

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ
ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

УДК 665.939.14:54-116+576.311.1

СМЕРТЕНКО АНДРІЙ ПЕТРОВИЧ

**ВИВЧЕННЯ ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНИХ
МОДИФІКАЦІЙ ТА СТРУКТУРНИХ ДОМЕНІВ
ТУБУЛІНУ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ
СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ**

03.00.25 — клітинна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00754307 (Q)

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у лабораторії фізико-хімічної біології клітини Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України та у відділенні біології цитоскелету Інституту молекулярної біології Чеської Академії Наук (Прага)

Наукові керівники — член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук

БЛЮМ Ярослав Борисович

доктор біології

ВІКЛЦКІ Владімір

Офіційні опоненти — доктор біологічних наук, гол. наук. спів.

ТЮЛЕНЄВ Володимир Іванович

кандидат біологічних наук, ст. наук. спів.

СОРОЧИНСЬКИЙ Борис Володимирович

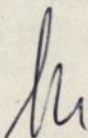
Провідна організація — Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України, Київ

Захист відбудеться " 4 " квітня 1996 р. о 14⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.19.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148, актовий зал.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Автореферат розісланий " 1 " березня 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук



Малишева Л.В.

576.8 +
595.132

AB 34.169

ЛИБ. им. В. Степанова
АН УССР

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Мікротрубочки (MT) приймають участь у здійсненні таких найважливіших функцій рослинної клітини, як клітинний поділ, формування клітинної стінки, позиціонування органел, внутрішньоклітинний транспорт, морфогенез клітин, тощо (Goddard et al., 1994). Протягом клітинного циклу MT можуть утворювати чотири основні типи структур: кортикальну сітку, препрофазну стрічку, веретено поділу та фрагмопласт. Кортикальна сітка, препрофазна стрічка та фрагмопласт утворюються лише в клітинах вищих рослин; проте в клітинах тварин функції, притаманні кортикальній сітці та фрагмопласту, виконують інші структури. Основним білком MT є тубулін - гетеродимер, що складається з α - та β -субодиниць, кожна з яких має молекулярну масу біля 50 кД (Dustin, 1984). Тубуліну властива висока консервативність: гомологія між генами тубуліну тварин і рослин досягає 78% (Silflow et al., 1987). Незважаючи на великий обсяг даних щодо структури та функцій тубуліну, залишається багато питань стосовно механізмів, які дозволяють клітині будувати такі різноманітні за структурою молекулярні ансамблі, використовуючи лише один білок.

Однією із основних причин мультифункціональності та гетероморфності MT являється гетерогенність тубуліну. Як і в клітинах тварин, в клітинах рослин також були знайдені множинні ізоформи α - та β -тубуліну (Hussey et al., 1991). По-перше, гетерогенність тубуліну виникає внаслідок того, що кожна його субодиниця кодується родиною неоднакових за своїми послідовностями генів. Другою причиною гетерогенності тубуліну виступають посттрансляційні модифікації (Bulinsky & Gundersen, 1991), які змінюють його заряд та конформацію. Так, за рахунок посттрансляційних модифікацій із продукту одного гену α -тубуліну *Tetrahymena pyriformis* виникає сім ізоформ білку (Penque et al., 1991). Більшість з досліджених на сьогоднішній день модифікацій тубуліну відбуваються на С-кінцевих доменах його субодиниць. Це, наприклад, циклічне тирозилування/детирозилування (Gundersen et al., 1984) та ацетилювання (L'Hernault & Rosenbaum, 1985) α -тубуліну, поліглутамілювання (Edde et al., 1990), фосфорилювання (Diaz-Nido et al., 1988) та полігліцилювання (Redeker et al., 1994) α - та β -тубуліну. Вони можуть регулювати динаміку MT та їх взаємодію з іншими білками. Ці дані корелюють з результатами досліджень просторового розташування домнів тубуліну. Якщо його N-кінцеві домени сховані у матриксі MT та приймають безпосередню участь у полімеризації MT,

то С-кінцеві домени вільно експоновані на поверхні МТ (Draber et al., 1989).

До цих пір основна маса даних щодо посттрансляційних модифікацій та доменів тубуліну була накопичена при дослідженні МТ тваришних клітин. Що ж стосується рослин, такі дані залишаються обмеженими. Наявність тирозильованої форми для α -тубуліну рослин було продемонстровано за допомогою імунофлюоресцентної мікроскопії (Wehland et al., 1984) та імуноблотингу (Dawson & Lloyd, 1985). Наявність ацетильованого тубуліну у рослин було показано лише за допомогою імунофлюоресцентної мікроскопії (Astrom, 1992), але антитіла проти ацетильованого тубуліну не впізнавали його в умовах імуноблотингу (Del-Casino et al., 1993). Фосфорилування тубуліну рослин було продемонстровано в досліджах по включенню радіоактивно-міченого фосфору в пермеабілізовані протопласти (Blume et al., 1991). Інші модифіковані форми рослинного тубуліну взагалі не вивчалися. До цього слід додати, що незважаючи на наявність даних щодо консервативності доменної організації тубуліну рослин (Picquot et al., 1988), до цих пір не вивчалась їх просторова орієнтація у стінці МТ. Це ускладнює розгляд можливих механізмів впливу посттрансляційних модифікацій тубуліну на функції МТ рослин. З іншої точки зору, наявність унікальних типів організації МТ в рослинних клітинах дозволяє сподіватись на відкриття особливостей механізмів, що регулюють їх утворення.

Мета та завдання роботи. Метою даної роботи було дослідження посттрансляційних модифікацій тубуліну, їх зв'язку з гетерогенністю тубуліну та участі в утворенні та функціонуванні різних структур МТ вищих рослин. Згідно з поставленою метою, в задачі експериментальної роботи входило:

1. Вивчити гетерогенність тубуліну *N. tabacum* за допомогою ізоелектричного фокусування з високою роздільною здатністю (ІФВРЗ).
2. Визначити наявність поліглутамільованої, тирозильованої, петирозильованої, ацетильованої та $\Delta 2$ (форма α -тубуліну, що не тирозилується) форм тубуліну в клітинах рослин походження за допомогою специфічних антитіл.
3. Проаналізувати локалізацію снітопів антитіл проти модифікованих форм тубуліну на його ізоформах, розділених за допомогою ІФВРЗ.
4. Розробити методику імунофлюоресцентного фарбування МТ в фіксованих та нефіксованих параформальдегідом клітинах *N. tabacum*.

5. Вивчити участь модифікованих форм тубуліну у формуванні різних типів структур МТ протягом клітинного циклу.
6. Визначити консервативність структурних доменів тубуліну рослин за допомогою антитіл - маркерів доменів тубуліну тварин.
7. Порівняти розташування структурних доменів тубуліну на поверхні нативних МТ рослин.

Наукова новизна. Вперше було проведено систематичний аналіз гетерогенності тубуліну вищих рослин за допомогою ІФВРЗ та імуноблотингу із специфічними антитілами. В результаті цих досліджень було встановлено, що клітини суспензійної культури *N. tabacum* мають високий рівень гетерогенності тубуліну, який знаходиться на одному рівні з гетерогенністю тубуліну мозку ссавців.

Вперше було доведено присутність поліглютамільованого, нетирозильованого та $\Delta 2$ -тубуліну у складі МТ вищих рослин. Наявність ацетильованого тубуліну вперше було продемонстровано шляхом імуноблотингу. Вперше було порівняно локалізацію епітопів п'яти антитіл - маркерів модифікованих форм тубуліну, на ізоформах α -тубуліну *N. tabacum*. Знайдено, що одна ізоформа тубуліну може нести до трьох таких епітопів.

Експериментально було доведено, що С-кінцеві домени обох субодиниць тубуліну, де знаходяться сайти чотирьох з п'яти вивчених модифікацій, локалізовані на поверхні МТ, в той час як N-кінцеві домени обох субодиниць сховані у матриці МТ.

Практична цінність. В ході виконання роботи були розроблені методичні підходи використання ІФВРЗ для вивчення гетерогенності тубуліну рослинного походження та його посттрансляційних модифікацій, що може бути застосовано для дослідження змін цих параметрів протягом розвитку рослини або під впливом фізіологічних факторів (гормони, світло, температура, тощо). Також розроблена методика імунофлюоресцентного фарбування МТ в суспензійних клітинах *N. tabacum*, яка використовується у дослідженнях структури та складу МТ в Інституті рослинництва (Прага, Чеська Республіка) та Університеті ім. Альберта-Людвіга (Фрайбург, Німеччина).

Серед антитіл, специфічних до тубуліну тварин, були виявлені такі, які можуть бути використані як маркери рослинного α - (TU-01 та TU-09) та β - (TU-06) тубуліну у біохімічних або імуноцитохімічних дослідках. До того ж була відібрана панель антитіл, застосування якої дозволяє проводити імунохімічне картування ізоформ рослинного тубуліну.

Результати роботи використовуються при читанні спецкурсу "Скелетні структури клітини та їх функції" на кафедрі клітинної

біології та генетичної інженерії Київського університету ім. Тараса Шевченка.

Основні положення, що виносяться на захист.

1. Для тубуліну суспензійних клітин *N. tabacum* характерна висока гетерогенність.
2. Тубулін вищих рослин має поліглютамільовану, тирозильовану, нетирозильовану, ацетильовану та $\Delta 2$ форми.
3. Епітопи, що впізнаються антитілами проти модифікованих форм тубуліну, специфічно локалізуються на його ізоформах. Одна ізоформа може нести до трьох таких епітопів. Посттрансляційні модифікації, таким чином, беруть участь у генерації високої гетерогенності тубуліну *N. tabacum*.
4. Кожна з модифікованих форм тубуліну задіяна у формуванні усіх субпопуляцій МТ кортикальної сітки, препрофазної стрічки, мітотичного веретена та фрагмопласту, за виключенням ацетильованого та $\Delta 2$ тубуліну, які концентруються переважно на полюсах мітотичного веретена та не детектуються у кінетохорних МТ.
5. Як і у випадку тубуліну тварин, С-кінцеві домени α - та β -субодиниць тубуліну рослин, де знаходяться сайти більшості з досліджених модифікацій, експоновані на поверхні МТ і тому є вільно доступними для ферментів, що їх здійснюють. N-кінцеві домени обох субодиниць сховані у матриксі МТ.

Апробація роботи. Результати досліджень було представлено на 15-му Міжнародному ботанічному конгресі (Йокогама, Японія, 1993); 8-му Європейському цитоскелетному форумі (Асізі, Італія, 1993); 4-му Європейському конгресі з клітинної біології (Прага, Чеська Республіка, 1994); Міжнародному симпозиумі "Біотехнологія та генетична інженерія рослин" (Київ, 1994); Чесько-Словацькому симпозиумі з цитоскелету (Брно, Чеська республіка, 1995); 10-ому Європейському цитоскелетному форумі (Стокгольм, Швеція, 1995); Семінарі Європейського товариства молекулярної біології "Контроль циклу клітинного поділу вищих рослин" (Сегед, Угорщина, 1995).

Публікації. Основні положення дисертації викладені у 10 роботах.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури, який містить 212 бібліографічних посилань. Робота викладена на 130 сторінках машинопису, і містить 5 таблиць та 14 малюнків.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для досліджень використовували клітини 5-8-ми денної суспензійної культури (у лог-фазі росту) *Nicotiana tabacum* штаму VBI-0, що вирощувалася на середовищі V4 (Opatrny & Opatrna, 1976) у темряві, при температурі 23-25°C та постійному перемішуванні.

Тубулін виділяли із суспензійних клітин *N. tabacum* за класичною методикою з використанням йоно-обмінної хроматографії на ДЕАЕ Сефадексі А-50 (Morejohn et al., 1984) з модифікаціями. Чистота отриманого тубуліну складала 80-85%, як було показано шляхом денситометричного сканування електрофореграм, після його електрофоретичного розділення. Цей білок використовували для карбоксиамідометилування (George et al., 1981), що дозволяло запобігти окисленню білків при ІФВРЗ.

ІФВРЗ тубуліну, що був очищений та карбоксиамідометильований, здійснювали у поліакриламідному гелі (ПААГ; 230x110x0,5 мм), що містив амфоліни BioLytes (BioRad, Richmond, CA) з діапазоном рІ 3,5-10 при 2500V та температурі 15°C протягом 11 год. (Linhartova et al., 1992). Гелі аналізували на лазерному денситометрі LKB 2202 Ultrosan (LKB, Швеція). Після ІФВРЗ білки переносили на нітроцелюлозні мембрани шляхом капілярного переносу (Albaugh et al., 1987).

Електрофоретичне розділення білків здійснювали у 7,5-10,0%-ному ПААГ, що містив 0,1%-ний додецилсульфат натрію (ДСН), згідно методу Лемлі (Laemmli, 1970). Для двомірного електрофорезу стрічку шириною 2-4 мм, що містила ізоформи тубуліну, вирізали з гелю після ІФВРЗ, промивали два рази по 5 хв. у буфері для розчинення зразку (Laemmli, 1970) та поміщали у концентруючий гель. Після електрофорезу білки переносили на нітроцелюлозні мембрани шляхом електроелекції (Towbin et al., 1979). Фарбування білків колоїдним сріблом проводили згідно з методикою Драбера (Draber et al., 1991). Білки у гелях фарбували розчином 0,25%-ного Кумасі діамантового блакитного R-250 у 25%-ному етанолі та 7%-ній оцетовій кислоті протягом 30 хв.

В експериментах з імуноблотингом (Draber et al., 1991) використовували антитіла отримані у лабораторії доктора В. Вікліцкі: TU-01, TU-02, TU-03, TU-04, TU-07 та TU-09 проти α -тубуліну мозку свині, антитіла TU-06, TU-12 та TU-14 проти β -тубуліну мозку свині, кролячі поліклональні антитіла проти α - та β -тубуліну, антитіла VI-01 проти віментину. Останні використовували як негативний контроль. Модифіковані форми тубуліну вивчали за допомогою антитіл Тут проти

тирозильованого α -тубуліну, Glu проти детирозильованого α -тубуліну (люб'язно надані доктором J. Bulinski, Колумбійський університет, США), 6-11В-1 проти ацетильованого α -тубуліну (люб'язно надані доктором J. Piregno, університет Рокфеллера, США), GT335 проти поліглютамільованого α - та β -тубуліну (люб'язно надані доктором A. Wolff, Парижський університет, Франція), L7 проти форми α -тубуліну, що не може бути тирозильована ($\Delta 2$ -форма; люб'язно надані доктором L. Paturle-Lafancschere, Центр ядерних досліджень, Гренобль, Франція).

Для візуалізації МТ клітини оброблялися протягом 5 хв. ферментами для руйнування клітинної стінки (1%-ний Мацерозим Р-10 та 0,2%-на пектиназа), які розчинювали у БСМТ (буфері для стабілізації мікротрубочок), до складу якого входили 25 мМ ППЕС-КОН, рН 6,9, 2 мМ ЕГТА, 1 мМ $MgSO_4$, та фіксувалися протягом 30 хв. розчином 3,7%-ного параформальдегіду у БСМТ, що містив 1%-ний Тритон Х-100. Після цього клітини поміщали на покривні скельця, котрі були покриті полі-L-лізином та фарбували первинними та вторинними антитілами. В деяких випадках клітини після фіксації параформальдегідом переносили до метанолу та ацетону, які були охолоджені до температури $-20^{\circ}C$, на 10 та 6 хв. відповідно. ДНК в клітинах фарбували за допомогою Хехст 33258 (Hoechst 33258), який розчинювали у фосфатному буфері до концентрації 0,4 мкг/мл. Зразки проглядали та фотографували на флюоресцентному мікроскопі Лайтц Ортоплан (Leitz Orthoplan).

Для приготування нефіксованого цитоскелету клітини після мацерації клітинної стінки екстрагували 10 хв. 0,1%-ним розчином Тритону Х-100, у БСМТ, до складу котрого входив також 0,4 М гліцерин та 10 μ М таксол (люб'язно наданий Національним Інститутом Раку, Бетесда, США). Після одноразового промивання у БСМТ+0,4 М гліцерин, клітини переносили до того ж буферу, який містив первинні антитіла. Через 50 хв. клітини одмивалися у БСМТ+0,4 М гліцерин, фіксували параформальдегідом. МТ в них фарбували, як описувалося вище. В цьому випадку інкубацію з первинними антитілами не проводили.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Дослідження посттрансляційних модифікацій тубуліну рослин

Моноклональні антитіла TU-01 та TU-06 візнають консервативні антигенні детермінанти, що локалізовані відповідно на N-кінцевому

структурному домені α -тубуліну та N-кінцевому структурному домені β -тубуліну (Draber et al., 1989). Тому вони були використані як маркери рослинного тубуліну. На загальному екстракті цитоплазматичних білків *N. tabacum* ці антитіла реагували з білками, що мали відносну молекулярну масу біля 50 кД (Рис. 1а, треки 2 та 3). Не спостерігалася їх реакція з іншими білками; вторинні антитіла також не давали неспецифічної реакції. На відміну від тваринного тубуліну, який при даних умовах електрофорезу розділявся на α - та β -субодиниці, тубулін *N. tabacum* залишався нерозділеним. Але тубулін, який був очищений та карбоксиамідометильований, при електрофорезі розділявся на дві смужки (Рис. 1б, трек 1). Результати імуноблотингу з антитілами TU-01 та TU-06 продемонстрували, що верхня смужка належала α -тубуліну, в той час як нижня смужка належала β -тубуліну (Рис. 1, треки 2 та 3). Антитіла також фарбували всі типи структур МТ протягом клітинного циклу: кортикальні МТ, преірофазну стрічку, веретено та фрагмопласт.

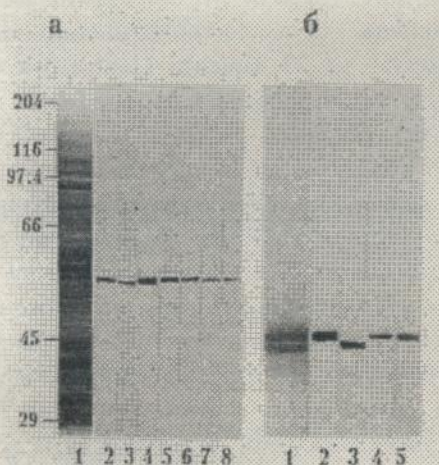


Рис. 1. Результати імуноблотингу екстракту цитоплазматичних білків *N. tabacum* та білкової фракції, що була збагачена тубуліном, з антитілами проти тубуліну після електрофоретичного розділення у 10%-му ПЛАГ-ДСН (а) та 7,5-му ПЛАГ-ДСН.

- (а) Реакція антитіл проти тубуліну з екстрактом цитоплазматичних білків. Трек 1, фарбування Кумасі. Треки 2 - 8, імунофарбування з антитілами TU-01, TU-06, GT335, Tug, Glu, L7 та 6-11B-1 відповідно. Відрізки та числа на лівому краю показують позиції та молекулярну масу специфічних маркерів.
- (б) Реакція антитіл проти тубуліну з фракцією білків, збагаченою тубуліном. Трек 1, фарбування Кумасі. Треки 2 - 5, імунофарбування з антитілами TU-01, TU-06, L7 та 6-11B-1 відповідно.

Антитіла GT335, Tug, Glu, 6-11B-1 та L7 впізнавали лише смужку білку, що відповідає позиції тубуліну (Рис. 1а, треки 4-8). Коли для імуноблотингу брали зразки, в яких субодиниці тубуліну були розділені, антитіла Tug, Glu, L7, 6-11B-1 реагували з α -тубуліном; антитіла GT335 реагували як з α -, так і з β -субодиницями. Реакція з антитілами L7 та 6-11B-1 представлена на Рис. 1б (треки 4 та 5). Відсутність реакції з іншими білками в експериментах з імуноблотингом свідчить про специфічність впізнавання антитілами рослинного тубуліну.

2. Гетерогенність тубуліну *N. tabacum*

За допомогою ІФВРЗ було розділено 22 ізоформи тубуліну *N. tabacum* (Рис. 2а). Як показало фарбування колоїдним сріблом, після перенесення на нітроцелюлозні мембрани, профіль розділених ІФВРЗ тубулінових ізоформ не змінювався (Рис. 2б, трек 2). Кожне з моноклональних антитіл TU-01 (Рис. 2б, трек 1) та TU-06 (Рис. 2б, трек 3) фабували по 11 ізоформ тубуліну, що відносилися відповідно до α - чи β -субодиниць. В аналогічних умовах тубулін мозку свині розділявся по заряду на 23 варіанти (Linhartova et al., 1992), тобто гетерогенність тубуліну *N. tabacum* відповідає такій мозку свавців.

Коли білки, що були розділені методом ІФВРЗ, послідовно розділяли згідно молекулярної маси за допомогою методу ПААГ-ДСН електрофорезу, залишалися п'ять ізоформ α -тубуліну та шість ізоформ β -тубуліну (Рис. 2в) при тому, що протеолітичні фрагменти тубуліну були відсутні. Розташування ізоформ тубуліну після двомірного електрофорезу свідчило на користь того, що майже всі вони склалися з декількох ізоформ, що розділялися ІФВРЗ. Найбільш ймовірно, що протягом електрофорезу в другому вимірі, відбувається дифузія сусідніх ізоформ. Імуноблотинг з антитілами TU-01 та TU-06 підтвердив належність всіх нижніх ізоформ до β -тубуліну, а всіх верхніх - до α -тубуліну. Для того, щоб виключити можливість виникнення додаткових ізоформ тубуліну в результаті взаємодії тубуліну з амфолінами під час розділення білків в умовах високої напруги, було проведено ІФВРЗ у другому вимірі. Після цього білки розподілялися по діагоналі гелю, що говорить про неймовірність виникнення артефактних ізоформ цим шляхом (George et al., 1982). Отже, всі контрольні експерименти свідчать про об'єктивність високого числа ізоформ тубуліну, що було визначено ІФВРЗ. Це дає змогу зробити висновок, що у порівнянні з двомірним електрофорезом, ІФВРЗ дозволяє досягти більш чіткого розділення та імунологічної характеристики ізоформ тубуліну.

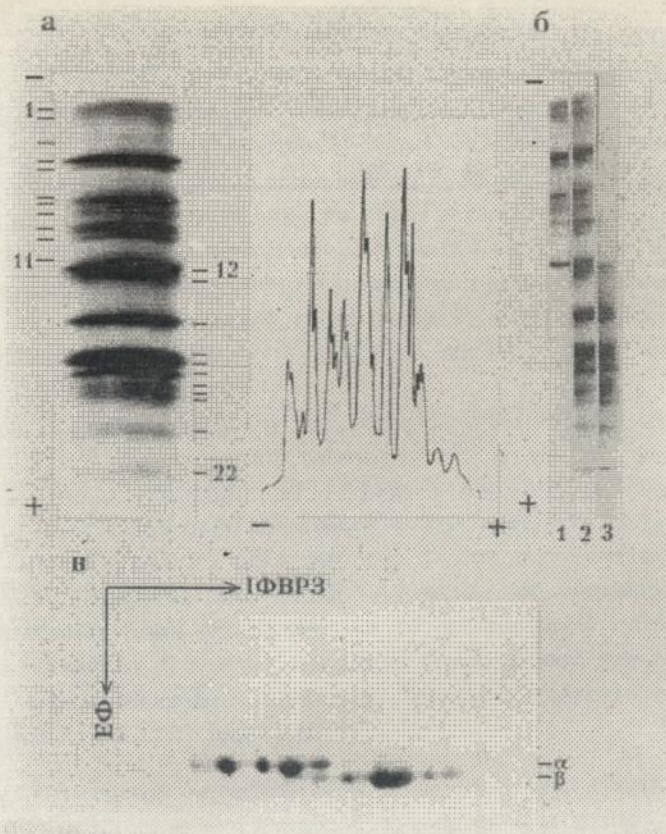


Рис. 2. Результати вивчення гетерогенності тубуліну в клітинах *N. tabacum* за допомогою ІФВРЗ.

- (а) Ізоформи тубуліну *N. tabacum*, розділені за допомогою ІФВРЗ та забарвлені Кумасі R-250 з відповідною денситограмою. Окремі ізоформи тубуліну позначені відрізками від 1-го до 11 для α -тубуліну та від 12 до 22 для β -тубуліну.
- (б) Імуноблот ізоформ тубуліну з антитілами проти α - та β -тубуліну. Трек 1, реакція з антитілами TU-01 проти α -тубуліну. Трек 2, фарбування білків, перенесених на нітроцелюлозну мембрану, за допомогою колоїдного срібла. Трек 3, реакція з антитілами TU-06 проти β -тубуліну.
- (в) Двумірний електрофорез тубуліну *N. tabacum*. Білки після розділення шляхом ІФВРЗ, розділялися згідно молекулярної ваги ПААГ-ДСН електрофорезом та фарбувалися Кумасі R-250.

Табл. 1. Реакція антитіл проти модифікованих форм та різних структурних доменів тубуліну з ізоформами тубуліну *N. tabacum*

Ізоформа	Антитіла													
	TU-01	TU-02	TU-03	TU-04	TU-07	TU-09	Tyr	Glu	L7	6-11B-1	T335	TU-06	TU-12	TU-14
α1	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-			
α2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-			
α3	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-			
α4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+			
α5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+				
α6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	±	+			
α7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+			
α8	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-			
α9	+	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+			
α10	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	+			
α11	+	-	-	-	-	+	±	-	-	+	+			
β12											±	+	-	-
β13											-	+	-	-
β14											+	+	-	±
β15											+	+	+	-
β16											+	+	+	+
β17											+	+	-	-
β18											+	+	+	-
β19											+	+	+	-
β20											+	+	+	-
β21											-	+	+	-
β22											-	+	-	-

+, реакція сильна; ±, реакція слабка; -, реакція відсутня

3. Розподіл епітопів - маркерів модифікованих форм тубуліну на його ізоформах

Епітопи, що впізнаються антитілами проти модифікованих форм тубуліну специфічно розташовувалися на окремих його ізоформах (Табл. 1). Епітопи антитіл проти поліглютамільованого тубуліну були знайдені на ізоформах обох α- та β-субодиниць, а епітопи антитіл

проти тирозильованого, нетирозильованого, ацетильованого та $\Delta 2$ -тубуліну локалізувалися лише на ізоформах α -субодиниці тубуліну. Антитіла Glu та L7 реагували лише з однією ізоформою кожне (Табл. 1). Антитіла Tug, GT335 та 6-11B-1 давали реакцію з п'ятьма та більше ізоформами тубуліну (Табл. 1). Оскільки 14 з 22 ізоформ тубуліну *N. tabacum* було поліглутамільовано, це може свідчити на користь того, що дана модифікація відіграє роль, важливу для регуляції властивостей МТ рослин. Так було показано, що поліглутамілювання в клітинах тварин регулює зв'язування тубуліну та τ -білку (Boucher et al., 1994). Білок, імунологічно гомологічний тваринному τ -білку, був знайдений в клітинах кукурудзи (Vantard et al., 1991). Цілком вірогідно, що поліглутамілювання тубуліну у вищих рослин може відігравати аналогічні функції.

Три ізоформи α -тубуліну ($\alpha 6$, $\alpha 9$, $\alpha 11$) були поліглутамільовані, ацетильовані та тирозильовані одночасно (Табл. 1). Це може бути наслідком трьох ситуацій: а) ізоформи тубуліну не розділилися остаточно; б) декілька типів по-різному модифікованих молекул змішані у одній смужці білку; в) одна ізоформа дійсно може нести декілька модифікацій. Edde et al. (1992) показали, що тирозилування/детирозилування може відбуватись на тій же молекулі тубуліну, що поліглутамілюється. Очевидно, що рівень гетерогенності тубуліну може зростати саме внаслідок комбінації багатьох посттрансляційних модифікацій на продукті одного гену.

*4. Локалізація модифікованих форм тубуліну в клітинах *N. tabacum* протягом різних стадій клітинного циклу*

Роль модифікованих форм тубуліну у формуванні різних типів структур МТ рослин протягом клітинного циклу вивчалася за допомогою непрямой імуофлюоресцентної мікроскопії. Антитіла GT335 фарбували всі інтерфазні МТ, МТ препрофазної стрічки, веретена та фрагментасти (Рис. 3а,б). Однакову з цією реакцію давали антитіла проти тирозильованого α -тубуліну (Рис. 3в,г). Детирозильований α -тубулін також був знайдений у МТ протягом усіх стадій клітинного циклу (Рис. 4д,е). Але характер фарбування відрізнявся від того, котрий давали антитіла GT335 та Tug. Імунопозитивний матеріал для цих антитіл був накопичений у дискретних кластерах з різною інтенсивністю свічення вздовж МТ, в той час як інші ділянки МТ не давали реакції з антитілами.

Локалізація $\Delta 2$ -тубуліну була схожа на локалізацію детирозильованого тубуліну. Інтерфазні МТ так само характеризувалися кластерним типом імуофарбування (Рис 4а,б). Подвійне фарбування з антитілами

TU-01 та L7 підтвердило розташування кожного кластеру на МТ. Дослідження за допомогою імуноелектронної мікроскопії реакції антитіл Tug та Glu з МТ клітин ліній CV1 та PtK2 виявило, що кожна МТ включала в себе як тирозильований, так і нетирозильований тубулін (Geuens et al., 1986). При цьому ці форми тубуліну також могли утворювати дискретні кластери та зустрічалися в МТ не у однакових кількостях. Приймаючи до уваги ці дані, можна зробити висновок, що імунофлюоресцентна мікроскопія виявляє лише місця переважного накопичення модифікованих форм тубуліну, а їх кількість в окремих місцях МТ може бути низкою за поріг чутливості методу. Тому можливо, що в клітинах *N. tabacum* детирозильований та $\Delta 2$ -тубулін також присутні й у інших місцях МТ, але у кількості, яка виходить за межі чутливості методу імунофлюоресцентної мікроскопії. $\Delta 2$ -тубулін також був ідентифікований у пренпрофазній стрічці, мітотичному веретені та фрагмoplastі. В мітотичному веретені антитіла L7 впізнавали переважно антигени на полюсі веретена та майже зовсім не реагували з кінетохорними МТ. Ацетильована форма також була знайдена у складі МТ протягом всіх стадій клітинного циклу. У мітотичному веретені антигени антитіл 6-11В-1 переважно концентрувалися на полюсах (Рис. 4в,г).

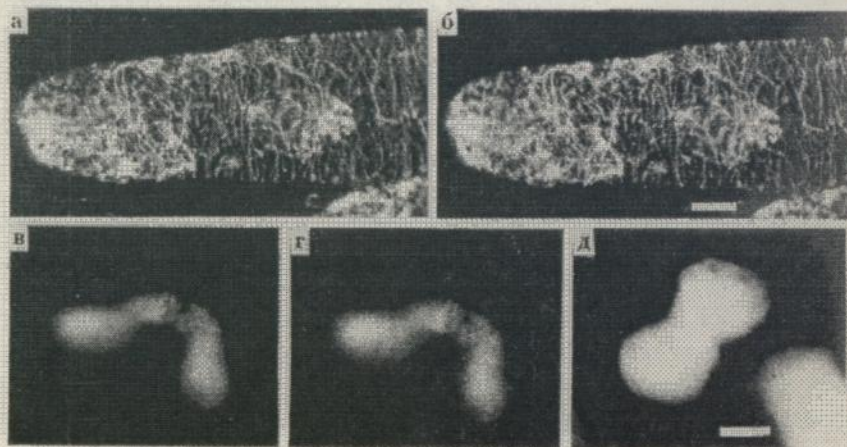


Рис. 3. Локалізація поліглутамільованого та тирозильованого тубуліну в клітинах *N. tabacum*.

(а,б) подвійне фарбування кортикальних МТ поліклональними антитілами проти тубуліну (а) та антитілами GT335 проти поліглутамільованого α - та β -тубуліну (б).

(в-д) Потрійне фарбування фрагмoplastу антитілами TU-01 (в), антитілами Tug(г) проти тирозильованого α -тубуліну та ДНК-специфічним барвником (д).

Відрізки відповідають 10 мкм.

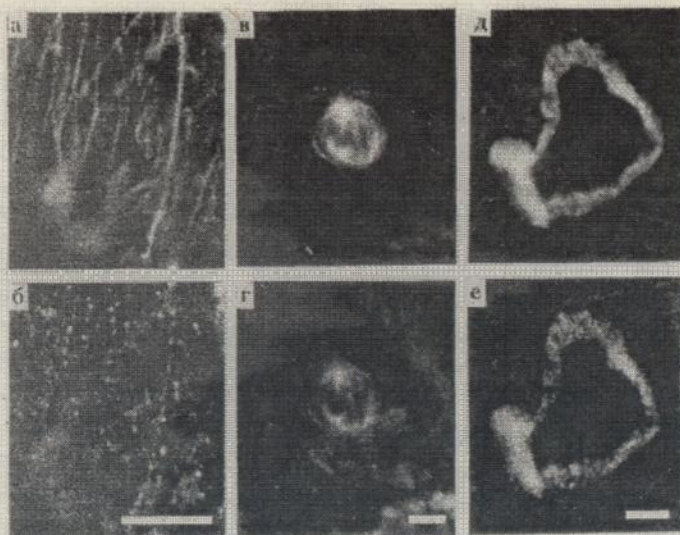


Рис. 4. Локалізація $\Delta 2$ -форми, ацетильованого та детирозильованого α -тубуліну у клітинах *N. tabacum*.

(а,б) Подвійне фарбування кортикальних МТ антитілами TU-01 (а) та антитілами L7 проти $\Delta 2$ -форми α -тубуліну(б).

(в,г) Подвійне фарбування мітотичного веретена поліклональними антитілами проти тубуліну (в) та мишиними антитілами 6-11В-1 проти ацетильованого α -тубуліну (г).

(д,е) Подвійне фарбування фрагменту антитілами TU-01 (д) та антитілами Glu проти детирозильованого α -тубуліну (е).

Відрізки відповідають 10 мкм.

Аналогічні дані щодо тирозильованого α -тубуліну були отримані на клітинах інших видів квіткових рослин (Wehland et al., 1984; Astrom, 1991; Del-Casino et al., 1993). Наявність у МТках тирозильованої форми тубуліну відповідає динамічному статусу МТ (Bulinsky & Gundersen, 1991). Висока динамічність рослинних МТ була показана у експериментах з фотовицвітанням мікроін'єктованого у рослинні клітини флюоресцентного тубуліну з мозку ссавців (Hush et al., 1994). З іншого боку вважається, що детирозильований (Bulinsky & Gundersen, 1991), ацетильований (Webster & Borisy, 1989) та $\Delta 2$ - (Paturle-Lafanecchere et al., 1994) тубуліни виступають як маркери більш стабільних МТ. У попередніх експериментах було показано, що орієнтація МТ та позиціювання целюлозних мікрофібрил клітинної стінки являють собою взаємозв'язані процеси. При цьому, як МТ, так і целюлозні мікрофіламенти звичайно орієнтуються перпендикулярно до

осі елонгації (Суг, 1994). Стабілізація кортикальних поперечних МТ може сприяти формуванню целюлозних мікрофібрил у такому ж напрямку та, таким чином, вести до видовження клітин *N. tabacum*. Іншими словами, стабілізація поперечних кортикальних мікротрубочок може бути елементом поляризації клітин та брати участь у визначенні напрямку їх експансії.

5. Дослідження структурних доменів тубуліну вищих рослин

Для аналізу структурних доменів тубуліну була використана панель специфічних антитіл (Табл. 2). В експериментах з імуноблотингом екстракту цитоплазматичних білків всі антитіла реагували з білком з молекулярною масою біля 50 кД. Оскільки такий самий білок впізнавали й антитіла TU-01 та TU-06, можна зробити висновок, що вони специфічно реагують з тубуліном рослин.

Далі, ми вивчили реакцію антитіл з ізоформами тубуліну, що були розілені за допомогою ІФВРЗ. Реакція одних антитіл відрізнялася, тоді як реакція другої частини співпадала з такою антитіл-маркерів. Згідно з реактивністю ізоформ α -тубуліну з антитілами (Табл. 1), їх було віднесено до двох груп. До першої групи були віднесені ізоформи, які впізнавалися всіма антитілами з TU-панелі, тобто TU-01, TU-02, TU-03, TU-04, TU-07 та TU-09. До другої групи були віднесені ізоформи, які впізнавалися лише антитілами TU-01 та TU-09. Реакція антитіл проти β -тубуліну була більш гетерогенною і дозволила виділити принаймні чотири групи ізоформ: 1) ті, що впізнавалися лише антитілами TU-06; 2) ті, що впізнавалися антитілами TU-06 та TU-12; 3) ті, що впізнавалися антитілами TU-06 та TU-14; 4) ті, що впізнавалися антитілами TU-06, TU-12 та TU-14 (Табл. 1). Збільшення панелі антитіл приведе до такої ситуації, коли кожна ізоформа буде впізнаватися унікальною скупиною антитіл, що дозволить їх "паспортизацію". Наприклад, застосування антитіл проти посттрансляційних модифікацій тубуліну: тирозильованої, ацетильованої та поліглутамільованої форм підвищувало кількість груп ізоформ α -тубуліну до восьми (Таб. 1).

Далі реакція антитіл TU-панелі з кортикальними МТ, прсирофазною стрічкою, мітотичним веретеном та фрагмопластом порівнювалася на фіксованих нараформальдегідом клітинах. У цілому, розбіжності в реакції антитіл з ізоформами тубуліну, що спостерігалися у експериментах з імуноблотингом, не співпадали з результатами цитологічного аналізу. Антитіла TU-04, TU-07, TU-09, TU-12 та TU-14 фарбували всі типи МТ, так само як антитіла TU-01 та TU-06. На відміну від цього, антитіла TU-02 та TU-03 реагували лише з тубуліном

у складі препрофазної стрічки, веретена та фрагменту, і не реагували з кортикальними МТ. Постфіксація клітин *N. tabacum* метанолом та ацетоном при -20°C не змінювала характеру реакції антитіл. Ці дані свідчать на користь того, що відсутність реакції з кортикальними МТ не виникає за рахунок конформаційного маскуванія епітопів для цих антитіл. Відомо, що антитіла TU-03 фарбують базальний шар епідермісу шкіри людини та миші, де відбуваються процеси інтенсивного поділу клітин (Draber et al., 1987, 1988). Дві гіпотези можуть бути запропоновані для пояснення даного феномену. Перша, кількість антигену антитіл дуже мала на протязі інтерфази та його кількість накопичується при вході клітини до М-фази. Друга, антиген(и) антитіл на протязі інтерфази можуть бути замасковані специфічними білками. Оскільки антитіла TU-02, TU-03, TU-04 та TU-07 впізнавали одні і тіж самі ізоформи тубуліну, найбільш вірогідною виглядає друга гіпотеза.

Різна специфічність реакції антитіл з МТ також спостерігалася в експериментих з нефікованими параформальдегідом клітинних. Згідно цієї специфічності, антитіла можуть бути розділені на дві групи. До першої групи відносяться антитіла TU-01, TU-02, TU-03, TU-04, TU-09 та 6-11В-1 проти N-кінцевого домену α -тубуліну та TU-06 проти N-кінцевого домену β -тубуліну, які фарбували МТ тільки після фіксації параформальдегідом та зовсім не реагували з таксол-стабілізованими МТ, що не були фіксовані. До другої групи слід віднести антитіла TU-07 проти α -тубуліну, антитіла Туг проти С-кінцевого домену α -тубуліну, TU-12 та TU-14 проти С-кінцевого домену β -тубуліну та GT335 проти С-кінцевого домену обох субодиниць, які в протилежність антитілам, що були віднесені до першої групи, фарбували як фіксовані, так і нефіковані параформальдегідом МТ. В цих дослідах таксол навряд чи міг впливати на реакцію МТ з антитілами. По-перше, з МТ, які були стабілізовані таксолом, а потім фіксовані параформальдегідом, антитіла першої групи давали позитивну реакцію. По-друге, мікроін'єковані у тваринні клітини антитіла також не фарбували МТ (Draber et al., 1989).

Про те, що негативна реакція антитіл проти епітопів N-кінцевого домену тубуліну з нефікованими МТ не виникає в результаті маскуванія епітопів специфічними білками свідчать дослідження Оки з співавт. (Ока et al., 1995). В їх експериментах обробка МТ, стабілізованих таксолом, буфером з 0,4 М KCl, який спричиняє дисоціацію комплексу МТ-асоційовані білки *in vitro*, не змінювала характеру реакції антитіл, які не реагували з нефікованими МТ. Таким чином, різниця в реакції антитіл, яка спостерігається у наших

експериментах, відображає структурні особливості організації МТ *in vivo*. Це відповідає моделі, що С-кінцеві домени обох субодиниць знаходяться на поверхні стінки МТ, в той час, як N-кінцеві домени сховані у матриксі МТ. Вважається, що домени тубуліну дуже мобільні та можуть змінювати свою орієнтацію під дією денатуруючих агентів, наприклад, фіксаторів. Тому фіксація призводить до релаксації нативної конформації тубуліну, після чого антитіла можуть впізнавати відповідні епітопи (Draber et al., 1989; Oka et al., 1995).

Табл. 2. Реакція антитіл проти структурних доменів тубуліну з мікротрубочками *N. tabacum*

Антитіла	Доменна специфічність ^a	МТ	
		Фіксовані	Нефіксовані
TU-01	α_N	+	-
TU-02	α_N	+	-
TU-03	α_N	+	-
TU-04	α_C	+	+
TU-06	β_N	+	-
TU-07	α	+	+
TU-09	α_N	+	-
TU-12	β_C	+	+
TU-13	β_N	+	-
TU-14	β_C	+	+
Тур	α_C	+	+
GT335	$\alpha_C\beta_C$	+	+
6-11-B1	α_N	+	-

^a α_N - N-кінцевий домен α -тубуліну; α_C - С-кінцевий домен α -тубуліну; β_N - N-кінцевий домен β -тубуліну; β_C - С-кінцевий домен β -тубуліну.

Нативна орієнтація доменів тубуліну корелює з їх функціями. N-кінцеві домени є суттєвими для процесів полімеризації тубуліну та формування МТ, тому логічно, що вони сховані у стінці МТ або знаходяться з її внутрішньої сторони. В протилежність, С-кінці не так важливі для полімеризації МТ *in vitro* (Saoudi et al., 1995), але вони відіграють важливу роль в регуляції взаємодії МТ та асоційованих білків (принаймні τ -білку Boucher et al., 1994). Сайти багатьох посттрансляційних модифікацій (тирозилювання/дестирозилювання, поліглутамілювання, полігліцилювання та фосфорилування)

знаходяться саме на С-кінцевих доменах. Як ці домени доступні для антитіл у пативних МТ, так вони доступні для ферментів, котрі приймають участь у посттрансляційних модифікаціях. Тобто у вищих рослин варіабельні С-кінцеві домени тубуліну мають всі атрибути, щоб вважатися регуляторами функціонування МТ.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що тубулін вищих рослин характеризується наявністю поліглутамільованої, тирозильованої, нетирозильованої, ацетильованої та $\Delta 2$ (форма α -тубуліну, що не може тирозилуватися) форм.
2. Гетерогенність тубуліну *N. tabacum* є високою та знаходиться на рівні гетерогенності тубуліну мозку ссавців.
3. Одна ізоформа тубуліну рослин може нести до трьох посттрансляційних модифікацій. Посттрансляційні модифікації, таким чином, є однією з причин високої гетерогенності тубуліну *N. tabacum*.
4. Усі модифіковані форми тубуліну є важливими для функціонування кортикальної сітки МТ, препрофазної стрічки, мітотичного веретена та фрагмопласту. Жодна форма не накопичується у окремих субпопуляціях МТ протягом інтерфази.
5. С-кінцеві домени α - та β -тубуліну, де знаходяться сайти багатьох посттрансляційних модифікацій, розташовані на поверхні стінки МТ, де вони можуть приймати участь у регуляції динаміки МТ та (чи) взаємодії МТ з іншими білками. N-кінцеві домени обох субодиниць сховані у матриксі МТ.
6. Папель антитіл, що була протестована, може бути використована для картування окремих ізоформ α - та β -тубуліну та дослідження динаміки їх експресії під час різноманітних фізіологічних процесів.
7. Знайдені моноклональні антитіла TU-02 та TU-03, які впізнають епітоп(и) α -тубуліну рослин тільки в тих клітинах, що діляться.
8. Проведені експерименти дають підстави вважати, що шляхи регуляції динаміки та організації МТ, котрі базуються на посттрансляційних модифікаціях тубуліну, в клітинах рослин та тварин характеризуються еволюційною консервативністю.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Smertenko A.P., Blume Ya.B., Viklicky V., Opatrny Z., Draber P. High charge heterogeneity of *Nicotiana tabacum* tubulin // Доп. НАН України. - 1996. - № 6, - прийнято до друку.
2. Smertenko A., Opatrny Z., Blume Ya., Viklicky V., Draber P. Probing *Nicotiana tabacum* microtubules with monoclonal anti-tubulin antibodies // Cell Biol. Int. - 1994. - v. 18, N 5. - P. 450.
3. Smertenko A. P., Strashnyuk N. M., Blume Ya. B. Taxol action on microtubules of control and taxol-resistant plants of *Nicotiana plumbaginifolia* // Cell Biol. Int. - 1994. - v. 18, N 5. - P. 447.
4. Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б., Смертенко А.П., Сидоров В.А., Глеба Ю.Ю. Получение амипрофосметилустойчивых линий *Nicotiana plumbaginifolia*, содержащих мутантный тубулин // Докл. Акад. Наук (Россия) - 1993. - т. 332, № 2. - С. 240-243.
5. Чабан Х.И., Смертенко А.П., Рипецкий Р.Т., Блюм Я.Б. Исследование роли микротрубочек в гравитропизме протонематических клеток мхов // Цитология и генетика - 1995. - т. 29, N 4. - С. 3-11.
6. Yemets A.I., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Kundel'chuk O.P., Blume Ya.B. Asymmetric somatic hybrids with mutant β -tubulin resistant to amiprophosmethyl // Proc. of Int. Symp. "Plant Mol. Biol. & Biotech." (New Delhi, December 14-17, 1994). - 1995. - P. 45-51.
7. Smertenko A.P., Blume Ya.B., Opatrny Z., Draber P., Viklicky V. Posttranslational modifications of *Nicotiana tabacum* tubulin // Abstr. of 10th Eur. Cytoskeletal Forum (27-31 May, 1995, Stockholm, Sweden). - 1995. - P. 15.
8. Smertenko A., Blume Ya., Viclicky V., Draber P. Distribution of tubulin modifications in the *Nicotiana tabacum* microtubules // Abstr. of EMBO Workshop "Control of Cell Division Cycle in Higher Plants", (October 5-7, 1995, Szeged, Hungary). - 1995. - P. 65.
9. Smertenko A. P., Blume Ya. B. Taxol effects on mitotic spindles of dividing protoplasts // Abstr. of 8th Eur. Cytoskeletal Forum (September 12-16, 1993, Assisi, Italy), p.46.
10. Strashnyuk N. M., Smeretenko A. P., Solodushko V. G., Blume Ya. B. Taxol-resistant mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* as a tool for investigation of plant microtubules // Abstr. of XV Int. Botanical Congress (August 28-September 3, 1993, Yokohama, Japan). - 1993. - P. 336.

Smertenko A.P. Studying of posttranslational modifications and structural domains of plant tubulin using specific antibodies.

Scientific Degree Candidate of Biological Sciences Thesis; speciality 03.00.25 - Cell Biology. Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiyiv, 1996.

The results of 10 scientific publications are defended.

Tyrosinated, detyrosinated, acetylated and Δ -2 (nontyrosinable) forms of α -tubulin as well as polyglutamylated forms of α - and β -tubulin are involved in the organization of plant microtubules (MTs). High resolution isoelectric focusing revealed that tubulin in *N. tabacum* cells is represented by 11 charge variants for α -subunit and 11 charge variants for β -subunit. Each of modified epitopes is localized on the unique pattern of tubulin isoforms, moreover, one isoform can carry up to three different modifications. Thus, modification is a cause of high tubulin heterogeneity in *N. tabacum*. All modified forms of tubulin are involved in the organization of cortical MTs, preprophase band, mitotic spindle and phragmoplast. However, antibodies against acetylated and Δ 2-tubulin gave no reaction with kinetochore MTs of mitotic spindle. The C-terminal domains of both tubulin subunits, where are localized the sites of all modifications except acetylation, are exposed on the surface of native MT and potentially can be involved in the regulation of properties and functions of MTs. In contrast, N-terminal domains are hidden in the MTs lattice. The results obtained revealed evolutionary conservativity of mechanisms for the regulation of MTs functions.

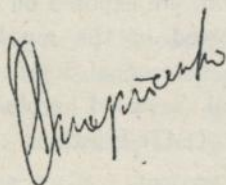
Смертенко А.П. Изучение посттрансляционных модификаций и структурных доменов тубулина растений при помощи моноклональных антител.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25 - клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается 10 научных работ по теме диссертации, в которых было показано, что в функционировании микротрубочек (MT) высших растений задействованы тирозилированная, ацетилированная, дитирозилированная, Δ 2 (нетирозилируемая) формы α -тубулина и полиглутамилированная форма α - и β -тубулина. Используя метод высокоразрешающего изоэлектрофокусирования было установлено, что тубулин в клетках *N. tabacum* представлен 22-мя изоформами. Одна изоформа может нести до трех модификаций. Следовательно, посттрансляционные модификации способствуют высокой

гетерогенности тубулина *N. tabacum*. Каждая из форм тубулина участвовала в формировании всех типов организации МТ: кортикальной сети, препрофазной ленте, митотическом веретене и фрагмопласте. При этом, антитела против ацетилированной и $\Delta 2$ -форм α -тубулина не реагировали с кинетохорными МТ веретена. Экспериментально продемонстрировано, что С-концевые структурные домены обеих субъединиц тубулина, где находятся, исключая ацетилирование, сайты остальных проанализированных модификаций, располагаются на поверхности нативной МТ и, таким образом, могут принимать участие в регуляции их функций. N-концевые домены спрятаны в матриксе МТ. Результаты работы свидетельствуют об эволюционной консервативности механизмов регуляции функциональных аспектов МТ.

Ключові слова: мікротрубочки, тубулін, рослини, пострасляційні модифікації, гетерогенність, структурні домени, антитіла, клітинний цикл.



444060

AB 34.169

AB 34.169