

УДК 575- 576.54

## ПОТЕНЦІЙНА РОЛЬ ПРОТЕЇНкіНАЗ SnRK1 У РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОГО ПОДІЛУ *ARABIDOPSIS THALIANA*

О.Є. КРАСНОПЬОРОВА <sup>1</sup>, Д.Д. БУЙ <sup>2</sup>, І.І. ГОРЮНОВА <sup>3</sup>, С.В. ІСАЄНКОВ <sup>4</sup>,  
П.А. КАРПОВ <sup>5</sup>, Я.Б. БЛЮМ <sup>6</sup>, А.І. ЄМЕЦЬ <sup>7</sup>

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а

E-mail: krasnopio524@gmail.com <sup>1</sup>, denisbuy90@gmail.com <sup>2</sup>, inna.horiunova.ukr@gmail.com <sup>3</sup>, stan.isayenkov@gmail.com <sup>4</sup>,  
karpov.p.a@gmail.com <sup>5</sup>, yemets.alla@gmail.com <sup>5</sup>, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net <sup>6</sup>

Відомо, що підродина протеїніназ SnRK1 бере участь у регулюванні вуглеводного обміну та енергетичного балансу. Ці ферменти характеризуються своєю багатофункціональністю та можуть приймати участь в багатьох інших важливих процесах у клітині. В даній роботі вивчали роль протеїніназ SnRK1 (KIN10 та KIN11) у регуляції клітинного поділу *Arabidopsis thaliana*. Для цього використовували мутантні лінії kin10/kin11 *A. thaliana* (<http://arabidopsis.info/>), нокаутні по генах KIN10 та KIN11. В цих мутантах було зафіксовано низький мітотичний індекс та показано знижений рівень експресії маркерів клітинної проліферації – генів CYCB1;1 (циклін B) та рослинного гомолога BRCA1 (Breast Cancer Suppressor Protein). Значно нижчий мітотичний індекс та рівень експресії CYCB1;1 і BRCA1 спостерігали саме у мутантах, які були вирощені за умов енергетичного голодування. Також було зафіксовано підвищену експресію CYCB1;1/BRCA1 та KIN10/KIN11 у суспензійній культурі *A. thaliana* в порівнянні з інтактними проростками. Такі дані можуть свідчити про можливу роль протеїніназ KIN10/KIN11 у регуляції проліферативної активності.

**Ключові слова:** протеїнінази, *Arabidopsis thaliana*, SnRK1, KIN10, KIN11, експресія генів, маркери мітозу, клітинний поділ.

**Вступ.** Протеїнінази родини SnRK є важливими компонентами сигнальних та регуляторних процесів вищих рослин [1, 2]. Підтверджено, що ці ферменти відіграють ключову роль у формуванні адаптивної відповіді рослин на дію стресів біотичної та абіотичної природи [3]. Одне

з найбільш важливих функціональних значень має підродина протеїніназ SnRK1 також відомих, як SnRK $\alpha$ , – найближчих рослинних гомологів АМФ-активованих протеїніназ тварин (AMP activated protein kinases) та протеїніназ комплексу SNF1 (Sucrose non-fermenting 1) з дріжджів [4-6]. Функціонально активні рослинні протеїнінази SnRK1 – це гетеротримери, до складу яких обов'язково входять каталітичні субодиниці SnRK $\alpha$  (SnRK $\alpha$ -1/KIN10/At3g01090 або SnRK $\alpha$ -2/KIN11/At3g29160) [7].

Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених рослинним протеїніназам SnRK1, їх функціональна роль розкрита лише частково. Встановлено, що протеїнінази SnRK1 є одним з ключових компонентів сигнальних каскадів енергетичного гомеостазу рослинної клітини [8–11]. Доведено, що ці ферменти ініціюють процеси, що сприяють перемиканню від анаболізму до катаболізму та є важливими регуляторами транскрипції. Відомо, що протеїнінази SnRK1 впливають на експресію генів, які беруть участь у регуляції росту, онтогенезу, аутофагії та ін. [12–15]. Було продемонстровано важливу роль цих ферментів у формуванні відповіді рослин на дію стресових факторів, зокрема темряви, дефіциту поживних речовин, холоду, посухи та ін. [16–18]. Також є підтвердження участі протеїніназ SnRK1 у формуванні стійкості рослин до сольового та осмотичного стресів [19]. Таким чином, фізіологічна відповідь рослин на дію стресових чинників може регулюватися за допомогою протеїніназ KIN10 (SnRK1.1) та KIN11(SnRK1.2).

© О.Є. КРАСНОПЬОРОВА, Д.Д. БУЙ, І.І. ГОРЮНОВА,  
С.В. ІСАЄНКОВ, П.А. КАРПОВ, Я.Б. БЛЮМ,  
А.І. ЄМЕЦЬ, 2019

Нещодавно нами за допомогою біоінформатичних методів було встановлено гомологію між протеїнкіназами SnRK1 рослинного походження і протеїнкіназами BRSK ссавців [7]. Так, існує значна подібність амінокислотних послідовностей, доменної архітектури та просторової структури каталітичних доменів рослинних SnRK1 і BRSK1 людини [7, 20]. За результатами спільної філогенетичної кластеризації повного кіному *A. thaliana* і протеїнкіназ BSRK людини, найвищий рівень гомології було знайдено для протеїнкінази BRSK1 та двох рослинних протеїнкіназ SnRK1 – SnRK $\alpha$ -1/KIN10 і SnRK $\alpha$ -2/KIN11. Отже, оскільки ці протеїнкінази є найближчими рослинними гомологами протеїнкінази BRSK1, можна припустити, що SnRK1 потенційно здатні виконувати подібні до BRSK1 функції і в рослинних клітинах. Так, враховуючи консервативність амінокислотних послідовностей  $\gamma$ -тубуліну рослин та тварин [21], нами було висунуто припущення щодо можливості фосфорилування протеїнкіназою KIN10 амінокислотного залишку Ser131  $\gamma$ -тубуліну *A. thaliana* [7], а також щодо можливої участі цих ферментів у процесах, пов'язаних з клітинним поділом.

З метою підтвердження або спростування даного припущення щодо участі протеїнкіназ KIN10 (SnRK $\alpha$ -1/KIN10/At3g01090) та KIN11 (SnRK $\alpha$ -2/KIN11/At3g29160) у клітинному поділі та у фосфорилуванні  $\gamma$ -тубуліну, нами було досліджено мутантні лінії *A. thaliana*, нокаутні по генах *KIN10* та *KIN11*. Зокрема, розраховували мітотичний індекс та досліджували кореляцію рівнів експресії маркерних генів клітинної проліферації, а саме, *CYCB1* та *BRCA1* [22, 23] за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Також було порівняно рівні експресії цих маркерних генів та генів протеїнкіназ KIN10 та KIN11 у суспензійній культурі клітин [24, 25] та інтактних проростках *A. thaliana*.

**Матеріали та методи.** У дослідженні було використано насіння мутантних ліній *kin10* та *kin11* *A. thaliana* (SALK\_139618C та SALK\_127939C), отриманих з Європейського стокового центру арабідопсиса (The European Arabidopsis Stock Centre, <http://arabidopsis.info/>), та, як контроль, дикого екотипу *A. thaliana* (Col-0). Насіння стерилізували протягом 10-ти хв в гі-

похлориті натрію, тричі відмивали стерильною водою та висаджували на живильне середовище Мурасіге-Скуга, МС (Murashige and Skoog salts, Duchefa, Нідерланди), що містило половинний набір мікро- і макросолей МС, вітаміни (тіамін і міоїнозитол) (2 г/л), 10 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН 5,7. У випадку моделювання умов енергетичного дефіциту насіння мутантних ліній та дикого типу висаджували на аналогічне середовище, однак без додавання сахарози. Висаджене насіння спочатку стратифікували при температурі +4 °С протягом 24 год, а далі культивували протягом 7 та 14 діб при +22 °С та довжині світлового періоду 16 год на добу.

Аналіз нокаутних мутантних ліній *kin10* та *kin11* проводили за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР).

Для підрахунку кількості клітин у стадії мітозу корені 14-денних проростків витримували 2 год у холодній воді (+4 °С) для синхронізації мітозів, після чого фіксували за допомогою модифікованого нами фіксатора Кларка (льодяна оцтова кислота 1 : 3, ацетоалкоголь 96 %) впродовж 24 год. Після 3-кратного промивання у 70%-ному етиловому спирті, корені поміщали у 4%-ний ацетоорсеїн і нагрівали на спиртівці до «прихованого» кипіння з наступною витримкою у барвнику впродовж 1 год. Давлені препарати виготовляли в 45%-ному розчині молочної кислоти. Мітотичний індекс обраховували за формулою:

$$MI = \frac{\Sigma(I + M + A + T)}{\Sigma(I + P + M + A + T)} * 100 \%,$$

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

Значення  $K_{MI}$  обраховували як співвідношення значень MI для оброблених варіантів з контролем:

$$KMI = \frac{MI \text{ вар.}}{MI \text{ контроль}}$$

Підрахунок мітотичного індексу та цитологічний аналіз здійснювали за допомогою мі-

кроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина) з об'єктивами Plan-Neofluar 40x/1.3 і 100x/2.6 Immersion Oil. Отримані дані обробляли за допомогою програмного забезпечення Axio-VisionsRel4.7 (CarlZeiss, Німеччина). Математичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу з використанням MS Excel (2010).

Для дослідження кореляції рівнів експресії цільових генів відбирали 7-ми денні проростки *A. thaliana*.

Суспензійну культуру *A. thaliana*. [24, 25] вирощували вродовж 7-ми діб на модифікованому середовищі Гамборга [26], що містило 2,5 мг/мл 2.4-Д, 2,5 мг/мл кінетину, а також 10 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН 5,7.

Загальну РНК виділяли за допомогою TRIzol-реагенту (Thermo Fisher Scientific, США) відповідно до протоколу, рекомендованого компанією-виробником. Якість виділеної РНК визначали спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу у агарозному гелі. Концентрацію РНК у різних зразках доводили до рівного значення. Синтез кДНК проводили з використанням набору RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) відповідно до протоколу компанії-виробника.

Рівень експресії генів *CYCB1;1/BRCA1* та *KIN10/KIN11* визначали за допомогою кількісної ПЛР (ΔΔCt метод) [27]. Ампліфікацію специфічних фрагментів генів проводили за використання набору SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, США). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 2 мкл кДНК, 1 мкл прямого та зворотнього праймерів. ПЛР проводили з інтеркалюючим барвником SybrGreen (490 нм) на ампліфікаторі iQ5 (Bio-Rad, США) за наступним протоколом: 95 °C 5хв; наступні 40 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 с при 95 °C, 30 с при 55 °C та 30 с при 72 °C, фінальна елонгація – при 72 °C впродовж 4 хв. Рівень флюоресценції вимірювали на стадії синтезу ампліконів. Для порівняння рівнів експресії генів, як референтний використовували ген актину (*AtActin*). Фрагменти генів *CYCB1;1*, *BRCA1* та *KIN10*, *KIN11* ампліфікували з використанням наступних праймерів:

*CYCB1;1\_for* 5'CTGTTGAGAGTGAATGGAGG3',

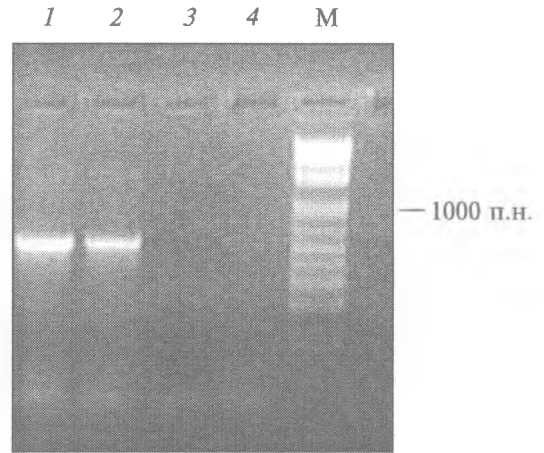


Рис. 1. Аналіз експресії *KIN10* та *KIN11* у нокаутних лініях SALK\_139618C та SALK\_127939C. 1 – контроль *KIN10*, 2 – контроль *KIN10*, 3 – SALK\_139618C (*kin10*), 4 – SALK\_127939C (*kin11*)

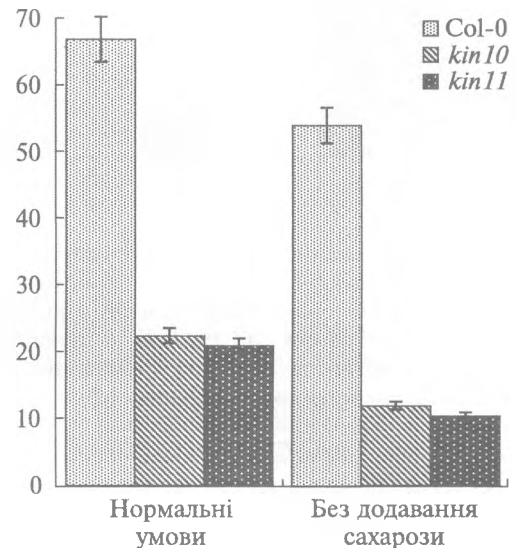


Рис. 2. Мітотична активність клітин кореневої апікальної меристеми *A. thaliana* (Col-0) та мутантних ліній *kin10/kin11*, за нормальних умов, та за умов енергетичного дефіциту (без додавання сахарози)

*CYCB1;1\_rev* 5'TAACCGACAAGAACCGATCC3';  
*BRCA1\_for* 5'CATTGATTGGATTAAGGCGTG3',  
*BRCA1\_rev* TAAGGTCCTTCTCGTATTCC3';  
*KIN10\_for* 5'CCTCAAGCCTGAAAACCTTGC3',  
*KIN10\_rev* 5'TGCATACGGGGAGTACCTTC3';  
*KIN11\_for* 5'GCGGGATGGTCAATTTCTAA3',

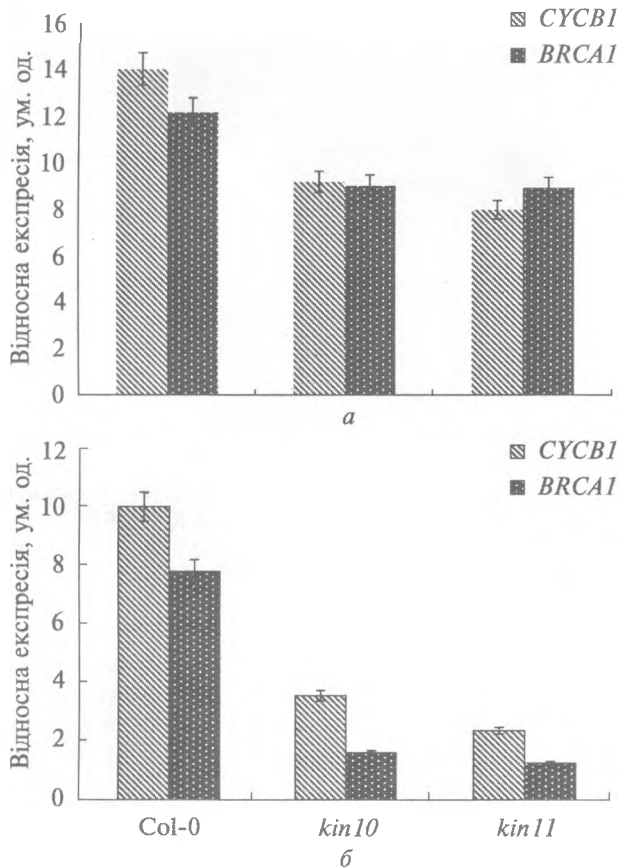


Рис. 3. Рівні експресії маркерних генів *CYCB1* та *BRCA1* (%) по відношенню до конститутивного рівня експресії гена актину (*AtActin*) у контрольній та мутантних лініях *A. thaliana* з нокаutowаною експресією *KIN10* та *KIN11* за нормальних умов (а) та за умов енергетичного дефіциту (б)

*KIN11\_rev* 5'AATCCAG'CCCTCAGCACATT-CCAGCA3',  
*AtAct\_rev* GGACTAAAACGCAAAACGAA3'.

Після ампліфікації якість продуктів оцінювали на підставі аналізу кривої плавлення продуктів ПЛР. Рівні експресії генів визначали окремо для кожної пари праймерів. Для оцінки якості та підтвердження відтворюваності результатів реакції, експерименти проводили у трьох повторях.

**Результати та їх обговорення.** В ході проведення аналізу мутантних ліній *kin10* та *kin11* було підтверджено відсутність продуктів генів *KIN10* та *KIN11* за допомогою ЗТ-ПЛР (рис. 1).

Для вивчення ролі протеїнкіназ SnRK1 у процесах клітинного поділу визначали мітотич-

ний індекс клітин кореневої апікальної меристеми у *kin10/kin11*-нокаутних лініях *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Порівняно з контролем, було зафіксовано набагато нижчий мітотичний індекс у мутантних ліній як за нормальних умов, так і за умов енергетичного дефіциту (рис. 2).

Також у *kin10/kin11*-нокаутних лініях досліджували кореляцію рівнів експресії маркерних генів клітинної проліферації *CYCB1;1* та *BRCA1* [22, 23, 28] за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту (рис. 3). Встановлено, що у обох мутантних лініях рівні експресії генів *CYCB1;1* та *BRCA1* були значно нижчими, ніж у дикого типу.

Гомологи *BRCA1* ссавців було знайдено у рослинних організмах, а саме в *A. thaliana*. Було показано, що подібно до тваринного *BRCA1* рослинний гомолог бере участь в регуляції клітинного циклу та дублюванні центросом [23]. Існують експериментальні данні, що свідчать про участь цього білку в процесах нуклеації мікротрубочок шляхом убіквітинування  $\gamma$ -тубуліну [29]. Отже, зниження рівня експресії гену цього ферменту може негативно впливати на функціонування  $\gamma$ -тубуліну. Загалом зниження рівнів експресії генів *CYCB1;1* та *BRCA1* свідчить про затримку клітинної проліферації та порушення процесів нуклеації мікротрубочок [22, 23].

Варто зазначити, що у мутантних лініях *kin10* та *kin11*, вирощених в умовах енергетичного дефіциту, експресія *CYCB1;1* та *BRCA1* була значно нижчою, ніж у рослин, вирощених за нормальних умов. Відомо, що представники протеїнкіназ SnRK1 здійснюють особливо важливі функції під час енергетичного голодування. Адже активність цих ферментів залежить від енергетичного балансу клітини [30]. Зниження енергетичного балансу призводить до активації *KIN10* та *KIN11*, які сприяють вмиканню процесів катаболізму в клітині, вмикаючи всі можливі енергозатратні механізми. Тому нокаутні лінії мутантів цих генів, що були вирощені в умовах енергетичного дефіциту значно вразливіші, ніж вирощені за нормальних умов. Відповідно, клітини таких рослин можуть мати нижчий рівень клітинної проліферації. Таким чином можна припустити,

що активність генів *KIN10* та *KIN11* пов'язана з клітинним поділом.

Для підтвердження гіпотези про можливість існування певної позитивної кореляції між інтенсивністю клітинного поділу та рівнем експресії генів *KIN10* та *KIN11* було проведено також порівняння рівнів експресії цільових генів у суспензійній культурі клітин *A. thaliana* та в інтактних проростках. Відомо, що суспензійні клітини *A. thaliana* характеризуються значно вищим мітотичним індексом у порівнянні із клітинами проростків [24]. На нашу думку, цей показник також може корелювати з рівнем експресії генів досліджуваних протеїнкіназ *KIN10* та *KIN11*.

Так, у клітинах суспензійної культури *A. thaliana* нами було зафіксовано більше, ніж в два рази вищі рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* у порівнянні з проростками арабідопсису (рис. 4.). Враховуючи значне перевищення рівнів експресії генів *KIN10* та *KIN11* у суспензійній культурі, можна припустити, що один з механізмів дії цих протеїнкіназ може бути пов'язаний саме з клітинним поділом.

Для підтвердження того, що суспензійна культура має високий мітотичний індекс, порівнювали також рівні експресії маркерних генів клітинної проліферації – *CYCB1;1* та *BRCA1* у суспензійної культури клітин *A. thaliana* та в інтактних проростках (рис. 5). Було встановлено вищий рівень експресії *CYCB1;1* та *BRCA1* саме у суспензійній культурі, що може свідчити про високий рівень клітинної проліферації. Посилена клітинна проліферація та високий рівень експресії генів каталітичних субодиниць *KIN10/KIN11* протеїнкіназ SnRK1 у суспензійній культурі підтверджує можливість участі цих ферментів у регуляції клітинного поділу.

На сьогодні відсутні будь-які данні, які експериментально підтверджували би нашу гіпотезу стосовно участі протеїнкіназ SnRK1 у регуляції клітинного поділу. Цікавим фактом є також те, що найближчим гомологом протеїнкіназ SnRK1 у тваринній клітині вважається АМФ-активована протеїнкіназа BRSK1 [20]. Цей фермент пов'язаний з регуляцією клітинного поділу у тваринних клітинах [31–33]. Фосфорилуючи  $\gamma$ -тубулін, протеїнкіназа BRSK1 регулює подвоєння центросом. Відомо, що саме

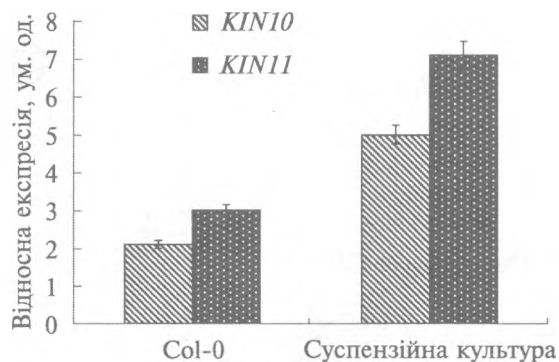


Рис. 4. Рівні експресії генів *KIN10* та *KIN11* (%) по відношенню до конститутивного рівня експресії гена актину (*AtActin*) в проростках *A. thaliana* (Col-0) та суспензійній культурі *A. thaliana*

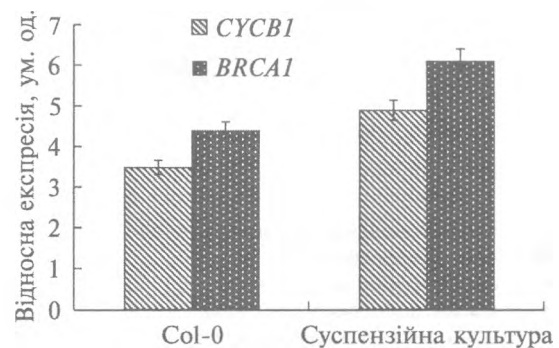


Рис. 5. Рівні експресії маркерних генів *CYCB1* та *BRCA1* (%) по відношенню до конститутивного рівня експресії гена актину (*AtActin*) у проростках *A. thaliana* (Col-0) та суспензійній культурі *A. thaliana*

$\gamma$ -тубулін є одним з найбільш важливих елементів, що регулюють збирання мікротрубочок та утворення веретена поділу [34]. Оскільки протеїнкінази SnRK1 було визначено як найближчі рослинні гомологи протеїнкінази BRSK1, можна припустити, що вони потенційно здатні виконувати подібні функції також у клітинах рослин (рис. 6). Попередні біоінформатичні дослідження підтвердили значну структурну подібність протеїнкіназ BRSK1 та SnRK1 [7]. Відповідно до отриманих нами даних, нами було висунуто припущення, що саме представники SnRK1, можуть брати участь у регуляції процесів клітинного поділу за подібним до тваринних BRSK1 сценарієм.

Отримані нами результати показують, що мітотичний індекс та рівні експресії маркерів

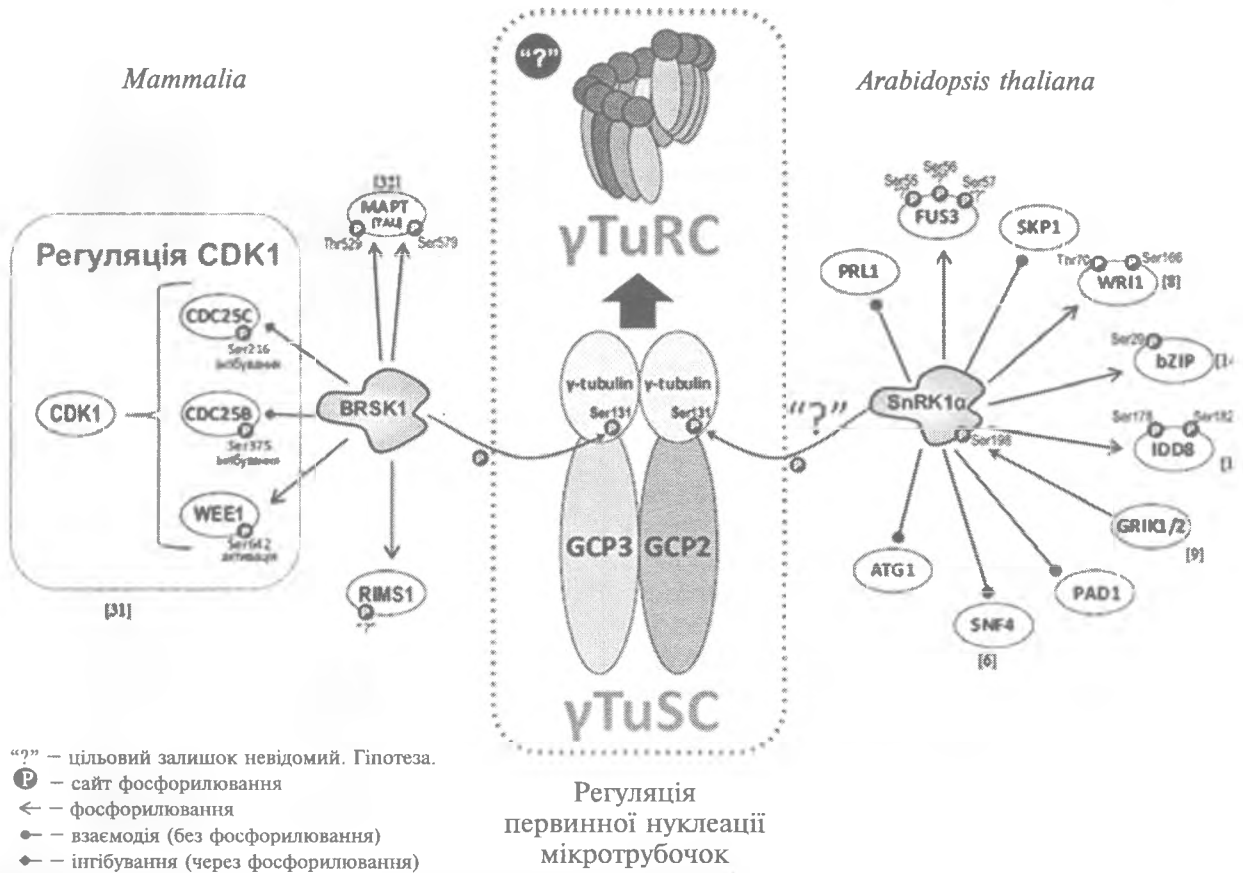


Рис. 6. Гіпотетична схема взаємодії протеїнкінази SnRK1(SnRKα) у порівнянні з протеїнкіназою BRSK1 зі своїми мішенями у рослинних клітинах на підставі літературних даних та результатів наших попередніх біоінформатичних досліджень [7]

клітинної проліферації *CYCBI;1* та *BRCA1* у нокаутних лініях SALK\_139618C та SALK\_127939C *A. thaliana*, мають значно нижчі показники ніж у контрольній лінії. За умов енергетичного дефіциту експресія даних генів також знижувалась. У суспензійній культурі *A. thaliana*, яка характеризується інтенсивним клітинним поділом, було встановлено високий рівень експресії як маркерних генів, так і *KIN10/KIN11*, у порівнянні з рослинами дикого типу (контроль).

Отже, отримані дані можуть розглядатись як додаткове підтвердження нашого попереднього припущення стосовно можливої участі каталітичних субодиниць протеїнкіназ SnRK1 (*KIN10* та *KIN11*) у регуляції процесів клітинної проліферації вищих рослин, шляхом фосфорилування  $\gamma$ -тубуліну. Також можна припус-

тити важливу роль цих ферментів у клітинному поділі рослин, що зростають за умов енергетичного дефіциту.

#### POTENTIAL ROLE OF PROTEIN KINASES SnRK1 IN REGULATION OF CELL DIVISION OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

*E.E. Krasnoperova, D.D. Buy, I.I. Goriunova, S.V. Isayenkov, P.A. Karpov, Ya.B. Blume, A.I. Yemets*

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine Osypovskogo Street 2a

E-mail: krasnopio524@gmail.com, denisbuy90@gmail.com, inna.horiunova.ukr@gmail.com, stan.isayenkov@gmail.com, karpov.p.a@gmail.com, yemets.alla@gmail.com, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

It is well known that the SNF1-related protein kinase-1 (SnRK1) subfamily is involved in the regulation of

carbohydrate metabolism and energy balance. These enzymes are multifunctional and can participate in many other important cellular processes. In this work, the role of protein kinases SnRK1 (KIN10 and KIN11) in the regulation of the cell division of *Arabidopsis thaliana* was studied. For this purpose, *A. thaliana kin10* and *kin11* knockout lines (<http://arabidopsis.info/>) were used. The cells of these mutant lines exhibited the low mitotic index. The expression level of the cell proliferation markers – *CYCB1, 1* (cyclin B) and plant *BRCA1* homolog (Breast Cancer Suppressor Protein) was reduced too. A significantly smaller mitotic index and expression level of *CYCB1, 1* and *BRCA1* genes were found in the mutants that were grown under energy starvation conditions. High level of expression of *CYCB1, 1/BRCA1* and *KIN10/KIN11* genes in *A. thaliana* cell suspension culture was also revealed in comparison to *Arabidopsis* seedlings. Obtained data may indicate the possible role of protein kinases KIN10/KIN11 in regulation of cell proliferative activity.

ПОТЕНЦІАЛЬНА РОЛЬ SNRK1  
ПРОТЕІНКІНАЗ В РЕГУЛЯЦІЇ  
КЛЕТЧНОГО ДЕЛЕННЯ  
*ARABIDOPSIS THALIANA*

Е.Е. Краснопєрова, Д.Д. Буй, И.И. Горюнова,  
С.В. Исаенков, П.А. Карпов, Я.Б. Блюм, А.И. Емец

Известно, что подсемейство протеинкиназ SnRK1 участвует в регуляции углеводного обмена и энергетического баланса. Эти ферменты многофункциональны и могут принимать участие во многих других важных клеточных процессах. В данной работе изучали роль протеинкиназ SnRK1 (KIN10 и KIN11) в регуляции клеточного деления *Arabidopsis thaliana*. Для этого использовали мутантные линии *kin10/kin11 A. thaliana*, нокаутные по генам *KIN10* и *KIN11* (<http://arabidopsis.info/>). В данных мутантах был установлен низкий митотический индекс и показано снижение уровня экспрессии маркеров клеточной пролиферации – *CYCB1, 1* (циклин B) и растительного гомолога *BRCA1* (Breast Cancer Suppressor Protein). Значительно меньший митотический индекс и уровень экспрессии *CYCB1, 1* и *BRCA1* наблюдали именно в мутантах, которые выращивали в условиях энергетического голодания. Также было зафиксировано высокую экспрессию генов *CYCB1, 1/BRCA1* и *KIN10/KIN11* в суспензионной культуре *A. thaliana* по сравнению с проростками арабидопсиса. Такие данные могут свидетельствовать о возможной роли протеинкиназ KIN10/KIN11 в регуляции клеточной пролиферативной активности.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wang, L., Hu, W., Sun, J., Liang, X., Yang, X., We, iS., Wang, X., Zhou, Y., Xiao, Q., Yang, G.,

and He., G., Genome-wide analysis of SnRK gene family in *Brachypodium distachyon* and functional characterization of BdSnRK2.9, *Plant Sci.*, 2015, vol. 237, pp. 35–45. doi 10.1016/j.plantsci.2015.05.008.

2. Wang, Y., Berkowitz, O., Selinski, J., Xu, Y., Hartmann, A., and Whelan, J., Stress responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Free Radic. Biol. Med.*, 2018, vol. 122, pp. 28–39. doi 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.031.
3. Wang, X., Wang, L., Wang, Y., Liu, H., Hu, D., Zhang, N., Zhang, S., Cao, H., Cao, Q., Zhang, Z., Tang, S., Song, D., and Wang, C., Arabidopsis PCaP2 plays an important role in chilling tolerance and ABA response by activating CBF- and SnRK2-mediated transcriptional regulatory network, *Front. Plant Sci.*, 2018, vol. 9, no. 215, doi: 10.3389/fpls.2018.00215.
4. 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, vol. 419, no. 2, pp. 247–59. doi 10.1042/BJ20082408.
5. Polge, C., Thomas, M., SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?, *Trends Plant Sci.*, 2007, vol. 21, no. 1. pp. 20–8. doi 10.1016/j.tplants.2006.11.005.
6. Lumbreras, V., Alba, M.M., Kleinow, T., Koncz, C., and Pagis M., Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution, *EMBO Rep.*, 2001, vol. 2, no. 1, pp. 55–60. doi 10.1093/embo-reports/kve001.
7. Karpov, P.A., Rayevsky, A.V., Krasnoperova, E.E., Isayenkov, S.V., Yemets, A.I., and Blume, Ya.B., Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana* as a potential regulator of primary microtubule nucleation centers in plants, *Cytol. Genet.*, 2017, vol. 51, no. 6, pp. 415–21. doi <https://doi.org/10.3103/S0095452717060056>
8. Tsai, A.Y.L., Gazzarrini, S., Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture, *Front. Plant Sc.*, 2014, doi 10.3389/fpls.2014.00119.
9. Zhai, Z., Liu, H., and Shanklin, J., Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 results in its proteasomal degradation, providing a link between energy homeostasis and lipid biosynthesis, *Plant Cell*, 2017, vol. 29, no. 4, pp. 871–89. doi 10.1105/tpc.17.00019.
10. Shen, W., Reyes, MI., and Hanley-Bowdoin, L., Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop, *Plant Physiol.*, 2009, vol. 150, no. 2, pp. 996–1005. doi 10.1104/pp.108.132787.
11. Mohannath, G., Jackel, J.N., Lee, Y.H., Buchmann,

- R.C., Wang, H., Patil, V., Adams, A.K., and Bisaro, D.M., A complex containing SNF1-related kinase (SnRK1) and adenosine kinase in *Arabidopsis*, *PLoS One*, 2014, vol. 149, no. 4, e87592. doi 10.1371/journal.pone.0087592.
12. Wang, F., Ye, Y., Chen, X., Wang, J., Chen, Z., and Zhou, Q., A sucrose non-fermenting-1-related protein kinase I gene from potato, StSnRK1, regulates carbohydrate metabolism in transgenic tobacco, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2017, vol. 23, no. 4, pp. 933–43. doi 10.1007/s12298-017-0473-4.
  13. Simon, N.M., Kusakina, J., Fernández-Lypez, A., Chembath, A., Belbin, F.E., and Dodd, A.N., The energy-signalling hub SnRK1 is important for sucrose-induced hypocotyl elongation, *Plant Physiol.*, 2018, vol. 176, pp. 1299–310. doi 10.1104/pp.17.01395.
  14. Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchler, T., Nidgele, T., Carbajosa, J.V., Hanson, J., Baena-González, E., Chaban, C., Weckwerth, W., Dröge-Laser, W., and Teige, M., SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants, *Elife*, 2015, doi 10.7554/eLife.05828.
  15. Chen, L., Su, Z., Huang, L., Xia, F., Qi, H., Xie, L., Xiao, S., and Chen, Q.-F., The AMP-activated protein kinase KIN10 is involved in the regulation of autophagy in *Arabidopsis*, *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 8, doi 10.3389/fpls.2017.01201.
  16. Nunes, C., O'Hara, L.E., Primavesi, L.F., Delatte, T.L., Schluepmann, H., Somsen, G.W., Silva, A.B., Fevereiro, P.S., Wingler, A., and Paul, M.J., The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation, *Plant Physiol.*, 2013, vol. 162, no. 3, pp. 1720–32. doi 10.1104/pp.113.220657.
  17. Martínez-Barajas, E., Delatte T., Schluepmann H., de Jong G. J., Somsen G. W., Nunes, C., Primavesi, L.F., Coello P., Mitchell R.A.C., and Paul, M.J., Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pre-grain filling: Tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase I activity, *Plant Physiol.*, 2011, vol. 156, no. 1, pp. 373–81. doi 10.1104/pp.111.174524.
  18. Jeong, E.-Y., Seo, P.J., Woo, J.C., and Park, C.-M., AKIN10 delays flowering by inactivating IDD8 transcription factor through protein phosphorylation in *Arabidopsis*, *BMC Plant Biol.*, 2015, vol. 15, no. 110, doi 10.1186/s12870-015-0503-8.
  19. Im, J.H., Cho, Y.H., Kim, G.D., Kang, G.H., Hong, J.W., and Yoo, S.D., Inverse modulation of the energy sensor Snf1-related protein kinase I on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Environ.*, 2014, vol. 10, pp. 2303–12. doi 10.1111/pce.12375.
  20. Krasnoperova, E.E., Isayenkov S.V., Karpov, P.A., and Yemets A.I., The cladistic analysis and characteristic of an expression of serine/threonine protein kinase KIN10 in different organs of *Arabidopsis thaliana*, *Reports NAS Ukraine*, 2016, no. 1, pp. 81–91 (in Ukrainian). doi 10.15407/dopovidi2016.01.081.
  21. Yemets, A.I., Lloyd, C., and Blume, Ya.B., Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression, *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology*, *Netherlands: Springer*, 2008, pp. 145–59. doi 10.1007/978-1-4020-8843-8.
  22. Crisanto, G., *The Arabidopsis cell division cycle*, *Arabidopsis Book*, 2009. no. 7: e0120. doi 10.1199/tab.0120.
  23. Trapp, O., Seeliger, K., and Puchta, H., Homologs of breast cancer genes in plants, *Front Plant Sci.*, 2011, vol. 2, no. 19, doi 10.3389/fpls.2011.00019.
  24. Menges, M., Murray, J.A., Murray synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity, *Plant J.*, 2002, vol. 30, no. 2, pp. 203–12. doi https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01274.x.
  25. Guzzo, F., Portaluppi, P., Grisi, R., Barone, S., Zampieri, S., Franssen, H., and Levi, M., Reduction of cell size induced by enod40 in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp Bot.*, 2005, vol. 56, no. 412, pp. 507–13. doi 10.1093/jxb/eri028.
  26. Gamborg, O. L., Eveleigh. D. E., Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley, *Can. J. Biochem.*, 1968, vol. 46, no. 5, pp. 417–21.
  27. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–8. doi 10.1006/meth.2001.1262.
  28. Shevchenko, G.V., Talaliev, A.S., and Doonan, J., *Arabidopsis thaliana* seedlings from the Chernobyl NPP zone are tolerant to DNA-damaging agents, *Reports NAS Ukraine*, 2012, no. 12, pp. 157–62. doi.org/10.15407/dopovidi2017.04.084.
  29. Starita, L.M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J.E., Griffin, K., Schlegel, B.P., Gygi, S.P., and Parvin, J.D., BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number, *Mol. Cell. Biol.*, 2004, vol. 24, no. 19, pp. 8457–66. doi 10.1128/MCB.24.19.8457-8466.2004.
  30. Baena-González, E., Sheen, J., Convergent energy and stress signaling, *Trends Plant Sci.*, 2008, vol. 13, no. 9, pp. 474–482. doi 10.1016/j.tplants.2008.06.006.
  31. Sample, V., Ramamurthy, S., Gorshkov, K., Ronnett, G.V., and Zhang, J., Polarized activities of



AMPK and BRSK in primary hippocampal neurons, *Mol. Biol. Cell*, 2015, vol. 26, no. 10, pp. 1935–46. doi 10.1091/mbc.E14-02-0764.

32. Alvarado-Kristensson, M., Rodriguez, M.J., Siliy, V., Valpuesta, J.M., and Carrera, A.C., SADB phosphorylation of  $\gamma$ -tubulin regulates centrosome duplication, *Nat. Cell Biol.*, 2009, vol. 11, no. 9, pp. 1081–92. doi 10.1038/ncb1921.
33. Dhumale, P., Menon, S., Chiang, J., and Püschel, A.W., The loss of the kinases SadA and SadB results in early neuronal apoptosis and a reduced number of progenitors, *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 4, e0196698. doi 10.1371/journal.pone.0196698.
34. Eklund, G., Lang, S., Glindre, J., Ehlén, E., and Alvarado-Kristensson, M., The nuclear localization of  $\gamma$ -tubulin is regulated by SadB-mediated phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 31, pp. 21360–73. doi 10.1074/jbc.M114.562389.

Надійшла в редакцію 07.12.18

Після доопрацювання 14.02.19

Прийнята до друку 18.05.19

#### СКОРОЧЕННЯ:

PRL1 – Protein pleiotropic regulatory locus  
 FUS3 – B3 domain-containing transcription factor  
 SKP1 S-phase kinase-associated protein 1  
 WR11 – WRINKLED1 transcription factor  
 bZIP – Basic Leucine Zipper Domain  
 IDD8 – INDETERMINATE DOMAIN-containing transcription factor  
 GRIK1/2 – Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1/2  
 PAD1 – Proteasome subunit alpha type-7-A  
 SNF4 – SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-2  
 AT4G1 – SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-2  
 CDK1 – Cyclin-dependent kinase 1  
 RIMS1 – Regulating synaptic membrane exocytosis 1  
 WEE1 – Well-like protein kinase