

doi: <https://doi.org/10.15407/knit2017.05.066>

УДК 58:577.112:52

О. А. Артеменко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

ЗНАЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИЙ КОСМИЧЕСКОГО РАСТЕНИЕВОДСТВА

Будущие длительные пилотируемые экспедиции требуют огромного количества метаболических ресурсов — воды, еды, кислорода, для производства которых необходимы специальные условия и массивное оборудование, слишком тяжелое для современных КА. Кроме того, такие системы жизнеобеспечения не могут быть осуществлены без высокого уровня круговорота. Поэтому растения рассматриваются как необходимый источник пищи и кислорода в биорегенеративных системах жизнедеятельности длительных космических миссий. Изучение принципов функционирования таких систем различной степени сложности и разработка научных основ их создания — это главная задача космического растениеводства. В работе показана важность изучения параметров роста, размножения растений и особенностей событий клеточного цикла в условиях клиностатирования, а именно: митотической активности, экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла (циклинов и циклинзависимых киназ), транскрипционных факторов, способствующих инициации программы повышения или понижения транскрипции генов. Все это необходимо учитывать при подборе легкоусваиваемых человеком растений, данных о составе почвы, приросте биомассы, при изучении роста и дифференциации клеток для получения полноценных семян в условиях микрогравитации.

Ключевые слова: клеточный цикл, микрогравитация, циклины, транскрипционный фактор, растения.

Исследование влияния реальной микрогравитации в космическом полете и в условиях симулированной микрогравитации (клиностатирование) на клеточный цикл растений показали очень неоднозначные результаты. Наблюдается как угнетение роста и размножения растений, так и стимуляция этих процессов, изменение параметров клеточного цикла, пролиферативной активности клеток апикальной меристемы корней и т. д., что подтверждает гипотезу о наибольшей гравичув-

ствительности у растений клеток, которые делятся или находятся в состоянии активного метаболизма [10, 11]. Противоречивые данные о пролиферативной активности вызваны разными сроками и условиями исследований клеточного цикла, а также «точечным» по срокам сбора материала [2]. С этой целью в данной работе исследуется влияние измененной гравитации на сформированные клетки меристемы корней гороха (*Pisum sativum* L.) в динамике и в процессе индукции прорастания, т. е. с использованием модели первого клеточного цикла, в который с высоким уровнем

© О. А. АРТЕМЕНКО, 2017

синхронности вступают клетки зародышевой меристемы корня при инициации прорастания семян.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, *a* показаны результаты исследований митотической активности (МА) в меристеме корня гороха. Первые митотические фигуры в контрольном варианте (1) выявлены на 33-м ч прорастания. Далее наблюдается волнообразное увеличение МА, что характерно для первого, частично синхронизированного митотического цикла систем с индуцированной пролиферацией. Кинетика деления клеток в экспериментальном варианте (2) в общем схожа с контролем, однако первые митозы наблюдаются на 3 ч позже, и на протяжении всего периода исследования МА в меристемах корней клиностатирированных проростков ниже, чем в контроле. Это приводит к замедлению роста корня в условиях измененной гравитации, что и наблюдается далее в течение 6 сут эксперимента.

Угнетающее влияние клиностатирирования на МА меристем корней не является специфичным только для первого клеточного цикла. Оно проявляется и при действии на меристему двухсуточных корней, причем уменьшение количества делений наблюдается уже через 3 ч (рис. 1, *б*). Очевидно, что при этом происходит задержка прохождения клетками G2-фазы (постсинте-

тической) цикла, длительность которой в меристеме гороха составляет 2 ч [3].

Таким образом, поскольку было установлено, что замедление клеточного цикла в условиях измененной гравитации происходит в основном за счет продления G1-фазы (что является обычной реакцией растений при действии неблагоприятных факторов) [7], далее нами было показано, что причиной этого события было накопление транскриптоводного изтипов D-циклина в апикальной меристеме корня в процессе индукции прорастания. Как известно, основными регуляторами клеточного цикла являются циклины и циклинзависимые киназы (ЦЗК). Циклинзависимые киназы есть в клетке постоянно, а уровень циклинов колеблется в зависимости от фаз клеточного цикла [8, 13, 18–20]. Синтез и накопление митотических циклинов (А и В) необходим для прохождения клеткой постсинтетической фазы и митоза, а циклин D необходим для вступления клетки в фазу синтеза ДНК. Активность циклина D и производных этой группы может контролироваться действием как эндогенных, так и экзогенных факторов, а измененная гравитация является одним из тех факторов, которые влияют на экспрессию генов, контролирующих клеточный цикл [5, 16]. У растений были выделены три подтипа циклина D ($\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$), которые регулируют процессы прохождения клеткой пресинтетической фазы цикла и начало

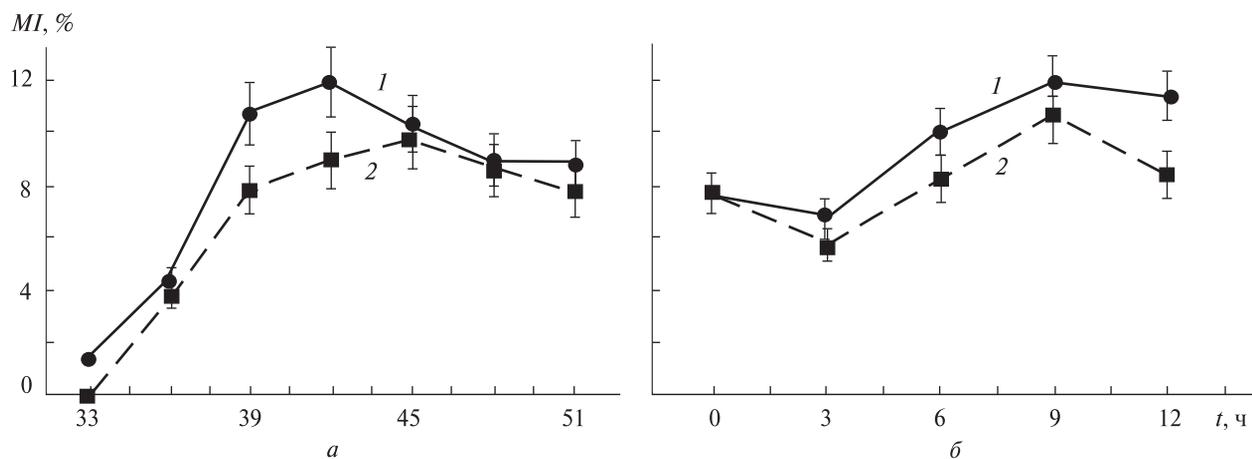


Рис. 1. Изменение индекса митотической активности (МИ, %) клеток меристемы корня гороха: *a* — для фазы прорастания, *б* — для двухсуточных проростков (1 — контроль, 2 — при клиностатирировании)

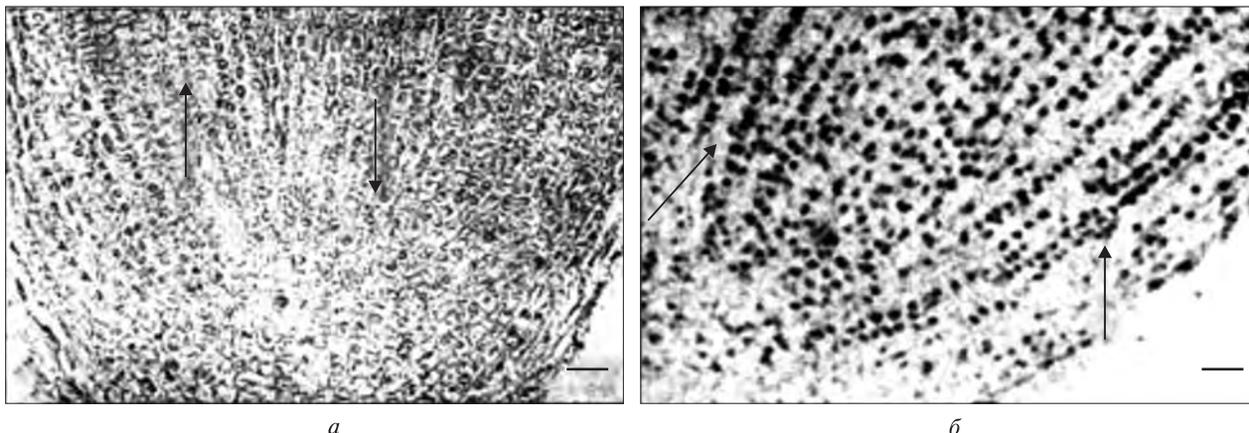


Рис. 2. Экспрессия гена $\delta 3$ -циклина в клетках меристемы корня гороха через 32 ч прорастания в контроле (а) и в условиях клиностаტიрования (б)

синтеза ДНК [6, 12]. Нами было показано, что именно накопление транскриптов $\delta 3$ -циклинов приводило к задержке вступления клеток в фазу синтеза ДНК в условиях клиностаტიрования (рис. 2) [1].

Несмотря на то что экспрессия циклина является абсолютно необходимой для соединения с ЦЗК, ее активации и образования активного ЦЗК-циклинового комплекса, который стимулирует продвижение клетки к S-фазе [15, 17], наличие транскриптов $\delta 3$ -циклина в условиях клиностаტიрования не ускоряет переход клеток из G1-фазы цикла к S-фазе, а наоборот, может быть причиной задержки этого процесса. Во-первых, из-за наличия транскриптов $\delta 3$ -циклина невозможна экспрессия следующего типа циклинов, отвечающих непосредственно за начало и продвижение в фазу синтеза ДНК [9]. Во-вторых, несвоевременно образованный $\delta 3$ -циклин-ЦЗК-комплекс может удерживаться в неактивном состоянии с помощью циклинзависимого ингибитора (белки p15/16/17, p21 или p27), или инактивироваться при фосфорилировании тирозина, что приводит к задержке и остановке клеточного цикла. Однако это ингибирование обратимо при синтезе cdc25-фосфатазы и ведет к восстановлению событий клеточного цикла [14]. Вопрос о механизме задержки вступления в фазу синтеза ДНК остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Чтобы противостоять на молекулярном уровне такому виду стресса, как изменение гравитации, с которым растение никогда не встречалось раньше в ходе эволюции, геном должен быть достаточно устойчив. В этом плане мультигенные семейства и резервные гены имеют преимущество в том, что они могут изменяться без риска навредить клетке, и потому именно они играют ключевую роль в ответе на гравитационный стресс. К таким генам безусловно относятся и гены клеточного цикла. Согласованная регуляция взаимодействия клеток растения осуществляется путём синтеза специальных гормонов (цитокинина и ауксина), которые вызывают сигнальный каскад в клетках. В случае, если сигнал вызывает изменение уровня экспрессии определенных генов, конечным звеном каскада часто оказываются транскрипционные факторы (ТФ). Транскрипционные факторы — одна из групп белков, обеспечивающих прочтение и интерпретацию генетической информации. Они связывают ДНК и способствуют инициации программы повышения или понижения транскрипции гена. Таким образом, они жизненно необходимы для нормального функционирования организма на всех уровнях. Одним из самых многочисленных типов ТФ растений являются MYB-белки (MYB-myeloblastosis). Это семейство ТФ включает белки, контролирующие развитие корня, паттернирование листа, формирование трихом, клеточный

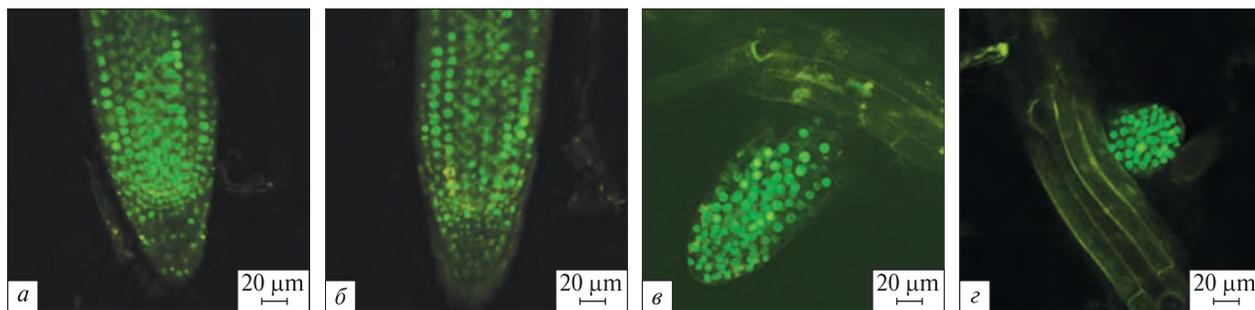


Рис. 3. Экспрессия MYB3R3 в корнях четырехсуточных проростков и в зачатках боковых корней *Arabidopsis thaliana* (а, в — контроль, б, г — клиностамирование)

цикл, циркадные ритмы, передачу фитохромного сигнала и т. д. ДНК-связывающий домен MYB-белков содержит от одного до трех повторов и приблизительно 50 аминокислот. Этот тип ТФ специфически взаимодействует с генами, содержащими (С/Т)AAC(G/Т)G-нуклеотидные последовательности [4]. Мы проанализировали экспрессию ТФ MYB3R3 в клетках корня *Arabidopsis thaliana* в стационарной меристеме четырехсуточных проростков и в зачатках боковых корней (рис. 3). В условиях клиностамирования наблюдается затухание экспрессии ТФ в сравнении с контролем, что может быть связано с уменьшением показателей активности клеточного цикла и роста корня. В то же время, в зачатках боковых корней, когда наблюдается пик пролиферативной активности в местах образования боковых корней, экспрессия ТФ также находится на высоком уровне как в контроле, так и при клиностамировании. Разница в размерах боковых корней контроля и эксперимента обусловлена более поздним началом роста боковых корней в условиях клиностамирования, что подтверждает известные ранее данные об уменьшении ростовых показателей в условиях измененной гравитации. Появление ТФ в дифференцированных клетках можно рассматривать как способ включения гена на нужной стадии развития. Факторы выбирают гены, которые должны быть активированы в ответ на сигнал из окружения клетки и которые управляют действием транскрипционного аппарата.

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные данные о влиянии клиностамирования на процесс и длитель-

ность фаз клеточного цикла, а также последующие изменения роста и развития растений в данных условиях являются ключевыми при создании бортовых оранжерей и биорегенеративных систем жизнеобеспечения. Для нормализации роста и развития растений в подобных условиях необходимо либо нивелировать действие факторов космического полета (в частности измененной гравитации) на растительные клетки, либо повлиять на процессы регуляции клеточного цикла, сделав растение невосприимчивым к действию этих факторов. Однако для реализации первого варианта необходимо дополнительное оборудование, наличие которого на борту КА строго регламентировано из-за его массы. Наиболее вероятным может быть вмешательство в процесс регуляции транскрипции генов $\delta 3$ -циклина, что обеспечит его синтез и деградацию в конце пресинтетической фазы и таким образом обеспечит своевременный переход к фазе синтеза ДНК. В свою очередь, это позволит клеткам расти и делиться без задержек, что приведет к росту биомассы растений в условиях измененной гравитации, так же, как и у растений на Земле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артеменко О. А. Експресія генів $\delta 1$ - та $\delta 3$ -циклінів в кореневій меристемі *Pisum sativum* L. за умов кліностамирування // Цитологія та генетика. — 2006. — 40, № 2. — С. 36—41.
2. Артеменко О. А. Особливості регуляції клітинного циклу рослин в умовах зміненої гравітації // Космічна наука і технологія. — 2015. — 21, № 5. — С. 108—113.
3. Артеменко О. А., Троян В. М., Азарскова М. В. Вплив кліностамирування на конформаційний стан хроматину

- та кінетику першого клітинного циклу при проростанні насіння гороху // Укр. бот. журн. — 2005. — **62**, № 1. — С. 122—130.
4. *Медведев С.* Физиология растений. — СПб.: БХВ-Петербург, 2012. — 512 с.
 5. *Cockcroft C. E., den Boer D. G., Healy J. M., Murray J. A.* Cyclin D control of growth rate in plants // *Nature*. — 2000. — **405**. — P. 575—579.
 6. *Healy J. M., Menges M., Doonan J. H., Murray J. A.* The arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled // *J. Biol. Chem.* — 2001. — **276**. — P. 7041—7047.
 7. *Herranz R., Medina F. J.* Cell proliferation and plant development under novel altered gravity environments // *Plant Biol. (Stuttg)*. — 2014. — **16**, N 1. — P. 23—30.
 8. *John P. C., Mews M., Moore R.* Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division // *Protoplasma*. — 2001. — **216**, N 3—4. — P. 119—142.
 9. *Kitazono A., Fitz Gerald J., Kron S.* Cell cycle: regulation by cyclins // 2005. — DOI: 10.1038/npg.els.0004024.
 10. *Kordyum E. L.* Biology of plant cell microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — **171**. — P. 1—72.
 11. *Kordyum E. L.* Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity // *J. Plant Biol.* — 2014. — **16**, N 1. — P. 79—90.
 12. *Kvarnheden A., Yao J., Zhan X., O'Brien I., Morris B.* Isolation of three distinct CycD3 genes expressed during fruit development in tomato // *J. Exp. Boil.* — 2000. — **51** (352). — P. 1789—1797.
 13. *Lim S., Kaldis P.* Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation // *Development*. — 2013. — **140**. — P. 3079—3093.
 14. *Martines M. C., Jorgenseti J. E., Lawton M. A., Lamb C., Doerner P. W.* Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1992. — N 89. — P. 7360—7364
 15. *Medina F., Herranz R.* Microgravity environment uncouples cell growth and cell proliferation in root meristematic cells. The mediator role of auxin // *Plant Signal Behav.* — 2010. — **5**, N 2. — P. 176—179.
 16. *Meijer M., Murray J.* The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **43**. — P. 621—633.
 17. *Novak B., Sible J., Tyson J.* Checkpoints in the cell cycle // *Curr. Biol.* — 2008. — R759—R768. — DOI: 10.1016/j.cub.2008.07.001.
 18. *Scofield S., Jones A., Murray J. A. H.* The plant cell cycle in context // *J. Exp. Bot.* — 2014. — **65**, N 10. — P. 2557—2562.
 19. *Tank J. G., Pandya R. V., Thaker V. S.* Phytohormones in regulation of the cell division and endoreduplication process in the plant cell cycle // *RSC Adv.* — 2014. — **4** (24). — P. 12605—12613.
 20. *Umeda M., Shimotohno A., Yamaguchi M.* Control of cell division and transcription by cyclin-dependent Kinaseactivating Kinases in plants // *Plant Cell Physiol.* — 2005. — **46**, N 9. — P. 1437—1442.
- Стаття надійшла до редакції 19.10.17*

REFERENCES

1. *Artemenko O.* Expression of $\delta 1$ - and $\delta 3$ -cyclins in Pea root meristema under clinorotation. *Cytology and Genetics*, **40** (2), 36—41 (2006) [in Ukrainian].
2. *Artemenko O.* Features of plant cell cycle regulations under altered gravity. *Space science and technology*, **21** (N 5), 108 — 113 (2015) [in Ukrainian].
3. *Artemenko O., Troyan V., Azarskova M.* Clinorotation influence on the conformation and kinetic state of chromatin in the first cell cycle. *Ukr. Bot. J.*, **62** (1), 122—130 (2005) [in Ukrainian].
4. *Medvedev S.* Plant physiology, 512 p. (BHV-Petersburg, SPb, 2012) [in Russian].
5. *Cockcroft C. E., den Boer D. G., Healy J. M., Murray J. A.* Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature*, **405**, 575—579 (2000).
6. *Healy J. M., Menges M., Doonan J. H., Murray J. A.* The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7041—7047 (2001).
7. *Herranz R., Medina F. J.* Cell proliferation and plant development under novel altered gravity environments. *Plant Biol. (Stuttg)*, **16** (1), 23—30 (2014).
8. *John P. C., Mews M., Moore R.* Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma*, **216** (3-4), 119—142 (2001).
9. *Kitazono A., Fitz Gerald J., Kron S.* Cell cycle: regulation by cyclins // 2005. — doi: 10.1038/npg.els.0004024.
10. *Kordyum E. L.* Biology of plant cell microgravity and under clinostating. *Int. Rev. Cytol.*, **171**, 1—72 (1997).
11. *Kordyum E. L.* Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *J. Plant Biol.*, **16** (1), 79—90 (2014).
12. *Kvarnheden A., Yao J., Zhan X., O'Brien I., Morris B.* Isolation of three distinct CycD3 genes expressed during fruit development in tomato. *J. Exp. Boil.*, **51** (352), 1789—1797 (2000).
13. *Lim S., Kaldis P.* Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, **140**, 3079—3093 (2013).
14. *Martines M. C., Jorgenseti J. E., Lawton M. A., Lamb C., Doerner P. W.* Spatial pattern of cdc2 expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, N 89, 7360—7364 (1992).

15. Medina F., Herranz R. Microgravity environment uncouples cell growth and cell proliferation in root meristematic cells. The mediator role of auxin. *Plant Signal Behav.*, **5** (2), 176–179 (2010).
16. Meijer M., Murray J. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.*, **43**, 621–633 (2000).
17. Novak B., Sible J., Tyson J. Checkpoints in the cell cycle. *Curr Biol.*, R759–R768 (2008). — doi: 10.1016/j.cub.2008.07.001.
18. Scofield S., Jones A., Murray J. A. H. The plant cell cycle in context. *J. Exp. Bot.*, **65** (10), 2557–2562 (2014).
19. Tank J. G., Pandya R. V., Thaker V. S. Phytohormones in regulation of the cell division and endoreduplication process in the plant cell cycle. *RSC Adv.*, **4** (24), 12605–12613 (2014).
20. Umeda M., Shimotohno A., Yamaguchi M. Control of cell division and transcription by cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in plants. *Plant Cell Physiol.*, **46** (9), 1437–1442 (2005).

Received 19.10.17

О. А. Артеменко

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

ЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ДЛЯ РОЗРОБКИ ТЕХНОЛОГІЙ КОСМІЧНОГО РОСЛИННИЦТВА

Майбутні довготривалі пілотовані експедиції потребують величезної кількості метаболічних ресурсів — води, їжі, кисню, для виробництва яких необхідні спеціальні умови і масивне обладнання, занадто важке для сучасних КА. Крім того, такі системи життєзабезпечення не можуть функціонувати без високого рівня кругообігу. Тому рослини розглядаються як необхідне джерело їжі та кисню у біореєнеративних системах життєдіяльності довготривалих космічних місій. Вивчення принципів функціонування таких систем різного ступеня складності та розробка наукових основ їхнього створення — це головна мета космічного рослинництва. В роботі показано важливість вивчення параметрів росту, розмноження

рослин і особливостей подій клітинного циклу в умовах клиноостатування, а саме: мітотичної активності, експресії генів-регуляторів клітинного циклу (циклінів та циклінзалежних кіназ), транскрипційних факторів, які сприяють ініціації програми підвищення або зниження транскрипції генів. На все це необхідно зважати при добірці рослин, які легко засвоюються людиною, даних про склад ґрунту, приросту біомаси, при вивченні росту та диференціації клітин для отримання повноцінного насіння в умовах мікрогравітації.

Ключові слова: клітинний цикл, мікрогравітація, цикліни, транскрипційний фактор, рослини.

О. А. Артеменко

Institute of Botany of the National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE IMPORTANCE OF CELL CYCLE PARAMETERS FOR THE DEVELOPMENT OF SPACE PLANT GROWING

The future long-term expeditions require a huge amount of metabolic resources — water, food, oxygen. These resources require special conditions and payload, which is too heavy for existing spacecrafts. In addition, such life support systems can not be implemented without a high level of cycling. Therefore, the plants could be considered as a necessary source of food and oxygen in the bioregenerative life systems of long-term space missions. The main tasks of space plant cultivation are the study of the principles of the functioning of such systems of different complexity and the development of scientific basis for their creation. In present work we pointed out the importance of plant growth parameters, generation and cell cycle events under clinorotation, specifically: mitotic activity, expression of the cell cycle genes-regulating (cyclins and cyclins depending kinases), transcription factors for initiation of decrease/increase of gene's transcription program. All these parameters must be taken into account when we choose the digestible plants and the data about soil composition and biomass increment as well as when we study a cell growth and differentiation for collecting spoiled seeds under microgravity.

Keywords: cell cycle, microgravity, cyclins, transcription factor, plants.