

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ОЛЕНЄВА ВІРА ДМИТРІВНА

УДК 581.17 + 57.022+ 57.017.3 + 57.042

ДИСЕРТАЦІЯ

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

Спеціальність 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія
09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 В.Д. Оленєва

Науковий керівник доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович

Київ – 2019

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 (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (09-біологія). – ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України”, Київ, 2018.

Засолення ґрунтів, посуха, метаболічний стрес та збільшення частки випромінювання ультрафіолету В знаходяться серед основних лімітуючих факторів життєдіяльності рослинних організмів. У якості адаптивної відповіді на дію стресів, рослини розвинули низку захисних внутрішньоклітинних механізмів, таких як контроль темпів росту, за рахунок регуляції синтезу білків та поділу клітин, а також зміни транскрипційної активності генів білків, залучених до реалізації специфічної адаптивної відповіді. До таких загальних захисних механізмів, характерних для усіх еукаріот, відноситься процес аутофагії. Даний процес передбачає формування двомембранних органел, аутофагосом, що доставляють цитоплазматичні компоненти до літичних вакуолей. Такий механізм передбачає деградацію пошкоджених білків та органел, а також забезпечення енергетичних та біосинтетичних потреб клітин, особливо у стресових умовах. Відомо, що індукція і реалізація процесів аутофагії у тварин залежить від функціонального стану цитоскелету, зокрема, потребує стабілізації МТ шляхом пост-трансляційного ацетилювання α -тубуліну.

У дисертаційній роботі проведено дослідження, в результаті якого було встановлено роль ацетилювання α -тубуліну, як функціональної пост-трансляційної модифікації при реалізації стрес-індукованої аутофагії у *Arabidopsis thaliana*.

Було проаналізовано вплив абіотичних стресів на ріст та розвиток проростків *A.thaliana*, та виявлено достовірне зниження показників довжин коренів за умов дії усіх стресових чинників. В той час, як пригнічення росту 7-денних рослин при опроміненні УФ-В, а також, метаболічному і осмотичному стресах сягало 15% та 23-25%, відповідно, додавання 150 мМ NaCl до живильного середовища викликало зниження зазначеного показнику майже на 60%, у порівнянні з контрольними рослинами. Синергічна дія кожного зі стресових чинників та інгібування аутофагії призводила до ще більшого зниження показників росту, у порівнянні з рослинами, що не зазнавали передобробки E-64, інгібітору цистеїнових протеаз. Зокрема, інгібування аутофагії в умовах голодування за сахарозою та осмотичного стресу викликало зниження середнього показнику довжин коренів на 33-35%, у порівнянні з контрольними рослинами. Отримані результати ілюструють негативний вплив пригнічення процесів аутофагії на виживаність та розвиток рослин в умовах стресу. Синергічна дія E-64 та сольового стресу призводила до зниження вище зазначеного показнику ще на 14%, а опромінення УФ-В, відповідно, на 31%. На фенотиповому рівні показано роль аутофагії, як захисного та адаптивного механізму рослин у відповідь на дію стресових чинників.

Було проведено дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії на морфологічному рівні, методами флюоресцентної та конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Виявлено характерні ознаки розвитку аутофагії під впливом усіх досліджуваних абіотичних факторів. Зокрема, в умовах стресу в клітинах рослин спостерігали появу монодансилкадаверин (MDC)-забарвлених структур, розміром 1-30 мкм, у кількості від 1 до декількох на клітину. Використовуючи створену нами трансгенну лінію *Arabidopsis thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-eGFP, було показано чітку колокалізацію зосереджених сигналів від Atg8h-GFP та флюоресцентного барвнику монодансилкадаверину, що вважається загальноприйнятим маркером аутофагосом. Характерною ознакою перебігу процесів аутофагії в

клітинах, що зазнавали впливу стресів, також було підвищення рівню ацидифікації цитоплазми, що досліджували з використанням флуоресцентного барвника акридину оранжевого (АО). При чому, за умов передобробки інгібітором аутофагії, спостерігали ще більш інтенсивне закислення цитоплазми. Даний факт є результатом інгібування аутофагії на етапі деградації вмісту аутолізосом, що призводить до накопичення структур з кислим рН у цитозолі. Для аналізу показників виживаності клітин в умовах стресу, використовували флуоресцентні барвники пропідіум йодид (PI) та флуоресцеїн діацетат (FDA). Слід зазначити, що за умов дії усіх досліджуваних стресових чинників, клітини виявляли досить високі показники виживаності, що суттєво знижувалися за умов синергічної дії стресу та E-64. Важливо відмітити, що наслідком такого синергічного впливу було підвищення кількості клітин, що мали апоптичну морфологію ядра. Отримані результати підтверджують роль аутофагії як захисного механізму рослин у стресових умовах.

Використовуючи трансгенну лінію *Arabidopsis thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-eGFP, було продемонстровано дифузну локалізацію сигналу від Atg8h-eGFP у контрольних рослин. На противагу цьому, для проростків, що зазнавали впливу абіотичних стресів, було характерним поява чітких, зосереджених сигналів від Atg8h-eGFP. З огляду на те, що процесинг Atg8, що відбувається безпосередньо перед вбудовуванням молекули у мембрану аутофагосоми, передбачає відрізання С-кінця разом з GFP, ми можемо зробити висновок, що дані сигнали хоча і не є власне аутофагосомами, але знаходяться у безпосередній близькості від них. Зокрема, на 7-й день культивування в умовах голодування, сольового та осмотичного стресів було показано активний розвиток аутофагії у коренях проростків, а саме, у клітинах кореневого чохла, епідермісу та перициклу, та клітинах провідної системи кореня. В той час, як аутофагія, індукована вище зазначеними стресами не поширювалася за межі кореневої системи,

опромінення УФ-В викликало масовий розвиток аутофагії, як у коренях, так і наземних тканинах, зокрема, у гіпокотиліях.

З огляду на роль аутофагії, як захисного механізму рослин, нами було проведено TUNEL-аналіз клітин *A.thaliana* для дослідження впливу абіотичних факторів на розвиток програмованої клітинної загибелі. Контрольні рослини характеризувалися невисоким рівнем розвитку програмованої клітинної загибелі (ПКЗ) – близько 6%, що вочевидь, відповідає базовому, фізіологічному рівню програмованої клітинної загибелі. У відповідь на дію абіотичних стресів, зазначений показник зростав суттєво: до 18-21% при метаболічному, сольовому та осмотичному стресах, при чому, кількість клітин у стані ПКЗ збільшувалася ще більше при синергічній дії стресу та інгібування аутофагії. У випадку опромінення проростків УФ-В, кількість TUNEL-позитивних клітин складала 9% і сягала 16% за умов попередньої обробки E-64. Наразі, характер взаємодії аутофагії та ПКЗ є незрозумілим, проте, ми можемо припустити, що ці два основоположні процеси є пов'язаними, зокрема, аутофагія може бути процесом, залученим до реалізації програмованої клітинної загибелі, або ж етапом, що передує її розвитку.

Для дослідження розвитку аутофагії на біохімічному рівні та роль ацетилювання α -тубуліну у реалізації цього катаболічного механізму, нами було проведено Вестерн-блот аналіз рівнів GFP та ацетильованого α -тубуліну. З огляду на те, що процесинг Atg8 передбачає відрізання С-кінця молекули разом з GFP, рівень вільного GFP використовували як достовірний показник активності перебігу аутофагії в клітинах. Було показано, що усі досліджувані стресові чинники обумовлювали розвиток аутофагії та суттєве підвищення рівня ацетильованого α -тубуліну у клітинах. На противагу цьому, у контрольних рослин ацетильований α -тубулін не був виявлений, або ж рівень модифікованого білку був незначний, у порівнянні з рослинами, що зазнавали дії стресових чинників. Підвищення рівня ацетильованого α -тубуліну, що корелює у часі з розвитком стрес-індукованої аутофагії, може свідчити про

участь цієї пост-трансляційної модифікації у реалізації даного адаптивного механізму, схожого до такого у клітинах тварин.

За результатами структурно-біологічної оцінки α -тубуліну та Atg8, було вперше показано, 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. Враховуючи, що внутрішньоклітинний транспорт аутофагосом та аутолізосом відбувається по стабільним мікротрубочкам, а ацетилювання α -тубуліну викликає їх стабілізацію, отримані результати опосередковано підтверджують участь мікротрубочок рослинного цитоскелету у реалізації транспорту зрілих аутофагосом і аутолізосом в процесі стрес-індукованої аутофагії.

Було проаналізовано також транскрипційну активність генів, що є залучені до реалізації стрес-індукованої аутофагії, а саме, генів α -тубулінів, ізотипів *atg8*, кінезинів, гексокіназ та генів, залучених до ацетилювання α -тубуліну. Було виявлено ко-експресію генів α -тубуліну та *atg8* під впливом різних абіотичних стресів. Дані результати ілюструють роль цитоскелету при розвитку стрес-індукованої аутофагії, та дають можливість виявити специфічні для певного стресу пари генів: а саме, гени *tua1* і *atg8e* при голодуванні; гени *tub4* і *atg8a*, *atg8e* при опроміненні УФ-В; *tua3* і *atg8f* при сольовому, та *tua3* і *atg8f*, *atg8e* при осмотичному стресах. Отримані профілі експресії генів *elp3*/деацетилаз та гексокіназ вказують на роль ацетилювання α -тубуліну як регуляторної модифікації, необхідної для реалізації аутофагії - етапу, що передує розвитку програмованої клітинної загибелі. Більш того, вперше встановлено рослинні кінезини, що вірогідно беруть участь у реалізації стрес-індукованої аутофагії. Зокрема, було показано суттєве підвищення транскрипційної активності генів *KIN5B*, *KIN12B*, *KIN12F* під впливом опромінення УФ-В, генів *KIN6*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B* при осмотичному-, та *KIN6*, *KIN12B* при сольовому стресах.

Результати імуногістохімічного аналізу ацетилювання α -тубуліну у проростках *A.thaliana* показали, що дана модифікація є тканиноспецифічною

реакцією на дію абіотичних стресів, та найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореновому чохлаку, епідермісі та перициклі).

Ключові слова: ацетилювання α -тубуліну, мікротрубочки, стрес-індукована аутофагія, голодування, осмотичний стрес, сольовий стрес, опромінення ультрафіолетом-В, *Arabidopsis thaliana*.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті:

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 // Молекулярная и прикладная генетика. – 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 // Доповіді НАН Укр. – 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 // Cytology and Genetics. – 2018. – Том 52, №4. - С.3-13. *(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).*

Тези:

1. 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
2. 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.

3. 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. San Francisco, California. - December 3-7, 2016.

4. 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.

5. 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.

6. 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, Україна. – С.36.

7. 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 // Proceedings of Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2018 Congress, 18-21 червня 2018, Копенгаген, Данія. - <https://eventmobi.com/pbe2018/documents/21781073-e22b-4f1c-8034-38010e7927bc>.

SUMMARY

Olenieva V.D. The functional role of α -tubulin acetylation in the development of stress-induced autophagy in *Arabidopsis thaliana*. – Qualifying scientific work, manuscript.

Thesis for a degree of Philosophy Doctor (Ph.D.) in Biology, specialty 03.00.11 – Cytology, cell biology, histology (09 - Biology). - “Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine”, Kyiv, 2018.

Salinity, drought, metabolic stress and UV-B irradiation are among the main factors limiting life of plants. As a response to the stress influence, plants have developed a bunch of protective intracellular mechanisms, such as control of growth rates and changes in a transcriptional activity of genes involved in the realization of a specific adaptive response. Autophagy is one of such general adaptive mechanisms, common to all eukaryotes. This process implies formation of double-membrane organelles, autophagosomes, which deliver cytoplasmic components to the lytic vacuoles. Such mechanism provides degradation of destroyed proteins and organelles and replenishment of energy and biosynthetic demands of cells, especially under stressful conditions. It is known that the induction and realization of animal autophagy depends on the functional state of the cytoskeleton, in particular, it requires stabilization of MT by post-translational acetylation of α -tubulin.

The results presented in this thesis confirm the role of acetylation of α -tubulin as a functional post-translational modification in the realization of stress-induced autophagy in *Arabidopsis thaliana*.

The analysis of the influence of abiotic stresses on the growth and development of *A. thaliana* seedlings was conducted, and a significant decrease in the roots' length was found under the conditions of all stressful stimuli. The influence of UV-B irradiation resulted in decrease of root length by 15% and by 23-25% under metabolic and osmotic stresses. It was detected that the plants were the most sensitive to the influence of salt stress, which manifested itself in the inhibition

of root growth by almost 60%. Moreover, the synergistic action of stressful stimuli and autophagy inhibition led to a further decrease in growth rates compared to plants that were not pretreated with E-64. In particular, metabolic and osmotic stresses, along with E-64 pretreatment, caused a decrease of the roots' length by 33-35% compared to control plants, which illustrates a negative effect of an autophagy inhibition on plants survival and growth under abiotic stresses. The synergistic effect of E-64 and salt stress decreased the mentioned indicator by 14%, and by 31% after UV-B irradiation. These results demonstrate the role of autophagy as a protective and adaptive plant mechanism in response to the influence of stresses at the phenotype level.

Moreover, we conducted a research on the development of stress-induced autophagy on the morphological level, using methods of fluorescence- and confocal microscopy. The typical features of autophagy development were detected under all stressful factors. In particular, the influence of stresses caused the formation of MDC-stained structures, with size range 1-30 μm . The number of structures was varying from one to several per cell. Using the transgenic *Arabidopsis thaliana* line, which stably expresses the Atg8h-eGFP fusion protein, it was showed a clear co-localization of the concentrated signals from Atg8h-GFP and monodansylcadaverine, which is considered a commonly used dye for autophagosomes. A typical feature of autophagy realization in cells, subjected to abiotic stresses, was an increase of cytoplasmic acidification. In addition, pretreatment of seedlings with an inhibitor of autophagy resulted in even more intense acidification of the cytoplasm. Since autophagy was inhibited at a stage of degradation of autolysosomes' content, it caused an accumulation of acidic structures in the cytosol. It should be noted that cells, subjected to abiotic factors, demonstrated high survival rates, which significantly decreased under synergistic action of stresses and E-64. It is important to mention that the consequence of such a synergistic effect also included the increase of the apoptotic cells number. The obtained results confirm the role of autophagy as a protective plant mechanism under stressful conditions.

Using the transgenic *A.thaliana* line that stably expresses the Atg8h-eGFP fusion protein, the diffuse localization of the Atg8h-eGFP signal in control plants was demonstrated. In contrast, seedlings that were subjected to abiotic stresses were characterized by the appearance of converging undistracted signal from Atg8h-eGFP. Albeit the GFP protein is cleaved from the Atg8 during its modification, the aforesaid *A.thaliana* line can still be used as an instrument for investigation of autophagy, in particular autophagosome formation, applying a converging undistracted signal from Atg8h-eGFP as a probable spot of autophagosome biogenesis. Overall, on the 7th cultivation day autophagy was observed in root cells as a mass cellular event under stressful pressure and was distributed in root cap, epidermal, pericycle and vascular cells. On the contrary to described above, UVB irradiation caused mass autophagy development both in root but also in above-ground tissues, especially in hypocotyls.

Taking into account the role of autophagy as a protective plant mechanism, we carried out the TUNEL analysis of *A. thaliana* cells to investigate the influence of abiotic stresses on the development of programmed cell death. Control plants were characterized by a low level of PCD - around 6% of cells, which obviously corresponds to the basic, physiological level of programmed cell death. In response to the influence of metabolic, salt and osmotic stresses, this indicator increased significantly - up to 18-21%. Moreover, the mentioned number increased even more under the synergistic action of stress and E-64. The analysis of irradiated seedlings revealed the number of TUNEL-positive cells of 9%, which reached 16% when pre-treated with E-64. Currently, the nature of autophagy and PCD interconnection is unclear, however, we can assume that these two fundamental processes are related, in particular, autophagy can be a process involved in the realization of programmed cell death, or can be a stage preceding its development.

One of the main work objectives was to investigate the involvement of α -tubulin acetylation in stress-induced plant autophagy response. For this purpose, the correlation of this modification level with the processing of Atg8 was investigated. Autophagy was examined by Western blot detection using anti-GFP antibodies,

applying the increase of ratio of free GFP to Atg8h-eGFP level as a reliable sign of autophagy development. In all stress-subjected samples the increase of free GFP level relative to Atg8h-eGFP was detected comparing with untreated ones. In turn, α -tubulin acetylation level was increased significantly only in cases of stress induction; in control plants this post-translational modification was not detected, or its level was insignificant compared to the treated ones. These discovered findings suggest the possibly similar to described in mammals role of plant α -tubulin acetylation as well as MTs in mediation of autophagy.

In addition, by means of bioinformatics, it was demonstrated that α -tubulin acetylation provides an enhanced interaction of α -tubulin and Atg8 protein by altering the charge and flexibility of the α -tubulin residues in the molecular binding site. Considering that stabilized microtubules provide an intracellular transport of autophagosomes and autolysosomes, and that α -tubulin acetylation leads to microtubules' stabilization, the obtained results indirectly confirm the role of plant microtubular cytoskeleton in the transport of mature autophagosomes and autolysosomes during stress-induced autophagy.

Transcriptome analysis of key genes involved in realization of autophagy induced by abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cells was conducted. The obtained data revealed co-expression of the α -tubulin and *atg8* genes under different abiotic stresses. We detected an overexpression of *tua1* and *atg8e* under starvation; *tub4* and *atg8a*, *atg8e* under UV-B irradiation, *tua3* and *atg8f* under osmotic-; and *tua3* and *atg8f*, *atg8e* under salt stress, which gives us an opportunity to point out these pairs of genes as specifically involved in a response to an exact stress. Expression profiles of *elp3*/deacetylases as well as hexokinases denote the crucial role of α -tubulin acetylation for autophagic response - a stage preceding the development of programmed cell death. Moreover, we have first found out plant kinesins, which are probably involved in stress-induced autophagy realization. Namely, a significant increase in the transcriptional activity of *KIN5B*, *KIN12B*, *KIN12F* genes after UV-B irradiation, *KIN6*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B* genes under osmotic-, and *KIN6*, *KIN12B* under salt stress was detected.

By means of immunohistochemical analysis of α -tubulin acetylation in *A.thaliana* seedlings, it was demonstrated that this modification has a tissue-specific character, in particular, it is most markedly manifested in young and meristematic tissues, as well as in root tissues (root cap, epidermis and pericycle cells).

Key words: α -tubulin acetylation, microtubules, stress-induced autophagy, starvation, osmotic stress, salt stress, UV-B irradiation, *Arabidopsis thaliana*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСУ АУТОФАГІЇ У КЛІТИНІ РОСЛИН.....	24
1.1. Механізм розвитку мікроаутофагії.....	24
1.2. Механізм розвитку шаперон-опосередкованої аутофагії.....	26
1.3. Механізм розвитку макроаутофагії.....	26
РОЗДІЛ 2. УЧАСТЬ РОСЛИННОГО ЦИТОСКЕЛЕТУ У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЦЕСІВ АУТОФАГІЇ.....	31
2.1. Пост-трансляційні модифікації α - та β -тубулінів.....	31
2.1.1. Тирозилування-детирозилування.....	32
2.1.2. Поліглутамінування і полігліцилування.....	32
2.1.3. Фосфорилування.....	33
2.1.4. Ацетилювання.....	34
2.2. Роль мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії.....	35
2.2.1. Сигнальна функція мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії.....	36
2.2.1. Транспортна функція мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії.....	37
РОЗДІЛ 3. АУТОФАГІЯ У РОСЛИН, ЯК АДАПТИВНИЙ ПРОЦЕС У ВІДПОВІДЬ НА ДІЮ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ.....	39
3.1. Роль аутофагії в опосередкуванні метаболічного стресу.....	39
3.2. Роль аутофагії в опосередкуванні сольового та осмотичного стресів.....	40
3.3. Роль аутофагії, як відповідь на опромінення УФ-В.....	42
РОЗДІЛ 4. ПРОГРАМОВАНА КЛІТИННА ЗАГИБЕЛЬ ЯК НАСЛІДОК ДІЇ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ У РОСЛИН.....	45

РОЗДІЛ 5. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
5.1. Отримання трансгенної лінії рослин <i>A. thaliana</i>	48
5.2. Об'єкт дослідження та моделювання стресових умов.....	49
5.3. Дослідження показників росту <i>A. thaliana</i> у стресових умовах.....	50
5.4. Флуоресцентна мікроскопія.....	51
5.5. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія.....	51
5.6. Отримання лізатів тканин та визначення концентрації білків.....	52
5.7. Електрофорез білків в денатуруючих умовах.....	52
5.8. Електроперенос білків та Вестерн-блот аналіз.....	53
5.9. TUNEL-аналіз.	54
5.10. Приготування гістологічних зрізів проростків <i>A.thaliana</i>	55
5.11. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.....	55
5.12. Імуногістохімічний аналіз α -тубуліну у зрізах проростків <i>A.thaliana</i>	59
5.13. Структурно-біологічна оцінка взаємодії α -тубуліну з Atg8a, і ацетильованого α -тубуліну з Atg8a	60
РОЗДІЛ 6. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	62
6.1. Вплив абіотичних стресових факторів на розвиток проростків <i>A.thaliana</i> . Синергічний вплив стресових факторів та інгібування аутофагії.....	62
6.2. Дослідження закономірностей розвитку аутофагії на морфологічному рівні внаслідок впливу абіотичних стресів.....	65
6.2.1. Дослідження закономірностей розвитку стрес-індукованої аутофагії з використанням флуоресцентної мікроскопії.....	65
6.2.1. Дослідження закономірностей розвитку стрес-індукованої аутофагії з використанням конфокальної лазерної скануючої мікроскопії.....	69
6.3. Інгібування аутофагії, як чинник, що ініціює розвиток стрес-індукованої програмованої клітинної загибелі клітин <i>A. thaliana</i>	72

6.4. Процесинг Atg8, як свідчення розвитку стрес-індукованої аутофагії супроводжується підвищенням рівня ацетилювання α -тубуліну.....	77
6.5. Структурно-біологічна оцінка взаємодії α -тубуліну з Atg8a, і ацетильованого α -тубуліну з Atg8a	81
6.6. Профілі експресії генів α -тубуліну, білка <i>atg8</i> , кінезинів, гексокіназ та генів ензимів, залучених до ацетилювання α -тубуліну при індукції аутофагії стресовими факторами.....	85
6.6.3. Зміни рівнів експресії генів α -тубулінів та ізотипів <i>atg8</i> при індукції аутофагії стресовими факторами.....	85
6.6.3. Зміни рівнів експресії генів гексокіназ та генів, залучених до ацетилювання α -тубуліну при індукції аутофагії стресовими факторами.....	94
6.6.3. Зміни рівнів експресії генів кінезинів при індукції аутофагії стресовими факторами.....	104
6.7. Гіперацетилювання α -тубуліну у відповідь на стрес є тканиноспецифічною адаптивною реакцією.....	109
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	118
ВИСНОВКИ.....	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

УФ-В – ультрафіолет-В

МТ – мікротрубочки

МС – живильне середовище Мурасіге-Скуга

GFP – зелений флуоресцентний білок

PI – пропідіум йодид

MDC – монодансилкадаверин

АО – акридин оранжевий

FDA – флуоресцеїн-діацетат

ВСТУП

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 деградаційний катаболічний процес, у ході якого клітинні цитоплазматичні компоненти зазнають переробки, 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 [1–7]. Однією з неканонічних функцій мікротрубочок цитоскелету 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 [2, 8-10].

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 цитоскелету мікротрубочок у 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 [8, 11]. Однією з головних регуляторних ланок розвитку аутофагії, які мають важливе значення до залучення мікротрубочок до даного процесу є функціональний стан останніх, що

безпосередньо пов'язаний з посттрансляційними модифікаціями тубуліну. Зокрема, на клітинах тварин була доведена участь посттрансляційного ацетилювання α -тубуліну у реалізації аутофагії [8], 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 зворотної 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 тканиноспецифічний 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 в 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.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСУ АУТОФАГІЇ У КЛІТИНІ РОСЛИН

Аутофагія є внутрішньоклітинним процесом деградації і рециркуляції макромолекул та органел. Механізм аутофагії є висококонсервативним процесом, характерним для усіх еукаріот. У клітинах людини порушення процесів аутофагії призводить до широкого кола нейродегенеративних розладів, захворювань серця та печінки, міопатій та старіння організму [12, 13]. Рослинна аутофагія є залученою до реалізації багатьох клітинних процесів, забезпечуючи підтримання гомеостазу, а також ріст та розвиток в процесі онтогенезу, зокрема, бере участь у процесах біогенезу вакуолей, розвитку пилку, формування і проростання насіння, руйнування хлоропластів в процесі старіння листків тощо [14, 15]. Однак, за умов впливу стресових чинників, таких як метаболічний-, сольовий- та осмотичний стреси, а також опромінення ультрафіолетом-В, відбувається додаткова індукція аутофагії для забезпечення енергетичних та біосинтетичних потреб клітини, а також для усунення пошкоджених білків та органел [12]. На сьогоднішній день виділяють три типи аутофагії: мікро-, макро- та шаперон-опосередкована аутофагія, які відрізняються особливостями механізмів розвитку та реалізації, однак, загалом виконують функцію деградації макромолекул та органел.

1.1. Механізм розвитку мікроаутофагії

Термін мікроаутофагія був вперше запропонований більш ніж 40 років тому [16] як гіпотетичний процес у клітинах тварин, що передбачає захоплення лізосомами невеличких частин цитоплазми. Протягом тривалого часу, процес мікроаутофагії був малодослідженим. Більшість знань про аутофагію в цілому було отримано при дослідженні макроаутофагії, однак,

досліди на клітинах дріжджів *Pichia pastoris* [17], а також клітинах тварин і рослин [18, 19] довели існування мікроаутофагії, як окремого типу аутофагії.

Деградація білків шляхом мікроаутофагії може бути селективним або неселективним процесом [20]. Протягом неселективної деградації, частини цитозолу захоплюються вакуолярною мембраною, шляхом формування трубчастої інвагінації, з якої надалі до люмену відщеплюються пухирці, що містять невеличкі частини цитозолу. Натомість, селективна мікроаутофагія є залученою до деградації специфічних органел, зокрема, мітохондрій (мікромітофагія) [21], ядер (мікронуклеофагія) [22] та пероксисом (мікропексофагія) [23].

На сьогоднішній день, процеси індукції та реалізації мікроаутофагії на молекулярному рівні ще є малодослідженими, однак, було показано, що мікроаутофагія запускається в клітинах дріжджів в умовах азотного голодування шляхом TOR-сигналіngu [24]. Крім того, процес мікроаутофагії також контролюється регуляторним комплексом EGO, що складається з трьох білків Ego1, Ego3 та ГТФази Gtr2 (гомолог Rag GTPase) [24]. Іншим регуляторним комплексом, залученим до реалізації мікроаутофагії є VTC (Vacuolar Transport Chaperone), що локалізований на вакуолярній мембрані і включає в себе білки Vtc1, Vtc2, Vtc3 та Vtc4 [24].

Слід відмітити, що процес мікроаутофагії також забезпечує деградацію вакуолярних мембран, вірогідно, як механізм регуляції розмірів органел. Зокрема, цей процес є критичним для реалізації макроаутофагії, а саме, для компенсації розмірів літичної вакуолі після злиття з аутофагосою [25]. Dubouloz та ін. показали, що процес мікроаутофагії бере участь у реалізації переходу від блокування клітинного циклу, індукованого рапаміцином, до логарифмічної фази росту, та скоріше є залученим до контролю розмірів органел та мембранного складу, аніж до процесу виживання клітин у стресових умовах [26].

1.2. Механізм розвитку шаперон-опосередкованої аутофагії

Шаперон-опосередкована аутофагія (ШОА) забезпечує селективну деградацію цитозольних білків у лізосомах [27]. Було показано, що ШОА забезпечує вибірккову деградацію багатьох білків і, таким чином, є залученою до регуляції різних патофізіологічних процесів, зокрема, регуляції метаболізму [28, 29], старіння [28, 29], активації Т-клітин [30], нейродегенеративних захворювань [30] та онкогенезу [30]. Селективність ШОА забезпечується шляхом вибіркової деградації окремих білків, а саме, білків, що містять KFERQ-послідовність [31]. Характерною ознакою СМА є механізм транслокації білків до лізосом для їх подальшої деградації. Зокрема, цей тип аутофагії не потребує везикул або інвагінації лізосомної мембрани, оскільки цільові білки досягають люмену за допомогою білкового транслокаційного комплексу, що розташовується у лізосомній мембрані [27]. Зазначена KFERQ-послідовність розпізнається у цитозолі білками теплового шоку, HSPA8/HSC70 [27]. Існує дві форми HSPA8/HSC70, одна з яких, цитозольна, доставляє субстрат до лізосомної мембрани, де він взаємодіє з ШОА-рецептором та полегшує розгортання білку, а інша, люменальна, є залученою до процесу його транслокації [32]. Рецепторами для субстратів СМА є мембранні білки, асоційовані з лізосомною мембраною (LAMP2A). Після розгортання цільового білку, LAMP2A мультимеризуються і утворюють транслокаційний комплекс, що стабілізується білками теплового шоку hsp90 та гліальними фібрилярними кислими білками (GFAP) [33]. Мультимеризація LAMP2A є оборотною реакцією і згодом після траслокації субстрату та його деградації лізосомними ферментами, зазначений комплекс дисоціює та розпадається на мономери [24].

1.3. Механізм розвитку макроаутофагії

На сьогоднішній день, молекулярні механізми розвитку макроаутофагії (надалі просто аутофагія) є найбільш дослідженими і вивченими. Однак,

враховуючи, що більшість експериментів була проведена на клітинах тварин та дріжджів, рослинна аутофагія представляє собою актуальну тему для дослідження.

На сьогоднішній день ідентифіковано більш ніж 30 генів аутофагії (Atg) [34]. Більшість з них була визначена завдяки мутагенезу дріжджів і вони є еволюційно консервативними для еукаріотичних клітин. Процес аутофагії складається з декількох етапів: ініціація, формування преаутофагосомної мембрани, розширення її (утворення фагофору), злиття аутофагосоми з лізосоною та деградація вмісту (Рис.1.1)

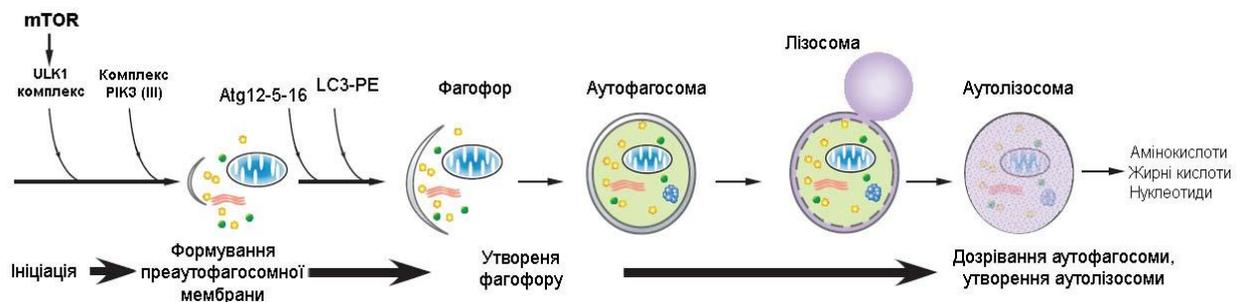


Рис.1.1 Етапи формування аутофагосоми [35].

Перший етап розвитку аутофагії передбачає її індукцію внутрішньоклітинними сигнальними каскадами. Велика кількість цих шляхів інтегрується TOR-кіназою [36, 37]. Було показано, що інактивація TOR призводить до індукції аутофагії шляхом активації транскрипційних факторів Gln3 та Gcn4 і, відповідно, підвищення експресії певних *atg* генів, зокрема, *atg1* і *atg13* [38, 39], а також інактивація TOR викликає дефосфорилування Atg13, що призводить до підвищення спорідненості білку до Atg1 та формування Atg1-Atg13-кіназного комплексу [35]. Окрім зазначених білків, комплекс містить також Atg17 (кіназу фокальної адгезії FIP200) та Atg101 [34], та локалізується у сайті формування преаутофагосомної мембрани.

Іншим регуляторним елементом, задіяним у процесі біогенезу аутофагосом, зокрема у регуляції формування фагофору, є фосфатидилінозитол 3-кіназний комплекс, що складається з

фосфатидилінозитол 3-кінази класу III (Vps34/ PI3K (III)), Atg6, Atg14 та Vps15 [40] (рис. 1.2.). Накопичення фосфатидилінозитол 3-фосфатів призводить до залучення Atg18-Atg2 [41] та формування комплексу Atg9-Atg18-Atg2, що контролює рециркуляцію ліпідних мембран в процесі біогенезу аутофагосом та бере участь у розширенні фагофору [42].

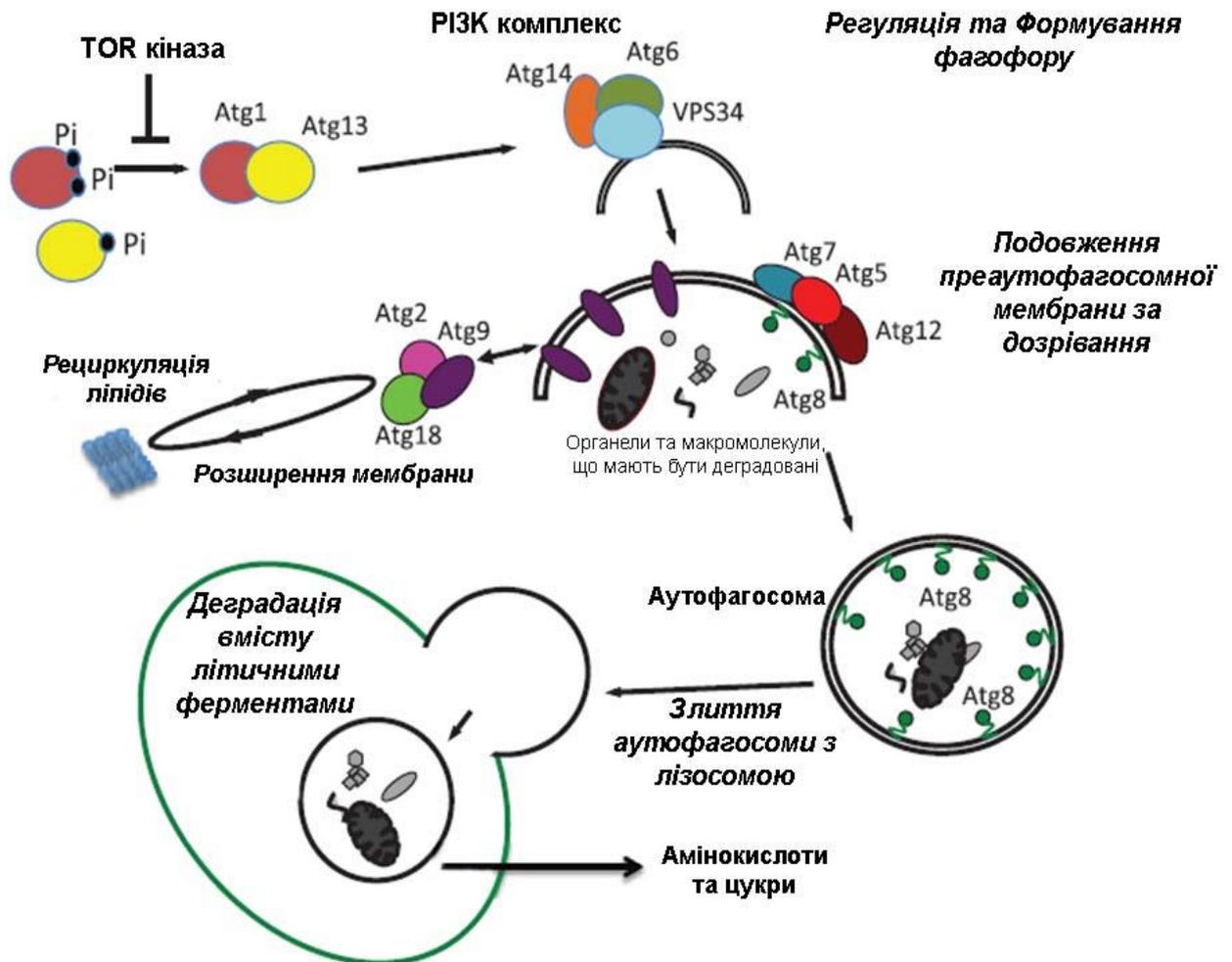


Рис. 1.2 Схематичне зображення індукції та реалізації аутофагії у клітинах дріжджів [42].

Ключовим елементом процесу біогенезу аутофагосом є дві системи убіквітин-подібних білків Atg8 і Atg12, що виконують переважно структурну роль у біогенезі аутофагосом. Зокрема, було показано, що комплекс Atg12-Atg5-Atg16, що формується внаслідок активації Atg12 убіквітин-подібним ферментом Atg7 та його подальшої кон'югації з Atg5, локалізується на

зовнішній мембрані аутофагосоми, і дисоціює одразу після формування везикули [35].

Однією з характерних ознак розвитку аутофагії є процесинг Atg8, що забезпечує другу реакцію кон'югації для формування аутофагосом. Процесинг молекули Atg8 (гомолог тваринного LC3) відбувається у декілька етапів (рис.1.3). Перший етап передбачає відрізання С-термінальної ділянки молекули, одразу після її синтезу, цистеїновою протеазою Atg4. Внаслідок цієї реакції, утворюється форма молекули LC3-I з експонованим залишком Гліцину на С-кінці. На наступному етапі LC3-I функціонує як убіквітин-подібний білок, а Atg7 та Atg3 як, відповідно, E1- та E2-подібні білки, транспортуючи молекулу LC3-I до фосфатидилетаноламіну (PE). Після кон'югації LC3-I з фосфатидилетаноламіном, утворюється форма LC3-II (Atg8-PE).

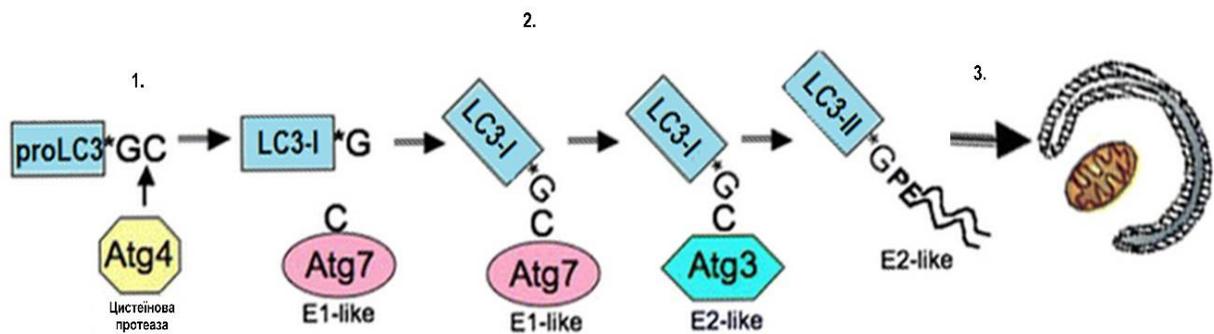


Рис. 1.3. Схема процесингу молекули LC3 (Atg8).

Оскільки, Atg8-PE закорююється у аутофагосомну мембрану ліпідним хвостом, дана модифікація є необхідною для побудови аутофагосом *de novo* [43], більш того, було показано, що співвідношення кількості модифікованого та немодифікованого LC3 (LC3II/LC3I) корелює з кількістю аутофагосом. Отже, процесинг Atg8 є беззаперечним доказом індукції та розвитку аутофагії у клітинах рослин.

Транспорт зрілих аутофагосом по мікротрубочкам цитоскелету забезпечує їх доставку до лізосом. Процес злиття аутофагосоми з лізосоною

опосередковується білками лізосомних мембран, зокрема, LAMP2 та Rab GTPазними білками [43–45], а також SNARE білками [46]. Подальша деградація вмісту аутофагосом забезпечується лізосомними ферментами – кислими гідролазами та катепсиновими протеазами.

РОЗДІЛ 2. УЧАСТЬ РОСЛИННОГО ЦИТОСКЕЛЕТУ У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЦЕСІВ АУТОФАГІЇ

Мікротрубочки (МТ) є обов'язковим та універсальним елементом еукаріотичних клітин. У рослин, МТ беруть участь у реалізації багатьох клітинних функцій, таких як, поділ клітин, регуляція форми клітин, позиціонування органел, внутрішньоклітинний транспорт, реалізація сигнальних відповідей, опосередковуючи, таким чином, підтримку гомеостазу та нормальне функціонування клітин рослин [3, 5, 47]. Мікротрубочки є динамічно нестабільними структурами, що забезпечують існування лабільних та стабільних популяцій мікротрубочок і зумовлюють виконання ними різного функціонального навантаження. Результати дослідження динаміки МТ *in vitro* дозволили виокремити серед рослинних білків, асоційованих з мікротрубочками (MAP-білків) такі, що стабілізують МТ – родини MAP65 и CLASP; де стабілізатори МТ – кінезин-13, катанін, MAP18 та MDO25; та білки, що ситуативно впливають на динаміку МТ - EB1, MAP215, MOR1, MAP200 и SPR2 [48]. Однак, одним із ключових факторів, що визначають функціональний стан мікротрубочок, є пост-трансляційні модифікації тубуліну. Такі модифікації можуть безпосередньо змінювати функціональний стан мікротрубочок або опосередковано впливати на білкове мікрооточення МТ, шляхом спорідненості до регуляторних білків [49].

2.1. Пост-трансляційні модифікації α - та β -тубулінів

Серед пост-трансляційних модифікацій тубуліну, характерних для більшості еукаріот, можна виділити ацетилювання, детирозилування, фосфорилування, поліглутамінування, а також полігліцилування [50].

2.1.1. Тирозилування-детирозилування

Більшість α -тубулінів містить тирозиновий залишок на С-кінці амінокислотної послідовності. Реакція тирозилування-детирозилування є зворотною і здійснюється двома ферментами: цитозольною карбоксипептидазою, що відщеплює термінальний тирозин, експонуючи глутаматний залишок, та тубулін тирозин лігазою, що здійснює зворотню модифікацію. За допомогою методу структурного моделювання було показано, що тубулін тирозинлігаза може взаємодіяти як з α - так і з β -тубуліном у димері [51]. Також було показано, що зв'язування тубуліну тирозин лігази з димером перешкоджає полімеризації мікротрубочок [52]. Така пост-трансляційна модифікація α -тубуліну є залученою до регуляції динаміки та взаємодії МТ у різних типах клітин та протягом різних стадій розвитку. Зокрема, було показано, що детирозилування впливає на взаємодію мікротрубочок з проміжними філаментами [53] та мікрофіламентами *in vivo* [54], а також, що процеси диференціації та поляризації епітеліальних клітин корелюють з детирозилуванням тубуліну [55].

Відомо, що мікротрубочки, що містять у складі гетеродимерів α/β -тубуліну детирозильований тубулін є стабільними [8]. Однак слід відмітити, що ця модифікація не стабілізує полімери мікротрубочок [56], проте, кінезини, що деполімеризують мікротрубочки (з родини кінезин-13) деполімеризують переважно тирозильовані мікротрубочки [57]. Також необхідно зазначити, що моторний білок кінезин-1 проявляє більшу афінність до МТ, збагачених детирозильованим α -тубуліном.

2.1.2. Поліглутамінування і полігліцилювання

Реакція поліглутамінування тубуліну є найбільш характерною для мікротрубочок нейронів [58], джугитків та центріолей [59, 60]. У свою чергу, пост-трансляційне полігліцилювання є специфічним виключно для тубулінів

джгутиків [60, 61], а також може виконувати функціональну роль в процесі збірки джгутиків деяких організмах [62]. Ферменти, що каналізують ці пост-трансляційні модифікації – глутамінази і гліцилази – належать до родини TTL-like (TTLL) ферментів; вони додають глутамат або гліцин, відповідно, до глутаматного залишку на С-кінці бічних ланцюгів α - і β -тубуліну.

Як і у випадку з іншими пост-трансляційними модифікаціями, поліглутамінування тубуліну впливає на білкове мікрооточення мікротрубочок. Зокрема, впливає на зв'язування MAP1 та MAP2 білків з тубуліном [63] та стимулює спастин-опосередкований розрив мікротрубочок [64]. Проте, наслідки поліглутамінування для діяльності моторних білків МТ ще є мало дослідженими. Було показано, що знижений рівень поліглутамінування тубуліну у мозку людини викликає зміни у розподілі кінезину-3, але не кінезину-1 [65]. Проте, Маас С. та ін. показали, що підвищення рівня поліглутамінування, внаслідок інгібування синаптичної активності, корелювало з пригніченням рухливості кінезину-1, але не кінезину-3 [66].

2.1.3. Фосфорилування

Фосфорилування тубуліну є однією з найбільш розповсюджених пост-трансляційних модифікацій білків. Фосфорилування β -тубуліну вперше було показано для мікротрубочок диференційованих клітин нейробластоми [67]. Пізніше, було продемонстровано пост-трансляційне фосфорилування α - та β -тубулінів серин-треоніновими кіназами, такими як, Cdk1, CK2 та CamKII, а також тирозиновими кіназами Jak2, Syk, Fes та Src [68]. Більшість з зазначених ферментів фосфорилує тубулін у складі мікротрубочок [68], однак, циклін-залежна кіназа Cdk1 фосфорилує Серин-172 вільної молекули β -тубуліну та інгібує полімеризацію МТ [1].

С-термінальний кінець тубуліну розташовується назовні, тому такі пост-трансляційні модифікації, як поліглутамінування, полігліцилювання,

тирозилювання-детирозилювання та фосфорилування необхідні для регуляції білкового мікрооточення МТ, зокрема, взаємодії з білками, асоційованими з мікротрубочками і моторними білками. Окрім зазначеного, такі пост-трансляційні модифікації можуть також бути пов'язані з регуляцією полімеризації мікротрубочок [1, 69].

2.1.4. Ацетилювання

Ацетилювання α -тубуліну є досить консервативною модифікацією, характерною для багатьох еукаріотів. На відміну від інших пост-трансляційних модифікацій, що відбуваються на С-кінці мікротрубочок, канонічним сайтом для ацетилювання α -тубуліну є Лізин-40 (K40), розташований на люменальній поверхні МТ [70]. Вважається, що дана модифікація регулює їх динамічний стан, а саме, викликає зростання їх стабільності, шляхом стабілізації латеральної взаємодії між сусідніми протофіламентами мікротрубочок. На сьогоднішній день, ацетилювання α -тубуліну у клітинах тварин є досить детально дослідженим [71, 72], у порівнянні з рослинами [73, 74]. Реакція ацетилювання α -тубуліну K40 може каталізуватися декількома ферментами, зокрема, консервативною α -тубулін ацетилтрансферазою (α -TAT) [75, 76], ARD1-NAT1 та GCN5 [72], а також E1p3 [77]. E1p3 – це субодиниця мультибілкового комплексу Елонгатор, що був вперше охарактеризований як білок, асоційований з РНК-полімеразою II [78], що сприяє елонгації транскрипції. Білковий комплекс Елонгатор складається з шести субодиниць (E1p1–E1p6), ядро якого формують субодиниці E1p1, E1p2 та E1p3, а інші виконують функцію допоміжних елементів [79]. Каталітична субодиниця E1p3 містить С-кінцевий гістон ацетилтрансферазний (НАТ) домен, що забезпечує здатність Елонгатору ацетилювати гістони *in vitro* [80]. Окрім участі у реалізації процесу транскрипції, E1p3 також є задіяним у реалізації багатьох клітинних процесах. Зокрема, E1p3 бере участь у репарації ДНК у *Saccharomyces cerevisiae* [81], у формуванні рослинного імунітету,

як відповідь на патогенну інвазію [82], у реалізації внутрішньоклітинного транспорту у нейронах миші, за рахунок ацетилювання α -тубуліну мікротрубочок [83], а також у забезпеченні динамічного стану мікротрубочок у *Caenorhabditis elegans* [84].

Зворотну реакцію деацетилювання у клітинах рослин забезпечують гістон деацетилази HDA14 та HDA6, що були показані як специфічні до α -тубуліну [9, 85]. Важливо відмітити, що деацетилаза HDAC6 опосередковує не лише деацетилювання залишку Ліз-40 α -тубуліну, але і процес злиття аутофагосоми з лізосоною [9].

2.2. Роль мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії

На сьогоднішній день, участь мікротрубочок цитоскелету у реалізації процесів аутофагії у клітинах тварин є доведеною, зокрема, було показано роль МТ у опосередкування біогенезу аутофагосом та їх внутрішньоклітинного транспорту [7, 35]. Використання антимікротрубочкових агентів вінбластину (для стабілізації МТ) та нокодазола (для деполімеризації МТ) при дослідженні аутофагії експериментально підтверджує вищезазначені функції мікротрубочок, оскільки призводить до зниження кількості та швидкості формування аутофагосом, а також, до порушення їх транспорту у клітинах [10]. Слід зазначити, що у клітинах рослин мікротрубочки можуть контактувати з аутофагосомами безпосередньо, взаємодіючи з LC3 (гомолог Atg8 ссавців), структурною молекулою аутофагосом, або опосередковано, за допомогою моторних білків (кінезин-1, кінезин-2 KIF2A и кінезин-3 KIF1B) [35]. Однак, наразі можливо тільки припустити наявність схожих механізмів взаємодії мікротрубочок з аутофагосомами у клітинах рослин.

Однією з ключових ланок опосередкування аутофагії мікротрубочками є пост-трансляційне ацетилювання α -тубуліну, що забезпечує функціональний стан МТ, необхідний для індукції та реалізації цього катаболічного механізму.

Зазвичай, мікротрубочки функціонують як високо динамічні структури, однак, як було зазначено вище, ацетилювання α -тубуліну по залишку Лізин-40 пов'язують зі стабілізацією мікротрубочок.

Умовно, серед функцій мікротрубочок цитоскелету в процесі реалізації аутофагії можна виділити сигнальну (ініціація сигнального шляху біогенезу аутофагосом) та транспортну, для забезпечення внутрішньоклітинного транспорту зрілих аутофагосом до літичних вакуолей.

2.2.1. Сигнальна функція мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії

Стабілізація мікротрубочок внаслідок гіперацетилювання α -тубуліну викликає залучення моторних білків МТ, а саме, кінезину-1 [8], та його переключення з аутофагосомо-транспортної функції на транспорт білку JIP (рис. 2.1.).

Подальше зв'язування JNK кінази JIP білком є необхідним для стрес-опосередкованої активації JNK та ініціації наступних етапів сигналіngu. Активована JNK фосфорилує антиапоптозний білок Bcl-2, що призводить до вивільнення Beclin1 (гомолог дріжджового Atg 6) з комплексу Bcl-2-Beclin1, та залучення його на ізольовані мембрани, сайти формування преаутофагосомних мембран. Beclin 1, разом з РІЗК (III), ініціюють фосфатидилінозитол-1,4,5-трифосфат-залежне залучення білка WIPI-1(гомолог дріжджового Atg 18) та комплексу Atg9-Atg18-Atg2, що контролює рециркуляцію ліпідних мембран і сприяє подовженню преаутофагосомної мембрани. Дозрівання фагофора і утворення зрілих аутофагосом довершується завдяки двом реакціям кон'югації, що мають наслідком утворення комплексу Atg12-Atg5 та процесинг молекули Atg8 [8].

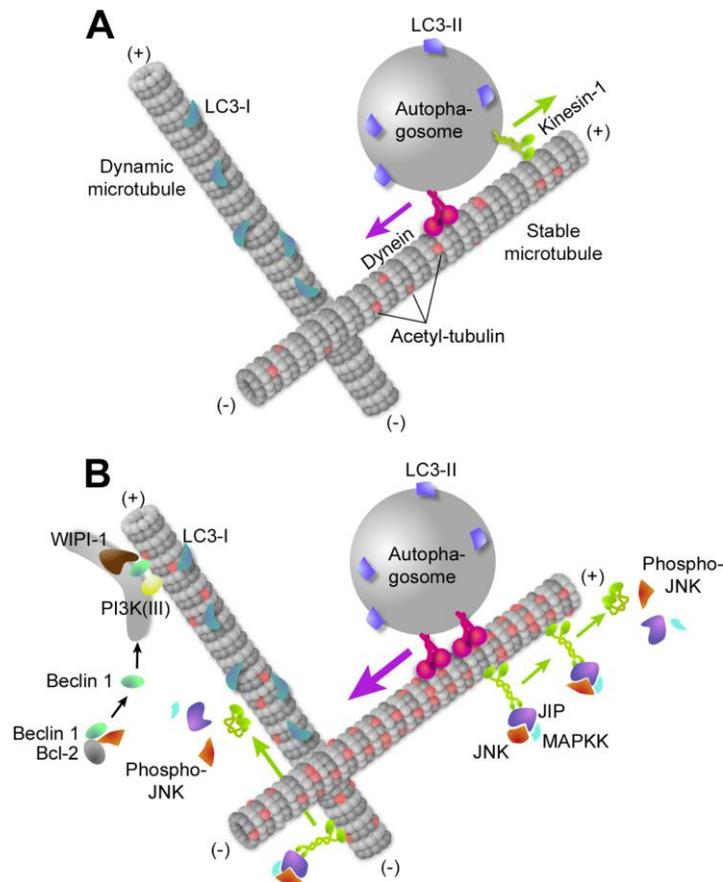


Рис. 2.1. Модель участі мікротрубочок у біогенезі аутофагосом [8].

2.2.2. Транспортна функція мікротрубочок у регуляції розвитку аутофагії

За фізіологічних умов, зокрема, в умовах достатньої кількості поживних речовин, кінезини KIF1B та KIF2A транспортують активний комплекс mTOR, локалізований на лізосомах, на периферію клітини. При дії стресових чинників відбувається інгібування mTOR та активація ULK1 (гомолог Atg1 дріжджів), що супроводжується утворенням аутофагосом та доцентровим рухом лізосом.

Новоутворені аутофагосоми рухаються по мікротрубочками у двох напрямках, що забезпечується конкурентною активністю моторних білків динеїнів та кінезинів. Згодом, аутофагосоми локалізуються у перинуклеарному просторі, де надалі зливаються з лізосомами і утворюють аутолізосоми [35]. Сформовані аутолізосоми транспортуються кінезинами до периферії клітини для подальшої деградації вмісту [86]. Cardoso та ін.

продемонстрували участь кінезину KIF5B у опосередкуванні транспорту лізосом та аутофагосом у напрямку до периферії [87]. Отримані після деградації вмісту аутолізосом макромолекули транспортуються до центру клітини для їх подальшого використання.

РОЗДІЛ 3. АУТОФАГІЯ У РОСЛИН, ЯК АДАПТИВНИЙ ПРОЦЕС У ВІДПОВІДЬ НА ДІЮ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ

3.1. Роль аутофагії в опосередкуванні метаболічного стресу

Метаболічний стрес у рослин передбачає дефіцит органогенних- та/або макроелементів, дефіцит вуглеводнів тощо. У клітинах рослин цукри виконують низку важливих функцій, таких як участь у процесі дихання для генерації енергії та синтезу макромолекул, роль транскрипційних факторів та сигнальних молекул для реалізації багатьох сигнальних шляхів, а зв'язування з цукром нерідко є критичним для належного функціонування білків та ліпідів. Загальними наслідками голодування за сахарозою (надалі просто голодування) є припинення росту клітин, деградація білків та ліпідів для забезпечення енергетичного та біосинтетичного попиту [88, 89], а також зниження активності гліколітичних ферментів. Загалом, кількість тотального білку знижується на 30-50%, як за рахунок підвищення протеазної активності, так і реалізації аутофагії у клітинах [19]. Голодування є давно-відомим та загальноприйнятим стресовим чинником для моделювання умов аутофагії у клітинах рослин [17, 19]. Раніше було показано, що виснаження поживного середовища за глюкозою мало чітку кореляцію зі зниженням концентрації тотального білку у лізатах клітин суспензійної культури клітин BY-2 (*Nicotiana tabacum*) та розвитком процесів аутофагії [90]. Rose T. та ін. продемонстрували підвищення експресії деяких генів Atg у *Arabidopsis thaliana*, зокрема Atg4a, Atg4b, Atg8a-Atg8i, Atg3, на початкових етапах голодування [91], що опосередковано свідчить про реалізацію процесів аутофагії на даному часовому проміжку та вказує на адаптивну функцію аутофагії в умовах метаболічного стресу.

3.2. Роль аутофагії в умовах сольового та осмотичного стресу

Одним з наслідків впливу осмотичного та сольового стресів є зниження темпів росту клітин, оскільки у рослин даний процес забезпечується зміною тургорного тиску і подальшим розширенням клітини. У свою чергу, регуляція тургорного тиску контролюється показниками концентрації осмотично активних речовин, таких як іони калію (K^+), пролін, манітол, сорбітол, бетаїн тощо. Більш того, іони K^+ опосередковують осмотичний тиск в клітинах ксилеми, таким чином, регулюючи транспорт води і мінералів від кореня до пагонів рослини [92]. Причиною осмотичного та сольового стресів є підвищений вміст іонів Na^+ і Cl^- у навколишньому середовищі, що призводить до зниження осмотичного потенціалу рідкої фази ґрунту і, відповідно, зниження темпів поглинання води. В умовах дефіциту води відбувається тургор-залежне закриття продихів та подальше зниження фотосинтетичної активності [92]. Осмотичний шок також має наслідком пошкодження мембран і порушення функціонування ферментів [93]. Порушення обміну речовин в умовах осмотичного стресу обумовлено головним чином змінами обміну вуглеводів у зв'язку зі зниженням фотосинтетичної активності [94]. Більш того, під впливом сольового стресу відбувається порушення іонного гомеостазу клітин, що призводить до зміни фізіологічного внутрішньоклітинного K^+/Na^+ співвідношення, а саме, дефіциту іонів K^+ і підвищенні концентрації Na^+ до токсичної. В той же час, обидва типи стресу призводять до значних окисних пошкоджень багатьох клітинних компонентів через підвищену продукцію активних форм кисню (молекулярний кисень, супероксидний радикал, гідроксильний радикал, перекис водню) та зміни у активності певних антиоксидантних ферментів [93].

Тривала дія вищезазначених абіотичних факторів викликає пригнічення росту та розвитку рослин, а іноді і їх загибель. В якості адаптивної відповіді на дію стресів, рослини розвинули низку захисних внутрішньоклітинних механізмів, таких як контроль темпів росту, за рахунок регуляції процесів

біосинтезу клітинної стінки, синтезу білків та поділу клітин, а також зміни транскрипційної активності генів білків, залучених до реалізації специфічної адаптивної відповіді. Наприклад, механізми посухо- та солестійкості передбачають зміни рівнів експресії багатьох генів, зокрема, salt-overly sensitive (SOS) генів, що регулюють Na^+/H^+ - транспортерну систему в умовах сольового стресу, генів НКТ (високо афінні транспортери калію) та NHX1 (Na^+/H^+ обмінник), що забезпечують фізіологічне K^+/Na^+ співвідношення [95].

Одним із наслідків дії даних стресових чинників є індукція аутофагії, як внутрішньоклітинного адаптивного механізму. І хоча процес аутофагії був відкритий досить давно [16, 96], відносно нещодавно було показано, що Atg білки є задіяні у регуляції процесів відповіді на сольовий та осмотичний стреси [97, 98]. Також, Diane C. Bassham та ін. показали, що реалізація адаптивної відповіді при дії різних абіотичних стресів здійснюється різними сигнальними шляхами [99], а саме, в умовах метаболічного та сольового стресів, аутофагія найбільш вірогідно регулюється НАДФ•Н-оксидазо-залежним шляхом, використовуючи активні форми кисню у якості сигнальних молекул, а за умов осмотичного стресу – НАДФ•Н-оксидазо-незалежним шляхом. Автори припускають, що початкові етапи сигнальних шляхів індукції аутофагії за різних стресових умов відрізняються, але сходяться перед або в момент формування аутофагосоми [99]. Тому, можна припустити, що рівні експресії генів основних білків, задіяних до реалізації аутофагії, за стресових умов будуть відрізнятися.

Однією з мішеней впливу стресових чинників можуть виступати мікротрубочки цитоскелету клітин. На сьогоднішній день, експериментальних даних, що описують механізми впливу абіотичних стресів на цитоскелетні структури, недостатньо. Однак, було показано, що перенесення 3-денних проростків *A. thaliana* на середовище, що містило 50 мМ NaCl, через 24 год викликало деполімеризацію МТ, а додавання 100 мМ NaCl у поживне середовище мало наслідком значну фрагментацію кортикальних мікротрубочок [6]. Використання 200 мМ сорбітолу в якості осмотичного

стресу, не впливало на організацію МТ в апікальній частині кореня (2мм), проте призводило до суттєвих змін в його базальній ділянці, зокрема, формуванню округлих отворів у схемі розташування мікротрубочок [100].

3.3. Роль аутофагії, як відповідь на опромінення УФ-В

Ультрафіолетове випромінювання (УФ-випромінювання) – це неіонізуюче електромагнітне випромінювання, яке складає близько 8-9% загального сонячного випромінювання. Умовно, спектр УФ-випромінювання поділяють на три хвильові діапазони: УФ-С (200-280нм), УФ-В (280-320нм) та УФ-А (320-400нм). Значний інтерес у дослідженні впливу УФ-В на живі організми викликаний збільшенням кількості сонячної радіації, що досягає поверхні Землі. УФ-В складає менш ніж 1% від загального сонячного випромінювання, однак є його високо активним компонентом, здатним негативно впливати на рослинні організми. Зокрема, УФ-В може викликати пошкодження ДНК (формування циклобутан-піримідинових димерів або піримідин (6-4) піримідинових димерів), деградацію ланок системи фотосинтезу, руйнування мембран, формування активних форм кисню (АФК), зміни вторинного метаболізму, а також морфології клітин та організму в цілому [101].

Первинною ланкою реалізації відповіді клітин рослин на опромінення є мономеризація димеру UVR8, що є фоторецептором УФ-В [102]. Амінокислотні залишки триптофану в положеннях 233 та 285 виступають у ролі хромофору молекули, що реагує порушенням сольових містків між молекулами димеру після опромінення. Для індукції УФ-В-сигналінгу мономери UVR8 утворюють комплекс з білками COP1 (constitutively photomorphogenic 1) та SPA (supressor of phyA-105). Подальше опромінення УФ-В викликає дисоціацію COP1-SPA з CUL4-DDB1-E3 убіквітин-лігазного комплексу, який сприяє деградації транскрипційного фактору HY5. Стабілізація HY5, індукована опроміненням УФ-В, викликає накопичення

даного транскрипційного фактору, оскільки білок позитивно регулює власну транскрипцію, а також є залученим до регуляції експресії COP1. Утворений комплекс UVR8-COP1-SPA регулює транскрипцію цільових генів, а HY5, часто є залученим до реалізації транскрипційної відповіді. Відомо, що опромінення рослин *Arabidopsis thaliana* в залежності від їх віку, умов культивування, дози опромінення та якісних характеристик джерела УФ-В може викликати зміни транскрипційного рівня сотень генів, що несуть різне функціональне навантаження [103].

Окрім таких захисних механізмів, як зміни транскрипційної активності та репараційні системи, у клітинах рослин у відповідь на опромінення активуються процеси аутофагії, адаптивного захисного механізму. Процеси реалізації аутофагії в клітинах тварин є набагато більш вивченими. Зокрема, доведено, що наслідком УФ-В опромінення епітеліальних клітин є розвиток даного катаболічного механізму [104]. Про індукцію та розвиток рослинної аутофагії в результаті опромінення наразі відомо небагато. Вірогідно, що аутофагія бере участь у захопленні та перетравленні окислених та зруйнованих органел та макромолекул, забезпечуючи енергетичний та біосинтетичний попит у стресових умовах.

Мікротрубочки цитоскелету можуть бути як мішенню впливу УФ-В, так і опосередковувати реалізацію відповіді на опромінення. На сьогоднішній день експериментальних даних, котрі описували би механізми впливу і наслідки опромінення на цитоскелетні структури, вкрай мало. Проте, на культурі клітин тютюну *N. tabacum* ВУ-2 було показано, що опромінення УФ-В у дозах 34, 81 та 135 кДж/м² призводить до деполімеризації як інтерфазних, так і мітотичних МТ, і корелює у часі з ущільненням цитоплазми клітин, конденсацією хроматину та формуванням мікроядер. Загалом, при опроміненні клітин ВУ-2 були виявлені основні ознаки розвитку програмованої клітинної загибелі [105]. Схожі результати були отримані при дослідженні впливу УФ-В на клітини *A. thaliana*. Зокрема, було виявлено, що вплив УФ-В має дозо-залежний характер і викликає порушення структури МТ

мікротрубочок та їх деполімеризацію в клітинах кореня *A.thaliana* [106]. Зокрема, опромінення у дозі 34 кДж/м² здатне викликати порушення організації МТ епідермальних клітин кореня, збільшення (свелінг) клітин зони диференціювання кореня та появу коротких пучків МТ у вищезазначених клітинах. В свою чергу, опромінення УФ-В у дозі 68 кДж/м² спричиняє деполімеризацію МТ у епідермальних клітинах, а також клітинах кортексу усіх зон кореня [106].

РОЗДІЛ 4. ПРОГРАМОВАНА КЛІТИННА ЗАГИБЕЛЬ ЯК НАСЛІДОК ДІЇ СТРЕСОВИХ ЧИННИКІВ У РОСЛИН

Можливим наслідком дії абіотичних стресів може бути розвиток програмованої клітинної загибелі (ПКЗ). Процеси ПКЗ є прикладом високо консервативного внутрішньоклітинного механізму, що забезпечують ріст, розвиток та функціонування організму у процесі онтогенезу. Наявність схожих для усіх еукаріот особливостей розвитку ПКЗ та аутофагії вказує на генеалогічну древність та надзвичайну важливу роль даних процесів для функціонування клітин. Процеси ПКЗ у рослин опосередковують розвиток організму як за фізіологічних умов (формування і проростання насіння, розвиток зародка, утворення провідних тканин ксилеми, тканиноспецифічне старіння), так і при патогенній інвазії та за умов дії абіотичних стресових чинників [107, 108]. Аутофагія, як механізм деградації і рециркуляції макромолекул та органел також виконує фундаментальну роль у реалізації вищезазначених клітинних процесів, зокрема, у розвитку та виживанні організму, до того ж, є інтегрованою у реалізацію ПКЗ [107–109].

Особливості розвитку і реалізації ПКЗ у тварин є досить детально дослідженими, що дозволяє виділити три основних типи клітинної загибелі: апоптоз (тип I), аутофагія (тип II) та некроз (тип III) [110]. Процес апоптозу у клітинах тварин обов'язково супроводжується зміною форми клітини (округленням), ретракцією цитоплазми у зв'язку зі змінами внутрішньоклітинного обміну $K^+/Na^+/Cl^-$ [110], залежною від каспази-3 конденсацією хроматину, а також нуклеосомною фрагментацією ДНК [5]. Відмінною рисою апоптозу є вакуоляризація плазматичної мембрани з наступною фрагментацією клітини та формування апоптичних тілець, що будуть деградовані лізосомними ферментами фагоцитів. Ключовим фактором при виборі типу клітинної загибелі є час та ступінь впливу стресового фактору [110]. На відміну від апоптозу, некроз розвивається внаслідок жорсткого впливу стресових факторів, що інгібує здатність реалізації апоптичного шляху

загибелі. У клітинах тварин морфологічними особливостями розвитку некрозу є відсутність ознак, характерних для апоптозу; первинне збільшення об'єму клітин, внаслідок втрати здатності осморегуляції [111]; руйнування плазматичної мембрани і деградація внутрішньоклітинного вмісту [112, 113]. Також, характерними ознаками некрозу у тварин є підвищення цитозольної концентрації іонів Ca^{2+} , деградації жирів та активація кальпаїнових протеаз. Продукція активних форм кисню (ROS) та азоту (RNS) мітохондріями призводить до зниження рівня АТФ і пермеабілізації мембран мітохондрій. В свою чергу, мембрани лізосом, також зазнають розривів, що має наслідком вихід активних катепсинових протеаз до цитозолу [114, 115].

Для рослини також є характерним наявність різних шляхів клітинної загибелі. Однак, враховуючи відмінності та особливості ПКЗ у рослин та тварин, доцільно не використовувати номенклатуру типів ПКЗ тварин для позначення схожих процесів у клітинах рослин [112]. Зокрема, конденсація хроматину та фрагментація нуклеосомною ДНК не є відмінними рисами апоптозу рослин, оскільки можуть мати місце як в процесі некрозу, так і при аутофагії [116, 117]; ретракція цитоплазми у клітинах рослин відрізняється від аналогічного процесу у тварин, оскільки супроводжується порушенням цілісності плазматичної мембрани та не призводить до утворення апоптичних тілець [118]. А каспазо-подібна активність, що виявляється у рослин, не завжди має наслідком розвиток апоптичної морфології клітин [119, 120]. Тому, використання терміну «апоптоз» для рослин вважається некоректним. Однак, у рослин може бути виділено принаймні 2 типи клітинної загибелі: вакуольна клітинна загибель та некроз [112].

Вакуольна клітинна загибель передбачає поступове зменшення об'єму цитоплазми, внаслідок його поглинання літичними вакуолями для подальшої деградації. Даний механізм є схожим до процесів мікро- та макро-аутофагії [107, 121, 122]. На кінцевому етапі вакуольної загибелі відбувається розрив тонопласту та масове вивільнення вакуольних гідролаз, що призводить до руйнування протопласту або всієї клітини разом з клітинною стінкою.

Характерними морфологічними ознаками вакуолярної загибелі є: накопичення аутофагосом і маленьких літичних вакуолей, формування актинових тяжів, руйнування ядерної оболонки та, в певних випадках, сегментація ядра. При цьому, органели клітини, як і плазматична мембрана, залишаються інтактними до моменту розриву тонопласту. Вакуолярна клітинна загибель забезпечує нормальний розвиток рослинного організму в процесі онтогенезу, відіграючи роль у розвитку зародка, морфогенезі тканин та органів, реалізації старіння, формування клітин суспензора, пилку, проток, молочних судин тощо [107].

Характерними ознаками некрозу, другого типу ПКЗ у рослин, є свелінг мітохондрій, відсутність літичних вакуолей, що збільшуються у об'ємі, та ранній розрив плазматичної мембрани, що викликає ретракцію протопласту. Наявність жорсткої клітинної стінки перешкоджає свелінгу протопласту на первинних стадіях некрозу і тому ускладнює детекцію даного процесу [123].

На протопластах та клітинах суспензійної культури тютюну (*Nicotiana tabacum*) було показано, що культивування у середовищах, що містили 200 мМ NaCl та 400 мМ сорбітол, відповідно, викликало появу ознак, характерних для розвитку ПКЗ, зокрема, ретракцію протопласту, підвищення рівня продукції активних форм кисню, деполяризацію мембран мітохондрій та формування мітохондріальних пор, а також нуклеосомну фрагментацію ДНК [124, 125]. Більш того, опромінення УФ-В клітин суспензійної культури тютюну (*Nicotiana tabacum*) ВУ-2 має наслідком появу характерних ознак ПКЗ (конденсація хроматину, нуклеосомна фрагментація ДНК, формування мікроядер та ацидифікація цитоплазми) [106].

На сьогоднішній день, достеменно невідомо, як саме взаємодіють у часі процеси аутофагії та програмованої клітинної загибелі, зокрема, чи є механізм аутофагії залученим до розвитку ПКЗ у клітинах рослин.

РОЗДІЛ 5.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

5.1. Отримання трансгенної лінії рослин *A. thaliana*

Для дослідження процесу аутофагії в клітинах проростків *Arabidopsis thaliana* була створена трансгенна лінія рослин, що стабільно експресує химерний білок GFP-Atg8h. Для цього, з листя проростків *A. thaliana* екотипу Columbia було виділено тотальну РНК за допомогою Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany), згідно рекомендацій виробника. Надалі, була синтезована тотальна кДНК, використовуючи реагент ImProm-ІІТМ Reverse Transcriptase (Promega, США). Кодуючу ділянку послідовності At3g06420 (Ath8H) ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням олігонуклеотидних послідовностей 3'-CTGCAAACAAAAAACACCGATTTCG та 3'-GCCGAAAGTTTTCTCGGTGCTGTA. Отриманий ПЛР-продукт було клоновано у вектор pGEM (Promega, USA). Повна послідовність гену At3g06420 без стоп-кодону було клоновано у pENTR™ 3C Gateway entry вектор (Invitrogen, USA), використовуючи ендонуклеази рестрикції BamH1 та Xho1 для подвійного розщеплення. Отриманий At3g06420 entry-клон використовували для Gateway LR-рекомбінації з pH7FWG2 бінарним destination вектором, використовуючи Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen, USA). Створена At3g06420 бінарна конструкція була використана для подальшої трансформації *Agrobacterium tumefaciens* GV310 методом електропорації [126]. Схематичне зображення векторної конструкції наведено на рис. 5.1. Рослини *Arabidopsis thaliana* були трансформовані методом floral-dip шляхом занурення суцвіть у суспензійну культуру агробактерії на 10–15 сек, згодом квітки покривали поліетиленовими плівками для створення умов з підвищеною вологістю [127].

Насіння першого покоління (F1) селектували на середовищі Мурасіге і Скуга, що містило 50 г/л канаміцину.

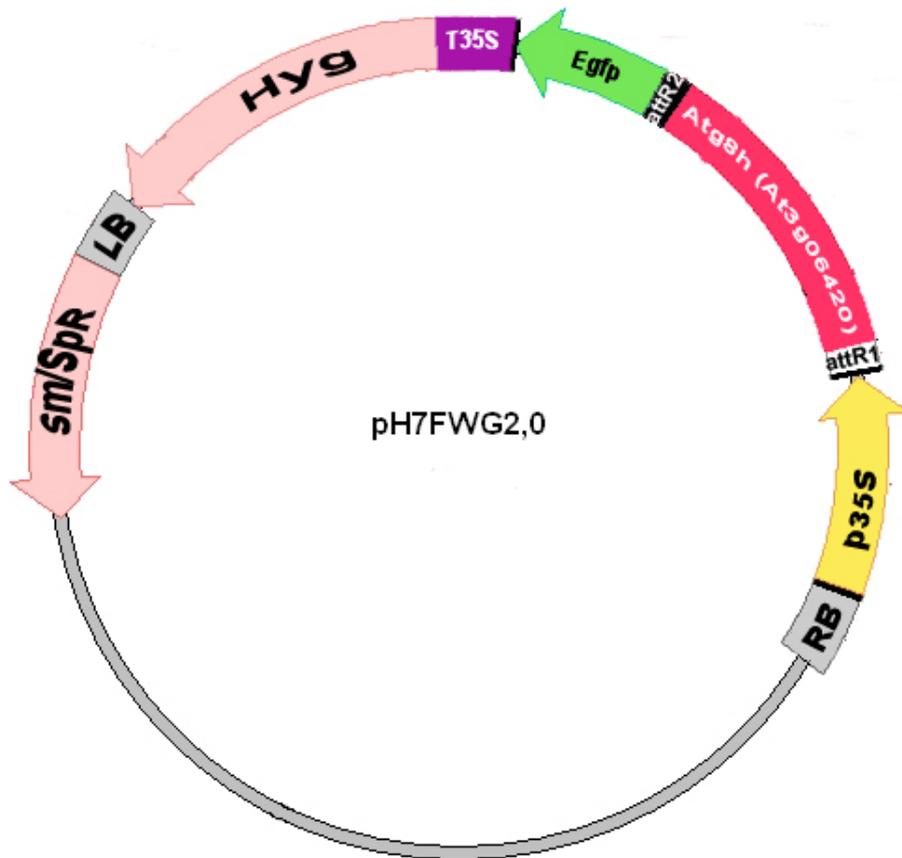


Рис. 5.1. Схематичне зображення бінарного вектору pH7FWG2, що використовувався для створення бінарної конструкції At3g06420: p35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, T35S – термінатор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти, HUG – ген стійкості до гігromіцину, sm/SpR – ген стійкості до стрептоміцину-спектіноміцину.

5.2. Об'єкт дослідження та моделювання стресових умов

Як об'єкт дослідження використовували 7-денні проростки *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia Col-0 та трансгенної лінії, що стабільно експресує химерний білок Atg8H-GFP. Насіння *A. thaliana* стерилізували 10%-им

розчином гіпохлориду натрію (NaOCl), що містив 0,5% Tween-20, протягом 10 хв. та відмивали чотири рази стерильною дистильованою водою. Після чого насіння контрольних рослин висаджувалося на стандартне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [58]. Для приготування поживного середовища для контрольних рослин у 1л дистильованої води розчиняли 4,4 г/л солей Murashige and Skoog medium including vitamins (M0222, Duchefa), 1%- сахарозу та додавали 10 г агару. Висаджене насіння стратифікували при температурі +4°C протягом 24 год. Після чого чашки Петрі із насінням культивували протягом 7 діб при 22 °C та довжині світлового періоду 14 годин на добу.

Для індукції аутофагії використовували такі стресові чинники: сольовий стрес, осмотичний стрес, голодування та опромінення УФ-В. Умови сольового стресу моделювали шляхом модифікації поживного середовища, що містило 150 мМ NaCl або 10 мМ манітолу для моделювання осмотичного стресу, відповідно. 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. Для виключення довжин хвиль спектру УФ-С та короткохвильового діапазону УФ-В використовували полістироловий світлофільтр [106]. 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. Інгібітор цистеїнових протеаз був вперше виділений у 1977 р. з культури грибів *Aspergillus japonicus* [128]. E-64 є загальноживаним необоротним (ковалентний тип зв'язування) інгібітором для багатьох цистеїнових протеаз, таких, як папаїн, актинідаїн, катепсина В і L. Як інгібітор лізосомних протеаз, E-64 інгібує процес аутофагії на стадії деградації вмісту літичних компартментів після злиття аутофагосом з лізосомами і утворення аутолізосом. Обробку проростків інгібітором проводили за добу до аналізу у

випадку голодування, сольового та осмотичних стресів (рослини пророщували на стресовому середовищі) або за добу до дії стресового фактору (опромінення УФ-В).

5.3. Дослідження показників росту *A. thaliana* у стресових умовах

Ріст та розвиток проростків аналізували на 7-у добу вирощування за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Для дослідження показників росту рослин *A. thaliana*, довжину коренів та гіпокотилів було підраховано за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d), <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Для достовірності даних експеримент було повторено три рази. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2013. Для кожного досліджуваного показника було визначено його середнє значення та стандартне відхилення від середнього значення в межах однієї вибірки.

5.4. Флуоресцентна мікроскопія

Вживаність клітин проростків *A. thaliana* досліджували, використовуючи флуоресцентні барвники пропідіум йодид (PI) (Fluka, Швейцарія) – 1.5 мкг/мл та флуоресцеїн-діацетат (FDA) (Sigma, США) – 2,5 мкг/мл. Для візуалізації аутофагосом використовували флуоресцентний барвник монодансилкадаверин (MDC) (Sigma, США) – 1 мкг/мл. Для дослідження ацидифікації цитоплазми клітин використовували флуоресцентний барвник акридин оранжевий (АО) (Sigma, США) – 10 мкг/мл. Проростки фарбували барвниками, розчиненими у 200 мкл фосфатно-сольового буфера PBS-T і негайно аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопу Axioscope 40 (Carl Zeiss, Німеччина). Фосфатно-сольовий буфер

PBS-T містив 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄ та 0,05% Tween-20, рН 7.4.

5.5. Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія

Розвиток стрес-індукованої аутофагії у клітинах лінії *A. thaliana*, які стабільно експресують химерний білок Atg8h-GFP, досліджували методом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Зображення отримували, використовуючи конфокальний 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). Знімки були отримані, використовуючи EC Plan-Neofluar об'єктив 20x/0,5 (Zeiss, Німеччина), у режимі мульти-трек, використовуючи лінійне перемикання з усередненням 8-и показників. 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. Всі дослідження виконували у 3 повторах, не менше 10 проростків для кожного повтору.

5.6. Отримання лізатів тканин та визначення концентрації білків

Для приготування лізатів тканин використовували буфер 20 мМ Тріс(гідроксиметил)амінометану рН 7.5, що містив 150 мМ NaCl, 1 мкМ EDTA, 1 мкМ EGTA, 1% Triton X-100, що містив інгібітори протеаз та фосфатаз: 1 мкМ Protease Inhibitor Cocktail, P 9599 (Sigma, США), 1 мкМ Na₃VO₄, 50 мМ NaF.

Зразки гомогенізували в буфері та рідкому азоті та центрифугували протягом 20 хвилин при 16400 g. Визначення концентрації білка проводили за методом Бредфорда [129]. 100 мкл проби змішували з 1 мл реакційного

розчину, для приготування якого, Coomassie Blue G250 розчиняли у 95% етанолі до концентрації 5 мг/л, отриманий розчин змішували зі 100 мл 85% фосфорної кислоти та доводили об'єм до 1л деіонізованою водою. Концентрація білка в пробах визначалась за оптичною густиною розчину при 595 нм у порівнянні з контролем за попередньо побудованою калібрувальною кривою. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини сироваткового альбуміну (Calbiochem, США).

5.7. Електрофорез білків в денатуруючих умовах

Електрофорез білків проводили за методом Лемлі у 10%-ному поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію при постійному струмі 20 мА. В якості лідируючого барвника використовували бромфеноловий синій. Гелі після електрофорезу фарбували 0,15%-ним розчином Coomassie G250 (Ferak, Німеччина) в суміші вода : етанол : оцтова кислота (6:3:1). Гелі відмивали розчином в суміші вода : етанол : оцтова кислота (6:3:1). Для приготування зразків для електрофорезу, лізати тканин у суміші з барвником бромфеноловим синім нагрівали до 95 °С протягом 10 хв, після чого охолоджували на льоду.

5.8. Електроперенос білків та Вестерн-блот аналіз

Для електропереносу білків використовували нітроцелюлозні мембрани (Hybond™-с super, Велика Британія). У випадку дослідження рівня LC3-II/LC3-I у зразках електроперенос здійснювали на PVDF-мембрани. З літературних даних відомо, що LC3-II краще утримується на PVDF-мембрані через вищу афінність до гідрофобних білків, у порівнянні з нітроцелюлозною мембраною [61]. Перед використанням нітроцелюлозні мембрани інкубували 10 хв. в дистильованій воді та 20 хв. в буфері для електропереносу, що містив

25 мМ Тріс(гідроксиметил)амінометану, 192 мМ гліцину та 10% метанолу. PVDF-мембрани попередньо змочували у метанолі на 30 с, після чого також інкубували у дистильованій воді та буфері для електропереносу. Гель після електрофорезу інкубували в буфері для електропереносу на горизонтальному шейкері. Підготовані мембрану та гель поміщали в касеті для електропереносу між шарами пористої вологої підложки та фільтрувального паперу. Орієнтували касету в камері для електропереносу Criterion Blotter (Bio-Rad, США) наступним чином - мембрану відносно аноду, гель відносно катоду. Електроперенос проводили при 100 V впродовж 60 хв.

Для Вестерн-блот гібридизації використовували наступні антитіла: мишачі моноклональні антитіла TU-16 до α -тубуліну (Thermo Fisher Scientific, США) та до ацетильованого α -тубуліну (T6793, Sigma, США). Для вичення експресії модифікованого та немодифікованого Atg8, використовували кролячі моноклональні антитіла G1544 до GFP (Sigma, США). Для проведення дослідів готували буфер TBS-T, що містив 20 мМ Тріс(гідроксиметил)амінометану та 150 мМ NaCl та 0,1% Tween-20, pH 7.6. Мембрани після електропереносу відмивали TBS-T та інкубували протягом 1 год в буфері TBS-T, що містив 5% знежиреного молока, для блокування сайтів неспецифічного зв'язування антитіл, після чого відмивали 4 рази по 5 хв TBS-T. Первинні антитіла до α -тубуліну використовували у концентрації 1 мкг/мл. Первинні антитіла до ацетильованого α -тубуліну використовували у концентрації 500 нг/мл. Первинні антитіла до GFP використовували у концентрації 250 нг/мл. Інкубацію з первинними антитілами проводили впродовж ночі при 4°C на горизонтальному шейкері. Відмивали мембрану 4 рази по 5 хв. TBS-T та інкубували протягом 1 години з антитілами проти IgG миші, кон'югованими з пероксидазою хрому в розведенні 1:10000. Після цього відмивали мембрану, як описано вище, та візуалізували за допомогою набору ECL (Bio-Rad, США).

5.9. TUNEL-аналіз

TUNEL-аналіз зразків проводили з використанням набору In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, Швейцарія), згідно рекомендацій виробника. Фіксацію зразків проводили у 4% параформальдегіді (на PBS, рН 7.4). Для позитивного контролю частину зразків обробляли ДНКазою (AMPD1-1КТ, DNAase1, Sigma) 10 хв при 25° С. Для негативного контролю - зразки інкубували в 50 мкл Label solution (без додавання термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази). Для візуалізації ядер зразки фарбували флуоресцентним барвником DAPI. Кількість TUNEL-позитивних клітин вираховували у 10 полях зору.

5.10. Приготування гістологічних зрізів проростків *A.thaliana*

Для приготування парафінових зрізів для TUNEL-аналізу 7-денні проростки були зафіксовані у 4%-параформальдегіді у фосфатно-сольовому буфері. Фіксація тривала 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. Для заливки зразків у парафінові блоки, їх інкубували у ксилолі двічі по 30 хв, 30 хв у суміші ксилолу та парафіну у співвідношенні 1:1, та двічі у чистому парафіні по 1 год за температури 60°С. В роботі використовували парафін Paraplast X-tra (Sigma, США). Через добу, після остаточного застигання, парафінові блоки використовували для приготування мікротомних зрізів товщиною 10 мкм, зрізи поміщали на полі-L-лізинові скельця. Після чого зрізи підсушували. Для подальшого TUNEL-аналізу, зрізи депарафінізували ксилолом двічі по 10 хв та регідрували (100%, 96% та 70% спиртом і деіонізованою водою).

5.11. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Для визначення змін рівнів експресії генів α -тубуліну (At4g14960, At5g19780, At1g04820, At5g19770, At1g50010, At1g64740) та *atg8* (At4g21980, At4g04620, At1g62040, At2g05630, At2g45170, At4g16520, At3g60640, At3g06420, At3g15580); гену субодиниці Елонгатору *elp3* (At5g50320); деацетилаз *hda6* (At5g63110) та *hda14* (At4g33470), гексокіназ (*hvk1* (At4g29130), *hvk2* (At2g19860), *hvk3* (At1g47840)), а також генів кінезинів (*KIN1* (At3g63480), *KIN5A* (At2g28620), *KIN5B* (At2g37420), *KIN5C* (At2g36200), *KIN5D* (At3g45850), *KIN6* (At1g20060), *KIN7A* (At1g18370), *KIN7O* (At3g10180), *KIN7D* (At4g39050), *KIN10A* (At4g14330), *KIN12A* (At4g14150), *KIN12B* (At3g23670), *KIN12D* (At3g19050), *KIN12F* (At3g20150), *KIN14K* (At5g41310)), з 7-денних рослин була виділена тотальна РНК, отримана кДНК та проведений ПЛР-аналіз з праймерами до відповідних генів. Виділення РНК з рослинного матеріалу проводили за допомогою PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно рекомендацій виробника. Якість РНК визначали електрофоретично в 1%-ному агарозному гелі з формамідом, а концентрацію - спектрофотометрично при довжині хвилі 260 нм.

Синтез кДНК проводили за допомогою ReverseertAid 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, згідно рекомендацій виробника. 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. Температура зв'язування праймера з матрицею становила: для *atg8a*, *atg8b*, *tua3*, *tua4*, *tua5*, *tua6* – 57°C; для *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*,

atg8h, - 58°C; для *atg8i*, *tua1*, *tua2* - 59°C; *hxx1*, *hxx2*, *hxx3*, *hda14*, *hda6* - 60°C; для *elp3* - 61°C, *KIN1*, *KIN5B*, *KIN5C*, *KIN6*, *KIN7A*, *KIN7O*, *KIN10A*, *KIN12B*, *KIN12D* - 58°C; *KIN5A*, *KIN5D* - 59°C; *KIN7D*, *KIN12A*, *KIN12F* - 60°C.

Ділянки послідовностей *atg8a* (358 п.н.), *atg8b* (413 п.н.), *atg8c* (425 п.н.), *atg8d* (559 п.н.), *atg8e* (453 п.н.), *atg8f* (480 п.н.), *atg8g* (470 п.н.), *atg8h* (454 п.н.), *atg8i* (429 п.н.) та *tua1* (560 п.н.), *tua2* (654 п.н.), *tua3* (585 п.н.), *tua4* (437 п.н.), *tua5* (470 п.н.), *tua6* (459 п.н.), *elp3* (737 п.н.), *hda6* (736 п.н.), *hda14* (436 п.н.), *hxx1* (500 п.н.), *hxx2* (700 п.н.), *hxx3* (615 п.н.), *KIN1* (666 п.н.), *KIN5A* (727 п.н.), *KIN5B* (618 п.н.), *KIN5C* (684 п.н.), *KIN5D* (400 п.н.), *KIN6* (461 п.н.), *KIN7A* (481 п.н.), *KIN7O* (624 п.н.), *KIN7D* (554 п.н.), *KIN10A* (432 п.н.), *KIN12A* (573 п.н.), *KIN12B* (683 п.н.), *KIN12D* (618 п.н.), *KIN12F* (567 п.н.), було ампліфіковано із синтезованої кДНК за допомогою ПЛР з використанням відповідних праймерів:

*atg8a*_forward 5'-GGGTTTGTTCCTCCCCCGAT-3',
*atg8a*_reverse 5'-AGCAGTTGGAGGCAATGTGT-3',
*atg8b*_forward 5'-ACCCTAAATCCATCCTCTCTGTT-3',
*atg8b*_reverse 5'-TGGCTTTTTTCAGCTCCAAGC-3',
*atg8c*_forward 5'-ACAGGACAAATGGCAACAAAGG-3',
*atg8c*_reverse 5'-GCACAAAAGCATTTGGAAGGCA-3',
*atg8d*_forward 5'-TCTTGTGTTCCGTGGTTCGAG-3',
*atg8d*_reverse 5'-ACACCATGAACGGAAGACCT-3',
*atg8e*_forward 5'-CAGAGTTTTATCCTTATCCGTTCCA-3',
*atg8e*_reverse 5'-AGCATTAAAACGTGGCGGAT-3',
*atg8f*_forward 5'-GTAGTCTACAGGCGTGGAAAGG-3',
*atg8f*_reverse 5'-AGGTGGCTTGCTTGCTTAGTA-3',
*atg8g*_forward 5'-GTCAGCTTCAGGCAGGATCA-3',
*atg8g*_reverse 5'-ACCGATTGGTTGTGCCTACAT-3',
*atg8h*_forward 5'-TGCCAGACATGGAGAAGAACA-3',
*atg8h*_reverse 5'-CGTGTGAATCATCATCACTTGGT-3',

atg8i_forward 5'-CCTTTTACTTCGCCGCTTG-3',
atg8i_reverse 5'-ATCAACCAAAGGTTTTCTCACTGC-3',
tua1_forward 5'-GGGAGAGCCAACAAAACAACC-3',
tua1_reverse 5'-GGACAAGCGCTCCAACAGTA-3',
tua2_forward 5'-CTGAGGTTCGATGGTGCCTT-3',
tua2_reverse 5'-TCCCACATAAAACCGACAACCT-3',
tua3_forward 5'-TTGTTGACTGGTGCCCAACT-3',
tua3_reverse 5'-TAGCGCACCGATAGACGAGA-3',
tua4_forward 5'-TTTCTTCCACGAAAATGAGAGAGTG-3',
tua4_reverse 5'-AACAGCGTTGAAGACGAGGA-3',
tua5_forward 5'-GCAGAGCATCGCTCGAATTA-3',
tua5_reverse 5'-CCACCACCAACAGCATTGAA-3',
tua6_forward 5'-ACAGCATCAAACACCTTCCTCA-3',
tua6_reverse 5'-TGTAATGACCACGGGCGAAA-3'.
elp3_forward 5'-GACTTGTCCTTGGGTGAGGG -3',
elp3_reverse 5'-GGGCCTTCCTAATTGCCTGT -3',
hda6_forward 5'-CTACTACGGTCAAGGCCACC -3',
hda6_reverse 5'-GGAGTCAGCACCACACTGAA -3',
hda14_forward 5'-GGAGCCGGAATGGCTTTAGT -3',
hda14_reverse 5'-TGAACCGTTGAGCACATGGA -3',
hvk1_forward 5'-AATGGCATGGTCTGCTTCCA-3',
hvk1_reverse 5'-CGATTTCTGCACCTCCTCGT-3',
hvk2_forward 5'-TTGAGAATTGGGCGAGGGAG-3',
hvk2_reverse 5'-GCCGGTGCCCAAATAACTG-3',
hvk3_forward 5'-AAAGACTGCGCCACTCCTAC-3',
hvk3_reverse 5'-CACACCGACCATCACATCCT-3',
KIN1_forward 5'-TTCGGTGGAGGCATTACAACA-3',
KIN1_reverse 5'-ACGGTTTCCACTTCAGCCAT-3',
KIN5A_forward 5'-CGCCAAGGATCATCTTCCCA-3',

KIN5A_reverse 5'-ACGGAGGTCGACCGTTACTA-3',
KIN5B_forward 5'-CGTGCAAAGGGGTTACGTTG-3',
KIN5B_reverse 5'-AATGGCTTCCACCACGTCAT-3',
KIN5C_forward 5'-GCCGGTGAGACAGAATAAGAGA-3',
KIN5C_reverse 5'-TGAGAGGCAACGGCTTCTTT-3',
KIN5D_forward 5'-GGGTTTTGCTTCCGGGAAAAG-3',
KIN5D_reverse 5'-GGCAGCAACTTCTCTACGGT -3',
KIN6_forward 5'-AAACCCACGACGTTCCCTAC-3',
KIN6_reverse 5'-GCCGCCAACATTCCACTTTT-3',
KIN7A_forward 5'-ATCCGCAAACCTCGAACACCT-3',
KIN7A_reverse 5'-AAGCTGAAAGCGGAGAGCAT-3',
KIN7O_forward 5'-TGCATCTGGCGAACTCACTT-3',
KIN7O_reverse 5'-GTGCTTGCATACCCCTGAGT-3',
KIN7D_forward 5'-AGCCTCCTCGTTTCTTCACC-3',
KIN7D_reverse 5'-CTCCTCTGACGGGTAGGGAA-3',
KIN10A_forward 5'-CTCCTCTGACGGGTAGGGAA-3',
KIN10A_reverse 5'-TTGCCACTTGAGCTCCACAT-3',
KIN12A_forward 5'-CTCAGATGTTGCCATGGAGGA-3',
KIN12A_reverse 5'-CTAGATGCCAACCGCTCAGT-3',
KIN12B_forward 5'-TAGCGTCGCTCCAGTAAGTG-3',
KIN12B_reverse 5'-ACTGTTGCACCAGCCGATTA-3',
KIN12D_forward 5'-TCCGAGCTTCGCTTTTGTCT-3',
KIN12D_reverse 5'-CTGGTGGTCCAATCCATGCT-3',
KIN12F_forward 5'-CATGGCAGACAATCGCATCG-3',
KIN12F_reverse 5'-GCAGGACCCACATTTGTGTA-3'.

Дизайн праймерів проводили, враховуючи такі критерії: вміст GC ~ 40—60%; відсутність неспецифічних вторинних структур — шпильок і димерів; близькі температури відпалу пари 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. Для нормалізації зображень транскрипційних профілів експресії генів отримані значення приводили до умовних одиниць вимірювання. Середні значення показників рівнів експресії генів на усіх часових проміжках після опромінення УФ-В отримували шляхом співвідношення значення рівня експресії у експериментальній точці дослідження до контролю на аналогічному часовому проміжку. Після цього проводили статистичну обробку отриманих даних та підрахунок середнього значення та стандартного відхилення 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.

5.12. Імуногістохімічний аналіз α -тубуліну у зрізах проростків *A.thaliana*

Для проведення імуногістохімічного аналізу α -тубуліну у зрізах проростків *A. thaliana*, попередньо були підготовлені парафінові зрізи рослин. Для цього, проростки *A. thaliana* були зафіксовані у фіксаторі Буена, фіксацію проводили протягом 24 год. Дегідратацію зразків та формування парафінових зрізів для імуногістохімічного аналізу проводили, як описано в п.5.9. Для подальшого імуногістохімічного аналізу, зрізи депарафінізували ксилолом тричі по 10 хв і регідрували (100%, 96% и 70% спиртом и деіонізованою водою). Розчини для проведення експерименту готували, використовуючи буфер PBS-T. Для блокування сайтів неспецифічного зв'язування антитіл, гістологічні зрізи відмивали PBS-T та 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 моноклональні антитіла до ацетильованого α -тубуліну (Ac-tubulin mouse, Sigma, T6793) у розведенні 1:100. Інкубацію з первинними антитілами проводили протягом ночі за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Інкубації зі вторинними антитілами проти IgG миші, кон'юговані з пероксидазою хрому (anti-mouse IgG - Peroxidase antibody, Sigma, A3682) у розведенні 1:100 проводили протягом 1 год. Після чого зрізи відмивали, як описано вище, і фарбували за допомогою набору DAB Substrate Kit (Pierce, США), згідно рекомендацій виробника. Для аналізу зразків, зрізи були заключні під покривні скельця з використанням DEPEX Mounting Media (SERVA, Німеччина)

5.13. Структурно-біологічна оцінка взаємодії α -тубуліну з Atg8a, і ацетильованого α -тубуліну з Atg8a

Множинне вирівнювання послідовностей проводили з використанням програми ClustalX2.1 (<http://en.bio-soft.net>). Структури білків α -тубуліну і Atg8a, продуктів генів *A.thaliana*, були передбачені за допомогою сервера Swiss [130]. Моделювання гомології проводили на основі послідовностей з баз даних UniProt (<http://www.uniprot.org>) і шаблонів з банку даних білків RCSB (www.rcsb.org). Автоматичне порівняння і моделювання білків за допомогою Swiss-model сервера обробляється декількома інструментами перевірки якості оцінки структури.

Для оцінки якості моделі використовували алгоритм QMEAN [131]. Білок-білковий докінг проводили за допомогою сервера Haddock [132] з використанням напівгнучкої процедури пошуку. Передбачення сайтів зв'язування проводили у середовищі серверів PRED-PPI [133] і MetaPPI (<http://projects.biotec.tu-dresden.de/metappi/>). Всі симуляції молекулярної динаміки (МД) виконували за допомогою програми Gromacs 4.5.5 [134] у силовому полі CHARMM36. Кожну систему розміщували у боксі з шаром

молекул води, моделі TIP3P, у 10 Å. Кінцеві системи були нейтралізовані шляхом додавання іонів Na⁺ та Cl⁻ шляхом заміни молекул води. Симуляції були проведені у граничних умовах з NPT-ансамблем, використовуючи алгоритм термостата Берндасена для підтримки температури (310 K) і константи тиску (1 бар). Для фіксації зв'язків, що містять атоми водню під час стримування положення і вільної МД, був використаний алгоритм LINCS.

РОЗДІЛ 6. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

6.1. Вплив абіотичних стресових факторів на розвиток проростків *A. thaliana*. Синергічний вплив стресових факторів та інгібування аутофагії

Для дослідження впливу абіотичних стресових факторів на розвиток проростків *A. thaliana* нами було проаналізовано рослини, що зазнавали впливу голодування, осмотичного та сольового стресів, а також були опромінені УФ-В, та визначено зміни довжини коренів та гіпокотилів контрольних та експериментальних рослин (рис. 6.1, А; рис.6. 2).

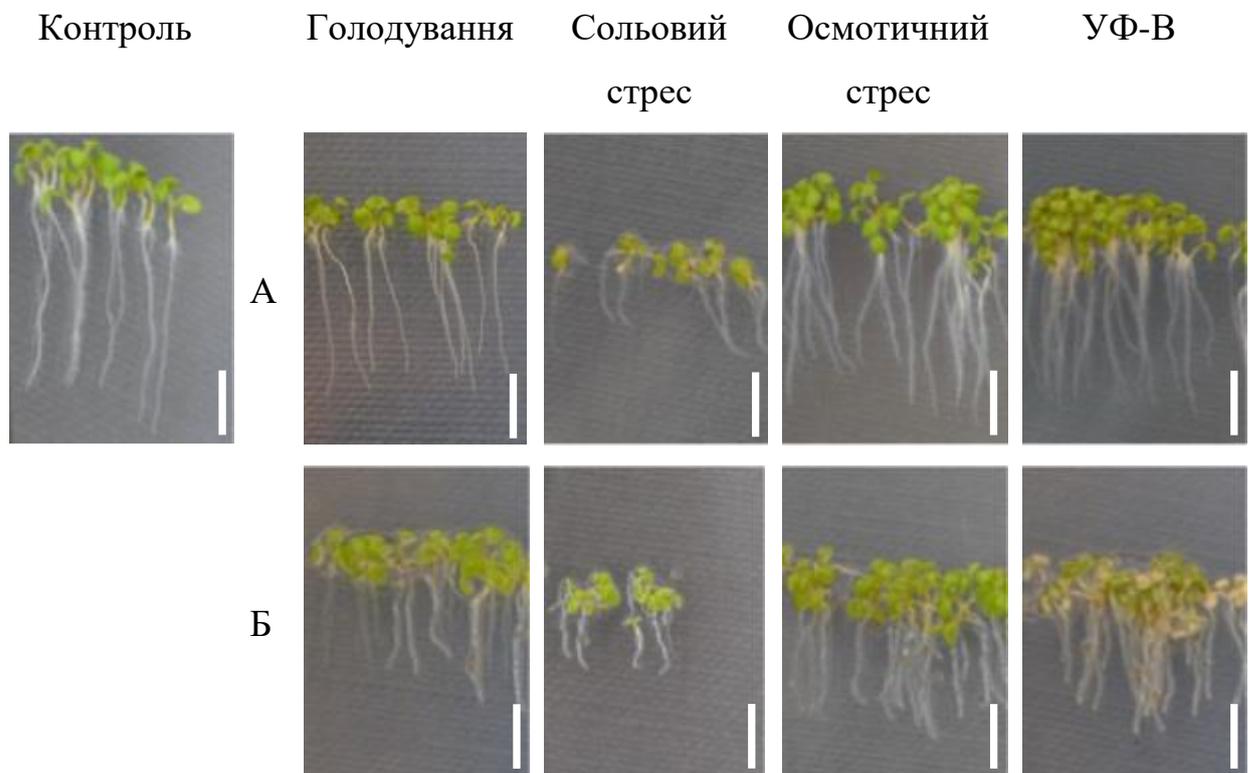


Рис. 6.1. Зміни фенотипу проростків *A. thaliana* за умов: голодування (середовище МС без сахарози), сольового стресу (150 мМ NaCl), осмотичного стресу (10 мМ манітолу) та опромінення УФ-В (41кДж/м²). А – без попередньої інкубації з Е-64. Б – з попередньою інкубацією з Е-64. Бар – 0,5 см.

Було показано, що в умовах осмотичного стресу та голодування, середня довжина коренів зменшувалась на 23-25% по відношенню до контролю. При опроміненні рослин УФ-В спостерігали зниження середнього показнику росту на 15%. Найнижчі показники продемонстрували рослини, що вирощувалися на середовищу з додаванням 150 мМ NaCl, у яких середня довжина коренів знижувалася майже на 60%.

Незважаючи на різний механізм дії абіотичних факторів, рослини розвинули низку загальних адаптивних внутрішньоклітинних механізмів, таких як контроль темпів росту, за рахунок регуляції процесів біосинтезу клітинної стінки, синтезу білків та поділу клітин тощо [4, 93, 94, 101, 135]. Нами було показано, що наслідком впливу усіх досліджуваних стресів є пригнічення росту рослин.

Одним із наслідків дії даних стресових чинників є індукція аутофагії як внутрішньоклітинного адаптивного механізму. Для дослідження ролі аутофагії у реалізації адаптивної відповіді клітин на дію абіотичних стресів, нами було проаналізовано проростки *A. thaliana*, вирощені у стресових умовах з додаванням або без E-64, високо селективного інгібітору цистеїнових протеаз, що викликає інгібування аутофагії на стадії деградації вмісту аутолізосом [136] (рис. 6.1, рис.6.2).

Було показано, що за умов синергічного впливу стресових факторів та інгібування аутофагії, показники довжин коренів суттєво знижувалися, у порівнянні з рослинами, що не інкубувалися з E-64. А саме, при голодування та осмотичному стресі, зазначений показник знижувався в середньому ще на 10%, а при сольовому стресі на 14%. При опроміненні рослин ультрафіолетом-В, спостерігали достовірне зниження середнього показнику росту від 15 до 46%, без та з додаванням E-64, відповідно.

Враховуючи, що E-64 блокує аутофагію на етапі деградації вмісту аутофагосом, а отже, блокує процес аутофагії в цілому, отримані результати свідчать про адаптивну функцію аутофагії за умов впливу абіотичних стресів.

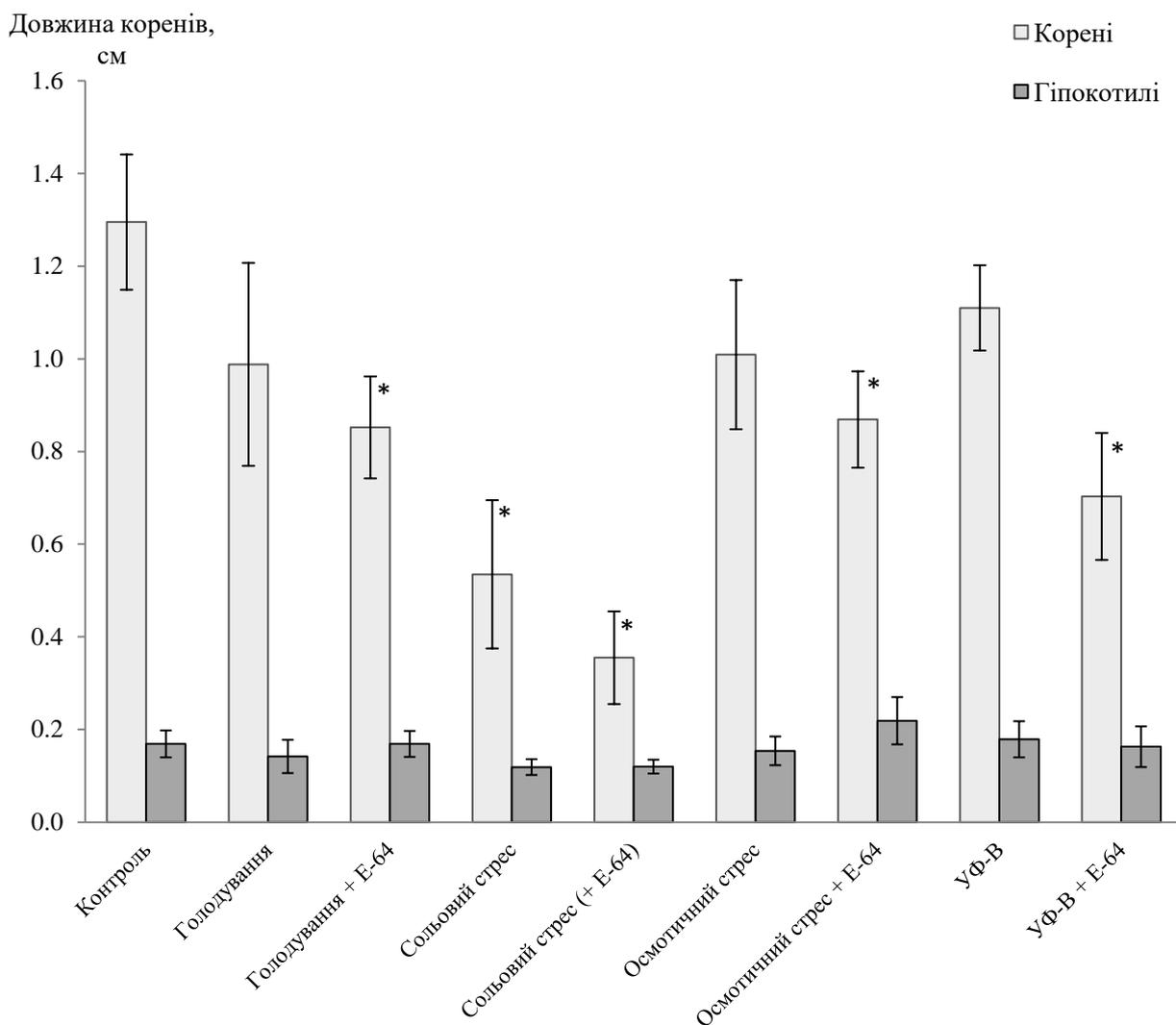


Рис. 6.2. Вплив стресових факторів на ростові показники коренів та гіпокотилів проростків *A. thaliana*; * - зниження середнього показнику росту у порівнянні з контролем достовірно, $p < 0,05$.

В цьому підрозділі ми проаналізували вплив голодування, УФ-В, осмотичного та сольового стресів на розвиток проростків *A. thaliana*. Було задетектовано зниження темпів росту у тій чи іншій мірі при дії усіх стресових чинників. Досліджуючи синергічний вплив стресових факторів та інгібування аутофагії, було показано зниження показників росту рослин, що зазнавали дії стресу без попередньої обробки інгібітором аутофагії. Отримані результати вказують на адаптивну роль аутофагії у відповідь на вплив абіотичних стресів.

Матеріали цього підрозділу опубліковано в [137].

6.2. Дослідження розвитку аутофагії на морфологічному рівні внаслідок впливу абіотичних стресів

6.2.1. Дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії з використанням флуоресцентної мікроскопії

Для прижиттєвого дослідження розвитку аутофагії в клітинах *A. thaliana* нами було використано флуоресцентний барвник монодансилкадаверин (MDC), що є загальноживаним маркером аутофагосом [138]. Для дослідження виживаності клітин проростків використовували флуоресцентні барвники пропідіум йодид (PI) та флуоресцеїн-діацетат (FDA). Для дослідження ацидифікації цитоплазми клітин, як показнику розвитку аутофагії, використовували флуоресцентний барвник акридин оранжевий (АО).

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 аутофагосомам (рис. 6.3, рис. 6.4). Також було виявлено, що усі абіотичні стреси мали наслідком незначне зниження рівня виживаності клітин. Зокрема, за умов голодування, як і за умов осмотичного стресу, клітини демонстрували високий рівень виживаності та в той же час появу ознак розвитку аутофагії. У свою чергу, сольовий стрес також мав наслідком появу MDC-позитивно забарвлених структур, проте показник виживаності клітин був знижений, у порівнянні з голодуванням та осмотичним стресом. Відповідь клітин на опромінення УФ-В характеризувалася досить високим показником виживаності та активним перебігом аутофагії (рис. 6.4).

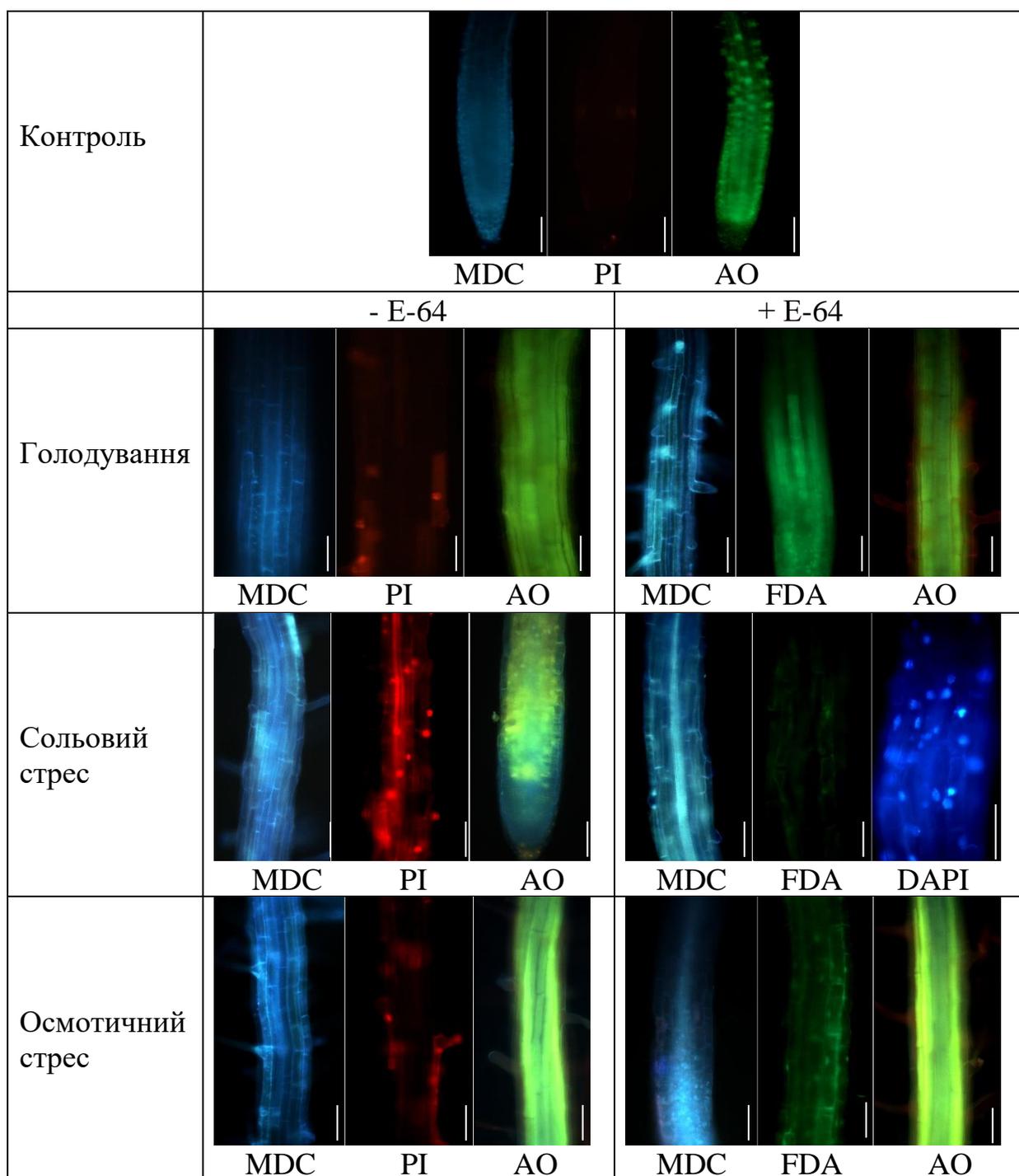


Рис. 6.3. Морфологічні ознаки розвитку аутофагії в клітинах кореня проростків *A. thaliana* під впливом голодування, сольового або осмотичного стресу та опромінення УФ-В: MDC – монодансилкадаверин, PI – пропідіум йодид, FDA – флуоресцеїн діацетат, AO – акридин оранжевий. Бар - 50 мкм.

У той же час слід зазначити, що при опроміненні УФ-В розвиток процесів аутофагії був притаманний усім тканинам дослідних рослин

(наземним та підземним), в той час, як дія інших стресових факторів мала вплив лише на клітини кореня (рис. 6.5).

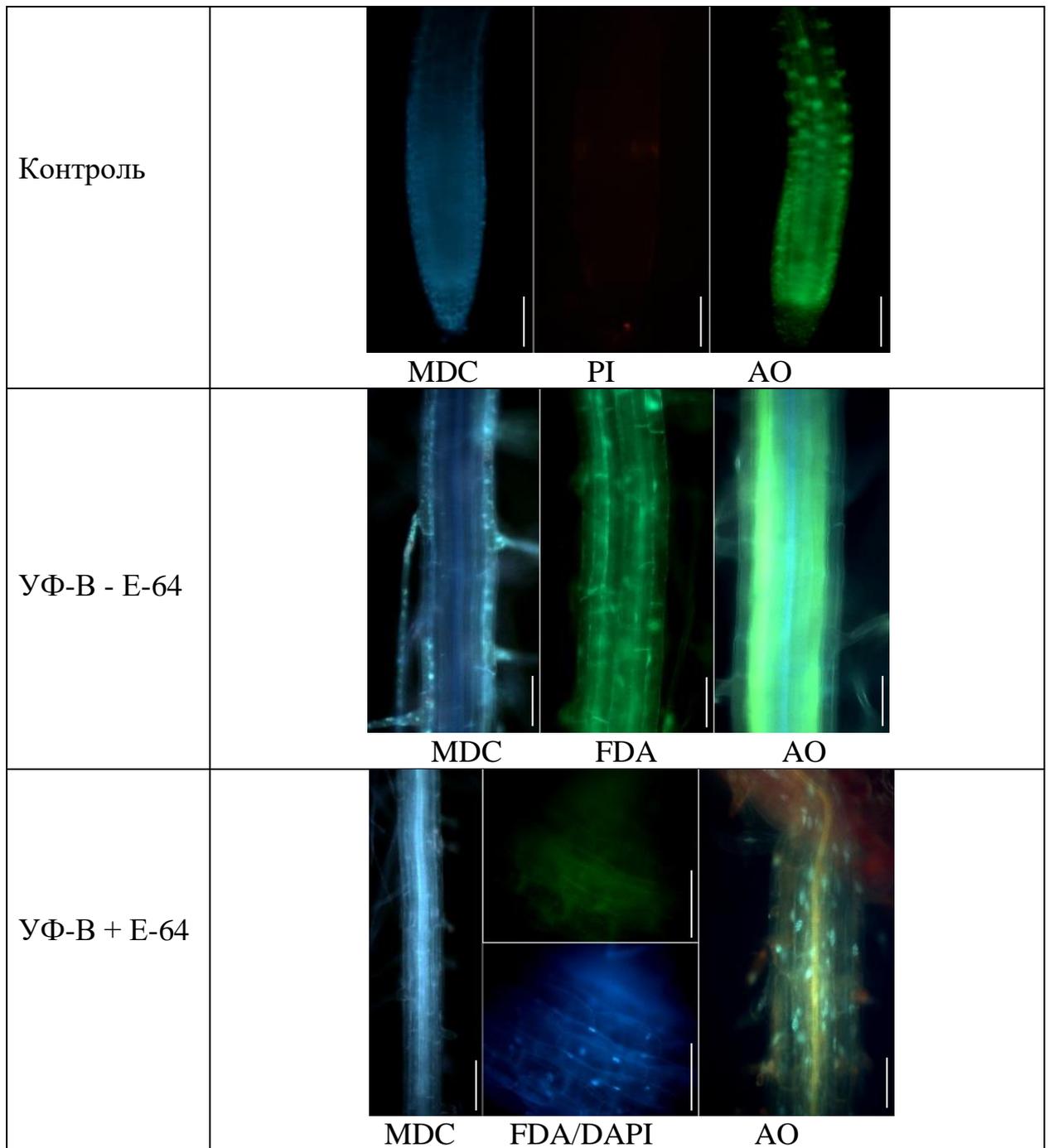


Рис. 6.4. Морфологічні ознаки розвитку аутофагії в клітинах кореня проростків *A.thaliana*, що вирощувалися за опромінення ультрафіолетом-В. MDC – монодансилкадаверин, PI – пропідіум йодид, FDA – флуоресцеїн діацетат, АО – акридин оранжевий. Бар - 50 мкм.

В умовах синергічної дії стресового впливу та інгібітору аутофагії E-64, проростки демонстрували зниження виживаності клітин. Також, важливим спостереженням було підвищення кількості клітин, що мали апоптичну морфологію ядра (наявність характерних апоптичних мікроядер при забарвленні клітин DAPI).

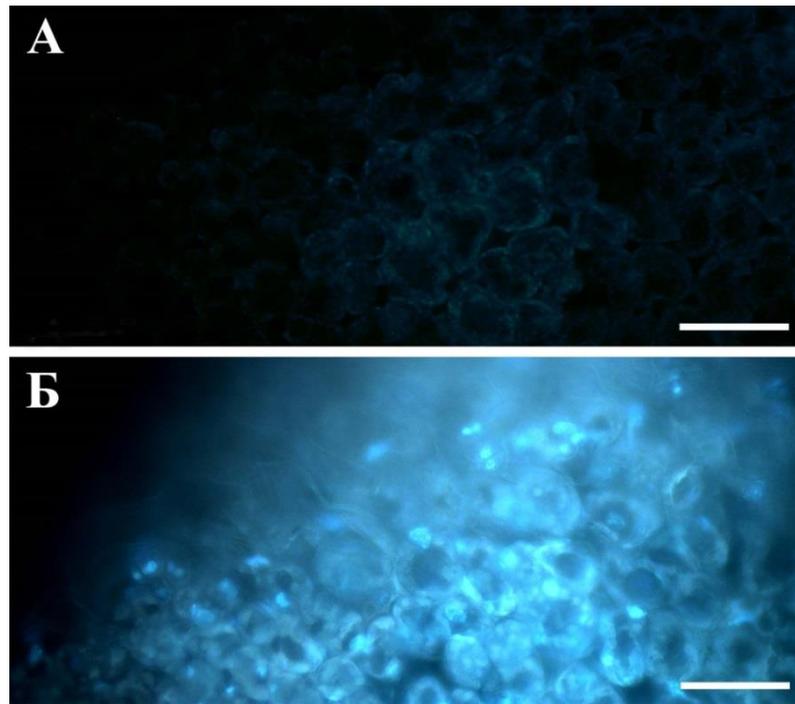


Рис. 6.5. Поява MDC-позитивно забарвлених структур в клітинах листа *A. thaliana* після опромінення УФ-В (41кДж/м²). А – контроль, Б – опромінені рослини; MDC – монодансилкадаверин. Бар - 50 мкм.

При дослідженні ацидифікації цитоплазми, як характерної ознаки розвитку процесу аутофагії, спостерігали підвищення рівня закислення цитоплазми за умов дії усіх стресових факторів у тій чи іншій мірі. При чому, у випадку використання інгібітору аутофагії E-64, усі досліджувані зразки демонстрували підвищене закислення цитоплазми, у порівнянні зі зразками, необробленими інгібітором. З огляду на те, що синергічна дія абіотичних стресів та E-64 індукує розвиток первинних етапів аутофагії, однак, блокує подальший перебіг цього адаптивного процесу на стадії деградації вмісту аутолізосом, у клітинах відбувається накопичення зазначених структур.

Враховуючи, що аутолізосоми мають рН у кислому діапазоні, накопичення їх у клітинах буде викликати загальне закислення цитоплазми.

Загалом, результати морфологічного дослідження проростків *A. thaliana*, що зазнавали голодування, осмотичного та сольового стресів, а також опромінювалися УФ-В, продемонстрували розвиток аутофагії у клітинах, як наслідок впливу усіх зазначених абіотичних стресів. А при синергічному впливі стресових чинників та інгібітору аутофагії спостерігали зниження показників виживаності клітин.

У попередніх дослідженнях на клітинах суспензійної культури ВУ-2 нами було показано чітку синхронізацію в часі процесів виснаження сахарози в живильному середовищі, зниження концентрації тотального білка та збільшення відсотка клітин з морфологічними ознаками аутофагії [139]. Так, на початкових стадіях культивування при наявності в середовищі цукрів, кількість клітин з аутофагією не перевищувала 3%. При різкому зниженні концентрації сахарози, спостерігалась тенденція до розвитку аутофагії зі збільшенням позитивно забарвлених клітин до 7%, а в подальшому цей показник досягав 42%, що корелювало з повним виснаженням середовища за сахарозою, при чому клітини виявляли досить високі показники виживаності. [139].

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.

6.2.1. Дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії з використанням конфокальної лазерної скануючої мікроскопії

Особливості розвитку стрес-індукованої аутофагії у клітинах лінії *A. thaliana* прижиттєво візуалізували за допомогою сигналу від зеленого

флуоресцентного білка із використанням створеної нами лінії *A. thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-GFP.

При дослідженні рослин методом конфокальної мікроскопії було виявлено, що контрольні рослини характеризувалися дифузною локалізацією сигналу Atg8h-eGFP, як у наземних, так і у підземних органах рослин, що не мала жодних ознак колокалізації з клітинними структурами (рис. 6.6, А). Однак, за умов впливу абіотичних чинників, спостерігали появу чітко визначених, зосереджених сигналів від Atg8h-GFP.

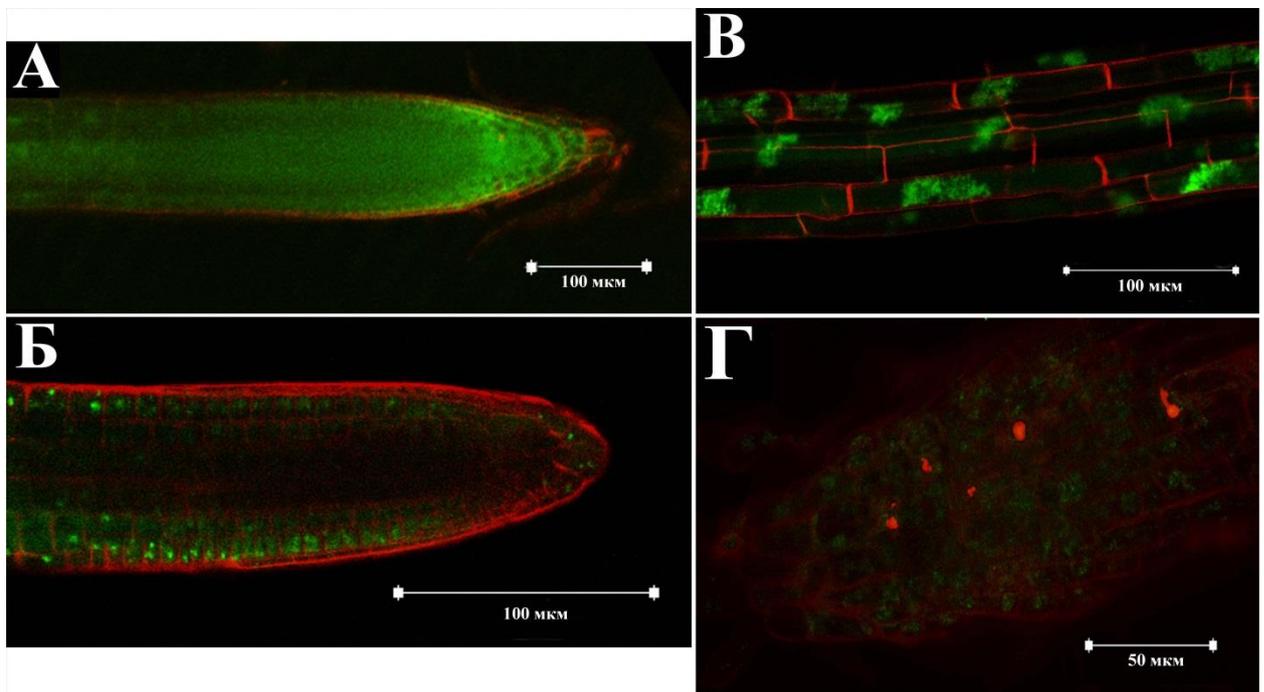


Рис. 6.6. Візуалізація химерного білку Atg8h-GFP у коренях 7-денних проростків *A. thaliana* за допомогою конфокальної мікроскопії: А – контрольні клітини кореня; Б – формування аутофагосом у клітинах кореневого чохла, епідермісу та перициклу під впливом метаболічного стресу; В – формування аутофагосом у клітинах провідної системи кореня в умовах голодування; Г – формування аутофагосом у епідермальних клітинах гіпокотіля після опромінення УФ-В.

Враховуючи, що для вбудовування у мембрану аутофагосом, Atg8 зазнає модифікації, протягом якої С-кінець молекули разом з GFP відщеплюється протеазою Atg4 [140], отримані результати дають нам можливість стверджувати, що зосереджені сигнали від GFP, що з'являються під впливом абіотичних стресів, хоча і не є власне аутофагосомами, проте, знаходяться у безпосередній близькості до них. Atg8, вочевидь, накопичується локально, у сайті формування фагофору, безпосередньо перед процесом модифікації та вбудовування у мембрану аутофагосоми.

Зокрема, на 7-й день культивування в умовах голодування, сольового та осмотичного стресів спостерігали активний розвиток аутофагії у коренях проростків, а саме, у клітинах кореневого чохла, епідермісу та перициклу, та клітинах провідної системи кореня (рис. 6.6, Б, В). На відміну від вище зазначених стресів, опромінення УФ-В викликало масовий розвиток аутофагії, як у коренях, так і наземних тканинах, зокрема, у гіпокотиліях (рис. 6.6, Г).

Більш того, було виявлено чітку колокалізацію зосереджених сигналів Atg8h-GFP та флуоресцентного барвника монодансилкадаверину, що вважається загальноприйнятим маркером аутофагосом (рис.6.7). Стрілка на рисунку вказує на зосереджені сигнали від структур, забарвлених монодансилкадаверином і колокалізованих з сигналами від Atg8h-GFP.

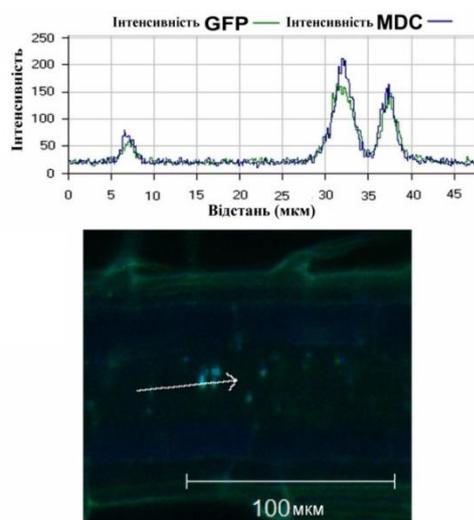


Рис. 6.7. Колокалізація сигналів від MDC-позитивно забарвлених структур та Atg8h-eGFP у клітинах кореня проростків *A. thaliana* за умов голодування.

Вплив усіх стресових чинників мав наслідком появу структур, розміром 1-30 мкм. Кількість таких структур варіювала від 1 до декількох на клітину.

На даному етапі роботи було показано, що голодування, сольовий та осмотичний стреси індукують розвиток аутофагії, як захисного механізму, проте, даний процес не поширюється за межі кореневої системи. З іншого боку, аутофагія, індукована опроміненням УФ-В, вірогідно, розвивається безпосередньо у опромінених клітинах, а тому може бути виявлена як у підземних, так і наземних тканинах рослин.

Матеріали цього підрозділу викладено в наступних публікаціях [137, 141, 142].

6.3. Інгібування аутофагії, як чинник, що ініціює розвиток стрес-індукованої програмованої клітинної загибелі клітин *A. thaliana*

Процеси програмованої клітинної загибелі у рослин опосередковують розвиток організму як за фізіологічних умов (формування і проростання насіння, розвиток зародка, утворення провідних тканин ксилеми, тканиноспецифічне старіння), так і при патогенній інвазії та за умов дії абіотичних стресових чинників [107, 108]. З огляду на те, що механізм аутофагії є адаптивною відповіддю на дію стресів, можливо припустити, що інгібування аутофагії додатково індукуватиме розвиток ПКЗ клітин рослин. Тому, для з'ясування взаємозв'язку процесів аутофагії та програмованої клітинної загибелі в клітинах арабідопсису за даних експериментальних умов, нами було проведено TUNEL-аналіз гістологічних зрізів рослин, що зазнавали впливу абіотичних стресів.

У контрольних рослин ми спостерігали невисокий рівень програмованої клітинної загибелі - близько 6% TUNEL-позитивних клітин (рис.6.8, рис.6.9). Даний показник знаходиться у межах фізіологічного значення, оскільки процеси ПКЗ, як і аутофагії, конститутивно реалізуються у клітинах кінчику кореня та клітинах, що механічно пошкоджуються при проростанні кореня.

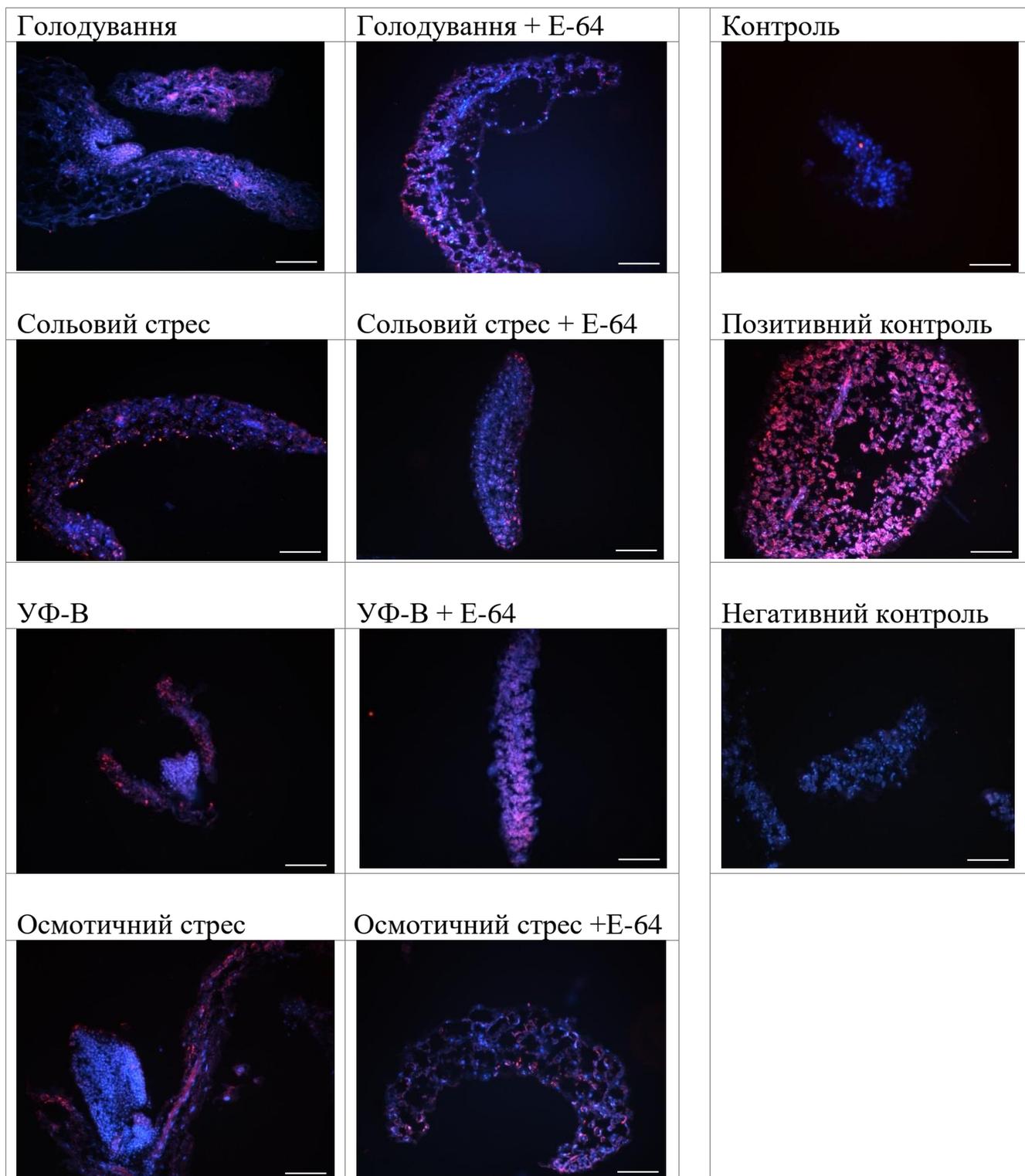


Рис. 6.8. TUNEL-аналіз зразків *A. thaliana* за умов впливу УФ-В (41кДж/м²), голодування, сольового та осмотичного стресів. Бар – 50 мкм.

Підрахунок TUNEL-позитивних клітин здійснювали за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d), <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Inoue Y. та ін. показали, що на відміну від клітин суспензійної культури тютюну BY-2 (*Nicotiana tabacum*), у яких в умовах достатньої кількості

поживних речовин відсутні будь-які прояви аутофагії, у клітинах арабідопсису процес аутофагії є конститутивним, навіть за відсутності впливу будь-яких стресових факторів [136].

Досліджуючи вплив абіотичних стресів на розвиток програмованої клітинної загибелі у клітинах *A. thaliana*, нами було показано, що за умов впливу осмотичного, метаболічного та сольового стресів, показник кількості клітин у стані програмованої клітинної загибелі сягав 18-21%.

Синергічний вплив зазначених стресових чинників та інгібування аутофагії мав наслідком підвищення відсотку TUNEL-позитивних клітин, проте значення відрізняються недостовірно.

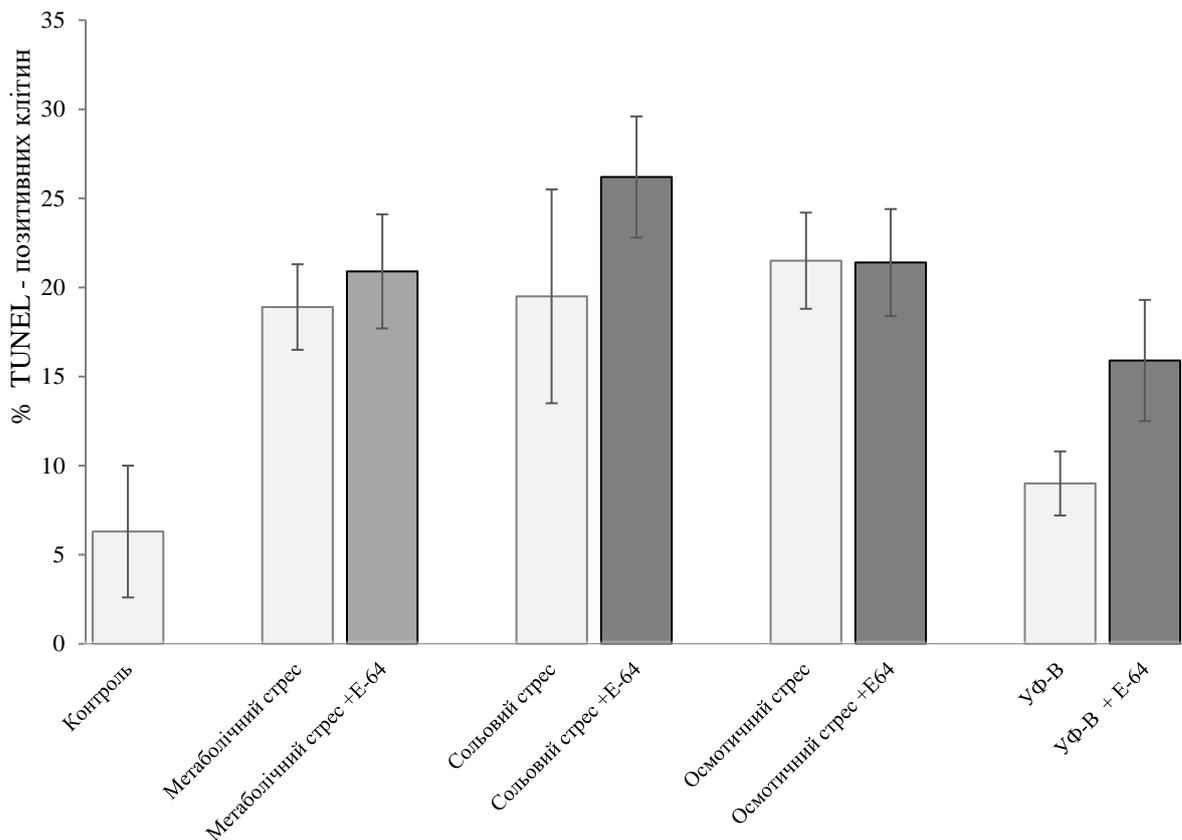


Рис. 6.9. Показники кількості TUNEL-позитивних клітин проростків *A. thaliana*, що зазнавали дії стресових факторів, а також їх синергічного впливу інгібітору аутофагії E-64.

За умов опромінення проростків ультрафіолетом-В, спостерігали дещо відмінні результати, а саме, кількість TUNEL-позитивних клітин складала 9%,

причому за умов обробки інгібітором аутофагії, цей відсоток зростав до 16% (рис. 6.9). Таке підвищення кількості клітин у стані ПКЗ є очікуваним, оскільки E-64 інгібує цистеїнові протеази та блокує процеси аутофагії на етапі деградації вмісту аутолізосом, а отже, знижує здатність клітин до виживання, що було підтверджено методом TUNEL-аналізу.

Отримані результати ілюструють той факт, що аутофагія є процесом, залученими до реалізації ПКЗ, або ж є етапом, що передує розвитку програмованої клітинної загибелі. Наразі, характер взаємодії цих двох основоположних механізмів є недостатньо зрозумілим, однак, результати TUNEL-аналізу дають нам можливість стверджувати, що реалізація аутофагії у відповідь на дію стресу є адаптивною захисною реакцією, що забезпечує високий рівень виживаності клітин у негативних умовах зовнішнього середовища. Достовірне підвищення кількості клітин у стані ПКЗ за умов передобробки інгібітором аутофагії при опроміненні проростків *A.thaliana*, підтверджує вагомий роль аутофагії у функціонуванні рослинних організмів, особливо, в умовах стресу.

Механізми розвитку програмованої клітинної загибелі, індукованої впливом абіотичних стресових чинників на клітини рослин, все ще є малодослідженими. Однак, вже було показано, що УФ-В опромінення клітин суспензійної культури тютюну (*Nicotiana tabacum*) ВУ-2 має наслідком появу характерних ознак ПКЗ (конденсація хроматину, нуклеосомна фрагментація ДНК, формування мікроядер та ацидифікація цитоплазми) [106]. Також, на протопластах клітин суспензійної культури ВУ-2 було показано, що культивування у середовищі, що містило 200 мМ NaCl, тобто в умовах сольового стресу, викликало появу ознак, характерних для розвитку ПКЗ (ретракцію протопласту, підвищення рівня продукції активних форм кисню, деполіаризацію мембран мітохондрій та формування мітохондріальних пор, а також нуклеосомну фрагментацію ДНК) [125]. Схожі результати були отримані при дослідженні клітин ВУ-2, що зазнавали осмотичного стресу,

умови якого створювали шляхом додавання 400 мМ сорбітом у поживне середовище [124].

Проведені дослідження вцілому вказують на загальні наслідки впливу абіотичних стресів, проте, молекулярні механізми індукції та реалізації ПКЗ наразі є недостатньо вивченими. Зокрема, однією з клітинних структур, що можуть бути мішенню впливу стресів, відтак і опосередковувати розвиток ПКЗ, є мікротрубочки. На сьогоднішній день експериментальних даних, котрі описували би механізми впливу і наслідки опромінення УФ-В, голодування, сольового або осмотичного стресів на цитоскелетні структури, вкрай мало. Красиленко Ю. та ін. показали, що вплив УФ-В має дозо-залежний характер і викликає порушення структури МТ мікротрубочок та їх деполімеризацію в клітинах кореня *A.thaliana* [105]. Зокрема, опромінення у дозі 34 кДж/м² здатне викликати порушення організації МТ епідермальних клітин кореня, збільшення (свелінг) клітин зони диференціювання кореня та появу коротких пучків МТ у вищезазначених клітинах. В свою чергу, опромінення УФ-В у дозі 68 кДж/м² спричиняє деполімеризацію МТ у епідермальних клітинах, а також клітинах кортексу усіх зон кореня [105]. Більш того, схожі результати були отримані на культурі клітин тютюну *N. tabacum* ВУ-2. А саме, опромінення УФ-В у дозах 34, 81 та 135 кДж/м² призводить до деполімеризації як інтерфазних, так і мітотичних МТ, що корелює у часі з ущільненням цитоплазми і стисканням клітин, конденсацією хроматину та формуванням мікроядер [143].

Wang С. Та ін.. проводили дослідження впливу сольового стресу на 3-денні проростки *A. thaliana* [6]. Автори показали, що через 24 год після перенесення проростків на поживне середовище, що містило 50 мМ NaCl, відбувалася деполімеризація мікротрубочок, а додавання 100 мМ NaCl у середовище мало наслідком значну фрагментацію кортикальних мікротрубочок [6]. Використання 200 мМ сорбітолу в якості осмотичного стресу для кукурудзи *Zea mays*, не впливало на організацію МТ в апікальній частині кореня (2 мМ), проте призводило до суттєвих змін в його базальній

ділянці, зокрема, формуванню округлих отворів у схемі розташування мікротрубочок [100].

Враховуючи вагому роль мікротрубочок у індукції та реалізації аутофагії у клітинах тварин, ми можемо припустити, що однією з ланок сигналінгу для ініціації ПКЗ у рослин, є порушення функціонування мікротрубочок. Вірогідно, що передчасна деполімеризація мікротрубочок, або зміна їх білкового мікрооточення, інгібує ініціацію або перебіг аутофагії, що служить додатковим стимулом для розвитку програмованої клітинної загибелі у рослин.

В цьому підрозділі було показано, що вплив абіотичних стресів мав наслідком зниження виживаності клітин, а синергічна дія стресових факторів та інгібітору аутофагії викликала підвищення кількості клітин у стані програмованої клітинної загибелі. Було зроблено висновок, що УФ-В, як стресовий фактор, що індукує аутофагію, є найбільш цікавим серед досліджуваних, оскільки опромінені проростки характеризувалися активним перебігом аутофагії та високими показниками виживаності.

Оскільки, механізм аутофагії виконує адаптивну роль у відповідь на дію стресу на ранніх стадіях культивування, а тривалий вплив абіотичних чинників викликає розвиток ПКЗ, отримані результати опосередковано свідчать, що аутофагія може бути етапом, залученим до розвитку ПКЗ.

Матеріали підрозділу опубліковано в [142, 144].

6.4. Процесинг Atg8, як свідчення розвитку стрес-індукованої аутофагії супроводжується підвищенням рівня ацетилювання α -тубуліну

Процесинг Atg8, як обов'язковий етап побудови аутофагосом при розвитку аутофагії, може слугувати беззаперечним доказом перебігу зазначеного катаболічного механізму у клітинах.

Як інструмент для дослідження аутофагії, раніше нами було створено трансгенну лінію *A.thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-

GFP. Враховуючи, що процесинг Atg8 передбачає відщеплення С-кінця молекули, підвищення рівня вільного GFP у рослин даної лінії може бути використано як достовірний доказ розвитку стрес-індукованої аутофагії. Для дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії у проростках трансгенної лінії арабідопсису, що експресує химерний білок Atg8h-GFP, було проведено Вестерн-блот аналіз зразків з використанням моноклональних антитіл до GFP (Anti-GFP, N-terminal antibody produced in rabbit, G1544, Sigma).

Було показано, що вплив усіх досліджуваних стресових чинників мав наслідком підвищення рівня вільного GFP відносно рівня Atg8h-GFP, у порівнянні з контрольними рослинами (рис. 6.10, А, Б). Незначний рівень вільного GFP був відмічений у контрольних рослин, що, вірогідно, відображає перебіг базової аутофагії.

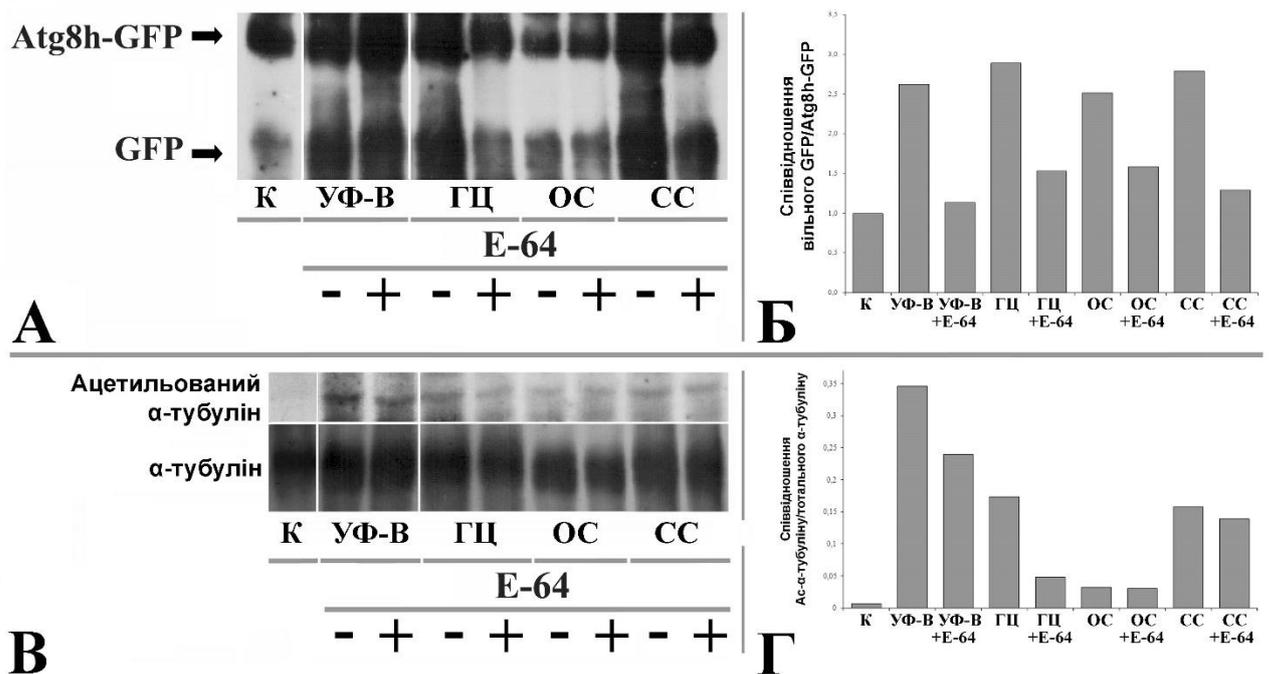


Рис. 6.10. Вестерн-блот аналіз білка Atg8h та ацетильованого α -тубуліну у проростках *A. thaliana* після дії стресових факторів (окремо або з попередньою обробкою E-64): А - GFP (вільний або у комплексі з Atg8h); Б – співвідношення рівнів вільного GFP до GFP у складі комплексу Atg8h-GFP; В – ацетильований α -тубулін; Г – рівні ацетильованого α -тубуліну відносно тотального α -тубуліну. К – контроль; УФ-В – опромінення у дозі 41кДж/м²,

ГЦ – голодування (середовище МС без сахарози); ОС – осмотичний стрес (10 мМ манітол); СС – сольовий стрес (150 мМ NaCl).

Вивільнення GFP, як достовірний доказ розвитку аутофагії у клітинах, чітко корелювало у часі з появою MDC-забарвлених структур та підвищенням рівня ацидифікації цитоплазми, що підтверджує роль опромінення УФ-В, голодування, осмотичного та сольового стресів, як чинників, що індуюють розвиток аутофагії в клітинах рослин.

Слід зазначити, що передобробка проростків інгібітором аутофагії Е-64 викликала зниження рівнів GFP/Atg8h-GFP у тій чи іншій мірі за умов впливу усіх абіотичних стресів. Механізм пригнічення вивільнення GFP (іншими словами, модифікації Atg8) інгібітором Е-64 наразі є недостатньо зрозумілим. Раніше, використовуючи FRET-аналіз, Лі та ін. показали неефективність використання Е-64d для пригнічення активності Atg4A та Atg4B для клітин НЕК-293А [145]. З огляду на це, ми можемо лише припустити наявність можливої непрямой взаємодії між Е-64 та цистеїновою протеазою Atg4, наслідком якої є пригнічення процесингу Atg8 у клітинах рослин.

Для дослідження ролі ацетилювання α -тубуліну у реалізації процесу аутофагії, нами був проведений Вестерн-блот аналіз тих самих зразків з використанням моноклональних антитіл до ацетильованого α -тубуліну. Було виявлено значне підвищення рівня модифікованого білку при дії усіх стресових факторів (рис. 6.9, В, Г). У якості контролю підрахунку використовували рівень експресії α -тубуліну. Слід зазначити, що ацетильованого α -тубуліну у контрольних рослин не було виявлено, або ж рівень модифікованого білку був незначний, у порівнянні з рослинами, що піддавалися дії стресу. Отримані результати дають можливість стверджувати, що ацетилювання α -тубуліну у рослин, так само, як і мікротрубочки цитоскелету, виконують схожу роль у реалізації аутофагії, як і у клітинах тварин. На клітинах HeLa було показано, що в умовах голодування, формування аутофагосом відбувається за участю мікротрубочок, та може бути наслідком гіперацетилювання тубуліну, що сприяє залученню кінезину-1 та

активації JNK-кінази [8]. Ацетильовані МТ беруть участь у злитті аутофагосом з лізосомами для утворення аутолізосом [146]. Однак, вірогідно, що процеси біогенезу аутофагосом реалізуються за участі динамічних популяцій мікротрубочок, а їх транспорт – за участі стабільних популяцій МТ [35], при чому регуляція динамічного стану цитоскелету може бути опосередкована ацетилюванням тубуліну [8].

Раніше були отримані біохімічні докази наявності ацетильованого α -тубуліну у складі багатьох структур мікротрубочок тютюну (препрофазна стрічка, мітотичне веретено, інтерфазні кортикальні мікротрубочки, фрагмопласт) [73], а також и для багатьох видів рослин [147]. Ця модифікація є залученою до стабілізації МТ [8], та, як показано у випадку дослідження *Brassica rapa*, є тканино-специфічною [148].

Слід зазначити, що у випадку попередньої обробки інгібітором аутофагії E-64 спостерігали зниження рівня ацетилювання α -тубуліну у тій чи іншій мірі за умов впливу усіх стресових факторів. Найбільш суттєвими були зміни у рівнях ацетилювання α -тубуліну у рослин, що зазнавали синергічного впливу E-64 та стресу, зокрема, голодування і УФ-В опромінення. У випадку одночасного інгібування аутофагії та впливу осмотичного та сольового стресів, зниження кількості модифікованого білку було незначним, у порівнянні з іншими абіотичними чинниками.

Отримані результати підтверджують роль голодування, УФ-В, осмотичного та сольового стресів як чинників, що індукують розвиток аутофагії. Підвищення рівня ацетилювання α -тубуліну, що корелює у часі з розвитком стрес-індукованої аутофагії свідчить про функціональну роль даної модифікації у реалізації зазначеного механізму. Причому, пригнічення процесингу Atg8 та зниження рівнів ацетилювання тубуліну за умов синергічного впливу E-64 та стресових чинників вказує на адаптивну роль аутофагії у відповідь на дію абіотичних стресів.

Матеріали цього підрозділу викладено в наступних публікаціях [137, 139, 141, 142, 149].

6.5. Структурно-біологічна оцінка взаємодії α -тубуліну з Atg8a, і ацетильованого α -тубуліну з Atg8a

Для проведення структурно-біологічної оцінки взаємодії білків α -тубуліну і Atg8, нами були обрані продукти генів *tua4* (at1g04820) і *atg8a* (At4g21980), що були показані, як опосередковано залучені до процесу реалізації аутофагії, як адаптивного відповіді на вплив абіотичних стресів [150, 151].

Для проведення біоінформатичного аналізу взаємодії тубуліну та Atg8, структурної молекули аутофагосом, нами були отримані моделі зазначених білків шляхом гомологічного моделювання на основі подібності з відомими просторовими структурами (PDBID: 5183, 5UBQ, 2JFF). Для оптимізації геометрії білків перед докінгом, було проведено релаксацію білків у водному середовищі протягом 30 нс моделювання молекулярної динаміки. Проведення всіх етапів мінімізації, рівноваги і вільної МД виконували за допомогою програми Gromacs 4.5.5 і силового поля CHARMM36. Передбачені сайти зв'язування були обрані за результатами обробки молекул он-лайн-серверами, а також, ґрунтуючись на літературних даних [152].

Після кожного моделювання, зрізи траєкторій були кластеризовані, а центроїд кожного кластера використовувався у якості релаксованого стану білка для подальшого білок-білкового докінгу за допомогою сервера Haddock. Для перевірки наших прогнозів щодо сайту зв'язування, ми використовували "сліпий" докинг, протягом якого відбувається обробка всієї поверхні білка (рис. 6.11).

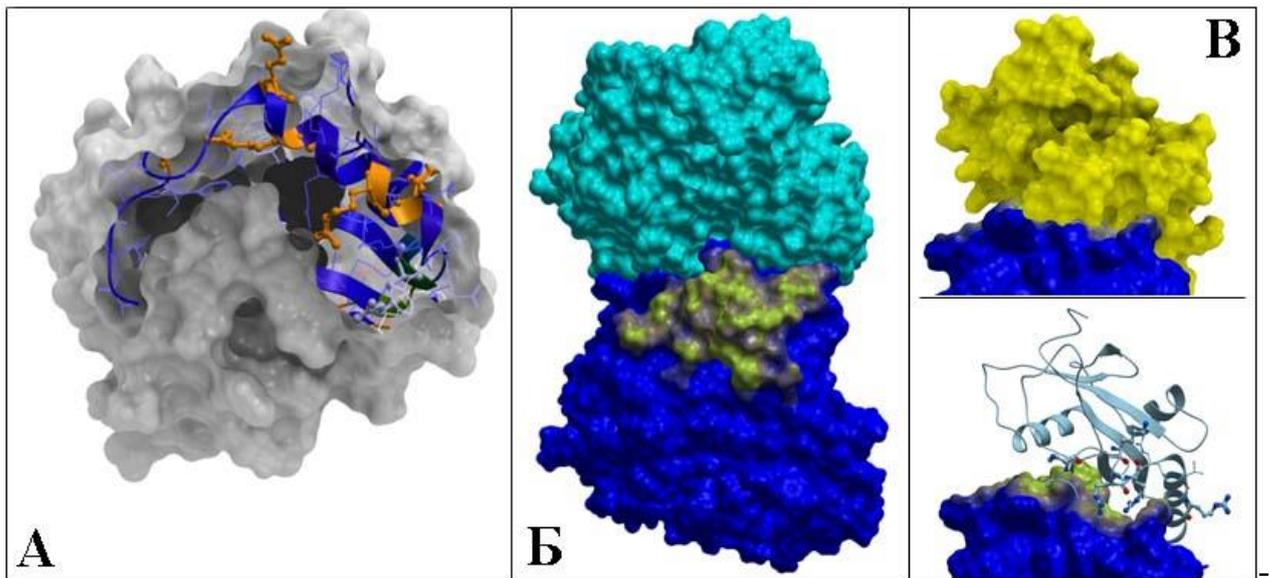


Рис.6.11. А. Поверхня молекули білка Atg8a з можливим сайтом зв'язування на N-кінці (представлена стрічкою синього кольору). Важливі амінокислотні залишки, схожі до таких у LC3 людини (гомолог Atg8), позначені помаранчевим кольором. Б. Дві субодиниці α - і β -тубулінів з *A. thaliana*, вирівняні відносно димера з *V. 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).

Для дослідження ролі ацетилювання α -тубуліну у опосередкуванні взаємодії досліджуваних білків, була виконана молекулярна динаміка комплексів Atg8a з немодифікованим α -тубуліном, а також з α -тубуліном, ацетильованим по амінокислотним залишкам Лізину-40 (K40) і Лізину-112 (K112). Процеси молекулярної динаміки були проведені з ідентичними координатами, окрім різного стану ацетилювання молекул. Було показано, що ацетилювання позитивно зарядженої молекули знижує її основність і нейтралізує кінцевий азот.

Таким чином, ацетилювання α -тубуліну в цілому зміщує загальну картину розподілу заряду і рухливості певних амінокислотних залишків. Вільна молекулярна динаміка протягом 50 нс продемонструвала стеричні

зміни в області зв'язування молекул та С-кінцевої петлі α -тубуліну, що викликало дисоціацію Atg8a з комплексу протягом останніх наносекунд МД. На рис. 6.12 продемонстровано різницю у станах зв'язування в обох комплексах.

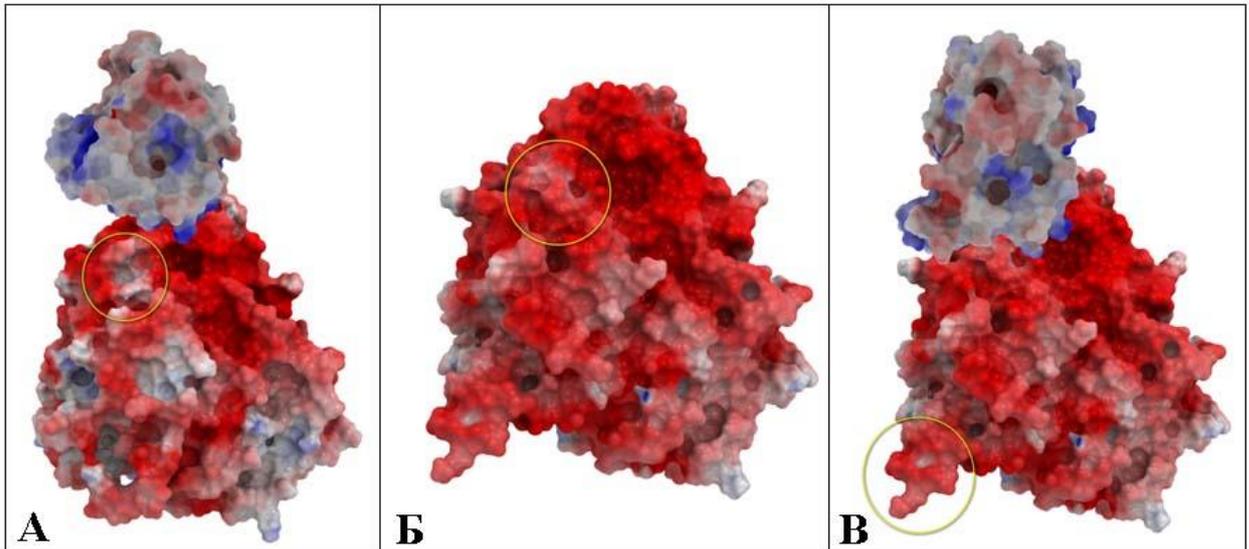


Рис.6.12. Фронтальний вигляд структури молекулярних комплексів Atg8a- α -тубулін з поверхневим розподілом електростатичного заряду. Ацетилований α -тубулін (А) є більш компактним порівняно з немодифікованим (Б, В), має менше негативно заряджену поверхню, особливо у місці розташування K112 (Б) і K40 (В). Білок Atg8a (синього кольору) міцніше і щільніше пов'язаний з ацетилованим тубуліном.

Отримані результати можна пояснити тим фактом, що не модифікований лізин є менш гнучким у порівнянні з ацетилованою формою, що разом з позитивним зарядом запобігає щільному контакту двох білків і полегшує процес дисоціації. У свою чергу, ацетилювання по залишкам Лізину знижує позитивний заряд молекули і призводить до утворення водневих зв'язків з амінокислотами, що оточують, відтак призводить до більш щільного та міцного контакту з поверхнею α -тубуліну.

Зв'язування водню, що відбувалося ідентично на початку МД для обох комплексів, з часом неухильно зменшувалася для немодифікованого α -

тубуліну. Більш того, було показано, що N-кінцева спіраль білка Atg8a згодом відштовхувалася від немодифікованого α -тубуліну (рис. 6.13).

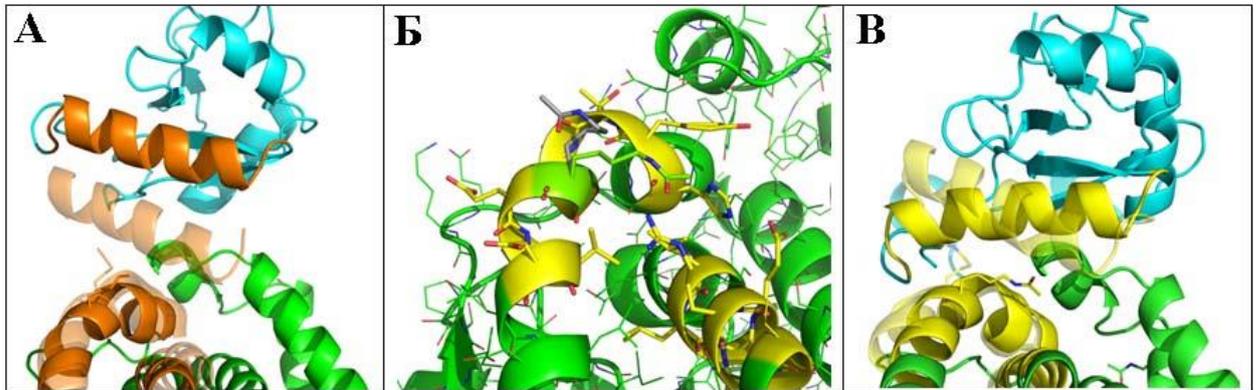


Рис.6.13. Залишки Лізину 112 (K112) позначені паличками, початковий стан динаміки N-кінцевий спіралі Atg8a позначено прозорими стрічками, як у немодифікованого (А), так і в ацетильованого (В) α -тубуліну. Візуальна різниця між двома положеннями ацетильованих (зелених) і немодифікованих (сірих) амінокислотних залишків у контактному середовищі молекули α -тубуліну (Б).

Ацетилювання α -тубуліну є одним з ключових елементів в процесі реалізації аутофагії, як адаптивної відповіді на дію стресових чинників. Дана посттрансляційна модифікація опосередковує зміни функціонального стану МТ, а саме, призводить до їх стабілізації, для індукції наступних етапів розвитку аутофагії, зокрема, залучення моторного білка кінезину-1 і активацію JNK кінази [8]. Для клітин тварин також було показано, що мікротрубочки беруть участь у транспорті зрілих аутофагосом для злиття з лізосомами і подальшого формування аутолізосом [2].

За допомогою біоінформатичного аналізу взаємодії Atg8a і α -тубуліну мікротрубочок, нами вперше було показано, що пост-трансляційне ацетилювання α -тубуліну забезпечує більш щільну і міцну взаємодію зазначених білків, шляхом зміни заряду і гнучкості залишків α -тубуліну у сайті зв'язування молекул. Отримані результати дають нам можливість припустити механізм взаємодії мікротрубочок та аутофагосом протягом

реалізації аутофагії у рослин. Зокрема, щільніший та міцніший контакт Atg8 з ацетилюваним тубуліном, що зазвичай є характерним для стабільних мікротрубочок, опосередковано підтверджує участь мікротрубочок цитоскелету в реалізації транспорту зрілих аутофагосом і аутолізосом в процесі стрес-індукованої аутофагії.

Матеріали цього підрозділу викладено в наступних публікаціях [153].

6.6. Профілі експресії генів α -тубуліну, білка *atg8*, кінезинів, гексокіназ та генів ензимів, залучених до ацетилювання α -тубуліну при індукції аутофагії стресовими факторами.

6.6.1. Зміни рівнів експресії генів α -тубулінів та білка *atg8* при індукції аутофагії стресовими факторами

Відомо, що індукція і реалізація процесів аутофагії залежить від функціонального стану цитоскелету, зокрема, потребує стабілізації МТ шляхом посттрансляційного ацетилювання α -тубуліну [8]. Також на біохімічному рівні нами вже було показано роль ацетилювання мікротрубочок у розвитку стрес-індукованої аутофагії у рослин [137]. Проте, на сьогоднішній день експериментальних даних, котрі б описували характер взаємодії мікротрубочок та аутофагосом вкрай мало, крім того, переважну більшість робіт з дослідження механізму участі цитоскелету у реалізації аутофагії, було проведено на клітинах тварин.

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.

Для з'ясування взаємозв'язку розвитку аутофагії та програмованої клітинної загибелі в умовах опромінення УФ-В, було вирішено провести відповідні експерименти на рослинах, що опромінювалися різними дозами УФ-В, та були проаналізовані на різних часових проміжках після дії стресового чинника. Грунтуючись на попередніх дослідженнях (дані не показано), нами було обрано дві дози опромінення УФ-В - 41кДж/м² та 81 кДж/м², проростки аналізували одразу після опромінення, через 3 год та через 24 год.

Враховуючи, що мікротрубочки цитоскелету є однією з найважливіших функціональних ланок в процесі реалізації стрес-індукованої аутофагії, логічно припустити, що під впливом стресового фактору транскрипційний профіль певних ізотипів α -тубуліну та *atg8*, залучених до опосередкування розвитку аутофагії, буде змінюватися. Так, за умов опромінення УФ-В у дозі 41кДж/м², спостерігали достовірне підвищення рівня експресії *tua2* та *tua4* у всіх трьох експериментальних точках ($p < 0,05$), а саме: одразу після опромінення, через 3 та через 24 год після опромінення (рис. 6.14, рис. 6.15). Було показано достовірне підвищення рівня експресії *tua3* через 3 години після опромінення ($p < 0,05$). Для генів *tua1*, *tua5* та *tua6* виявлено певну тенденцію до регуляції рівня їх експресії, зокрема, спостерігали зниження експресії на початкових етапах стрес-індукованої відповіді та його достовірне підвищення ($p < 0,05$) через 24 години після впливу стресового фактору.

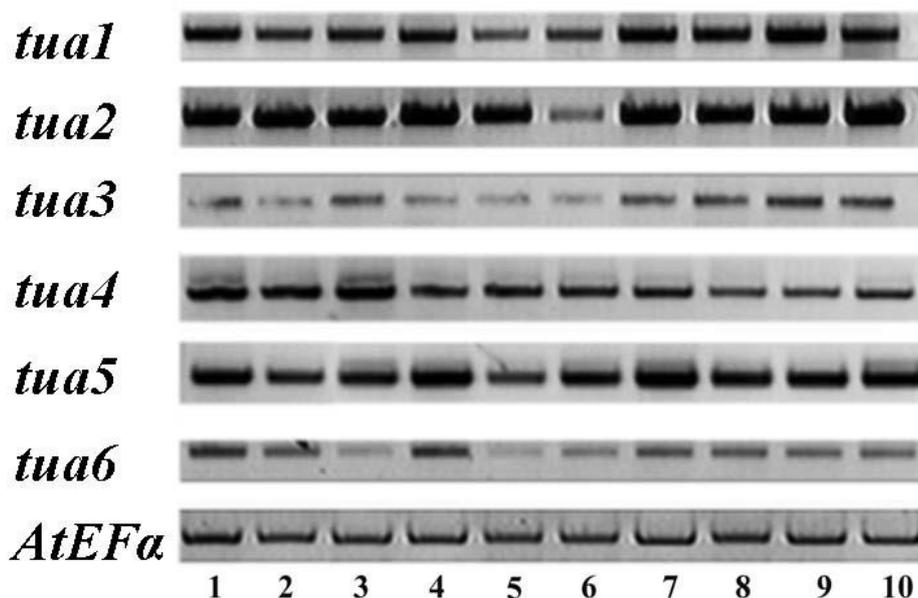


Рис. 6.14. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів α -тубуліну. 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 5-7 - УФ-В у дозі 84 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 8 – осмотичний стрес, 9 – голодування, 10 – сольовий стрес.

Загалом, можна виділити дві тенденції у змінах рівнів експресії генів α -тубуліну у відповідь на опромінення УФ-В у дозі 41 кДж/м², 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 під впливом УФ-В.

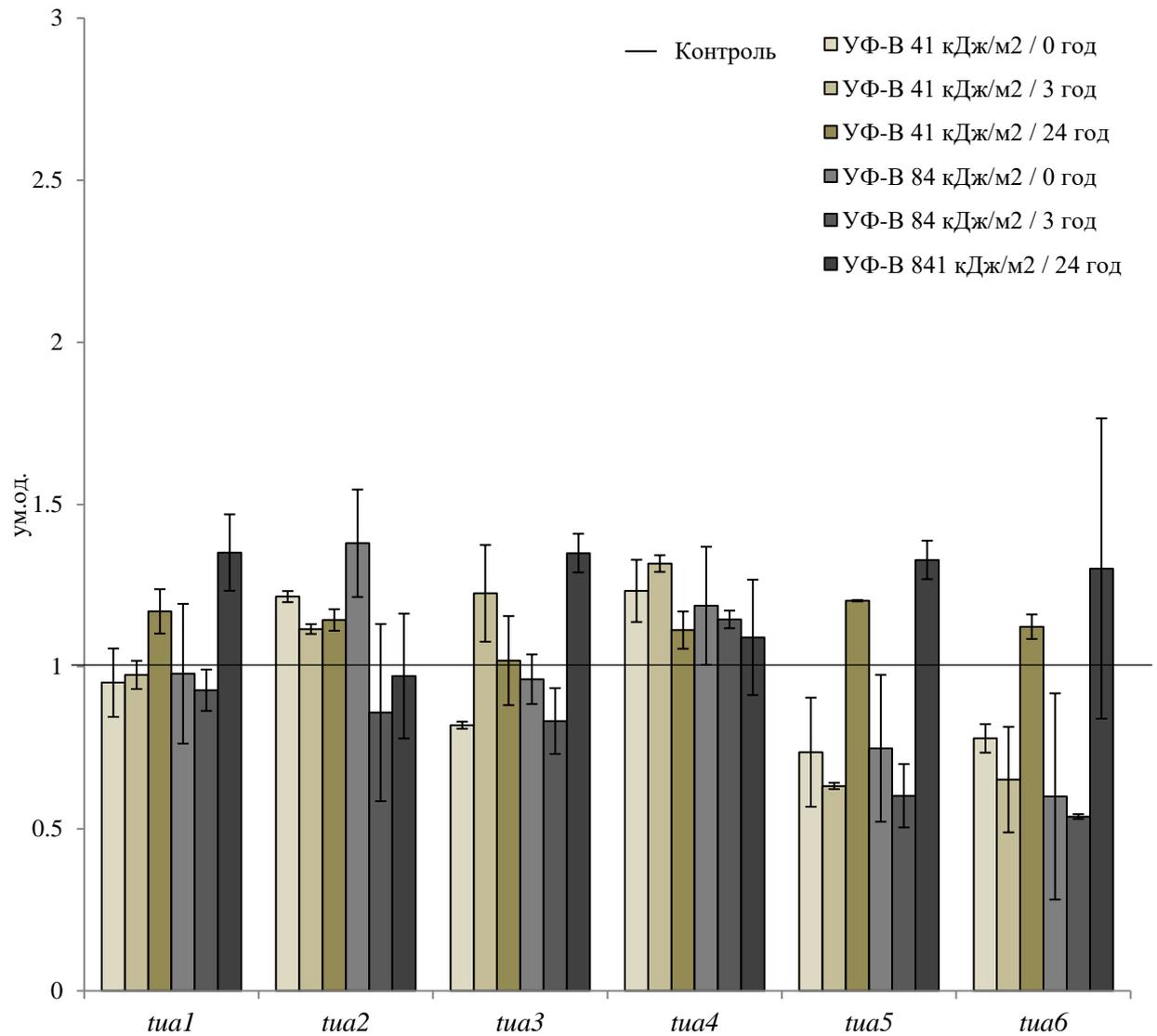


Рис. 6.15. Транскрипційні профілі експресії різних генів α -тубуліну у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²).

Опромінення проростків УФ-В у дозі 81 кДж/м² мало наслідком формування схожих профілів експресії досліджуваних генів. Зокрема, аналогічно було виявлено дві тенденції стрес-індукованої відповіді: початкове зниження з подальшим зростанням рівнів експресії (*tua1*, *tua3*, *tua5* та *tua6*) та стабільне збільшення цього показника у тій чи іншій мірі для усіх часових проміжків (*tua4*). Слід відзначити, що на відміну від дози 41кДж/м², що спричиняла підвищення рівня експресії гена *tua2* на усіх часових проміжках,

опромінення УФ-В у дозі 81 кДж/м² викликало зниження даного показнику через 3 та 24 год.

Загалом, зміни рівнів експресії більшості ізотипів α -тубуліну при опроміненні УФ-В мали чітко визначений дозо- та часо-залежний характер. Зважаючи на те, що гени α -тубуліну є високо консервативними і зазвичай демонструють стабільну експресію протягом онтогенезу, можна зробити висновок про залучення гену *tua4* до реалізації аутофагії, індукованої УФ-В, оскільки рівень його експресії був достовірно підвищеним на більшості часових проміжках дослідження після дії стресу.

Для дослідження взаємозв'язку між мікротрубочками та розвитком аутофагії, індукованої голодуванням, осмотичним та сольовими стресами, нами був проведений транскрипційний аналіз генів α -тубуліну у проростках *A. thaliana*, що вирощувалися на стресовому середовищі (без сахарози, або з додаванням 10 мМ манітолу чи 150 мМ NaCl, відповідно) (рис. 6.14, рис. 6.16). Було виявлено стрес-залежний характер експресії деяких генів α -тубуліну, що виявлялося у підвищеній експресії певних генів, в залежності від виду стресового чинника.

Так, при голодуванні 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 достовірне підвищення рівнів експресії генів *tua1* та *tua3* за умов сольового стресу, та гену *tua4* за умов осмотичного стресу ($p < 0,05$).

Отримані профілі експресії генів дають можливість стверджувати, що певні гени α -тубуліну є залученими до реалізації відповіді, при чому є специфічними, в залежності від виду стресового чинника, що впливає на рослини.

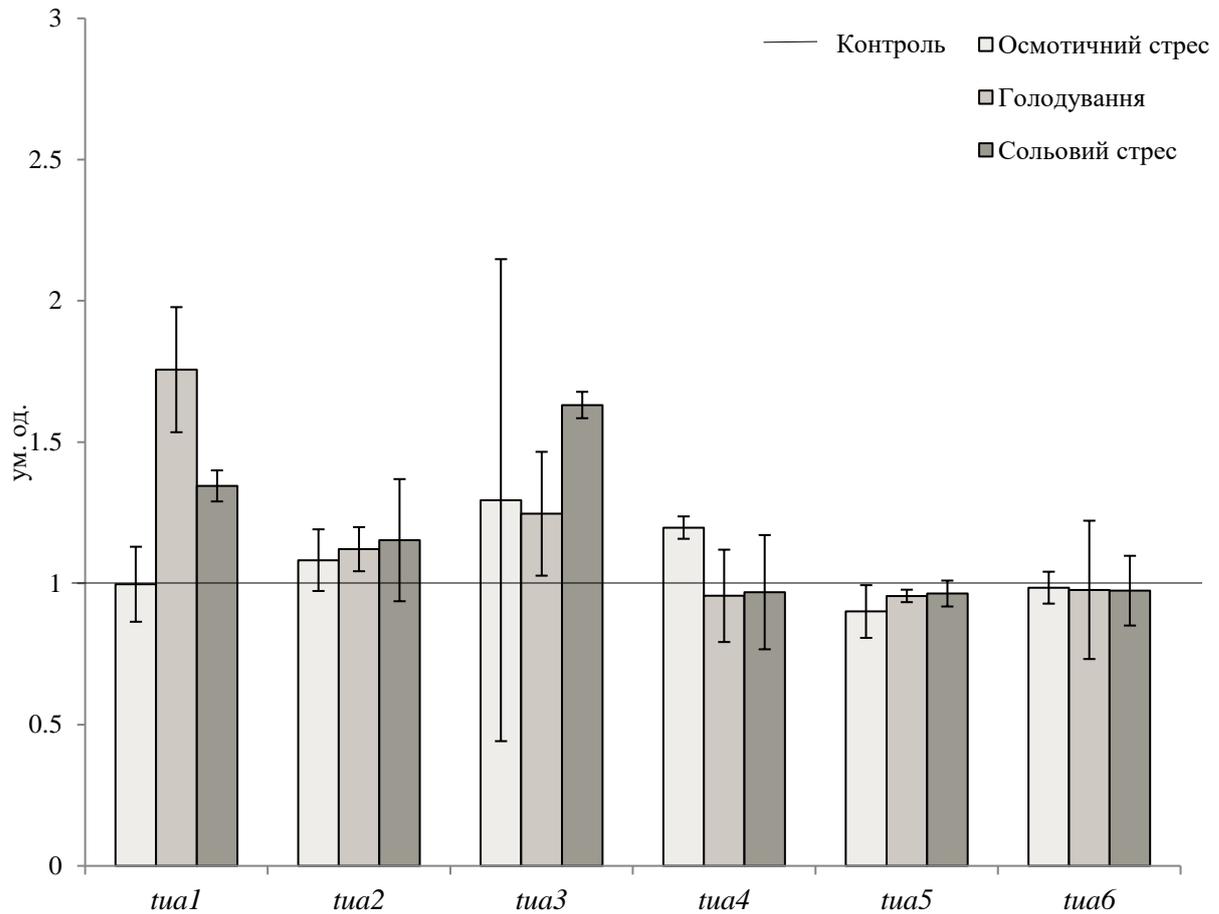


Рис. 6.16. Транскрипційні профілі експресії різних генів α -тубуліну при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

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. 6.17, рис. 6.18). Зокрема, рівні експресії генів *atg8a* та *atg8e* зростали майже на усіх часових проміжках дослідження. А саме, рівень експресії *atg8a* зростав у 2- та 3 рази через 24 год після опромінення у дозах 41кДж/м² та 81 кДж/м², відповідно ($p < 0,05$). Натомість, транскрипційний профіль генів *atg8f* та *atg8i* залишався у тій чи іншій мірі сталим або зазнавав незначної негативної регуляції експресії у відповідь на опромінення. Важливо відмітити, що експресії генів *atg8c* та *atg8d* виявлено не було, або рівень експресії було неможливо задетектувати.

Слід відзначити, що усі досліджувані гени, окрім *atg8f*, демонстрували достовірну позитивну регуляцію транскрипційної активності через 24 год

після опромінення у дозі 81 кДж/м² (*atg8a*, *atg8b*, *atg8e*, *atg8g*, *atg8h*, *atg8i*) та у дозі 41 кДж/м² (*atg8a*, *atg8e*, *atg8g*). З огляду на те, що на даному часовому проміжку при опроміненні спостерігається підвищення кількості клітин з ознаками ПКЗ, отримані дані опосередковано свідчать про роль аутофагії, як адаптивного процесу, що передує розвитку ПКЗ [139].

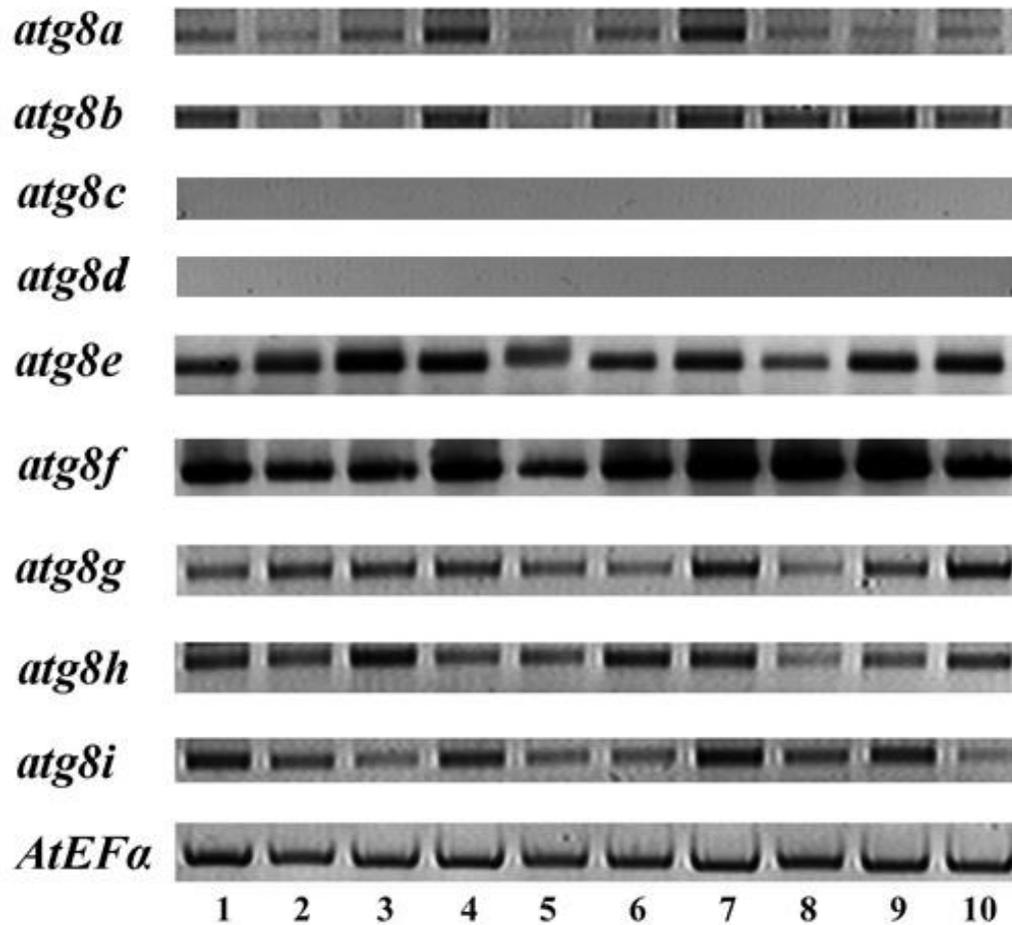


Рис. 6.17. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів *atg8*. 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 5-7 - УФ-В у дозі 84 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 8 – осмотичний стрес, 9 – голодування, 10 – сольовий стрес.

Слід зауважити, що як і у випадку регуляції експресії генів тубуліну, мала місце дозо- та часозалежна інтенсивність клітинної відповіді на дію стресу, що реалізувалася у підвищенні рівнів експресії генів *atg8a*, *atg8e*,

atg8g, *atg8h*. Отримані результати дають можливість припустити, що зазначені гени *atg8* є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої УФ-В, а також характеризують часові проміжки перебігу даного адаптивного процесу.

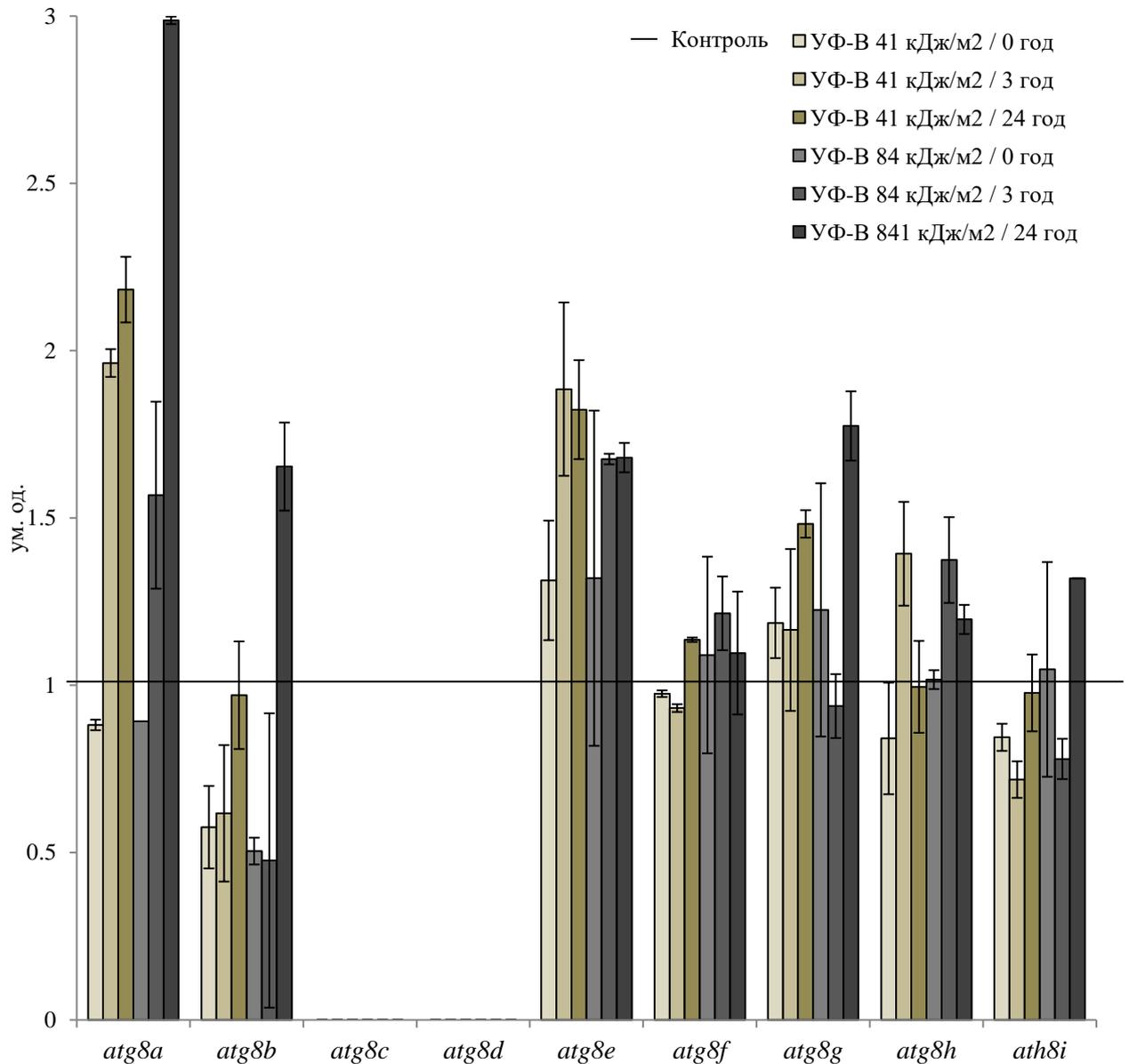


Рис. 6.18. Транскрипційні профілі експресії генів ізотипів *atg8* у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²).

Досліджуючи аналогічні показники транскрипційної активності генів *atg8* в умовах голодування, осмотичного та сольового стресів, було виявлено, що певні гени зазнають суттєвого підвищення експресії, в той час як інші

демонстрували пригнічення експресії, в залежності від стресових умов (рис. 6.17, рис. 6.19). Зокрема, рівні експресії генів *atg8e* та *atg8f* 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.

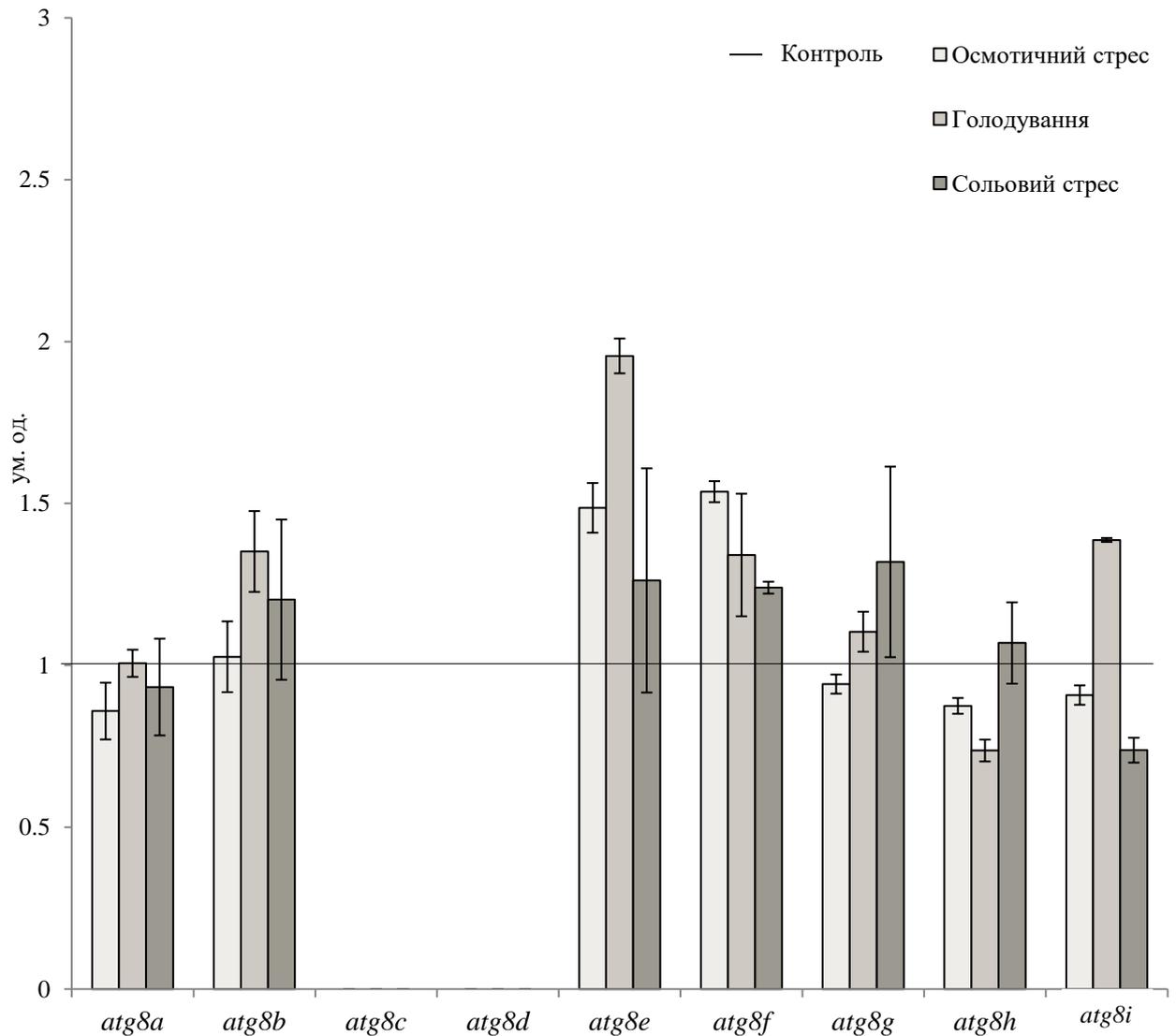


Рис. 6.19. Транскрипційні профілі експресії генів білка *atg8* при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Також слід зазначити, що вплив метаболічного стресу мав наслідком підвищення рівнів експресії генів *atg8b*, *atg8g* та *atg8i*, в той час як *atg8h* зазнавав негативної регуляції експресії ($p < 0,05$). Було показано, що в умовах

сольового стресу відбувалося підвищення експресії генів *atg8f* та *atg8g*, в той час як рівні експресії генів *atg8a*, *atg8b*, *atg8e* та *atg8h* залишалися у тій чи іншій мірі незмінними, на відміну від *atg8i*, що зазнавав негативної регуляції. Як і у випадку опромінення УФ-В, експресії генів *atg8c* та *atg8d* за умов впливу усіх стресових чинників виявлено не було. Як уже було зазначено, специфічними для реалізації адаптивної відповіді, індукованої осмотичним стресом, були виявлені *atg8e* та *atg8f*, при чому інші гени *atg8* зазнавали незначної негативної регуляції.

Враховуючи, що білок Atg8 є структурною одиницею аутофагосом, що безпосередньо приймає участь у реалізації стрес-індукованої аутофагії у клітині, проведений транскриптомний аналіз підтверджує розвиток аутофагії за даних експериментальних умов та дає можливість стверджувати, що вищезазначені гени *atg8* є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої певним стресовим чинником.

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.

6.6.2. Зміни рівнів експресії генів гексокіназ та генів, залучених до ацетилювання α -тубуліну при індукції аутофагії стресовими факторами

Враховуючи, що раніше нами було встановлено функціональну роль ацетилювання у реалізації стрес-індукованої аутофагії [137], завданням цього етапу роботи було також дослідити транскрипційні профілі генів, що опосередковують регуляторні функції ацетилюваного α -тубуліну в умовах розвитку аутофагії, індукованої абіотичними стресами. 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. 6.20).

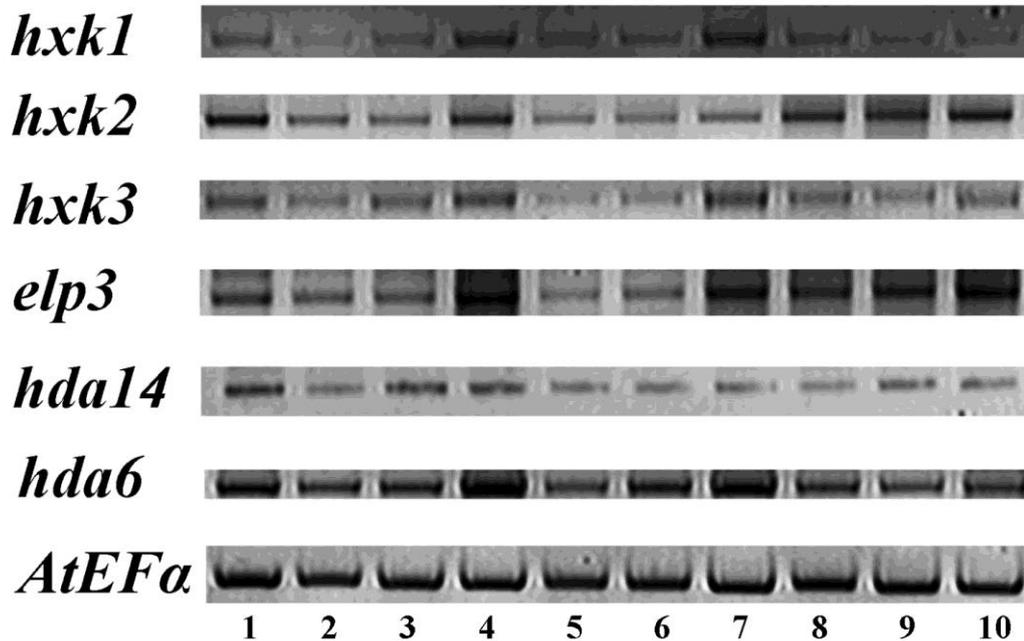


Рис. 6.20. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів гексокіназ (*hchk1*, *hchk2*, *hchk3*), *elp3* та деацетилаз (*hda14*, *hda6*). 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 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 опроміненні проростків *A.thaliana* рівень експресії гену *hda6* змінювався суттєво впродовж усіх часових проміжків дослідження, як у порівнянні з контролем, так і з аналогічним показником для *hda14*, який характеризувався майже незмінним транскрипційним профілем (рис. 6.21). Зокрема, рівень експресії гена зростав майже вдвічі через 24 год після опромінення у обох дозах ($p < 0,05$). Важливо відмітити, що продукт гена *hda6* є специфічним не лише до ацетилювання залишка Ліз-40 α -тубуліну (модифікація, що забезпечує функціональний стан МТ для реалізації аутофагії), але також опосередковує злиття аутофагосоми з лізосоною [9], тому підвищений рівень експресії даного гена свідчить про розвиток аутофагії

після опромінення УФ-В, а також підтверджує функціональну роль ацетилювання α -тубуліну в реалізації даного адаптивного процесу.

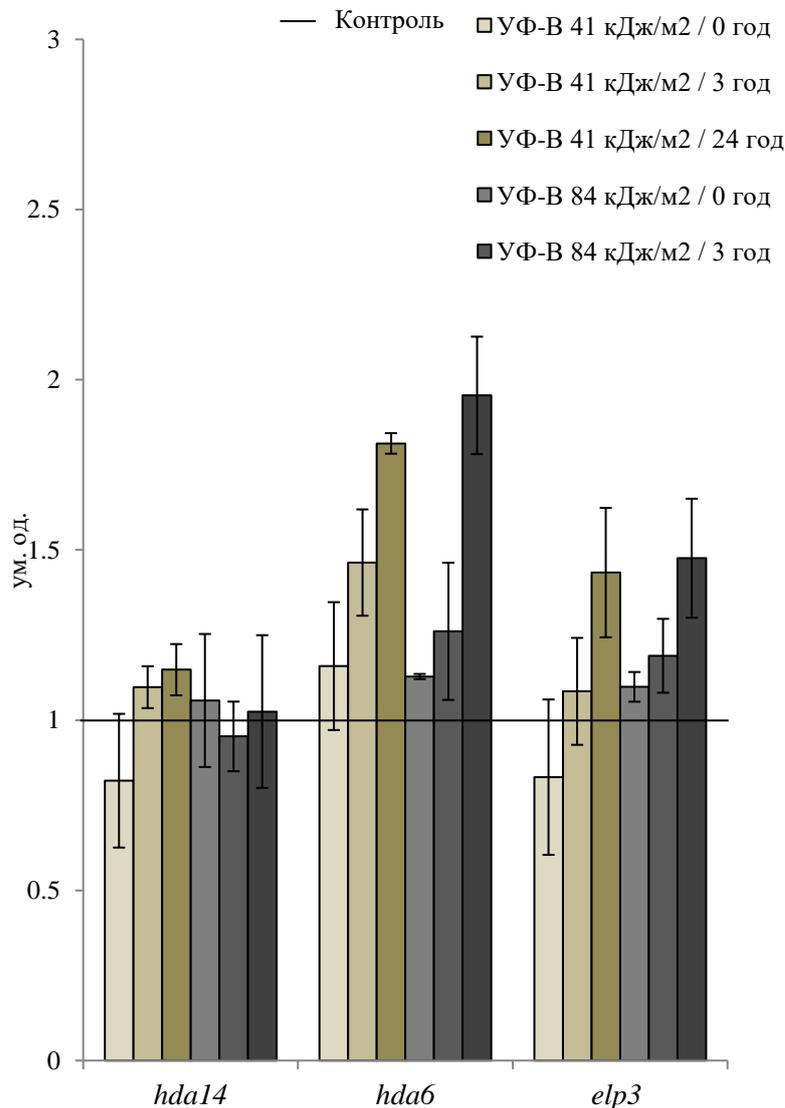


Рис. 6.21. Транскрипційні профілі експресії генів гістондеацетилаз (*hda14*, *hda6*) та *elp3* у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²).

Досліджуючи рівні експресії *elp3*, було виявлено схожі транскрипційні профілі при опроміненні у різних дозах УФ-В, зокрема, було показано суттєве підвищення рівнів експресії через 24 год після опромінення УФ-В у обох дозах (рис. 6.21). На ранніх часових проміжках спостерігали пригнічення (опромінення у дозі 41 кДж/м²) або незначне підвищення рівня

транскрипційної активності *elp3* (опромінення у дозі 84 кДж/м²), що з часом супроводжувалося суттєвою позитивною регуляцією експресії гену.

Отримані дані можна пояснити тим, що ацетилювання α -тубуліну є оборотною модифікацією, яка відбувається у клітинах і за фізіологічних умов, тому, вірогідно, для реалізація початкових етапів аутофагії в клітині використовується наявний пул ацетильованого α -тубуліну. А в подальшому, при його виснаженні, відбувається підвищення експресії субодиниці Елонгатору, що виконує гістон ацетилтрансферазну функцію для забезпечення ацетилювання тубуліну мікротрубочок, необхідного для реалізації захисних механізмів у відповідь на дію стресу.

При дослідженні впливу голодування, осмотичного та сольового стресів на клітини проростків *A. thaliana* було виявлено однозначне підвищення рівнів експресії гена *hdaб* внаслідок дії усіх досліджуваних чинників (рис. 6.22).

Слід зазначити, що деацетилаза *hda14*, яка також є специфічною до α -тубуліну [147], продемонструвала стрес-залежні зміни у рівнях експресії, а саме, відбувалася позитивна регуляція гена за умов осмотичного стресу та голодування, на відміну від сольового стресу, що викликав негативну регуляцію зазначеного гена.

Досліджуючи рівні експресії гена *elp3*, продукт якого виконує функцію ацетилювання α -тубуліну, функціонуючи у складі мультибілкового комплексу Елонгатор, нами було показано достовірне підвищення рівнів експресії гену за умов впливу усіх стресових факторів ($p < 0,05$).

Враховуючи, що нами було показано, що за даних експериментальних умов клітини проростків характеризуються активним перебігом аутофагії, що чітко супроводжується підвищенням рівня ацетилювання α -тубуліну, результати транскрипційного аналізу генів *hda14*, *hdaб* та *elp3* підтверджують регуляторну роль ацетилювання α -тубуліну при розвитку стрес-індукованої аутофагії у *A.thaliana*.

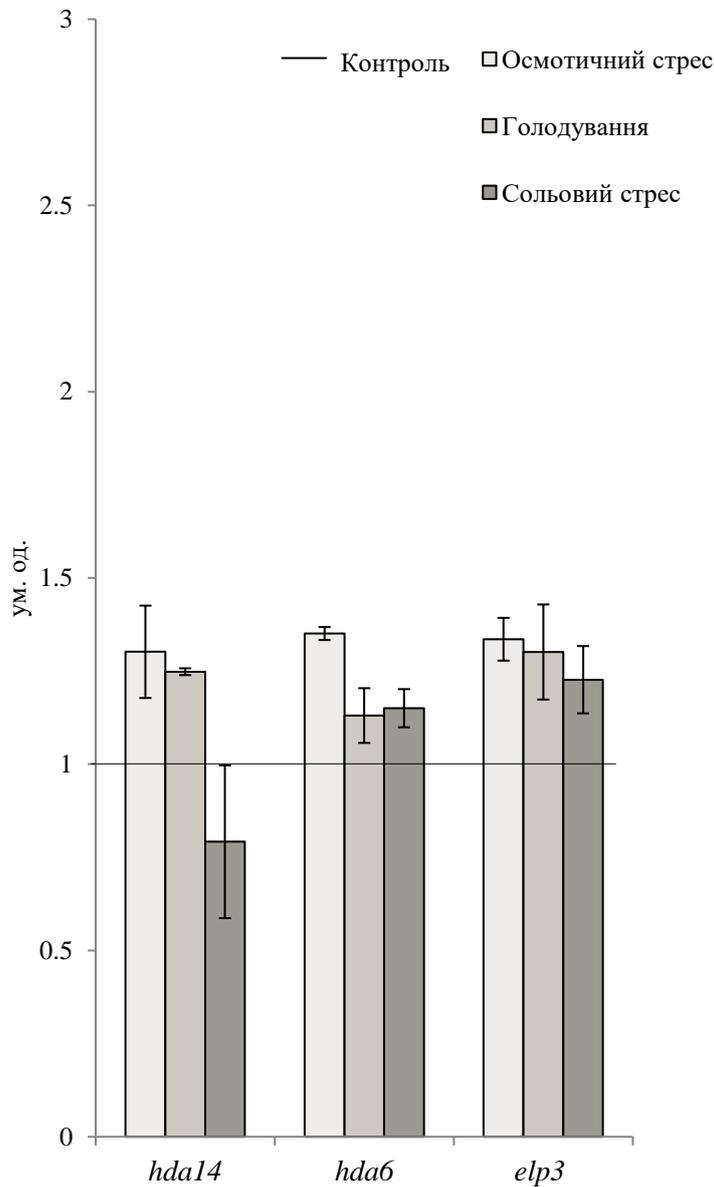


Рис. 6.22. Транскрипційні профілі експресії генів гістондеацетилаз (*hda14*, *hda6*) та *elp3* при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Зокрема, *elp3*, продукт якого виконує ацетилтрансферазну функцію, виявляв дозо- та часо-залежний характер змін транскрипційної активності, демонструючи суттєве підвищення рівнів експресії на часових проміжках, що відповідають розвитку аутофагії у клітинах. Суттєва позитивна регуляція *hda6* при опроміненні УФ-В та сольовому стресі, а також обох деацетилаз *hda6*, *hda14* при голодуванні та осмотичному стресі, також свідчить про перебіг аутофагії, при чому, як ранніх, так і більш пізніх етапів цього адаптивного механізму. Оскільки, деацетилази HDA6, HDA14 виконують функцію

специфічного деацетилювання α -тубуліну, та забезпечують наявність динамічних популяцій мікротрубочок, підвищення рівня транскрипційної активності їх генів може свідчити про опосередковану участь деацетилаз у реалізації первинних етапів аутофагії [35]. У свою чергу, деацетилаза HDAC6, тваринний гомолог HDA6 у рослин, опосередковує не лише ацетилювання залишку Ліз-40 α -тубуліну, але і процес злиття аутофагосоми з лізосоною [9], тому, підвищення рівня *hda6* є достовірним доказом реалізації адаптивної відповіді на дію стресу.

Наступним етапом цієї частини роботи було дослідити взаємозв'язок аутофагії та програмованої клітинної загибелі на транскрипційного рівні, використовуючи зміни рівнів експресії гексокіназ 1, 2 та 3, як показник переходу клітин до реалізації ПКЗ у відповідь на вплив абіотичних стресів.

Однією з характерних ознак розвитку апоптозу у клітинах тварин є формування пори у подвійній мембрані мітохондрій, втрата трансмембранного потенціалу і, як наслідок, вихід проапоптичних білків, зокрема, цитохрому *c*, у цитоплазму. Одними з білків, що виконують антиапоптозну функцію є гексокінази. Вони взаємодіють з зовнішньою мембраною мітохондрій безпосередньо, заякорюючись N-гідрофобною ділянкою (гексокіназа 1 та гексокіназа 2), або опосередковано, за допомогою білків, асоційованих з мітохондріями (гексокіназа 3). Взаємодія гексокіназ з іонним каналом мітохондрій VDAC призводить до зміни у чутливості мітохондрій до впливу проапоптичних сигналів, опосередкованих родиною білків Bcl2, і, таким чином, інгібує закриття каналу і формування пори [154]. Хоча наразі механізм взаємодії гексокіназ та мітохондрій є дискусійним, відомо, що гексокінази виконують антиапоптозну функцію, тому підвищення рівня їх експресії відбувається на етапі, який передуює розвитку ПКЗ у клітині. Відтак, на наступному етапі нашого дослідження стала оцінка змін у експресії гексокіназ у відповідь на вплив абіотичних стресів, та встановлення приналежності у часі експресії досліджуваних генів до розвитку аутофагії як перехідного етапу до ПКЗ (рис. 6.20, рис. 6.23, рис. 6.24).

Досліджуючи зміни профілів експресії гексокіназ *hvk1*, *hvk2* та *hvk3* у відповідь на УФ-В, було продемонстровано, що рівень експресії гену *hvk2* у відповідь на опромінення у дозі 41 кДж/м² суттєво не змінювався і, у тій чи іншій мірі, залишався сталим. Однак, було виявлено значне підвищення рівнів експресії генів *hvk1* та *hvk3* через 24 год після опромінення, як у дозі 41 кДж/м², так і 81 кДж/м². Зокрема, рівень експресії *hvk1* зростав у 1,5- та 2,5 рази через 24 години після опромінення у дозах 41кДж/м² та 81 кДж/м², відповідно ($p < 0,05$).

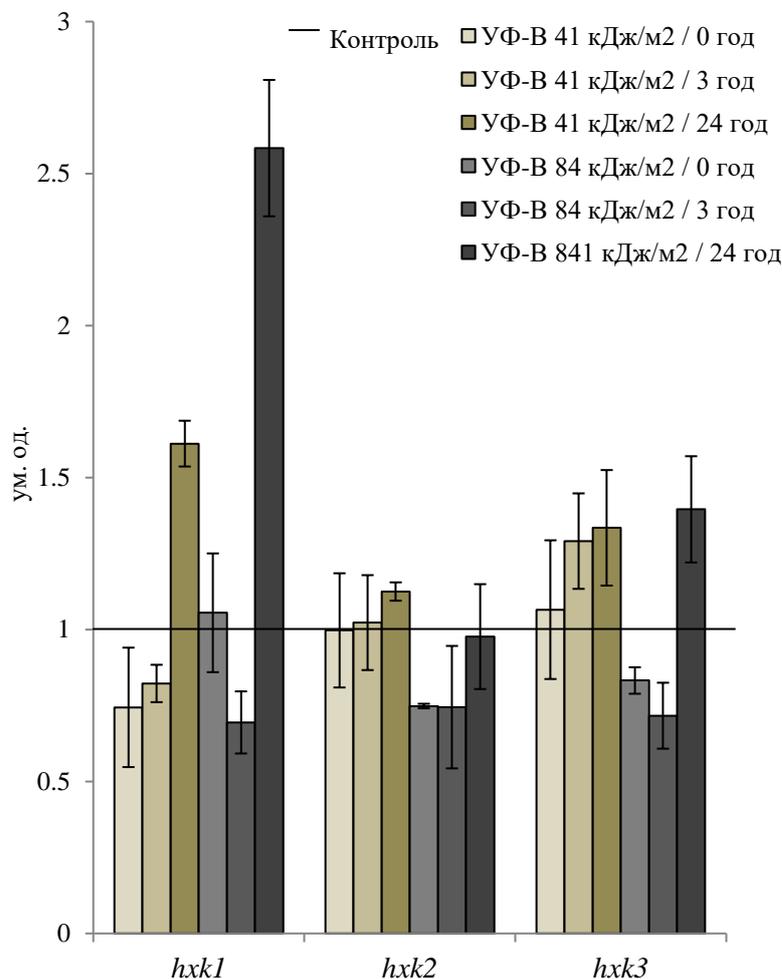


Рис. 6.23. Транскрипційні профілі експресії генів гексокіназ 1, 2 та 3 у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²).

Враховуючи, що транскрипційний аналіз проводили, використовуючи тотальну РНК проростків, а в залежності від типу, клітини виявляють різну

чутливість до дії стресових чинників, ми можемо припустити, що найбільш вірогідним часовим проміжком переходу клітин від аутофагії до розвитку ПКЗ є етап через 24 години після опромінення УФ-В.

З огляду на те, що гексокінази виконують антиапоптозну функцію, отримані результати опосередковано підтверджують реалізацію аутофагії на ранніх часових проміжках і її роль, як перехідного етапу до клітинної загибелі у відповідь на тривалий вплив стресового фактору.

Як і у випадку з опроміненням УФ-В, був проведений транскрипційний аналіз генів гексокіназ 1, 2 та 3 (*hvk1*, *hvk2*, *hvk3*) за умов голодування, осмотичного та сольового стресів, використовуючи підвищений рівень експресії генів гексокіназ як ознаку розвитку програмованої клітинної загибелі.

В результаті проведеного дослідження було показано незначні зміни у рівнях експресії генів гексокіназ (рис. 6.24). Однак, спостерігали підвищення рівня експресії гена *hvk2* при осмотичному та сольовому стресах ($p < 0,05$), в той час як за умов голодування даний показник залишався у межах контролю.

На противагу цьому, спостерігали незначну позитивну регуляцію гена *hvk3* за умов дії метаболічного стресу та відсутність чутливості зазначеного гена до впливу осмотичного та сольового стресів. При цьому вплив усіх досліджуваних стресових чинників мав наслідком негативну регуляцію гену *hvk1*.

Kim M. та ін. показали, що наокдаун гену *hvk1* тютюну (*Nicotiana benthamiana*) викликає затримку росту рослин, появу некротичних уражень листя та аномальну морфологію листків рослин [155]. Автори також показали, що рослини *A.thaliana*, що мають підвищену експресію генів *hvk1* та *hvk2* проявляли підвищену стійкість до розвитку програмованої клітинної загибелі, індукованої перекисом водню H_2O_2 та піколіновою кислотою [155].

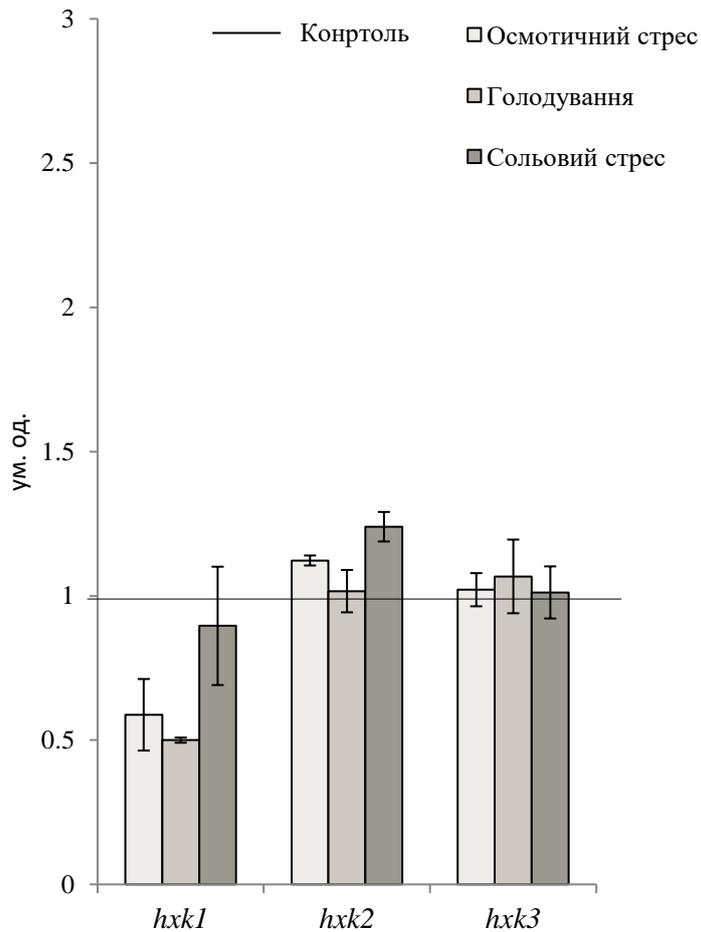


Рис. 6.24. Транскрипційні профілі експресії генів гексокіназ 1, 2 та 3 при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Більш того, раніше було показано, що гексокінази разом з VDAC є модуляторами розвитку програмованої клітинної загибелі [156]. А саме, обробка клітин суспензійної культури тютюну BY-2 (*Nicotiana tabacum*) перекисом водню H_2O_2 викликала появу характерних для ПКЗ ознак, зокрема, втрату мембранного потенціалу мітохондрій, що вказує на проникність внутрішньої мембрани мітохондрій та появу пори у подвійній мембрані мітохондрії. Використання Рутенію червоного, інгібітору, що блокує VDAC у клітинах тварин [157], у стресових умовах, зокрема, при обробці рослин перекисом водню, запобігало деполаризації мембран мітохондрій і подальшому розвитку ПКЗ. Схожі результати автори продемонстрували, використовуючи рослини з підвищеною експресією генів гексокіназ [156], припускаючи виконання Рутенієм червоним та гексокіназами схожої функції

блокатора VDAC при розвитку ПКЗ, індукованої пермеабілізацією мітохондріальної мембрани наслідок обробки клітин H_2O_2 .

Авторами Tateda та ін. було показано роль VDAC у розвитку програмованої клітинної загибелі клітин рослин, індукованої патогенною інвазією, а також гетерологічною експресією проапоптичних білків тварин Вах [158]. Також було продемонстровано, що ендogenousні комплекси VDAC клітин рослин є залученими до сигналіngu ПКЗ, та опосередковуються родиною білків Bcl-2, що гетерологічно експресуються у рослин [158]. Враховуючи, що білки родини Bcl-2 не є представленими у рослин, автори статті [156] припускають, що гексокінази є єдиним відомим регулятором ендogenousних комплексів VDAC у рослин, за умов розвитку програмованої клітинної загибелі.

Використовуючи трансгенні лінії рослин, що мали підвищену експресію генів VDAC або гексокіназ, а також використання Рутенію червоного, було показано, що усі три речовини, VDAC, Нехокіназа та Рутеній червоний, мають токсичний ефект на клітини рослин [156, 159]. Для того, щоб знизити активність ферментів гексокіназ при сталому високому рівні експресії генів, автори використовували NAG, функціональний інгібітор активності гексокіназ на ранніх етапах розвитку калусу тютюну [160], а Рутеній червоний використовували у концентрації, що не викликає суттєвого зниження виживаності клітин. Було продемонстровано, що і обробка Рутенієм, і підвищена експресія генів гексокіназ, сприяли драматичному зниженню ступеню деполяризації мембран мітохондрій, зумовлену обробкою H_2O_2 [156].

З огляду на те, що ко-експресії гексокіназ та VDAC має наслідком розвиток здорових клітин та нормальної морфології листя, автори припускають наявність фізичної взаємодії двох білків, що обмежує їх токсичність, та пропонують використовувати співвідношення рівнів експресії VDAC та гексокіназ, як один з показників розвитку програмованої клітинної загибелі у рослин [156]. Отримані нами результати, зокрема, підвищення

рівнів експресії генів гексокіназ 1, 2 та 3, в залежності від типу стресового фактора, підтверджують розвиток ПКЗ, зумовленої впливом абіотичних стресів, та опосередковано свідчать про часові межі перебігу процесів аутофагії та клітинної загибелі. Ґрунтуючись на отриманих профілях експресії гексокіназ при опроміненні УФ-В, ми можемо припустити, що найбільш вірогідним часовим проміжком переходу клітин від аутофагії до розвитку ПКЗ є етап через 24 години після впливу стресу.

6.6.3. Зміни рівнів експресії генів кінезинів при індукції аутофагії стресовими факторами

Одним з ключових елементів для реалізації аутофагії в клітинах тварин є кінезин-1 [8, 35]. Кінезини представляють собою суперродину білків, що мають АТФ-зв'язуючий сайт та сайт взаємодії з мікротрубочками. Використовуючи енергію, отриману від гідролізу АТФ, кінезини виконують транспортну функцію у клітинах, транспортуючи органели та макромолекули як до плюс-кінця, так і до мінус-кінця мікротрубочок [161]. Перші два рослинних кінезини були ідентифіковані з пилкової трубки тютюну (РКН, pollen kinesin homologue) та фрагмопласту тютюну (NtKRP125, tobacco kinesin related protein) [162, 163]. Подальші дослідження кінезинів рослин показали, що вони виконують не тільки транспортну, а й низку інших життєво важливих функцій, таких як участь у клітинному поділі (формування веретена, сегрегація хромосом, участь в утворенні препрофазної стрічки та фрагмопласту), морфогенезі, рості клітин, а також, участь в індукції розвитку процесів аутофагії [164]. На сьогоднішній день, у арабідопису виділяють 61 ген кінезинів, проте їх функції є ще недостатньо вивченими [164]. Однак, на клітинах тварин вже було показано надзвичайно важливу роль кінезину-1, як у регуляції індукції, так і розвитку аутофагії, індукованої стресовими умовами [8]. Тому, для дослідження участі моторних білків кінезинів, у реалізації адаптивної відповіді на дію стресу, був проведений транскрипційний аналіз

експресії генів кінезинів, гомологів кінезину-1 людини, за аналогічних експериментальних умов.

Було показано, що при опромінення УФ-В у дозі 41 кДж/м² майже усі кінезини у тій чи іншій мірі мали пригнічену експресію одразу після опромінення, рівень експресії *KIN7O*, *KIN12A* та *KIN12D* знаходився у межах контролю (рис. 6.25, рис. 6.26). Через 3 години після впливу стресу, рівень експресії кінезинів змінювався досить суттєво, як у межах вибірок, так і у порівнянні з транскрипційними профілями експресії генів одразу після опромінення. Однак, через 24 години після дії стресу, більшість генів зазнавала суттєвої позитивної регуляції (*KIN5B*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B*, *KIN12F*), особливо істотним було підвищення рівня експресії генів *KIN5B* та *KIN12F*.

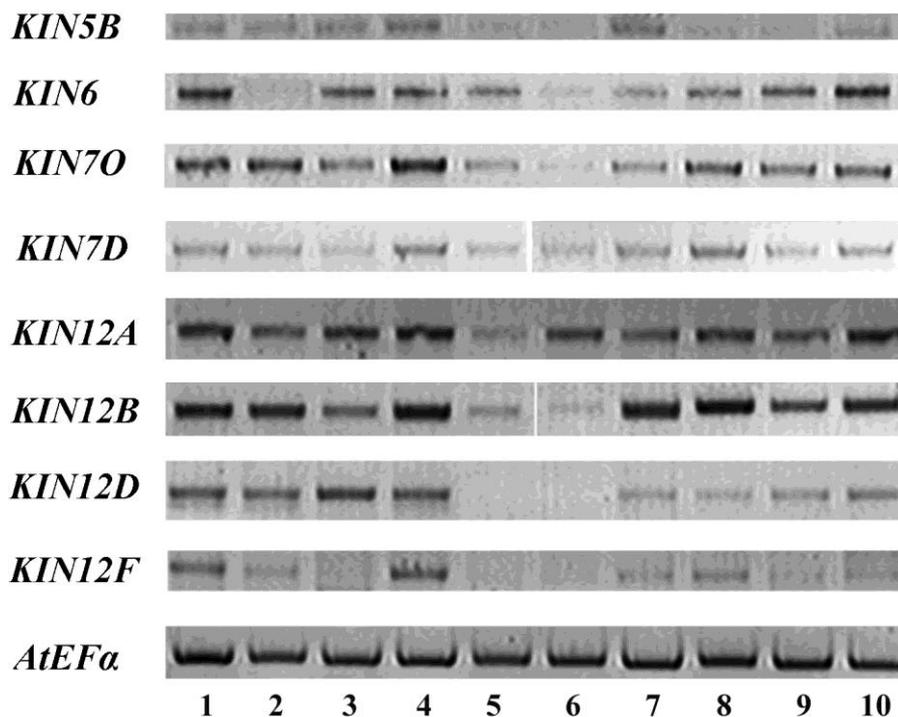


Рис. 6.25. Електрофореграма продуктів ПЛР-реакції кДНК досліджуваних зразків з праймерами до генів кінезинів. 1- контрольні рослини; 2-10 – рослини, що зазнавали впливу стресових факторів: 2-4 - УФ-В у дозі 41 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 5-7 - УФ-В у дозі 84 кДж/м² через 0, 3 і 24 год після опромінення, 8 – осмотичний стрес, 9 – голодування, 10 – сольовий стрес.

Слід зазначити, що усі досліджувані кінезини мали пригнічену експресію при опроміненні УФ-В у дозі 84 кДж/м² одразу після опромінення та через 3 години після впливу абіотичного стресу. На противагу цьому, гени *KIN5B* та *KIN12B* продемонстрували суттєве підвищення рівнів експресії через 24 години після опромінення ($p < 0,05$). Також важливо відмітити, що експресії генів *KIN1*, *KIN5A*, *KIN5C*, *KIN5D*, *KIN7A*, *KIN10A* виявлено не було, або рівень експресії було неможливо задетектувати.

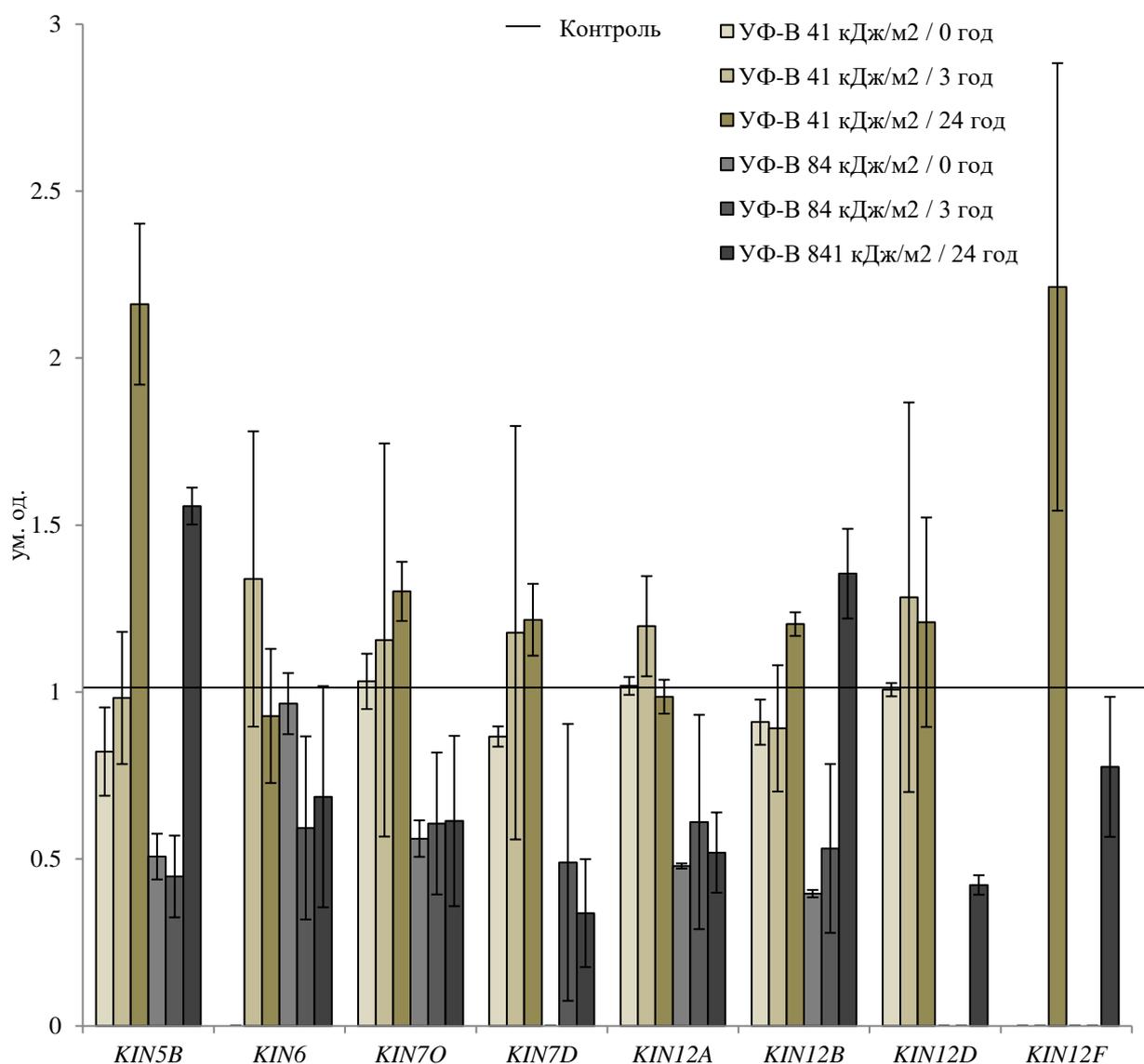


Рис. 6.26. Транскрипційні профілі експресії генів кінезинів, гомологів кінезину-1 людини, у контролі та через 0, 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 кДж/м² та 81 кДж/м²).

Враховуючи, що перебіг аутофагії у клітинах рослин відбувається не синхронно, а в залежності від характеру впливу абіотичного чинника та чутливості типу клітин до стресового фактору, ґрунтуючись на отриманих раніше результатах, можна зробити висновок, що аутофагія, як адаптивний механізм реалізується у клітинах рослин, починаючи з декількох годин після опромінення та етапу розвивається впродовж 24 годин після впливу стресу. Причому, через добу після опромінення УФ-В, нами були показано появу клітин у стані програмованої клітинної загибелі, що вказує на взаємодію та взаємозв'язок перебігу процесів аутофагії та програмованої клітинної загибелі.

Тому, отримані транскрипційні профілі досліджуваних генів кінезинів дають нам можливість стверджувати, що *KIN5B*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12F* є опосередковано залученими до реалізації аутофагії у клітинах *A. thaliana*, індукованої опроміненням УФ-В.

В результаті проведеного транскрипційного аналізу генів кінезинів, гомологів кінезину-1 людини, проростків *A.thaliana*, що вирощувалися в умовах голодування, сольового та осмотичного стресів, було показано, що сольовий стрес мав наслідком підвищення рівня *KIN6*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B* та пригнічення експресії *KIN5B*, $p < 0,05$ (рис. 6.27).

У випадку метаболічного стресу, майже усі гени зазнавали негативної регуляції, окрім *KIN6*, рівень якого залишався у межах контролю. У проростків, що рослини на середовищі, з додаванням 150 мМ NaCl, на 7-у добу культивування спостерігали пригнічення експресії генів *KIN5B*, *KIN7D*, *KIN12A*, *KIN12F*, в той час як *KIN6* та *KIN12B* зазнавали суттєвої позитивної регуляції. Отримані транскрипційні профілі кінезинів дають можливість виділити кінезини, специфічні для реалізації аутофагії, індукованої певним абіотичним чинником, а також опосередковано підтверджують роль кінезинів у забезпеченні перебігу цього адаптивного механізму у клітинах *A. thaliana*.

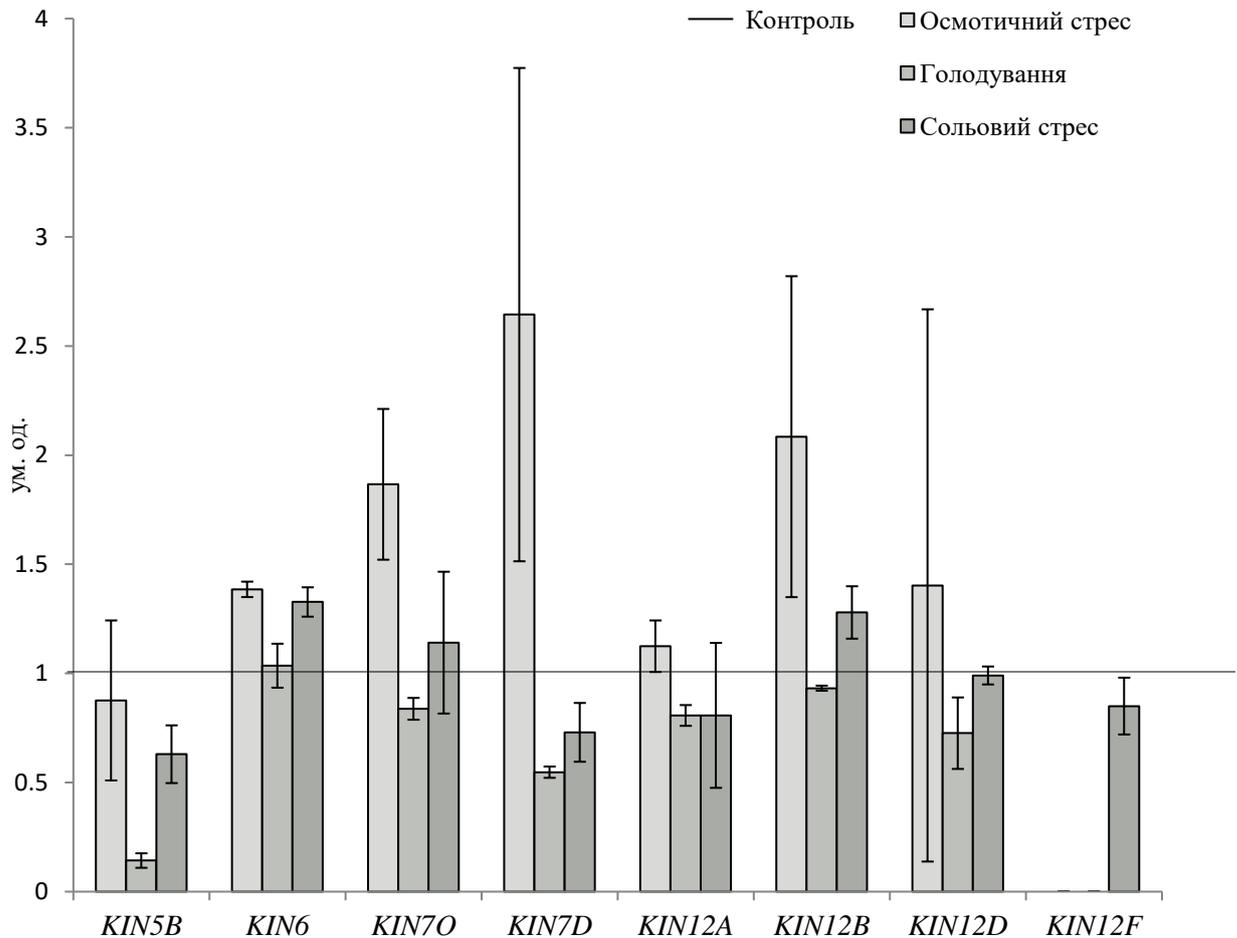


Рис. 6.27. Транскрипційні профілі експресії генів кінезинів, гомологів кінезину-1 людини при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Загалом, результати проведеного транскрипційного аналізу підтверджують розвиток аутофагії, індукованої досліджуваними абіотичними факторами, у *A. thaliana* та опосередковано підтверджують роль мікротрубочок у опосередкуванні даного адаптивного механізму. Продемонстрована ко-експресія 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, вказує на специфічність пар білків зазначених генів для розвитку аутофагії, індукованої абіотичними стресовими чинниками. Отримані профілі експресії генів *elp3*/деацетилаз та гексокіназ підтверджують функціональну роль ацетилювання α -тубуліну у процесі перебігу аутофагії, етапу, що є залученим до розвитку програмованої клітинної загибелі. Суттєве підвищення транскрипційної активності генів *KIN5B*, *KIN12B*, *KIN12F* після

опромінення УФ-В, генів *KIN6*, *KIN7O*, *KIN7D*, *KIN12B* при осмотичному-, та *KIN6*, *KIN12B* при сольовому стресах, дають нам можливість стверджувати про залучення продуктів зазначених генів кінезинів до реалізації адаптивної відповіді клітин рослин на дію стресових факторів.

Матеріали цього підрозділу викладено в наступних публікаціях [149, 150, 153].

6.7. Гіперацетилювання α -тубуліну у відповідь на стрес є тканиноспецифічною адаптивною реакцією

На клітинах тварин було показано, що ацетилювання α -тубуліну є регуляторною модифікацією при розвитку стрес-індукованої аутофагії [8, 11, 165]. Більш того, на попередніх етапах роботи нами було показано роль ацетилювання для реалізації даного адаптивного механізму. Отже, суттєве підвищення рівню ацетилюваного тубуліну у клітинах рослин може свідчити про перебігу процесів аутофагії в цих клітинах.

Тому, для дослідження тканиноспецифічності даної пост-трансляційної модифікації, нами був проведений імуногістохімічний аналіз ацетилювання α -тубуліну у проростках *A. thaliana*, що зазнавали впливу абіотичних стресів. Нами було показано підвищення рівня модифікованого білку у тій чи іншій мірі при дії усіх досліджуваних стресів. Слід зазначити, що дана модифікація мала яскраво виражений тканиноспецифічний характер, що виявлявся у характерному розташуванні ацетилюваних мікротрубочок у клітинах та тканинах проростків *A. thaliana*. Зокрема, корені рослин, виявили вищу чутливість до дії стресових чинників, у порівнянні з листям. У коренях контрольних рослин було виявлено незначний, базовий рівень аутофагії, що проявлявся у підвищеному рівні ацетилюваного тубуліну лише у декількох клітинах епідермісу (рис. 6.28, А)

У свою чергу, корені експериментальних рослин демонстрували гіперацетилювання α -тубуліну у зонах кореневого чохла, епідермісу т

перициклу. Найбільш активно процес аутофагії відбувався внаслідок нестачі вуглеводнів, тобто, за умов голодування (рис. 6.28, Б), а також, після опромінення УФ-В (рис. 6.28, В).

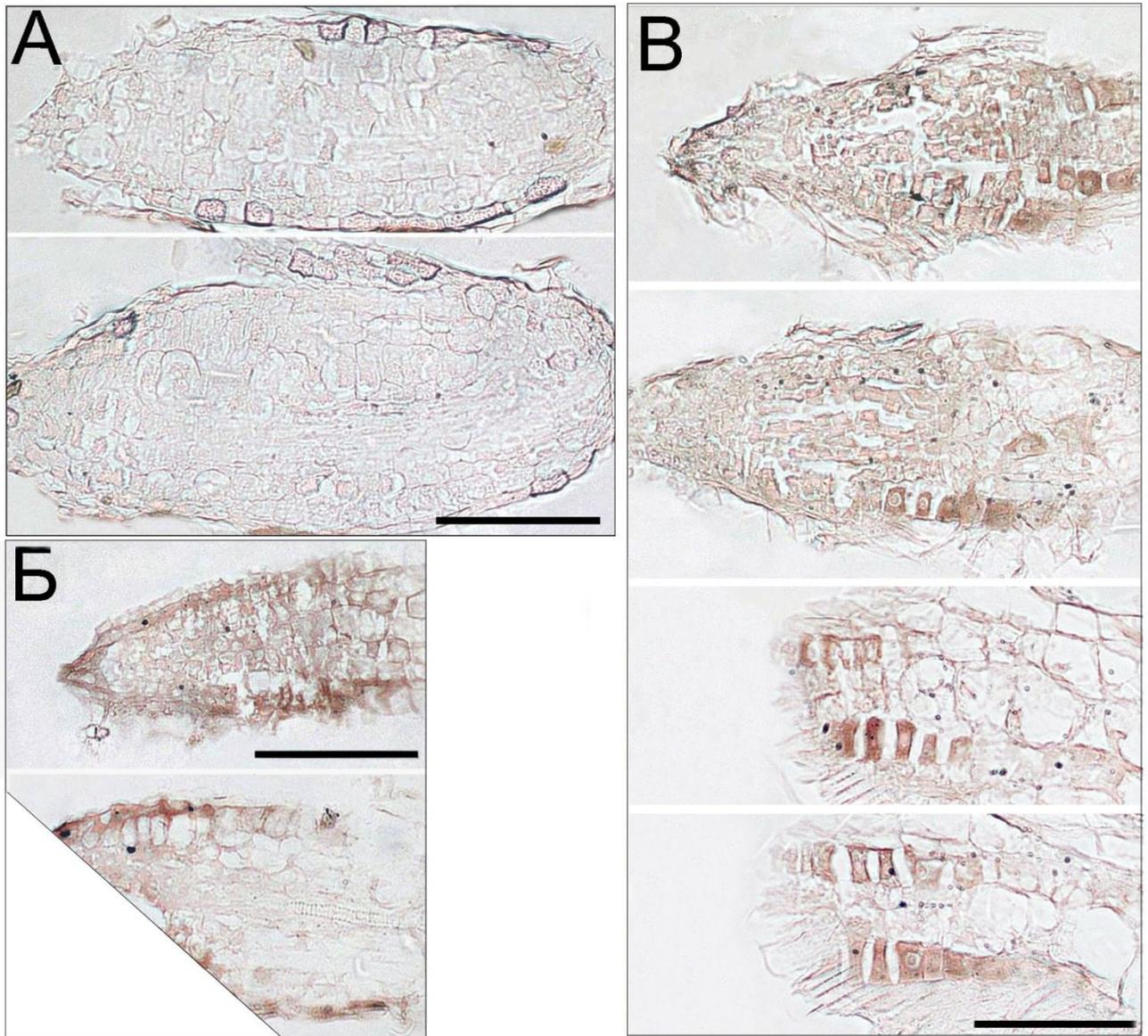


Рис. 6.28. Імуногістохімічне дослідження ацетильованого α -тубуліну (фарбування 3,3'-діамінобензидином, DAB) у коренях проростків *A. thaliana*. А – контроль; Б – голодування; В – опромінення УФ-В. Бар – 100 мкм.

Слід зазначити, що рівень ацетилювання α -тубуліну у гіпокотиліях експериментальних рослин практично не відрізнявся від контролю, демонструючи незначне підвищення модифікованого булку у клітинах обкладки провідних пучків (дані не показано).

Раніше, використовуючи лінію *A. thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-eGFP нами було показано, що в умовах абіотичного стресу на 7-й день культивування відбувається розвиток та активний перебіг процесу аутофагії в клітинах кореневого чохла, епідермісу, перициклу та клітинах провідних шляхів. Отримані результати імуногістохімічного дослідження ацетилювання α -тубуліну чітко корелюють з даними флуоресцентного дослідження аутофагії.

На відміну від коренів, листки рослин в цілому виявили нижчу чутливість до дії стресових чинників (рис. 6.29).

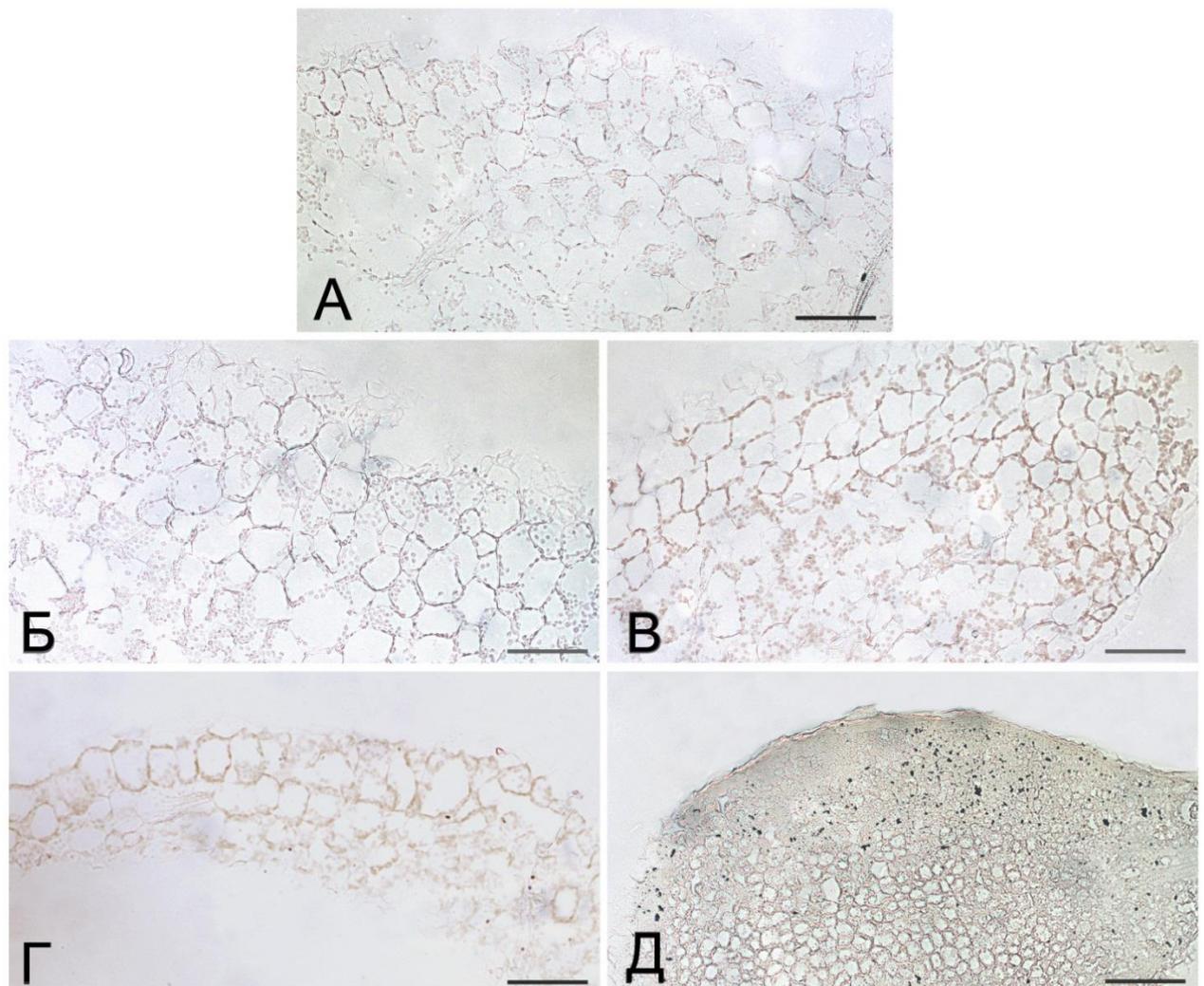


Рис. 6.29. Імуногістохімічний аналіз ацетильованого α -тубуліну (фарбування DAI) у листі проростків *A. thaliana*. А – контроль, Б – опромінення УФ-В, В – голодування, Г – осмотичний стрес, Д – сольовий стрес. Бар – 100 мкм.

У свою чергу, умови голодування, так само, як і осмотичний та сольовий стреси, викликали підвищення рівня ацетильованого α -тубуліну в цілому та, особливо, у клітинах стовпчастої паренхіми.

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 тканиноспецифічність зазначеної модифікації (рис. 6.30).

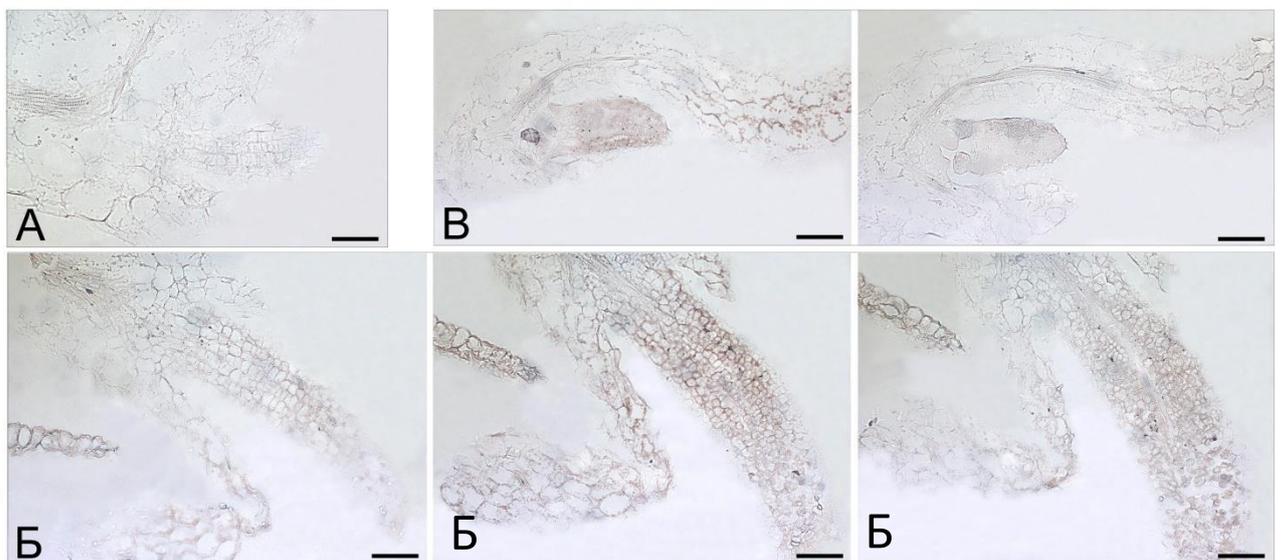


Рис. 6.30. Імуногістохімічний аналіз (DAB) ацетильованого α -тубуліну у клітинах зародкових бруньок проростків *A. thaliana*. А – контроль, Б – опромінення УФ-В, В - осмотичний стрес. Бар – 100 мкм.

Слід зазначити, що така особливість була характерною для усіх стресових чинників, проте, найбільш виражено проявлялася при опроміненні ультрафіолетом-В (рис. 6.31).

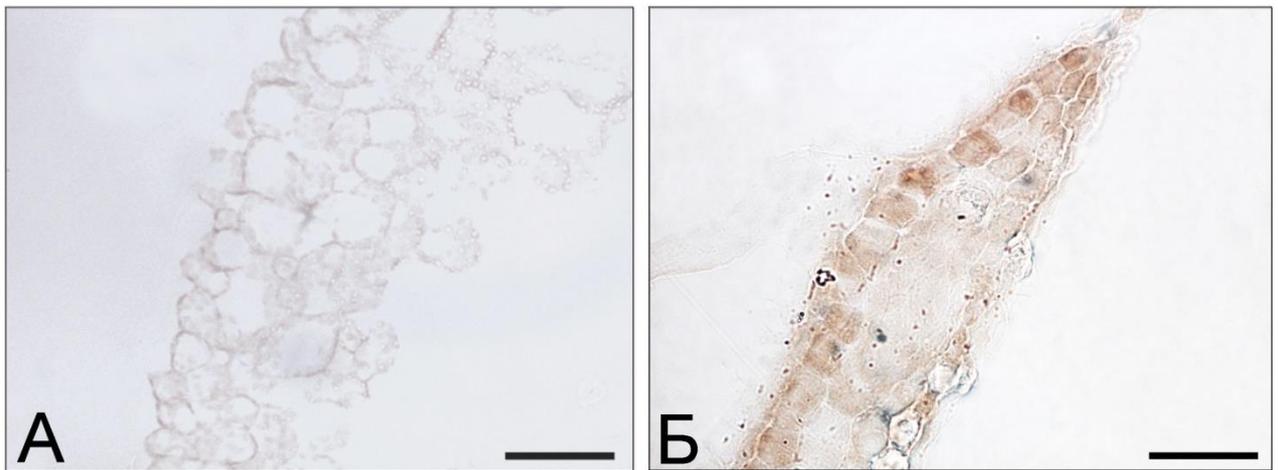


Рис. 6.31. Імуногістохімічний аналіз (DAB) ацетильованого α -тубуліну у клітинах молодих листків проростків *A. thaliana*. А – контроль; Б – опромінення УФ-В. Бар – 50 мкм.

Ацетилювання α -тубуліну є одним з ключових елементів у процесі реалізації аутофагії, як адаптивної відповіді на дію стресових чинників. Ця пост-трансляційна модифікація забезпечує функціональний стан мікротрубочок, а саме, призводить до їх стабілізації, для ініціації наступних етапів індукції аутофагії. Дослідження тканинспецифічності ацетилювання α -тубуліну дає нам можливість виділити тканини та клітини росли, що є чутливими до впливу абіотичних стресів. Зокрема, було показано, 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.

Незначне підвищення рівня 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 будуть зазнавати

умов голодування, осмотичного та сольового стресів раніше за клітини листків.

Гіперацетилювання α -тубуліну у клітинах молодих листків та зародкових бруньок свідчать про високу чутливість клітин меристеми до впливу абіотичних стресів. Поздовжні зрізи коренів підтверджують зроблені висновки, оскільки, перицикл так само є меристемою, що при діленні та диференціації клітин може дати початок зародкам бічних коренів [148].

Ці результати дуже добре ілюструють той факт, що ацетилюванню α -тубуліну відводиться одна з ключових ролей у процесі реалізації аутофагії, у тому числі, і як адаптивної відповіді на дію стресових факторів [166, 167]. Ця посттрансляційна модифікація забезпечує функціональний стан мікротрубочок, а, саме, сприяє їх стабілізації, що може розцінюватися як тригер для запуску наступних етапів індукції аутофагії, зокрема, ефективної взаємодії з кінезинами, що потенційно беруть участь у транспорті аутофагосом, що формуються [10]. Для клітин тварин раніше вже було показано, що мікротрубочки також беруть участь у транспорті зрілих аутофагосом для злиття з лізосомами і подальшого утворення аутолізосом [7].

Дослідження тканиноспецифічності ацетилювання α -тубуліну дозволяє нам виділити тканини і клітини рослин, чутливі до дії абіотичних стресів. Зокрема, було показано, що в результаті впливу стресових факторів найбільш яскраво виражена відповідь у вигляді тканиноспецифічного гіперацетилювання α -тубуліну відбувається в коренях проростків *A. thaliana*, а саме, у зонах кореневого чохла, епідермісу та перициклу. Можна припустити, що розвиток аутофагії в клітинах кореневого чохла є наслідком впливу не тільки абіотичних факторів, але й механічного стресу, обумовленого проростанням кореня в поживне середовище. Незначне підвищення рівня ацетилювання α -тубуліну в листках рослин за умов впливу абіотичних стресів може бути наслідком як низької чутливості диференційованих клітин листя до впливу даних факторів, так і результатом анатомічних особливостей рослин. А саме, клітини кореня, контактуючи з поживним середовищем та

забезпечуючи поглинання і транспорт води та мінеральних елементів до листя, зазнають голодування, осмотичного і сольового стресів раніше, ніж клітини листя.

Гіперацетилювання α -тубуліну в клітинах молодого листя і зародкових бруньок свідчить про високу чутливість клітин меристеми до впливу абіотичних стресів. Аналізуючи дані, отримані на поздовжніх зрізах коренів, було показано підвищення рівня ацетилювання α -тубуліну в клітинах перициклу. Ці результати підтверджують зроблені раніше висновки про більш високу чутливість меристематичних клітин до впливу стресових факторів, з огляду на те, що перицикл також є меристемою, і при розподілі та диференціації клітин може дати початок зачатків бічних коренів [168]. Раніше було показано, що заміна залишку Ліз-40 іншими амінокислотними залишками в трансгенних лініях *A. thaliana* призводить до порушень ділення клітин і їх росту .

Очевидно, що ацетилювання α -тубуліну у рослин може здійснюватися за допомогою Елонгатора - мультибілкового комплексу, що складається з шести субодиниць (ELP1-6), який бере участь у багатьох клітинних процесах у еукаріот, зокрема, ацетилюванні гістонів під час транскрипції, модифікації тРНК, деметилюванні ДНК [27], а також у формуванні імунітету рослин і реалізації адаптивної реакції у відповідь на вплив біотичних та абіотичних факторів [169, 170]. Субодиниця ELP3 має метилтрансферазний, а також гістонацетильтрансферазний (НАТ) домени [171]. Останній з них здатний забезпечувати ацетилювання α -тубуліну, що вперше було показано для нейронів людини [83].

У *A. thaliana* ідентифіковані мутанти *elo1*, *elo2*, *elo3*, дефектні по генам субодиниць Елонгатора (ELP1-3) [170]. Мутант *elo3* характеризується точковою заміною амінокислотного залишку аспарагінової кислоти, локалізованого в НАТ домені і консервативного для всіх ELP3 гомологів, на аспарагін. В цілому, мутанти *elo* характеризуються плейотропних ефектом впливу на фенотип: знижений темп росту первинних коренів, змінена і

зменшена архітектура суцвіть рослин, сповільнений ріст рослин після проростання насіння, і суттєва затримка при проростанні насіння у мутанта *elo3*. Також, товщина листя мутантів по генам Елонгатора знижена, у порівнянні з диким типом, внаслідок зменшення кількості клітин стовпчастої паренхіми [30]. Мутант *elo3* проявляє найбільш серйозні наслідки дефекту гена, а саме, зменшення кількості клітин стовпчастої паренхіми до 52,4%, і відповідного збільшення міжклітинної простору.

Беручи до уваги різні фенотипічні прояви дефектів генів субодиниць Елонгатора, зокрема, *elp3*, можна припустити, що вищезазначені наслідки можуть бути результатом зниження рівня ацетилювання α -тубуліну, як це зазначено у трансгенних ліній *A. thaliana* із заміною ацетильованого залишку Ліз-40 іншими залишками [26]. Отримані на попередніх етапах роботи результати дозволяють нам стверджувати, що ацетилювання α -тубуліну є однією з ключових ланок у індукції і реалізації аутофагії у рослин [137]. Все це дозволяє також припустити, що дефекти по генам Елонгатора, зокрема, *elp3*, будуть викликати порушення процесів аутофагії. Раніше, нами було показано, що при розвитку стрес-індукованої аутофагії відбувається підвищення рівня експресії гена *elp3* [149, 150], що опосередковано свідчить про регуляторну роль ацетилювання α -тубуліну в реалізації аутофагії, як адаптивної реакції у відповідь на вплив абіотичних стресів. З огляду на той факт, що аутофагія в клітинах рослин виконує не тільки захисну і адаптивну функцію у відповідь на дію стресових факторів, а й бере участь у підтримці гомеостазу, росту й розвитку рослин, порушення процесів даного механізму матимуть негативні наслідки для росту і розвитку рослин.

Таким чином, за допомогою імуногістохімічного аналізу ацетилювання α -тубуліну в різних тканинах проростків *A. thaliana* нами було показано, що дана модифікація має тканиноспецифічний 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.

Матеріали цього підрозділу викладено в наступних публікаціях [149].

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Встановлено роль ацетилювання α -тубуліну у реалізації аутофагії у *Arabidopsis thaliana*, індукованої впливом абіотичних стресів (голодування, опромінення УФ-В, осмотичний та сольовий стреси) за участю мікротрубочок. Зазначені абіотичні стреси були обрані, як такі, що є основними серед лімітуючих факторів життєдіяльності рослинних організмів. Тому, для розробки біотехнологічних засобів впливу на культивування сільськогосподарських рослин, що зростають в умовах впливу зазначених абіотичних стресів, необхідним є глибоке розуміння молекулярних процесів відповіді клітин рослин та їх адаптації до дії стресових чинників. Одним з основних механізмів відповіді на несприятливі умови, що є характерним для усіх еукаріот, є аутофагія. Даний процес передбачає формування двомембранних структур *de novo*, захоплення ними зруйнованих білків чи органел, що мають бути деградовані, злиття з літичними вакуолями та утворення аутолізосом, а також деградацію вмісту структури, як кінцевий етап механізму [2]. Молекулярні основи розвитку аутофагії у клітинах тварин є досить детально вивченими на сьогоднішній день [2, 12, 24, 25, 40, 41, 170]. Однією з основних ланок реалізації зазначеного адаптивного механізму у клітинах тварин є мікротрубочки [2, 7, 8]. Зокрема, як високо динамічна складова цитоскелету, мікротрубочки приймають участь у біогенезі аутофагосом та їх внутрішньоклітинному транспорті для злиття з лізосомами [2, 7]. Одну з ключових ролей у індукції розвитку аутофагії у тварин, відіграє кінезин-1, що зумовлює стрес-опосередковану активацію JNK кінази, вивільнення Beclin1, та індукцію подальших етапів сигналінгу, що призводить до залучення будівельних білків аутофагосом [8]. Однак, попри надзвичайне фундаментальне і прикладне значення адаптивної реакції аутофагії, механізми регуляції та реалізації зазначеного процесу в клітинах рослин є малодослідженими та фрагментарними [173, 174].

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%.

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. 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%. На даному етапі роботи нами було продемонстровано роль аутофагії, як адаптивного механізму в умовах впливу абіотичних стресів.

Наступним завданням дисертаційної роботи було дослідити розвиток стрес-індукованої аутофагії на морфологічному рівні, та виявити характерні ознаки перебігу процесів аутофагії у клітинах. За результатами морфологічної оцінки розвитку аутофагії методом флюоресцентної мікроскопії, вплив усіх досліджуваних стресових факторів мав наслідком розвиток та реалізацію аутофагії у клітинах проростків, що загалом проявлялося у появі MDC-забарвлених структур, підвищенні ацидифікації цитоплазми, та у незначному зниженні рівня виживаності клітин. 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). Тому, отримані дані підтверджують роль аутофагії, як адаптивного захисного механізму у відповідь на дію стресових чинників.

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. Проте внаслідок впливу абіотичних факторів сигнали від Atg8h-GFP набували ознак специфічної субклітинної локалізації. Враховуючи, що процесинг Atg8, зокрема, відщеплення С-кінця молекули разом з GFP, є необхідним етапом для вбудовування білку у мембрану аутофагосоми [140], можна зробити висновок, що така локалізація сигналів від GFP хоча і не є власне маркером аутофагосом, проте свідчить про їх безпосередню близькість до них. 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 опромінених клітинах, а тому може бути виявлена як у підземних, так і наземних тканинах рослин. Одночасно було зафіксовано чітку колокалізацію сфокусованих сигналів від Atg8h-GFP та

флуоресції монодансилкадаверину, котрий вважається загальноприйнятим маркером аутофагосом.

Крім того, нами було досліджено вплив абіотичних факторів на розвиток програмованої клітинної загибелі у проростках *A.thaliana* методом TUNEL-аналізу. Показник ПКЗ у контрольних рослин знаходився у межах фізіологічного значення - близько 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.

Для дослідження ролі ацетилювання α -тубуліну у реалізації стрес-індукованої аутофагії, ми використовували трансгенну лінію *A.thaliana*, що стабільно експресує химерний білок Atg8h-GFP. Було проведено Вестерн-блот аналіз рівнів GFP та ацетильованого 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. Вочевидь, що зафіксований невисокий рівень вільного GFP у контрольних рослин відображає базовий рівень аутофагії. Ті ж самі зразки були використані для оцінки рівнів ацетилювання 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.

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. 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 [2, 7]. 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.

З огляду на вагому роль мікротрубочок у опосередкуванні розвитку аутофагії у рослин, наступним етапом роботи було проведення аналізу профілів експресії генів білків, що є залученими до реалізації стрес-індукованої аутофагії, а саме, генів α -тубулінів, ізотипів *atg8*, кінезинів, гексокіназ та генів, залучених до ацетилювання α -тубуліну. Було продемонстровано ко-експресію та підвищення транскрипційної активності генів *tua1* і *atg8e* при голодуванні; генів *tub4* і *atg8a*, *atg8e* при опроміненні УФ-В; *tua3* і *atg8f* при сольовому, та *tua3* і *atg8f*, *atg8e* при осмотичному стресі, що вказує на специфічність пар білків зазначених генів для розвитку

стрес-індукованої аутофагії. Суттєве підвищення транскрипційної активності гену *elp3*, що було задетектовано під впливом усіх стресових чинників, свідчить про регуляторну роль ацетилювання тубуліну в реалізації аутофагії. Слід зазначити, що нами було також виявлено підвищення транскрипційної активності *hxx1*, *hxx3* при опроміненні УФ-В; *hxx1* при голодуванні; та *hxx2* при осмотичному та сольовому стресах, що ілюструє часові проміжки реалізації аутофагії та переходу до ПКЗ.

З огляду на отримані результати, підвищений рівень ацетильованого α -тубуліну в клітинах може слугувати доказом перебігу в них процесів аутофагії. Тому, для більш глибокого розуміння даного адаптивного механізму, нами було проведено імуногістохімічний аналіз ацетилювання α -тубуліну у проростках *A. thaliana*, що зазнавали впливу абіотичних стресів.

Було встановлено, що ацетилювання α -тубуліну є тканиноспецифічною реакцією на дію абіотичних стресів, та найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореневому чохлаку, епідермісі та перициклі). Тканиноспецифічний характер ацетилювання тубуліну у даному випадку дає можливість виокремити тканини і клітини рослин, що є більш чутливими до дії певних стресів, індукуючи адаптивний механізм аутофагії у відповідь на стресові умови.

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 гіпокотиліях.

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 ацетилюваного 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 ацетилюваного 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 ацетилюваний 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 деацетилаз *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 (кореневому чохлаку, епідермісі та перициклі).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-saez I, Lantez V, Job D. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell*. 2006;17(3):1041–50.
2. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Pous C. Autophagy and microtubules – new story , old players. *J Cell Sci*. 2013;126(5):1071–80.
3. de Keizer J, Mulder BM, Janson ME. Microtubule networks for plant cell division. *Syst Synth Biol*. 2014;8:187–94.
4. Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(1):104–11.
5. Wasteneys GO. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci*. 2002;115(Pt7):1345–54.
6. Wang C, Li J, Yuan M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. *Plant Cell Pysiol*. 2007 Nov;48(11):1534–47.
7. Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2009;84(3):431–48.
8. Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG, Perdiz D, Cantaloube I, Rouault A, et al. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem*. 2010 Jul;285(31):24184–94.
9. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao Y-S, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J*. 2010;29(5):969–80.
10. Köchl R, Hu XW, Chan EYW, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 2006;7(2):129–45.
11. Köchl R, Hu XW, Chan EYW, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes.

- Traffic. 2006;7(2):129–45.
12. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1383–435.
 13. Filfan M, Sandu RE, Zavaleanu A-D, Gresita A, Glavan D-G, Olaru D-G, et al. Autophagy in aging and disease. *Rom J Morphol Embryol.* 2017;58(1):27–31.
 14. Lv X, Pu X, Qin G, Zhu T, Lin H. The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Apoptosis.* 2014;19(6):905–21.
 15. Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy.* 2009;5(7):954–63.
 16. de Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 1966;28:435–92.
 17. Tuttle DL, Dunn WA. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. 1995;35:25–35.
 18. Dunn WA. Autophagy and related mechanisms of protein degradation. *Trends Cell Biol.* 1994;4(4):139–43.
 19. Moriyasu Y, Ohsumi Y. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 1996;111(4):1233–41.
 20. Kunz JB, Schwarz H, Mayer A. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem.* 2004;279(11):9987–96.
 21. Camougrand N, Bhatia-Kissova I. Mitophagy in yeast: actors and physiological roles. *FEMS Yeast Res.* 2010;10(8):1023–34.
 22. Krick R, Muhe Y, Prick T, Bredschneider M, Bremer S, Wenzel D, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus. *Autophagy.* 2009;5(2):270–2.
 23. Manjithaya R, Mathewson RD, Subramani S, Farre J. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell.* 2008;14(3):365–76.
 24. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and

- aging. *Cell Res.* 2014;24(1):92–104.
25. Mijaljica D, Prescott M, Klionsky DJ, Devenish RJ. Autophagy and vacuole homeostasis. A case for self-degradation? *Autophagy.* 2015;3(5):417–21.
 26. Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameroni E, de Virgilio C. The TOR and EGO Protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell.* 2005;19(1):15–26.
 27. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012;22(8):407–17.
 28. Schneider JL, Suh Y, Cuervo AM. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab.* 2014;20(3):417–32.
 29. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(759–770).
 30. Valdor R, Mocholi E, Botbol Y, Guerrero-Ros I, Chandra D, Koga H, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1046–54.
 31. Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(8):305–9.
 32. Xilouri M, Stefanis L. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res Rev.* 2016;32:13–21.
 33. Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kaushik S, Kiffin R, Cuervo AM. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell.* 2010;39(4):535–47.
 34. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):132–9.
 35. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Poüs C. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci.* 2013 Mar;126(5):1071–80.
 36. Liu Y, Bassham DC. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2010 Jan;5(7):e11883.

37. Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*. 2008;4(7):851–65.
38. Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, et al. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in Yeast. *Mol Cell Biol*. 2001;21(13):4347–68.
39. Beck T, Hall MN. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*. 1999;402(6762):689–92.
40. Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex – at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol*. 2010;20(6):355–62.
41. Polson H, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Clague MJ, Tooze SA, et al. Mammalian tua18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*. 2010;6(4):506–22.
42. Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J Exp Bot*. 2014;65(14):3799–811.
43. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO*. 2000;19(21):5720–8.
44. Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, Colombo MI. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2004;117(Pt13):2687–97.
45. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen E, Hartmann D, Lu R, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. 2000;406(6798):902–5.
46. Ungermann C, Langosch D. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt17):3819–28.
47. Hamada T. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in

- plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;312:1-52.
48. Hamada T. Lessons from *in vitro* reconstitution analyses of plant microtubule-associated proteins. *Front Plant Sci*. 2014;5(409):1–9.
 49. Hammond J, Cai D, Verhey K. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;20(1):71–6.
 50. Smertenko A, Blume Y, Viklicky V, Opatrny Z, Draber P. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms. *Planta*. 1997;42:349–58.
 51. Prota AE, Magiera MM, Kuijpers M, Bargsten K, Frey D, Wieser M, et al. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J Cell Biol*. 2013;200(3):259–70.
 52. Szyk A, Deaconescu AM, Piszczek G, Roll-mecak A. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol* . 2011;18(11):1250–8.
 53. Kreitzer G, Liao G, Gundersen GG. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules *in vivo* via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 1999;10(4):1105–18.
 54. Marcos S, Moreau J, Job D, Andrieux A, Bloch-Gallego E. Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS One*. 2009;4(4):e5405.
 55. Quinones GB, Danowski BA, Devaraj A, Singh V, Ligon LA. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Mol Biol Cell*. 2011;22(7):1045–57.
 56. Khawaja S, Gregg GG. Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol*. 1988;106:141–9.
 57. Peris L, Wagenbach M, Lafanechère L, Brocard J, Ayana T, Kozielski F, et al. Motor dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol*. 2014;185(7):1159–66.

58. Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Gros F, Denoulet P, Eddé B. Developmental regulation of polyglutamylated α - and β - tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci.* 1994;107(8):2313–22.
59. Abal M, Keryer G, Bornens M. Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition. *Biol cell.* 2005;97(6):425–34.
60. Gaertig J, Wloga D. Ciliary tubulin and its post-translational modifications. *Curr Top Dev Biol.* 2008;85:83-113.
61. Sloboda RD. Posttranslational protein modifications in cilia and flagella. *Methods Cell Biol.* 2009;94:347-63.
62. Levilliers N, Wloga D, Webster DM, Rogowski K, Jerka-dziadosz M, Janke C, et al. TLL3 is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev Cell.* 2009;16(6):867–76.
63. Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, et al. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12839–48.
64. Lacroix B, Dijk J Van, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-herrada G, Rogowski K, et al. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol.* 2010;189(6):945–54.
65. Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, et al. Loss of α -tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3213–8.
66. Maas C, Belgardt D, Kyu H, Heisler FF, Lappe-siefke C, Magiera MM, et al. Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8731–6.
67. Gard DL, Kirschner MW. A polymer-dependent increase in phosphorylation of β -tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma. *J Cell Biol.* 1985;100(3):764–74.

68. Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci.* 2011;123(Pt20):3447–55.
69. Laurent CE, Delfino FJ, Cheng HY, Smithgall TE. The human c-Fes tyrosine kinase binds tubulin and microtubules through separate domains and promotes microtubule assembly. *Mol Cell Biol.* 2004;24(21):9351–8.
70. Soppina V, Herbstman JF, Skiniotis G, Verhey KJ. Luminal localization of α -tubulin K40 acetylation by cryo-EM analysis of fab-labeled microtubules. *PLoS One.* 2012;7(10):e48204.
71. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Mol Cell Biol.* 2011;12(12):773–86.
72. Perdiz D, Mackeh R, Poüs C, Baillet A. The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cell Signal.* 2011;23(5):763–71.
73. Smertenko A, Blume Y, Viklicky V, Opatrny Z, Draber P. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta.* 1997;201(3):349–58.
74. Tran T, Uhrig G, Nimick M, Moorhead GB. Interfacing protein lysine acetylation and protein phosphorylation Ancient modifications meet on ancient proteins. *Plant Signal Behav.* 2012;7(8):901–3.
75. Friedmann DR, Aguilar A, Fan J, Nachury M V, Marmorstein R. Structure of the α -tubulinacetyltransferase, α TAT1, and implications for tubulin-specific acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(48):19655–60.
76. Taschner M, Vetter M, Lorentzen E. Atomic resolution structure of human α -tubulin acetyltransferase bound to acetyl-CoA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(48):19649–54.
77. Song Y, Brady ST. Posttranslational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* 2015;25(3):125–36.
78. Otero G, Fellows J, Li Y, Bizemont T De, Dirac AMG, Gustafsson CM, et al. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II

- holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*. 1999;3(1):109–18.
79. Li Y, Takagi Y, Jiang Y, Tokunaga M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. A multiprotein complex that interacts with RNA polymerase II Elongator. *J Biol Chem*. 2001;276(32):29628–32.
 80. Kim J, Lane WS, Reinberg D. Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(3):1241–6.
 81. Li Q, Fazly AM, Zhou H, Huang S, Zhang Z, Stillman B. The Elongator complex interacts with PCNA and modulates transcriptional silencing and sensitivity to DNA damage agents. *PLoS Genet*. 2009;5(10):e1000684.
 82. Silva KJP, Brunings AM, Pereira JA, Peres NA, Folta KM, Mou Z. The *Arabidopsis* ELP3/ELO3 and ELP4/ELO1 genes enhance disease resistance in *Fragaria vesca* L. *BMC Cell Biol*. 2017;17(1):230.
 83. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, Malaise O, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin. *Cell*. 2009;136(3):551–64.
 84. Solinger JA, Paolinelli R, Berlanda F, Marchesi S, Sauder U, Mitsushima D, et al. The *Caenorhabditis elegans* Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. *PLoS Genet*. 2010;6(1):e1000820.
 85. Tran HT, Nimick M, Uhrig RG, Templeton G, Morrice N, Gourlay R, et al. *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J*. 2012;71(2):263–72.
 86. Yang Y, Feng L, Zheng X. Microtubule and kinesin/dynein-dependent, bi-directional transport of autolysosomes in neurites of PC12 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(8):1147–56.
 87. Cardoso CMP, Groth-Pedersen L, Høyer-Hansen M, Kirkegaard T, Andersen JS, Jaattela M. Depletion of kinesin 5B affects lysosomal distribution and stability and induces peri-nuclear accumulation of autophagosomes in cancer

- cells. *PLoS One*. 2009;4(2):e4424.
88. Saglio PH, Pradet A. Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiol*. 1980;66:516–9.
 89. Tassi F, Maestri E, Restivo FM, Marmioli N. The effects of carbon starvation on cellular metabolism and protein and RNA synthesis in *Gerbera* callus cultures. *Plant Sci*. 1992;83:127–36.
 90. Литвин Д, Ємець А, Блюм Я. Розвиток аутофагії в клітинах тютюну ВУ-2 супроводжується ацетилюванням α -тубуліну Доповіді НАН Укр. 2013;5:179–85.
 91. Rose TL, Bonneau L, Der C, Marty-Mazars D, Marty F. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol cell*. 2006;98(1):53–67.
 92. Lebaudy A, Very A-A, Sentenac H. K^+ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Lett*. 2007;581(12):2357–66.
 93. Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys*. 2005;444(2):139–58.
 94. Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A. Plant adaptation to drought stress. *F1000 res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev–1554.
 95. Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, et al. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H^+ -ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol*. 2007;27(22):7781–90.
 96. Wilden WVANDER, Herman EM, Chrispeels MJ. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(1):428–32.
 97. Slavikova S, Ufaz S, Avin-wittenberg T, Levanony H, Galili G. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. 2008;59(14):4029–43.
 98. Shin J, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon J, An G. OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Mol*

- Cells. 2009;27(1):67–74.
99. Taylor P, Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. 2009;5(7):37–41.
 100. Blancaflor EB, Hasenstein KH. Growth and microtubule orientation of *Zea mays* roots subjected to osmotic stress. Int J Plant Sci. 1995;156(6):774–83.
 101. Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends Plant Sci. 1998;3(4):131–5.
 102. Rizzini L, Favory J-J, Cloix C, Faggionato D, O’Hara A, Kaiserli E, et al. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein. Science. 2011;332(6025):103–6.
 103. Brosché M, Schuler MA, Kalbina I, Connor L, Strid Å. Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. Photochem Photobiol Sci. 2002;1(9):656–64.
 104. Yang Y, Wang H, Wang S, Xu M, Liu M, Liao M, et al. GSK3 β signaling is involved in ultraviolet B-induced activation of autophagy in epidermal cells. Int J Oncol. 2012;41(5):1782–8.
 105. Krasnylenko YA, Yemets AI, Sheremet YA, Blume YB. Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in Arabidopsis. Physiol Plant. 2012;145(4):505–15.
 106. Lytvyn D, Yemets A, Blume YaB. UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line. Environ Exp Bot. 2010 Mar;68(1):51–7.
 107. van Doorn WG, Woltering EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Sci. 2005;10(3):117–22.
 108. McCabe PF, Reape TJ. Apoptotic-like programmed cell death in plants. New Phytol. 2008;180(1):13–26.
 109. van Doorn WG. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. J Exp Bot. 2011;62(14):4749–61.
 110. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(12):2405–19.

111. Lennon S V, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 1991;24:203–14.
112. van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-tong VE, Gallois P, Jones AM, et al. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.* 2011;18(8):1241–6.
113. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3–15.
114. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
115. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):263–8.
116. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907–16.
117. Lee C, Baehrecke EH. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development.* 2001;128(8):1443–55.
118. Nunez R, Sancho-Martinez SM, Novoa J, Lopez-Hernandez FJ. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. *Cell Death Differ.* 2010;17(11):1665–71.
119. Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, et al. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science.* 2004;305(5685):855–8.
120. Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, Kondo M, Fuji K, Ogasawara K, et al. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.* 2009;23(21):2496–506.
121. Filonova LH, Bozhkov P V, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, Arnold S Von. Two waves of programmed cell death occur during formation and

- development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt24):4399–411.
122. Bozhkov P V, Filonova LH, Suarez MF. Programmed cell death in plant embryogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2005;67:135–79.
 123. Jones A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.* 2000;5(5):225–30.
 124. Lin J, Wang Y, Wang G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J Plant Physiol.* 2006;163(7):731–9.
 125. Monetti E, Kadono T, Tran D, Azzarello E, Arbelet-bonnin D. Deciphering early events involved in hyperosmotic stress-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *J Exp Bot.* 2014;65(5):1361–75.
 126. McCormac AC, Elliott MC, Chen DF. A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Mol Biotechnol.* 1998;9(2):155–9.
 127. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1998;16(6):735–43.
 128. Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J, Tanaka I. Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 1978; 42(3): 523-528.
 129. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
 130. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Web Server issue):W252-258.
 131. Benkert P, Tosatto SCE, Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins.* 2008;71(1):261–77.

132. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):1731–7.
133. Guo Y, Li M, Pu X, Li G, Guang X, Xiong W, et al. PRED_PPI: a server for predicting protein-protein interactions based on sequence data with probability assignment. *BMC Res Notes.* 2010;3(1):145.
134. Kutzner C, Páll S, Fechner M, Esztermann A, De Groot BL, Grubmüller H. Best bang for your buck: GPU nodes for GROMACS biomolecular simulations. *J Comput Chem.* 2015;36(26):1990–2008.
135. Hasegawa PM, Bressan RA. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2000;51:463–99.
136. 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):1641–52.
137. Olenieva V, Lytvyn D, Yemets A, Bergounioux C, Blume Y. Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol Int.* 2017;doi: 10.1002/cbin.10843.
138. Biederbick A, Kern H, Elsässer H. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol.* 1995;66(1):3–14.
139. Литвин Д, Федина В. Ацетилювання α -тубуліну впливає на зміни білкового мікрооточення мікротрубочок при розвитку аутофагії в клітинах тютюну. Збірник наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. 2015;17:65–9.
140. Klionsky DJ. For the last time, it is GFP-Atg8, not Atg8-GFP (and the same goes for LC3). *Autophagy.* 2011;7(10):1093–4.
141. Olenieva V, Lytvyn D, Blume YB. Acetylation of α -tubulin as a crucial modification for autophagy development induced by abiotic stimuli. In: Молодіжна конференція «Біологія рослин та біотехнологія». Київ; 2017.

- с.36.
142. Fedyna V, Lytvyn D, Blume YB. α -Tubulin acetylation is essential for autophagy development induced by different abiotic factors: transcriptome and biochemical study. In: Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress. Prague, Czech Republic; 2016.
 143. Krasnylenko Y a, Yemets AI, Blume YB. Plant microtubules reorganization under the indirect UV-B exposure and during UV-B-induced programmed cell death. *Plant Signal Behav.* 2013;8(5):e24031;
 144. Федина В, Литвин Д, Блюм Я. З'ясування ролі мікротрубочок у розвитку аутофагії у рослин , спричиненої дією абіотичних стресів. Збірник наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. 2016;19:47–50.
 145. Li M, Chen X, Ye Q, Vogt A, Yin X. A high-throughput FRET-based assay for determination of Atg4 activity. *Autophagy.* 2015;8(3):401–12.
 146. Giannoutsou E, Galatis B, Zachariadis M, Apostolakos P. Formation of an endoplasmic reticulum ring associated with acetylated microtubules in the angiosperm preprophase band. *Cytoskeleton.* 2012 Apr;69(4):252–65.
 147. Tran HT, Nimick M, Uhrig RG, Templeton G, Morrice N, Gourlay R, et al. *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J.* 2012;71(2):263–72.
 148. Nakagawa U, Kamemura K, Imamura A. Regulated changes in the acetylation of α -tubulin on Lys40 during growth and organ development in fast plants, *Brassica rapa* L . *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;77(11):2228–33.
 149. 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 // Цитология и генетика – Том 52, №4. - С.3-13.
 150. Оленева В, Литвин Д, Емец А, Блюм Я. Вплив УФ-В на транскрипційні

- профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Доповіді НАН Укр. 2018;1:100–9.
151. Оленева ВД, Литвин ДІ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Вплив голодування, осмотичного та сольового стресів на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Вісн Укр тов-ва генетиків і селекціонерів. 2017;15(2):175–81.
152. Raevsky A, Sharifi M, Samofalova D, Karpov P, Blume YB. Structural and functional features of lysine acetylation of plant and animal tubulins. *Cell Biol Int*. 2017;doi: 10.1002/cbin.10887.
153. 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.
154. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(3):171–82.
155. Kim M, Lim J-H, Ahn CS, Park K, Kim GT, Kim WT, et al. Mitochondria-Associated Hexokinases Play a Role in the Control of Programmed Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. 2006;18(9):2341–55.
156. Godbole A, Dubey AK, Reddy PS, Udayakumar M, Mathew MK. Mitochondrial VDAC and hexokinase together modulate plant programmed cell death. *Protoplasma*. 2013;250(4):875–84.
157. Israelson A, Zaid H, Abu-Hamad S, Nahon E, Shoshan-Barmatz V. Mapping the ruthenium red-binding site of the voltage-dependent anion channel-1. *Cell Calcium*. 2008;43(2):196–204.
158. Tateda C, Yamashita K, Takahashi F, Kusano T, Takahashi Y. Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death. *Plant Cell Rep*. 2009;28(1):41–51.

159. Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, et al. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell*. 1999;11(7):1253–66.
160. Camacho-Pereira J, Meyer LE, Machado LB, Oliveira MF, Galina A. Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria is modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. *Plant Physiol*. 2008;149(2):1099–110.
161. Endow SA. Determinants of molecular motor directionality. *Nat Cell Biol*. 1999;1(6):163–7.
162. Tiezzi A, Moscatelli A, Cai G, Bartalesi A. An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Cell Motil Cytoskelet*. 1992;21(2):132–7.
163. Cai G, Bartalesi A, Casino C Del, Moscatelli A, Tiezzi A, Cresti M. The kinesin-immunoreactive homologue from *Nicotiana tabacum* pollen tubes : Biochemical properties and subcellular localization. *Planta*. 1993;191:496–506.
164. Li J, Xu Y, Chong K. The novel functions of kinesin motor proteins in plants. *Protoplasma*. 2012;249(Suppl 2):S95–100.
165. Xie R, Nguyen S, McKeehan WL, Liu L. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol*. 2010;11:89.
166. McEwan DG, Dikic I. The three musketeers of autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol*. 2011;21(4):195–201.
167. Popelka H, Klionsky DJ. Posttranslationally-modified structures in the autophagy machinery: an integrative perspective. *FEBS J*. 2015;282(18):3474–88.
168. Dubrovsky JG, Doerner PW, Colon-carmona A, Rost TL. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2010;124(4):1648–57.

169. DeFraia CT, Mou Z. The role of the Elongator complex in plants. *Plant Signal Behav.* 2011;6(1):19–22.
170. Nelissen H, Fleury D, Bruno L, Robles P, De Veylder L, Traas J, et al. The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(21):7754–9.
171. Dalwadi U, Yip CK. Structural insights into the function of Elongator. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(9):1613–22.
172. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 2011;7(7):673–82.
173. Wang Y, Zheng X, Yu B, Han S, Guo J, Tang H, et al. Disruption of microtubules in plants suppresses macroautophagy and triggers starch excess-associated chloroplast autophagy. *Autophagy.* 2015;11(12):2259–74.
174. Wang Y, Zheng X, Liu Y. Functional links between microtubules, autophagy and leaf starch degradation in plants. *Plant Signal Behav.* 2016;11(7):e1201626.

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

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. **Федына 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., Ємец 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).