY, Gu XT, Saiyin H, et al. Brain-selective kinase 2 (BRSK2) phosphorylation on PCTAIRE1 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *J Biol Chem.* 2012;287(36):30368-30375.
37. Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* 2002;129(2):469-485.
38. Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM. A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol.* 2002;128(1):256-270.
39. Chu CW, Hou F, Zhang J, et al. A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol Biol Cell.* 2011;22(4):448-456.
40. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 2007;131(6):1047-58.
41. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005;21(1):1-14.
42. Crozet P, Jammes F, Valot B, et al. 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(16):12071-12077.
43. Cunha-Ferreira I, Chazeau A, Buijs RR, et al. The HAUS Complex Is a Key Regulator of Non-centrosomal Microtubule Organization during Neuronal Development. *Cell Rep.* 2018;24(4):791-800.
 44. Dai XX, Duan X, Liu HL, Cui XS, Kim NH, Sun SC. Chk2 regulates cell cycle progression during mouse oocyte maturation and early embryo development. *Mol Cells.* 2014;37(2):126-132.
 45. Dammermann A, Desai A, Oegema K. The minus end in sight. *Curr Biol.* 2003;13(15):R614-R624.
 46. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W375-W383.
 47. Davletova S, Mészáros T, Miskolczi P, et al. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J Exp Bot.* 2001;52(355):215-221.
 48. Dequiedt F, Martin M, Von Blume J, et al. New role for hPar-1 kinases EMK and C-TAK1 in regulating localization and activity of class IIa histone deacetylases. *Mol Cell Biol.* 2006;26(19):7086-7102.
 49. Dixit AK, Jayabaskaran C. Phospholipid mediated activation of calcium dependent protein kinase 1 (CaCDPK1) from chickpea: a new paradigm of regulation. *PLoS One.* 2012;7(12):e51591.
 50. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):1731-1737.
 51. Döppler H, Bastea LI, Eiseler T, Storz P. Neuregulin mediates F-actin-driven cell migration through inhibition of protein kinase D1 via Rac1 protein. *J Biol Chem.* 2013;288(1):455-465.

52. Duan DX, Chai GS, Ni ZF, et al. Phosphorylation of tau by death-associated protein kinase 1 antagonizes the kinase-induced cell apoptosis. *J Alzheimers Dis.* 2013;37(4):795-808.
53. Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, et al. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 7):1085-1095.
54. 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.
55. 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.
56. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2006;Chapter 5:Unit-5.6.
57. Fabian L, Xia X, Venkitaramani DV, et al. Titin in insect spermatocyte spindle fibers associates with microtubules, actin, myosin and the matrix proteins skeletor, megator and chromator. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 13):2190-2204.
58. Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature.* 2001;410(6830):842-847.
59. Fan Y, Burkart GM, Dixit R. The Arabidopsis SPIRAL2 Protein Targets and Stabilizes Microtubule Minus Ends. *Curr Biol.* 2018;28(6):987-994.e3.
60. Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE Jr, Schulman H, Meyer T. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron.* 2003;39(2):283-297.
61. Fink CC, Meyer T. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12(3):293-299.
62. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, et al. InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D190-D199.

63. Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D279-D285.
64. Fojo T, editor. *The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
65. Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, et al. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell.* 2006;17(3):1041-1050.
66. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 2001;359(Pt 1):1-16.
67. Franz S, Ehlert B, Liese A, Kurth J, Cazalé AC, Romeis T. Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant.* 2011;4(1):83-96.
68. Fu X, Brown KJ, Yap CC, Winckler B, Jaiswal JK, Liu JS. Doublecortin (Dcx) family proteins regulate filamentous actin structure in developing neurons. *J Neurosci.* 2013;33(2):709-721.
69. Fujita N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem.* 2003;278(49):49254-49260.
70. Fujita S, Pytela J, Hotta T, et al. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis* [published correction appears in *Curr Biol.* 2013 Nov 4;23(21):2196]. *Curr Biol.* 2013;23(20):1969-1978.
71. Gascuel O, Steel M. Neighbor-joining revealed. *Mol Biol Evol.* 2006;23(11):1997-2000.
72. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D1100-D1107.
73. Geiger D, Scherzer S, Mumm P, et al. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):8023-8028.

74. Getz TM, Dangelmaier CA, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *J Thromb Haemost.* 2010;8(10):2283-2293.
75. Giganti D, Yan K, Badilla CL, Fernandez JM, Alegre-Cebollada J. Disulfide isomerization reactions in titin immunoglobulin domains enable a mode of protein elasticity. *Nat Commun.* 2018;9(1):185.
76. Goldspink DA, Rookyard C, Tyrrell BJ, et al. Ninein is essential for apico-basal microtubule formation and CLIP-170 facilitates its redeployment to non-centrosomal microtubule organizing centres. *Open Biol.* 2017;7(2):160274.
77. Gouet C, Aburto B, Vergara C, Sanhueza M. On the mechanism of synaptic depression induced by CaMKIIN, an endogenous inhibitor of CaMKII. *PLoS One.* 2012;7(11):e49293.
78. Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 2000;23(4):441-450.
79. Gu Y, Chen T, Meng Z, et al. CaMKII γ , a critical regulator of CML stem/progenitor cells, is a target of the natural product berbamine. *Blood.* 2012;120(24):4829-4839.
80. Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace IS, Cobb JA, Roberts DM. Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell.* 2003;15(4):981-991.
81. Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(17):9666-9670.
82. Hardin SC, Winter H, Huber SC. Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. *Plant Physiol.* 2004;134(4):1427-1438.

83. Harmon AC, Gribskov M, Harper JF. CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal?. *Trends Plant Sci.* 2000;5(4):154-159.
84. Harper JF, Harmon A. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(7):555-566.
85. Harrison B, Kraus M, Burch L, et al. DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9999-10014.
86. Hashimoto T. Microtubules in plants. *Arabidopsis Book.* 2015;13:e0179.
87. Hasepass I, Voit R, Hoffmann I. Phosphorylation at serine 75 is required for UV-mediated degradation of human Cdc25A phosphatase at the S-phase checkpoint. *J Biol Chem.* 2003;278(32):29824-29829.
88. Hey S, 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(14):10472-10479.
89. Hildebrand PW, Goede A, Bauer RA, et al. SuperLooper--a prediction server for the modeling of loops in globular and membrane proteins. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W571-W574.
90. Hoffman L, Farley MM, Waxham MN. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II isoforms differentially impact the dynamics and structure of the actin cytoskeleton. *Biochemistry.* 2013;52(7):1198-1207.
91. Holmfeldt P, Zhang X, Stenmark S, Walczak CE, Gullberg M. CaMKIIgamma-mediated inactivation of the Kin I kinesin MCAK is essential for bipolar spindle formation. *EMBO J.* 2005;24(6):1256-1266.
92. Hong Y, Takano M, Liu CM, Gasch A, Chye ML, Chua NH. Expression of three members of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 1996;30(6):1259-1275.
93. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D512-D520.

94. Houle F, Poirier A, Dumaresq J, Huot J. DAP kinase mediates the phosphorylation of tropomyosin-1 downstream of the ERK pathway, which regulates the formation of stress fibers in response to oxidative stress. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 20):3666-3677.
95. Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 2003;132(2):666–80.
96. 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-W229.
97. 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;393(1):61-66.
98. Huang JZ, Huber SC. Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions. *Plant Cell Physiol.* 2001;42(10):1079-1087.
99. Hübner K, Phi-van L. KN-62, a selective inhibitor of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II, inhibits the lysozyme pre-mRNA splicing in myelomonocytic HD11 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(2):405-409.
100. Huck B, Kemkemer R, Franz-Wachtel M, Macek B, Hausser A, Olayioye MA. GIT1 phosphorylation on serine 46 by PKD3 regulates paxillin trafficking and cellular protrusive activity. *J Biol Chem.* 2012;287(41):34604-34613.
101. Hudmon A, Schulman H. Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:473-510.
102. Ito T, Ishida S, Oe S, Fukazawa J, Takahashi Y. Autophosphorylation Affects Substrate-Binding Affinity of Tobacco Ca²⁺-Dependent Protein Kinase1. *Plant Physiol.* 2017;174(4):2457-2468.

103. Ivanovska J, Tregubova A, Mahadevan V, et al. Identification of DAPK as a scaffold protein for the LIMK/cofilin complex in TNF-induced apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(8):1720-1729.
104. Ivison SM, Graham NR, Bernales CQ, et al. Protein kinase D interaction with TLR5 is required for inflammatory signaling in response to bacterial flagellin. *J Immunol.* 2007;178(9):5735-5743.
105. Ivison SM, Khan MA, Graham NR, et al. A phosphorylation site in the Toll-like receptor 5 TIR domain is required for inflammatory signalling in response to flagellin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(4):936-941.
106. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(12):773-786.
107. Janknecht R. Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1). *Oncogene.* 2003;22(5):746-755.
108. Januschke J, Gervais L, Gillet L, Keryer G, Bornens M, Guichet A. The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Development.* 2006;133(1):129-139.
109. Jensen HH, Brohus M, Nyegaard M, Overgaard MT. Human calmodulin mutations. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:396.
110. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med.* 2016;48(7):e245.
111. Jiang K, Rezabkova L, Hua S, et al. Microtubule minus-end regulation at spindle poles by an ASPM-katanin complex [published correction appears in *Nat Cell Biol.* 2017 Jun 29;19(7):873]. *Nat Cell Biol.* 2017;19(5):480-492.
112. Jiang L, Rong R, Sheikh MS, Huang Y. Mitotic arrest by tumor suppressor RASSF1A is regulated via CHK1 phosphorylation. *Mol Cancer Res.* 2014;12(1):119-129.

113. Jin J, Shirogane T, Xu L, et al. SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev.* 2003;17(24):3062-3074.
114. Jones RG, Plas DR, Kubek S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2005;18(3):283-293.
115. Jung J, Shin JS, Lee SY, et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem.* 2004;279(8):7048-7054.
116. Kamm KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem.* 2001;276(7):4527-4530.
117. Kann ML, Soues S, Levilliers N, Fouquet JP. Glutamylated tubulin: diversity of expression and distribution of isoforms. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2003;55(1):14-25.
118. Karpov PA, Rayevsky 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 Genet.* 2017;51(6):415–21.
119. 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.* 2019;1–38.
120. Kawai T, Sanjo H, Akira S. Duet is a novel serine/threonine kinase with Dbl-Homology (DH) and Pleckstrin-Homology (PH) domains. *Gene.* 1999;227(2):249-255.
121. Kim BM, You MH, Chen CH, et al. Death-associated protein kinase 1 has a critical role in aberrant tau protein regulation and function. *Cell Death Dis.* 2014;5(5):e1237.
122. Klimecka M, Szczegieliak J, Godecka L, Lewandowska-Gnatowska E, Dobrowolska G, Muszyńska G. Regulation of wound-responsive calcium-dependent protein kinase from maize (ZmCPK11) by phosphatidic acid. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(4):589-595.

123. Kojima Y, Miyoshi H, Clevers HC, Oshima M, Aoki M, Taketo MM. Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23532-23540.
124. Kollman JM, Greenberg CH, Li S, et al. Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(2):132-137.
125. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(11):709-721.
126. Kollman JM, Zelter A, Muller EG, et al. The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol Biol Cell.* 2008;19(1):207-215.
127. Koo TH, Eipper BA, Donaldson JG. Arf6 recruits the Rac GEF Kalirin to the plasma membrane facilitating Rac activation. *BMC Cell Biol.* 2007;8:29.
128. Kost B, Chua NH. The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell.* 2002;108(1):9-12.
129. Krämer A, Mailand N, Lukas C, et al. Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol.* 2004;6(9):884-891.
130. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-1874.
131. Kuntal BK, Aparoy P, Reddanna P. EasyModeller: A graphical interface to MODELLER. *BMC Res Notes.* 2010;3:226.
132. Kuo CY, Chou TY, Chen CM, Tsai YF, Hwang GY, Hwang TL. Hepatitis B virus X protein disrupts stress fiber formation and triggers apoptosis. *Virus Res.* 2013;175(1):20-29.
133. Küry S, van Woerden GM, Besnard T, et al. De Novo Mutations in Protein Kinase Genes CAMK2A and CAMK2B Cause Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 2017;101(5):768-788.
134. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-2948.

135. Lee JY. Versatile casein kinase 1: multiple locations and functions. *Plant Signal Behav.* 2009;4(7):652-654.
136. Lee MM, Chan MK, Bundschuh R. SIB-BLAST: a web server for improved delineation of true and false positives in PSI-BLAST searches. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W53-W56.
137. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D257-D260.
138. L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry.* 1985;24(2):473-478.
139. Li J, Chen LA, Townsend CM Jr, Evers BM. PKD1, PKD2, and their substrate Kidins220 regulate neurotensin secretion in the BON human endocrine cell line. *J Biol Chem.* 2008;283(5):2614-2621.
140. Li J, Li Y, Deng Y, et al. A calcium-dependent protein kinase, ZmCPK32, specifically expressed in maize pollen to regulate pollen tube growth. *PLoS One.* 2018;13(5):e0195787.
141. Lin PT, Gleeson JG, Corbo JC, Flanagan L, Walsh CA. DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci.* 2000;20(24):9152-9161.
142. Lin Y, Hupp TR, Stevens C. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *FEBS J.* 2010;277(1):48-57.
143. Lizcano JM, Göransson O, Toth R, et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 2004;23(4):833-843.
144. Loog M, Toomik R, Sak K, Muszynska G, Järv J, Ek P. Peptide phosphorylation by calcium-dependent protein kinase from maize seedlings. *Eur J Biochem.* 2000;267(2):337-343.
145. Lu SX, Hrabak EM. An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 2002;128(3):1008-1021.

146. Ludwig AA, Romeis T, Jones JD. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot.* 2004;55(395):181-188.
147. MacRae TH. Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem.* 1997;244(2):265-278.
148. Manka SW, Moores CA. Pseudo-repeats in doublecortin make distinct mechanistic contributions to microtubule regulation. *EMBO Rep.* 2020;21(12):e51534.
149. Martín ML, Busconi L. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol.* 2001;125(3):1442-1449.
150. Martín ML, Busconi L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J.* 2000;24(4):429-435.
151. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis [published correction appears in *Nature* 1999 Feb 25;397(6712):719]. *Nature.* 1998;395(6705):863-869.
152. McPherson CE, Eipper BA, Mains RE. Genomic organization and differential expression of Kalirin isoforms. *Gene.* 2002;284(1-2):41-51.
153. McVicker DP, Millette MM, Dent EW. Signaling to the microtubule cytoskeleton: an unconventional role for CaMKII. *Dev Neurobiol.* 2015;75(4):423-434.
154. Meunier S, Shvedunova M, Van Nguyen N, Avila L, Vernos I, Akhtar A. An epigenetic regulator emerges as microtubule minus-end binding and stabilizing factor in mitosis. *Nat Commun.* 2015;6:7889.
155. Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, et al. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell.* 2011;145(4):607-621.
156. Mori IC, Murata Y, Yang Y, et al. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* 2006;4(10):e327.

157. Morsomme P, Boutry M. The plant plasma membrane H(+)-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1465(1-2):1-16.
158. Motose H, Hamada T, Yoshimoto K, et al. NIMA-related kinases 6, 4, and 5 interact with each other to regulate microtubule organization during epidermal cell expansion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2011;67(6):993-1005.
159. Müller M, Lutter D, Püschel AW. Persistence of the cell-cycle checkpoint kinase Wee1 in SadA- and SadB-deficient neurons disrupts neuronal polarity. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 2):286-294.
160. Nakamura M, Ehrhardt DW, Hashimoto T. Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1064-1070.
161. Nakamura M, Lindeboom JJ, Saltini M, Mulder BM, Ehrhardt DW. SPR2 protects minus ends to promote severing and reorientation of plant cortical microtubule arrays. *J Cell Biol*. 2018;217(3):915-927.
162. Nakamura M, Naoi K, Shoji T, Hashimoto T. Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in *Arabidopsis* epidermal cells. *Plant Cell Physiol*. 2004;45(9):1330-1334.
163. Nashchekin D, Fernandes AR, St Johnston D. Patronin/Shot Cortical Foci Assemble the Noncentrosomal Microtubule Array that Specifies the *Drosophila* Anterior-Posterior Axis. *Dev Cell*. 2016;38(1):61-72.
164. Neef S, Mann C, Zwenger A, Dybkova N, Maier LS. Reduction of SR Ca²⁺ leak and arrhythmogenic cellular correlates by SMP-114, a novel CaMKII inhibitor with oral bioavailability. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(4):45
165. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 2000;352.
166. Ng CP, Lee HC, Ho CW, et al. Differential mode of regulation of the checkpoint kinases CHK1 and CHK2 by their regulatory domains. *J Biol Chem*. 2004;279(10):8808-8819.

167. Nie J, Sun C, Faruque O, et al. Synapses of amphids defective (SAD-A) kinase promotes glucose-stimulated insulin secretion through activation of p21-activated kinase (PAK1) in pancreatic β -Cells. *J Biol Chem*. 2012;287(31):26435-26444.
168. Nishiyama R, Mizuno H, Okada S, et al. Two mRNA species encoding calcium-dependent protein kinases are differentially expressed in sexual organs of *Marchantia polymorpha* through alternative splicing. *Plant Cell Physiol*. 1999;40(2):205-212.
169. 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 Genet*. 2017;51(4):239–46.
170. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*. 2011;3:33. Published 2011 Oct 7.
171. Oda Y. Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Front Plant Sci*. 2015;6:236.
172. Oh MH, Wu X, Kim HS, et al. CDPKs are dual-specificity protein kinases and tyrosine autophosphorylation attenuates kinase activity. *FEBS Lett*. 2012;586(23):4070-4075.
173. Onselaer MB, Oury C, Hunter RW, et al. The Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase β -AMP-activated protein kinase- α 1 pathway regulates phosphorylation of cytoskeletal targets in thrombin-stimulated human platelets. *J Thromb Haemost*. 2014;12(6):973-986.
174. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*. 2004;36(1):40-45.
175. Park YY, Nam HJ, Do M, Lee JH. The p90 ribosomal S6 kinase 2 specifically affects mitotic progression by regulating the basal level, distribution and stability of mitotic spindles. *Exp Mol Med*. 2016;48(8):e250.
176. Patharkar OR, Cushman JC. A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudo-response regulator. *Plant J*. 2000;24(5):679-691.

177. Pellicena P, Schulman H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol.* 2014;5:21.
178. Pengelly RJ, Greville-Heygate S, Schmidt S, et al. Mutations specific to the Rac-GEF domain of TRIO cause intellectual disability and microcephaly. *J Med Genet.* 2016;53(11):735-742.
179. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612.
180. Picht E, DeSantiago J, Huke S, Kaetzel MA, Dedman JR, Bers DM. CaMKII inhibition targeted to the sarcoplasmic reticulum inhibits frequency-dependent acceleration of relaxation and Ca²⁺ current facilitation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(1):196-205.
181. Pizon V, Iakovenko A, Van Der Ven PF, et al. Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 23):4469-4482.
182. Pronk S, Páll S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 2013;29(7):845-854.
183. Raíces M, Chico JM, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM. Molecular characterization of StCDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Mol Biol.* 2001;46(5):591-601.
184. Rasmussen CG, Wright AJ, Müller S. The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *Plant J.* 2013;75(2):258-269.
185. Ratner N, Bloom GS, Brady ST. A role for cyclin-dependent kinase(s) in the modulation of fast anterograde axonal transport: effects defined by olomoucine and the APC tumor suppressor protein. *J Neurosci.* 1998;18(19):7717-7726.
186. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* 2004;23(8):1761-1769.

187. Redeker V. Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. In: *Methods in Cell Biology*. Elsevier; 2010. p. 77–103.
188. Reiner O, Sapir T. Mark/Par-1 marking the polarity of migrating neurons. *Adv Exp Med Biol*. 2014;800:97-111.
189. Rezazadeh S, Claydon TW, Fedida D. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317(1):292-299
190. Robison AJ, Bass MA, Jiao Y, et al. 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.
191. Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JD. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J*. 2001;20(20):5556-5567.
192. Romeis T, Piedras P, Jones JD. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell*. 2000;12(5):803-816.
193. Roostalu J, Surrey T. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(11):702-710.
194. Roostalu J, Thomas C, Cade NI, Kunzelmann S, Taylor IA, Surrey T. The speed of GTP hydrolysis determines GTP cap size and controls microtubule stability. *Elife*. 2020;9:e51992.
195. Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol*. 2006;574(Pt 3):889-903.
196. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14056-14064.

197. Rovina D, Fontana L, Monti L, et al. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 4 (MARK4) plays a role in cell cycle progression and cytoskeletal dynamics. *Eur J Cell Biol.* 2014;93(8-9):355-365.
198. Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):589-602.
199. Rozengurt E. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology (Bethesda).* 2011;26(1):23-33.
200. Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell.* 2001;12(4):971-980.
201. Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 2000;23(3):319-327.
202. Saito S, Hamamoto S, Moriya K, et al. N-myristoylation and S-acylation are common modifications of Ca²⁺-regulated Arabidopsis kinases and are required for activation of the SLAC1 anion channel. *New Phytol.* 2018;218(4):1504-1521.
203. Sathyanarayanan PV, Poovaiah BW. Autophosphorylation-dependent inactivation of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase: Chimeric calcium/calmodulin dependent protein kinase. *Eur J Biochem.* 2002;269(10):2457-63.
204. Scholz RP, Regner J, Theil A, et al. DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 1):92-102.
205. Seldin L, Muroyama A, Lechler T. NuMA-microtubule interactions are critical for spindle orientation and the morphogenesis of diverse epidermal structures. *Elife.* 2016;5:e12504.
206. Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW. Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science.* 2003;300(5626):1715-1718.
207. Sheen J. Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science.* 1996;274(5294):1900-1902.

208. Shen K, Teruel MN, Subramanian K, Meyer T. CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron*. 1998;21(3):593-606.
209. Shen W, Hanley-Bowdoin L. Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol*. 2006;142(4):1642-1655.
210. Shen W, Reyes MI, Hanley-Bowdoin L. Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol*. 2009;150(2):996-1005.
211. 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.
212. Shimamura A, Ballif BA, Richards SA, Blenis J. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol*. 2000;10(3):127-135.
213. Shimoda Y, Han L, Yamazaki T, Suzuki R, Hayashi M, Imaizumi-Anraku H. Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin-dependent protein kinase in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*. 2012;24(1):304–21.
214. Sigrist CJ, de Castro E, Cerutti L, et al. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D344-D347.
215. Sinnott-Smith J, Zhukova E, Hsieh N, Jiang X, Rozengurt E. Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*. 2004;279(16):16883-16893.
216. Smith L, Parizi-Robinson M, Zhu MS, et al. Properties of long myosin light chain kinase binding to F-actin in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35597-35604.
217. Spratley SJ, Bastea LI, Döppler H, Mizuno K, Storz P. Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *J Biol Chem*. 2011;286(39):34254-34261.

218. Stacklies W, Seifert C, Graeter F. Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:101.
219. Stephenson JR, Wang X, Perfitt TL, et al. A Novel Human CAMK2A Mutation Disrupts Dendritic Morphology and Synaptic Transmission, and Causes ASD-Related Behaviors. *J Neurosci*. 2017;37(8):2216-2233.
220. Styczynski MP, Jensen KL, Rigoutsos I, Stephanopoulos G. BLOSUM62 miscalculations improve search performance. *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):274-275.
221. Swatek KN, Wilson RS, Ahsan N, Tritz RL, Thelen JJ. Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases. *Biochem J*. 2014;459(1):15-25.
222. Swulius MT, Waxham MN. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(17):2637-2657
223. Takeda N, Maekawa T, Hayashi M. Nuclear-localized and deregulated calcium- and calmodulin-dependent protein kinase activates rhizobial and mycorrhizal responses in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*. 2012;24(2):810-822.
224. Tao L, Xie Q, Ding YH, et al. CAMKII and calcineurin regulate the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through the FOXO transcription factor DAF-16. *Elife*. 2013;2:e00518.
225. Thaiparambil JT, Eggers CM, Marcus AI. AMPK regulates mitotic spindle orientation through phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Mol Cell Biol*. 2012;32(16):3203-3217.
226. Tian X, Tian Y, Moldobaeva N, Sarich N, Birukova AA. Microtubule dynamics control HGF-induced lung endothelial barrier enhancement. *PLoS One*. 2014;9(9):e105912.
227. Timm T, Marx A, Panneerselvam S, Mandelkow E, Mandelkow EM. Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. *BMC Neurosci*. 2008;9 Suppl 2(Suppl 2):S9.

228. Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, Kempf T, Hoffmann I. Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16978-16990.
229. Tovey CA, Conduit PT. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond. *Essays Biochem.* 2018;62(6):765-780.
230. Trinczek B, Brajenovic M, Ebneith A, Drewes G. MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5915-5923.
231. Tsai YC, Riess O, Soehn AS, Nguyen HP. The Guanine nucleotide exchange factor kalirin-7 is a novel synphilin-1 interacting protein and modifies synphilin-1 aggregate transport and formation. *PLoS One.* 2012;7(12):e51999.
232. Tuy FP, Saillour Y, Kappeler C, Chelly J, Francis F. Alternative transcripts of *Dclk1* and *Dclk2* and their expression in doublecortin knockout mice. *Dev Neurosci.* 2008;30(1-3):171-186.
233. UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(5):2699.
234. 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.
235. van Haren J, Boudeau J, Schmidt S, et al. Dynamic microtubules catalyze formation of navigator-TRIO complexes to regulate neurite extension. *Curr Biol.* 2014;24(15):1778-1785.
236. van Kleeff PJM, Gao J, Mol S, et al. The Arabidopsis GORK K⁺-channel is phosphorylated by calcium-dependent protein kinase 21 (CPK21), which in turn is activated by 14-3-3 proteins. *Plant Physiol Biochem.* 2018;125:219-231.
237. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell Cycle.* 2009;8(15):2385-2398.

238. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*. 2003;52(4):609-623.
239. Waggener CT, Dupree JL, Elgersma Y, Fuss B. CaMKII β regulates oligodendrocyte maturation and CNS myelination. *J Neurosci*. 2013;33(25):10453-10458.
240. Wang S, Wu D, Quintin S, et al. NOCA-1 functions with γ -tubulin and in parallel to Patronin to assemble non-centrosomal microtubule arrays in *C. elegans*. *Elife*. 2015;4:e08649.
241. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296-W303.
242. Wieczorek M, Bechstedt S, Chaaban S, Brouhard GJ. Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*. 2015;17(7):907-916.
243. Willard FS, Crouch MF. MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. *Cell Signal*. 2001;13(9):653-664.
244. Witczak 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(23):3737-3755.
245. Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 20):3447-55.
246. Woodruff JB, Ferreira Gomes B, Widlund PO, Mahamid J, Honigsmann A, Hyman AA. The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin. *Cell*. 2017;169(6):1066-1077.e10.
247. Wu J, de Heus C, Liu Q, et al. Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus. *Dev Cell*. 2016;39(1):44-60.
248. Wu J, Janknecht R. Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42669-42679.

249. Wu PR, Tsai PI, Chen GC, et al. DAPK activates MARK1/2 to regulate microtubule assembly, neuronal differentiation, and tau toxicity. *Cell Death Differ.* 2011;18(9):1507-1520.
250. Xu X, Omelchenko T, Hall A. LKB1 tumor suppressor protein regulates actin filament assembly through Rho and its exchange factor Dbl independently of kinase activity. *BMC Cell Biol.* 2010;11:77.
251. Yamahashi Y, Saito Y, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M. Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1b (PAR1b) phosphorylates guanine nucleotide exchange factor H1 (GEF-H1) to regulate RhoA-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem.* 2011;286(52):44576-44584.
252. Yang G, Komatsu S. Involvement of calcium-dependent protein kinase in rice (*Oryza sativa* L.) lamina inclination caused by brassinolide. *Plant Cell Physiol.* 2000;41(11):1243-1250.
253. 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.
254. Yeaman C, Ayala MI, Wright JR, et al. Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol.* 2004;6(2):106-112.
255. Yi P, Goshima G. Microtubule nucleation and organization without centrosomes. *Curr Opin Plant Biol.* 2018;46:1-7.
256. Yip Delormel T, Boudsocq M. Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 2019;224(2):585-604.
257. Yoon GM, Dowd PE, Gilroy S, McCubbin AG. Calcium-dependent protein kinase isoforms in *Petunia* have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity. *Plant Cell.* 2006;18(4):867-78.
258. Yoshida H, Goedert M. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *J Neurochem.* 2012;120(1):165-176.

259. Yoshimura Y, Terabayashi T, Miki H. Par1b/MARK2 phosphorylates kinesin-like motor protein GAKIN/KIF13B to regulate axon formation. *Mol Cell Biol.* 2010;30(9):2206-2219.
260. Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14795-14800.
261. Zhao JW, Gao ZL, Ji QY, et al. Regulation of cofilin activity by CaMKII and calcineurin. *Am J Med Sci.* 2012;344(6):462-472.
262. Zhao Y, Pokutta S, Maurer P, Lindt M, Franklin RM, Kappes B. Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. *Biochemistry.* 1994;33(12):3714-3721.
263. Zhou Y, Yamada N, Tanaka T, et al. Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2. *Nat Commun.* 2015;6:7679.
264. Zou JJ, Wei FJ, Wang C, et al. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol.* 2010;154(3):1232-1243.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ЗДОБУВАЧА

Статті:

1. 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 Genet.* 2018;52(6):428–439. doi.org/10.3103/S0095452718060038
2. Novozhylov DO, Karpov PA, Blume YB. Bioinformatic search for Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. *Cytol Genet.* 2017;51(4):239–246. doi.org/10.3103/S0095452717040053
3. Новожилов ДО, Карпов ПА, Самофалова ДО, Попітак МА, Блюм ЯБ. Інгібуючий вплив KN-93 і KN-62 як результат CaM-спрямованого блокування активації протеїнкінази CaMK2 тварин і протеїнкіназ CDPK рослинного походження. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2020;26:298–304. doi.org/10.7124/FEEO.v26.1283
4. Новожилов ДО, Карпов ПА, Раєвський АВ, Ожередов СП, Блюм ЯБ. Ca²⁺- та Ca²⁺-кальмодулін-залежні протеїнкінази – потенційні регулятори структури і функцій мікротрубочок у рослин. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2017;20:323–328.) doi.org/10.7124/FEEO.v20.788

Тези:

Новожилов ДО, Карпов ПА, Блюм ЯБ. Біоінформаційний пошук СРК і СРК протеїнкіназ, потенційно пов'язаних з регуляцією рослинного цитоскелету. Збірник тез доповідей конференції «5-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом», 2-6 жовтня Одеса. 2016;59.

ДОДАТОК Б

**ПОСЛІДОВНОСТІ КАТАЛІТИЧНИХ ДОМЕНІВ ПРОТЕЇНКІНАЗ
ВИБІРКИ Ca²⁺-ТА КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ З *A.
thaliana*, А ТАКОЖ Ca²⁺/КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ
ЛЮДИНИ І МИШІ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У РЕГУЛЯЦІЇ
МІКРОТРУБОЧОК**

CPK1 (CDPK1_ARATH, At5g04870)

YSLGRKLGQGQFGTTFLCVEKTTGKEFACKSIAKRKLLTDEDVEDVRRE
IQIMHHLAGHPNVISIKGAYEDVVAVHLMCECCAGGELFDRIIQRGHYTERK
AAELTRTIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLFVSKHEDSLLKTIDFGLSMFF
KPDDVFTDVVGSPYYVAPEVLRKRYGPEADVWSAGVIVYILLSGVPPFWAET
EQGIFEQVLHGDLDFSSDPWPSISESAKDLVRKMLVRDPKKRLTAHQVLCHP
WV

CPK2 (CDPK2_ARATH, At3g10660)

YSLGRKLGQGQFGTTFLCLEKGTGNEYACKSISKRKLLTDEDVEDVRRE
IQIMHHLAGHPNVISIKGAYEDVVAVHLMELCSGGELFDRIIQRGHYTERKA
AELARTIVGVLEACHSLGVMHRDLKPENFLFVSREEDSLLKTIDFGLSMFFKP
DEVFTDVVGSPYYVAPEVLRKRYGPESDVWSAGVIVYILLSGVPPFWAETEQ
GIFEQVLHGDLDFSSDPWPSISESAKDLVRKMLVRDPKRRLTAHQVLCHPWV

CPK3 (CDPK3_ARATH, At4g23650)

YFGRELGRGQFGVTYLVTHKETKQQVACKSIPTRRLVHKDDIEDVRRE
VQIMHHLSGHRNIVDLKGAYEDRHSVNLIMELCEGGELFDRIISKGLYSERAA
ADLCRQMVMVHVSCHSMGVMHRDLKPENFLFLSKDENSPLKATDFGLSVFF
KPGDKFKDLVGSAYYVAPEVLKRNYGPEADIWSAGVILYILLSGVPPFWGEN
ETGIFDAILQGQLDFSADPWPAISDGAKDLVRKMLKYDPKDRLTAAEVLNH
PWI

CPK4 (CDPK4_ARATH, At4g09570)

YLLGKKLGQGQFGTTYLCTEKSSSANYACKSIPKRKLVCREYEDVWR
 EIQIMHHLSEHPNVVRIKGTYESVVFVHIVMEVCEGGELFDRIVSKGCFSERE
 AAKLIKTILGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLFDSPSDDAKLKATDFGLSVFY
 KPGQYLYDVVGSPYYVAPEVLKKCYGPEIDVWSAGVILYILLSGVPPFWAET
 ESGIFRQILQGKIDFKSDPWPTISEGAKDLIYKMLDRSPKKRISAHEALCHPWI

CPK5 (CDPK5_ARATH, At4g35310)

YTLSRKLGGQGQFGTTYLCTEIASGVVDYACKSISKRKLISKEDVEDVRREI
 QIMHHLAGHGSIVTIKGAYEDSLYVHIVMELCAGGELFDRIIQRGHYSERKAA
 ELTKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDDFSLKAIDFGLSVFFKPG
 QIFTDVVGSPYYVAPEVLLKRYGPEADVWTAGVILYILLSGVPPFWAETQQGI
 FDAVLKGYIDFESDPWPVISDSAKDLIRRMLSSKPAERLTAHEVLRHPWI

CPK6 (CDPK6_ARATH, At2g17290)

YTLSRKLGGQGQFGTTYLCTDIATGVVDYACKSISKRKLISKEDVEDVRREI
 QIMHHLAGHKNIVTIKGAYEDPLYVHIVMELCAGGELFDRIIHRGHYSERKA
 AELTKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDDFSLKAIDFGLSVFFKP
 GQIFKDVVGSPYYVAPEVLLKHYGPEADVWTAGVILYILLSGVPPFWAETQQ
 GIFDAVLKGYIDFDTPWPVISDSAKDLIRKMLCSPSERLTAHEVLRHPWI

CPK7 (CDPK7_ARATH, At5g12480)

YDLGREVGRGEGFGITYLCTDKETGEKYACKSISKKKLRTAVDIEDVRRE
 VEIMKHMPKHPNVVSLKDSFEDDDAVHIVMELCEGGELFDRIVARGHYTER
 AAAAVMKTIVEVVQICHKQGVMHRDLKPENFLFANKKETSALKKAIDFGLSV
 FFKPGEQFNEIVGSPYYMAPEVLRNYGPEIDVWSAGVILYILLCGVPPFWAE
 TEQGVAQAIIRSVDFKRDPWPRVSDSAKDLVRKMLEPDPKKRLTAAQVLEH
 TWI

CPK8 (CDPK8_ARATH, At5g19450)

YDLGREVGRGEGFGITYLCTDIKTGEKYACKSISKKKLRTAVDIEDVRREV
 EIMKHMPRHPNIVSLKDAFEDDDAVHIVMELCEGGELFDRIVARGHYTERAA
 AAVMKTILEVVQICHKHGVMHRDLKPENFLFANKKETSALKKAIDFGLSVFFK

PGEGFNEIVGSPYYMAPEVLRRNYGPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQ
GVAQAIIRSVIDFKRDPWPRVSETAKDLVRKMLEPDPKKRLSAAQVLEHSWI

CPK9 (CDPK9_ARATH, At3g20410)

YTLGKELGRGQFGVTYLCTENSTGKKYACKSISKKKLVTKADKDDMRR
EIQIMQHLSGQPNIVEFKGAYEDEKAVNLVMELCAGGELFDRIIAKGHYTER
AAASVCRQIVNVVKICHFMGVLHRDLKPENFLLSSKDEKALIKATDFGLSVFI
EEGKVYRDIVGSAYYVAPEVLRRRYGKEVDIWSAGIILYILLSGVPPFWAETE
KGIFDAILEGHIDFESQPWPSISSAKDLVRRMLTADPKRRISAADVLQHPWL

CPK10 (CDPKA_ARATH, At1g18890)

YILGRELGRGEFGITYLCTDRETHEALACKSISKRKLRTAVDIEDVRREV
AIMSTLPEHPNVVCLKASYEDNENVHLMELCEGGELFDRIVARGHYTERA
AAAVARTIAEVVMMCHSNGVMHRDLKPENFLFANKKENSPLKAIDFGLSVF
FKPGDKFTEIVGSPYYMAPEVLKRDYGPVVDVWSAGVIIYILLCGVPPFWAE
TEQGVALAILRGVLDVDFKRDWPQISESAKSLVKQMLDPDPTKRLTAQQVLAH
PWI

CPK11 (CDPKB_ARATH, At1g35670)

YLLGKKLGQGQFGTTYLCTEKSTSANYACKSIPKRKLVCREYEDVWR
EIQIMHHLSEHPNVVRIKGTYESVVFVHIVMEVCEGGELFDRIVSKGHFSERE
AVKLIKTI LGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLFDSPKDDAKLKATDFGLSVFY
KPGQYLYDVVGSPYYVAPEVLKKCYGPEIDVWSAGVILYILLSGVPPFWAET
ESGIFRQILQGKLDVFKSDPWPTISEAAKDLIYKMLERSPKKRISAHEALCHPWI

CPK12 (CDPKC_ARATH, At5g23580)

YFLGQVLGQGQFGTTFLCTHKTGQKLACKSIPKRKLLCQEDYDDVLR
EIQIMHHLSEYPNVVRIESAYEDTKNVHLMELCEGGELFDRIVKRGHYSERE
AAKLIKTIVGVVEACHSLGVVHRDLKPENFLFSSSEDEDASLKSTDFGLSVFCT
PGEAFSELVGSAYYVAPEVLHKHYGPECDVWSAGVILYILLCGFPPFWAESEI
GIFRKILQGKLEFEINPWPSISESAKDLIKMLESNPKKRLTAHQVLCHPWI

CPK13 (CDPKD_ARATH, At3g51850)

YLLDRELGRGEFGVTYLCIERSSRDLLACKSISKRKLRTAVDIEDVKREV
AIMKHLPKSSSIVTLKEACEDDNAVHLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAA

AGVTKTIVEVVQLCHKHGVHRDLKPENFLFANKKENSPLKAIDFGLSIFFKP
 GEKFSEIVGSPYYMAPEVLKRNYGPEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWAEESEQG
 VAQAILRGVIDFKREPWPNISETAKNLVRQMLEPDPKRRLTAKQVLEHPWI

CPK14 (CDPKE_ARATH, At2g41860)

YKLGRELGRGEFGVTYLCTELETGEIFACKSILKKKLKTSIDIEDVKREVEI
 MRQMPEHPNIVTLKETYEDDKAVHLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAA
 SVIKTIEVVQMCHKHGMHRDLKPENFLFANKKETASLKAIDFGLSVFFKPG
 ERFNEIVGSPYYMAPEVLRRSYGQEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEHEGV
 AKAILKSVIDFKRDPWPKVSDNAKDLIKMLHPDPRRRLTAQQVLDHPWI

CPK15 (CDPKF_ARATH, At4g21940)

YTLGKELGRGQFGITYTCKENSTGNTYACKSILKRKLTRKQDIDDVKREI
 QIMQYLSGQENIVEIKGAYEDRQSIHLVMELCGGSELDRIIAQGHYSEKAAA
 GVIRSVLNVVQICHFMGVIHRDLKPENFLLASTDENAMLKATDFGLSVFIEEG
 KVYRDIVGSAYYVAPEVLRRSYGKEIDIWSAGIILYILLCGVPPFWSETEKGIF
 NEIIKGEIDFDSQPWPSISESAKDLVRKLLTKDPKQRISAAQALEHPWI

CPK16 (CDPKG_ARATH, At2g17890)

YTIGKLLGHGQFGYTYVATDKKTGDRVAVKKIDKAKMTIPIAVEDVKR
 EVKILQALTGHENVVRFYNAFEDKNSVYIVMELCEGGELLDRIILARKDSRYS
 ERDAAVVVRQMLKVAAECHLRGLVHRDMKPENFLFKSTEEDSPLKATDFGL
 SDFIKPGKKFHDIVGSAYYVAPEVLKRRSGPESDVWSIGVISYILLCGRRPFW
 DKTEDGIFKEVLKNKPDFRRKPWPTISNSAKDFVKKLLVKDPRARLTAAQAL
 SHPWV

CPK17 (CDPKH_ARATH, At5g12180)

YSLGKELGRGQFGVTHLCTQKATGHQFACKTIAKRKLVNKEDIEDVRR
 EVQIMHHLTGQPNIVELKGAYEDKHSVHLMELCAGGELFDRIIAKGHYSER
 AAASLLRTIVQIVHTCHSMGVIHRDLKPENFLLLNKDENSPLKATDFGLSVFY
 KPGEVFKDIVGSAYYIAPEVLKRKYGPEADIWSIGVMLYILLCGVPPFWAEESE
 NGIFNAILRGHVDFSSDPWPSISPQAKDLVKKMLNSDPKQRLTAAQVLNHPW

I

CPK18 (CDPKI_ARATH, At4g36070)

YTIGKLLGHGQFGFTYVATDNNNGNRVAVKRIDKAKMTQPIEVEDVKR
 EVKILQALGGHENVVGFFHNAFEDKTYIYIVMELCDGGELLDRIKAKDSRYT
 EKDAAVVVRQMLKVAAECHLRGLVHRDMKPENFLFKSTEEGSSLKATDFGL
 SDFIKPGVKFQDIVGSAYYVAPEVLKRRSGPESDVWSIGVITYILLCGRRPFW
 DKTQDGFNEVMRKKPDFREVPWPTISNGAKDFVKKLLVKEPRARLTAAQA
 LSHSWV

CPK19 (CDPKJ_ARATH, At1g61950)

YSLGRELGRGQFGITYICTEISSGKNFACKSILKRKLIRTKDREDVRREIQI
 MHYLSGQPNIVEIKGAYEDRQSVHLMELCEGGELFDKITKRGHYSEKAAAE
 IIRSVVKVVQICHFMGVIHRDLKPENFLLSSKDEASSMLKATDFGVSVFIEEGK
 VYEDIVGSAYYVAPEVLKRNYGKAIDIWSAGVILYILLCGNPPFWAETDKGIF
 EEILRGEIDFESEPWPSISESAKDLVRNMLKYDPKKRFTAAQVLEHPWI

CPK20 (CDPKK_ARATH, At2g38910)

YSVGRKLGQGQFGTTFLCVDKKTGKEFACKTIAKRKLTPEDVEDVRRE
 IQIMHHLSGHPNVIQIVGAYEDAVAVHVVMEICAGGELFDRIIQRGHYTEKK
 AAELARIIVGVIEACHSLGVMHRDLKPENFLFVSGDEEAALKTIDFGLSVFFK
 PGETFTDVVGSPYYVAPEVLRKHYSHECDVWSAGVIIYILLSGVPPFWDETEQ
 GIFEQVLKGDLDIFSEPWPSVSESAKDLVRRMLIRDPKKRMTTHEVLCHPWA

CPK21 (CDPKL_ARATH, At4g04720)

YSLGKELGRGQFGITYMCKEIGTGNTYACKSILKRKLISKQDKEDVKREI
 QIMQYLSGQPNIVEIKGAYEDRQSIHLVMECAGGELFDRIIAQGHYSERAAA
 GIIRSIVNVVQICHFMGVVHRDLKPENFLLSSKEENAMLKATDFGLSVFIEEG
 KVYRDIVGSAYYVAPEVLRRSYGKEIDIWSAGVILYILLSGVPPFWAENEKGI
 FDEVIKGEIDFVSEPWPSISESAKDLVRKMLTKDPKRRITAAQVLEHPWI

CPK22 (CDPKM_ARATH, At4g04710)

YSFGDELGKGNFGTTYLCKENSTGKSYACKSIPKRTLSSEEEKEAVKTEI
 QIMDHVSGQPNIVQIKGSYEDNNSIHIVMELCGGGELFDKIDALVKSHSYSE
 KDAAGIFRSIVNAVKICHSLDVVHRDLKPENFLFSSKDENAMLKAIDFGCSVY
 IKEGKTFERVVGSKYYIAPEVLEGSYGKEIDIWSAGVILYILLSGVPPFQTGIES

IIVSTLCIVDAEIKECRLDFESQPWPLISFKAKHLIGKMLTKKPKERISAADVLE
HPWM

CPK23 (CDPKN_ARATH, At4g04740)

YSLGRELGRGGLGITYMCKEIGTGNİYACKSILKRKLISELGREDVKTEIQ
IMQHLSGQPNVVEIKGSYEDRHSVHLMELCAGGELFDRIIAQGHYSERAAA
GTIKSIVDVVQICHLNGVIHRDLKPENFLFSSKEENAMLKVTDGFLSAFIEEGK
IYKDVGSPYYVAPEVLRQSYGKEIDIWSAGVILYILLCGVPPFWADNEEGVF
VEILKCKIDFVREPWPSISDSAKDLVEKMLTEDPKRRITAAQVLEHPWI

CPK24 (CDPKO_ARATH, At2g31500)

YDLGKELGRGEFGVTHECIEISTRERFACKRISKEKLRTVIDVEDVRREVE
IMRCLPKHPNIVSFKEAFEDKDAVYLVMEICEGGELFDRIVSRGHYTERAAAS
VAKTILEVVKVCHEHGVIHRDLKPENFLFSNGTETAQLKAIDFGLSIFFKPAQ
RFNEIVGSPYYMAPEVLRNRYGPEIDVWSAGVILYILLCGVPPFWAETEEGIA
HAIVRGNIDFERDPWPKVSHEAKELVKNMLDANPYSRLTVQEVLEHPWI

CPK25 (CDPKP_ARATH, At2g35890)

YNLGSKLGHGQFGTTFVCVEKGTGEEYACKSIPKRKLENEEDVEDVRRE
IEIMKHLLGQPNVISIKGAYEDSVAVHMMELCRGGELFDRIVERGHYSERK
AAHLAKVILGVVQTCHSLGVMHRDLKPENFLFVNDDSDPLKAIDFGLSMFL
KPGENFTDVVGSPYYIAPEVLNKNYGPEADIWSAGVMIYVLLSGSAPFWGET
EEEIFNEVLEGELDLTSDPWPQVSESAKDLIRKMLERNPIQRLTAQQVLCHPW
I

CPK26 (CDPKQ_ARATH, At4g38230)

YSLGHKLGQGQFGTTYMCKEISTGREYACKSITKRKLISKEDVEDVRREI
QIMHHLAGYKNIVTIKAYEDPLYVHIVMELCSGGELFDRIIQRGHYSERKAA
ELIKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDDFSLKAIDFGLSVFFKPG
QIFEDVVGSPYYVAPEVLLKHYGPEADVWTAGVILYILVSGVPPFWAETQQG
IFDAVLKGHIDFSDPWPLISDSAKNLIRGMLCSRPSERLTAHQVLRHPWI

CPK27 (CDPKR_ARATH, At4g04700)

YILGEELGRGNFGLTRKCVEKSTGKTFACKTILKTKLKDEECEEDVKREI
RIMKQLSGEPNIVEFKNAYEDKDSVHIVMEYCGGGELYDKILALYDVGKSYS

EKEAAGIIRSIVNVVKNCHYMGVMHRDLKPENFLLTSNDDNATVKVIDFGCS
 VFIEEGKVYQDLAGSDYYIAPEVLQGNYGKEADIWSAGIILYILLCGKSPFVK
 EPEGQMFNEIKSLEIDYSEEPWPLRDSRAIHLVKRMLDRNPKERISAAEVLGH
 PWM

CPK28 (CDPKS_ARATH, At5g66210)

YTIGKLLGHGQFGYTYVAIHRPNGDRVAVKRLDKSKMVLPIAVEDVKR
 EVQILIALSGHENVVQFHNAFEDDDYVYIVMELCEGGELDRILSKKGNRYS
 EKDAAVVVRQMLKVAGECHLHGLVHRDMKPENFLFKSAQLDSPLKATDFG
 LSDFIKPGKRFHDIVGSAYYVAPEVLKRRSGPESDVWSIGVITYILLCGRRPFW
 DRTEGIFKEVLRNKPDFSRRKPWATISDSAKDFVKKLLVKDPRARLTAAQAL
 SHAWV

CPK29 (CDPKT_ARATH, At1g76040)

YDLHKELGRGQFGITYKCTDKSNGREYACKSISKRKLIRRKDIEDVRREV
 MILQHLTGQPNIVEFRGAYEDKDNLHLMELCSGGELFDRIKKKGSYSEKEA
 ANIFRQIVNVVHVCHFMGVVHRDLKPENFLLVSNEEDSPIKATDFGLSVFIEE
 GKVYRDIVGSAYYVAPEVLHRNYGKEIDVWSAGVMLYILLSGVPPFWGETE
 KTIFEAILEGKLDLETSPWPTISESAKDLIRKMLIRDPPKKRITAAEAELEHPWM

CPK30 (CDPKU_ARATH, At1g74740)

YILGRELGRGEFGITYLCTDRETREALACKSISKRKLRTAVDVEDVRREV
 TIMSTLPEHPNVVVKLKATYEDNENVHLMELCEGGELFDRIVARGHYTERA
 AATVARTIAEVVRMCHVNGVMHRDLKPENFLFANKKENSALKAIDFGLSVL
 FKPGERFTEIVGSPYYMAPEVLKRNYGPEVDVWSAGVILYILLCGVPPFWAE
 TEQGVALAILRGVLDVDFKRDPWSQISESAKSLVKQMLEPDSTKRLTAQQVLDH
 PWI

CPK31 (CDPKV_ARATH, At4g04695)

YILGDELGQGQFGITRKCVEKTSGKTYACKTILKTNLKSREDEEAVKREI
 RIMKHLSGEPNIVEFKKAYEDRDSVHIVMEYCGGGELFKKIEALSKDGKSYS
 EKEAVEIIRPIVNVVKNCHYMGVMLRDLKPENFLLSSTDKNATVKAIDFGCS
 VFIEEGEVHRKFAGSAYYIAPEVLQGKYGKEADIWSAGIILYILLCGKPPFVTE

PEAQMFSEIKSAKIDVDSESWKFIDVKAKHLVNRMLNRNPKERISAAEVLGH
PWM

CPK32 (CDPKW_ARATH, At3g57530)

YTLGRELGRGEFGVTYLCTDKETDDVFACKSILKKKLRTAVDIEDVRRE
VEIMRHMPEHPNVVTLKETYEDEHAVHLMELCEGGELFDRIVARGHYTER
AAAAVTKTIMEVVQVCHKHGMHRDLKPENFLFGNKKETAPLKAIDFGLSV
FFKPGERFNEIVGSPYYMAPEVLKRNYGPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAE
TEQGVAQAIIRSVLDFRRDPWPKVSENAKDLIRKMLDPDQKRRLTAQQVLD
HPWL

CPK33 (CDPKX_ARATH, At1g50700)

YTLSKELGRGQFGVTYLCTEKSTGKRFACKSISKKKLVTKGDKEDMRRE
IQIMQHLSGQPNIVEFKGAYEDEKAVNLMELCAGGELFDRILAKGHYSERA
AASVCRQIVNVNICHFMGMHRDLKPENFLSSKDEKALIKATDFGLSVFIE
EGRVYKDIVGSAYYVAPEVLKRRYGKEIDIWSAGIILYILLSGVPPFWAETEK
GIFDAILEGEIDFESQPWPSISNSAKDLVRRMLTQDPKRRISAAEVLKHPWL

CPK34 (CDPKY_ARATH, At5g19360)

YTLGKELGRGQFGVTHLCTQKATGLQFACKTIAKRKLVNKEDIEDVRRE
VQIMHHLTGQPNIVELKGAYEDKHSVHLMELCAGGELFDRIIAKGHYSERA
AASLLRTIVQIIHTCHSMGVIHRDLKPENFLLLSKDENSPLKATDFGLSVFYKP
GEVFKDIVGSAYYIAPEVLRRKYGPEADIWSIGVMLYILLCGVPPFWAESENG
IFNAILSGQVDFSSDPWPVISPQAKDLVRKMLNSDPKQRLTAAQVLNHPWI

CRK1 (CAMK1_ARATH, At2g41140)

YEIDGEVGRGHFGYTCSAKGKKGSLKGQEVAVKVIPKSKMTTAAIADV
SREVKMLRALTGHKNLVQFYDAFEDDENYIVMELCKGGELLDKILQRGGK
YSEDDAKKVMVQILSVVAYCHLQGVVHRDLKPENFLFSTKDETSPLKAIDFG
LSDYVKPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRTYGTEADMWSIGVIAIILLCGSRP
FWARTESGIFRAVLKAEPNFEEAPWPSLSPEAVDFVKRLLNKDYRKRLTAAQ
ALCHPWL

CRK2 (CAMK2_ARATH, At3g19100)

IELGEEIGRGHFGYTCSAKFKKGELKDQEVAVKVIPKSKMTSAISIEDVR
 REVKILRALSGHQNLVQFYDAFEDNANVYIVMELCGGGELLDRLARGGKYS
 EDDAKAVLIQILNVVAFCHLQGVVHRDLKPENFLYTSKEENSMLKVIDFGLS
 DFVRPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRSYTTEADVWSIGVIA YILLCGSRPFWA
 RTESGIFRAVLKADPSFDEPPWPSLSFEAKDFVKRLLYKDPRKRMTASQALM
 HPWI

CRK3 (CAMK3_ARATH, At2g46700)

YELGKEVGRGHFGHTCSGRGKKGDIKDHPPIAVKIISKAKMTTAIAIEDVR
 REVKLLKSLSGHKYLIKYYDANCEDANNVYIVMELCDGGELLDRLARGGKY
 PEDDAKAIVVQILTVVSFCHLQGVVHRDLKPENFLFTSSREDSCLKLIDFGLS
 DFIRPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRSYSLEADIWSIGVITYILLCGSRPFWAR
 TESGIFRTVLRTEPNYDDVPWPCSSSEGKDFVKRLLNKDYRKRMSAVQALTH
 PWL

CRK4 (CAMK4_ARATH, At5g24430)

YELGKEVGRGHFGHTCWAKAKKKGKMKNQTVAVKIISKAKMTSTLSIED
 VRREVKLLKALSGHRHMVKFYDVYEDADNVFVVMELCEGGELLDRLARG
 GRYPEVDAKRILVQILSATAFFHLQGVVHRDLKPENFLFTSRNEDAILKVIDF
 GLSDFIRYDQRLNDVVGSAYYVAPEVLHRSYSTEMWWSIGVISYILLCGSRP
 FYGRTESAIFRCVLRANPNFEDMPWPSISPTAKDFVKRLLNKDHRKRMTAAQ
 ALAHPWL

CRK5 (CAMK5_ARATH, At3g50530)

YELGDEVGRGHFGYTC AAKFKKGDNKGQQVAVKVIPKAKMTTAIAIED
 VRREVKILRALSGHNNLPHFYDAYEDHDNVYIVMELCEGGELLDRLSRGGK
 YTEEDA KTVMIQILNVVAFCHLQGVVHRDLKPENFLFTSKEDTSQLKAIDFG
 LSDYVRPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRSYSTEMIWSVGVIVYILLCGSRPF
 WARTESGIFRAVLKADPSFDDPPWPLLSSEARDFVKRLLNKDPRKRLTAAQA
 LSHPWI

CRK6 (CAMK6_ARATH, At3g49370)

YELGREVGRGHFGHTCWAKAKKGGKIKGQTVAVKIISKSKMTSALSIEDV
RREVKLLKALSGHSHMVKFYDVFEDSDNVFVVMELCEGGELLDLSILARGGR
YPEAEAKRILVQILSATAFFHLQGVVHRDLKPENFLFTSKNEDAVLKVIDFGL
SDYARFDQRLNDVVGSAYYVAPEVLHRSYSTEADIWSIGVISYILLCGSRPFY
GRTESAIFRCVLRANPNFDDLWPSPISPIAKDFVKRLLNKDHRKRMTAAQAL
AHPWL

CRK7 (CAMK7_ARATH, At3g56760)

YEIDGEVGRGHFGYTCSTAKGKKGSLKGQDVAVKVIPKSKMTTAAIAIEDV
RREVKILRALTGHKNLVQFYDAFEDDENYIVMELCQGGELLDKILQRGGK
YSEVDAKKVMIQILSVVAYCHLQGVVHRDLKPENFLFTTKDESSPLKAIDFG
LSDYVRPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRTYGTEADMWSIGVIA YILLCGSRPF
WARSESGIFRAVLKAEPNFEEAPWPSLSPDAVDFVKRLLNKDYRKRLTAAQA
LCHPWL

CRK8 (CAMK8_ARATH, At1g49580)

VELGEEIGRGHFGYTCSTAKFKKGELKGQVVAVKIIPKSKMTTAAIAIEDVR
REVKILQALSGHKNLVQFYDAFEDNANVYIAMELCEGGELLDRLARGGKYS
ENDAKPVIIQILNVVAFCHFQGVVHRDLKPENFLYTSKEENSQLKAIDFGLSD
FVRPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRSYTTEADVWSIGVIA YILLCGSRPFWAR
TESGIFRAVLKADPSFDEPPWPFLSSDAKDFVKRLLFKDPRRRMSASQALMH
PWI

CAMK1 (KCC1A_HUMAN)

YDFRDVLGTGAFSEVILAEDKRTQKLVAIKCIAKEALEGKEGSMENEIA
VLHKIKHPNIVALDDIYESGGHLYLIMQLVSGGELFDRIVEKGFYTERDASRLI
FQVLDAVKYLHDLGIVHRDLKPENLLYYSLDEDSKIMISDFGLSKMEDPGSV
LSTACGTPGYVAPEVLAQKPYSKAVDCWSIGVIA YILLCGYPPFYDENDAKL
FEQILKAEYEFDSPYWDDISDSAKDFIRHLMKEDPEKRFTCEQALQHPWI

CAMK2B (KCC2B_HUMAN)

YQLYEDIGKGAFSVVRRCVKLCTGHEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
 RICRLLKHSNIVRLHDSISEEGFHLYVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
 IQQILEAVLHCHQMGMVVHRDLKPENLLLASKCKGAAVKLADFGLAIEVQGD
 QQAWFGFAGTPGYLSPEVLRKEAYGKPVDIWACGVILYILLVGYPPFWDED
 QHKLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKNLINQMLTINPAKRITAEALKHP
 WV

CAMK2D (KCC2D_HUMAN)

YQLFEELGKGAFSVVRRCMKIPTGQEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
 RICRLLKHPNIVRLHDSISEEGFHLYVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
 IQQILESVNHCHLNGIVHRDLKPENLLLASKSKGAAVKLADFGLAIEVQGDQ
 QAWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVDMWACGVILYILLVGYPPFWDEDQ
 HRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINPAKRITASEALKHPWI

CAMK2G (KCC2G_HUMAN)

YQLFEELGKGAFSVVRRCVKKTSTQEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
 RICRLLKHPNIVRLHDSISEEGFHLYVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
 IHQILESVNHIHQHDIVHRDLKPENLLLASKCKGAAVKLADFGLAIEVQGEQQ
 AWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVDIWACGVILYILLVGYPPFWDEDQHK
 LYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKNLINQMLTINPAKRITADQALKHPWV

CAMK2A (KCC2A_HUMAN)

YQLFEELGKGAFSVVRRCVKVLAGQEYAAKIINTKKLSARDHQKLERE
 ARICRLLKHPNIVRLHDSISEEGHHYLIFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASH
 CIQQILEAVLHCHQMGMVVHRDLKPENLLLASKLKGAAVKLADFGLAIEVEGE
 QQAWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVLDLWACGVILYILLVGYPPFWDED
 QHRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINPSKRITAAEALKHP
 WI

CAMK4 (KCC4_HUMAN)

FEVESELGRGATSIVYRCKQKGTQKPYALKVLKKTVDKKIVRTEIGVLL
 RLSHPNIIKLKEIFETPTEISLVLELVTGGELFDRIVEKGYYSERDAADAVKQIL
 EAVAYLHENGIVHRDLKPENLLYATPAPDAPLKIADFGLSKIVEHQVLMKTV

CGTPGYCAPEILRGCAYGPEVDMWSVGIITYILLCGFEPFYDERGDQFMFRI
LNCEYYFISPWWDEVSLNAKDLVRKLIVLDPKKRLTTFQALQHPWV

MYLK3 (MYLK3_HUMAN)

VCQHEVLGGGRFGQVHRCTEKSTGLPLAAKIIKVKSAKDREDVKNEINI
MNQLSHVNLIQLYDAFESKHSCTLVMEYVDGGELFDTRITDEKYHLTELDVVL
FTRQICEGVHYLHQHYILHLDLKPENILCVNQTGHQIKIIDFGLARRYKPREKL
KVNFGTPEFLAPEVVNYEFVSFPTDMWSVGVITYMLLSGLSPFLGETDAETM
NFIVNCSWDFDADTFEGLSEEAKDFVSRLLVKEKSCRMSATQCLKHEWL

AMPK1 (AAPK1_HUMAN)

YILGDTLGVGTFGKVKVGKHELTGHKVAVKILNRQKIRSLDVVGKIRRE
IQNLKLFRRPHIIKLYQVISTPSDIFMVMMEYVSSGGELFDYICKNGRLDEKESRR
LFQQILSGVDYCHRHMVVHRDLKPENVLLDAHNAKIADFGLSNMMSDGE
FLRTSCGSPNYAAPEVISGRLYAGPEVDIWSSGVILYALLCGTLPFDDDHVPT
LFKKICDGIFYTPQYLNPSVISLLKHMLQVDPMKRATIKDIREHEWF

BRSK1 (BRSK1_HUMAN)

YRLEKTLGKGQTGLVKLGVHCITGQKVAIKIVNREKLSSEVLMKVEREI
AILKLIEHPHVLKLHDVYENKKYLYLVLEHVSSGGELFDYLVKKGRLTPKEAR
KFFRQIVSALDFCHSYSICHRDLKPENLLLDEKNNIRIADFGMASLQVGDSLL
ETSCGSPHYACPEVIKGEKYDGRRADMWSCGVILFALLVGALPFDDDNLRQL
LEKVKRGVFMHPHFIPPDCQSLLRGMIEVEPEKRLSLEQIQKHPWY

BRSK2 (BRSK2_HUMAN)

YRLEKTLGKGQTGLVKLGVHCVTCQKVAIKIVNREKLSSEVLMKVEREI
AILKLIEHPHVLKLHDVYENKKYLYLVLEHVSSGGELFDYLVKKGRLTPKEAR
KFFRQIISALDFCHSHSICHRDLKPENLLLDEKNNIRIADFGMASLQVGDSLLE
TSCGSPHYACPEVIRGEKYDGRKADVWSCGVILFALLVGALPFDDDNLRQLL
EKVKRGVFMHPHFIPPDCQSLLRGMIEVDAARRLTLEHIQKHIWY

CHEK1 (CHK1_HUMAN)

WDLVQTLGEGAYGEVQLAVNRVTEEA VAVKIVDMKRAVDPCPENIKKEI
CINKMLNHENVVKFYGHRREGNIQYLFLEYCSGGELFDRIEPDIGMPEPDAQ
RFFHQLMAGVVYLHGIGITHRDIKPENLLLDERDNLKISDFGLATVFRYNNRE

RLLNKMCGTLPYVAPELLKRREFHAEPVDVWSCGIVLTAMLAGELPWDQPS
 DSCQEYSDWKEKKTYLNPWKKIDSAPLALLHKILVENPSARITIPDIKKDRWY
 CHEK2 (CHK1_HUMAN)

YIMSKTLGSGACGEVKLAFERKTCKKVAIKIISKRRKFAIGSAREADPALN
 VETEIEILKKLNHPCCIKNFFDAEDYYIVLELMEGGELFDKVVGNGKRLKEAT
 CKLYFYQMLLAVQYLHENGIIHRDLKPENVLLSSQEEDCLIKITDFGHSKILGE
 TSLMRTLTCGTPTYLAPEVLVSVGTAGYNRAVDCWSLGVILFICLSGYPPFSEH
 RTQVSLKDQITSGKYNFIPEVWAEVSEKALDLVKKLLVDPKARFTTEEALR
 HPWL

DAPK1 (DAPK1_HUMAN)

YDTGEELGSGQFAVVKKCREKSTGLQYAAKFIKKRRTKSSRRGVSRREDI
 EREVSILKEIQHPNVITLHEVYENKTDVILILELVAGGELFDFLAEKESLTEEEA
 TEFLKQILNGVYYLHSLQIAHFDLKPENIMLLDRNVPKPRIKIIDFGLAHKIDF
 GNEFKNIFGTPEFVAPEIVNYEPLGLEADMWSIGVITYILLSGASPFLGDTKQE
 TLANVSAVNYEFEDEYFSNTSALAKDFIRLLVKDPKKRMTIQDSLQHPWI

DAPK3 (DAPK3_HUMAN)

YEMGEELGSGQFAIVRKCRQKGTGKEYAAKFIKKRRLSSRRGVSRREEIE
 REVNILREIRHPNIITLHDIFENKTDVVLILELVSGGELFDFLAEKESLTEDEAT
 QFLKQILDGVHYLHASKRIAHFDLKPENIMLLDKNVNPRIKLIDFGIAHKIEAG
 NEFKNIFGTPEFVAPEIVNYEPLGLEADMWSIGVITYILLSGASPFLGETKQET
 LTNISAVNYDFDEEYFSNTSELAKDFIRLLVKDPKRRMTIAQSLEHSWI

LKB1 (STK11_HUMAN)

YLMGDLLGEGSYGKVKEVLDSETLCRRRAVKILKKKKLRRIPNGEANVK
 KEIQLLRRLRHKNVIQLVDVLYNEEKQKMYMVMMEYCVCGMQEMLDSVPEK
 RFPVCQAHGYFCQLIDGLEYLHSQGIVHKDIKPGNLLLTTGGTLKISDLGVAE
 ALHPFAADDTCRTSQGSPAFQPPEIANGLDTFSGFKVDIWSAGVTLYNITTGL
 YPFEGDNIYKLFENIGKGSYAIPGDCGPPLSDLLKGMLEYEPAKRFSIRQIRQH
 SWF

MARK1 (MARK1_HUMAN)

YRLQKTIGKGNFAKVKLARHVLTGREVAVKIIDKTQLNPTSLQKLFREV
RIMKILNHPNIVKLFEVIETEKTLYL VMEYASGGEVFDYLV AHGRMKEKEAR
AKFRQIVSAVQYCHQKYIVHRDLKAENLLLDGDMNIKIADFGFSNEFTVGNK
LDTFCGSPPYAAPELFQGKKYDGPEVDVWSLGVILYTLVSGSLPFDGQNLKE
LRERVLRGKYRIPFYMSTDCENLLKKLLVLNPIKRGSLAQIMKDRWM

MARK2 (MARK2_HUMAN)

YRLLKTIGKGNFAKVKLARHILTGKEVAVKIIDKTQLNSSSLQKLFREVR
IMKVLNHPNIVKLFEVIETEKTLYL VMEYASGGEVFDYLV AHGRMKEKEAR
AKFRQIVSAVQYCHQKFIVHRDLKAENLLLDADMNIKIADFGFSNEFTFGNK
LDTFCGSPPYAAPELFQGKKYDGPEVDVWSLGVILYTLVSGSLPFDGQNLKE
LRERVLRGKYRIPFYMSTDCENLLKKFLILNPSKRGTLAQIMKDRWM

MARK3 (MARK3_HUMAN)

YRLLKTIGKGNFAKVKLARHILTGREVAIKIIDKTQLNPTSLQKLFREVRI
MKILNHPNIVKLFEVIETEKTLYLIMEYASGGEVFDYLV AHGRMKEKEARSK
FRQGCQAGQTIKVQVSFDLLSLMFTFIVSAVQYCHQKRIVHRDLKAENLLLD
ADMNIKIADFGFSNEFTVGGKLDTFCGSPPYAAPELFQGKKYDGPEVDVWSL
GVILYTLVSGSLPFDGQNLKELRERVLRGKYRIPFYMSTDCENLLKRFLVLNP
IKRGTLAQIMKDRWI

MARK4 (MARK4_HUMAN)

YRLLRTIGKGNFAKVKLARHILTGREVAIKIIDKTQLNPSSLQKLFREVRI
MKGLNHPNIVKLFEVIETEKTLYL VMEYASAGEVFDYLV SHGRMKEKEARA
KFRQIVSAVHYCHQKNIVHRDLKAENLLLDAAENIKIADFGFSNEFTLGSKLD
TFCGSPPYAAPELFQGKKYDGPEVDIWSLGVILYTLVSGSLPFDGHNLKELRE
RVLRGKYRVPFYMSTDCESILRRFLVLNPAKRCTLAQIMKDKWI

PKD1 (KPCD1_HUMAN)

IFPDEVLGSGQFGIVYGGKHRKTGRDVAIKIIDKLRFPKQESQLRNEVAI
LQNLHHPGVVNLECMFETPERVFVMEKLGDMLEMILSSEKGRLEPHITKF
LITQILVALRHLHFKNIVHCDLKPENVLLASADPPQVKLCDFGFARIIGEKSF

RRSVVGTPAYLAPEVLRNKGYNRSLDMWSVGVIIYVSLSGTFPFNEDEDIHD
 QIQNAAFMYPPNPWKEISHEAIDLINLLQVKMRKRYSDKTLSPWL

PKD2 (KPCD2_HUMAN)

IFPDEVLGSGQFGVVYGGKHRKTGRDVAVKVIDKLRFPKQESQLRNEV
 AILQSLRHPGIVNLECMFETPEKVFVMEKLGDMLEMILSSEKGRLEPERLTK
 FLITQILVALRHLHFKNIVHCDLKPENVLLASADPFQVKLCDFGFARIIGES
 FRRSVVGTPAYLAPEVLLNQGYNRSLDMWSVGVIMYVSLSGTFPFNEDEDIN
 DQIQNAAFMYPASPWSHISAGAIDLINLLQVKMRKRYSDKSLSPWL

PKD3 (KPCD3_HUMAN)

IFADEVLGSGQFGIVYGGKHRKTGRDVAIKVIDKMRFPKQESQLRNEV
 AILQNLHHPGIVNLECMFETPERVFVMEKLGDMLEMILSSEKSRLEPERITK
 FMVTQILVALRNLHFKNIVHCDLKPENVLLASAEPFQVKLCDFGFARIIGEK
 SFRRSVVGTPAYLAPEVLRKSGYNRSLDMWSVGVIIYVSLSGTFPFNEDEDIN
 DQIQNAAFMYPPNPWREISGEAIDLINLLQVKMRKRYSDKSLSPWL

RSK1 (KS6A1_HUMAN) каталітичний домен 1

FELLKVLGQGSFGKVFLVRKVTRPDSGHLIYAMKVLKKATLKVDRVRT
 KMERDILADVNHFPVVKLHYAFQTEGKLYLILDFLRGGDLFTRLSKEVMFTE
 EDVKFYLAELALGLDHLHSLGIYRDLKPENILLDEEGHIKLTDFGLSKEAIDH
 EKKAYSFCGTVEYMAPEVVNRQGHSHSADWWSYGVLMFEMLTGSLPFQ GK
 DRKETMTLILKAKLGMPQFLSTEAQSLLRALFKRNPANRLGSGPDGAEEIKR
 HVFY

RSK1 (KS6A1_HUMAN) каталітичний домен 2

YVVKETIGVGSYSECKRCVHKATNMEYAVKVIDKSKRDPSEEIEILLRY
 GQHPNIITLKD VYDDGKHVYLVTELMRGGELLDKILRQKFFSEREASFVLHTI
 GKTVEYLHSQGVVHRDLKPSNILYVDESGNPECLRICDFGFAKQLRAENGLL
 MTPCYTANFVAPEVLKRQGYDEGC DIWSLGILLYTMLAGYTPFANGPSDTPE
 EILTRIGSGKFTLSGGNWNTVSETAKDLVSKMLHVDPHQRLTAKQVLQHPW
 V

RSK2 (KS6A2_HUMAN) каталітичний домен 1

FELLKVLGQGSFGKVFLVKKISGSDARQLYAMKVLKKATLKVRDRVRT
 KMERDILVEVNHPFIVKLHYAFQTEGKLYLILDFLRGGDLFTRLSKEVMFTEE
 DVKFYLAELALALDHLHSLGIIYRDLKPENILLDEEGHIKLTDFGLSKESIDHE
 KKAYSFCGTVEYMAPEVVNRRGHTQSADWWSFGVLMFEMLTGTLPFQGKD
 RKETMTMILKAKLGMPQFLSPEAQSLLRMLFKRNPANRLGAGPDGVEEIKRH
 SFF

RSK2 (KS6A2_HUMAN) каталітичний домен 2

YEVKEDIGVGSYSVCKRCIHKATNMEFAVKIIDKSKRDPTEEIEILLRYG
 QHPNIITLKDVYDDGKYVYVVTTELMKGGELLDKILRQKFFSEREASAVLFTIT
 KTVEYLHAQGVVHRDLKPSNILYVDESGNPESIRICDFGFAKQLRAENGLLM
 TPCYTANFVAPEVLKRQGYDAACDIWSLGVLLYTMLTGYTPFANGPDDTPE
 EILARIGSGKFSLSGGYWNSVSDTAKDLVSKMLHVDPHQRLTAALVLRHPWI

RSK3 (KS6A3_HUMAN) каталітичний домен 1

FELLKVLGQGSYGVFLVRKVKGSDAGQLYAMKVLKKATLKVRDRVR
 SKMERDILAEVNHPFIVKLHYAFQTEGKLYLILDFLRGGDLFTRLSKEVMFTE
 EDVKFYLAELALALDHLHSLGIIYRDLKPENILLDEEGHIKITDFGLSKEAIDH
 DKRAYSFCGTIEYMAPEVVNRRGHTQSADWWSFGVLMFEMLTGSLPFQGK
 DRKETMALILKAKLGMPQFLSGEAQSLLRALFKRNPANRLGAGIDGVEEIKR
 HPPF

RSK3 (KS6A3_HUMAN) каталітичний домен 2

YEIKEDIGVGSYSVCKRCVHKATDTEYAVKIIDKSKRDPSEEIEILLRYGQ
 HPNIITLKDVYDDGKFVYLVMEIMRGGELLDRIILRQRYFSEREASDVLCTITK
 TMDYLHSQGVVHRDLKPSNILYRDESGSPESIRVCDGFAKQLRAGNGLLMT
 PCYTANFVAPEVLKRQGYDAACDIWSLGIILYTMLAGFTPFANGPDDTPEEIL
 ARIGSGKYALSGGNWDSISDAKDVVSKMLHVDPHQRLTAMQVLKHPWV

RSK4 (KS6A4_HUMAN) каталітичний домен 1

FELLKVLGQGSFGKVFLVRKKTGPDAGQLYAMKVLKKASLKVRDRVR
 TKMERDILVEVNHPFIVKLHYAFQTEGKLYLILDFLRGGDVFTRLSKEVLFTE
 EDVKFYLAELALALDHLHQLGIVYRDLKPENILLDEIGHIKLTDFGLSKESVD

QEKKAYSFCGTVEYMAPEVVNRRGHSQSADWWSYGVLMFEMLTGTLPFQG
 KDRNETMNMILKAKLGMPQFLSAEAQSLLRMLFKRNPANRLGSEGVVEIKR
 HLFF

RSK4 (KS6A4_HUMAN) каталітичний домен 2

YELKEDIGVGSYSVCKRCIHATTNMEFAVKIIDKSKRDPSEEIEILMRYG
 QHPNIITLKDVFDGRYVYLVTDLMKGGELLDRLKQKCFSEREASDILYVIS
 KTVDYLHCQGVVHRDLKPSNILYMDESASADSIRICDFGFAKQLRGENGLL
 TPCYTANFVAPEVLMQQGYDAACDIWSLGVLFYTMLAGYTPFANGPNDTPE
 EILLRIGNGKFSLSGGNWDNISDGAKDLLSHMLHMDPHQRYTAEQILKHSWI

MLCK1 (MYLK1_HUMAN)

MNSKEALGGGKFGAVCTCMEKATGLKLAACKVIKKQTPKDKEMVLEIE
 VMNQLNHRNLIQLYAAIETPHEIVLFMEYIEGGELFERIVDEDYHLTEVDTMV
 FVRQICDGILFMHKMRVLHLDLKPENILCVNTTGHLVKIIDFGLARRYNPNEK
 LKVNFGTPEFLSPEVVNYDQISDKTDMWSMGVITYMLLSGLSPFLGDDDTET
 LNNVLSGNWYFDEETFEAVSDEAKDFVSNLIVKDQRARMNAAQCLAHPWL

MLCK2 (MYLK2_HUMAN)

YDIEERLGSYGKFGQVFRLEVEKKTRKVVWAGKFFKAYSAAKEKENIRQEISI
 MNCLHHPKLVQCVDAFEEKANIVMVLEIVSGGELFERIIDEDFELTERECIKY
 MRQISEGVEYIHKQGIVHLDLKPENIMCVNKTGTRIKLIDFGLARRLENAGSL
 KVLFGTPEFVAPEVINYEPIGYATDMWSIGVICYILVSGLSPFMGDNDNETLA
 NVTSATWDFDDEAFDEISDDAKDFISNLLKKDMKNRLDCTQCLQHPWL

MLCK3 (MYLK3_HUMAN)

VCQHEVLGGGRFGQVHRCTEKSTGLPLAAKIIKVKSAKDREDVKNEINI
 MNQLSHVNLIQLYDAFESKHSCTLVMEYVDGGELFDTRITDEKYHLTELDVVL
 FTRQICEGVHYLHQHYILHLDLKPENILCVNQTGHQIKIIDFGLARRYKPREKL
 KVNFGTPEFLAPEVVNYEFVSFPTDMWSVGVITYMLLSGLSPFLGETDAETM
 NFIVNCSWDFDADTFEGLSEEAKDFVSRLLVKEKSCRMSATQCLKHEWL

KALRN (KALRN_HUMAN)

YTELNEIGRGRFSIVKKCIHKATRKDVAVKFVSKKMKKKEQAAHEAAL
 LQHLQHPQYITLHDTYESPTSILILELMDDGRLLDYLMNHDELMEEKVAFYI

RDIMEALQYLHNCRVAHLDIKPENLLIDLRIIPVPRVKLIDLEDAVQISGHFHH
 HLLGNPEFAAPEVIQGIPVSLGTDIWSIGVLTIVMLSGVSPFLDESKEETCINV
 CRVDFSFPHEYFCGVSNAARDFINVILQEDFRRRPTAATCLQHPWL

TTN (TITIN_HUMAN)

YMIAEDLGRGEFGIVHRCVETSSKKTMAKFKVKVKGTDQVLVKKEISIL
 NIARHRNILHLHESFESMEELVMIFEFISGLDIFERINTSAFELNEREIVSYVHQ
 VCEALQFLHSHNIGHFDIRPENIYQTRRSSTIKIIEFGQARQLKPGDNFRLFT
 APEYYAPEVHQHDVVSTATDMWSLGTLYVLLSGINPFLAETNQIIENIMN
 AEYTFDEEAFKEISIEAMDFVDRLLVKERKSRMTASEALQHPWL

TRIO (TRIO_HUMAN)

YSEVAELGRGRFSVVKKCDQKGTKRAVATKFNKKLMKRDQVTHELG
 ILQSLQHPLLVGLLDTFETPTSILVLEMADQGRLLDCVVRWGSLTEGKIRAH
 LGEVLEAVRYLHNCRIAHLDLKPENILVDESLAKPTIKLADFGDAVQLNTTY
 YIHQLLGNPEFAAPEIILGNPVSLTSDTWSVGVLTIVLLSGVSPFLDDSVEETC
 LNICRLDFSFPDDYFKGVSQKAKEFVCFLQEDPAKRPSAALALQEQWL

DCLK1 (DCLK1_HUMAN)

YKVGRTIGDGNFAVVKECVERSTAREYALKIHKKSKCRGKEHMIQNEVS
 ILRRVKHPNIVLLIEEMDVPTELYLMELVKGGDLFDAITSTNKYTERDASG
 MLYNLASAIKYLHSLNIVHRDIKPENLLVYEHQDGSKSLKLGDFGLATIVDGP
 LYTVCGTPTYVAPEIIAETGYGLKVDIWAAGVITYILLCGFPPFRGSGDDQEV
 LFDQILMGQVDFPSPYWDNVSDSAKELITMMLLVDVDQRFSAVQVLEHPWV

CAMK2A (KCC2A_MOUSE)

YQLFEELGKGAFSVVRRCVKVLGQEQYAAKIINTKKLSARDHQKLERE
 ARICRLKHPNIVRLHDSISEEGHHYLIFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASH
 CIQQILEAVLHCHQMGGVVHRDLKPENLLLASKLKGAAVKLADFGLAIEVEGE
 QQAWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVLDWACGVILYILLVGYPPFWDED
 QHRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINPSKRITAAEALKHP
 WI

CAMK2B (KCC2B_MOUSE)

YQLYEDIGKGAFSVVRRCVKLCTGHEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
 RICRLKHSNIVRLHDSISEEGFHLYVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
 IQQILEAVLHCHQMGVVHRDLKPENLLLASKCKGAAVKLADFGLAIEVQGD
 QQAWFGFAGTPGYLSPEVLRKEAYGKPVDIWACGVILYILLVGYPPFWDED
 QHKLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKNLINQMLTINPAKRITAEALKHP
 WV

CAMK2D (KCC2D_MOUSE)

YQLFEELGKGAFSVVRRCMKIPTGQEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
 RICRLKHPNIVRLHDSISEEGFHLYVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
 IQQILESVNHCHLNGIVHRDLKPENLLLASKSKGAAVKLADFGLAIEVQGDQ
 QAWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVDMWACGVILYILLVGYPPFWDEDQ
 HRLYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKDLINKMLTINPAKRITASEALKHPWI

CAMK2G (KCC2G_MOUSE)

YQLFEELGKGAFSVVRRCVKKTSTQEYAAKIINTKKLSARDHQKLEREA
 RICRLKHPNIVRLHDSISEEGFHLYVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHC
 IHQILESVNHIHQHDIVHRDLKPENLLLASKCKGAAVKLADFGLAIEVQGEQQ
 AWFGFAGTPGYLSPEVLRKDPYGKPVDIWACGVILYILLVGYPPFWDEDQHK
 LYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKNLINQMLTINPAKRITADQALKHPWV

PRKAA1 (AAPK1_MOUSE)

YILGDTLGVGTFGKVKVGKHELTGHKVAVKILNRQKIRSLDVVGKIRRE
 IQNLKLFRRPHIHKLYQVISTPSDIFMVMMEYVSSGGELFDYICKNGRLDEKESRR
 LFQQILSGVDYCHRHMVVHRDLKPENVLLDAHMNAKIADFGLSNMMSDGE
 FLRTSCGSPNYAAPEVISGRLYAGPEVDIWSSGVILYALLCGTLPFDDDHVPT
 LFKKICDGIFYTPQYLNPSVISLLKHMLQVDPMKRAAIKDIREHEWF

BRK1 (BRK1_HUMAN)

YRLEKTLGKGQTGLVKLGVHCITGQKVAIKIVNREKLSESVLMKVEREI
 AILKLIEHPHVLKLHDVYENKKYLYLVLEHVSSGGELFDYLVKKGRLTPKEAR
 KFFRQIVSALDFCHSYSICHRDLKPENLLLDEKNNIRIADFGMASLQVGDSLL

ETSCGSPHYACPEVIKGEKYDGRRADMWSCGVILFALLVGALPFDDDNLRQL
LEKVKRGVFMHPHFIPPDCQSLLRGMIEVEPEKRLSLEQIQKHPWY

CHEK2 (CHK2_MOUSE)

YIMSKTLGSGACGEVKMAFERKTCQKVAIKIISKRRFALGSSREADTAPS
VETEIEILKKLNHPCCIHKIKDVFDAEDYYIVLELMEGGELFDRVVGKRLKEAT
CKLYFYQMLVAVQYLHENGIIHRDLKPENVLLSSQEEDCLIKITDFGQSKILG
ETSLMRTLCTPTYLAPVLSNGTAGYSRAVDCWSLGVILFICLSGYPPFSE
HKTQVSLKDQITSGKYNFIPEVWTDVSEEALDLVKKLLVDPKARLTTEEAL
NHPWL

DAPK1 (DAPK1_MOUSE)

YDTGEELGSGQFAVVKKCREKSTGLQYAAKFIKKRRTKSSRRGVSREDI
EREVSILKEIRHPNVITLHEVYENKTDVILEL VAGGELDFDLAEKESLTEEEA
TEFLKQILSGVYYLHSLQIAHFDLKPENIMLLDRNVPKPRIKIIDFGLAHKIDFG
NEFKNIFGTPEFVAPEIVNYEPLGLEADMWSIGVITYILLSGASPFLGDTKQET
LANVSAVNYDFEEFFRNTSTLAKDFIRLLVKDPKKRMTIQDSLQHPWI

LKB1 (STK11_HUMAN)

YLMGDLLGEGSYGKVKEVLDSETLCRRRAVKILKKKKLRRIPNGEANVK
KEIQLLRRLRHKNVIQLVDVLYNEEKQKMYMVMMEYCVCGMQEMLDSVPEK
RFPVCQAHGYFCQLIDGLEYLHSQGIVHKDIKPGNLLLTTGGTLKISDLGVAE
ALHPFAADDTCRTSQGSPAFQPPEIANGLDTFSGFKVDIWSAGVTLYNITTGL
YPFEGDNIYKLFENIGKGSYAIPGDCGPPLSDLLKGMLEYEPAKRFSIRQIRQH
SWF

DCLK1 (DCLK1_MOUSE)

YKVGRTIGDGNFAVVKECIERSTAREYALKIIKKSKCRGKEHMIQNEVSI
LRRVKHPNIVLLIEEMDVPTELYLMELVKGGDLFDAITSTSKYTERDASGM
LYNLASAIKYLHSLNIVHRDIKPENLLVYEHQDGSKSLKLGDFGLATIVDGPL
YTVCGTPTYVAPEIIAETGYGLKVDIWAAGVITYILLCGFPPFRGSGDDQEV
FDQILMGQVDFPSPYWDNVSDSAKELINMMLLVNVDQRFSAVQVLEHPWV