УДК 576.3:57.042:581.43

Г. В. Шевченко, Е. Л. Кордюм

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*-GFP-ABD2 В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЦИТОСКЕЛЕТА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Використання трансформованих рослин Arabidopsis thaliana-GFP-ABD2 в експериментах з дослідження впливу модельованої мікрогравітації (клиностатування) на цитоскелет виявило взаємодію актинових мікрофіламентів з іншими елементами цитоскелета, а саме з тубуліновими мікротрубочками. Дослідження показали, що взаємодія між мікрофіламентами та мікротрубочками має важливе значення для росту клітин у дистальній зоні розтягу кореня. Взаємодія між елементами цитоскелета в умовах стаціонарного контролю відрізняється від такої в умовах клиностатування. Обговорюється можливий механізм даної взаємодії.

Несмотря на довольно длительный опыт проведения экспериментов с растительным материалом в условиях космических полетов исследованы далеко не все вопросы, относящиеся к способности растений воспринимать гравитацию. Невыясненной остается природа гравичувствительности растительной клетки, неспециализированной к восприятию гравитации, которая, как известно, реагирует на изменения силы тяжести изменениями ультраструктуры и метаболизма [11]. Одним из структурных элементов, опосредующих гравичувствительность клетки, является цитоскелет [1, 2]. Основные составные цитоскелета — микротрубочки (МТ) и микрофиламенты (МФ) — полимерные структуры, образованные белками тубулином и актином [7]. Цитоскелет обеспечивает деление клеток, их рост, а также внутриклеточные сигнальные реакции. Упорядоченная организация элементов цитоскелета существенна для роста клеток в дистальной зоне растяжения корня (ДЗР), расположенной между апикальной меристемой и базальной частью зоны растяжения [3]. Это зона формирования изгиба корня при гравистимуляции растения. Из всех ростовых зон корня ДЗР наиболее чувствительна к внешним стимулам, таким как механическое воздействие, действие ионов металлов, кислорода и ауксина [6, 15]. Частично такая чувствительность обусловлена изменениями организации МТ и МФ. Так, нарушение упорядоченной структуры МТ в ДЗР в клетках корней растений *Arabidopsis thaliana* при клиностатировании приводит к изменению размеров клеток [22]. Несмотря на довольно широкую изученность функций цитоскелета, до сих пор не определена роль отдельных элементов цитоскелета, как МТ, так и МФ, в процессах, происходящих в растительной клетке в условиях микрогроавитации.

Как известно, актиновые МФ регулируют рост клеток, контролируя транспорт везикул к местам активного роста клеточной стенки [6]. Этот процесс осуществляется при взаимодействии МФ с МТ [23, 25]. Для наблюдения такого взаимодействия необходимо создание специфических экспериментальных условий. Поскольку участие сети актина в росте и взаимодействие между МФ и МТ в ростовых процессах устанавливалось на Земле при постоянном действии силы тяжести, проведение экспериментов в условиях моделированной микрогравитации (клиностатирование) позволяет выявить механизм

[©] Г. В. ШЕВЧЕНКО, Е. Л. КОРДЮМ, 2012

регулирования и функционирования отдельных элементов цитоскелета в процессе роста растительных клеток.

В своих исследованиях мы впервые использовали трансгенные растения Arabidopsis thaliana-GFP-ABD2, в конструкции которых сцеплены ген белка фимбрина, связывающегося с актином ABD2 (актин-связывающий домен 2) и ген зеленого флуоресцентного белка GFP, что позволяет декорировать МФ [24] и визуализировать их в живых растениях непосредственно после клиностатирования (или доставки с орбиты космического корабля). Применение данных растений способствует развитию космической биологии, поскольку исключает процесс фиксации растений и связанные с этим погрешности в интерпретации результатов. Как известно, фиксатор (формальдегид или глутаральдегид) может искажать структуру цитоскелета, в особенности самого тонкого ее элемента — сети актиновых МФ (до 6 нм в диаметре).

Для определения того, каким образом рост клеток в ДЗР корня зависит от организации МФ и их взаимодействия с МТ, мы использовали фармацевтический подход и анализировали организацию МФ в клетках коры в ДЗР корней проростков A. thaliana-GFP-ABD2 после деполимеризации белков актина и тубулина в контроле и при клиностатировании. Ниже мы обсудим, каким образом МФ контролируют рост клеток в ДЗР корня A. thaliana, и могут ли они непосредственно воспринимать изменения силы тяжести. Растения A. thaliana-GFP-ABD2 рассматриваются в качестве объектов для экспериментов по моделированию микрогравитации в лабораторных условиях и возможности их использования на борту орбитальной станции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали трансформированную линию *A. thaliana* (L) Неупh экотип Соlumbia-GFP-ABD2 (любезно предоставленную проф. Д. Фолькманном и Ф. Балушкой из университета г. Бонн, Германия). Семена стерилизовали в растворе 50 % этанола и 3 % перекиси водорода (5 мин), промывали в дистиллированной воде и высаживали в стеклянные трубки (r = 1 см) на среду Murashige-Skoog (MS) (Sigma, Со.). Трубки заворачивали в темную бумагу и оставляли в стационарном контроле и на медленно вращающемся горизонтальном клиностате (2 мин⁻¹) на 7 сут. Для деполимеризации МТ и МФ использовали гербицид оризалин (20 мкМ) и цитохалазин D (CD) (10 мкМ) за 4 ч до наблюдения. Исследовали шесть вариантов экспериментальных проростков: 1) стационарный контроль, 2) контроль с добавлением CD, 3) контроль с добавлением оризалина, 4) горизонтальное клиностатирование, 5) клиностатирование с добавлением CD, 6) клиностатирование с добавлением оризалина. В каждом варианте измеряли не менее 35 клеток. Все эксперименты повторяли три раза. Статистический анализ проводили на программе Origin 7.5 (t-test). После снятия с клиностата проростки исследовали в лазерном конфокальном микроскопе LSM5 Pascal (Zeiss, Germany) при длине волны для флуоресцентного белка GFP 500-600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Организация микрофиламентов в дистальной зоне растяжения корней Arabidopsis-GFP-ABD2. У проростков Arabidopsis-GFP-ABD2 ДЗР начинается приблизительно на расстоянии 143.58 ± 2.24 мкм от верхушки корня. В ДЗР клетки растут диффузно (изотропно), т. е. всей поверхностью, а в центральной зоне растяжения (ЦЗР) — предпочтительно в одном направлении (анизотропно) [4]. Актиновые МФ в ДЗР и в контрольных и клиностатированных корнях формировали сеть как из переплетенных пучков различной плотности, так и из отдельных микрофиламентов (рис. 1). Область клеточных стенок была ярче из-за связи МФ с цитоплазматической мембраной.

Не отмечено видимой разницы в организации МФ в зонах корня между контрольными и экспериментальными растениями. Согласно нашим измерениям клиностатирование не оказывало существенного влияния на длину и ширину клеток ДЗР (таблица).

Организация МФ в ДЗР растений A. thaliana-GFP-ABD2, обработанных цитохалазином D. Разрушение актина цитохалазином D приводило к частичному повреждению сети МФ как в контрольных, так и в клиностатированных растениях. Сеть $M\Phi$ в клетках заметно фрагментирована. Центральная область клеток преимущественно лишена филаментных структур, их фрагменты скапливались на периферии (рис. 2).

В контроле разрушение МФ приводило к утрате формы клеток, а иногда даже к их разбуханию (рис. 2, a), что не наблюдалось при клиностатировании (рис. 2, δ). Измерение размеров клеток обнаружило разницу в длине и ширине по сравнению с клиностатированными растениями (таблица).

При клиностатировании сеть МФ также выглядела поврежденной (рис. 2, δ). Наиболее сильные повреждения приводили к хаотичному расположению фрагментов МФ по всей клетке и частому их скоплению возле клеточных стенок. Несмотря на видимые повреждения, параметры клеток при клиностатировании были более выровненными, чем в контроле (таблица).

Организация $M\Phi$ в ДЗР растений А. thaliana-GFP-ABD2, обработанных оризалином. Разрушение МТ оризалином также приводило к частичному нарушению организации МФ в ДЗР проростков A. thaliana-GFP-ABD2 (рис. 3).

Отличительной особенностью обработки оризалином является появление наряду с разрушенными филаментами точечных скоплений актина во всей ДЗР корня (рис. 3), что свидетельствует

Параметры клеток в дистальной зоне растяжения корней *Arabidopsis thaliana*-GFP-ABD2, обработанных цитохалазином D и оризалином

Эксперимент	Длина клеток, мкм	Ширина клеток, мкм
Необраб	ботанные клетки	
Контроль	15.98 ± 2.84	16.49 ± 2.84
Клиностатирование	14.99 ± 2.48	$15.14 \pm 2.82^{*}$
Обработк	а цитохалазином	D
Контроль	12.22 ± 1.74	13.48 ± 2.12
Клиностатирование	$16.08 \pm 2.38^*$	$16.12 \pm 2.46^{*}$
Обработка оризалином		
Контроль	15.52 ± 2.35	15.25 ± 1.67
Клиностатирование	14.51 ± 2.29	14.78 ± 2.18

* статистически достоверная разница (p < 0.05)

ISSN 1561-8889. Космічна наука і технологія. 2012. Т. 18. № 6



Рис. 1. Организация микрофиламентов в клетках зоны растяжения растений *А. thaliana*-GFP-ABD2: *а* — контроль, *б* — клиностатирование



Рис. **2.** Микрофиламенты в дистальной зоне растяжения растений *А. thaliana*-GFP-ABD2, обработанных цитохалазином D: a — контроль, δ — клиностатирование



Рис. 3. Микрофиламенты в дистальной зоне растяжения корней проростков *A. thaliana*-GFP-ABD2, обработанных оризалином: a — контроль, δ — клиностатирование

о нарушении организации сети МФ. Это явление подтверждает взаимодействие между МФ и МТ [22]. В этом эксперименте с обработкой оризалином не наблюдали видимой разницы в повреждении МФ между контрольными и экспериментальными растениями. Измерение параметров клеток также не выявило существенного отличия в размерах клеток (таблица), также подтверждая тот факт, что разрушение МТ в ДЗР существенно не влияет на рост клеток.

Роль $M\Phi$ в росте клеток в ДЗР корней A. thaliana. Наши эксперименты показали, что клиностатирование существенно не изменяло организацию МФ и размеры клеток в ДЗР проростков A. thaliana-GFP-ABD2. Исходя из этого можно предположить, что МФ не реагируют непосредственно на изменение силы тяжести. Однако этот факт не исключает изменения организации МФ, поскольку ориентация пучков актина зависит от организации МТ, которые, в свою очередь, подвергаются рандомизации при клиностатировании [21]. Следует отметить, что тонкие изменения сети актина в целом не так легко обнаружить визуальным наблюдением под микроскопом ввиду чрезвычайно тонкой структуры МФ и их сеткообразной организации, без четкой ориентации отдельных филаментов. Применение цитохалазина D в контроле привело к частичному разрушению сети МФ и большей разнице размеров клеток, что показывает некоторые замедление роста клеток. Это подтверждает известный факт о том, что именно МФ выполняют лидирующую роль в регулировании роста клеток, особенно в ДЗР корня [4, 7]. При клиностатировании четко наблюдали разрушение МФ, которое, однако, не приводило к изменению параметров клеток до такой степени, как это происходило в контроле, доказывая тем самым, что организация МФ у клиностатируемых растений более стабильна.

Появление разрушенных МФ в ДЗР после деполимеризации тубулина подтверждает вклад МТ в организацию МФ. Похожие эффекты наблюдались и у растений линии *Arabidopsis*-GFP-MAP4 (с декорированными МТ), у которых разрушение МФ влияло на организацию МТ и размеры клеток [22]. Другие исследования также показали, что пертурбации одного из элементов цитоскелета способны вызвать изменения в организации другого [8]. Так, на примере корневых волосков мутанта *distorted2 (dis2)* (с нарушением полимеризации кортикальных МФ) показано, что эндоплазматические МТ формируют кластеры и пучки в местах полимеризации МФ. Также они являются гиперчувствительными к разрушителям МТ, что предполагает меньшую динамичность последних по сравнению с контролем. Сходные результаты были получены и при применении низких концентрация латрункулина/цитохалазина (ингибиторы полимеризации МФ), которые также приводили к группировке МТ в пучки и снижение их динамичности [18, 20].

О взаимодействии кортикальных МФ и МТ свидетельствует также тот факт, что функционирование кортикальных МТ необходимо для восстановления кортикального актинового цитоскелета после повреждения [19].

Согласно нашим предыдущим наблюдениям [22] разрушение самих микротрубочек не приводит к большим изменениям размеров клеток. Этим подтверждается идея о том, что в отличие от $M\Phi$ MT не играют ведущей роли в удлинении клеток. Таким образом, в настоящее время неясным остается вопрос, каким образом взаимозависимая организация элементов цитоскелета влияет на их функционирование и ростовые процессы в растительной клетке.

Общепринятым является представление о том, что кортикальные микротрубочки определяют форму клеток, своим расположением определяя упорядоченное размещение целлюлозных фибрилл клеточной стенки [14, 26]. Известно, что доставка материала клеточной стенки к цитоплазматической мембране обеспечивается актиново-миозиновой системой, и цитоплазматический актин необходим для направленного попадания везикул Гольджи с компонентами цитоплазматической мембраны и клеточной стенки к диффузно растущей клеточной мембране, как это происходит у растений с верхушечным типом роста [23]. Поскольку МТ обеспечивают стабильность треков МФ, их разрушение должно сказываться на процессе доставки везикул, и следовательно, на стабильности роста. Однако наши измерения не выявили большой разницы длины и ширины клеток в контроле. Это означает, что рост клеток стабилизирован даже при поврежденных МТ. Этот противоречивый факт можно объяснить довольно динамической природой актинового цитоскелета, который способен выполнять как ингибиторную, так и стимулирующую роли в экзоцитозе [12], и способен восстановить экзоцитоз и сохранить стабильность клеточного роста даже после частичного разрушения МТ.

Поскольку взаимодействие между организацией МТ и МФ существенно для регулирования растяжения клеток [5, 8, 9], следует предполагать, что оно каким-либо образом будет нарушено в условиях клиностатирования. Однако, несмотря на использование ингибиторов, мы не наблюдали видимой разницы в разрушении актинового цитоскелета, и параметры клеток выглядели более стабильными у клиностатируемых растений. Исследования Arabidopsis-GFP-MAP4 линии после обработки CD и оризалином также не выявили существенного расхождения размеров клеток [22]. Это означает, что при клиностатировании механизм координации роста в ДЗР действует более эффективно, чем в контроле. Таким образом, исследования, проведенные с использованием трансгенных растений A.thaliana-GFP-ABD2, позволило впервые проследить организацию МФ *in vivo* в клетках корня после воздействия моделированной микрогравитации (клиностатирование). Полученные данные доказывают, что МФ непосредственно не реагируют на изменение силы тяжести, однако играют существенную роль в обеспечении стабильности роста клеток в ДЗР корня проростков Arabidopsis. Взаимодействие МФ с организацией МТ вносит весомый вклад в этот процесс. Стабильность роста клеток в ДЗР при клиностатировании предполагает, что в условиях моделированной микрогравитации растения Arabidopsis используют иной механизм организации сети МФ, чем в наземном контроле. Одним из правдоподобных объяснений данного феномена может быть активность других факторов, к примеру белков, регулирующих функционирование как МФ, так и МТ. Показано, что некоторые белки в клетках растений взаимодействуют как с микротрубочками, так и с микрофиламентами [10, 18]. Среди них — формины, известные регуляторы динамики МТ и МФ в интерфазе и митозе [13]. В данный механизм могут быть также вовлечены белки, связанные только с МФ. Так, МФ частично ответственны за распределение в клетке белков, отвечающих за ряд клеточных процессов. Среди таких белков — переносчики ауксина вовнутрь и извне клетки [16]. Известно, что циркуляция ауксина напрямую связана с гравичувствительными реакциями растений. В связи с этим функциональные исследования цитоскелетных белков, которые координационно регулируют сети компонентов цитоскелета, могут помочь лучше понять точное взаимодействие между микротрубочками и микрофиламентами.

- 1. *Таирбеков М. Г.* Гравитационная биология клетки (теория и эксперимент). М., 1997. 128 с.
- 2. *Таирбеков М. Г.* Вероятные механизмы гравитационной чувствительности клеток. // Докл. Акад. наук. 2000. **375**, № 1. С. 121 124.
- Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P. W. Root apex transition zone: a signalling – response nexus in the root // Trends Plant Sci. – 2010. – 15, N 7. – P. 402 – 408.
- Baluška F., Volkmann D., Barlow P. A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: cytoskeletal and developmental implications // J. Plant Growth Regul. – 2001. – 20. – P. 170–181.
- Blancaflor E. B. Cortical actin filaments potentially interact with cortical microtubules in regulating polarity of cell expansion in primary roots of maize (*Zea mays L.*) // J. Plant Growth Regul. – 2000. – 19. – P. 406–414.
- Blancaflor E. B. The cytoskeleton and gravitropism in higher plants // J. Plant Growth Regul. – 2002. – 21. – P. 120–136.
- Blancaflor E. B., Wang Y-S., Motes C. M. Organization and function of the actin cytoskeleton in developing root cells // Int. Rev. Cytol. – 2006. – 252. – P. 219–264.
- Collings D., Lill A., Himmelspach R., Wasteneys G. Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in Arabidopsis thaliana // New Phytologist. – 2006. – 170. – P. 275–290.
- Fu Y., Gu Y., Zheung Z., Wasteneys G., Yang Z. Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis // Cell. – 2005. – 120. – P. 687–700.

- Higaki T., Sano T., Hasezawa S. Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants // Curr. Opin. Cell Biol. – 2007. – 10, N 6. – P. 549–556.
- Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol. – 1997. – 171. – P. 1–78.
- Lang T., Wacker I., Wunderlich I., et al. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells // Biophys. J. – 2000. – 78. – P. 2863–2877.
- Li Ya., Shen Yu, Cai Ch., Zhong Ch., Zhu L., Yuan M., Rena H. The type II Arabidopsis formin14 interacts with microtubules and microfilaments to regulate cell division // Plant Cell. – 2010. – 22. – P. 2710–2726.
- Lloyd C. W., Chan J. Microtubules and the shape of plants to come // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2004. – 5. – P. 13–23.
- Mancuso S., Marras A. M., Magnus V., Baluška F. Noninvasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-referencing microelectrode // Analytical Biochemistry. — 2005. — 341. — P. 344—351.
- Muday G. K., Murphy A. S. An emerging model of auxin transport regulation // Plant Cell. – 2002. – 14. – P. 293–299.
- Petraśek J., Schwarzerova K. Actin and microtubule cytoskeleton interactions // Curr. Opin. Plant Biol. – 2009. – 12. – P. 728–734.
- Saedler R., Mathur N., Srinivas B. P., et al. Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the Arabidopsis ARPC2 subunit homolog // Plant Cell Physiol. – 2004. – 45. – P. 813–822.
- Sampathkumar A., Lindeboom J., Debolt S., et al. Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2011. – 23. – P. 2302–2313.
- Schwab B., Mathur J., Saedler R., et al. Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: actin controls the spatial organization of microtubules // Mol. Gen. Genomics. – 2003. – 269. – P. 350–360.

- Shevchenko G. Patterns of cortical microtubules formed in epidermis of *Beta vulgaris* roots under clinorotation // Adv. Space Res. — 1999. — 24. — P. 739—742.
- Shevchenko G., Kalinina Ia., Kordyum E. L. Interrelation between microtubules and microfilaments in the elongation zone of *Arabidopsis* root under clinorotation // Adv. Space Res. – 2007. – 39. – P. 1171–1175.
- Smith L. G., Oppenheimer D. G. Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005. 21. P. 271–295.
- Wang Y. S., Yoo C. M., Blancaflor E. B. Improved imaging of actin filaments in transgenic Arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain // New Phytol. – 2008. – 177. – P. 525–536.
- Wasteneys G., Galway M. Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views // Annu. Rev. Plant Biol. – 2003. – 54. – P. 691–722.
- 26. Wasteneys G. O., Yang Z. New views on the plant cytoskeleton // Plant Physiol. - 2004. - **136**. - P. 3884-3891.

Надійшла до редакції 08.10.12

G. V. Shevchenko, E. L. Kordyum

APPLICATION OF TRANSGENIC *ARABIDOPSIS THALIANA*-GFP-ABD2 PLANTS IN EXPERIMENTS FOR THE INVESTIGATION OF CYTOSKELETON IN SIMULATED MICROGRAVITY

Application of transgenic *Arabidopsis thaliana*-GFP-ABD2 plants in experiments for the study of simulated microgravity (clinorotation) impact on cytoskeleton revealed the interconnection of actin microfilaments with other cytoskeleton elements, in particular with tubulin microtubules. Investigations showed that interconnection between microfilaments and microtubules is essential for cell growth in the distal elongation zone of a root. The interconnection between cytoskeleton elements in the stationary control differs from that under clinorotation. Possible mechanism of such interconnection is discussed.