

## Оригинальные работы

УДК 576.311.348.7+544.475+581.43

Я.А. ШЕРЕМЕТ<sup>1</sup>, А.И. ЕМЕЦ<sup>1</sup>, А. АЗМИ<sup>2</sup>,  
К. ВИССЕНБЕРГ<sup>2</sup>, Ж.-П. ВЕРБЕЛЕН<sup>2</sup>,  
Я.Б. БЛЮМ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев  
E-mail: yarasheremet@gmail.com

<sup>2</sup> Университет Антверпена, отдел биологии роста и развития  
растений, Бельгия

### ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СЕРИН/ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ И ПРОТЕИНФОСФАТАЗ НА ПРОХОЖДЕНИЕ МИТОЗА КЛЕТКАМИ СИНХРОНИЗИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА ВУ-2



Для изучения участия разных типов серин/треониновых протеинкиназ и протеинфосфатаз в регуляции прохождения митоза растительной клеткой было исследовано влияние ингибиторов циклин-зависимых (оломоуцина),  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых (W7) протеинкиназ, протеинкиназы С (Н7 и стауроспорина) и ингибитора протеинфосфатаз (окадаиновой кислоты) на прохождение митоза клетками синхронизированной культуры табака ВУ-2. Установлено, что обработка культуры ВУ-2 ингибиторами циклин-зависимых протеинкиназ и протеинкиназы С приводила к запаздыванию вступления клеток в митоз, снижению значения митотического индекса, а также смещению пика митоза по сравнению с контролем. Ингибирование  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых протеинкиназ приводило к ускорению вступления клеток в профазу и задержке выхода их из митоза. В свою очередь ингибирование серин/треониновых протеинфосфатаз вызывало незначительное ускорение вступления синхронизированных клеток ВУ-2 во все фазы митоза.

© Я.А. ШЕРЕМЕТ, А.И. ЕМЕЦ, А. АЗМИ, К. ВИССЕНБЕРГ,  
Ж.-П. ВЕРБЕЛЕН, Я.Б. БЛЮМ, 2012

**Введение.** Прохождение клеточного цикла эукариотическими клетками является сложным и хорошо скоординированным процессом, который регулируется рядом факторов [1, 2]. Известно, что начало деления клетки и его скорость обусловлены в определенной мере процессами фосфорилирования/дефосфорилирования ряда белков [1–3]. Показано, что в клетках животных фосфорилирование тубулина, основного структурного элемента микротрубочек, может принимать участие в реорганизации микротрубочек, а также влиять на их организацию и динамические свойства во время митоза [4–6]. Установлено, что тубулин животного происхождения может фосфорилироваться с помощью различных циклонуклеотид-зависимых (цАМФ- и цГМФ-зависимых) протеинкиназ,  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ (в частности  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимыми и  $Ca^{2+}$ -зависимыми, фосфолипид-стимулированными киназами), казеинкиназ [4, 6, 7], циклин-зависимых [8], а также тирозинкиназ [4, 9, 10].

Ранее нами было показано, что растительный тубулин также может подвергаться фосфорилированию как по остаткам серина и треонина [11], так и по остаткам тирозина [12]. Обе субъединицы тубулина растений интенсивно фосфорилируются по остаткам серина и треонина вследствие активации протеинкиназы С,  $Ca^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых протеинкиназ [13]. Такое фосфорилирование по остаткам серина и треонина может принимать участие в реорганизации микротрубочек на протяжении митотического цикла [13]. Недавно обнаружено, что члены семейства казеинкиназ 1 (в частности казеин-1-подобная протеинкиназа 6) катализируют фосфорилирование  $\beta$ -тубулина растительной клетки по остаткам серина в положениях 413 и 420 [14]. Показано, что повышение уровня экспрессии казеин-1-подобной протеинкиназы 6 может нарушать организацию микротрубочек в интерфазных клетках, что в свою очередь приводит к изменению морфологии растительных клеток [14, 15]. Нами также установлено, что изменение организации микротрубочек в клетках главного корня *A. thaliana* вследствие ингибирования серин/треониновых протеинкиназ связано с соответствующими нарушениями роста и морфологии корня [16]. С помощью биоинформа-

ционного поиска нами найден ряд растительных гомологов протеинкиназ животного происхождения, которые могут принимать участие в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления растительной клетки [17, 18]. Тем не менее поиск специфических протеинкиназ растительного происхождения, непосредственно катализирующих фосфорилирование тубулина, и выяснение функциональной роли посттрансляционной модификации остается актуальным вопросом. Поэтому целью настоящего исследования было изучение возможного участия серин/треониновых протеинкиназ и протеинфосфатаз в регулировании прохождения митоза растительной клеткой.

**Материалы и методы.** В работе использовали суспензионную культуру табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2), экспрессирующую химерный белок GFP-MAP4 [19]. Культуру клеток поддерживали, используя метод [20] с внесенными модификациями. Клетки пересаживали каждую неделю (2,5 мл семидневной культуры) в 50 мл жидкой среды Мурасиге и Скуга (МС) [21], содержащей 4,4 г/л набора макро- и микросолей («Duchefa», Нидерланды), 30 г/л сахарозы («Duchefa», Нидерланды), 0,2 г/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) («Serva», Германия), 1 мг/л тиамин-гидрохлорида («Sigma», США), 10 мг/л мио-инозитола («Sigma», США), 0,2 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  («Merck», Германия), рН 5,8. Культуру выращивали в темноте при 28 °С на орбитальном шейкере при 130 об/мин. Синхронизацию культуры осуществляли в соответствии с методом [20]. Стационарную культуру пересаживали в соотношении 15:100 с добавлением 5 мг/л афидиколина («ICN Biochemicals», Бельгия) – специфического ингибитора ДНК-полимеразы  $\alpha$ . После 20 ч инкубации с афидиколином клетки тщательно отмывали в 5 л среды МС. Через 4 ч после отмывки от афидиколина (на границе перехода  $G_2/M$ ) культуру клеток обрабатывали ингибиторами в соответствующих концентрациях. Каждый опыт проводили в трех независимых повторах.

В качестве ингибитора циклин-зависимых протеинкиназ использовали оломоуцин («Sigma», США), который растворяли в 100%-ном этаноле в концентрации 5 мМ. Ингибитор

$\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин-зависимых протеинкиназ W7 («Sigma», США) растворяли в дистиллированной воде при 70 °С, концентрация маточного раствора составляла 100 мМ. Ингибитор протеинкиназы С ( $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы) стауроспорин («Sigma», США) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (10 мМ). Маточный раствор (50 мМ) другого ингибитора протеинкиназы С — Н7 («Sigma», США) также готовили на основе ДМСО. Ингибитор протеинфосфатаз 1 и 2А, оокадаиновую кислоту (10 мкМ) растворяли в ДМСО. Маточные растворы ингибиторов хранили при температуре –20 °С. В работе использовали 100 мкМ оломоуцин, 10 мкМ W7, 50 мкМ Н7, 50 мкМ стауроспорин и 10 нМ оокадаиновую кислоту. Клетки обрабатывали таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО в питательной среде с синхронизированными клетками ВУ-2 не превышала 0,5 % [22, 23].

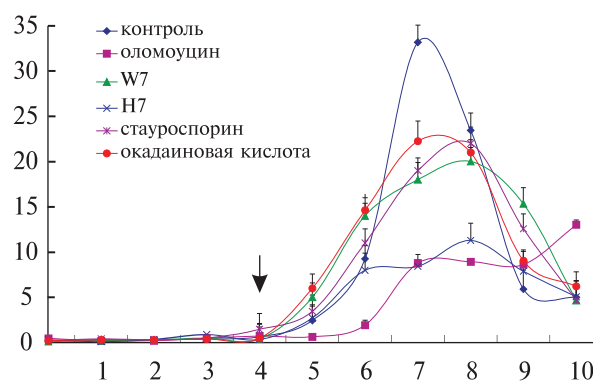
Для подсчета митотического индекса образцы клеток 0,5 мл суспензии на один образец отбирали с интервалом в 1 ч на протяжении всего эксперимента в течение 10 ч и фиксировали в растворе этилового спирта и уксусной кислоты (3:1). Клетки отмывали в фосфатном стабилизирующем буфере и окрашивали 4,6-диамино-фенилиндолом (DAPI) в концентрации 5 мг/л. Подсчеты проводили с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа («Nikon», Eclipse E-600, Нидерланды). Митотический индекс (%) рассчитывали как соотношение делящихся клеток к общему числу проанализированных клеток [24]. Отдельно подсчитывали процент клеток, находящихся в про-, мета-, ана- и телофазе, для чего определяли соотношение клеток в определенной фазе митоза к общему числу проанализированных клеток (интерфазных и митотических). Для каждого отобранного образца анализировали 1000 клеток. Все результаты были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В ходе проведенных экспериментов установлено, что обработка синхронизированной культуры клеток ВУ-2 ингибиторами как серин/треониновых протеинкиназ, так и ингибитором протеинфосфатаз приводила к изменениям в

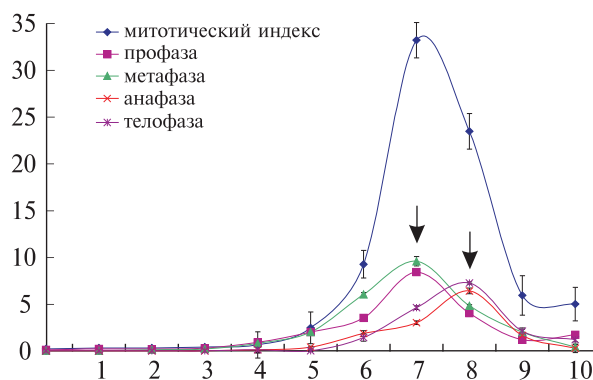
скорости прохождения митоза. Обнаружено, что после отмывки от афидиколина клетки синхронизированной суспензионной культуры ВУ-2, находящиеся в ранней S-фазе, продолжали продвигаться по клеточному циклу и уже через 4 ч вступали в митоз. В контрольном образце клетки достигали максимального значения митотического индекса через 7 ч после отмывки от афидиколина ( $33 \pm 1,8 \%$ ), а через 10 ч большая часть клеток выходила из митоза (рис. 1). Максимальное количество профазных и метафазных клеток наблюдалось через 7 ч после отмывки от афидиколина, а максимальное количество клеток в ана- и телофазе — через 8 ч (рис. 2).

Установлено, что в большинстве случаев обработка клеток синхронизированной культуры ВУ-2 ингибиторами серин/треониновых протеинкиназ приводила к задержке вступления клеток в митоз, снижению пролиферативной активности, а также к смещению митотического пика по сравнению с необработанной культурой. Обработка клеток табака ингибитором циклин-зависимых протеинкиназ, оломоуцином, приводила к запаздыванию на 3 ч вступления клеток в митоз по сравнению с контролем (рис. 1). Обнаружено, что лишь незначительное количество клеток вступало в профазу после 3 ч обработки оломоуцином в концентрации 100 мкМ (рис. 3). При этом максимальное значение митотического индекса было в три раза ниже ( $9 \pm 1,4 \%$ ) по сравнению с контролем (рис. 2).

Полученные нами данные хорошо соотносятся с ранее опубликованными результатами относительно влияния ингибитора циклин-зависимых протеинкиназ нахождение клеточного цикла в разных типах клеток высших растений [25, 26]. В этих работах было показано, что добавление оломоуцина в среду с синхронизированной культурой клеток ВУ-2 сразу после отмывки от афидиколина в значительной степени замедляет вступление клеток в митоз и приводит к снижению максимального значения митотического индекса в полтора раза по сравнению с контролем [26]. В ряде работ также показано, что специфические ингибиторы циклин-зависимых протеинкиназ, в том числе и оломоуцин, вызывают торможение при переходе из  $G_1$ - в S-фазу



**Рис. 1.** Влияние ингибиторов серин/треониновых протеинкиназ и ингибитора протеинфосфатаз на митотический индекс синхронизированной культуры ВУ-2. Ингибиторы (100 мкМ оломоуцин; 10 мкМ W7; 50 мкМ H7; 50 мкМ стауроспорин; 10 нМ окадаиновая кислота) были добавлены в среду с культурой клеток через 4 ч после отмывки от афидиколина (обозначено стрелкой). Необработанная культура клеток указана в качестве контроля. По вертикали — митотический индекс, %. На рис. 1–7 по горизонтали — время отмывки от афидиколина, ч



**Рис. 2.** Митотический индекс и процентное соотношение клеток в разных фазах митоза (по вертикали) в синхронизированной культуре ВУ-2. Пики клеток в про-, мета-, ана- и телофазе обозначены стрелками

и из  $G_2$ - в M-фазу клеточного цикла [25, 27]. Известно, что прохождение клеточного цикла эукариотическими клетками определяется последовательной активацией специфических циклин-зависимых протеинкиназ [1]. Установлено, что в растительной клетке циклин-зависимые протеинкиназы физически ассоциированы с митотическими и кортикальными микротрубочками [3, 28, 29]. Это, в свою

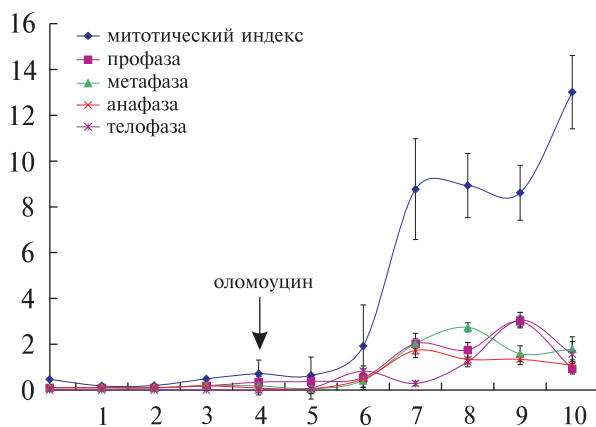


Рис. 3. Митотический индекс и процентное соотношение клеток в разных фазах митоза (по вертикали) в синхронизированной культуре ВУ-2 после обработки 100 мкМ оломоуцином

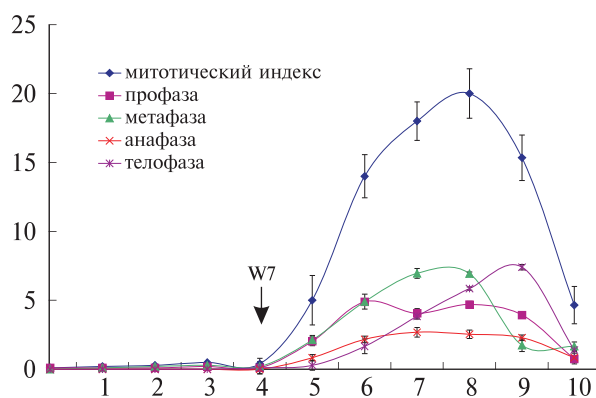


Рис. 4. Митотический индекс и процентное соотношение клеток в разных фазах митоза (по вертикали) в синхронизированной культуре ВУ-2 после обработки 10 мкМ W7

очередь, может свидетельствовать о том, что активность данного типа протеинкиназ может играть значительную роль в регуляции динамических свойств и стабильности микротрубочек [30].

Обработка суспензионной культуры клеток ВУ-2 ингибитором  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых протеинкиназ – W7 – также приводила к нарушениям прохождения митоза синхронизированными клетками по сравнению с контролем. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что после обработки клеток ВУ-2 этим веществом в концентрации 10 мкМ на протяжении 2 ч происходило их более ин-

тенсивное вступление в профазу по сравнению с контролем. Однако после обработки W7 в течение 3 ч количество клеток, вступивших в профазу, значительно уменьшалось (рис. 4), что и являлось причиной снижения максимального значения митотического индекса в 1,6 раза ( $20 \pm 1,8 \%$ ) и его задержки на 1 ч по сравнению с контролем (рис. 2). Необходимо отметить, что синхронизированные клетки ВУ-2 вследствие обработки W7 выходили из митоза на 1 ч позже. Полученные данные о влиянии ингибитора  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых протеинкиназ на прохождение митоза в клетках растений частично согласуются с результатами исследований, проведенных на животных клетках. В частности было показано, что применение разных типов ингибиторов  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых протеинкиназ, в том числе и W7, приводит к нарушению пролиферации клеток либо вызывает полную остановку их деления [31, 32]. По нашим данным обработка растительных клеток W7 не вызывала остановки митоза и, более того, приводила к ускорению вступления клеток в профазу.

После обработки клеток синхронизированной культуры ВУ-2 ингибиторами протеинкиназы С – стауроспорином и Н7 – также были выявлены нарушения в прохождении ими митоза. Обнаружено, что после 1 и 2 ч экспозиции культуры клеток ВУ-2 с Н7 в концентрации 50 мкМ клетки медленнее вступали в митоз (рис. 1), что, как выяснилось, было следствием их двухчасового запаздывания при вступлении в профазу (рис. 5). В присутствии Н7 митотический пик синхронизированной культуры клеток смещался по отношению к контролю на 1 ч, а общее число клеток, вступивших в митоз, было почти в три раза меньше.

Обработка синхронизированных клеток с помощью стауроспорина в концентрации 50 нМ приводила к запаздыванию их вступления в профазу на 1 ч (рис. 6), что, в свою очередь, проявлялось в смещении пика митоза на 1 ч по сравнению с контролем (рис. 1). Однако общее количество клеток, вступивших в митоз после действия стауроспорина, было в два раза больше, чем количество клеток, вступивших в митоз после обработки Н7.

Известно, что в эукариотических клетках протеинкиназа С принимает участие в регулировании многих важных процессов, таких как деление клетки, определение полярности клетки и апоптоз [33, 34]. В ряде работ на животных клетках показано, что протеинкиназа С влияет на прохождение клеточного цикла, в частности, участвует в организации митотических и мейотических построений микротрубочек. Установлено, что протеинкиназа С принимает участие в регуляции организации и стабильности микротрубочек веретена деления в мейотических клетках животных [35, 36], а также играет определенную роль в регуляции микротрубочково-кинетохорного взаимодействия веретена деления и, соответственно, расхождении хромосом в митотических клетках [37].

Полученные нами данные относительно влияния стауроспорина на прохождение митоза клетками ВУ-2 суспензионной культуры соответствуют результатам более ранних работ [38, 39], в которых было показано, что этот ингибитор в концентрации 20 мкМ вызывает запаздывание вступления клеток синхронизированной культуры ВУ-2 в митоз. Установлено, что нарушение прохождения митоза клетками ВУ-2, обработанными стауроспорином, осуществляется за счет снижения скорости формирования препрофазной ленты [38]. В другом исследовании на меристематических клетках корневого апекса лука (*Allium cepa*) было выявлено, что стауроспорин в концентрациях 2 и 60 мкМ приводит к нарушению формирования препрофазной ленты [39]. При изучении главных корней *A. thaliana* показано, что обработка проростков стауроспорином вызывает значительные изменения в организации микротрубочек, а также приводит к уменьшению количества митозов в меристематических клетках корня [16]. Следовательно, можно предположить, что ингибирование протеинкиназы С в синхронизированных клетках суспензионной культуры ВУ-2 с помощью стауроспорина и Н7 приводит к задержке их вхождения в митоз за счет нарушения организации и/или динамики микротрубочек при формировании препрофазной ленты.

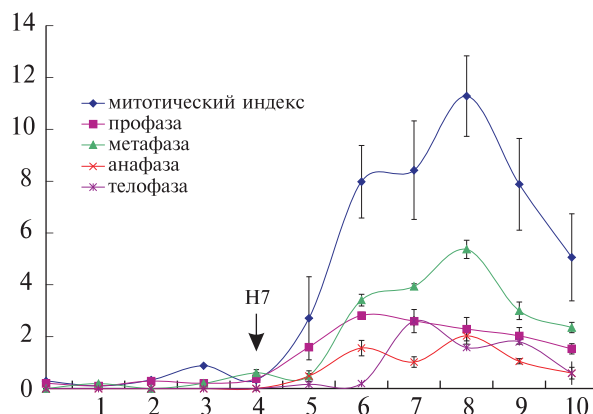


Рис. 5. Митотический индекс и процентное соотношение клеток в разных фазах митоза (по вертикали) в синхронизированной культуре ВУ-2 после обработки 50 мкМ Н7

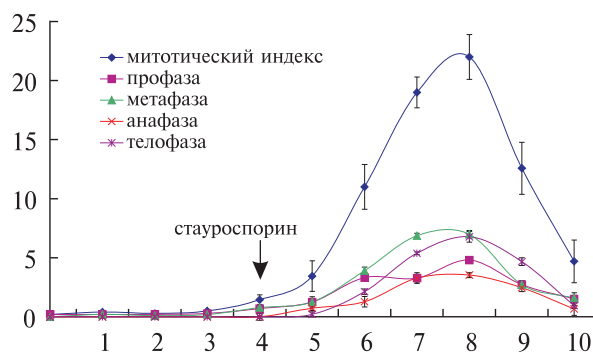


Рис. 6. Митотический индекс и процентное соотношение клеток в разных фазах митоза (по вертикали) в синхронизированной культуре ВУ-2 после обработки 50 нМ стауроспорином

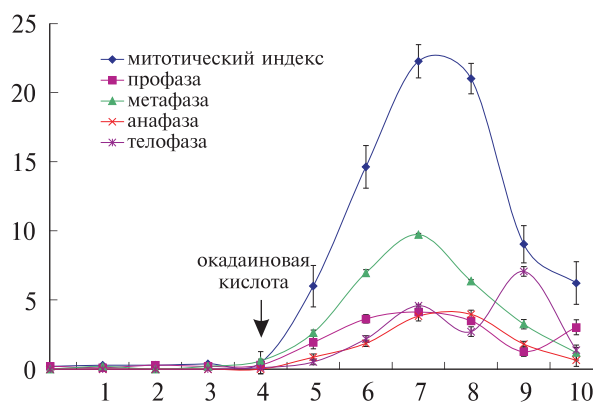


Рис. 7. Митотический индекс и процентное соотношение клеток в разных фазах митоза (по вертикали) в синхронизированной культуре ВУ-2 после обработки 10 нМ окадаиновой кислотой

Кроме того, нами исследовано влияние оокадаиновой кислоты — ингибитора серин/треониновых протеинфосфатаз — на прохождение митоза синхронизированными клетками ВУ-2. Обнаружено, что в отличие от действия ингибиторов протеинкиназы С и циклин-зависимых протеинкиназ кратковременная обработка клеточной культуры табака 10 нМ оокадаиновой кислотой приводила к незначительному ускорению вступления клеток в митоз (рис. 1). Показано, что через 2 ч экспозиции клеток ВУ-2 с использованным ингибитором они интенсивнее вступали во все фазы митоза (рис. 7) по сравнению с контролем (рис. 2). Однако после более длительной обработки культуры ВУ-2 оокадаиновой кислотой количество митотических клеток было меньшим, что и явилось следствием снижения значения митотического индекса до  $22 \pm 1,2$  %. Установлено также, что обработанные оокадаиновой кислотой клетки задерживались при переходе из мета- в анафазу и медленнее выходили из митоза (рис. 7).

Полученные нами данные подтверждают результаты исследований с использованием синхронизированных клеток *Vicia faba*, продемонстрировавших, что обработка проростков оокадаиновой кислотой в концентрации 1 мкМ на разных фазах клеточного цикла приводит к ускорению прохождения S-фазы и вступления клеток в митоз, однако замедляет переход из метафазы в анафазу [41]. Обнаружено, что ингибирование протеинфосфатаз в растительных клетках может приводить к нарушениям в прохождении клеточного цикла за счет изменений в организации митотических микротрубочек, а также нарушений при образовании фрагмента [41, 42]. Однако следует отметить, что полученные нами данные относительно влияния 10 нМ оокадаиновой кислоты на прохождение митоза клетками синхронизированной культуры ВУ-2 несколько отличаются от результатов других работ, где показано, что обработка клеток табака оокадаиновой кислотой в микромолярных концентрациях (1 и 12 мкМ) приводила к торможению клеточного цикла на разных фазах митоза [43, 44]. Такие отличия относительно влия-

ния этого ингибитора на прохождение митоза можно объяснить за счет разницы в его используемых концентрациях. В наших экспериментах была использована оокадаиновая кислота в концентрации 10 нМ, что позволяет исследовать специфические эффекты этого вещества в растительной клетке [45]. Недавно с помощью методов структурного моделирования и молекулярного докинга нами были изучены молекулярные механизмы взаимодействия оокадаиновой кислоты с протеинфосфатазами растений и проведен сравнительный анализ сайтов ее связывания на поверхности молекул протеинфосфатаз животных и растений [45]. Установлено, что оокадаиновая кислота имеет более высокое сродство к протеинфосфатазе 2А, чем к протеинфосфатазе 1 [45], что подтверждает селективную активность этого ингибитора как в растительных, так и животных клетках [46, 47]. Нами также обнаружено, что обработка проростков *Arabidopsis* разными концентрациями оокадаиновой кислоты приводила к значительным изменениям ориентации кортикальных микротрубочек клеток различных зон главного корня *A. thaliana* [48]. Анализируя полученные нами и другими авторами результаты, можно предположить, что ингибирование протеинфосфатаз растительной клетки ускоряет процесс вхождения клеток в митоз также за счет изменения динамических свойств микротрубочек. Такой вывод согласуется с результатами, полученными на животных клетках, где было показано, что оокадаиновая кислота может стимулировать процесс тремиллинга микротрубочек в клетке и значительно увеличивать скорость их элонгации *in vitro* [49, 50].

Таким образом, использование ингибиторов таких серин/треониновых протеинкиназ, как циклин-зависимые протеинкиназы (оломуцин),  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимые протеинкиназы (W7) и протеинкиназы С (H7 и стауроспорин), а также ингибитора протеинфосфатаз (оокадаиновая кислота) на прохождение митоза клетками синхронизированной суспензионной культуры табака ВУ-2 позволило установить, что ингибирование циклин-зависимых протеинкиназ и

протеинкиназы С приводит к замедлению вступления клеток синхронизированной культуры табака BY-2 в профазу, тогда как ингибирование  $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимой протеинкиназы вызывало ускорение вступления клеток BY-2 в профазу и задержку выхода клеток из митоза по сравнению с контролем. В свою очередь ингибирование серин/треониновых протеинфосфатаз вызывает незначительное ускорение вступления синхронизированных клеток во все фазы митоза. Базируясь на полученных данных, можно заключить, что ингибирование серин/треониновых протеинкиназ и протеинфосфатаз в растительной клетке приводит к нарушениям перехода клеток из  $G_2$  в М фазу клеточного цикла, которые, в свою очередь, могут быть следствием изменения организации и динамики микротрубочек.

*Работа выполнена при поддержке грантов Research Foundation – Flanders (FWO), Университет Антверпена, и INTAS 03-51-6459.*

*Ya.A. Sheremet, A.I. Yemets,  
A. Azmi, K. Vissenberg,  
J.-P. Verbelen, Ya.B. Blume*

EFFECT OF INHIBITORS SERINE/THREONINE  
PROTEIN KINASES AND PROTEIN  
PHOSPHATASES ON MITOSIS  
PROGRESSION OF SYNCHRONIZED  
TOBACCO BY-2 CELLS

In order to investigate the role of various serine/threonine protein kinases and protein phosphatases in the regulation of mitosis progression in plant cells the influence of cyclin-dependent (olomoucine) and  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent (W7) protein kinases inhibitors, as well as protein kinase C inhibitors (H7 and staurosporine) and protein phosphatases inhibitor (okadaic acid) on mitosis progression in synchronized tobacco BY-2 cells has been studied. It was found that BY-2 culture treatment with inhibitors of cyclin dependent protein kinases and protein kinase C causes prophase delay, reduces the mitotic index and displaces of mitotic peak as compare with control cells. Inhibition of  $Ca^{2+}$ -calmodulin dependent protein kinases enhances the cell entry into prophase and delays their exit from mitosis. Meanwhile inhibition of serine/threonine protein phosphatases insignificantly enhances of synchronized BY-2 cells entering into all phases of mitosis.

*Я.А. Шеремет, А.І. Ємець, А. Азмі, К. Віссенберг,  
Ж.-П. Вербелен, Я.Б. Блюм*

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ СЕРИН/ТРЕОНІНОВИХ  
ПРОТЕЇНКИНАЗ ТА ПРОТЕЇНФОСФАТАЗ  
НА ПРОХОДЖЕННЯ МІТОЗУ КЛІТИНАМИ  
СИНХРОНІЗОВАНОЇ КУЛЬТУРИ  
ТЮТЮНУ BY-2

Для з'ясування участі різних типів серин/треонінових протеїнкіназ та протеїнфосфатаз в регулюванні проходження мітозу рослинною клітиною було досліджено вплив інгібіторів циклін-залежних (оломоуцину),  $Ca^{2+}$ -кальмодулін-залежних (W7) протеїнкіназ і протеїнкінази С (H7 і стауроспорину) та інгібітора протеїнфосфатаз (окадаїнової кислоти) на проходження мітозу клітинами синхронізованої культури тютюну BY-2. Виявлено, що обробка культури BY-2 інгібіторами циклін-залежних протеїнкіназ і протеїнкінази С призводила до затримки вступу клітин в мітоз, зниження показника мітотичного індексу, а також зміщенню мітотичного піка у порівнянні із контролем. Інгібування  $Ca^{2+}$ -кальмодулін-залежних протеїнкіназ призводило до пришвидшення вступу клітин в профазу та затримки виходу їх з мітозу. Проте інгібування серин/треонінових протеїнфосфатаз викликало незначне прискорення вступу синхронізованих клітин BY-2 у всі фази мітозу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dewitte W., Murray J. The plant cell cycle // Annu. Rev. Plant Biol. – 2003. – **54**. – P. 235–264.
2. Morgan D.O. The cell cycle : Principles of control / Ed E. Lawrence. – London: New Sci. Press Ltd., 2007. – 297 p.
3. Mészáros T., Miskolczi P., Ayaydin F., Pettko-Szandtner A., Peres A., Magyar Z., Horváth G.V., Bakó L., Fehér A., Dudits D. Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatase control  $G_2/M$  progression in alfalfa cells // Plant Mol. Biol. – 2000. – **43**. – P. 595–605.
4. MacRae T.H. Tubulin post-translational modifications. Enzymes and their mechanisms of action // Eur. J. Biochem. – 1997. – **24**. – P. 265–278.
5. Westerman S., Weber K. Post-translational modifications regulate microtubules function // Nature Rev. Mol. Cell. Biol. – 2003. – **4**. – P. 938–947.
6. Abeyweera T., Chen X., Rotenberg S. Phosphorylation of 6-tubulin by protein kinase C activates motility of human breast cells // J. Biol. Chem. – 2009. – **284**, № 26. – P. 17648–17656.
7. Ludueña R.F. Multiple forms of tubulin: different

- gene products and covalent modifications // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – **178**. – P. 207–275.
8. *Fourest-Lieuvain A., Peris L., Gache V., Garcia-Saez I., Juillan-Binard C., Lantez V., Job D.* Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1 // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – **17**. – P. 1041–1050.
  9. *Kukharsky V., Sulimenko V., Macurek L., Sulimenko T., Dráberová E., Dráber P.* Complexes of gamma-tubulin with nonreceptor protein tyrosine kinases Src and Fyn in differentiating P19 embryonal carcinoma cells // *Exp. Cell Res.* – 2004. – **298**, № 1. – P. 218–228.
  10. *Sulimenko V., Dráberová E., Sulimenko T., Macurek L., Richterová V., Dráber P.* Regulation of microtubule formation in activated mast cells by complexes of gamma-tubulin with Fyn and Syk kinases // *J. Immunol.* – 2006. – **176**. – P. 7243–7253.
  11. *Blume Y.B., Smertenko A., Ostapets N., Viklicky V., Draber P.* Post-translational modifications of plant tubulin // *Cell. Biol. Int.* – 1997. – **21**. – P. 918–920.
  12. *Blume Y.B., Yemets A., Sulimenko V., Sulimenko T., Chan J., Lloyd C., Dráber P.* Tyrosine phosphorylation of tubulin in plant cells // *Planta*. – 2008. – **229**. – P. 143–150.
  13. *Blume Ya.B., Lloyd C.W., Yemets A.I.* Plant tubulin phosphorylation and its role in cell cycle progression // In: *The plant cytoskeleton: a key tool for agro-biotechnology* / Eds Ya.B. Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviario. – Dordrecht : Springer, 2008. – P. 145–159.
  14. *Ben-Nissan G., Cui W., Kim D.-J., Yang Y., Yoo B.-C., Lee J.-Y.* *Arabidopsis* casein kinase 1-like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules // *Plant Physiol.* – 2008. – **148**. – P. 1897–1907.
  15. *Lee J.Y.* Versatile casein kinase 1: multiple locations and functions // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – **4**, № 7. – P. 652–654.
  16. *Шеремет Я.А., Емец А.И., Виссенберг К., Вербелен Ж.-П., Блюм Я.Б.* Влияние ингибиторов серин/треониновых протеинкиназ на морфологию корня *Arabidopsis thaliana* и организацию микротрубочек в его клетках // *Цитология*. – **52**, № 5. – 2010. – С. 399–406.
  17. *Карпов П.А., Надеждина Е.С., Емец А.И., Матусов В.Г., Ныторко А.Ю., Шашина Н.Ю., Блюм Я.Б.* Биоинформационный поиск растительных протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании белков микротрубочек и регуляции деления клеток // *Цитология и генетика*. – 2009. – **43**, № 3. – P. 63–79.
  18. *Karpov P.A., Nadezhkina E.S., Yemets A.I., Matusev V.G., Nytorok A.Yu., Shashina N.Yu., Blume Ya.B.* Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases. // *BMC Genom.* – 2010. – **11**, № 1. – P. 1–14.
  19. *Granger C.L., Cyr R.J.* Spatiotemporal relationships between growth and microtubule orientation as revealed in living root cells of *A. thaliana* transformed with green-fluorescent-protein gene construct GFP-MBD // *Protoplasma*. – 2001. – **216**. – P. 201–214.
  20. *Nagata T., Nemoto Y., Hasegawa S.* Tobacco BY-2 cell line as the *HeLa* in the cell biology of higher plants // *Int. Rev. Cytol.* – 1992. – **132**. – P. 1–30.
  21. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – **15**. – P. 473–497.
  22. *Yemets A.I., Stelmakh O.A., Blume Ya. B.* Nocodazole provokes an apoptosis in isopropyl-N-phenyl carbamate resistant and sensitive *Nicotiana* lines but in two different ways // *BMC Plant Biol.* – 2005. – **5**, № 1. – S. 37.
  23. *Ожередов С.П., Ожередова И.П., Брицун В., Лоцинский М.О., Емец А.И., Блюм Я.Б.* Скрининг новых производных 2,4- и 2,6-динитроанилинов на фитотоксичность и антимитотическую активность // *Цитология и генетика*. – 2009. – **43**, № 5. – С. 3–13.
  24. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
  25. *Binarová P., Doležel J., Draber P., Herberle-Bors E., Strnad M., Bugre L.* Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation // *Plant J.* – 1998. – **16**. – P. 697–707.
  26. *Temmerman W., Ritsema T., Simyn-Mateo C., Van Montagu M., Mironov V., Inzé D., Goethals K., Holsters M.* The *fas* locus of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* affects mitosis of tobacco BY-2 cells // *FEBS Lett.* – 2001. – **492**. – P. 127–132.
  27. *Glab N., Labidi B., Qin L.-X., Trehin C., Bergounioux C., Meijerc L.* Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/Cdk2 kinases activity, blocks plant cells at G<sub>1</sub> to S and G<sub>2</sub> to M cell cycle transitions // *FEBS Lett.* – 1994. – **353**. – P. 207–211.
  28. *Bögge L., Zwerger K., Meskiene I.* The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and in the nucleus // *Plant Physiol.* – 1997. – **113**. – P. 841–852.
  29. *Mineyuki Y.* The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants // *Int. Rev. Cytol.* – 1999. – **187**. – P. 1–49.
  30. *Vantard M., Cowling R., Delichère C.* Cell cycle regulation of the microtubular cytoskeleton // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – **43**. – P. 691–703.
  31. *Hidaka H., Sasaki Y., Tanaka T., Endo T., Ohno S.,*



- Fujii Y., Nagata T. N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — **78**, № 7. — P. 4354–4357.
32. Osawa M., Swindells M.B., Tanikawa J., Tanaka T., Mase T., Furuya T., Ikura M. Solution structure of calmodulin-W-7 complex: basis of diversity NMR in molecular recognition // J. Mol. Biol. — 1998. — **276**. — P. 165–176.
33. Hirai T., Chida K. Protein kinase C $\xi$  (PKC $\xi$ ): activation mechanisms and cellular functions // J. Biochem. — 2003. — **133**. — P. 1–7.
34. Jenny M., Wrulich O., Schwaiger W., Ueberall F. Relevance of atypical protein kinase C isoforms to the drug discovery process // Chembiochem. — 2005. — **6**. — P. 491–499.
35. Baluch D., Koeneman B., Hatch K., McGaughey R., Capco D. PKC isoforms in post-activated and fertilized mouse eggs: association with the meiotic spindle // Dev. Biol. — 2004. — **274**. — P. 45–55.
36. Zheng Z.-Y., Li O.-Z., Chen D.-Y., Schatten H., Sun Q.-Y. Translocation of phosphoprotein kinase C  $\xi$  implies their roles in meiotic-spindle organization, polar-body emission and nuclear activity in mouse eggs // Reproduction. — 2005. — **129**. — P. 229–234.
37. Liu X., Xie X., Miki T. Inhibition of protein kinase C  $\xi$  blocks the attachment of stable microtubules to kinetochores leading to abnormal chromosome alignment // Cell. Signal. — 2006. — **18**. — P. 2314–2323.
38. Katsuta J., Shibaoka H. Inhibition by kinase inhibitors of the development and the disappearance of the preprophase band of microtubules in tobacco BY-2 cells // J. Cell Sci. — 1992. — **103**. — P. 397–405.
39. Nogami A., Mineyuki Y. Loosening of a preprophase band of microtubules in onion (*Allium cepa* L.) root tip cells by kinase inhibitors // Cell Struct. Funct. — 1999. — **24**. — P. 419–424.
40. Baskin T.I., Wilson J.E. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules // Plant Physiol. — 1997. — **113**. — P. 493–502.
41. Polit J., Kaźmierczak A. Okadaic acid (1  $\mu$ M) accelerates S phase and mitosis but inhibits heterochromatin replication and metaphase-anaphase transition in *Vicia faba* meristem cells // J. Exper. Bot. — 2007. — **58**, № 11. — P. 2785–2797.
42. Ayaydin F., Vissi E., Meszaros T. Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa // Plant J. — 2000. — **21**. — P. 3985–3995.
43. Hasezava S., Nagata T. Okadaic acid as a probe to analyse the cell cycle progression in plant cells // Bot. Acta. — 1992. — **105**. — P. 63–69.
44. Zhang K., Tsukitani Y., John P. Mitotic arrest in tobacco caused by the phosphoprotein phosphatase inhibitor okadaic acid // Plant Cell Physiol. — 1992. — **33**. — P. 677–688.
45. Самофалова Д.А., Карпов П.А., Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Реконструкция пространственной структуры комплексов растительных протеинфосфатаз типа 1 и 2А с окадаиновой кислотой // Цитология и генетика. — 2011. — **45**, № 3. — P. 26–34.
46. Smith R., Walker J. Plant protein phosphatases // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. — 1996. — **47**. — P. 101–125.
47. Titarenko R.E., Leon J., Berger S. Berger S., Vancanneyt G., Sánchez-Serrano J.J. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. — 1998. — **13**. — P. 153–165.
48. Шеремет Я.А., Емец А.И., Вербелен Ж.-П., Блюм Я.Б. Влияние окадаиновой кислоты на морфологию корня *Arabidopsis* и организацию микротрубочек в его клетках // Цитология и генетика. — 2009. — **43**, № 1. — С. 3–10.
49. Sheldon E., Wadsworth P. Stimulation of microtubule dynamic turnover in living cells treated with okadaic acid // Cell Motil. Cytoskeleton. — 1996. — **35**. — P. 24–34.
50. Howell B., Odde D.J., Cassimeris L. Kinase and phosphatase inhibitors cause rapid alterations in microtubule dynamic instability in living cells // Cell Motil. Cytoskeleton. — 1997. — **38**. — P. 201–214.

Поступила 15.09.11