

УДК: 57.017.3+58.01/.07+57.052

## ВПЛИВ ГОЛОДУВАННЯ, ОСМОТИЧНОГО ТА СОЛЬОВОГО СТРЕСІВ НА ТРАНСКРИПЦІЙНІ ПРОФІЛІ ГЕНІВ ОСНОВНИХ БІЛКІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ ЗА УЧАСТЮ МІКРОТРУБОЧОК

В. Д. ОЛЕНЄВА, Д. І. ЛИТВИН, А. І. ЄМЕЦЬ, Я. Б. БЛЮМ

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а  
e-mail: olenieva.vira@gmail.com

**Мета.** Дослідити зміни рівнів експресії генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок за умов впливу голодування, осмотичного та сольового стресів. **Методи.** Умови стресу для рослин *Arabidopsis thaliana* моделювали шляхом модифікації поживного середовища Мурасіге і Скуга, що містило 150 мМ NaCl та 10 мМ манітолу для моделювання сольового та осмотичного стресів, відповідно. Для моделювання умов голодування проростки пророщували на середовищі без цукрози. Зміни рівнів експресії досліджували за допомогою ПЛР-аналізу з використанням специфічних праймерів. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 1 %-ному агарозному гелі. **Результати.** Зміни рівнів експресії більшості генів  $\alpha$ -тубуліну та білка *atg8* мали чітко визначений стресо-залежний характер. Суттєве підвищення рівнів експресії генів *tua1* і *atg8e* при голодуванні; *tua3* і *atg8f* при сольовому-, та *tua3* і *atg8f*, *atg8e* при осмотичному стресі опосередковано свідчать про наявність взаємозв'язку між структурними одиницями аутофагосом і мікротрубочками. Показано позитивну регуляцію генів *elr3* та *hda6* під впливом усіх досліджуваних абіотичних чинників, а також незначне підвищення експресії генів гексокіназ 2 та 3. **Висновки.** Результати проведеного транскрипційного аналізу підтверджують розвиток аутофагії, індукованої голодуванням, осмотичним та сольовим стресами у *A. thaliana*, вказують на роль мікротрубочок у опосередкуванні даного адаптивного механізму, і дають можливість виділити гени  $\alpha$ -тубуліну та білка *atg8*, які є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої певним стресовим фактором. Отримані профілі експресії генів *elr3*/ацетилаз та гексокіназ підтверджують функціональну роль ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну у процесі перебігу аутофагії, як етапу, залученого до розвитку програмованої клітинної загибелі.

**Ключові слова:** транскрипційний аналіз, аутофагія, абіотичні фактори,  $\alpha$ -тубулін, *atg8*.

**Вступ.** Засолення ґрунтів, посуха та метаболічний стрес знаходяться серед основних лімітуючих факторів життєдіяльності рослинних організмів. Метаболічний стрес у рослин передбачає дефіцит органогенних- та/або макроелементів, дефіцит вуглеводнів тощо. У клітинах рослин цукри виконують низку важливих функцій, таких як участь у процесах дихання для генерації енергії та синтезу макромолекул, роль транскрипційних факторів та сигнальних молекул для реалізації багатьох сигнальних шляхів, а зв'язування з цукром нерідко є критичним для належного функціонування білків та ліпідів. Загальними наслідками голодування за цукрозою (надалі просто голодування) є припинення росту клітин, деградація білків та ліпідів для забезпечення енергетичного та біосинтетичного попиту, а також зниження активності гліколітичних ферментів. На відміну від голодування, осмотичний та сольовий стреси викликають осмотичний шок, наслідками якого можуть бути пошкодження мембран та порушення функціонування ферментів [1].

До наслідків впливу сольового стресу також слід віднести індукцію іонного стресу, токсичну дію іонів  $\text{Na}^+$  та дефіцит іонів  $\text{K}^+$  [2].

В той же час обидва типи стресу призводять до значних окисних пошкоджень багатьох клітинних компонентів через підвищену продукцію активних форм кисню (молекулярний кисень, супероксидний радикал, гідроксильний радикал, перекис водню) та зміни у активності певних антиоксидантних ферментів [1].

Тривала дія вищезазначених абіотичних факторів викликає пригнічення росту та розвитку рослин, а іноді і їх загибель. В якості адаптивної відповіді на дію стресів, рослини розвинули низку захисних внутрішньоклітинних механізмів, таких як контроль темпів росту, за рахунок регуляції процесів біосинтезу клітинної стінки, синтезу білків та поділу клітин, а також зміни транскрипційної активності генів білків, залучених до реалізації специфічної адаптивної відповіді. Наприклад, механізми посухо- та солестійкості передбачають зміни рівнів експресії багатьох генів, зокрема, *salt-overly sensitive* (SOS) генів, що регулюють  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -транспортну систему в умовах сольового стресу, генів НКТ (високо афінні транспортери калію) та *NHX1* ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінник), що забезпечують високе внутрішньоклітинне  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  співвідношення та зниження концентрації іонів  $\text{Na}^+$  у клітині, шляхом їх захоплення вакуолею, відповідно [3].

Одним із наслідків дії даних стресових чинників є індукція аутофагії як внутрішньоклітинного адаптивного механізму. Даний процес передбачає формування двомембранних органел — аутофагосом, котрі доставляють цитоплазматичні компоненти до літичних вакуолей для деградації. За відсутності вуглеводнів (зокрема, при голодуванні за цукрозою), клітини адаптуються до стресових умов завдяки використанню білків та ліпідів як джерела енергії. Загалом, кількість тотального білку знижується на 30–50 % як за рахунок підвищення протеазної активності, так за рахунок реалізації аутофагії у клітинах [4]. Голодування є давно відомим та загально визнаним стресовим чинником для моделювання умов аутофагії у клітинах рослин, однак тільки нещодавно було показано участь *Atg* білків у регуляторних процесах відповіді на сольовий та осмотичний стрес [5]. D. C. Vasham та ін. показали, що реалізація адаптивної відповіді при дії різних абіотичних стресів здійснюється різними сигнальними шляхами [6], а саме, в умовах метаболічного та сольового стресів, аутофагія найбільш вірогідно регулю-

ється НАДФ•Н-оксидазо-залежним шляхом, використовуючи активні форми кисню у якості сигнальних молекул, а за умов осмотичного стресу (посухи) — НАДФ•Н-оксидазо-незалежним шляхом. Враховуючи, що початкові етапи сигнальних шляхів індукції аутофагії за різних стресових умов відрізняються, можна припустити, що рівні експресії генів основних білків, задіяних до реалізації аутофагії, за стресових умов будуть відрізнятися.

Можливим наслідком дії абіотичних стресів може бути розвиток програмованої клітинної загибелі (ПКЗ). На протопластах та клітинах суспензійної культури тютюну (*Nicotiana tabacum*) було показано, що культивування у середовищах, що містили 200 мМ NaCl та 400 мМ сорбітол, відповідно, викликало появу ознак, характерних для розвитку ПКЗ, зокрема, ретракцію протопласту, підвищення рівня продукції активних форм кисню, деполіаризацію мембран мітохондрій та формування мітохондріальних пор, а також нуклеосомну фрагментацію ДНК [7, 8]. Раніше нами було показано підвищення кількості TUNEL-позитивних клітин проростків *Arabidopsis thaliana* за умов дії стресових чинників, як достовірний показник розвитку ПКЗ. Так, відсоток клітин у стані ПКЗ зростав з 5 до 18 % в умовах метаболічного стресу, та до 20 % за умов дії сольового стресу [9].

Однією з мішеней впливу стресових чинників можуть виступати мікротрубочки (МТ) клітин. На сьогоднішній день експериментальних даних, що описують механізми впливу абіотичних стресів на цитоскелетні структури, недостатньо. Однак, було показано, що перенесення 3-денних проростків *A. thaliana* на середовище, що містило 50 мМ NaCl, через 24 год викликало деполімеризацію МТ, а додавання 100 мМ NaCl у поживне середовище мало наслідком значну фрагментацію кортикальних мікротрубочок [10]. Використання 200 мМ сорбітолу в якості осмотичного стресу, не впливало на організацію МТ в апікальній частині кореня (2 мМ), проте призводило до суттєвих змін в його базальній ділянці, зокрема, формуванню округлих отворів у схемі розташування мікротрубочок [11].

Відомо, що однією з функцій мікротрубочок є їх участь у реалізації аутофагії, зокрема, у опосередкуванні біогенезу аутофагосом та їх внутрішньоклітинного транспорту. Індукція та розвиток даного адаптивного механізму потре-

бує необхідного функціонального стану цитоскелету, що забезпечується шляхом посттрансляційного ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну [12, 13].

Враховуючи, що процес аутофагії є адаптивним механізмом у відповідь на дію абіотичних стресових чинників, а також, вірогідно, є етапом, залученим до розвитку ПКЗ [14], метою роботи був транскрипційний аналіз генів  $\alpha$ -тубуліну, білка *atg8* (продукт гену є структурною одиницею аутофагосом), *elp3* (гена субодиниці мультибілкового комплексу елонгатор, що має гістонацетильтрансферазну активність) та деацетилаз, що забезпечують регуляторні функції ацетилюваного  $\alpha$ -тубуліну, а також генів гексокіназ, які є маркерами розвитку ПКЗ.

### Матеріали і методи

Експерименти проводили на 7-денних проростках *A. thaliana* екотипу Columbia 0. Проростки вирощували на стандартному середовищі Мурасіге-Скуга, що містило 10 г/л глюкози, рН 5,8, у кліматичній камері при температурі 24 °С та довжині світлового та темного періоду 16/8 год з інтенсивністю освітлення 3200 люкс. Умови сольового стресу моделювали шляхом модифікації поживного середовища, що містило 150 мМ NaCl та 10 мМ манітолу для моделювання осмотичного стресу, відповідно. Для моделювання умов голодування проростки пророщували на середовищі без цукрози. Для визначення змін рівнів експресії генів  $\alpha$ -тубуліну (At4g14960, At5g19780, At1g04820, At5g19770, At1g50010, At1g64740) та білка *atg8* (At4g21980, At4g04620, At1g62040, At2g05630, At2g45170, At4g16520, At3g60640, At3g06420, At3g15580), а також генів субодиниці комплексу елонгатор *elp3* (At5g50320), деацетилаз *hda6* (At5g63110), *hda14* (At4g33470) та гексокіназ (*hxx1* (At4g29130), *hxx2* (At2g19860), *hxx3* (At1g47840)) з 7-денних рослин була виділена тотальна РНК, отримана кДНК та проведений ПЛР-аналіз з праймерами до відповідних генів.

Виділення РНК з рослинного матеріалу проводили за допомогою PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно рекомендацій виробника. Якість та цілісність виділеної РНК визначалась електрофоретично в ага-

рознаму гелі з формамідом. Концентрацію РНК у зразках визначали спектрофотометрично. Синтез кДНК проводили за допомогою RevertAid RT cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) з використанням інгібіторів РНКаз (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific, США), зворотної транскриптази (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific, США) та 1 мкг тотальної РНК як матриці, згідно рекомендацій виробника. ПЛР проводили з використанням Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США) за наступних умов: початкова денатурація — 94 °С протягом 5 хв; 30 циклів ампліфікації (денатурація — 94 °С, 30 сек; зв'язування праймера з матрицею — 30 сек; синтез — 72 °С, 1 хв) та фінальна елонгація — при 72 °С протягом 10 хв. Температура зв'язування праймера з матрицею становила: для *atg8a*, *atg8b*, *tua3*, *tua4*, *tua5*, *tua6* — 57 °С; для *atg8c*, *atg8d*, *atg8e*, *atg8f*, *atg8g*, *atg8h*, — 58 °С; для *atg8i*, *tua1*, *tua2* — 59 °С; *hxx1*, *hxx2*, *hxx3*, *hda14*, *hda6* — 60 °С; для *elp3* — 61 °С. Як контроль для ПЛР використовували рівень експресії фактору елонгації  $\alpha$  (*AtEFA*). Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 1 %-ному агарозному гелі. Експерименти проводили у трьох повторах. Рівень експресії генів вимірювали денситометрично за допомогою програми TotalLab. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2013. Для кожного досліджуваного показника було визначено його середнє значення та стандартне відхилення від середнього значення в межах однієї вибірки.

### Результати та обговорення

Для дослідження взаємозв'язку між мікротрубочками та розвитком аутофагії нами був проведений транскрипційний аналіз ко-експресії генів  $\alpha$ -тубуліну (6 генів) та білка *atg8* (9 генів) за умов впливу стресових факторів на проростки *A. thaliana* (рис. 1, рис. 2). Було виявлено стресо-залежний характер експресії деяких генів  $\alpha$ -тубуліну, що проявлявся у підвищеній експресії генів у тій чи іншій мір, в залежності від стресового чинника.

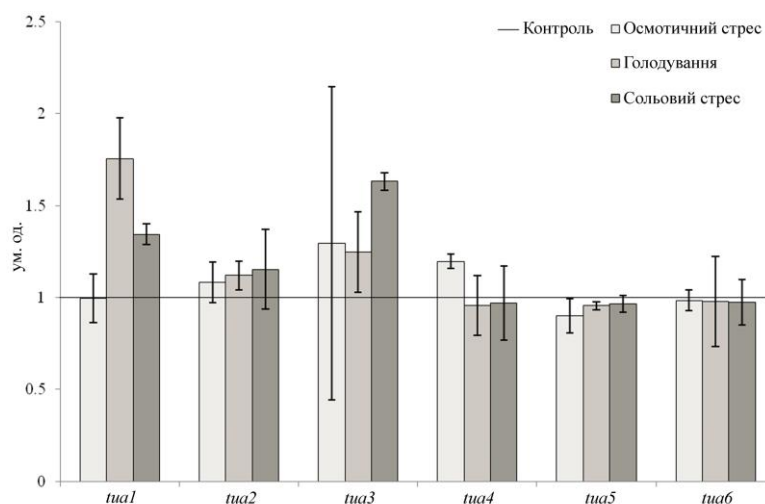


Рис. 1. Транскрипційні профілі експресії різних генів  $\alpha$ -тубуліну при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Так, при голодуванні спостерігали незначне підвищення експресії *tua2* і *tua3*, та суттєве підвищення експресії гена *tua1*. При цьому, в умовах метаболічного стресу рівні експресії інших генів тубуліну (*tua4*, *tua5* та *tua6*) залишилися сталими. Слід зазначити, що в цілому, гени *tua5* та *tua6* демонстрували сталий рівень експресії, не чутливий до впливу стресових чинників. Було виявлено достовірне підвищення рівнів експресії генів *tua1* та *tua3* за умов сольового стресу та гена *tua4* за умов осмотичного стресу. Отримані профілі експресії генів дають можливість стверджувати, що певні гени  $\alpha$ -тубуліну є залученими до реалізації стрес-

індукованої відповіді, при чому є специфічними, в залежності від виду стресового чинника, що впливає на рослини.

В результаті проведеного транскриптомного аналізу профілю експресії генів *atg8* було виявлено, що деякі з них зазнають суттєвого підвищення експресії, в той час як інші демонстрували пригнічення експресії, в залежності від стресових умов (рис. 2). Зокрема, рівні експресії *atg8e* та *atg8f* підвищувалися за умов впливу усіх досліджуваних стресових чинників, однак, слід відмітити, що зміна експресії гена *atg8e* в умовах голодування була найбільш виражена у порівнянні з осмотичним та сольовим стресами.

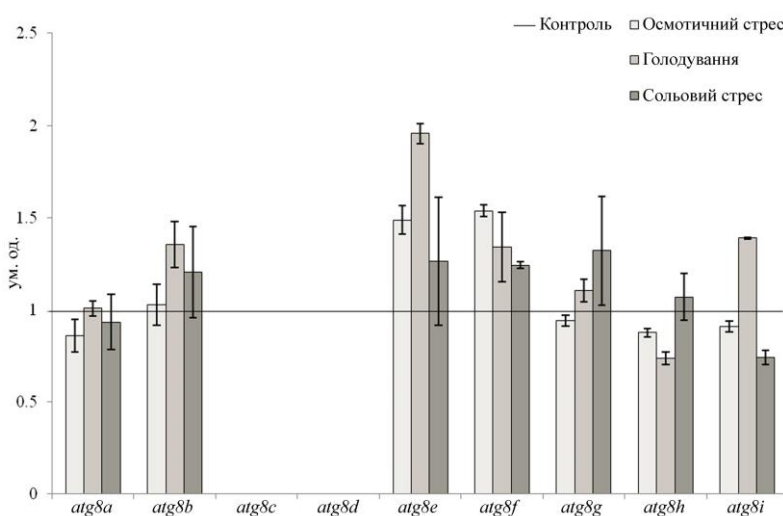


Рис. 2. Транскрипційні профілі експресії генів білка *atg8* при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Також слід зазначити, що вплив метаболічного стресу мав наслідком позитивну регуляцію експресії генів *atg8b*, *atg8h* та *atg8g*, в той час як ген *atg8h* зазнавав негативної регуляції. Було показано, що в умовах сольового стресу відбувалося підвищення експресії генів *atg8f* та *atg8g*, в той час як рівні експресії генів *atg8a*, *atg8b*, *atg8e* та *atg8h* залишалися у тій чи іншій мірі незмінними, на відміну від *atg8i*, що зазнавав негативної регуляції. Слід відмітити, що експресії генів *atg8c* та *atg8d* за умов впливу усіх стресових чинників виявлено не було. Як уже було зазначено, специфічними для реалізації адаптивної відповіді, індукованої осмотичним стресом, були виявлені *atg8e* та *atg8f*, при чому інші гени *atg8* зазнавали незначної негативної регуляції. Враховуючи, що білок Atg8 є структурною одиницею аутофагосом, що безпосередньо приймає участь у реалізації стрес-індукованої аутофагії у клітині, проведений транскриптомний аналіз підтверджує розвиток аутофагії за даних експериментальних умов та дає можливість стверджувати, що вищезазначені гени *atg8* є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої певним стресовим чинником.

На сьогоднішній день достеменно невідомо, як саме відбувається взаємодія мікротрубочок з аутофагосомами — безпосередньо через Atg8, структурну молекулу аутофагосом, або через моторні білки та білки, асоційовані з мікротрубочками. Однак, отримані транскрипційні профілі генів  $\alpha$ -тубуліну та білка *atg8* опосередковано свідчать про наявність взаємозв'язку між мікротрубочками та аутофагосомами. Зокрема, було виявлено ко-експресію генів *tua1* і *atg8e* при голодуванні; *tua3* і *atg8f* при сольовому, та *tua3* і *atg8f*, *atg8e* при осмотичному стресі, що також є непрямим доказом специфічності пар білків зазначених генів для розвитку аутофагії, індукованої різними стресовими чинниками.

Характерною ознакою розвитку ПКЗ є формування пори у подвійній мембрані мітохондрій та вихід проапоптичних білків, таких як AIF, Omi та цитохром c. Одними з білків, що виконують антиапоптозну функцію є гексокінази. З зовнішньою мембраною мітохондрій вони взаємодіють безпосередньо, заякорюючись N-гідрофобною ділянкою (гексокіназа 1 та гексокіназа 2), або опосередковано за допомогою білків, асоційованих з мітохондріями (гексокіназа 3). Взаємодія гексокіназ з іонним каналом мітохондрій VDAC призводить до зміни у чутливості мітохондрій до впливу проапоптичних сигналів, опосередкованих родиною білків Bcl2, таким

чином інгібуючи закриття каналу і формування пори. Отже, підвищений рівень експресії генів гексокіназ свідчить про перехід клітини до етапу ПКЗ. Тому наступним етапом роботи було дослідження профілів експресії генів гексокіназ (*hxx1*, *hxx2*, *hxx3*) в умовах голодування, осмотичного та сольового стресів.

Зважаючи на те, що раніше нами було встановлено функціональну роль ацетилювання у реалізації стрес-індукованої аутофагії [15], завданням цієї роботи було також дослідити транскрипційні профілі генів, що опосередковують регуляторні функції ацетилюваного  $\alpha$ -тубуліну. Зокрема, це передбачало дослідження змін у експресії генів *elp3*, субодиниці білкового комплексу елонгатор, та генів гістондеацетилази *hda14* та *hda6*, які специфічно ацетилюють та деацетилюють  $\alpha$ -тубулін, відповідно [16].

В результаті проведеного дослідження було показано незначні зміни у рівнях експресії генів гексокіназ (рис. 3). Зокрема, спостерігали підвищення рівня експресії гена *hxx2* при осмотичному та сольовому стресі, в той час як за умов голодування даний показник залишався у межах контролю. На противагу цьому спостерігали незначну позитивну регуляцію гена *hxx3* за дії метаболічного стресу та відсутність чутливості зазначеного гена до впливу осмотичного та сольового стресів. При цьому вплив усіх досліджуваних стресових чинників мав наслідком негативну регуляцію гена *hxx1*. Слід зазначити, що раніше нами було показано вплив опромінення УФ-В на рівні експресії генів гексокіназ [17], і було виявлено суттєве підвищення рівнів експресії генів *hxx1* та *hxx3*, та стабільність експресії гена *hxx2* після опромінення як у дозі 41 кДж/м<sup>2</sup>, так і 81 кДж/м<sup>2</sup>. Враховуючи, що на сьогоднішній день функціональна роль гексокіназ у клітинах рослин є малодослідженою, отримані дані опосередковано свідчать про специфічність ізотипів гексокіназ для реалізації стрес-індукованої відповіді.

Дія усіх досліджуваних стресових факторів мала наслідком підвищення рівнів експресії гена *hda6* (рис. 4). Раніше було показано, що білок *hda6* окрім функції специфічного деацетилювання залишку Ліз-40  $\alpha$ -тубуліну (модифікації, що забезпечує функціональний стан мікротрубочок, необхідний для реалізації аутофагії), також опосередковує функцію злиття аутофагосом з лізосомами [18]. Тому підвищений рівень експресії даного гена підтверджує розвиток аутофагії за даних експериментальних умов.



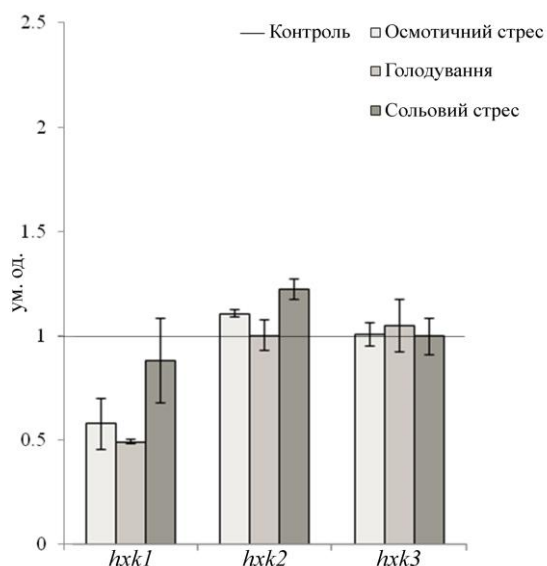


Рис. 3. Транскрипційні профілі експресії генів гексокіназ 1, 2 та 3 при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

При цьому деацетилаза *hda14*, яка також є специфічною до  $\alpha$ -тубуліну, продемонструвала стрес-залежні зміни у рівнях експресії, а саме, відбувалася позитивна регуляція гена за умов осмотичного стресу та голодування, на відміну від сольового стресу, що викликав негативну регуляцію зазначеного гена.

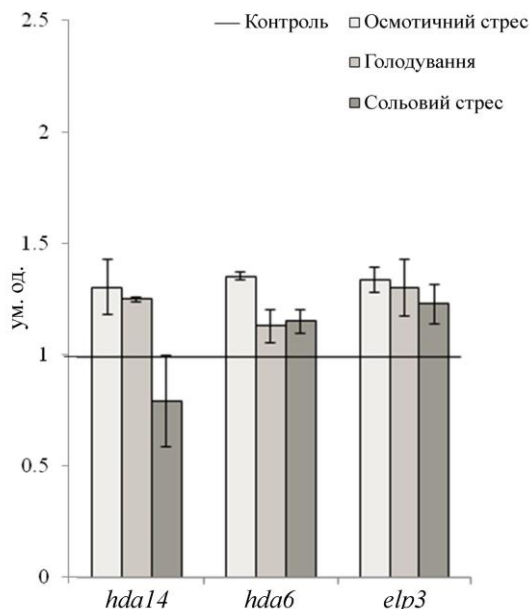


Рис. 4. Транскрипційні профілі експресії генів гістондеацетилаз (*hda14*, *hda6*) та *elp3* при голодуванні, осмотичному та сольовому стресах.

Досліджуючи рівні експресії гена *elp3*, продукт якого виконує функції ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну, функціонуючи у складі мультибілкового комплексу елонгатор, нами було показано достовірне підвищення рівнів експресії гену за умов впливу усіх стресових факторів. Отримані результати на транскрипційному рівні підтверджують роль ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну, як функціональної модифікації, необхідної для реалізації стрес-індукованої аутофагії.

### Висновки

Результати проведеного транскрипційного аналізу підтверджують розвиток аутофагії, індукованої голодуванням, осмотичним та сольовим стресами у *A. thaliana*, вказують на роль мікротрубочок в опосередкуванні даного адаптивного механізму, та дають можливість виділити гени  $\alpha$ -тубуліну та *atg8*, що є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої певним стресовим фактором. Отримані профілі експресії генів *elp3*/деацетилаз та гексокіназ підтверджують функціональну роль ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну у процесі перебігу аутофагії, етапу, що є залученим до розвитку програмованої клітинної загибелі.

### References

1. Mahajan S., Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview // Arch. Biochem. Biophys. — 2005. — Vol. 444. — P. 139–158.
2. Zhu J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses // Curr. Opin. Plant Biol. — 2001. — Vol. 4. — P. 401–406.
3. Batelli G., Verslues P. E., Agius F., Qiu Q., Fujii H., Pan S., et al. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and up-regulating its transport activity // Mol. Cell Biol. — 2007. — Vol. 27. — P. 7781–7790.
4. Moriyasu Y., Ohsumi Y. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation // Plant Physiol. — 1996. — Vol. 111. — P. 1233–1241.
5. Slavikova S., Ufaz S., Avin-Wittenberg T., Levanyony H., Galili G. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses // J. Exp. Bot. — 2008. — Vol. 59. — P. 4029–4043.
6. Liu Y., Xiong Y., Bassham D. C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants // Autophagy. — 2009. — Vol. 5, №. 7. — P. 954–963.
7. Monetti E., Kadono T., Tran D., Azzarello E., Arbelet-Bonnin D., Biligui B., Briand J., Kawano T., Mancuso S., Bouteau F. Deciphering early events involved in hyperosmotic stress-induced pro-

- grammed cell death in tobacco BY-2 cells // J Exp Bot. — 2014. — Vol. 65, № 5. — P. 1361–1375.
8. Lin J., Wang Y., Wang G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status // J. Plant Physiol. — 2006. — Vol. 163, № 7. — P. 731–739.
  9. Fedyna V., Lytvyn D., Yemets A., Blume Ya. Microtubule cytoskeleton participates in realization of autophagy, which is crucial for cell surviving under the influence of stressful stimuli in *Arabidopsis thaliana* // Factors Exp. Evol. Organisms. — 2016. — Vol. 19. — P. 47–50 (in Ukr.).
  10. Wang C., Li J., Yuan M. Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. — 2007. — Vol. 48, № 11. — P. 1534–1547.
  11. Blancaflor E. B., Hasenstein K. H. Growth and microtubule orientation of *Zea mays* roots subjected to osmotic stress // Int. J. Plant Sci. — 1995. — Vol. 156, № 6. — P. 774–783.
  12. Geeraert C., Ratier A., Pfisterer S. G., et al. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation // J. Biol. Chem. — 2012. — Vol. 285, No 31. — P. 24184–24194.
  13. Lytvyn D., Yemets A., Bergounioux C., 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, N 2. — P. 179–185 (in Ukr).
  14. Lytvyn D. I., Blume Ya. B. Microtubular cytoskeleton in autophagy and programmed cell death development in plants. In: Programmed Cell Death in Plants and Animals (Ed. J. Rice), 2016, Nova Science Publishers: New York, p. 1–26.
  15. Olenieva V., Lytvyn D., Yemets A., Bergounioux C., Blume Y. Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. Cell Biol. Int. — 2017. — DOI: 10.1002/cbin.10842.
  16. Tran H. T., Nimick M., Uhrig R. G., Templeton G., Morrice N., Gourlay R., DeLong A., 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. — P. 263–272.
  17. Olenieva V., Lytvyn D., Yemets A., 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, in press (in Ukr).
  18. Lee J. Y., Koga H., Kawaguchi Y. et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for

ubiquitin-selective quality-control autophagy // EMBO J. — 2010. — Vol. 29, N 5. — P. 969–980.

Представлено В. А. Кунахом  
Надійшла 06.12.2017

#### INFLUENCE OF SUCROSE STARVATION, OSMOTIC AND SALT STRESSES ON EXPRESSION PROFILES OF GENES INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF AUTOPHAGY BY MEANS OF MICROTUBULES

V. D. Olenieva, D. I. Lytvyn, A. I. Yemets, Ya. B. Blume

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

**Aim.** The aim of this work was to investigate changes in expression profiles of key genes involved in the development of autophagy by means of microtubules under the influence of sucrose starvation, osmotic and salt stresses. **Methods.** *Arabidopsis thaliana* seeds were sown aseptically on Murashige and Skoog solid medium. Salt and osmotic stresses were simulated by seed germination and seedlings cultivation on the media containing 150 mM NaCl and 10 mM mannitol, respectively. For investigation of starvation-induced autophagy plants were germinated and grown on sucrose-free medium. **Results.** Changes in expression of  $\alpha$ -tubulin and *atg8* genes had clearly defined stress-dependent nature. Overexpression of *tua1* and *atg8e* under starvation; *tua3* and *atg8f* under osmotic stress; *tua3* and *atg8f*, *atg8e* during salt stress indirectly testifies interaction between the structural units of autophagosomes and microtubules. It was shown that influence of investigated abiotic stimuli results in overexpression of *elp3* and *hda6* genes. Small increase in expression levels of hexokinase 2 and 3 was demonstrated. **Conclusions.** Transcriptome analysis of key genes involved in realization of autophagy induced by sucrose starvation, osmotic and salt stresses in *Arabidopsis thaliana* cells was conducted. Received data indirectly testifies interaction between the structural units of autophagosomes and microtubules and enables to point  $\alpha$ -tubulin and *atg8* genes, which are specific for the realization of autophagy induced by a certain abiotic stimuli. Expression profiles of *elp3*/deacetylases as well as hexokinases indicate the critical role of  $\alpha$ -tubulin acetylation for autophagic response, that is involved in the development of programmed cell death.

**Keywords:** autophagy, sucrose starvation, osmotic stress, salt stress, transcriptome analysis,  $\alpha$ -tubulin, *atg8*.