



УДК 576.311.348.7+543.272

© 2011

Академик НАН Украины Я. Б. Блюм, Д. И. Литвин,
Ю. А. Красиленко, Я. А. Шеремет, А. И. Емец

Нитротирозилирование как посттрансляционная модификация растительного α -тубулина

*Впервые за допомогою імунопреципітації з подальшим електрофорезом та Вестерн-блот аналізу було встановлено включення нитротирозину (NO_2 -Tyr) у α -тубулін клітин суспензійної культури *Nicotiana tabacum* лінії Bright Yellow-2 (BY-2). Крім того, досліджено ефекти донора оксиду азоту нітроприсуїду натрію на частоту зустрічальності мітохондричних фігур та організацію різних типів побудов мікротрубочок в інтерфазових та мітохондричних клітинах BY-2. Висловлено припущення, що присутність нитротирозильованого α -тубуліну в клітинах рослин вказує на зворотний характер даної посттрансляційної модифікації, яка має регуляторне значення для рослинних клітин.*

Известно, что процессы роста и развития растений координируются рядом внутриклеточных сигнальных молекул — вторичных посредников, играющих ключевую роль в молекулярных каскадах, например, ионами кальция, циклическим мононуклеотидфосфатом, пероксидом водорода, углекислым газом и оксидом азота (NO) [1]. Особый интерес представляет изучение механизмов сигналинга NO в виду его физико-химических свойств, которые объясняют повсеместность его распространения и важное физиологическое значение в клетках различных представителей филогенетически отдаленных видов. У растений NO вовлечен в регуляцию процессов роста и развития, а также в формирование ответа на действие абиотических и биотических факторов окружающей среды [2, 3]. К сожалению, сведения о путях передачи сигнала от NO в растительной клетке и молекулах-эффекторах, принимающих и преобразовывающих этот сигнал, ограничены. Известно, что одним из механизмов передачи сигнала от NO являются соответствующие посттрансляционные модификации белков, в частности нитротирозилирование [4].

Поскольку компоненты цитоскелета, в частности микротрубочки, обеспечивают процессы деления, роста и дифференциации клеток растений, актуальной задачей является исследование тубулина как основного белка микротрубочек в качестве потенциальной мишени нитротирозилирования. Известно, что в животной клетке α -тубулин является одной

из главных мишеней нитрования, а в условиях *in vivo* весьма распространено нитротирозилирование актина и α -тубулина [5].

Данные относительно зависимости организации микротрубочек от концентрации NO в клетках растений получены авторами [6, 7]. Было обнаружено, что кортикальные микротрубочки в эпидермальных клетках зоны растяжения корней *Arabidopsis thaliana* являются чувствительными к действию нитропрусида натрия, донора NO, поскольку изменяют свою исходную поперечную/косую ориентацию на хаотическую или продольную [6]. Непосредственный путь передачи сигнала от NO в растительной клетке, так же как и в животной клетке, может быть реализован через нитротирозилирование α -тубулина [8]. Соответственно микротрубочки растительных клеток способны выступать *downstream*-эффе́кторами в сигнальных каскадах при участии NO [5–7]. Однако наличие нитротирозилирования растительного α -тубулина и соответственно функциональная роль этой посттрансляционной модификации остаются не исследованными.

В связи с этим целью нашего исследования было установление посттрансляционного нитротирозилирования α -тубулина в клетках суспензионной культуры *Nicotiana tabacum* линии Bright Yellow-2 (BY-2) и поиск доказательств его роли в регуляции функциональных свойств микротрубочек.

Материалы и методы исследования. Суспензионную культуру клеток, экспрессирующую репортерный ген *gfp-mbd*, культивировали в модифицированной жидкой питательной среде Мурашиге–Скуга, согласно методике [9]. Трехдневную культуру BY-2, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, обрабатывали донором NO нитропрусидом натрия (Sigma, США) в концентрациях 0,2–5 ммоль/л. Образцы отбирали через 15–180 мин, а также через 24 ч после обработки нитропрусидом натрия. В качестве контроля использовали 5 ммоль/л нитропрусид натрия, инактивированный 24-часовой экспозицией в условиях дневного света [10].

Для биохимического анализа нитротирозилирования тубулина проводили иммунопреципитацию α -тубулина из экспериментальных образцов с последующим фракционированием преципитированных белков с помощью гель-электрофореза. Затем наличие модификации проверяли, проводя Вестерн-блоттинг гибридизацию с использованием специфических мышинных антител к α -тубулину (TU-01), любезно предоставленных доктором П. Драбером (Институт молекулярной генетики Чешской академии наук, Прага) и кроличьих антител к нитротирозину (anti-NO₂-Tyr) (Upstate, США). Клетки BY-2 лизировали с использованием набора CellLytic™ P Cell Lysis Reagent (Sigma, США), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Sigma, США) при концентрации 1 : 100 в соотношении 150 мг клеток на 100 мкл буфера для лизиса. Гомогенизированные в жидком азоте клетки BY-2 центрифугировали (13000 g) в течение 20 мин при температуре +4 °C с последующим определением концентрации белка по Бредфорду [11]. Белки разделяли при помощи денатурирующего электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле по Лэммли [12] и проводили электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Hybond™ ECL™ (GE Healthcare, США).

Для Вестерн-блота использовали антитела TU-01 концентрацией 2,2 мкг/мл, а к anti-NO₂-Tyr — концентрацией 0,7 мкг/мл. Нитроцеллюлозные мембраны после электропереноса отмывали в буфере TBST (10 ммоль/л Tris-Cl, pH 7,5, 150 ммоль/л NaCl, 0,05% Tween-20) и инкубировали в течение 1 ч в блокирующем буфере (TBST, содержащий 3%-е обезжиренное сухое молоко). Инкубацию с антителами против α -тубулина проводили в течение суток (ночи) при +4 °C, согласно методике [13], антитела к нитротирозину использовали, согласно рекомендации производителя. В качестве вторичных антител брали антимышинные

IgG (Santa Cruz Biotechnology, США) и антикриолици IgG (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированные с пероксидазой хрена, оба в разведении 1 : 3000. Иммунодетекцию проводили с помощью набора ECL SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для повторной иммунодетекции проводили отмывание мембран от первичных и вторичных антител с использованием реагента Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., США), согласно рекомендациям производителя.

Иммунопреципитацию α -тубулина из клеток ВУ-2 проводили, согласно методике, описанной нами ранее [14] с применением антител TU-16 (IgM), также любезно предоставленных доктором П. Драбером [15]. Для проведения реакции использовали протеин-L-агарозу (Thermo Fisher Scientific Inc, США) в расчете 20 мкл на образец, на которой предварительно иммобилизовали упомянутые антитела. Полученный аффинный носитель инкубировали в присутствии 1 мг тотального белкового экстракта клеток ВУ-2 в объеме 1 мл в течение 3 ч. Для доказательства специфичности реакции использовали следующие контроли: протеин-L-агароза, инкубированная отдельно с лизатом клеток ВУ-2; протеин-L-агароза, инкубированная с лизатом клеток ВУ-2 и контрольными антителами; протеин-L-агароза, инкубированная с антителами TU-16 без лизата клеток ВУ-2.

Изменения прижизненной организации микротрубочек интерфазных и делящихся клеток ВУ-2 (GFP-MBD), а также подсчет частоты встречаемости митотических фигур на 1000–1500 клеток ВУ-2 были исследованы с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) по методике, описанной ранее [6]. Ядерную ДНК для подсчета клеток ВУ-2 визуализировали с помощью DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола) в концентрации 5 мкг/мл. Все эксперименты проводили с трехкратным повторением.

Результаты и их обсуждение. В результате Вестерн-блот анализа белков лизата клеток ВУ-2 было установлено, что обработка нитропруссидом натрия в концентрациях 200 мкмоль/л, 1 ммоль/л и 5 ммоль/л вызывала лишь незначительные изменения в профиле нитротирозилирования белков, что выражалось в повышении уровня модифицированных белков с молекулярной массой до 30 кДа (данные не приведены). При этом относительно высокий уровень нитротирозилирования белков в интактных клетках позволяет говорить о том, что данная посттрансляционная модификация белков имеет физиологическое значение.

Для идентификации нитротирозилирования непосредственно растительного α -тубулина была проведена его иммунопреципитация с использованием специфических антител TU-16 IgM. Для получения доказательств наличия данной модификации в молекуле α -тубулина Вестерн-блоттинг анализ нитротирозина и α -тубулина в преципитированных образцах проводили последовательно с использованием одной и той же нитроцеллюлозной мембраны. Для этого после детекции нитротирозина с помощью соответствующих антител удаляли связавшиеся с антигеном первичные и вторичные антитела путем промывания в буфере, описанного выше, и для повторной гибридизации использовали антитела TU-01 против α -тубулина. В результате было показано полное совпадение их позиций на электрофореграмме (соответствующих α -тубулину и нитротирозилированному белку) (рис. 1). Таким образом, можно говорить о присутствии данной посттрансляционной модификации в молекуле α -тубулина, изолированного из клеток табака ВУ-2.

Кроме того, в комплексе с α -тубулином были преципитированы четыре белка с относительной молекулярной массой, кДа: 22, 28, 36 и 54, также содержащих нитротирозин

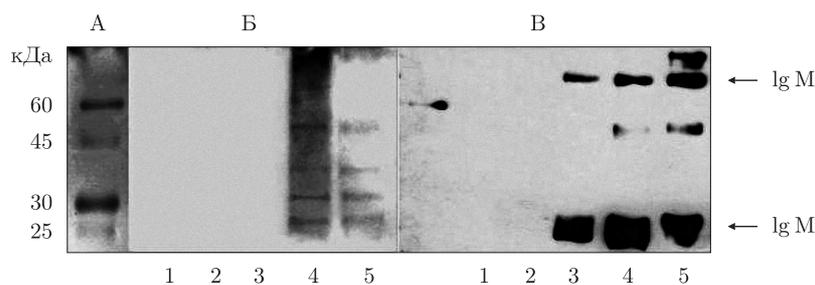


Рис. 1. Результаты иммунопреципитации α -тубулина с помощью антител TU-16, (Ig M), связанных с протеин-L-агарозой, и Вестерн-блот анализа гибридизации с использованием антител против остатков anti-NO₂-Туг (Б) и TU-01 Ig M (В): А — маркеры молекулярных масс (нитроцеллюлозная мембрана, окрашенная Ропсеау S).

Протеин-L-агароза: 1 — инкубированная с лизатом клеток ВУ-2; 2 — инкубированная с лизатом клеток ВУ-2 и негативными антителами; 3 — инкубированная с антителами TU-16; 4, 5 — иммунопреципитация α -тубулина из лизата клеток ВУ-2

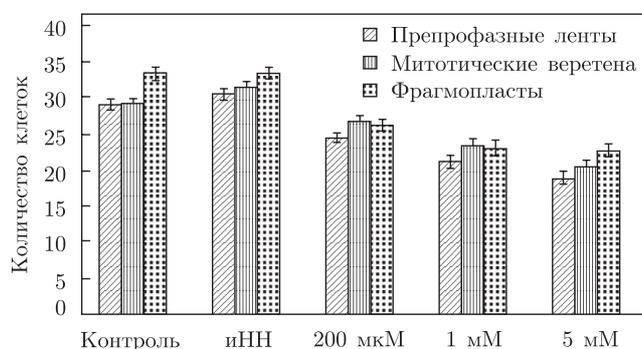


Рис. 2. Частота встречаемости митотических фигур в клетках ВУ-2 (GFP-MBD) после обработки нитропруссидом натрия в течение 3 ч. Расчеты приведены на 1000 клеток ВУ-2.

Ось ординат: количество клеток, вступивших в митоз; ось абсцисс: концентрации нитропрусида натрия. иНН — инактивированный нитропруссид натрия в концентрации 5 ммоль/л

в своем составе (см. полосы 4, 5 на рис. 1, Б). Возможно, эти белки являются ассоциированными с микротрубочками.

Нами также было обнаружено, что вследствие обработки нитропруссидом натрия в клетках ВУ-2 уменьшалось общее количество митотических микротрубочек. Результаты наблюдений свидетельствуют о дозозависимом уменьшении количества препрофазных лент, митотических веретен и фрагмопластов по сравнению с контролем (рис. 2). В то же время следует отметить, что обработка клеток ВУ-2 инактивированным нитропруссидом натрия не оказывала существенного влияния на частоту встречаемости митотических фигур по сравнению с контролем (см. рис. 2). Уменьшение количества митотических построений под влиянием нитропрусида натрия, скорее всего, связано с замедлением вхождения клеток в митоз, что в свою очередь может быть следствием уменьшения динамичности микротрубочек.

Наряду с описанными изменениями частот встречаемости митотических фигур обработка нитропруссидом натрия не приводила к существенным нарушениям организации микротрубочек в интерфазных и делящихся клетках ВУ-2. Следовательно, происходило формирование кортикальных сетей, препрофазных лент, митотических веретен и фрагмопластов (см. *д-з* на рис. 3), которые практически не отличались от контроля (см. *а-з*).

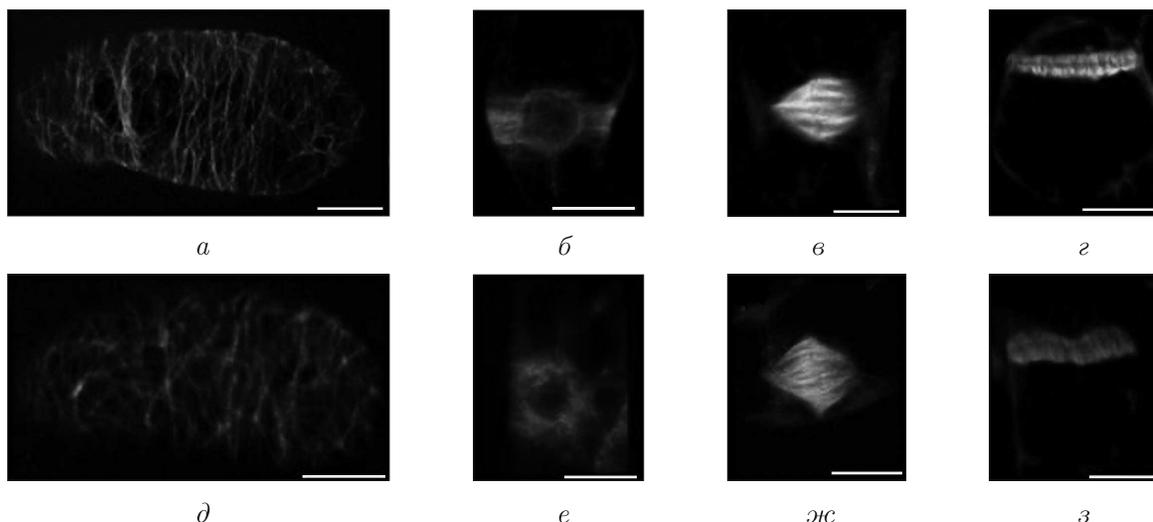


Рис. 3. Организация разных типов построений микротрубочек в клетках ВУ-2: а... г — контроль; д... з — обработка нитропруссидом натрия в концентрации 5 ммоль/л в течение 3 ч.

Типы построений микротрубочек: а, д — кортикальная сеть; б, е — препрофазная лента; в, ж — митотическое веретено; г, з — фрагмопласт. М-б 10 мкм

Таким образом, нами впервые установлено, что растительный α -тубулин подвергается нитротирозилированию, функциональная роль которого связана, скорее всего, с регуляцией динамичности микротрубочек в клетке.

1. Wilson I. D., Neil S. J., Hancock D. T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants // *Plant Cell Environ.* – 2008. – **31**, No 5. – P. 622–631.
2. Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. New insights into nitric oxide signalling in plants // *Ann. Rev. Plant. Biol.* – 2008. – **59**. – P. 21–39.
3. Красиленко Ю. А., Емец А. И., Блюм Я. Б. Функциональная роль оксида азота у растений // *Физиол. растений.* – 2010. – **57**, № 4. – С. 483–494.
4. Bian K., Ke Y., Kamisaki Y. et al. Proteomic modifications by nitric oxide // *J. Pharma. Sci.* – 2006. – **101**, No 4. – P. 271–279.
5. Блюм Я. Б., Красиленко Ю. А., Емец А. И. Нитротирозилування як регуляторна посттрансляційна модифікація протеїнів // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – № 5. – С. 3–11.
6. Емец А. И., Красиленко Ю. А., Шеремет Я. А., Блюм Я. Б. Реорганизация микротрубочек как ответ на реализацию сигнальных каскадов NO в растительной клетке // *Цитология и генетика.* – 2009. – **43**, № 2. – С. 73–77.
7. Shi F.-M., Yao L.-L., Pei B.-L. et al. Cortical microtubule as a sensor and target of nitric oxide signal during the defence responses to *Verticillium dahliae* toxins in *Arabidopsis* // *Plant Cell Environ.* – 2009. – **32**, No 4. – P. 428–438.
8. Blume Y. B., Nyporko A., Demchuk O. Nitrotyrosination of plant α -tubulins: potential mechanisms of influence to cellular processes // *BMC Plant Biol.* – 2005. – **5**. – P. 1186–1189.
9. Hasezawa S., Nagata T. Dynamic organization of plant microtubules at the three distinct transition points during the cell cycle progression of synchronized tobacco BY – 2 cells // *Bot. Acta.* – 1991. – **104**. – P. 206–211.
10. Ötvös K., Pasternak T. P., Dudits D. et al. Nitric oxide, a signaling molecule in plant cell reactivation // *BMC Plant Biol.* – 2005. – **5**, suppl. 1. – P. 527–531.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, No 5259. – P. 680–685.

13. *Viklický V., Dráber P., Hasek J. et al.* Production and characterization of a monoclonal antitubulin antibody // *Cell Biol. Int. Rep.* – 1982. – **6**, No 8. – P. 725–731.
14. *Blume Y. B., Yemets A., Sulimenko V. et al.* Tyrosine phosphorylation of tubulin in plant cells // *Planta.* – 2008. – **229**, No 1. – P. 143–150.
15. *Dráberová E., Dráber P.* Novel monoclonal antibodies TU-08 and TU-16 specific for tubulin subunits // *Folia biol. (Praha).* – 1998. – **44**, No 1. – P. 3–6.

ГУ “Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины”, Киев

Поступило в редакцию 26.01.2011

Academician of the NAS of Ukraine **Ya. B. Blume, D. I. Lytvin, Yu. A. Krasylenko,
Ya. A. Sheremet, A. I. Yemets**

Nitrotyrosination as a posttranslational modification of plant α -tubulin

*Nitrotyrosine (NO₂-Tyr) incorporation into α -tubulin of *Nicotiana tabacum* Bright Yellow-2 (BY-2) suspension culture cells is first shown, by using the immunoprecipitation technique with a further electrophoresis and the Western-blot analysis. In addition, the effects of nitric oxide donor sodium nitroprusside on the frequency of mitotic figures occurrence and the organization of various microtubular arrays in interphase and mitotic BY-2 cells are studied. It is assumed that the presence of nitrotyrosinated α -tubulin in plant cells may indicate the reversibility and a possible regulatory role of this modification in plant cells.*