

**ОБРАБОТКА ЦИКЛОГЕКСИМИДОМ СПОСОБСТВУЕТ
ВОССТАНОВЛЕНИЮ КОРТИКАЛЬНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК,
РАЗРУШЕННЫХ ОРИЗАЛИНОМ, В КЛЕТКАХ ПРОРОСТКОВ**

Arabidopsis thaliana

Ключевые слова: оризалин, организация кортикальных микротрубочек, циклогексимид, *Arabidopsis thaliana* линия GFP-Tu α b

Вступление

Микротрубочки эукариотических клеток состоят из гетеродимеров α - и β -тубулина, которые образуют полый цилиндр с внешним диаметром равным около 25 нм [9]. В клетках растений микротрубочки формируют несколько типов структур: веретено деления, фрагмопласт, препрофазную ленту и сеть кортикальных микротрубочек. Основной функциональной задачей первых трёх типов микротрубочковых структур является организация деления клеток, тогда как система кортикальных микротрубочек контролирует направленный рост клеток: пространственная упорядоченность пучков кортикальных микротрубочек предопределяет направление депозиции во внеклеточном матриксе вновь синтезированных целлюлозных микрофибрилл и, таким образом, направление действия механических сил тургорного давления, растягивающих клетку в заданном направлении [2, 14].

На сегодняшний день в научных исследованиях и прикладных методиках широко используются вещества, которые избирательно разрушают микротрубочки в клетках, специфически связываясь с тубулинами и препятствуя их полимеризации в микротрубочки. Действие большинства антимикротрубочковых веществ является обратимым – отмывание ингибитора, как правило, приводит к постепенному восстановлению микротрубочек в клетках. Однако, исследования показали, что восстанавливающиеся микротрубочковые структуры часто имеют либо аномальную морфологию, либо восстановление определённых типов микротрубочковых структур затруднено. В частности, после удаления антимикротрубочковых веществ из питательной среды в ряде случаев было отмечено формирование многополюсных веретён деления, разветвлённых фрагмопластов – и, как следствие, появление многоядерных дочерних клеток и клеток с деформированными клеточными стенками [6, 7]. Кроме того, проведенные исследования показали, что в интерфазных клетках в период восстановления в кортикальном слое цитоплазмы формируются короткие пучки кортикальных микротрубочек, при этом клетки оказываются неспособными восстановить из этих фрагментов целостную кортикальную сеть микротрубочек и, как следствие, невозможным оказывается возобновление направленного роста клеток [10, 18, 22]. Известно, что пространственная организация кортикальных микротрубочек поддерживается многочисленными белками,

ассоциированными как с самими микротрубочками, так и с цитоплазматической мембраной, а через неё – и с целлюлозо-синтетазными комплексами клетки [8, 13]. В ряде исследований было показано, что обработка антимиотрубочковыми веществами оказывает существенное влияние на характер экспрессии генов [4, 5, 15, 19, 20]. Таким образом, неспособность клетки к восстановлению пространственной организации кортикальных микротрубочек после отмывания антимиотрубочковых веществ может быть связана с включением или выключением определённых генов. Мы предположили, что одним из условий преодоления клеткой восстановительного блока может быть включение других внутриклеточных программ, прямо или опосредованно вовлечённых в регулирование организации кортикальных микротрубочек. Для проверки данной гипотезы в качестве переключателя клеточных программ в восстановительный период нами был использован циклогексимид, который является не только общеизвестным ингибитором синтеза белка, но и оказывает существенное влияние как на организацию кортикальных микротрубочек в клетках [1, 16], так и на характер экспрессии генов [3, 21, 23].

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали трёхдневные проростки *Arabidopsis thaliana* линии GFP-Tuα6, экспрессирующие GFP-α6-тубулин – один из основных структурных белков микротрубочек (семена линии GFP-Tuα6 были любезно предоставлены Dr. Andrei Smertenko, UK).

Для разрушения микротрубочек трёхдневные проростки *A. thaliana* линии GFP-Tuα6 обрабатывали раствором антимиотрубочкового гербицида оризалина в концентрации 15 мкМ на протяжении 2 ч («Dow Elanco»; стоковый раствор 0,15 М в ацетоне). Часть обработанных оризалином проростков, после отмывания гербицида, была подвергнута действию циклогексимиды – обратимого ингибитора синтеза белка - в концентрации 1-10 мкМ на протяжении 4 ч («Sigma»; стоковый раствор 10 мМ в этаноле). Динамику восстановления цитоплазматических и кортикальных микротрубочек изучали через 24, 48, 72 и 96 ч после отмывания ингибиторов. Визуализацию микротрубочек проводили с помощью инвертированного лазерного сканирующего микроскопа с аргонным лазером (длина волны экситации 488 нм, длина волны эмиссии – 665 нм).

Результаты

Исследование клеток гипокотыля трёхдневных проростков *A. thaliana* линии GFP-Tuα6 с помощью лазерного сканирующего микроскопа показало присутствие высокоупорядоченных поперечно, косо и продольно ориентированных пучков кортикальных микротрубочек в клетках. Обработка проростков растворами оризалина в концентрации 15 мкМ на протяжении 2 ч приводила к полной деполимеризации микротрубочковых структур в клетках. Отмывание гербицида и последующая пост-инкубация проростков в безгербицидной среде способствовала постепенному восстановлению

микротрубочкового цитоскелета: уже через 24 ч было отмечено частичное восстановление цитоплазматических, но не кортикальных, микротрубочек, которые имели хаотическую ориентацию в цитоплазме клеток гипокотилля. Через 48 ч пост-инкубации в свежей питательной среде в некоторых клетках гипокотилля появились короткие неупорядоченные фрагменты кортикальных микротрубочек. Однако, не смотря на последующий более длительный период пост-инкубации – 72 ч и 96 ч, соответственно, – клетки гипокотилля так и не смогли восстановить организацию кортикальных микротрубочек, характерную для интактных проростков.

Обработка трёхдневных проростков *A. thaliana* линии GFP-Tuα6 растворами циклогексимида в концентрации 1 мкМ на протяжении 4 ч приводила к истончению сети кортикальных микротрубочек по сравнению с контролем, тогда как 4 ч инкубация проростков в 10 мкМ циклогексимида способствовала нарушению параллельной организации микротрубочек друг относительно друга, приводила к появлению в клетках гипокотилей микротрубочек смешанной ориентации и к накоплению микротрубочковых «узлов» в клетках.

Часть проростков *A. thaliana* линии GFP-Tuα6 после отмывания оризалина была подвергнута 4 ч пост-инкубации в 1-10 мкМ растворах циклогексимида. После трёхкратного отмывания токсина проростки переносили в свежую питательную среду и, в целом, пост-инкубационный период для таких проростков составил 24-96 ч. Результаты микроскопических исследований динамики восстановления микротрубочек в клетках гипокотилей проростков *A. thaliana* линии GFP-Tuα6, прошедших часть пост-инкубационного периода в растворах ингибитора синтеза белка циклогексимида, приведены в таблице 1.

Проведенные исследования показали, что пост-инкубация проростков в растворах циклогексимида приводила к восстановлению организации не только цитоплазматических, но и кортикальных микротрубочек. Уже через 24 ч после отмывания оризалина и, соответственно, через 20 ч после пост-инкубации в 1 мкМ циклогексимида, в клетках гипокотилля проростков было показано появление коротких пучков кортикальных микротрубочек хаотической ориентации, а после пост-инкубации в 10 мкМ растворе циклогексимида – было выявлено полное восстановление организации кортикальных микротрубочек. Через 48 ч после отмывания оризалина, у проростков, прошедших часть пост-инкубационного периода в 1 мкМ растворе циклогексимида, было показано полное восстановление организации кортикальных микротрубочек, тогда как проростки, обработанные 10 мкМ циклогексимидом, погибли (по-видимому, данная концентрация токсина способна запускать в клетках программу клеточной гибели). Следует отметить, что восстановление организации кортикальных микротрубочек коррелировало с постепенным восстановлением полярного роста проростков, обработанных 1 мкМ раствором циклогексимида.

Обсуждение

Известно, что гербицид динитроанилинового ряда - оризалин, специфически и обратимо связывается с мономерами растительного тубулина, что приводит к нарушению процессов полимеризации и к ускорению процессов

деполимеризации микротрубочек в клетке [11]. Обработка клеток и тканей растения растворами оризалина сопровождается прогрессивной потерей всех типов микротрубочковых структур клетки. Отмывание гербицида и последующая пост-экспозиция клеток культуры или проростков на свежей питательной среде приводит к постепенному восстановлению микротрубочек в клетках. В ряде исследований было отмечено, что восстановление кортикальных микротрубочек после удаления оризалина из питательной среды затруднено. Так, в клетках мезофилла пшеницы обработка 10 мкМ растворами оризалина приводила к полной разборке микротрубочек; после отмывания гербицида восстановление микротрубочек шло медленно, при этом клетки утрачивали способность устанавливать поперечно-ориентированные пучки кортикальных микротрубочек, росли изодиаметрически и не могли сформировать лопасти, типичные для мезофильных клеток [22]. Проростки кукурузы обрабатывали оризалином в концентрации 5 мкМ на протяжении 3 ч и затем гербицид удаляли из питательной среды. После 48 ч восстановительного периода корни проростков приобретали характерную свэллинговую форму, при этом у большинства клеток кортекса кортикальные микротрубочки полностью отсутствовали, а в некоторых эпидермальных клетках было показано присутствие только фрагментарных микротрубочковых структур [10].

Проведенные нами исследования подтвердили описанный в литературе феномен: восстановление организации кортикальных микротрубочек в клетках гипокотилей проростков *A. thaliana* линии GFP-Tuα6, обработанных оризалином, за весь период наблюдений не происходило (вплоть до 96 ч пост-инкубации в свежей питательной среде). Причина формирования такого восстановительного блока на сегодняшний день остаётся не известной. Согласно литературным данным, в результате деполимеризации микротрубочек в клетках различных организмов запускаются программы, изменяющие характер экспрессии генов. Так, обработка клеток амёбы *Physarum polycephalum* антимикуротрубочковыми веществами колхицином, винбластином, подофиллотоксином и гризеофульвином в течение 5-15 мин ингибировала синтез белка и стимулировала синтез новых РНК-транскриптов [4]. Обработка клеточных линий животных антимикуротрубочковыми веществами, в частности, винбластином, нокодазолом, доластином, индуцировала экспрессию генов регуляторных и структурных белков [5, 20]. Исследования, проведенные С. Rosette и М. Karin [19] на культуре клеток млекопитающих показали, что деполимеризация микротрубочек активирует транскрипционный фактор NF-κB и индуцирует NFκB-зависимую экспрессию генов. В клетках трансгенных растений *Arabidopsis* обработка оризалином индуцировала экспрессию гена фосфоглицерат мутаза [15]. Мы предположили, что одной из причин замедленного восстановления кортикальных микротрубочек в клетках гипокотыля после обработки оризалином, может быть изменение характера экспрессии генов, вызванное разрушением микротрубочек. И, следовательно, снять восстановительный блок также возможно только путём переключения клеточной программы. Известно, что перестройка микротрубочкового цитоскелета является одним из важнейших звеньев во время реализации

практически всех онтогенетических внутриклеточных программ и программ ответа растительных клеток на действие факторов окружающей среды [12, 17]. По-этому теоретически, в качестве переключателя клеточной программы могут быть использованы фитогормоны (ауксин, цитокинин, гиббереллин), низкие температуры, свет определённой длины волны, химические ингибиторы/стимуляторы - т.е., любые факторы, влияющие на организацию микротрубочкового цитокелета и на характер экспрессии генов. В наших исследованиях в качестве фактора, вызывающего переключение внутриклеточной программы, мы использовали раствор циклогексимида. Согласно литературным данным, циклогексимид является не только ингибитором синтеза белка, но и оказывает существенное влияние на организацию кортикальных микротрубочек. Так, обработка корней кукурузы растворами циклогексимида приводила к быстрой и полной потере поперечно-ориентированных кортикальных микротрубочек, а индивидуальные микротрубочки утрачивали способность формировать пучки [1]; обработка корней проростков лука растворами циклогексимида в концентрации 11-360 мкМ на протяжении 2 ч приводила к исчезновению кортикальных микротрубочек и к их последующему появлению в глубине цитоплазмы клеток [16]. Кроме того, циклогексимид является активным переключателем работы генов: обработка клеток растений растворами циклогексимида индуцировала экспрессию генов холодового стресса [3, 23], в клетках *Dictyostelium discoideum* обработка циклогексимидом изменяла характер экспрессии генов – активировала работу одних и ингибировала работу других генов [21].

Проведенные нами исследования показали, что обработка проростков *A. thaliana* линии GFP-Tu α 6 растворами циклогексимида в концентрации 1-10 мкМ приводила к изменению организации кортикальных микротрубочек, а 4 ч пост-инкубация проростков, обработанных оризалином, в 1-10 мкМ растворах циклогексимида способствовала полному восстановлению организации кортикальных микротрубочек в клетках гипокотилей проростков в течение 24-48 ч восстановительного периода.

Таким образом, задержка восстановления организации кортикальных микротрубочек после обработки проростков оризалином, по-видимому, связана с реализацией определённых внутриклеточных программ. При этом сформированный восстановительный блок может быть снят путём переключения клеточной программы, в частности, с помощью кратковременной инкубации проростков в растворах циклогексимида.

Список литературы:

1. Baluska F., Barlow P.W., Hauskrecht M., Kubica S., Parker J.S., Volkmann D. Microtubule arrays in maize root cells. Interplay between the cytoskeleton, nuclear organization and post-mitotic cellular growth patterns // *New Phytologist*. – 1995. – Vol. 130, No. 2. - P. 177-192.
2. Baskin T.I., Beemster G.T.S., Judy-March J.E., Marga F. Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity

- of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 135. – P. 1-12.
3. Berberich T., Kusano T. Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize // Molecular and General Genetics MGG. – 1997. – Vol. 254, No. 3. – P. 275-283.
 4. Bernstam V.A., Gray R.H., Bernstein I.A. Effect of microtubule-disrupting drugs on protein and RNA synthesis in *Physarum polycephalum* amoebae // Arch. Microbiol. – 1980. – Vol. 128, No. 1. – P. 34-40.
 5. Bourguarel-Rey V., Khyari S.El., Rimet JO., Bordas B., Guigal N., Braguer D., Seree E., Barra Y., Briand C. Opposite effect of antimicrotubule agents on *c-myc* oncogene expression dependent on the cell lines used // Eur. J. Cancer. – 2000. – Vol. 36, Issue 8. – P. 1043-1049.
 6. Clearly A.L., Hardham A.R. Depolymerization of microtubule arrays in root tip cells by oryzalin, and their recovery by modified nucleation patterns // Can. J. Bot. – 1988. – Vol. 66. – P. 2353-2366.
 7. Galatis B., Apostolakos P. Patterns of microtubule reappearance in root cells of *Vigna sinensis* recovering from a colchicine treatment // Protoplasma. – 1991. – Vol. 160, No. 2-3. - P. 131-143.
 8. Gardiner J., Marc J. Putative microtubule-associated proteins from the *Arabidopsis* genome // Protoplasma. – 2003. – Vol. 222. – P. 61-74.
 9. Goddard R.H., Wick S.W., Silflow C.D., Snustad D.P. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton // Plant Physiol. – 1994. – Vol. 104. – P. 1-6.
 10. Hasenstein K.H., Blancaflor E.B., Lee L.S. The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots // Physiol. Plant. – 1999. – Vol. 105, No. 4. – P. 729-738.
 11. Hugdahl J.D., Morejohn L.C. Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. // Plant Physiol. – 1993. – Vol. 102. – P. 725-740.
 12. Hussey P.J. The plant cytoskeleton in cell differentiation and development Oxford: Blackwell Publishing. – 2004.
 13. Hussey P.J., Hawkins T.J., Igarashi H., Kaloriti D., Smertenko A. The plant cytoskeleton: Recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1 // Plant Mol. Biol. – 2002. – Vol. 50. – P. 915-924.
 14. Kohorn B.D. Plasma membrane-cell wall contacts // Plant Physiol. – 2000. – Vol. 124.- P. 31-38.
 15. Mazareli M., Lennon K.A., Puthoff D.P., Rodermeil S.R., Baum T.J. Expression of an *Arabidopsis* phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes // Plant Mol. Biol. – 2003.- Vol. 53. – P. 513-530.
 16. Mineyuki Y., Iida H., Anraku Y. Loss of microtubules in the interphase cells of onion (*Allium cepa* L.) root tips from the cell cortex and their appearance in the cytoplasm after treatment with cycloheximide // Plant Physiol. – 1994. – vol. 104. – P. 281-284.

17. Nick P. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants // *Int. Rev. Cyt.* – 1998. – Vol. 184. – P. 33-80.
18. Quader H., Wagenbreth I., Robinson D.G. Structure, synthesis and orientation of microfibrils. V. On the recovery of *Oocystis solit* // *Cytobiologie.* – 1978. – Vol. 18. – P. 39-51.
19. Rosette C., Karin M. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kB // *J. Cell bio.* – 1995. – Vol. 128, No. 6. – P. 1111-1119.
20. Shimoyama T., Hamano T., Natsume T., Koizumi F., Kiura K., Tanimoto M., Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an antimicrotubule agent, TZT-1027 (Soblidotin), *in vitro* // *The Pharmacogenomic Journal.* – 2006. – Vol. 6. – P. 388-396.
21. Singleton C.K., Manning S.S., Feng Y. Effect of protein synthesis inhibition on gene expression during early development of *Dictyostelium discoideum* // *Mol. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 8, No. 1. – P. 10-16.
22. Wernicke W., Jung G. Role of cytoskeleton in cell shaping of developing mesophyll of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Eur. J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 57, No. 1. – P. 88-94.
23. Zarka D.G., Vogel J.T., Cook D., Thomashow M.F. Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature // *Plant Physiology.* – 2003. – Vol. 133, No. 2. – P. 910-918.

О. Кундельчук

**ОБРОБКА ЦИКЛОГЕКСИМІДОМ СПРИЯЄ ВІДНОВЛЕННЮ
ОРГАНІЗАЦІЇ КОРТИКАЛЬНИХ МІКРОТРУБОЧОК, ЗРУЙНОВАНИХ
ОРИЗАЛІНОМ, В КЛІТИНАХ ПРОРОСТКІВ *Arabidopsis thaliana***

Ключові слова: оризалін, організація кортикальних мікротрубочок, циклогексимід, *Arabidopsis thaliana* лінія GFP-Tuαβ

Вперше показано, що гальмування відновлення просторової організації кортикальних мікротрубочок в рослинних клітинах після обробки антимікротрубочковими сполуками може бути знятим шляхом переключення клітинних програм, зокрема за допомогою пост-інкубації проростків *Arabidopsis thaliana* лінії GFP-Tuαβ протягом 4 г в 1 мкМ розчинах циклогесиміду.

О. Kundelchuk

**THE CYCLOHEXIMIDE POSTINCUBATION COULD PROMOTE THE
CORTICAL MICRTOTUBULES ORGANIZATION RECOVERY AFTER
ORYZALINE TREATMENT IN *Arabidopsis thaliana* SEEDLINGS**

Key words: oryzalin, cortical microtubules organization, cycloheximide, *Arabidopsis thaliana* line GFP-Tuαβ

The inhibition of plant cortical microtubules recovery after oryzaline treatment could be overridden through cellular programme switching by *Arabidopsis thaliana* line GFP-Tuαβ seedlings post-incubation with 1 mkM cycloheximide, 4h.

Таблица 1.

Динамика восстановления интерфазных микротрубочек в клетках гипокотилей проростков *A. thaliana* линии GFP-Tua6 после обработки оризалином

Общая длительность восстановительного периода	Условия первых 4 ч восстановительного периода после обработки проростков оризалином:					
	свежая питательная среда		4 ч 1 мкМ циклогексимид		4 ч 10 мкМ циклогексимид	
	цитоплазматические МТ	кортикальные МТ	цитоплазматические МТ	кортикальные МТ	цитоплазматические МТ	кортикальные МТ
0 ч	-	-	-	-	-	-
24 ч	-/+	-	+	-/+	+	+
48 ч	+	-/+	+	+	+	ГП
72 ч	+	-/+	+	+	+	ГП
96 ч	+	-/+	+	+	+	ГП

“-“ -полное отсутствие микротрубочек в клетках;

“-/+” - появление фрагментов микротрубочек соответствующего типа;

“+” – появление хорошо организованных микротрубочек соответствующего типа;

МТ – микротрубочки; ГП – гибель проростков.