

ФЕДИНА В.Д. ✉, ЛИТВИН Д.І., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: vira.fedyna@gmail.com

✉ vira.fedyna@gmail.com, (068) 842-51-12

З'ЯСУВАННЯ РОЛІ МІКРОТРУБОЧОК У РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ У РОСЛИН, СПРИЧИНЕНОЇ ДІЄЮ АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ

Аутофагія є внутрішньоклітинним катаболическим процесом, притаманним усім еукаріотам, зокрема рослинам [1]. Розвиток цього адаптивного процесу передбачає утворення аутофагосом, двомембранних органел, які доставляють цитоплазматичні компоненти до вакуолей або лізосом для їх подальшої деградації [2]. За фізіологічних умов цей процес зумовляє підтримання клітинного гомеостазу та реалізацію індивідуального розвитку організму. Однак, під впливом стресових чинників, рівень аутофагії значно зростає для елімінації шкідливих макромолекул, забезпечення енергетичного та біосинтетичного попиту і, як наслідок, підвищення здатності клітин до виживання [3]. Також на певних стадіях онтогенезу рослин та/або при формуванні адаптивної відповіді на дію зовнішніх факторів розвиток аутофагії може бути передумовою процесів запрограмованої клітинної загибелі (ЗКЗ) [4]. Однак, попри фундаментальну роль аутофагії у забезпеченні життєдіяльності рослин, механізми біогенезу аутофагосом та їх внутрішньоклітинного транспорту є недостатньо вивченими.

На сьогоднішній день у дріжджів ідентифіковано 38 генів аутофагії (*atg*) [5], більшість із яких є еволюційно консервативними для усіх еукаріотів та, зокрема, для *Arabidopsis thaliana* [6]. Відомо, що продукт гена *atg8* бере участь у біогенезі аутофагосом, безпосередньо вбудовуючись у їх мембрану [7]. Також важливу роль у реалізації механізмів аутофагії відводять мікротрубочковому цитоскелету [8]. Зокрема, для клітин ссавців було показано безпосередню участь мікротрубочок у формуванні [9] та транспорті [10] аутофагосом для їх подальшого злиття з лізосомами. З високою вірогідністю можна передбачити наявність аналогічних або принципово схожих процесів у рослинній клітині, що потребує експериментальних доказів. Тому це дослідження було присвячене вивченню змін профілю експресії генів основних білків, залучених до реалізації ау-

тофагії, та рівня запрограмованої клітинної загибелі під впливом біотичних стресових факторів у клітинах *A. thaliana*.

Матеріали і методи

Об'єкт дослідження та умови дослідю. Для досліджень використовували 7-денні проростки *A. thaliana* (екотип Columbia). Рослини пророщували та культивували в стерильних умовах на середовищі Мурасіге і Скуга. Розвиток аутофагії досліджували під час дії таких стресових чинників: метаболічний стрес (пророщування та культивування на середовищі, що не містило цукрози), сольовий стрес (пророщування та культивування у присутності 150 мМ NaCl) та опромінення ультрафіолетом-В (УФ-В) (опромінювання у дозі 41 кДж/м² здійснювали на 6-у добу культивування, використовуючи полістироловий фільтр для виключення довжин хвиль спектру УФ-С та короткохвильового діапазону УФ-В [11], проростки аналізували через 24 год після опромінення).

TUNEL аналіз. Для дослідження ЗКЗ під час дії стресових факторів готували гістологічні зрізи зразків та проводили TUNEL реакцію, використовуючи набір In Situ Detection Kit TMR (Roche, США) згідно з інструкціями виробника. Для візуалізації ядер використовували флуоресцентний барвник 4',6-діамідино-2-феніліндол (DAPI). Як інгібітор аутофагії використовували E-64, високоселективний інгібітор цистеїнових протеаз [12].

Транскрипційний аналіз. Для дослідження стрес-індукованих змін рівнів експресії ізотипів α -тубуліну (At4g14960, At5g19780, At1g04820, At5g19770, At1g50010, At1g64740) та *atg8* (At4g21980, At4g04620, At1g62040, At2g05630, At2g45170, At4g16520, At3g60640, At3g06420, At3g15580) у тканинах 7-денних рослин проводили виділення тотальної РНК, отримання кДНК та ПЛР-аналіз з використанням праймерів до відповідних генів. Продукти ПЛР аналізували за до-

помогою електрофорезу в 1 %-ному агарозному гелі.

Результати та обговорення

Для з'ясування взаємозв'язку між розвитком стрес-індукованої аутофагії та запрограмованої клітинної загибелі у клітинах арабідопсису за досліджуваних експериментальних умов визначали рівень нуклеосомної фрагментації ДНК за допомогою методу TUNEL. У контрольних рослин спостерігали незначний рівень ЗКЗ, який не перевищував 6 % від загальної кількості клітин (рис. 1), що є базовим, фізіологічним рівнем, характерним для рослин *A. thaliana* [13]. Дія стресових чинників мала наслідком достовірне підвищення кількості клітин у стані запрограмованої клітинної загибелі, рівень якої сягав 18 та 20 % за умов дії метаболічного і сольового стресів відповідно. Слід зазначити, що синергічний вплив названих стресових чинників та інгібітору аутофагії Е-64 мав наслідком збільшення кількості TUNEL-позитивних клітин, але такий ефект не був статистично достовірним.

З іншого боку, проростки *A. thaliana* виявили підвищену стійкість до дії опромінювання УФ-В порівняно з іншими досліджуваними стресовими впливами. Так, через 24 год після опромінення було виявлено лише 9 % TUNEL-позитивних клітин листків (паренхіматозних та клітин епідермісу). Натомість, попередня обробка проростків інгібітором Е-64 достовірно підвищувала кількість клітин у стані ЗКЗ до 16 %, що є логічним, оскільки Е-64 інгібує цистеїнові про-

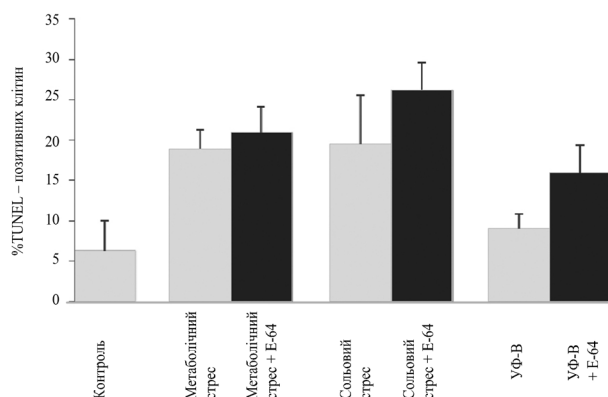


Рис. 1. Показники кількості TUNEL-позитивних клітин проростків *A. thaliana* за умов дії різних стресових факторів (метаболічний та сольовий стреси, опромінення УФ-В), а також синергічного впливу стресових факторів та інгібітору аутофагії

тези та, як наслідок, блокує процеси аутофагії на етапі деградації вмісту аутолізосом, а отже, знижує життєздатність клітин, що було підтверджено за допомогою TUNEL-аналізу. Важливо зазначити, що розвиток аутофагії при опроміненні УФ-В був притаманний усім тканинам дослідних рослин (наземним та підземним); інші стресові чинники аналогічно впливали лише на клітини кореня. Отримані дані свідчать, з одного боку, про важливість процесу аутофагії як адаптивного механізму опосередкування негативного впливу зовнішніх абіотичних факторів, а з іншого – про селективність такої клітинної відповіді щодо певних типів стресів, зокрема опромінення УФ-В.

Також слід відзначити підвищений рівень клітин з ознаками ЗКЗ при синергічній дії стресового фактора та інгібітору аутофагії Е-64, а саме підвищення рівня закислення цитоплазми (виявлявся за допомогою вітального флуоресцентного барвника акридин оранжевого) та підвищення кількості клітин з апоптичною морфологією ядра (наявність характерних апоптичних мікроядер при забарвленні клітин DAPI). У випадку попередньої обробки Е-64 в усіх зразках відбувалося підвищення рівня закислення цитоплазми у порівнянні зі зразками, не обробленими інгібітором.

Враховуючи надзвичайно важливу роль аутофагії в адаптації до впливу абіотичних стресових чинників, необхідно глибоко розуміти механізми розвитку цього процесу у клітині рослин. Для дослідження взаємозв'язку між мікротрубочками та розвитком стрес-індукованої аутофагії було проведено транскрипційний аналіз профілю експресії генів 6 ізотипів α -тубуліну та 9 ізотипів *atg8* у стресових умовах. Для контролю використовували рослини, які вирощували у стандартних умовах. В результаті було встановлено стрес-індукований характер експресії досліджуваних генів (рис. 2).

Зокрема, за умов метаболічного стресу відбувалося підвищення рівнів експресії у тій чи іншій мірі усіх ізотипів α -тубуліну та *atg8*, проте була виявлена значна позитивна регуляція експресії генів *tua5*, *tua6* та *atg8f*, *atg8h*, *atg8i*. Опромінення УФ-В призводило до гіперекспресії генів *tua4*, *atg8f* та *atg8g*, але слід відзначити, що вплив цього стресового фактора також індукував незначне підвищення рівнів експресії майже усіх ізотипів досліджуваних генів. Під час індук-

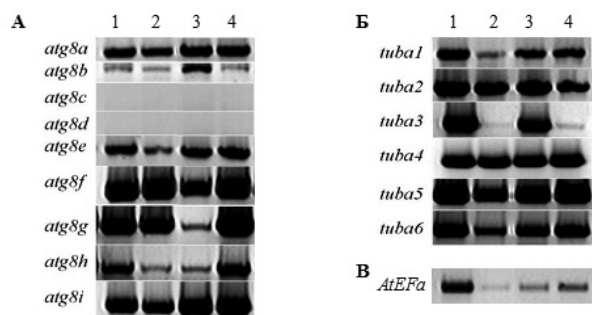


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК з праймерами до генів ізотипів *atg8* (А) та α -тубуліну (Б), *AtEFA* (В): 1 – контроль, 2 – опромінення УФ-В, 3 – метаболічний стрес, 4 – сольовий стрес

ції аутофагії за умов сольового стресу відбувалася регуляція експресії *tua4*, *atg8g* та *atg8h*. З іншого боку, сольовий стрес також викликав негативну регуляцію експресії *tua3*. Слід зазначити, що експресії генів *atg8c* та *atg8d* не було виявлено, причому жоден стресовий стимул не індукував транскрипцію цих генів.

Отже, отримані дані свідчать про залучення мікротрубочок до опосередкування розвитку процесів аутофагії, індукованої абіотичними стимулами. Враховуючи, що ко-експресія певних ізотипів генів α -тубуліну та *atg8* є стрес-регульованою, можна зробити висновок, що різні стресові фактори по-різному реалізують розвиток стрес-індукованої аутофагії. Отримані дані слугуватимуть підґрунтям для подальшого дослідження ролі мікротрубочкового цитоскелету у реалізації цього адаптивного механізму.

Висновки

У роботі було продемонстровано, що синергійний вплив стресових факторів та інгібітору аутофагії Е-64 знижують виживаність клітин, що підкреслює адаптивну та захисну роль аутофагії у клітинах *A. thaliana*. Водночас стрес-залежні зміни ко-експресії генів ізотипів α -тубуліну та *atg8* вказують на функціональну роль мікротрубочкового цитоскелету в реалізації процесів аутофагії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bassham D.C., Laporte M., Marty F., Moriyasu Y., Ohsumi Y., Olsen L.J., Yoshimoto K. Autophagy in development and stress responses of plants // *Autophagy*. – 2006. – 2, № 1 – P. 2–11.
2. Liu Y., Bassham D.C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2012. – 63. – P. 215–237.
3. Yang Z., Klionsky D. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – 22, № 2. – P. 124–131.
4. Minina E.A., Bozhkov P.V., Hofius D. Autophagy as initiator or executioner of cell death // *Trends Plant Sci.* – 2014. – 19, № 11. – P. 692–697.
5. Araki Y., Ku W.C., Akioka M., May A.I., Hayashi Y., Arisaka F., Ishihama Y., Ohsumi Y. Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity // *J. Cell Biol.* – 2013. – 203, № 2. – P. 299–313.
6. Avin-Wittenberg T., Honig A., Galili G. Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals // *Protoplasma*. – 2012. – 249, № 2. – P. 285–299.
7. Kirisako T., Baba M., Ishihara N., Miyazawa K., Ohsumi M., Yoshimori T., Noda T., Ohsumi Y. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast // *J. Cell Biol.* – 1999. – 147, № 2. – P. 435–446.
8. Monastyrskaya I., Rieter E., Klionsky D.J., Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2009. – 84, № 3. – P. 431–448.
9. Fass E., Shvets E., Degani I., Hirschberg K., Elazar Z. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes // *J. Biol. Chem.* – 2006. – 281. – P. 36303–36316.
10. Jahreiss L., Menzies F.M., Rubinsztein D.C. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes // *Traffic*. – 2008. – 9, № 4. – P. 574–587.
11. Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Y.B. UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – 68, № 1. – P. 51–57.
12. Moriyasu Y., Inoue Y. Use of protease inhibitors for detecting autophagy in plants. In: *Methods in Enzymology* (1st ed.). – Elsevier Inc. – 2008. – P. 557–580.
13. Inoue Y., Suzuki T., Hattori M., Yoshimoto K., Ohsumi Y., Moriyasu Y. AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells // *Plant Cell Physiol.* – 2006. – 47, № 12. – P. 1641–1652.

FEDYNA V.D., LYTVYN D.I., BLUME Y.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a, e-mail: vira.fedyna@gmail.com*

MICROTUBULE CYTOSKELETON PARTICIPATES IN REALIZATION OF AUTOPHAGY, WHICH IS CRUCIAL FOR CELL SURVIVING UNDER THE INFLUENCE OF STRESSFUL STIMULI IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Aim. Significant role of microtubules (MTs) in the regulation of autophagy development is widely described. In yeasts and animal cells, MTs provide processes of maturation and traffic of autophagosomes. In plants, autophagic mechanisms still poorly understood despite its fundamental role for cellular functioning. We investigated an involvement of microtubule cytoskeleton in the realization of autophagy, a process, which is essential for cell surviving under stress conditions.

Methods. *Arabidopsis thaliana* seedlings were subjected to metabolic- and salt stresses, as well as ultraviolet B irradiation as well as to synergistic action of stressful stimuli and E-64 inhibitor of autophagy-related cysteine proteases. The interrelation between MTs and stress-induced autophagy was investigated via performing of expression profiling of α -tubulin and *atg8* isotypes. **Results.** It was shown that synergistic action of stressful factors and autophagy inhibition was realized in decreased cell viability that confirms the role of autophagy in the mediation of abiotic stress influences. Obtained results suggest stress-specific involvement of certain isotypes of *atg8* and α -tubulin in autophagy development at the transcriptional level. **Conclusions.** Our work underlines the role of microtubule cytoskeleton in realization of autophagy, as an adaptive process, under adverse abiotic influences.

Keywords: autophagy, stressful stimuli, *Arabidopsis thaliana*, α -tubulin, *atg8*, programmed cell death.