

## АЦЕТИЛЮВАННЯ $\alpha$ -ТУБУЛІНУ ВПЛИВАЄ НА ЗМІНИ БІЛКОВОГО МІКРООТОЧЕННЯ МІКРОТРУБОЧОК ПРИ РОЗВИТКУ АУТОФАГІЇ В КЛІТИНАХ ТЮТЮНУ

Аутофагія є внутрішньоклітинним висококонсервативним катаболічним процесом, що притаманний усім еукаріотам, зокрема рослинам. Даний процес включає в себе механізми деградації та рециркуляції макромолекул та органел у відповідь на дію стресових факторів, патогенного впливу, а також в процесі індивідуального розвитку та старіння рослинного організму [1]. Останнім часом важливу роль у реалізації механізмів розвитку аутофагії відводять мікротрубочковому цитоскелету [2]. Мікротрубочки беруть безпосередню участь у формуванні [3] та транспорті аутофагосом для їх подальшого злиття з лізосомами [4]. Участь цитоскелету в розвитку аутофагії опосередковується залученням до цього процесу кінезинів, динеїнів та білків, асоційованих з мікротрубочками [2]. Але даних, які б вичерпно описували картину залучення цитоскелету до формування аутофагосом недостатньо; окрім того, основний масив результатів стосовно даної проблеми отримано на клітинах дріжджів та ссавців. Вважається, що у процесі аутофагії молекули тубуліну стабільних мікротрубочок зазнають пострансляційних модифікацій, які впливають на ефективність їх зв'язування з молекулами мікрооточення, у першу чергу моторними білками та білками, асоційованими з мікротрубочками [5]. Зокрема, до таких важливих модифікацій відносять ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну в положенні Ліз-40 [5]. Так, встановлено локальне акумуляування лабільними мікротрубочками клітин HeLa таких аутофагосомних маркерів, як фосфоінозитол-3 кінзаза, WIPI-1 (фосфоінозитид зв'язуючий білок, що містить WD домен), Atg12-Atg5 комплекс та LC3 (гомолог Atg8 у *Saccharomyces cerevisiae* та *Arabidopsis thaliana*) [6]. У свою чергу даний процес відбувається залежно від гіперацетилювання тубуліну лабільних та стабільних мікротрубочок. Це призводить до локального накопичення кінезину-1 та сигнального білка JIP-1, що має наслідком фосфорилування та активацію JNK1 кінзази, порушення інгібіторного комплексу

Bcl-2-Bcl-1 та індукцію аутофагії [6]. З високою вірогідністю можна передбачити наявність аналогічних або принципово схожих процесів у рослинній клітині, що потребує експериментальних доказів. Дана робота присвячена дослідженню залучення ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну в рослинній клітині на моделі суспензійної культури клітин тютюну (*Nicotiana tabacum*) BY-2 до регуляції аутофагії та програмованої клітинної загибелі шляхом впливу на білкове мікрооточення мікротрубочок.

### Матеріали і методи

**Культура клітин та умови досліду.** Клітини тютюну BY-2 культивували в стандартних умовах. Субкультивування BY-2 проводили пасажем 2 мл клітинної суспензії кожні 7 днів. В експериментах по виснаженню культури тривалість культивування було збільшено до 15 діб для індукції аутофагії. Для аналізу зразків за допомогою Вестерн блотингу та методом TUNEL 1 мл клітинної суспензії відбирали в асептичних умовах, на 4, 7, 8, 9, 11, 14 і 15 добу культивування.

**Флуоресцентна мікроскопія і TUNEL аналіз.** Для мікроскопічної оцінки розвитку аутофагії було використано селективний флуоресцентний маркер монодансилкадаверин (МДК). Для дослідження програмованої клітинної загибелі використовували набір In Situ Detection Kit TMR (Roche) відповідно до інструкцій виробника.

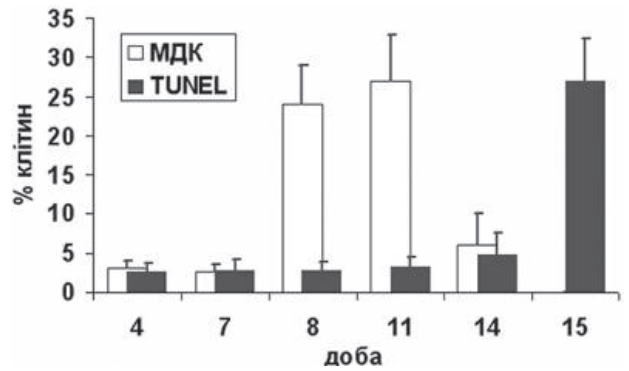
**Електрофорез та Вестерн блотинг.** Білки клітинних лізатів розділяли електрофоретично в ДСН-ПААГ у відновлюючих умовах та проводили електроперенос на нітроцелюлозну мембрану (GE Healthcare) за допомогою системи Bio-Rad Criterion. Для імунодетекції ацетилюваного тубуліну використовували моноклональні антитіла T6793, Sigma. Інкубація з відповідними HRP-міченими вторинними антитілами передувала подальшому детекції сигналу за допомогою хемілюмінесцентного субстрату SuperSignal Pico (Thermo Fisher Scientific Inc.).

**Ко-імунопреципітація та аналіз системою Experion Bio-Rad.** Ко-імунопреципітацію проводили з використанням набору Pierce® Co-Immunoprecipitation (Co-IP). Для проведення досліджень білків, що утворюють комплекс з модифікованим тубуліном було використано антитіла до ацетильованого (T6793, Sigma), які було іммобілізовано на альдегід-активованій агарозі. Для аналізу використовували зразки клітин, відібрані через 4, 11 та 14 діб культивування, що відповідало стадії експоненційного росту культури, стадії розвитку аутофагії та стадії розвитку програмованої клітинної загибелі. Ко-імунопреципітацію проводили згідно протоколу виробника, імунопреципітати аналізували за допомогою автоматизованої системи капілярного електрофорезу Experion (Bio-Rad).

### Результати і обговорення

Як було нами продемонстровано раніше, виснаження культурального середовища за глюкозою, при тривалому культивуванні клітин ВУ-2, призводить до різкого підвищення рівня аутофагії та гіперацетилювання  $\alpha$ -тубуліну [7]. За даних експериментальних умов спостерігалось різке зростання кількості клітин, що містять аутофagosоми з 8-ї по 11-ту добу культивування (від 24 до 27 % клітин, відповідно), що відповідало початку стадії виснаження культивацийного середовища. Однак подальші клітинні події виявили протилежний розвиток даного процесу. На 14-ту добу, кількість клітин, що містять аутофagosоми різко зменшувалася (до 14 %); а на 15-ту добу культивування клітини, що містили аутофagosоми не траплялись взагалі. В той же час, у даному часовому діапазоні було виявлено чітку зворотну кореляцію між прогресом аутофагії та розвитком програмованої клітинної загибелі, яку визначали за рівнем нуклеосомної фрагментації ДНК методом TUNEL-аналізу. Так, упродовж усього терміну культивування клітин з 1 по 14 добу кількість клітин з ознаками нуклеосомної фрагментації ДНК знаходилась на сталому рівні у діапазоні між 2,5 і 3,1 %. Однак на 14 і 15 добу кількість TUNEL-позитивних клітин стрімко зростала, досягаючи 4,8 % і 27 %, відповідно (рис. 1).

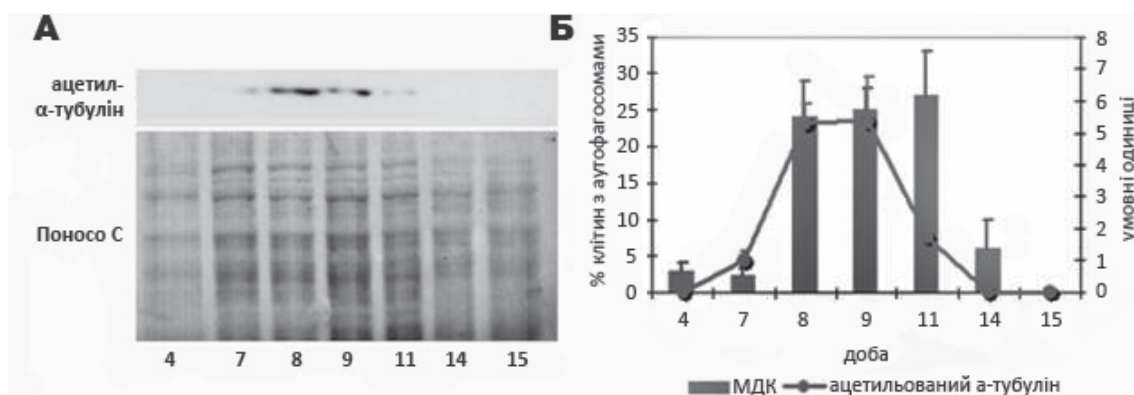
Слід зазначити, що на стадії культивування, яка відповідала розвитку аутофагії як масове явище також спостерігалось закислення цитоплазми клітин, що є однією з ознак програмованої клітинної загибелі. Кисла реакція цитоплазми виявлялась за допомогою забарвлення клітин флуоресцентним барвником акридин оранже-



**Рис. 1.** Розвиток аутофагії та нуклеосомної фрагментації ДНК в клітинах ВУ-2 впродовж 15-денного пролонгованого культивування. МДК – відсоток клітин, що містять аутофagosоми, забарвлені монодансилкадаверином (МДК). TUNEL – відсоток TUNEL-позитивних клітин

вим, який було використано в якості вітального індикатора рН цитоплазми (не показано). Важливо, що кисла реакція спостерігалась в основному в цитоплазмі і вакуолях, але не в ядрах, де була рідкісною подією. Зміщення реакції цитоплазми клітин в кислий діапазон при розвитку аутофагії може свідчити на користь двох тверджень: а саме, що аутофагія і програмована клітинна загибель виступають як два дискретних адаптивних процеси (в аналогічних стресових умовах), або аутофагію слід розглядати як один з етапів розвитку програмованої клітинної загибелі. З іншого боку, слід відзначити повний збіг у часі детектування розвитку аутофагії та зникнення її ознак з гіперацетилюванням та деацетилюванням  $\beta$ -тубуліну в клітинах ВУ-2 (рис. 2).

Отже, ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну було виявлено, як оборотний процес і зниження рівня ацетилювання синхронно передувало розвитку нуклеосомної фрагментації ДНК. Максимальний рівень модифікованого тубуліну на 8-му, 9-ту добу та його зниження на 10-ту відповідають максимальному рівню аутофагії в даному часовому проміжку (24–27 % клітин, позитивно забарвлених монодансилкадаверином) (рис. 1, 2). Базальний рівень аутофагії на термінальних часових проміжках експерименту супроводжувався відсутністю ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну. Так, відомо, що аутофагія може відігравати не лише роль клітинного механізму, який забезпечує виживання, але й такого, що передуює клітинній загибелі [8]. Отримані нами результати дають підставу передбачити одночасну реалізацію в клітинах, що культивуються як процесів аутофагії, так



**Рис. 2.** Ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну в процесі розвитку аутофагії в клітинах ВУ-2 при тривалому культивуванні. А – Вестерн-блот аналіз рівня ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну, Б – динаміка розвитку аутофагії та ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну, МДК – монодансилкадаверин

і програмованої клітинної загибелі, кожен з яких, ймовірно, конкурентно регулюється однаковим набором зовнішніх стимулів. Для встановлення афінності ацетильованого  $\alpha$ -тубуліну до цитозольних білків та порівняння різних пулів білків асоційованих з мікротрубочками за умов аутофагії нами було проведено ко-імунопреципітацію білкових комплексів з їх подальшим аналізом за допомогою автоматизованої системи капілярного електрофорезу Exregion. У результаті, нами було виявлено визначальний вплив пост-трансляційного ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну на мікрооточення мікротрубочок. Зразки, відібрані на різних часових проміжках культивування відзначались різним складом білкових комплексів ко-імунопреципітованих антитілами до ацетильованого  $\alpha$ -тубуліну. Слід зазначити, що фракція тубу-

лінподібних білків, що знаходилась у діапазоні 45–58 кДа, була майже незмінною в усіх групах порівняння (зразки 4, 11 та 14 доби культивування). Певні ко-імунопреципітовані білки були асоційовані з експоненційною стадією росту та стадією аутофагії (4 та 11 доба), інші зі стадіями аутофагії та початком розвитку ознак програмованої клітинної загибелі (11 та 14 доба). Зокрема, преципітовані комплекси ацетильованого  $\beta$ -тубуліну зі зразків 4 та 11-ї доби були подібні білкам малої та середньої молекулярної ваги, натомість, 11 та 14 доба виявили подібність високомолекулярних білків. З іншого боку, мікрооточення  $\alpha$ -тубуліну також характеризувалось білками, що або були властиві усім експериментальним стадіям, або такими, що детектувались на початковій чи фінальній стадії дослідження. Значні відмінно-

Таблиця 1

Спектри білків, що утворюють комплекс з ацетильованим  $\alpha$ -тубуліном з клітин ВУ-2 зразків різних стадій розвитку культури (4, 11 та 14 доба культивування, за результатами аналізу системою Exregion)

4-та доба			11-та доба			14-та доба		
Молекулярна вага, кДа	% від загального білка	Концентрація нг/мкл	Молекулярна вага, кДа	% від загального білка	Концентрація нг/мкл	Молекулярна вага, кДа	% від загального білка	Концентрація нг/мкл
17,68	4,9	11,93	18,97	4,86	7,5	25,55	7,57	3,33
32,78	4,98	12,11	30,9	4,68	7,23	80,39	7,33	3,22
77,22	7,15	17,4	78,33	8,1	12,5	93,74	6,45	2,83
93,75	10,93	26,62	105,53	7,43	11,47	106,53	5,92	2,6
116,74	5,51	13,41	119,34	8,08	12,47	119,08	11,8	5,19
140,7	5,08	12,38	130,78	6,64	10,25	130,02	12,92	5,68
156,68	6,56	15,98	139,86	6,77	10,45	141,36	11,85	5,21
184,26	4,55	11,07	150,15	6,87	9,89	167,93	8,49	3,73
			207,09	5,64	8,11	196,38	8,24	3,62
						210,35	7,29	3,21
						222,76	6,2	2,72

сті у спектрі білків, що формують комплекси з ацетилованим  $\alpha$ -тубуліном вказують на регуляторну роль даної пост-трансляційної модифікації у підтримці функціонального стану рослинного цитоскелету в умовах трофічного стресу. Так, нами було визначено білки з молекулярними вагами 78.3, 105.5, 119.3, 130.8, 139.9, 150.2 кДа, що мають відношення до опосередкування аутофагії мікротрубочками (детектовані в зразках клітин ВУ-2 на 11 добу культивування) (табл. 1).

Наявність високомолекулярних білків (більше 105 кДа) в зразках отриманих преципітатів ацетилованого  $\alpha$ -тубуліну дає нам підстави розраховувати на наявність у складі даних комплексів гомологів моторного білка кінезину-1 людини, що узгоджується з даними про роль даної пост-трансляційної модифікації у зв'язуванні кінезину-1 з МТ [9]. Є дані про наявність кінезин-1-подібних білків в клітинах тютюну, не зважаючи на суттєві відмінності суперродини кінезинів у рослин, порівняно з іншими еукаріотами

[10]. Так, наприклад, показано, що кінезинподібний білок NACK1 (108,6 кДа, UniProt номер – Q8S950) і NACK2 (107,2 кДа, UniProt номер – Q8S950) регулює активність та локалізацію мітоген-активованої протеїнкінази NPK1 в клітинах ВУ-2 [11]. Інший білок TKRP125 (125 кДа кінезинподібний білок, UniProt номер – O23826) бере участь у регуляції організації МТ впродовж клітинного циклу, в тому числі в організації фрагментації, а також русі хромосом в анафазі [11].

### Висновки

У роботі було показано, що ацетилювання  $\alpha$ -тубуліну є регуляторною пост-трансляційною модифікацією, що залучена до опосередкування аутофагії в рослинній клітині цитоскелетом через зміни білкового мікрооточення МТ. Водночас, твердження про участь кінезинів, а також інших білків цитоскелету, у регуляції аутофагії вимагає подальшого вивчення в клітинах рослин.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Liu Y., Bassham D.C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2012. – 63. – P. 215–237.
2. Monastyrska I., Rieter E., Klionsky D.J., Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2009. – 84, N 3. – P. 431–448.
3. 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. – 281. – P. 36303–36316.
4. Jahreiss L., Menzies F.M., Rubinsztein D.C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes // *Traffic.* – 2008. – 9. – P. 574–587.
5. Verhey K.J., Gaertig J. The tubulin code // *Cell Cycle.* – 2007. – 6, N 17. – P. 2152–2160.
6. Geeraert C., Ratier A., Pfisterer S.G., Perdiz D., Cantaloube I., Rouault A., Patingre S., Proikas-Cezanne T., Codogno P., Roys C. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation // *J. Biol. Chem.* – 2010. – 285, N 31. – P. 24184–24194.
7. Литвин Д.І., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Розвиток аутофагії в клітинах тютюну ВУ-2 супроводжується ацетилюванням  $\alpha$ -тубуліну // *Доп. НАН України.* – 2013. – 5. – С. 179–185.
8. Patel S., Caplan J., Dinesh-Kumar S.P. Autophagy in the control of programmed cell death // *Current opinion in plant biology.* – 2006. – 9. – P.391–396.
9. Mackeh R., Perdiz D., Lorin S., Codogno P., Roys C. Autophagy and microtubules – new story, old players // *J. Cell Sci.* – 2013. – 126. – P. 1071–1080.
10. Reddy A.S.N., Day I.S. Kinesins in the *Arabidopsis* genome: A comparative analysis among eukaryotes // *BMC Genomics.* – 2001. – 2. – 2. Doi: 10.1186/1471-2164-2-2
11. Nishihama R., Soyano T., Ishikawa M., Araki S., Tanaka H., Asada T., Irie K., Ito M., Terada M., Banno H., Yamazaki Y., Machida Y. Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex // *Cell.* – 2002. – 109, N 1. – P. 87–99.

LYTVYN D.I. <sup>1</sup>, FEDYNA V.D. <sup>2</sup>, YEMETS A.I. <sup>1</sup>, BLUME Y.B. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a, e-mail: dmytro.lytvyn@gmail.com

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology",  
Ukraine, 01601, Kyiv, Prospekt Hlushkov, 2, e-mail: vera\_oleneva@ukr.net

### **$\alpha$ -TUBULIN ACETYLATION INFLUENCES ON MICROTUBULE PROTEIN MICROENVIRONMENT UNDER AUTOPHAGY DEVELOPMENT IN TOBACCO CELLS**

**Aims.** Microtubules (MTs) play an important role in the regulation of autophagy development in yeast and animal cells. MTs participate in maturation and traffic of autophagosomes through their dynamic state changes and post-translational modifications of tubulin, including acetylation. But the role of the plant cytoskeleton remains unclear in this field of cellular functions. We investigated the involvement of plant MTs in the development of starvation-induced autophagy via tubulin acetylation. **Methods.** We subjected BY-2 tobacco cells to metabolic stress induced by prolonged cultivation, and analyzed interrelation of autophagy development and tubulin acetylation and its microenvironment. **Results.** Development of autophagy was strongly accompanied by  $\alpha$ -tubulin acetylation in tobacco BY-2 cells. This post-translational modification was caused by changes in the MTs microenvironment that was revealed via co-immunoprecipitation assay. The termination of autophagy led to the development of nucleosomal DNA fragmentation and decreases in  $\alpha$ -tubulin acetylation. **Conclusions.** Our work indicates the role of the functional state of the cytoskeleton in the mediation of plant autophagy via changes in the tubulin post-translational modifications and its microenvironment.

**Keywords:** BY-2 tobacco cells, microtubules, plant autophagy, starvation, tubulin acetylation.