

© Л. Е. Козеко

Інститут ботаніки ім. Н. Г. Холодного НАН України, Київ

АКТИН ПРОРОСТКОВ *BETA VULGARIS* ПРИ КЛИНОСТАТИРОВАНИИ

Вивчався вплив зміненої гравітації на експресію актину в коренях тридобових паростків *Beta vulgaris*, що росли в умовах горизонтального клиностатування (2 об/хв). Показано, що клиностатування не викликає змін загальної кількості актину в тканинах. Виявлено три ізоформи актину, співвідношення кількості білку в них було подібним в клиностатованих і неклиностатованих паростках. Це свідчить про стабільну експресію актину в умовах зміненої гравітації.

Введение. Во многих концепциях гравичувствительности растений цитоскелет рассматривают как один из основных компонентов клеточной системы восприятия и передачи гравитационного стимула [6]. Участие актиновых микрофиламентов в гравичувствительности показано как в специализированных [14], так и в неспециализированных к восприятию гравитационного стимула клетках [13]. Актиновые микрофиламенты — структура высокодинамичная, отвечающая быстрой реорганизацией на различные внешние воздействия.

Актин характеризуется множественностью молекулярных форм, уровень экспрессии которых различается по временным и пространственным характеристикам [11]. Предполагают, что большое количество изоформ актина определяется их разной функциональной нагрузкой [4]. Изменения в соотношении актиновых изоформ при кратковременном воздействии микрогравитации в условиях параболического полета и быстрого клиностатирования показаны на протопластах клеток мезофилла, не специализированных к восприятию гравитационного сигнала [12]. Вместе с тем согласно унифицированной концепции стресса, при непродолжительном влиянии фактора в растении развивается быстрая неспецифическая стрессовая реакция, в то время как для адаптации клеток требуется более длительное действие фактора [1].

Целью данной работы было изучение влияния клиностатирования на количество актина и состав его изоформ в растительных клетках в том случае, когда прорастание и рост проростка осуществляется при постоянном вращении в гравитационном поле.

Материалы и методы. Исследования проводили на корнях проростков *Beta vulgaris* (с. Бордо 237). Соплодия проращивали в темноте при 22 °С в условиях стационарного контроля или горизонтального клиностатирования (2 об/мин) в течение 3 сут. Актин изучали методами твердофазного имму-

ноферментного анализа (ИФА) и иммуноблоттинга после одномерного и двумерного электрофоретического разделения суммарных белков в полиакриламидном геле (ПААГ). Корни трехсуточных проростков отрезали на льду. Навески корней по 300 мг гомогенизировали в замороженном состоянии в фарфоровой ступке с пестиком.

Для ИФА белок экстрагировали с ФСБ pH7.4. Содержание белка в экстракте определяли по [2]. Экстракт наносили на планшеты по 100 мкг белка с последовательными 2-кратными разведениями в четырех повторностях. Для выявления актина в ИФА и иммуноблоттингах использовали моноклональные антитела, специфичные ко всем формам актина (Sigma) в разведении 1:1000. Вторичными антителами для ИФА служили анти-мышинные IgG, конъюгированные с пероксидазой (Sigma). Выявление пероксидазной активности проводили с помощью хромогенного субстрата. Оптическую плотность регистрировали с использованием иммуноферментного анализатора (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм.

Для одномерного электрофореза в денатурирующих условиях (ДДС-На ПААГ) белки экстрагировали буфером, содержащим 100 мМ Трис-НСl, pH7.4, 25 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и протеопротектор 2 мМ ФМСФ. Для подготовки белков к электрофорезу в экстракт добавляли буфер, содержащий 2 М Трис-НСl, pH8.7, 8 % ДДС-На, 0.4 М 2-меркаптоэтанол (на 3 объема экстракта 1 объем буфера), прогревали 3 мин при 90 °С, белок осаждали ацетоном и растворяли в буфере, содержащем 80 мМ имидазол pH6.8, 10 % глицерин и 2 % ДДС-На. Образцы (по 20 мкг белка) разделяли в 10 %-м ДДС-На-ПААГ по [7]. Двумерное электрофоретическое разделение белков проводили по [3]. Белки солибилизировали в буфере, содержащем 9 М мочевины, 2 % нонидет Р-40, 2 % 2-меркаптоэтанол, 4 % амфолиты pH5-8, 1 % амфолиты pH3.5-10 и 2 мМ ФМСФ. В первом направлении белки

(100 мкг) разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ) в градиенте pH 4.75-8.0. Прибором для электрофореза служил Mini Dual Gel (Sigma). Гели окрашивали кумасси G-250 или проводили вестерн-блоттинг. Изоэлектрические точки (pI) определяли измерением pH в растворах с фрагментами геля. Для определения молекулярной массы белков использовали белки — стандарты фирмы Sigma.

Для вестерн-блот-анализа полипептиды, разделенные в одномерном или двумерном ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham). Вторичными антителами служили анти-мышинные IgG, конъюгированные с биотином (Sigma). Биотин визуализировали через экстравидин-пероксидазную систему (Sigma), выявляя пероксидазную активность с помощью SIGMA FAST™ DAB. Для анализа гелей и блотов использовали компьютерную программу ImageMaster™ TotalLab, version 2.00 (Amersham). Все эксперименты проводились на менее чем в 2-кратной повторности.

Результаты исследований. Результаты проведенных экспериментов показали, что рост корней клиностастированных проростков *B. vulgaris* дезориентирован, в отличие от проростков, растущих в норме, корни которых ориентированы по гравитационному вектору. Электрофоретическое разделение суммарных белков корней в ДДС-Na-ПААГ и анализ полученных электрофореграмм показал, что белковый спектр в клиностадном варианте не отличается от такового в контроле по гетерогенности спектра и проценту белка в каждой зоне (рис. 1, а). С помощью иммуноблоттинга выявлено две зоны (рис. 1, б): актин с молекулярной массой около 45 кД и слабоокрашенная зона с более высокой электрофоретической подвижностью. Денситометрирование иммуноблота показало, что количество актина в клиностадном варианте равно 69084 ± 5247 пкл и 65057 ± 3988 пкл в контроле, что говорит о сходном количестве актина в обоих вариантах. Данные ИФА подтвердили, что различия между вариантами по количеству актина недостоверны (рис. 2).

Двумерное разделение белков с последующей иммунодетекцией актина на мембране позволило выявить в обоих вариантах пять иммунореактивных зон (рис. 3): три с молекулярной массой около 45 кД (зоны 1, 2 и 3) и две слабо окрашенные зоны с более высокой электрофоретической подвижностью (зоны 4 и 5). Эти результаты позволяют нам предполагать экспрессию трех изоформ актина (зоны 1, 2 и 3) в корнях 3-сут проростков *B. vulgaris*. В различных растительных объектах с использованием двумерного электрофореза разделяют от двух до восьми изоформ актина [10]. Слабо окрашенные более подвижные зоны выявлялись как при одно-

мерном, так и при двумерном разделении белка; поскольку система выделения белка при этом различна, то возможность артефакта в результате изменений полипептидной цепи в ходе приготовления образцов белка снижается. Эти зоны могут быть продуктами деградации актина, т. к. известно, что антитела, реагирующие со всеми формами актина, также реагируют и с некоторыми продуктами его распада [5]. Кроме того, учитывая, что аминокислотная последовательность актинов имеет определенное сходство с актин-зависимыми белками (от 27 до 45 % идентичности у *Arabidopsis*) [9], нельзя исключать и возможности слабой неспецифической иммунной реакции с такими белками. Определение градиента pH в изоэлектрофокусировочном геле

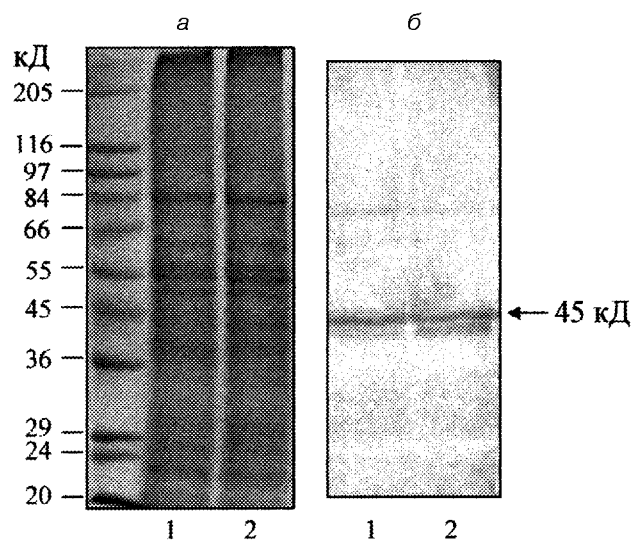


Рис. 1. Электрофореграммы белков после разделения в ДДС-Na-ПААГ (а) и иммуноблоты актина (б) из корней клиностастированных (1) и растущих в норме (2) проростков *B. vulgaris*

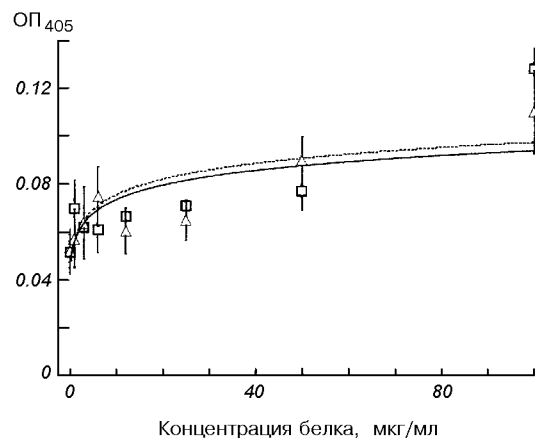


Рис. 2. Относительное количество актина в экстракте белка из корней клиностастированных и растущих в норме проростков *B. vulgaris* по данным ИФА

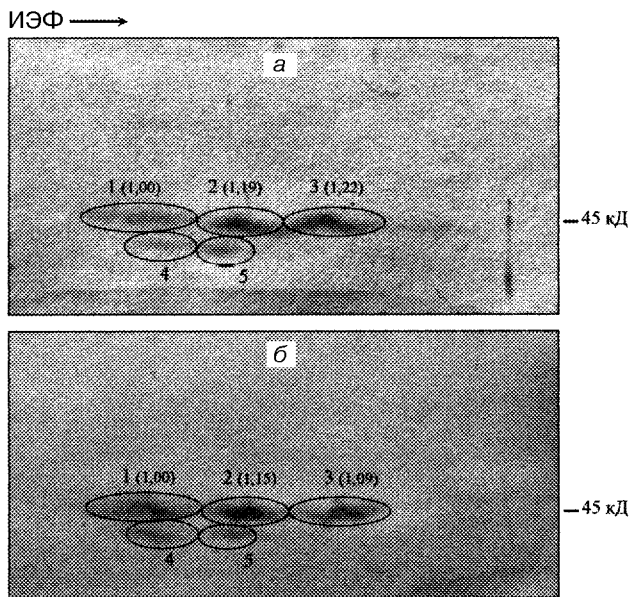


Рис. 3. Иммуноблоты актина после двумерного электрофоретического разделения в ПААГ белков из корней растущих в норме (а) и клиностазированных (б) проростков *B. vulgaris*. В скобках указана относительная интенсивность окрашивания зон актина, определенная с использованием ImageMaster™ TotalLab

позволило определить, что рI изоформ актина равно 5.65(1), 5.80(2) и 5.95(3). Это согласуется с данными других исследователей о том, что актин — кислый белок и рI его изоформ у растений лежит в интервале рН от 5.1 до 6.05 [10, 12]. Сравнительный анализ интенсивности окрашивания зон показал, что относительное количество белка в каждой зоне различается между вариантами незначительно. Полученные результаты дают основание полагать, что экспрессия изоформ актина не подвержена существенному влиянию длительного клиностаტიрования, и их участие в ответе клетки на действие измененной гравитации, по-видимому, осуществляется в основном за счет динамичной реорганизации сети микрофиламентов в клетках.

На протопластах клеток мезофилла показано, что кратковременное (3—15 мин) влияние микрогравитации в параболическом полете и при клиностаტიровании приводило к потере двух изоформ актина клетками [12]. Это может быть быстрой стрессовой реакцией клеток на изменение вектора гравитации и предполагает функциональную неэквивалентность и различную стабильность отдельных изоформ. Согласно современной теории стресса после быстрой неспецифической реакции наступает стадия адаптации, в ходе которой клетка переходит в новое устойчивое функциональное состояние [8]. Мы предполагаем, что выявленная нами стабильность белковых и актиновых спектров свидетельст-

вует о том, что прорастание и рост проростков при постоянном вращении в гравитационном поле дает возможность растению в значительной степени адаптироваться к этим условиям, в частности на уровне экспрессии молекулярных форм актина.

1. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. — Киев: Наук. думка, 2003.—277 с.
2. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
3. Jones P. P. Analysis of radiolabeled lymphocyte proteins by one- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis // *Immunology* / Eds B. B. Michell, S. M. Sniigi. — S. F., Freeman, 1980.—P. 398—440.
4. Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. Functional nonequivalency of actin isoforms in *Arabidopsis* // *Mol. Biol. of the Cell.*—2002.—13.—P. 251—261.
5. Kandasamy M. K., Meagher R. B. Actin-organelle interactions: association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells // *Cell Motil. Cytoskeleton.*—1999.—44.—P. 110—118.
6. Kordyum E. L. A role for the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity and Ca^{2+} -signaling in microgravity // *Cell Biol. Int.*—2003.—27.—P. 219—221.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 5259.—P. 680.
8. Lichtenthaler H. K. The stress concept in plants: An introduction // *Stress of life from molecules to man: Annals of the New York Academy of Sciences.* — New York, 1998.—P. 187—198.
9. McKinney E. C., Kandasamy M. K., Meagher R. B. *Arabidopsis* contains ancient classes of differentially expressed actin-related protein genes // *Plant Physiol.*—2002.—128.—P. 997—1007.
10. McLean B. G., Huang S., McKinney E. C., Meagher R. B. Plants contain highly divergent actin isoforms // *Cell Motil. Cytoskeleton.*—1990.—17.—P. 276—290.
11. Meagher R. B., McKinney E. C., Kandasamy M. K. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family // *Plant Cell.*—1999.—11.—P. 995—1005.
12. Schnabl H., Hunte C., Schulz M., et al. Effects of fast clinostat treatment and microgravity of *Vicia faba* L. mesophyll cell protoplast ubiquitin pools and actin isoforms // *Microgravity Sci. Technol.*—1996.—9/4.—P. 275—280.
13. Shevchenko G. V., Kordyum E. L. Orientation of root hair growth is influenced by simulated microgravity // *Annu. Int. Gravit. Physiol. Meeting*, 22-27 April, 2001, Budapest, Hungary.
14. Sievers A. From gravitational to space biology in Bonn Newsletter ASGSB // *Newsletter ASGSB.*—2000.—16.—P. 18—25.

ACTIN OF *BETA VULGARIS* SEEDLINGS UNDER THE CLINOROTATION

L. Ye. Kozeko

We study the influence of altered gravity on actin expression in roots of *Beta vulgaris* seedlings grown on the horizontal clinostat (2 rpm) from seed germination for three days. It is shown that the total actin quantity was not influenced. Three actin isoforms are revealed; a relative protein quantity of these isoforms was similar both in clinorotated seedlings and in ones grown in norm. This points to stable expression of actin under the altered gravity conditions.