

Влияние организации целлюлозы на кислотоиндуцированное растяжение клеточных стенок в гипокотильях *Arabidopsis thaliana*

Суслов Д.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

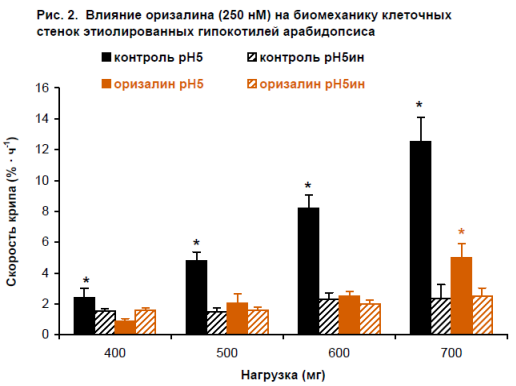
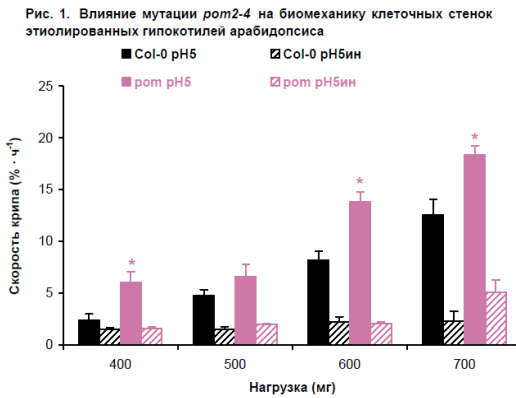
d.suslov@spbu.ru

Ключевые слова: рост клеток растяжением; клеточная стенка; растяжимость клеточной стенки; целлюлоза; кислый рост; экспансины

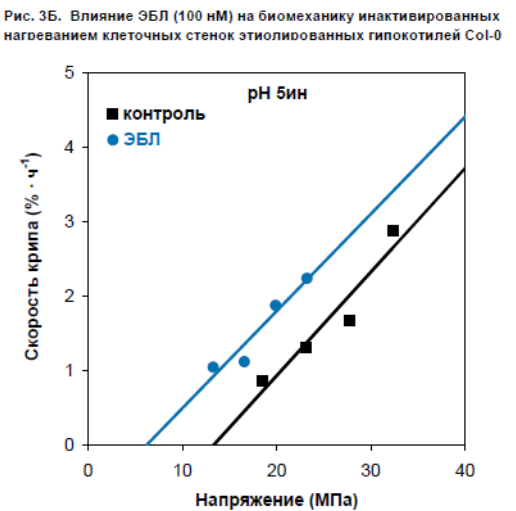
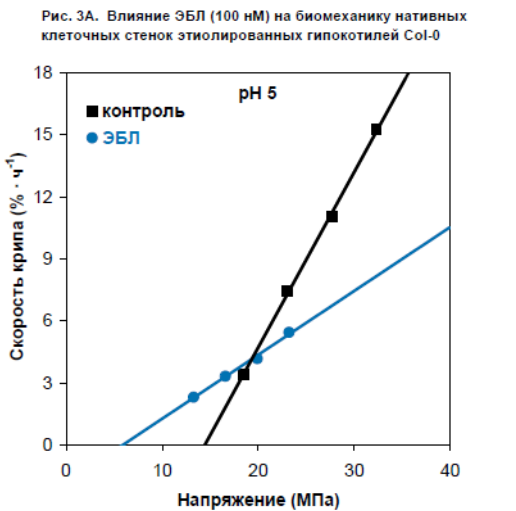
Мотивация и цель: Высокая скорость увеличения объема растительных клеток в ходе роста растяжением достигается за счет накопления в них воды. Важнейшим биофизическим фактором, лимитирующим скорость роста клеток растений, является растяжимость клеточных стенок, которая зависит от трехмерной организации полимеров стенки и от активностей многочисленных ферментативных и неферментативных белков, непрерывно формирующих и разрушающих ковалентные и нековалентные связи между компонентами стенок. Центральную роль в регуляции растяжимости клеточных стенок играет целлюлоза – самый прочный компонент в данной структуре. Кислый рост является одним из ранних процессов в ходе индуцированного ауксином растяжения органов растений. Он связан с подкислением апопласта H^+ -АТФазами плазмалеммы, что активирует в клеточной стенке белки экспансины, увеличивающие ее растяжимость за счет разрушения водородных связей между структурными полимерами стенки [1]. Недавно продемонстрировали, что нарушение организации целлюлозы в клеточных стенках под влиянием ингибиторов и мутаций устраняет кислый рост гипокотилей арабидопсиса [2]. Поскольку эти данные не поддерживаются результатами некоторых наших экспериментов, мы изучили влияние разных типов реорганизации целлюлозы на кислый рост гипокотилей арабидопсиса. Исследовали эффекты изменения ориентации целлюлозы под влиянием фитогормона эпибрассинолида (ЭБЛ, 100 нМ) [3], ингибитора микротрубочек оризалина (250 нМ) и мутации *rom2-4*, уменьшения кристалличности целлюлозы под влиянием мутации *ixr1-1* и снижения уровня целлюлозы в клеточных стенках в присутствии специфичного ингибитора изоксабена (0.1 нМ).

Методы и алгоритмы: Проявлением способности клеточных стенок поддерживать кислый рост является увеличение скорости их крипа (зависимая от времени необратимая деформация под влиянием постоянной нагрузки) в кислом буфере с pH 4.5–5.0 по сравнению с буфером с pH, близким к нейтральному (от 5.5 и выше), либо при сравнении растяжения в кислом буфере «нативных» клеточных стенок и клеточных стенок, инактивированных нагреванием, которое устраняет эндогенную активность экспансинов. В связи с этим крип клеточных стенок замороженных/оттаявших гипокотилей арабидопсиса измеряли экстенсометром, работающим при постоянной нагрузке, при pH 5, который активирует эндогенные экспансины клеточных стенок, и при pH 5 с тепловой инактивацией, т. е. при условиях, когда эндогенные экспансины не работают.

Результаты: Все экспериментальные обработки, использованные в данном исследовании, ингибировали рост побегов арабидопсиса: длина 4-суточных этиолированных гипокотилей уменьшалась в диапазоне от 46 % (оризалин) до 27 % (ЭБЛ). Варианты, в которых ориентация целлюлозы в клеточных стенках становилась более хаотичной (rom2-4, оризалин, ЭБЛ), сохраняли способность к кислому росту, но в разной степени. У мутанта rom2-4 скорость крипа клеточных стенок в кислом буфере увеличивалась по сравнению с контролем (Col-0) (рис. 1), тогда как оризалин (рис. 2) и ЭБЛ снижали скорость растяжения клеточных стенок *in vitro* у Col-0 при pH 5.



Такое различие эффектов может быть обусловлено неодинаковым влиянием указанных обработок на площадь поперечного сечения клеточных стенок гипокотилей, так как скорость крипа пропорциональна механическому напряжению (сила, поделенная на площадь поперечного сечения образца), генерированному в клеточных стенках постоянной нагрузкой. Обнаружили, что ЭБЛ достоверно увеличивает площадь поперечного сечения клеточных стенок. На основе этого рассчитали механические напряжения в клеточных стенках в присутствии ЭБЛ и определили зависимость скорости крипа от напряжения. Характер данной зависимости демонстрирует, что эффект кислого буфера противоположен при низких и высоких значениях механического напряжения (рис. 3А).



У мутанта *ixr1-1*, характеризующегося пониженной кристалличностью целлюлозы, был выявлен мощный индуцированный кислым буфером крип клеточных стенок, скорость которого была достоверно выше, чем у Col-0. Таким образом, уменьшение кристалличности микрофибрилл целлюлозы не является препятствием для кислого роста гипокотилей арабидопсиса.

В условиях ингибирования синтеза целлюлозы изоксабеном у растений Col-0 стимуляция крипа клеточных стенок кислым буфером сохранялась, но была существенно меньшей, чем у Col-0 в отсутствие ингибитора (см. рис. 1 и 2). Любопытно, что в присутствии изоксабена скорость крипа при pH 5 очень слабо изменялась при увеличении нагрузки (или механического напряжения), в отличие от контрольных растений дикого типа, у которых кислотоиндуцированное растяжение клеточных стенок значительно усиливалось при увеличении нагрузки (см. рис. 1). Этот факт косвенно свидетельствует об уменьшении активности эндогенных экспансинов под влиянием изоксабена. Не исключено, что в условиях ингибирования синтеза целлюлозы запускаются сигнальные каскады, активируемые нарушением целостности стенки [4], которые подавляют экспрессию экспансинов.

Выводы: Таким образом, в отличие от литературных данных [2], в настоящем исследовании было показано, что дезорганизация целлюлозы под влиянием фитогормонов, мутаций и ингибиторов не устраняет полностью, а по-разному модифицирует кислый рост гипокотилей арабидопсиса. Общий эффект может определяться как изменением структуры стенки, делающим ее более или менее оптимальной для работы экспансинов, так и изменением уровня экспрессии экспансинов с участием систем поддержания целостности клеточных стенок. Вклад последнего механизма можно было бы выяснить на основе данных транскриптомики и последующего биоинформационного анализа.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ (№ 23-24-00379).

Effects of cellulose arrangement on the acid-induced cell wall extension in *Arabidopsis thaliana* hypocotyls

Suslov D.V.*

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

* d.suslov@spbu.ru

Key words: extension growth; cell wall; cell wall extensibility; cellulose; acid growth; expansins

Motivation and Aim: A high rate of increase in plant cell volume during extension growth is achieved due to water accumulation in them. The most important biophysical factor limiting plant cell growth rate is cell wall extensibility, which depends on the three-dimensional organization of wall polymers and on the activities of numerous enzymatic and non-enzymatic proteins that continuously form and destroy covalent and non-covalent bonds between the wall components. Cellulose, the strongest component in this structure, plays a central role in regulating the cell wall extensibility. The acid growth is one of the early processes during the auxin-induced elongation of plant organs. It is associated with the apoplast acidification by the plasmalemma H⁺-ATPases, which activates expansin proteins in the cell wall, increasing its extensibility due to the breakage of hydrogen bonds between the structural polymers of the wall [1]. It has

recently been demonstrated that cellulose disorganization in cell walls under the influence of inhibitors and mutations eliminates the acid growth of arabidopsis hypocotyls [2]. Since these data are not supported by the results of some of our experiments, we studied the effect of different types of cellulose reorganization on the acid growth of arabidopsis hypocotyls. The effects of a change in cellulose orientation under the influence of the phytohormone epibrassinolide (EBL, 100 nM) [3], the microtubule inhibitor oryzalin (250 nM) and the mutation *pom2-4*, a decrease in cellulose crystallinity under the influence of the mutation *ixr1-1* and a decrease in the level of cellulose in cell walls in the presence of a specific inhibitor isoxabene (0.1 nM) were studied.

Methods and Algorithms: A manifestation of the ability of cell walls to support the acid growth is an increase in their creep rate (the time-dependent irreversible deformation under the influence of a constant load) in an acidic buffer with a pH of 4.5–5.0 compared with a buffer with a pH close to neutral (from 5.5 and above), or when comparing the extension in an acidic buffer of “native” cell walls and heat-inactivated cell walls, which eliminates the activity of endogenous expansins. In this regard, the cell wall creep of frozen/thawed arabidopsis hypocotyls was measured with a constant-load extensometer, at pH 5, which activates endogenous cell wall expansins, and at pH 5 with heat-inactivation, i.e. under conditions when endogenous expansins do not work.

Results: All experimental treatments used in this study inhibited arabidopsis shoot growth: the length of 4-day-old etiolated hypocotyls decreased in the range from 46 % (oryzalin) to 27 % (EBL). Variants in which the orientation of cellulose in the cell walls became more chaotic (*pom2-4*, oryzalin, EBL) retained the ability to the acid growth, but to varying degrees. In the *pom2-4* mutant, the cell wall creep rate in the acidic buffer increased compared to the control (Col-0) (Fig. 1), whereas oryzalin (Fig. 2) and EBL decreased the rate of *in vitro* cell wall extension in Col-0 at pH 5.

Fig. 1. Effects of *pom2-4* mutation on the cell wall biomechanics in etiolated arabidopsis hypocotyls

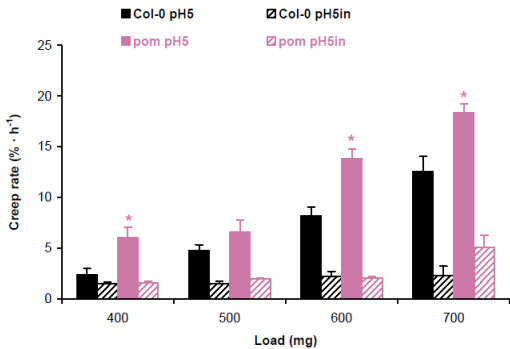
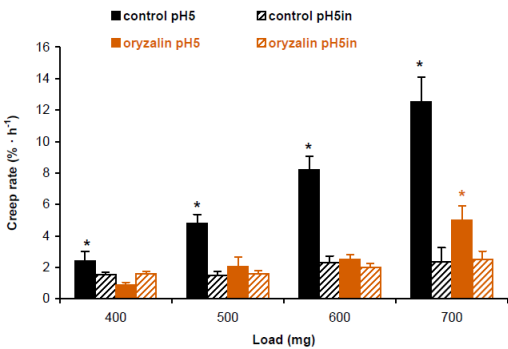


Fig. 2. Effects of oryzalin (250 nM) on the cell wall biomechanics in etiolated arabidopsis hypocotyls



Such a difference in the effects may be due to the unequal effect of these treatments on the hypocotyl cell wall cross-sectional area, since creep rate is proportional to the stress (force divided by the cross-sectional area of the sample) generated in the cell walls by a constant load. It was found that EBL significantly increased the cell wall cross-sectional area. Based on this, the cell wall stress in the presence of EBL was calculated and the dependence of the creep rate on the stress was determined. The character of this dependence demonstrates that the acidic buffer effect is opposite at low and high values of stress (Fig. 3A).

Fig. 3A. Effects of EBL (100 nM) on the biomechanics of native cell walls in etiolated Col-0 hypocotyls

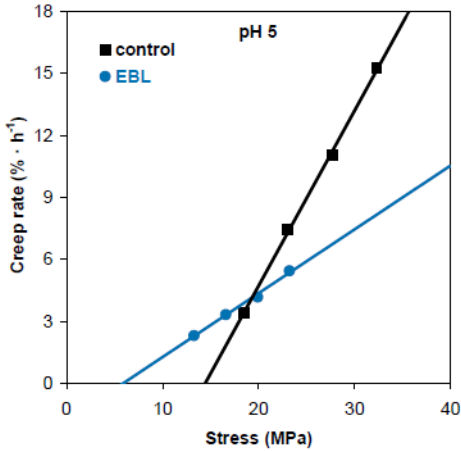
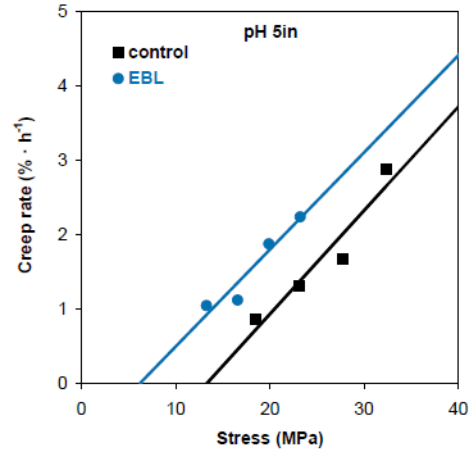


Fig. 3B. Effects of EBL (100 nM) on the biomechanics of heat-inactivated cell walls in etiolated Col-0 hypocotyls



In the mutant *ixr1-1*, characterized by reduced cellulose crystallinity, a powerful acidic buffer-induced creep of cell walls was detected, the rate of which was significantly higher than that of Col-0. Thus, a decrease in the crystallinity of cellulose microfibrils is not an obstacle to the acid growth of arabidopsis hypocotyls.

Under conditions of cellulose synthesis inhibition by isoxabene in Col-0 plants, the stimulation of cell wall creep with an acidic buffer was maintained, but was significantly lower than in Col-0 in the absence of the inhibitor (Fig. 1, 2). Curiously, in the presence of isoxabene, the creep rate at pH 5 changed very slightly with increasing load (or stress) in contrast to wild-type control plants, in which the acid-induced cell wall extension was significantly increased with increasing load (Fig. 1). This fact suggests a decrease in the activity of endogenous expansins under the influence of isoxabene. It is possible that under conditions of cellulose synthesis inhibition, the signaling cascades activated by cell wall integrity sensing are triggered [4], which suppress the expression of expansins. **Conclusion:** Thus, in contrast to the literature data [2], it was shown in this study that the disorganization of cellulose under the influence of phytohormones, mutations and inhibitors does not completely eliminate, but modifies the acid growth of arabidopsis hypocotyls in different ways. The overall effect can be determined both by a change in the wall structure, rendering it more or less optimal for the work of expansins, and by a change in the level of expansin expression involving the systems of cell wall integrity sensing. The contribution of the latter mechanism could be clarified on the basis of transcriptomics data and subsequent bioinformatics analysis.

Funding: The study is supported by the RSF grant (No. 23-24-00379).

Список литературы/References

1. Arsuffi G., Braybrook S.A. Acid growth: an ongoing trip. *J Exp Bot.* 2018;69(2):137-146
2. Xin X., Lei L., Zheng Y., Zhang T., Pingali S.V., O'Neill H., Cosgrove D.J., Li S., Gu Y. Cellulose synthase interactive1- and microtubule-dependent cell wall architecture is required for acid growth in *Arabidopsis* hypocotyls. *J Exp Bot.* 2020;71(10):2982-2994
3. Somssich M., Vandenbussche F., Ivakov A., Funke N., Ruprecht C., Vissenberg K., Van Der Straeten D., Persson S., Suslov D. Brassinosteroids influence arabidopsis hypocotyl graviresponses through changes in mannans and cellulose. *Plant Cell Physiol.* 2021;62(4):678-692
4. Voxeur A., Höfte H. Cell wall integrity signaling in plants: "To grow or not to grow that's the question". *Glycobiology.* 2016;26(9):950-960