
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.01.100>

УДК 57.017.3+ 58.01/.07+ 57.052

В.Д. Оленєва, Д.І. Литвин, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

E-mail: olenieva.vira@gmail.com

Вплив УФ-В на транскрипційні профілі генів основних білків, залучених до розвитку аутофагії за участю мікротрубочок

*Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом,
членом-кореспондентом НАН України А.І. Ємець*

*Проведено транскрипційний аналіз основних генів, залучених до реалізації аутофагії, індукованої опроміненням ультрафіолетом В (УФ-В) у клітинах *Arabidopsis thaliana*. Зміни рівня експресії більшості ізотипів α -тубуліну та *atg8* мали чітко визначений дозо- та часозалежний характер. Істотне підвищення рівня експресії генів *tub4* і *atg8a* через 3 та 24 год після опромінення в обох дозах опосередковано свідчить про наявність взаємозв'язку між структурними одиницями аутофагосом і мікротрубочками. Отримані профілі експресії генів *elp3/деацетилаз* та *гексокіназ* вказують на роль ацетилювання α -тубуліну як регуляторної модифікації, необхідної для здійснення аутофагічної відповіді — етапу, що передує розвитку програмованої клітинної загибелі.*

Ключові слова: *транскриптомний аналіз, аутофагія, УФ-В, α -тубулін, *atg8*, програмована клітинна загибель.*

Дослідження впливу неіонізуючого ультрафіолетового випромінювання В (УФ-В, 280–315 нм) на живі організми стає все більш актуальним у зв'язку з накопиченням даних про руйнування захисного озонового шару внаслідок антропогенного впливу та кліматичних змін [1]. Зниження концентрації озону призводить до підвищення кількості УФ-В випромінювання, що досягає поверхні Землі. УФ-В складає менш ніж 1 % загального сонячного випромінювання, однак є його високоактивним компонентом, здатним негативно впливати на рослинні організми. Зокрема, УФ-В може викликати пошкодження ДНК (формування циклобутан-піримідинових димерів або піримідин(6-4)піримідонових димерів), деградацію ланок системи фотосинтезу, руйнування мембран, утворення активних форм кисню (АФК), зміни вторинного метаболізму, а також морфології клітин та організму в цілому [2].

Адаптивна відповідь рослинного організму на дію УФ-В здійснюється за рахунок регуляції експресії різних генів. Первинною ланкою реалізації такої транскрипційної відповіді клітин рослин на опромінення є мономеризація димеру UVR8, що є фоторецептором УФ-В [3]. Амінокислотні залишки триптофану в положеннях 233 та 285 виступають у ролі хромофора молекули, що реагує порушенням сольових містків між молекулами димеру після опромінення. Для індукції УФ-В-сигналіngu мономери UVR8 утворюють комплекс з

© В.Д. Оленєва, Д.І. Литвин, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм, 2018

білками COP1 (constitutively photomorphogenic 1) та SPA (suppressor of phyA-105). Подальше опромінення УФ-В викликає дисоціацію COP1–SPA з CUL4–DDB1–E3 убіквітинлігазного комплексу, який сприяє деградації транскрипційного фактору HY5. Стабілізація HY5, індукована опроміненням УФ-В, спричиняє накопичення даного транскрипційного фактору, оскільки білок позитивно регулює власну транскрипцію, а також залучений до регуляції експресії COP1. Утворений комплекс UVR8–COP1–SPA регулює транскрипцію цільових генів, а HY5 часто залучений до реалізації транскрипційної відповіді. Відомо, що опромінення рослин *Arabidopsis thaliana* залежно від їх віку, умов культивування, дози опромінення та якісних характеристик джерела УФ-В може зумовлювати зміни транскрипційного рівня сотень генів, що мають різне функціональне навантаження [4].

Крім таких захисних механізмів, як зміни транскрипційної активності та репараційні системи, у клітинах рослин у відповідь на опромінення активуються процеси аутофагії, адаптивного захисного механізму. Процеси реалізації аутофагії в клітинах тварин більш вивчені. Зокрема, доведено, що наслідком УФ-В опромінення епітеліальних клітин є розвиток даного катаболічного механізму [5]. Про індукцію та розвиток рослинної аутофагії в результаті опромінення наразі відомо небагато. Вірогідно, що аутофагія бере участь у захопленні та перетравленні окиснених та зруйнованих органел і макромолекул, забезпечуючи енергетичні та біосинтетичні потреби в стресових умовах.

Можливим наслідком впливу даного абіотичного фактору також може бути розвиток програмованої клітинної загибелі (ПКЗ). Процеси ПКЗ, індуковані опроміненням УФ-В, досить детально вивчені на клітинах тварин. Зокрема, відомо, що опромінення може індукувати розвиток апоптозу за участю різних клітинних механізмів [6]. У рослин процеси реалізації ПКЗ під впливом ультрафіолету малодосліджені. Раніше нами було показано, що опромінення клітин суспензійної культури тютюну (*Nicotiana tabacum*) BY-2 спричиняє появу характерних ознак ПКЗ (конденсація хроматину, нуклеосомна фрагментація ДНК, формування мікроядер та ацидифікація цитоплазми) [7].

Однією з клітинних структур, що можуть бути мішенню та опосередковувати дію УФ-В, є мікротрубочки (МТ). На сьогодні експериментальних даних, які описували б механізми впливу і наслідки опромінення на цитоскелетні структури, вкрай мало. Однак показано, що вплив УФ-В має дозозалежний характер і викликає порушення структури МТ та їх деполімеризацію в клітинах кореня *A. thaliana* [8]. Зокрема, опромінення в дозі 34 кДж/м² здатне зумовлювати порушення організації МТ епідермальних клітин кореня, збільшення (свелінг) клітин зони диференціювання кореня та появу коротких пучків МТ у вищезазначених клітинах. У свою чергу, опромінення УФ-В у дозі 68 кДж/м² спричиняє деполімеризацію МТ у епідермальних клітинах, а також клітинах кортексу всіх зон кореня [8]. Більш того, схожі результати були отримані на культурі клітин тютюну *N. tabacum* BY-2. А саме, опромінення УФ-В у дозах 34, 81 та 135 кДж/м² призводить до деполімеризації як інтерфазних, так і мітотичних МТ, що корелює в часі з ущільненням цитоплазми і стисненням клітин, конденсацією хроматину та формуванням мікроядер. Загалом, за умов опромінення клітин BY-2 були виявлені основні ознаки розвитку програмованої клітинної загибелі [9].

Відомо, що індукція і реалізація процесів аутофагії залежить від функціонального стану цитоскелета, зокрема, потребує стабілізації МТ шляхом посттрансляційного ацетилювання α -тубуліну [10]. Оскільки аутофагія є захисним механізмом рослин у відповідь на вплив

стресових факторів і, ймовірно, етапом, що передує розвитку ПКЗ, мета дослідження полягала в транскрипційному аналізі рівня експресії генів ізотипів α -тубуліну, *atg8* (продукт гена бере участь у біогенезі аутофагосом), *elp3* (продукт гена виконує гістонацетилтрансферазну функцію у складі мультібілкового комплексу елонгатор) та деацетилаз, що вірогідно опосередковують ацетилювання та деацетилювання α -тубуліну відповідно, а також гексокіназ, які виконують проапоптозну функцію і вказують на аутофагію як етап, що передує розвитку ПКЗ, у відповідь на опромінення УФ-В.

Експерименти проводили на 7-добових 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 24 °С і довжині світлового та темного періодів 16/8 год з інтенсивністю освітлення 3200 лк. Опромінення УФ-В здійснювали за допомогою ультрафіолетової лампи TL 20W/12RS (“Philips”, Велика Британія) у дозах 41 та 84 кДж/м². Щоб усунути вплив довжин хвиль спектра УФ-С та короткохвильового діапазону УФ-В використовували полістироловий світлофільтр [7]. Проростки аналізували одразу після опромінення та через 3 і 24 год. Для визначення змін рівня експресії генів α -тубуліну (*At4g14960*, *At5g19780*, *At1g04820*, *At5g19770*, *At1g50010*, *At1g64740*) та *atg8* (*At4g21980*, *At4g04620*, *At1g62040*, *At2g05630*, *At2g45170*, *At4g16520*, *At3g60640*, *At3g06420*, *At3g15580*), а також гена субодиниці елонгатору *elp3* (*At5g50320*), деацетилаз *hda6* (*At5g63110*), *hda14* (*At4g33470*) та гексокіназ (*hxx1* (*At4g29130*), *hxx2* (*At2g19860*), *hxx3* (*At1g47840*)) із 7-добових рослин було виділено тотальну РНК, отримано кДНК та проведено ПЛР-аналіз з праймерами до відповідних генів. РНК з рослинного матеріалу виділяли за допомогою PureLink™ RNA Mini Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) згідно з рекомендаціями виробника. Якість та цілісність виділеної РНК визначали електрофоретично в агарозному гелі з формамідом. Концентрацію РНК у зразках визначали спектрофотометрично.

Синтез кДНК здійснювали 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 з рекомендаціями виробника. ПЛР проводили з використанням Таq ДНК-полімерази (“Thermo Fisher Scientific”, США) за таких умов: початкова денатурація — 94 °С протягом 5 хв; 30 циклів ампліфікації (денатурація — 94 °С, 30 с; зв’язування праймера з матрицею — 30 с; 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; для *hxx1*, *hxx2*, *hxx3*, *hda14*, *hda6* — 60 °С; для *elp3* — 61 °С. Як контроль для ПЛР використовували рівень експресії фактору елонгації α (*AtEFa*). Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі. Експерименти виконували в 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 визначено його середнє значення та стандартне відхилення від середнього значення в межах однієї вибірки.

Оскільки функціональний стан мікротрубочок є однією з найважливіших ланок у процесі реалізації стрес-індукованої аутофагії, логічно припустити, що під впливом стресового фак-

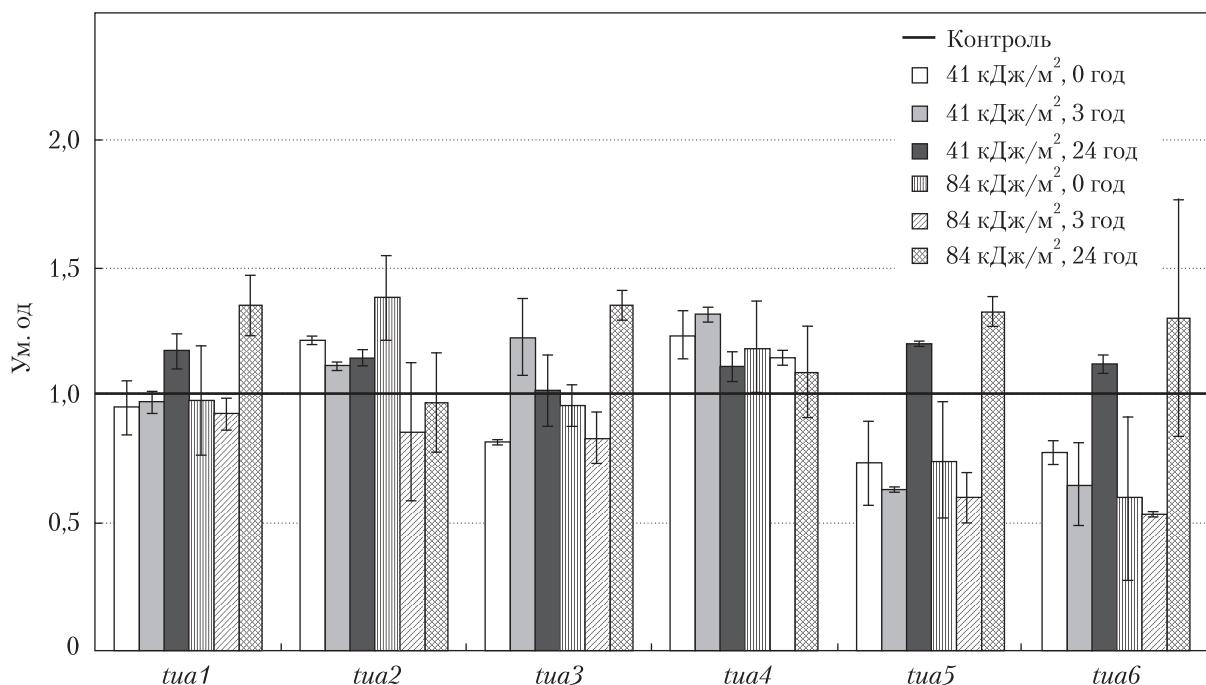


Рис. 1. Транскрипційні профілі експресії різних генів α -тубуліну в контролі та через 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 та 84 кДж/м²)

тору транскрипційний профіль певних ізотипів α -тубуліну та *atg8*, залучених до опосередкування розвитку аутофагії, буде змінюватися. Так, за умов опромінення УФ-В у дозі 41 кДж/м² спостерігали достовірне підвищення рівня експресії *tua2* та *tua4* у всіх трьох експериментальних точках, а саме: одразу після опромінення та через 3 і через 24 год (рис. 1). Виявлено достовірне підвищення рівня експресії *tua3* через 3 год після опромінення. Для генів *tua1*, *tua5* та *tua6* мала місце певна тенденція до регуляції рівня їх експресії, зокрема спостерігали зниження експресії на початкових етапах стрес-індукованої відповіді та його достовірне підвищення через 24 год після впливу стресового фактору. Загалом, можна виділити дві тенденції в змінах рівня експресії генів α -тубуліну у відповідь на опромінення. Так, рівень експресії генів *tua1*, *tua3*, *tua5* та *tua6* знижувався на початкових етапах стрес-індукованої відповіді з подальшим їх підвищенням. У свою чергу, для генів *tub2* та *tub4* характерним було в тій чи іншій мірі стабільне в часі підвищення рівня експресії під впливом УФ-В.

За умов опромінення проростків УФ-В у дозі 84 кДж/м² спостерігалось формування подібного транскриптомного профілю досліджуваних генів. Зокрема, аналогічно було виявлено дві тенденції стрес-індукованої відповіді: початкове зниження з подальшим зростанням рівня експресії (*tua1*, *tua3*, *tua5* та *tua6*) та стабільне збільшення цього показника в тій чи іншій мірі для усіх часових проміжків (*tua4*).

Слід відзначити, що на відміну від дози 41 кДж/м², яка спричиняла підвищення рівня експресії гена *tua2* на усіх часових проміжках, опромінення УФ-В у дозі 84 кДж/м² викликало зниження даного показника через 3 та 24 год. Зміни рівня експресії більшості ізотипів α -тубуліну мали чітко визначений дозо- та часозалежний характер. Зважаючи на те що гени

α -тубуліну є висококонсервативними і зазвичай виявляють стабільну експресію протягом онтогенезу, можна зробити висновок про залучення гена *tub4* до реалізації процесів аутофагії, оскільки його експресія достовірно індукувалася під впливом стресового фактору на більшості часових проміжків дослідження.

Крім того, раніше нами було виявлено, що під впливом опромінення проростків *A. thaliana* УФ-В знижується швидкість проростання рослин порівняно з контрольними, а також збільшується кількість клітин, які знаходилися в стані ПКЗ [11]. При цьому у разі передобробки рослин інгібітором цистеїнових протеаз E-64, який блокує процеси аутофагії на етапі деградації вмісту аутолізосом, достовірно знижувалася життєздатність клітин, що свідчить про адаптивну роль аутофагії в умовах опромінення УФ-В.

У результаті проведеного транскриптомного аналізу профілю генів *atg8* встановлено, що деякі з них в умовах впливу досліджуваного стресового фактору зазнають істотного підвищення рівня експресії (рис. 2). Зокрема, рівень експресії генів *atg8a* та *atg8e* підвищувався майже для всіх часових проміжків дослідження. Натомість, транскрипційний профіль генів *atg8f* та *atg8i* залишався у тій чи іншій мірі сталим і не зазнавав істотних змін у відповідь на опромінення, а експресія генів *atg8c* та *atg8d* взагалі була відсутня. Слід відзначити, що рівень експресії майже всіх досліджуваних генів, крім *atg8f*, достовірно підвищувався через 24 год після опромінення в дозі 84 кДж/м² (*atg8a*, *atg8b*, *atg8e*, *atg8g*, *atg8h*, *atg8i*) та у дозі 41 кДж/м² (*atg8a*, *atg8e*, *atg8g*). Оскільки на даному часовому проміжку за умов опромінення підвищується кількість клітин з ознаками ПКЗ [7], отримані дані опосередковано свідчать про роль аутофагії, як адаптивного процесу, що передує розвитку ПКЗ. Слід зауважити, що, як і у випадку регуляції експресії генів тубуліну, мала місце дозо- та часозалежна інтенсивність клітинної відповіді на дію стресу, що реалізувалася в підвищенні рівня експресії генів *atg8a*, *atg8e*, *atg8g*, *atg8h*. На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що вищезазначені гени *atg8* є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої УФ-В, а також характеризують часові проміжки перебігу даного адаптивного процесу.

Відомо, що в процесі стрес-індукованої аутофагії МТ забезпечують індукцію біогенезу аутофагосом шляхом залучення комплексу необхідних білків, зокрема і білка Atg8, а також забезпечують внутрішньоклітинний транспорт зрілих аутофагосом для злиття з лізосомами [10]. На сьогодні достеменно невідомо, як відбувається взаємодія тубуліну та білка Atg8 — безпосередньо чи із залученням білків, асоційованих з МТ. Проте результати проведеного транскрипційного аналізу опосередковано підтверджують наявність взаємозв'язку між структурними одиницями аутофагосом і МТ. Зокрема, нами виявлено підвищення рівня експресії генів *tub4* і *atg8a*, що є непрямим доказом залучення пари білків зазначених генів до реалізації аутофагії, індукованої УФ-опроміненням.

Однією з характерних ознак розвитку апоптозу в клітинах тварин є формування пори в подвійній мембрані мітохондрій, втрата трансмембранного потенціалу і, як наслідок, вихід проапоптотичних білків, зокрема цитохрому *c*, у цитоплазму. Взаємодія гексокіназ з іонним каналом VDAC, розташованим на зовнішній мембрані мітохондрій, інгібує закриття каналу і формування пори [12]. Хоча наразі механізм взаємодії гексокіназ та мітохондрій є дискусійним, відомо, що гексокінази виконують антиапоптотичну функцію, тому підвищення рівня їх експресії відбувається на етапі, який передує розвитку ПКЗ у клітині. А отже, на наступному етапі ми оцінювали зміни в експресії гексокіназ у відповідь на опромінення

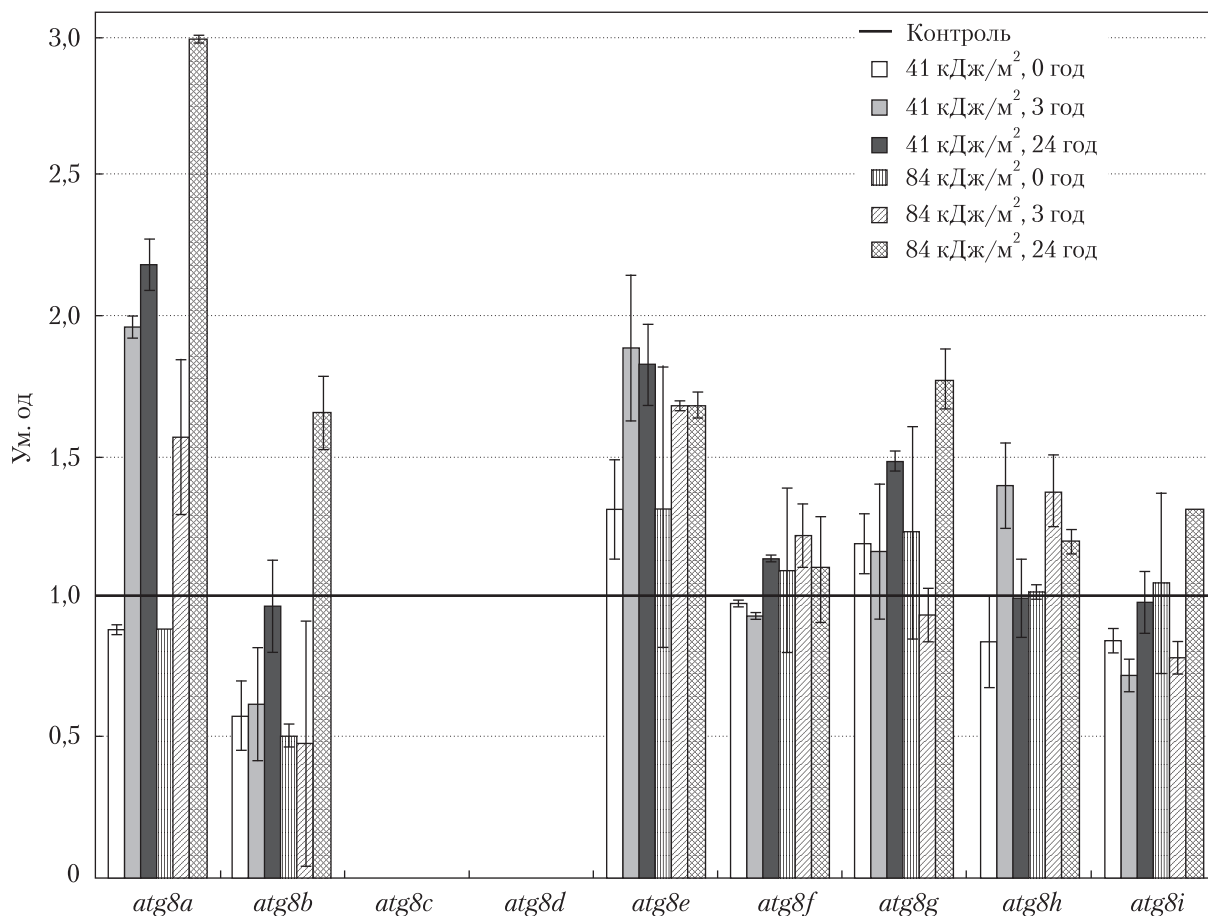


Рис. 2. Транскрипційні профілі експресії генів ізотипів *atg8* у контролі та через 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 та 84 кДж/м²)

УФ-В та визначали належність у часі експресії досліджуваних генів до розвитку аутофагії як перехідного етапу до ПКЗ (рис. 3). Враховуючи, що гексокінази виконують антиапоптозну функцію, отримані результати опосередковано підтверджують реалізацію аутофагії на ранніх часових проміжках і її роль як перехідного етапу до клітинної загибелі у відповідь на тривалий вплив стресового фактору.

Враховуючи встановлену нами роль ацетилювання α -тубуліну як регуляторної модифікації в процесі розвитку стрес-індукованої аутофагії [11], також ставилося за мету дослідити рівень експресії генів, що опосередковують регуляторні функції ацетилюваного тубуліну. Зокрема, за даних експериментальних умов було досліджено транскрипційні профілі гена субодиниці елонгатору, що виконує гістонацетилтрансферазну функцію - *elp3* (At5g50320), а також генів гістондеацетилаз, які є специфічними до α -тубуліну: *hda14* (At4g33470) та *hda6* (At5g63110) [13, 14].

Рівень експресії гена *hvk2* у відповідь на опромінення істотно не змінювався і в тій чи іншій мірі залишався сталим. Однак було виявлено значне підвищення рівня експресії генів *hvk1* та *hvk3* через 24 год після опромінення як у дозі 41 кДж/м², так і 84 кДж/м².

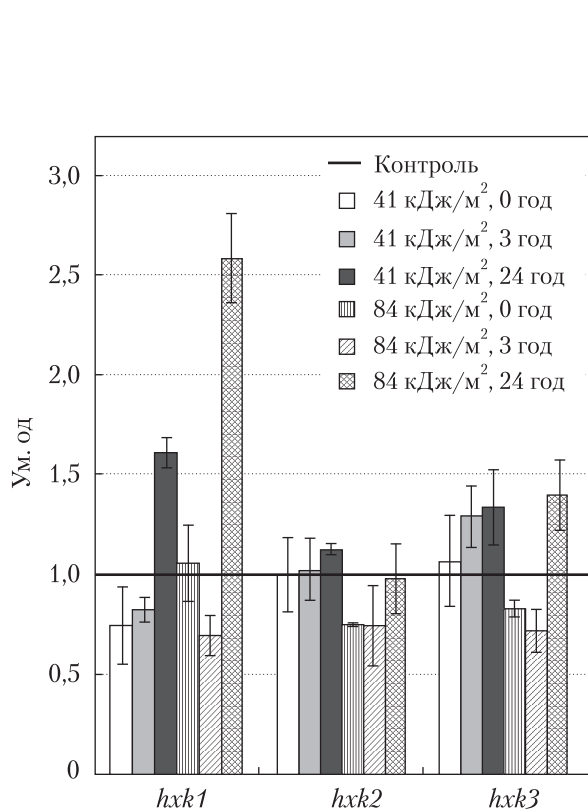


Рис. 3. Транскрипційні профілі експресії генів гексокіназ 1, 2 і 3 у контролі та через 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 та 84 кДж/м²)

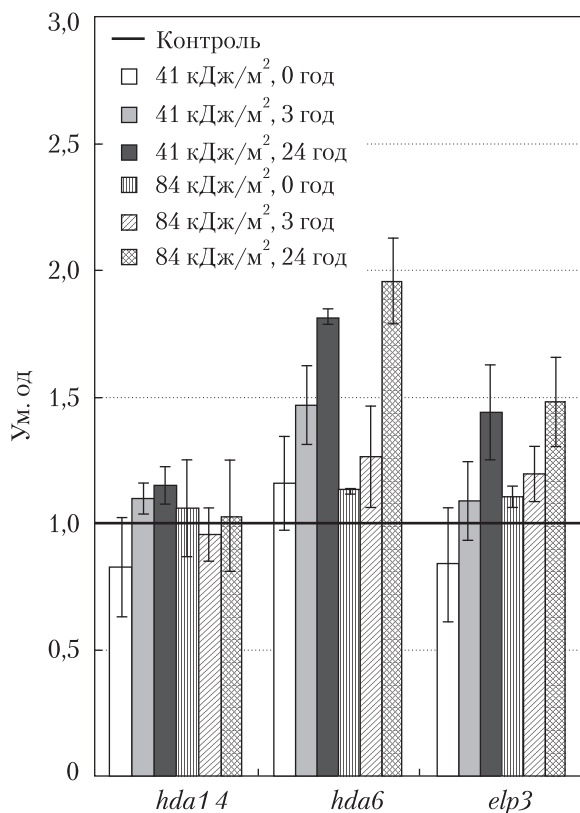


Рис. 4. Транскрипційні профілі експресії генів гістондеацетилаз (*hda14*, *hda6*) та *elp3* у контролі та через 3 і 24 год після опромінення УФ-В (41 та 84 кДж/м²)

Рівень експресії гена *hda6* змінювався істотно впродовж усіх часових проміжків дослідження як порівняно з контролем, так і з аналогічним показником для *hda14*, який виявив майже незмінний транскрипційний профіль (рис. 4). Важливо відзначити, що продукт гена *hda6* не лише є специфічним до ацетилювання залишка Ліз-40 α -тубуліну (модифікація, що забезпечує функціональний стан МТ для реалізації аутофагії), але також опосередковує злиття аутофагосоми з лізосоною [15]. А отже, підвищений рівень експресії даного гена свідчить про розвиток аутофагії після опромінення УФ-В, а також підтверджує функціональну роль ацетилювання α -тубуліну в реалізації даного адаптивного процесу.

У результаті дослідження рівня експресії *elp3* (див. рис. 4) виявлено схожі транскрипційні профілі при опроміненні в різних дозах УФ-В, зокрема, показано істотне підвищення рівня експресії через 24 год після опромінення УФ-В у обох дозах. На ранніх часових проміжках спостерігали пригнічення експресії гена (опромінення в дозі 41 кДж/м²) або незначне підвищення (опромінення в дозі 84 кДж/м²), що з часом супроводжувалося подальшим підвищенням рівня експресії гена.

Отримані дані можна пояснити тим, що ацетилювання α -тубуліну є зворотною модифікацією, яка відбувається в клітинах і за фізіологічних умов, тому, вірогідно, для реалізації

початкових етапів аутофагії клітина використовує наявний пул ацетильованого α -тубуліну. А в подальшому, з його виснаженням, відбувається підвищення експресії субодиниці елонгатору, що виконує гістонацетилтрансферазну функцію для реалізації захисних механізмів у відповідь на дію стресового фактору.

Результати дослідження на транскрипційному рівні підтверджують розвиток аутофагії, індукованої опроміненням УФ-В у *A. thaliana*, опосередковано свідчать про роль МТ у реалізації даного адаптивного процесу і дають можливість виділити конкретні ізотипи α -тубуліну та білка *atg8*, які є специфічними для реалізації аутофагії, індукованої опроміненням УФ-В. Отримані профілі експресії генів *elp3*/деацетилаз та гексокіназ вказують на роль ацетилювання α -тубуліну як регуляторної модифікації, необхідної для здійснення аутофагічної відповіді – етапу, що передує розвитку програмованої клітинної загибелі.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Bais A.F., McKenzie R.L., Bernhard G., Aucamp P.J., Ilyas M., Madronich S., Tourpali K. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. **14**, № 1. P. 19–52.
2. Jansen M.A.K., Gaba V., Greenberg B.M. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends. Plant. Sci.* 1998. **3**, № 4. P. 131–135.
3. Rizzini L., Favory J.J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., Ulm R. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science*. 2011. **332**, № 6025. P. 103–106.
4. Brosché M., Schuler M.A., Kalbina I., Connor L., Strid Å. Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002. **1**, № 9. P. 656–664.
5. Yang Y., Wang H., Wang S., Xu M., Liu M., Liao M., Frank J. A., Adhikari S., Bower K. A., Shi X., Ma C., Luo J. GSK3 β signaling is involved in ultraviolet B-induced activation of autophagy in epidermal cells. *Int. J. Oncol.* 2012. **41**, № 5. P. 1782–1788.
6. Kulms D., Schwarz T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2002. **64**, № 5-6. P. 837–841.
7. Lytvyn D.I., Yemets A.I., Blume Y.B. UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line. *Environ. Exp. Bot.* 2012. **68**, № 1. P. 51–57.
8. Krasnylenko Yu.A., Yemets A.I., Sheremet Ya.A., Blume Ya.B. Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* 2012. **145**. P. 505–515.
9. Krasnylenko Yu.A., Yemets A.I., Blume Ya.B. Plant microtubules reorganization under indirect influence of enhanced UV-B irradiation and during UV-B induced programmed cell death. *Plant Signal. Behav.* 2013. **8**, № 5. e24031.
10. Geeraert C., Ratier A., Pfisterer S.G., Perdiz D., Cantaloube I., Rouault A., Patingre 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.* 2012. **285**, № 31. P. 24184–24194.
11. 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: <https://doi.org/10.1002/cbin.10843>
12. Pastorino J.G., Hoek J.B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2008. **40**, № 3. P. 171–182.
13. 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., Nguyen L. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin. *Cell*. 2009. **136**, № 3. P. 551–564.
14. 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 α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J.* 2012. **71**, № 2. P. 263–272.

15. Lee J.Y., Koga H., Kawaguchi Y., Tang W., Wong E., Gao Y.S., Pandey U.B., Kaushik S., Tresse E., Lu J., Taylor J.P., Cuervo A.M., Yao T.P. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* 2010. **29**, № 5. P. 969–980.

Надійшло до редакції 24.11.2017

REFERENCES

1. Bais, A.F., McKenzie, R.L., Bernhard, G., Aucamp, P.J., Ilyas, M., Madronich, S. & Tourpali, K. (2015). Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 14, No. 1, pp. 19-52.
2. Jansen, M.A.K., Gaba, V. & Greenberg, B.M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends. Plant. Sci.*, 3, No. 4, pp. 131-135.
3. Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I. & Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science*, 332, No. 6025, pp. 103-106.
4. Brosché, M., Schuler, M.A., Kalbina, I., Connor, L. & Strid, Å. (2002). Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1, No. 9, pp. 656-664.
5. Yang Y., Wang H., Wang S., Xu, M., Liu, M., Liao, M., Frank, J. A., Adhikari, S., Bower, K. A., Shi, X., Ma, C. & Luo, J. (2012). GSK3 β signaling is involved in ultraviolet B-induced activation of autophagy in epidermal cells. *Int. J. Oncol.*, 41, No. 5, pp. 1782-1788.
6. Kulms, D. & Schwarz, T. (2002). Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 64, No. 5-6, pp. 837-841.
7. Lytvyn, D.I., Yemets, A.I. & Blume, Y.B. (2012). UV-B overexposure induces programmed cell death in a BY-2 tobacco cell line. *Environ. Exp. Bot.*, 68, No. 1, pp. 51-57.
8. Krasnylenko, Yu.A., Yemets, A.I., Sheremet, Ya.A. & Blume, Ya.B. (2012). Nitric oxide as a critical factor for perception of UV-B irradiation by microtubules in Arabidopsis. *Physiol. Plant.*, 145, pp. 505-515.
9. Krasnylenko, Yu.A., Yemets, A.I., Blume, Ya.B. (2013). Plant microtubules reorganization under indirect influence of enhanced UV-B irradiation and during UV-B induced programmed cell death. *Plant Signal. Behav.*, 8, No. 5, e24031.
10. Geeraert, C., Ratier, A., Pfisterer, S.G., Perdiz, D., Cantaloube, I., Rouault, A., Pattingre, S., Proikas-Cezanne, T., Codogno, P. & Poüs, C. (2012). Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J. Biol. Chem.*, 285, No. 31, pp. 24184-24194.
11. Olenieva, V., Lytvyn, D., Yemets, A., Bergounioux, C. & Blume, Y. (2017). Tubulin acetylation accompanies autophagy development induced by different abiotic stimuli in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Biol. Int.* doi: <https://doi.org/10.1002/cbin.10843>
12. Pastorino, J.G. & Hoek, J.B. (2008). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 40, No. 3, pp. 171-182.
13. 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. & Nguyen, L. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin. *Cell.*, 136, No. 3, pp. 551-564.
14. Tran, H.T., Nimick, M., Uhrig, R.G., Templeton, G., Morrice, N., Gourlay, R., DeLong, A. & Moorhead, G.B. (2012). *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J.*, 71, No. 2, pp. 263-272.
15. Lee, J.Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y.S., Pandey, U.B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., Taylor, J.P., Cuervo, A.M. & Yao, T.P. (2010). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.*, 29, No. 5, pp. 969-980.

Received 24.11.2017

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

ГУ “Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины”, Киев

E-mail: olenieva.vira@gmail.com

ВЛИЯНИЕ УФ-В НА ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ПРОФИЛИ ГЕНОВ ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В РАЗВИТИИ АУТОФАГИИ ПРИ УЧАСТИИ МИКРОТРУБОЧЕК

Проведен транскрипционный анализ основных генов, задействованных в реализации аутофагии, индуцированной облучением ультрафиолетом В (УФ-В) в клетках *Arabidopsis thaliana*. Изменения уровней экспрессии большинства изоформ α -тубулина и *atg8* несли четко определенный дозо- и времязависимый характер. Существенное повышение экспрессии генов *tub4* и *atg8a* через 3 и 24 ч после облучения в обеих дозах опосредованно указывает на наличие взаимосвязи между структурными единицами аутофагосом и микротрубочками. Полученные профили экспрессии генов *elp3*/деацетилаз и гексокиназ подтверждают роль ацетилирования α -тубулина как регуляторной модификации, необходимой для осуществления процесса аутофагии – этапа, предшествующего развитию программируемой клеточной гибели.

Ключевые слова: транскриптомный анализ, аутофагия, УФ-В, α -тубулин, *atg8*, программируемая клеточная гибель.

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

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: olenieva.vira@gmail.com

INFLUENCE OF UV-B ON EXPRESSION PROFILES OF GENES INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF AUTOPHAGY BY MEANS OF MICROTUBULES

Transcriptome analysis of key genes involved in realization of autophagy induced by UV-B irradiation in *Arabidopsis thaliana* cells is conducted. Changes in expression of α -tubulin and *atg8* genes had clearly defined dose- and time-dependent nature. Overexpression of *tub4* and *atg8a* shown at time points of 3 and 24 h after irradiation indirectly testifies to the interaction between the structural units of autophagosomes and microtubules. Expression profiles of *elp3*/deacetylases, as well as hexokinases, denote the crucial role of α -tubulin acetylation for autophagic response - a stage preceding the development of programmed cell death.

Keywords: transcriptome analysis, autophagy, UV-B, α -tubulin, *atg8*, programmed cell death.