



УДК 575.8-57.023:581.1

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.081>

О. Є. Краснопорова, С. В. Ісаєнков, П. А. Карпов,
член-кореспондент НАН України А. І. Ємець,
академік НАН України Я. Б. Блюм

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

E-mail: krasnopio524@gmail.com

Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії в різних органах *Arabidopsis thaliana*

Проведено кладистичний аналіз та побудовано філогенетичне дерево найближчих гомологів протеїнкінази KIN10 із *Arabidopsis thaliana*. Показано, що KIN10 і її два найближчих гомолога в рослинах *A. thaliana*: KIN11 (P92958) та Akin11 (Q9FLZ3) є представниками унікальної підродини рослинних протеїнкіназ SnRK1. Охарактеризовано експресію KIN10 в різних органах рослин *A. thaliana*. Найбільшу кількість транскриптів KIN10 відмічено в наземній фотосинтезуючій частині рослин, де протеїнкіназа KIN10 забезпечує регуляцію біосинтетичних та різноманітних сигнальних процесів.

Ключові слова: KIN10, серин-треонінові протеїнкінази, найближчі гомологи, кладистичний аналіз, філогенетичне дерево, експресія генів.

Протеїнкінази є однією з ключових груп регуляторних білків клітини, що беруть участь у регуляції широкого спектра біохімічних та фізіологічних клітинних процесів. У клітинах рослин однією з найпоширеніших є родина серин-треонінових протеїнкіназ SnRK [1]. Висококонсервативна родина SnRK протеїнкіназ належить до SNF-споріднених кіназ [1, 2]. Близькими ортологами SnRK є протеїнкінази SNF1 дріжджів та AMPK ссавців [1]. У рослинах *Arabidopsis thaliana* родина SnRK налічує 38 представників, які поділяються на три підродини — SnRK1, SnRK2 та SnRK3 [2].

Підродина SnRK1 з *A. thaliana* є найбільш консервативною серед усіх SnRK кіназ та характеризується своєю багатofункціональністю. Зокрема, ці протеїнкінази беруть участь у формуванні відповіді на дію різних стресових факторів, таких як пригнічення фотосинтезу, водний стрес, енергетичний голод та ін. [3]. Останні дослідження свідчать про те, що SnRK1 бере участь у формуванні антивірусних реакцій шляхом регулювання транскрипції [4].

SnRK1 протеїнкінази активуються при зниженні внутрішньоклітинного рівня глюкози та запускають зміни транскрипційного профілю клітини, що спричиняє відновлення клітинного гомеостазу, стимуляцію подальшого росту та розвитку рослин. Активація SnRK1 протеїнкіназ сприяє формуванню довготривалої адаптації до стресових факторів. Ці ферменти активують катаболічні процеси в умовах енергетичного голоду та пригнічують анаболічні реакції, що потребують АТФ [5]. Робота SnRK1 протеїнкіназ може пригнічуватися трегалозо-6-фосфатами (Т6Ф) в молодих проростках та в тканинах, що інтенсивно розвиваються [6].

Протеїнкінази підроддини SnRK1 регулюють роботу близько 1000 генів, а загалом SnRK1 беруть активну участь у формуванні адаптивних відповідей на дію стресів різної природи [7]. Крім цього, слід зазначити, що з'являється все більше експериментальних доказів участі цих протеїнкіназ у інших процесах життєдіяльності рослинної клітини. Попри невеликий об'єм даних стосовно регуляції цими протеїнкіназами процесів внутрішньоклітинного транспорту, цілком ймовірно, що представники підроддини SnRK1 також можуть відігравати важливу роль у транспортних процесах та участі в цих процесах цитоскелета [8].

Одним із найбільш вивчених представників підроддини SnRK1 є протеїнкіназа KIN10 з *A. thaliana*. Відомо, що протеїнкіназа KIN10 бере участь у формуванні відповіді на дію низки стресових факторів різної природи, а саме пригнічення процесів фотосинтезу, порушення фотоперіодизму, дефіцит поживних речовин та інші абіотичні стреси. Існують експериментальні дані, які свідчать про те, що протеїнкіназа KIN10 є важливим регулятором транскрипції, активується при дефіциті фосфору та бере участь у процесах автофагії [9]. Однак попри все вищесказане, точна роль цієї протеїнкінази у ряді важливих клітинних процесів залишається нез'ясованою. Щоб наблизитись до вирішення цих питань, ми ставили за мету проведення кладистичного аналізу, побудову філогенетичного дерева та встановлення найближчих гомологів протеїнкінази KIN10, з'ясування характеру експресії гена цієї протеїнкінази залежно від типу органа рослини.

Матеріали та методи. Для проведення кладистичного аналізу та побудови філогенетичного дерева найближчих гомологів протеїнкінази KIN10 з *A. thaliana* було створено вибірку амінокислотних послідовностей каталітичних доменів представників SNF-споріднених протеїнкіназ.

Амінокислотні послідовності протеїнкіназ були відібрані з бази даних білкових послідовностей UniProt, що містить інформацію про функції білків. Послідовності каталітичних доменів визначали, застосовуючи мережевий інструмент SMART. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей каталітичних доменів проводили за допомогою програми ClustalX версії 2.1 з використанням вагової матриці BLOSSUM. Кладистичний аналіз виконували на основі множинного вирівнювання каталітичних доменів з використанням програми для візуалізації MegaB та методу зв'язку найближчих сусідів (neighbour-joining) [10].

Для визначення та порівняння рівня експресії гена *AKIN10* в різних органах рослини використовували двомісячні рослини *A. thaliana* дикого типу. Для транскрипційного аналізу загальну РНК виділяли окремо з кожного типу органів рослин (корінь, стебло, листя, квітки). Виділення РНК проводили за допомогою TRIzol-реагенту ("Invitrogen", США) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Якість та цілісність виділеної РНК визначали спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Концентрацію РНК в різних зразках вирівнювали до загальної величини. Синтез кДНК проводили за допомогою RevertAid RT cDNA Synthesis Kit ("Fermentas", Литва) відповідно до протоколу компанії-виробника. Ділянку послідовності *KIN10* (700 п. н.) ампліфікували

за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із синтезованої кДНК із застосуванням таких праймерів:

Kin10_for CCTCAAGCCTGAAAACCTTGC,
Kin10_rev TGCATACGGGGAGTACCTTC.

Умови ампліфікації були такими: початкова денатурація — 95 °С протягом 3 хв, наступні 35 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 с при 95 °С, 30 с при 56 °С та 1 хв при 72 °С, фінальна елонгація — при 72 °С протягом 3 хв.

Як контроль використовували рівень експресії фактору елонгації α (*AtEF α*) [11]. Для проведення ПЛР *AtEF α* також використовували вищезазначені умови ампліфікації. ПЛР проводили з використанням праймерів:

AtEF α _for GGAGTGGCAAAAACACTGGT,
AtEF α _rev CTTGCCTCTTACCCATCCAA.

Після проведення ПЛР ампліфіковані фрагменти генів *KIN10* та *EF α* розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі. Рівень експресії в різних типах тканин визначали шляхом денситометричного аналізу електрофореграм за допомогою програми TotalLab (Великобританія), яка є у вільному доступі.

Результати та обговорення. Для проведення кладистичного аналізу та побудови філогенетичного дерева було вибрано каталітичні домени білків з підродини протеїнкіназ SnRK1 з *A. thaliana*, до якої належить протеїнкіназа KIN10, і з підродин протеїнкіназ SnRK2 та SnRK3, які вважаються найближчими рослинними гомологами протеїнкінази KIN10 [2]. Також було відібрано каталітичні домени інших гомологів протеїнкінази KIN10 з різних організмів (табл. 1).

Отримані результати кластеризації свідчать про те, що протеїнкіназа KIN10 має два найближчих гомолога: KIN11 (номер із генбанку P92958) та Akin11 (номер із генбанку Q9FLZ3) в рослинах *A. thaliana* (рис. 1). Всі ці три протеїнкінази є унікальними для рослин та складають підродину рослинних кіназ SnRK1. Потрібно зауважити, що на відміну від протеїнкінази KIN11, функції та механізми дії якої вже активно досліджуються [9], протеїнкіназа Akin11 ще зовсім не досліджена. На сьогоднішній день відома тільки її амінокислотна послідовність [12]. Проте припускають, що всі три ферменти беруть участь у регуляції подібних процесів та виконують схожі функції і саме тому мають високий рівень ідентичності [2].

Нами також було порівняно консервативні домени протеїнкінази KIN10 з доменами протеїнкіназ SNF1, які вважаються її аналогами в дріжджах. Відомо, що подібно до протеїнкінази KIN10, протеїнкінази SNF1 є енергетичними сенсорами. Зниження рівня глюкози призводить до активації протеїнкіназ SNF1. Представники цієї підродини мають відношення до широкого спектра клітинних ферментативних реакцій та є важливими регуляторами транскрипції [3].

Слід зазначити, що дріжджові протеїнкінази SNF1 більш подібні до протеїнкіназ SnRK1, ніж до двох інших рослинних підродин протеїнкіназ SnRK2 та SnRK3. Цікавим є той факт, що представники підродини SnRK1 більш подібні до своїх гомологів у тваринних організмах, ніж до підродин рослинних протеїнкіназ SnRK2 та SnRK3 (див. рис. 1). Така подібність може свідчити про те, що ці рослинні протеїнкінази є унікальними для рослинних організмів та можуть виконувати дуже специфічні функції в клітинах рослин.

Зокрема, в результаті кластеризації було показано, що протеїнкіназа KIN10 має високий ступінь схожості з представниками тваринних підродин ААРК1 та ААРК2. Відомо, що білки ААРК1 та ААРК2 є 5'-АМФ-активованими протеїнкіназами, які також є енергетичними

Таблиця 1. Вибірка протеїнкіназ, які є найближчими гомологами протеїнкінази KIN10, з бази даних UniProt для кладистичного аналізу

Назва	Номер	Організм	Головні функції
1	2	3	4
KIN10	Q38997	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у вуглеводному обміні, синтезі жирних кислот
KIN11	P92958	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у вуглеводному обміні, синтезі жирних кислот
AKin11	Q9FLZ3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Не досліджені
SRK2I	Q39193	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Разом з SRK2D є ключовим компонентом і активатором шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
SRK2D	Q39192	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Разом з SRK2I є ключовим компонентом і активатором шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
SRK2C	Q9M9E9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції генів толерантності до посухи і осмотичного стресу
SRK2J	O64812	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2A	P43291	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2H	Q9FFP9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2F	Q9SMQ4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2B	Q9C958	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2G	P43292	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції солестійкості та клітинній відповіді на осмотичний стрес
SRK2E	Q940H6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Один з ключових активаторів шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK1	Q8RWC9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKE	Q9LZW4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKN	Q93VD3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції чутливості до посухи та транспірації листя
CIPK6	O65554	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції чутливості до посухи
CIPKO	Q9LDI3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь в контролі внутрішньоклітинного гомеостазу та солестійкості
CIPK2	Q9LYQ8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPK7	Q9XIW0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції холодостійкості
CIPKB	O22932	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, негативний регулятор протонного насоса АНА2
CIPKA	Q9C562	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKF	P92937	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKL	Q94CG0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPK3	Q2V452	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Участь у регуляції солестійкості, холодостійкості, стійкості до гіперосмотичного стресу
CIPK8	Q9STV4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKC	Q9SN43	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPK9	Q9MAM1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції K ⁺ гомеостазу
CIPKD	O22971	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKG	Q9SEZ7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKJ	Q9FJ55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKM	O80902	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKQ	Q84VQ3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Кальцієзалежне регулювання утворення активних форм ксено
CIPKK	Q9FJ54	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти, участь у регуляції проростання насіння
CIPKI	Q9LP51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPKH	Q94C40	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPK5	Q9LEU7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
CIPK4	Q9SUL7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості

Таблиця 1. Продовження

1	2	3	4
CIPKP	Q8W1D5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Взаємодія з CBL-білками, участь у регуляції солестійкості
AAPK1	P45894	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Участь у трансдукції інсуліноподібних сигналів
AAPK1	Q5EG47	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK1	Q09136	<i>Sus scrofa</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK1	Q13131	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q95ZQ4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Регуляція клітинного енергетичного рівня
AAPK1	P54645	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK1	Q5RDH5	<i>Pongo abelii</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	P54646	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q5RD00	<i>Pongo abelii</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q28948	<i>Sus scrofa</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q09137	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AAPK2	Q8BRK8	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль у регуляції енергетичного обміну, регулятор клітинної полярності, інгібує білковий, вуглеводний і ліпідний біосинтез, а також ріст і проліферацію клітин
AMPKA	Q54YF2	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Енергетичний сенсор, участь у метаболізмі
BRSK1	B2DD29	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль у поляризації нейронів і подвоєнні центросом
BRSK1	Q8TDC3	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль у поляризації нейронів і подвоєнні центросом
BRSK2	Q69Z98	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль у поляризації нейронів і секреції інсуліну
BRSK2	Q8IWQ3	<i>Homo sapiens</i>	Ключова роль у поляризації нейронів і секреції інсуліну
BRSK1	Q5RJI5	<i>Mus musculus</i>	Ключова роль у поляризації нейронів і подвоєнні центросом
BRSK2	D3ZML2	<i>Rattus norvegicus</i>	Ключова роль в поляризації нейронів і секреції інсуліну
CIPK3	Q8LIG4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK2	Q7X996	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK1	Q9LGV5	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK4	Q2QMI0	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK8	Q5JLD8	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK5	Q9LWM4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK6	Q6Z9F4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з CBL-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти

Таблиця 1. Закінчення

1	2	3	4
CIPKB	Q0JI49	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKD	Q5QNM6	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKA	Q10LQ2	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKF	Q2RBF0	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKI	Q5W736	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKH	Q75L42	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKE	Q2QYM3	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPK7	Q75GK4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKJ	Q68Y49	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKC	Q5JLS2	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKN	Q6ZLP5	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKM	Q5KQF5	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKG	Q6ERS4	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
CIPKW	Q2QY53	<i>Oryza sativa</i>	Взаємодія з СВЛ-білками, компонент шляхів біосинтезу абсцизової кислоти
HUNKA	Q5XHI9	<i>Xenopus laevis</i>	Не досліджені, можлива участь у розвитку нервової системи
HUNK	Q68UT7	<i>Pan troglodytes</i>	Участь у ембріональному розвитку нервової системи
HUNK	B1WAS2	<i>Xenopus laevis</i>	Не досліджені, можлива роль у ембріональному розвитку
HUNK	O88866	<i>Mus musculus</i>	Не досліджені, можлива роль у ембріональному розвитку мишей
HUNKB	Q6VZ17	<i>Xenopus laevis</i>	Не досліджені, можлива участь у розвитку нервової системи
MARK4	Q96L34	<i>Homo sapiens</i>	Участь у визначенні клітинної полярності та регуляція динаміки мікротрубочок
MARK2	Q7KZI7	<i>Homo sapiens</i>	Участь у визначенні клітинної полярності та регуляція динаміки мікротрубочок
MARK3	P27448	<i>Homo sapiens</i>	Регуляція динаміки мікротрубочок, регуляція активності деяких гістондеацетилаз
MARK1	Q9P0L2	<i>Homo sapiens</i>	Участь у регуляції клітинної полярності та регуляція динаміки мікротрубочок
MELK	Q14680	<i>Homo sapiens</i>	Участь у регуляції клітинного циклу, апоптозу та сплайсингу
NUAK2	Q66HE5	<i>Rattus norvegicus</i>	Стресактивуюча протеїнкіназа, бере участь у регуляції толерантності до енергетичного голоду
SIK2	Q9IA88	<i>Gallus gallus</i>	Участь у регуляції трансдукції інсулінового сигналіngu
SIK3	Q9Y2K2	<i>Homo sapiens</i>	Участь у розвитку хрящової тканини та ендохондральному скостенінні
SNF1	P52497	<i>Candida albicans</i>	Участь у енергетичному обміні
SNF1	Q00372	<i>Candida glabrata</i>	Участь у енергетичному обміні
SNF1	O74536	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Участь у енергетичному обміні
SNF1	P06782	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Участь у енергетичному обміні
Y8013	Q54VU4	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Регуляція транскрипції



Рис. 1. Філогенетичне дерево найближчих гомологів протеїнкінази KIN10 в рослинах та інших організмах

сенсорами та беруть участь в регуляції метаболізму у тваринних клітинах [13]. Ці ферменти є важливими регуляторами експресії генів, енергетичного обміну, клітинної полярності, білкового, вуглеводного та ліпідного біосинтезу, а також у процесах клітинного росту та

проліферації. Протеїнкіназа KIN10 є одним із головних регуляторів транскрипції та подібно до протеїнкіназ AАРK1 та AАРK2 бере участь в енергетичному обміні та метаболізмі [5], що може свідчити про функціональну близькість цих тваринних гомологів із зазначеним рослинним ферментом.

Результати кладистичного аналізу також вказують на високий ступінь подібності протеїнкінази KIN10 до білків з підродин тваринних протеїнкіназ BRSK1 та BRSK2 (див. рис. 1). Протеїнкінази BRSK1 та BRSK2 (також відомі, як SAD-B та SAD-A) є АМФ-активованими протеїнкіназами, що здійснюють фосфорилування асоційованого з мікротрубочками протеїну тау. Таким чином вони впливають на його здатність зв'язуватися з мікротрубочками, що може призводити до певних змін в їх організації. Відомо, що представники підродини протеїнкіназ BRSK беруть участь у подвоєнні центросом та поляризації нейронів кори головного мозку [14].

За структурою свого каталітичного домену протеїнкіназа KIN10 також має велику подібність із представниками тваринних MARK-кіназ (див. рис. 1). Ця родина серин-треонінових протеїнкіназ є досить великою. MARK-кінази є одними із головних регуляторів динамічних станів мікротрубочок [15]. MARK-кінази, подібно до протеїнкіназ BRSK, здійснюють фосфорилування протеїну тау та інших протеїнів, асоційованих з мікротрубочками. Представники родини MARK також відповідають за перебіг багатьох важливих клітинних процесів, таких як клітинна диференціація, визначення полярності та зміна форми клітини, міграція нейронів головного мозку і контроль клітинного циклу [15]. Цілком вірогідно, що відповідно до результатів проведеного нами філогенетичного аналізу протеїнкіназа KIN10 може мати деякі подібні до своїх тваринних гомологів функції в рослинних клітинах. Тому подальше експериментальне підтвердження та детальне вивчення функціональних характеристик цієї унікальної протеїнкінази є вкрай важливим.

З цією метою на наступному етапі роботи було вивчено особливості експресії гена, що кодує протеїнкіназу KIN10, в різних органах арабідопсису (рис. 2). Згідно з результатами проведеного аналізу, найвищий рівень транскриптів спостерігався саме в листі, де активно відбуваються процеси фотосинтезу (див. рис. 2). Високий рівень експресії тестованого гена було відмічено також і в квітках. Незначний рівень транскриптів протеїнкінази KIN10 порівняно з іншими органами рослин було зафіксовано в коренях (див. рис. 2).

Слід зазначити, що одним із головних місць клітинної локалізації протеїнкінази KIN10 є хлоропласти, де і відбувається фотосинтез [9]. Відомо, що представники SNF-споріднених кіназ складаються з трьох субодиниць — α , β та γ . Існує припущення, що в *A. thaliana* внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкінази SnRK1 (KIN10) регулює певний комплекс $\beta\gamma$ -субодиниць, що має сигнальний хлоропластний транзитний пептид. При взаємодії з цим комплексом каталітичні субодиниці можуть потрапляти в хлоропласти і таким чином регулювати активність біосинтетичних процесів у цих органелах [9].

Відповідно до результатів аналізу, найвищий рівень експресії *KIN10* було встановлено, саме в зеленій частині рослини, де проходять активні процеси фотосинтезу, що може свідчити про участь цього гена в регуляції біосинтетичних та сигнальних процесів, пов'язаних із фотосинтезом та метаболізмом цукрів.

Таким чином, результати проведеного нами кладистичного аналізу вказують на те, що рослинна протеїнкіназа KIN10 має велику кількість близьких гомологів тваринного походження. З іншого боку, такі дані свідчать про унікальність цієї протеїнкінази для рослинного світу. Отримані нами дані щодо рівня експресії гена *KIN10* у різних органах арабідопсису можуть бути інтерпретовані на користь важливої ролі протеїнкінази KIN10 в фотосинте-

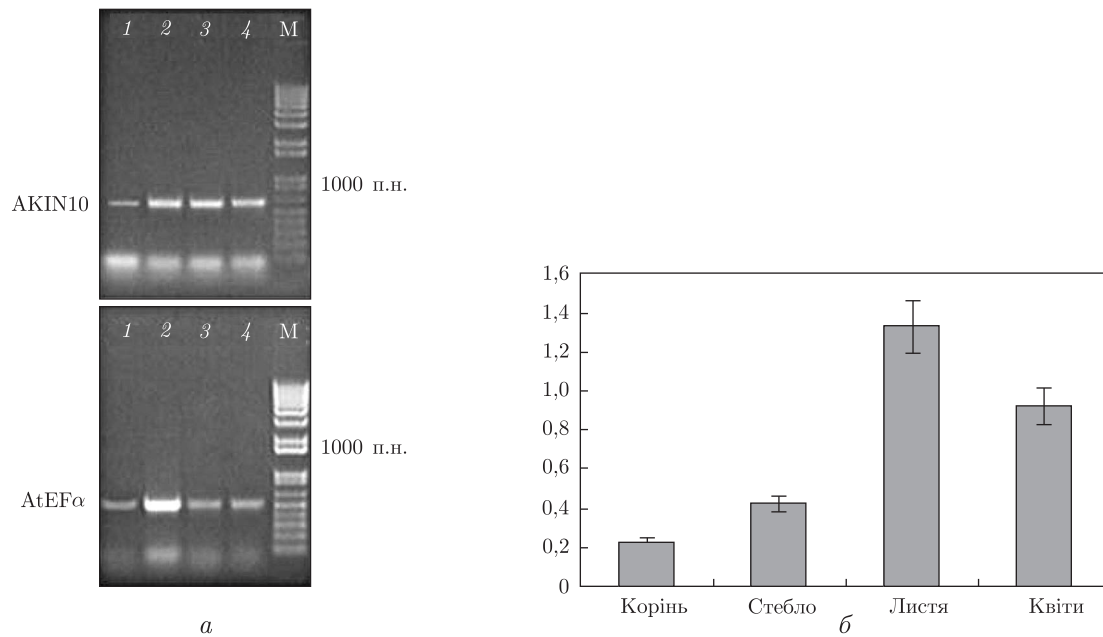


Рис. 2. Аналіз експресії гена *KIN10*. *a* — електрофореграма інтенсивності експресії *KIN10* у різних органах рослин *A. thaliana*; *б* — рівень експресії гена протеїнкінази *KIN10* у різних органах рослин *A. thaliana*

тичних процесах. Оскільки багато аспектів функціонування протеїнкінази KIN10 у рослинних клітинах залишаються ще невивченими, отримані результати полегшують подальше дослідження функціональних характеристик цих протеїнкіназ та виявлення їх потенційних субстратів.

Цитована література

1. Mohannath G., Jackel J. N., Lee Y. H., Buchmann C., Wang H., Patil V., Adams A. K., Bisar D. M. A complex containing SNF1-related kinase (SnRK1) and adenosine kinase in Arabidopsis // PLoS One. – 2014. – **9**, No 1. – e87592.
2. Halford N. G., Hey S., Jhurreea D., Laurie S., McKibbin R. S., Paul M., Zhang Y. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of *Snf1*-related (*SnRK1*) protein kinase // J. Exp. Bot. – 2003. – **54**. – P. 467–475.
3. Halford N. G., Hardie D. G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? // Plant Mol. Biol. – 1998. – **37**. – P. 735–748.
4. Son S., Oh C. J., An C. S. Arabidopsis thaliana remorins interact with SnRK1 and play a role in susceptibility to beet curly top virus and beet severe curly top virus // Plant Pathol. J. – 2014. – **30**, Iss. 3. – P. 269–278.
5. Baena-González E., Sheen J. Convergent energy and stress signaling // Trends Plant Sci. – 2008. – **9**. – P. 474–482.
6. Lawlor D. W., Paul M. J. Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat // Front. Plant Sci. – 2014. – **5**. – P. 418–432.
7. Nunes C., O'Hara L. E., Primavesi L. F., Delatte T. L., Schluempmann H., Somsen G. W., Silva A. B., Fevereiro P. S., Wingler A., Paul M. J. The trehalose 6-Phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation // Plant Physiol. – 2013. – **162**, No 3. – P. 1720–1732.
8. Jeong E.-Y., Seo P. J., Woo J. C., Park C.-M. AKIN10 delays flowering by inactivating IDD8 transcription factor through protein phosphorylation in Arabidopsis // BMC Plant Biol. – 2015. – **15**, No 1. – P. 110–123.

9. *Fragoso S., Espíndola L., Páez-Valencia J., Gamboa A., Camacho Y., Martínez-Barajas E., Coello P.* SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation // *Plant Physiol.* – 2009. – **149**, No 4. – P. 1906. – 1916.
10. *Karpov P. A., Nadezhdina E. S., Yemets A. I., Blume Ya. B.* Results of the clusterization of human microtubule and cell-cycle related serine/threonine protein kinases and their plant homologues // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* – 2010. – **65**. – P. 213–216.
11. *Kjaersgård I. V., Jespersen H. M., Rasmussen S. K., Welinder K. G.* Sequence and RT-PCR expression analysis of two peroxidases from *Arabidopsis thaliana* belonging to a novel evolutionary branch of plant peroxidases // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – **33**, No 4. – P. 699–708.
12. *Sato S., Kaneko T., Kotani H., Nakamura Y., Asamizu E., Miyajima N., Tabata S.* Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. IV. Sequence features of the regions of 1, 456, 315 bp covered by nineteen physically assigned P1 and TAC clones // *DNA Res.* – 1998. – **5**. – P. 41–54.
13. *Littler D. R., Walker J. R., Davis T., Wybenga-Groot L. E., Finerty P.J. Jr., Newman E., Mackenzie F., Dhe-Paganon S.* A conserved mechanism of autoinhibition for the AMPK kinase domain: ATP-binding site and catalytic loop refolding as a means of regulation // *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2010. – **66**. – P. 143–151.
14. *Bright N. J., Carling D., Thornton C.* Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **22**. – P. 14946–14954.
15. *Matenia D., Mandelkow E. M.* The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – **34**. – P. 332–342.

References

1. *Mohannath G., Jackel J. N., Lee Y. H., Buchmann C., Wang H., Patil V., Adams A. K., Bisar D. M.* PLoS One, 2014, **9**, No 1: e87592.
2. *Halford N. G., Hey S., Jhurrea D., Laurie S., McKibbin R. S., Paul M., Zhang Y. J.* *Exp. Bot.*, 2003, **54**: 467–475.
3. *Halford N. G., Hardie D. G.* *Plant Mol. Biol.*, 1998, **37**: 735–748.
4. *Son S., Oh C.J., An C.S.* *Plant Pathol. J.*, 2014, **30**, Iss. 3: 269–278.
5. *Baena-González E., Sheen J.* *Trends Plant Sci.*, 2008, **9**: 474–482.
6. *Lawlor D. W., Paul M. J.* *Front. Plant Sci.*, 2014, **5**: 418–432.
7. *Nunes C., O'Hara L. E., Primavesi L. F., Delatte T. L., Schlupepmann H., Somsen G. W., Silva A. B., Feveireiro P. S., Wingler A., Paul M. J.* *Plant Physiol.*, 2013, **162**, No 3: 1720–1732.
8. *Jeong E.-Y., Seo P. J., Woo J. C., Park C.-M.* *BMC Plant Biol.*, 2015, **15**, No 1: 110–123.
9. *Fragoso S., Espíndola L., Páez-Valencia J., Gamboa A., Camacho Y., Martínez-Barajas E., Coello P.* *Plant Physiol.*, 2009, **149**, No 4: 1906–1916.
10. *Karpov P. A., Nadezhdina E. S., Yemets A. I., Blume Ya. B.* *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, 2010, **65**: 213–216.
11. *Kjaersgård I. V., Jespersen H. M., Rasmussen S. K., Welinder K. G.* *Plant Mol. Biol.*, 1997, **33**, No 4: 699–708.
12. *Sato S., Kaneko T., Kotani H., Nakamura Y., Asamizu E., Miyajima N., Tabata S.* *DNA Res.*, 1998, **5**: 41–54.
13. *Littler D. R., Walker J. R., Davis T., Wybenga-Groot L. E., Finerty P.J. Jr., Newman E., Mackenzie F., Dhe-Paganon S.* *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2010, **66**: 143–151.
14. *Bright N. J., Carling D., Thornton C. J.* *Biol. Chem.*, 2008, **22**: 14946–14954.
15. *Matenia D., Mandelkow E. M.* *Trends Biochem. Sci.*, 2009, **34**: 332–342.

Надійшло до редакції 25.06.2015

Е. Е. Красноперова, С. В. Исаенков, П. А. Карпов,
член-корреспондент НАН Украины **А. И. Емец,**
академик НАН Украины **Я. Б. Блюм**

ГУ “Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины”, Киев

E-mail: krasnopio524@gmail.com

Клади́стический анализ серин-треониновой протеинкиназы KIN10 и особенности ее экспрессии в разных органах *Arabidopsis thaliana*

Проведен клади́стический анализ и построено филогенетическое дерево ближайших гомологов протеинкиназы KIN10 из Arabidopsis thaliana. Показано, что KIN10 и ее два ближайших гомолога в растениях Arabidopsis thaliana: KIN11 (P92958) и Akin11 (Q9FLZ3) являются представителями уникального подсемейства растительных протеинкиназ SnRK1. Охарактеризована экспрессия KIN10 в различных органах растений A. thaliana. Наибольшее количество транскриптов KIN10 отмечено именно в наземной фотосинтезирующей части растения, где протеинкиназа KIN10 обеспечивает регуляцию биосинтетических и различных сигнальных процессов.

Ключевые слова: KIN10, серин-треониновые протеинкиназы, ближайшие гомологи, клади́стический анализ, филогенетическое дерево, экспрессия генов.

Е. Е. Krasnoperova, S. V. Isayenkov, P. A. Karpov,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Yemets,**
Academician of the NAS of Ukraine **Ya. B. Blume**

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: krasnopio524@gmail.com

The cladistic analysis of serine/threonine protein kinase KIN10 and peculiarities of its expression in different organs of *Arabidopsis thaliana*

The cladistic analysis and the phylogenetic tree construction of the closest homologs of protein kinase KIN10 are performed. The obtained results have shown the membership of KIN10 and its two closest homologs in plants (KIN11 (P92958) and Akin11 (Q9FLZ3)) to the unique subfamily of protein kinases SnRK1. In addition, the expression level of KIN10 gene in different plant organs are characterized. The highest level of KIN10 transcripts is observed in the green photosynthetic part of the plant, where KIN10 protein kinase regulates the biosynthetic and signaling processes.

Keywords: KIN10, serine-threonine protein kinases, closest homologs, cladistic analysis, phylogenetic tree, gene expression.