

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СЕРИНТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ НА МОРФОЛОГИЮ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* И ОРГАНИЗАЦИЮ МИКРОТРУБОЧЕК В ЕГО КЛЕТКАХ

© Я. А. Шеремет,^{1,*} А. И. Емец,¹ К. Виссенберг,² Ж.-П. Вербелен,² Я. Б. Блюм¹

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев,

и ² Университет Антверпена, Бельгия;

* электронный адрес: yarasheremet@gmail.com

Исследовано влияние различных ингибиторов протеинкиназ, фосфорилирующих по серину и треонину (циклинзависимой, Ca^{2+} -кальмодулинзависимой и протеинкиназы С), на организацию микротрубочек в клетках основных зон первичного корня *Arabidopsis thaliana* в условиях *in vivo*. Обнаружено, что повышенная чувствительность к действию всех исследуемых ингибиторов протеинкиназ характерна для микротрубочек эпидермальных клеток, клеток коры переходной зоны и зоны растяжения корня, а также трихобластов и атрихобластов зоны дифференциации. Установлено, что вследствие ингибирования активности серинтреониновых протеинкиназ микротрубочки данных типов клеток изменяют исходную ориентацию из поперечной (косой) на хаотическую или продольную относительно основной оси первичного корня. Микротрубочки клеток меристематической зоны корня, а также корневых волосков менее чувствительны к действию тестируемых ингибиторов протеинкиназ. Поскольку установлено, что изменение организации микротрубочек в клетках первичного корня под влиянием ингибиторов серинтреониновых протеинкиназ связано с последующими нарушениями процессов его роста и дифференциации, сделано предположение о том, что фосфорилирование белков микротрубочек и прежде всего тубулина может быть вовлечено в регулирование данных процессов.

Ключевые слова: микротрубочки, фосфорилирование по серину и треонину, протеинкиназы, ингибиторы, *Arabidopsis*.

Принятые сокращения: цАМФ — циклический аденозинмонофосфат, ДМСО — диметилсульфоксид, CDK — циклинзависимая киназа, GFP — зеленый флуоресцентный белок, MAP — белок, ассоциированный с микротрубочками.

Ранее нами было показано что в растительной клетке α - и β -субъединицы тубулина могут подвергаться посттрансляционному фосфорилированию как по остаткам серина (треонина) (Blume et al., 1997, 2008a), так и по остаткам тирозина (Blume et al., 2008b). Используя ряд специфических ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на модельном растении *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующем ген *gfp-map4*, мы показали, что фосфорилирование остатков тирозина принимает активное участие в организации микротрубочек в клетках разных типов всех ростовых зон первичного корня (Yemets et al., 2008). Недавно в растительной клетке была обнаружена казеин-подобная киназа SKL6, которая катализирует фосфорилирование β -субъединицы тубулина по остаткам серина в положениях 413 и 420 (Ben-Nissan et al., 2008). В другой работе было продемонстрировано, что α -тубулин из чая (*Camellia sinensis*) имеет 4 сайта фосфорилирования протеинкиназой С (Fang et al., 2006). Недавно из суспензионной культуры *Nicotiana tabacum* выделили 27 фосфорилированных белков, среди которых был идентифицирован и тубулин, фосфорилирование которого осуществляется по Ca^{2+} -кальмодулинзависимому пути (Gerber et al., 2006). Однако функциональная роль посттрансляционного фос-

форилирования белков микротрубочек по остаткам серина и треонина остается практически неизученной.

В настоящее время охарактеризованы основные типы серинтреониновых протеинкиназ, фосфорилирующих по остаткам серина и треонина и ассоциированных с микротрубочками растений (Карпов и др., 2009). Следовательно, можно предположить, что такая посттрансляционная модификация играет важную роль в организации сети кортикальных микротрубочек и регуляции их динамических свойств в растительных клетках.

С другой стороны, нами было установлено, что обе субъединицы тубулина растений интенсивно фосфорилируются по остаткам серина и треонина вследствие активации соответствующих протеинкиназ (зависимых от цАМФ, Ca^{2+} и Ca^{2+} -кальмодулина), а также протеинкиназы С (Blume et al., 2008a). Было обнаружено, что использование специфических ингибиторов Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ и протеинкиназы С приводит к изменениям организации микротрубочек в клетках корневого апекса 3-суточных проростков *Allium cepa* (Blume et al., 2008a). В другой работе нами было показано, что индукция гиперфосфорилирования белков посредством ингибирования серин/треониновых протеинфосфа-

таз также приводит к нарушению организации микротрубочек растительных клеток (Шеремет и др., 2009).

В связи с этим для выяснения роли различных типов серин/треониновых протеинкиназ в фосфорилировании белков микротрубочек растительной клетки и их функционального значения мы предприняли попытку исследования влияния ингибиторов ряда серин/треониновых протеинкиназ на реорганизацию микротрубочек в клетках разных типов. В настоящей работе определяли взаимосвязь между ингибированием активности серин/треониновых протеинкиназ (циклинзависимой, Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы и протеинкиназы С) и изменением параметров роста и морфологии первичного корня, а также организации микротрубочек в разных клетках корней проростков *A. thaliana*.

Материал и методика

В экспериментах использовали 4-суточные проростки линии *A. thaliana*, экспрессирующей химерный ген *gfp-map4* (Mathur, Chua, 2000), которые получали как описано ранее (Шеремет и др., 2009). В качестве ингибитора циклинзависимых протеинкиназ использовали оломоуцин (Sigma, США), который растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 50 мМ и хранили при $-20^{\circ}C$. Ингибитор Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ W7 (Sigma, США) растворяли в дистиллированной воде при $70^{\circ}C$ и маточный раствор (100 мМ) хранили при $-20^{\circ}C$. Ингибитор протеинкиназы С (Ca^{2+} -зависимой и стимулируемой фосфолипидом) стауроспорин (Sigma, США) растворяли в ДМСО (10 мМ) и хранили при температуре $-20^{\circ}C$. Маточный раствор (50 мМ) другого ингибитора протеинкиназы С — Н7 (Sigma, США) — также готовили в ДМСО и хранили при $-20^{\circ}C$. В экспериментах свежие рабочие растворы ингибиторов в различных концентрациях готовили на дистиллированной воде. Конечная концентрация ДМСО в них не превышала 0.5 % и, как было установлено нами ранее, не является токсичной для растительных клеток и микротрубочек (Mitrofanova et al., 2003; Yemets et al., 2005; Ожередов и др., 2009), что соответствует результатам предыдущих работ.

В первой серии экспериментов изучали влияние обработки ингибиторами протеинкиназ в различных концентрациях в течение 6, 24 и 48 ч на рост и морфологию корней 4-суточных проростков *A. thaliana*. Полученные данные документировали с помощью цифровой фотокамеры Canon Power Shot G6 в режиме макросъемки. Длину корней *A. thaliana* измеряли согласно ранее описанной методике (Yemets et al., 2008). Все эксперименты проводили в трех повторностях, результаты обрабатывали статистически согласно общепринятым методикам (Лакин, 1990).

Для изучения краткосрочного и пролонгированного влияния специфических ингибиторов на организацию и ориентацию микротрубочек в клетках различных ростовых зон первичного корня 4-суточные проростки обрабатывали соответствующими веществами в различных концентрациях на протяжении 1—48 ч. Микротрубочки, меченные GFP, в клетках *A. thaliana* визуализировали *in vivo* с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Для получения трехмерного изображения использовали линию 488 аргонового лазера (возбуждение при 488—543 нм, эмиссия при 510—540 нм), иммерсионный объектив с

увеличением $63\times$ (Plan-Apochromat). На основании серийных оптических срезов (с интервалом 0.3—0.5 мкм) реконструировали трехмерные модели построений микротрубочек с помощью программного обеспечения LSM 510, версия 4.0 SP2 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Влияние ингибиторов протеинкиназ на рост и морфологию первичных корней проростков *A. thaliana*. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что рост и развитие первичных корней являются чувствительными к ингибированию процессов фосфорилирования в клетке с помощью специфических ингибиторов серинтреониновых протеинкиназ. Обработка 4-суточных проростков всеми исследуемыми ингибиторами протеинкиназ приводила к значительным изменениям скорости роста первичных корней. Как видно на рис. 1, обработка проростков оломоуцином или W7 в течение 24 ч вызывала снижение скорости роста корней в 4 раза, а обработка Н7 или стауроспорином — в 2 и 1.5 раза соответственно по сравнению с контролем. Следует отметить, что спустя 24—48 ч после начала действия оломоуцина на проростки корни возобновляли свой рост. Это может свидетельствовать о том, что данный тип ингибитора циклинзависимых протеинкиназ оказывал временное ингибирующее влияние на рост корня. Наблюдаемые нами эффекты оломоуцина на проростки *A. thaliana* соответствуют результатам более ранней работы, в которой было показано, что другие ингибиторы циклинзависимых протеинкиназ (богемин и росковитин) тоже вызывают краткосрочное торможение деления клеток на границе фаз клеточного цикла G_2/M меристематических клеток корневых апексов *Vicia faba* (Binarova et al., 1998).

Также обнаружено, что обработка корней *A. thaliana* всеми тестируемыми ингибиторами протеинкиназ приводила к значительным нарушениям морфологии первичных корней, а именно к появлению вздутия в зоне растяжения (рис. 2, в) и в меристематической зоне корня (рис. 2, д), а также изменяла рост и формирование корневых волосков (рис. 2, б—д). Показано, что обработка проростков ингибитором W7 в концентрации 10 мкМ на протяжении 24 ч приводила к аномальному формированию новых корневых волосков в непосредственной близости к

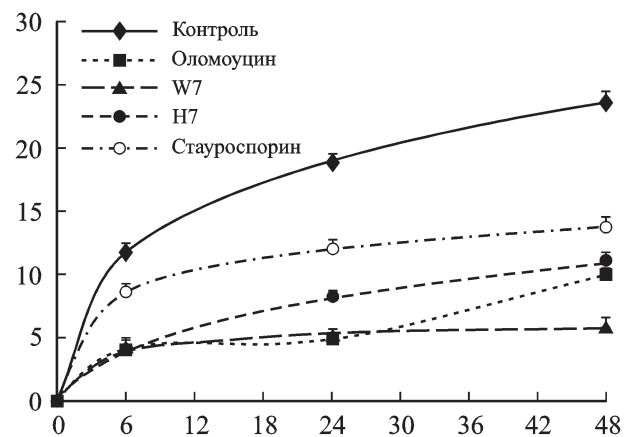


Рис. 1. Прирост длины первичных корней *Arabidopsis thaliana* (по оси ординат, %) после их обработки ингибиторами протеинкиназ (по оси абсцисс время обработки, ч).

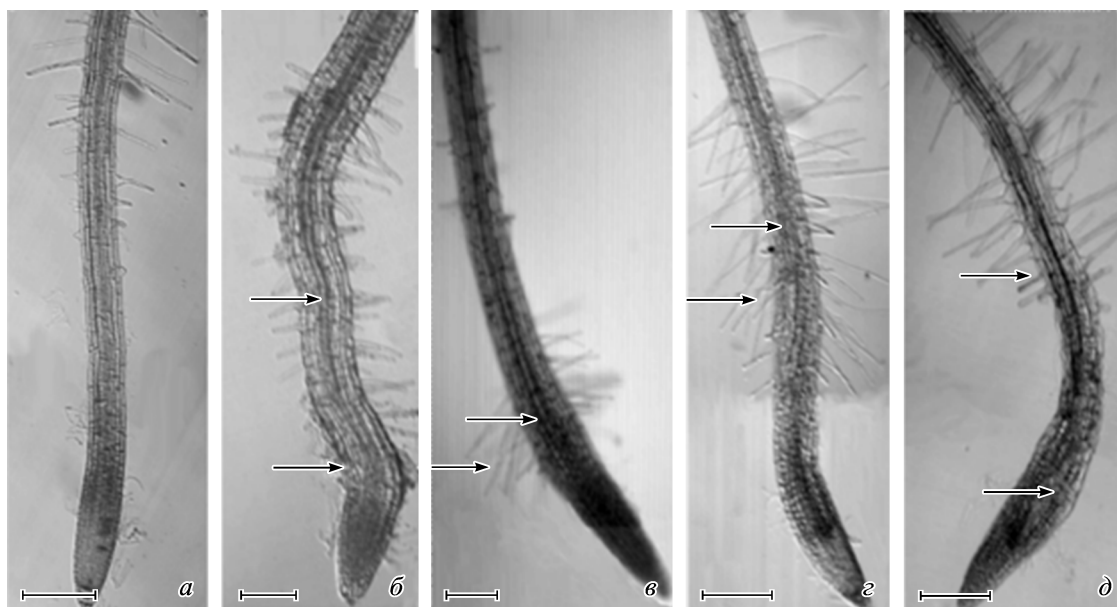


Рис. 2. Морфология корневых апексов проростков *Arabidopsis thaliana* после обработки ингибиторами протеинкиназ. *а* — контроль, *б* — 100 мкМ оломоуцин, *в* — 10 мкМ W7, *г* — 50 мкМ Н7, *д* — 50 нМ стауроспорин. Зоны разбухания корней и аномального формирования корневых волосков указаны стрелками. Масштабная линейка — 200 мкм.

меристематической зоне корня (рис. 2, *в*). Обработка проростков оломоуцином в концентрации 100 мкМ в течение 24 ч (рис. 2, *б*), Н7 в концентрации 50 мкМ (рис. 2, *г*) или стауроспорином в концентрации 50 нМ (рис. 2, *д*) индуцировала формирование большего количества новых корневых волосков по сравнению с необработанными проростками (рис. 2, *а*). Однако следует отметить, что элонгация новообразованных корневых волосков в проростках угнеталась (по сравнению с контролем) в результате действия вышеупомянутых ингибиторов. Обобщенные результаты о влиянии разных типов ингибиторов протеинкиназ на рост и морфологию первичных корней представлены в табл. 1.

Полученные нами результаты согласуются с данными другой работы, в которой продемонстрировано, что рост корней *Arabidopsis* значительно замедляется в присутствии ингибиторов цАМФ-зависимой протеинкиназы, протеинкиназы С и ингибитора легких цепей миозина (Baskin, Wilson, 1997). В частности, оказалось, что шесть различных типов ингибиторов протеинкиназ (4-диметиламинопурин, хелеритрин, ML-9, K252a, Н-89 и стауроспорин) замедляли рост первичных корней *Arabidopsis* после 48-часовой обработки на твердой среде, а три из них (K252a, Н-89 и стауроспорин) стимулировали набухание корней. Авторами было обнаружено, что все вышеупомянутые типы ингибиторов влияли на процессы растяжения клеток, вызывая его замедление (Baskin, Wilson, 1997). В свою очередь мы в настоящей работе впервые продемонстрировали, что ингибиторы Ca^{2+} -кальмодулинзависимых и циклинзависимых протеинкиназ вызывают замедление процесса роста первичного корня, индуцируют набухание в различных ростовых зонах корня, а также нарушают процессы формирования и роста корневых волосков. Недавно нами показано, что ингибитор протеинфосфатазы 1 и протеинфосфатазы 2А (окадаиновая кислота) также вызывает изменения в общей морфологии первичных корней проростков *A. thaliana*, в частности приводит к нарушению роста и морфологии корневых во-

лосков (Шеремет и др., 2009). Следовательно, обобщая полученные нами данные, можно предположить, что ингибирование Ca^{2+} -кальмодулинзависимых и циклинзависимых протеинкиназ, а также протеинкиназы С влияет на рост первичных корней, а также вызывает изменение общей морфологии корня, в частности приводит к индукции формирования новых корневых волосков.

Влияние ингибиторов протеинкиназ на организацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana*. Поскольку известно, что нарушения общей морфологии корневых апексов могут являться результатом изменений структурно-функциональных свойств микротрубочек, на следующем этапе работы изучали изменения в организации микротрубочек в клетках корня после воздействия ингибиторов различных протеинкиназ. Подробная характеристика исходной ориентации микротрубочек в клетках всех ростовых зон корня *A. thaliana* (Verbelen et al., 2006) была детально описана нами ранее (Емец и др., 2009). Изображение организации микротрубочек в клетках контрольных корней *Arabidopsis* представлено на рис. 3, *а–г*.

В результате проведенных экспериментов установили, что обработка проростков оломоуцином в концентрации 50 мкМ не изменяет ориентацию как митотических, так и кортикальных микротрубочек. Повышение концентрации этого ингибитора до 100 мкМ уже через 6 ч сопровождалось незначительной дезориентацией микротрубочек в эпидермальных клетках переходной зоны и зоны растяжения корня. Увеличение времени действия оломоуцина до 24 или 48 ч приводило к изменению исходной ориентации кортикальных микротрубочек из поперечной или косой относительно основной оси корня на хаотическую или продольную как в переходной зоне, так и зонах растяжения и дифференциации (рис. 4, *б, в, д*). В то же время в меристематической зоне корня кортикальные и эндоплазматические микротрубочки сохраняли свою нативную организацию и ориентацию (рис. 4, *а, г*) по сравнению с контролем (рис. 3, *а, б*).

Эффекты ингибиторов протеинкиназ на рост и морфологию первичных корней *A. thaliana*

Название ингибитора	Ингибирование роста первичных корней		Индукция свеллинга		Влияние на корневые волоски					
	24 ч	48 ч	меристематическая зона	зона растяжения	индукция образования	рост		морфология		
						стимуляция	подавление	свеллинг	ветвление	загибание
Оломоуцин	В 4 раза	В 2.5 раза	–	–	+	–	+	–	–	–
W7	То же	В 4 раза	–	+	+	–	+	–	–	–
H7	В 2 раза	В 2 раза	–	–	+	–	+	–	–	–
Стаурспорин	В 1.5 раза	В 1.7 раза	+	–	+	–	+	–	–	–

«+» — изменения по сравнению с контролем; «–» — без изменений по сравнению с контролем.

Известно, что оломоуцин, являющийся аналогом пурина, специфически ингибирует циклинзависимые протеинкиназы (Vesely et al., 1994). В растительной клетке в зависимости от структурного сходства выделяют несколько типов циклинзависимых протеинкиназ: CDK-A (классические), CDK-B и CDK-D (Joubes et al., 2000). Известно, что циклинзависимые протеинкиназы, в частности CDK-A, важны для прохождения клеточного цикла и вступления клеток растений в митоз (Hemerly et al., 1995). Ранее было показано, что оломоуцин как в животной, так и в растительной клетке ингибирует переход фаз клеточного цикла $G_1 \rightarrow S$ и $G_2 \rightarrow M$ (Glab et al., 1994; Meijer, 1996; Binarova et al., 1998). Рядом авторов установлено, что одна из циклинзависимых протеинкиназ классического типа, *cdc2*, локализуется не только в ядре и на митотических хромосомах (Bogre et al., 1997), но и колокализуется с митотическими (Colasanti et al., 1993; Mineyuki, 1999; Meszaros et al., 2000) и кортикальными построениями микротрубочек в растительной клетке (Hemsley et al., 2001). На животных клетках было обнаружено, что циклинзависимая протеинкиназа *Cdk1* катализирует фосфорилирование не только ряда белков, ассоциированных с микротрубочками, но и фосфорилирование β -субъединицы тубулина по 172-му остатку серина (Fourest-Leievin et al., 2006).

В настоящей работе нами впервые показано, что в условиях *in vivo* ингибитор циклинзависимых протеинкиназ — оломоуцин — влияет на организацию кортикальных микротрубочек в различных клетках корня, приводя к изменению их исходной поперечной ориентации на продольную. Поскольку известно, что в растительной клетке циклинзависимые протеинкиназы физически ассоциированы с митотическими и кортикальными микротрубочками, а организация микротрубочек является чувствительной к действию оломоуцина, можно сделать вывод о том, что циклинзависимые протеинкиназы принимают самое непосредственное участие в регуляции организации микротрубочек растительной клетки.

Обработка проростков *A. thaliana* другим ингибитором — W7 — также приводила к изменениям в ориентации кортикальных микротрубочек. При концентрации 1 мкМ W7 не вызывал нарушений в организации кортикальных микротрубочек клеток корней. При повышении концентрации W7 до 10 мкМ удалось обнаружить, что после 6-часовой обработки кортикальные микротрубочки в отдельных эпидермальных клетках и клетках коры зоны растяжения корня изменяли исходную ориентацию с поперечной на хаотическую. Длительная обработка корней (24 ч) данным ингибитором в указанной концентрации

приводила к изменению поперечной (хаотической) ориентации кортикальных микротрубочек на продольную в клетках как переходной зоны, так и зон растяжения и дифференциации (рис. 5, б). Необходимо отметить, что наряду с наблюдаемой дезориентацией микротрубочек в клетках зон растяжения и дифференциации в клетках меристематической зоны корня кортикальные микротрубочки сохраняли свою исходную ориентацию (рис. 5, а). Повышение концентрации W7 до 50 мкМ приводило к полной деполимеризации микротрубочек в клетках всех ростовых зон корня уже через 1 ч обработки.

Известно, что W7 является специфическим ингибитором Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ, молекула которого связывается с двумя доменами кальмодулина, блокируя тем самым связывание кальмодулина с другими молекулами (Osawa et al., 1998). Кальмодулин в свою очередь является повсеместным Ca^{2+} -связывающим белком и первичным внутриклеточным Ca^{2+} -сигнальным рецептором; он передает сигналы за счет модулирования активности кальмодулинсвязывающихся белков и, таким образом, генерирует физиологические ответы клетки на различные стимулы (Trewavs, Malho, 1998; Chin, Means, 2000; Park et al., 2004). Ca^{2+} -кальмодулинзависимое фосфорилирование белков является одним из основных механизмов для усиления и распространения сигналов, опосредованных Ca^{2+} -кальмодулином, и принимает участие в регуляции широкого спектра процессов развития растений (Sathyanarayanan, Poovaiah, 2004; Tirichine et al., 2006). К настоящему времени у арабидопсиса идентифицировано несколько семейств протеинкиназ, зависимых от Ca^{2+} -кальмодулина (Wang et al., 2007).

Известно, что кальмодулин в растительной клетке помогает стабилизировать микротрубочки, защищая их от деполимеризирующего действия комплекса Ca^{2+} -кальмодулин (Fisher et al., 1996). Показано, что W7 за счет взаимодействия с молекулами кальмодулина оказывает дестабилизирующее действие на микротрубочки протопластов суспензионной культуры моркови (Fisher et al., 1996). На системе пермеабелизованных протопластов *N. plumbaginifolia* нами продемонстрировано, что обе субъединицы растительного тубулина интенсивно фосфорилируются при активации Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ (Blume et al., 2008a). Также обнаружено, что обработка корневых апексов 3-суточных проростков *Allium cepa* антагонистом кальмодулина трифлюоперазином индуцирует реорганизацию микротрубочек — изменение их поперечной ориентации на продольную (Blume et al., 2008a).

В свою очередь в настоящей работе нами впервые в условиях *in vivo* показано, что ингибитор W7 изменяет

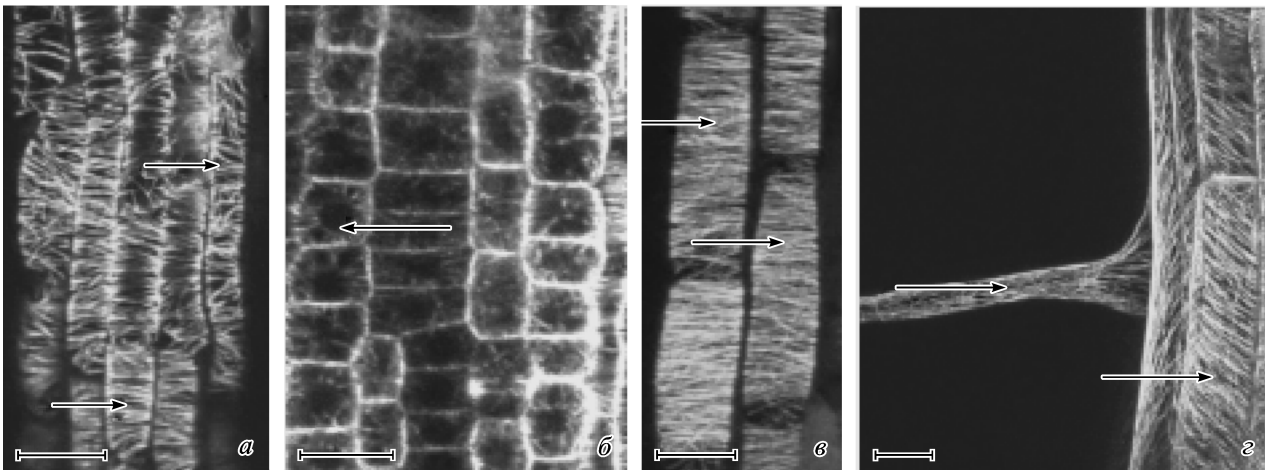


Рис. 3. Организация микротрубочек в клетках корней *Arabidopsis thaliana*.

a, б — меристематическая зона; *в* — зона растяжения; *г* — зона дифференциации. Стрелками указаны кортикальные (*a, в, г*) и эндоплазматические (*б*) микротрубочки. Масштабная линейка — 20 мкм.

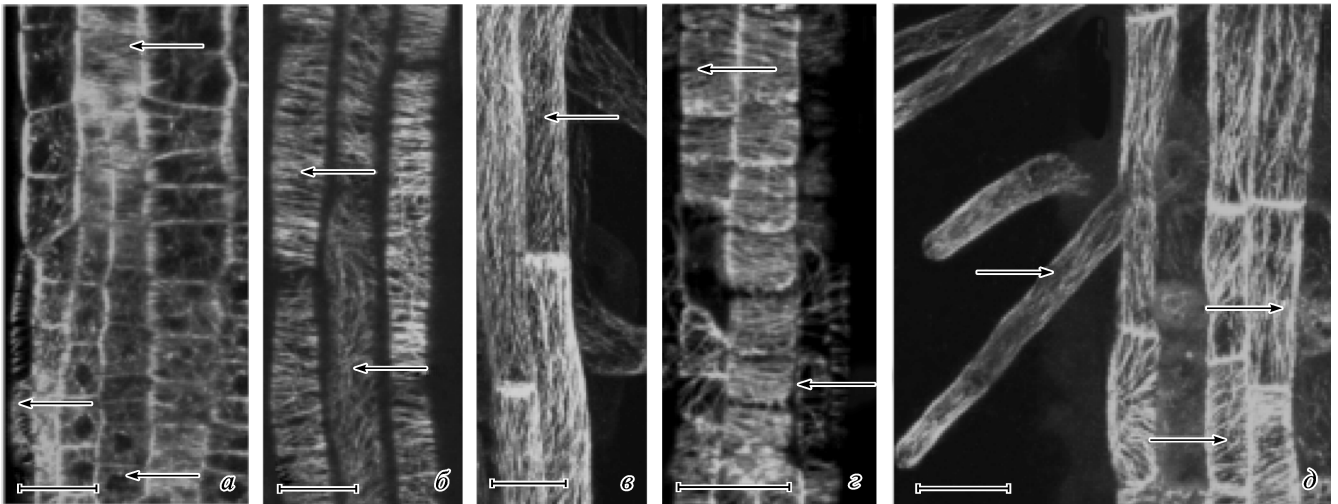


Рис. 4. Организация микротрубочек в клетках корней *Arabidopsis thaliana* после обработки оломоуцином (100 мкМ).

a — меристематическая зона, 24 ч; *б* — зона растяжения, 24 ч; *в* — зона дифференциации, 24 ч; *г* — меристематическая зона, 48 ч; *д* — зона дифференциации, 48 ч. Стрелками указаны кортикальные микротрубочки. Масштабная линейка — 20 мкм.

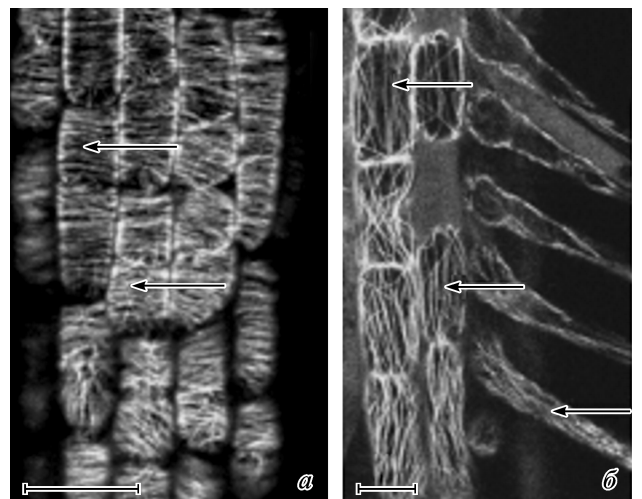
организацию микротрубочек в клетках растений сходным с действием трифлюоперазина образом, вызывая изменение исходной ориентации микротрубочек (поперечной или косой) в клетках зоны растяжения и дифференциации на продольную. Полученные данные подтверждают участие Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ в регуляции структуры микротрубочек растительной клетки.

В ходе дальнейших экспериментов было обнаружено, что ингибирование протеинкиназы С также приводит к изменениям организации микротрубочек растительной клетки. Обработка корней ингибитором Н7 позволила выявить концентрационно-временную зависимость его влияния на организацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana*. Обработка проростков данным ингибитором в концентрации 10 мкМ в течение 3—12 ч не вызывала на-

рушений в ориентации микротрубочек во всех ростовых зонах корня. Увеличение же времени обработки до 24 ч приводило к незначительной дезориентации микротрубо-

Рис. 5. Организация микротрубочек в клетках корней *Arabidopsis thaliana* после обработки ингибитором W7 (10 мкМ) в течение 24 ч.

a — меристематическая зона; *б* — зона дифференциации, 24 ч. Стрелками указаны кортикальные микротрубочки. Масштабная линейка — 20 мкм.



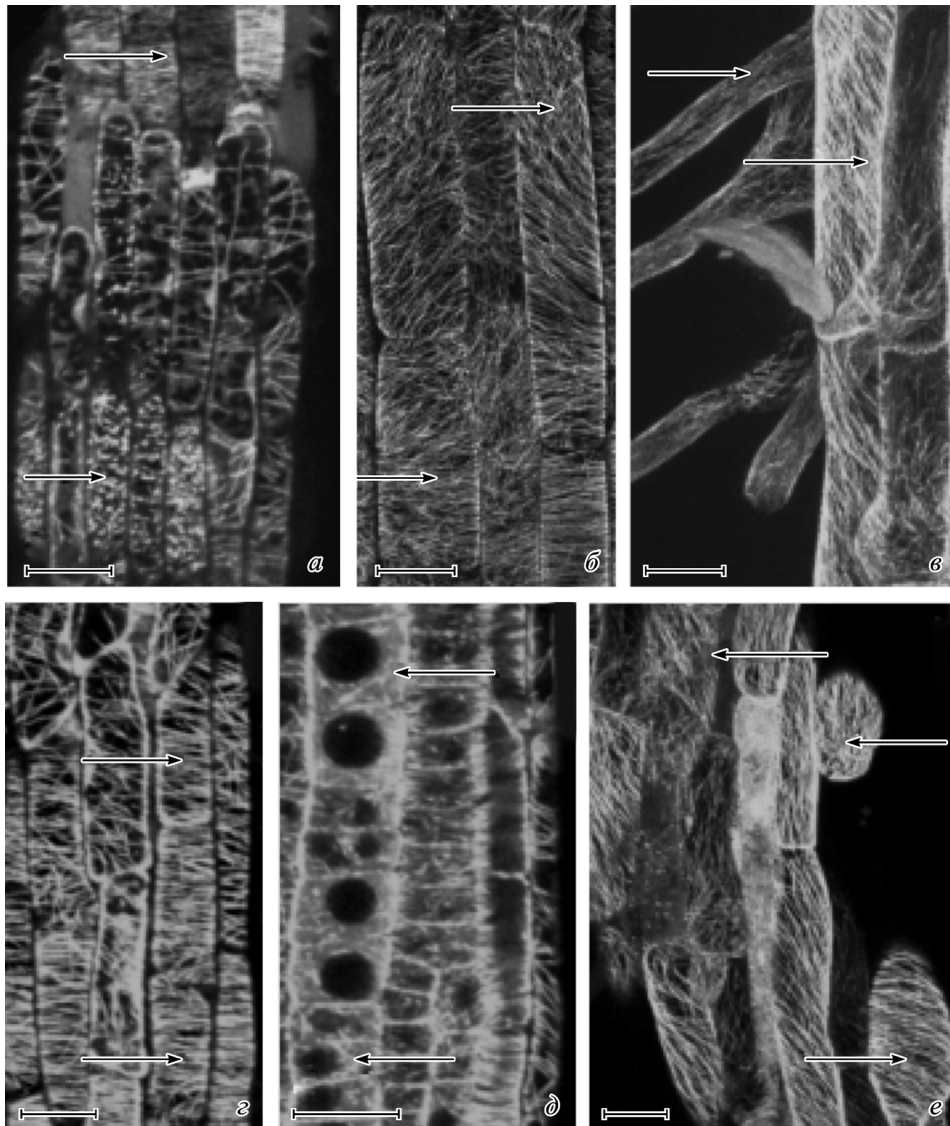


Рис. 6. Организация микротрубочек в клетках корней *Arabidopsis thaliana* после обработки ингибитором Н7.

a — меристематическая зона, 50 мкМ, 24 ч; *b* — зона растяжения, 50 мкМ, 24 ч; *c* — зона дифференциации, 50 мкМ, 24 ч; *d*, *e* — меристематическая зона, 100 мкМ, 24 ч; *e* — зона дифференциации, 100 мкМ, 24 ч. Стрелками указаны кортикальные микротрубочки. Масштабная линейка — 20 мкм.

чек в эпидермальных клетках переходной зоны корня, а также зоны растяжения корня по сравнению с контролем. Повышение концентрации Н7 до 50 мкМ вызвало дезориентацию кортикальных микротрубочек в клетках переходной зоны и зоны растяжения корня уже через 6 ч обработки проростков. После пролонгированного (24 ч) действия Н7 (50 мкМ) частично разрушенные микротрубочки были обнаружены в клетках корневого чехлика (рис. 6, *a*); в большинстве эпидермальных клеток зоны растяжения микротрубочки были дезориентированы (рис. 6, *b*). Однако следует отметить, что микротрубочки в меристематических клетках корня, а также трихобластах и атрихобластах зоны дифференциации корня характеризовались меньшей чувствительностью к данному ингибитору (рис. 6, *в*).

В случае же обработки проростков 100 мкМ Н7 дезориентацию кортикальных микротрубочек в эпидермальных клетках зоны растяжения корня можно было наблюдать уже через 3 ч экспозиции. В результате 24-часовой обработки ингибитором в данной концентрации в клетках

корневого чехлика микротрубочки были стабилизированы (рис. 6, *г*), кортикальные и эндоплазматические микротрубочки в меристематической зоне корня были практически полностью деполимеризованы (рис. 6, *д*), а в клетках зон растяжения и дифференциации кортикальные микротрубочки были утолщены. В отдельных эпидермальных клетках кортикальные микротрубочки были дезориентированы, вследствие чего они приобретали раздутую форму (рис. 6, *е*).

Стауроспорин в концентрации 10 нМ тоже вызывал нарушения в организации микротрубочек клеток корня, но только после 12-часового действия. Обнаружено, что наиболее чувствительными к данному типу ингибитора были микротрубочки клеток переходной зоны и зоны растяжения корня, где микротрубочки изменяли свою исходную поперечную ориентацию на хаотическую. После пролонгированного (24 ч) действия ингибитора в данной концентрации выявили деполимеризацию микротрубочек в отдельных клетках переходной зоны корня (рис. 7, *a*), а также дезориентацию микротрубочек клеток как зоны

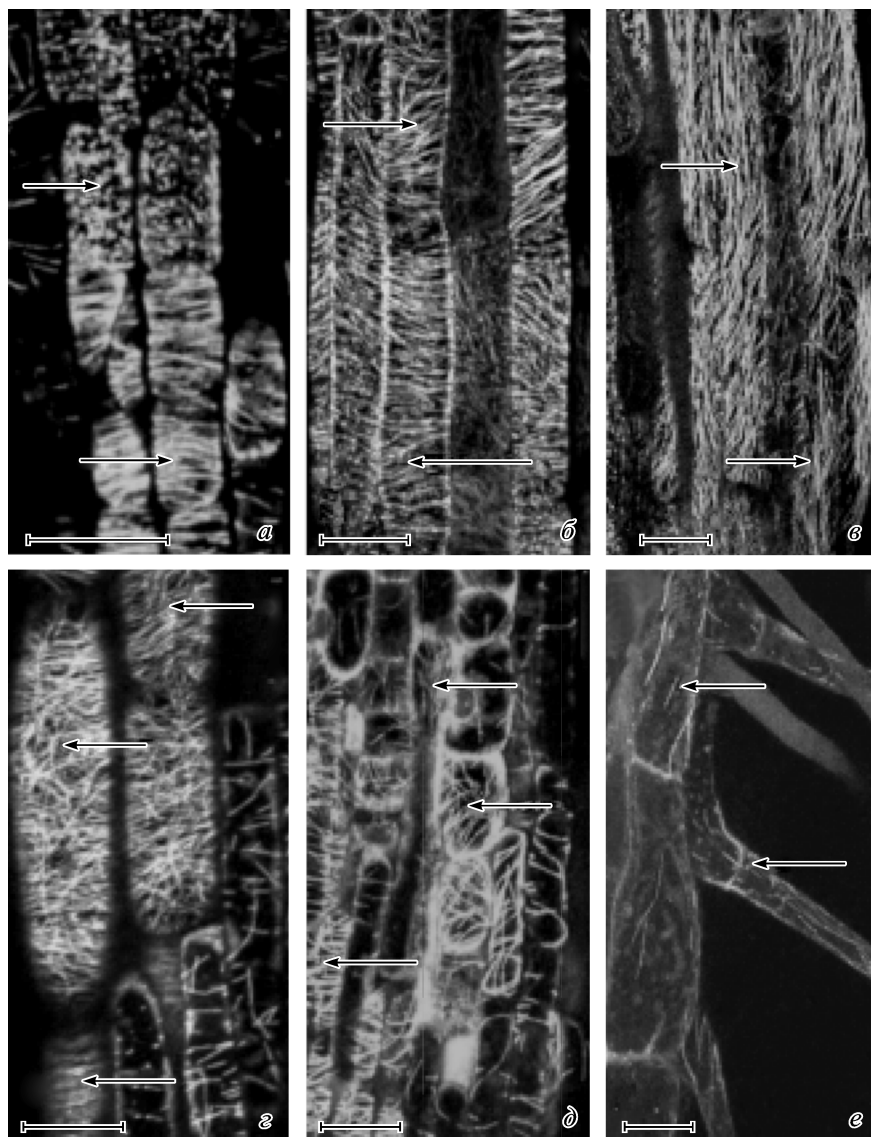


Рис. 7. Организация микротрубочек в клетках корней *Arabidopsis thaliana* после обработки стауроспорином.

a — переходная зона, 10 нМ, 24 ч; *б* — зона растяжения, 10 нМ, 24 ч; *в* — зона дифференциации, 10 нМ, 24 ч; *г* — зона растяжения, 50 нМ, 3 ч; *д* — меристематическая и переходная зоны, 50 нМ, 24 ч; *е* — зона дифференциации, 50 нМ, 24 ч. Стрелками указаны кортикальные микротрубочки. Масштабная линейка — 20 мкм.

растяжения (рис. 7, б), так и зоны дифференциации (рис. 7, в). Обработка проростков стауроспорином в более высокой концентрации (50 мкМ) уже через 3 ч приводила к изменениям исходной поперечной ориентации кортикальных микротрубочек в эпидермальных клетках зоны растяжения корня на хаотическую (рис. 7, г). Увеличение времени обработки проростков до 12—24 ч приводило к нарушению нативной организации микротрубочек в клетках всех ростовых зон корня. В клетках корневого чехлика микротрубочки были частично деполимеризованы, в клетках меристемы и клетках коры переходной зоны (рис. 7, д) и зоны растяжения сохранялись дезориентированные и утолщенные микротрубочки. В клетках как зоны растяжения, так и зоны дифференциации (рис. 7, е) визуализировались только отдельные тяжи утолщенных микротрубочек, поскольку большая часть микротрубочек в клетках данной ростовой зоны корня была деполимеризована.



















































Известно, что в эукариотических клетках протеинкиназа С выполняет незаменимую роль при работе сигналь-

ной системы с участием фосфорилирования белков (Stone, Walker, 1995). Протеинкиназа С экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих, ее субстратами в различных типах клеток служат ядерные белки, белки цитоскелета и ферменты (Nishizuka, 2003; Battaini, Mochly-Rosen, 2007). К настоящему времени аналоги протеинкиназы С найдены и охарактеризованы в клетках различных видов растений, таких как *Brassica campestris* (Nanmori et al., 1994), *Oryza sativa* (Karibe et al., 1995) и *Solanum tuberosum* (Subramaniam et al., 1997).

Ранее нами было показано, что полимиксин Б, специфический ингибитор протеинкиназы С, вызывает изменение исходной поперечной ориентации микротрубочек на продольную в клетках корневого апекса 3-суточных проростков *A. cepa* (Blume et al., 2008a). В настоящей работе нами впервые было изучено влияние других типов ингибиторов протеинкиназы С (Н7 и стауроспорина) на организацию микротрубочек в растительных клетках в условиях *in vivo*. При сравнении ориентации микротрубочек в кор-

Таблица 2

Схематическое изображение изменений в ориентации и организации кортикальных микротрубочек в клетках первичных корней *Arabidopsis thaliana* по отношению к основной оси корня после действия ингибиторов протеинкиназ

Ингибитор	Меристематическая зона			Переходная зона		Зона растяжения		Зона дифференциации		
	Корневой чехлик	Эпидермис	Меристема	Эпидермис	Кортекс	Эпидермис	Кортекс	Атрихобласты	Трихобласты	Корневые волоски
Контроль										
Оломоуцин										
W7										
H7										
Стауроспорин										

нях необработанных проростков и экспонированных в присутствии ингибиторов протеинкиназы С было обнаружено, что особенной чувствительностью к действию этих веществ в более низких концентрациях обладают микротрубочки переходной зоны и зоны растяжения корня, изменяющие исходную поперечную ориентацию на хаотическую. Увеличение концентрации и времени обработки ингибиторами приводит к стабилизации микротрубочек в клетках меристематической зоны корня, а также вызывает дезориентацию и частичную деполимеризацию микротрубочек в клетках зон растяжения и элонгации. Полученные нами результаты о влиянии стауроспорина на организацию микротрубочек в клетках *Arabidopsis* согласуются с данными более ранних работ (Baskin, Wilson, 1997), в которых было установлено, что стауроспорин в более высоких концентрациях (1 мкМ) вызывает дезорганизацию и рандомизацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana*. Причем большей чувствительностью к действию ингибитора в концентрации 1 мкМ обладали микротрубочки в клетках зон растяжения и дифференциации, тогда как микротрубочки в меристематической зоне корня обладали меньшей чувствительностью к действию стауроспорина (Baskin, Wilson, 1997).

Таким образом, в настоящей работе нами исследовано влияние различных специфических ингибиторов серин/треониновых протеинкиназ на организацию микротрубочек в разных типах клеток основных зон первичного корня *A. thaliana*. Данные обобщены в табл. 2.

Наибольшей чувствительностью к действию всех тестируемых типов протеинкиназ обладали микротрубочки в эпидермальных клетках, клетках коры переходной зоны и зоны растяжения корня, а также микротрубочки в трихобластах и атрихобластах зоны дифференциации. Следует отметить, что такую дифференциальную чувствительность микротрубочек в клетках разных зон корня к действию ингибиторов мы не связываем с разницей в степени их доступности к клеткам корня, поскольку эксперименты были проведены с разными временными интервалами — как короткими (1 ч), так и более длительными (48 ч), что является достаточным для абсолютно полного проникновения веществ во все исследуемые нами ткани и клетки.

Наблюдаемые изменения в ориентации микротрубочек в клетках корня согласуются с изменениями общей морфологии первичных корней. Обнаружено, что индукция формирования большего количества новых корневых волосков после обработки ингибиторами протеинкиназ также может быть следствием нарушения исходной ориентации микротрубочек в клетках ростовых зон корня. Известно, что рандомизация микротрубочек в клетках зоны дифференциации необходима для формирования новых корневых волосков (Takahashi et al., 2003). Также показано, что микротрубочки принимают участие в регуляции направления и стабильности их апикального роста (Sieberer et al., 2002). Следует отметить, что в самих корневых волосках обработка ингибиторами серин/треони-

новых протеинкиназ не вызвала существенных изменений в организации микротрубочек по сравнению с контролем. Поэтому анализ полученных данных позволяет предположить, что фосфорилирование белков микротрубочек, в том числе и тубулина, может принимать опосредованное участие в процессе индукции и формирования новых корневых волосков и не оказывать влияния на их дальнейший рост.

В свою очередь, согласно ранее полученным нами данным относительно влияния окадаинового кислоты на организацию микротрубочек в клетках корней *A. thaliana*, было установлено, что индукция гиперфосфорилирования белков за счет ингибирования протеинфосфатазы 1 и протеинфосфатазы 2А по-разному влияет на организацию микротрубочек в зависимости от типа клеток, вызывая либо деполимеризацию кортикальных микротрубочек в клетках зоны растяжения, либо стабилизацию микротрубочек в клетках зоны дифференциации (Шеремет и др., 2009). Особенной чувствительностью к действию окадаинового кислоты во всех тестируемых концентрациях обладали микротрубочки в клетках корневых волосков, которые изменяли свою исходную ориентацию по сравнению с контролем, вследствие чего корневые волоски претерпевали значительные изменения в общей морфологии: они загибались, ветвились, раздувались или вовсе прекращали свой рост.

Обобщая полученные данные, можно предположить, что изменение исходной ориентации микротрубочек в клетках зон растяжения и дифференциации корня вследствие ингибирования различных типов серин/треониновых протеинкиназ может являться причиной изменения скорости их роста, а также нарушения общей морфологии первичного корня и образования корневых волосков. При этом ингибирование серин/треониновых протеинфосфатаз оказывает противоположное влияние как на рост, общую морфологию первичного корня, так и на организацию микротрубочек в различных клетках всех ростовых зон корня (Шеремет и др., 2009). Следовательно, можно сделать вывод о том, что фосфорилирование белков микротрубочек, в том числе и тубулина, по остаткам серина и треонина вовлечено в регуляцию процессов элонгации корня, а также принимает участие в процессах индукции, формирования и роста корневых волосков. Это в свою очередь свидетельствует о том, что данный тип посттрансляционной модификации принимает участие в регуляции развития высших растений.

Список литературы

Емец А. И., Красиленко Ю. А., Шеремет Я. А., Блюм Я. Б. 2009. Реорганизация микротрубочек как ответ на реализацию сигнальных каскадов оксида азота (II) в растительной клетке. Цитология и генетика. 43 (2) : 3—10.

Карпов П. А., Надеждина Е. С., Емец А. И., Матусов В. Г., Ныторко А. Ю., Шашина Н. Ю., Блюм Я. Б. 2009. Биоинформационный поиск растительных протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток. Цитология и генетика. 43 (3) : 63—79.

Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высш. шк. 352 с.

Ожередов С. П., Ожередова И. П., Брицун В., Лозинский М. О., Емец А. И., Блюм Я. Б. 2009. Скрининг новых производных 2, 4- и 2, 6-динитроанилинов на фитотоксичность и антимитотическую активность. Цитология и генетика. 43 (5) : 3—13.

Шеремет Я. А., Емец А. И., Вербелен Ж.-П., Блюм Я. Б. 2009. Влияние окадаинового кислоты на морфологию корня

Arabidopsis thaliana и организацию микротрубочек в его клетках. Цитология и генетика. 43 (1) : 3—12.

Baskin T. I., Wilson J. E. 1997. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. Plant Physiol. 113 : 493—502.

Battaini F., Mochly-Rosen D. 2007. Happy birthday protein kinase C: past, present and future of a superfamily. Pharmacol. Res. 55 : 461—466.

Ben-Nissan G., Cui W., Kim D.-J., Yang Y., Yoo B.-C., Lee J.-Y. 2008. *Arabidopsis* casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules. Plant Physiol. 148 : 1897—1907.

Binarova P., Dolezel J., Draber P., Herberle-Bors E., Stnad M., Bogre L. 1998. Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. Plant J. 16 : 697—707.

Blume Ya. B., Lloyd C. W., Yemets A. I. 2008a. Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression. In: The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 145—159.

Blume Ya. B., Smertenko A., Ostapets N. N., Viklicky V., Draber P. 1997. Post-translational modifications of plant tubulin. Cell Biol. Int. 21 : 918—920.

Blume Ya., Yemets A., Sulimenko V., Sulimenko T., Chan J., Lloyd C., Draber P. 2008b. Evidence of tyrosine phosphorylation of plant tubulin. Planta. 229 : 143—150.

Bogre L., Zwerger K., Meskiene I., Binarova P., Csizmadia V., Planck., Wagner E., Hirt H., Hererle-Bors E. 1997. The cdc2Ms kinase is differentially regulated in the cytoplasm and in the nucleus. Plant Physiol. 113 : 841—852.

Chin D., Means A. 2000. Calmodulin, a prototypical calcium sensor. Trends. Cell Biol. 10 : 332—338.

Colosanti J., Cho S. O., Wick S., Sundaresan V. 1993. Localization of the functional p34cdc2 homologue of maize in root tip and stomata complex cells: association with predicted division sites. Plant J. 5 : 1101—1111.

Fang W.-P., Jiang C.-J., Yu M., Ye A.-H., Wang Z.-X. 2006. Differential expression of *Tua1*, a tubulin-encoding gene, during flowering of tea plant *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze using cDNA amplified fragment length polymorphism technique. Acta biochim. biophys. Sin. 38 : 653—662.

Fisher D., Gilroy S., Cyr R. 1996. Evidence for opposing effects of calmodulin on cortical microtubules. Plant Physiol. 112 : 1079—1087.

Fourrest-Lieuvain A., Peris L., Gache V., Garcia-Saez I., Juil-lan-Binard C., Lantéz V., Job D. 2006. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. Mol. Biol. Cell. 17 : 1041—1050.

Gerber I. B., Laukens K., Witters E., Dubery I. A. 2006. Lipopolysaccharide-responsive phosphoproteins in *Nicotiana tabacum* cells. Plant Physiol. Biochem. 44 : 369—379.

Glab N., Labidi B., Qin L.-X., Trehin C., Bergounioux C., Meijer L. 1994. Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/Cdk2 kinases activity, blocks plant cells at G₁ to S and G₂ to M cell cycle transitions. FEBS Lett. 353 : 207—211.

Hemerly A., Engler J. A., Bergounioux C., Van Montagu M., Engler G., Inze D., Ferreira P. 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. EMBO J. 14 : 3925—3936.

Hemsley R., McCutcheon S., Doonan J., Lloyd C. 2001. P34 (cdc2) kinase is associated with cortical microtubules from higher plant protoplasts. FEBS Lett. 508 : 157—161.

Joubes J., Chevalier C., Dudits D., Herberle-Bors E., Inze D., Umeda M., Renaudin J. 2000. CDK-related protein kinases in plants. Plant Mol. Biol. 43 : 607—620.

Karibe H., Komatsu S., Hirano H. 1995. A calcium- and phospholipid-dependent protein kinase from rice (*Oryza sativa*) leaves. Physiol. Plant. 95 : 127—133.

Mathur J., Chua N. H. 2000. Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. Plant Cell. 12 : 465—477.

- Meijer L. 1996. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* 6 : 393—397.
- Mészáros T., Miskolczi, Ayaydin F., Pettko-Szandtner A., Peres Z., Magyar Z., Horvath G. V., Bakó L., Fehér A., Dutis D. 2000. Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatase control G₂/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol. Biol.* 43 : 595—605.
- Mineyuki Y. 1999. The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 187 : 1—49.
- Mitrofanova I. V., Zilbervarg I. R., Yemets A. I., Mitrofanova O. V., Blume Ya. B. 2003. The effect of dinitroaniline and phosphorothioamide herbicides on polyploidization *in vitro* of *Nepeta* plants. *Cell Biol. Int.* 27 : 229—231.
- Nanmori T., Taguchi W., Kinugasa W., Oji Y., Sahara S., Fukami Y., Kikkawa U. 1994. Purification and characterization of protein kinase C from higher plant, *Brassica campestris* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 : 311—318.
- Nishizuka Y. 2003. Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue. *J. Biochem.* 133 : 155—158.
- Osawa M., Swindells M. B., Tanikawa J., Tanaka T., Mase T., Furuya T., Ikura M. 1998. Solution structure of calmodulin—W-7 complex: basis of diversity NMR in molecular recognition. *J. Mol. Biol.* 276 : 165—176.
- Park C. Y., Heo W. D., Yoo J. H., Lee J. H., Kim M. C., Chun H. J., Moon B. C., Kim I. H., Park H. C., Choi M. S., Ok H. M., Cheong M. S., Lee S. M., Kim H. S., Lee K. H., Lim C. O., Chung W. S., Cho M. J. 2004. Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms in dependent in NIM1, a key regulator of system acquired resistance. *Mol. Cells.* 18 : 207—213.
- Sathyanarayanan P., Poovaiah B. 2004. Decoding Ca²⁺ signals in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23 : 1—11.
- Sieberer B., Timmers A. C. J., Lhuissier F. G. P., Emons A. M. C. 2002. Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiol.* 130 : 977—988.
- Stone J., Walker C. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108 : 451—457.
- Subramaniam R., Després C., Brisson N. 1997. A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant J.* 9 : 653—664.
- Takahashi H., Kawahara A., Inoue Y. 2003. Randomization of cortical microtubules in root epidermal cells induces root hair initiation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol.* 44 : 350—359.
- Tirichine L., Imaizumi-Ankaru H., Yoshida S., Murakami Y., Madsen L. H. et al. 2006. Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature.* 441 : 694—701.
- Trewavas A., Mahlo R. 1998. Calcium signaling in plant cell: the big network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 : 428—433.
- Verbelen J.-P., De Cnodder T., Le J., Vissenberg K., Baluska F. 2006. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities. *Plant Signal. Behav.* 1 : 296—304.
- Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. 1994. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* 224 : 771—786.
- Wang H., Chevalier D., Larue C., Ki Cho S., Walker J. C. 2007. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Arabidopsis book*. Rockville, MD: Amer. Soc. of Plant Biologists. 1—38.
- Yemets A., Sheremet Y., Vissenberg K., Van Orden J., Verbelen J.-P., Blume Ya. B. 2008. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biol. Int.* 32 : 630—637.
- Yemets A. I., Stelmakh O. A., Blume Ya. B. 2005. Nocodazole provokes an apoptosis in isopropyl-N-phenyl carbamate resistant and sensitive *Nicotiana* lines but in two different ways. *BMC Plant Biol.* 5 (S37) : 1—5.

Поступила 9 VI 2009

THE EFFECT OF INHIBITORS OF SERINETHREONINE PROTEIN KINASES
ON *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOT MORPHOLOGY AND MICROTUBULES ORGANIZATION
IN ITS CELLS

Ya. A. Sheremet,^{1,*} A. I. Yemets,¹ K. Vissenberg,² J.-P. Verbelen,² Ya. B. Blume¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev,
and ² University of Antwerp, Belgium;

* e-mail: yarasheremet@gmail.com

The effect of different types of serine/threonine protein kinases inhibitors (cyclin-dependent, Ca²⁺-calmodulin-dependent and protein kinase C) on microtubules organization in cells of *Arabidopsis thaliana* main primary root zones were investigated *in vivo*. The microtubules in epidermal and cortex cells in the transition and elongation zones as well as microtubules in trichoblasts and atrichoblasts in the differentiation zone showed the greatest sensitivity to protein kinases inhibitors studied. It was established that microtubules in these cell types modified their initial transverse/oblique orientation to a chaotic or longitudinal relative to the major axis of primary root as a result of serinethreonine protein kinases inhibition. The microtubules in cells in root meristematic zone as well as in root hairs were less sensitive to influence of protein kinases inhibitors tested. Alterations of microtubules orientation in the cells in primary root zones under the influence of serinethreonine protein kinases inhibitors led to further disturbances in growth and differentiation processes. It was assumed that phosphorylation of microtubules proteins, especially tubulin, might be involved in the regulation of these processes.

Key words: microtubules, phosphorylation, serinethreonine protein kinases, inhibitors, *Arabidopsis*.