

АНАЛІЗ ПРОСТОРОВОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ АКТИНОВИХ МІКРОФІЛАМЕНТІВ У ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ДІЮ ХОЛОДУ ЗА ВИКОРИСТАННЯ ПРОГРАМИ MICROFILAMENT ANALYZER

Візуалізація цитоскелетних структур, таких як мікротрубочки та актинові філаменти, здійснюється головним чином за допомогою аналізу мікроскопічних зображень, отриманих за допомогою конфокального скануючого лазерного мікроскопа. На сьогоднішній день великий інтерес становить комп'ютерне моделювання просторового зображення цитоскелету за використання механічної моделі [1], що допомагає здійснити більш точний і достовірний аналіз організації цитоскелетних структур. Нещодавно було розроблено програмне забезпечення MicroFilament Analyzer (MFA), що з високою точністю дозволяє аналізувати і визначати орієнтацію фібрилярних структур на цифрових знімках у більш стандартизований, об'єктивний і повторювальний спосіб [2].

Актин – один із ключових компонентів цитоскелету, що відіграє вирішальну роль в розвитку рослини, регулюючи низку таких фундаментальних клітинних процесів, як диференціація та ріст клітини, міжклітинні взаємодії, клітинна моторика, зокрема рухливість органел та транспорт везикул, відповідь на дію стресу та ін. [3–5]. Одним з актуальних наукових напрямів є дослідження ролі актинового цитоскелету у відповіді клітини на дію різних абіотичних факторів, наприклад, гравітації, механічного стресу, високих і низьких температур, засолення тощо [6–10]. Температура є одним із ключових факторів, що регулює функціонування рослин протягом усього онтогенезу [11]. Встановлено, що низька температура призводить до суттєвих змін організації мікротрубочок, зокрема, до їх деполімеризації [12, 13]. Показано також, що на ранніх етапах відповіді клітини на дію холоду відбувається порушення організації актинових філаментів, що в подальшому призводить до зміни їх нативної орієнтації [14–16]. Однак відомостей щодо впливу низьких температур на організацію актинового цитоскелету у рослин недостатньо. Тому метою цієї роботи був аналіз організації актинових

філаментів *in vivo* в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* (GFP-ABD2-GFP) після впливу холодого фактора за допомогою програмного забезпечення MFA.

Матеріали і методи

Експерименти проводили на 4-денних проростках лінії *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., що експресує химерний ген *35::GFP-ABD2-GFP* (F-актин зв'язуючий домен (ABD) гена фібрину (*AtFIM1*) із *A. thaliana*, злитий з геном *gfp* як з С-, так і з N-кінців ABD2), що дозволяє здійснювати візуалізацію актинових філаментів у живих клітинах цієї лінії [17]. Вирощування насіння, дослідження впливу низьких температур на ріст, морфологію коренів, статистична обробка даних відбувалися за описаними нами раніше методиками [18]. Організацію актинових філаментів після впливу +4°C та +0,5°C досліджували *in vivo* за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM 5 PASCAL (“Carl Zeiss”, Німеччина). Для отримання тривимірного зображення використовували аргоновий лазер із довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 405/488, емісійний фільтр BP 505–530, об'єктиви Plan Achromat 40x/1.4 DIC і 60x/1.4 Oil DIC. Тривимірне зображення організації актинових філаментів отримували на основі серії оптичних зрізів (Z-стеків) з інтервалом 0,2–0,7 мкм за допомогою програмного забезпечення версії 4SP2 LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Німеччина).

Для аналізу орієнтації мікрофіламентів після впливу досліджуваних температур використовували програмне забезпечення Microfilament Analyzer (MFA), що було розроблене співробітниками Університету Анверпена (Бельгія, м. Анверпен) [2] і знаходиться у вільному доступі на сайті <http://www.ua.ac.be/bimef/MFA>. Ця програма здійснює аналіз зображень мікрофіламентів клітин різних зон кореня *A. thaliana*, що були отримані за допомогою конфокального мікроско-

пії. Отримані дані представлено у вигляді таблиць та графіків в Microsoft Office Excel 2007.

Результати та обговорення

Схема опрацювання цифрових зображень.

Для аналізу конфокального зображення необхідно мати два файли: зріз зображення (на якому добре видно контури клітини) і зображення Z-стека, що накладаються один на одного (рис. 1 а). Далі потрібно визначити контур клітини, що можна здійснити автоматично в програмі або вручну для виявлення фібрил в середині окремої клітини. На наступному етапі відбувається детекція (виявлення) актинових філаментів окремо в кожній вибраній клітині (рис. 1 б). Отримані результати інтерпретуються у вигляді віртуальної сітки в градусах. Лінії віртуальної сітки знаходяться в горизонтальному положенні в початковому зображенні, і лінії, що лежать поверх, будуть мати таку ж орієнтацію, як лінії визначення. Користувач програми аналізує і визначає кут (напряму) розташування мікрофіламентів, що коливається в межах від 0° до 360° на кожному кроці.

Для зручності віртуальну сітку поділяють на чотири категорії для виявлення основної орієнтації(й) в середині клітини. Перша категорія – це клітини, у яких мікрофіламенти розміщуються на віртуальній сітці в діапазоні 80–100° і їй присвоюється поперечна орієнтація щодо повздовжньої осі клітини. Наступна категорія володіє поперечною орієнтацією, в якій діапазон розміщення мікрофіламентів сягає 170–10°. Двом іншим категоріям відповідають проміжні значення в діапазоні між 10–80° і 100–170°, і їм присвоюється навскісна орієнтація актинових філаментів в середині клітини. За наявності двох чи більше присутніх орієнтацій остання називається випадковою орієнтацією. Після того, як число мікрофіламентів і їх орієнтація в кожній клітині були виявлені, отримані дані можуть бути відображені у вигляді графічного зображення (рис. 1 в). Візуальне представлення виявлених актинових філаментів у зображенні Z-стека зберігається, і числові дані експортуються в автоматично створену таблицю (*.xls), що містить в собі виявлені параметри клітини, число актинових філаментів на кут в клітині, а також його домінуючий напрям.

Отримані результати підтверджуються даними, що спостерігали раніше [2] в клітинах кореня *A. thaliana* (GFP-MAP4) для визначення основної


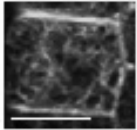
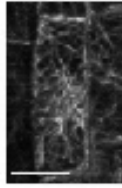
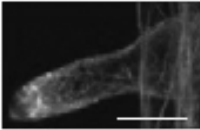



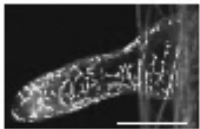




	Епідермальна клітина кореневого апексу	Меристематична клітина	Епідермальна клітина зони розтягу	Кореневий волосок (зона диференціації)
а) Тривимірне зображення актинових філаментів в клітині в реальному часі				
б) Детекція актинових ниток в середині клітини за допомогою програми				
в) Орієнтація актинових філаментів в результаті MFA	 Рандомна	 Коса	 Рандомна	 Повздовжня

Рис. 1. Орієнтація актинових філаментів в різних типах клітин кореня *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP). Масштаб: 20 мкм

орієнтації мікротрубочок у середині клітини після гравістимулювання.

Аналіз організації мікрофіламентів після дії низьких температур. Відомо, що функції актинового цитоскелету нерозривно пов'язані з його динамічними властивостями. Для вивчення цих властивостей та їх ролі в життєдіяльності клітини нами було використано лінію *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP), що дозволяє здійснювати візуалізацію актинових філаментів за допомогою конфокальної мікроскопії в живих клітинах. Зокрема, нами було вивчено дію температури +4°C на організацію актинових філаментів клітин різних зон кореневого апексу та виявлено взаємозв'язок між порушеннями в організації актинового скелету і змінами у морфології та ростовій активності коренів [18]. Зі зниженням температури та збільшенням часу холодової обробки ступінь деполімеризації актину загалом зростає. Так, після 1 год обробки температурою +4°C в клітинах епідерми сітка мікрофіламентів ставала більш рідкою порівняно з контролем, а після обробки температурою +0,5°C пучки мікрофіламентів мали невпорядковану орієнтацію та частково деполімеризувалися.

У контрольних зразках у клітинах меристеми актинові філаменти були представлені у вигляді тонкої високодинамічної сітчастої структури та розміщувалися по всій цитоплазмі клітини [19]. Після дії холоду (+4°C) через 1 год в цих клітинах відбувалося порушення організації мікрофіламентів та їх часткова деполімеризація [18]. Після обробки температурою +0,5°C протягом 2 год в окремих клітинах спостерігалася повна деполімеризація мікрофіламентів.

У перехідній зоні кореня в контролі актиновий цитоскелет мав вигляд пучків F-актину, що розміщувалися навколо ядра і приєднувалися поперечними тяжами до клітинної стінки. В зоні розтягу пучки F-актину також розміщуються навколо ядра, а біля поверхні клітини спостерігаються більш товсті і помітні нитки актину [19]. Нами було встановлено, що після впливу температури +4°C актинові філаменти в цих зонах росту кореня реорієнтуються, F-актин стає більш тонким і коротким [18]. Зі зниженням температури до +0,5°C кількість клітин із частковою і навіть повною деполімеризацією актинових філаментів збільшується.

Підвищена чутливість до дії холоду була відмічена нами також і для актинових філаментів у клітинах *корневих волосків*. На ранніх стадіях розвитку кореневого волоска формується густа

сітка з пучків F-актину, що заповнює весь кортекс клітини. На більш пізньому етапі розвитку кореневого волоска пучки F-актину розтягуються в напрямку його росту і на самому апексі формують дуже тонку і динамічну сітку мікрофіламентів [19]. Однак через одну годину після холодової обробки (+4°C) в клітинах волосків спостерігається розрідження актинової сітки і часткова деполімеризація мікрофіламентів [18]. Після обробки температурою +0,5°C можна було спостерігати лише яскраво забарвлені точкові структури або актинові нитки, а після двох годин обробки відбувалася деполімеризація цих структур.

Раніше було показано використання програми MFA для аналізу організації актинового цитоскелету в епідермальних клітинах *A. thaliana* на різних стадіях розвитку [20]. Було встановлено, що на ранніх стадіях розвитку F-актин організується в основному випадковим чином. У міру зростання клітини мікрофіламенти в першу чергу приймають поздовжню орієнтацію, яка також зберігається в найбільших клітинах. У процесі еволюції від молодих до старих клітин спостерігається приблизно рівномірний розподіл поперечних, косих або комбінованих орієнтацій, крім перехідних фаз, де в основному спостерігається випадкова і повздовжня орієнтація актинових філаментів.

Аналіз конфокальних зображень клітин із різних зон кореня *A. thaliana* (GFPABD2-GFP) за допомогою MFA уточнює та суттєво доповнює інформацію щодо впливу зазначених температур на організацію та орієнтацію актинових філаментів у клітинах (рис. 2). За допомогою програми MFA нами було встановлено, що під дією холоду в клітинах епідерми орієнтація мікрофіламентів із часом поступово змінювалася із рандомної на повздовжню, а потім навскісну, а в клітинах меристеми та перехідної зони – з рандомної на переважно поперечну. В клітинах зони розтягу після впливу понижених температур напрямку орієнтації мікрофіламентів змінювався від хаотичного на переважно повздовжній; у клітинах зони диференціації в основному зберігалася повздовжня та коса орієнтація щодо осі кореня. Отже, за допомогою програмного забезпечення MFA нами вперше було встановлено, що під впливом холоду відбуваються не тільки розрідження динамічної актинової сітки та зміни характеру полімеризації/деполімеризації актину в клітинах різних зон кореневого апексу, але й диференційно змінюється орієнтація мікрофіламентів відносно основної осі кореня.

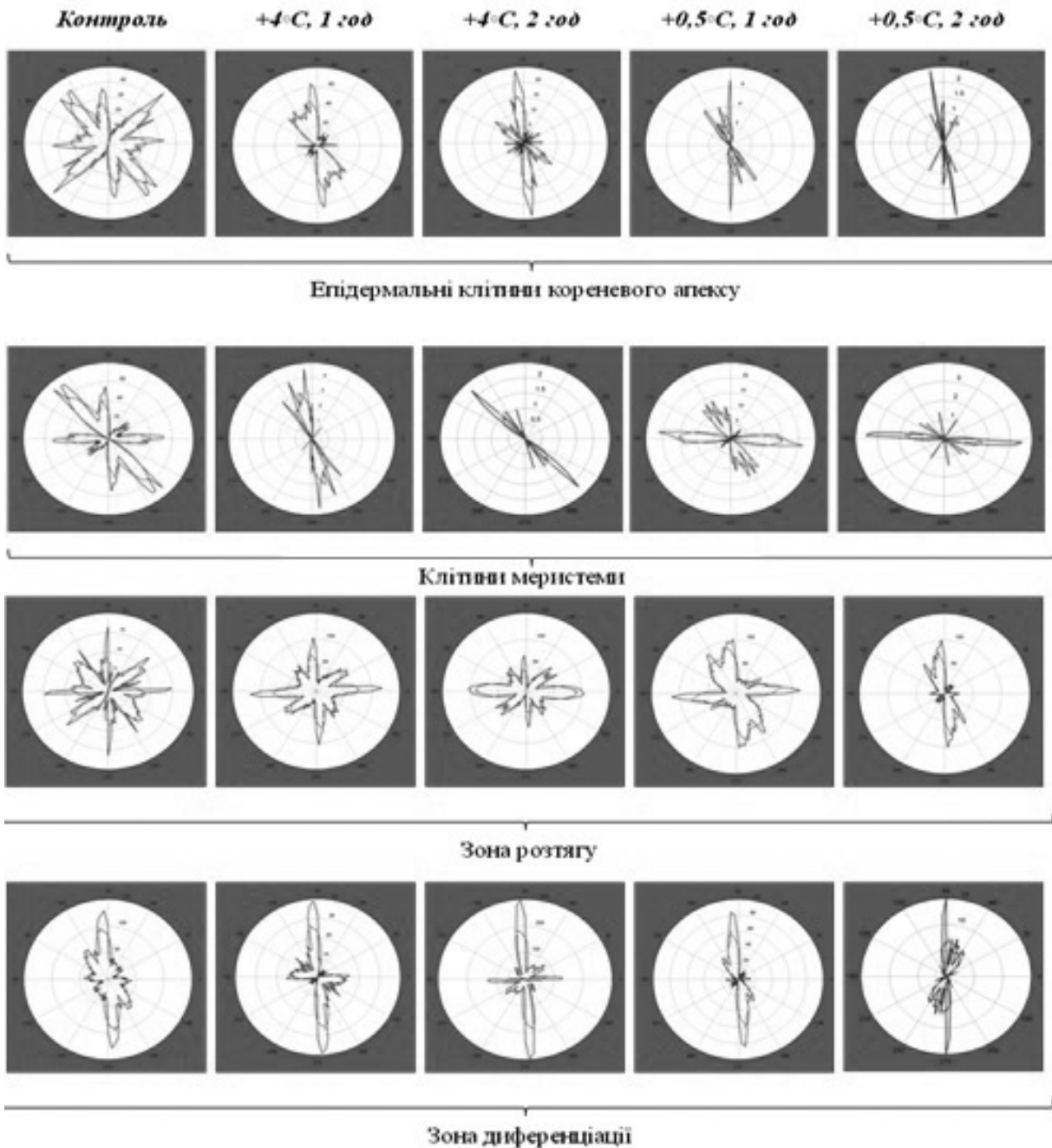


Рис. 2. Орієнтація актинових філаментів (за результатами програми MFA) в різних типах клітин кореня *A. thaliana* після впливу понижених температур +4°C та +0,5°C через 1 та 2 год обробки

Отримані дані узгоджуються з іншими дослідженнями, в яких спостерігали деполімеризацію цитоскелетних структур через короткі інтервали часу після обробки рослини холодом, наприклад, у клітинах ріпаку (*Brassica napus*) та люцерни (*Alfalfa*) [14–15]. Зміни організації актинового цитоскелету під впливом холоду також спостерігали в пилку груші (*Pyrus pyrifolia*), що супроводжувалися вивільненням цитозольного

Ca²⁺ і активацією K⁺-каналів [21]. У клітинах суспензійної культури ріпаку під впливом холоду сітка мікрофіламентів розріджувалася, змінювала свою організацію та деполімеризувалася [22]. Показано, що навіть короткочасна експозиція культури клітин *Nicotiana tabacum* L. BY-2 холодом (0°C, 5 хв) призводила до зникнення радіальних мікрофіламентів, а більш тривала (20 хв) – до формування неупорядкованої розрідженої сітки

мікрофіламентів. Через більш тривалий проміжок часу (12 год) спостерігалися лише яскраві короткі пучки або окремі скупчення F-актину навколо ядра і в периферії клітини [16].

Отже, програмне забезпечення MicroFilament Analyzers дозволяє фіксувати зміни у динамічній організації цитоскелету за умов впливу різних факторів та порівнювати ефекти дії між собою. Так, за допомогою MFA було проведено аналіз організації мікротрубочок у клітинах епідермісу коренів *A. thaliana* під час гравістимуляції. Аналіз показав чіткий ефект дії гравістимулу на організацію мікротрубочок, зокрема, їх різницю в клітинах, розміщених по різні боки згину кореня. [2]. Нами вперше було використано програмне забезпечення MFA для дослідження орієнтації актинових філаментів у середині клітини після впливу холодного фактора і виявлено, що

ця програма є зручним інструментом, який стандартизує обробку складних зображень і доповнює наші дані щодо змін організації мікрофіламентів під час впливу низьких температур (+4°C; +0,5°C) у живих клітинах.

Висновки

Отримані результати та їх аналіз показали, що холодний стрес і час його обробки є значущими факторами, які впливають на організацію актинових філаментів клітин різних зон кореневого апексу *A. thaliana*. Використання програмного забезпечення MFA для з'ясування впливу низьких температур на орієнтацію актинового цитоскелету має важливе значення для точного і детального розуміння реакції клітини на дію абіотичного стресу у більш швидкий і стандартизований спосіб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dzhurakhalov A., Draelants D., De Vos. D., Bogaerts I., Kalve S., Prinsen E., Vissenberg K., Vanroose W., Broeckhove J., Beemster G.T.S. Towards mechanistic models of plant organ growth // J. Exp. Bot. – 2012. – 63. – P. 3325–3337.
2. Jacques E., Buytaert J., Wells D.M., Lewandowski M., Bennett M.J., Dirckx J., Verbelen J.P., Vissenberg K. MicroFilament Analyzer, an image analysis tool for quantifying fibrillar orientation, reveals changes in microtubule organization during gravitropism // Plant J. – 2013. – 74. – P. 1045–1058.
3. Hussey P.J., Katelaar T., Deeks M.J. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth // Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – 57 – P. 109–125.
4. Pollard T.D., Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // Cell. – 2003. – 112. – P. 453–465.
5. Lee S.H., Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells // Mol Cells. – 2010. – 29, № 4. – P. 311–325.
6. Pozhvanov G.A., Suslov D.V., Medvedev S.S. Actin cytoskeleton rearrangements during the gravitropic response of *Arabidopsis* roots // Cell Tiss. Biol. – 2013. – 7, № 2. – P. 185–191.
7. Deng L., Fairbank N.J., Fabry B., Smith P.G., Maksym G.N. Localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultured airway smooth muscle cells // Amer. J. Physiol. – 2004. – 287, № 2. – P. 440–448.
8. Toivola D.M., Strnad P., Habtezion A., Omary M.B. Intermediate filaments take the heat as stress proteins // Trends Cell Biol. – 2010. – 20, № 2. – P. 79–91.
9. Wasteneys G.O., Yang, Z. New views on the plant cytoskeleton // Plant Physiol. – 2004. – 136. – P. 3884–3891.
10. Fan T.T., Ni J.J., Dong W.C., An L.Z., Xiang Y., Cao S.Q. Effect of low temperature on profilins and ADFs transcription and actin cytoskeleton reorganization in *Arabidopsis* // Biologia plantarum. – 2015. – 20, № 10. – P. 793–796.
11. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants // New Phytol. – 2008. – 179, № 3. – P. 615–628.
12. Willin M., Stromberg E. Cold-stable and cold-adapted microtubules // Int. Rev. Cytol. – 1995. – 157. – P. 1–31.
13. Zhao J.-L., Li X.-L., Zhang H., Li Y. Chilling stability of microtubules in root-tip cell of cucumber // Plant Cell Rep. – 2003. – 22. – P. 32–37.
14. Orvar B.L., Sangwan V., Omann F.M., Dhindsa R.S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of action cytoskeleton and membrane fluidity // Plant J. – 2000. – 23, № 6. – P. 785–794.
15. Sangwan V., Foulds I., Singh J., Dhindsa R. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx // Plant J. – 2001. – 27. – P. 1–12.
16. Pokorna J., Schwarzerova K., Zelenkova S., Petrasko J., Janotova I., Capkova V. Sites of actin filament initiation and reorganization in cold-treated tobacco cells // Plant, Cell Environment. – 2004. – 27. – P. 641–653.
17. Wang Y.S., Yoo C.M., Blancaflor E.B. Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fibrin actin-binding domain 2 // New Phytol. – 2008. – 177. – P. 525–536.
18. Плоховська С.Г., Заславський В.А., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Участь актинових філаментів в ответі кліток корня *Arabidopsis thaliana* на діяльність низької температури // Доповіді НАН України. – 2015. – № 7. – С. 136–142.
19. Voigt B., Timmers A. C.J., Samaj 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. – 84. – P. 95–608.
20. Jacques E., Lewandowski M., Buytaert J., Fierens Y., Verbelen J.P., Vissenberg K. Microfilament analyzer identifies actin network organizations in epidermal cells of *Arabidopsis thaliana* roots // Plant Signal. Behav. – 2013. – 8, № 7, e24821. Doi: 10.4161/psb.24821.

21. Wu J.Y., Jin C., Qu H.Y., Tao S.T., Xu G.H., Wu J., Wu H.Q., Zhang S.L. Low temperature inhibits pollen viability by alteration of actin cytoskeleton and regulation of pollen plasma membrane ion channels in *Pyrus pyrifolia* // Environ. Exp. Bot. – 2012. – 78. – P. 70–75.
22. Egierszdorff S., Kacperska A. Low temperature effects on growth and actin cytoskeleton organization in suspension cells of winter oilseed rape // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2001. – 65. – P. 149–158.

PLOHOVSKA S.H., KRAVETS E.A., BLUME YA.B., YEMETS A.I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a*

STUDY OF SPATIAL ORGANIZATION OF PLANT ACTIN FILAMENTS ON COLD ACTION BY MICROFILAMENT ANALYZER PROGRAM

Aim. The paper demonstrated the use of MicroFilament analyzer (MFA) program to study the organization of actin filaments in different cells of *Arabidopsis* roots under cold action. **Methods.** For visualization of actin filaments in different types of root cells of *A. thaliana* (GFP-ABD2-GFP) seedlings the confocal laser scanning microscope LSM 510 META was used. To analyze the microfilaments' orientation after exposure to temperatures +4° and +0.5°C MFA software has been applied. **Results.** It has been found that low temperatures effect the organization and the orientation of native microfilaments in different cell types of the main *Arabidopsis* roots. The analysis by MFA showed that cold stress and exposure time are important factors affecting the orientation of actin filaments. **Conclusions.** Using MFA software to determine the effects of low temperatures on microfilaments is essential for a more accurate and detailed understanding of cold effect on the behavior of these filamentous structures in *Arabidopsis* in a quickly and standardized manner.

Keywords: actin filaments, root apex, low temperature, MicroFilament analyzers (MFA), *A. thaliana* лінії GFP-ABD2-GFP.