

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ШАДРІНА РУСЛАНА ЮРІЇВНА

УДК: 577.121.2+57.017.3+543.272.32

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ АУТОФАГІЇ У ВІДПОВІДІ *ARABIDOPSIS THALIANA*
НА ВПЛИВ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА УЧАСТЬ МІКРОТРУБОЧОК В
ОПОСЕРЕДКУВАННІ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ**

Спеціальність – 091 «Біологія»

Галузь знань – 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

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

_____ Руслана ШАДРІНА

Науковий керівник: Алла ЄМЕЦЬ, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент Національної академії наук України

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Шадріна Р. Ю. Роль аутофагії у відповіді *Arabidopsis thaliana* на вплив мікрогравітації та участь мікротрубочок в опосередкуванні цього процесу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2024.

Дослідження присвячене аналізу процесів аутофагії в рослинах *Arabidopsis thaliana* під впливом мікрогравітації з особливим акцентом на ролі мікротрубочок. Аутофагія як внутрішньоклітинний механізм деградації та рециркуляції макромолекул і органел виступає ключовим фактором в адаптації рослин до стресових умов. На сьогодні вивчення фізіологічної ролі аутофагії при стресі є однією з актуальних проблем біології, оскільки в залежності від ступеня пошкодження клітин цей процес може сприяти або виживанню, або загибелі клітин. Тому у даному дослідженні зосереджено увагу на вивченні розвитку процесів аутофагії, а також ролі цитоскелету, зокрема мікротрубочок, у рослин в умовах зміненої гравітації.

Вивчення адаптації рослин до зміненої гравітації є ключовим для розвитку систем життєзабезпечення в космосі. Нещодавно було показано, що *Arabidopsis thaliana* та інші види рослин можуть розвиватися та давати урожай насіння у космічних умовах, проте за таких умов розвитку вони зазнають певних молекулярних змін [1, 2]. Дослідження адаптації рослин за участю аутофагії в змодельованих умовах є надзвичайно актуальним, оскільки дає змогу створити фундамент для подальших космічних досліджень із вирощуванням рослин, а далі – для отримання продуктів харчування в умовах зміненої гравітації.

Як матеріал досліджень використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia Col-0 та дві трансгенні лінії *A. thaliana*: GFP-ATG8a та GFP-MAP4. Стресові умови моделювали за допомогою кліноостату, на якому вирощували

рослини (режим обертання 4 об/хв). Використання кліноостату дозволяє імітувати умови мікрогравітації, що є важливим для дослідження адаптаційних механізмів рослин. Візуалізацію аутофагосом здійснювали за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії. Цей метод дозволяє отримати детальні зображення внутрішньоклітинних структур та процесів, що є ключовим для аналізу аутофагії. За допомогою молекулярно-генетичних методів оцінювали експресію генів білків ATG, α - і β -тубулінів в досліджуваних рослинах. Ці методи дозволяють кількісно оцінити рівні експресії генів та виявити зміни, які виникають під впливом мікрогравітації.

Було проаналізовано вплив мікрогравітації на ріст та розвиток проростків *A.thaliana*. У результаті проведених досліджень нами було виявлено, що кліноостатування не впливало на проростання насіння, а також не викликало суттєвих відхилень у морфології пагонів проростків. Затримка в розвитку пагонів спостерігали лише на 6-ту та 9-ту добу кліноостатування, на 12-ту добу пагони практично морфологічно не відрізнялися від контрольних рослин. Також 12-денні проростки мали правильну листову розетку, яка складалася з 4–6 овальних зелених листків. У той же час проростки, що зростали в експериментальних умовах, на відміну від контролю мали дезорієнтований ріст коренів, що було наслідком постійної зміни вектора сили тяжіння. При аналізі морфології та розвитку головних коренів проростків були виявлені відмінності в їх зонах росту. Зокрема, зони розтягу та перехідна були коротшими за умов кліноостатування в порівнянні із контрольними рослинами. Кількісний аналіз середньої площі епідермальних клітин в перехідній зоні показав незначні відмінності (менше на 29 %) у розмірах досліджуваних рослин порівняно із контролем. Також було проаналізовано кут гравітропічного нахилу (GSA). Результати показали значне збільшення GSA у проростків *A. thaliana* в умовах кліноостатування, що свідчить про відхилення від нормальної вертикальної орієнтації коренів, як, наприклад, у контролі.

Методами флуоресцентної та конфокальної лазерної скануючої мікроскопії було проведено дослідження розвитку стрес-індукованої аутофагії на морфологічному рівні. Виявлено характерні ознаки розвитку аутофагії під впливом мікрогравітації, зокрема збільшення кількості аутофагосом у клітинах кореня. За допомогою флуоресцентного барвника MDC було виявлено появу структур розміром від 3 до 20 мкм, що свідчить про активний розвиток аутофагії під впливом стресових умов мікрогравітації. Отримані результати за використання барвника LTR та трансгенної лінії *A. thaliana* (GFP-ATG8a) в обох випадках показали індукцію аутофагії та максимальний рівень утворення аутофагосом у епідермальних клітинах кореня перехідної зони рослин *A. thaliana* після 6-ти діб культивування.

Визначено кількість аутофагосом за допомогою трансгенної лінії *A. thaliana* GFP-ATG8a. Результати показали значне збільшення кількості аутофагосом у клітинах, що знаходилися під впливом мікрогравітації, що свідчить про активацію аутофагії як захисного механізму. На 6-ту добу вирощування спостерігалася найбільш суттєва зміна кількості аутофагосом (більше ніж у 2 рази) порівняно з контролем, хоча на 9-ту добу кількість аутофагосом зменшилася у клітинах перехідної зони кореня, їх було все одно більше, ніж у контрольних рослинах. На 12-ту добу вирощування кількість аутофагосом у клітинах коренів рослин в умовах кліноостатування була подібною до контрольних рослин.

Було досліджено вміст ендогенного NO в проростках *A. thaliana* за умов кліноостатування. Результати показали, що мікрогравітація викликає підвищення рівня NO у клітинах кореня, що може бути одним із механізмів адаптації рослин до стресових умов. Було показано підвищення вмісту нітритів в 1,5 рази у контрольних рослин та 1,8 рази у кліноостатованих на 6-ту добу культивування. Збільшення тривалості культивування призводило до поступового зниження ендогенного вмісту NO, що може свідчити про адаптацію рослин до умов кліноостатування.

Також досліджено вплив кліноостатування на організацію мікротрубочок в клітинах кореня за допомогою лінії *A. thaliana* (GFP-MAP4). Виявлено зміни в просторовій організації мікротрубочок, що свідчить про їх залученість у процеси аутофагії. На 6-ту добу вирощування мікротрубочки стали дезорієнтованими у клітинах усіх досліджуваних зон кореня, що свідчить про вплив мікрогравітації на структурну організацію цитоскелету рослин.

Білок ATG8 є одним із центральних компонентів, який залучений до процесів аутофагії й бере участь у формуванні аутофагосом. В *Arabidopsis thaliana* наявні кілька ізотипів білка ATG8, які можуть виконувати різні функції в аутофагії. Зокрема, було виявлено, що частина генів *AtATG8*, (*AtATG8b*, *AtATG8e*, *AtATG8f* та *AtATG8i*) може бути більш специфічною для повноцінної реалізації аутофагії за умов мікрогравітації.

Проаналізовано рівні експресії генів α - та β -тубуліну при індукції аутофагії мікрогравітацією. Зокрема, встановлено підвищення рівнів експресії генів *AtTUA2*, *AtTUA3* на 6–9 добу. Результати аналізу експресії генів β -тубуліну показали залучення генів *AtTUB2* і *AtTUB3* після 6–9 діб вирощування за умов мікрогравітації, оскільки спостерігали їх підвищений рівень експресії.

У науковій праці вперше продемонстровано рівні експресії генів β -тубуліну в процесі розвитку стрес-індукованої аутофагії за умов кліноостатування. Також проаналізовано рівні експресії генів білка ATG8, та встановлено, що мікрогравітація індукує підвищення експресії ізотипів *AtATG8* *A. thaliana* на різних часових проміжках. Також було встановлено залученість мікротрубочок до реалізації процесів аутофагії.

Дослідження підтвердили важливість α - та β -тубулінів у стрес-індукованій аутофагії, що є підґрунтям для подальшого вивчення механізмів реакції рослин на мікрогравітацію, включаючи роль білка ATG8 та оксиду азоту (NO), та складає практичну цінність дисертаційних результатів. Отримані дані можуть закласти основу для майбутніх досліджень із вивчення

адаптації рослин під час космічних польотів та розв'язання проблем, пов'язаних із вирощуванням рослин у космосі.

Ключові слова: мікрогравітація, аутофагія, оксид азоту, мікротрубочки, α -тубулін, β -тубулін, ATG8, експресія генів.

SUMMARY

Shadrina R. Yu. The role of autophagy in the response of *Arabidopsis thaliana* to microgravity conditions and the participation of the microtubules in mediating this process. – Manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree (Ph.D) on a speciality 091 – Biology. Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The research is dedicated to the analysis of autophagy processes in *Arabidopsis thaliana* plants under the influence of microgravity, with a particular focus on the role of microtubules in this process. Autophagy, as an intracellular mechanism of degradation and recycling of macromolecules and organelles, is a key factor in the adaptation of plants to various stress conditions. Currently, studying the physiological role of autophagy under stress is one of the actual problems of biology, as depending on the degree of cell damage, this process can either contribute to survival or cell death. Therefore, the scientific work focuses on the induction of autophagy processes under conditions of altered gravity.

Studying plant adaptation to microgravity is key for developing life support systems in space. Recent experiments have shown that *Arabidopsis thaliana* and other species can develop and yield seeds in space conditions, however, they undergo molecular changes. Researching plant adaptation involving autophagy in simulated space conditions is extremely important, as it allows creating a foundation for further space research in plant cultivation, and subsequently food production in altered gravity conditions.

A. thaliana plants of the Columbia Col-0 ecotype and two transgenic lines of *A. thaliana* were used as research material: GFP-ATG8a and GFP-MAP4. Stress conditions were modeled using a clinostat on which the plants were grown (4 rpm rotation mode). The use of a clinostat allows to simulate microgravity conditions, which is important for the study of plant adaptation mechanisms. Autophagosomes were visualized using laser confocal microscopy. This method allows to obtain detailed images of intracellular structures and processes, which is key for the analysis of autophagy. Molecular genetic methods were used to evaluate the gene expression of ATG, α - and β -tubulin proteins in the studied plants. These methods allow us to quantify gene expression levels and identify changes that occur under the influence of microgravity.

It was analyzed the effect of microgravity on the growth and elongation of *A. thaliana* seedlings. As a result of our studies, we found that wedge-statement did not affect seed germination and did not cause significant deviations in the morphology of seedling shoots. Delayed shoot development was observed only on the 6th and 9th day of wedging, and on the 12th day the shoots were practically morphologically indistinguishable from control plants. Also, 12-day-old seedlings had a regular leaf rosette consisting of 4-6 oval green leaves. At the same time, seedlings growing under experimental conditions, unlike the control, had disoriented root growth, which was a consequence of a constant change in the gravity vector. The analysis of the morphology and development of the main roots of seedlings revealed differences in their growth zones. In particular, the tensile and transitional zones were shorter under wedging conditions compared to control plants. Quantitative analysis of the average area of epidermal cells in the transition zone showed insignificant differences (29 % less) in the size of the treated plants compared to the control. The gravitropic slope angle (GSA) was also analyzed. The results showed a significant increase in GSA in *A. thaliana* seedlings under wedge conditions, indicating a deviation from the normal vertical root orientation, as in the control.

The development of stress-induced autophagy at the morphological level was studied by fluorescence and confocal laser scanning microscopy. The characteristic signs of autophagy development under the influence of microgravity were revealed, in particular, an increase in the number of autophagosomes in root cells. Using the fluorescent dye MDC, the appearance of structures ranging in size from 3 to 20 μm was detected, indicating the active development of autophagy under the influence of stressful microgravity conditions. The results obtained using the LTR dye and the transgenic line of *A. thaliana* (GFP-ATG8a) in both cases showed the induction of autophagy and the maximum level of autophagosome formation in the epidermal cells of the root transition zone of *A. thaliana* plants after 6 days of cultivation.

The number of autophagosomes was counted using the transgenic line of *A. thaliana* GFP-ATG8a. The results showed a significant increase in the number of autophagosomes in cells exposed to microgravity, indicating the activation of autophagy as a defense mechanism. On the 6th day of cultivation, the most significant change in the number of autophagosomes was observed (more than 2-fold) compared to the control, although on the 9th day the number of autophagosomes decreased in the cells of the root transition zone, they were still more than in the control plants. On the 12th day of cultivation, the number of autophagosomes in the cells of plant roots under conditions of clonostatization was similar to that of control plants.

The content of endogenous NO in *A. thaliana* seedlings under conditions of wedge stasis was investigated. The results showed that microgravity causes an increase in NO levels in root cells, which may be one of the mechanisms of plant adaptation to stressful conditions. An increase in the nitrite content by 1.5 times in control plants and 1.8 times in clonostatized plants on the 6th day of cultivation was shown. The increase in the duration of cultivation led to a gradual decrease in the endogenous NO content, which may indicate the adaptation of plants to the conditions of clonostatization.

Also, the effect of wedge formation on the organization of microtubules in root cells was studied using the *A. thaliana* line (GFP-MAP4). Changes in the spatial organization of microtubules were detected, indicating their involvement in autophagy. On the 6th day of cultivation, microtubules became disoriented in cells of all studied root zones, indicating the effect of microgravity on the structural organization of the plant cytoskeleton.

The ATG8 protein is one of the central components involved in autophagy and is involved in the formation of autophagosomes. In *Arabidopsis thaliana*, there are several isotypes of ATG8 protein that can perform different functions in autophagy. In particular, it was found that some of the *AtATG8* genes (*AtATG8b*, *AtATG8e*, *AtATG8f*, and *AtATG8i*) may be more specific for the full realization of autophagy in microgravity.

The expression profiles of α - and β -tubulin genes were analyzed during the induction of autophagy by microgravity. In particular, an increase in the expression levels of *AtTUA2* and *AtTUA3* genes on days 6-9 was found. The results of the analysis of β -tubulin gene expression showed the involvement of *AtTUB2* and *AtTUB3* genes after 6-9 days of cultivation under microgravity, as their increased expression levels were observed.

This paper demonstrates for the first time the expression profiles of β -tubulin genes during the development of stress-induced autophagy under conditions of clinostatization. We also analyzed the gene expression profiles of the ATG8 protein and found that microgravity induces an increase in the expression of *A. thaliana AtATG8* isotypes at different time intervals. The involvement of microtubules in the realization of autophagy processes was also established.

The studies confirmed the importance of α - and β -tubulins in stress-induced autophagy, which is the basis for further study of the mechanisms of plant response to microgravity, including the role of ATG8 protein and nitric oxide (NO), and is of practical value to the dissertation results. The data obtained can form the basis for

future research on plant adaptation during space flights and solving problems related to plant cultivation in space.

Keywords: microgravity, autophagy, nitric oxide, microtubules, α -tubulin, β -tubulin, ATG8, gene expression.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧАСтатті:

1. Yemets A, **Shadrina R**, Blume R, Plokhovska S, Blume Y. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. *npj Microgravity*. 2024 Mar 18;10(1):1–16. doi: 10.1038/s41526-024-00381-9. (*Особистий внесок – проведення молекулярно-біологічного аналізу, лазерної та конфокальної мікроскопії, узагальнення результатів, підготовка матеріалів для публікації*). (*Scopus/WoS, Q1, IF -5.1*).
2. Yemets AI, Plokhovska SH, **Shadrina RYu**, Kravets OA, Blume YaB. Elucidation of cellular mechanisms of autophagy involvement in plant adaptation to microgravity conditions. *Space Sci. & Technol*. 2023;29(2):22–31. <https://doi.org/10.15407/knit2023.02.022> (*Особистий внесок – приймала участь в проведенні експериментальних досліджень, аналізі результатів та підготовці статті*). (*Scopus/WoS, Q4*).
3. Plokhovska SH, **Shadrina RYu**, Kravets OA, Yemets AI, Blume YaB. The Role of Nitric Oxide in the *Arabidopsis thaliana* Response to Simulated Microgravity and the Involvement of Autophagy in This Process. *Cytol Genet*. 2022 Jun 1;56(3):244–52. doi: 10.3103/S0095452722030100. (*Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, формування матеріалів для публікації*). (*Scopus/WoS, Q4, IF – 0.5*).
4. **Шадріна РЮ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на умови мікрогравітації. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2019 Серпень 30;25:327–32. doi:10.7124/FEEО.v25.1186. (*Особистий внесок – участь у виконанні всіх експериментів, обробці даних та написанні статті*).

Тези:

5. **Shadrina RYu**, Arslan SH, Yemets AI. Development of autophagy on simulated microgravity in plants and the role of microtubules in this process. В: Наукове видання під загальною редакцією Блюма ЯБ. Тези доп. IV конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія»; 2024 трав. 16-18; Київ, Україна. Київ: 2024. С. 14
6. Plokhovska SH, Kravets OA, **Shadrina RYu**, Yemets AI, Blume YaB. Crosstalk between nitric oxide and melatonin signalling molecules in *Arabidopsis* under simulated microgravity. В: Наукове видання під загальною редакцією Соколова ВМ. Тези доп. Міжнародна наукова інтернет-конференція «Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи»; 2022 жовт. 26; Одеса, Україна. 2022. С. 144–145.
7. Blume Ya. B, Plokhovska SH, **Shadrina RYu**, Kravets OA, Yemets AI. The role of nitric oxide in *Arabidopsis thaliana* response to simulated microgravity and the participation of autophagy in the mediation of this process. In: Manolis KG, editor. Abstracts. 44th COSPAR Sci. Assembly; 2022 Jul 16–24; Athens, Greece. 2022. P. 2902.
8. **Шадріна РЮ**, Плоховська СГ, Горюнова ІІ, Кравець ОА, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Розвиток стрес-індукованої автофагії у відповіді рослин на умови мікрогравітації та радіаційне опромінення. В: Ульянченко ОВ, редактор. Тези доп. Міжнародна науково-практична конференція «Стрес і адаптація рослин»; 2021 лют. 25–26; Харків, Україна. Вісник ХНАУ: Серія Біологія. 2021. С. 71.
9. **Shadrina RYu**, Horiunova II, Yemets AI. Changes in atg8 and tua gene expression during autophagy induced by microgravity condition in *Arabidopsis thaliana*. В: Наукове видання під загальною редакцією Отченашко ВВ. Тези доп. IX Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція студентів,

аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2021 трав. 20–21; Київ, Україна. 2021. С. 96.

10. **Shadrina RYu**, Horiunova II, Yemets AI. Transcriptome analysis of *atg8* and *tua* genes involved in process of autophagy induced by microgravity stress. In: Scientific publication under the general editorship by Skrypnyk NV. Abstr. XVIII International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: bioscience advances»; 2020 May 2; Kyiv, Ukraine. 2020. P. 140.
11. **Shadrina R**, Yemets A, Blume Y. Autophagy development in *Arabidopsis thaliana* under microgravity. Plant Biology (PB19) & Plant Synthetic Biology Major Symposium organized by ASPB (American Society of Plant Biologists); 2019 Aug; San Jose, CA, USA. 2019. P. 297.
12. **Шадріна РЮ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Дослідження морфологічних ознак аутофагії в коренях *Arabidopsis thaliana* в умовах зміненої гравітації. В: Сибірний АА, редактор. Тези доп. 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології; 2019 черв. 18–21; Яремче, Україна. 2019. С. 155.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ АУТОФАГІЇ У РОСЛИН.....	24
1.1. Механізми розвитку аутофагії у рослин.....	25
1.1.1. Формування фагофору.....	26
1.1.2. Експансія та закриття фагофору.....	28
1.1.3. Злиття аутофагосоми із вакуолею.....	30
1.2. Молекулярні механізми регуляції аутофагії.....	30
1.2.1. Транскрипційна регуляція.....	31
1.2.2. Посттранскрипційна регуляція.....	32
1.2.3. Посттрансляційна регуляція.....	33
РОЗДІЛ 2. РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТУ У ПРОЦЕСАХ РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ У РОСЛИН.....	36
2.1. Роль мікрофіламентів у розвитку аутофагії.....	36
2.2. Роль мікротрубочок у розвитку аутофагії.....	38
2.3. Вплив оксиду азоту на організацію цитоскелету.....	40
РОЗДІЛ 3. АУТОФАГІЯ ЯК АДАПТИВНИЙ ПРОЦЕС ВНАСЛІДОК ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ.....	43
3.1. Роль аутофагії у відповіді на біотичний стрес.....	43
3.2. Фізіологічна роль аутофагії при абіотичному стресі.....	45
РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
4.1. Рослинний матеріал.....	49
4.2. Вирощування рослин та моделювання стресових умов.....	49
4.3. Обробка насіння <i>A. thaliana</i> донором та скавенджером NO.....	50
4.4. Методи дослідження.....	50
4.4.1. Дослідження показників росту <i>A. thaliana</i>	50

	15
4.4.2. Дослідження ендogenous вмісту та внутрішньоклітинної локалізації NO в коренях <i>A. thaliana</i>	51
4.4.3. Візуалізація аутофагосом в клітинах кореня <i>A. thaliana</i>	52
4.4.4. Дослідження просторової організації мікротрубочок в клітинах кореня <i>A. thaliana</i>	53
4.4.5. Виділення РНК та ПЛР у реальному часі.....	54
4.4.6. Теплові карти <i>A. thaliana</i> за нормальних умов.....	57
4.4.7. Статистична обробка отриманих даних.....	58
РОЗДІЛ 5. РОЗВИТОК АУТОФАГІЇ ЯК АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ ДОСЛІДЖУВАНИХ РОСЛИН НА УМОВИ ЗМІНЕНОЇ ГРАВІТАЦІЇ.....	59
5.1. Вплив мікрогравітації на ріст та морфологію коренів проростків <i>A. thaliana</i>	59
5.2. Вплив мікрогравітації на формування аутофагосом у клітинах коренів <i>A. thaliana</i>	70
РОЗДІЛ 6. РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ У ВІДПОВІДІ <i>A. thaliana</i> НА ДІЮ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА РОЛЬ АУТОФАГІЇ В ОПОСЕРЕДКУВАННІ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ.....	77
6.1. Вплив екзогенного донора та скавенджера NO на ріст і розвиток проростків <i>A.thaliana</i>	77
6.2. Дослідження вмісту NO у відповідь на дію мікрогравітації.....	81
6.3. Роль аутофагії у відповідь на дію мікрогравітації за участі оксиду азоту	86
РОЗДІЛ 7. УЧАСТЬ МІКРОТРУБОЧОК У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЦЕСІВ АУТОФАГІЇ ЗА УМОВ МІКРОГРАВІТАЦІЇ.....	91
7.1. Дослідження впливу мікрогравітації на організацію мікротрубочок у клітинах кореня <i>A. thaliana</i>	91

	16
7.2 Рівні експресії генів <i>atg8</i> при індукції аутофагії мікрогравітацією.....	94
7.3. Рівні експресії генів α - та β -тубуліну при індукції аутофагії мікрогравітацією.....	100
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	109
ВИСНОВКИ.....	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	118
ДОДАТОК.....	146

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MT – мікротрубочки

MC – живильне середовище Мурасіге-Скуга

GFP – зелений флуоресцентний білок

MDC – монодансилкадаверин

LTR – барвник LysoTracker Red

NO – оксид азоту

SNP – нітропрусид натрію

cPTIO – скавенджер NO

AtATG – гени аутофагії

AtTUA – гени α -тубуліну

AtTUB – гени β -тубуліну

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Однією з фундаментальних проблем космічної біології є створення технології автотрофної ланки для життєзабезпечення космонавтів у тривалих космічних польотах. Для цього необхідно використовувати рослини, які можуть завершити весь свій онтогенез за один цикл в умовах космосу [3]. Під час космічного польоту було проведено дослідження, у результаті якого вдалось виростити рослини та зібрати насіння кількох їх видів, зокрема *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa* та *Triticum aestivum* [2]. Насіння *A. thaliana* не відрізнялося від контролю, вирощеного за нормальних умов, але його аналіз показав значні зміни в посттранскрипційній регуляції, синтезі клітинної стінки, динаміці мікротрубочок та транскрипції генів пластид [4, 5]. Тому вивчення клітинних механізмів, залучених у відповідь на умови мікрогравітації, є надзвичайно важливим та актуальним завданням у галузі космічної біології.

Як нерухомі організми рослини піддаються різним абіотичним стресам – таким, як дефіцит поживних речовин, засолення ґрунту, посуха та екстремальні температури. Оскільки ці стреси можуть суттєво вплинути на нормальний ріст та фізіологію, рослини розвинули складний набір регуляторних механізмів, що дозволяє їм адаптуватися до несприятливих умов [6]. Важливим механізмом відповіді рослин на стрес є деградація пошкоджених білків та органел через процеси аутофагії для підтримки гомеостазу і переробки поживних речовин [7–9]. Аутофагія може відбуватись без впливу стресових факторів, проте швидко ініціюється дефіцитом поживних речовин та різними стресовими чинниками. За нормальних умов аутофагія забезпечує клітинний гомеостаз, старіння листя, підтримку розвитку та функціонування кореневої меристеми, проростання пилку та розвиток насіння [10].

Формування аутофагосом є високодинамічним процесом, до якого залучено велику кількість білків, зокрема ATG (autophagy related proteins). Більшість ATG-білків є консервативними у рослин, оскільки їх участь у формуванні аутофагосом є критично важливою [11]. Раніше було встановлено, що УФ-опромінення, голодування, осмотичний та сольовий стреси характерним чином впливають на рівні експресії генів *AtATG8* у *Arabidopsis*. Також було встановлено підвищення рівня ацетилювання α -тубуліну при дії зазначених абіотичних стресів, що вказує на функціональне залучення мікротрубочок під час розвитку аутофагії [12]. Встановлено, що мікротрубочки та їх білки регулюють два основні комплекси, що беруть участь в ініціації аутофагії: mTORC1 та комплекс РІЗ-кінази класу III [13].

Моделювання умов мікрогравітації є зручним інструментом для вивчення впливу цього стресу на живі організми. Знання щодо того, як рослини можуть відчувати та адаптуватися до зміни гравітації в космосі, залишаються все ще обмеженими. Оскільки відсутність постійного вектора сили тяжіння на рослинний організм є стресовим фактором, можна припустити, що мікрогравітація здатна індукувати розвиток аутофагії для виживання та адаптації рослин під час їх вирощування за таких умов. Таким чином, актуальним лишається з'ясування впливу мікрогравітації на рослини, а також дослідження ролі мікротрубочок у реалізації стрес-індукованої аутофагії.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було з'ясування ролі мікротрубочок у реалізації аутофагії, індукованої мікрогравітацією, а також особливостей експресії генів тубуліну та білка аутофагії ATG8 в процесі формування відповіді рослин на дію цього стресового фактору.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні завдання:

1. Дослідити вплив кліностагування на ріст та розвиток головних коренів проростків *A. thaliana*.

2. Охарактеризувати закономірності розвитку аутофагії, індукованої кліноостатуванням в клітинах коренів проростків *A.thaliana*.
3. Дослідити вплив екзогенних донора та скавенджера NO на ріст і розвиток проростків *A.thaliana* за умов кліноостатування.
4. Визначити вміст ендogenous NO та його внутрішньотканину локалізацію у клітинах кореня *A.thaliana* у відповідь на дію кліноостатування.
5. Вивчити вплив кліноостатування на особливості просторової організації мікротрубочок в клітинах різних зон головного кореня *A. thaliana*.
6. Проаналізувати зміни рівнів експресії генів α -тубуліну, β -тубуліну та білка ATG8 під час розвитку аутофагії, індукованою кліноостатуванням, у *A. thaliana*.
7. Провести порівняльний аналіз експресії генів *AtATG*, *AtTUB* та *AtTUA* для встановлення можливого зв'язку між розвитком аутофагії та залученням мікротрубочок до впливу індукованої мікрогравітації.

Об'єкт дослідження – закономірності розвитку аутофагії та участь мікротрубочок в цьому процесі в рослинах *Arabidopsis thaliana* в умовах мікрогравітації.

Предмет дослідження – особливості утворення аутофагосом і зміни просторової організації мікротрубочок у відповідь на дію мікрогравітації, зміни рівнів експресії генів білків ATG8, α - і β -тубуліну, залучених до початкових етапів розвитку аутофагії в *A. thaliana*.

Методи дослідження. В роботі були використані цитологічні (світлова мікроскопія, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія), молекулярно-біологічні (виділення РНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в реальному часі, біоінформатичні методи роботи із тепловими картами та статистичні методи досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. У результаті виконання наукової роботи було встановлено, що кліноостатування індукує процеси

розвитку аутофагії в клітинах кореня *A. thaliana* за участю мікротрубочок. Вперше проаналізовано рівні генів *AtATG*, α -, β -тубулінів під час розвитку аутофагії, спричиненою мікрогравітацією та виявлено спільну експресію генів *AtATG8* і *AtTUA*, а також генів *AtTUA* і *AtTUB*, що може слугувати підтвердженням спільної участі цих генів під час розвитку аутофагії. Показано роль NO у відповіді рослин на кліноостатування за участі донора (SNP) та скавенджера (сРТІО) NO. Виявлено, що обробка насіння *A. thaliana* донором оксиду азоту SNP стимулює зміни росту коренів та призводить до підвищення стійкості рослин до кліноостатування. Визначено концентрацію ендogenous NO та внутрішньотканинну локалізацію у клітинах кореня *A.thaliana* у відповідь на умови мікрогравітації.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати, що підтверджують функціональну роль генів α - та β -тубуліну у розвитку стрес-індукованої аутофагії, формують основу для подальшого вивчення клітинних механізмів залучення різних ізотипів білка ATG8 та їх взаємодії з іншими клітинними компонентами у розвитку аутофагії за умов мікрогравітації. Також використання ефективних донорів та скавенджерів NO дозволить з'ясувати роль NO в опосередкуванні дії такого стресу, як мікрогравітація, а отримані результати слугуватимуть підґрунтям для розробки підходів підвищення адаптації рослин під час їх вирощування в умовах космічного польоту. Результати даного дослідження можуть стати основою для подальших розробок і досліджень, що спрямовані на адаптацію та стале вирощування рослин у умовах, подібних до космічних.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетної тематики відділу клітинної біології та біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»: «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»

(2017–2021 рр., номер ДР 0117U000909) та проекту «Розробка концепції регуляції розвитку та стресостійкості рослин для їх адаптації до умов космічних польотів шляхом залучення клітинно-біологічних ресурсів» цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень (2018–2022 рр., номер ДР 01118U003742).

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було обрано актуальну тему наукового дослідження, здійснено постановку основних завдань роботи, проведено інтерпретацію отриманих результатів та підготовлено наукові статті. Автором особисто опрацьовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, проведено основні експериментальні дослідження, викладено основні положення та узагальнення дисертаційної роботи. Наукові роботи опубліковано у співавторстві з Ємець А. І., Плоховською С. Г., Горюновою І. І., Блюмом Я. Б., Блюмом Р. Я., Кравець О. А. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний експериментальний матеріал і творчий доробок за темою.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційної роботи було представлено на 6-му з'їзді Українського товариства клітинної біології (18–21 червня 2019 р., Яремче, Україна); Міжнародний симпозіум «Plant Biology» (3–7 серпня 2019, Сан Хосе, США); XVIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» (2 травня 2020 р., Київ, Україна); IX Всеукраїнській науково-практичній онлайн-конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (20–21 травня 2021 р., Київ, Україна); Міжнародній науково-практичній конференції «Стрес і адаптація рослин» (25–26 лютого 2021 р., Харків, Україна); 44-й Генеральній науковій Асамблеї COSPAR (16-24 липня 2022 р., Афіни, Греція); Міжнародній науковій інтернет-конференції «Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи» (26

жовтня 2022 р., Одеса, Україна), IV-й Конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (16–18 травня 2024 р. Київ, Україна).

За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 12 праць, з них 4 статті (три з них – в журналах, що належать до наукометричних баз Scopus/Web of Science, зокрема у виданні Q1) та 8 тез доповідей в профільних журналах та збірниках матеріалів міжнародних та вітчизняних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, семи розділів, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатку. Робота містить 27 рисунків, список використаних джерел, який складається з 236 посилань, та 1 додаток. Загальний обсяг рукопису 148 сторінок.

Автор висловлює вдячність науковому керівнику доктору біологічних наук, професору, члену-кореспонденту НАН України Аллі ЄМЕЦЬ за наукове керівництво та консультації; співробітникам Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», зокрема, к.б.н. ПЛОХОВСЬКІЙ Світлані за підтримку та допомогу у проведенні експериментів.

РОЗДІЛ 1

ФІЗІОЛОГІЧНА РОЛЬ АУТОФАГІЇ У РОСЛИН

Аутофагія (в перекладі з грец. «самопоїдання») – це еволюційний та консервативний процес деградації та переробки пошкоджених органел, елементів цитоплазми, денатурованих чи агрегованих білків [14, 15]. У ссавців, крім голодування, аутофагія також індукується у відповідь на різні стимули, включаючи гормони та пошкодження клітини, а дисфункція цього процесу пов'язана з низкою різних генетичних захворювань [16]. В організмі рослини аутофагія необхідна при проростанні насіння, утворенні судин та аеренхіми. Крім того, аутофагія залучена до процесів старіння, органогенезу, біогенезу рослинних вакуолей тощо [17, 18]. Істотну роль аутофагія також відіграє у відповіді рослинних клітин на стресові фактори біотичної та абіотичної природи [12, 17, 19–22]. Після активації аутофагії утворюється та розширюється мембранна структура, відома як фагофор, яка згодом замикається та утворює подвійну мембранну везикулу, що називається аутофагосою. Утворена аутофагосома містить аутофагічне тіло, яке доставляється у вакуолю (рослини та дріжджі) або лізосому (тварини). Зовнішня мембрана зливається з вакуолярною/лізосомальною мембраною, а її вміст вивільняється у вакуолю чи лізосому, де розщеплюється гідролазами та протеазами до амінокислот та жирних кислот [23–26]. Продукти розпаду транспортуються назад у цитоплазму для повторного використання клітиною для синтезу білка та постачання енергії під час впливу різних стресових чинників [15, 21].

У рослин описано три типи аутофагії: мікро-, макро- та мегааутофагія.

Мікроаутофагія відбувається шляхом інвагінації тонопласту для захоплення цитоплазматичного матеріалу, скупченого на поверхні вакуолі, для створення аутофагічних тілець у вакуолі. Було показано, що пошкоджені

мембрани хлоропластів поглинаються вакуолею, що нагадує процес мікроаутофагії [27], але на сьогодні існує мало інформації щодо розвитку цього процесу у рослин.

Мегааутофагія включає масову деградацію клітини на завершальній фазі запрограмованої клітинної загибелі. Під час цього процесу пермеабілізація або розрив тонопласту призводить до вивільнення великої кількості гідролаз у цитоплазму, що повністю руйнує цитоплазму та навіть клітинні стінки, що зрештою призводить до загибелі клітини [28].

Макроаутофагія є найкраще охарактеризованим типом аутофагії у рослин та інших організмів, тому її часто називають просто аутофагією. Даний процес передбачає формування везикули у цитоплазмі через експансію ізольованих мембран, що замикаються й утворюють аутофагосому, зовнішня мембрана якої згодом зливається з тонопластом і вивільняє аутофагічне тіло у вакуолю для деградації [8, 22].

1.1. Механізм розвитку аутофагії у рослин

Загальна модель розвитку аутофагії у рослин показана на рис. 1.1 і включає в себе основні етапи: ініціацію аутофагії; формування фагофору; закриття фагофору; утворення аутофагосами; злиття аутофагосоми із вакуолею. Для формування аутофагосом необхідні ATG білки. В *A. thaliana* ідентифіковано 47 білків ATG [29]. Більшість ATG білків є консервативними у рослин і можуть бути поділені на 5 субкомплексів: комплекс ATG1; комплекс фосфоінозитид-3-кінази класу III (PI3K); комплекс ATG9 та два убіквітиноподібні кон'югати (ATG5-ATG12 та ATG8) [15].

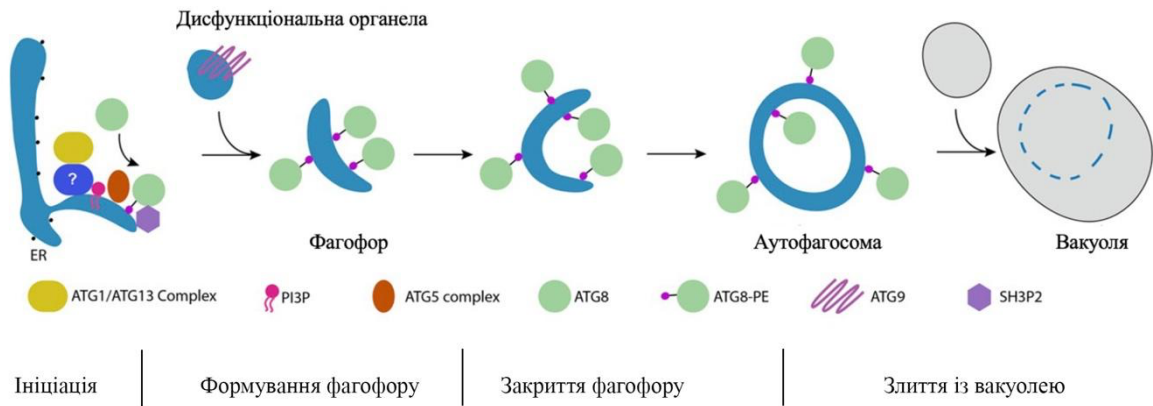


Рис. 1.1. Модель розвитку аутофагії у рослин [29]

Також відомо, що ендомембранна система бере участь у процесах ремоделювання мембран в ході біогенезу аутофагосом [29–32]. Процес біогенезу аутофагосоми можна розділити на чотири основні етапи: ініціація мембранного мішка у формі чаші (фагофор/ізоляційна мембрана); експансія (розширення фагофору); дозрівання (закриття аутофагосоми) та деградація (злиття аутофагосоми з вакуолею/лізосоною) [15].

1.1.1. Формування фагофору

Фагофор – типова структура, що утворюється на ендоплазматичному ретикулумі й має відкриту чашоподібну форму з двома мембранами та закрученими краями. Утворення фагофора включає наступні етапи: рекрутинг комплексів ATG1 та PI3K до омегасоми, що веде до утворення PI3P; приєднання комплексу ATG12-ATG5-ATG16; зв'язування ATG8 з фосфатидилетаноламіном на зародковому фагофорі; від'єднання фагофору від ER. Далі фагофор подовжується, щоб збільшити розмір своєї мембрани для подальшого захоплення вантажу, і це також вимагає роботи певної групи білків. До прикладу, структурний аналіз показав, що ATG9 може утворювати тример, що свідчить про здатність ATG9 рекрутувати додаткові везикули під

час зародження фагофора [33, 34]. Було показано, що у дріжджів ATG8 бере участь в процесі злитті вакуоль [35].

У мутантних за генами *atg2*, *atg9* та *atg18* ліній рослин *A. thaliana* виявлено дефекти у формуванні аутофагосом та фенотип раннього старіння – це вказує на те, що ATG2-ATG18-ATG9 також може брати участь в подовженні аутофагосом [36]. Зокрема, було показано збільшення рівня ліпідованого та неліпідованого ATG8 у всіх мутантів *atg2*, *atg9* і *atg18*, що свідчить про збій у формуванні аутофагосом. У мутанта *A. thaliana atg2* виявлено численні крихітні аутофагосоми в цитозолі, а їхня доставка у вакуолю була заблокована [36]. Також виявлено, що у мутанта за геном *atg13* не формуються аутофагосоми, що доводить важливість комплексу ATG1/ATG13 в ініціації формування сайту утворення фагофору у рослин [37]. Критичним для формування фагофору також є наявність РІЗР, оскільки обробка рослин інгібіторів РІЗК повністю блокує формування аутофагосом [38]. До прикладу, даний дефект у мутанта дріжджів *atg6/vps30* можна відновити шляхом експресії його гомолога *A. thaliana* ATG6 [39].

ATG9 – це єдиний трансмембранний білок ATG, що є консервативним у всіх еукаріотів. Він має шість трансмембранних доменів, а його N- та С-кінці експоновані в цитозоль. Вважається, що ATG9 виконує ключову роль в доставці ліпідів та інших регуляторів до мембрани фагофору. Походження ATG9-везикул, все ще є суперечливим, проте система Гольджі-ендосома була запропонована як ключовий шлях для отримання везикул ATG9 у клітинах дріжджів, ссавців та рослин [15].

Показано, що дефіцит ATG9 у *A. thaliana* призводить до різкого накопичення пов'язаних з аутофагосомами трубчастих структур безпосередньо на мембрані ендоплазматичного ретикулуму. Аналіз динаміки демонструє тимчасову мембранну асоціацію між везикулами і аутофагосомною мембраною під час розвитку аутофагії [40]. У *A. thaliana* ATG9 не є обов'язковим для формування преаутофагосомної структури, що

свідчить про альтернативні або додаткові функції ATG9 в рослинах порівняно з іншими організмами. Тим не менш, нокаутований мутант *atg9* демонструє наявність великих структур аномальної форми та знижений темп аутофагії, що вказує на необхідність ATG9 для формування повноцінних аутофагосом [41].

1.1.2. Експансія та закриття фагофору

Від'єднання фагофору від ендоплазматичного ретикулуму і подальше дозрівання здійснюється за допомогою двох убіквітиноподібних комплексів. Гени, що відповідають за цей процес, є консервативними й мають гомологів у еукаріот, включаючи рослини. Ліпідація схожа на кон'югацію убіквітину з його цільовими білками. Для цього потрібні: E1-подібний білок ATG7, E2-подібні білки ATG3 та ATG10, а також E3-подібний комплекс ATG12-ATG5-ATG16, який визначає місце ліпідації [34].

Другий комплекс складається з убіквітиноподібного білка ATG8 і фосфатидилетаноламіну (PE). Ліпідація ATG8 є посттрансляційною модифікацією, необхідною для аутофагії. Перед ліпідацією ATG8 зазнає процесингу, при якому термінальний хвіст відрізається протеїнкіназою ATG4, що робить гліцин доступним для зв'язування з PE. Далі ATG8 функціонує як убіквітиноподібний білок, а ATG7 і ATG3 діють як E1- та E2-подібні ферменти, транспортуючи ATG8 до PE.

Комплекс ATG8-PE може розташовуватися як у зовнішній, так і у внутрішній аутофагосомальній мембрані, що робить ATG8 зручним молекулярним маркером для моніторингу аутофагії [42]. Встановлено, що *atg*-мутанти, які не змогли сформувати фагофор, все ще мали ATG8-PE комплекс. Це свідчить про те, що ATG8 може бути підданий процесам ліпідації і за відсутності чашоподібної преаутофагосомної мембрани [43].

Раніше було запропоновано модель мембранного каркасу (membrane scaf-fold model), згідно якої взаємодія ATG8-PE з комплексом ATG12-ATG5-

ATG16 відбувається через взаємодію ATG8-ATG12, що призводить до формування вигинів на мембрані, які є необхідними для формування аутофагосом [44]. Комплекс ATG5-ATG12-ATG16 та частина комплексів ATG8-PE на зовнішній мембрані здатні запобігати передчасному синтезу фагофора [45].

Процес замикання фагофора в аутофагосому забезпечує злиття зовнішньої мембрани таким чином, що внутрішня мембрана залишається відділеною від зовнішньої, що є топологічно ідентичним процесу поділу [46]. На клітинах дріжджів показано, що комплекс ATG8-PE сам сприяє закриттю мембран. У ссавців подібну роль виконує родина білків LC3/GABARAP (гомолог ATG8 у рослин). Було встановлено, що ATG8 не є обов'язковим для формування аутофагосом та селективного поглинання мітохондрій, але є необхідним для злиття аутофагосом з лізосомами [47].

У фінальному процесі розвитку аутофагосом залучається комплекс ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), який необхідний для ущільнення мембрани при закритті фагофору. Білки ESCRT також беруть участь у зворотному процесі (розщеплення мембрани), що відбувається під час різних подій ремоделювання мембрани [48].

ATG8 та ESCRT-комплекс є потенційними кандидатами в регулюванні закриття аутофагосом. ATG8-PE сприяє геміфузії, що забезпечує прив'язування ліпідної мембрани або іншої ATG8-PE для закриття аутофагосоми як у дріжджів, так і у ссавців. Субодиниці ESCRT також можуть брати участь у остаточному процесі поділу для замикання/формування аутофагосоми [49]. На клітинах ссавців і дріжджів показано, що незакриті фагофори накопичуються в мутантах *ESCRT-III*, що вказує на ключову роль комплексу ESCRT у закритті фагофорів [46]. Також було показано, що мутанти *A. thaliana chmp1* (charged multivesicular body protein 1) мали аутофагосоми із затримкою у закритті та аномальний поділ пластид, що вказує

на функціональну роль SNMP1 у закритті аутофагосоми для секвестрування пластидного вантажу у рослин [50].

1.1.3. Злиття аутофагосоми із вакуолею

Під час злиття двомембранної аутофагосоми із одномембранною вакуолею/лізосоною відбувається подовження зовнішньої мембрани фагосоми з мембраною вакуолі із наступним видаленням внутрішньої мембрани. Механізми зв'язування мембрани включають комплекси SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) та HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting), які були добре охарактеризовані як посередники злиття між вакуолею/лізосоною та іншими везикулами [51]. Комплекс білків SNARE може змінювати свою конформацію, щоб скоротити відстань між двома компартментами та полегшити злиття внутрішньоклітинних транспортних везикул з мембраною-мішенню. Виділяють два типи білків SNARE (Q-SNARE та R-SNARE), які локалізовані на мембрані акцептора та мембрані донора, які збираються у чотириспіральний комплекс SNARE та рекрутують комплекс HOPS [51–55]. Ймовірно, що координація між комплексом HOPS і комплексом SNARE також діє в рослинних клітинах для злиття з мембраною вакуолі.

1.2. Молекулярні механізми регуляції аутофагії

У рослин аутофагія відіграє важливу роль у різних реакціях на стрес, захисті від патогенів і процесах розвитку, таких як проростання насіння, дозрівання пилку та старіння листя [56]. Однак регуляторні механізми аутофагії у рослин залишаються недостатньо вивченими. Останні дослідження виявили кілька регуляторів аутофагії рослин, які змінюють активність

аутофагії на транскрипційному, посттранскрипційному та посттрансляційному рівнях.

1.2.1. Транскрипційна регуляція

Регуляція транскрипції має важливе значення для експресії генів *atg* у відповідь на стресові фактори навколишнього середовища. Нещодавно було виявлено кілька регуляторів транскрипції, які безпосередньо регулюють активність генів *atg*. Зокрема, білок теплового шоку (HsfA1a), фактори транскрипції родини WRKY і транскрипційні фактори у брасиностероїдному шляху (BZR1) та етиленовому шляху (ERF5) [57].

Білки теплового шоку. Фактори транскрипції теплового шоку (Hsfs) регулюють експресію генів, що реагують на стрес. Рослинні Hsf поділяються на три категорії (HsfA, B і C). В роботі Wang та ін. (2015) було показано, що під час посухи у томатів індукується HsfA1a, який зв'язується з елементами теплового шоку в промоторі ATG10 і ATG18f. Надекспресія HsfA1a збільшує кількість аутофагосом і рівні транскриптів ATG10 і ATG18f, а їх кількість зменшується під час посухи через HsfA1a. Таким чином, HsfA1a позитивно регулює аутофагію та підвищує стійкість томатів до посухи [58].

Фактори транскрипції родини WRKY модулюють багато фізіологічних процесів рослин, таких як ріст, розвиток і реакція на абіотичні та біотичні стреси. Виявлено, що WRKY33 регулює аутофагію рослин, спричинену патогенами та тепловим стресом. У *Arabidopsis* мутація в WRKY33 призводить до зниження регуляції експресії ATG18a, важливого фактора для формування аутофагосом. Крім того, WRKY33 взаємодіє з ATG18a в ядрі, що вказує на те, що ATG18a може саморегулювати свою власну експресію, діючи як кофактор з WRKY33 [59]. Ці результати свідчать про те, що WRKY33 відіграє вирішальну роль у позитивній регуляції аутофагії, що була викликана дією патогенів.

Брасиностероїди. Також встановлено, що BZR1 (brassinazole resistant 1) – життєво важливий транскрипційний фактор у передачі сигналу брасиностероїдів, який також відіграє позитивну роль у розвитку аутофагії. Обробка брасинолідом підвищує рівні експресії генів *atg* і викликає надекспресію гена *BZR1*. Встановлено, що BZR1 безпосередньо зв'язується з промоторами ATG2 і ATG6 [60]. Ці результати показують, що опосередкована BZR1 передача сигналів брасиностероїдів позитивно регулює аутофагію. З іншого боку, BZR1 вибірково деградує шляхом аутофагії [61]. Ці результати свідчать про те, що є регуляція зворотного зв'язку між BZR1-залежною передачею сигналів та розвитком аутофагії.

Етилен. У томатів голод та посуха індукують ERF5 (ethylene response factor 5) за рахунок попередника етилену ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), що призводило до посилення експресії *atg8i* [62]. Також виявлено, що ERF5 безпосередньо зв'язується з промоторами ATG8d і ATG18h і активує експресію генів для розвитку аутофагії, яка є важливою для опосередкованої етиленом стійкості до посухи [63].

1.2.2. Посттранскрипційна регуляція

Аутофагія може регулюватися на посттранскрипційному рівні через мікроРНК, зокрема у тварин [64]. Однак регуляція аутофагії, опосередкована мікроРНК, не виявлена в рослинах. Було показано, що феномен «стресу» ендоплазматичного ретикулуму (ER-стрес) індукує аутофагію [65]. ER-стрес відбувається за умов, коли порушується протеостаз із накопиченням неправильно згорнутих і розгорнутих білків. У рослин індукція аутофагії при таких стресових умовах відбувається через шлях, що залежить від IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1). IRE1B є подвійною протеїнкіназою та рибонуклеазою. Встановлено, що IRE1B руйнує РНК, що кодують білки, які перешкоджають індукції аутофагії через ER-стрес у *A. thaliana* [66]. Також за

допомогою транскриптомного аналізу ідентифіковано дванадцять цільових генів RIDD (regulated IRE1-dependent RNA degradation). У *A. thaliana* RIDD в основному атакують мРНК, що кодують секретовані білки, які транслюються рибосомами на ЕР. Показано, що IRE1b стимулює аутофагію шляхом деградації мРНК кількох негативних регуляторів аутофагії через RIDD [66].

1.2.3. Посттрансляційна регуляція

Посттрансляційні модифікації важливі для регуляції активності білка шляхом його хімічної модифікації з функціональними групами, такими як фосфат, метильні групи та ацетат [57]. Регулювання аутофагії на посттрансляційному рівні є незамінним для того, щоб рослини могли адаптуватися до різних видів стресу. Основними посттрансляційними модифікаціями, які регулюють активність та тривалість аутофагії, є фосфорилування, убіквітування, ліпідація, S-сульфгідратація, S-нітрозилювання та ацетилювання.

Фосфорилування. Фосфорилування білків є найпоширенішою посттрансляційною модифікацією в еукаріот. Фосфорилування регулює активність аутофагії через конформаційні зміни в структурі білків АТГ, що спричиняє активацію або дезактивацію білка, тим самим регулюючи його функцію. У дріжджів і ссавців індукція аутофагії при голодуванні або іншому стресі забезпечується TOR (target of rapamycin), яка функціонує як протеїнкіназа Ser/Thr і є негативним регулятором аутофагії в багатьох організмах [67]. Комплекс TOR складається з TOR, RAPTOR (рекрутує субстрати) та LST8 (стабілізатор комплексу) [68–70]. Було встановлено, що за умов голодування білки TOR стають неактивними, що веде до дефосфорилування АТГ13, який зв'язується із АТГ1 та призводить до ініціації процесів аутофагії [67, 71].

Убіквітування. Загалом, убіквітування є різновидом посттрансляційної модифікації білків для його подальшого розпізнавання протеасомою 26S і деградації [72]. Під час аутофагії убіквітування сильно впливає на стабільність і функцію кількох основних компонентів ATG білків [73]. Наприклад, TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) сприяє аутофагії шляхом убіквітування ULK1 в клітинах ссавців [74]. Раніше TRAF були визначені як сигнальні адаптери, що функціонують як убіквітин-лігази E3. У *A. thaliana* білки TRAF відіграють подвійну роль у регулюванні аутофагії шляхом модуляції стабільності ATG6 [75].

Ліпйдація – це посттрансляційна модифікація, за допомогою якої білки ковалентно модифікуються специфічними ліпідами. У процесі утворення аутофагосом ATG8 ліпидується шляхом кон'югації з фосфатидилетаноламіном (PE) [76, 77]. ATG4 є цистеїновою протеазою і відіграє подвійну роль у ліпйдації ATG8. З одного боку, ATG4 видаляє аргінін на С-кінці, що призводить до того, що ATG8 залишається із відкритими гліциновим залишком, який є важливим для ліпйдації ATG8. З іншого боку, ATG4 також деліпидує ATG8 з мембрани аутофагосоми для переробки.

S-сульфгідрація. Сірковмісні сполуки, такі як сірководень (H_2S), відіграють важливу роль у розвитку рослин та у їх відповіді на стрес. Сірководень індукує реакції антиоксидантного захисту, діючи як важлива сигнальна молекула, або через посттрансляційну модифікацію білків через S-сульфгідрацію [78–80]. Зокрема, було показано, що сульфід не здатний поглинати активні форми кисню, що утворюються внаслідок обмеження азоту, на відміну від добре відомих відновників. Крім того, відновники не змогли пригнічувати накопичення аутофагосом такою ж мірою, як сульфід. Автори припускають, що сульфід пригнічує аутофагію, викликану азотним голодуванням у коренях *A. thaliana* [81].

S-нітрозилювання. Оксид азоту (NO) є важливою між- та внутрішньоклітинною сигнальною молекулою, яка бере участь у

різноманітних процесах розвитку та стресових реакціях рослин [82, 83]. Вступаючи у взаємодію із білками, NO регулює їх активність через S-нітрозилування сульфгідрильних груп. S-нітрозилування білків відбувається шляхом приєднання групи оксида азоту (-NO) до тіолу цистеїну в білку з утворенням S-нітрозитола (SNO), що є механізмом NO-опосередкованої передачі сигналу в багатьох процесах і в тому числі в аутофагії. Головний висококонсервативний регулятор сигналіngu NO-редуктаза GSNO (GSNOR – snitrosoglutathione reductase), яка також регулює внутрішньоклітинний рівень S-нітрозоглутатіону (GSNO), основного виду біологічно активного NO [83–85].

Ацетилювання. Ацетилювання – універсальний вид пострасляційних модифікацій білків, що відіграє одну з ключових ролей в регуляції їх стабільності. У гістонів рівні ацетилювання зворотно регулюються гістонацетилтрансферазами (НАТ) та гістондеацетилазами (HDA) [56]. Було показано, що ацетилювання гістонів може брати участь в епігенетичній регуляції аутофагії. До прикладу, ацетилювання білка ATG3 та деацетилювання ATG7 сіртуїном 1 необхідне для ініціації аутофагії, спричиненої голодом [86, 87]. Також у *A. thaliana* було показано, що HDA9 пригнічує експресію ATG8E, ATG2 та ATG13, які є прямою мішенню гістондеацетилази під час старіння листків. Виявлено, що фермент HDA9 відіграє важливу роль у забезпеченні зміни кольору листя у жовтий в потрібний для цього час [88].

РОЗДІЛ 2

РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТУ У ПРОЦЕСАХ РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ

Цитоскелет – це мережа видовжених білкових полімерних волокон, які відіграють ключову роль у процесах росту і морфогенезу клітин, визначають субклітинну організацію, поділ, полярність, диференціацію клітин, впливають на рух органел та внутрішньоклітинний транспорт речовин [89, 90]. Основними компонентами, що складають систему цитоскелету у рослин, є мікрофіламенти та мікротрубочки. Вони є білковими полімерами, які постійно реструктуруються строго регульованим шляхом, щоб сприяти динамічній просторовій організації та швидкій перебудові. Встановлено, що компоненти цитоскелету відіграють важливу роль у координації та організації багатьох важливих етапів розвитку аутофагії, зокрема у формуванні аутофагосом, їх транспорті та взаємодії з лізосомами [7, 91].

2.1. Роль мікрофіламентів у розвитку аутофагії

Мікрофіламенти (МФ), також відомі як актинові філаменти або F-актин, являють собою ниткоподібні структури, що утворюються з актинових субодиниць, які також називаються глобулярним актином (G-актином). МФ є полярними структурами з двома різними кінцями, які називаються (+) кінцем і (-) кінцем, здатні утворюватись *de novo* [92]. Полімеризація МФ починається з процесу нуклеації, тобто з утворення структури, що складається з трьох мономерів глобулярного актину, які збираються в початкове ядро. Подальше додавання субодиниць актину до цього ядра призводить до формування нового МФ [93–95].

Виділяють широкий спектр білків, що зв'язують та ремоделюють актин: фактори нуклеації; білки, що зв'язують та блокують мономери; білки, які

регулюють баланс між складанням і розбиранням, що визначає швидкість та ріст мікрофіламента [94, 96]. Фактори нуклеації, такі як форміни та білки ARP2/3 (ActinRelated Protein 2/3), мають вирішальне значення для ініціації утворення нових філаментів. Аутофагосоми пов'язані з актиновим цитоскелетом через так званий комплекс ARP2/3. На ранніх стадіях біогенезу аутофагосоми комплекс ARP2/3 асоціюється з міченими ATG9 везикулами та опосередковує їх рух між так званим донором мембрани та фагофором.

У клітинах тварин комплекс ARP2/3, ймовірно, залишається пов'язаним з мембраною аутофагосоми на різних стадіях, де він може бути активований факторами, що сприяють нуклеації актину (NPF), такими як WHAMM та JMY [97]. WHAMM і JMY містять мотив VCA (verprolin central acidic), який активує ARP2/3 та сприяє полімеризації актину. Утворення аутофагосом значно порушується, коли рівень цих білків знижується внаслідок РНК інтерференції. Коли домен VCA видаляється з JMY, змінений у результаті мутації відповідного гена білок втрачає здатність активувати полімеризацію актину, і, як наслідок, утворення аутофагосоми блокується [97].

Серія нещодавніх досліджень продемонструвала зв'язок комплексу ARP2/3 з полімеризацією актину на різних етапах аутофагії [98]. Динаміка актину є необхідною для аутофагії, оскільки нокаутні мутанти за комплексом ARP2/3 впливають на її рівень. Є кілька білків, які можуть активувати ARP2/3, але вони не консервативні в рослинах, лише комплекс SCAR/WAVE та Pan1p (відомий як EN/Pan1 у рослин) зберігає консервативність у філогенезі. Мутації в генах комплексів ARP2/3 та SCAR/WAVE не є летальними для рослин, однак збільшення об'єму клітин можуть спостерігатися у певних типів клітин – таких, наприклад, як трихоми [99].

У рослин білок NAP1 (Nck-associated protein 1), локалізований на мембранному комплексі SCAR/WAVE, рекрутується до аутофагосоми на ранній стадії її розвитку для асоціації з мембраною, на якій розміщений ATG8. Також NAP1 допомагає у складанні інших компонентів SCAR/WAVE та

комплексу ARP2/3 (100). Однак невідомо, чи залежить участь NAP1 в аутофагії від його активності в полімеризації актину. Результати попередніх досліджень показали, що у рослин актинові філаменти не залучені до масової аутофагії, проте вони можуть брати участь в інших типах селективної аутофагії [94]. У рослин NAP1 регулює аутофагію, яка виникає у відповідь на різні стреси, зокрема засолення та голодування. Також показано, що NAP1 реагує на постійний механічний тиск, який може викликати масове утворення аутофагосом, коли клітини знаходяться під тиском [100, 101].

2.2. Роль мікротрубочок у розвитку аутофагії

Мікротрубочки (МТ) – це довгі полімери, які є структурно та функціонально важливими компонентами цитоскелету еукаріотичних клітин. Мікротрубочки утворюються шляхом полімеризації гетеродимерів тубуліну і складаються з α - і β -субодиниць, що призводить до утворення порожнистої циліндричної структури, тобто власне мікротрубочки. МТ утворюють мітотичне веретено поділу, аксонемі війок та джгутиків, слугують рейками для внутрішньоклітинного транспорту, реалізують поділ клітини, забезпечують підтримку гомеостазу та регуляцію форми клітини [7, 102, 103]. МТ є високодинамічними та нестабільними структурами, які виконують різноманітні функції. Важливо зазначити, що для забезпечення певного функціонального стану МТ необхідні пострасляційні модифікації тубуліну, а саме ацетилювання, детирозилування, фосфорилування, поліглутамінування та полігліцилювання [104].

Дослідження мікротрубочок у рослин за стресових умов показали, що мутанти із втратою функції гена *tub9* в *A. thaliana* мали гіперчутливий фенотип при сольовому стресі. У той час, як посилена стійка надекспресія *tub9* у трансгенних рослинах рису підвищувала стійкість до сольового стресу [105]. На сьогоднішній день участь МТ у реалізації процесів аутофагії у клітинах

тварин є доведеною. Зокрема, було показано роль МТ у опосередкування біогенезу аутофагосом та їх внутрішньоклітинного транспорту [106, 107]. Роль МТ у регуляції аутофагії у рослин наразі активно досліджується. Умовно в процесі реалізації аутофагії виділяють дві основні функції МТ: сигнальну (ініціація сигнального шляху біогенезу аутофагосом) та транспортну (внутрішньоклітинний транспорту зрілих аутофагосом до літичних вакуолей).

Роль МТ у формуванні аутофагосом відрізняється між конститутивною та стресс-індукованою аутофагією. В попередніх дослідженнях із використанням нокодазолу та таксолу було виявлено, що МТ за нормальних умов не беруть участі у формуванні аутофагосом [108, 109]. Показано, що при використанні високих концентрацій нокодазолу відбувається розбирання МТ, що запобігає утворенню аутофагосом. Крім того, стабілізація МТ за допомогою таксолу або мікромолярних концентрацій нокодазолу має подібний ефект, що свідчить про важливу динамічну роль МТ [108, 110]. Використання різноманітних речовин, які взаємодіють із тубуліном, можуть призвести до побічних ефектів та зміни функцій МТ у процесі формування аутофагосом. Особливо це стосується експериментів, проведених з алкалоїдами барвінку, в яких утворення аутофагосом посилюється як за нормальних умов, так і в умовах стресу [108].

Також було показано, що МТ та їх моторні білки регулюють два основні комплекси, що беруть участь у ініціації аутофагії: mTORC1 та РІЗ-кіназний комплекс III класу. mTOR зв'язується з цитоплазматичною поверхнею лізосом, а його активність контролюється локалізацією лізосом [7].

Роль МТ у злитті аутофагосом з лізосомами залишається ще досить суперечливою, оскільки більшість результатів досліджень не дають підстав чітко відрізнити процес транспорту аутофагосом та злиття зазначених структур. Участь МТ у формуванні аутолізосом спочатку була запропонована на основі спостереження, де повне розбирання МТ інгібує колокалізацію аутофагосом та лізосом та/або деградацію білка шляхом аутофагії [109, 111,

112]. Роль МТ у формуванні аутолізосом, ймовірно, залежить від стабільних МТ [113]. Зокрема, опосередкована таксолом стабілізація МТ не впливає на злиття аутофагосом та лізосом, що свідчить про те, що динамічні МТ не беруть участі в збиранні аутофагосом і лізосом або в їх злитті [108]. Також було показано, що МТ не беруть участь у процесі злиття аутофагосом з лізосомами в клітинах СНО (клітини яєчника китайського хом'яка), а тривалість життя аутофагосом не змінюється за відсутності МТ [114, 115].

2.3. Вплив оксиду азоту на організацію цитоскелету

Оксид азоту (NO) є центральною сигнальною молекулою, що опосередковує окислювально-відновний гомеостаз за умов абіотичних і біотичних стресів в рослинних і тваринних клітинах [116, 117]. У рослинних клітинах ендогенний NO може вироблятися або L-аргінін-залежною синтазою оксиду азоту (NOS), або через активність нітратредуктази (NR). Передача сигналів NO впливає на різноманітні клітинні відповіді, включаючи зміни рівнів експресії генів через сигнальні каскади, регуляцію транскрипційних факторів, а також прямі посттрансляційні модифікації білків. При базальному рівні NO рослини використовують шлях передачі сигналу NO, щоб полегшити ріст і розвиток рослин, тоді як більш високі концентрації викликають запрограмовану клітинну смерть (PCD)

Однак належне розуміння молекулярних механізмів передачі сигналу NO в рослинах тільки почало з'являтися. Одним з ключових аспектів дії NO є його здатність впливати на організацію цитоскелету. Відомо, що NO може спричиняти як стабілізацію, так і деполімеризацію цих структур залежно від концентрації та контексту дії. Зростаюча кількість доказів у літературі свідчить про те, що цитоскелет може бути безпосередньою мішенню сигналізації NO у ссавців, а також у рослин. Наприклад, у тканині мозку миші ізоформи α - і β -тубуліну були ідентифіковані у фракції білка, збагаченої N-Тур

[118]. Також на проростках *A.thaliana* було продемонстровано дефекти росту та пов'язану з ними реорганізацію МТ, вирощених у присутності NO₂-Туг [119]. Зміни в організації МТ безпосередньо спостерігали, використовуючи зображення живих клітин МТ, і візуалізували флуоресцентний репортер МТ. Залежно від концентрації NO₂-Туг знижував мітотичну активність і викликав набухання клітин через реорганізацію кортикальних МТ.

Раніше Красиленко та ін. (2019) продемонстрували вплив інгібітора синтази оксиду азоту L-NAME на ріст кореня, морфологію та організацію мікротрубочок в *Arabidopsis thaliana*. Результати дослідження показали, що обробка рослин L-NAME призводить до дозозалежного та часозалежного інгібування росту первинних коренів. Цей ефект супроводжується змінами в морфології кореня, включаючи утворення подовжених кореневих волосків та набрякання епідермальних клітин в зоні диференціації. Окрім цього, L-NAME провокував реорганізацію мікротрубочок в епідермальних клітинах різних зон росту кореня, викликаючи їх випадкову орієнтацію та/або деполімеризацію [120].

Окрім впливу на цитоскелет, нещодавні дослідження показали, що NO може модулювати активність аутофагії через різні сигнальні шляхи, включаючи модуляцію рівнів реактивних видів кисню (ROS) та активність ключових регуляторних білків аутофагії [121]. Враховуючи, що мікрогравітація є одним із ключових факторів, з якими стикаються рослини в умовах космічного простору, розуміння того, як NO та аутофагія впливають на адаптацію рослин до цих умов, може мати значний вплив на розвиток біологічних технологій для космічних місій.

У даному розділі було детально розглянуто роль цитоскелету у розвитку аутофагії в рослинних клітинах. Дослідження показали, що стабільність мікротрубочок, опосередкована різноманітними білками та посттрансляційними модифікаціями тубуліну, є критично важливою для злиття аутофагосом з лізосомами та утворення аутолізосом. Також було

підкреслено значення оксиду азоту (NO) як сигнальної молекули, яка впливає на організацію цитоскелету та регулює аутофагію за умов абіотичних та біотичних стресів. Вивчення ролі NO та участь цитоскелету в процесах аутофагії мають особливе значення в умовах мікрогравітації, де цитоскелет і аутофагія відіграють важливу роль у адаптації рослин до умов космічного простору. Подальше дослідження цих процесів сприятиме розвитку біологічних технологій для космічних місій, забезпечуючи ефективну адаптацію рослин до екстремальних умов.

РОЗДІЛ 3

АУТОФАГІЯ ЯК АДАПТИВНИЙ ПРОЦЕС ВНАСЛІДОК ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

Процеси аутофагії відбуваються також за нормальних умов, за відсутності стресових факторів. Як зазначалося вище, аутофагія необхідна для підтримки гомеостазу та нормального росту і розвитку рослин. Встановлено, що більшість мутантів за генами аутофагії у *A. thaliana* мали здатність завершити життєвий цикл, проте їх листя передчасно старішало [23, 67]. Все більше доказів свідчить про те, що аутофагія відіграє центральну роль у відповідях рослин на біотичні та абіотичні стреси, такі як інфікування патогенами, голодування, засолення, посуха, гіпоксія, нагрівання, охолодження та окислювальний стрес [24–26, 56, 122–124].

3.1. Роль аутофагії у відповіді на біотичний стрес

У природному середовищі рослини постійно вражаються різними патогенними організмами, які загалом можна розділити на дві категорії: некротрофи та біотрофи. Некротрофні патогени (такі як *Botrytis cinerea* або *Alternaria brassicicola*) вбивають свого господаря, щоб отримати поживні речовини з мертвої тканини. У той час, як біотрофні патогени (наприклад, *Golovinomyces cichoracearum*) потребують живого господаря, щоб розмножуватися в його всередині [125, 126]. Крім того, існують гемібіотрофи, які на одній стадії інфекції є біотрофними, а на іншій – некротрофними. Протягом тривалого співіснування з патогенами рослини виробили різні захисні механізми, спрямовані на запобігання проникнення патогенних організмів. Аутофагія може бути залучена до гіперчутливої відповіді, що індукується як одна з імунних реакцій рослин, що включає ініціацію запрограмованої клітинної загибелі (PCD) для обмеження поширення

патогенів, які в основному викликають накопичення саліцилової кислоти та активних форм кисню (ROS) [21, 127]. Було показано, що при інфікуванні вірусом тютюнової мозаїки у клітинах тютюну дикого типу індукується аутофагія, яка обмежує PCD у місці проникнення вірусу. У свою чергу в мутантних рослинах, в яких ген *ATG6/Beclin 1* «вимкнений», аутофагія не індукується, і PCD не відбувається [128]. У мутантах *A. thaliana atg7* та *atg9* при інфікуванні клітин авірулентним бактеріальним штамом Pto AvrRPS4 або авірулентним ізолятом Noco2 фітопатогенного ооміцету *Hyaloperonospora arabidopsidis* сповільнюється процес протікання PCD [129].

Встановлено зв'язок між аутофагією, програмованою клітинною загибеллю та саліциловою кислотою, яка є відомим регулятором росту рослин. У листі мутантів *A. thaliana atg5* накопичується велика кількість саліцилової кислоти. Блокування сигнальної ролі або зменшення біосинтезу саліцилової кислоти пригнічує раннє старіння та PCD. Таким чином, припускається, що аутофагія негативно регулює PCD через сигнальний шлях, що залежний від саліцилової кислоти, під час старіння та імунної відповіді [130]. Дослідження мутантів *A. thaliana atg5*, *atg7* і *atg18* показали, що аутофагія відіграє позитивну роль у стійкості рослин до грибних патогенів [59]. Було показано, що блокування аутофагії у мутантів *atg18a* викликає гіперчутливі реакції на некротрофні гриби та сприяє фосфорилюванню ATG18a, що призводить до зниження активності аутофагії та зниження стійкості рослин до *Botrytis cinerea*. І навпаки, надмірна експресія варіанту ATG18a, що імітує дефосфорилювання, призводить до індукції гіпераутофагії та підвищує резистентність до *B.cinerea* [131].

Серед біотрофних патогенів найбільш вивченим прикладом є *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Нещодавно було ідентифіковано як про-, так і антибактеріальну функцію аутофагії при інфікуванні *A. thaliana* біотрофним патогеном *Pst*, який модулює механізми аутофагії за допомогою різних ефекторів. З одного боку, *Pst* може активувати аутофагію за допомогою

ефектора HrpZ1 для посилення аутофагії через модуляцію розщеплення ATG8 за допомогою ATG4. З іншого боку, *Pst* також може негативно регулювати аутофагію за допомогою ефекторів HopF3 і AvrPtoB, націлюючись на механізм аутофагії через ATG8 і ATG1 [132].

Хоча генетичні дані підкреслюють важливу роль аутофагії в імунітеті рослин, поки молекулярні механізми залишаються невідомими. Ймовірно, аутофагія бере участь в імунітеті рослин через сигнальні шляхи, до яких залучена саліцилова кислота. В нещодавньому огляді було показано взаємозв'язок між ATG та NPR1, який бере участь у формуванні вродженого імунітету та набутої стійкості рослин [133]. NPR1 також регулює гени, експресія яких змінюється через дію саліцилової кислоти. Відомо, що саліцилова кислота може впливати на активність та/або локалізацію регуляторів транскрипції шляхом посттрансляційних модифікацій факторів транскрипції та корегуляторів [134].

3.2. Фізіологічна роль аутофагії при абіотичному стресі

Як нерухомі організми рослини повинні справлятися з різними змінами навколишнього середовища, включаючи нестачу поживних речовин, засолення ґрунтів, посуху та тепловий стрес. Щоб належним чином реагувати на стресові фактори, рослини розвинули різні сигнальні та регуляторні механізми [25, 135, 136]. Було показано, що аутофагія бере участь у видаленні пошкоджених білків і клітинних компонентів, утворених у відповідь на вплив навколишнього середовища.

Голодування. Найчастіше аутофагія ініціюється у будь-яких типах клітин при голодуванні. В умовах нестачі поживних речовин аутофагія є стратегією виживання, в процесі якої деградуються та засвоюються власні енергетичні джерела [19, 137]. Голодування у рослин відбувається при дефіциті азоту та вуглецю, сахарози, а також за відсутності світла. Так,

використання дефіциту цукрів як стресового фактора є зручною моделлю для дослідження аутофагії в суспензійній культурі клітин [138, 139]. Встановлено, що у *A. thaliana* при голодуванні відбувається підвищення рівня транскриптів таких генів *atg*, як *atg4a*, *atg4b*, *atg8a*, *atg8i*, *atg3* та *atg7*, а мутанти *atg7-1*, *atg9-1*, *atg4a4b-1*, *atg5-1*, *atg10-1* виявляють підвищену чутливість до цього виду стресу [137].

Оксидувальний стрес. Рослини *A. thaliana* з порушенням аутофагії є гіперчутливими до окислювального стресу. Було показано, що проростки лінії *RNAi-ATG18a*, оброблені метилвіологеном, який індукує утворення ROS, продемонстрували затримку росту та сильне знебарвлення порівняно з рослинами дикого типу. Крім того, пригнічення експресії *ATG18* призводить до накопичення окислених білків, що згодом підвищує чутливість до окислювального стресу [122]. Подібні результати спостерігалися, коли мутанти рису *atg10b* також піддавалися обробці метилвіологеном. Очевидно, що аутофагія відіграє важливу роль у захисті рослинних клітин від окислювальних стресів шляхом руйнування окислених білків [140].

Засолення. Засолення та посуха є найбільш поширеними стресовими факторами, які впливають на ріст та розвиток рослин в процесі їх життєдіяльності. Зокрема, було показано, що під час моделювання осмотичного стресу відбувається індукція формування аутофагосом. Рослини лінії *A. thaliana RNAi-ATG18a*, які зазнали впливу засолення чи посухи, продемонстрували підвищену чутливість до стресу. Крім того, за допомогою інгібітору NADPH-оксидази було показано, що регуляція аутофагії може здійснюватися залежним від NADPH-оксидази (у разі сольового стресу) або незалежним від NADPH-оксидази шляхами (у разі осмотичного стресу) [123]. Для мутантних ліній *A. thaliana atg2*, *atg5* і *atg7* характерним було уповільнене проростання насіння та порушення секвестрування Na^+ у вакуолі у відповідь на сольовий стрес [141].

Підтоплення. Показано, що аутофагія також відбувається під час підтоплення рослин. Заболочування та підтоплення обмежують дифузію газу в клітини рослин та провокують різке зростання ROS, що може спричинити гіпоксію. Підтоплення рослин *A. thaliana* призводить до індукції утворення аутофагосом, а мутанти *atg2-1*, *atg5-1*, *atg7-3* та *atg10-1* демонструють підвищену чутливість до занурення порівняно з рослинами дикого типу. Крім того, у цих мутантів спостерігається підвищена експресія генів, залучених до регуляції анаеробного дихання – ADH1 (alcohol dehydrogenase 1) та PDC1 (pyruvate decarboxylase 1), але знижена експресія інших генів, які чутливі до гіпоксії та етилену [142].

Температурний стрес. Було виявлено, що високотемпературний стрес (+30 °C) у *A. thaliana* ініціює аутофагію як у клітинних стінках пиляка, так і в мікроспорах, тоді як мутанти *atg* (*atg2-1*, *atg5-1*, *atg7-2* та *atg10-1*) мають помітне порушення розвитку пилку, що свідчить про те, що аутофагія задіяна у дегенерації тапетуму та розвитку пилку під час високотемпературного стресу [143]. Також встановлено, що аутофагосоми накопичуються в рослинах томатів, які зазнавали теплового стресу [124].

Також встановлено, що такі абіотичні стресові фактори, як голодування, осмотичний/сольовий стрес та ультрафіолет В, пригнічують ріст та розвиток проростків *A. thaliana*. Було показано, що за умов інгібування аутофагії (за дії інгібітора цистеїнових протеаз E-64) спостерігається пригнічення росту коренів у порівнянні з необробленими рослинами. У результаті розвитку стрес-індукованої аутофагії у проростках *A. thaliana* спостерігається утворення аутофагосом, ацидифікація цитоплазми, зниження виживаності клітин та підвищення кількості клітин, для яких характерна апоптична морфологія ядра. Також 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 стресі, що свідчить про залучення специфічних пар білків – продуктів зазначених генів

для розвитку аутофагії, індукованої абіотичними стресовими чинниками [20, 144].

Мікрогравітація. Результати багатьох нещодавно опублікованих досліджень різних типів клітин тварин та людини в умовах мікрогравітації свідчать про те, що цей стресовий фактор здатен індукувати в них розвиток аутофагії, що може призводити до розвитку різних морфологічних та патофізіологічних сценаріїв [145, 146]. Проте на сьогодні немає експериментальних даних стосовно впливу мікрогравітації на розвиток аутофагії в клітинах рослин. Водночас добре відомо, що під час космічного польоту в умовах невагомості або змодельованої мікрогравітації рослини зазнають значних морфологічних та фізіологічних змін. У рослин, що вирощували в умовах мікрогравітації, було виявлено суттєві відмінності у поділі та диференціації клітин, швидкості росту коренів і пагонів, процесах репродукції тощо [47, 148]. Всі ці дані дозволяють припустити, що мікрогравітація може бути стресовим фактором, який здатен впливати на розвиток аутофагії у рослин.

Тому надзвичайно актуальним є вивчення впливу мікрогравітації на рослини, а також дослідження ролі мікротрубочок, які безпосередньо залучені до поділу, росту та диференціації клітин, у реалізації стрес-індукованої аутофагії, що поглибить розуміння процесів адаптації та вирощування рослин в умовах космічних місій.

У даному розділі розглянуто адаптивні функції аутофагії у відповідь на різні стресові фактори, такі як біотичний та абіотичний стрес. Крім того, обговорено можливий вплив мікрогравітації на розвиток аутофагії у рослин та необхідність подальших досліджень у цьому напрямку для покращення адаптації рослин до умов космічного простору

РОЗДІЛ 4

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Рослинний матеріал

У роботі використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia Col-0 та дві трансгенні лінії *A. thaliana*: GFP-ATG8a (катал. номер CS39996) та GFP-MAP4 (катал. номер CS799990). Насіння цих ліній було отримано з Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, Великобританія, <https://arabidopsis.info>). Лінія GFP-MAP4 є стабільно трансформованою [149] та використовується як загально визнаний об'єкт для дослідження змін просторової організації мікротрубочок. Лінія GFP-ATG8a [150] також широко використовується для прижиттєвого дослідження аутофагосомних структур.

4.2. Вирощування рослин та моделювання стресових умов

Насіння *A. thaliana* стерилізували в 10 %-му розчині гіпохлориту натрію (NaOCl), що містив 0,5 % Tween-20, протягом 15 хв та відмивали п'ять разів стерильною дистильованою водою. Після цього насіння висаджували на живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС), що містило вітаміни (M0222, Duchefa, Нідерланди), 4,4 г/л макро- та мікросолей, 10 г/л сахарози, 8 г агару, рН 5,7. Висаджене насіння стратифікували при температурі +4 °С протягом 24 год. Надалі чашки Петрі із насінням залишали для проростання в вертикальному положенні (контроль) при постійній температурі +22 °С та 16/8-годинному фотоперіоді. Для моделювання умов мікрогравітації чашки розміщували в горизонтальний кліностант (режим обертання 4 об/хв) при аналогічних до контрольних умовах вирощування.

4.3. Обробка насіння *A. thaliana* донором та скавенджером NO

Як екзогенний донор NO в роботі використовували нітропрурид натрію (SNP, Sigma, США), а як скавенджер NO карбокси-2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-оксил-3-оксид (сРТІО, Sigma, США), які розчиняли у дистильованій воді безпосередньо перед проведення дослідження. NO та сРТІО використовували у концентраціях 100, 200, 500 та 1000 мкМ. Насіння окремо витримували у водних розчинах SNP та сРТІО протягом 24 год, потім стерилізували (10 % NaOCl), відмивали стерильною дистильованою водою (5 разів) та переносили на поверхню агаризованого середовища MS, аналогічного за складом тому, на якому проводили пророщування насіння *A. thaliana*.

4.4. Методи дослідження

4.4.1. Дослідження показників росту *A. thaliana*

Ріст та розвиток проростків аналізували з 4 по 12 добу вирощування в контрольних умовах і при кліноостатуванні за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Розвиток та зміни морфології первинних, бічних та додаткових коренів проростків *A. thaliana* за умов мікрогравітації вивчали за допомогою мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина), об'єктиви Plan-Neofluar 10x/0.30 та 20x/0.5 DIC.

Довжину коренів рослин, кореневі волоски та площу клітин вимірювали за допомогою програмного забезпечення Image J (версія 1.38d; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), яка є відкритому доступі. Результати записували як середнє значення \pm стандартне відхилення триразового експерименту. Розрахунки швидкості росту коренів проводили, як описано раніше [151]. Середнє кутове відхилення, гравітропічний індекс (GI), індекс вертикального росту (VGI) та індекс горизонтального росту (HGI) розраховували, як описано

в роботі Villacampa та ін. [152]. Порівняння між вимірами довжини коренів оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Об'єм вибірки складав 30 коренів для кожного експерименту, досліди повторювали принаймні тричі для усіх досліджуваних зразків у певних часових проміжках.

4.4.2. Дослідження ендogenous вмісту та внутрішньоклітинної локалізації NO в коренях *A. thaliana*

Вміст NO у кліноставованих проростків визначали за стандартною методикою з деякими модифікаціями [153]. В основу цього методу покладено кількісне визначення нітриту за допомогою реактиву Грісса після утворення нітриту з ендogenous NO. Для цього наважку свіжозрізаного рослинного матеріалу 100 мг гомогенізували в рідкому азоті, додавали 1 мл дистильованої води і нагрівали на водяній бані (+98 °C) протягом 1 хв та охолоджували на льоду. Далі гомогенат центрифугували 10 хв при 6000 об/хв та додавали 0,5 мл реактиву Грісса (1 %-ий розчин в 12 %-ій оцтовій кислоті). Через 30 хв визначали світлопоглинання розчину за допомогою спектрофотометра (SPECORD 210) при довжині хвилі 540 нм, використовуючи розчин нітриту натрію як стандарти. Концентрацію нітритів (мкг/мл) розраховували за формулою: $X=A/V$, де A – вміст нітритів, знайдений на калібрувальному графіку (мкг); V – об'єм проби, взятої для аналізу (мл).

Внутрішньоклітинну локалізацію NO в клітинах коренів визначали за допомогою флуоресцентного барвника DAF-FM DA (4-аміно-5-метиламіно-20,70-дифторфлуоресцеїн діацетат). Для цього проростки *A. thaliana* інкубували в розчині DAF-FM (10 мкМ) при +37 °C протягом 20 хв із трикратним відмиванням у буфері PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, pH 7,4). Внутрішньоклітинну візуалізацію ендogenous NO здійснювали за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина), збудження

аргоновим лазером з довжиною хвилі 405 нм, роздільний фільтр HFT 405/488, дзеркало, фільтр емісії BP 505–530, об'єktiv Plan-Neofluar 10x/0.30 DIC. Досліди повторювали тричі для усіх досліджуваних зразків у певних часових проміжках.

4.4.3. Візуалізація аутофагосом в клітинах кореня *A. thaliana*

Для візуалізації аутофагосом використовували флуоресцентний барвник монодансилкадаверин (MDC, Sigma, США) в концентрації 1 мкг/мл, який розчиняли у буфері PBS (рН 7,4) безпосередньо перед проведенням експерименту. Для дослідження виживаності клітин коренів контрольних та експериментальних зразків рослини *A. thaliana* культивували у розчині пропідіум йодиду (Sigma, США) у концентрації 1.5 мкг/мл із подальшим відмиванням у PBS-буфері

Особливості субклітинної локалізації аутофагосом у клітинах проростків *A. thaliana* також досліджували за допомогою інтеркалюючого барвника LysoTracker™ Red DND-99 (Invitrogen, США) у концентрації 1 мМ з подальшим трикратним відмиванням проростків у буфері PBS (рН 7,4). Візуалізацію аутофагосом в клітинах коренів кліноостатованих рослин здійснювали за допомогою мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина), збудження HeNe лазером з довжиною хвилі 543 нм, роздільний фільтр HFT 488/543, дзеркало, фільтр емісії LP 560, об'єktiv Plan Achromat 40x/1.4 Oil DIC.

Для підтвердження отриманих результатів за допомогою ацидотропних барвників в роботі також було використано трансгенну лінію *A. thaliana* (GFP-ATG8a). Флуоресцентний сигнал фіксували за допомогою конфокального мікроскопу LSM 510 META, збудження аргоновим лазером з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 488/543, дзеркало, фільтр емісії BP 505–530,

об'єктив Plan Achromat 40x/1.4 Oil DIC. Всі дослідження проводили в 3 повторах, використовували не менше 10 проростків для кожного повтору.

Також трансгенна лінія *A. thaliana* GFP-ATG8a була використана для кількісного визначення аутофагосом в клітинах кореня *A. thaliana* за умов змодельованої мікрогравітації. Кожна група зразків складалася щонайменше з трьох незалежних повторів, в кожній з яких досліджували щонайменше 30 клітин [154]. Підрахунок GFP-мічених аутофагосом проводили за допомогою програмного забезпечення Image J (версія 1.38 d).

4.4.4. Дослідження просторової організації мікротрубочок в клітинах кореня *A. thaliana*

Орієнтацію та організацію МТ в реальному часі в живих клітинах за умов клінонстатування досліджували за використання трансгенної лінії *A. thaliana* (GFP-MAP4). Візуалізацію МТ здійснювали за допомогою мікроскопу LSM 510 META (збудження аргоновим лазером з довжиною хвилі 488 нм, роздільний фільтр HFT 488/543, дзеркало, фільтр емісії BP 505–530, об'єктив Plan Achromat 40x/1,4 Oil DIC). Індивідуальну конфігурацію визначали для кожного об'єкта зміною параметрів швидкості сканування, точкової діафрагми та детектора променя. Отримані серії оптичних зрізів (Z-стеки) з інтервалом 0,2–0,7 мкм дозволили відтворити тривимірні структури різних типів організації МТ за допомогою програмного забезпечення LSM 510 META. Організацію МТ досліджували у різних типах клітин кореня: епідермальних клітинах кореневого чохла та меристеми, перехідної зони, зони розтягу та диференціації. Дослідження повторювали принаймні тричі для усіх досліджуваних зразків у певних часових проміжках, досліджуючи не менше десяти коренів в кожному окремому повторі.

4.4.5. Виділення РНК та проведення ПЛР у реальному часі

Тотальну РНК виділяли з проростків *A. thaliana* (Col-0) на 6, 9 та 12-ту добу кліноостатування за допомогою innuSOLV RNA Reagent (Analytik Jena AG, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. Якість та цілісність ізольованої РНК перевіряли електрофоретично в 1 %-му агарозному гелі з формамідом. Концентрацію РНК у зразках визначали за допомогою спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher, США) при довжині хвилі 260 нм, а потім концентрацію доводили до 100 нг/мкл. кДНК синтезували за допомогою зворотної транскриптази Revertasa Máxima (Thermo Fisher, США), 5x розчин для ПЛР, що містив 5 мМ dNTP, 2,5 мМ MgCl₂ (Укрентех, Україна), 1 мкл олігонуклеотидів OligodT (18) (Thermo Fisher, США), 500 нг тотальної РНК як матриці та води, вільної від РНКаз.

ПЛР в реальному часі проводили на ампліфікаторі Biorad CFX96 (США). До реакційної суміші входило: ДНК-полімераза (Thermo Fisher, США), 50 нг матриці кДНК та барвник (SYBR Green, Sigma, Німеччина). Реакцію проводила за наступних умов: початкова денатурація – +94 °С протягом 12 хв; 44 цикли ампліфікації (денатурація – +94 °С, 15 сек; 55–65 °С зв'язування праймера з матрицею – 10 сек; синтез – +72 °С, 40 сек) та фінальна елонгація – при +72 °С протягом 10 хв. Дизайн праймерів здійснювали, враховуючи такі критерії: вміст GC ~ 40–60 %; відсутність неспецифічних вторинних структур – шпильок і димерів; близькі температури відпалу пари праймерів. Послідовність праймерів, температуру плавлення та довжину ампліфікованого продукту наведено нижче:

AtATG8a. T = +64 °С. Довжина продукту – 205 п. н.

forward 5'-GAAGAAGTGAGTAATGGGTTTGC-3'.

reverse 5'-CCAGTTGGAGGCAATGTGTT-3'.

AtATG8b. T = +62 °С. Довжина продукту – 168 п. н.

forward 5'-TTTCAGGGTATTTGCTCTG-3'.

reverse 5'-TACTTGTGCCTCTGGAATTT-3'.

AtATG8c. T = +64 °C. Довжина продукту – 234 п. н.
forward 5'-GAGTGTGCCTTGCTTTGAAC-3'.
reverse 5'-ACGAAGATAGCCTTTTCGGC-3'.

AtATG8d. T = +64 °C. Довжина продукту – 122 п. н.
forward 5'-TTCTCCCTGATACGTGCTG-3'.
reverse 5'-GTCTGTGTTGTTTTACGTGGG-3'.

AtATG8e. T = +64 °C. Довжина продукту – 161 п. н.
forward 5'-TGAAGCTGGAAGGATCAGG-3'.
reverse 5'-ACATACACAGACTCATGCTACATC-3'.

AtATG8f. T = +64 °C. Довжина продукту – 114 п. н.
forward 5'-GCACAAGGTTTTGATTTTCGAGG-3'.
reverse 5'-TGTAGGCGTGGAAGGAATG-3'.

AtATG8g. T = +65 °C. Довжина продукту – 118 п. н.
forward 5'-ТААСGGTAGGCCAGTTTGTG-3'.
reverse 5'-TGAGAGGAGGAGACAGTACC-3'.

AtATG8h. T = +64 °C. Довжина продукту – 139 п. н.
forward 5'-CGCAATGATGTTGTTCTCGACTC-3'.
reverse 5'-TCCTCTGGTTTGTTCTTCGTT-3'.

AtATG8i. T = +64 °C. Довжина продукту – 133 п. н.
forward 5'-АТТАТСТСССGCGACTCC-3'.
reverse 5'-CACGTTGGGTTCGTTTCTATC-3'.

AtTUA1. T = +63 °C. Довжина продукту – 202 п. н.
forward 5'-CAGTTTTTCGGTCCCTGAG-3'.
reverse 5'-GTGTGAGCTCTTTACCAGTC-3'.

AtTUA2. T = +63 °C. Довжина продукту – 199 п. н.
forward 5'-АТСТССАСAGGTCTССАС-3'.
reverse 5'-GAAGCTGGCTСТАТАССТGA-3'.

AtTUA3. T = +65 °C. Довжина продукту – 178 п. н.
forward 5'-GCAACAACGCAAAAGACTCG-3'.

reverse 5'-AGCATTCACATCGGACAAGC-3'.

AtTUA4. T = +62 °C. Довжина продукту – 213 п. н.

forward 5'-AGACATCGGAATCAAACACAG-3'.

reverse 5'-TATCCAGGTCGGAAATGCTT-3'.

AtTUA5. T = +63 °C. Довжина продукту – 156 п. н.

forward 5'-GTTTTGTTTTGCAGGTGCC-3'.

reverse 5'-GGTCGATCCGTGAGAACA-3'.

AtTUA6. T = +63 °C. Довжина продукту – 178 п. н.

forward 5'-AACAGGTTTCATCGAAACGG-3'.

reverse 5'-CTTGCTGGGAGCTTTACTG-3'.

AtTUB1. T = +59 °C. Довжина продукту – 85 п. н.

forward 5'-TGCTGAAACCAATCATGACCC-3'.

reverse 5'-TCTTGTGTTGACACTTTCGAGG-3'.

AtTUB2. T = +59 °C. Довжина продукту – 106 п. н.

forward 5'-TCAAACCTCACTACCCCCAGC-3'.

reverse 5'-AAACACCATGTAGACCAAGCA-3'.

AtTUB3. T = +60 °C. Довжина продукту – 213 п. н.

forward 5'-CCCCCAGCTGTAAGATTTTCGT-3'.

reverse 5'-ССААТАGСАСАСАAGАСАAGAGG-3'.

AtTUB4. T = +59 °C. Довжина продукту – 144 п. н.

forward 5'-AGATCCAGTTCCTCCTCCCA-3'.

reverse 5'-TCTGAGTTTTTGAATCGTGGAACG-3'.

AtTUB5. T = +59 °C. Довжина продукту – 80 п. н.

forward 5'-ATTCCTGAACCTGTGCCTCC-3'.

reverse 5'-АСТАТGТGААТСАТGGGGCTGC-3'.

AtTUB6. T = +60 °C. Довжина продукту – 197 п. н.

forward 5'-CATTGACACGCTCCAACCTGC-3'.

reverse 5'-TCCGTTGTTTACTGTTTTGTTCA-3'.

AtTUB7. T = +60 °C. Довжина продукту – 209 п. н.

forward 5'-AGGCTCCACAACAGTGTTCAG-3'.

reverse 5'-ACGGATTTCGGTTTTGTATTCGT-3'.

AtTUB8. T = +59 °C. Довжина продукту – 141 п. н.

forward 5'-TGGGTTTTGTTCAGTTGGAGAC-3'.

reverse 5'-TGGAGACGAGGGAATGGGAT-3'.

AtTUB9. T = +59 °C. Довжина продукту – 217 п. н.

forward 5'-GTGGTGGTGTATCTTAGTTGGTG-3'.

reverse 5'-CTCAGGGACACTCAAGGCAC-3'.

AtEF α . T = +63 °C. Довжина продукту – 208 п. н.

forward 5'-ATTTTCGCCTAACAGATGGATG-3'.

reverse 5'-CCTCAAGAAGAGTTGGTCC-3'.

AtEF α . T = +64 °C. Довжина продукту – 167 п. н.

forward 5'-TGC GTCTTTTTCTATTTTCGCC-3'.

reverse 5'-TGTTGTCTCCCTCGAATCC-3'.

Як контроль для ПЛР використовували рівень експресії фактору елонгації α (*AtEF α*). Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 1%-му агарозному гелі. Рівень експресії оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta C_t$. Середні значення показників рівнів експресії генів на усіх часових проміжках після впливу індукованої мікрогравітації отримували шляхом співвідношення значення рівня експресії у експериментальній точці дослідження до контролю на аналогічному часовому проміжку. Далі було проведено статистичну обробку отриманих даних та підрахунок середнього значення та стандартного відхилення за допомогою програми Microsoft Excel 2020. Експерименти проводили у трьох повторах.

4.4.6. Теплові карти *A. thaliana* за нормальних умов

Транскриптомні дані за нормальних умов для *A. thaliana* були отримані з загальнодоступної бази даних (<https://bar.utoronto.ca/eplant>). Для аналізу було

взято рівні експресії ідентифікованих генів у двох різних тканинах на двох стадіях розвитку. Експресію аналізували в сім'ядолях і гіпокотиллях 7-денних рослин, а також у корені та вегетативній розетці листків 14-денних рослин. Теплові карти експресії будували за допомогою інструменту Heatmap у програмі TBtools v1.097188.

4.4.7. Статистична обробка отриманих даних

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми OriginPro 2019b. Зокрема, достовірність результатів підтверджували за допомогою t-критерію Стьюдента. Варіацію середніх значень виражали як стандартне відхилення (STD) або як стандартну похибку середнього значення (SEM) для даних експресії генів. Для визначення того, наскільки суттєво відрізняються набори даних, проводили односторонній або двосторонній ANOVA-тест, який включав розрахунок найменших достовірних відмінностей Фішера (LSDs). LSD були використані для визначення однорідних груп наборів даних на різних рівнях достовірності ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

РОЗДІЛ 5

РОЗВИТОК АУТОФАГІЇ ЯК АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ ДОСЛІДЖУВАНИХ РОСЛИН НА УМОВИ ЗМІНЕНОЇ ГРАВИТАЦІЇ

5.1. Вплив мікрогравітації на ріст та морфологію коренів проростків *A. thaliana*

Відомо, що за умов космічного польоту або модельованої мікрогравітації рослини можуть зазнавати більш чи менш значних морфофізіологічних змін. Було виявлено суттєві відмінності у швидкості росту коренів, проліферативній активності клітин, процесах репродукції, старінні органів тощо [1, 155]. Також мікрогравітація спричиняє переорієнтацію напрямку руху асимілятів із послабленням їх надходження до верхівок стебла та коренів. Оскільки за різних стресових умов основними факторами, що запускають аутофагію, є брак життєвих ресурсів (наприклад, зниження рівня амінокислот, факторів росту тощо), здається логічним припустити, що мікрогравітація може призвести до розвитку аутофагії для виживання та адаптації рослин. Виходячи з цього, метою першого етапу досліджень було оцінити вплив клінонстатування на ріст і розвиток проростків *A. thaliana*. Оцінювали загальний стан проростків, їх морфофізіологічні особливості, звертаючи особливу увагу на розвиток коренів як в контролі, так і при клінонстатуванні, використовуючи горизонтальний клінонстат із швидкістю 4 об/хв.

У результаті проведених досліджень нами було виявлено, що клінонстатування не впливало на проростання насіння, а також не викликало суттєвих відхилень у морфології пагонів проростків (рис. 5.1.). Затримка в розвитку пагонів спостерігали лише на 6-ту та 9-ту добу клінонстатування, на 12-ту добу пагони практично морфологічно не відрізнялися від контрольних рослин. Також 12-денні проростки мали правильну листову розетку, яка

складалася з 4–6 овальних зелених листків. У той же час проростки, що зростали в експериментальних умовах, на відміну від контролю мали дезорієнтований ріст коренів, що було наслідком постійної зміни вектора сили тяжіння.

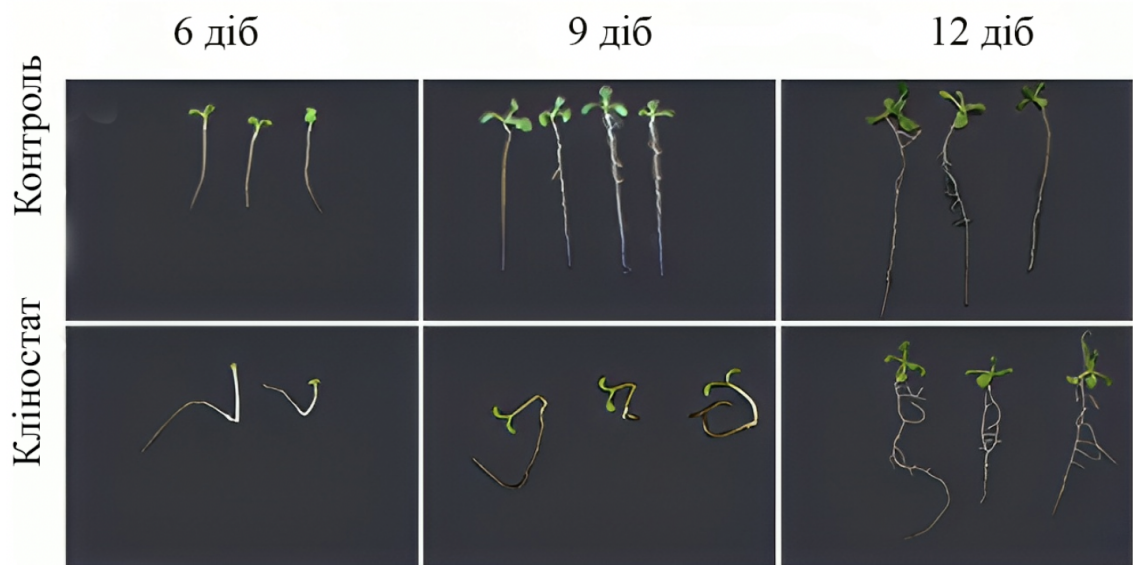


Рис. 5.1. Вплив кліноостатування на ріст коренів та проростків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Зображення проростків у різні часові проміжки кліноостатування; бар – 1 см

Середня довжина головних коренів (рис. 5.2.) та кореневих волосків (рис. 5.3.) кліноостатованих проростків *A. thaliana* достовірно не відрізнялася від контрольних проростків на всіх досліджуваних часових інтервалах. Проте встановлено, що кількість кореневих волосків у рослин збільшувалася під час кліноостатування, і це було особливо помітно зі збільшенням тривалості їх культивування. Зокрема, на 12-ту добу кількість кореневих волосків зросла на 15 % порівняно з контролем. В *A. thaliana* кореневі волоски відіграють значну роль у формуванні розгалуженої кореневої системи і, отже, визначають можливості рослини у пошуку та споживанні ресурсів, а також механічне прикріплення до субстрату. У результаті кліноостатування спостерігалось

більш інтенсивне утворення та ріст бічних коренів вже через 12 діб порівняно з контролем.

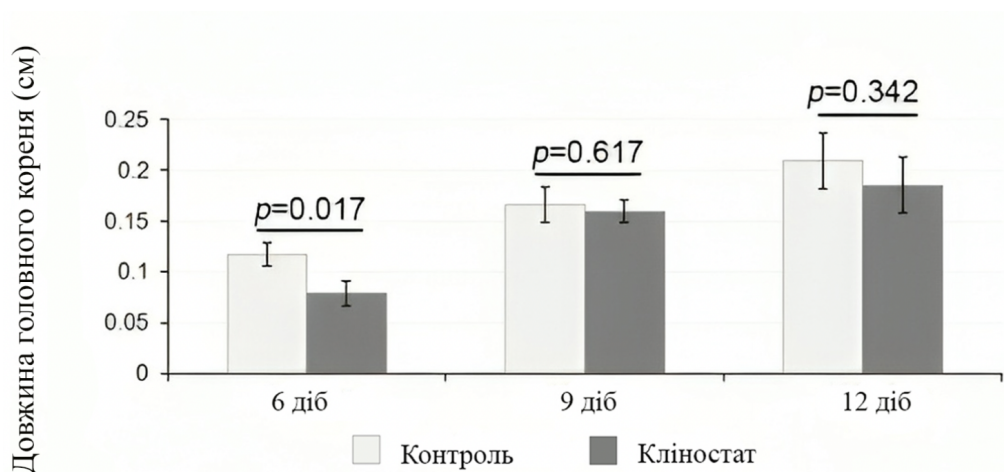


Рис. 5.2. Вплив кліностатування на довжину головного кореня проростків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$, n – кількість рослин, $n=30$

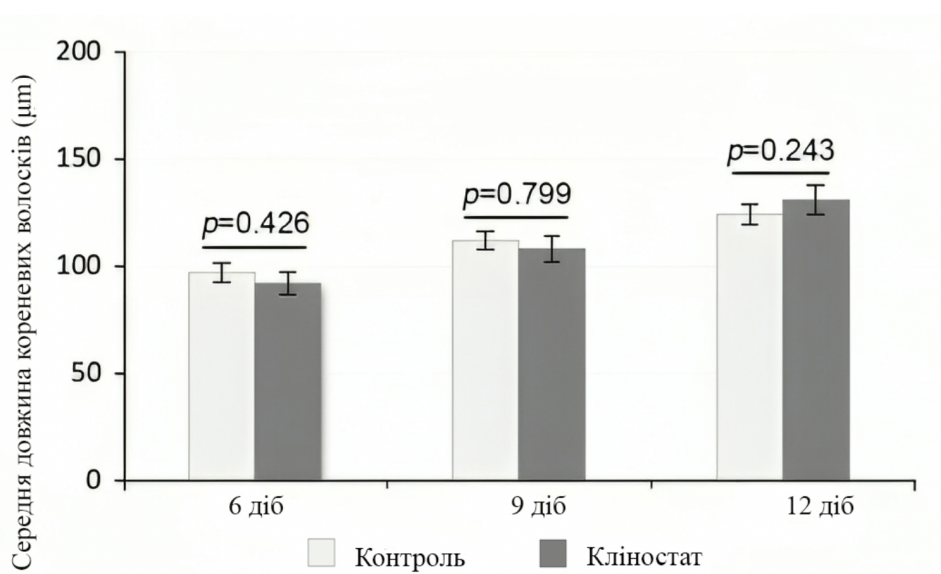


Рис. 5.3. Вплив кліностатування на довжину кореневих волосків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$, ($n=100$)

При аналізі морфології та розвитку головних коренів під час кліноостатування були виявлені відмінності в їх зонах росту. Наприклад, зони розтягу та перехідна були коротшими, в порівнянні із контрольними рослинами (рис. 5.4.). Зокрема, через 6 діб кліноостатування перехідна зона коренів була в 1,8 раза коротшою, ніж у контрольних рослин. Подальші спостереження через 9 і 12 діб показали ще більші відмінності: перехідна зона була відповідно в 2 і 2,1 раза коротшою, ніж у контрольних рослин. Такі зміни в морфології коренів можуть свідчити про вплив умов кліноостатування на процеси клітинного поділу і розтягування в зонах росту коренів. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що змінена гравітація впливає на напрямок росту та розвиток коренів, що, в свою чергу, відображається на довжині та структурі їхніх зон росту.

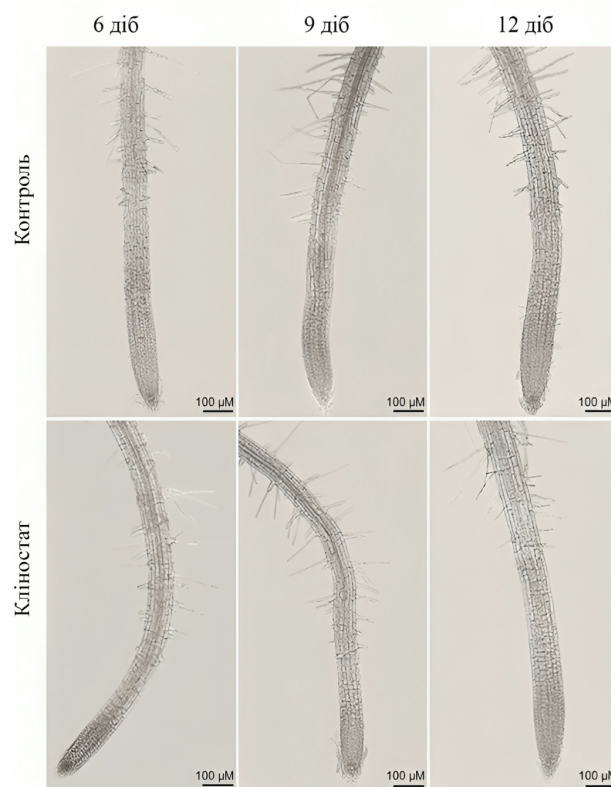


Рис. 5.4. Вплив кліноостатування на ріст коренів *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Зовнішній вигляд різних зон кореня в умовах кліноостатування; бар – 100 μm

Також спостерігалися незначні відмінності в розмірах клітин у перехідній зоні головних коренів. Наприклад, при визначенні середньої площі епідермальних клітин в перехідній зоні (рис. 5.5.) було виявлено, що через 6 діб кліноостатування площа клітин зменшилася на 29 % порівняно з контрольними рослинами, що є значним скороченням. Подальші спостереження через 9 діб показали зменшення площі клітин на 21 % у порівнянні з контролем. Це свідчить про те, що ефект кліноостатування продовжує впливати на морфологічні характеристики клітин кореня навіть через 9 діб. Однак через 12 діб після початку експерименту різниця в середній площі клітин між експериментальною та контрольною групами зменшилася до приблизно 14 %, що є статистично незначущою ($p=0,102$). Це може вказувати на адаптацію рослин до умов кліноостатування. На представленому графіку чітко видно динаміку змін середньої площі клітин під впливом кліноостатування протягом різних часових інтервалів.

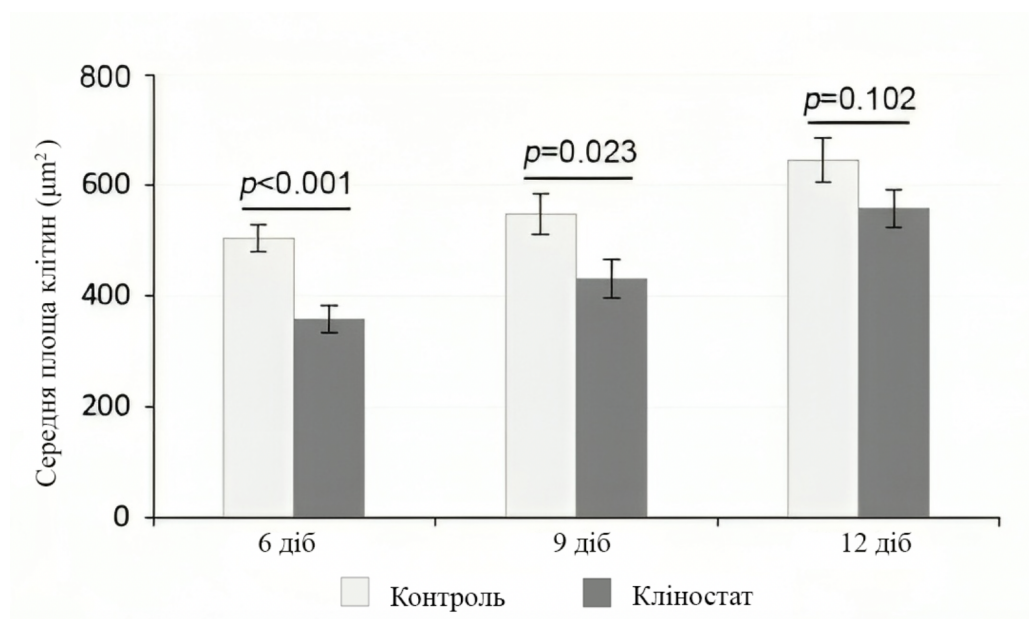


Рис. 5.5. Кількісний аналіз середньої площі епідермальних клітин перехідної зони проростків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу за умов кліноостатування. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$, $n = 50$

Для оцінки фенотипових змін головного кореня, було проведено кількісний аналіз кута гравітропічного нахилу (gravitropic set-point angle – GSA). Фенотипічні зміни в головних коренях, спричинені кліноостатуванням, показують, що розвиток коренів відхиляється від моделі, яку можна описати як вертикальний низхідний ріст з гравітропічним кутом нахилу (GSA), що дорівнює 0. Кількісна оцінка кута (рис. 5.6.) показала значне збільшення GSA у проростків *A. thaliana* в умовах кліноостатування, що свідчить про відхилення від нормальної вертикальної орієнтації коренів, як наприклад у контролі. Це відхилення залежить від часу, досягаючи піку на 12-ту добу кліноостатування, що свідчить про гравітропну реакцію кореня.

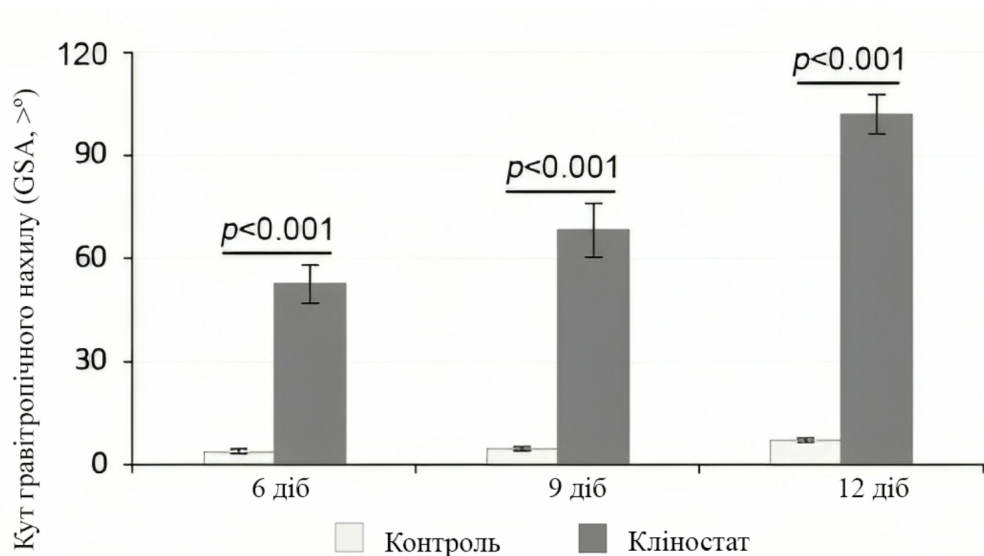


Рис. 5.6. Кількісний аналіз кута гравітропічного нахилу проростків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Кут нахилу кореня, виражений як абсолютне значення інтегрального середнього кутового відхилення. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$, $n = 30$

Також проаналізовано морфологію коренів, використовуючи три величини, що були описані раніше [152]. Зокрема, гравітропічний індекс (GI), індекс вертикального росту (VGI) та індекс горизонтального росту (HGI). На рисунку (рис. 5.7.) зображено схему параметрів росту кореня. Значення L_y

починається від точки згину кореня, далі проводиться лінія по вертикалі вниз до горизонтальної лінії Lx, яка йде від кінчика кореня. Ld – це найкоротша довжина кореня від згину до кінчика.

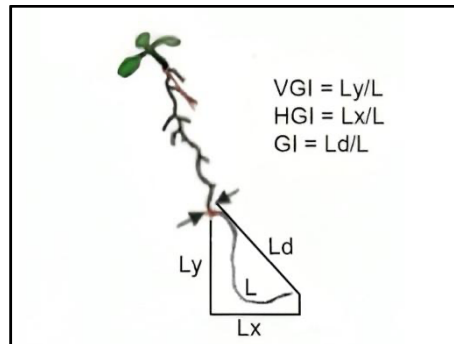


Рис. 5.7. Зображення параметрів росту кореня *A. thaliana* [152]

Гравітропічний індекс GI – це співвідношення найкоротшої відстані від точки згину кореня до кінчика кореня (Ld) до довжини кореня (L). GI також називають параметром прямолінійності, і чим ближче значення до одиниці, тим пряміший корінь. При аналізі контрольних та кліноостатованих проростків ми отримали значення GI 0,9 та 0,7 відповідно на всіх часових проміжках (рис. 5.8.).

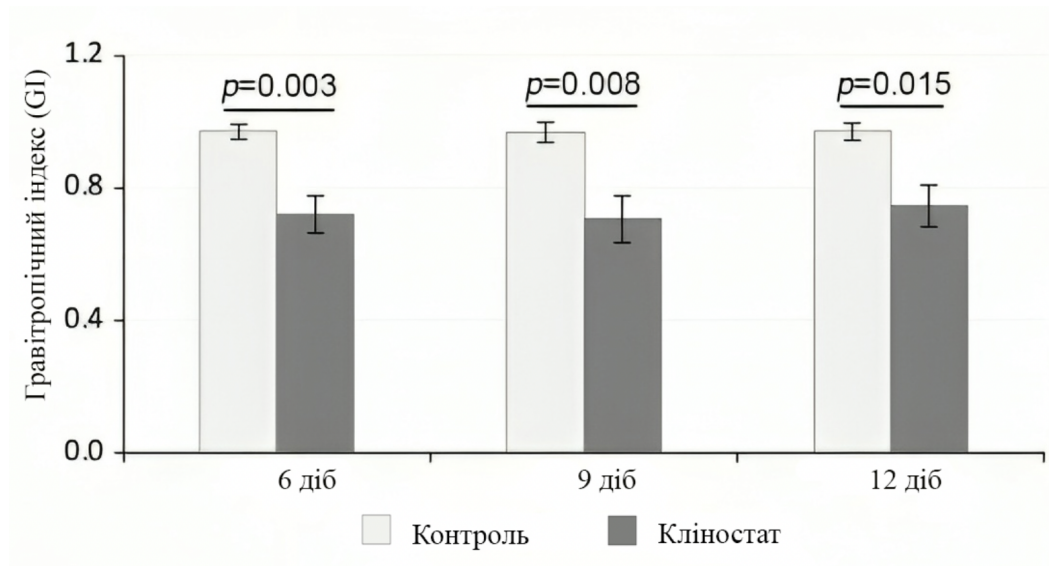


Рис. 5.8. Гравітропічний індекс проростків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. GI – гравітропічний індекс (n = 30). Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$

Статистичний аналіз показав, що VGI є чутливим морфометричним параметром, що дозволяє виявляти слабкі гравітропічні дефекти. Показник VGI рахується як співвідношення між значенням L_y до довжини кореня (L). Показники VGI у контрольних рослин становили 0,9 на всіх досліджуваних часових інтервалах (рис. 5.9.). Це свідчить про те, що корінь росте вниз ($GSA = 0^\circ$) і проявляє позитивний гравітропізм, його VGI наближається до 1. У експериментальних рослинах значення $VGI = 0,3$, це значить, що середнє відхилення коренів від вертикалі було більшим. Дані свідчать, що корені мають діагравітропний фенотип ($GSA = 90^\circ$ або 270°), і його VGI наближається до 0. У випадку, коли корінь росте вгору демонструючи негативний гравітропізм ($GSA = 180^\circ$), VGI буде дорівнювати -1.

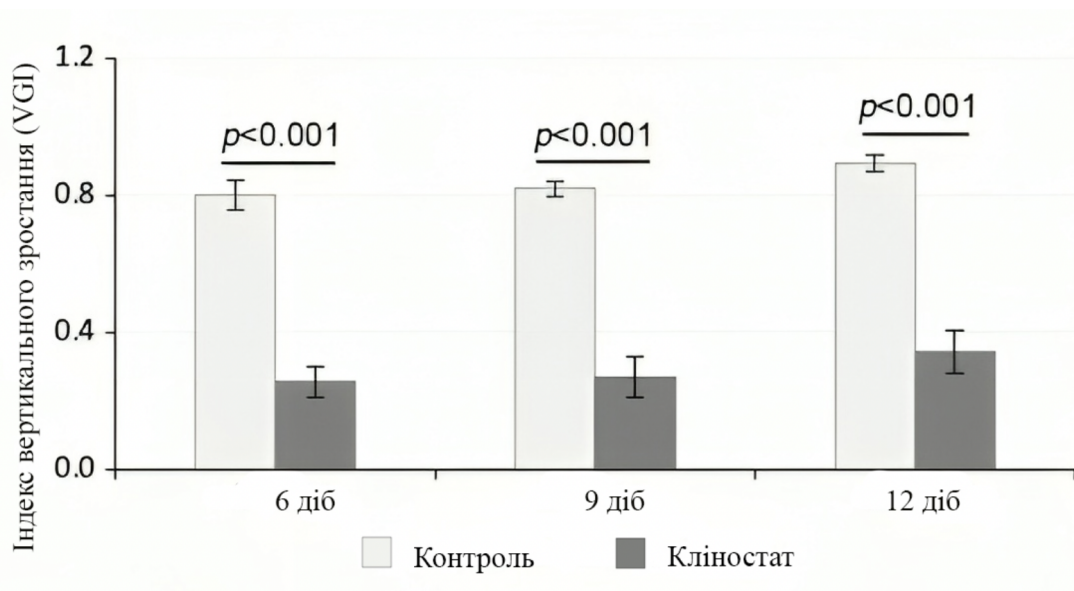


Рис. 5.9. Вертикальний індекс росту проростків (VGI) *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$; ($n = 30$)

Показник VGI характеризує відхилення морфології кореня від модельного гравітропного фенотипу, тоді як індекс горизонтального росту HGI описує напрямки росту кореня у бік. HGI є результатом діленням величини (L_x) на довжину кореня (L). При аналізі HGI нами було отримано протилежні значення, зокрема, для контрольних рослин $HGI = 0,1$ (рис. 5.10.),

оскільки HGI майже дорівнює 0. Це свідчить про те, що корінь росте вертикально й має позитивний гравітропізм ($GSA = 0^\circ$). Для проростків в умовах кліностакування, значення $HGI = 0,7$, що вказує на відхилення кінчика кореня вправо або вліво від вертикалі. Якщо HGI наближається до 1, це вказує на діагравітропні фенотипи з горизонтальним характером росту коренів.

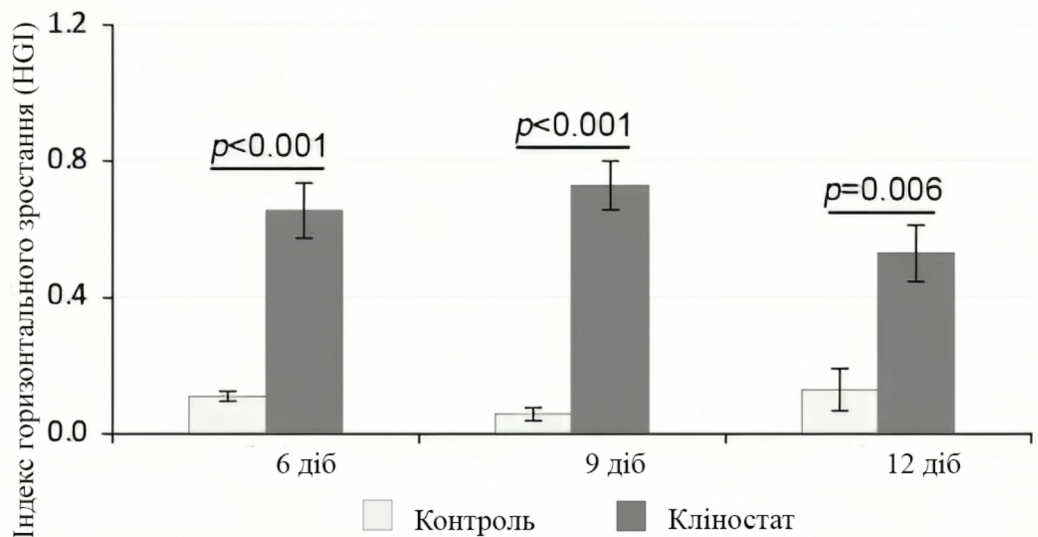


Рис. 5.10. Індекс горизонтального зростання (HGI) проростків *A. thaliana* на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу. Двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, $p > 0,05$; ($n = 30$)

Отримані результати наших досліджень узгоджуються із свіжими даними. Нещодавно Romano та ін. (2024) показали, що після перебування рослин в умовах мікрогравітації та симуляції гравітації Місяця було виявлено дещо нижчі темпи росту, ніж у контрольному зразку [156]. Також дослідження, проведене Shimazu та ін. (2001) на проростках гороху (*Pisum sativum*) та кукурудзи (*Zea mays*), підтверджує наші спостереження, демонструючи вплив змінених гравітаційних умов на ріст і розвиток вищих рослин [157].

Як відомо, реакція вищих рослин на дію мікрогравітації включає три основні фази: сприйняття гравітаційного стимулу, його передачу в зону розтягу кореня і формування ростового вигину кореня з направленням вздовж

гравітаційного вектору або стебла в протилежному до гравітаційного вектору [158–160]. В диференційній регуляції відповіді клітини чи органа на зміну гравітації нараховують від 130 до 280 генів. Однією з причин порушення морфогенезу може бути редукція полярного транспорту ауксину та цитокініну, які є гравізалезними [161]. Отже, необхідні подальші дослідження, щоб зрозуміти, як формується адаптація до мікрогравітації, і як координуються сигнальні та регуляторні системи з механізмами відповіді на гравістимул та за відсутності гравістимуляції.

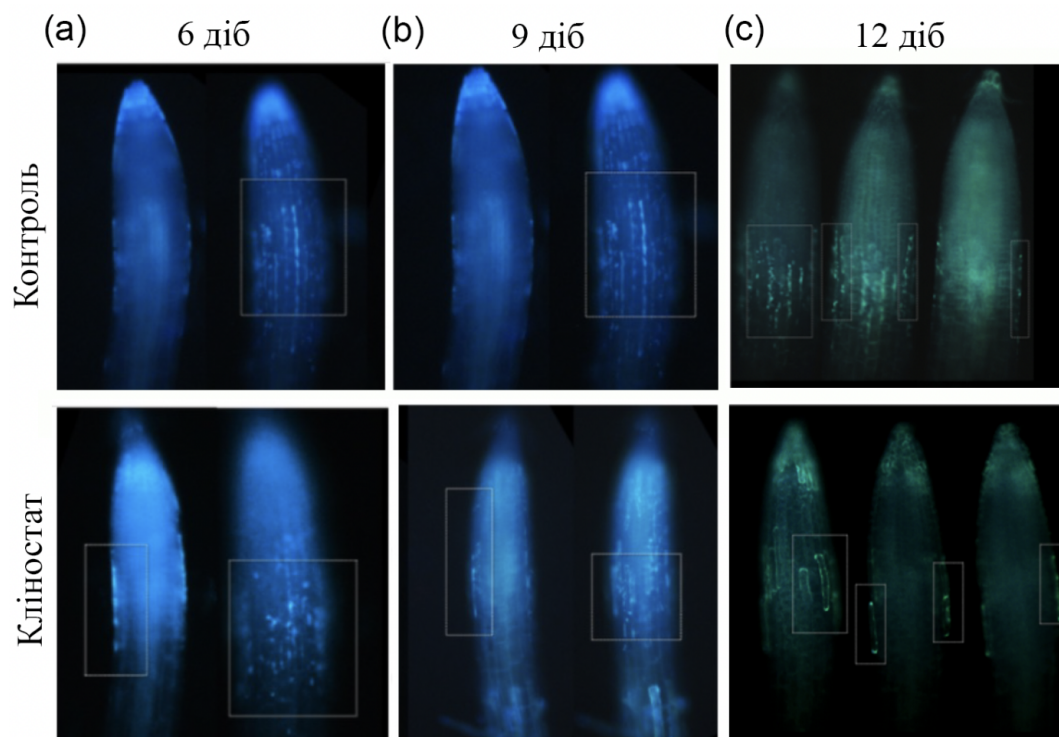


Рис. 5.11. Морфологічні ознаки розвитку аутофагії в клітинах кореня проростків *A.thaliana*, що зазнавали впливу кліностатування протягом 12 діб (a – g). Масштаб: 20x

Для оцінки розвитку аутофагії (рис. 5.11.) було проаналізовано контрольні рослини та рослини, що вирощували в умовах кліностатування, на кожному часовому проміжку (6–12 діб). Корені проростків *A. thaliana*

культивували у розчині монодансилкадаверину (MDC). В результаті проведених досліджень [162] виявлено появу ознак розвитку аутофагії. Зокрема, спостерігали появу MDC-забарвлених структур розміром від 3 до 20 мкм. Слід відзначити, що для клітин кореневого чохла було характерним поява аутофагосом вже з 6 доби клінонстатування та поступове їх збільшення із продовженням часу обробки до 9 діб. Також було виявлено, що на 10 добу культивування у клітинах кореневого чохла кількість аутофагосом стрімко знижувалась, що може бути ознакою адаптації коренів до умов мікрогравітації. Під час 11 та 12 доби кількість аутофагосом не була більшою від контролю.

При дослідженні ознак розвитку аутофагії в умовах змодельованої мікрогравітації було виявлено, що зона розтягу кореня виявляє підвищену чутливість до впливу зазначеного стресового чинника. З огляду на те, що різні зони кореня виявляють різну чутливість до впливу мікрогравітації, зокрема найбільш активний розвиток аутофагії в зоні кореневого чохла спостерігали на 9-ту добу клінонстатування, а в зоні розтягу кореня – на 10-ту добу, необхідними були подальші дослідження для визначення часового проміжку для аналізу аутофагії, індукованої умовами мікрогравітації. За результатами оцінки виживаності клітин проростків *A. thaliana* за допомогою пропідіум йодиду, який дозволяє візуалізувати ДНК апоптичних клітин, було виявлено, що з 6 по 10-ту добу клінонстатування корені характеризувались високими показниками виживаності. У цей проміжок клінонстатування, як і в контролі, відсоток клітин у стані програмованої клітинної загибелі знаходився в межах 1–5 %, що є фізіологічною нормою для клітин проростків *A. thaliana*. Відповідно, ці дані свідчать про те, що незважаючи на особливості адаптації експериментальних рослин до умов мікрогравітації розвиток аутофагії не призводить до прискорення процесів програмованої клітинної загибелі. Аналогічні висновки були також зроблені при дослідженні індукції аутофагії у рослин абіотичними стресовими чинниками [20, 163, 164].

Результати дослідження показують, що мікрогравітація впливає на ріст та розвиток рослин *A. thaliana*. Експерименти в космічних польотах також показують вкорочення та закручування коренів *A. thaliana* [165]. А саме в дослідженні Califar та ін. (2020), було показано, що під час культивування в умовах мікрогравітації корені демонструють викривлення і дезорієнтацію росту. Відсутність стабільного гравітаційного вектора спричиняє хаотичний ріст коренів, які закручуються або змінюють напрямок. Такі умови призводять до скорочення зон розтягу та перехідної зони коренів, що зменшує загальну довжину кореневої системи і може негативно впливати на здатність рослин до поглинання води та поживних речовин. Автори також показали, що затримка росту коренів на ранніх стадіях кліностатування також є характерною рисою, хоча з часом рослини адаптуються до нових умов. Результати даної праці перегукуються з результатами наших досліджень, що вже описано вище. Нами також було виявлено загинання коренів у відповідь на умови мікрогравітації та продемонстровано, що ріст та морфологічні зміни *A. thaliana*, викликані мікрогравітацією, впливають на різні клітинні процеси та беруть участь у регуляції аутофагії в рослинах [164].

5.2. Вплив мікрогравітації на формування аутофагосом у клітинах коренів *A. thaliana*

Аутофагія є високо консервативним та еволюційно закріпленим шляхом підтримання клітинного гомеостазу або виживання за умов дії стресу, що провокується недостатністю життєвих ресурсів, накопиченням пошкоджених органел або білків в клітині. Аутофагія задіяна в підтримці гомеостазу клітин, формуванні зародка, проростанні насіння, утворенні провідних тканин ксилеми, старінні листків і захисті від патогенів [166]. Деградація пошкоджених органел та білкових агрегатів відбувається завдяки функціонуванню літичних структур клітини. Для цього реалізація механізмів

аутофагії передбачає формування двомембранних молекул – аутофагосом, які доставляють компоненти, що потребують деградації, до літичних вакуолей для їх подальшої рециркуляції [167].

Нещодавно було показано, що різні абіотичні стреси (голодування, осмотичний і сольовий стресс та УФ-Б-опромінення) індукують в клітинах проростків *A. thaliana* розвиток аутофагії, яка розглядається як внутрішньоклітинний адаптивний процес [163, 168]. Оскільки за дії різних стресових умов головними факторами, які активізують аутофагію, є нестача життєвих ресурсів (наприклад, зниження рівня амінокислот, енергоресурсів, факторів росту тощо), логічним виглядає припущення, що мікрогравітація може призводити до розвитку/активізації аутофагії для виживання рослин за цих умов. Одним із підходів до вивчення аутофагії є спостереження за кислотністю клітин, оскільки під час аутофагії лізосоми/вакуолі будуть злиті з аутофагічними тілами. LysoTracker Red – це барвник, який забарвлює кислі компартменти клітини та може використовуватися як доказ аутофагічної доставки вантажу до лізосом (169). Отримані попередні результати свідчать про наявність морфологічних ознак індукції цього процесу в період з 6 по 12-ту добу культивування за умов мікрогравітації. Для виявлення аутофагосом у клітинах коренів *A. thaliana* в роботі нами було використано флуоресцентний барвник LysoTracker™ RedDND-99 (LTR). В результаті проведених досліджень було виявлено появу забарвлених червоних структур розміром від 1 мкм, що відповідають аутофагосомам (рис. 5.12.). На 6-ту добу культивування в епідермальних клітинах перехідної зони кореня виявлено велику кількість аутофагосом у порівнянні із контрольними рослинами. Виявлено, що на 9-ту добу вирощування корені, скоріше за все починали адаптуватися до стресу, про що свідчить зменшення кількості аутофагосом у клітинах кореня у порівнянні із даним показником на 6-ту добу. На 12-ту добу кліноостатування спостерігали невелику кількість аутофагосом в

епідермальних клітинах перехідної зони кореня. Отримані дані свідчать про адаптацію рослин до стресових умов, викликаних гравітаційними змінами.

Для підтвердження отриманих результатів нами було проведено додаткові експерименти з використанням трансгенної лінії *A. thaliana* GFP-ATG8a (рис. 5.12. g–l.). Слід зазначити, що у рослин, вирощених в кліностабільних умовах, також спостерігали збільшення кількості аутофагосом (структур, мічених GFP-ATG8) в епідермальних клітинах перехідної зони кореня на 6 та 9-ту добу у порівнянні з контролем. Крім того, було виявлено зменшення кількості аутофагосом на 12-ту добу в епідермальних клітинах перехідної зони кореня проростків *A. thaliana* (GFP-ATG8a), вирощених в умовах мікрогравітації. Таким чином, отримані результати за використання барвника LTR та трансгенної лінії *A. thaliana* (GFP-ATG8a) в обох випадках показали індукцію аутофагії та максимальний рівень утворення аутофагосом у клітинах коренів рослин після 6-ти діб культивування за умов кліностабільності та поступове зниження кількості аутофагосом в тих самих клітинах кореня на 9 та 12-ту добу вирощування. Важливо зазначити, що розміри епідермальних клітин коренів експериментальних рослин були меншими порівняно з контрольними. Найімовірніше це пов'язано зі стресовим навантаженням, що зазнають клітини внаслідок вирощування рослин в умовах кліностабільності.

При підрахунку аутофагосом, мічених GFP-ATG8a, виявлено, що на 6-ту добу вирощування спостерігається найбільш суттєва зміна кількості аутофагосом (більш ніж у 2 рази) порівняно з контролем (рис. 5.13.). Хоча на 9-ту добу кількість аутофагосом зменшилася, у клітинах перехідної зони кореня їх було все одно більше, ніж у контрольних рослинах. На 12-ту добу вирощування кількість аутофагосом у клітинах коренів рослин в умовах кліностабільності була подібною до контрольних рослин. Ці результати підтверджують наше припущення про адаптацію рослин до стресу мікрогравітації.

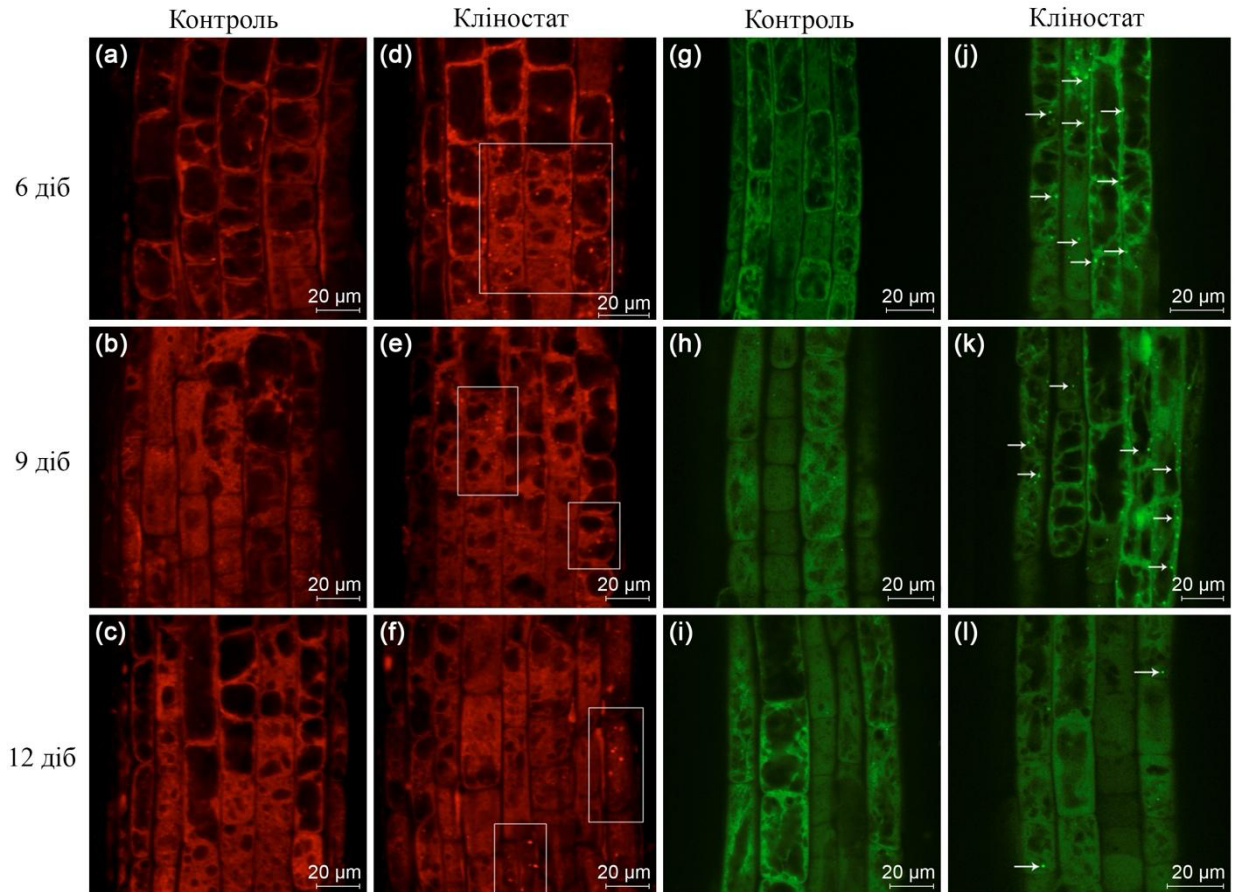


Рис. 5.12. Візуалізація аутофагосом (позначено квадратом) барвником LTR в епідермальних клітинах перехідної зони кореня *A. thaliana* (Col-0) у контрольних та кліноостатованих рослин (a–f). Та GFP-ATG8a-мічені (g–l) аутофагосоми (позначено стрілками) в епідермальних клітинах перехідної зони кореня трансгенної лінії *A. thaliana* (GFP-ATG8a) (g–i). Масштаб: 20 мкм.

Як було показано раніше, барвник LTR можна використовувати як доказ аутофагічної доставки вантажу до лізосом [170, 171]. Крім того, LTR також використовували для отримання відповідних даних про розвиток аутофагії в жирових клітинах *D. melanogaster* [172]. Наші результати [173], отримані за допомогою барвника LTR, показали, що активні процеси аутофагії відбуваються в умовах мікрогравітації через 6–9 діб. Попередні дослідження продемонстрували, що для підтвердження результатів, отриманих за

допомогою ацидотропних барвників, слід використовувати додаткові підходи, такі як лінії, що експресують GFP-ATG8/LC3 [171, 174]. Таким чином, за використання трансгенної лінії *A. thaliana* GFP-ATG8а нами було встановлено активний розвиток аутофагії на 6-ту та 9-ту добу вирощування рослин в умовах змодельованої мікрогравітації. Також раніше лінія GFP-ATG8а була використана для дослідження ролі аутофагії в деградації хлоропластів [175].

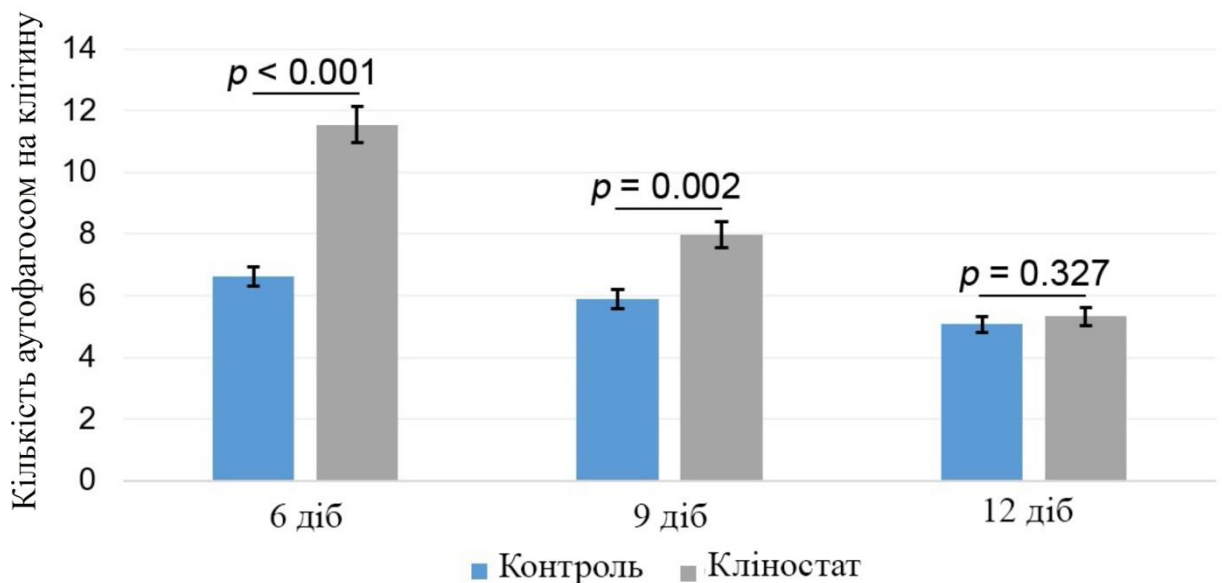


Рис. 5.13. Кількість аутофосом у рослинах трансгенної лінії *A.thaliana* (GFP-ATG8а) на 6–12-ту добу культивування за умов мікрогравітації; $p > 0,05$

Варто зазначити, що дослідження впливу мікрогравітації на індукцію аутофагії у рослин раніше не проводилися. Раніше лише було відомо про дослідження розвитку аутофагії в умовах мікрогравітації з використанням клітин НЕК293Т, що стабільно експресують GFP-LC3 [176]. Також було встановлено, що кліностагування цих клітин призводить до утворення аутофосом у цитоплазмі та змінює експресію аутофагічних маркерів, таких як LC3-II та р62 вже через 72 години. Індукція аутофагії супроводжувалася активацією АМРК (АМР-залежної протеїнкінази) і зниженням активності

мішені рапаміцину (mTOR), що є негативним регулятором аутофагії. Для підтвердження ролі AMPK у процесі індукції аутофагії за умов кліноостатування автори використовували siRNA для пригнічення експресії AMPK. Виявилося, що клітини з пригніченою експресією AMPK не показали індукцію аутофагії під впливом змодельованої мікрогравітації, що підтверджує важливість AMPK у регуляції цього процесу. Крім того, було проведено дослідження на клітинах C2C12, щоб перевірити індукцію аутофагії в м'язових клітинах. Результати підтвердили, що мікрогравітація призводить до утворення великих та характерних плям LC3 в цитоплазмі, що свідчить про індукцію аутофагії. Дослідники дійшли висновку, що змодельована мікрогравітація сприяє індукції аутофагії через регуляцію сигнальних шляхів AMPK-mTOR. Це відкриття має важливе значення для розуміння того, як мікрогравітація впливає на клітинні процеси, та як вона може сприяти розробці нових підходів до запобігання м'язовій атрофії під час тривалих космічних польотів шляхом модуляції аутофагії.

Узагальнюючи результати, що були отримані за допомогою мікроскопічного аналізу з використанням лінії GFP-ATG8a та барвника LTR, можна зробити висновок, що в умовах мікрогравітації найбільш активно індукція аутофагії відбувається через 6–9 діб. В той час, як через 12 діб вирощування виявлено зменшення кількості аутофагосом, що свідчить про важливу роль процесів аутофагії під впливом мікрогравітаційного стресу. Можна припустити, що таке зниження розвитку аутофагії (подібно до контролю) після тривалого періоду культивування в умовах мікрогравітації може бути пов'язане з адаптацією рослини до відсутності сталого вектора гравітації.

Матеріали цього розділу викладено в наступних публікаціях:

1. Шадріна РЮ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на умови мікрогравітації. Фактори

експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2019 Серпень 30;25:327–32. doi:10.7124/FEEO.v25.1186.

2. Yemets A, Shadrina R, Blume R, Plokhovska S, Blume Y. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. *npj Microgravity*. 2024 Mar 18;10(1):1–16. doi: 10.1038/s41526-024-00381-9.

3. Шадріна РЮ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Дослідження морфологічних ознак аутофагії в коренях *Arabidopsis thaliana* в умовах зміненої гравітації. В: Сибірний АА, редактор. Тези доп. 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології; 2019 черв. 18–21; Яремче, Україна. 2019. С. 155.

4. Shadrina R, Yemets A, Blume Y. Autophagy development in *Arabidopsis thaliana* under microgravity. Plant Biology (PB19) & Plant Synthetic Biology Major Symposium organized by ASPB (American Society of Plant Biologists); 2019 Aug; San Jose, CA, USA. 2019. P. 297.

5. Шадріна РЮ, Плоховська СГ, Горюнова ІІ, Кравець ОА, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Розвиток стрес-індукованої аутофагії у відповіді рослин на умови мікрогравітації та радіаційне опромінення. В: Ульянченко ОВ, редактор. Тези доп. Міжнародна науково-практична конференція «Стрес і адаптація рослин»; 2021 лют. 25–26; Харків, Україна. Вісник ХНАУ: Серія Біологія. 2021. С. 71.

РОЗДІЛ 6

РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ У ВІДПОВІДІ *A. thaliana* НА ДІЮ МІКРОГРАВІТАЦІЇ ТА РОЛЬ АУТОФАГІЇ В ОПОСЕРЕДКУВАННІ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ

6.1. Вплив екзогенного донора та скавенджера NO на ріст і розвиток проростків *A.thaliana*

Оксид азоту (NO) – сигнальна молекула, залучена до регуляції різноманітних процесів у рослин: від проростання насіння, їх росту та розвитку до цвітіння та дозрівання плодів [177]. Крім того, NO як сигнальна молекула відіграє ключову роль у відповіді рослин на дію біотичних та абіотичних стресових чинників. Зокрема, NO підвищує стійкість рослин до таких стресів, як посуха, засолення, УФ-В випромінювання, вплив важких металів, високих та низьких температур [151, 178–180]. Продемонстровано, що при ураженні рослин патогенами відбувається вивільнення молекул NO, що вказує про їх залучення у регуляцію стійкості до хвороб [181].

Виявлено, що етилен, кальцій, ROS та NO являються найпершими сигнальними компонентами у відповідній реакції на зміну сили тяжіння [182]. Раніше повідомлялося про роль NO та ROS як месенджерів у гравітропічній відповіді шляхом впливу на перерозподіл ауксину в рослині [183]. Для підтвердження цієї гіпотези коріння проростків кукурудзи піддавали впливу параболічної та опосередкованої мікрогравітації. В результаті було виявлено залучення ауксину, ROS та NO до формування гравітропної відповіді. NO може брати участь у механізмах регуляції апоптозу клітин, в тому числі при дії мікрогравітації. Наприклад, у листках каланхое, що зазнали впливу імітованої мікрогравітації (1 об/хв), виявили збільшення кількості апоптичних клітин, що безпосередньо корелювало з рівнем NO [184]. Результати

досліджень ролі NO у локалізації білка PIN2 та транспорті ауксину при гравітропічній реакції вказують на залучення NO як важливого компоненту відповіді рослин на гравітацію [185]. Слід зазначити, що роль NO в механізмах адаптації до мікрогравітації, включаючи аутофагію, практично не вивчена. В нашій роботі проведено дослідження ролі NO в регуляції росту рослин та розвитку аутофагії за умов дії симульованої мікрогравітації за допомогою донорів та скавенджерів NO.

В результаті проведених досліджень [186] було виявлено, що попередня обробка насіння *A. thaliana* розчином SNP (донор NO) в концентраціях 100–500 мкМ (протягом 24 год) стимулювала як проростання насіння, так і ріст проростків та підвищувала стійкість рослин до мікрогравітації. Обробка SNP по-різному впливала на ріст кореня проростків в контрольних умовах та за умов змін гравітації. В контрольних зразках SNP в концентрації 100 та 500 мкМ стимулював приріст коренів на 6-ту та, особливо, 8 добу вирощування (рис. 6.1. а.). У контролі приріст кореня збільшувався в межах 18 %, досягаючи максимуму на 6-ту добу росту, особливо при використанні SNP в концентрації 500 мкМ (на 64 % відносно контролю без обробки). За умов кліноостатування також було виявлено позитивний вплив донора NO, найбільший стимулюючий ефект спостерігали на 8 добу при концентрації 100 мкМ SNP (на 35 % відносно кліноостатованих рослин без обробки SNP).

В результаті попередньої обробки насіння сРТІО (скавенджер NO) у концентраціях 100–1000 мкМ встановлено, що сРТІО пригнічує ріст головних коренів проростків *A. thaliana*. Після обробки сРТІО у концентраціях 100–500 мкМ відбувалося незначне сповільнення росту коренів і більш виражене – після обробки сРТІО у концентрації 1000 мкМ (рис. 6.1. б). Оскільки ріст коренів після обробки сРТІО все ж таки продовжувався, це, вірогідно, пояснюється тим, що підтримання певного внутрішньоклітинного рівня ендогенного NO може забезпечуватись постійною активністю нітратредуктазної та/або L-аргінін-залежної системи його синтезу.

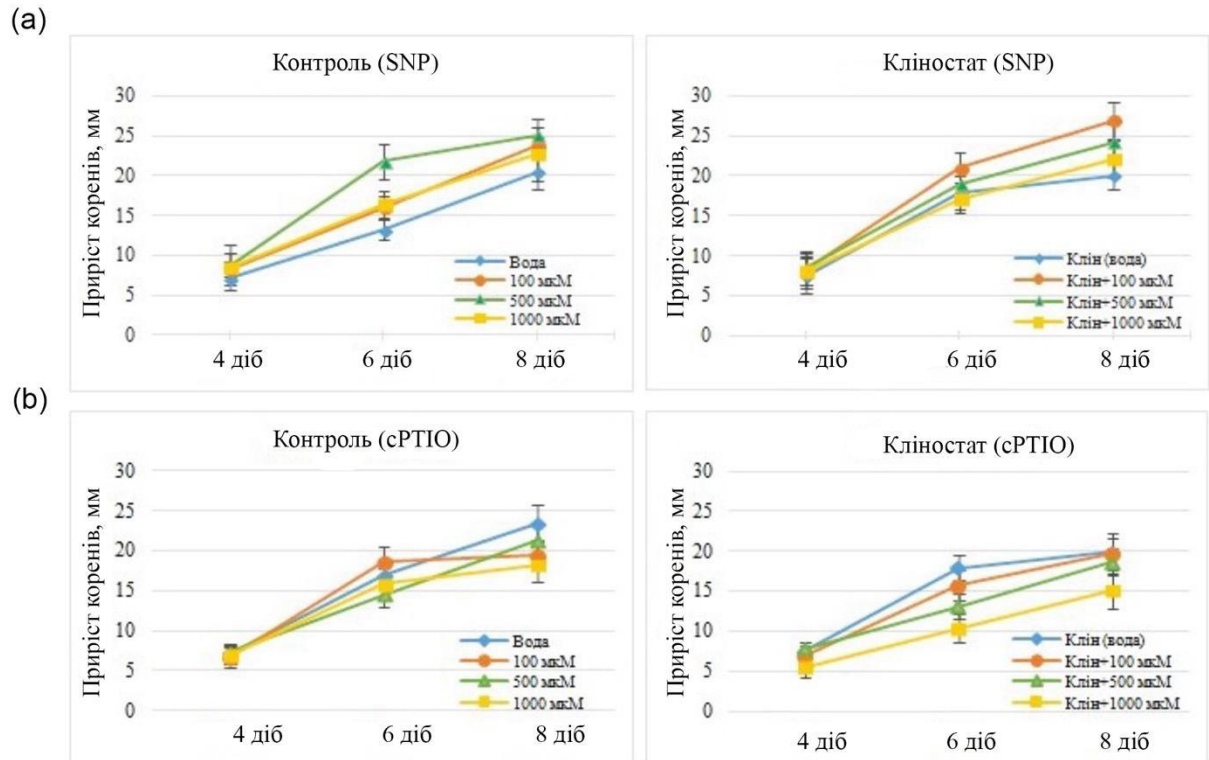


Рис. 6.1. Приріст головних коренів *A. thaliana* за умов кліностагування та обробки (a) SNP, (b) cPTIO

В загальних рисах морфологічні показники проростків *A. thaliana* при кліностагуванні мало відрізнялися від контролю. Зокрема, кліностаговані проростки відрізнялися від контрольних дезорієнтацією росту, що було пов'язано з постійною зміною їхнього положення відносно вектора гравітації. Слід зазначити, що зона диференціації з несформованими кореневими волосками була довшою порівняно з контролем (рис. 6.2. а, б). Крім впливу на ріст головних коренів проростків *A. thaliana*, обробка екзогенним донором SNP спричиняла ряд змін їх морфології, що проявлялось в ініціації формування нових корневих волосків. Так, після обробки насіння 1000 мкМ SNP спостерігали інтенсивне утворення нових корневих волосків у зоні диференціації. Подібна картина спостерігалась і у кліностагованих рослин, які зазнавали обробки донором NO (рис. 6.2. с, d).

У контрольних рослин обробка скавенджером 1000 мкМ сРТІО призводила до утворення зачатків численних корневих волосків, які припиняли ріст, що було також характерно і для кліноостатованих проростків (рис. 6.2. е, ф). Таким чином, обробка сРТІО призводить до усунення біологічної активності ендogenous NO, що підтверджує його зв'язування зі скавенджером.

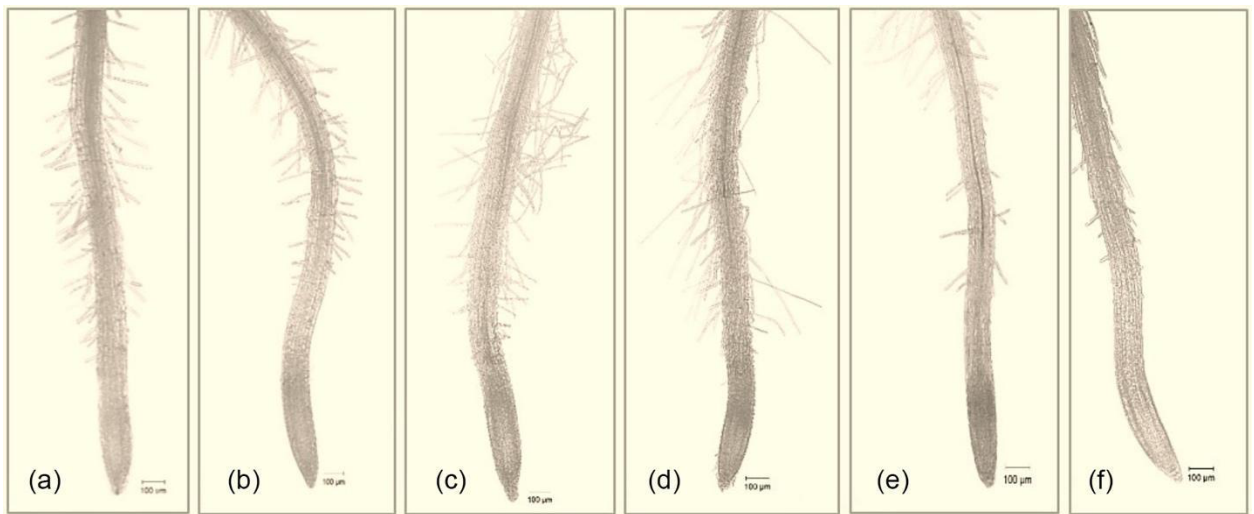


Рис. 6.2. Морфологія коренів проростків *A. thaliana* за умов кліноостатовування та обробки SNP/сРТІО (1000 мкМ); (а) – H₂O; (б) – кліноостат; (с) – SNP; (д) – кліноостат/SNP; (е) – сРТІО; (ф) – кліноостат/сРТІО. Масштаб: 10х

Отримані нами результати узгоджуються з результатами ряду авторів, які підтверджують важливу роль NO у процесах коренеутворення. NO також бере участь у регуляції спокою та проростання насіння [187, 188]. Щодо механізмів дії, то NO може взаємодіяти з іншими гормонами, і від їх взаємобалансу залежить ефект його дії. NO може впливати на метаболізм абсцизової кислоти або на її баланс з гібереловою кислотою, що регулює спокій та активацію проростання насіння. NO також взаємодіє з ауксином в регуляції розвитку коренів, що призводить до формування корневих волосків,

збільшуючи кількість їх зачатків, а також до подовження головного кореня за рахунок збільшення активності кореневої меристеми [189]. Зокрема, коли корінь зазнає гравістимуляції, ауксин переважно транспортується в нижню частину зони розтягу, утворюючи градієнт концентрації в цій області (цим обумовлюється гальмування розтягнення клітин), що спонукає корінь згинатися вниз [190]. Асиметричний розподіл ауксину викликає серію наступних каскадних реакцій, таких як запуск асиметричного розподілу інших сигнальних молекул, зокрема NO [191].

Також нещодавні дослідження Minibayeva та ін. (2023) продемонстрували, що донори NO (SNP) і поліамін (спермін) викликають індукцію аутофагії в коренях пшениці, при цьому SNP виявився найефективнішим індуктором. NO і ROS відіграють важливі сигнальні ролі в цьому процесі, що підтверджується генерацією NO і накопиченням H₂O₂ під час обробки нітритом. Також було виявлено, що експресія генів *atg*, змінювалась після обробки донорами NO і сперміну. Ці результати перетинаються із нашими дослідженням, оскільки підтверджують важливість NO у процесах, пов'язаних з ростом і розвитком рослин [121].

6.2. Дослідження вмісту NO у відповідь на дію мікрогравітації

Механізм дії NO також пов'язаний з його взаємодією з ROS, що може покращувати окислювально-відновний гомеостаз і посилювати антиоксидантну здатність клітин [192], а також індукувати утворення токсичного аніону пероксинітриду (ONOO⁻) [193]. На тваринних клітинах показано, що мікрогравітація індукуює ангіогенез через такий сигнальний шлях: індукцибельна NO синтаза – оксид азоту – цГМФ [194]. Умови мікрогравітації можуть збільшувати як активність антиоксидантних ферментів, так і вміст глутатіону, що є важливим механізмом у системі захисту клітини проти

окисного стресу та відіграє важливу роль у адаптації тварин до мікрогравітації [195, 196].

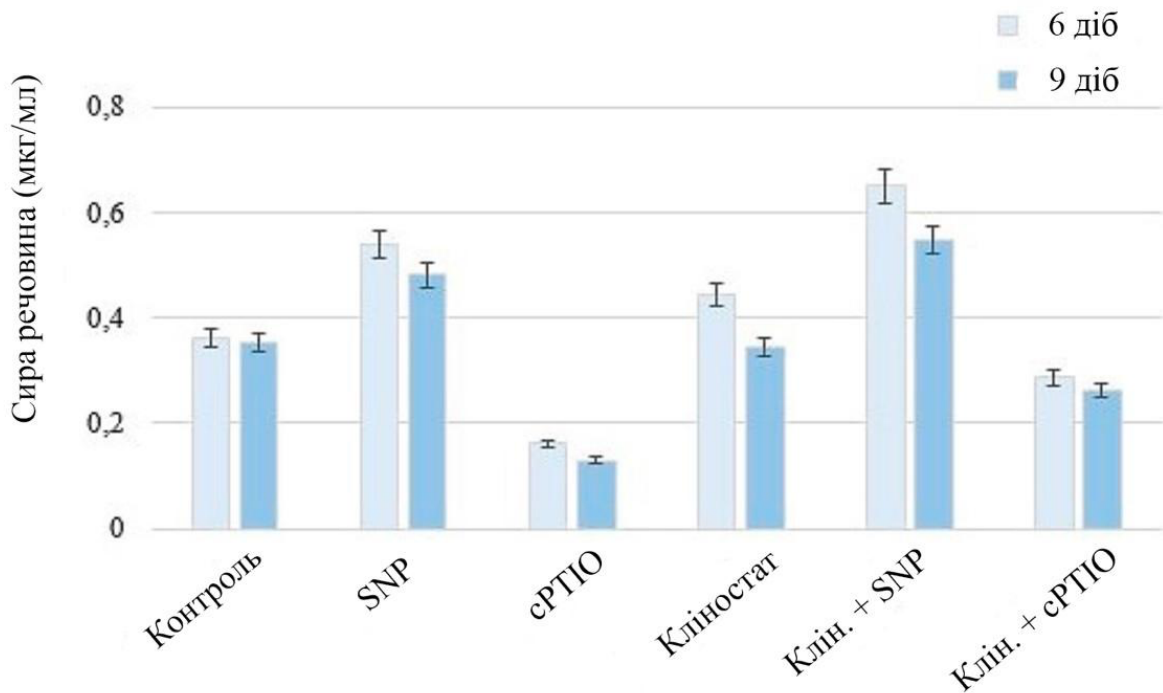


Рис. 6.3. Вміст ендогенного NO в проростках *A. thaliana* за умов кліностатування та обробки SNP або cPTIO

В нашій роботі було проведено дослідження по визначенню внутрішньоклітинної вмісту нітритів (NO_2) в кліностатованих рослинах за допомогою реакції Грісса. Концентрацію нітритів (µг/мл) визначали на 6 та 9-ту добу культивування проростків *A. thaliana*, попередньо оброблених SNP або cPTIO в концентрації 1000 мкМ. В результаті проведених досліджень було виявлено, що на 6 добу вирощування обробка SNP призводить до підвищення рівня ендогенного NO в 1,5 раза у контрольних рослин та в 1,8 раза – у кліностатованих (рис. 6.3.). На 9-ту добу культивування внутрішньоклітинний вміст NO поступово знижувався, що може свідчити про адаптацію рослин до впливу зміненої гравітації. Важливо зазначити, що обробка cPTIO призводила до зниження вмісту ендогенного NO, особливо за умов кліностатування. За

цих умов вміст NO, індукований кліноостатуванням, знижувався в 1,3–1,35 рази після обробки скавенджером NO (рис. 6.3.).

Окрім вимірювання внутрішньоклітинної концентрації NO, нами було використано флуоресцентний барвник DAF-FM DA для визначення тканинної локалізації NO в коренях кліноостатованих рослин [197]. Важливо зазначити, що DAF-FM DA використовується для виявлення та кількісного визначення низьких концентрацій оксиду азоту (NO). В результаті проведених досліджень було виявлено флуоресценцію барвника в епідермальних клітинах коренів на 6-ту добу вирощування (рис. 6.4.). Часовий проміжок 6 діб обирався відповідно до результатів попередніх досліджень, описаних вище, адже найбільший пік аутофагії припадав на 6 добу. Флуоресцентний аналіз показав, що обробка рослин донором NO (SNP) призводить до значного підвищення рівня флуоресценції, що свідчить про збільшення концентрації NO у клітинах коренів як за нормальних умов, так і за умов кліноостатування (рис. 6.4. с, d). На рис. 6.4 ми можемо спостерігати появу зеленого сигналу після обробки донором NO (SNP) як в контролі, так і за умов кліноостатування. Умови мікрогравітації є стресовими для рослин, і підвищення рівня NO може бути частиною адаптивної відповіді рослин на цей стрес. Навпаки, використання інгібітора NO (сРТІО) значно знижувало інтенсивність флуоресценції (рис. 6.4. е, f), що свідчить про зв'язування ендogenous NO з сРТІО.

Таким чином, результати даного дослідження вказують на важливу роль оксиду азоту в регуляції фізіологічних процесів в коренях рослин в умовах мікрогравітації. Підвищення рівня NO при стресових умовах може слугувати захисним механізмом, спрямованим на покращення виживання та адаптації рослин. Подальші дослідження необхідні для глибшого розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі цього процесу, а також для розробки стратегій покращення стійкості рослин до стресових умов.

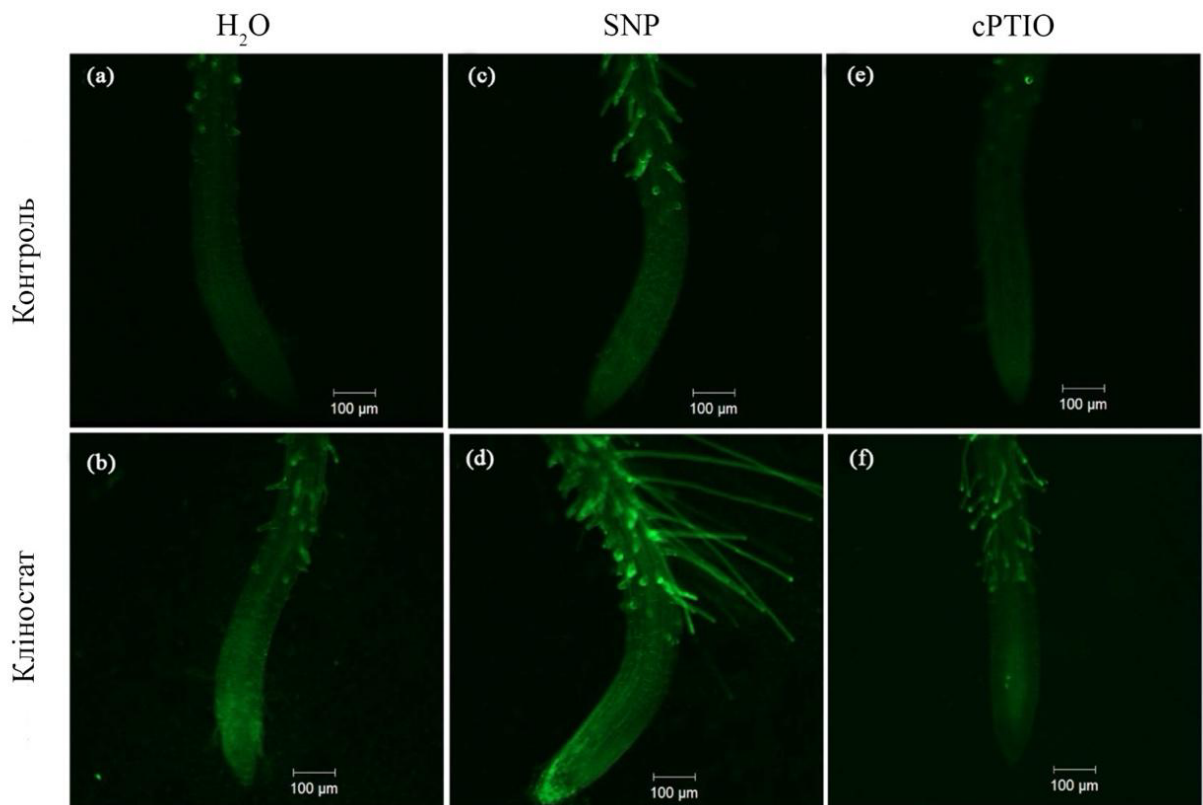


Рис. 6.4. Локалізація NO в клітинах кореня та кореневих волосках *A. thaliana* на 6-ту добу вирощування за нормальних умов і мікрогравітації, а також за обробки SNP чи cPTIO. Масштаб: 10x; (a) – H₂O, контроль; (b) – H₂O, кліностат; (c) – SNP, контроль; (d) – SNP, кліностат; (e) – cPTIO, контроль; (f) – cPTIO, кліностат. Масштаб: 10x

Також було проведено кількісну оцінку рівнів флуоресценції (ум. од). Рис. 6.5 демонструє рівень флуоресценції оксиду азоту (NO) в епідермальних клітинах апексу коренів та кореневих волосках *Arabidopsis thaliana* після обробки донором NO (SNP) та інгібітором NO (cPTIO) за умов кліностатування. На контрольних зразках, оброблених водою (H₂O), видно базальний рівень флуоресценції, який помітно підвищується за умов кліностатування, що вказує на вплив мікрогравітації на метаболізм NO у коренях рослин. Зразки, оброблені SNP, показують значне підвищення рівня флуоресценції як за нормальних умов, так і за умов кліностатування, що свідчить про збільшення внутрішньоклітинної концентрації NO. Навпаки,

зразки, оброблені сРТІО, демонструють майже повну відсутність флуоресценції як за нормальних умов, так і за умов кліноостатування, що підтверджує ефективне зниження рівня NO інгібітором. Загалом, отримані дані вказують на те, що мікрогравітація значно підвищує рівень NO у коренях рослин, а обробка SNP додатково підсилює цей ефект, тоді як інгібітор сРТІО ефективно знижує рівень NO в клітинах незалежно від умов вирощування.

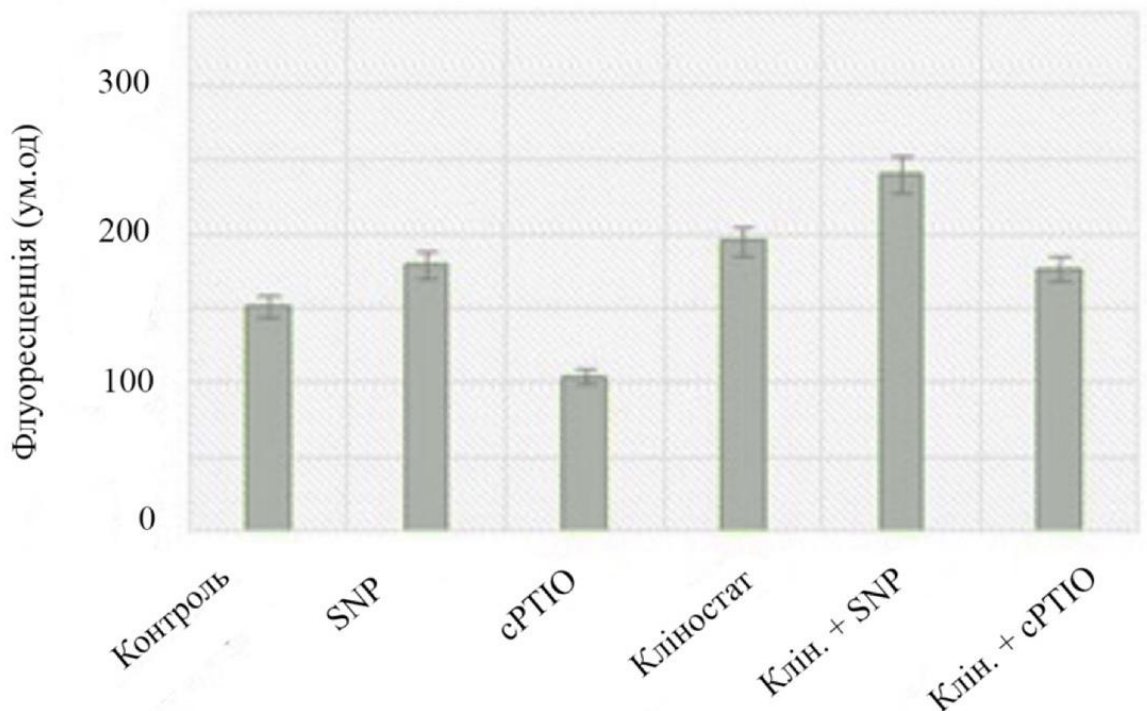


Рис. 6.5. Рівень флуоресценції NO в епідермальних клітинах апексу коренів та корневих волосках після обробки SNP/сРТІО за умов кліноостатування

Раніше на коренях сої було показано, що NO також бере участь у гравітропічному вигинанні кореня [198]. За допомогою барвника DAF-2DA було виявлено, що гравісимуляція викликає швидке асиметричне накопичення NO в коренях, що є необхідним у відповіді на стрес. Роль NO в регуляції мікрогравітації досліджували також на ціанобактеріях *Microcystis aeruginosa*, що дозволило авторам змоделювати наступну послідовність подій, які відбуваються після обробки SNP та сРТІО в такому порядку: мікрогравітація

– зміни генерації NO – підвищення концентрації NO – надпродукція продуктів NO та NO-похідних – нітрозативний стрес – негативні наслідки. Якщо SNP посилює надпродукцію NO в умовах мікрогравітації, то сРТІО, навпаки, перехоплює частину NO і опосередковано зменшує вплив токсичних продуктів, генерованих з NO [199]. Таким чином, використання ефективних донорів і скавенджерів NO може бути рекомендовано для забезпечення регулювання вмісту ендogenous NO, який залучається до відповіді клітин на вплив факторів зовнішнього середовища, зокрема мікрогравітації.

6.3. Роль аутофагії у відповідь на дію мікрогравітації за участі оксиду азоту

Аби дослідити вплив донорів та скавенджерів NO на індукцію процесів аутофагії за умов мікрогравітації, було використано флуоресцентний барвник LTR [197]. Візуалізацію аутофагосом проводили на 6 добу вирощування, оскільки за попередніми даними в цей період відбувається індукція процесу аутофагії. В результаті дослідження динамічних змін аутофагії було виявлено внутрішньоклітинне накопичення аутофагосом на 6-ту добу вирощування та поступове зменшення їх кількості при подальшому культивуванні за умов мікрогравітації. Для з'ясування ролі NO у розвитку аутофагії використовували обробку насіння як донором, так і скавенджером NO. Згідно отриманих даних, обробка SNP не призводила до суттєвих змін процесу аутофагії порівняно із кліноостатованими зразками без обробки SNP (рис. 6.6. с). Це свідчить про можливу інгібуючу роль молекул оксиду азоту на процеси аутофагії за умов мікрогравітації. Нещодавно опубліковані дані показують протилежні результати, а саме обробка пшениці донором NO індукувала процеси аутофагії за нормальних умов [121], але у нашому випадку рослини піддавались стресу мікрогравітації, і, можливо, комбінація стресу та внесення додаткових молекул NO не спричинили зростання аутофагосом. Раніше Sarkar та ін. (2011)

також було показано, що NO пригнічує синтез аутофагосом за допомогою ряду механізмів. NO порушує аутофагію шляхом інгібування активності субстратів S-нітрозилювання, JNK1 та ІКК β . Крім того, NO інгібує ІКК β і знижує фосфорилування AMPK, що призводить до активації mTORC1 через TSC2 [200].

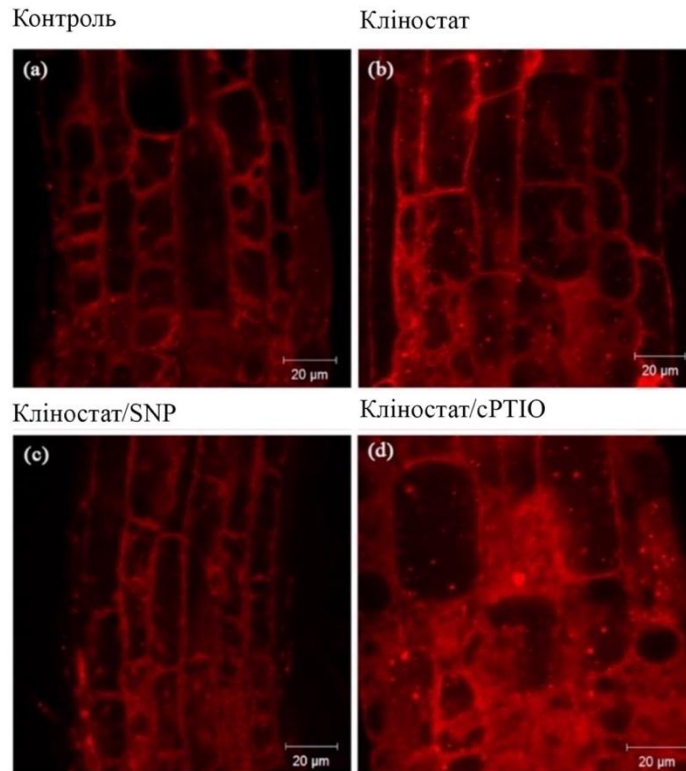


Рис. 6.6. Локалізація аутофагосом в клітинах кореня *A. thaliana* на 6-ту добу вирощування за умов клінонатування: (a) – контроль; (b) – клінонат; (c) – клінонат/SNP; (d) – клінонат/cPTIO. Масштаб: 20 мкм

Дослідження комбінованого впливу клінонатування та обробки насіння cPTIO показало незначне збільшення аутофагосом в порівнянні із клінонатованими зразками без обробки cPTIO (рис. 6.6. d). Можливо, cPTIO, будучи скаванджером NO, дійсно може спричиняти індукцію аутофагії через зниження рівня NO та порушення відповідних сигнальних шляхів, пов'язаних

з аутофагією. Дані результати вимагають подальших більш глибоких майбутніх досліджень.

Існує небагато досліджень про взаємозв'язок між мікрогравітацією та NO, проведених на тваринах. Показано, що мікрогравітація може впливати на синтез NOS та вироблення NO у ссавців [201]. Так, остеобласти, культивовані за умов моделюваної мікрогравітації, демонструють вищу активність NOS і підвищену продукцію NO. Вплив мікрогравітації призводить до підвищення вмісту NO, а також іNOS та мРНК у серцевих міоцитах щурів. Частково, як вважають, через активацію протеїнкінази C [199]. Умови мікрогравітації можуть впливати на розвиток ембріонів мишей шляхом регуляції експресії NO. Так, у культуральному середовищі за умов мікрогравітації виявлено вищий вміст NO та активність NOS, що потенційно призводить до затримки ембріонального розвитку миші та апоптозу клітин [202].

Історія досліджень NO на рослинах значно обмежена, що, власне, і вказує на актуальність та потребу в таких роботах. Відомо, що NO регулює різноманітні клітинні сигнали через S-нітрозилювання специфічних залишків цистеїну білків [153]. Внутрішньоклітинний рівень S-нітрозоглутатіону (GSNO), основного біологічно активного виду NO, регулюється GSNO-редуктазою (GSNOR), яка є головним регулятором сигналіngu NO. Раніше було продемонстровано, що S-нітрозилювання викликає селективну аутофагію в клітинах *A. thaliana* у відповідь на кисневе голодування. S-нітрозилювання GSNOR1 по залишку Cys-10 індукує конформаційні зміни через залучення білків, які кодують білок ATG8. Після зв'язування з білком ATG8 GSNOR1 компарменталізується в аутофагосомах та деградує. Отже, вказаний механізм демонструє фізіологічну залежність селективної аутофагії та індуковане S-нітрозилюванням GSNOR1 у зв'язку з гіпоксією, тим самим встановлюючи молекулярний зв'язок між NO-сигналігом та аутофагією [153].

В умовах зміненої мікрогравітації рівень GSNOR знижений в порівнянні з наземним контролем, однак рівні транскрипту цього білка залишаються постійними, що свідчить про зниження деградації та обороту GSNO, яка є основною формою зберігання, найшвидшого джерела та буферу NO внаслідок присутності сигналу тяжіння [203]. Одночасно збільшується рівень транспортера вакуолярного нітрату (NO_3^-) хлоридного каналу А (CLC-A), який опосередковує швидке накопичення NO_3^- у вакуолях та вивільнення в цитозолі [204]. Ці зміни вказують на прискорення синтезу NO та зниження буферизації його активності за відсутності сили тяжіння. Дія NO на білки призводить до S-нітрозилювання, що може відбуватися через GSNO, NO або продукт реакції NO - супероксид та пероксинітрит (ONOO^-) [205]. Показано, що активність GSNOR необхідна для деяких реакцій S-нітрозилювання, тоді як інші посттрансляційні модифікації відбуваються незалежно від GSNOR.

Таким чином, можна зробити висновок, що регулювання вмісту ендogenous NO є важливою складовою внутрішньоклітинних механізмів сигналіngu, які залучаються до відповіді клітин рослин на симульовану мікрогравітацію. Отримані результати слугуватимуть підґрунтям для розробки підходів підвищення адаптації рослин під час їх культивування в умовах космічного польоту.

Матеріали цього розділу викладено в наступних публікаціях:

1. Plokhovska SH, Shadrina RYu, Kravets OA, Yemets AI, Blume YaB. The Role of Nitric Oxide in the *Arabidopsis thaliana* Response to Simulated Microgravity and the Involvement of Autophagy in This Process. *Cytol Genet.* 2022 Jun 1;56(3):244–52. doi: 10.3103/S0095452722030100.

2. Yemets AI, Plokhovska SH, Shadrina RYu, Kravets OA, Blume YaB. Elucidation of cellular mechanisms of autophagy involvement in plant adaptation to microgravity conditions. *Space Sci. & Technol.* 2023;29(2):22–31. <https://doi.org/10.15407/knit2023.02.022>

3. Plokhovska SH, Kravets OA, Shadrina RYu, Yemets AI, Blume YaB. Crosstalk between nitric oxide and melatonin signalling molecules in *Arabidopsis* under simulated microgravity. В: Наукове видання під загальною редакцією Соколова ВМ. Тези доп. Міжнародна наукова інтернет-конференція «Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи»; 2022 жовт. 26; Одеса, Україна. 2022. С. 144–145.

4. Blume YaB, Plokhovska SH, Shadrina RYu, Kravets OA, Yemets AI. The role of nitric oxide in *Arabidopsis thaliana* response to simulated microgravity and the participation of autophagy in the mediation of this process. In: Manolis KG, editor. Abstracts. 44th COSPAR Sci. Assembly; 2022 Jul 16–24; Athens, Greece. 2022. P. 2902.

РОЗДІЛ 7

УЧАСТЬ МІКРОТРУБОЧОК У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОЦЕСІВ АУТОФАГІЇ ЗА УМОВ МІКРОГРАВІТАЦІЇ

7.1. Дослідження впливу кліноостатування на організацію мікротрубочок у клітинах кореня *A. thaliana*

Порушення росту головних коренів можуть бути наслідком негативного впливу кліноостатування на поділ та елонгацію клітин, що може бути пов'язане з порушеннями в організації МТ. Експресія химерного гена *gfp-map4* у лінії *A. thaliana* (GFP-MAP4) дозволила нам вивчити тканиноспецифічну організацію МТ у живих клітинах коренів, які вирощували в умовах зміненої гравітації. Дослідження проводили з 6 по 12 добу культивування проростків на горизонтальному кліноостаті (4 об/хв), а контрольні – у нормальних умовах (без кліноостату).

В результаті проведених досліджень на 6-ту добу кліноостатування спостерігали зміну типової орієнтації та організації кортикальних МТ у різних типах клітин кореня. Встановлено, що МТ в епідермальних клітинах кореневого апексу контрольних рослин мають переважно поперечну орієнтацію (рис. 7.1. е). В інтерфазних клітинах меристеми візуалізуються ендоплазматичні МТ, що радіально відходять від ядра (рис. 7.1. ф). У клітинах меристеми, що ділиться, виявлено такі мітотичні фігури МТ, як мітотичне веретено, препрофазна стрічка та фрагмопласт. В епідермальних клітинах перехідної зони та зони розтягу кореня *A. thaliana* присутні впорядковані паралельні ряди кортикальних МТ (рис. 7.1. г), розташованих поперечно, а в клітинах зони диференціації вони набувають навскісної орієнтації (рис. 7.1. h).

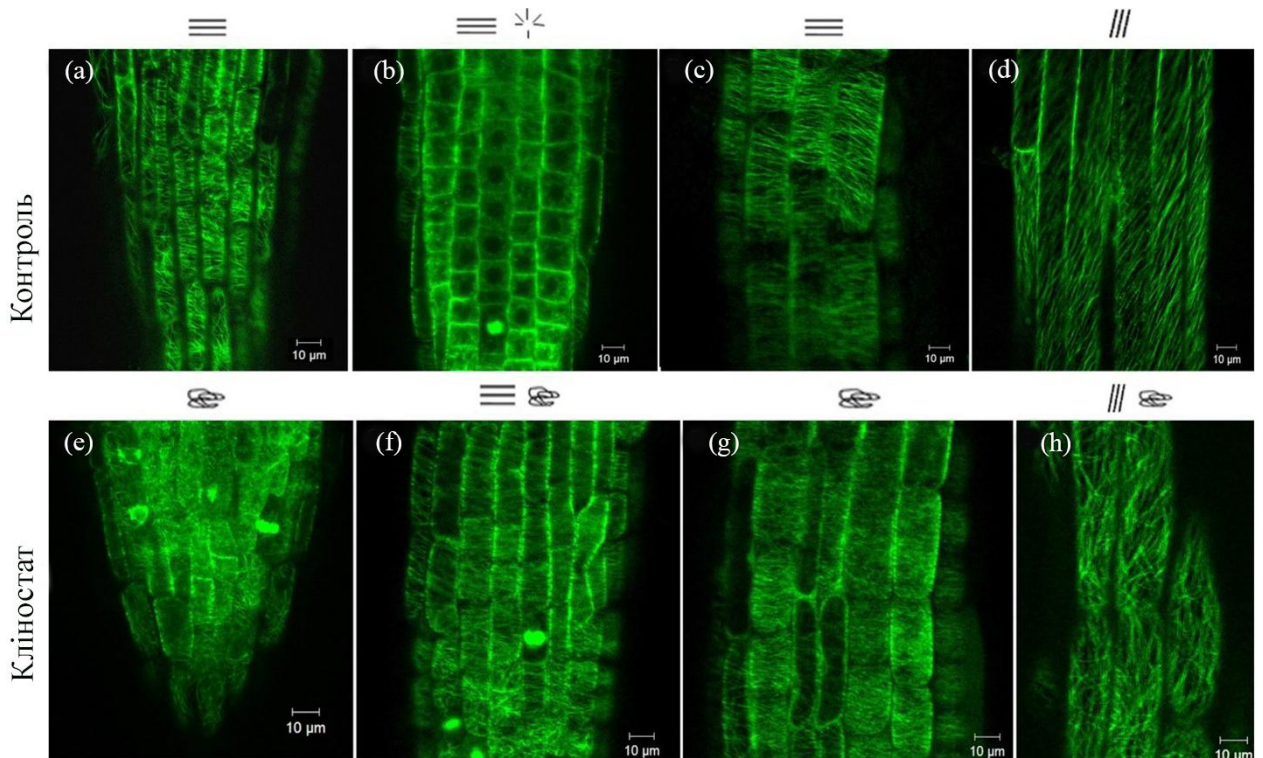


Рис. 7.1. Організація мікротрубочок в різних типах клітин кореня *A.thaliana* на 6-ту добу вирощування за умов кліностагування: (а, е) – епідермальні клітини кореневого чохла; (b, f) – зона меристеми; (с, g) – епідермальні клітини на рівні зони розтягу; (d, h) – зона диференціації. Масштаб: 10 мкм

Також було показано, що на 9 та 12-ту добу кліностагування рослин виявлено незначну дезорганізацію МТ у клітинах усіх досліджуваних зон кореня *A.thaliana*. Зміни в організації МТ не призвели до різких порушень росту та морфології коренів, як нами було зазначено вище. Таким чином, отримані дані показують, що змодельована мікрогравітація викликала порушення в нативній організації МТ через постійні зміни положення рослинних клітин і органів відносно вектора гравітації. Все це свідчить про те, що МТ самі по собі можуть виступати як гравітаційні рецептори клітин, а їх структурна реорганізація є одним із елементів гравітаційної чутливості клітин кореня.

Відомо, що цитоскелет рослинної клітини бере участь у відповіді клітинної стінки на дію різноманітних абіотичних факторів. Зокрема, це стосується змін нативної організації МТ та МФ за дії мікрогравітації [92, 206, 207]. Наші спостереження також підтверджують гіпотезу, що МТ відіграють важливу роль у тропізмі. Ці висновки знаходять підтримку в дослідженнях Шевченко та Кордюм (2015) про організацію цитоскелету за умов кліноостатування. Так, експерименти в умовах симульованої мікрогравітації виявили підвищену частоту хаотично розташованих кортикальних мікротрубочок в дистальній зоні розтягу *A.thaliana* та гіпокотиліях *B. napus* [208]. За даними літератури, також відомо, що сайт сприйняття гравітації знаходиться в межах дистальної зони розтягу кореня і, як припускають, на нього припадає близько 2 % всієї здатності кореня сприймати гравітацію [209, 210].

Наші дослідження впливу кліноостатування на організацію мікротрубочок (МТ) у клітинах кореня *A. thaliana* узгоджуються з опублікованими даними про роль цитоскелету в адаптації рослин до абіотичних факторів, таких як змінена гравітація. Зокрема, було встановлено, що при гравістимуляції проростків *Zea mays* кортикальні МТ в клітинах на внутрішній стороні вигину коренів змінюють орієнтацію із поперечної на поздовжню. Реорієнтація кортикальних МТ спостерігалася також в колеоптилях кукурудзи та гіпокотиліях соняшника за умов змодельованої мікрогравітації [211, 212], досліди *in vitro* показують гравізалежність процесу полімеризації МТ. Це дає підставу припускати, що МТ самі здатні виконувати функцію гравірецептора клітин, а структурні перебудови тубулінового цитоскелету є одним з елементів чутливості до зміненої мікрогравітації.

7.2. Рівні експресії генів *atg8* при індукції аутофагії мікрогравітацією

Раніше було встановлено, що УФ-опромінення, голодування, осмотичний та сольовий стреси характерним чином впливають на рівні експресії генів *atg8* у *A. thaliana* [12]. Нашими колегами було охарактеризовано закономірності експресії генів α -тубуліну, білка ATG8 і генів ензимів, залучених до ацетилювання α -тубуліну, а також генів кінезинів (моторних білків), які можуть бути причетними до опосередкування процесів аутофагії за участю МТ [12, 168]. Також було проведено попередні дослідження щодо впливу кліноостатування на можливий розвиток аутофагії в коренях *A. thaliana*. Отримані результати свідчать про наявність морфологічних ознак індукції цього процесу в період з 6 по 12-ту добу кліноостатування. Однак вплив такого фактору, як мікрогравітація, на розвиток аутофагії та значення цього процесу для адаптації рослин за умов невагомості залишається мало дослідженим.

Відомо, що білок ATG8 відіграє важливу роль в процесах реалізації аутофагії. Локалізуючись як із зовнішньої, так і внутрішньої мембрани аутофагосоми, він відповідає за від'єднання та експансію преаутофагосомної структури [213]. У *A. thaliana* родина генів *atg8* представлена 9-ма генами, які віднесені до трьох субродин. Наявність багатьох генів *atg8* свідчить про те, що їх білкові продукти можуть бути задіяні на різних етапах формування аутофагосом [214]. Ба більше, тканинно-специфічна експресія цих генів вказує на можливість диференційованої ролі різних ізоформ ATG8 у відповідь на специфічні сигнали та стреси в окремих типах клітин. Це припущення підтримується дослідженнями Thompson та ін. (2005), що показують, як різні ізоформи ATG8 залучаються до процесів аутофагії у різних тканинах рослин за нормальних умов [150].

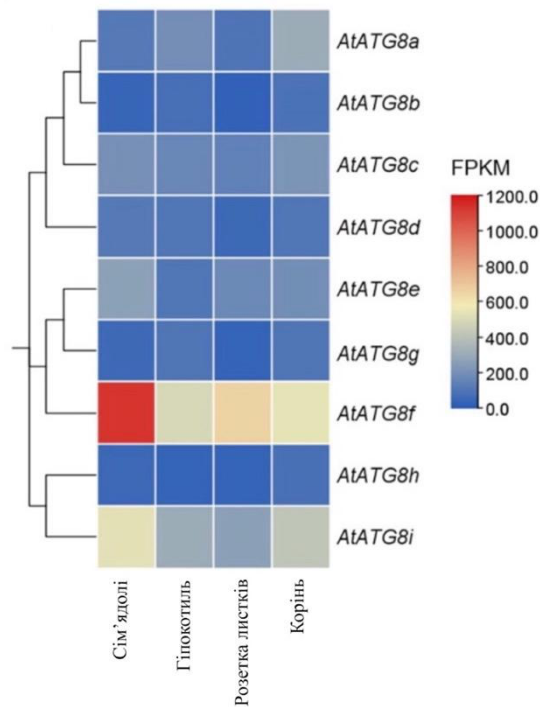


Рис. 7.2. Теплова карта, що демонструє різні рівні експресії ізотипів генів *AtATG* в *A. thaliana* за нормальних умов

Для дослідження відмінностей у рівні експресії генів *AtATG8* в різних частинах рослини *Arabidopsis thaliana* за нормальних умов було використано теплові карти, отримані з бази даних ePlant (рис. 7.2.). До уваги брався параметр FPKM (фрагменти на кілобазу транскрипту на мільйон прочитань), який враховує довжину транскрипту і загальну кількість прочитаних фрагментів у зразку, що дозволяє порівнювати рівні експресії генів між різними зразками. Що яскравіший колір на тепловій карті, то вищий рівень експресії. Аналіз теплової карти показує, що гени сімейства *AtATG8* мають різну ступінь залученості у функціонуванні різних частин рослини *A. thaliana*. Було встановлено, що *AtATG8f* експресується в усіх частинах рослини (чи проростків) *A. thaliana*, а саме: *AtATG8f* продемонстрував високий рівень експресії у сім'ядолях (червоний колір) та середній рівень експресії у гіпокотилі та розетці листків (жовтий та світло-синій кольори). В корені рівень експресії був також високий (темно-синій колір). Високий рівень експресії *AtATG8f* у сім'ядолях вказує, що цей ген може бути критичним для ранніх

етапів розвитку рослини. Також ізотип *AtATG8i* показав у сім'ядолях та корені дещо підвищену експресію. Підвищений рівень експресії *AtATG8i* у сім'ядолях та корені може вказувати на спеціалізовану функцію цього гена в цих тканинах – можливо, пов'язану з регуляцією аутофагії в умовах стресу або розвитку. Сірий колір на тепловій карті, що відповідає 400 FPKM для гена *AtATG8a* в корені, свідчить про невисокий рівень експресії. 4 з 9 ізотипів *AtATG* (*AtATG8b*, *AtATG8d*, *AtATG8g*, *AtATG8h*) показали низький рівень експресії у корені, що відповідав синьому кольору на тепловій карті. Це може свідчити про те, що дані гени не залучені у реалізації розвитку аутофагії в клітинах кореня під час проростання. Низький рівень експресії може вказувати на те, що ці ізотипи не є ключовими для адаптації кореня до нормальних умов або специфічних стресових факторів, з якими стикається рослина на ранніх етапах розвитку.

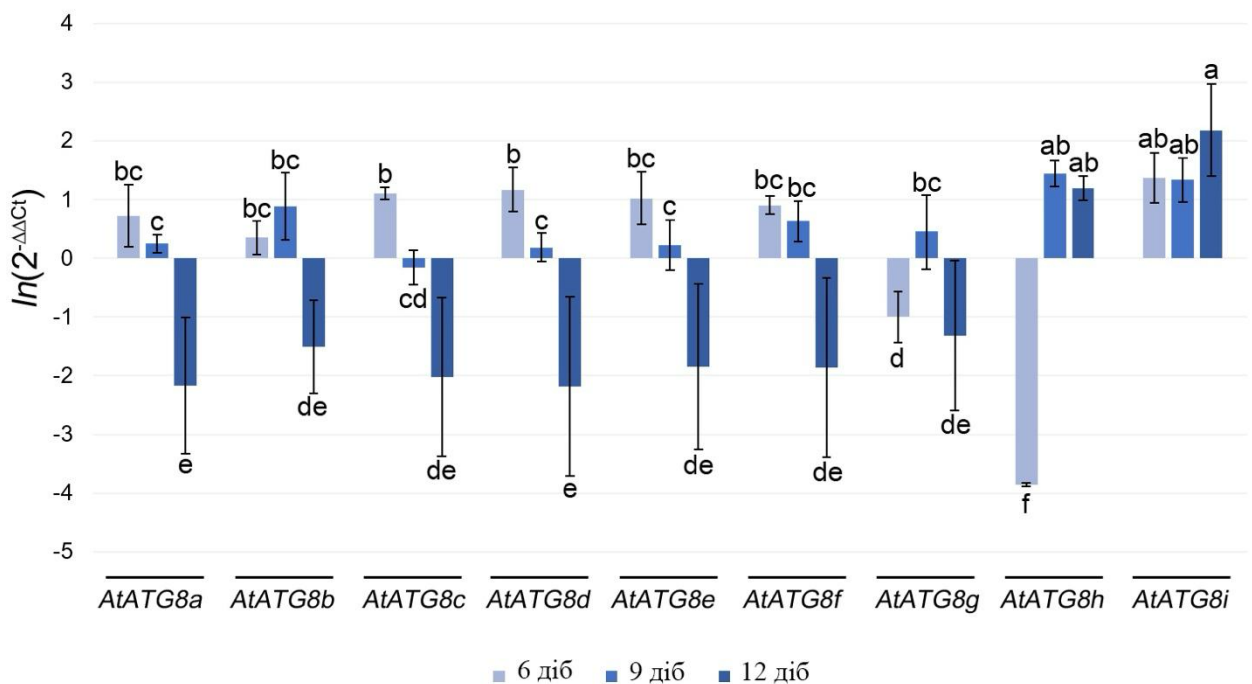


Рис. 7.3. Відносна експресія ізотипів *AtATG8* у проростків *A. thaliana* на 6, 9 та 12-ту добу вирощування за умов кліностагування. Літерами (a, b... і т. д.) позначають достовірно відмінні набори даних (при $p < 0,05$, Fischer LSD), бари похибок – SEM

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу рівнів експресії 9-ти генів родини *atg8* було виявлено, що рівні їх експресії відрізнялися в залежності від тривалості кліноостатування (рис. 7.3.) [173]. Для більшості цих генів (шість з дев'яти) загальна картина була наступною: помірне збільшення експресії на 6-й день росту порівняно з контролем; незначне збільшення експресії (іноді несуттєве) на 9-й день, за яким слідувало значне 3,7–8,8-кратне зменшення експресії на 12-й день (в діапазоні $\ln(2-\Delta\Delta CT) = -1,5-2,18$, як показано на рис. 7.3. Для забезпечення достовірної нормалізації в аналізі було використано ген домашнього господарства *AtEFA*. Зокрема, через 6 діб росту рослин в умовах змодельованої мікрогравітації *AtATG8a*, *AtATG8b*, *AtATG8c*, *AtATG8d*, *AtATG8e*, *AtATG8f*, *AtATG8i* достовірно підвищували свою експресію в 1,42–3,93 раза порівняно з контролем (рис. 7.3.). Найбільше зростання експресії на 6-ту добу зафіксовано для *AtATG8i* ($\ln = 1,37$) та паралогів *AtATG8c* і *AtATG8d* – в 3,03–3,21 раза відповідно ($\ln = 1,11-1,17$). У той же час *AtATG8g* і *AtATG8h* продемонстрували зниження експресії в 2,72 і 47,46 раза відповідно. Варто зазначити, що ці два гени були єдиними генами АТG8, які знижували рівень експресії на 6-й день росту за умов кліноостатування, тоді як *AtATG8h* показав максимальне зниження ($\ln = -3,93$), яке не було зафіксоване для жодного з представників *AtATG8*.

На 9-ту добу культивування експресія генів *AtATG8c*, *AtATG8d*, *AtATG8e*, *AtATG8g* рослин, що були в умовах мікрогравітації, достовірно не відрізнялася від контрольних. *AtATG8a* показав невелике, але достовірне збільшення експресії в 1,28 раза порівняно з контролем. *AtATG8b*, *AtATG8h* та *AtATG8i* показали подібне зростання у 2,43, 4,22 та 3,81 раза відповідно ($\ln = 0,89-1,44$, рис. 7.3.). Пізніше, на 12-ту добу, експресія більшості генів АТG8 достовірно знижувалася в 3,72–8,76 раза. Індивідуальні відмінності між генами *AtATG8a-g* із зниженою експресією на 12-ту добу експерименту були недостовірними. Цікаво, що паралоги *AtATG8h* та *AtATG8i* мали підвищену експресію на 12-ту добу кліноостатування ($\ln = 1,19-2,18$). Зростання експресії

AtATG8i було найвищим серед усіх *AtATG8* на будь-якій стадії і збільшувалося у 8,85 разів порівняно з контролем.

Порівнюючи рівні експресії теплової карти та рівнів експресії генів (рис. 7.2., рис. 7.3.) *AtATG8* в умовах кліноостатування, важливо розуміти, що теплова карта показує базову експресію генів *AtATG8* в різних частинах рослини за нормальних умов. Для більшості генів *AtATG8* (*AtATG8a*, *AtATG8b*, *AtATG8c*, *AtATG8d*, *AtATG8e*) спостерігається незначне підвищення рівнів експресії після 6 та 9 діб кліноостатування та загальне зниження рівнів експресії після 12 діб, що може свідчити про негативний вплив стресу на ці гени або їх регуляцію. Експресія *AtATG8f* може бути важливим для кореневої системи, оскільки на тепловій карті ми спостерігали досить високий її рівень, що відповідав 600 FPKM. Молекулярно-генетичним аналізом підтверджено, що рівень *AtATG8f* зростає на 6 добу в умовах мікрогравітації. Це може свідчити про кілька важливих аспектів. По-перше, високий рівень експресії *AtATG8f* у кореневій системі вказує на його можливу критичну роль у забезпеченні клітинного гомеостазу та адаптації до змін у навколишньому середовищі. Крім того, підвищення рівня експресії *AtATG8f* може бути пов'язане з необхідністю адаптації кореневої системи до нових умов мікрогравітації, забезпечуючи оптимальний ріст і розвиток рослини. В той самий час *AtATG8i* показує стабільну та підвищену експресію в умовах мікрогравітації, і за даними теплової карти ми також спостерігали підвищення рівнів експресії в корені, що відповідало 400 FPKM, і це може вказувати на його залученість до адаптації умов мікрогравітації. Постійно високий рівень експресії *AtATG8i* може свідчити про його важливість у забезпеченні стабільної роботи клітин кореня під час стресу, що спричинений відсутністю постійного вектора сили тяжіння. *AtATG8g* на тепловій карті демонстрував низькі рівні експресії як в пагоні, так і в корені *A. thaliana*, і за умов мікрогравітації ми також спостерігали низькі рівні експресії на усіх часових, що, можливо, свідчить про його незначну роль у відповідях на стресові умови.

Нещодавно було опубліковано більше доказів про роль білка ATG8 у формуванні аутофагосом [11, 215]. Також були проведені дослідження експресії гена *ATG8* у *A. thaliana* за різних абіотичних стресів [216]. Нашими колегами раніше було досліджено зміни в експресії гена *AtATG8* в *A. thaliana* в умовах голодування, засолення та осмотичного стресу [20]. При порівнянні наших даних з результатами рівнів експресії генів *AtATG8* за умов голодування, сольового та осмотичного стресів та УФ-Б опромінення було встановлено підвищення рівнів експресії (у 1,5–2 рази) генів *AtATG8e*, *AtATG8f* за умов впливу усіх досліджуваних стресових чинників. При цьому для гена *AtATG8i* вищі рівні експресії порівняно з контролем були відмічені тільки за умов голодування. Цікаво, що один ізотип *AtATG8a* був знижений під час цих стресів, але індукований в умовах мікрогравітації – можливо, саме він бере участь у процесах аутофагії за умов кліностатування. При фіксованому вуглецевому голодуванні спостерігається надмірна експресія генів *AtATG8a*, *AtATG8b*, *AtATG8h*, *AtATG8i*, і також подібна картина експресії генів була отримана в умовах мікрогравітації.

Раніше [217] було показано, що гени *AtATG8f* та *AtATG8h* мають вирішальне значення для підтримання процесів аутофагії за умов фосфатного голодування, тоді як втрата цих генів призводить до підвищеного ліпидування ATG8. Цікавим є той факт, що *AtATG8f* та *AtATG8h* показали подібні патерни експресії в коренях за фосфатного голодування.

Таким чином, мікрогравітація може індукувати аутофагію, що важливо для рослин, які намагаються адаптуватися до екстремальних умов. Оскільки ATG8 є структурною частиною аутофагосоми, яка безпосередньо бере участь у викликаній стресом аутофагії, то можна припустити, що гени *AtATG8* беруть безпосередню участь у розвитку аутофагії за умов мікрогравітації.

7.3. Рівні експресії генів α - та β -тубуліну при індукції аутофагії мікрогравітацією

Як зазначалось вище, важливу роль у регуляції розвитку аутофагії відіграє цитоскелет. МТ через зміни динамічного стану та посттрансляційну модифікацію тубуліну (ацетилювання), залучені до процесів дозрівання, активного транспорту зрілих аутофагосом для злиття з літичними органелами, опосередкування клітинних сигналів, що регулюють аутофагію [20]. З використанням лінії *A. thaliana* (ATG8h-GFP), вестерн-блот-аналізу ліпідації ATG8 та визначення синхронного вивільнення GFP було показано, що такі стресові навантаження, як метаболічний, сольовий, осмотичний стрес та УФ-Б опромінення, призводили до розвитку/активації аутофагії, особливо в тканинах кореня [12]. Хоча зв'язок між МТ та аутофагією все ще досліджується, уже було показано, що мікрогравітація може впливати на архітектуру цитоскелета та сприяти функціональному клітинному ремоделюванню [218, 219]. Останні дослідження показують, що цитоскелет може бути першим датчиком мікрогравітації [220]. Оскільки МТ є важливими регуляторами позиціонування та руху органел, вони також можуть брати участь у функціонуванні аутофагосом у клітинах. Наразі недостатньо відомо, як МТ взаємодіють з аутофагосомами: через ATG8, моторні білки чи будь-які інші білки, асоційовані з МТ.

Утворення аутофагосом є складним процесом, який вимагає координації експресії ряду генів, зокрема генів α - та β -тубуліну [6, 12]. Перед проведенням експериментальної частини також було проаналізовано теплові карти, що демонстрували рівень експресії генів α - та β -тубуліну в *A. thaliana* за нормальних умов (рис. 7.4.).

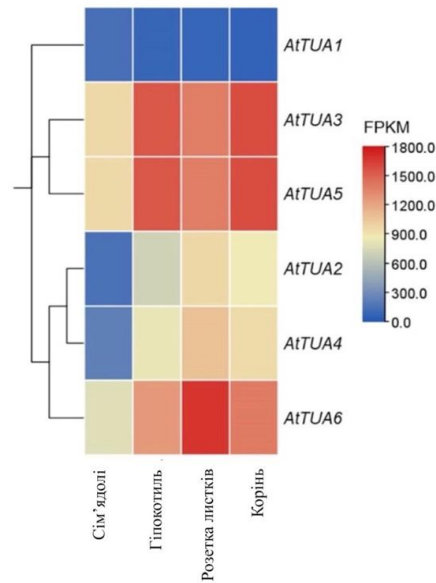


Рис. 7.4. Теплова карта, що демонструє різні рівні експресії ізотипів генів *AtTUA* в *A. thaliana* за нормальних умов

Аналіз теплової карти експресії генів *AtTUA* в різних частинах рослини *A. thaliana* за нормальних показав різну активність цих генів, що вказує на їх тканино-специфічну експресію. Важливо зазначити, що 5 із 6 генів *AtTUA* за нормальних умов показали підвищення рівнів експресії у корені та гіпокотилі, що відповідало діапазону значень 900–1500 FPKM. Ми побачили, що гени *AtTUA3* і *AtTUA5* демонстрували високий рівень експресії, що відповідало 1500 FPKM, що свідчить про їх важливу роль у рості та розвитку пагона (зокрема розвитку гіпокотіля) та кореня.

Корінь є гравічутливим органом рослини, який реагує на зміни в навколишньому середовищі. Висока експресія *AtTUA3* і *AtTUA5* може вказувати на їхню участь у забезпеченні структурної цілісності та функціональності кореневої системи, що є критично важливим для стабільного зростання і адаптації рослини до стресових умов. Ці гени можуть відігравати ключову роль у регуляції мікротрубочок, які забезпечують внутрішньоклітинний транспорт і підтримують структурну цілісність клітин кореня, що дозволяє рослині ефективно реагувати на зміни у навколишньому

середовищі та підтримувати оптимальний ріст і розвиток. Також ген *AtTUA6* демонстрував високий рівень експресії в корені та листках, що відповідало 1300 FRKM. У той же час ген *AtTUA1* показав низький рівень експресії у всіх частинах рослини, що може вказувати на його менш активну роль або специфічні функції у певних умовах. Загальний паттерн експресії генів *AtTUA* свідчить про їх важливість для різних клітинних процесів у різних тканинах рослини.

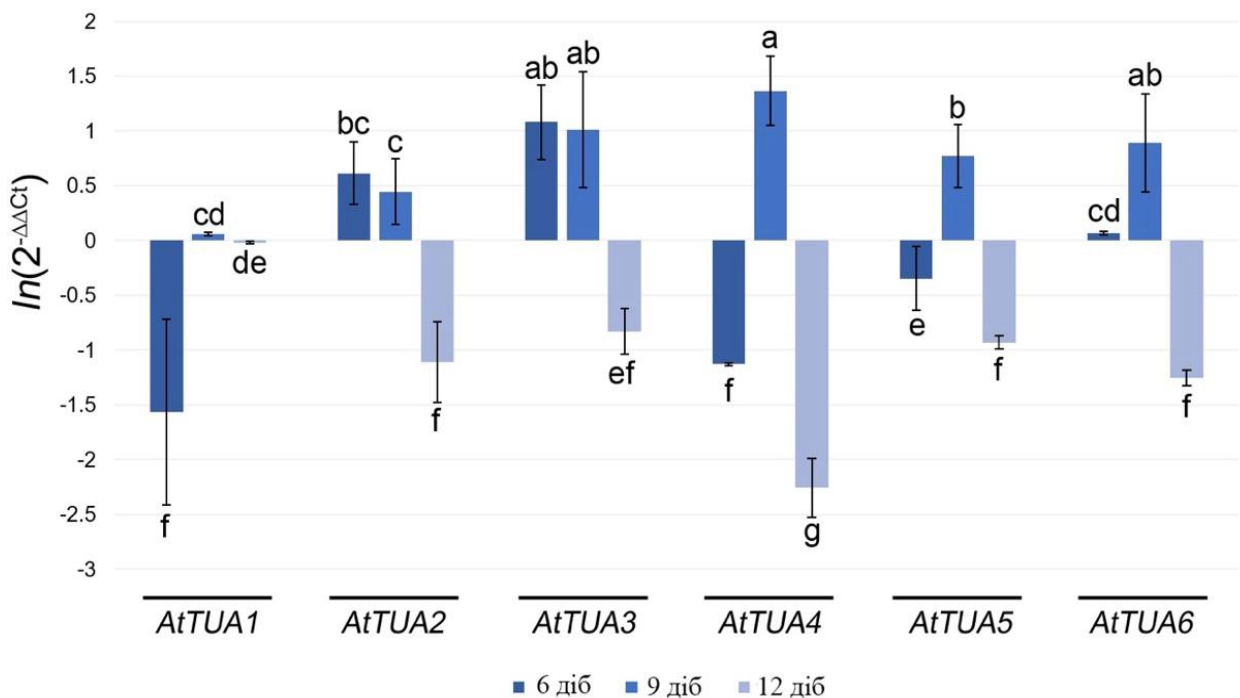


Рис. 7.5. Відносна експресія ізотипів *AtTUA* на 6, 9 та 12-ту добу вирощування рослин в умовах мікрогравітації. Літерами (a, b... і т. д.) позначають достовірно відмінні набори даних (при $p < 0,05$, Fischer LSD), бари похибок – SEM

Враховуючи зазначене, нами було проведено дослідження експресії 6 генів α -тубуліну (рис. 7.5.) та 9 генів β -тубуліну *A. thaliana* за дії на рослини кліноштатування. Після 6 діб кліноштатування не було виявлено специфічних патернів експресії для панелі *AtTUA*. Наприклад, експресія генів *AtTUA1*, *AtTUA4* та *AtTUA5* була значно знижена порівняно з контролем. Рівень

експресії генів *AtTUA1* та *AtTUA4* достовірно не відрізнявся, $\ln = -1,57$ та $-1,13$ відповідно (зниження в 4,79 та 3,09 раза на 6-ту добу), тоді як експресія гена *AtTUA5* залишалася вищою $\ln = -0,35$. Експресія *AtTUA2* та *AtTUA3*, навпаки, достовірно зростала в 1,85–2,95 раза (рис. 7.5.). У той же час збільшення рівня експресії гена *AtTUA6* було статистично достовірним, проте незначним – лише в 1,07 раза. Цікаво, що група паралогічних генів мала протилежну динаміку експресії. Так, підвищення експресії *AtTUA3* супроводжувалося зниженням експресії *AtTUA1* та *AtTUA5*, тоді як зниження експресії *AtTUA4* спостерігалось на фоні високої експресії гена *AtTUA2*.

На 9-ту добу кліноостатування всі гени *AtTUA* мали підвищену експресію, проте на різних рівнях. Гени *AtTUA3*, *AtTUA4* та *AtTUA6* мали підвищення в експресії у 2,44–3,93 раза, тоді як *AtTUA2* та *AtTUA5* – у 1,56 та 2,16 раза відповідно. Зміна експресії *AtTUA1* була дуже незначною, проте статистично достовірною – лише на 6 % більше порівняно з контролем. Через 12 діб культивування в умовах мікрогравітації експресія всіх генів α -тубулінів знижувалася. Найбільше зниження рівнів експресії було зафіксовано для гена *AtTUA4*, експресія якого зменшилася в 9,55 раза ($\ln = -2,26$). Інші чотири гени, *AtTUA2*, *AtTUA3*, *AtTUA5* та *AtTUA6*, були знижені приблизно в 2,29–3,51 раза. Зміна рівня експресії *AtTUA1* була, знову ж таки, дуже низькою – ген експресувався лише на 1,7 % нижче порівняно з контролем.

Порівнюючи рівні експресії теплової карти та рівнів експресії генів *AtTUA* в умовах кліноостатування, ми бачимо, що ген *AtTUA1* зберігає низький рівень експресії як в нормальних умовах, так і під впливом мікрогравітації, що може свідчити про його менш активну роль або специфічні функції, які не залежать від мікрогравітаційного стресу. Як вже було сказано вище, за нормальних умов гени *AtTUA3* та *AtTUA5* демонструють високий рівень експресії у гіпокотилі, розетці листків та корені. В умовах мікрогравітації їх експресія зростає на 9-ту добу, але знижується на 12-ту, що може вказувати на їх адаптивну відповідь на стресові умови. Висока експресія *AtTUA3* та *AtTUA5*

на 9-ту добу може свідчити про активну адаптацію кореневої системи до нових умов, забезпечуючи необхідну структурну підтримку для кореня. Зниження рівня експресії на 12-ту добу може відображати завершення адаптивної реакції. Отримані дані свідчать про важливість *AtTUA3* та *AtTUA5* у регуляції структурних компонентів мікротрубочок, можливо забезпечуючи правильну форму та функцію кореневої системи попри дезорієнтованість росту. Також за нормальних умов нами було виявлено підвищення рівнів експресії *AtTUA2* та *AtTUA4*. За умов мікрогравітації на 6 та 9 добу їх експресія також зростала, що свідчить про залученість даних ізотипів у реалізації відповіді на стресові умови в умовах мікрогравітації, коли коріння рослини зазнає дезорієнтації, й порушується нормальний ріст.

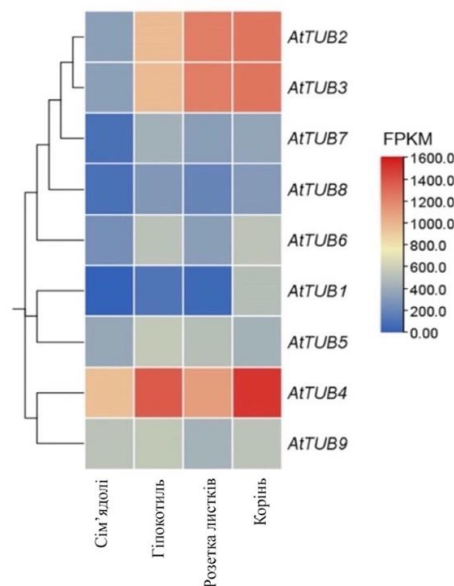


Рис. 7.6. Теплова карта, що демонструє різні рівні експресії ізотипів генів *AtTUB* в *A. thaliana* за нормальних умов

Отримані результати свідчать, що зміни в експресії ізотипів генів *AtTUA* можуть бути пов'язані з роллю мікротрубочок у розвитку процесів аутофагії під час мікрогравітації, зокрема на 9-ту добу культивування, коли активність аутофагії була найвищою. Ген *AtTUA1*, ймовірно, не бере участі в процесі аутофагії, оскільки його експресія була стабільно низькою протягом тривалого

вирощування досліджуваних рослин. Це узгоджується з гіпотезою про те, що різні ізотипи тубуліну можуть мати специфічні функції в залежності від типу клітин та умов вирощування, а також можуть бути задіяні у різних аспектах відповіді рослин на стресові фактори, такі як мікрогравітація.

Аналіз теплової карти (рис. 7.6.) експресії генів β -тубулінів за нормальних умов показав різну активність генів у різних частинах рослини *A.thaliana*, зокрема у корені. Важливо зазначити, що усі 9 ізотипів мали рівень експресії у корені вище 200 FPKM, що свідчить про важливість генів *AtTUB* у процесах розвитку кореневої системи. Найвищий рівень експресії в корені серед усіх досліджених генів був зафіксований для гену *AtTUB4*, досягаючи значення понад 1400 FPKM, що свідчить про, можливо, ключову роль у забезпеченні структурної стабільності мікротрубочок, що є критично важливим для адаптації кореневої системи до механічних стресів та змін у навколишньому середовищі. В той самий час гени *AtTUB2* та *AtTUB3* також демонструють, також, високий рівень експресії в корені, що відповідає приблизно 1200 FPKM. Ці результати підкреслюють важливість певних генів β -тубулінів, таких як *AtTUB2*, *AtTUB3*, *AtTUB4* у підтримці структурної цілісності та функціональності кореневої системи, забезпечуючи адаптацію та стійкість рослини до навколишніх умов.

На відміну від *AtTUA* переважна більшість генів β -тубулінів демонстрували високу подібність експресії (рис. 7.7.). Гени *AtTUB4-9* мали підвищену експресію на 6-ту добу в 1,65–3,36 раза (лише експресія *AtTUB4* достовірно відрізнялася від групи). На 9-ту добу спостерігали достовірне зниження рівнів експресії цих генів у 1,7–2,58 раза, тоді як на 12-ту добу кліноостатування гени *AtTUB4-9* знову були достовірно підвищені у межах 13,9–79,7 % порівняно з контролем. В той самий час *AtTUB2* і *AtTUB3*, які містяться в одному локусі, демонстрували схожі патерни експресії у відповідь на кліноостатування. *AtTUB2* і *AtTUB3* мали підвищені рівні експресії на 6-й день, а саме – 2,75-кратне збільшення експресії *AtTUB2* та 5,65-кратне для

AtTUB3 порівняно з контролем (рис. 7.7.). На 9-ту добу експресія генів була ще вищою, демонструючи 3,34- та 10,97-кратне збільшення експресії відповідно, що супроводжувалося 4,58- та 1,21-кратним зниженням рівнів експресії на 12-ту добу.

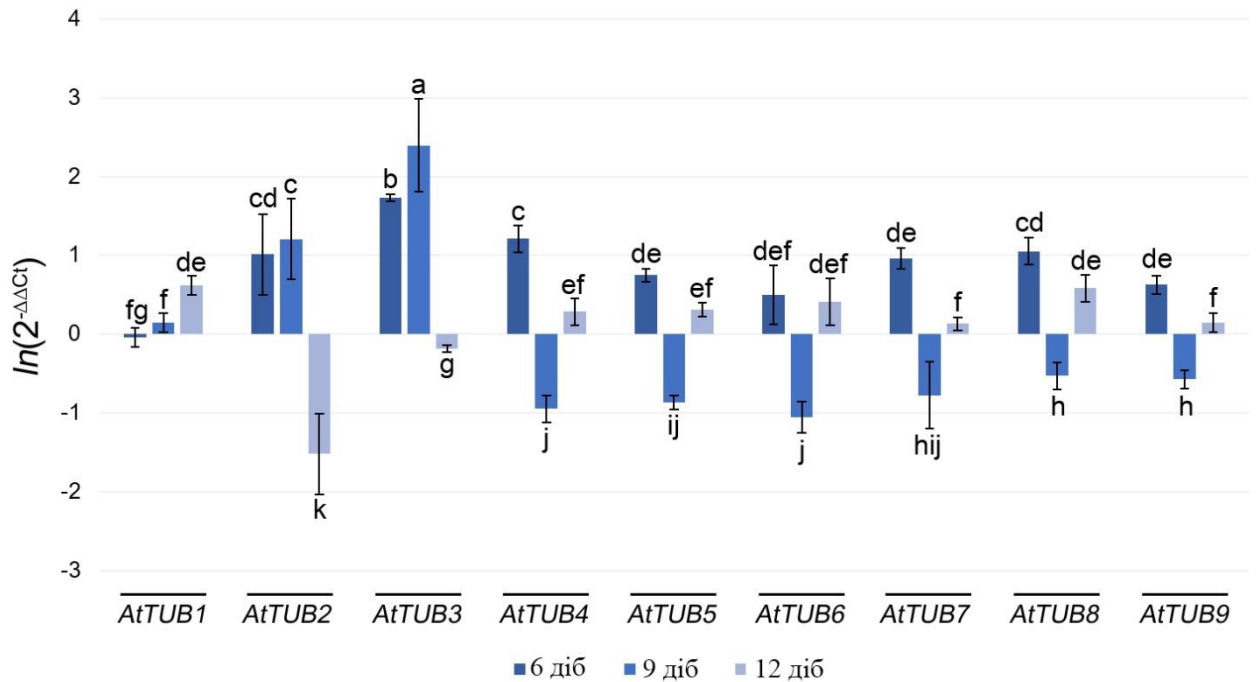


Рис. 7.7. Відносна експресія ізотипів *AtTUB* на 6, 9 та 12-ту добу вирощування рослин в умовах мікрогравітації. Літерами (a, b... і т. д.) позначають достовірно відмінні набори даних (при $p < 0,05$, Fischer LSD), бари похибок – SEM

Зауважимо, що ген *AtTUB1* був єдиним геном β -тубуліну, який майже не змінював рівень експресії на 6-ту добу, достовірно не відрізнявся від контролю, але був підвищений на 9-ту та 12-ту добу – відповідно 16 та 86,7 %.

На основі порівняльного аналізу отриманих даних було виявлено подібні рівні експресії *AtATG8a*, *AtATG8c*, *AtATG8d* та *AtTUA2*, *AtTUA3*, що може слугувати підтвердженням участі цих генів у реалізації аутофагії, індукованої мікрогравітацією. Раніше також було виявлено спільну експресію

AtTUA1 і *atg8e* при голодуванні, *AtTUA3* і *AtATG8f* при сольовому стресі, *AtTUA3* і *AtATG8f*, *AtATG8e* при осмотичному стресі, що також є доказом специфічності цих білкових пар у розвитку аутофагії, індукованої різними стресами [12].

Теплова карта і графік експресії генів *AtTUB* в умовах мікрогравітації показують загалом узгоджені результати, але з деякими відмінностями. Гени *AtTUB2*, *AtTUB3* і *AtTUB4* демонструють високу експресію у різних частинах рослини на тепловій карті, і ця експресія підтверджується на графіку, особливо на ранніх етапах впливу мікрогравітації (6–9 доба). Це вказує на можливу важливу роль цих генів у адаптаційних процесах рослини до умов мікрогравітації. Висока експресія *AtTUB2*, *AtTUB3* і *AtTUB4* вказує на те, що ці гени можуть бути критичними для підтримки структурної стабільності та функціональності кореневої системи. Зокрема, їх активність може бути необхідною для формування і стабілізації мікротрубочок, які забезпечують правильний ріст і розвиток кореня навіть в умовах дезорієнтованого росту, спричиненого мікрогравітацією.

Участь β -тубуліну в індукції аутофагії ще недостатньо вивчена, оскільки гени *TUB* використовуються як гени «домашнього господарства» у *Glehnia littoralis* та *A. thaliana* [221, 222]. Виявлена нами диференційна ко-експресія різних генів *AtATG* і тубуліну може бути пов'язана з точним налаштуванням систем мікротрубочок та аутофагії одна до одної для належного функціонування. Висновки щодо змін експресії генів β -тубуліну потребують подальшого поглибленого дослідження, оскільки їхні рівні експресії відрізняються від рівнів експресії генів *TUA*, особливо це було помітно на 9-ту добу кліноостатування. Залишається незрозумілим, чому рівень експресії шести генів β -тубуліну знову зріс після тривалого мікрогравітаційного стресу, хоча це не спостерігалось для жодного з генів *tua*. Можна припустити, що це пов'язано з тим, що β -тубулін бере участь у ряді посттрансляційних модифікацій [223], необхідних для зв'язування білків, асоційованих з МТ або

моторних білків, а також вони можуть модулювати функцію МТ у відповідь на позаклітинні подразники.

Оцінюючи рівні експресії всіх досліджуваних нами генів, можна стверджувати, що гени *AtATG8b*, *AtATG8f*, а також *AtTUA2*, *AtTUA3* та *AtTUB2* і *AtTUB3* ко-експресуються у відповідь на дію кліностагування. Ми припускаємо, що ці гени можуть бути ключовими елементами в адаптації рослин до тривалого впливу мікрогравітації.

Матеріали цього розділу викладено в публікації:

1. Yemets A, Shadrina R, Blume R, Plokhovska S, Blume Y. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. npj Microgravity. 2024 Mar 18;10(1):1–16. doi: 10.1038/s41526-024-00381-9.

2. Shadrina RYu, Arslan SH, Yemets AI. Development of autophagy on simulated microgravity in plants and the role of microtubules in this process. В: Наукове видання під загальною редакцією Блюма ЯБ. Тези доп. IV конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія»; 2024 трав. 16-18; Київ, Україна. Київ: 2024. С. 14

3. Shadrina RYu, Horiunova II, Yemets AI. Changes in atg8 and tua gene expression during autophagy induced by microgravity condition in *Arabidopsis thaliana*. В: Наукове видання під загальною редакцією Отченашко ВВ. Тези доп. IX Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2021 трав. 20–21; Київ, Україна. 2021. С. 96.

4. Shadrina RYu, Horiunova II, Yemets AI. Transcriptome analysis of *atg8* and *tua* genes involved in process of autophagy induced by microgravity stress. In: Scientific publication under the general editorship by Skrypnyk NV. Abstr. XVIII International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: bioscience advances»; 2020 May 2; Kyiv, Ukraine. 2020. P. 140.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дисертаційній роботі наведено оригінальні дані, які чітко демонструють, що мікрогравітація індукує розвиток аутофагії в клітинах *A. thaliana* із залученням до цього процесу мікротрубочок. Аутофагія бере участь у видаленні та деградації неправильно згорнутих, довгофункціонуючих білків та пошкоджених органел у процесі росту та розвитку рослин. При аутофагії *de novo* формуються спеціалізовані структури аутофагосоми. Це двомембранні утворення, всередині яких міститься клітинний матеріал, що підлягає руйнуванню. При злитті аутофагосом та лізосом виникають великі структури – аутофаголізосоми, де і відбувається розщеплення компонентів клітини, що підлягають деградації [224, 225]. На даний час вивчення фізіологічної ролі аутофагії при стресі є однією з актуальних проблем біології, оскільки в залежності від ступеня пошкодження клітин цей процес може сприяти або виживанню, або загибелі клітин [226, 227]. Встановлено, що мікрогравітація є стресовим фактором, який впливає на морфологію та ріст рослин [228]. Раніше було продемонстровано вплив мікрогравітації на формування клітин мезофілу в арабідопсисі та проростках гороху [155, 210]. Також відомо, що численні стимули можуть викликати аутофагію, але точний спосіб дії мікрогравітації на рослини не з'ясований.

Нами проведено дослідження впливу мікрогравітації на ріст та розвиток проростків *A. thaliana* та встановлено, що кліноостатування не впливає на проростання насіння *A. thaliana*, і суттєвих морфологічних відхилень на цьому етапі не спостерігається. Однак проростки, вирощені в умовах змодельованої мікрогравітації, відрізнялися від контрольних рослин дезорієнтацією напрямку росту коренів, що пов'язано з постійною зміною їх положення відносно вектора сили тяжіння. При аналізі морфології та розвитку головних коренів проростків були виявлені відмінності в їх зонах росту. Зокрема, зони розтягу та перехідна були коротшими за дії кліноостатування в порівнянні із

контрольними рослинами. В той самий час кількісний аналіз середньої площі епідермальних клітин в перехідній зоні показав незначні відмінності (менше на 29 %) у розмірах досліджуваних рослин порівняно з контролем.

Для оцінки морфології кореня було використано чотири величини, зокрема гравітропічний індекс (GI), індекс вертикального росту (VGI), кут гравітропічного нахилу (GSA) та індекс горизонтального росту (HGI). GI є показником, який використовується для оцінки прямолінійності росту кореня рослин у відповідь на гравітацію. У нашому дослідженні, проростки *Arabidopsis thaliana* за умов кліноостатування, мали значення GI 0,7, що свідчить про менш прямолінійний ріст коренів порівняно з контролем, де GI дорівнювало 0,9. Це означає, що кліноостатування впливає на гравітропічний ріст коренів, змушуючи їх відхилятися від нормального вертикального напрямку. Дослідження також показало значне збільшення GSA у проростків після кліноостатування, порівняно з контролем, що свідчить про відхилення коренів від нормальної вертикальної орієнтації. Це відхилення було часово-залежним, досягаючи піку на 12-й день. Показник VGI для контрольних рослин становив 0,9, що свідчить про їх вертикальний ріст вниз. Для проростків в умовах кліноостатування VGI становив 0,3, що вказує на значне відхилення від вертикалі. HGI вказує на напрямки росту кореня у горизонталі. HGI для контрольних рослин був близьким до 0 (0,1), що вказує на вертикальний ріст кореня вниз. Для проростків в умовах кліноостатування HGI становив 0,7, що вказує на відхилення кінчика кореня вправо або вліво від вертикалі під впливом мікрогравітації.

Також було виявлено появу морфологічних ознак розвитку аутофагії, зокрема виникнення MDC-забарвлених структур розміром від 3 до 20 мкм. Слід відзначити, що на 10-ту добу культивування у клітинах кореня кількість MDC-забарвлених структур стрімко знижувалась, що може бути ознакою адаптації коренів до умов мікрогравітації.

За допомогою флуоресцентного барвника LTR продемонстровано, що на 6-ту добу клінонстатування відбувається збільшення кількості аутофагосом в епідермальних клітинах перехідної зони кореня, а також поступове зменшення їх кількості на 9-ту та 12-ту добу порівняно з контрольними рослинами. При підрахунку аутофагосом за використання трансгенної лінії *A. thaliana* (GFP-ATG8a) отримали наступні результати: індукцію аутофагії та максимальний рівень утворення аутофагосом у клітинах кореня рослин на 6-ту добу вирощування і поступове зменшення їх кількості на 12-ту добу культивування за умов мікрогравітації. Можна припустити, що таке зниження розвитку аутофагії може бути пов'язане з адаптацією рослини до відсутності сталого вектора гравітації.

Оксид азоту (NO) є важливою між- та внутрішньоклітинною сигнальною молекулою, яка бере участь у різних процесах розвитку та стресових реакціях рослин [229, 230]. Раніше повідомлялося про роль NO та ROS як месенджерів у гравітропічній відповіді шляхом впливу на перерозподіл ауксину в рослині [183]. Результати досліджень ролі NO при гравітропічній реакції вказують на залучення NO як важливого компонента відповіді рослин на гравітацію [185]. Нами проведено дослідження ролі NO у відповіді рослин на умови симульованої мікрогравітації за участі донора (SNP) та скавенджера (сPTIO). Встановлено, що обробка насіння *A. thaliana* донором NO-SNP стимулює зміни ростових параметрів коренів та призводить до підвищення стійкості рослин до клінонстатування. Після обробки насіння SNP вміст ендogenous NO у контрольних рослин на 6-ту добу культивування підвищувався у 1,5 раза, у клінонстатованих у 1,8 раза. На 9–12 добу вміст ендogenous NO поступово знижувався, що може свідчити про адаптацію рослин до умов клінонстатування.

За допомогою специфічного флуоресцентного зонда DAF-FM DA виявлено підвищення рівня флуоресценції в епідермальних клітинах апексів коренів та кореневих волосках у клінонстатованих рослин, що свідчить про

накопичення ендogenous NO в цих тканинах кореня за умов стресу. На 6-ту добу вирощування за умов кліноостатування порівняно з контрольними рослинами виявлено збільшення кількості аутофагосом в епідермальних клітинах перехідної зони кореня з наступним зменшенням цього показника на 9–12 добу. Обробка насіння скавенджером NO сРТІО незначно пригнічувала ріст проростків, і цей ефект посилювався за умов кліноостатування, включаючи значне зростання накопичення аутофагосом в епідермальних клітинах. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що регулювання вмісту ендogenous NO є важливою складовою внутрішньоклітинних механізмів сигналіngu, які залучаються до відповіді клітин рослин на симульовану мікрогравітацію.

Аутофагосоми – це рухливі структури, для руху яких потрібні МТ. Встановлено, що порушення МТ призводить до значного зменшення кількості зрілих аутофагосом, але не впливає на тривалість їх життя або злиття з лізосомами. Було припущено, що МТ залучені до доставки лише зрілих аутофагосом для деградації і таким чином створюють просторовий бар'єр між фагофорами та лізосомами [231, 232]. Існує все більше доказів ролі МТ в аутофагії у клітинах дріжджів та ссавців [233–235], але даних щодо рослин мало. У клітинах дріжджів та тварин МТ забезпечують дозрівання та рух аутофагосом через їх динамічні зміни та посттрансляційні модифікації тубуліну. МТ утворюють складну взаємопов'язану мережу, яка часто функціонує як шляхи для внутрішньоклітинного метаболізму, що контролюється специфічними моторними білками [236].

Наші дослідження з використанням лінії *A. thaliana* (GFP-MAP4) також продемонстрували, що відбуваються зміни нативної орієнтації МТ у клітинах кореня. МТ стають дезорганізованими та дезорієнтованими на 6-ту добу вирощування у всіх досліджуваних зонах кореня *A. thaliana* за умов кліноостатування. Проте через 9–12 діб різких порушень в орієнтації та організації МТ не виявлено, що може бути пов'язано з певною адаптацією рослин до мікрогравітації. Ці дані додатково підтверджують те, що МТ є

внутрішньоклітинною мішенню та безпосередньо беруть участь у відповіді на стрес викликаний мікрогравітацією.

Білок ATG8 є структурною одиницею аутофагосом і безпосередньо бере участь у розвитку стрес-індукованої аутофагії у клітині. Отримані результати свідчать також про те, що частина генів *AtATG8* (*AtATG8b*, *AtATG8e*, *AtATG8f* та *AtATG8i*) може бути більш специфічною для повноцінної реалізації аутофагії за умов мікрогравітації. Оскільки ріст і розвиток рослин безпосередньо залежать від правильного функціонування цитоскелету, нами було виявлено значні зміни в профілях експресії генів α - і β -тубуліну в умовах мікрогравітації. На основі проведених досліджень можемо зробити висновок, що основна реакція рослин на стрес, викликана мікрогравітацією, спостерігається протягом перших 6–9 діб вирощування в умовах мікрогравітації.

Дослідження рівнів експресії генів α - та β -тубуліну за умов мікрогравітації показали важливу роль цитоскелета, зокрема мікротрубочок, у регуляції цього процесу. Було виявлено, що мікрогравітація значно впливає на архітектуру цитоскелета, що підтверджує важливість МТ у дозріванні та транспортуванні аутофагосом до літичних органел. Аналіз рівнів експресії генів α - та β -тубуліну за нормальних умов показав різну тканинну специфічність цих генів, зокрема високий рівень експресії в кореневій системі, що свідчить про їх важливу роль у підтриманні структурної цілісності та функціональності кореня.

Результати молекулярного аналізу шести ізотипів α -тубуліну показують, що деякі з цих генів можна ідентифікувати як більш специфічні у здійсненні аутофагії за умов мікрогравітації. Зокрема, встановлено підвищення рівнів експресії генів *AtTUA2*, *AtTUA3* на 6–9 добу. На 12-ту добу вирощування рослин за умов кліноостатування жоден із шести ізотипів не показав підвищення рівня експресії. Ген *AtTUA1*, ймовірно, не бере участі в процесі

аутофагії, оскільки його експресія була стабільно низькою протягом досліджуваного періоду вирощування рослин.

Аналіз експресії дев'яти генів β -тубуліну також показав варіативність. Спостерігали певний патерн експресії, а саме: на ранніх етапах кліностагування (6 діб) більшість генів β -тубуліну мали підвищені рівні експресії, далі спостерігали зниження на 9-ту добу і знову незначне зростання після 12 діб. Ізотипи *AtTUB2* і *AtTUB3* продемонстрували підвищені рівні експресії, як на 6 – ту, так і на 9 – ту добу за умов мікрогравітації.

В результаті проведеного порівняльного аналізу рівнів експресії всіх досліджуваних генів можна стверджувати, що гени *AtATG8b*, *AtATG8f*, та *AtTUA2*, *AtTUA3*, та *AtTUB2* та *AtTUB3* спільно експресуються у відповідь на дію мікрогравітації. Ми припускаємо, що ці гени можуть бути ключовими елементами адаптації рослин до мікрогравітації. Оскільки дані про експресію рослинного тубуліну в умовах мікрогравітації отримані вперше, закладено підґрунтя для подальшого вивчення генів і білків аутофагії та їх взаємодії з цитоскелетом.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що мікрогравітація індукує процеси розвитку аутофагії в клітинах кореня *A. thaliana* за участю мікротрубочок. На транскрипційному рівні охарактеризовано закономірності експресії генів α - і β -тубуліну та білка ATG8, які можуть бути залучені до опосередкування процесів аутофагії за участю мікротрубочок при дії мікрогравітації в клітинах кореня проростків *A. thaliana*.

1. Встановлено, що мікрогравітації впливає на ріст та розвиток головних коренів проростків *A. thaliana*. Виявлено, що на морфологічному рівні розвиток стрес-індукованої аутофагії у коренях експериментальних рослин характеризується появою MDC-забарвлених структур, що відповідають аутофагосомам.

2. Продемонстровано закономірності розвитку аутофагії індукованої кліноостатуванням у коренях проростків *A. thaliana*. Отримані результати за допомогою барвника LTR та трансгенної лінії GFP-ATG8a в обох випадках показали індукцію аутофагії та максимальний рівень утворення аутофагосом у клітинах кореня рослини на 6-ту добу вирощування рослин, а потім поступове зменшення їх кількості на 9-12 добу в умовах мікрогравітації.

3. Встановлено вплив екзогенних донора та скавенджера оксиду азоту (NO) на розвиток і ріст коренів проростків *A. thaliana* за умов кліноостатування. Виявлено, що донор оксиду азоту – нітропрурид натрію (SNP) стимулює зміни ростових параметрів коренів та призводить до підвищення стійкості рослин при дії мікрогравітації.

4. Встановлено, що за умов кліноостатування відбувається підвищення вмісту ендогенного оксиду азоту в досліджуваних рослинах та продемонстровано участь донорів та скавенджерів оксиду азоту в цьому процесі. Зокрема, показано підвищення вмісту нітритів в 1,5 рази у контрольних рослин та 1,8 рази у кліноостатованих на 6-ту добу культивування.

Із збільшенням тривалості культивування відбувається поступове зменшення ендогенного вмісту оксиду азоту, що може свідчити про адаптацію рослин до умов кліноостатування.

5. Виявлено зміни нативної орієнтації мікротрубочок у клітинах кореня *A. thaliana* за умов мікрогравітації. Зокрема було показано, що мікротрубочки стають дезорієнтованими на 6-ту добу вирощування в клітинах всіх досліджуваних зон кореня *A. thaliana* за дії кліноостатування. Отримані дані підтверджують те, що мікротрубочки можуть виступати як самостійні гравітаційні рецептори клітин, а структурна реорганізація мікротрубочок є одним із елементів гравітаційної чутливості клітин кореня.

6. Проаналізовано рівні експресії генів білка ATG8 та встановлено, що мікрогравітація індукує підвищення рівня експресії генів *AtATG8* *A. thaliana* на різних часових проміжках. Зокрема, рівень експресії генів *AtATG8b*, *AtATG8e*, *AtATG8f* та *AtATG8i* зростає на 6-ту та 9-ту добу кліноостатування.

7. Отримано дані, які підтверджують участь генів α -тубуліну у розвитку аутофагії, індукованої кліноостатуванням у *A. thaliana*. Зокрема, встановлено підвищення рівнів експресії генів *AtTUA2* та *AtTUA3* на 6-ту та 9-ту добу кліноостатування. Виявлено спільну експресію генів α -тубуліну та білка ATG8, що може слугувати підтвердженням участі цих генів у реалізації аутофагії, індукованої мікрогравітацією.

8. Вперше визначено рівні експресії генів β -тубуліну в процесі розвитку стрес-індукованої аутофагії за умов кліноостатування та виявлено підвищення рівнів експресії генів *AtTUB2* і *AtTUB3* на 6-ту та 9-ту добу вирощування та зниження рівнів їх експресії на 12-ту добу в умовах мікрогравітації. Отримані дані свідчать про спільну експресію генів *AtTUA2*, *AtTUA3*, та *AtTUB2*, *AtTUB3*, що підтверджує їх участь у адаптації до цього виду стресу.

9. Проведено порівняльний аналіз рівнів експресії всіх досліджуваних генів та встановлено спільну експресію *AtATG8b*, *AtATG8f*, та *AtTUA2*, *AtTUA3*, та *AtTUB2* та *AtTUB3*, що вказує на специфічність залучення зазначених генів

у реалізацію адаптивної відповіді клітин рослин на вплив мікрогравітації. Таким чином, отримані результати створюють вихідну платформу для подальшого вивчення клітинних механізмів залучення різних ізотипів ATG8 та їх взаємодії з іншими клітинними компонентами у розвитку аутофагії за умов мікрогравітації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Karahara I, Suto T, Yamaguchi T, Yashiro U, Tamaoki D, Okamoto E, et al. Vegetative and reproductive growth of Arabidopsis under microgravity conditions in space. *J Plant Res.* 2020 Jul 1;133(4):571–85.
2. Karahara I, Suto T, Yamaguchi T, Yashiro U, Tamaoki D, Okamoto E, et al. Vegetative and reproductive growth of Arabidopsis under microgravity conditions in space. *J Plant Res.* 2020 Jul;133(4):571–85.
3. Kordyum E, Hasenstein KH. Plant biology for space exploration - Building on the past, preparing for the future. *Life Sci Space Res.* 2021 May;29:1–7.
4. Kruse CPS, Meyers AD, Basu P, Hutchinson S, Luesse DR, Wyatt SE. Spaceflight induces novel regulatory responses in Arabidopsis seedling as revealed by combined proteomic and transcriptomic analyses. *BMC Plant Biol.* 2020 May 27;20(1):237.
5. Link BM, Busse JS, Stankovic B. Seed-to-seed-to-seed growth and development of Arabidopsis in microgravity. *Astrobiology.* 2014 Oct;14(10):866–75.
6. Wang P, Wang T, Han J, Li M, Zhao Y, Su T, et al. Plant Autophagy: An Intricate Process Controlled by Various Signaling Pathways. *Front Plant Sci.* 2021;12:754982.
7. Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Poüs C. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci.* 2013 Mar 1;126(Pt 5):1071–80.
8. Marshall RS, Vierstra RD. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annu Rev Plant Biol.* 2018 Apr 29;69:173–208.
9. Michaeli S, Galili G, Genschik P, Fernie AR, Avin-Wittenberg T. Autophagy in Plants--What's New on the Menu? *Trends Plant Sci.* 2016 Feb;21(2):134–44.

10. Cui X, Zheng J, Zheng J, Gong Q. Study of Autophagy in Plant Senescence. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1744:299–306.
11. Bu F, Yang M, Guo X, Huang W, Chen L. Multiple Functions of ATG8 Family Proteins in Plant Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:466.
12. 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*. 2019;43(9):1056–64.
13. Wang P, Richardson C, Hawes C, Hussey PJ. Arabidopsis NAP1 Regulates the Formation of Autophagosomes. *Curr Biol CB*. 2016 Aug 8;26(15):2060–9.
14. Kim JH, Jung H, Chung T. Birth, Growth, Maturation, and Demise of Plant Autophagic Vesicles. *J Plant Biol*. 2020 Jun 1;63(3):155–64.
15. Zhuang X, Chung KP, Luo M, Jiang L. Autophagosome Biogenesis and the Endoplasmic Reticulum: A Plant Perspective. *Trends Plant Sci*. 2018 Aug;23(8):677–92.
16. Lei Y, Huang Y, Wen X, Yin Z, Zhang Z, Klionsky DJ. How Cells Deal with the Fluctuating Environment: Autophagy Regulation under Stress in Yeast and Mammalian Systems. *Antioxidants* [Internet]. 2022 Feb [cited 2023 Feb 2];11(2):304. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/2/304>
17. Bozhkov PV. Plant autophagy: mechanisms and functions. *J Exp Bot*. 2018 Mar 14;69(6):1281–5.
18. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 20;20(3):460–73.
19. Avin-Wittenberg T. Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell Environ*. 2019 Mar;42(3):1045–53.

20. Olenieva VD, Lytvyn DI, Yemets AI, Blume YB. Influence of UV-B on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules. *Dopov Nac akad nauk Ukr.* 2018;(1):100–9.
21. Signorelli S, Tarkowski ŁP, Van den Ende W, Bassham DC. Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends Plant Sci.* 2019 May;24(5):413–30.
22. Tang J, Bassham DC. Autophagy in crop plants: what's new beyond Arabidopsis? *Open Biol.* 2018 Dec 5;8(12):180162.
23. Su T, Li X, Yang M, Shao Q, Zhao Y, Ma C, et al. Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Front Plant Sci* [Internet]. 2020 Feb 28 [cited 2024 Apr 9];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00164/full>
24. Wang S, Hu W, Liu F. Autophagy in the Lifetime of Plants: From Seed to Seed. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan;23(19):11410.
25. Li Y, Xu X, Qi G, Cui D, Huang C, Sui X, et al. Mechanisms of autophagy function and regulation in plant growth, development, and response to abiotic stress. *Crop J.* 2023 Dec 1;11(6):1611–25.
26. Sedaghatmehr M, Balazadeh S. Autophagy: a key player in the recovery of plants from heat stress. *J Exp Bot.* 2024 Apr 15;75(8):2246–55.
27. Nakamura S, Hidema J, Sakamoto W, Ishida H, Izumi M. Selective Elimination of Membrane-Damaged Chloroplasts via Microautophagy. *Plant Physiol.* 2018 Jul;177(3):1007–26.
28. Chen Q, Shinozaki D, Luo J, Pottier M, Havé M, Marmagne A, et al. Autophagy and Nutrients Management in Plants. *Cells.* 2019 Nov 12;8(11):E1426.

29. Soto-Burgos J, Zhuang X, Jiang L, Bassham DC. Dynamics of Autophagosome Formation1[OPEN]. *Plant Physiol.* 2018 Jan;176(1):219–29.
30. Chung T. How phosphoinositides shape autophagy in plant cells. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol.* 2019 Apr;281:146–58.
31. Pecenková T, Markovic V, Sabol P, Kulich I, Žárský V. Exocyst and autophagy-related membrane trafficking in plants. *J Exp Bot.* 2017 Dec 18;69(1):47–57.
32. Wang P, Hawkins TJ, Hussey PJ. Connecting membranes to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Plant Biol.* 2017 Dec;40:71–6.
33. Hollenstein DM, Kraft C. Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr Opin Cell Biol.* 2020 Aug 1;65:50–7.
34. Wun CL, Quan Y, Zhuang X. Recent Advances in Membrane Shaping for Plant Autophagosome Biogenesis. *Front Plant Sci.* 2020;11:565.
35. Varga VB, Keresztes F, Sigmond T, Vellai T, Kovács T. The evolutionary and functional divergence of the Atg8 autophagy protein superfamily. *Biol Futura.* 2022 Dec 1;73(4):375–84.
36. Kang S, Shin KD, Kim JH, Chung T. Autophagy-related (ATG) 11, ATG9 and the phosphatidylinositol 3-kinase control ATG2-mediated formation of autophagosomes in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 2018 Apr;37(4):653–64.
37. Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2011 Oct;23(10):3761–79.
38. Le Bars R, Marion J, Le Borgne R, Satiat-Jeunemaitre B, Bianchi MW. ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nat Commun.* 2014 Jun 20;5:4121.

39. Fujiki Y, Yoshimoto K, Ohsumi Y. An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol.* 2007 Mar;143(3):1132–9.
40. Zhuang X, Chung KP, Cui Y, Lin W, Gao C, Kang BH, et al. ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2017 Jan 17 [cited 2023 Feb 2];114(3):E426–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5255614/>
41. Gomez RE, Lupette J, Chambaud C, Castets J, Ducloy A, Cacas JL, et al. How Lipids Contribute to Autophagosome Biogenesis, a Critical Process in Plant Responses to Stresses. *Cells.* 2021 May 21;10(6):1272.
42. Nair U, Yen WL, Mari M, Cao Y, Xie Z, Baba M, et al. A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy.* 2012 May 1;8(5):780–93.
43. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):5971–81.
44. Noda NN. Structural view on autophagosome formation. *FEBS Lett.* 2024;598(1):84–106.
45. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell Graz Austria.* 2016 Dec 1;3(12):588–96.
46. Zhou F, Wu Z, Zhao M, Murtazina R, Cai J, Zhang A, et al. Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *J Cell Biol.* 2019 Jun 3;218(6):1908–27.
47. Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol.* 2016 Dec 19;215(6):857–74.

48. Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jan;21(1):25–42.
49. Takahashi Y, He H, Tang Z, Hattori T, Liu Y, Young MM, et al. An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat Commun.* 2018 Jul 20;9(1):2855.
50. Spitzer C, Li F, Buono R, Roschztardt H, Chung T, Zhang M, et al. The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2015 Feb;27(2):391–402.
51. Bas L, Papinski D, Licheva M, Torggler R, Rohringer S, Schuschnig M, et al. Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome–vacuole fusion. *J Cell Biol.* 2018 Oct 1;217(10):3656–69.
52. Fujiwara M, Uemura T, Ebine K, Nishimori Y, Ueda T, Nakano A, et al. Interactomics of Qa-SNARE in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2014 Apr;55(4):781–9.
53. Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Sep;7(9):631–43.
54. Kumar N, Leonzino M, Hancock-Cerutti W, Horenkamp FA, Li P, Lees JA, et al. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J Cell Biol.* 2018 Oct 1;217(10):3625–39.
55. Takemoto K, Ebine K, Askani JC, Krüger F, Gonzalez ZA, Ito E, et al. Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 2018 Mar 6;115(10):E2457–66.

56. Qi H, Xia FN, Xiao S. Autophagy in plants: Physiological roles and post-translational regulation. *J Integr Plant Biol.* 2021 Jan;63(1):161–79.
57. Yang M, Bu F, Huang W, Chen L. Multiple Regulatory Levels Shape Autophagy Activity in Plants. *Front Plant Sci.* 2019;10:532.
58. Wang Y, Cai S, Yin L, Shi K, Xia X, Zhou Y, et al. Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating ATG genes and inducing autophagy. *Autophagy.* 2015 Nov 2;11(11):2033–47.
59. Lai Z, Wang F, Zheng Z, Fan B, Chen Z. A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J Cell Mol Biol.* 2011 Jun;66(6):953–68.
60. Wang Y, Cao JJ, Wang KX, Xia XJ, Shi K, Zhou YH, et al. BZR1 Mediates Brassinosteroid-Induced Autophagy and Nitrogen Starvation in Tomato. *Plant Physiol.* 2019 Feb;179(2):671–85.
61. Zhang Z, Zhu JY, Roh J, Marchive C, Kim SK, Meyer C, et al. TOR Signaling Promotes Accumulation of BZR1 to Balance Growth with Carbon Availability in Arabidopsis. *Curr Biol CB.* 2016 Jul 25;26(14):1854–60.
62. Pan Y, Seymour GB, Lu C, Hu Z, Chen X, Chen G. An ethylene response factor (ERF5) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep.* 2012 Feb;31(2):349–60.
63. Zhu T, Zou L, Li Y, Yao X, Xu F, Deng X, et al. Mitochondrial alternative oxidase-dependent autophagy involved in ethylene-mediated drought tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol J.* 2018 Dec;16(12):2063–76.
64. Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 2015 Jun;25(6):354–63.

65. Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Sep 15;8(1):1–40.
66. Bao Y, Pu Y, Yu X, Gregory BD, Srivastava R, Howell SH, et al. IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy.* 2018;14(9):1562–73.
67. Wang P, Mugume Y, Bassham DC. New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Aug;80:113–22.
68. Burkart GM, Brandizzi F. A tour of TOR complex signaling in plants. *Trends Biochem Sci.* 2021 May;46(5):417–28.
69. Pu Y, Luo X, Bassham DC. TOR-Dependent and -Independent Pathways Regulate Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2017;8:1204.
70. Son O, Kim S, Kim D, Hur YS, Kim J, Cheon CI. Involvement of TOR signaling motif in the regulation of plant autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun 27;501(3):643–7.
71. Zhou Y, Manghwar H, Hu W, Liu F. Degradation Mechanism of Autophagy-Related Proteins and Research Progress. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 30;23(13):7301.
72. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:159–80.
73. Xie Y, Kang R, Sun X, Zhong M, Huang J, Klionsky DJ, et al. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy. *Autophagy.* 2015;11(1):28–45.
74. Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol.* 2013 Apr;15(4):406–16.

75. Qi H, Xia FN, Xie LJ, Yu LJ, Chen QF, Zhuang XH, et al. TRAF Family Proteins Regulate Autophagy Dynamics by Modulating AUTOPHAGY PROTEIN6 Stability in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2017 Apr;29(4):890–911.
76. Nadolski MJ, Linder ME. Protein lipidation. *FEBS J*. 2007 Oct;274(20):5202–10.
77. Gomez RE, Chambaud C, Lupette J, Castets J, Pascal S, Brocard L, et al. Phosphatidylinositol-4-phosphate controls autophagosome formation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*. 2022 Jul 28;13(1):4385.
78. Álvarez C, García I, Moreno I, Pérez-Pérez ME, Crespo JL, Romero LC, et al. Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2012 Nov;24(11):4621–34.
79. Paul BD, Snyder SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jul 11;13(8):499–507.
80. Huang D, Huo J, Liao W. Hydrogen sulfide: Roles in plant abiotic stress response and crosstalk with other signals. *Plant Sci*. 2021 Jan 1;302:110733.
81. Laureano-Marín AM, Moreno I, Romero LC, Gotor C. Negative Regulation of Autophagy by Sulfide Is Independent of Reactive Oxygen Species. *Plant Physiol*. 2016 Jun;171(2):1378–91.
82. Feng J, Chen L, Zuo J. Protein S-Nitrosylation in plants: Current progresses and challenges. *J Integr Plant Biol*. 2019 Dec;61(12):1206–23.
83. Zhan N, Wang C, Chen L, Yang H, Feng J, Gong X, et al. S-Nitrosylation Targets GSNO Reductase for Selective Autophagy during Hypoxia Responses in Plants. *Mol Cell*. 2018 Jul 5;71(1):142-154.e6.

84. Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, et al. S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol*. 2011 Nov;181(5):527–33.
85. Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*. 2001 Mar 22;410(6827):490–4.
86. Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Apr;16(4):258–64.
87. Son SM, Park SJ, Fernandez-Estevez M, Rubinsztein DC. Autophagy regulation by acetylation—implications for neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2021 Jan;53(1):30–41.
88. Chen X, Lu L, Mayer KS, Scalf M, Qian S, Lomax A, et al. POWERDRESS interacts with HISTONE DEACETYLASE 9 to promote aging in Arabidopsis. *eLife*. 2016 Nov 22;5:e17214.
89. Wang X, Mao T. Understanding the functions and mechanisms of plant cytoskeleton in response to environmental signals. *Curr Opin Plant Biol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Feb 2];52:86–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526619300299>
90. Blume YB. A journey through a plant cytoskeleton: Hot spots in signaling and functioning. *Cell Biol Int*. 2020;44(6):1262–6.
91. Duckney PJ, Wang P, Hussey PJ. Membrane contact sites and cytoskeleton-membrane interactions in autophagy. *FEBS Lett*. 2022;596(17):2093–103.

92. Pozhvanov G. Visualization and analysis of actin cytoskeleton organization in plants. *Biol Commun* [Internet]. 2018 Jun 8 [cited 2023 Feb 2];63(1):59–69. Available from: <https://biocomm.spbu.ru>
93. Wojnacki J, Galli T. A new actin-binding domain glues autophagy together. *J Biol Chem* [Internet]. 2018 Mar 23 [cited 2023 Feb 2];293(12):4575–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5868261/>
94. Zheng X, Wu M, Li X, Cao J, Li J, Wang J, et al. Actin filaments are dispensable for bulk autophagy in plants. *Autophagy*. 2019 Dec 2;15(12):2126–41.
95. Lebecq A, Fangain A, Boussaroque A, Caillaud MC. Dynamic apico-basal enrichment of the F-actin during cytokinesis in Arabidopsis cells embedded in their tissues. *Quant Plant Biol* [Internet]. 2022 ed [cited 2023 Feb 2];3:e4. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/quantitative-plant-biology/article/dynamic-apicobasal-enrichment-of-the-factin-during-cytokinesis-in-arabidopsis-cells-embedded-in-their-tissues/9057F35F7BB4326B88F5CFC088FDE573>
96. Winder SJ, Ayscough KR. Actin-binding proteins. *J Cell Sci*. 2005 Feb 15;118(Pt 4):651–4.
97. Kast DJ, Zajac AL, Holzbaur ELF, Ostap EM, Dominguez R. WHAMM Directs the Arp2/3 Complex to the ER for Autophagosome Biogenesis through an Actin Comet Tail Mechanism. *Curr Biol CB*. 2015 Jun 29;25(13):1791–7.
98. Coutts AS, La Thangue NB. Actin nucleation by WH2 domains at the autophagosome. *Nat Commun*. 2015 Jul 30;6:7888.
99. Deeks MJ, Hussey PJ. Arp2/3 and SCAR: plants move to the fore. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Dec;6(12):954–64.

100. Wang P, Gao E, Hussey PJ. Autophagosome Biogenesis in Plants: An Actin Cytoskeleton Perspective. *Trends Plant Sci.* 2020 Sep;25(9):850–8.
101. King JS, Veltman DM, Insall RH. The induction of autophagy by mechanical stress. *Autophagy.* 2011 Dec;7(12):1490–9.
102. Hashimoto T. Microtubules in Plants. *Arab Book Am Soc Plant Biol.* 2015 Apr 27;13:e0179.
103. Motta MR, Schnittger A. A microtubule perspective on plant cell division. *Curr Biol [Internet].* 2021 May 24 [cited 2023 Feb 2];31(10):R547–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982221004607>
104. Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct;18(10):2207.
105. Chun HJ, Baek D, Jin BJ, Cho HM, Park MS, Lee SH, et al. Microtubule Dynamics Plays a Vital Role in Plant Adaptation and Tolerance to Salt Stress. *Int J Mol Sci [Internet].* 2021 May 31 [cited 2023 Feb 2];22(11):5957. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8199277/>
106. Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2009 Aug;84(3):431–48.
107. Kast DJ, Dominguez R. The Cytoskeleton–Autophagy Connection. *Curr Biol.* 2017 Apr 24;27(8):R318–26.
108. Köchl R, Hu XW, Chan EYW, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic Cph Den.* 2006 Feb;7(2):129–45.
109. Yoshimoto K, Ohsumi Y. Unveiling the Molecular Mechanisms of Plant Autophagy-From Autophagosomes to Vacuoles in Plants. *Plant Cell Physiol.* 2018 Jul 1;59(7):1337–44.

110. 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 30;285(31):24184–94.
111. Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol*. 2020 Apr 3;432(8):2462–82.
112. Ke PY. Molecular Mechanism of Autophagosome–Lysosome Fusion in Mammalian Cells. *Cells*. 2024 Jan;13(6):500.
113. Trisciuglio D, Degrassi F. The Tubulin Code and Tubulin-Modifying Enzymes in Autophagy and Cancer. *Cancers* [Internet]. 2021 Dec 21 [cited 2023 Feb 2];14(1):6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8750717/>
114. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*. 2008;33(1):109–22.
115. Mohanasundaram P, Coelho-Rato LS, Modi MK, Urbanska M, Lautenschläger F, Cheng F, et al. Cytoskeletal vimentin regulates cell size and autophagy through mTORC1 signaling. *PLOS Biol*. 2022 Sep 13;20(9):e3001737.
116. Kabange NR, Mun BG, Lee SM, Kwon Y, Lee D, Lee GM, et al. Nitric oxide: A core signaling molecule under elevated GHGs (CO₂, CH₄, N₂O, O₃)-mediated abiotic stress in plants. *Front Plant Sci* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2024 Jun 29];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.994149/full>
117. Yemets AI, Krasnylenko YA, Lytvyn DI, Sheremet YA, Blume YB. Nitric oxide signalling *via* cytoskeleton in plants. *Plant Sci*. 2011 Nov 1;181(5):545–54.

118. Zhang Q, Qian WJ, Knyushko TV, Clauss TRW, Purvine SO, Moore RJ, et al. A method for selective enrichment and analysis of nitrotyrosine-containing peptides in complex proteome samples. *J Proteome Res.* 2007 Jun;6(6):2257–68.
119. Blume YB, Krasylenko YA, Demchuk OM, Yemets AI. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front Plant Sci.* 2013 Dec 26;4:530.
120. Krasylenko YA, Yemets AI, Blume YB. Nitric oxide synthase inhibitor L-NAME affects Arabidopsis root growth, morphology, and microtubule organization. *Cell Biol Int.* 2019;43(9):1049–55.
121. Minibayeva F, Mazina A, Gazizova N, Dmitrieva S, Ponomareva A, Rakhmatullina D. Nitric Oxide Induces Autophagy in *Triticum aestivum* Roots. *Antioxid Basel Switz.* 2023 Aug 22;12(9):1655.
122. Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis. *Autophagy.* 2007 Jun;3(3):257–8.
123. Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy.* 2009 Oct;5(7):954–63.
124. Zhou J, Wang J, Yu JQ, Chen Z. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front Plant Sci.* 2014;5:174.
125. Lenz HD, Haller E, Melzer E, Kober K, Wurster K, Stahl M, et al. Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant J Cell Mol Biol.* 2011 Jun;66(5):818–30.
126. Zhang J, Yang W, Yue J, Liu Y, Pei D, Wang H. The Responses of Wheat Autophagy and ATG8 Family Genes to Biotic and Abiotic Stresses. *J Plant Growth Regul.* 2020 Jun 1;39(2):867–76.

127. Hayward AP, Dinesh-Kumar SP. What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annu Rev Phytopathol.* 2011;49:557–76.
128. Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell.* 2005 May 20;121(4):567–77.
129. Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NHT, Mattsson O, et al. Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell.* 2009 May 15;137(4):773–83.
130. Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, Kusano M, Consonni C, Panstruga R, et al. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2009 Sep;21(9):2914–27.
131. Zhang B, Shao L, Wang J, Zhang Y, Guo X, Peng Y, et al. Phosphorylation of ATG18a by BAK1 suppresses autophagy and attenuates plant resistance against necrotrophic pathogens. *Autophagy.* 2021 Sep;17(9):2093–110.
132. Lal NK, Thanasuwat B, Huang PJ, Cavanaugh KA, Carter A, Michelmore RW, et al. Phytopathogen Effectors Use Multiple Mechanisms to Manipulate Plant Autophagy. *Cell Host Microbe.* 2020 Oct 7;28(4):558-571.e6.
133. Huang S, Zhang B, Chen W. Research Progress of ATGs Involved in Plant Immunity and NPR1 Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 9;22(22):12093.
134. Caarls L, Pieterse CMJ, Van Wees SCM. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front Plant Sci* [Internet]. 2015 Mar 25 [cited 2024 Apr 9];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2015.00170/full>

135. Qi J, Song CP, Wang B, Zhou J, Kangasjärvi J, Zhu JK, et al. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. *J Integr Plant Biol.* 2018 Sep;60(9):805–26.
136. Hilker M, Schmülling T. Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 2019 Mar;42(3):753–61.
137. Rose TL, Bonneau L, Der C, Marty-Mazars D, Marty F. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol Cell.* 2006 Jan;98(1):53–67.
138. Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, et al. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy.* 2006 Mar;2(1):2–11.
139. Pommerrenig B, Ludewig F, Cvetkovic J, Trentmann O, Klemens PAW, Neuhaus HE. In Concert: Orchestrated Changes in Carbohydrate Homeostasis Are Critical for Plant Abiotic Stress Tolerance. *Plant Cell Physiol.* 2018 Jul 1;59(7):1290–9.
140. Shin JH, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon JS, An G. OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. *Mol Cells.* 2009 Jan 31;27(1):67–74.
141. Luo L, Zhang P, Zhu R, Fu J, Su J, Zheng J, et al. Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2017;8:1459.
142. Chen L, Liao B, Qi H, Xie LJ, Huang L, Tan WJ, et al. Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy.* 2015;11(12):2233–46.

143. Dündar G, Shao Z, Higashitani N, Kikuta M, Izumi M, Higashitani A. Autophagy mitigates high-temperature injury in pollen development of *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol*. 2019 Dec 15;456(2):190–200.
144. Olenieva VD, Lytvyn DI, Yemets AI, Blume YB. Вплив голодування, осмотичного та сольового стресів на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. *Visnik Ukr Tov Genet Sel* [Internet]. 2017 [cited 2022 Nov 26];15(2):174–80. Available from: <http://utgis.org.ua/journals/index.php/VisnykUTGiS/article/view/876>
145. Blaber EA, Pecaat MJ, Jonscher KR. Spaceflight Activates Autophagy Programs and the Proteasome in Mouse Liver. *Int J Mol Sci*. 2017 Sep 27;18(10):E2062.
146. Li CF, Sun JX, Gao Y, Shi F, Pan YK, Wang YC, et al. Clinorotation-induced autophagy via HDM2-p53-mTOR pathway enhances cell migration in vascular endothelial cells. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 2;9(2):147.
147. Kordyum EL. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *Plant Biol Stuttg Ger*. 2014 Jan;16 Suppl 1:79–90.
148. Kordyum EL, Chapman DK. Plants and microgravity: Patterns of microgravity effects at the cellular and molecular levels. *Cytol Genet*. 2017 Mar 1;51(2):108–16.
149. Rosero A, Žársky V, Cvrčková F. AtFH1 formin mutation affects actin filament and microtubule dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*. 2013 Jan;64(2):585–97.
150. Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD. Autophagic Nutrient Recycling in *Arabidopsis* Directed by the ATG8 and ATG12 Conjugation Pathways. *Plant Physiol*. 2005 Aug;138(4):2097–110.

151. Plohovska SH, Krasnylenko YA, Yemets AI. Nitric oxide modulates actin filament organization in *Arabidopsis thaliana* primary root cells at low temperatures. *Cell Biol Int*. 2019;43(9):1020–30.
152. Villacampa A, Fañanás-Pueyo I, Medina FJ, Ciska M. Root growth direction in simulated microgravity is modulated by a light avoidance mechanism mediated by flavonols. *Physiol Plant*. 2022;174(3):e13722.
153. Zhang Y, Su J, Cheng D, Wang R, Mei Y, Hu H, et al. Nitric oxide contributes to methane-induced osmotic stress tolerance in mung bean. *BMC Plant Biol*. 2018 Sep 24;18(1):207.
154. Jiao Y, Srba M, Wang J, Chen W. Correlation of Autophagosome Formation with Degradation and Endocytosis Arabidopsis Regulator of G-Protein Signaling (RGS1) through ATG8a. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 27;20(17):4190.
155. Kamal KY, van Loon JJWA, Medina FJ, Herranz R. Differential transcriptional profile through cell cycle progression in *Arabidopsis* cultures under simulated microgravity. *Genomics*. 2019 Dec 1;111(6):1956–65.
156. Romano LE, van Loon JJWA, Izzo LG, Iovane M, Aronne G. Effects of altered gravity on growth and morphology in *Wolffia globosa* implications for bioregenerative life support systems and space-based agriculture. *Sci Rep*. 2024 Jan 3;14(1):410.
157. Shimazu T, Yuda T, Miyamoto K, Yamashita M, Ueda J. Growth and development in higher plants under simulated microgravity conditions on a 3-dimensional clinostat. *Adv Space Res*. 2001 Jan 1;27(5):995–1000.
158. Kuznetsov OA, Hasenstein KH. Intracellular magnetophoresis of amyloplasts and induction of root curvature. *Planta*. 1996;198(1):87–94.

159. Matía I, González-Camacho F, Herranz R, Kiss JZ, Gasset G, van Loon JJWA, et al. Plant cell proliferation and growth are altered by microgravity conditions in spaceflight. *J Plant Physiol.* 2010 Feb 15;167(3):184–93.
160. Sathasivam M, Hosamani R, K Swamy B, Kumaran G S. Plant responses to real and simulated microgravity. *Life Sci Space Res.* 2021 Feb;28:74–86.
161. Correll MJ, Pyle TP, Millar KDL, Sun Y, Yao J, Edelmann RE, et al. Transcriptome analyses of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in space: implications for gravity-responsive genes. *Planta.* 2013 Sep 1;238(3):519–33.
162. Shadrina RY, Yemets AI, Blume YB. Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на умови мікрогравітації. *Fakt Eksp Evolucii Org.* 2019 Aug 30;25:327–32.
163. 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.* 2019;43(9):1056–64.
164. Paul AL, Amalfitano CE, Ferl RJ. Plant growth strategies are remodeled by spaceflight. *BMC Plant Biol.* 2012 Dec 7;12(1):232.
165. Califar B, Sng NJ, Zupanska A, Paul AL, Ferl RJ. Root Skewing-Associated Genes Impact the Spaceflight Response of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2020;11:239.
166. Chen Q, Soulay F, Saudemont B, Elmayan T, Marmagne A, Masclaux-Daubresse CL. Overexpression of ATG8 in *Arabidopsis* Stimulates Autophagic Activity and Increases Nitrogen Remobilization Efficiency and Grain Filling. *Plant Cell Physiol.* 2019 Feb 1;60(2):343–52.
167. Masclaux-Daubresse C, Chen Q, Havé M. Regulation of nutrient recycling *via* autophagy. *Curr Opin Plant Biol.* 2017 Oct 1;39:8–17.

168. Lytvyn D, Yemets A, Blume Y. α -tubulin acetylation and detyrosination correlate with starvation-induced autophagy in tobacco cells. 2017.
169. Moriyasu Y, Hattori M, Jauh GY, Rogers JC. Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. *Plant Cell Physiol.* 2003 Aug;44(8):795–802.
170. Chazotte B. Labeling Lysosomes in Live Cells with LysoTracker. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011 Feb 1;2011(2):pdb.prot5571.
171. Marion J, Le Bars R, Besse L, Batoko H, Satiat-Jeunemaitre B. Multiscale and Multimodal Approaches to Study Autophagy in Model Plants. *Cells.* 2018 Jan;7(1):5.
172. Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and Regulation of Starvation-Induced Autophagy in the Drosophila Fat Body. *Dev Cell.* 2004 Aug 1;7(2):167–78.
173. Yemets A, Shadrina R, Blume R, Plokhovska S, Blume Y. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. *Npj Microgravity.* 2024 Mar 18;10(1):1–16.
174. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy.* 2021 Jan;17(1):1–382.
175. Dong J, Chen W. The role of autophagy in chloroplast degradation and chlorophagy in immune defenses during Pst DC3000 (AvrRps4) infection. *PloS One.* 2013;8(8):e73091.
176. Ryu HW, Choi SH, Namkoong S, Jang IS, Seo DH, Choi I, et al. Simulated microgravity contributes to autophagy induction by regulating AMP-activated protein kinase. *DNA Cell Biol.* 2014 Mar;33(3):128–35.

177. Khan M, Al Azawi TNI, Pande A, Mun BG, Lee DS, Hussain A, et al. The Role of Nitric Oxide-Induced ATILL6 in Growth and Disease Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2024 Apr 11];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.685156/full>
178. Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F, Santa-María GE. Plant Survival in a Changing Environment: The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress. *Front Plant Sci* [Internet]. 2015 Nov 9 [cited 2024 Apr 11];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2015.00977/full>
179. Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell Environ*. 2017;40(4):462–72.
180. Amnan MAM, Pua TL, Lau SE, Tan BC, Yamaguchi H, Hitachi K, et al. Osmotic stress in banana is relieved by exogenous nitric oxide. *PeerJ*. 2021 Feb 9;9:e10879.
181. Nasir NNM, Ho CL, Lamasudin DU, Saidi NB. Nitric oxide improves tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 in banana. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2020 Aug 1;111:101503.
182. Gilroy S, Białasek M, Suzuki N, Górecka M, Devireddy AR, Karpiński S, et al. ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *Plant Physiol*. 2016 Jul;171(3):1606–15.
183. Mugnai S, Pandolfi C, Masi E, Azzarello E, Monetti E, Comparini D, et al. Oxidative Stress and NO Signalling in the Root Apex as an Early Response to Changes in Gravity Conditions. *BioMed Res Int*. 2014 Aug 17;2014:e834134.
184. Pedroso MC, Durzan DJ. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. *Ann Bot*. 2000 Nov;86(5):983–94.

185. Paris R, Vazquez M, Graziano M, Terrile M, Miller N, Spalding E, et al. Distribution of Endogenous NO Regulates Early Gravitropic Response and PIN2 Localization in Arabidopsis Roots. *Front Plant Sci.* 2018 Apr 1;9:495.
186. Plokhovska SH, Shadrina RYu, Kravets OA, Yemets AI, Blume YaB. The Role of Nitric Oxide in the *Arabidopsis thaliana* Response to Simulated Microgravity and the Involvement of Autophagy in This Process. *Cytol Genet.* 2022 Jun 1;56(3):244–52.
187. Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta.* 2006 May;223(6):1154–64.
188. Wang Z, Ma R, Zhao M, Wang F, Zhang N, Si H. NO and ABA Interaction Regulates Tuber Dormancy and Sprouting in Potato. *Front Plant Sci* [Internet]. 2020 Apr 8 [cited 2024 Apr 11];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00311/full>
189. Sun H, Feng F, Liu J, Zhao Q. Nitric Oxide Affects Rice Root Growth by Regulating Auxin Transport Under Nitrate Supply. *Front Plant Sci.* 2018 May 23;9:659.
190. Strohm AK, Baldwin KL, Masson PH. Multiple roles for membrane-associated protein trafficking and signaling in gravitropism. *Front Plant Sci* [Internet]. 2012 [cited 2024 Apr 11];3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518769/>
191. Hu RG, Sheng J, Qi X, Xu Z, Takahashi TT, Varshavsky A. The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. *Nature.* 2005 Oct;437(7061):981–6.

192. Correa-Aragunde N, Cejudo FJ, Lamattina L. Nitric oxide is required for the auxin-induced activation of NADPH-dependent thioredoxin reductase and protein denitrosylation during root growth responses in arabidopsis. *Ann Bot.* 2015 Sep;116(4):695–702.
193. Beckman JS, Chen J, Crow JP, Ye YZ. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res.* 1994;103:371–80.
194. Siamwala JH, Majumder S, Tamilarasan KP, Muley A, Reddy SH, Kolluru GK, et al. Simulated microgravity promotes nitric oxide-supported angiogenesis via the iNOS-cGMP-PKG pathway in macrovascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 2010 Aug 4;584(15):3415–23.
195. Rizzo AM, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, Berselli P, Marciani P, et al. Simulated microgravity induce glutathione antioxidant pathway in *Xenopus laevis* embryos. *Cell Biol Int.* 2009 Aug;33(8):893–8.
196. Lin J, Wang L. Oxidative Stress in Oocytes and Embryo Development: Implications for In Vitro Systems. *Antioxid Redox Signal.* 2020 Dec 8;
197. Ємець АІ, Плоховська СГ, Шадріна РЮ, Кравець ОА, Блюм ЯБ. Elucidation of cellular mechanisms of autophagy involvement in plant adaptation to microgravity conditions. *Космічна Наука І Технологія.* 2023;29(2):22–31.
198. Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W. Nitric Oxide Mediates Gravitropic Bending in Soybean Roots. *Plant Physiol.* 2005 Feb;137(2):663–70.
199. Xiong J, Li Y, Nie J. Effects of simulated microgravity on nitric oxide level in cardiac myocytes and its mechanism. *Sci China C Life Sci.* 2003 Jun;46(3):302–9.

200. Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, et al. Complex Inhibitory Effects of Nitric Oxide on Autophagy. *Mol Cell*. 2011 Jul 8;43(1):19–32.
201. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Veldhuijzen JP, Van Loon JJWA. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR*. 2003;32(8):1551–9.
202. Cao Y jing, Fan X jun, Shen Z, Ma B hua, Duan E kui. Nitric oxide affects preimplantation embryonic development in a rotating wall vessel bioreactor simulating microgravity. *Cell Biol Int*. 2007 Jan 1;31(1):24–9.
203. Yun BW, Skelly MJ, Yin M, Yu M, Mun BG, Lee SU, et al. Nitric oxide and S-nitrosoglutathione function additively during plant immunity. *New Phytol*. 2016 Jul;211(2):516–26.
204. de Angeli A, Thomine S, Frachisse JM, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H. Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett*. 2007 May 25;581(12):2367–74.
205. Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, et al. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB PLANTS*. 2013;5:pls052.
206. Kordyum EL, Shevchenko GV, Yemets AI, Nyporko AI, Blume YB. Application of GFP technique for cytoskeleton visualization onboard the International Space Station. *Acta Astronaut*. 2005 Mar;56(6):613–21.
207. Kato S, Murakami M, Saika R, Soga K, Wakabayashi K, Hashimoto H, et al. Suppression of Cortical Microtubule Reorientation and Stimulation of Cell Elongation in Arabidopsis Hypocotyls under Microgravity Conditions in Space. *Plants*. 2022 Feb 8;11(3):465.

208. Shevchenko GV, Kordyum EL. Organization of cytoskeleton during differentiation of gravisensitive root sites under clinorotation. *Adv Space Res.* 2005 Jan 1;35(2):289–95.
209. Perrin RM, Young LS, Murthy U M N, Harrison BR, Wang Y, Will JL, et al. Gravity signal transduction in primary roots. *Ann Bot.* 2005 Oct;96(5):737–43.
210. Kiss JZ, Wolverton C, Wyatt SE, Hasenstein KH, van Loon JJWA. Comparison of Microgravity Analogs to Spaceflight in Studies of Plant Growth and Development. *Front Plant Sci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 10];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01577>
211. Blancaflor EB, Hasenstein KH. Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots. *Planta.* 1993;191:231–7.
212. Himmelpach R, Wymer CL, Lloyd CW, Nick P. Gravity-induced reorientation of cortical microtubules observed in vivo. *Plant J.* 1999;18(4):449–53.
213. Yang X, Bassham DC. New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015;320:1–40.
214. Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33105–14.
215. Lystad AH, Simonsen A. Mechanisms and Pathophysiological Roles of the ATG8 Conjugation Machinery. *Cells.* 2019 Sep;8(9):973.
216. Wang P, Nolan TM, Yin Y, Bassham DC. Identification of transcription factors that regulate ATG8 expression and autophagy in *Arabidopsis*. *Autophagy.* 2020 Jan 2;16(1):123–39.
217. Lin LY, Chow HX, Chen CH, Mitsuda N, Chou WC, Liu TY. Role of autophagy-related proteins ATG8f and ATG8h in the maintenance of autophagic

activity in *Arabidopsis* roots under phosphate starvation. *Front Plant Sci.* 2023;14:1018984.

218. Crawford-Young SJ. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int J Dev Biol.* 2006;50(2–3):183–91.

219. Takahashi K, Takahashi H, Furuichi T, Toyota M, Furutani-Seiki M, Kobayashi T, et al. Gravity sensing in plant and animal cells. *NPJ Microgravity.* 2021 Feb 8;7(1):2.

220. Vorselen D, Roos WH, MacKintosh FC, Wuite GJL, van Loon JJWA. The role of the cytoskeleton in sensing changes in gravity by nonspecialized cells. *FASEB J.* 2014 Feb;28(2):536–47.

221. Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J.* 2008 Aug;6(6):609–18.

222. Li L, Li N, Fang H, Qi X, Zhou Y. Selection and Validation of Reference Genes for Normalisation of Gene Expression in *Glehnia littoralis*. *Sci Rep.* 2020 Apr 30;10(1):7374.

223. Blume Y, Yemets A, Sheremet Y, Nyporko A, Sulimenko V, Sulimenko T, et al. Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on an *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells. *BMC Plant Biol.* 2010 Feb 18;10:29.

224. Marshall RS, Vierstra RD. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annu Rev Plant Biol.* 2018;69(1):173–208.

225. Yagyu M, Yoshimoto K. New insights into plant autophagy: molecular mechanisms and roles in development and stress responses. *J Exp Bot.* 2024 Feb 28;75(5):1234–51.
226. Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):105–12.
227. Feng Q, De Rycke R, Dagdas Y, Nowack MK. Autophagy promotes programmed cell death and corpse clearance in specific cell types of the *Arabidopsis* root cap. *Curr Biol.* 2022 May 9;32(9):2110-2119.e3.
228. Baba AI, Mir MY, Riyazuddin R, Cséplő Á, Rigó G, Fehér A. Plants in Microgravity: Molecular and Technological Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 11;23(18):10548.
229. Ageeva-Kieferle A, Georgii E, Winkler B, Ghirardo A, Albert A, Hüther P, et al. Nitric oxide coordinates growth, development, and stress response via histone modification and gene expression. *Plant Physiol.* 2021 Sep 1;187(1):336–60.
230. Khan M, Ali S, Al Azzawi TNI, Yun BW. Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan;24(5):4782.
231. Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes *. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):36303–16.
232. Aniento F, Sánchez de Medina Hernández V, Dagdas Y, Rojas-Pierce M, Russinova E. Molecular mechanisms of endomembrane trafficking in plants. *Plant Cell.* 2022 Jan 1;34(1):146–73.
233. Schepers J, Behl C. Lipid droplets and autophagy—links and regulations from yeast to humans. *J Cell Biochem.* 2021;122(6):602–11.

234. Seta Y, Kawakatsu K, Degawa S, Goto T, Nishikata T. Morphological Evidence for Novel Roles of Microtubules in Macrophage Phagocytosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 10;24(2):1373.

235. Xie G, Jin H, Mikhail H, Pavel V, Yang G, Ji B, et al. Autophagy in sarcopenia: Possible mechanisms and novel therapies. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2023 Sep;165:115147.

236. 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.

ДОДАТОК
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті:

1. Yemets A, **Shadrina R**, Blume R, Plokhovska S, Blume Y. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of ATG8 and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*. *npj Microgravity*. 2024 Mar 18;10(1):1–16. doi: 10.1038/s41526-024-00381-9. (Особистий внесок – проведення молекулярно-біологічного аналізу, лазерної та конфокальної мікроскопії, узагальнення результатів, підготовка матеріалів для публікації). (Scopus/WoS, **Q1**, IF -5.1).
2. Yemets AI, Plokhovska SH, **Shadrina RYu**, Kravets OA, Blume YaB. Elucidation of cellular mechanisms of autophagy involvement in plant adaptation to microgravity conditions. *Space Sci. & Technol.* 2023;29(2):22–31. <https://doi.org/10.15407/knit2023.02.022> (Особистий внесок – приймала участь в проведенні експериментальних досліджень, аналізі результатів та підготовці статті). (Scopus/WoS, **Q4**).
3. Plokhovska SH, **Shadrina RYu**, Kravets OA, Yemets AI, Blume YaB. The Role of Nitric Oxide in the *Arabidopsis thaliana* Response to Simulated Microgravity and the Involvement of Autophagy in This Process. *Cytol Genet.* 2022 Jun 1;56(3):244–52. doi: 10.3103/S0095452722030100. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, формування матеріалів для публікації). (Scopus/WoS, **Q4**, IF – 0.5).
4. **Шадріна РЮ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Розвиток аутофагії як адаптивної відповіді рослин *Arabidopsis thaliana* на умови мікрогравітації. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2019 Серпень 30;25:327–32. doi:10.7124/FEEO.v25.1186. (Особистий внесок – участь у виконанні всіх експериментів, обробці даних та написанні статті).

Тези:

5. **Shadrina RYu**, Arslan SH, Yemets AI. Development of autophagy on simulated microgravity in plants and the role of microtubules in this process. В: Наукове видання під загальною редакцією Блюма ЯБ. Тези доп. IV конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія»; 2024 трав. 16-18; Київ, Україна. Київ: 2024. С. 14
6. Plokhovska SH, Kravets OA, **Shadrina RYu**, Yemets AI, Blume YaB. Crosstalk between nitric oxide and melatonin signalling molecules in *Arabidopsis* under simulated microgravity. В: Наукове видання під загальною редакцією Соколова ВМ. Тези доп. Міжнародна наукова інтернет-конференція «Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи»; 2022 жовт. 26; Одеса, Україна. 2022. С. 144-145.
7. Blume YaB, Plokhovska SH, **Shadrina RYu**, Kravets OA, Yemets AI. The role of nitric oxide in *Arabidopsis thaliana* response to simulated microgravity and the participation of autophagy in the mediation of this process. In: Manolis KG, editor. Abstracts. 44th COSPAR Sci. Assembly; 2022 Jul 16-24; Athens, Greece. 2022. P. 2902.
8. **Шадріна РЮ**, Плоховська СГ, Горюнова ІІ, Кравець ОА, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Розвиток стрес-індукованої автофагії у відповіді рослин на умови мікрогравітації та радіаційне опромінення. В: Ульянченко ОВ, редактор. Тези доп. Міжнародна науково-практична конференція «Стрес і адаптація рослин»; 2021 лют. 25-26; Харків, Україна. Вісник ХНАУ: Серія Біологія. 2021. С. 71.
9. **Shadrina RYu**, Horiunova II, Yemets AI. Changes in atg8 and tua gene expression during autophagy induced by microgravity condition in *Arabidopsis thaliana*. В: Наукове видання під загальною редакцією Отченашко ВВ. Тези доп. IX Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція студентів,

аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2021 трав. 20-21; Київ, Україна. 2021. С. 96.

10. **Shadrina RYu**, Horiunova II, Yemets AI. Transcriptome analysis of atg8 and tua genes involved in process of autophagy induced by microgravity stress. In: Scientific publication under the general editorship by Skrypnyk NV. Abstr. XVIII International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: bioscience advances»; 2020 May 2; Kyiv, Ukraine. 2020. P. 140.
11. **Shadrina R**, Yemets A, Blume Y. Autophagy development in *Arabidopsis thaliana* under microgravity. Plant Biology (PB19) & Plant Synthetic Biology Major Symposium organized by ASPB (American Society of Plant Biologists); 2019 Aug; San Jose, CA, USA. 2019. P. 297.
12. **Шадріна РЮ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Дослідження морфологічних ознак аутофагії в коренях *Arabidopsis thaliana* в умовах зміненої гравітації. В: Сибірний АА, редактор. Тези доп. 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології; 2019 черв. 18-21; Яремче, Україна. 2019. С. 155.