

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 576.35:576.36

**ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ БЕЛОК, ВЫЯВЛЯЕМЫЙ В КЛЕТКАХ
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛ К ТЯЖЕЛЫМ ЦЕПЯМ
ДИНЕИНА, СВЯЗАН С ВЕЗИКУЛЯРНЫМИ ОРГАНЕЛЛАМИ,
В ТОМ ЧИСЛЕ С АППАРАТОМ ГОЛЬДЖИ¹**

© 2008 г. Н. А. Шанина, Е. М. Лазарева, Ю. С. Ченцов, Е. А. Смирнова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы

E-mail: kinggobi@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.06.07 г.

Цитоплазматический динеин – мультисубъединичный комплекс, который осуществляет транспорт органелл по микротрубочкам в сторону их минус-конца. Были использованы антитела, полученные к двум функциональным доменам (моторному и микротрубочкосвязывающему) одного из основных компонентов комплекса – тяжелой цепи динеина слизневика *Dictyostelium discoideum*, – для того чтобы протестировать клетки меристемы корня пшеницы *Triticum aestivum*. Было показано, что в тотальных экстрактах клеток меристемы взаимодействуют с полипептидом высокой молекулярной массы (>500 кДа) и что полоса, распознаваемая антителами в растительных экстрактах, имеет более медленную электрофоретическую подвижность, чем высокомолекулярная полоса на препарате динеина млекопитающих. Антитела, связанные с протеин А-сефарозой, преципитировали высокомолекулярный полипептид из очищенных клеточных экстрактов. Иммуоцитохимический анализ показал, что антиген, выявляемый антителами к тяжелой цепи динеина, связан с везикулами, локализация которых зависит от стадии клеточного цикла. Антигенпозитивные везикулы в клетках располагаются в околядерной области на стадии интерфазы и ранней профазы, на периферии веретена и в области полюсов веретена во время митоза и в интерзональной области во время формирования фрагмопласта и клеточной пластинки. Некоторые антигенпозитивные везикулы также взаимодействуют с антителами к белкам-маркерам аппарата Гольджи. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в клетках высших растений присутствует высокомолекулярный белок, который взаимодействует с антителами к моторному и микротрубочкосвязывающему доменам тяжелой цепи динеина *Dictyostelium*. Выявляемый антиген ассоциирован с везикулярными структурами в цитоплазме, в том числе и с аппаратом Гольджи.

Ключевые слова: внутриклеточный транспорт, динеин, микротрубочки, митоз, растительные клетки.

Цитоплазматический динеин и кинезин – моторные белки, ответственные за транспорт мембранных органелл по микротрубочкам. Динеин – это большой мультисубъединичный комплекс, который перемещает органеллы в сторону минус-конца микротрубочек. Он состоит из двух тяжелых цепей (Dynein Heavy Chains – ДНС, молекулярная масса >500 кДа) и нескольких меньших по молекулярной массе компонентов – промежуточных (74 кДа), промежуточных легких (55 кДа) и легких цепей (Tctex1/tp3, road block, LC8) (Hirokawa, 1998; Vallee et al., 2004; Pfister et al., 2006). Центральная и С-концевая части молекулы ДНС образуют глобулярную структуру, которая взаимодействует с микротрубочками и несет моторный домен (Koonce, Samsó, 1996, Nishiura et al., 2004). N-концевой участок моле-

кулы участвует в димеризации двух тяжелых цепей, а также ассоциирует с другими субъединицами динеина, которые формируют каргосвязывающую часть комплекса (Oiwa, Sakakibara, 2005). Цитоплазматический динеин играет важную роль в формировании и распределении комплекса Гольджи, разрушении ядерной оболочки, сборке и функционировании специализированных систем микротрубочек, таких как митотическое веретено и аксонома жгутиков (Vale, 2003).

Микротрубочки относятся к элементам цитоскелета и присутствуют во всех эукариотических клетках, однако организация системы микротрубочек в клетках растений отличается от той, которая присутствует в клетках животного происхождения. В растительных клетках микротрубочки формируют несколько систем, которые последовательно сменяют друг друга в ходе клеточного цикла. В большинстве растительных клеток, в том

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 03-04-48399).

числе и в меристематических, на стадии интерфейсы присутствуют кортикальные пучки микротрубочек, в конце G_2 -периода образуется препрофазное кольцо микротрубочек, в начале митоза формируется митотическое веретено, а в конце – цитокинетический аппарат клетки, фрагмопласт (Hasezawa, Kumagai, 2002). Еще одним отличительным свойством высших растений является отсутствие центриолей и centrosомы как доминантного центра организации микротрубочек (Smirnova, Vajner, 1992), а также таких специализированных структур, как реснички и жгутики (Vale, 2003).

Моторные белки играют важную роль в организации и функционировании систем микротрубочек во время клеточного деления, роста и дифференцировки клеток растений (Reddy, 2001). В растительных клетках выявлено и охарактеризовано множество кинезиноподобных белков (Lee, Liu, 2004), однако в геноме *Arabidopsis* не было обнаружено полноразмерных генов для субъединиц динеина (кроме легких цепей LC8). Отсутствие жгутикового динеина в клетках высших растений объясняется тем, что у них нет ресничек и жгутиков, а функции цитоплазматического динеина выполняют многочисленные минус-конец-ориентированные кинезиноподобные белки (Lawrence et al., 2001).

Однако ранее было показано, что в пыльцевых трубках *Nicotiana tabacum* присутствует динеиноподобный полипептид с молекуляр. массой более 400 кДа (Moscatelli et al., 1995). Динеин – это высококонсервативный белок, который принимает участие во многих внутриклеточных процессах и обнаруживается у самых разных групп организмов: от дрожжей до человека (Höök, Vallee, 2006; Pfister et al., 2006). Для того чтобы выяснить, есть ли в клетках высших растений динеиноподобные белки, мы использовали антитела, полученные к двум функционально разным доменам (моторному и микротрубочкосвязывающему) ДНС слизневики *Dictyostelium discoideum*, для тестирования клеточных экстрактов и иммуноцитохимического окрашивания клеток меристемы корня пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская 39.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Приготовление экстрактов. Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Московская 39) проращивали при 25°C на влажной фильтровальной бумаге, помещенной в чашки Петри. Корешки отрезали после того, как их длина достигала 1.5 см, замораживали в жидком азоте и размельчали до порошкообразного состояния, используя ступку и пестик. Полученный порошок смешивали с 1 мл 5 × буфера Лаэммли, состоящего из 312.5 мМ трис-НСl, рН 6.8, 10% SDS, 25% 2-меракаптоэтанола и 10% глицерина. Затем образцы кипятили в течение 5 мин и центрифугировали при 10000 g; супернатант, содержащий растворенный белок,

собирали и использовали для анализа. Образцы очищенного динеина, выделенного из мозга крупного рогатого скота, были получены, как описано ранее (Steffen et al., 1997), и любезно предоставлены С.А. Кузнецовым (Институт зоологии, Университет Росток, Германия).

Электрофорез и Вестерн-блоттинг. Белки разделяли в градиентном (5–12%) полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (в присутствии SDS) в соответствии с методом, предложенным Лаэммли (Laemmli, 1970). Гели окрашивали с использованием Кумасси R-250. Для Вестерн-блоттинга белки переносили на нитроцеллюлозу Hybond C Extra (“Amersham Bioscience”, США), используя полусухой метод (Towbin et al., 1979). Нитроцеллюлозу после переноса окрашивали с помощью красителя Понсо S (“Sigma-Aldrich”, США) для того, чтобы установить положение маркеров молекулярной массы и убедиться в эффективности переноса белков. Затем полоски инкубировали с кроличьими поликлональными антителами, полученными к фрагменту (молекуляр. масса 78 кДа), который находится в области АТФ-связывающего домена (1699–2395) (Koonce, Samsó, 1996), а также с антителами, полученными к фрагменту (молекуляр. масса 57 кДа), который находится в области микротрубочкосвязывающего домена (3182–3678) ДНС слизневики *Dictyostelium discoideum* (Samsó, Koonce, 2004). Антитела были любезно предоставлены М. Кунсом (М. Кунсе, Научный центр Вадсворт, США). В качестве вторых антител были использованы козы антикроличьи антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой (“Sigma-Aldrich”, США). Окраску визуализировали в системе субстратов для щелочной фосфатазы BCIP/NBT (“Sigma Aldrich”, США).

Иммунопреципитация. Замороженные корешки измельчали до состояния порошка в жидком азоте. Полученный порошок переносили в охлажденный на льду буферный раствор (PBS, 50 мМ HEPES, 200 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 1% NP-40, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 10 мкг/мл апротинина, рН 7.6) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем лизированный материал центрифугировали при 50000 g (30 мин, 4°C), и полученный супернатант, содержащий растворенные белки, использовали для дальнейшего исследования. Иммунопреципитацию белковых экстрактов проводили в течение 1 ч при 4°C антителами к разным фрагментам ДНС *Dictyostelium*, прикрепленными к протеин А-сефарозе CL-4B (“Amersham Bioscience”, США). Преципитированный белок элюировали буфером для белков Лаэммли и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Иммуноцитохимия. Семена пшеницы проращивали при 25°C на влажной фильтровальной бумаге, помещенной в чашки Петри. Когда корешки достигали длины 1.5 см, их отрезали и фиксировали

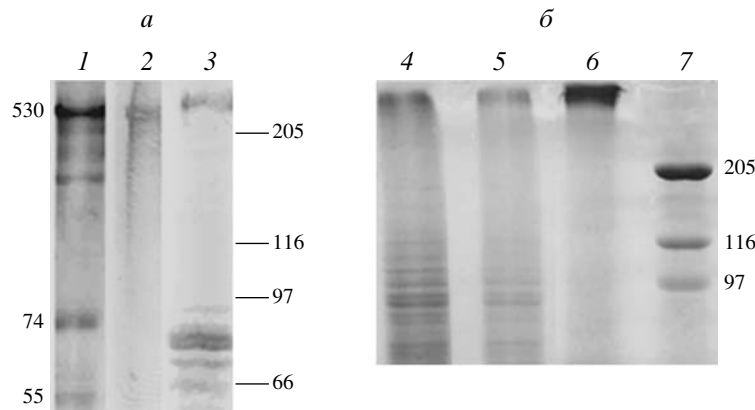


Рис. 1. Взаимодействие антител к моторному домену ДНС *Dictyostelium* с динеином животных и экстрактами клеток растений: *a* – специфичность антител к ДНС; *б* – иммунопреципитация антителами к ДНС высокомолекулярного компонента из клеточного экстракта, полученного из корешков пшеницы. Дорожки: 1 – электрофорез в полиакриламидном геле очищенного динеина, выделенного из мозга крупного рогатого скота (окраска Кумасси); слева – положение тяжелой, промежуточной и легкой промежуточной цепей динеина; 2 – иммуноблоттинг препарата очищенного динеина, выделенного из мозга крупного рогатого скота, с антителами к ДНС (окрашивание в системе ВСIP/NBT); 3 – иммуноблоттинг тотального клеточного экстракта из корешков пшеницы с антителами к ДНС (справа – положение маркеров молекуляр. массы, кДа); 4 – электрофорез белков тотального клеточного экстракта (окраска Кумасси); 5 – то же после инкубации с антителами к ДНС, связанными с протеин А-сефарозой; 6 – иммунопреципитат, полученный антителами к ДНС из тотального клеточного экстракта (гель, окрашенный Кумасси); 7 – маркеры молекуляр. массы.

в течение 1,5–2 ч в 4%-ном параформальдегиде, приготовленном в буферном растворе РНЕМ, рН 6,9 (60 мМ PIPES, 25 мМ HEPES, 10 мМ ЭГТА, 2 мМ $MgCl_2$), а затем инкубировали в течение 15–20 мин в 0,4 М маннитоле, содержащем 1% целлюлазы и 5 мМ ЭГТА. После этого корешки помещали на обезжиренные покровные стекла и мацерировали под бинокулярной лупой тонкими препаровальными иглами. Выделенные клетки оставляли высыхать на покровных стеклах в течение 18–24 ч при 4°C. После этого покровные стекла покрывали 0,2%-ной желатиной и высушивали, а полученные препараты использовали для иммуноцитохимического окрашивания. Препараты помещали в буферный раствор РНЕМ, затем инкубировали в течение 30 мин в этом же буферном растворе с добавлением 0,5% Тритона X-100 и 5% ДМСО и ополаскивали в 10 мМ буферном растворе *trис*-HCl (рН 7,6). Далее препараты инкубировали в течение 18–24 ч при комнатной температуре: 1) с мышинными моноклональными антителами к α -тубулину, клон DM1A (“Sigma-Aldrich”, США) и кроличьими поликлональными антителами к моторному или микротрубочкосвязывающему доменам *Dictyostelium* ДНС; 2) с кроличьими поликлональными антителами к моторному или микротрубочкосвязывающему доменам *Dictyostelium* ДНС и мышинными моноклональными антителами к белку аппарата Гольджи 58K (formiminotransferase cyclodeaminase – FTCD) (“Sigma-Aldrich”, США) или с мышинными моноклональными антителами к маннозидазе II (“Covance”, США). После ополаскивания в 10 мМ буферном растворе *trис*-HCl (рН 7,6) и 20 мМ бу-

ферном растворе *trис*-HCl, содержащем 0,1%-ный бычий сывороточный альбумин (рН 8,2), препараты инкубировали в течение 45 мин при 37°C с овечьими антимышиными антителами IgG, конъюгированными с FITC (“Amersham Bioscience”, США), и ослиными антикроличьими антителами IgG, конъюгированными с флуорохромом Texas Red (“Amersham Bioscience”, США). Затем препараты заключали в среду Vectashield, содержащую краситель DAPI (“Vector Laboratories”, США), и анализировали с использованием микроскопов Opton 3 и Axiovert 200 M (“Zeiss”, Германия), снабженных эпифлуоресцентным освещением, со стандартным набором фильтров и объективом Neofluar 100x. Изображения записаны с помощью камер DC Kodak 260 и AxioCam HRm и обработаны с помощью Adobe Photoshop 6.0 and 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антитела к моторному и микротрубочкосвязывающему доменам ДНС имели сходную кросс-реактивность с клеточными экстрактами и внутриклеточную локализацию, выявляемую с помощью иммуноцитохимического окрашивания, поэтому ниже представлены данные только для одного типа антител (к моторному домену).

Вместе с тотальными экстрактами растительных клеток электрофоретическому разделению подвергались препараты очищенного цитоплазматического динеина, выделенного из мозга крупного рогатого скота (рис. 1, *a*; 1). Как и ожидалось, после блоттинга антитела к ДНС специфически реагировали только с тяжелой субъединицей дине-

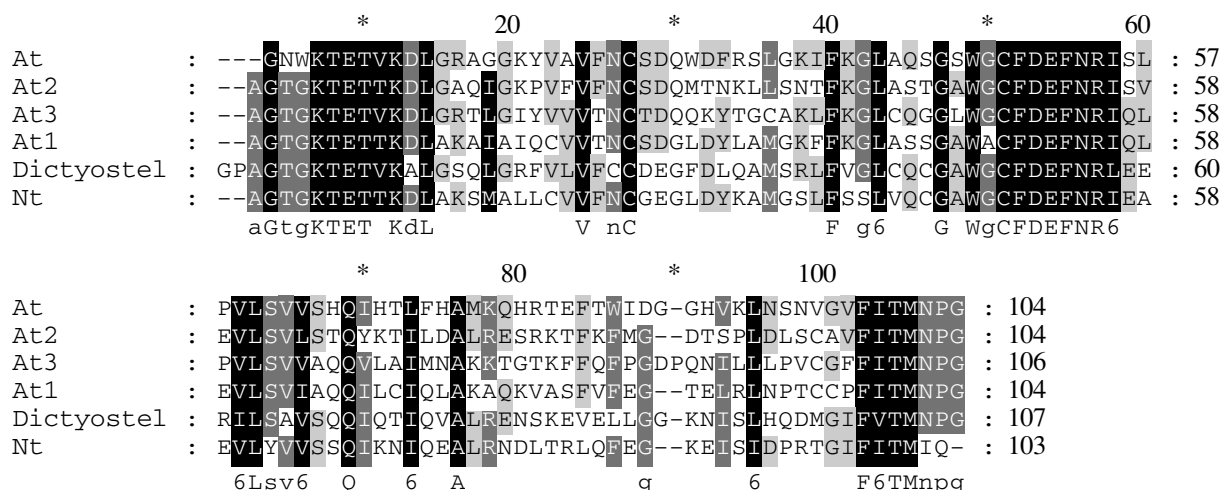


Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum*, идентифицированных как DHC (At, Nt), DHC1 (At1), DHC2 (At2), DHC3 (At3), и участка моторного домена DHC *Dictyostelium* с помощью программы AliBee – Multiple Alignment. Внизу расположена консенсусная последовательность. (■) – идентичные, (▨) – консервативные аминокислоты (программа GeneDoc).

ина (рис. 1, а; 2). В растительном экстракте антитела специфически реагировали с полосой высокой молекулярной массы. Низкомолекулярные компоненты, по-видимому, представляют собой продукты деградации белков. Приблизительная молекулярная масса высокомолекулярного полипептида в растительном экстракте составляет >500 кДа (учитывая молекулярную массу изученных тяжелых цепей, которая составляет около 530 кДа). Полоса, распознаваемая антителами в растительных экстрактах, имела меньшую электрофоретическую подвижность (рис. 1, а; 3), чем высокомолекулярная полоса на препарате динеина млекопитающих. Таким образом, в тотальных экстрактах клеток корешков пшеницы присутствует высокомолекулярный полипептид, который иммунологически сходен с DHC *Dictyostelium*.

Далее были проведены эксперименты по иммунопреципитации высокомолекулярного полипептида из экстракта клеток корешков с помощью антител, связанных с протеин А-сефарозой (рис. 1, б). Высокомолекулярный компонент отчетливо выявляется в лизате до инкубации с комплексом антитела-протеин А-сефароза (рис. 1, б; 4) и в меньшей степени – после инкубации с ним (рис. 1, б; 5). Преципитированный антителами материал анализировали с помощью электрофореза, и результаты показали, что преципитат также содержит высокомолекулярный компонент (рис. 1, б; 6). Неиммунные кроличьи IgG не преципитировали высокомолекулярный компонент из клеточного лизата. Этот компонент также не выявлялся, если антитела не были прикреплены к протеин А-сефарозе. Таким образом, в белковом экстракте клеток корешков пшеницы содержится высокомолекулярный антиген,

который специфически реагирует с антителами, полученными к DHC *Dictyostelium*.

Анализ базы данных. Используя участок моторного домена DHC слизевика *Dictyostelium* (697 аминокислот), к которому были получены антитела, мы просканировали базы данных TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) и TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) с помощью tBLASTn. Были найдены короткие фрагменты ДНК в геноме *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum*. Эти фрагменты (нуклеотидные последовательности AY239583.1; AY258210.1; AY258211.1; AY258212.1; AF462145.1) аннотированы как предполагаемые DHC и их изоформы DHC1, DHC2 и DHC3 в геноме *Arabidopsis thaliana* и как цитоплазматические DHC – в *Nicotiana tabacum*. Множественное выравнивание последовательностей с помощью ClustalW 1.83 (<http://www.genebee.msu.su/clustal/>) показало, что все растительные фрагменты выравниваются в области 273–376 аминокислот пептида *Dictyostelium* (697 аминокислот), к которому были получены антитела. Фрагмент, аннотированный как DHC *Arabidopsis thaliana*, имеет 46% идентичности и 68% сходства с указанным участком моторного домена DHC *Dictyostelium*, а фрагмент, аннотированный как DHC *Nicotiana tabacum*, – 52 и 63% соответственно. Фрагменты, аннотированные как изоформы DHC1, 2, 3 *Arabidopsis thaliana*, имеют 43, 46 и 50% идентичности и 56, 62 и 63% сходства с участком моторного домена DHC *Dictyostelium* (рис. 2) соответственно.

Иммуноцитохимия. Для выявления внутриклеточной локализации белка, распознаваемого антителами к DHC, было проведено двойное им-

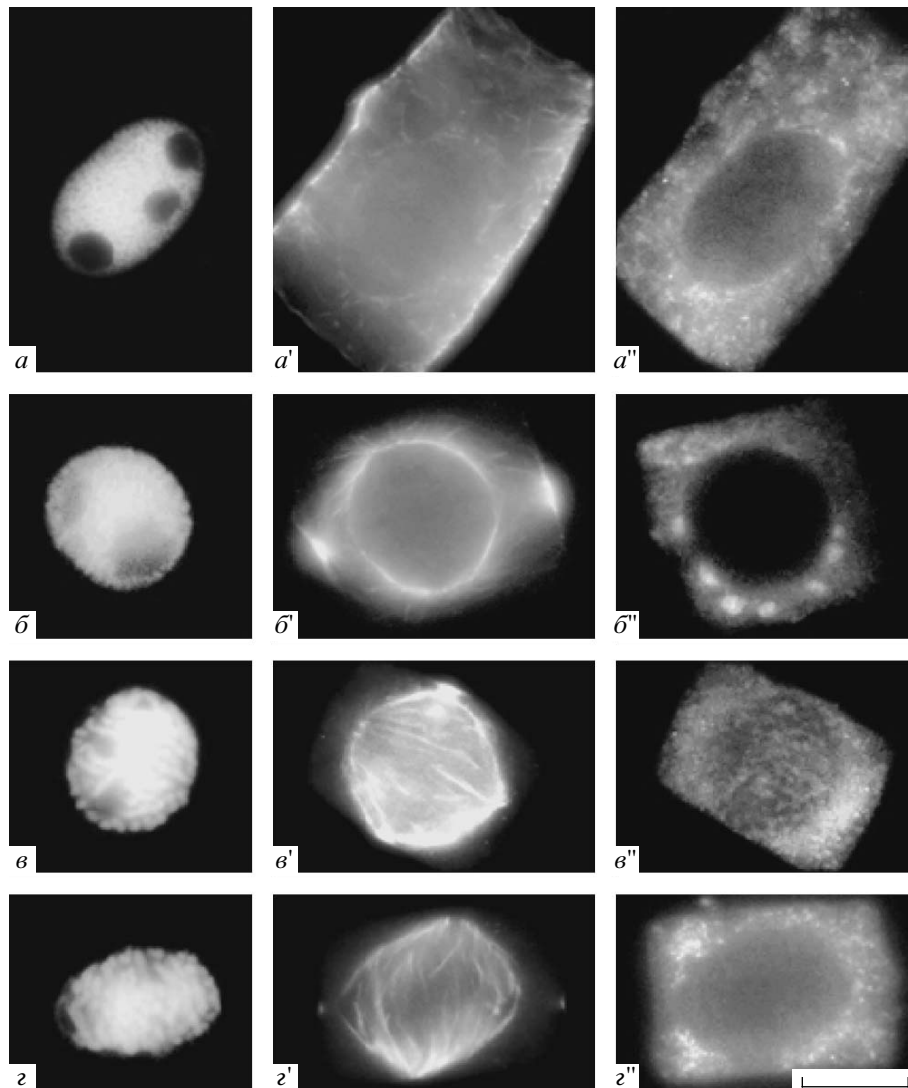


Рис. 3. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток меристемы корня пшеницы с помощью антител к тубулину (*a'*, *b'*, *v'*, *z'*) и ДНС (*a''*, *b''*, *v''*, *z''*).

a-z – выявление ядер и хромосом с помощью DAPI. *a-a''* – клетка на стадии интерфазы, микротрубочки располагаются под плазматической мембраной и вокруг ядра; *b-b''* – клетка на стадии средней профазы, препрофазное кольцо микротрубочек располагается в экваториальной области кортикальной цитоплазмы; *v-v''* – клетка на стадии поздней профазы с профазным веретеном и остатками препрофазного кольца; *z-z''* – клетка на стадии прометафазы. Масштаб здесь и далее – 10 мкм.

муноцитохимическое окрашивание клеток с использованием антител к ДНС и к белку микротрубочек тубулину. В клетках на стадии интерфазы присутствуют кортикальные пучки и редкие околоядерные микротрубочки. На этой стадии антитела к ДНС окрашивают мелкие везикулы или частицы в центральной и периферической цитоплазме и более крупные везикулы – в околоядерной области (рис. 3, *a-a''*). В конце G_2 -периода и в ранней профазе в клетках присутствует препрофазное кольцо микротрубочек, расположенное в экваториальной области кортекса, а вокруг ядра формируется профазное веретено. В таких клетках антитела к ДНС окрашивают крупные вези-

кулы и нитевидные структуры, локализованные в околоядерной области, где также располагается и профазное веретено (рис. 3, *b-b''*). В некоторых клетках крупные везикулы располагаются внутри профазного веретена, иногда непосредственно в области его полюса. На стадии поздней профазы наблюдается разрушение препрофазного кольца, а профазное веретено становится более выраженным. В таких клетках антитела, как правило, выявляют диффузные скопления мелких везикул, расположенных в области полюса или над полюсами профазного веретена (рис. 3, *v-v''*). В прометафазе происходит изменение морфологии профазного веретена. В его составе выявля-

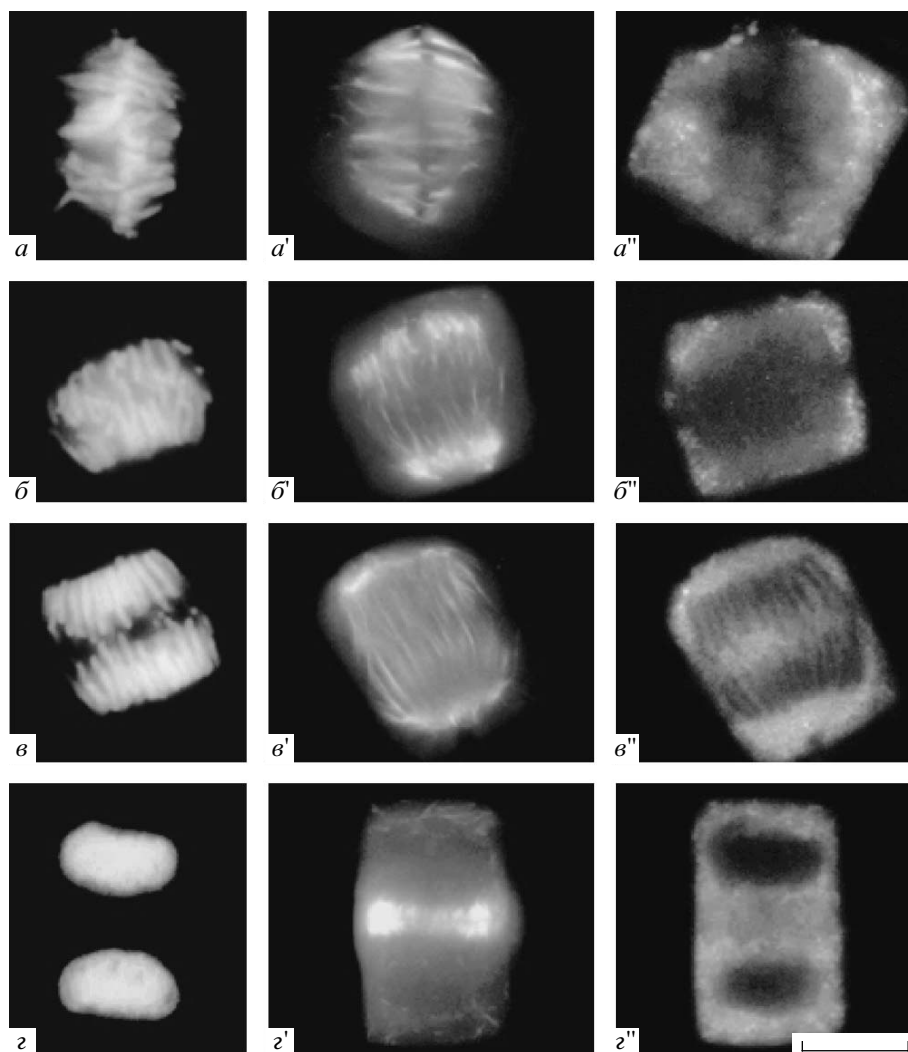


Рис. 4. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток меристемы корня пшеницы с помощью антител к тубулину (*a*, *b*, *v*, *z*) и ДНС (*a'*, *b'*, *v'*, *z'*). *a-z* – выявление ядер и хромосом с помощью DAPI. *a-a''* – клетка на стадии метафазы, митотическое веретено имеет бочковидную форму; *b-b''* – клетка на стадии ранней анафазы; *v-v''* – клетка на стадии средней анафазы; *z-z''* – клетка на стадии телофазы, в интерзональной области расположен фрагмопласт.

ются отдельные кинетохорные фибриллы, веретено из конвергентного трансформируется в бочковидное. В таких клетках антитела к ДНС окрашивают разные по размеру везикулы, расположенные по периферии веретена (рис. 3, *z-z''*). В некоторых клетках полярные области окрашены более интенсивно, чем периферия веретена. В метафазе веретено имеет бочковидную форму и состоит из упорядоченно ориентированных кинетохорных фибрилл, дистальные концы которых направлены в сторону расширенных полярных зон. На этой стадии антитела к ДНС окрашивают разного размера везикулы, расположенные по периферии веретена, в полярных зонах веретена и над ними (рис. 4, *a-a''*). На стадии анафазы по мере расхождения хромосом к полюсам веретена кинетохорные фибриллы укорачиваются, а некинетохорные микротрубочки удлиняются по направлению

к экваториальной зоне клетки, где они инициируют формирование фрагмопласта. На стадии ранней анафазы антитела к ДНС окрашивают везикулы, расположенные по периферии веретена или в полярной области (рис. 4, *b-b''*), а в средней анафазе антигенпозитивный материал присутствует и в интерзональной области, где начинается формирование фрагмопласта и клеточной пластинки (рис. 4, *v-v''*). В клетках на стадии телофазы фрагмопласт располагается в экваториальной зоне клетки, где формируется клеточная пластинка. Короткие микротрубочки локализуются в околоядерной области дочерних клеток. На этой стадии окрашивание интерзональной области антителами к ДНС уменьшается. Однако в околоядерной области выявляются мелкие антигенпозитивные везикулы и нитевидные структуры (рис. 4, *z-z''*). Таким образом, на всех стадиях антитела к ДНС связыва-

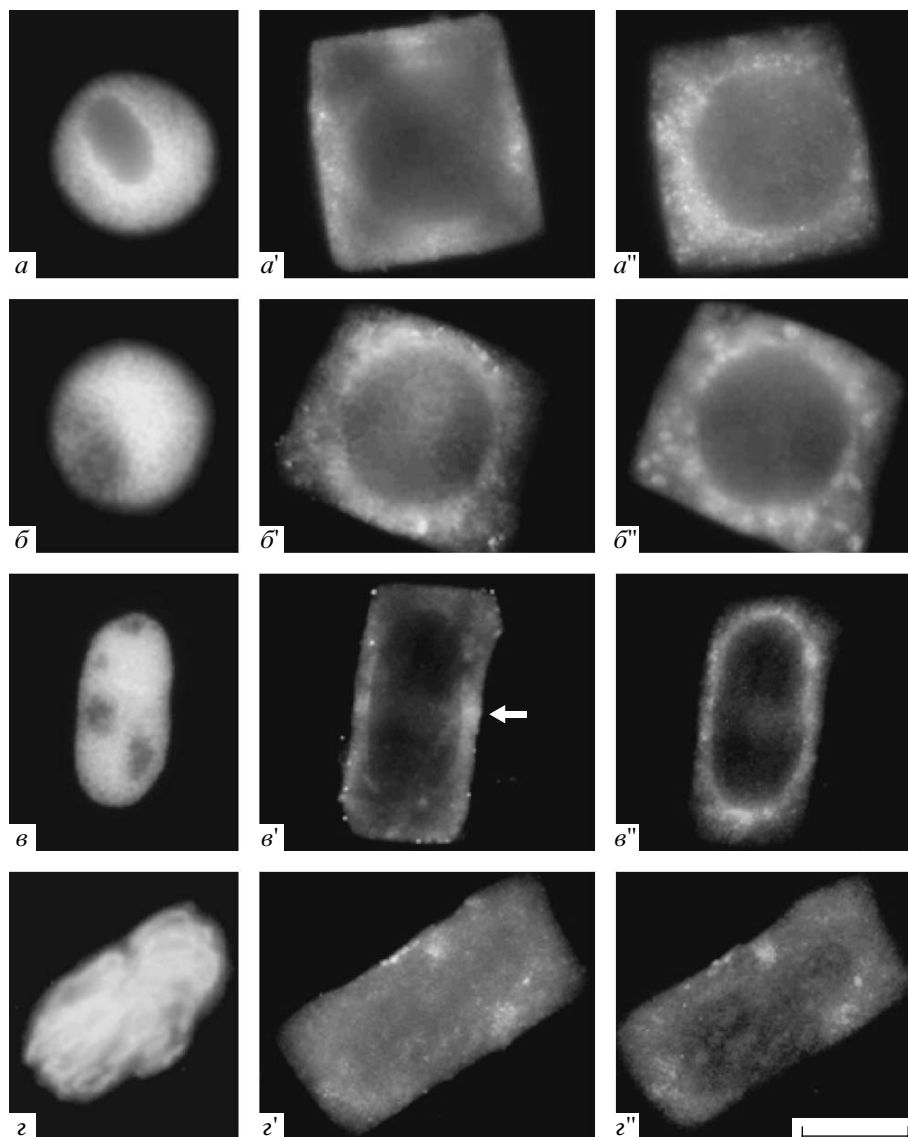


Рис. 5. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток меристемы корня пшеницы с помощью антител к аппарату Гольджи (*a', б', в', z'*) и ДНС (*a'', б'', в'', z''*). *a-z* – выявление ядер и хромосом с помощью DAPI. *a-a''* – клетка на стадии интерфазы, аппарат Гольджи занимает периферическое положение (*a'*), а ДНС-позитивные везикулы (*a''*) располагаются в околоядерной области; *б-б''* – клетка на стадии интерфазы, аппарат Гольджи (*б'*) и ДНС-позитивные везикулы (*б''*) расположены в околоядерной области; *в-в''* – клетка на стадии позднего G_2 -периода или ранней профазы (область пояса Гольджи отмечена стрелкой), локализация аппарата Гольджи (*в'*) и ДНС-позитивных везикул (*в''*) не совпадает; *z-z''* – клетка на стадии прометафазы, в которой наблюдается совместная локализация окрашивания некоторых везикул или их скоплений.

ются с разными по размеру везикулами или частицами, распределение которых варьирует в зависимости от стадии клеточного цикла.

Для того чтобы охарактеризовать эти везикулы, мы провели двойное иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к ДНС и к белкам-маркерам аппарата Гольджи – маннозидазе II и 58K/FTCD. Эти белки присутствуют в составе аппарата Гольджи растительных клеток, и антитела к ним были использованы для идентификации аппарата Гольджи в разных тканях и клетках

растений (Nebenführ, Staehelin, 2001; Baluška et al., 2002; Lu et al., 2005; Strasser et al., 2006).

Двойное окрашивание клеток антителами к ДНС и к белкам аппарата Гольджи показало, что совместная локализация антигенов, выявляемых данными антителами, наблюдается не на всех стадиях клеточного цикла и проявляется неодинаково в разных клетках. На стадии интерфазы локализация аппарата Гольджи и ДНС-позитивных везикул может не совпадать (рис. 5, *a-a''*) или совпадать частично (рис. 5, *б-б''*). Такие же различия характерны

и для клеток, находящихся на стадии профазы. Следует отметить отсутствие ДНС-позитивных везикул в области пояса Гольджи (Nebenführ et al., 2000), который представляет собой скопления диктиосом в зоне расположения препрофазного кольца микротрубочек (рис. 5, в-в").

В прометафазе-анафазе диктиосомы аппарата Гольджи располагаются по периферии митотического веретена и в его полярных зонах. В этих же зонах выявляется антиген, распознаваемый антителами к ДНС (рис. 5, z-z", 6, a-a" – в-в"). Однако наиболее выраженной является совместная локализация двух антигенов на стадии телофазы. Мелкие везикулы и нитевидные структуры, расположенные в интерзональной области, где формируется фрагмопласт и клеточная пластинка, окрашиваются как антителами к ДНС, так и к белкам аппарата Гольджи (рис. 6, z-z"). Таким образом, некоторые из тех везикул, которые выявляются с помощью антител к ДНС, относятся и к аппарату Гольджи, однако другие структуры, выявляемые антителами к ДНС, представляют собой иные классы цитоплазматических органелл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Семейство белков динеинов подразделяется на два класса – жгутиковый (аксонемный) и цитоплазматический динеин (Höök, Vallee, 2006; Pfister et al., 2006). В настоящее время выделяют цитоплазматический динеин 1 и 2. Утверждается, что цитоплазматический динеин 1 присутствует во всех клетках, где есть микротрубочки (Höök, Vallee, 2006). Он обеспечивает транспорт внутриклеточных органелл по микротрубочкам в сторону их минус-конца и таким образом участвует во многих клеточных процессах, в том числе транспорте элементов аппарата Гольджи, лизосом, эндосом, делении клеток и др. Внутриклеточная локализация цитоплазматического динеина 1 отражает его функции. Так, в делящихся клетках позвоночных он выявляется в связи с полюсными микротрубочками, полюсом веретена и кинетохорами хромосом (Pfarr et al., 1990; Steuer et al., 1990).

Цитоплазматический динеин 2 присутствует только внутри или вокруг основания жгутика или реснички. Он отвечает за ретроградный транспорт в аксонеме (Höök, Vallee, 2006). В дальнейшем при обсуждении мы будем рассматривать только цитоплазматический динеин 1.

Растительные клетки имеют хорошо выраженную систему микротрубочек и гетерогенную группу кинезиноподобных белков (Reddy, 2001; Lee, Liu, 2004). Однако полноразмерные гены, кодирующие ДНС, не были выявлены в геноме *Arabidopsis*, поэтому сделано заключение, что в растительных клетках цитоплазматический динеин отсутствует, а

его функции выполняют многочисленные минус-конец-ориентированные кинезиноподобные белки (Lawrence et al., 2001). Однако неясно, почему и как такой крупный и консервативный белок, присутствующий у разных групп организмов – от дрожжей до человека, в ходе эволюции исчез у цветковых растений? Остается также неясным, есть ли динеин у других групп растений, имеющих жгутиковые формы подвижности. Так, наличие внутренних динеиновых ручек было показано с помощью метода электронной микроскопии у папоротникообразных (Huams, Campbell, 1985), однако эта проблема также мало и плохо изучена. Мы считаем, что вопрос о том, есть ли динеиноподобные белки у высших растений, остается открытым.

Поэтому для тестирования растительного материала мы использовали антитела к двум функциональным доменам ДНС слизневика *Dictyostelium discoideum*. Полученные данные указывают на присутствие высокомолекулярного полипептида, распознаваемого антителами к ДНС в клеточных экстрактах высших растений. Этот полипептид не только распознается антителами, но и преципитируется ими из тотальных экстрактов. Антиген, распознаваемый антителами к ДНС, ассоциирован с везикулами или частицами, распределение которых в цитоплазме зависит от стадии клеточного цикла. Некоторые из этих везикул относятся к комплексу Гольджи. Наши наблюдения коррелируют с данными о распределении других минус-конец-ориентированных моторных белков в растительных клетках. Так, динеиноподобный белок в пыльцевых трубках табака также был выявлен в связи с мембранными органеллами (Moscatelli et al., 1998). Другой минус-конец-ориентированный моторный белок, кинезин-13А, ассоциирован с диктиосомами аппарата Гольджи в клетках меристемы корня *Arabidopsis* (Lu et al., 2005). Использование нами антител к белкам-маркерам аппарата Гольджи показало, что некоторые из везикул, меченные антителами к ДНС, также относятся к аппарату Гольджи. Совместная локализация двух антигенов является наиболее выраженной во время анафазы-телофазы. Как известно, во время цитокинеза образование и рост клеточной пластинки происходят при участии фрагмопласта. В состав фрагмопласта входят микротрубочки, которые обеспечивают направленный транспорт везикул, в том числе и аппарата Гольджи, к месту формирования клеточной пластинки (Staelin, Nepler, 1996; Jurgens, 2005). Поэтому совместная локализация окрашивания антителами к аппарату Гольджи и ДНС на этой стадии является еще одним свидетельством в пользу того, что выявляемый антителами к ДНС антиген находится там, где мог бы предположительно находиться динеин. Точно так же расположение ДНС-позитивных везикул в области полюса веретена в митозе может быть связано с минус-ко-

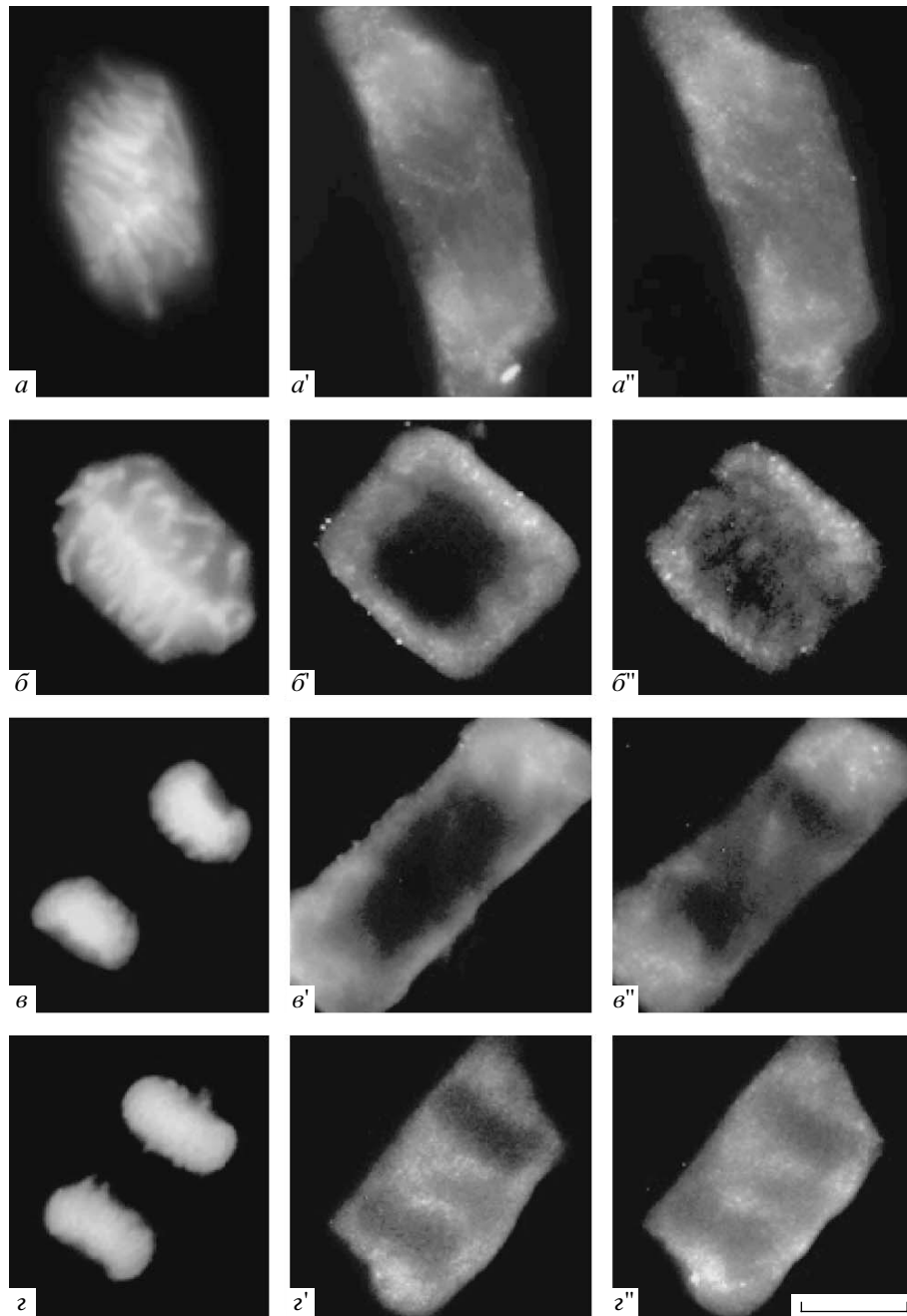


Рис. 6. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток с помощью антител к аппарату Гольджи (a' , b' , v' , z') и ДНС (a'' , b'' , v'' , z''). a - z – выявление ядер и хромосом с помощью DAPI. a - a'' – клетка на стадии метафазы, у которой наблюдается диффузное скопление аппарата Гольджи и ДНС-позитивных везикул в полюсах веретена; b - b'' – клетка на стадии метафазы, у которой наблюдаются гранулярные скопления аппарата Гольджи и ДНС-позитивных везикул в полюсах веретена; v - v'' – клетка на стадии поздней анафазы, у которой аппарат Гольджи и ДНС-позитивные везикулы локализируются в полюсах веретена; z - z'' – клетка на стадии телофазы, у которой аппарат Гольджи и ДНС-позитивные везикулы локализируются в зонах фрагмопласта и околоядерной.

нец-ориентированным транспортом мембранных органелл.

Мы не выявили окрашивания микротрубочек антителами к ДНС ни на одной из стадий клеточного цикла. Это отличается от внутриклеточного распределения цитоплазматического динеина

в клетках животных (Pfarr et al., 1990; Steuer et al., 1990), но находится в соответствии с данными Вайсберга и соавторов (Vaisberg et al., 1996), которые показали ассоциацию изоформ ДНС с мембранными органеллами в клетках млекопитающих.

Проведенный нами поиск выявил очень короткие последовательности в геноме табака и *Arabidopsis*, которые имеют сходство с участком моторного домена ДНС *Dictyostelium*. На основании этих данных трудно сделать какое-либо предположение. Тем не менее хотелось бы отметить, что субъединицы динеина кодируются по меньшей мере двумя семействами генов и экспрессия отдельных членов этих семейств отличается у разных клеточных типов (Pfister et al., 2006). Например, два гена (*dyn1* и *dyn2*) кодируют ДНС у патогенного грибка-паразита *Ustilago maydis*, поражающего кукурузу. Ген *dyn1* кодирует моторный домен, а *dyn2* – домен связывания с микротрубочками. Оба гена локализованы на разных хромосомах, транскрибируются как разные мРНК и транслируются как отдельные полипептиды. Только затем полипептиды взаимодействуют и формируют тяжелую цепь (Straube et al., 2001). Можно предположить, что необычная экспрессия ДНС существует и в клетках растений особенно еще и потому, что растения являются хозяевами многих паразитарных форм, которые могли внести свой вклад в изменение генома.

Таким образом, в клетках высших растений полипептид с относительной молекуляр. массой >500 кДа, выявляемый антителами к моторному и микротрубочкосвязывающему доменам *Dictyostelium* ДНС, локализуется в связи с разными везикулярными органеллами, в том числе и с аппаратом Гольджи. Локализация этих везикул зависит от стадии клеточного цикла. Следовательно, в клетках высших растений присутствует белок, который имеет сходные с ДНС свойства.

Авторы выражают искреннюю признательность М. Кунсу (М. Коонсе) за предоставление антител к ДНС, С.А. Кузнецову – за препарат динеин, Е.С. Надеждиной, А.А. Пенину, С.А. Спирину – за советы и помощь в работе над статьей, а также В.Н. Хотинной – за помощь при выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Baluška F., Hlavačka A., Šamaj J. et al. F-Actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 422–431.

Hasezawa S., Kumagai F. Dynamic changes and the role of the cytoskeleton during the cell cycle in higher plant cells // *Int. Rev. Cytol.* 2002. V. 214. P. 161–191.

Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport // *Science.* 1998. V. 279. P. 519–526.

Höök P., Vallee R.B. The dynein family at a glance // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. P. 4369–4371.

Hyams J.S., Campbell C.J. Widespread absence of outer dynein arms in the spermatozoid of lower plants // *Cell Biol. Int. Rep.* 1985. V. 9. P. 841–848.

Jurgens G. Cytokinesis in higher plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. V. 56. P. 281–299.

Koonce M.P., Samsó M. Overexpression of cytoplasmic dynein's globular head causes a collapse of the interphase microtubule network in *Dictyostelium* // *Mol. Biol. Cell.* 1996. V. 7. P. 935–948.

Laemlli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

Lawrence C.J., Morris R.N., Meagher R.B. et al. Dyneins have run their course in plant lineage // *Traffic.* 2001. V. 2. P. 362–363.

Lee Y.R.J., Liu B. Cytoskeletal motors in *Arabidopsis*. Sixty-one kinesins and seventeen myosins // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 3877–3883.

Lu L., Lee Y.R.J., Pan R. et al. An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in *Arabidopsis* // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. P. 811–823.

Moscatelli A., Del Casino C., Lozzi L. et al. High molecular weight polypeptides related to dynein heavy chains in *Nicotiana tabacum* pollen tubes // *J. Cell Sci.* 1995. V. 108. P. 1117–1125.

Moscatelli A., Cai G., Ciampolini F. et al. Dynein heavy chain-related polypeptides are associated with organelles in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* // *Sex Plant Reprod.* 1998. V. 11. P. 31–40.

Nebenführ A., Frohlich J.A., Staehelin A.L. Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 135–151.

Nebenführ A., Staehelin A.L. Mobile factories: Golgi dynamics in higher plants // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 160–167.

Nishiura M., Kon T., Shiroguchi K. et al. A single-headed recombinant fragment of *Dictyostelium* cytoplasmic dynein can drive the robust sliding of microtubules // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 22799–22802.

Oiwa K., Sakakibara H. Recent progress in dynein structure and mechanism // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. V. 17. P. 98–103.

Pfarr C.M., Coue M., Grissom P.M. et al. Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis // *Nature.* 1990. V. 345. P. 263–265.

Pfister K.K., Shah P.R., Hummerich H. et al. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families // *PLoS Genetics.* 2006. V. 2. P. e1.

Reddy A.S.N. Molecular motors and their function in plants // *Int. Rev. Cytol.* 2001. V. 204. P. 97–178.

Samsó M., Koonce M.P. 25-Å resolution structure of a cytoplasmic dynein motor reveals a seven-member planar ring // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 340. P. 1059–1072.

Smirnova E.A., Bajer A.S. Spindle poles in higher plant mitosis // *Cell Motil. Cytoskel.* 1992. V. 23. P. 1–7.

Staehelin A.L., Hepler P.K. Cytokinesis in higher plants // *Cell.* 1996. V. 84. P. 821–824.

Steffen W., Karki S., Vaughan K.T. et al. The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding

- the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes // *Mol. Biol. Cell.* 1997. V. 8. P. 2077–2088.
- Steuer E.R., Wordeman L., Schroer T.A. et al. Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores // *Nature.* 1990. V. 345. P. 266–268.
- Strasser R., Schoberer J., Jin C. et al. Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi-alpha-mannosidase II, a key enzyme in the formation of complex N-glycans in plants // *Plant J.* 2006. V. 45. P. 789–803.
- Straube A., Enard W., Berner A. et al. A split motor domain in a cytoplasmic DHC // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 5091–5100.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.
- Vaisberg E.A., Grisom P.M., McIntosh J.R. Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles // *J. Cell Biol.* 1996. V. 133. P. 831–842.
- Vale R.D. The molecular motor toolbox for intracellular transport // *Cell.* 2003. V. 112. P. 467–480.
- Vallee R.B., Williams J.C., Varma D. et al. Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport // *J. Neurobiol.* 2004. V. 58. P. 189–200.

High Molecular Weight Protein Detected in Higher Plant Cells by Antibodies against Dynein Is Associated with Vesicular Organelles Including Golgi Apparatus

N. A. Shanina, E. M. Lazareva, Yu. S. Chentsov, and E. A. Smirnova

Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119992 Russia

E-mail: kinggobi@yandex.ru

Abstract—The cytoplasmic dynein is a multisubunit complex driving organelles along microtubules to their minus-end. We used antibodies against two functional domains (motor and microtubule-binding) of one of principal components of the complex—dynein heavy chain of slime mould *Dictyostelium discoideum*—to test root meristem cells of wheat *Triticum aestivum*. The antibodies reacted with a high molecular weight protein (> 500 kDa) in the total cell extract and the band recognized by the antibodies in plant extracts had a lower electrophoretic mobility than the high molecular weight band of mammalian dynein. Antibodies coupled to protein A–Sepharose precipitated the high molecular weight protein from the purified cell extracts. Immunocytochemical analysis demonstrated that the antigen recognized by antibodies against dynein heavy chains is associated with the vesicles whose localization depends on the cell cycle stage. The antigen-positive vesicles were localized to the perinuclear region in interphase and early prophase, to the spindle periphery and to spindle pole region during mitosis, and to the interzonal region in the period of fragmoplast and cell plate formation. Some antigen-positive vesicles also reacted with antibodies against Golgi protein markers. The obtained data indicate that higher plant cells contain a high molecular weight protein interacting with antibodies against the motor and microtubules-binding domains of *Dictyostelium* dynein heavy chain. The revealed antigen was associated with the vesicular structures in the cytoplasm including the Golgi apparatus.

Key words: intracellular transport, dynein, microtubules, mitosis, plant cells.