

ШАДРІНА Р. Ю.<sup>✉</sup>, ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

<sup>✉</sup> ruslanashadrina@gmail.com, (093) 625-02-08**РОЗВИТОК АУТОФАГІЇ ЯК АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ РОСЛИН *ARABIDOPSIS THALIANA* НА УМОВИ МІКРОГРАВІТАЦІЇ**

**Мета.** Метою роботи було проведення аналізу впливу мікрогравітації на ріст і розвиток проростків *Arabidopsis thaliana* на різних часових проміжках культивування (4–10 діб) та дослідження розвитку аутофагії, індукованої умовами мікрогравітації у клітинах їх коренів. **Методи.** У дослідженні були використані мікроскопічні методи та культури *in vitro*, а також клінонотування рослинного матеріалу для моделювання умов мікрогравітації. **Результати.** Виявлено клітини з ознаками аутофагії на 9-у та 10-у добу культивування проростків за умов клінонотування. **Висновки.** За отриманими результатами можна констатувати, що мікрогравітація здатна індукувати розвиток аутофагії в коренях проростків *A. thaliana*. У ході експериментів зафіксовано піки формування аутофагосом: у клітинах зони кореневого чохла на 9-у добу та в клітинах зони розтягнення кореня на 10-у добу клінонотування.

**Ключові слова:** *Arabidopsis thaliana*, аутофагія, мікрогравітація.

Аутофагія – висококонсервативний внутрішньоклітинний процес деградації і рециркуляції макромолекул та органел, характерний для усіх еукаріотів [1–3]. Водночас аутофагія є прикладом динамічних перебудов субклітинних мембран, залучених до процесу транспортування білків та органел. Механізм аутофагії передбачає формування двомембранних молекул, аутофагосом, які доставляють цитоплазматичні компоненти до лізосом або літичних вакуолей для їх подальшої рециркуляції [4, 5].

Відомо, що процеси аутофагії опосередковують онтогенез рослин та відіграють важливу роль на багатьох етапах розвитку рослин (формування і проростання насіння, розвиток зародка, утворення провідних тканин ксилеми тощо), а також підтримання гомеостазу в клітинах [3, 5]. Однак за умов впливу стресових чинників відбувається додаткова індукція аутофагії як адаптивного і захисного механізму, що було встановлено для

клітин і тварин, і рослин [1–4]. У той час, як реалізація процесу аутофагії у клітинах тварин є досить детально вивченою, зокрема, було з'ясовано роль аутофагії в онтогенезі клітин, їх відповіді на вплив стресових чинників та за формування вродженого імунітету, залучення аутофагії до реалізації нейродегенеративних та патологічних процесів [6–8], молекулярні механізми процесів аутофагії у рослин потребують більш глибоко дослідження. Так, зокрема, раніше нами було продемонстровано вплив ряду стресових абіотичних факторів (голодування, осмотичний і сольовий стресс та УФ-опромінення) на індукцію та розвиток аутофагії у проростках *Arabidopsis thaliana* [9].

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 процесів аутофагії, що може призводити до розвитку різних морфофізіологічних та патофізіологічних сценаріїв [10–15]. Проте на сьогоднішні експериментальних даних, що свідчили б про можливий вплив мікрогравітації на розвиток аутофагії в клітинах рослин, поки що взагалі немає. Водночас добре відомо, що під час космічного польоту в умовах невагомості або модельованого впливу мікрогравітації рослини зазнають значних морфологічних та фізіологічних змін [16, 17]. У рослин, що виростили в умовах мікрогравітації, було виявлено суттєві відмінності у клітинному поділі та диференціації клітин, швидкості росту коренів і проростків, процесах репродукції тощо [17, 18]. Всі ці дані дозволяють припустити, що мікрогравітація може бути стресовим фактором, що спричиняє розвиток аутофагії у рослин.

Отже, метою дослідження був аналіз впливу мікрогравітації на ріст і розвиток проростків *A. thaliana* на різних часових проміжках культивування (4–10 доби культивування) та дослідження розвитку аутофагії, індукованої умовами мікрогравітації, у клітинах коренів проростків *A. thaliana*.

© ШАДРІНА Р. Ю., ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.

### Матеріали і методи

Як об'єкт дослідження використовували проростки *A. thaliana* екотипу Columbia Col-0. Насіння *A. thaliana* стерилізували у 10 %-ному 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 стандартне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [19]. Для приготування поживного середовища в 1л дистильованої води розчиняли 4,4 г/л солей середовища МС, набір вітамінів (M0222, Duchefa), 1 %-ву сахарозу і додавали 10 г агару, рН 5,6-5,7.

Стратифікацію насіння проводили за температури +4°C протягом доби, після чого чашки Петрі з насінням культивували протягом 10 діб за 22°C та довжини світлового періоду 14 год на добу. Умови змінної сили тяжіння моделювали шляхом пророщування насіння та подальшого культивування рослин у змодельованих умовах мікрогравітації шляхом клінонстатування із режимом обертання 2 об/хв протягом 10 діб за 22°C та довжини світлового періоду 14 год на добу. Ріст та розвиток проростків аналізували з 4 до 10 доби вирощування за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G6. Для аналізу показників росту рослин *A. thaliana* вимірювали довжину коренів та гіпокотилів за допомогою програми ImageJ (версія 1.38 d) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), починаючи з 4 дня клінонстатування. Для достовірності отриманих результатів експеримент було проведено в трьох повторностях. Вимірювання довжин коренів проростків проводили, аналізуючи щонайменше 20 проростків контрольних та експериментальних рослин для кожного часового проміжку експерименту. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2018. Для кожного досліджуваного показника було визначено його середнє значення та стандартне відхилення від середнього значення в межах однієї вибірки.

Візуалізацію аутофагосом проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням таких флуоресцентних барвників, як загальноживаний маркер аутофагосом монодансилкадаверин (MDC) (Sigma, США) у концентрації 1 мкг/мл та пропідіум йодид (PI) (Fluka,

Швейцарія) у концентрації 1,5 мкг/мл для оцінки виживання клітин проростків *A. thaliana*.

### Результати та обговорення

У той час, коли для оцінки розвитку рівня аутофагії в *A. thaliana* в умовах мікрогравітації чашки Петрі з насінням, висадженим на середовище МС, пророщували та культивували в умовах клінонстатування, насіння контрольних рослин поміщали у культуральну кімнату для подальшого проростання та культивування. Дослідження довжин коренів проростків проводили, починаючи із четвертої доби культивування. Часові проміжки для аналізу рослин було обрано на основі оцінки довжини коренів у програмі ImageJ. З огляду на ту обставину, що на третю добу культивування, корені рослин були надто короткими для аналізу, було прийнято рішення проводити дослідження росту та розвитку проростків, починаючи із четвертої доби культивування (рис. 1.).

У ході експерименту нами було проаналізовано 200 коренів. На 4-у добу дослідження середня довжина коренів контрольних рослин була меншою, ніж 5 мм, проте на 10-у добу їх середня довжина складала приблизно 2 см (рис. 2).

Корені рослин, що вирощувалися в умовах клінонстатування, на 4-у добу культивування мали середню довжину меншу, ніж 4 мм, а на десяту добу експерименту середня їх довжина сягала 18 мм. Отримані дані демонструють те, що клінонстатування є стресовим чинником для рослини та пригнічує ріст коренів. Враховуючи дрібні розміри проростків на часовому проміжку до 6-ї доби культивування (середня довжина коренів складала менше 5 мм), було вирішено проводити аналіз рослин за допомогою методів флуоресцентної мікроскопії, починаючи з 6-ї доби експерименту.

Для оцінки розвитку аутофагії за допомогою мікроскопії було проаналізовано контрольні рослини та рослини, що вирощували в умовах мікрогравітації, на кожному часовому проміжку. Для приготування препаратів для люмінесцентної мікроскопії рослини обиралися випадковим чином, аби уніфікувати умови експерименту. Корені проростків *A. thaliana* культивували у розчині монодансилкадаверину (1 мкг/мл), після чого відмивали у фосфатно-сольовому буфері PBS.

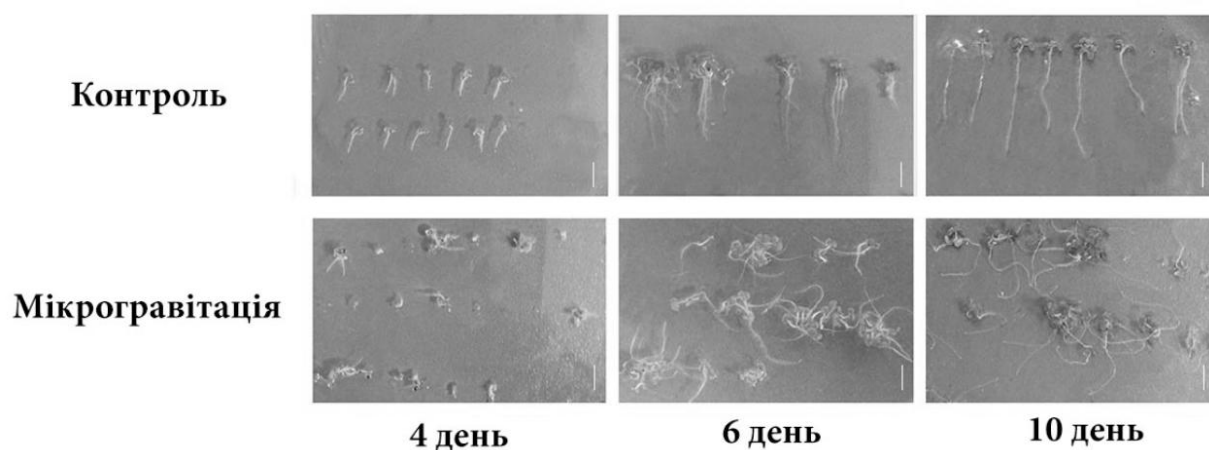


Рис. 1. Зміни фенотипу проростків *A. thaliana*, що вирощувалися за умов кліностакування (2 об/хв). Бар – 0,5 см.

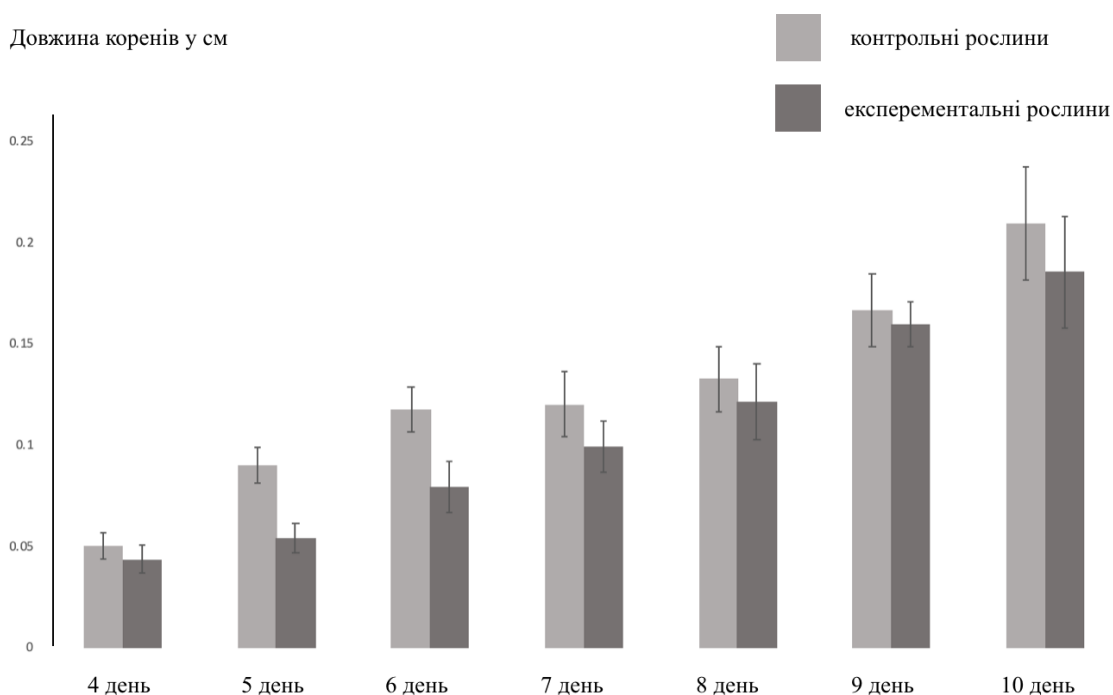


Рис. 2. Ростові показники коренів проростків *A. thaliana*. Порівняння контрольних та експериментальних рослин.

Для мікроскопічного аналізу було взято по 10 контрольних та експериментальних рослин для кожного часового проміжку. Для дослідження виживання клітин коренів контрольних та експериментальних проростків рослини *A. thaliana* культивували у розчині пропідіум йодиду у концентрації 1,5 мкг/мл та відмивали у PBS буфері. Появу морфологічних ознак розвитку аутофагії було виявлено, починаючи з 6-ї

добы культивування. Зокрема, можна було спостерігати появу MDC-забарвлених структур розміром від 3 до 20 мкм. Слід відзначити, що для клітин кореневого чохла була характерною поява аутофагосом уже з 7 доби кліностакування (рис. 3А, В), а на 9-у добу розвиток аутофагії сягав максимуму (рис. 3Е, F). Також було виявлено, що на 10-у добу культивування у клітинах кореневого чохла кількість аутофагосом стрі-

мо знижувалась у порівнянні з 9-м днем, що може бути ознакою адаптації коренів до умов мікрогравітації.

Під час дослідження морфологічних ознак розвитку аутофагії в умовах мікрогравітації було з'ясовано, що зона розтягнення кореня виявляє підвищену чутливість до впливу зазначеного стресового чинника. Появу аутофагосом у цій зоні було задетектовано на 7-у добу експерименту; їх кількість суттєво зростала та сягала свого піку на 10-у добу клінонстатування. З огляду на те, що різні зони кореня виявляють різну чутливість до впливу умов мікрогравітації, зокрема, найбільш активний розвиток аутофагії в зоні коренового чохлика спостерігали на 9-у добу клінонстатування, а в зоні розтягнення кореня – на 10-у добу, необхідними є подальші дослідження для визначення часового проміжку для аналізу аутофагії, індукованої умовами мікрогравітації. У цей період найбільш виражено проявлявся свелінг кореня, що опосередковано свідчить про залучення мікротрубочок у процес адаптації до умов мікрогравітації. З іншого бо-

ку, роль мікротрубочок у реакції рослинних клітин на умови як мікро-, так і гіпергравітації уже достатньо добре описані [21–23].

За результатами оцінки виживання клітин проростків *A. thaliana* за допомогою пропідіум йодиду, який дозволяє візуалізувати ДНК апоптичних клітин, було виявлено, що з 6-ї до 10-ї доби клінонстатування корені цих проростків характеризувалися високими показниками виживання. 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* [24]. 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 зроблені нами і раніше у ході дослідження індукції аутофагії у рослин абіотичними стресовими чинниками [25–27].

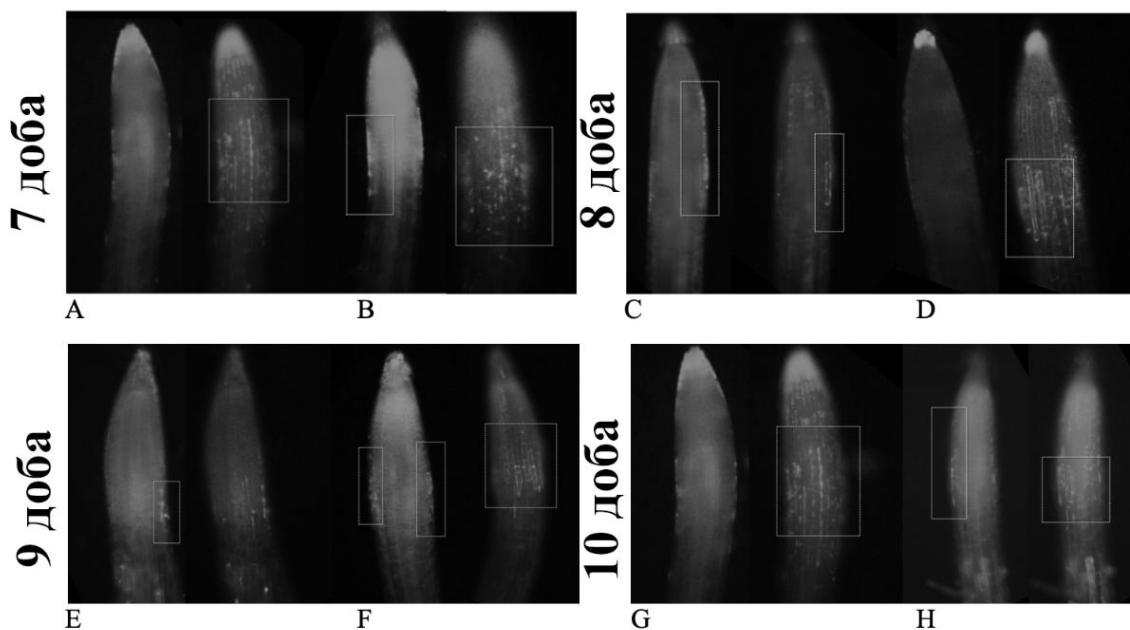


Рис. 3. Морфологічні ознаки розвитку аутофагії в клітинах коренів проростків *A. thaliana*, що зазнавали впливу клінонстатування. MDC – монодансилкадаверин. Збільшення 20 х. (А – контрольні рослини, В – експериментальні, 7 доба клінонстатування; С – контрольні рослини, D – експериментальні, 8 доба клінонстатування; Е – контрольні рослини, F – експериментальні, 9 доба клінонстатування; G – контрольні рослини, H – експериментальні, 10 доба клінонстатування).

## Висновки

Отримано первинні результати дослідження розвитку аутофагії, індукованої умовами мікрогравітації, в коренях проростків *A. thaliana*. Виявлено, що різні зони кореня виявляють різну чутливість до впливу умов мікрогравітації, зокрема, найбільш активний розвиток аутофагії в зоні коренового чохла спостерігали на 9-у добу кліностакування, а в зоні розтягнення кореня – на 10-у добу. Однак для отримання повної картини, яка відображала б зако-

номірності розвитку аутофагії у клітинах проростків *A. thaliana* за умов мікрогравітації, а також їх подальшої адаптації до цих умов, потрібно продовжити описані в роботі експерименти в межах наступних 2–5 діб кліностакування.

*Робота виконана в рамках 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 на 2018–2022 роки.*

## References

- Dikic I., Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *J. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19 (6). P. 349–364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.
- Reggiori F., Klionsky D.J. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *J. Genetics.* 2013. Vol. 194. P. 341–361. doi: 10.1534/genetics.112.149013.
- Wang P., Mugume Y., Bassham DC. New advances in autophagy in plants: regulation, selectivity and function. *J. Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. Vol. 80. P. 113–122. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.018.
- Kriel J., Loos B. The good, the bad and the autophagosome: exploring unanswered questions of autophagy-dependent cell death. *J. Cell Death Differ.* 2019. Vol. 26. P. 640–652. doi: 10.1038/s41418-018-0267-4.
- Yoshimoto K., Ohsumi Y. Unveiling the molecular mechanisms of plant autophagy – from autophagosomes to vacuoles in plants. *J. Plant Cell Physiol.* 2018. Vol. 59 (7). P. 1337–1344. doi.org/10.1093/pcp/pcy112.
- Hofius D., Munch D., Bressendorff S. Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *J. Cell Death Differ.* 2011. Vol. 18 (8). P. 1257–1262. doi: 10.1038/cdd.2011.43.
- Nah J., Yuan J., Jung Y.-K. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *J. Mol. Cells.* 2015. Vol. 38. P. 381–389. doi: 10.14348/molcells.2015.0034.
- Stefan W.R., Augustine M.K. Autophagy: an integral component of the mammalian stress response. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* 2013. Vol. 1 (3). P. 176–188.
- Olenieva V., Lytvyn D., Yemets A., Bergounioux C., Blume Y. Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Biol. Int.* 2017. doi: 10.1002/cbin.10843.
- Blaber E.A., Pecauc M.J., Jonscher K.R. Spaceflight activates autophagy programs and the proteasome in mouse liver. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18 (10). doi: 10.3390/ijms18102062.
- Ferranti F., Caruso M., Cammarota M., Masiello M.G., Corano Scheri K., Fabrizi C., Fumagalli L., Schiraldi C., Cucina A., Catizone A., Ricci G. Cytoskeleton modifications and autophagy induction in TCam-2 seminoma cells exposed to simulated microgravity. *J. BioMed. Res. Int.* 2014. doi: 10.1155/2014/904396.
- Li C.F., Sun J.X., Gao Y., Shi F., Pan Y.K., Wang Y.C., Sun X.Q. Clinorotation-induced autophagy via HDM2-p53-mTOR pathway enhances cell migration in vascular endothelial cells. *J. Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9 (2). P. 147. doi: 10.1038/s41419-017-0185-2.
- Markolefa I., Lambrou G. The role of autophagy during osteoclastogenesis under microgravity conditions. *Int. J. Astrobiol.* 2018. P. 1–7. doi: 10.1017/S1473550418000277.
- Sambandam Y., Townsend M. Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis. *J. Bone.* 2014. Vol. 61. P. 125–131. doi: 10.1016/j.bone.2014.01.004.
- Wang Y.-C., Lu D.-Y., Shi F., Zhang S., Yang C.-B., Wang B., Cao X.-S., Du T.-Y., Gao Y., Zhao J.-D., Sun X.-Q. Clinorotation enhances autophagy in vascular endothelial cells. *J. Biochem. Cell Biol.* 2013. Vol. 91 (5). P. 309–314. <https://doi.org/10.1139/bcb-2013-0029>.
- Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating. *J. Int. Rev. Cytol.* 1997. Vol. 171. P. 1–78.
- Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *J. Plant Biol.* 2014. Vol. 16. P. 79–90. doi: 10.1111/plb.12047.
- Kordyum E.L., Chapman D.K. Plants and microgravity: Patterns of microgravity effects at the cellular and molecular levels. *J. Cytol. Genet.* 2017. Vol. 51 (2). P. 108–116.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *J. Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- Kundelchuk O.P., Tarasenko L.V., Blume Ya.B. Influence of aminophosphomethyl on the root cell structure in the herbicide-sensitive and resistant lines of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2002. Vol. 49 (3). P. 381–386 doi: 10.1023/A:1015501304476.
- Soga K., Kotake T., Wakabayashi K., Hoson T. Changes in the transcript levels of microtubule-associated protein MAP65-1 during reorientation of cortical microtubules in azuki bean epicotyls. *J. Acta Physiol. Plant.* 2012. Vol. 4. P. 533–440. doi: 10.1007/s11738-011-0850-5.
- Soga K., Kotake T., Wakabayashi K., Kamisaka S., Hoson T. Transient increase in the transcript levels of  $\gamma$ -tubulin complex genes during reorientation of cortical microtubules by gravity in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyls. *J. Plant Res.* 2008. Vol. 121. P. 493–498. doi: 10.1007/s10265-008-0179-3.

23. Soga K., Wakabayashi K., Hoson T. Growth and cortical microtubule dynamics in shoot organs under microgravity and hypergravity conditions. *J. Plant Signaling & Behavior*. 2018. Vol. 13. doi: 10.1080/15592324.2017.1422468.
24. Inoue Y., Suzuki T., Hattori M., Yoshimoto K., Ohsumi Y., Moriyasu Y. AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *J. Plant Cell Physiol*. 2007. Vol. 47 (12). P. 1641–1652. doi.org/10.1093/pcp/pcp031.
25. Olenieva V. Vplyv UF-B na transkrypciyni profili geniv osnovnyh bilkiv zaluchenyh do rozvytku autophagiy za uchastu mikrotrubochok. Ex Lytvyn D., Yemets A., Blume Y. *Dopovidi Natsionalnoy akademiy nauk Ukrainy*. 2018. T. 1. P. 100–108. [in Ukrainian] / Оленева В.Д., Вплив УФ-В на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. *Доп. НАН України*. 2018. Т. (1). С. 100–108.
26. Olenieva V. Vplyv goloduvaniya, osmotychnogo ta solovogo stresiv na transkrypciyni profili geniv osnovnyh bilkiv zaluchenyh do rozvytku autophagiy za uchastu mikrotrubochok. Ex Lytvyn D., Yemets A., Blume Y. *Visnyk Ukr. Tovarystva geneykiv i selekcioneriv*. 2018. Vol. 16 (2). P. 174–180. [in Ukrainian] / Оленева В.Д. Вплив голодування, осмотичного та сольового стресів на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. *Вісник Укр. товариства генетиків і селекціонерів*. 2018. Т. 16 (2). С. 174–180.
27. Olenieva V. Expressia kinezinov goloduvaniya, osmotychnogo ta solovogo stresiv na transkrypciyni profili geniv osnovnyh bilkiv zaluchenyh do rozvytku autophagiy za uchastu mikrotrubochok. Ex Lytvyn D., Yemets A., Blume Y. *Visnyk Ukr. Tovarystva geneykiv i selekcioneriv*. 2018. Vol. 16 (2). P. 174–180. [in Ukrainian] / Оленева В.Д. Вплив голодування, осмотичного та сольового стресів на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок. Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. *Вісник Укр. тов-ства генетиків і селекціонерів*. 2018. Т. 16 (2). С. 174–180.
28. Olenieva V. Ekspresiya kinezinov, uchastvuyushchikh v razvitii autofagii u *Arabidopsis thaliana*, i vklad atsetilirovaniya tubulina vo vzryvoopasnyy belok ATG8 s mikrotrubochkami. Ex Lytvyn D., Yemets A., Blume Y. *Faktory eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv: Zb. nauk. pr. K.: Ukr. t-vo henetykiv i selektsioneriv im. M.I. Vavylova*, 2018. Vol. 22. P. 162–168. [in Ukrainian] / Оленева В. Экспресия кинезинов, вовлеченных в развитие аутофагии у *Arabidopsis thaliana*, и вклад ацетилирования тубулина во взаимодействие белка ATG8 с микротрубочками. Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова*, 2018. Т. 22. С. 162–168.

**SHADRINA R. Yu., YEMETS A. I., BLUME Ya. B**

*Institute of food biotechnology and genomics NAS of Ukraine,*

*Ukraine, 04123, Kyiv 123, Osipovskogo str., 2a, e-mail: ruslanashadrina@gmail.com*

#### **AUTOPHAGY DEVELOPMENT AS AN ADAPTIVE RESPONSE TO MICROGRAVITY CONDITIONS IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

**Aim.** The main aim of the study was to analyze the effect of microgravity on the growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings at different time intervals of cultivation (4–10 days) and to investigate the development of autophagy induced by the conditions of microgravity in seedlings root cells. **Methods.** Microscopic methods as well as *in vitro* propagation method were used. To simulate of microgravity conditions plants were placed in clinostat machine. **Results.** In the course of experiments, the peaks of the formation of autophagosome were recorded: in the cells of the root cap zone of at 9th day and in the cells of the root zone extension on the 10th day of clinical establishment. **Conclusions.** It can be concluded that microgravity is capable to induce the development of autophagy in the roots of *A. thaliana* seedlings. Cells with signs of autophagy were revealed on the 9th and 10th day of cultivation of seedlings under microgravity conditions.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, autophagy, microgravity.