

УДК 577.212:004

## **ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПРОТЕИНКИНАЗ СК1 В ОРГАНИЗАЦИИ КОРТИКАЛЬНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК КЛЕТОК КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA***

П.А. КАРПОВ <sup>1\*</sup>, Я.А. ШЕРЕМЕТ <sup>2</sup>, Я.Б. БЛЮМ <sup>3</sup>, А.И. ЕМЕЦ <sup>4</sup>

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Украина, 04123, Киев, ул. Осиповского, 2а

E-mail: karpov@nas.gov.ua <sup>1\*</sup>, yarasheremet@gmail.com <sup>2</sup>, blume.yaroslav@nas.gov.ua <sup>3</sup>, yemets.alla@gmail.com <sup>4</sup>

*Представители подсемейства Казеин киназа 1 (СК1) отличаются межвидовым консерватизмом и обширным набором субстратов фосфорилирования. Недавно появились доказательства того, что СК1 способны непосредственно фосфорилировать тубулин. Таким образом, СК1 вносят вклад в тубулиновый код и функциональную специализацию микротрубочек. В данной работе мы представляем результаты исследования ответной реакции тубулинового цитоскелета растений на обработку СК1-специфичным ингибитором D4476. Было показано, что D4476 оказывает сильный дозозависимый эффект на рост и морфологию корней *Arabidopsis thaliana*. Эксперименты на растениях, экспрессирующих химерный ген *gfp-тар4*, доказали взаимосвязь наблюдаемых морфологических реакций с пространственной реорганизацией микротрубочек вызванной избирательным ингибированием протеинкиназ СК1.*

**Ключевые слова:** казеин киназа 1, микротрубочки, фосфорилирование, ингибитор, D4476, *Arabidopsis*.

**Введение.** Представители группы протеинкиназ СК1 (семейство серин-треониновых казеинкиназ 1, подсемейство казеинкиназ 1/СК1) отличаются эволюционным консерватизмом и обширным набором белковых субстратов. Все известные протеинкиназы СК1 являются мономерами, несущими единственный киназный домен, специфичный к остаткам серина и треонина, а их экспрессия является облигатной и в большей или меньшей степени наблюдается во всех клетках организма [1]. Данные протеинкиназы занимают лидирующие позиции по числу целевых субстратов фосфорилирования и играют фундаменталь-

ную роль в самых разнообразных и зачастую, жизненно важных процессах эукариот [2]. Обнаружено, что протеинкиназы СК1 животных и грибов имеют непосредственное отношение к регуляции клеточного цикла, сегрегации хромосом, дифференциации и морфогенезу клетки, апоптозу, мембранному транспорту, регуляции циркадных ритмов и т.д. [3–9]. В частности, показано, что протеинкиназы СК1 млекопитающих колокализуются с цитоскелетом, влияют на динамику микротрубочек, а их субстратами являются такие белки, как тубулин и тау [9–14]. Так, протеинкиназа СК1α является одним из ферментов, участвующих в гиперфосфорилировании тау-белков, сопровождающего формирование телец спорадического миозита (sIBM) и болезни Альцгеймера [13]. Доказано, что протеинкиназа СК1δ животных способна избирательно взаимодействовать с микротрубочками, влияя на их динамику и регулируя аппарат веретена деления [15]. Одновременно, протеинкиназы СК1δ млекопитающих и дрожжей способны фосфорилировать EB1 (MAP1) [16, 17]. Во время митоза протеинкиназа СК1δ животных проявляет выраженную ассоциацию с митотическим веретеном деления, сетью аппарата Гольджи и ассоциированными с микротрубочками цитоплазматическими гранулярными частицами [18]. Экспериментально доказана ассоциация и субстратная специфичность протеинкиназы СК1δ мыши по отношению к α/β-тубулину, MAP1A, MAP4, тау-белку, статину и APC [16–22]. Установлено, что один из основных механизмов стабилизации микротрубочек жи-

© П.А. КАРПОВ, Я.А. ШЕРЕМЕТ, Я.Б. БЛЮМ, А.И. ЕМЕЦ, 2019

вотных реализуется через СК1δ-зависимое фосфорилирование ряда аминокислотных остатков α- и β-тубулина. [20, 23, 24]. Предполагается, что это может влиять на скорость оборота микротрубочек, и тем самым, влиять на сборку микротрубочек во время митоза [21]. Кроме того, есть основания полагать, что протеинкиназа СК1δ может выступать в качестве одного из ключевых факторов, обеспечивающих характерную для М-фазы перестройку сети микротрубочек [21].

В настоящее время в клетках млекопитающих идентифицировано семь изоформ протеинкиназы СК1 (СК1α, СК1β, СК1γ1, СК1γ2, СК1γ3, СК1δ и СК1ε), являющиеся отдельными генами, которые отличаются локализацией и уровнем экспрессии [25–27]. Все известные протеинкиназы СК1 несут консервативный каталитический домен в N-концевой части, а также, варибельный C-хвост, аминокислотный состав которого в значительной мере детерминирует субстратную специфичность разных изоформ [28–30].

В случае растений, очевиден тот факт, что группа растительных СК1-подобных (СК1-Like) протеинкиназ несомненно сложнее и больше чем у животных и грибов. Известно, что геном *Arabidopsis thaliana* кодирует, по меньшей мере, 14 генов СК1-like (СКЛ) протеинкиназ. Кроме того, их продукты отличаются внутриклеточной локализацией (цитоплазма, ядро, эндоплазматический ретикулум, везикулоподобные гранулированные структуры и т.д.) и экспрессией [27]. Общий план доменной организации и состава растительных протеинкиназ СКЛ аналогичен СК1 животных и дрожжей, а их каталитические домены сохраняют значительное сходство с животными и грибными СК1 [31, 32]. Последнее обосновывает применение ингибиторов, специфичных по отношению протеинкиназам СК1 животного и грибного происхождения, для исследования функции их растительных гомологов. Тем не менее, многие функции СК1-подобных протеинкиназ растений пока не изучены [33]. Известно, что растительные протеинкиназы СКЛ вовлечены в регуляцию метаболизма брассиностероидов [34], гиббереллиновый сигналинг, процессы регуляции онтогенеза [35] и межклеточной передачи сигналов

[36]. Было показано, что у *Arabidopsis* активность протеинкиназы СКЛ6 — наиболее вероятного функционального гомолога животной СК1δ, — связана с поздней фазой регуляции эндосомального компартмента, а также влияет на мембранный транспорт [37]. Как и протеинкиназа СК1δ, растительная СКЛ6 связана с кортикальными микротрубочками, а также фосфорилирует тубулин *in vitro* [38]. Опыты с применением доминантно-негативных мутантов и сверхэкспрессирующих линий, несущих нокаутную или эктопическую форму гена *СКЛ6*, показали, что фосфорилирование растительного тубулина протеинкиназой СКЛ6 может играть решающую роль в регуляции динамики микротрубочек в интерфазе [38]. Экспериментально доказано, что протеинкиназа СКЛ6 фосфорилирует растительный β-тубулин *in vitro* по остаткам Ser413 и Ser420. Кроме того, гиперэкспрессия СКЛ6 изменяет интерфазную организацию кортикальных микротрубочек. Это, несомненно, идентифицирует данную протеинкиназу как новый белок ассоциированный с микротрубочками [38, 39].

Тем не менее, многие функциональные аспекты СК1-зависимой регуляции микротрубочек растений пока не ясны. В настоящее время известно всего несколько сильных и одновременно селективных ингибиторов протеинкиназы СК1 животных [14, 40]. Одним из наиболее перспективных является D4476 (4-[4-(2,3-дигидро-бензо[1,4]диоксин-6-ил)-5-пиридин-2-ил-1Н-имидазол-2-ил]бензамид) [14, 41]. Результаты масштабного биохимического профилирования против панели протеинкиназ человека свидетельствуют о том, что D4476 в концентрации 10 мкМ ингибирует протеинкиназу СК1δ более чем на 90 %, и практически не влияет на активность других протеинкиназ [14, 41]. Было предположено, что D4476 аналогичным образом ингибирует активность всех изоформ протеинкиназы СК1 человека. Данное допущение основывалось на значительной идентичности последовательностей и сходном эффекте, оказываемом D4476 на протеинкиназу СК1 млекопитающих и *S. pombe*. [14] Однако данное предположение не является однозначным, поскольку другими авторами был подтвержден ингибирующий эффект D4476 по отношению к протеинкиназе

СК1ε человека при отсутствии такового в случае СК1γ1 (CSNK1G1) и СК1γ2 (CSNK1G2) [42]. Также ингибирующий эффект D4476 был доказан для протеинкиназы СК1α эритроцитов человека [43]. Таким образом, существуют определенные отличия ингибирующего действия D4476 на уровне изоформ киназы 1 человека, хотя на сегодняшний день по ингибирующей способности и избирательности действия, D4476 является одним из наиболее надежных агентов для прижизненного исследования роли протеинкиназ СК1.

Как уже упоминалось выше, существуют данные о том, что растительные киназы 1 способны фосфорилировать тубулин [38, 39], внося таким образом непосредственный вклад в функциональную специализацию микротрубочек [44]. Поэтому в настоящей работе нами была исследована ответная реакция микротрубочек в клетках корня *A. thaliana* на обработку растений ингибитором D4476. Представленные данные направлены на выявление связи между действием различных концентраций D4476, пространственной реорганизацией микротрубочек, и морфологических ответных реакций, вызванных избирательным ингибированием группы растительных СК1-подобных протеинкиназ.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись проростки *A. thaliana* (экотип Landsberg erecta (Ler)), экспрессирующие химерный белок GFP-MAP4 [45]. Проращивание семян и культивирование растений осуществлялось в асептических условиях согласно ранее описанному протоколу [46]. В физиологических экспериментах были использованы четырехдневные проростки.

Для изучения влияния ингибирования протеинкиназ СК1 на морфологию корней *A. thaliana*, а также организацию микротрубочек применяли ингибитор D4476 (CAS 301836-43-1; 4-[4-(2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-ил)-5-(2-пиридинил)-1Н-имидазол-2-ил]бензамид) («Sigma», США). Для приготовления stock-раствора (10 мМ) D4476 использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Приготовленный раствор хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а его разведение до рабочих концентраций выполняли непосредственно перед началом экспериментов. Для обработки растительного материала ис-

пользовали растворы, содержащие D4476 в концентрациях 0,1; 1; 10 и 50 мкМ. Корни обрабатывали согласно ранее разработанному протоколу [46]. Замеры длины первичного корня проростков осуществляли через 6, 24 и 48 ч с момента обработки ингибитором. Аналогичные концентрации D4476 и контрольные точки обработки соблюдались при исследовании ответа кортикальных микротрубочек на целевое подавление активности протеинкиназы СК1. Все морфометрические исследования сопровождались фотофиксацией, а эксперименты были выполнены минимум в трех повторностях.

Фотофиксацию растущих корней выполняли с использованием цифровой фотокамеры Canon Power Shot G6. Прирост длины корней измеряли непосредственно на фото-снимках с использованием программы ImageJ (версия 1.44) [47]. Оценку прироста корня осуществляли согласно ранее описанной методике [46], результаты измерений представлены в виде средних значений с учетом разброса показателя стандартной ошибки ( $M \pm m$ ).

Прижизненная визуализация микротрубочек достигалась за счет GFP-флуоресценции ассоциированного с микротрубочками химерного белка GFP-MAP4 [45]. GFP-меченые микротрубочки визуализировали в клетках апикальной меристемы, зоны элонгации и зоны созревания/дифференциации первичного корня проростков *A. thaliana* [48]. Для этих исследований использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия). При наблюдении и фотофиксации был использован иммерсионный объектив Zeiss 63× Plan-Apochromat NA 1.4. Возбуждение свечения GFP достигалось за счет применения аргонного лазера с длиной волны 488 нм.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для первоначальной оценки влияния СК1-специфичного ингибитора D4476 на развитие и морфологию первичного корня *A. thaliana*, был выполнен ряд экспериментов, направленных на выявление взаимосвязи ингибирования растительных СК1 и наличия специфического морфо-физиологического ответа. Исследования выполняли с использованием первичного корня проростков *A. thaliana*. Конт-

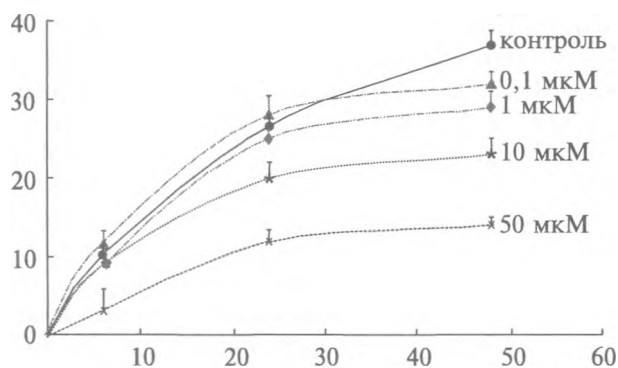


Рис. 1. Влияние D4476 на рост первичного корня *A. thaliana*; по вертикали — прирост длины первичного корня, %, по горизонтали — экспозиция D4476, ч

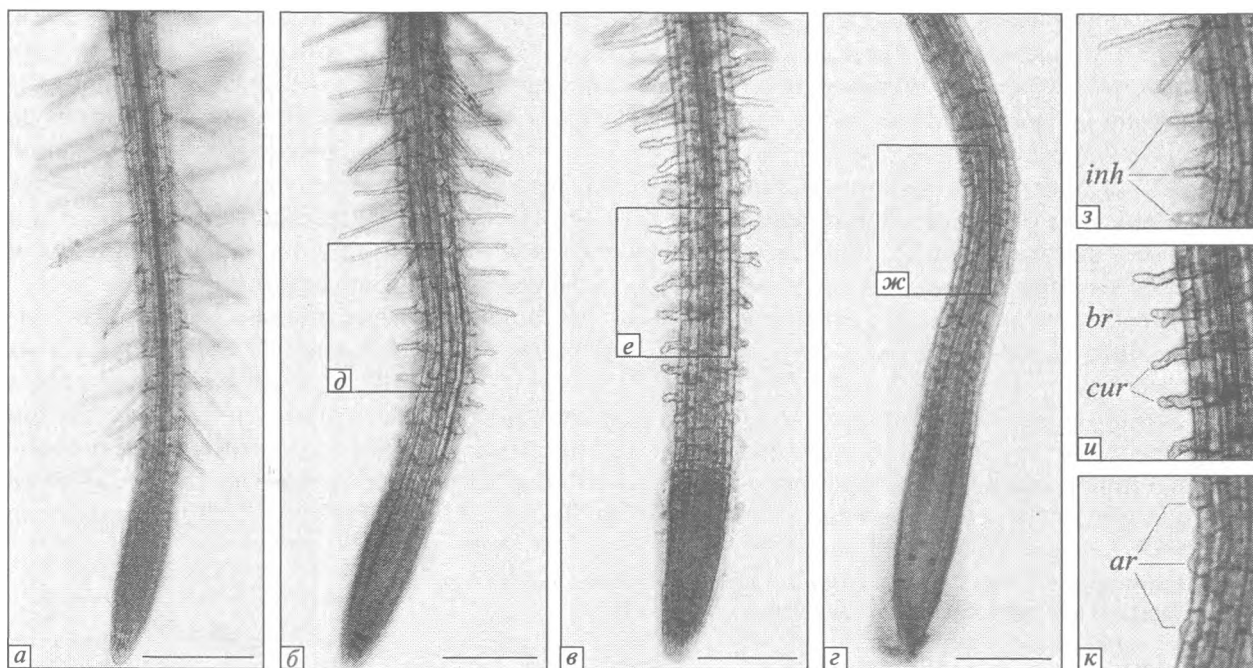
ролем служили проростки *A. thaliana*, не подвергавшиеся воздействию ингибитора. В результате применения различных концентраций (0,1; 1,0; 10 и 50 мкМ) D4476 и временных экспозиций (6, 24 и 48 ч) выявлен дозозависимый морфо-физиологический ответ. Таким образом, данный аспект действия D4476 на растения *A. thaliana* согласуется с ранее описанным эффектом на клетках животных [41, 49–51]. Кроме того, эти результаты можно рассматривать как косвенное доказательство консервативности протеинкиназ СК1 животного и растительного происхождения [31]. При этом рост первичных корней *A. thaliana*, обработанных 0,1 и 1 мкМ D4476 в течение 6 и 24 ч, практически не отличался от контроля. В то же самое время, применение более высоких концентраций D4476 (10 и 50 мкМ) приводило к угнетению роста первичного корня и через 24 ч данный показатель уступал контролю в 1,3 и 2,2 раза, соответственно (рис. 1). Кроме того, в случае 24-х часовой экспозиции наблюдали заметное снижение роста обработанных корней не зависимо от концентрации раствора ингибитора. Наблюдаемый эффект D4476 на ростовые процессы носил кумулятивный характер, что полностью согласуется с ранее описанными особенностями действия данного ингибитора [41, 52].

Помимо непосредственного влияния на рост корней обработка D4476 в различных концентрациях приводила к нарушению морфологии первичного корня. Наиболее замет-

ный морфологический ответ на воздействие D4476 наблюдался при формировании корневых волосков. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что рост первичного корня и морфология корневых волосков являются наиболее чувствительными к действию D4476. Наблюдавшийся морфо-физиологический ответ зависел от концентрации и экспозиции ингибитора (рис. 2), что подтверждает аналогичные данные, полученные ранее на примере *Leishmania* [53].

Так, обработка 0,1 мкМ D4476 в течение 24 ч не вызывало явных изменений общей морфологии корней проростков *A. thaliana*. Однако уже в концентрации 1 мкМ D4476 и аналогичной экспозиции (24 ч) наблюдалось появление первых признаков угнетения роста корневых волосков (рис. 2, б, з). Обработка 10 мкМ D4476 (24 ч) приводила к появлению заметных отклонений в морфологии трихобластов, формировавшихся в условиях данного эксперимента. Из наиболее выраженных морфологических ответов следует отметить склонность корневых волосков к формированию изгибов и ветвлению (рис. 2, в, и). Максимальная из использованных концентраций D4476 (50 мкМ) оказалась критичной для развития трихобластов. При данной концентрации, уже в первые часы обработки, наблюдалось полное угнетение роста и нарушение морфогенеза корневых волосков, хотя начальная специализация клеток эпидермиса присутствовала (рис. 2, г, к). Нами не было обнаружено изменений в таком показателе, как соотношение трихобластов и атрихобластов эпидермиса [54]. Это позволяет связывать наблюдавшуюся остановку развития трихобластов непосредственно со специфичным ингибированием протеинкиназы СК1.

Для подтверждения взаимосвязи наблюдавшихся морфо-физиологических изменений корня с перестройками микротрубочек было исследовано действие различных концентраций D4476 на их пространственную организацию. Изучение изменений в организации микротрубочек в клетках первичных корней проростков *A. thaliana* проводили с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Контролем в наших исследова-



**Рис. 2.** Морфология первичного корня *A. thaliana* после 24-х часовой обработки различными концентрациями D4476: *a* — контроль; *б, д* — ингибирование роста корневых волосков D4476 (1 мкМ) (*inh*); *в, и* — ингибирование роста первичного корня D4476 (10 мкМ) с одновременным закручиванием (*cur*) и ветвлением (*br*) корневых волосков; *г, к* — ингибирование роста первичного корня D4476 (50 мкМ) с остановкой роста корневых волосков (*ar*). Масштаб = 200 мкм

ниях служила организация микротрубочек в клетках различных типов зон корней *A. thaliana*, не подвергавшихся воздействию ингибитора и описанная нами ранее [55]. Дополнительно, особенности организации системы кортикальных микротрубочек в клетках контрольных растений, несущих GFP-MAP4 маркер, и использовавшихся в настоящих исследованиях, представлены на рис. 3, *a, b*. Результаты этих наблюдений полностью согласуются с ранее полученными данными [55].

Под влиянием D4476 в растениях *A. thaliana*, экспрессирующих химерный ген *gfp-map4*, наблюдалась четкая корреляция между ингибированием протеинкиназ СК1 и перестройками системы кортикальных микротрубочек. Как и в случае морфо-физиологического ответа, наиболее чувствительной моделью для исследования влияния D4476 оказалась сеть микротрубочек трихобластов и атрихобластов эпидермиса проростков в зоне дифференциации корня.

Обработка проростков *A. thaliana* D4476 в концентрации 0,1 мкМ не приводила к видимым изменениям организации микротрубочек в сравнении с клетками контрольных растений (таблица). Анализ проростков обработанных D4476 в концентрации 1 мкМ на протяжении 24 и 48 ч, выявил отдельные клетки зоны дифференциации корня, отличавшиеся значительной неупорядоченностью расположения микротрубочек (рис. 3, *в*). Кроме того, в отдельных клетках из различных зон корня проростков, обработанных D4476 (1 μM) в течение 48 ч, отмечена переориентация микротрубочек с поперечно-наклонной на продольную (рис. 3, *г*), что отчетливо видно при сравнении с клетками контрольных растений (рис. 3, *a*).

Обнаружено, что при 6-ти часовой обработке проростков 10 мкМ ингибитора отдельные клетки зоны дифференциации меняют упорядоченную наклонную ориентацию микротрубочек на хаотическую (рис. 3, *д*). Кроме того, последующее увеличение экспозиции ингибитора

до 24-х и 48-ми часов приводило к появлению аналогичных нарушений в клетках переходной зоны и зоны растяжения. Одновременно было обнаружено появление отдельных клеток зоны дифференциации, менявших ориентацию микротрубочек с поперечно-наклонной на хаотическую или продольную (таблица, рис. 3, е).

Для всех исследованных типов клеток корня *A. thaliana* дестабилизирующий эффект D4476 в концентрации 50 мкМ на систему микротрубочек был значительно более выраженным, чем в случае использования 1 и 10 мкМ D4476. Так, уже после 6-часовой обработки 50 мкМ D4476 микротрубочки трихобластов дестабилизировались и приобретали явную хаотическую ориентацию (рис. 3, ж). Под воздействием D4476

в данной концентрации микротрубочки клеток переходной зоны и зоны растяжения меняли поперечно-наклонную ориентацию на хаотическую. При увеличении времени воздействия до 24 и 48 ч клетки с хаотической или продольной ориентацией микротрубочек также появлялись в менее восприимчивых клетках эпидермиса и кортекса переходной зоны, зон растяжения и дифференциации первичного корня.

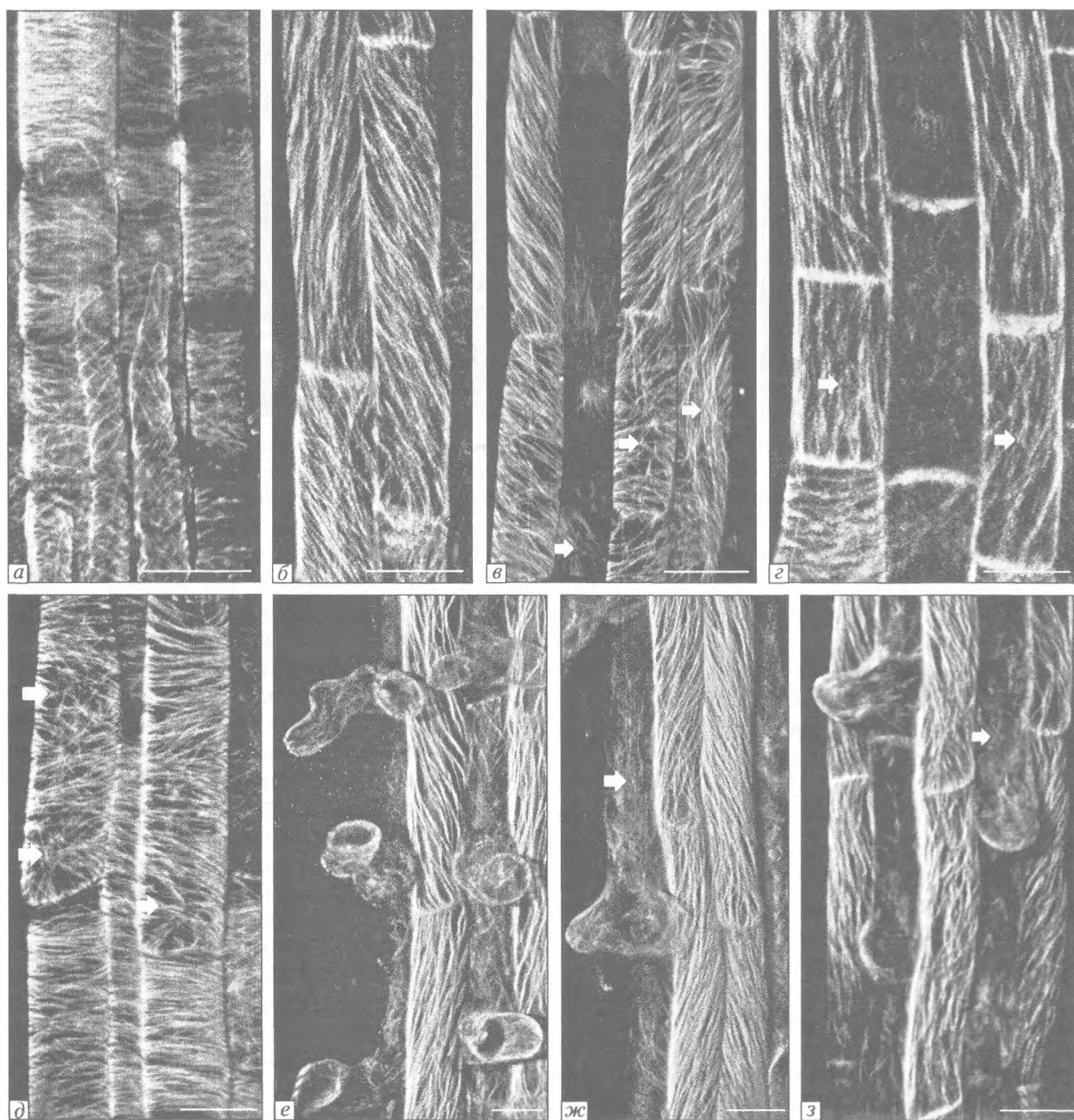
В таблице представлена обобщающая информация относительно эффектов, вызванных ингибитором D4476 при использовании его в различных концентрациях и при различной длительности обработки на организацию и ориентацию микротрубочек в клетках первичного корня *A. thaliana* (таблица). Представленные

**Ориентация кортикальных микротрубочек клеток первичного корня *A. thaliana* после обработки ингибитором протеинкиназы CK1 D4476**

| D4476             |               | Корневые аспекты |           |           | Зона перехода |         | Зона растяжения |         | Зона дифференциации |         |             |
|-------------------|---------------|------------------|-----------|-----------|---------------|---------|-----------------|---------|---------------------|---------|-------------|
| концентрация, мкМ | экспозиция, ч | корневой чехлик  | эпидермис | меристема | эпидермис     | кортекс | эпидермис       | кортекс | эпидермис           | кортекс | трихобласты |
| 0                 | —             |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
| 0,1               | 6             |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 24            |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 48            |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
| 1                 | 6             |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 24            |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 48            |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
| 10                | 6             |                  | ≡         | ≡         | ≡             | ≡       | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 24            |                  | ≡         | ≡         |               |         |                 |         |                     |         |             |
|                   | 48            |                  | ≡         | ≡         |               |         |                 |         |                     |         |             |
| 50                | 6             |                  | ≡         | ≡         | ///           | ///     | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 24            |                  | ≡         | ≡         | ///           | ///     | ///             | ///     | ///                 | ///     |             |
|                   | 48            |                  | ≡         | ≡         |               |         |                 |         |                     |         |             |

**Примечание:** схематические обозначения ориентации микротрубочек относительно главной оси первичного корня: — хаотическая; ≡ — поперечная; /// — наклонная; — хаотическая; ||| — продольная; — деполимеризованные микротрубочки.





**Рис. 3.** Организация кортикальных микротрубочек в клетках первичного корня контрольных (*а, б*) и обработанных ингибитором D4476 (*в–з*) проростков *A. thaliana* (линия, экспрессирующая *GFP-MAP4*): *а* – зона перехода/растяжения; *б* – зона дифференциации; *в* – зона дифференциации (обработка 1 мкМ D4476 в течение 24 ч) – легкая дезорганизация микротрубочек в отдельных клетках; *г* – зона растяжения (обработка 1 мкМ D4476 в течение 48 ч) – переориентация организации микротрубочек с поперечно-наклонного типа на продольный; *д* – зона дифференциации (обработка 10 мкМ D4476 в течение 6 ч) – дезориентация микротрубочек; *е* – зона дифференциации (обработка 10 мкМ D4476 в течение 24 ч) – хаотическая и продольная ориентация микротрубочек в отдельных клетках; *ж* – зона дифференциации (обработка 50 мкМ D4476 в течение 6 ч) – дезориентация микротрубочек в трихобластах; *з* – зона дифференциации (обработка 50 мкМ D4476 в течение 24 ч) – дезориентация микротрубочек в трихобластах, а также в клетках зоны элонгации. Масштаб = 20 мкм

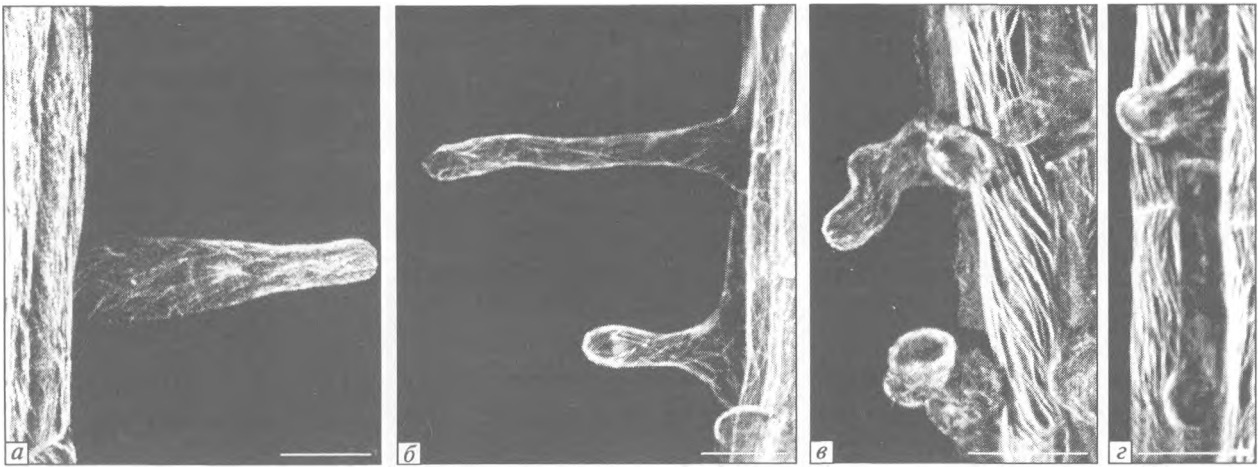


Рис. 4. Организация микротрубочек в трихобластах первичного корня проростков *A. thaliana* (линия, экспрессирующая *gfp-map4*) после воздействия ингибитора D4476 в течение 24 ч: а — контроль; б — 1 мкМ D4476; в — стабилизация микротрубочек; г — 50 мкМ D4476 — инициация деполимеризации микротрубочек

данные наглядно демонстрируют, что организация микротрубочек после обработки корней ингибитором кардинально отличается от контроля (таблица, рис. 3, з). Полученные данные позволяют утверждать, что микротрубочки трихобластов проявляет наибольшую чувствительность к действию всех концентраций данного специфического ингибитора протеинкиназ СК1 (рис. 4). Обработка проростков *A. thaliana* D4476 в концентрациях 1–10 мкМ вызывает явную дезориентацию и стабилизацию микротрубочек клеток корневых волосков (рис. 4, б, в), а увеличение концентрации до 50 мкМ приводит к частичной деполимеризации (рис. 4, г).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что специфический ингибитор протеинкиназ СК1 D4476 оказывает значительное влияние на морфологию и рост первичного корня проростков *A. thaliana*. Выраженное ингибирование роста корней было зафиксировано в случае всех проростков, обработанных 10 и 50 мкМ D4476. При этом визуально заметные отличия фиксировались для всех сроков обработки: 6, 24 и 48 ч. Результаты проведенных исследований подтверждают выраженную дозовую зависимость эффектов D4476. Это согласуется с аналогичными данными о воздействии D4476 на протеинкиназы СК1 линии опухолевых клеток человека RAS (HCT-116, T24, и NCI-H1299) и LSC (leukemia stem cells) [56, 57].

Полученные данные с использованием растений, экспрессирующих ассоциированный с микротрубочками химерный белок GFP-MAP4, подтверждают, что вызванное D4476 ингибирование протеинкиназ СК1 приводит к значительным перестройкам микротрубочек. Эти результаты позволяют утверждать, что ингибирование протеинкиназ СК1 приводит к изменению ориентации микротрубочек (от наклонной к хаотической или продольной) в клетках зоны дифференциации корня. Подтверждено, что переориентация микротрубочек также зависит от концентрации и времени воздействия ингибитора, а наиболее чувствительными к D4476 являются кортикальные микротрубочки трихобластов. Так, после обработки этим ингибитором микротрубочки корневых волосков дезориентируются, стабилизируются или полностью деполимеризуются. Все наблюдавшиеся перестройки микротрубочек четко коррелировали с соответствующими морфологическими изменениями корней, обработанными D4476.

Ранее было показано, что растительная протеинкиназа СК1-like 6 (CKL6) фосфорилирует  $\beta$ -тубулин, а нарушение ее экспрессии вызывает перестройки микротрубочек в клетках *A. thaliana* и увеличение общей гетерогенности клеток [38]. Как известно, система микротрубочки играют фундаментальную роль в управлении морфогенезом высших растений [58]. В



частности, микротрубочки принимают непосредственное участие в формировании корневых волосков и детерминируют их апикальный рост [59–62]. Кроме того, известно, что снижение экспрессии генов  $\alpha$ -тубулина вызывает ветвление корневых волосков трихобластов, а также аномальное формирование корневых волосков клетками тканей, для которых в норме это не свойственно [63]. Показано, что деполимеризация или стабилизация микротрубочек может нарушать полярность роста трихобластов. В свою очередь, такое изменение полярности и приводит к формированию множественных точек независимого роста в пределах одного корневого волоска [64]. Все вышесказанное, в совокупности с результатами нашего исследования позволяет предположить, что наблюдавшиеся изменения ориентации микротрубочек, а также сопутствующий морфо-физиологический ответ клеток трихобластов и атрихобластов самым прямым образом связаны с направленным ингибированием протеинкиназ СК1.

Разумеется, данные эффекты могут быть комплексными. Как известно, D4476 является АТФ-конкурентным ингибитором, и несмотря на достаточно высокую специфичность в отношении протеинкиназ СК1, его избирательность на уровне изоформ достаточно низкая [41]. Так, число изоформ протеинкиназы СК1 у растений выше, чем у млекопитающих и дрожжей. Результаты предварительного анализа информации представленной в GeneBank [65] и UniProtKB [66] позволили нам выявить не менее 18-ти протеинкиназ, относящихся к СК1 и СК1-подобным (СК1-Like) протеинкиназам. Согласно данным Бен-Ниссана и соавт. взаимодействие протеинкиназы СКL6 из *A. thaliana* с микротрубочкой происходит за счет домена, расположенного в С-концевой области, и данный участок молекулы не перекрывается с каталитическим (киназным) доменом [38]. Из этого следует, что окончательный ответ, на вопрос, какие из растительных СК1-подобных протеинкиназ, помимо СКL6, принимают участие в вышеописанных ответах на обработку D4476 может быть дан только на основании комплексного анализа лиганд-белкового взаимодействия, анализа С-концевых доменов и отбора изоформ этих

протеинкиназ, экспрессирующихся в тканях первичного корня. Тем не менее, уже сейчас можно утверждать, что растительные казеинкиназы I являются важными «агентами влияния» на структуру и динамику микротрубочек. Кроме того, протеинкиназы СК1 относятся к той малой группе протеинкиназ, которые способны непосредственно фосфорилировать молекулы тубулина.

**Соответствие этическим стандартам.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Это исследование не получало какого-либо конкретного гранта от финансирующих учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

#### ARABIDOPSIS ROOT MORPHOLOGY AND ITS CORRELATION WITH CORTICAL MICROTUBULE REARRANGEMENTS CAUSED BY SPECIFIC INHIBITION OF PROTEIN KINASES CK1

P.A. Karpov, Ya.A. Sheremet,  
Ya.B. Blume, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology  
and Genomics NAS of Ukraine,  
Ukraine 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A,

E-mail: karpov@nas.gov.ua, yarasheremet@gmail.com,  
blume.yaroslav@nas.gov.ua, yemets.alla@gmail.com

The members of the casein kinase I (CK1) subfamily are distinguished by strong interspecific conservatism and huge number of phosphorylation substrates. Recent data demonstrate evidence of direct CK1-dependent phosphorylation of tubulin. Consequently, CK1 protein kinases can contribute in the tubulin code and functional specialization of microtubules (MT). In this paper, we present new data on the plant tubulin cytoskeleton response provoked by treatment with D4476 — specific inhibitor of CK1. It was found that D4476 demonstrate a strong and dose-dependent effect on the growth and morphology of primary roots in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Subsequent experiments, on plants expressing a MT-associated fluorescent marker (GFP-Map4), have shown a pronounced correlation between morphological reactions and cortical rearrangements of microtubules caused by D4476-dependent inhibition of protein kinases CK1.

# ВПЛИВ ІНГІБУВАННЯ ПРОТЕЇНКІНАЗ СКІ НА МОРФОЛОГІЮ КОРЕНЯ І ПРОСТОРОВУ ОРГАНІЗАЦІЮ КОРТИКАЛЬНИХ МІКРОТРУБОЧОК В КЛІТИНАХ *ARABIDOPSIS THALIANA*

П.А. Карнов, Я.О. Шеремет, Я.Б. Блюм, А.І. Емец

Представники підродини Казеїн кіназа І (СКІ) відрізняються міжвидовим консерватизмом і значною кількістю субстратів фосфорилування. Нещодавно з'явилися докази того, що протеїнкінази СКІ здатні безпосередньо фосфорилувати тубулін. Таким чином, СКІ можуть вносити певний вклад в тубуліновий код і функціональну спеціалізацію мікротрубочок. В даній роботі представлено результати дослідження відповіді тубулінового цитоскелету рослин на дію СКІ-специфічного інгібітору D4476. Встановлено, що D4476 має потужний дозозалежний ефект на ріст і морфологію коріння *Arabidopsis thaliana*. Експерименти на рослинах, що експресують асоційований з мікротрубочками флуоресцентний GFP-маркер (GFP-MAP4), довели існування зв'язку виявлених морфологічних реакцій з просторовою реорганізацією мікротрубочок, що була викликана фактором селективного інгібування протеїнкіназ СКІ.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Gross, S.D., Anderson, R.A., Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family, *Cell Signal*, 1998, vol. 10, pp. 699–711.
- Schitteck, B., Sinnberg, T., Biological functions of casein kinase I isoforms and putative roles in tumorigenesis, *Mol Cancer*, 2014, vol. 13, no. 231, doi: 10.1186/1476-4598-13-231.
- Robinson, L.C., Menold, M.M., Garrett, S. and Culbertson, M.R., Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis, *Mol. Cell Biol*, 1993, vol. 13, pp. 2870–81.
- Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S. and Young, M.W. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I $\epsilon$ , *Cell*, 1998, vol. 94, pp. 97–107.
- Peters, J.M., McKay, R.M., McKay, J.P. and Graff, J.M., Casein kinase I transduces Wnt signals, *Nature*, 1999, vol. 401, pp. 345–50.
- Dhillon, N., Hoekstra, M.F., Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair, *EMBO J.*, 1994, vol. 13, pp. 2777–88.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K. and Robinson, L.C., Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase I deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex, *EMBO J.*, 1997, vol. 16, pp. 4194–204.
- Murakami, A., Kimura, K. and Nakano, A., The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 3804–10.
- Ikeda, K., Zhapparova, O., Brodsky, I., Semenova, I., Tirnauer, J.S., Zaliapin, I., and Rodionov, V., CKI activates minus-end-directed transport of membrane organelles along microtubules, *Mol. Biol. Cell*, 2011, vol. 22, pp. 1321–9.
- Schwab, C., DeMaggio, A.J., Ghoshal, N., Binder, L.I., Kuret, J., McGeer, and P.L., Casein kinase I delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases, *Neurobiol. Aging*, 2000, vol. 21, pp. 503–10.
- Flaherty, D.B., Soria, J.P., Tomasiewicz, H.G., and Wood, J.G., Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3 $\beta$  and cdk5 are key participants, *J. Neurosci. Res.*, 2000, vol. 62, pp. 463–72.
- Li, G., Yin, H., and Kuret, J., Casein kinase I $\delta$  phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules, *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, pp. 15938–45.
- Kannanayakal, T.J., Mendell, J.R., and Kuret, J., Casein kinase I alpha associates with the tau-bearing lesions of inclusion body myositis, *Neurosci. Lett.*, 2008, vol. 431, pp. 141–5.
- Perez, D.I., Gil, C., and Martinez, A., Protein kinases CKI and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases, *Med. Res. Rev.*, 2011, vol. 31, pp. 924–54.
- Wittau, M., Wolff, S., Xiao, Z., Henne-Bruns, D., and Knippschild, U., Die stressinduzierte Casein Kinase I delta kann die Spindeldynamik durch direkte Interaktion mit dem Mikrotubuli assoziierten Protein MAP1A beeinflussen. In: Rothmund M., Jauch KW., Bauer H. (eds) Chirurgisches Forum 2005. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, vol. 34, ch. 13, Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 37–9. doi: 10.1007/3-540-26560-0\_13.
- Zyss, D., Ebrahimi, H., and Gergely, F., Casein kinase I delta controls centrosome positioning during T cell activation, *J. Cell Biol.*, 2011, vol. 195, pp. 781–97.
- Wolff, S., Xiao, Z., Wittau, M., Süssner, N., Stutter, M., and Knippschild, U., Interaction of casein kinase I delta (CKI delta) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A), *Biochem. Biophys. Acta*, 2005, no. 1745, pp. 196–206.
- Kuret, J., Johnson, G.S., Cha, D., Christenson, E.R., DeMaggio, A.J., and Hoekstra, M.F., Casein kinase I is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain, *J. Neurochem.*, 1997, vol. 69, pp. 2506–15.

19. Singh, T.J., Grundke-Iqbal I., and Iqbal K., Phosphorylation of tau protein by casein kinase-I converts it to an abnormal Alzheimer-like state, *J. Neurochem.*, 1995, vol. 64, pp. 1420–3.
20. Behrend, L., Stöter, M., Kurth, M., Rutter, G., Heukeshoven, J., Deppert, W., and Knippschild, U., Interaction of casein kinase I delta (CKId) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus, *Eur. J. Cell Biol.*, 2000a, vol. 79, pp. 240–51.
21. Behrend, L., Milne, D.M., Stuter, M., Deppert, W., Campbell, L.E., Meek, D.W., and Knippschild, U., IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase I-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects, *Oncogene*, 2000b, vol. 19, pp. 5303–13.
22. Lühler, J., Hirner, H., Schmidt, B., Kramer, K., Fischer, D., Thal, D.R., Leithäuser, F., and Knippschild, U., Immunohistochemical characterisation of Cell-Type Specific Expression of CKIδ in Various Tissues of Young Adult BALB/c Mice, *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 1, e4174.
23. Aletta, J.M., Phosphorylation of type III beta-tubulin PC12 cell neurites during NGF-induced process outgrowth, *J. Neurobiol.*, 1996, vol. 31, pp. 461–75.
24. MacRae, T.H., Tubulin post-translational modifications enzymes and their mechanisms of action, *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 244, pp. 265–78.
25. Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., and Stöter, M., The casein kinase I family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes, *Cell Signal*, 2005, vol. 17, no. 6, pp. 675–89.
26. Alborno, A., Yáñez, J.M., Foerster, C., Aguirre, C., Pereiro, L., Burzio, V., Moraga, M., Reyes, A.E., and Antonelli, M., The CKI gene family: expression patterning in zebrafish development, *Biol. Res.*, 2007, vol. 40, pp. 251–66.
27. Lee, J.-Y., Versatile casein kinase I, *Plant Sign. Behav.*, 2009, vol. 4, pp. 652–4.
28. Graves, P.R., Haas, D.W., Hagerdon, C.H., De Paoli-Roach, A.A., and Roach, P.J., Molecular cloning, expression and characterization of a 49 kDa casein kinase I isoform from rat testis, *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, pp. 6394–401.
29. Graves, P.R., Roach, P.J., Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase Id, *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, pp. 21689–94.
30. Cegielska, A., Gietzen, K.F., Rivers, A., and Virshup, D.M., Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis, *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, pp. 1357–64.
31. Park, H.H., Casein kinase I-like protein linked to lipase in plant, *Plant Signal. Behav.*, 2012, vol. 7, no. 7, pp. 719–21.
32. Karpov, P.A., Nadezhkina, E.S., Yemets, A.I., and 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. Sci. Bulletin*, 2010, vol. 65, no. 4, pp. 213–6.
33. Wang, M., Yu, D., Guo, X., Cui, Y., Li, X., Zhang, J., Zhao, L., Chang, H., Hu, S., Zhang, C., Shi, J., and Liu, X., Casein kinase I-Like 3 is required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*, *African J. Biotech.*, 2011, vol. 10, no. 61, pp. 13219–29.
34. Liu, W., Xu, Z.H., Luo, D., and Xue, H.W., Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity, *Plant J.*, 2003, vol. 36, pp. 189–202.
35. Dai, C., and Xue, H.-W. Rice EARLY FLOWERING1, a CKI, Phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signaling, *EMBO J.*, 2010, vol. 29, pp. 1916–27.
36. Lee, J.Y., Taoka, K., Yoo, B.C., Ben-Nissan, G., Kim, D.J., and Lucas, W.J., Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins, *Plant Cell*, 2005, vol. 17, pp. 2817–31.
37. Ben-Nissan, G., Yang, Y., and Lee, J.Y., Partitioning of casein kinase I-like 6 to late endosome-like vesicles, *Protoplasma*, 2010, vol. 240, pp. 45–56.
38. Ben-Nissan, G., Cui, W., Kim, D.J., Yang, Y., Yoo, B.C., and Lee, J.Y., Arabidopsis Casein kinase I-Like 6 contains a microtubule-binding domain and affects the organization of cortical microtubules, *Plant Physiol.*, 2008, vol. 148, pp. 1897–907.
39. Li, H., Zeng, X., Liu, Z.Q., Meng, Q.T., Yuan, M., and Mao, T.L., Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer, *Plant Mol. Biol.*, 2009, vol. 69, no. 3, pp. 313–24.
40. Cozza, G., Gianoncelli, A., Montopoli, M., Caparrotta, L., Venerando, A., Meggio, F., Pinna, L.A., Zagotto, G., and Moro, S., Identification of novel protein kinase CKI delta (CKIdelta) inhibitors through structure-based virtual screening, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, vol. 18, pp. 5672–5.
41. Rena, G., Bain, J., Elliot, M., and Cohen, P., D4476, a cell-permeant inhibitor of CKI, suppresses the site-specific phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1a, *EMBO Rept.*, 2004, vol. 5, pp. 60–5.
42. Aud, D.E., Peng S.L.-Y., Methods of treating inflammatory diseases, 2008 (Jun.19, 2008); US 2008/0146617 A1.
43. Zelenak, C., Eberhard, M., Jilani, K., Qadri, S.M., Macek, B., and Lang, F., Protein kinase CKIα regulates erythrocyte survival, *Cell Physiol. Biochem.*, 2012, vol. 29, pp. 171–80.
44. Karpov, P.A., Nadezhkina, E.S., Yemets, A.I., Matusov, V.G., Nyporko, A.Y., Shashina, N.Y., and Blume, Y.B., Bioinformatic search of plant microtubule- and cell cycle related serine-threonine protein kinases, *BMC Genomics*, 2010b, vol. 11, S1, S14, doi: 10.1186/1471-2164-11-S1-S14.
45. Mathur, M., Chua, N.-H., Microtubule stabilization

- leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes, *Plant Cell*, 2000, vol. 12, pp. 465–77.
46. Yemets, A., Sheremet, Y., Vissenberg, K., Van Orden, J., Verbelen, J.-P., and Blume, Y.B., Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells, *Cell Biol. Int.*, 2008, vol. 32, pp. 630–7.
  47. Collins, T.J., ImageJ for microscopy, *Biotechniques*, 2007, vol. 43, suppl. 1, pp. 25–30.
  48. Barrada, A., Montañ, M.H., Robaglia, C., and Menand, B., Spatial regulation of root growth: placing the plant TOR pathway in a developmental perspective, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, no. 8, pp. 19671–97.
  49. Knippschild, U., Krüger, M., Richter, J., Xu, P., Garcia-Reyes, B., Peifer, C., Halekotte, J., Bakulev, V., and Bischof, J., The CK1 family: contribution to cellular stress response and its role in carcinogenesis, *Front. Oncol.*, 2014, vol. 4, no. 96. doi: 10.3389/fonc.2014.00096.
  50. Krüger, M., Kalbacher, H., Kastritis, P.L., Bischof, J., Barth, H., Henne-Bruns, D., Vorgias, C., Sarno, S., Pinna, L.A., and Knippschild, U., New potential peptide therapeutics perturbing CK1 $\delta$ / $\alpha$ -tubulin interaction, *Cancer Lett.*, 2016, vol. 375, no. 2, pp. 375–83.
  51. Carrino, M., Quotti Tubi, L., Fregnani, A., Canovas Nunes, S., Barila, G., Trentin, L., Zambello, R., Semenzato, G., Manni, S., and Piazza, F., Prosurvival autophagy is regulated by protein kinase CK1 alpha in multiple myeloma, *Cell Death Discov.*, 2019, vol. 5, no. 98. doi: 10.1038/s41420-019-0179-1.
  52. Manni, S., Carrino, M., Manzoni, M., Ganesin, K., Nunes, S.C., Costacurta, M., Tubi, L.Q., Macacca-ro, P., Taiana, E., Cabrelle, A., Barila, G., Martinez, A., Zambello, R., Bonaldi, L., Trentin, L., Neri, A., Semenzato, G., and Piazza, F., Inactivation of CK1 $\alpha$  in multiple myeloma empowers drug cytotoxicity by affecting AKT and  $\beta$ -catenin survival signaling pathways, *Oncotarget.*, 2017, vol. 8, no. 9, pp. 14604–19.
  53. Rachidi, N., Taly, J.F., Durieu, E., Leclercq, O., Aulner, N., Prina, E., Pescher, P., Notredame, C., Meijer, L., and Späth, G.F., Pharmacological assessment defines *Leishmania donovani* casein kinase I as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, no. 3, pp. 1501–15.
  54. Berger, F., Hung, C.-Y., Dolan, L., and Schiefelbein, J., Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*, *Developm. Biol.*, 1998, vol. 194, no. 2, pp. 235–45.
  55. Yemets, A., Krasnylenko, Y., Sheremet, Y., and Blume, Y., Nitric oxide donor and scavenger influence on *Arabidopsis thaliana* root development via cortical microtubules reorganization, *Acta Biol. Cracoviensia (Ser. Botanica)*, 2009, vol. 51, S.2, pp. 122.
  56. Jares, M., Miller, P.G., Chu, L.P., Puram, R.V., Fink, E.C., Schneider, R.K., Al-Shahrour, F., Peca, P., Breyfogle, L.J., Hartwell, K.A., McConkey, M.E., Cowley, G.S., Root, D.E., Kharas, M.G., Mullally, A., and Ebert, B.L., Csnk1a1 inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia, *J. Exp. Med.*, 2014, vol. 211, no. 4, pp. 605–12.
  57. Cheong, J.K., Zhang, F., Chua, P.J., Bay, B.H., Thorburn, A., and Virshup, D.M., Casein kinase 1 $\alpha$ -dependent feedback loop controls autophagy in RAS-driven cancers, *J. Clin. Invest.*, 2015, vol. 125, no. 4, pp. 1401–18.
  58. Lucas, J., Shaw, S.L., Cortical microtubule arrays in the *Arabidopsis* seedling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, vol. 11, pp. 94–8.
  59. Barlow, P.W., Baluska, F., Cytoskeletal perspectives on root growth and morphogenesis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 51, pp. 289–322.
  60. Takahashi, H., Hirota, K., Kawahara, A., Hayakawa, E., and Inoue, Y., Randomization of cortical microtubules in root epidermal cells induces root hair initiation in *Lettuce (Lactuca sativa L.)* seedlings, *Plant Cell Physiol.*, 2003, vol. 44, pp. 350–9.
  61. Van Bruaene, N., Joss, G., and van Oostveldt, P., Reorganization and in vivo dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development, *Plant Physiol.*, 2004, vol. 136, pp. 3905–919.
  62. Vassileva, V.N., Kouchi, H., and Ridge, R.W., Microtubule dynamics in living root hairs: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals, *Plant Cell*, 2005, vol. 17, pp. 1777–87.
  63. Bao, Y., Kost, B., and Chua, N.H., Reduced expression of alpha-tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism, *Plant J.*, 2001, vol. 28, pp. 145–57.
  64. Bibikova, T.N., Blancaflor, E.B., and Gilroy, S., Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, 1999, vol. 17, pp. 657–65.
  65. Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W., GenBank, *Nucleic. Acids Res.*, 2013, vol. 41(Database issue), dd. D36–D42.
  66. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic. Acids Res.*, 2017, vol. 45 (D1), dd. D158–D169.

Поступила в редакцию 21.04.19

После доработки 06.06.19

Принята в печать 18.11.19