

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ
БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

ОЛЕНЄВА ВІРА ДМИТРІВНА



УДК 581.17:57.022:57.017.3:57.042

**ФУНКЦІОНАЛЬНА РОЛЬ АЦЕТИЛЮВАННЯ α -ТУБУЛІНУ
ПРИ РОЗВИТКУ СТРЕС-ІНДУКОВАНОЇ АУТОФАГІЇ
У *ARABIDOPSIS THALIANA***

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович,
Державна установа «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН
України», завідувач відділу геноміки
та молекулярної біотехнології,
директор

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Стойка Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації
клітин та апоптозу

доктор біологічних наук, професор
Кравець Володимир Степанович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В.П. Кухаря НАН України,
завідувач відділу молекулярних
механізмів регуляції метаболізму клітини

Захист відбудеться «09» квітня 2019 року о 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «07» березня 2019 року.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Посуха, засолення ґрунтів, нестача поживних елементів та збільшення частки випромінювання ультрафіолету В знаходяться серед основних лімітуючих факторів життєдіяльності рослинних організмів. Одним із наслідків дії цих стресових факторів є індукція аутофагії як внутрішньоклітинного адаптивного процесу. Аутофагія, як катаболічний процес, у ході якого цитоплазматичні компоненти деградують, притаманна клітинам рослин, що зазнають стресового впливу навколишнього середовища. Даний механізм характеризується формуванням аутофагосом - структур з подвійною мембраною, які доставляють цитоплазматичні компоненти до вакуолей для деградації.

Відомо, що мікротрубочки, як високодинамічна складова цитоскелету, беруть участь у реалізації багатьох клітинних процесів, зокрема, у поділі та рості клітин, внутрішньоклітинному транспорті та позиціонуванні органел та макромолекул, а також у виживанні та адаптації до стресових умов (Fourest-Lieuvin et al., 2006; Maskeh et al., 2013; Wasteneys et al., 2002). Однією з неканонічних функцій мікротрубочок є його участь у реалізації індукції та розвитку процесів аутофагії. Їх роль полягає у регуляції активного транспорту зрілих аутофагосом для злиття з літичними органелами, опосередкуванні клітинних сигналів, що регулюють аутофагію та, власне, регуляції біогенезу аутофагосом (Maskeh et al., 2013; Lee et al., 2010; Köchl et al., 2006).

Не зважаючи на надзвичайно важливу фізіологічну роль аутофагії, механізми її регуляції в клітинах рослин є малодослідженими, а, часом, і фрагментарними. З іншого боку, для клітин тварин експериментально доведена роль мікротрубочок в опосередкуванні розвитку аутофагії як за фізіологічних, так і за стресових умов, а саме, участь у біогенезі та внутрішньоклітинному транспорті аутофагосом для злиття їх з літичними органелами і утворенні аутолізосом (Geeraert et al., 2010). Однією з головних регуляторних ланок розвитку аутофагії, які мають важливе значення для залучення мікротрубочок до даного процесу, є функціональний стан останніх, безпосередньо пов'язаний з посттрансляційними модифікаціями тубуліну. Зокрема, на клітинах тварин була доведена участь посттрансляційного ацетилювання α -тубуліну у реалізації аутофагії (Geeraert et al., 2010), однак, на клітинах рослин схожих досліджень проведено не було. Саме цим і визначається актуальність нашого дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних НДР відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2011–16 рр., № ДР 0111U001597); «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (2015–19 рр., № ДР 0115U002084); «Дослідження відповіді рослин на дію абіотичних та біотичних чинників на клітинному та генетичному рівнях для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливого впливу змін кліматичних умов» (2017–21 рр., № ДР 0117U000909).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було з'ясування ролі участі мікротрубочок із залученням ацетилювання α -тубуліну у реалізації аутофагії,

індукованої абіотичними стресовими чинниками (голодування, осмотичний/сольовий стрес, опромінення ультрафіолетом В), та дослідження на транскрипційному рівні участі моторних білків кінезинів в опосередкуванні процесів аутофагії за цих умов в клітинах *Arabidopsis thaliana*.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні завдання:

1. Дослідити вплив абіотичних стресових факторів (голодування, осмотичний і сольовий стреси, ультрафіолет В), а також синергічний вплив цих стресових чинників та інгібування аутофагії на розвиток проростків *A. thaliana*.
2. Охарактеризувати закономірності розвитку аутофагії, індукованої голодуванням, осмотичним і сольовим стресами і ультрафіолетом В, на морфологічному рівні у проростках *A. thaliana*.
3. З'ясувати вплив інгібування аутофагії на розвиток стрес-індукованої програмованої клітинної загибелі (ПКЗ) у клітинах *A. thaliana*.
4. Дослідити зміни рівнів ацетилюваного α -тубуліну та білка аутофагії Atg8 під впливом досліджуваних абіотичних стресових факторів.
5. Провести структурно-біологічну оцінку впливу пост трансляційного ацетилювання α -тубуліну на його взаємодію з білком Atg8.
6. Проаналізувати зміни рівнів експресії генів α -тубуліну, білка *atg8*, кінезинів, гексокіназ та генів ензимів, залучених до ацетилювання α -тубуліну у ході розвитку стрес-індукованої аутофагії.
7. Дослідити тканинспецифічність гіперацетилювання α -тубуліну у відповідь на дію досліджуваних абіотичних стресових чинників.

Об'єкт дослідження. Особливості ацетилювання α -тубуліну та експресії генів білків, пов'язаних з мікротрубочками, у ході розвитку аутофагії у *A. thaliana*, індуковані різними абіотичними стресовими чинниками.

Предмет дослідження. Процеси індукції та реалізації стрес-індукованої аутофагії у *A. thaliana* за участю мікротрубочок.

Методи дослідження. В роботі були використані цитологічні (флюоресцентна мікроскопія, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія, імуногістохімія), молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), ПЛР зворотньої транскрипції, клонування генетичних конструкцій генів химерних білків), біохімічні (електрофорез та Вестерн-блот аналіз), біоінформатичні (структурно-біологічна оцінка взаємодії білків) методи досліджень

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено функціональний взаємозв'язок ацетилювання α -тубуліну рослин і розвитком аутофагії, індукованої абіотичними стресовими чинниками (голодування, осмотичний/сольовий стрес, ультрафіолет В). Вперше проаналізовано профілі експресії генів α -тубулінів, одного з ключових білків аутофагії *atg8* та генів білків, залучених до ацетилювання та деацетилювання α -тубуліну, у ході розвитку стрес-індукованої аутофагії. Виявлено тканинспецифічний характер ацетилювання α -тубуліну як адаптивної реакції на дію стресових факторів у клітинах *A. thaliana*. Доведено, що посттрансляційне ацетилювання забезпечує більш міцну взаємодію α -тубуліну з білком Atg8, що є важливим фактором залучення мікротрубочок до розвитку аутофагії. Шляхом транскрипційного аналізу генів моторних білків кінезинів рослин вперше проаналізовано залучення цих білків до участі у реалізації аутофагії у відповідь на дію досліджуваних абіотичних стресових факторів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати, що підтверджують функціональну роль ацетилювання α -тубуліну у реалізації стрес-

індукованої аутофагії у клітинах рослин, можуть бути використані у подальших дослідженнях зазначених адаптивних механізмів з практичною метою. Зокрема, вони можуть бути використані як підґрунтя для подальшої розробки дослідницьких стратегій управління розвитком процесів аутофагії у клітинах рослин в умовах глобальних змін клімату. Глибоке розуміння клітинних механізмів регуляції аутофагії є важливою передумовою розвитку біотехнологічних підходів для підвищення стійкості сільськогосподарських культур до дії зовнішніх абіотичних факторів. Результати досліджень можуть бути використані у навчальному процесі під час підготовки фахівців з клітинної та молекулярної біології.

Особистий внесок здобувача. Ідея дослідження, постановка наукових завдань, наступна інтерпретація отриманих результатів, розробка структури дисертаційної роботи, а також публікація наукових статей була здійснена спільно з науковим керівником. Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, проведено основні експериментальні дослідження, викладено основні положення та узагальнення дисертаційної роботи.

Апробація результатів дослідження. Матеріали дисертації були представлені на XI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених “Шевченківська весна-2013: Біологічні науки” (Київ, 18-22 березня, 2013), науково-практичній конференції молодих вчених “Plant Genomics and Biotechnology” (Київ, 23-24 грудня 2013 р.), 4-му з’їзді Українського товариства клітинної біології (Ужгород, 17-20 вересня 2014 р.), XI-му Українському біохімічному конгресі (Київ, 6-10 жовтня 2014 р.), конференції молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016” (Київ, 26-27 травня 2016 р.), XI-й (Одеса, 12–16 вересня 2016 р.) та XIII-й (Яремче, 17–21 вересня 2018 р.) Міжнародних наукових конференціях “Фактори експериментальної еволюції організмів”, Міжнародному симпозиумі з клітинної біології та 5-му Всеукраїнському конгресі з клітинної біології (Одеса, 2-6 жовтня 2016 р.), Молодіжній конференції “Біологія рослин та біотехнологія”, (Київ, 16-18 травня 2017 р.), X з’їзді УТГіС ім. М.І. Вавилова (Умань, 2-6 жовтня 2017 р.), Міжнародних конгресах з біології рослин “Plant Biology Europe FESB/EPSO 2016 Congress” (Прага, Чехія, 26-30 червня 2016 р.) та “Plant Biology Europe-2018 (Копенгаген, 18-21 червня 2018 р.) та Міжнародній зустрічі ASCB/EMBO-2018 (Сан-Дієго, США, 8-12 грудня 2018 р.).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 16 праць, з них 8 статей (в т.ч. 3 – у зарубіжних журналах) та 8 тез доповідей у профільних журналах та збірниках матеріалів конференції.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на 147 сторінках друкованого тексту, містить 36 рисунків і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини з обговоренням результатів роботи, узагальнення результатів дослідження, висновків і переліку використаних джерел, який містить 174 посилань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляд літератури) узагальнено дані щодо механізмів аутофагії та участі мікротрубочок у регуляції цього процесу. Описано три типи аутофагії, характерні для клітин еукаріотів. Розглянуто роль макроаутофагії як адаптивної відповіді на дію абіотичних стресових чинників. Описано механізм залучення мікротрубочок до реалізації аутофагії у клітинах тварин та

проаналізовано можливі паралелі щодо залучення останніх до аналогічних процесів у рослин. Наведено короткий огляд посттрансляційних модифікацій тубуліну, зокрема, ацетилювання α -тубуліну. Зазначено необхідність дослідження ролі ацетилювання α -тубуліну у реалізації стрес-індукованої аутофагії у клітинах рослин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для експериментів використовували 7-денні проростки *A. thaliana* екотипу Columbia Col-0 та трансгенної лінії, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-GFP. Трансгенну лінію *A. thaliana* було отримано шляхом трансформації рослин методом floral-dip.

Рослини вирощували на стандартному середовищі Мурасіге і Скуга (МС), що містило 1% сахарозу, рН 5,7 (Audebert et al., 1994). Умови сольового стресу моделювали шляхом додавання до поживного середовища 150 мМ NaCl або 10 мМ манітолу для моделювання осмотичного стресу. Для моделювання умов голодування проростки пророщували на середовищі без сахарози. Опромінення УФ-В здійснювали за допомогою ультрафіолетової лампи TL 20W/12RS (Philips, Велика Британія) у дозах 41 кДж/м² та 81 кДж/м². Проростки аналізували одразу та через 3 та 24 год після опромінення. Для дослідження аутофагії використовували високоселективний інгібітор цистеїнових протеаз E-64 у концентрації 10 мкМ.

Показники росту головних коренів проростків *A. thaliana* досліджували на 7-у добу вирощування при стресових умовах та документували за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Довжину коренів вираховували за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d), <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Розвиток аутофагії на морфологічному рівні аналізували за допомогою монодансилкадаверину (MDC) (1 мкг/мл); пропідіум йодиду (PI) (1,5 мкг/мл) та флуоресцеїн-діацетату (FDA) (2,5 мкг/мл), а також акридину оранжевого (АО) (10 мкг/мл). Для візуалізації аутофагосом у клітинах лінії *A. thaliana*, які стабільно експресує химерний білок Atg8h-GFP, використовували конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META (Zeiss, ФРН), оснащений лазерами для збудження з довжиною хвилі 548 нм та 488 нм (для PI та GFP), а також для збудження з довжиною хвилі 488 нм та 405 нм (для GFP та MDC). Збудження від PI та GFP збирали за допомогою фільтрів емісії LP615 та BP505-530, а збудження від GFP та MDC - за допомогою фільтрів BP 505-530 та LP 420, відповідно.

Для приготування лізатів тканин використовували буфер 20 мМ Тріс-(гідроксиметил)-амінометану, рН 7,5, що містив 150 мМ NaCl, 1 мкМ ЕДТА, 1 мкМ ЕГТА, 1% Triton X-100 та інгібітори протеаз та фосфатаз: 1 мкМ Protease Inhibitor Cocktail P 9599 (Sigma, США), 1 мкМ Na₃VO₄, 50 мМ NaF. Концентрацію білків в пробах визначали за оптичною густиною розчину при 595 нм у порівнянні з контролем за попередньо побудованою калібрувальною кривою.

Електрофорез білків проводили за методом Лемлі у 10%-ному поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію при постійному струмі 20 мА. Для електропереносу білків використовували нітроцелюлозні мембрани (Hybond™-с super, Велика Британія) та PVDF-мембрани (при аналізі рівня білка LC3-II/LC3-I). Для Вестерн-блот гібридизації використовували мишачі моноклональні антитіла TU-16 до α -тубуліну (Thermo Fisher Scientific, США) та до ацетилюваного α -тубуліну (T6793, Sigma, США). Для вивчення експресії модифікованого та немодифікованого білка Atg8 використовували кролячі

моноклональні антитіла G1544 до GFP (Sigma, США). Досліди проводили, використовуючи буфер TBS-T, що містив 20 мМ Тріс-(гідроксиметил)-амінометан, рН 7,6, 150 мМ NaCl та 0,1%-ний Tween-20.

TUNEL-аналіз зразків проводили з використанням набору *In Situ Cell Death Detection Kit*, TMR red (Roche, Швейцарія) згідно рекомендацій виробника. Для приготування парафінових зрізів 7-денні проростки фіксували у 4%-ному параформальдегіді у PBS буфері (рН 7,4) протягом доби, після чого зразки дегідрували, послідовно інкубуючи у розчинах етанолу різної концентрації: 30%-50%-70%-90%-96%-100%, по 30 хв на кожен етап. В роботі використовували парафін Paraplast X-tra (Sigma, США). Парафінові блоки використовували для приготування мікротомних зрізів товщиною 10 мкм, зрізи поміщали на полі-L-лізині скельця. Для подальшого аналізу, зрізи депарафінізували ксилолом двічі по 10 хв та регідрували 100%, 96% та 70% спиртом і деіонізованою водою. Для візуалізації ядер зразки фарбували флуоресцентним барвником DAPI. Кількість TUNEL-позитивних клітин вираховували у 10 полях зору.

РНК з рослинного матеріалу виділяли за допомогою PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Якість РНК визначали електрофоретично в 1%-ному агарозному гелі з формамідом, а концентрацію - спектрофотометрично при довжині хвилі 260 нм. Синтез кДНК проводили за допомогою RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) з використанням інгібіторів РНКаз (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific, США), зворотної транскриптази (Thermo Scientific, США) та 1 мкг тотальної РНК як матриці. ПЛР проводили з використанням Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) за наступних умов: початкова денатурація - 94°C протягом 5 хв; 30 циклів ампліфікації (денатурація – 94°C, 30 сек; зв'язування праймера з матрицею – 30 сек; синтез –72°C, 1 хв.) та фінальна елонгація – при 72°C протягом 10 хв. Ділянки послідовностей генів було ампліфіковано із синтезованої кДНК за допомогою ПЛР з використанням відповідних праймерів. Як контроль для ПЛР використовували рівень експресії фактору елонгації α (AtEF α). Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 1%-ному агарозному гелі. Рівні експресії генів вимірювали денситометрично за допомогою програми TotalLab 2.00. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2013. Експерименти проводили у трьох повторах, для кожного досліджуваного показника визначали його середнє значення та стандартне відхилення в межах однієї вибірки.

Для імуногістохімічного аналізу α -тубуліну проростки *A. thaliana* фіксували у фіксаторі Буена протягом 24 год та готували парафінові зрізи. Для блокування сайтів неспецифічного зв'язування антитіл зрізи інкубували 1 год у буфері PBS-T, що містив 5% знежиреного молока, після чого відмивали PBS-T (3 рази по 5 хв). Як первинні антитіла використовували антитіла до ацетильованого α -тубуліну у розведенні 1:100. Вторинні антитіла проти IgG миші, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США), використовували у розведенні 1:100. Потім зрізи відмивали і фарбували за допомогою набору DAB Substrate Kit (Pierce, США).

3-вимірні структури α -тубуліну і білків Atg8a з *A. thaliana* були передбачені за допомогою сервера Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>). Моделювання гомології проводили на основі послідовностей з баз даних UniProt (<http://www.uniprot.org>) і шаблонів з банку даних білків RCSB (www.rcsb.org). Для оцінки якості моделі використовували алгоритм QMEAN (Benkert et al., 2008). Білок-білковий докінг проводили за допомогою сервера Haddock (Dominguez et al.,

2003) з використанням напівгнучкої процедури пошуку. Передбачення сайтів зв'язування проводили у середовищі серверів PRED-PPI (Guo et al., 2010) і MetaPPI (<http://projects.biotec.tu-dresden.de/metappi/>). Всі симуляції молекулярної динаміки (МД) виконували за допомогою програми Gromacs 4.5.5 (Kutzner et al., 2015) у силовому полі CHARMM36.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив абіотичних стресових факторів на розвиток проростків *A. thaliana*. Синергічний вплив стресових факторів та інгібування аутофагії. У роботі було проведено дослідження впливу абіотичних стресових факторів на ріст та розвиток проростків *A. thaliana* та встановлено, що усі досліджувані абіотичні чинники викликали пригнічення росту рослин, що виявлялося у зменшенні довжин коренів експериментальних проростків у порівнянні з контрольними (рис. 1, А; рис. 2). Так, при опроміненні ультрафіолетом-В середній показник довжин коренів знижувався на 15%, а в умовах осмотичного стресу та голодування за сахарозою – на 23 та 25%, відповідно. Найнижчі показники росу в умовах стресу продемонстрували рослини, що вирощувалися з додаванням 150 мМ NaCl до живильного середовища, зокрема, середня довжина коренів знижувалася майже на 60%.

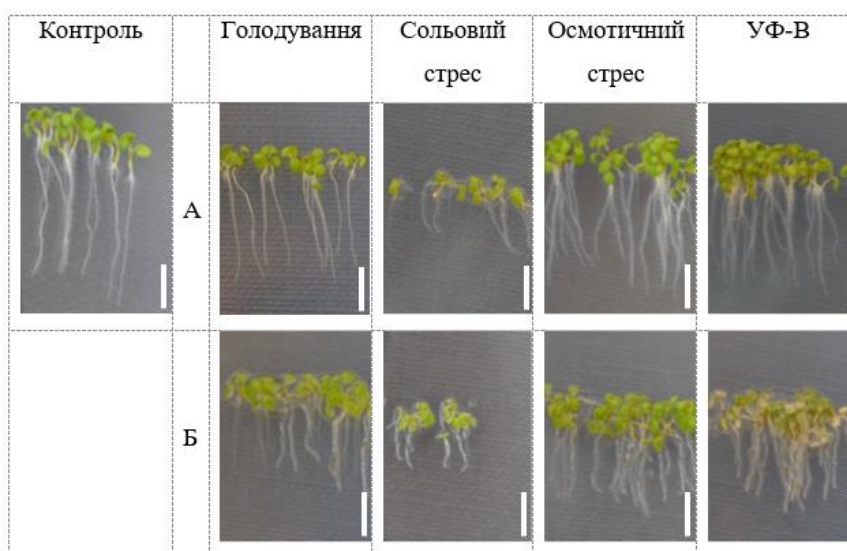


Рис. 1. Зміни фенотипу проростків *A. thaliana* за умов: голодування (середовище МС без сахарози), сольового стресу (150 мМ NaCl), осмотичного стресу (10 мМ манітолу) та опромінення УФ-В (41кДж/м²). А – без попередньої інкубації з Е-64. Б – з попередньою інкубацією з Е-64. Бар – 0,5 см.

Для більш глибокого розуміння ролі аутофагії як адаптивної реакції у клітинах рослин було проведено дослідження синергічного впливу абіотичних факторів та інгібування аутофагії. Загалом, для рослин, попередньо оброблених інгібітором аутофагії Е-64, було характерним ще більш виражене зниження довжини коренів (рис. 1, Б). При метаболічному та осмотичному стресах зазначений показник знижувався в середньому ще на 10%, а при сольовому стресі – ще на 14%. Синергічна дія опромінення УФ-В та Е-64 викликала достовірне зниження показників росту з 15 до 46%.

Дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії з використанням флуоресцентної мікроскопії. За результатами морфологічної оцінки розвитку аутофагії, ацидифікації цитоплазми, морфології ядра та виживаності клітин

проростків *A. thaliana*, що зазнавали впливу абіотичних стресів, усі досліджувані стресові фактори мали наслідком появу MDC-позитивно забарвлених структур, що морфологічно відповідали аутофасомам (рис. 3).

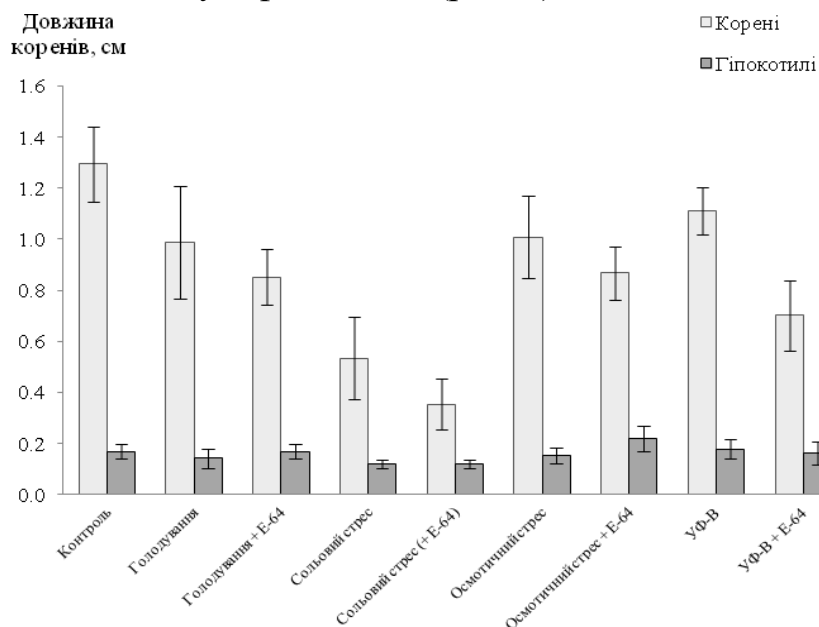


Рис. 2. Вплив стресових факторів на ростові показники коренів та гіпокотилів проростків *A. thaliana*.

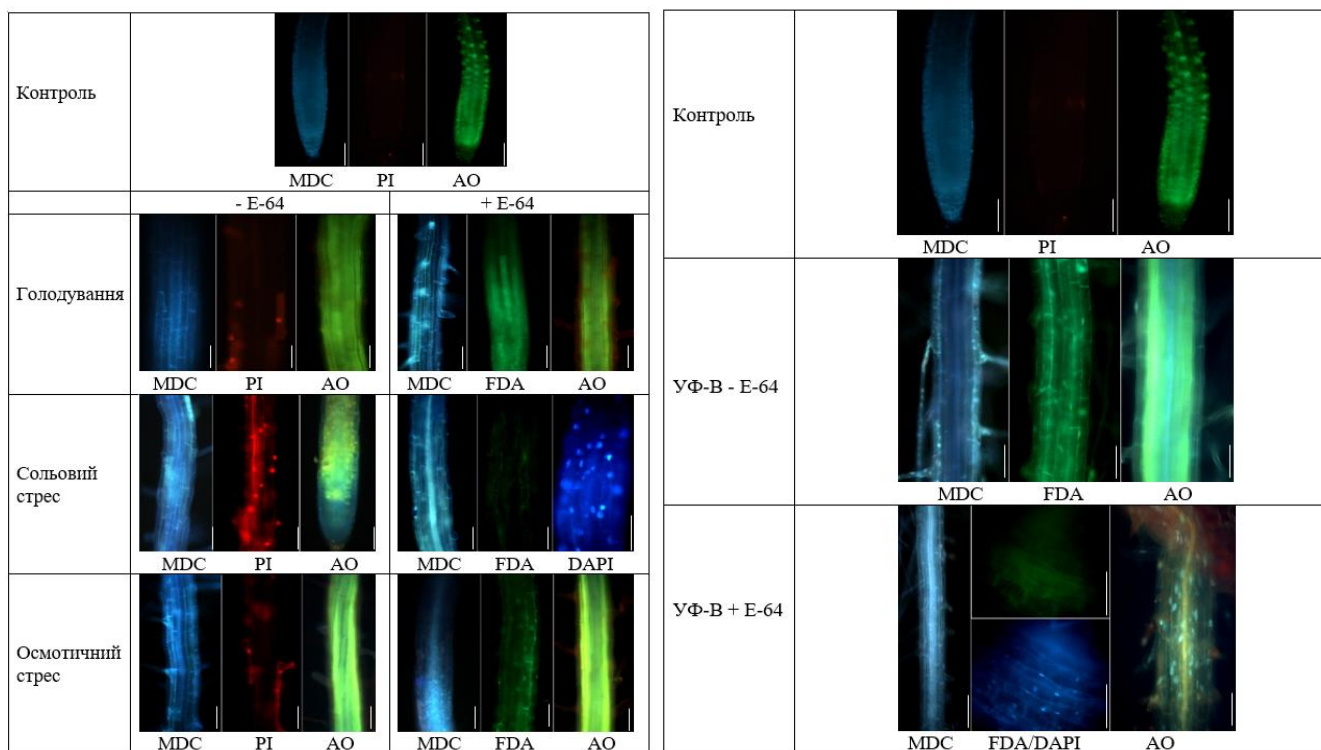


Рис. 3. Морфологічні ознаки розвитку аутофагії в клітинах кореня проростків *A. thaliana* під впливом голодування, сольового або осмотичного стресу та опромінення УФ-В: MDC – монодансилкадаверин, PI – пропідіум йодид, FDA – флуоресцеїн діацетат, АО – акридин оранжевий. Бар - 50 мкм.

Також було виявлено, що усі абіотичні стресові чинники мали наслідком незначне зниження рівня виживаності клітин. Слід зазначити, що процеси стрес-індукованої аутофагії були більшою мірою характерними для коренів проростків, в

той час як ознаки аутофагії у наземних частинах (листяках) були зафіксовані лише під впливом опромінення УФ-В. Слід зазначити, що синергічна вплив стресових факторів та інгібування аутофагії зумовлював зниження показників виживаності клітин незалежно від типу стресового чинника. Також було відмічено підвищення кількості клітин з апоптичною морфологією ядра (наявність характерних апоптичних мікроядер при забарвленні клітин DAPI).

З огляду на отримані результати, можна зробити висновок, що аутофагія є адаптивним внутрішньоклітинним механізмом, що індукується у відповідь на опромінення УФ-В, голодування, умови осмотичного або сольового стресів та, вірогідно, є етапом, залученим до розвитку програмованої клітинної загибелі.

Дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії з використанням конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Дослідження процесів реалізації стрес-індукованої аутофагії за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії здійснювали з використанням трансгенної лінії *A. thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8-eGFP. Контрольні рослини характеризувалися дифузною локалізацією сигналу від Atg8h-eGFP як у наземних, так і у підземних органах рослин без жодних ознак колокалізації з клітинними структурами (рис. 4, А). Проте внаслідок впливу абіотичних факторів сигнали від Atg8h-GFP набували ознак специфічної субклітинної локалізації (рис. 4, Б-Г). Враховуючи, що процесинг Atg8, зокрема, відщеплення С-кінця молекули разом з GFP, є необхідним етапом для вбудовування білку у мембрану аутофагосоми (Klionsky et al., 2011), можна зробити висновок, що така локалізація сигналів від GFP хоча і не є власне маркером аутофагосом, проте свідчить про їх безпосередню близькість до них. Одночасно було зафіксовано чітку колокалізацію сфокусованих сигналів від Atg8h-GFP та флуоресценції монодансилкадаверину, котрий вважається загальноприйнятим маркером аутофагосом (рис. 5).

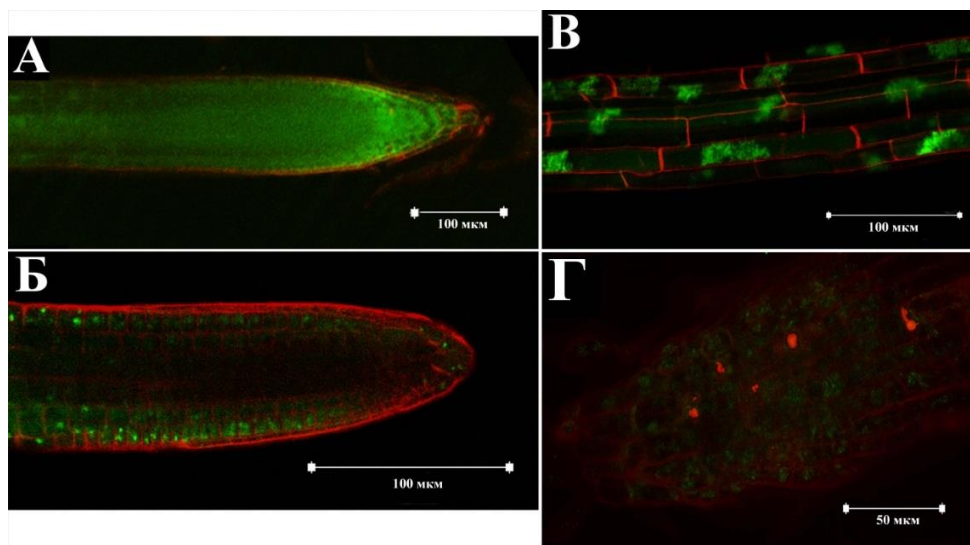


Рис. 4. Візуалізація химерного білку Atg8h-GFP у коренях 7-денних проростків *A. thaliana* за допомогою конфокальної мікроскопії: А – контрольні клітини кореня; Б – формування аутофагосом у клітинах кореневого чохла, епідермісу та перициклу під впливом метаболічного стресу; В – формування аутофагосом у клітинах провідної системи кореня в умовах голодування; Г – формування аутофагосом у епідермальних клітинах гіпокотила після опромінення УФ-В.

Ймовірно, що Atg8 накопичується локально, у сайтах формування преаутофагосомної мембрани, безпосередньо перед процесом вбудовування у мембрану аутофагосоми. При аналізі проростків на 7-й день культивування за стресових умов було виявлено, що голодування, сольовий та осмотичний стреси індукують розвиток аутофагії, проте, даний процес не поширюється за межі кореневої системи. З іншого боку, аутофагія, індукована опроміненням УФ-В, вірогідно, розвивається безпосередньо у опроміненіх клітинах, а тому може бути виявлена як у підземних, так і наземних тканинах рослин.

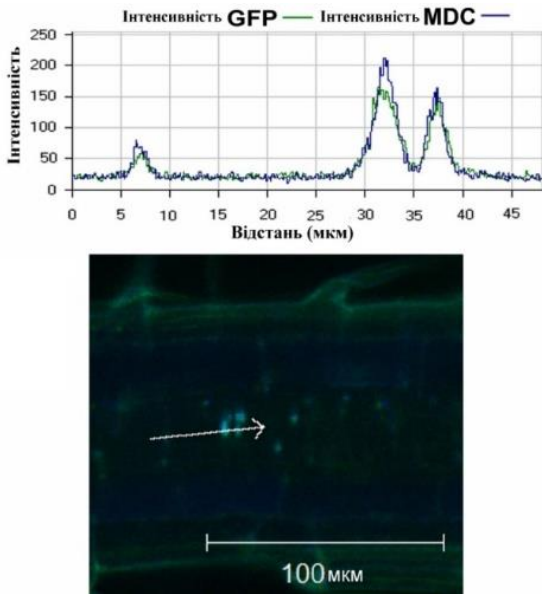


Рис. 5. Колокалізація сигналів від MDC-позитивно забарвлених структур та Atg8h-eGFP у клітинах кореня проростків *A. thaliana* за умов голодування.

Інгібування аутофагії, як чинник, що ініціює розвиток стрес-індукованої програмованої клітинної загибелі клітин *A. thaliana*. Для з'ясування взаємозв'язку процесів аутофагії та ПКЗ в клітинах арабідопсису за даних експериментальних умов, нами було проведено TUNEL-аналіз гістологічних зрізів рослин, що зазнавали впливу абіотичних стресів. Показник ПКЗ у контрольних рослин знаходився у межах фізіологічного значення - близько 6% (рис. 6). Однак за умов впливу осмотичного, метаболічного та сольового стресів відсоток TUNEL-позитивних клітин зростав до 18-21%, при чому інгібування аутофагії зумовлювало ще більше підвищення кількості клітин у стані ПКЗ. Аналогічний показник при опроміненні ультрафіолетом-В становив 9% та достовірно зростав до 16% за умов синергічного впливу UV-B та інгібітору аутофагії E-64. Дані результати свідчать про те, що аутофагія може передувати розвитку ПКЗ за умов посилення дії абіотичних стресових факторів.

Процесинг Atg8, як свідчення розвитку стрес-індукованої аутофагії супроводжується підвищенням рівня ацетилювання α -тубуліну. Для дослідження ролі ацетилювання α -тубуліну у реалізації стрес-індукованої аутофагії, ми використовували трансгенну лінію *A. thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-GFP для проведення Вестерн-блот аналізу рівнів GFP та ацетилюваного α -тубуліну. З огляду на те, що внаслідок процесингу Atg8, С-кінець молекули разом зі злитим GFP відрізається, рівень вільного GFP використовували як показник активності перебігу аутофагії в клітинах. Зокрема, в умовах стресу, нами було продемонстровано суттєве підвищення рівня вільного GFP відносно рівня Atg8h-GFP, у порівнянні з контрольними рослинами, що на біохімічному рівні підтверджує реалізацію стрес-індукованої аутофагії у клітинах (рис. 7).

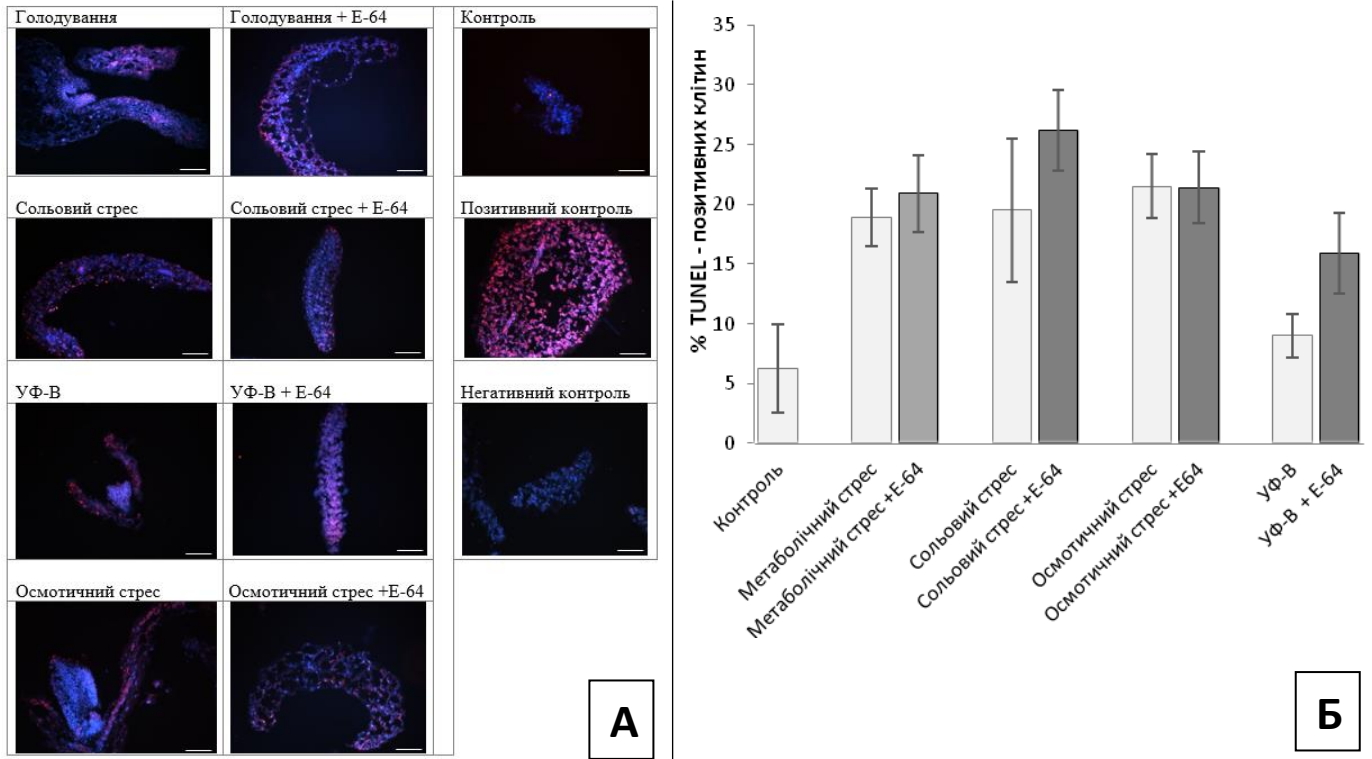


Рис. 6. А - TUNEL-аналіз зразків *A. thaliana* за умов впливу УФ-В (41кДж/м^2), голодування, сольового та осмотичного стресів. Бар – 50 мкм. Б - Показники кількості TUNEL-позитивних клітин проростків *A. thaliana*, що зазнавали дії стресових факторів, а також їх синергічного впливу інгібітору аутофагії E-64.

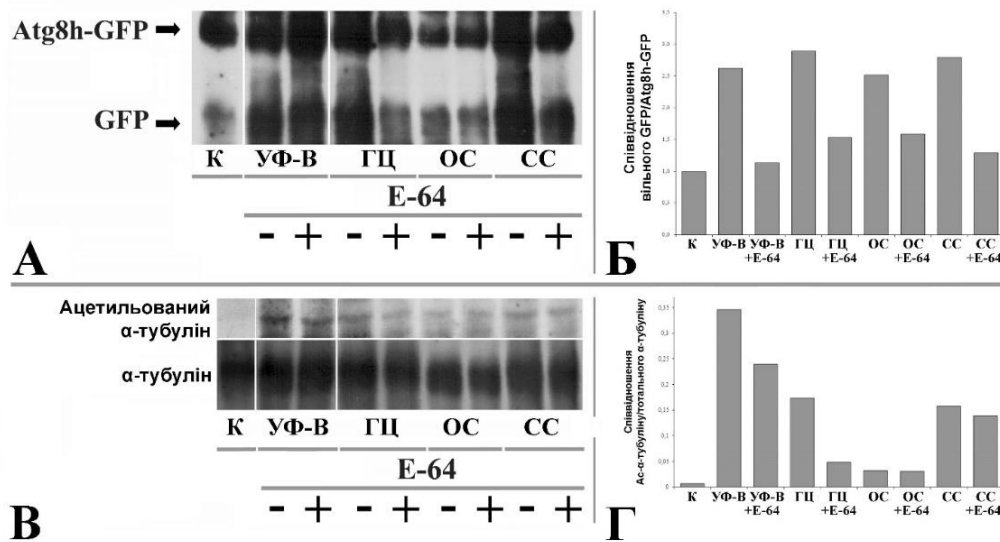


Рис. 7. Вестерн-блот аналіз білка Atg8h та ацетильованого α -тубуліну у проростках *A. thaliana* після дії стресових факторів (окремо або з попередньою обробкою E-64): А - GFP (вільний або у комплексі з Atg8h); Б – співвідношення рівнів вільного GFP до GFP у складі комплексу Atg8h-GFP; В – ацетильований α -тубулін; Г – рівні ацетильованого α -тубуліну відносно тотального α -тубуліну. К – контроль; УФ-В – опромінення у дозі 41кДж/м^2 , ГЦ – голодування (середовище МС без сахарози); ОС – осмотичний стрес (10 мМ манітол); СС – сольовий стрес (150 мМ NaCl).

Вочевидь, що зафіксований невисокий рівень вільного GFP у контрольних рослин відображає базовий рівень аутофагії. Ті ж самі зразки були використані для оцінки рівнів ацетильовання α -тубуліну за допомогою Вестерн-блоту з

використанням антитіл до ацетильованого α -тубуліну. Загальний рівень α -тубуліну слугував контролем для підрахунку. Було виявлено, що усі досліджувані стресові фактори викликали суттєве підвищення кількості ацетильованого тубуліну. Задетектовані підвищення рівнів ацетильованого α -тубуліну, що корелює у часі з розвитком стрес-індукованої аутофагії, свідчить на користь участі даної модифікації у реалізації зазначеного процесу. Синергічна ж дія стресових чинників та інгібування аутофагії мала наслідком пригнічення процесингу Atg8 та зниження рівнів ацетилювання тубуліну, що підкреслює адаптивну роль аутофагії у відповідь на стрес.

Структурно-біологічна оцінка взаємодії α -тубуліну з Atg8a, і ацетильованого α -тубуліну з Atg8a. Для більш глибокого розуміння ролі ацетилювання α -тубуліну у реалізації стрес-індукованої аутофагії нами було проведено структурно-біологічну оцінку взаємодії білка Atg8a і α -тубуліну у ацетильованому та не модифікованому станах. За результати біоінформатичного аналізу виявлено, що ацетилювання α -тубуліну забезпечує більш щільну і міцну взаємодію зазначених білків шляхом зміни заряду і гнучкості залишків α -тубуліну у сайті зв'язування молекул (рис. 8, 9).

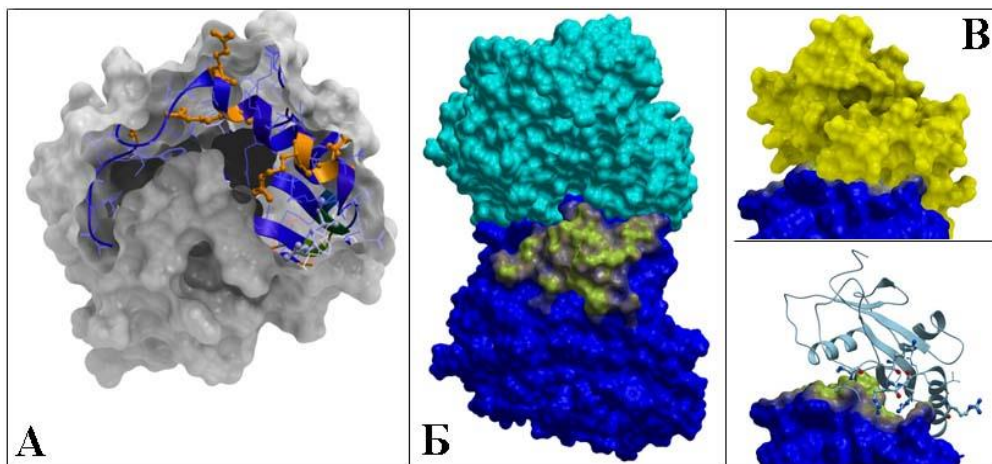


Рис. 8. А. Поверхня молекули білка Atg8a з можливим сайтом зв'язування на N-кінці (представлена стрічкою синього кольору). Важливі амінокислотні залишки, схожі до таких у LC3 людини (гомолог Atg8), позначені помаранчевим кольором. Б. Дві субодиниці α - і β -тубулінів з *A. thaliana*, вирівняні відносно димера з *B. taurus* (1JFF), для демонстрації правильності передбачення сайту зв'язування, позначеного світло-зеленим кольором. В. Поверхня і стрічковий тип відображення білка Atg8a (жовтого кольору), приєднаного до епітопів α -тубуліну (темно-синього кольору) на передбаченому сайті зв'язування (світло-зеленого кольору).

З огляду на відсутність експериментальних даних, які стосуються ролі мікротрубочок у реалізації аутофагії у рослин, отримані результати дозволяють нам зробити певні припущення щодо механізму взаємодії аутофагосом та мікротрубочок. Зокрема, відомо, що ацетилювання α -тубуліну сприяє стабілізації мікротрубочок, і що в такому стані вони беруть участь у внутрішньоклітинному транспорті аутофагосом та аутолізосом у клітинах тварин (Maskeh et al., 2013; Monastyrska et al., 2009). Тому щільніший контакт білка Atg8 з ацетильованим тубуліном опосередковано свідчить про участь мікротрубочок у реалізації

транспорту зрілих аутофагосом у ході аутофагії, індукованої різними стресовими факторами.

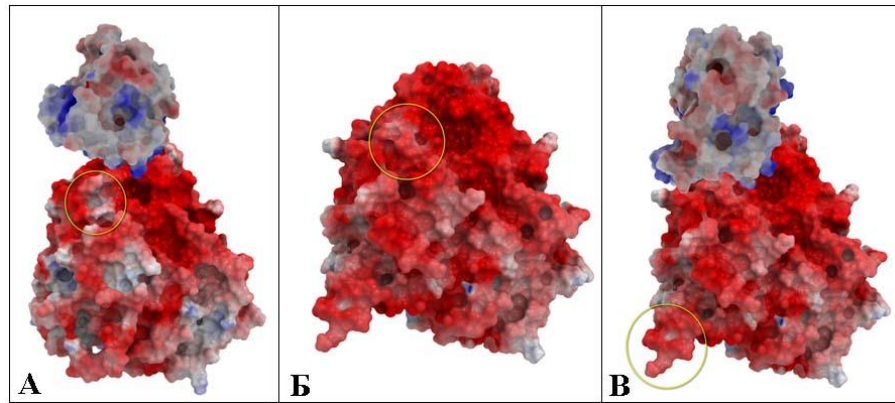


Рис. 9. Фронтальний вигляд структури молекулярних комплексів Atg8 α - α -тубулін з поверхневим розподілом електростатичного заряду. Ацетилований α -тубулін (А) є більш компактним порівняно неацетилованим (Б, В), має менше негативно заряджену поверхню, особливо у місці розташування K112 (Б) і K40 (В). Білок Atg8 α (синього кольору) міцніше і щільніше пов'язаний з ацетилованим тубуліном.

Профілі експресії генів α -тубуліну, білка *atg8*, кінезинів, гексокіназ та генів ензимів, залучених до ацетилювання α -тубуліну при індукції аутофагії стресовими факторами. З огляду на вагому роль мікротрубочок в опосередкуванні розвитку аутофагії у рослин наступним нашим завданням було проведення аналізу профілів експресії генів білків, залучених до реалізації аутофагії, індукованої абіотичними стресовими факторами на клітини рослин. Зокрема, було проведено аналіз рівнів експресії генів α -тубуліну та білка *atg8* для отримання додаткових підтверджень взаємодії мікротрубочок та аутофагосом, базуючись на коекспресії зазначених генів; а також генів білків, що регулюють динамічний стан мікротрубочок шляхом ацетилювання (*elp3*) та деацетилювання α -тубуліну (*hda6* і *hda14*). Для дослідження взаємозв'язку процесів аутофагії та ПКЗ також було проаналізовано профілі експресії генів гексокіназ, продукти яких виконують проапоптозну функцію, а підвищення рівня їх експресії може слугувати достовірним доказом розвитку ПКЗ. Також враховуючи, що для клітин тварин було показано роль кінезину-1 як однієї з ключових ланок індукції та реалізації аутофагії, метою цього етапу роботи було проведення транскрипційного аналізу рівнів експресії генів кінезинів, які є гомологами кінезину-1 людини.

Зміни експресії генів α -тубулінів та білка *atg8* при індукції аутофагії стресовими факторами. Загалом можна виділити дві тенденції у змінах рівнів експресії генів α -тубуліну у відповідь на опромінення УФ-В, а саме, рівні експресії генів *tua1*, *tua3*, *tua5* та *tua6* знижувались на початкових етапах стрес-індукованої відповіді з подальшим їх підвищенням. У свою чергу, для генів *tua2* та *tua4* у тій чи іншій мірі характерним було стабільне в часі підвищення рівнів експресії цих генів під впливом УФ-В (рис. 10, 11). При голодуванні, осмотичному та сольовому стресах спостерігали незначне посилення експресії генів *tua2* і *tua3* та суттєве підвищення експресії гена *tua1*. При цьому в умовах метаболічного стресу рівні експресії інших генів тубуліну (*tua4*, *tua5* та *tua6*) залишалися в межах контролю. Слід зазначити, що в цілому гени *tua5* та *tua6* демонстрували сталий рівень експресії та низьку чутливість до впливу досліджуваних стресових чинників. Було виявлено

достовірно підвищення рівнів експресії генів *tua1* та *tua3* за умов сольового стресу та гену *tua4* за умов осмотичного стресу (рис. 10, 11).

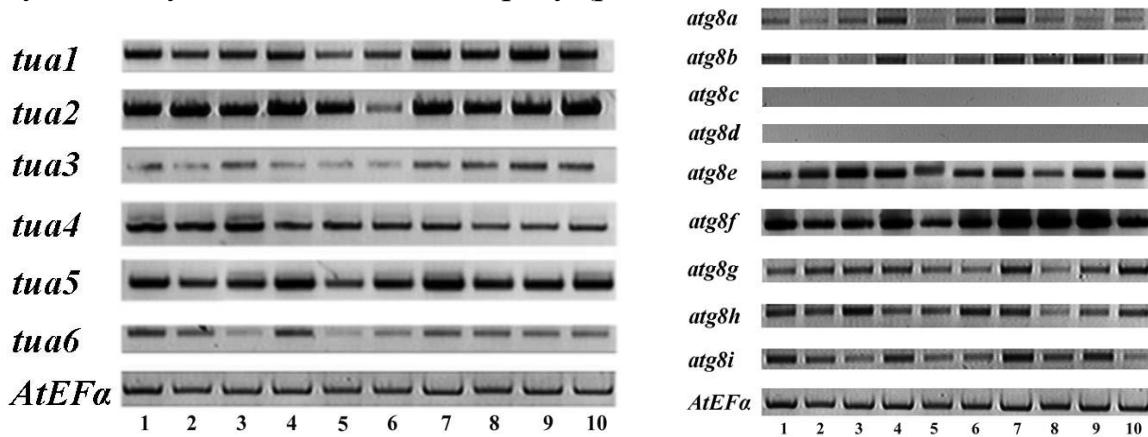


Рис. 10. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів α -тубуліну та *atg8*. 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 5-7 - УФ-В у дозі 84 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 8 – осмотичний стрес, 9 – голодування, 10 – сольовий стрес.

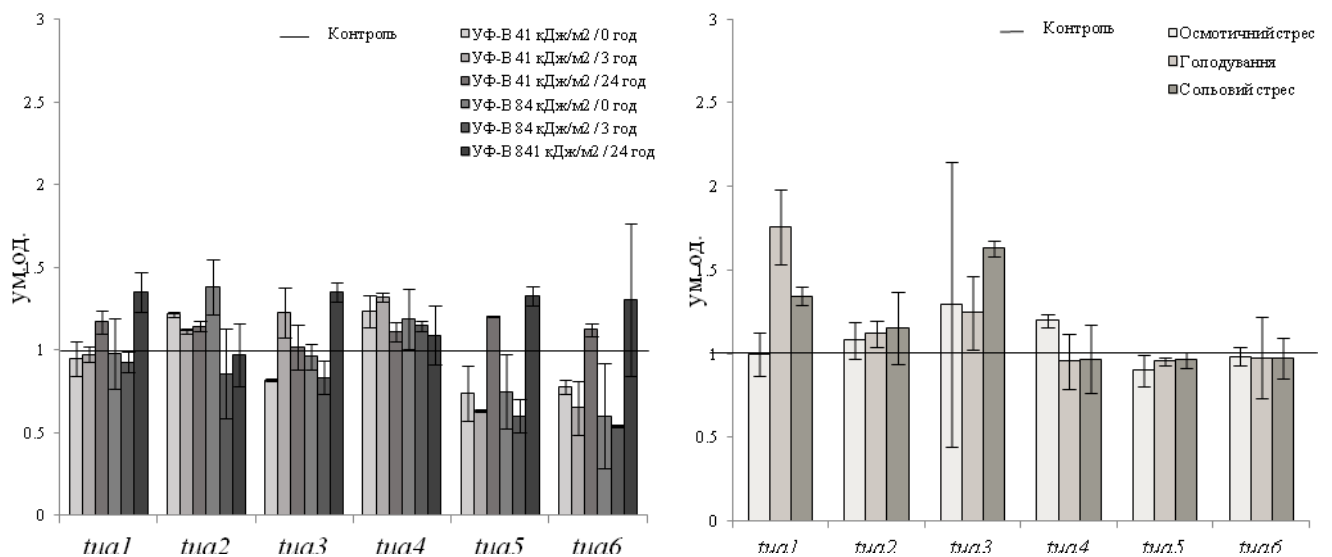


Рис. 11. Транскрипційні профілі експресії різних генів α -тубуліну у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²), та при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

В результаті дослідження рівнів експресії генів *atg8* після опромінення УФ-В в обох дозах було встановлено, що рівні експресії окремих генів *atg8* підвищуються за цих умов дію стресу (рис. 10, 12). Зокрема, рівні експресії генів *atg8a* та *atg8e* зростали майже на усіх часових проміжках дослідження. Аналогічні зміни транскрипційної активності окремих генів *atg8* також спостерігались і за умов голодування, осмотичного та сольового стресів, хоча активність частини генів пригнічувалась в залежності від стресових умов (рис. 12). Зокрема, рівні експресії *atg8e* та *atg8f* зростали під впливом усіх досліджуваних чинників. Посилення експресії гена *atg8e* в умовах голодування було найбільш вираженим у порівнянні з осмотичним та сольовим стресами. Важливо відзначити, що експресії генів *atg8c* та *atg8d* виявлено не було, або рівень експресії було неможливо задетектувати.

Узагальнюючи результати транскрипційного аналізу генів α -тубуліну та білка *atg8* у проростках *A. thaliana*, зокрема, виявлену коекспресію генів *tub4* і *atg8a*, *atg8e* при опроміненні УФ-В, генів *tua1* і *atg8e* при голодуванні, *tua3* і *atg8f* при сольовому та *tua3* і *atg8f*, *atg8e* при осмотичному стресах, можна розглядати їх як свідчення залучення відповідних пар білків до розвитку аутофагії, індукованої досліджуваними абіотичними стресовими чинниками.

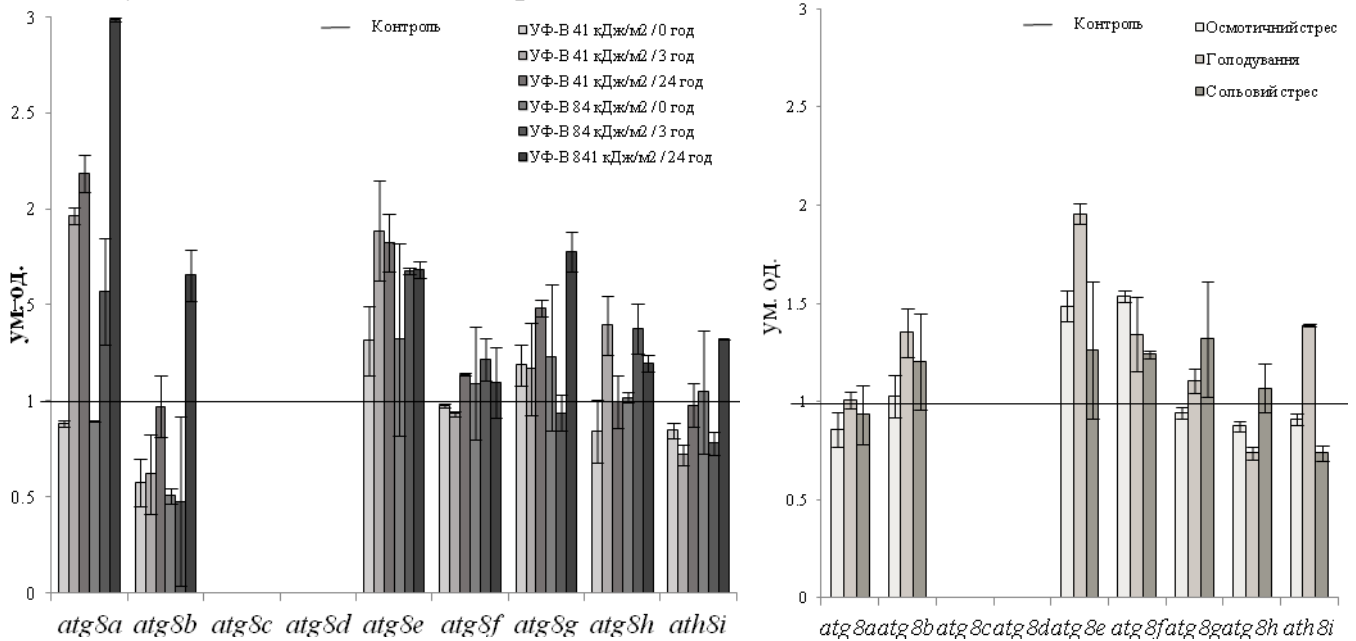


Рис. 12. Транскрипційні профілі експресії генів ізотипів *atg8* у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²) та при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Зміни рівнів експресії генів гексокіназ та генів, залучених до ацетилювання/деацетилювання α -тубуліну, при індукції аутофагії стресовими факторами. На наступному етапі роботи було проведено аналіз рівнів експресії гену ацетилтрансферази *elp3* та генів деацетилаз *hda14* і *hda6*, продукти яких регулюють рівні ацетилювання α -тубуліну (рис. 13, 14). При опроміненні проростків *A. thaliana* рівні експресії гена *hda6* суттєво змінювались впродовж усіх часових проміжків дослідження порівняно як з контролем, так і з аналогічним показником для *hda14*, транскрипційний профіль якого майже не змінювався. Важливо відзначити, що продукт гена *hda6* також опосередковує злиття аутофагосоми з лізосоною у тваринній клітині (Lee et al., 2010), тому підвищені рівні його експресії можуть свідчити про розвиток аутофагії після опромінення УФ-В.

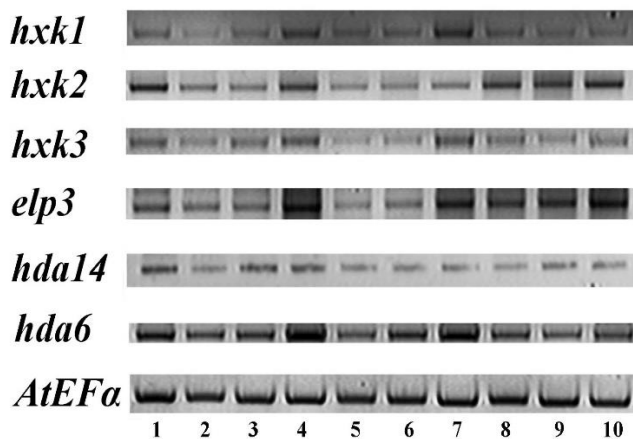


Рис. 13. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів гексокіназ (*hmk1*, *hmk2*, *hmk3*), *elp3* та деацетилаз (*hda14*, *hda6*). 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 5-7 - УФ-В у дозі 84 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 8 – осмотичний стрес, 9 – голодування, 10 – сольовий стрес.

При дослідженні впливу голодування, осмотичного та сольового стресів на клітини проростків *A. thaliana* було виявлено однозначне підвищення рівнів експресії гена *hda6* внаслідок дії усіх досліджуваних чинників. Слід зазначити, що рівні експресії гена *hda14* також були залежними від стресів, а саме, відбувалось посилення його експресії за умов осмотичного стресу та голодування на відміну від сольового стресу, коли ці показники знижувались. При оцінці рівнів експресії гена *elp3* за умов впливу усіх стресових чинників було показано суттєве їх підвищення через 24 год після опромінення УФ-В у обох дозах. Ці дані свідчать на користь участі ацетилювання тубуліну в реалізації аутофагії.

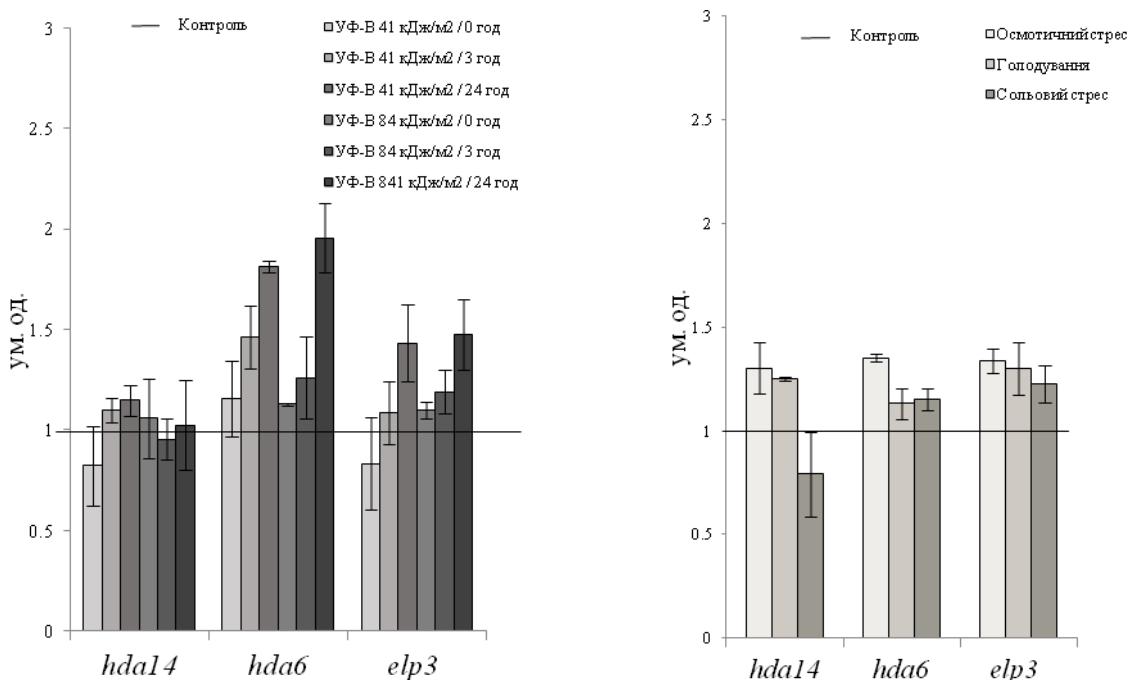


Рис. 14. Транскрипційні профілі експресії генів гістондеацетилаз (*hda14*, *hda6*) та *elp3* у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²), та при голодуванні, осмотичному і сольовому стресах.

Слід зазначити, що нами було також виявлено підвищення транскрипційної активності *hxc1*, *hxc3* при опроміненні УФ-В; *hxc1* при голодуванні; та *hxc2* при осмотичному та сольовому стресах, що ілюструє часові проміжки реалізації аутофагії та переходу до ПКЗ (рис. 15) за умов впливу різних стресових чинників.

Зміни рівнів експресії генів кінезинів при індукції аутофагії досліджуваними стресовими факторами. Одним з ключових елементів для реалізації аутофагії в клітинах тварин є кінезин-1 (Geeraert et al., 2010). У геномі арабідопису виявлено 61 ген кінезинів (Li et al., 2012), проте їх функції у реалізації аутофагії у рослин ще не вивчались. Нами встановлено, що при опроміненні УФ-В у дозі 41 кДж/м² експресія майже усіх генів досліджуваних гомологів кінезину-1 у тій чи іншій мірі пригнічувалась одразу після опромінення, а рівні експресії генів *KIN70*, *KIN12A* та *KIN12D* знаходились на рівні контролю (рис. 16 та 17). Через 3 год після опромінення рівні експресії кінезинів змінювались досить суттєво, однак через 24 год після початку дії УФ-В рівні експресії більшості генів суттєво підвищувались (*KIN5B*, *KIN70*, *KIN7D*, *KIN12B*, *KIN12F*), особливо це стосувалось генів *KIN5B* та *KIN12F*.

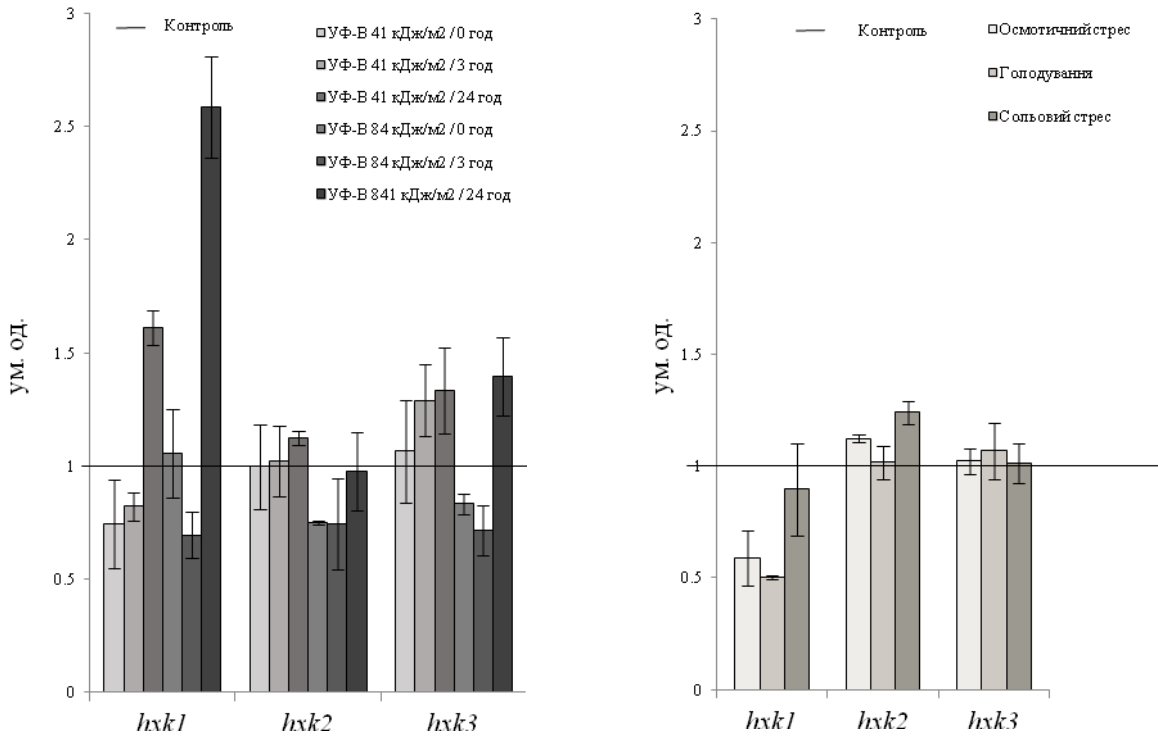


Рис. 15. Транскрипційні профілі експресії генів гексокіназ 1, 2 та 3 у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²), та при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Результати транскрипційного аналізу генів кінезинів - гомологів кінезину-1 людини – на проростках *A.thaliana*, що вирощувалися в умовах голодування, сольового та осмотичного стресів, свідчать про те, що сольовий стрес викликав підвищення рівнів експресії генів *KIN6*, *KIN70*, *KIN7D*, *KIN12B* та пригнічення експресії гена *KIN5B* (рис. 6.18). У випадку метаболічного стресу активність майже усіх генів пригнічувалась, окрім гена *KIN6*, експресія якого залишалась у межах контролю. За умов сольового стресу на 7-у добу культивування спостерігали пригнічення експресії генів *KIN5B*, *KIN7D*, *KIN12A*, *KIN12F*, в той час як для генів *KIN6* та *KIN12B* рівні експресії суттєво підвищувались. Таким чином, отримані дані дозволяють виокремити кінезини, специфічні для реалізації аутофагії. Опосередковано вони також свідчать про участь кінезинів у забезпеченні перебігу цього адаптивного механізму у рослин.

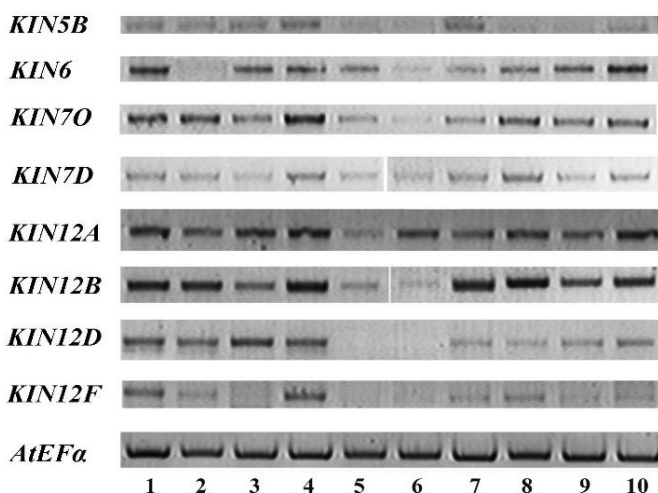


Рис. 16. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів кінезинів. 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 5-7 - УФ-В у дозі 84 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 8 – осмотичний стрес, 9 – голодування, 10 – сольовий стрес.

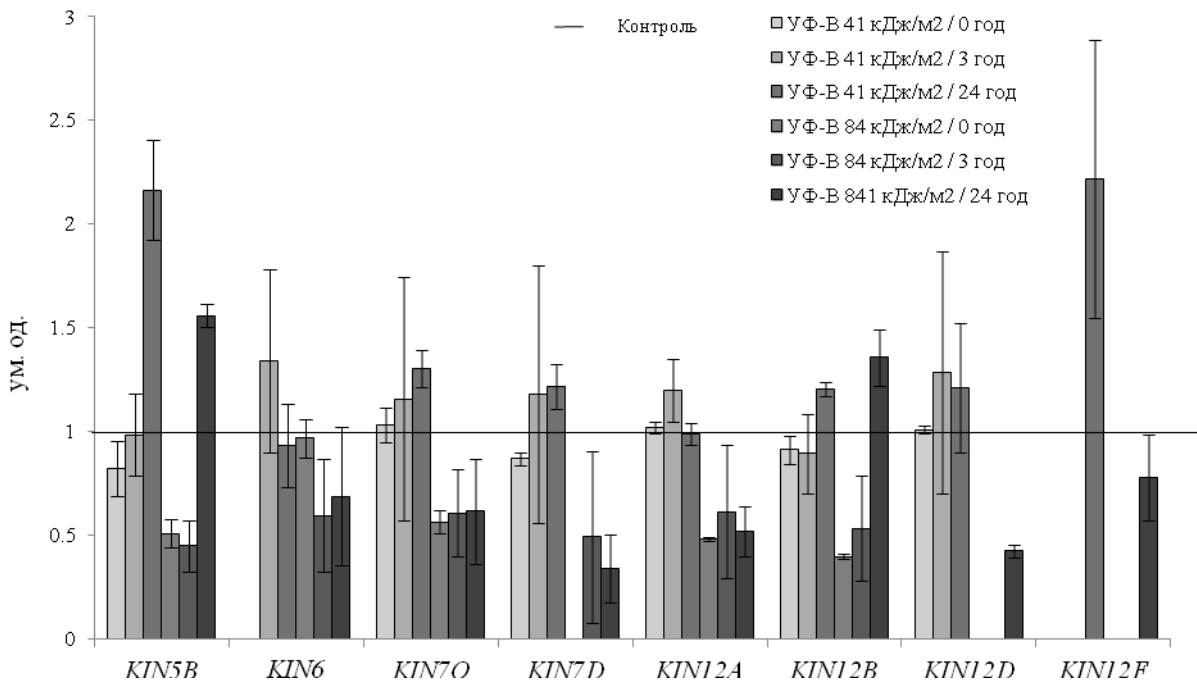


Рис. 17. Транскрипційні профілі експресії генів кінезинів, гомологів кінезину-1 людини, у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²).

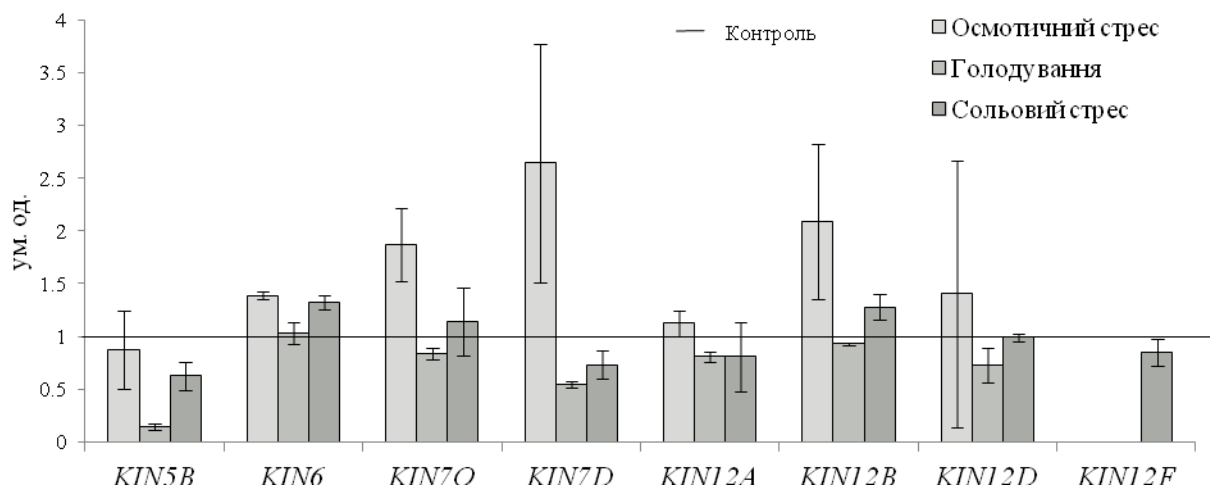


Рис. 18. Транскрипційні профілі експресії генів кінезинів, гомологів кінезину-1 людини при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Гіперацетилювання α -тубуліну у відповідь на стрес є тканинспецифічною адаптивною реакцією. Для дослідження тканинспецифічності ацетилювання α -тубуліну був проведений імуногістохімічний аналіз цієї модифікації у проростках *A. thaliana*, що зазнавали впливу абіотичних стресів. Було показано підвищення рівня модифікованого білку у тій чи іншій мірі при дії усіх досліджуваних стресів. Слід зазначити, що дана модифікація мала яскраво виражений тканинспецифічний характер. Зокрема, корені рослин виявили вищу чутливість до дії стресових чинників у порівнянні з листям (рис. 19, рис. 20). Так, було виявлено, що за стресових умов найбільш виражена відповідь у вигляді тканинспецифічного гіперацетилювання тубуліну відбувається у коренях проростків *A. thaliana*, а саме, в зонах кореневого чохла, епідермісу та перициклу.

Можна припустити, що розвиток аутофагії у клітинах кореневого чохла є наслідком впливу не тільки абіотичних факторів, але і механічного стресу, обумовленого проростанням кореня у живильне середовище.

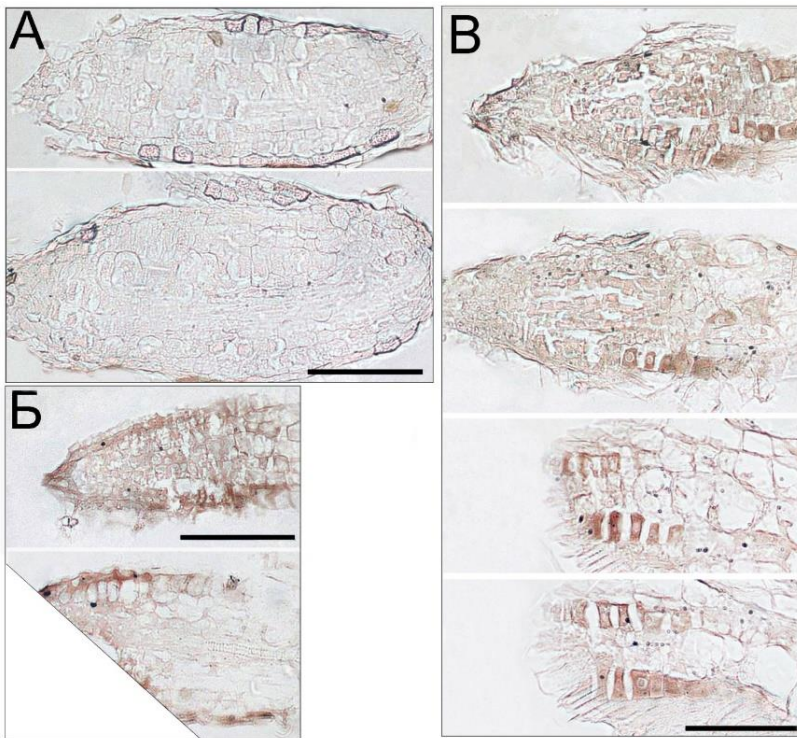


Рис. 19. Імуногістохімічне дослідження ацетильованого α -тубуліну (фарбування 3,3'-діамінобензидином, DAB) у корнях проростків *A. thaliana*. А – контроль; Б – голодування; В – опромінення УФ-В. Бар – 100 мкм.

Незначне підвищення рівнів ацетилювання α -тубуліну у листках рослин під впливом абіотичних стресів може бути результатом як низької чутливості диференційованих клітин листків до дії зазначених факторів, так і результатом анатомічних особливостей рослин, оскільки клітини кореня зазнаватимуть умов голодування, осмотичного та сольового стресів раніше за клітини листків.

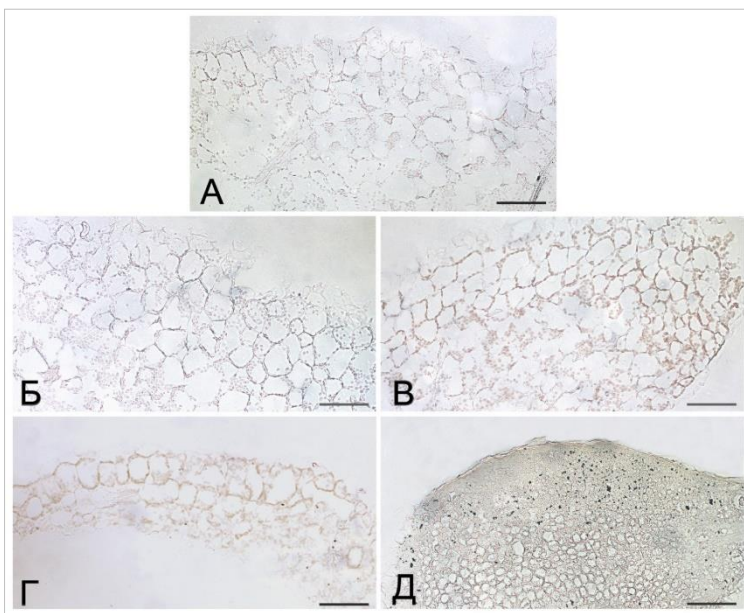


Рис. 20. Імуногістохімічний аналіз ацетильованого α -тубуліну (фарбування DAB) у листі проростків *A. thaliana*. А – контроль, Б – опромінення УФ-В, В – голодування, Г – осмотичний стрес, Д – соловий стрес. Бар – 100 мкм.

Важливо зазначити, що молоді клітини, що діляться, демонстрували найвищу чутливість до впливу абіотичних стресів, що проявлялось у гіперацетилюванні α -тубуліну у меристематичних клітинах та клітинах молодих тканин, відтак, і перебігу в них процесу стрес-індукованої аутофагії. Паралельні зрізи зародкових бруньок

проростків, що зазнавали стресу, демонстрували тканинспецифічність зазначеної модифікації (рис. 21).

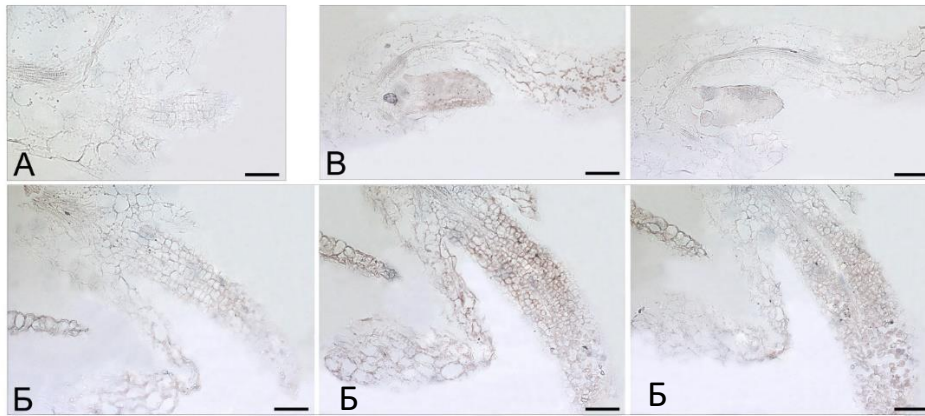


Рис. 21. Імуногістохімічний аналіз (DAB) ацетильованого α -тубуліну у в клітинах зародкових бруньок проростків *A. thaliana*. А – контроль, Б – опромінення УФ-В, В - осмотичний стрес. Бар – 100 мкм.

Слід зазначити, що така особливість була характерною для усіх стресових чинників, проте, найбільш виражено проявлялася при опроміненні ультрафіолетом-В (рис. 22).

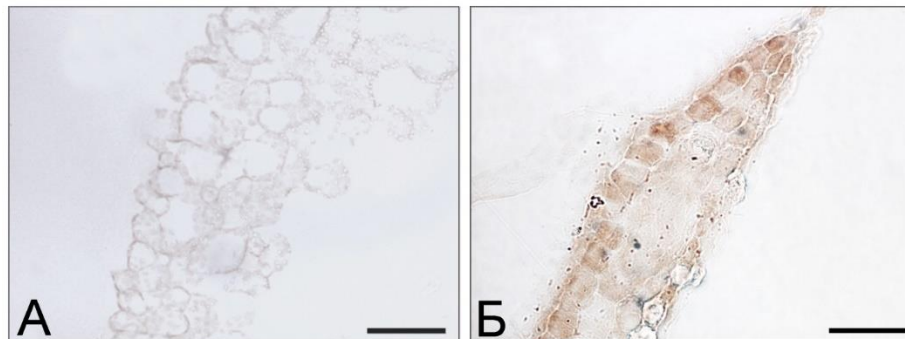


Рис. 22. Імуногістохімічний аналіз (DAB) ацетильованого α -тубуліну у клітинах молодих листків проростків *A. thaliana*. А – контроль; Б – опромінення УФ-В. Бар – 50 мкм.

Таким чином, за допомогою імуногістохімічного аналізу ацетилювання α -тубуліну в різних тканинах проростків *A. thaliana* нами було показано, що дана модифікація має тканинспецифічний характер. Зокрема, під впливом досліджуваних стресових факторів вона найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореневому чохлаку, епідермісі та перициклі). Отримані результати слугують ще одним підтвердженням залучення ацетилювання α -тубуліну у реалізацію механізмів аутофагії у рослин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено функціональний взаємозв'язок ацетилювання α -тубуліну проростків *Arabidopsis thaliana* з розвитком аутофагії, індукованої абіотичними стресами (голодування, осмотичний/сольовий стрес, ультрафіолет В). На транскрипційному рівні охарактеризовано закономірності експресії генів α -тубуліну, білка *atg8* і генів ензимів, залучених до ацетилювання α -

тубуліну, а також генів моторних білків кінезинів, які можуть бути залучені до опосередкування процесів аутофагії за участю мікротрубочок при зазначених стресових станах в клітинах *A. thaliana*.

1. Встановлено, що такі абіотичні стресові фактори, як голодування, осмотичний/сольовий стрес та ультрафіолет В, пригнічуючи ріст та розвиток проростків *A. thaliana* за умов інгібування аутофагії у присутності інгібітора цистеїнових протеаз E-64 призводять до більш значимого пригнічення росту коренів, у порівнянні з рослинами, що не оброблялись E-64, що вказує на адаптивну роль аутофагії у відповіді рослин на дію досліджуваних стресових чинників.

2. Виявлено, що на морфологічному рівні розвиток стрес-індукованої аутофагії у проростках *A. thaliana* характеризується появою аутофагосом розміром 1-20 мкм (у кількості від 1 до декількох на клітину), ацидифікацією цитоплазми, зниженням виживаності клітин та підвищенням кількості клітин, для яких характерна апоптична морфологія ядра. При голодуванні, сольовому та осмотичному стресах розвиток аутофагії був характерний для клітин кореневого чохла, епідермісу та перициклу та клітин провідної системи кореня. Опромінення УФ-В викликало масовий розвиток аутофагії як у коренях, так і наземних тканинах *A. thaliana*, зокрема, у гіпокотиллях.

3. Встановлено, що інгібування аутофагії, індукованої досліджуваними абіотичними факторами, викликає підвищення кількості клітин у стані програмованої клітинної загибелі, зростаючи з 18-21% до 21-26% за умов осмотичного, метаболічного та сольового стресів та з 9% до 16% при опроміненні УФ-В.

4. Продемонстровано суттєве підвищення рівня ацетильованого α -тубуліну та процесованого білка Atg8 в процесі розвитку аутофагії, індукованої різними стресовими чинниками, що свідчить про залучення ацетилювання α -тубуліну до реалізації клітинних механізмів цього явища.

5. Проведено структурно-біологічну оцінку взаємодії ацетильованого α -тубуліну і білка Atg8 та показано, що ацетилювання α -тубуліну забезпечує більш міцну взаємодію зазначених білків шляхом зміни заряду і гнучкості залишків α -тубуліну у сайті зв'язування обох молекул. З огляду на те, що ацетильований α -тубулін є характерною ознакою стабільних мікротрубочок, отримані результати опосередковано підтверджують участь мікротрубочок в реалізації транспорту зрілих аутофагосом у ході розвитку стрес-індукованої аутофагії.

6. Отримано профілі експресії генів α -тубулінів, білка *atg8*, кінезинів, гексокіназ та генів ензимів, залучених до ацетилювання/деацетилювання α -тубуліну в процесі розвитку стрес-індукованої аутофагії. Виявлено коекспресію та підвищення транскрипційної активності генів *tub4* і *atg8a*, *atg8e* при опроміненні УФ-В, генів *tua1* і *atg8e* при голодуванні, *tua3* і *atg8f* при сольовому та *tua3* і *atg8f*, *atg8e* при осмотичному стресах, що свідчить на користь залучення специфічних пар білків-продуктів зазначених генів для розвитку аутофагії, індукованої абіотичними стресовими чинниками.

7. Показано зміни транскрипційної активності генів ацетилтрансферази *elp3* та деацетилази *hda14* і *hda6* і гексокіназ у відповідь на дію досліджуваних стресових чинників, що знову ж таки свідчить про важливість ацетилювання α -тубуліну для забезпечення процесів перебігу аутофагії - етапу, який може передувати розвитку програмованої клітинної загибелі. Продемонстровано суттєве підвищення транскрипційної активності генів кінезинів *KIN5B*, *KIN12B*, *KIN12F* після

опромінення УФ-В, генів кінезинів *KIN6*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B* при осмотичному та генів кінезинів *KIN6* і *KIN12B* при сольовому стресах, що вказує на специфічність залучення продуктів зазначених генів у реалізацію адаптивної відповіді клітин рослин на дію абіотичних стресових факторів.

8. За допомогою імуногістохімічного аналізу встановлено, що гіперацетилювання α -тубуліну у відповідь на вплив досліджуваних абіотичних стресів найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореновому чохлаку, епідермісі та перициклі).

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Литвин Д.І., Федина В.Д., Блюм Я.Б. Ацетилювання α -тубуліну впливає на зміни білкового мікрооточення мікротрубочок при розвитку аутофагії в клітинах тютюну. Збірник наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. 2015, Том 17, С. 65-69. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

2. Федина В.Д., Литвин Д.І., Блюм Я.Б. З'ясування ролі мікротрубочок у розвитку аутофагії у рослин, спричиненої дією абіотичних стресів. Збірник наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. 2016, Том 19, С. 47-50. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

3. Федина В., Литвин Д., Емец А., Блюм Я.Б. Реализация индуцированной стрессовыми факторами аутофагии у растений с участием микротрубочек. Мол. прикл. генетика (Минск), 2017, Том 22, С. 52-61. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

4. Olenieva V., Lytvyn D., Yemets A., Bergounioux C., Blume Ya. Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. Cell Biol. Intl., 2017, doi: 10.1002/cbin.10843. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

5. Оленєва В.Д., Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вплив УФ-В на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Доп. НАН України, 2018, №1, С. 100-109. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

6. Оленєва В.Д., Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Вплив голодування, осмотичного та сольового стресів на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Вісник укр. генетиків та селекціонерів, 2018, Том 15, № 2, С.174–80. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

7. Литвин Д.И., Оленева В.Д., Емец А.И., Блюм Я.Б. Гистохимический анализ тканеспецифического ацетилирования α -тубулина как ответной реакции на индукцию аутофагии у *Arabidopsis thaliana* различными стрессовыми факторами. Cytol. Genetics, 2018, vol. 52, №4, P. 245-252. *(Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

8. Оленева В.Д., Литвин Д.И., Блюм Я.Б. Экспрессия кинезинов, вовлеченных в развитие аутофагии у *Arabidopsis thaliana*, и вклад ацетилирования тубулина во взаимодействие белка Atg8 с микротрубочками. Збірник наукових праць “Фактори

експериментальної еволюції організмів”, 2018, Том 23, С.162-168. (Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

9. **Федина В.Д.**, Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Функціональна роль ацетилювання α -тубуліну у реалізації аутофагії, індукованої абіотичними стресовими чинниками. Укр. біохім. журн., 2016, Том 88, №4, С. 88.

10. **Fedyna V.**, Lytvyn D., Yemets A.I., Blume Ya.B. The role of microtubular cytoskeleton in realization of stress-induced autophagy in plants // Proceedings of International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology (2-6 жовтня 2016, Одеса, Україна), С. 7.

11. **Fedyna V.**, Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Ya.B. α -Tubulin acetylation as a key modification for plant autophagy development // Proceedings of ASCB Annual Meeting (December 3-7, 2016, San Francisco, California, USA).

12. Lytvyn D., **Olenieva V.**, Blume Ya.B. Acetylation of α -tubulin mediates stress-induced autophagy in *Arabidopsis*. IV Міжнародна конференція “Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти” (4–6 жовтня 2017, Львів, Україна), с. 69-70.

13. **Fedyna V.**, Lytvyn D., Blume Y. α -Tubulin acetylation is essential for autophagy development induced by different abiotic factors: transcriptome and biochemical study. Proceedings of Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress (26-30 червня 2016, Прага, Чехія).

14. **Olenieva V.**, Lytvyn D, Blume Ya. Acetylation of α -tubulin as a crucial modification for autophagy development induced by abiotic stimuli. Молодіжна конференція «Біологія рослин та біотехнологія» (16-18 травня 2017, Київ), С. 36.

15. **Olenieva V.**, Lytvyn D., Yemets A.I., Blume Ya.B. α -Tubulin acetylation and stress-induced autophagy development in *Arabidopsis thaliana*: kinesin recruiting and easing microtubule interaction with autophagosomes. Proc. Plant Biol. Europe EPSO/FESPB 2018 Congress (18-21 червня 2018, Копенгаген, Данія), <https://eventmobi.com/pbe2018/documents/21781073-e22b-4f1c-8034-38010e7927bc>.

16. **Olenieva V.**, Yemets A.I., Blume Ya.B. Crucial role of α -tubulin acetylation under stress-induced autophagy in *Arabidopsis thaliana*: kinesin recruiting and easing microtubule interaction with autophagosomes. 2018 ASCB/EMBO Meeting (December 8-12, 2018, San Diego, CA, USA).

АНОТАЦІЯ

Оленєва В. Д. Функціональна роль ацетилювання α -тубуліну при розвитку стрес-індукованої аутофагії у *Arabidopsis thaliana*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2019.

Досліджено роль ацетилювання α -тубуліну при реалізації аутофагії у клітинах *A. thaliana*, індукованої стресовими факторами абіотичної природи (голодування, осмотичний і сольовий стреси, ультрафіолет В). На морфологічному, транскрипційному та біохімічному рівнях показано розвиток аутофагії у відповідь на дію цих чинників. Встановлено, що інгібування стрес-індукованої аутофагії

викликає підвищення кількості клітин у стані програмованої клітинної загибелі, що ілюструє роль аутофагії як адаптивного механізму. Продемонстровано суттєве підвищення рівнів ацетилюваного α -тубуліну під впливом абіотичних стресових факторів, а також показано, що ацетилювання α -тубуліну забезпечує більш міцну його взаємодію тубуліну з білком аутофагії Atg8, що підтверджує функціональну роль мікротрубочок у реалізації аутофагії. Встановлені закономірності впливу стресових чинників на експресію генів α -тубуліну та білка *atg8* і генів ферментів, залучених до ацетилювання тубуліну (ацетилтрансфераза *elp3* та деацетилази *hda14* і *hda6*). Виокремлено рослинні кінезини, вірогідно залучені до розвитку аутофагії та проаналізовано закономірності їх експресії під впливом досліджуваних абіотичних факторів. Встановлено тканинспецифічний характер ацетилювання α -тубуліну як модифікації, котра у відповідь на вплив абіотичних стресів найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореневому чохлаку, епідермісі та перициклі).

Ключові слова: α -тубулін, ацетилювання, аутофагія, *A. thaliana*, абіотичні стреси, опромінення УФ-В, голодування, сольовий стрес, осмотичний стрес, програмована клітинна загибель, профілі експресії гену.

АННОТАЦІЯ

Оленева В. Д. Функціональна роль ацетилювання α -тубуліна при розвитку стресс-індуцированої аутофагії у *Arabidopsis thaliana*. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукописи.

Дисертація на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2019.

Проведено дослідження ролі ацетилювання α -тубуліна при реалізації стресс-індуцированої аутофагії в клітках *A. thaliana*. На морфологічному, транскрипційному і біохімічному рівнях показано розвиток аутофагії в відповідь на дію абіотичного стресу. Виявлено, що інгібування стресс-індуцированої аутофагії викликає збільшення кількості кліток в стані програмуваної клітинної загибелі, що ілюструє роль аутофагії як адаптивного механізму. Продемонстровано суттєве підвищення рівня ацетилюваного α -тубуліна під впливом абіотичних стресових факторів, а також показано, що ацетилювання α -тубуліна забезпечує більш міцне і стійке взаємодія тубуліна з білком аутофагії Atg8, що підтверджує функціональну роль мікротрубочок у реалізації аутофагії. Виявлені закономірності впливу стресових факторів на експресію генів α -тубуліна та білка *atg8*, а також генів ферментів, залучених до ацетилювання тубуліна (ацетилтрансфераза *elp3* і деацетилази *hda14* і *hda6*). Виявлені рослинні кінезини, вірогідно залучені до розвитку аутофагії та проаналізовано закономірності їх експресії під впливом досліджуваних абіотичних факторів. Продемонстровано тканинспецифічний характер ацетилювання α -тубуліна як модифікації, котра в відповідь на дію абіотичних стресів найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореневому чохлаку, епідермісі та перициклі).

выражено проявляется в молодых и меристематических тканях, а также в тканях корней (корневом чехлике, эпидермисе и перицикле).

Ключевые слова: α -тубулин, ацетилирование, аутофагия, *A. thaliana*, абиотические стрессы, облучение УФ-В, голодание, солевой стресс, осмотический стресс, программируемая клеточная гибель, профили экспрессии гена.

SUMMARY

Olenieva V.D. The functional role of α -tubulin acetylation in the development of stress-induced autophagy in *Arabidopsis thaliana*. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The role of post-translational acetylation of α -tubulin in the realization of stress-induced autophagy in *A. thaliana* cells was investigated. It was shown on the morphological, transcriptional and biochemical levels, that the development of autophagy is induced as a response to abiotic stress influence. It was found that an inhibition of stress-induced autophagy causes an intensification of programmed cell death development, which illustrates the role of autophagy as an adaptive mechanism. A significant increase in the level of acetylated α -tubulin was detected under the influence of abiotic stress. Moreover, it was shown that acetylation of α -tubulin provides a stronger interaction of tubulin with Atg8, an autophagy protein, which altogether confirms the functional role of microtubules in the realization of stress-induced autophagy. The regularities of the influence of stress factors on the expression of α -tubulin genes and the *atg8*, as well as on the enzymes involved in the acetylation of the tubulin (acetyltransferase *elp3*, deacetylases *hda14* and *hda6*) have been established. The plant kinesins that are likely to be specific for the realization of stress-induced autophagy have been identified and the patterns of their expression under the influence of the abiotic factors were analyzed. Stress-induced α -tubulin acetylation was shown as a tissue-specific modification, which is most pronounced in young and meristic tissues, as well as in root tissues (root cap, epidermis and pericycles).

Key words: α -tubulin, acetylation, autophagy, *A. thaliana*, abiotic stress, UV-B irradiation, starvation, salt stress, osmotic stress, programmed cell death, gene expression.