

ВИВЧЕННЯ КЛІТИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ПРОТЕЇНКІНАЗИ KIN10 З *ARABIDOPSIS THALIANA*

Серед усіх класів протеїнкіназ серин/треонінові протеїнкінази є найпоширенішим класом кіназ у еукаріот. Вони виконують безліч важливих клітинних функцій, а саме беруть участь у передачі сигналів, апоптозі, аутофагії, диференціації, регуляції метаболічних шляхів та інших важливих процесах [1].

На сьогоднішній день особливу увагу заслуговують рослинні протеїнкінази SnRK, які є важливими елементами метаболізму рослин та беруть участь у формуванні відповіді на дію різних стресів [2, 3]. У рослинах *Arabidopsis thaliana* відомо близько 38 членів SnRK протеїнкіназ, які поділяються на три підродини: SnRK1, SnRK2 та SnRK3 [4]. Відомо, що каталітична субодиниця KIN10 підродини SnRK1 з *A. thaliana* є еволюційно консервативною. Цей фермент грає ключову роль в регуляції анаболічних і катаболічних процесів, що беруть участь у формуванні клітинної відповіді на дію стресових факторів, за умов нормального росту та розвитку. Окрім того KIN10 є важливим регулятором транскрипції на дію низки стресових факторів різної природи. KIN10 активується переважно при зниженні рівня глюкози і аденозитрифосфатів та підвищення рівня АМФ [5–7].

Вважається, що KIN10 бере участь в метаболізмі крохмалю. За високої активності гена *KIN10* спостерігається пригнічення накопичення та синтезу крохмалю. При інгібуванні KIN10 ферментом трегалозо-6-фосфат (Т6Ф) спостерігали посилення метаболізму крохмалю в різних органах. Також було продемонстровано збільшення активності KIN10 під час фосфорного дефіциту, що свідчить про безпосередню її участь в деяких змінах метаболізму рослин [3, 8].

Біоінформаційні дослідження каталітичного домену кіназ, що фосфорилують елементи цитоскелету, вказують на те, що KIN10 може брати участь в фосфорилуванні мікротрубочок [9]. У одній із останніх робіт було показано взаємодію протеїнкіназ цього типу з елементами цитоскелету [10], що є нетиповим для SnRK кіназ. Загалом KIN10 бере участь в багатьох важливих сигналь-

них та біохімічних процесах, але багато її функцій, включаючи можливу взаємодію та регуляцію структур та елементів цитоскелету, залишаються не вивченими.

Для подальшого дослідження протеїнкінази KIN10, а саме її локалізації в клітинах та можливої участі в фосфорилуванні елементів цитоскелету, нами було проведено клонування кодувочої послідовності гена *KIN10* та створено бінарну плазмідну конструкцію pGWR7-KIN10-BFP для експресії химерного гена *KIN10*, злитого з репортерним геном *BFP* (blue fluorescent protein). Для оцінки функціональності створеної конструкції та визначення клітинної локалізації KIN10, було проведено трансформацію клітини *Nicotiana tabacum* суспензійної культури BY-2 цією плазмідною конструкцією.

Матеріали і методи

Для створення плазмідної конструкції pGWR7-KIN10-BFP кодувочу послідовність *KIN10* без стоп кодону було ампліфіковано із попередньо синтезованої кДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням відповідних праймерів, що містять *XhoI* та *SmaI* сайти рестрикції, відповідно:

KIN10*XhoI*_for5'-GCCTCGAGATGGATGGATCAGGCACAGG-3'

KIN10*SmaI*_rev5'-CGCCCGGGGAGGACTCGGAGCTGAGCAA-3'.

Умови ампліфікації із ДНК полімеразою *Pfu* (Fermentas, Литва) були наступними: початкова денатурація 95 °C протягом 3 хв, наступні 35 циклів ампліфікації були виконані таким чином: 30 с при 95 °C, 30 с при 56 °C та 1 хв при 72 °C, фінальна елонгація – при 72 °C протягом 3 хв.

Для проведення клонування в плазмідний вектор TagBFP-AS-C (Євроген, Росія), що містить у своїй послідовності ген *BFP* (Blue Fluorescent Protein) – одну із модифікацій флуоресцентного зеленого білка [11]. Ця плазміда була розрізана у мультіклональному сайті рестриктазами *XhoI* і *SmaI* та оброблена лужною фосфатазою. Після чого вектор було використано для подальшого лігування з попередньо ампліфікованим та оброб-

леним рестриктазами *XhoI* і *SmaI* ДНК-фрагментом *-KIN10* у співвідношенні 1:6. Таким чином, було створено функціональний Entry-клон для подальшого застосування у реакції LR-рекомбінації і переносу послідовності ДНК, що кодує злитий білок KIN10-BFP у вектор призначення [12].

Для подальшого клонування *KIN10-BFP* було проведено LR-реакцію рекомбінації [13, 14], де послідовність *KIN10-BFP* шляхом гомологічної рекомбінації було вбудовано у вектор призначення pGWR7 (Університет міста Гента, Бельгія) під контроль 35S промотору. Реакцію проводили наступним чином: до 6 мкл попередньо створеного Entry-клону (100 нг) додавали 1 мкл вектора призначення pGWR7 (100 нг) та 1 мкл ТЕ-буфера (рН 8,0). До 8 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл суміші ферментів LR Clonase™ II (Invitrogen, США) та перемішували пікетуванням. Реакцію проводили при 25 °С протягом 18 годин. Для зупинки реакції до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнази К та інкубували при 37 °С протягом 10 хв [15].

Створеною конструкцією було проведено трансформацію протопластів суспензійної культури тютюну BY-2. Для виділення протопластів використовували 50 мл попередньо пересадженої двохденної культури BY-2. Культуру клітин осаджували центрифугуванням в стерильній пробірці при 1000xg протягом 5 хв. Після чого осад ресуспендували в 50 мл середовища MS із стандартним набором макро- та мікросолей, що містило 30,5 г/л манітолу, 30 г/л глюкози, 200 мг/л 2,4-Д, 1 %-ний розчин ферменту целюлази Onozuka R-10 (Sigma, США) і 0,1%-ний розчин пектинази (Serva, США), рН 5,5. Протопласти інкубували у розчині ферментів 30–40 хв за температури 30 °С. Після чого центрифугували при 1000 xg протягом 5 хв. Отриманий осад протопластів ресуспендували в середовищі MS, склад якого наведено вище, однак без додавання ферментів. Розчин з протопластами знову центрифугували при 1000 xg протягом 5 хв, а осад, що утворився ресуспендували в середовищі MS, що містило 96 г/л сахарози, рН 5,5. Якість та кількість ізольованих протопластів оцінювали за допомогою світлового мікроскопу, кількість підраховували у камері Фукса-Розенталя.

Для проведення трансформації до 30 мкл плазмідної ДНК додавали 150 мкл протопластів та 450 мкл розчину PEG-mixture (12,6 г PEG-6000, 4,1 г манітолу, 1,18 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ рН 9). Протопласти інкубували 15–30 хв в темряві при кім-

натній температурі. Після чого обережно по крапліні додавали 3 мл 0,275М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (64,94 г/л). Трансформаційну суміш центрифугували 7 хв при 1000 об/хв. Супернатант видаляли, а осад протопластів розчиняли в 2,5 мл середовища в середовищі, що містило стандартний набір солей MS, 30,5 г/л манітолу, 30 г/л глюкози, 200 мг/л 2,4-Д та 1 %-ний розчин ферменту целюлази Onozuka R-10. Трансформаційну суміш інкубували 24 год в темряві при 24 °С. Після етапу інкубації ефективність трансформації протопластів оцінювали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Axio Scope plus 5 (Carl Zeiss), застосовуючи відповідні світлофільтри (BP365/12. FT 395. LP 397) для візуалізації BFP в клітинах.

Результати та обговорення

У результаті проведеної роботи нами було клоновано ген *KIN10* та створено плазмідну конструкцію pGWR7-*KIN10-BFP*, схему якої наведено на рис. 1. Створена конструкція кодує химерний злитий білок KIN10-BFP. Функціональність створеної конструкції було перевірено шляхом транзійтної трансформації протопластів, що були отримані з клітин суспензійної культури тютюну BY-2. Після проведення трансформації було встановлено, що близько 10 % від загальної кількості трансформованих протопластів демонстрували флуоресценцію BFP.

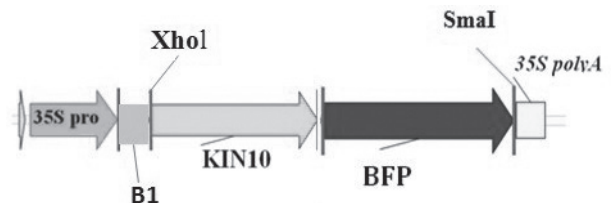


Рис. 1. Схематичне зображення плазмідної конструкції pGWR7-*KIN10-BFP*

Як показують результати люмінесцентної мікроскопії клітин BY-2, трансформованих pGWR7-*KIN10-BFP*, флуоресценція BFP була рівномірно розподілена по всьому об'єму цитоплазми (рис. 2). У деяких випадках спостерігали флуоресценцію блакитного кольору і в ядрах клітин. Відповідно до такого характеру розподілу химерного злитого білка, можна припустити, що KIN10 відіграє важливу роль у регуляції біохімічних процесів цитоплазми та, як уже зазначалося раніше, може впливати на профілі експресії генів ядра. Отримані нами дані також знаходять своє підтвердження в роботах інших дослідників [8, 16].

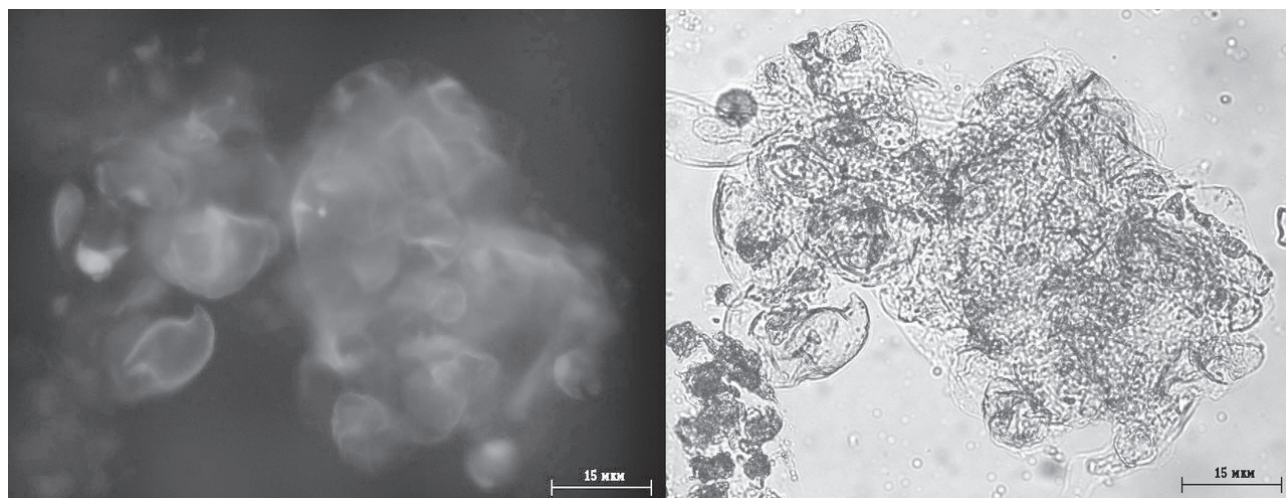


Рис. 2. Експресія *KIN10-BFP* в клітинах BY-2 після трансформації вектором *pGWR7-KIN10-BFP*

Згідно отриманих результатів та даних інших дослідників, каталітична субодиниця KIN10 має переважно цитоплазматичну та хлоропластну локалізацію [9]. Ця протеїнкіназа бере участь в багатьох клітинних процесах як безпосередньо, так і опосередковано шляхом регуляції активності інших важливих клітинних елементів. Припускається, що цитоплазматична локалізація KIN10 пов'язана саме з регуляцією активності різних цитоплазматичних ферментів, а саме нітратредуктази, НМГ–CoA редуктази та ін. [17], тому такий характер клітинної локалізації є прогнозованим. Окрім того, слід зазначити, що саме завдяки цитоплазматичній локалізації та можливій участі у регуляції роботи цитоскелету, протеїнкіназа KIN10 може відігравати роль у внутрішньоклітинному транспорті, на що опосередковано вказують дані з роботи [16]. Кількість ідентифікованих протеїнкіназ, що можуть регулювати елементи цитоскелету з кожним роком зростає [18]. Цілком ймовірно, що серед низки таких кіназ може бути і KIN10, але для цього потрібні подальші дослідження клітинної колокалізації з елементами цитоскелету та визначення субстратної специфічності цієї протеїнкінази.

ЛІТЕРАТУРА

1. Hardie DG. Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions // *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999. – 50. – P. 97–131.
2. Halford N.G., Hardie D.G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? // *Plant Mol. Biol.* – 1998. – 37, N 5. – P. 735–748.
3. Polge C., Thomas M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? // *Trends. Plant Sci.* – 2007. – 21, N 1. – P. 20–28.
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.* – 419, N 2. – P. 247–259.

Висновки

У ході роботи було створено плазмідну конструкцію *pGWR7-KIN10-BFP*, що кодує химерний злитий білок KIN10-BFP. Було показано функціональну придатність даної конструкції для трансформації рослинних клітин та транз'єнтної експресії злитого білка KIN10-BFP. Завдяки проведенню трансформації клітин суспензійної культури BY-2 та мікроскопічного аналізу було визначено внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкінази KIN10. Зокрема, було показано, що химерний білок KIN10-BFP рівномірно розподіляється по всьому цитоплазматичному простору клітини, що може свідчити про важливість цього ферменту в регуляції багатьох клітинних процесів цитоплазми, таких як метаболізм вуглеводнів, регуляція рівня АТФ, апоптоз та ін.

Створена плазмідна конструкція може бути потужним інструментом для подальшого вивчення та з'ясування клітинних мішеней цього ферменту, шляхом створення стабільних трансформантів рослин, експериментів із колокалізацією чи транз'єнтною трансформацією протопластів мутантних ліній рослин.

5. Baena-González E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // *Nature*. – 2007. – 418, N 7156. – P. 938–942.
6. Halford N.G., Hey S., Jhureea 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, N 382. – P. 467–475.
7. Polge C., Jossier M., Crozet P., Gissot L., Thomas M. b-Subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities: physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKINb1-subunit // *Plant Physiol.* – 2008. – 148. – P. 570–1582.
8. Fragoso S., Espárrdola L., Parez-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, N 4. – P. 1906–1916.
9. 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. S. B.* – 2010. – 65, N 4. – P. 213–216.
10. 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, N 8. – P. 2385–2400.
11. Subach O.M., Gundorov I.S., Yoshimura M., Subach F.V., Zhang J., Grьenwald D., Souslova E.A., Chudakov D.M., Verkhusha V.V. Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe // *Chem Biol.* – 2008. – 15, N 10. – P. 1116–1124.
12. Joubus J., De Schutter K., Verkest A., Inzй D., De Veylder L. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures // *Plant J.* – 2004. – 37, N 6. – P. 889–896.
13. Karimi M., Inze D., Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation // *Trends. Plant Sci.* – 2002. – 7, № 5. – P. 193–195.
14. Karimi M., De Meyer B., Hilson P. Modular cloning in plant cells // *Trends Plant Sci.* – 2005. – 10, № 3. – P. 103–105.
15. Karimi M., Bleys A., Vanderhaeghen R., Hilson P. Building blocks for plant gene assembly // *Plant Physiol.* – 2007. – 145, N 4. – P. 1183–1891.
16. Farr6s R., Ferrando A., J6sik J., Kleinow T., Okr6ysz L., Tiburcio A., Salchert K., del Pozo C., Schell J., Koncz C. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase // *EMBO J.* – 2001. – 20, N 11. – P. 2742–2756.
17. Hey S.J., Powers S.J., Beale M.H., Hawkins N.D., Ward J.L., Halford N.G. Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified *HMG-CoA* reductase // *Plant Biotechnol J.* – 2005. – 4, N 2. – P. 219–229.
18. 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 protein kinases, participating in microtubule protein phosphorylation and cell division regulation // *Tsitol Genet.* – 2009. – 43, N 3. – P. 63–79.

KRASNOPEROVA E.E., ISAYENKOV S.V., YEMETS A.I., BLUME YA.B.

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

STUDY A CELLULAR LOCALIZATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* PROTEIN KINASE KIN10

Aims. Protein kinase KIN10 from *Arabidopsis thaliana*, is one of the key regulator of response formation to different types of abiotic stress. To get insight of the molecular mechanisms of cellular response regulation to the various factors the study of KIN10 is very important. In order to evaluate the KIN10 cellular localization to continue experiments with colocalization the plasmid construct pGWR7-KIN10-BFP was created. **Methods.** The coding sequence of KIN10 was cloned using various molecular methods including PCR, RT-PCR. In order to check functionality of created construct the isolation and transformation of protoplasts were performed. **Results.** The plasmid construct pGWR7-KIN10-BFP with coding sequence of *KIN10* was created. The intracellular localization of KIN10 was evaluated by transient expression in plant cells. It was found that KIN10 is uniformly distributed throughout the cell cytoplasm. **Conclusions.** We have created vector construct pGWR7-KIN10-BFP. It has been shown the ability of this construct to express within the cell and produces chimerical KIN10-BFP fusion protein. This construct can be useful for further colocalization study with cytoskeleton elements in order to evaluate the role of this kinase in the regulation of cytoskeleton. Our study demonstrates cytoplasmic localization of KIN10 kinase.

Keywords: KIN10, protein kinase, plasmid construct, intracellular localization, fluorescent microscopy.