

УДК: 57.017.3+ 58.01/07+ 57.052

## **ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ $\alpha$ -ТУБУЛИНА КАК ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ НА ИНДУКЦИЮ АУТОФАГИИ У *ARABIDOPSIS THALIANA* РАЗЛИЧНЫМИ СТРЕССОВЫМИ ФАКТОРАМИ**

ЛИТВИН Д.И., ОЛЕНЕВА В.Д., ЕМЕЦ А.И., БЛЮМ Я.Б.

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев  
E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

*Для изучения роли ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализации аутофагии, индуцированной различными стрессовыми факторами, с помощью Вестерн-блот анализа определены уровни этой посттрансляционной модификации у растений *Arabidopsis thaliana*, подвергшихся воздействию таких абиотических факторов, как солевой и осмотический стресс, голодание или ультрафиолет-В. Показано существенное повышение уровней ацетилированного  $\alpha$ -тубулина при развитии аутофагии, которые снижались при синергическом влиянии стрессовых воздействий и ингибитора аутофагии Е-64. Для изучения тканеспецифичности данной модификации был также проведен иммуногистохимический анализ ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в проростках *A. thaliana*. В результате этих экспериментов удалось обнаружить, что индуцируемое стрессом ацетилирование  $\alpha$ -тубулина имеет тканеспецифический характер, в частности, проявляясь наиболее выражено в молодых и меристематических тканях, а также в тканях корней (корневом чехлике, эпидермисе и перичикле). Полученные результаты могут служить подтверждением регуляторной роли ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализации аутофагии как адаптивной реакции на воздействие стрессовых факторов у растений.*

**Ключевые слова:**  *$\alpha$ -тубулин; ацетилирование; аутофагия; *Arabidopsis thaliana*; голодание, ультрафиолет-В, солевой стресс, осмотический стресс; иммуногистохимический анализ*

**Введение.** Аутофагия, как внутриклеточный катаболический процесс, является высококонсервативным механизмом, присущим всем эука-

риотам, в частности, растениям [1–3]. Процесс аутофагии предполагает деградацию и рециркуляцию поврежденных макромолекул и органелл, как при физиологических условиях, так и в ответ на патогенную инвазию или воздействие стрессовых факторов [2, 4–6]. Известно, что одним из ключевых звеньев реализации аутофагии являются микротрубочки [7]. В частности, в экспериментах с клетками животных было показано, что микротрубочки опосредуют биогенез аутофагосом и их внутриклеточный транспорт [8, 9]. Индукция и реализация данного внутриклеточного механизма зависит от функционального состояния цитоскелета, в частности, требует стабилизации микротрубочек путем посттрансляционного ацетилирования  $\alpha$ -тубулина при развитии аутофагии в клетках животных, индуцированной голоданием [10]. В этой же работе было показано, что ацетилирование  $\alpha$ -тубулина микротрубочек вызывает усиленное вовлечение кинезина-1, последующую активацию JNK1-киназы, фосфорилирование Bcl-2, высвобождение Beclin1 из комплекса Bcl-2-Beclin1 и дальнейшее формирование аутофагосом. Также на культуре клеток HeLa была продемонстрирована роль ацетилирования микротрубочек в процессе слияния новообразованных аутофагосом с лизосомами и формирования аутолизосом [11].

© ЛИТВИН Д.И., ОЛЕНЕВА В.Д., ЕМЕЦ А.И., БЛЮМ Я.Б., 2018

При исследовании механизмов индукции аутофагии у растений было показано, что в клетках суспензионной культуры табака BY-2 (*Nicotiana tabacum*) [12], так же, как и в клетках проростков *Arabidopsis thaliana* [13], развитие стресс-индуцированной аутофагии строго сопровождается повышением уровня ацетилирования  $\alpha$ -тубулина. Однако вопрос взаимосвязи микротрубочек с базовыми элементами аутофагии у растений все еще является малоизученным [14]. Ранее нами было показано повышение уровней экспрессии гена *elp3*, продукт которого выполняет ацетилтрансферную функцию в клетках растений [15], в частности, в период реализации стресс-индуцированной аутофагии [16], что также опосредованно подтверждает роль ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализации данного адаптивного механизма [17]. Поэтому в настоящей работе нами была предпринята попытка проанализировать изменения уровней ацетилированного  $\alpha$ -тубулина при развитии аутофагии, индуцированной абиотическими стрессовыми факторами с экстраполяцией на тканеспецифичность данной модификации путем иммуногистохимического анализа ацетилирования микротрубочек при вышеупомянутых экспериментальных условиях.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на 7-дневных проростках *A. thaliana* экотипа Columbia 0. Проростки выращивали на стандартной среде Мурасиге-Скуга, которая содержала 10 г/мл глюкозы, рН 5,8, в климатической камере при температуре 24 °C и длине светового и темного периодов 16/8 ч с интенсивностью освещения 3200 люкс. Облучение УФ-В осуществляли при помощи ультрафиолетовой лампы TL 20W/12RS («Philips», Великобритания) в дозе 41 кДж/м<sup>2</sup>. Для исключения длин волн спектра УФ-С и коротковолнового диапазона УФ-В использовали полистироловый светофильтр [18]. Проростки анализировали через 24 ч после облучения. Условия солевого стресса моделировали путем модификации питательной среды, содержащей 150 мМ NaCl и 10 мМ маннитола

для моделирования осмотического стресса, соответственно. Для моделирования условий голодания проростки проращивали на среде без сахарозы.

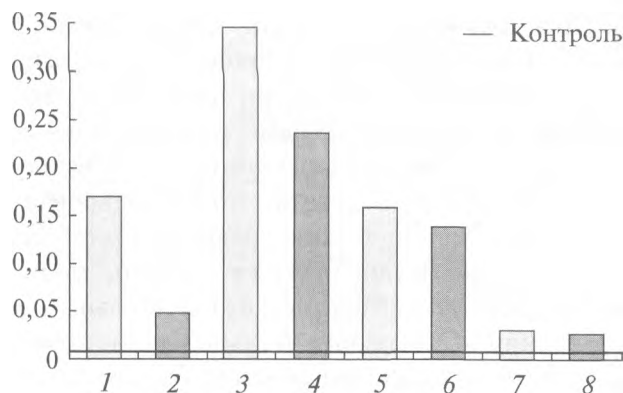
Для исследования аутофагии использовали высокоселективный ингибитор цистеиновых протеаз E-64 в концентрации 10 мкМ. В качестве ингибитора лизосомных протеаз это вещество подавляет процесс аутофагии на стадии деградации содержимого литических компартментов после слияния аутофагосом с лизосомами и формирования аутолизосом. Обработку проростков E-64 проводили за 1 сутки до анализа в случае голодания, солевого и осмотического стрессов (растения проращивали на соответствующих средах) или за 1 сутки до облучения УФ-В.

Подготовку образцов для электрофореза и последующего Вестерн-блот анализа проводили согласно протоколу, разработанному ранее [13]. Растворы для проведения исследований готовили используя буфер TBS-T, содержащий 20 мМ Трис(гидроксиметил)-аминометана, 150 мМ NaCl и 0,1%-ный Tween-20, рН 7,6. В качестве первичных антител использовали: моноклональные антитела к  $\alpha$ -тубулину класса IgG (TU-16, Thermo, MA1-19209) в концентрации 1 мкг/мл и моноклональные антитела к ацетилированному  $\alpha$ -тубулину (Ac-tubulin mouse, Sigma, T6793) в концентрации 500 нг/мл. Инкубацию с первичными антителами проводили в течении ночи при 4 °C на горизонтальном шейкере. Затем отмывали мембрану 4 раза по 5 мин в буфере TBS-T и инкубировали 1 ч с антителами против IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1:10000 («Sigma», США). После этого отмывали мембрану, как описано выше, и визуализировали с помощью набора ECL («Bio-Rad», США).

Для приготовления гистологических срезов для иммуногистохимического анализа ацетилирования  $\alpha$ -тубулина 7-дневные проростки *A. thaliana* фиксировали с помощью фиксатора Буэна в течение 24 ч. Дегидратацию образцов выполняли последовательно инку-

бируя образцы в растворах этанола разной плотности, начиная с 20%-ного, с шагом в 10 % (по 30 мин на каждый этап). Для формирования гистологических блоков образцы инкубировали 1 ч в ксилоле, 1 ч в ксилоле с парафином 1 : 1, и дважды по 1 часу в чистом парафине Paraplast X-tra («Sigma», США). Через 1 сутки, после окончательного застывания, парафиновые блоки нарезали на микротоме на срезы толщиной 10 мкм, срезы помещали на поли-L-лизиновые стекла. Для дальнейшего иммуногистохимического анализа срезы депарафинизировали с помощью обработки ксилолом трижды по 10 мин и регидратировали (100%-, 96%- и 70%-ным спиртом и деионизированной водой). Растворы для проведения эксперимента готовили используя буфер PBS-T, содержащий 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 0,05%-ный Tween-20, pH 7,4. Блокирование сайтов неспецифического связывания антител выполняли как описано выше. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к ацетилированному  $\alpha$ -тубулину мышей («Sigma», США) в разведении 1:100. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при температуре +4 °С. Инкубацию с вторичными антителами против IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена («Sigma», США) в разведении 1 : 100, проводили в течение 1 ч, после чего срезы отмывали, как описано выше, и окрашивали с помощью набора DAB Substrate Kit («Pierce», США), согласно методике производителя. Для анализа образцов срезы были заключены под покровные стекла с использованием DEPEX Mounting Media («ERVA», США).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для исследования регуляторной роли ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализации аутофагии, индуцированной влиянием абиотических стрессов, изначально было доказано, что воздействие стрессовых факторов в аналогичных концентрациях и дозах имело следствием развитие аутофагии в проростках *A. thaliana*



**Рис. 1.** Уровни ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в проростках *A. thaliana*, выращенных в условиях воздействия абиотических стрессов, а также синергического влияния стрессовых факторов и ингибирования аутофагии. По горизонтали – 1 – голодание; 2 – голодание + E-64; 3 – УФ-В; 4 – УФ-В + E-64; 5 – солевой стресс; 6 – солевой стресс + E-64; 7 – осмотический стресс; 8 – осмотический стресс + E-64. По вертикали – соотношение Ас- $\alpha$ -тубулин/тотальный  $\alpha$ -тубулин

*ana* [13]. Как известно, посттрансляционный процессинг белка Atg8, структурной молекулы аутофagosом, является необходимым для формирования аутофagosомной мембраны, следовательно, может служить неоспоримым доказательством развития аутофагии в клетках. Ранее, используя созданную линию *A. thaliana*, стабильно экспрессирующую слитый белок Atg8h-GFP, нами было показано значительное повышение уровня свободного белка GFP по отношению к химерному белку Atg8-GFP под воздействием абиотических стрессов. Принимая во внимание, что процессинг Atg8 предполагает отщепление С-конца его молекулы и присоединения фосфатидилэтанол-амин, с помощью которого будет осуществляться процесс заякоривания Atg8 в аутофagosомную мембрану, повышение уровня свободного GFP подтверждает, что исследуемые абиотические факторы индуцируют развитие аутофагии у арабидопсиса.

Поэтому дальнейшим этапом нашего исследования стало проведение Вестерн-блот анализа ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в условиях развития стресс-индуцированной аутофагии.

Для исследования роли ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализации процесса аутофагии нами был проведен Вестерн-блот анализ образцов с использованием моноклональных антител к ацетилированному  $\alpha$ -тубулину (рис. 1). Следует отметить, что ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в контрольных растениях выявлено не было, или же уровень модифицированного белка был незначительным в сравнении с экспериментальными растениями. Было показано повышение уровня модифицированного белка при воздействии всех исследуемых абиотических факторов. В качестве контроля подсчета ацетилированного  $\alpha$ -тубулина использовали уровень тотального  $\alpha$ -тубулина. Важно заметить, что наиболее существенно уровень ацетилированного тубулина повышался в ответ на условия голодания, солевого стресса и облучения УФ-В.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что ацетилирование  $\alpha$ -тубулина у растений, так же, как и микротрубочки в целом, выполняют схожую роль в реализации аутофагии, как и в клетках животных. На клетках HeLa было показано, что в условиях голодания формирование аутофагосом происходит при участии микротрубочек и может быть следствием гиперацетилирования тубулина, что способствует привлечению кинезина-1 [10]. Ацетилированные микротрубочки принимают участие в слиянии аутофагосом с лизосомами для образования аутолизосом [19], однако, вероятно, что процессы биогенеза аутофагосом реализуются при участии динамических популяций микротрубочек, а их транспорт — при участии стабильных популяций [7], причем, важная роль в опосредовании обоих процессов может принадлежать ацетилированию тубулина [10]. Ранее были получены биохимические доказательства присутствия ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в составе различных структур микротрубочек табака (препрофазная лента, митотическое веретено, интерфазные кортикальные микротрубочки, фрагмопласт) [20], а также и для многих видов растений [21]. Как уже упо-

миналось выше, эта модификация вовлечена в стабилизацию микротрубочек [10] и, как показано в случае исследования на *Brassica rapa*, является тканеспецифической [22].

Следует отметить, что при изучении уровней ацетилирования тубулина в условиях синергического влияния абиотических стрессов и ингибирования аутофагии, нами было показано снижение количества модифицированного белка в сравнении с аналогичными показателями, полученными для проростков без предварительной обработки Е-64. Показатели соотношения ацетилированного  $\alpha$ -тубулина к тотальному  $\alpha$ -тубулину существенно снижались в условиях голодания и облучения УФ-В (в 1,5 и 3,5 раза, соответственно). В случае одновременного ингибирования аутофагии и воздействия солевого и осмотического стрессов снижение количества модифицированного белка было незначительным по сравнению с результатами воздействия других стрессовых факторов. Снижение уровня ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в условиях синергического влияния и абиотических стрессов указывают на адаптивную роль аутофагии в ответ на воздействие абиотических стрессов. Таким образом, поскольку ацетилирование  $\alpha$ -тубулина является регуляторной модификацией в ходе развития аутофагии, существенное повышение уровня ацетилированного тубулина в клетках растений может служить своеобразным индикатором протекания аутофагии в данных клетках.

Это предположение и послужило отправной точкой для исследования тканеспецифичности ацетилированного  $\alpha$ -тубулина с помощью иммуногистохимической детекции этой модификации в соответствующих образцах из проростков *A. thaliana*, подвергнутых влиянию исследуемых стрессовых факторов. В результате проведенной работы, было показано повышение в той или иной мере уровня ацетилированного  $\alpha$ -тубулина при воздействии всех исследуемых стрессов (рис. 2–5). Следует отметить, что данная модификация носила ярко выраженный тканеспецифический ха-

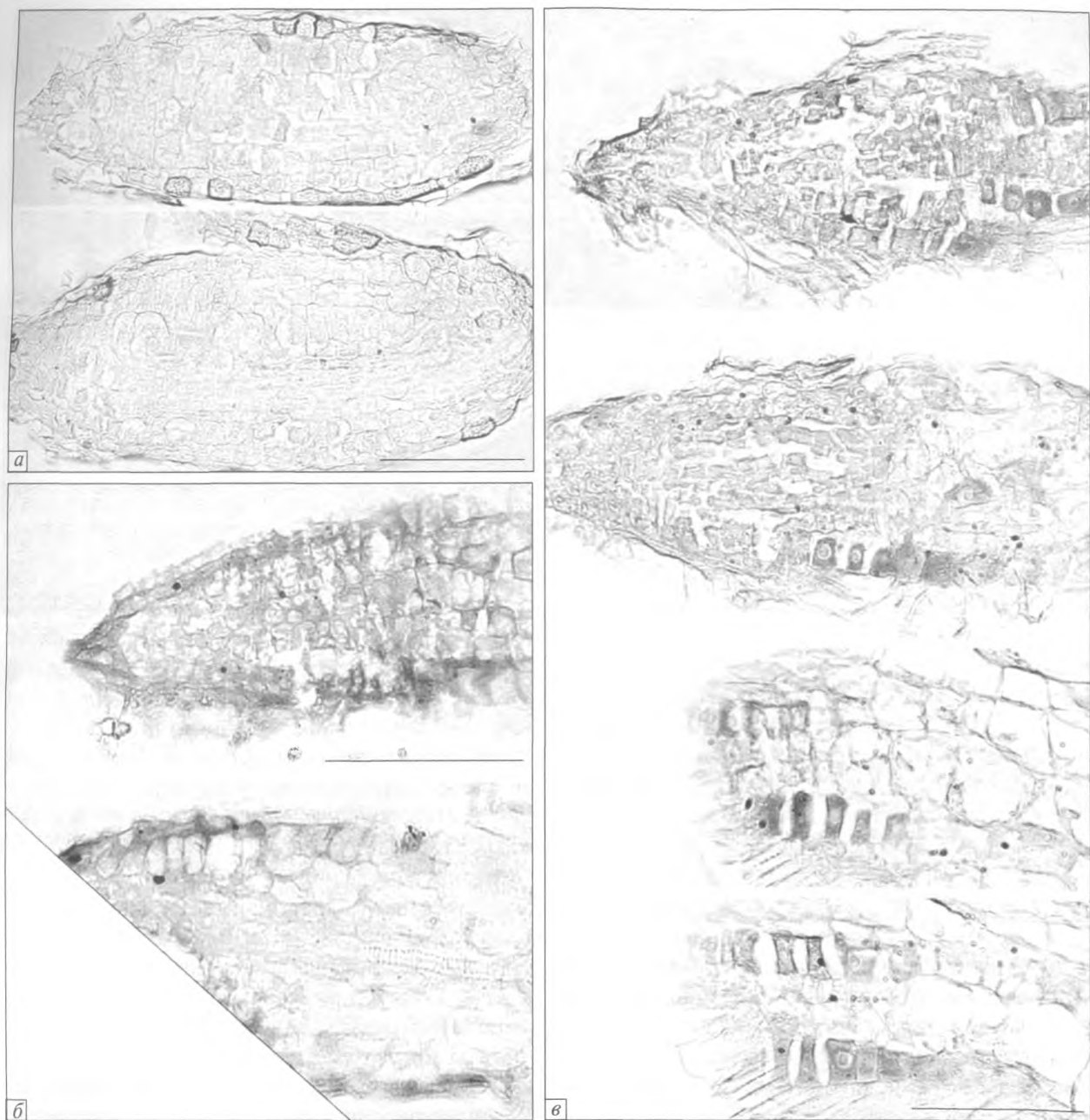
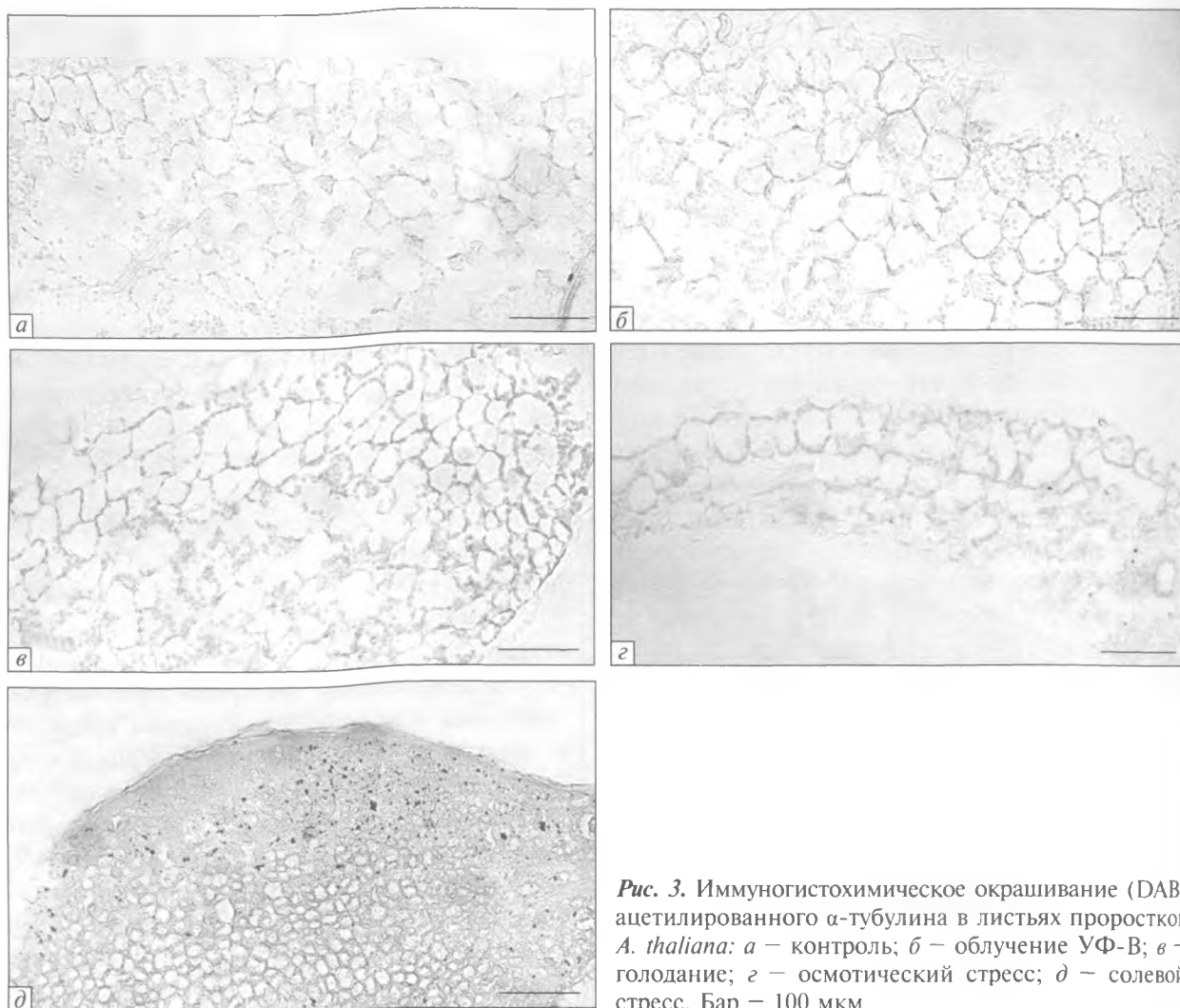


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание 3,3'-Диаминобензидин (DAB) ацелированного  $\alpha$ -тубулина в продольных срезах корней проростков *A. thaliana*: а – контроль; б – голодание; в – облучение УФ-В. Бар – 100 мкм

рактир, который проявлялся в различном распределении пучков ацелированных микротрубочек в проростках *A. thaliana*. Прежде всего оказалось, что корни растений более чувствительны к влиянию стрессовых факторов,

в сравнении с листьями. В корнях контрольных растений был выявлен базовый уровень аутофагии лишь в нескольких клетках эпидермиса, который проявлялся в повышенном уровне ацелированного тубулина (рис. 2, а).



**Рис. 3.** Иммуногистохимическое окрашивание (DAB) ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в листьях проростков *A. thaliana*: *a* – контроль; *б* – облучение УФ-В; *в* – голодание; *г* – осмотический стресс; *д* – солевой стресс. Бар – 100 мкм

В свою очередь, корни экспериментальных растений демонстрировали гиперацетилирование  $\alpha$ -тубулина в зонах корневого чехлика, эпидермиса и перицикла. Наиболее активно процесс аутофагии происходил вследствие влияния голодания (рис. 2, *б*) и облучения УФ-В (рис. 2, *б*). Следует отметить, что уровень ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в гипокотылях экспериментальных растений практически не отличался от контроля, демонстрируя незначительное повышение модифицированного белка в клетках обкладки проводящих пучков (данные не показаны).

Здесь уместно напомнить, что клетки, ранее созданной нами линии *A. thaliana*, стабиль-

но экспрессирующей слитый белок Atg8h-eGFP, характеризовались диффузным распределением сигнала от Atg8h-GFP [13]. Однако, в результате воздействия изучаемых стрессовых факторов, в клетках наблюдалось появление сконцентрированных сигналов от химерного белка Atg8h-eGFP, что может интерпретироваться как свидетельство обнаружения мест локализации биогенеза аутофагосом. На 7-й день культивирования в стрессовых условиях отмечалось развитие и активное протекание процесса аутофагии в клетках корневого чехлика, эпидермиса, перицикла и клетках проводящих путей [13], что вместе с результатами проведенного иммуногистохимичес-

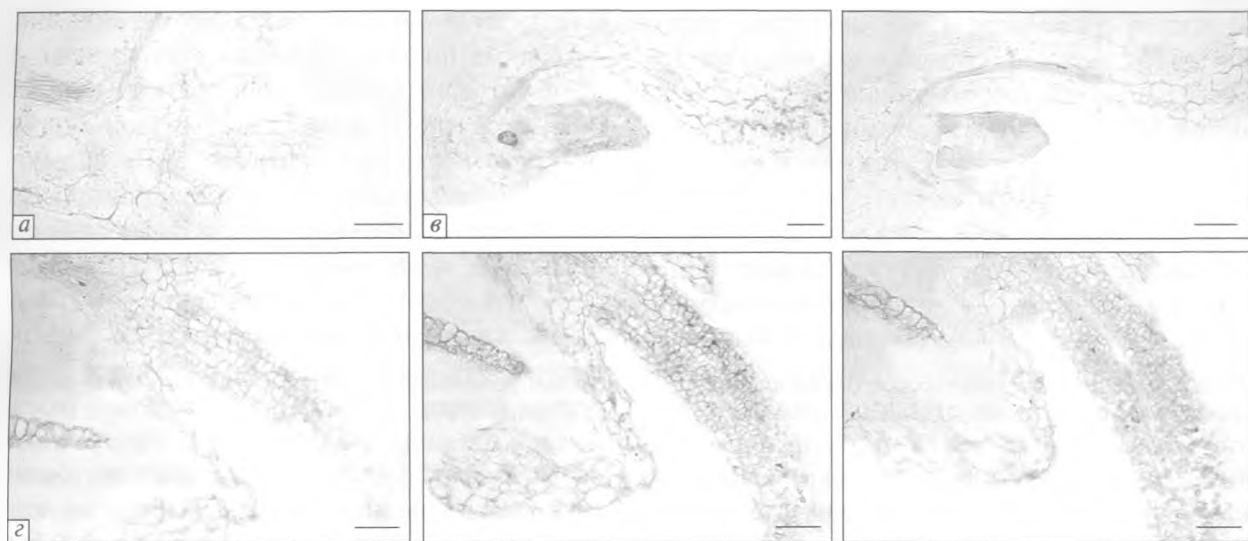


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание (DAB) ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в клетках продольных срезов зачаточных почек и молодых тканей *A. thaliana*: а – контроль; б – облучение УФ-В; в – осмотический стресс. Бар – 100 мкм

кого анализа ацетилирования тубулина подтверждает регуляторную роль данной модификации в реализации стресс-индуцированной аутофагии.

В целом, в отличие от корней, листья проростков проявили меньшую чувствительность к влиянию стрессовых факторов (рис. 3). Ультрафиолетовое облучение в дозе 41 кДж/м<sup>2</sup> не имело значительных последствий для распределения сигналов от ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в клетках листьев. В свою очередь, следствием голодания, так же, как осмотического и солевого стрессов, было повышение уровня ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в целом и, в особенности, в клетках столбчатой паренхимы.

Важно отметить, что молодые делящиеся ткани арабидопсиса обладали наибольшей чувствительностью к воздействию абиотических стрессов, что выражалось в гиперацетилировании  $\alpha$ -тубулина в меристематических клетках и клетках молодых тканей, что, следовательно, может быть сопряжено с особенностями протекания в них процессов аутофагии, индуцированной стресс факторами (рис. 4).

Параллельные срезы зачаточных почек демонстрируют тканеспецифичность вышеука-

занной модификации. Следует отметить, что такая особенность была зафиксирована после воздействия всех стрессовых факторов, однако, наиболее выражено она проявлялась в условиях облучения ультрафиолетом-В (рис. 5).

Эти результаты очень хорошо иллюстрируют тот факт, что ацетилированию  $\alpha$ -тубулина отводится одна из ключевых ролей в процессе реализации аутофагии, в том числе и как адаптивного ответа на воздействие стрессовых факторов [23, 24]. Данная пост-трансляционная модификация обеспечивает функциональное состояние микротрубочек, а именно, их стабилизацию, что может рассматриваться в качестве триггера для запуска последующих этапов индукции аутофагии, в частности, обеспечению эффективного взаимодействия с ними кинезина, потенциально участвующего в транспорте формирующихся аутофагосом [10]. Именно для клеток животных ранее уже было показано, что микротрубочки также принимают участие в транспорте зрелых аутофагосом для слияния с лизосомами и дальнейшего образования аутолизосом [7].

Исследование тканеспецифичности ацетилирования  $\alpha$ -тубулина позволяет нам выде-

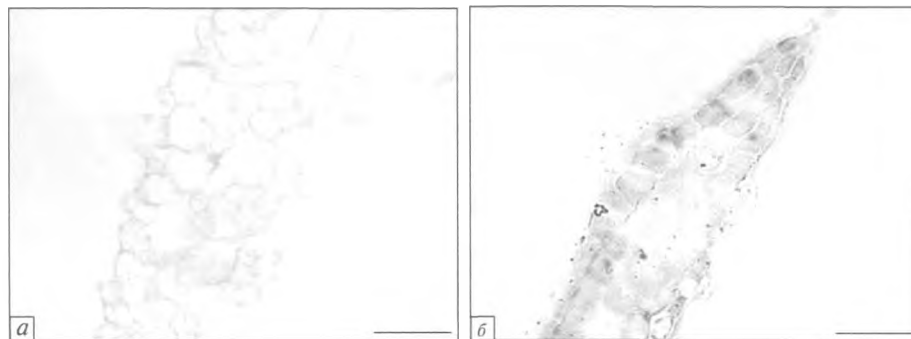


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание (DAB) ацетилированного  $\alpha$ -тубулина в клетках поперечных срезов молодых листьев *A. thaliana*: а – контроль; б – облучение УФ-В. Бар – 50 мкм

лить ткани и клетки растений, чувствительные к воздействию абиотических стрессов. В частности, было показано, что в результате воздействия стрессовых факторов наиболее ярко выраженный ответ в виде тканеспецифического гиперацетилирования  $\alpha$ -тубулина происходит в корнях проростков *A. thaliana*, а именно: в зонах корневого чехлика, эпидермиса и перикарпа. Можно предположить, что развитие аутофагии в клетках корневого чехлика является следствием влияния не только абиотических факторов, но и механического стресса, обусловленного прорастанием корня в питательную среду. Незначительное повышение уровня ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в листьях растений, при воздействии абиотических стрессов, может быть следствием как низкой чувствительности дифференцированных клеток листьев к влиянию данных факторов, так и результатом анатомических особенностей растений. А именно, клетки корня, контактируя с питательной средой и обеспечивая поглощение и транспорт воды и минеральных элементов к листьям, подвергаются влиянию голодания, осмотического и солевого стрессов раньше, нежели клетки листьев.

Гиперацетилирование  $\alpha$ -тубулина в клетках молодых листьев и зачаточных почек свидетельствует о высокой чувствительности клеток меристемы к воздействию абиотических стрессов. Анализируя данные, полученные на продольных срезах корней, было показано

повышение уровня ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в клетках перикарпа. Эти результаты подтверждают сделанные ранее выводы о более высокой чувствительности меристематических клеток к влиянию стрессовых факторов, ввиду того, что перикарп также является меристемой, и при делении и дифференциации клеток может дать начало зачаткам боковых корней [25]. Ранее было показано, что замена остатка Лиз-40 другими аминокислотными остатками в трансгенных линиях *A. thaliana* приводит к нарушениям деления клеток и их роста [26].

Очевидно, что ацетилирование  $\alpha$ -тубулина у растений может осуществляться с помощью Элонгатора – мультибелкового комплекса, состоящего из шести субъединиц (ELP1-6), который принимает участие во многих клеточных процессах у различных эукариот, в частности, ацетилировании гистонов во время транскрипции, модификации ТРНК, деметилировании ДНК [27], а также в формировании иммунитета растений и реализации адаптивной реакции в ответ на воздействие биотических и абиотических факторов [16, 28]. Субъединица ELP3 имеет метилтрансферазный, а также гистоацетилтрансферазный (НАТ) домены [27]. Последний из них способен обеспечивать ацетилирование  $\alpha$ -тубулина, что впервые было показано для нейронов человека [29].

У *A. thaliana* идентифицированы мутанты *elo1*, *elo2*, *elo3*, дефектные по генам субъеди-



ниц Элонгатора (ELP1-3) [30]. Мутант *elo3* характеризуется точечной заменой аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты, локализованного в НАТ домене и для всех ELP3 гомологов, на аспарагин. В целом, мутанты *elo* характеризуются плейотропным эффектом влияния на фенотип: сниженный темп роста первичных корней, измененная и уменьшенная архитектура соцветий растений, замедленный рост растений после прорастания семян и существенно задержанное прорастание семян у мутанта *elo3*. Толщина листьев мутантов по генам Элонгатора снижена, по сравнению с диким типом, вследствие уменьшенного количества клеток столбчатой паренхимы [30]. Мутант *elo3* проявляет наиболее серьезные последствия дефекта гена, а именно – уменьшение количества клеток столбчатой паренхимы до 52,4 % и соответствующего увеличения межклеточного пространства.

Принимая во внимание различные фенотипические проявления дефектов генов субъединиц Элонгатора, в частности *elp3*, можно предположить, что выше указанные последствия могут быть следствием снижения уровня ацетилирования  $\alpha$ -тубулина, как это отмечено у трансгенных линий *A. thaliana* с заменой ацетилируемого остатка Лиз-40 другими остатками [26]. Ранее нами получены результаты, позволяющие утверждать, что ацетилирование  $\alpha$ -тубулина является одним из ключевых звеньев в индукции и реализации аутофагии у растений [13, 32]. Все это позволяет предположить, что дефекты по генам Элонгатора, в частности *elp3*, будут вызывать нарушение процессов аутофагии. Ранее нами было показано, что при развитии стресс-индуцированной аутофагии происходит повышение уровня экспрессии гена *elp3* [17, 32], что опосредованно свидетельствует о регуляторной роли ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализации аутофагии, как адаптивной реакции в ответ на воздействие абиотических стрессов. Учитывая тот факт, что аутофагия в клетках растений выполняет не только защитную и адаптивную функции в ответ на воздействие стрес-

совых факторов, но и принимает участие в поддержании гомеостаза, росте и развитии растений, нарушения процессов данного механизма будут иметь негативные последствия для роста и развития растений.

Таким образом, нами было показано, что уровень ацетилирования  $\alpha$ -тубулина существенно возрастает при развитии аутофагии, индуцированной такими стрессовыми факторами, как голодание, УФ-В, солевой и осмотический стрессы, что свидетельствует в пользу регуляторной роли данной посттрансляционной модификации в реализации указанного процесса. Также было продемонстрировано, что синергическое влияние стрессовых факторов и ингибирование аутофагии приводят к снижению уровней ацетилирования  $\alpha$ -тубулина.

С помощью иммуногистохимического анализа ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в различных тканях проростков *A. thaliana* было показано, что эта модификация носит тканеспецифический характер. В частности, под влиянием исследуемых стрессовых факторов она наиболее выражено проявляется в молодых и меристематических тканях, а также в тканях корней (корневом чехлике, эпидермисе и перицикле). Полученные результаты служат еще одним подтверждением вовлечения ацетилирования  $\alpha$ -тубулина в реализацию механизмов аутофагии у растений.

#### IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TISSUE-SPECIFIC ACETYLATION OF $\alpha$ -TUBULIN AS A RESPONSE FOR AUTOPHAGY DEVELOPMENT IN *ARABIDOPSIS THALIANA* INDUCED BY DIFFERENT STRESSFUL STIMULI

*D.I. Lytvyn, V.D. Olenieva, A.I. Yemets, Ya.B. Blume*  
Institute of Food Biotechnology and Genomics  
of the Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Kyiv  
E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

In order to investigate the levels of post-translational  $\alpha$ -tubulin acetylation in *Arabidopsis thaliana* seedlings that were subjected to various abiotic stresses, such as salt and osmotic stress, starvation or ultraviolet-B, a Western blot analysis of  $\alpha$ -tubulin acetylation was conducted. It was shown a significant increase in the levels of acetylated  $\alpha$ -tubulin during the development of stress-induced au-

tophagy. It should be noted, that the synergistic action of abiotic factors and the inhibitor of autophagy E-64 caused the decrease of aforementioned indicators. By means of immunohistochemical analysis of  $\alpha$ -tubulin acetylation, it was demonstrated that this modification has a tissue-specific character, in particular, is most markedly manifested in young and meristematic tissues, as well as in root tissues (root cap, epidermis and pericycle cells). The obtained results can serve as confirmation of the regulatory role of  $\alpha$ -tubulin acetylation in realization of autophagy as a response to the influence of abiotic stresses in plants.

ГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ  
ТКАНИНОСПЕЦИФІЧНОГО АЦЕТИЛЮВАННЯ  
 $\alpha$ -ТУБУЛІНУ ЯК ВІДПОВІДІ НА ІНДУКЦІЮ  
АУТОФАГІЇ У *ARABIDOPSIS THALIANA*  
РІЗНИМИ СТРЕСОВИМИ ФАКТОРАМИ

Д.І. Литвин, В.Д. Оленева, А.І. Емец, Я.Б. Блюм

Інститут харчової біотехнології та геноміки  
НАН України, Київ

Було проведено Вестерн-блот аналіз ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну і визначено рівні цієї посттрансляційної модифікації у рослин *Arabidopsis thaliana*, що зазнавали впливу різних абіотичних факторів, таких, як сольовий та осмотичний стреси, голодування і ультрафіолет-В. Було показано суттєве підвищення рівнів модифікованого  $\alpha$ -тубуліну при розвитку стрес-індукованої аутофагії, що знижувалися за умов синергічного впливу абіотичних факторів та інгібітору аутофагії E-64. В результаті проведеного імуногістохімічного аналізу ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну було виявлено, що дана модифікація, яка індукується стресом, має тканиноспецифічний характер, зокрема, найбільш виражено проявляється у молодих та меристематичних тканинах, а також у тканинах коренів (кореновому чохлаку, епідермісі і перициклі). Отримані результати можуть слугувати підтвердженням регуляторної ролі ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну у реалізації аутофагії як відповіді на дію абіотичних стресів у рослин.

REFERENCES

1. Avin-Wittenberg, T., Honig, A., and Galili, G. Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals, *Protoplasma*, 2012, vol. 249, no. 2, pp. 285–99. doi: 10.1007/s00709-011-0296-z.
2. Liu, Y., Bassham, D.C., Autophagy: pathways for self-eating in plant cells, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2012, vol. 63, pp. 215–37. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105441.
3. Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A.R., and Avin-Wittenberg, T., Autophagy in plants-what's new on the menu? *Trends Plant Sci.*, 2016, vol. 21, no. 2, pp. 134–44. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.008.
4. Bassham, D.C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L.J., and Yoshimoto, K., Autophagy in development and stress responses of plants, *Autophagy*, 2006, vol. 2, no. 1, pp. 2–11.
5. Batoko, H., Dagdas, Y., Baluska, F., and Sirko, A., Understanding and exploiting autophagy signaling in plants, *Essays Biochem.*, 2017, vol. 61, no. 6, pp. 675–85. doi: 10.1042/EBC20170034.
6. Wang, P., Mugume, Y., and Bassham, D.C., New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017, pii: S1084-9521(17)30129-5. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.018.
7. Mackeh, R., Perdiz, D., Lorin, S., Codogno, P., and Poüs, C., Autophagy and microtubules – new story, old players, *J. Cell Sci.*, 2013, vol. 126, no. 5, pp. 1071–80. doi: 10.1242/jcs.115626
8. Köchl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y., and Tooze, S.A., Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes, *Traffic*. 2006, vol. 7, no. 2, pp. 129–45. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x.
9. Monastyrska I., Rieter E., Klionsky D.J., Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2009, vol. 84, no. 3, pp. 431–48. doi: 10.1111/j.1469-185X.2009.00082.x.
10. Geeraert, C., Ratier, A., Pfisterer, S.G., Perdiz, D., Cantaloube, I., Rouault, A., Pattingre, S., Proikas-Cezanne, T., Codogno, P., Poüs, C. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation, *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 31, pp. 24184–94. doi: 10.1074/jbc.M109.091553.
11. Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, W.L., and Liu, L., Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes, *BMC Cell Biol.*, 2010, vol. 11, 89 p. doi.org/10.1186/1471-2121-11-89
12. Lytvyn, D., Yemets, A., Bergounioux, C., and Blume, Ya.B. Development of autophagy in BY-2 (*Nicotiana tabacum*) cells is accompanied by acetylation of  $\alpha$ -tubulin, *Reports Natl. Acad. Sci. Ukraine*, 2013, vol. 5, pp. 179–85 (in Ukrainian).
13. Olenieva, V., Lytvyn, D., Yemets, A., Bergounioux, C., and Blume, Y., Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol. Int.*, 2017, doi: 10.1002/cbin.10842.
14. Lytvyn, D.I., Blume, Ya.B., *Microtubular cytoskeleton in autophagy and programmed cell death development in plants*, Nova Science Publishers: New York, 2016, pp. 1–34.
15. Tran, H.T., Nimick, M., Uhrig, R.G., Templeton, G., Morrice, N., Gourlay, R., DeLong, A., and Moorhead

- G.B. Arabidopsis thaliana histone deacetylase 14 (HDA14) is an  $\alpha$ -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3, *Plant J.*, 2012, vol. 71, no. 2, pp. 263–72. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04984.x.
16. Ding, Y., Mou, Z., Elongator and its epigenetic role in plant development and responses to abiotic and biotic stresses, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, 296 p. doi: 10.3389/fpls.2015.00296.
  17. Olenieva, V., Lytvyn, D., Yemets, A., and Blume, Ya. B., Influence of UV-B on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules, *Reports Natl. Acad. Sci. Ukraine*, 2018, vol. 1, pp. 100–9 (in Ukrainian). DOI: 10.15407/dopovidi2018.01.100.
  18. Lytvyn, D.I., Yemets, A.I., and Blume, Y.B., UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line, *Environ. Exp. Bot.*, 2010, vol. 68, no. 1, pp. 51–7. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.11.004.
  19. Giannoutsou, E., Galatis, B., Zachariadis, M., and Apostolakis, P., Formation of an endoplasmic reticulum ring associated with acetylated microtubules in the angiosperm preprophase band., *Cytoskeleton*, 2012, vol. 69, no. 4, pp. 252–65. doi: 10.1002/cm.21020.
  20. Smertenko, A., Blume, Y., Viklicky, V., Opatrny, Z., and Draber, P., Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms, *Planta*, 1997, vol. 201, no. 3, pp. 349–58. doi:10.1007/s004250050077.
  21. Nakagawa, U., Suzuki, D., Ishikawa, M., Sato, H., Kamemura, K., and Imamura, A. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin on Lys40 is a widespread post-translational modification in angiosperms, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, vol. 77, no. 7, pp. 1602–5. doi: 10.1271/bbb.130261.
  22. Nakagawa, U., Kamemura, K., and Imamura, A., Regulated changes in the acetylation of  $\alpha$ -tubulin on Lys<sup>40</sup> during growth and organ development in fast plants, *Brassica rapa L.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, vol. 77, no. 11, pp. 2228–33. doi.org/10.1271/bbb.130475.
  23. McEwan, D.G., Dikic, I., The three musketeers of autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation, *Trends Cell Biol.*, 2011, vol. 21, no. 4, pp. 195–201. doi: 10.1016/j.tcb.2010.12.006.
  24. Popelka, H., Klionsky, D.J., Post-translationally-modified structures in the autophagy machinery: an integrative perspective, *FEBS J.*, 2015, vol. 282, no. 18, pp. 3474–88. doi: 10.1111/febs.13356.
  25. Dubrovsky J.G., Doerner P.W., Colyn-Carmona A., Rost T.L. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 2000, vol. 124, no. 4, pp. 1648–57. doi.org/10.1104/pp.124.4.1648.
  26. Xiong, X., Xu, D., Yang, Z., Huang, H., and Cui, X., A single amino-acid substitution at lysine 40 of an Arabidopsis thaliana-tubulin causes extensive cell proliferation and expansion defects, *J. Integr. Plant Biol.*, 2013, vol. 55, no. 3, pp. 209–20. doi: 10.1111/jipb.12003.
  27. Dalwadi, U., Yip, C.K., Structural insights into the function of Elongator, *Cell Mol. Life Sci.*, 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2747-6.
  28. DeFraia, C., Mou, Z., The role of the Elongator complex in plants, *Plant Signal. Behav.*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. 19–22.
  29. Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malgrange, B., Chapelle, J.P., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A., and Nguyen, L., Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin, *Cell*, 2009, vol. 136, no 3, pp. 551–64. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.043.
  30. Nelissen, H., Fleury, D., Bruno, L., Robles, P., De Veylder, L., Traas, J., Micol, J.L., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Lijsebettens, M., The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 21, pp. 7754–9. doi: 10.1073/pnas.0502600102
  31. Lytvyn, D.I., Fedyna, V.D., Yemets, A.I., and Blume, Y.B.  $\alpha$ -Tubulin acetylation influences on microtubule protein microenvironment under autophagy development in tobacco cells, *Factors Exp. Evolution Organisms*, 2015, vol. 17, pp. 65–9 (in Ukrainian).
  32. Olenieva, V., Lytvyn, D., Yemets, A., and Blume, Ya.B., Influence of sucrose starvation, osmotic and salt stresses on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules, *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2018, vol. 16, no. 2, pp. 174–80 (in Ukrainian).

Поступила 12.03.18