

## ВЛИЯНИЕ МЕДИ НА ЦИТОСКЕЛЕТ РАЗНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК КОРНЕЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Медь (Cu) является микроэлементом, который играет важную роль в процессах фотосинтеза, дыхания, антиоксидантной активности, обмене веществ через клеточную стенку. У растений медь является кофактором в пластоцианине, супероксиддисмутазы, цитохром-с-оксидазы и этилена; рецепторных апопластических оксидаз: аскорбата оксидазы, диаминооксидазы и полифенолоксидазы [1]. Избыток Cu обладает токсичным эффектом и влияет на ряд жизненно важных функций в клетках растений. В частности показано, что медь в высоких концентрациях ингибирует пролиферацию клеток корней *Vigna unguiculata* L. [2] и *Allium sativum* L. [3], а также воздействует на микротрубочки веретена деления и кортикальной сетки интерфазных клеток [3]. Влияние меди на актиновые филаменты (микрофиламенты) растительных клетках мало изучено. Известно лишь, что в клетках главных корней *Brassica napus* L., обработанных разными концентрациями  $\text{CuSO}_4$  *in vitro*, наблюдается уменьшение количества полимеризованного актина (F-актина) с одновременным увеличением количества свободного глобулярного актина (G-актина), однако в отдельных случаях деполимеризация микрофиламентов не происходит, что указывает на возможную сборку актина *de novo* [4]. В растениях Cu аккумулируется преимущественно в корнях (35–45 %), в особенности при его повышенном содержании в почве [5]. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния Cu на актиновые филаменты разных типов клеток главных корней *Arabidopsis thaliana*.

### Материалы и методы

Объектом исследования были четырехдневные проростки линии *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Landsberg erecta (Ler.)), экспрессирующей химерный ген *gfp-fabd2* (F-актин связывающий домен (ABD) гена фимбрина (AtFIM1) из *A. thaliana*, слитый с геном *gfp*), позволяющий визуализировать актиновые филаменты в клетках *in vivo* [6]. Для поверхностной стерилизации семена *A. thaliana* выдерживали в 6 %-ном (v:v) растворе гипохлорита натрия

в течение 10–15 мин с последующим пятикратным отмыванием стерильной дистиллированной водой, затем их переносили на твердую питательную среду, содержащую половинный набор макро- и микросолей MS (Duchefa, Нидерланды) (2,2 г/л), сахарозу (10 г/л), тиамин гидрохлорид (0,1 мг/л), мио-инозитол (100 мг/л) и джелрайт (4 г/л), pH 5,7. Высаженные семена сначала стратифицировали при температуре +4 °C в течение 24 ч, а затем проращивали при постоянной температуре +22 °C и 16/8-часовом фотопериоде в течении 4-х дней.

Далее, проростки обрабатывали  $\text{CuSO}_4$  (Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 5, 10 и 20 мкМ на протяжении 1, 6, 24, 48 и 72 ч.

Для изучения влияния  $\text{CuSO}_4$  на рост главных корней *A. thaliana* определяли показатели относительного прироста корней (%) [7], рассчитанные как соотношение фактического прироста (мм) обработанных корней к фактическому приросту корней контроля (мм), вычисленное по формуле  $D = ((L_{\text{ср}} - L_0) / L_0) * 100 \%$  в программе Microsoft Office Excel 2010, где D – показатель относительного прироста главных корней, %;  $L_{\text{ср}}$  – средние значения длин корней обработанных проростков, мм;  $L_0$  – средние значения длин корней необработанных проростков (контроль), мм. Значение длин корней (мм) приводили как среднее арифметическое (M) ± среднее отклонение (m). Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Canon Power Shot G6 (Canon, Тайвань) в режиме макросъемки сразу после завершения обработки проростков, а затем через 24, 48 и 72 ч. Длину корней определяли с помощью программы ImageJ (версия 1.38 d), которая находится в свободном доступе на сайте <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Изменения морфологии главных корней проростков *A. thaliana* изучали с помощью светового люминесцентного микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия), объективы Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5 и 40x/1.30 Oil DIC, после 6-, 24-, 48- и 72-часовой обработки  $\text{CuSO}_4$ . Витальное окрашивание 0,5 мг/мл пропидиум йодидом (Sigma-Aldrich, США) проводили на протяжении 5 мин, с последующим трехкрат-

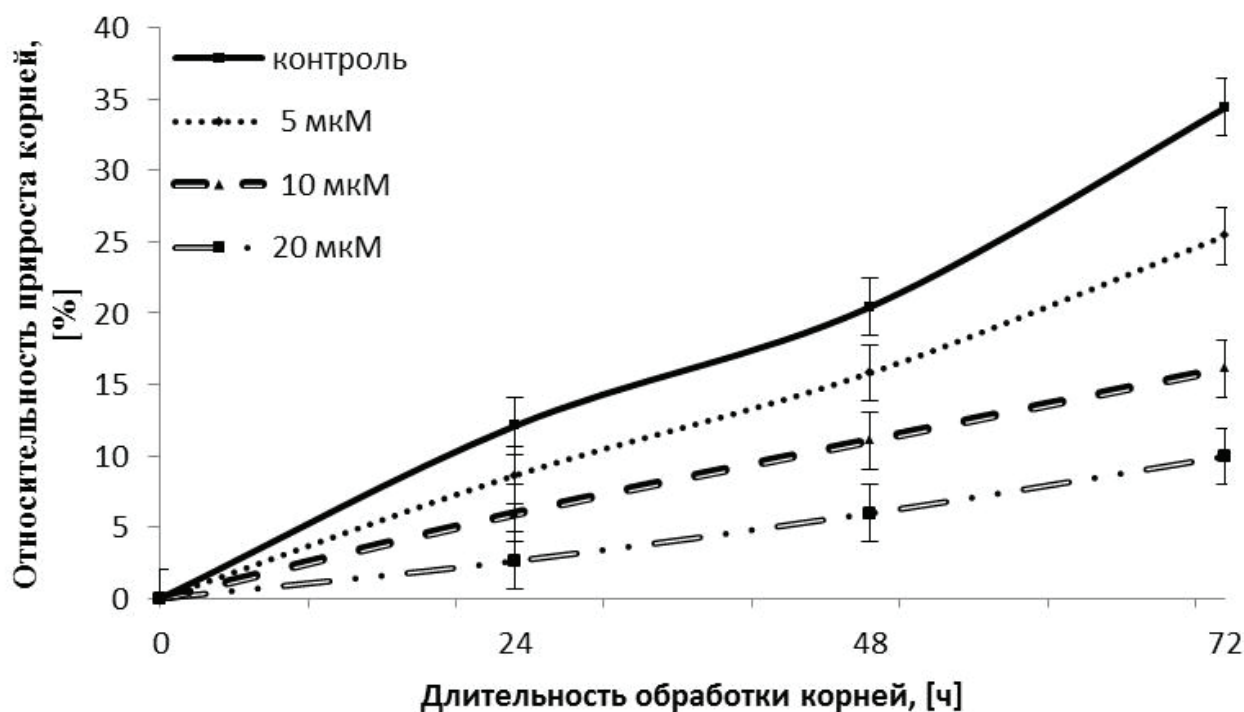


Рис. 1. Влияние ионов меди на рост главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2)

ным отмыванием в фосфатном буфере (pH = 7,1). Исследования проводили с использованием следующих параметров: длина волны возбуждения ВР 530-585, разделительного фильтра FT 600 и эмиссионного фильтра LP 615 с использованием объективов Plan-Neofluar 10x/0.30, 20x/0.5. b Организацию микрофиламентов в разных типах клеток *A. thaliana* после обработки  $\text{CuSO}_4$  на протяжении 1–2 ч изучали прижизненно с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Германия) при следующих параметрах: аргоновый лазер с длиной волны 488 нм, разделительный фильтр FT 405/488, эмиссионный фильтр LP 505-570, объективы Plan Arochromat 40x/1.4 DIC и 60x/1.4 Oil DIC. Индивидуальную конфигурацию определяли для каждого объекта путем изменения параметров скорости сканирования, точечной диафрагмы и детектора луча. С помощью программного обеспечения версии 4SP2 LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) получали трехмерные структуры организации микрофиламентов на основе серии оптических срезов (*Z*-стеков) с интервалом 0,2–0,7 мкм. Все исследования проводили в 3–5 повторах с использованием не менее 10 проростков для каждой концентрации.

### Результаты и обсуждение

Нами установлено, что обработка  $\text{CuSO}_4$  ингибирует рост главных корней проростков *A. thaliana*. В частности через 24 ч прирост корней уменьшался в 1,1 раза при обработке  $\text{CuSO}_4$  в концентрации 5 мкМ, в 1,5 раза – при 10 мкМ и в 0,9 раза – при 20 мкМ. В свою очередь обработка сульфатом меди на протяжении 48 и 72 ч приводила к ингибированию роста корней в 1,1 и 1,4 раза (5 мкМ), в 1,5 и 1,4 раза (10 мкМ) и в 0,8 и 1,2 раз (20 мкМ), соответственно (рис. 1).

Причиной данных изменений, как нами было установлено, явилось влияние Cu на структуру клеток и их актиновые филаменты. В частности, показаны изменения морфологии корней *A. thaliana* после 24-часовой обработки 5–20 мкМ Cu, которые усиливались при увеличении времени экспозиции до 48–72 ч, частота возникновения нарушений и их обозначение представлены в таблице 1.

Нами было обнаружено потемнение клеток в зоне деления, переходной и зоны элонгации корней (рис. 2). Для установления причины таких потемнений клетки обрабатывали пропидиум йодидом, который детектирует только мертвые клетки [8]. Таким образом, нами продемонстрировано, что обработка  $\text{CuSO}_4$  приводит к гибели клеток, скорее всего путем апоптоза (рис. 2).

Влияние  $\text{CuSO}_4$  на протяжении 48 ч. на морфологию главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2)

Концентрация $\text{CuSO}_4$ , мкМ	Рост главных корней	Свеллинг эпидермальных клеток переходной зоны и зоны дифференциации	Отмирание клеток зоны деления, переходной и зоны растяжений	Корневые волоски		
				инициация	рост	ветвление
5	↓	+	+	-	↑	+
10	↓	+	+	+/-	↑	+
20	↓	+	+	+/-	↑	+

Примечания: условные обозначения: + появление в сравнении с контролем, +/- нерегулярное появление эффекта, стимуляция роста, ингибирование роста.

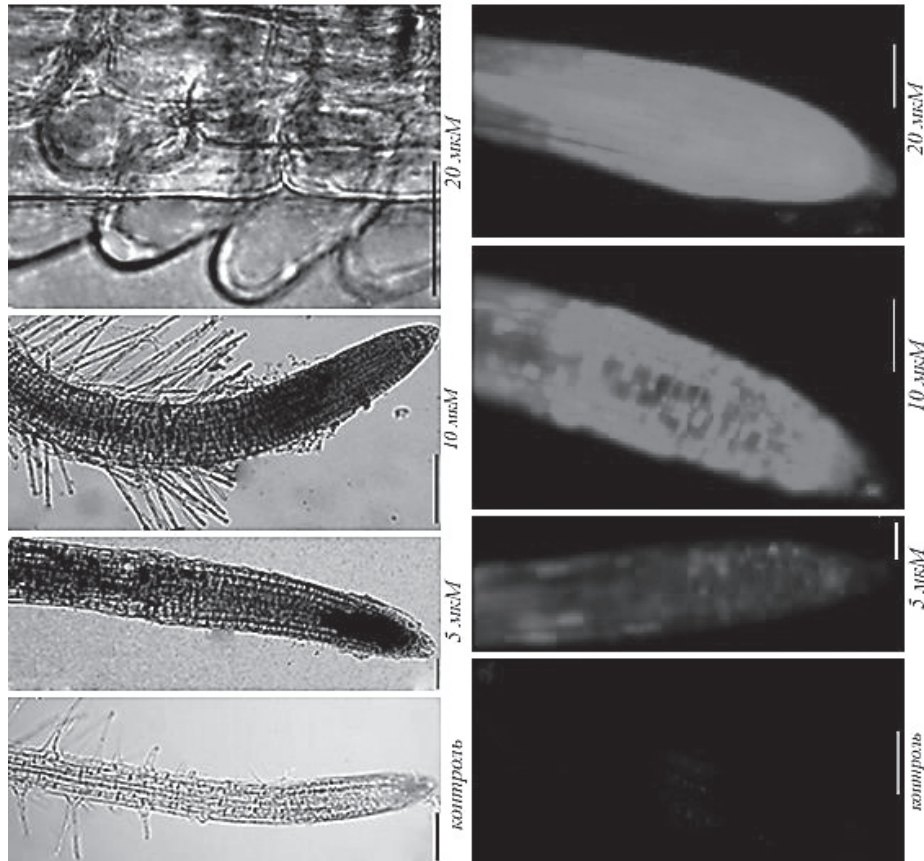
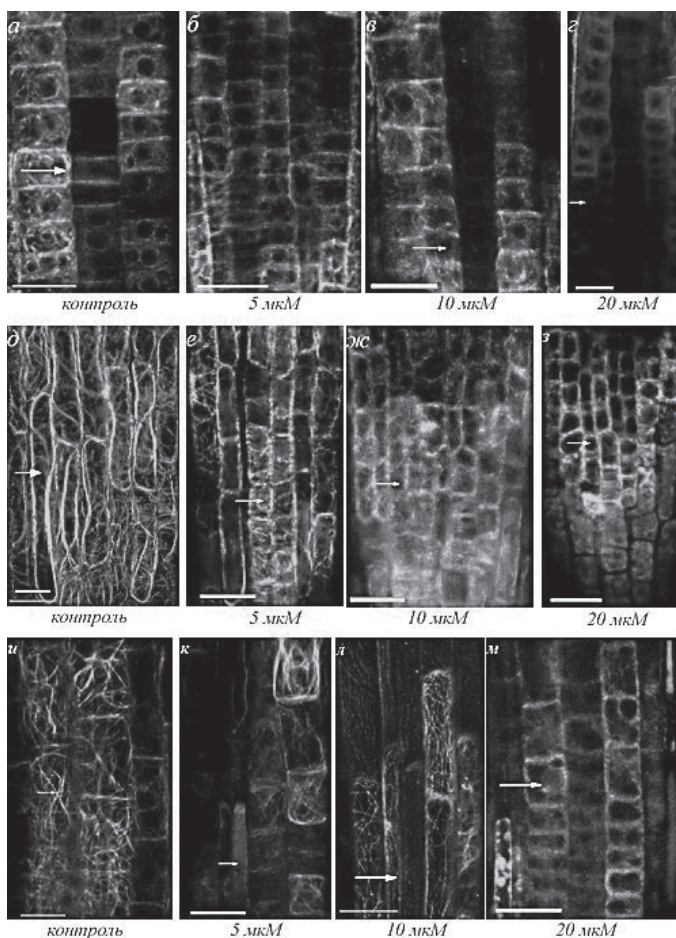


Рис. 2. Влияние меди на морфологию главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) после 48 ч обработки. Масштаб: 200 мкм

Таким образом, нами продемонстрировано возникновение стресс-индуцированного ответа корней на интоксикацию  $\text{Cu}$ , который проявляется в ингибировании роста главных корней с одновременной активацией инициации и роста корневых волосков. Ранее подобное влияние  $\text{Cu}$  на морфологию корней не было описано.

Подобные изменения в некоторой степени можно объяснить влиянием ионов меди на цитоскелет, что нами продемонстрировано далее. Для установления непосредственного влияния  $\text{Cu}$  на актиновые филаменты живых клеток

нами была использована линия *A. thaliana*, экспрессирующая химерный ген *gfp-fabd2*, продукт которого, белок *gfp-fabd2*, декорирует актиновые филаменты клеток данной линии. В живых интерфазных клетках меристематической зоны необработанных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) актиновые филаменты представляют собой плотную относительно однородную сеть из высокодинамических структур (рис. 3 а), а в дифференцированных клетках корневого апекса – гетерогенную сеть из удлиненных закрученных и утолщенных тяжей (рис. 3).



**Рис. 3.** Организация микрофиламентов в разных типах клеток корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) после обработки проростков медью в течение 1 ч: а, б, в, г – меристематические клетки; д, е, ж, з – эпидермальные клетки переходной зоны; и, к, л, м – эпидермальные и субэпидермальные клетки зоны элонгации. Масштаб: 200 мкм

При обработке 5 мкМ  $\text{CuSO}_4$  существенных изменений в организации микрофиламентов меристематических клеток нами не было обнаружено, в то время как при обработке 10 и 20 мкМ наблюдалась их частичная деполимеризация. При обработке всеми обозначенными выше концентрациями в эпидермальных клетках зоны деления и переходной зоны наблюдалась повышенная неупорядоченность микрофиламентов, их частичная деполимеризация или в отдельных клетках формирование утолщенных тяжей (рис. 3. е, ж, з). В эпидермальных клетках зоны элонгации при обработке 5 мкМ наблюдалось формирование более утолщенных и гетерогенных тяжей, а при 10, 20 мкМ частичная или полная деполимеризация последних (рис. 3 к, л, м). В клетках кортекса формировалась более утолщенная однородная сеть микрофиламентов при воздействии 10 и 20 мкМ, в то время как обработка 5 мкМ не вызвала видимых эффектов.

В атрихобластах, трихобластах и корневых волосках наблюдалось нарушение организации микрофиламентов, они приобретали частично продольную ориентацию, а также были частично деполимеризированы.

### Выводы

Таким образом, нами впервые продемонстрирована взаимосвязь между ингибированием роста главного корня, изменениями его морфологии и нарушениями организации актиновых филаментов после обработки  $\text{CuSO}_4$ . Установлено, что наиболее чувствительными к действию ионов меди являются клетки корневого апекса, о чем свидетельствует их частичное отмирание, а также эпидермальные клетки зоны элонгации и корневые волоски. В меньшей степени чувствительными являются клетки меристемы главного корня. Самое сильное воздействие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  наблюдалось на эпидермальные клетки разных

зон (далее по возрастанию силы воздействия): зона роста < зона растяжения < переходная зона < зона дифференциации. Также нами продемонстрировано, что актиновые филаменты являются одной из мишеней действия данного металла. Молекулярные механизмы воздействия металлов на микрофиламенты на сегодняшний день практически не изучены. Можно предположить по аналогии с действием других фитотоксичных металлов, таких как кадмий, что существует ряд специфичных сайтов присоединения  $\text{Cu}^{2+}$  непосредственно к актину, а также наличие опосредованных механизмов воздействия, таких как способность двухвалентных металлов конкури-

ровать с  $\text{Ca}^{2+}$  и активировать гельсолин, что приводит к деполимеризации микрофиламентов [9]. Данный вопрос требует дальнейшего детального изучения для понимания механизмов действия металлов на клетки с целью разработки механизмов защиты растений от интоксикации металлами, ввиду усиленного загрязнения ими почв.

Исследования были выполнены в рамках тематики «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2012–2016 рр.).

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Cochu Ch.M., Gogolin K.A., Ye H. Copper cofactor delivery in plant cells // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2006. – N 9. – P. 256–263.
2. Blamey F.P.C., Kopittke P.M., Wehr J.B., Menzies N.W. Recovery of cowpea seedling roots from exposure to toxic concentrations of trace metals // *Plant Soil*. – 2011. – N 341. – P. 423–436.
3. Liu D.H., Xue P., Meng Q., Zhe J., Gu J., Jiang W. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L. // *Plant. Cell. Rep.* – 2009. – N 28. – P. 695–702.
4. Kulikova A.L., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V. Actin is involved in early plant responses to heavy metal stress and associates with molecular chaperons in stress environments // *Russ. J. Rep. Dev. Biol. Sci.* – 2009. – N 424. – P. 49–52.
5. Liibben S., Sauerbeck D. The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat // *Water Air Soil Pollut.* – 1991. – N 57–58. – P. 239–247.
6. Voigt B., Timmers A.C.J., Samaj J., Muller J., Baluska F., Menzel D. GFP-FABD2 fusion construct allows *in vivo* visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings // *Eur. J. Cell Biol.* – 2005. – N 84 – P. 95–608.
7. Yemets A., Sheremet Y., Vissenberg K., Van Orden J., Verbelen J.P., Blume Y.B. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells // *Cell Biol Int.* – 2008. – N 32 (6). – P. 630–637.
8. Rieger A.M., Nelson Kimberly L., Konowalchuk J.D., Barreda D.R. Modified annexin v/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death [Електронний ресурс] // *J. Vis. Exp.* – 2011. – Режим доступу: <http://www.jove.com/details.php?id=2597>.
9. Wan L., Zhang H. Effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction // Cadmium toxicity. Effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction // *Plant Signal Behav.* – 2012. – N 7 (3). – P. 345–348.

#### HORIUNOVA I.I., YEMETS A.I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kiev-123, Osypovskoho str., 2a, e-mail: yemets.alla@gmail.com, innagoriunova@yandex.ru*

#### EFFECT COPPER ON ACTIN FILAMENTS ORGANIZATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOT CELLS

**Aims.** Copper (Cu) is a micronutrient that has roles in photosynthesis, respiration, antioxidant activity, cell wall metabolism and hormone perception. Excess Cu is toxic and therefore its delivery has to be tightly regulated. **Methods.** Light and fluorescent microscopy, laser scanning confocal microscope. **Results.** It was shown for the first time that copper (5–20  $\mu\text{M}$ ) induced *Arabidopsis thaliana* (GFP-FABD2) primary root growth inhibition accompanied with morphological alterations, reorientation and/or depolymerization of actin filaments in cells of meristematic, transition and elongation root zones. **Conclusions.** The results showed that the study of cell response to copper toxicity can happen marker for excess copper in the environment.

**Keywords:** actin filaments, copper, *Arabidopsis thaliana* L., cytotoxicity, primary root, confocal microscope.