

КРАСНОПЬОРОВА О.Є.✉, ІСАЄНКОВ С.В., КАРПОВ П.А., ЄМЕЦЬ А.І.

Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, e-mail: krasnopio524@gmail.com

✉ krasnopio524@gmail.com

НОВІ ГЕНЕТИЧНІ КОНСТРУКЦІЇ *KIN10-His/KIN11-His* ЯК ІНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВСТАНОВЛЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ГОМОЛОГІЇ ПРОТЕЇНкіНАЗ *SnRK1* ТА *BSRK*

Протеїнкінази є одними з найважливіших елементів сигнальних, регуляторних та інших складних механізмів у живих клітинах. Їх роль широко відома у формуванні та регуляції метаболічних шляхів, клітинного циклу, запрограмованої клітинної загибелі та багатьох інших клітинних процесів. Деякі з цих ферментів виконують специфічні функції, інші можуть впливати на ряд функцій у живій клітині, включаючи регуляцію цитоскелету і поділ клітин [1–3].

Протягом останнього періоду значна увага приділяється з'ясуванню функціональних особливостей родини протеїнкіназ SnRK (SNF1-related protein kinase), які добре охарактеризовані для *Arabidopsis thaliana*. З філогенетичної точки зору, протеїнкінази SnRK є найближчими гомологами протеїнкіназ, які активуються АМФ, (AMP activated protein kinase) тварин і протеїнкіназ SNF1 (Sucrose non-fermenting 1) дріжджів [4, 5]. Для SnRK протеїнкіназ характерні багатofункціональність і складність механізмів дії [6, 7]. Функціональні комплекси цих протеїнкіназ є складними гетеромерами, до складу яких входять обов'язкові каталітичні субодиниці SnRK1 α (SnRK α -1/KIN10/At3g01090; SnRK α -2/KIN11/At3g29160), а також асоційовані з ними регуляторні SnRK1 β (SnRK β -1/At5g21170; SnRK β -2/At4g16360; SnRK β -3/At2g28060) та активаційні SnRK1 γ (SnRK γ -1/At3g48530; SnRK γ -2/At1g69800) субодиниці і, ймовірно, субодиниця SnRK1 $\beta\gamma$ (SnRK $\beta\gamma$ /At1g09020) [8, 9]. Функції цих комплексів SnRK1 у рослин різноманітні [10]. Серед основних можна відзначити підтримку внутрішньоклітинного гомеостазу та формування відповіді на різноманітні стреси [9, 11]. Також протеїнкінази SnRK1 пригнічують анаболічні і активують катаболічні шляхи енергетичного обміну [9], регулюють циркадні ритми, проростання та дозрівання насіння, беруть участь у процесах аутофагії, метаболізмі крохмалю і т. д. Слід зазначити, що SnRK1 протеїнкінази також є важливими

транскрипційними факторами і регулюють роботу більше 1000 генів [7]. Однак багато функцій комплексів SnRK1 та їх компонентів досі залишаються не вивченими, що і зумовлює постійний інтерес до дослідження представників цієї родини [10, 12–15].

Цікавим фактом є те, що протеїнкінази SnRK1 α (SnRK α -1/KIN10/At3g01090 та SnRK α -2/ KIN11/At3g29160) є найближчими гомологами тварин протеїнкіназ BRSK (Brain-specific kinases 1/2) [16]. Відомо, що представники родини BRSK відіграють важливу роль у встановленні полярності нейронів та дуплікації центросом [17]. Враховуючи схожість каталітичних доменів протеїнкіназ SnRK1 α і BRSK 1/2, а також міжвидову консервативність головних цитоскелетних білків тварин і рослин, ми припускаємо відповідну схожість сайтів фосфорилування та можливу участь протеїнкіназ KIN10 (At3g01090, AK21, SKIN10, SNR2, SNRK1.1) і KIN11 (AT3G29160, SNF1, SNRK1.2) у регуляції цитоскелету вищих рослин. Із метою пошуку нових субстратів і вивчення їх можливої взаємодії з білками цитоскелету нами були створені генетичні конструкції pGWB8-KIN10:His і pGWB8-KIN11:His, а також, підтверджена структурна гомологія каталітичних субодиниць рослинної SnRK1 і тваринної протеїнкінази BRSK1.

Матеріали і методи

Виділення тотальної РНК з рослин *A. thaliana* проводили за допомогою TRIzol-реагенту (Thermo Fisher Scientific, США – www.thermofisher.com) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Якість і цілісність виділеної РНК визначали спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу у агарозному гелі. Ампліфікацію кодуючих послідовностей для протеїнкіназ KIN10 та KIN11 повної довжини проводили за допомогою ПЛР з синтезованої кДНК, отриманої за допомогою набору RevertAid RT

cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва) відповідно до протоколу компанії-виробника.

ПЛР ампліфікація повних кодуєчих послідовностей генів протеїнкіназ (рис. 1) була виконана з використанням Gateway-специфічних праймерів, які містять у собі сайти розпізнавання для ВР-клонази [18]. Дизайн праймерів здійснювали за допомогою програми Primer3 [19], що є у вільному доступі (<http://simgene.com/Primer3>):

KIN10Gate_for 5'GGGGAGAAGTTTGTACAAA
AAAGCAGGCTTCATGGAT-3',

KIN10Gate_rev 5'GGGGAGCACTTTGTACAAG
AAAGCTGGGTCGAGGACT-3'

KIN11Gate_for 5'GGGGACAAGTTTGTACAAA
AAAGAAGGCTTCATGGATCATTCATCAAAT
AGATTTGGC-3'

KIN11Gate_rev 5'GGGGACCACTTTGTACAAG
AAAGCTGGGTCGATCACACGATCACGAAGC
TC-3'

Для клонування фрагментів кДНК у вектор призначення (Destination vector) була проведена Gateway-реакція [20], в результаті чого були отримані генетичні конструкції pGWB8-KIN10:His та pGWB8-KIN11:His. Трансформацію компетентних клітин *E. coli* (штам DH5a) отриманими конструкціями pGWB8-KIN10:His та pGWB8-KIN11:His виконували згідно зі стандартною методикою [21] з відповідною адаптацією стосовно завдань дослідження. Трансформацію компетентних клітин *A. tumefaciens* (штам GV3100) конструкціями pGWB8-KIN10:His та pGWB8-KIN11:His також виконували згідно зі стандартною методикою [22], адаптованою до конкретних експериментальних умов.

Амінокислотні послідовності протеїнкіназ KIN10 (Q38997), KIN11 (P92958) і BRSK1 (Q8TDC3) були отримані з бази даних UniProtKB [23]. Ступінь гомології досліджених білків оцінювали на підставі результатів пошуку із застосуванням SIB BLAST [24], вирівнювання амінокислотних послідовностей – за допомогою програми ClustalX v.2.0 [25] і даних філогенетичного аналізу в програмі MEGA7 [26].

Моделі просторової структури каталітичних доменів досліджуваних протеїнкіназ були побудовані за допомогою сервера I-TASSER v.5 [27]. Візуалізацію, аналіз і структурне порівняння 3D-моделей здійснювали за

допомогою програми PyMOL v.1.5.0.5 (<http://pymol.org>).

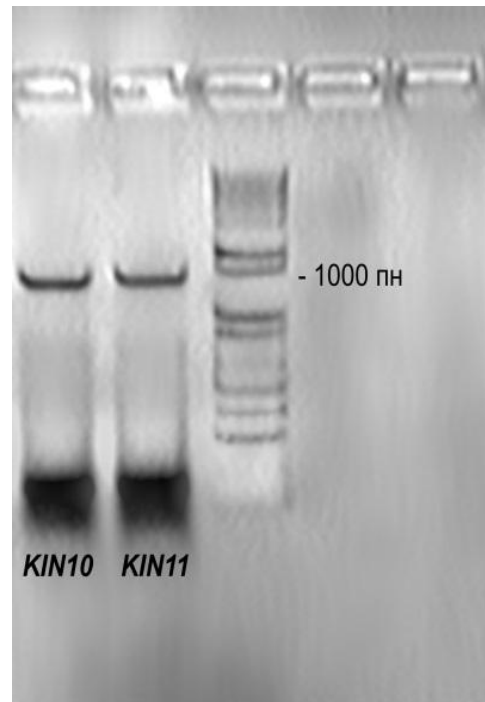


Рис. 1. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР ампліфікації повних послідовностей протеїнкіназ *KIN10* та *KIN11* в агарозному гелі.

Результати та обговорення

У результаті проведеної роботи були створені генетичні конструкції pGWB8-KIN10:His та pGWB8-KIN11:His на основі відповідних бінарних векторів, що містять у своїй послідовності полігістидиновий тег (His-tag) – амінокислотний мотив у білках, що складається з шести розташованих поруч залишків гістидину (рис. 2). Оскільки створені генетичні конструкції планується використовувати для трансформації рослин або їх клітинних культур, His-тег генетичні конструкції для KIN10 і KIN11 були трансформовані в агробактеріальні клітини штаму GV3101. Таким чином, у подальшому трансформовані агробактерії будуть використані для перенесення ДНК послідовностей генів *KIN10* і *KIN11*, зв'язаних з His-тегом, у геном рослин. Такий підхід дасть можливість визначити субстратну специфічність цих ферментів і підтвердити або спростувати їх безпосередню взаємодію з елементами цитоскелету на підставі результатів гібридизації з His-специфічними антитілами.

Як згадувалося вище, багато функцій і механізмів дії SnRK1 протеїнкіназ ще не

вивчені. В кіномі арабідопсису каталітичні субодиниці (*SnRK1α*) *KIN10* та *KIN11* є найближчими гомологами. Крім того, ці протеїнкінази є обов'язковими елементами всіх без винятку комплексів *SnRK1*. До того ж результати біоінформаційного по-

рівняння послідовностей і просторових структур цих протеїнкіназ з арабідопсису і протеїнкінази *BRSK* людини свідчать на користь того, що протеїнкіназа людини є найближчим гомологом рослинних *SnRK1α* (рис. 3).

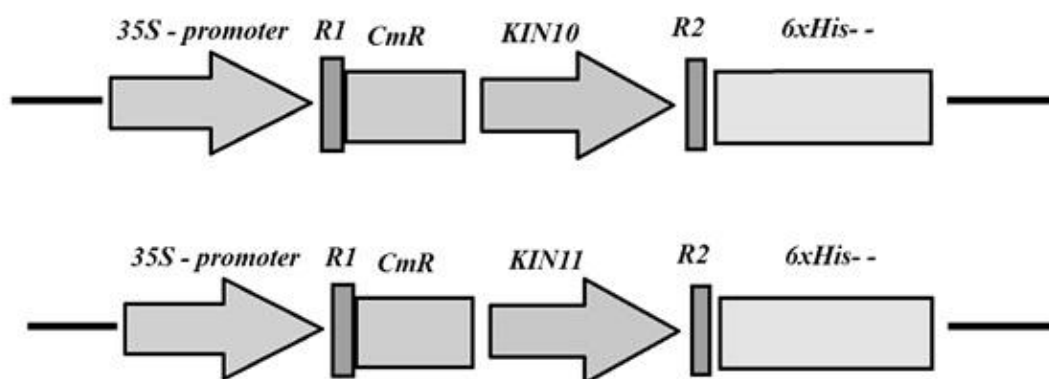


Рис. 2. Схеми створених генетичних конструкцій *pGWB8-KIN10:His* та *pGWB8-KIN11:His*.

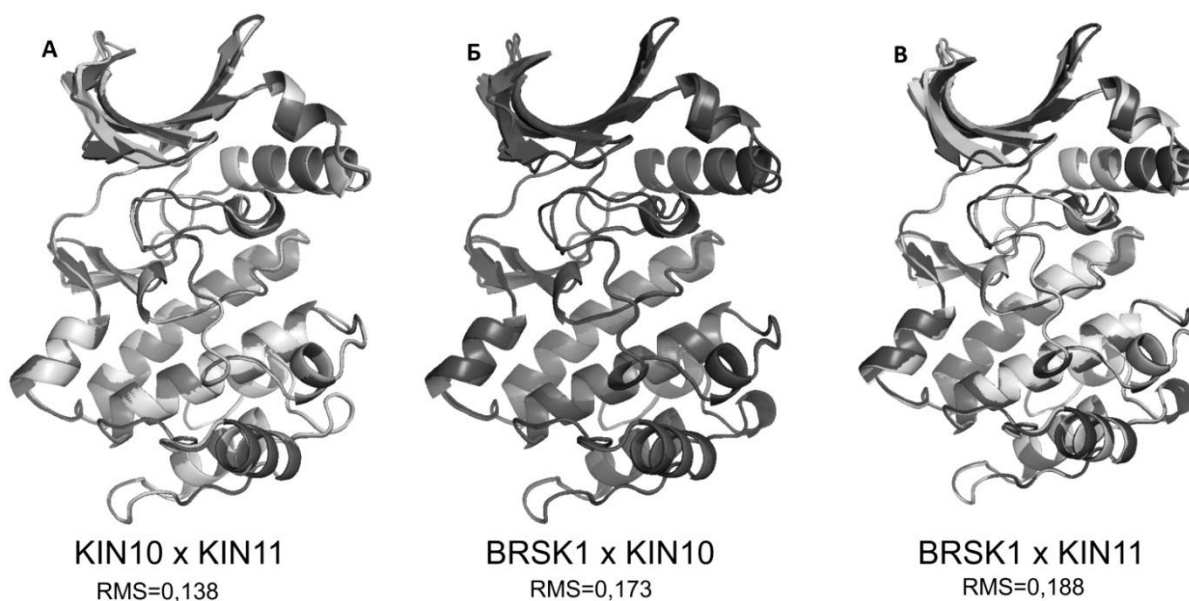


Рис. 3. Результати структурного вирівнювання 3D-моделей каталітичних доменів протеїнкіназ *KIN10* і *KIN11* (А) із *A. thaliana* та структурне порівняння *KIN10* (Б) і *KIN11* (В) з каталітичним доменом протеїнкінази *BRSK1* людини.

Таким чином, можна зробити припущення, що рослинні *SnRK1* як і протеїнкінази *BRSK* ссавців [27] можуть брати участь у регуляції структури і функцій рослинного цитоскелету. Такі функції не характерні для інших

SnRK протеїнкіназ, що підкреслює унікальність родини *SnRK1*. Відповідно, створені нами генетичні конструкції відкривають можливість подальшого експериментального дослідження функцій протеїнкіназ *KIN10* та

KIN11. Очікується, що експерименти із застосуванням трансформованих створеними генетичними конструкціями цілих рослин чи рослинних клітин допоможуть прояснити субстратну специфічність таких протеїнкіназ. Таким чином, ми сподіваємося що це дозволить підтвердити або спростувати можливий зв'язок KIN10 та KIN11 з регуляцією рослинного цитоскелету.

Висновки

Створено генетичні конструкції рGWB8-KIN10:His та рGWB8-KIN11:His на основі біна-

рних векторів, що містять полігістидиновий тег. Структурне вирівнювання 3D-моделей каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 і KIN11 з *A. thaliana*, та порівняння їх з каталітичним доменом протеїнкінази BRSK1 людини підтверджує їх значну структурну гомологію, що дозволяє зробити припущення щодо часткової подібності їх функції. Враховуючи останнє, сподіваємося, що створені конструкції дозволяють нам отримати експериментальні докази субстратної специфічності протеїнкіназ KIN10 і KIN11, а також прояснити роль комплексів SnRK1 у регуляції структури і функцій рослинного цитоскелету.

Література

1. Emanuelle S., Hossain M.I., Moller I.E., Pedersen H.L., van de Meene A.M., Doblin M.S., Koay A., Oakhill J.S., Scott J.W., Willats W.G., Kemp B.E., Basic A., Gooley P.R., Stapleton D.I. SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK // *Plant J.* – 2015. – 82, № 2. – P. 183–1892.
2. Karpov P.A., Nadezhdina E.S., Yemets A.I., Matusov V.G., Nyporko A.Yu., Shashina N.Yu., Blume Ya.B. Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases // *BMC Genomics.* – 2010. – 11, Suppl. 1. – S 14. doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.
3. Karpov P.A., Rayevsky A.V., Blume Ya.B. Bioinformatic search for plant homologs of the protein kinase Bub1 – a key component of the mitotic spindle assembly checkpoint // *Cytol. Genetics.* – 2010. – V. 44, N 6. – P. 376–388.
4. Witzczak C.A., Sharoff C.G., Goodyear L.J. 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. – P. 3737. doi: 10.1007/s00018-008-8244-6.
5. Sanz P. Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – 31 (Pt 1). – P. 178–181.
6. Halford N.G., Hey S.J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants // *Biochem. J.* – 2009. – 419, № 2. – P. 247–259.
7. Polge C., Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? // *Trends. Plant Sci.* – 2007. – 21, № 1. – P. 20–28.
8. Nietzsche M., Schiefl I., Börnke F. The complex becomes more complex: protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell- and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5, #54. doi: 10.3389/fpls.2014.00054.
9. Tomé F., Nägele T., Adamo M., Garg A., Marco-Illorca C., Nukarinen E., Pedrotti L., Peviani A., Simeunovic A., Tatkiwicz A., Tomar M., Gamm M. The low energy signaling network // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00353.
10. Tsai A.Y.-L., Gazzarrini S. Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5, № 119. doi: 10.3389/fpls.2014.00119.
11. Cho H.Y., Wen T.N., Wang Y.T., Shih M.C. Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in *Arabidopsis* under submergence // *J. Exp. Bot.* – 2016. – 67, № 9. – P. 2745–2760.
12. Crozet P., Margalha L., Butowt R., Fernandes N., Elias C.A., Orosa B., Tomanov K., Teige M., Bachmair A., Sadanandom A., Baena-González E. SUMOylation represses SnRK1 signaling in *Arabidopsis* // *Plant J.* – 2016. – 85, № 1. – P. 120–133.
13. Shin J., Sánchez-Villarreal A., Davis A.M., Du S.X., Berendzen K.W., Koncz C., Ding Z., Li C., Davis S.J. The metabolic sensor AKIN10 modulates the *Arabidopsis* circadian clock in a light-dependent manner // *Plant Cell Environ.* – 2017. – 5. doi: 10.1111/pce.12903.
14. Jamsheer K.M., Laxmi A. Expression of *Arabidopsis* FCS-Like Zinc finger genes is differentially regulated by sugars, cellular energy level, and abiotic stress // *Front. Plant Sci.* – 2015. – 24, 6:746.
15. Chiang C.P., Li C.H., Jou Y., Chen Y.C., Lin Y.C., Yang F.Y., Huang N.C., Yen H.E. Suppressor of K⁺ transport growth defect 1 (SKD1) interacts with RING-type ubiquitin ligase and sucrose non-fermenting 1-related protein kinase (SnRK1) in the halophyte ice plant // *J. Exp. Bot.* – 2013. – 64, № 8. – P. 2385–2400.
16. Краснопьорова О.Є., Ісаєнков С.В., Карпов П.А., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Кладистичний аналіз серин-треонінової протеїнкінази KIN10 та особливості її експресії в різних органах *Arabidopsis thaliana* // *Доп. НАН України.* – 2016. – № 1. – С. 81–91.
17. Bright J.N., Carling D., Thornton C. Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 2008. – 283, N 22. – P. 14946–14954.
18. Karimi M., Inzé D., Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation // *Trends. Plant Sci.* – 2002. – 7, № 5. – P. 193–195.
19. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ. – 2000. – P. 365–386.

20. Freuler F., Stettler T., Meyerhofer M., Leder L., Mayr L.M. Development of a novel Gateway-based vector system for efficient, multiparallel protein expression in *Escherichia coli* // Protein Expr. Purif. – 2008. – V. 59 (2). – P. 232–241.
21. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. – 1990. – 96, № 1. – P. 23–28.
22. Cui W., Liu W., Wu G. A simple method for the transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by foreign DNA // Chin. J. Biotechnol. – 1995. – 11, № 4. – P. 267–274.
23. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. – 2008. – V. 36. – D. 190–195.
24. Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. Sebastopol. O'Reilly and Associates, 2003. – 368 p.
25. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A. McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and ClustalX version 2.0 // Bioinformatics. – 2007. – V. 23. – P. 2947–2948.
26. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. – 2016. – V. 33. – P. 1870–1874.
27. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction // Nature Meth. – 2015. – V. 12, 1. – P. 7–8.

KRASNOPEROVA E.E., ISAYENKOV S.V., KARPOV P.A., YEMETS A.I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv-123, Osipovskogo str., 2a, e-mail: krasnopio524@gmail.com*

NEW GENETIC CONSTRUCTIONS *KIN10-His* / *KIN11-His* AS A TOOL FOR THE IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL HOMOLOGY OF PROTEIN KINASES *SnRK1* AND *BSRK*

Aim. The protein kinases SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* are one of the key regulators of plant responses to different types of abiotic stresses. Many functions of these enzymes have not been studied yet. The possible functions of these protein kinases are regulation of cytoskeletal elements. To gain insight into molecular mechanisms of interaction of these enzymes with the cytoskeleton elements and discovery of potential substrates, the genetic constructs pGWB8-*KIN10:His* and pGWB8-*KIN11:His* for plant transformation were created. **Methods.** The coding sequences of *KIN10* and *KIN11* were cloned using gateway cloning system and other molecular-biological methods including PCR, RT-PCR. **Results.** The *KIN10* and *KIN11* His-tag fusions in genetic constructs pGWB8-*KIN10:His* and pGWB8-*KIN11:His* were created. **Conclusions.** We have created plasmid constructs pGWB8-*KIN10:His* and pGWB8-*KIN11:His*. According to bioinformatical analysis the *KIN10* and *KIN11* shared high level of homology with human BRSK1. Thus the *KIN10* and *KIN11* might play important role in regulation of cytoskeleton. Created His-tag constructs can be used for identification of new substrates among cytoskeletal and other proteins.

Keywords: SnRK1, protein kinases, plasmid construct, cytoskeletal elements, polyhistidine-tag.