



УДК 57.017.735+581.1

Д. І. Литвин, А. І. Ємець, академік НАН України Я. Б. Блюм

Розвиток аутофагії в клітинах тютюну ВУ-2 супроводжується ацетилюванням α -тубуліну

Досліджено характеристики розвитку та перебігу процесів аутофагії, індукованих метаболічним стресом, а також пов'язані з цим зміни ацетилювання α -тубуліну в клітинах ВУ-2 в умовах тривалого культивування суспензійної культури. Показано, що виснаження сахарози в живильному середовищі призводить до стрімкого розвитку аутофагії, що, у свою чергу, супроводжується зниженням рівня білка в клітинах. За допомогою вестерн-блот аналізу показано гіперацетилювання α -тубуліну, що чітко корелює в часі з даними показниками. Отримані результати свідчать про роль цієї посттрансляційної модифікації тубуліну в підтриманні функціонального стану цитоскелета, необхідного для реалізації аутофагії в рослинній клітині.

Аутофагія, як внутрішньоклітинний катаболічний процес, — високонсервативне явище, притаманне всім еукаріотам, зокрема рослинам. Вона включає в себе механізми деградації та рециркуляції макромолекул і органел у відповідь на дію стресових факторів, патогенного впливу, а також в процесі індивідуального розвитку та старіння рослинного організму [1, 2]. Останнім часом важливу роль у реалізації механізмів розвитку аутофагії відводять компонентам цитоскелета, зокрема мікротрубочкам [3], які залучені до забезпечення таких клітинних процесів, як розділення хромосом та клітинний поділ, визначення загальної морфології клітин та їх диференціація, а також структурне впорядкування цитоплазми та органел [4]. Вважається, що мікротрубочки беруть безпосередню участь у формуванні [5] та транспорті аутофагосом для їх подальшого злиття з лізосомами [6]. Відомо, що участь цитоскелета в розвитку аутофагії опосередковується залученням до цього процесу кінезинів, динейнів та білків, асоційованих з мікротрубочками [3]. Але даних, які б вичерпно описували картину залучення цитоскелета до формування аутофагосом, все ще недостатньо; крім того, основний масив результатів стосовно цієї проблеми отримано на клітинах дріжджів та ссавців.

Вважається, що у процесі аутофагії молекули тубуліну стабільних мікротрубочок зазнають посттрансляційних модифікацій, які впливають на ефективність їх зв'язування з молекулами мікрооточення, у першу чергу моторними білками та білками, асоційованими з мікротрубочками [7]. Зокрема, до таких важливих модифікацій відносять ацетилювання

© Д. І. Литвин, А. І. Ємець, Я. Б. Блюм, 2013

α -тубуліну в положенні Ліз-40 [7, 8]. Так, встановлено локальне акумулювання лабільними мікротрубочками клітин HeLa таких аутофагосомних маркерів, як фосфоінозитол-3 кіназа, WIPI-1 (фосфоінозитидзв'язуючий білок, що містить WD домен), Atg12–Atg5 комплексу та LC3 (гомолог Atg8 у *Saccharomyces cerevisiae* та *Arabidopsis thaliana*) [9]. 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 зумовлює фосфорилування та активацію JNK1 кінази, порушення інгібіторного комплексу Bcl-2–Beclin 1 та індукцію аутофагії [9]. З високою вірогідністю можна передбачити наявність аналогічних або принципово схожих процесів у рослинній клітині, що потребує експериментальних доказів.

З огляду на вищесказане ми ставили за мету встановити ймовірність функціонального взаємозв'язку між розвитком аутофагії в рослинній клітині та ацетилюванням α -тубуліну.

У досліджах використовували суспензійну культуру клітин тютюну (*Nicotiana tabacum*) ВУ-2. Клітини культивували в рідкому середовищі Мурасіге–Скуга при дотриманні стандартних умов як описано нами раніше [10]. Аутофагію індукували шляхом тривалого культивування суспензії клітин без заміни живильного середовища, моделюючи, таким чином, умови метаболічного стресу. За звичайних умов пасаж клітин ВУ-2 проводили кожні 7 діб, що відповідало стаціонарній фазі росту культури. Для створення умов розвитку аутофагії строк культивування було подовжено до 11 діб.

Розвиток аутофагії та виживання клітин оцінювали за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням мікроскопа Axiostar plus (“Carl Zeiss”, Німеччина). Аутофагосоми візуалізували за допомогою селективного барвника монодансилкадаверину (“Sigma”, США) у концентрації 0,1 мМ. Як маркер загиблих клітин використовували пропідій йодид (“Fluka”, Швейцарія) у концентрації 1 мкг/мл. Для статистичної достовірності результатів клітини аналізували в п'яти полях зору при збільшенні $\times 20$. Динаміку росту культури клітин ВУ-2 оцінювали колориметрично за змінами концентрації загального білка в клітинній суспензії, застосовуючи метод Бредфорд [11]. Виснаження живильного середовища в процесі культивування оцінювали за зменшенням концентрації сахарози, яку визначали колориметрично з використанням набору Glucose (GO) Assay Kit (“Sigma”, США).

Рівень ацетилювання α -тубуліну визначали за допомогою вестерн-блот аналізу. Білкові екстракти отримували, використовуючи CelLytic™ P Cell Lysis Reagent (“Sigma”, США), що містив суміш інгібіторів протеаз (“Sigma”, США). Електрофорез білків та вестерн-блот аналіз проводили як описано нами раніше [10]. Для детектування загального та ацетилюваного тубуліну використовували моноклональні антитіла TU-01 до α -тубуліну в концентрації 2,2 мкг/мл, люб'язно надані доктором П. Драбером (Інститут молекулярної генетики Чеської академії наук, Прага), і моноклональні антитіла до ацетилюваного тубуліну (T6793, “Sigma”, США) в розведенні 1 : 2000. Для точного кількісного визначення рівня ацетилюваного тубуліну вестерн-блот аналіз проводили шляхом почергової імунодетекції двох антигенів на одній нітроцелюлозній мембрані, вважаючи за контроль рівень загального тубуліну. Підготовку мембрани для повторної імунодетекції здійснювали з використанням реагенту Restore Western Blot Stripping Buffer (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) згідно з рекомендаціями виробника. Результати імунодетекції піддавали денситометричному аналізу.

Для характеристики перебігу метаболічного стресу при тривалому культивуванні було проведено порівняльний аналіз виснаження живильного середовища за вмістом сахарози (як його основного енергетичного компонента) та динаміки змін концентрації загально-

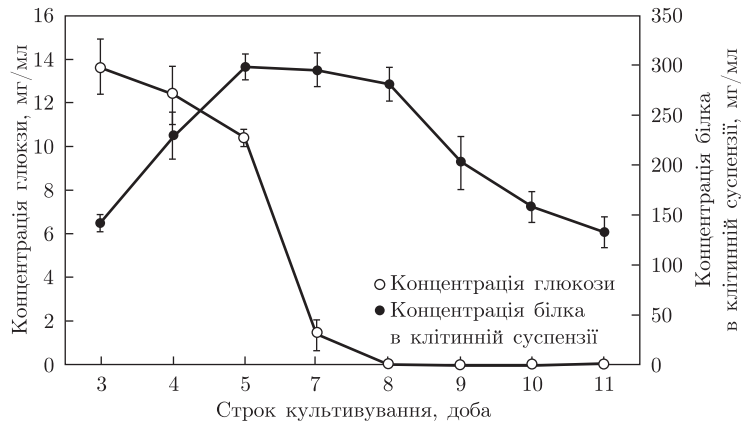


Рис. 1. Динаміка виснаження сахарози в культуральному середовищі та зміни в концентрації білка клітин ВУ-2 в умовах тривалого культивування

го білка в суспензії клітин. Колориметричне визначення концентрації сахарози виявило її стрімке падіння після 5-ї доби, що відповідає переходу культури в стаціонарну стадію росту. На 7-му добу культивування концентрація сахарози знижувалася до критичного значення — 1,4 мг/мл; більш пізні часові проміжки (8-ма–11-та доба) відзначалися повною відсутністю сахарози в живильному середовищі (рис. 1). Водночас зворотно пропорційною виявилась динаміка накопичення білка в клітинній суспензії. На 5-ту добу концентрація білка (300 мг/мл) досягла максимального рівня і залишалась такою до 8-ї доби включно, що відповідає стаціонарній стадії росту культури. Надалі, починаючи з 9-ї доби культивування, відбувалося поступове, статистично достовірне зниження даного показника, значення якого на останньому часовому проміжку (11-та доба) було більш ніж удвічі меншим за максимальне (див. рис. 1). Така динаміка зниження концентрації білка збігається в часі з різким падінням вмісту сахарози в живильному середовищі і, ймовірно, є наслідком його виснаження.

Логічно припустити, що за відсутності сахарози для задоволення трофічних потреб рослини клітина вдається до використання внутрішніх джерел енергії. Так, іншими дослідниками показано, що заміна живильного середовища на таке, що не містить сахарози, викликала утворення аутофагосом у клітинах лінії ВУ-2. Дані структури містили кислу фосфатазу, вакуолярну H^+ -АТФазу та цистеїнові протеази, що може свідчити про реалізацію макроаутофагічного типу відповіді на цей стресовий чинник [12]. Наслідком цих процесів може бути гідроліз клітиною власних білків шляхом аутофагії [13, 14]. Для прижиттєвого дослідження розвитку аутофагії в клітинах тютюну ВУ-2 нами було використано флуоресцентний барвник монодансилкадаверин, який є загальноживимим маркером аутофагосом — двомембранних органел, що беруть участь у деградації як макромолекул, так і інших органел [15]. На морфологічному рівні процес аутофагії в клітинах ВУ-2 характеризувався утворенням у клітині множинних вакуолярних структур, локалізованих дифузно в цитоплазмі, або таких, що утворюють скупчення в перинуклеарному просторі (рис. 2).

У результаті мікроскопічних досліджень відмічено чітку синхронізацію в часі процесів виснаження сахарози в живильному середовищі, зниження концентрації білка та збільшення відсотка клітин з морфологічними ознаками аутофагії. Так, на початкових стадіях культивування при наявності в середовищі цукрів кількість клітин з аутофагією не перевищувала 3%. При різкому зниженні концентрації сахарози на 7-му добу спостерігалася тенденція

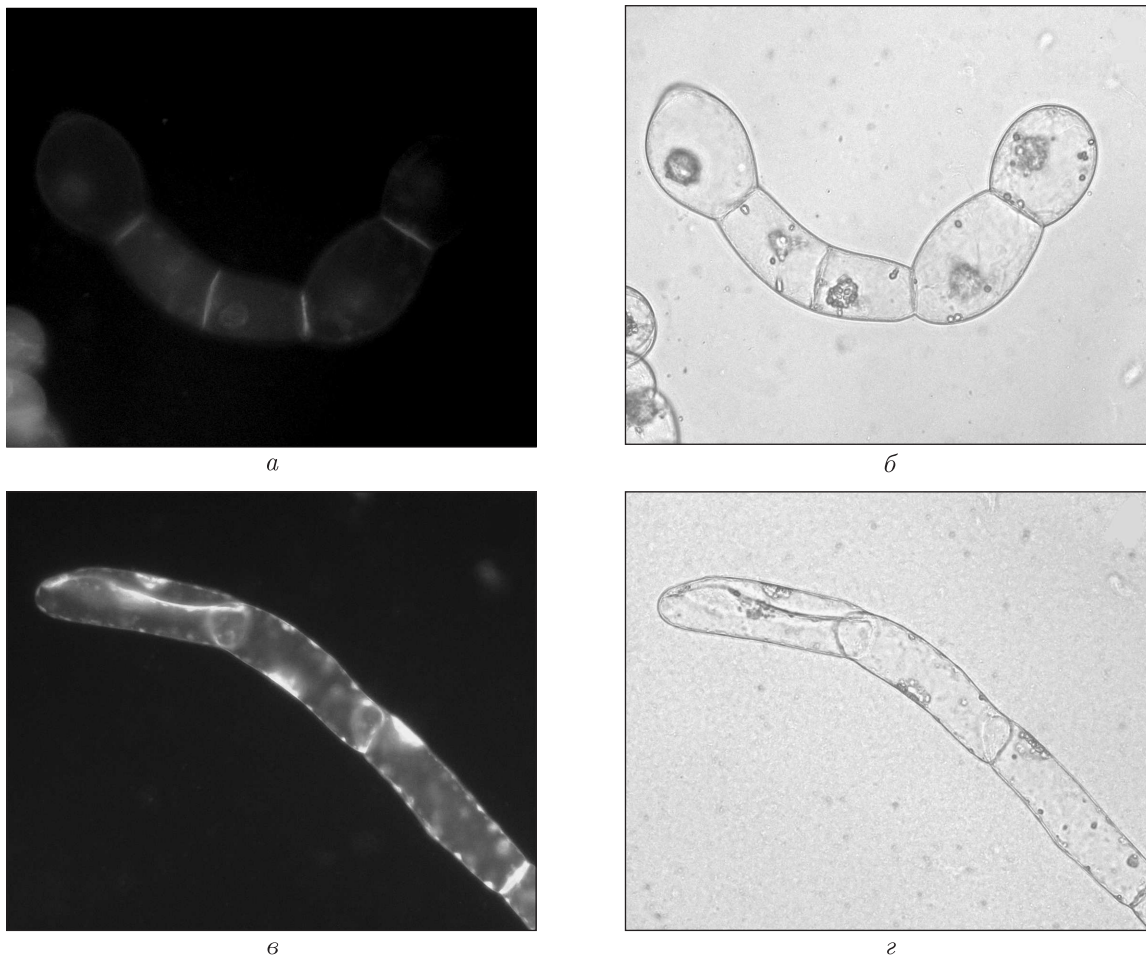


Рис. 2. Морфологічні ознаки аутофагії в клітинах ВУ-2.

a, б — клітини на 4-ту добу культивування, відсутність аутофагосом; *в, з* — клітини на 9-ту добу культивування, спостерігаються численні аутофагосоми;
a, в — забарвлення клітин монодансилкадаверином; *б, з* — загальна морфологія клітин

до розвитку аутофагії зі збільшенням позитивно забарвлених клітин до 7%. У подальшому процес набував ще більшого поширення, і на 8-му, 9-ту та 10-ту добу 15, 19 та 31% клітин відповідно містили аутофагосоми. На 11-ту добу культивування цей показник мав максимальне значення і становив 42% (рис. 3). Отже, можна впевнено стверджувати, що в умовах метаболічного стресу, одним з аспектів якого є виснаження живильного середовища, розвиток аутофагії є адаптивним механізмом забезпечення трофічних процесів клітини. Слід зазначити, що клітини ВУ-2 виявляли досить стабільні показники виживання в умовах тривалого культивування. Так, якщо впродовж стандартного строку культивування кількість загиблих клітин, що визначали за забарвленням пропідій йодидом, не перевищувала 7%, через 11 днів показник загибелі клітин становив 21,5%. Високий відсоток виживання клітин свідчить про достовірність отриманих результатів та адекватність даної моделі для відтворення умов аутофагії в клітинах лінії ВУ-2.

Основним завданням дослідження було з'ясування змін функціонального стану мікротрубочок при розвитку аутофагії, а саме ацетилювання α -тубуліну. Для проведення та-

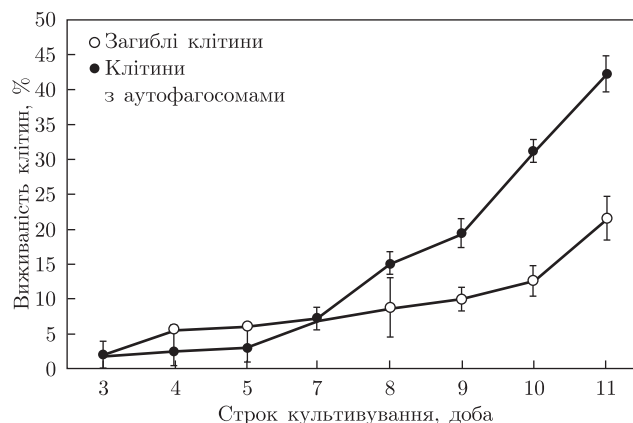


Рис. 3. Динаміка виживаності клітин BY-2 та розвиток аутофагії протягом 11-добового культивування

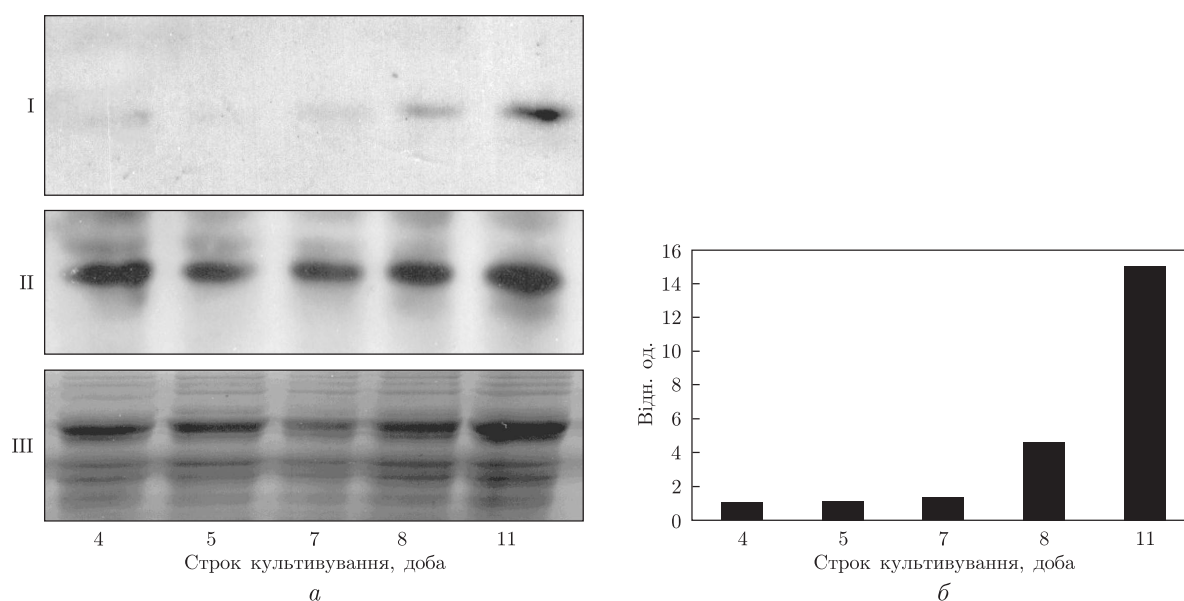


Рис. 4. Вестерн-блот аналіз ацетилювання α -тубуліну в клітинах BY-2 за умов аутофагії (а); I — ідентифікація рівня ацетилювання α -тубуліну з використанням антитіл Т6793, II — ідентифікація рівня α -тубуліну з використанням антитіл TU-01, III — контроль нанесення зразків (нітроцелюлозна мембрана після електропереносу, забарвлення Ронсеау S); б — співвідношення рівня ацетильованого α -тубуліну до загального рівня цього білка

кого аналізу використовували ті ж самі зразки клітин, для яких у зазначені вище строки досліджували рівень виживання клітин, концентрацію сахарози та загального білка, а також наявність аутофагії. Для точного кількісного порівняння рівня ацетильованого α -тубуліну відносно загального проводили вестерн-блот аналіз з використанням антитіл до ацетильованого та α -тубуліну взагалі на одній мембрані, застосовуючи повторну імунодетекцію. В результаті було встановлено достовірне гіперацетилювання α -тубуліну в клітинах на 8-му–11-ту добу культивування (рис. 4, а), що збігається в часі з посиленням процесів аутофагії, описаних вище. За допомогою денситометричного аналізу отриманих результатів імунодетекції виявлено збільшення кількості модифікованого α -тубуліну в 3,5 раза на 8-му добу порівняно з 7-ю добою і в 11,5 раза — на 11-ту

добу. Наявність певного низького базального рівня ацетилювання α -тубуліну на ранніх стадіях культивування клітин ВУ-2 збігається з незначною, у межах кількох відсотків, кількістю клітин з ознаками аутофагії, що визначались для цих же часових проміжків.

Таким чином, беручи до уваги літературні дані про залучення цитоскелета до опосередкування розвитку аутофагії та ту важливу роль, що відводиться ацетилюванню α -тубуліну у формуванні функціонального стану мікротрубочок у тваринній клітині, можна стверджувати про існування у рослин подібних механізмів залучення цитоскелета до реалізації механізмів аутофагії.

1. Liu Y., Bassham D. C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2012. – **63**. – P. 215–237.
2. Bassham D. C., Laporte M., Marty F. et al. Autophagy in development and stress responses of plants // *Autophagy*. – 2006. – **2**, No 1. – P. 2–11.
3. Monastyrska I., Rieter E., Klionsky D. J., Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy // *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* – 2009. – **84**, No 3. – P. 431–448.
4. Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – **22**, No 1. – P. 104–111.
5. Fass E., Shvets E., Degani I. et al. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**. – P. 36303–36316.
6. 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.
7. Verhey K. J., Gaertig J. The tubulin code // *Cell Cycle*. – 2007. – **6**, Is. 17. – P. 2152–2160.
8. Blume Y. B., Smertenko A., Ostapets N. N. et al. Post-translational modifications of plant tubulin // *Cell Biol. Int.* – 1997. – **21**. – P. 918–920.
9. 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.* – 2010. – **285**, No 31. – P. 24184–24194.
10. Блюм Я. Б., Литвин Д. И., Шеремет Я. А., Красильченко Ю. А., Емец А. И. Нитротирозилирование как посттрансляционная модификация α -тубулина в клетках ВУ-2 // *Доп. НАН України*. – 2011. – № 7. – С. 161–166.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
12. Takatsuka C., Inoue Y., Higuchi T. et al. Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: isolation of the autolysosome and its characterization // *Plant Cell Physiol.* – 2011. – **52**, No 12. – P. 2074. – 2087.
13. Kaushik S., Singh R., Cuervo A. M. Autophagic pathways and metabolic stress // *Diabetes Obes. Metab.* – 2010. – **12**, No 2. – P. 4–14.
14. Mizushima N., Klionsky D. J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism // *Ann. Rev. Nutr.* – 2007. – **27**. – P. 19–40.
15. Biederbick A., Kern H. F., Elsässer H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles // *Eur. J. Cell Biol.* – 1995. – **66**, No 1. – P. 3–14.

Д. И. Литвин, А. И. Емец, академик НАН Украины Я. Б. Блюм

**Развитию аутофагии в клетках ВУ-2 (*Nicotiana tabacum*)
сопутствует ацетилирование α -тубулина**

Исследованы характеристики развития и протекания процессов аутофагии, индуцированных метаболическим стрессом, а также связанные с этим изменения ацетилирования α -тубулина в клетках ВУ-2 в условиях длительного культивирования суспензионной культуры. Показано, что истощение сахарозы в культивационной среде приводит к стремительному развитию аутофагии, что сопровождается, в свою очередь, снижением уровня белка в клетках. С помощью вестерн-блот анализа показано гиперацилирование α -тубулина, четко коррелирующее по времени с данными показателями. Полученные результаты свидетельствуют о роли этой посттрансляционной модификации тубулина в поддержании функционального состояния цитоскелета, необходимого для реализации аутофагии в растительной клетке.

D. I. Lytvyn, A. I. Yemets, Academician of the NAS of Ukraine Ya. B. Blume

**Development of autophagy in ВУ-2 (*Nicotiana tabacum*) cells is
accompanied by acetylation of α -tubulin**

The characteristics of autophagy development induced by metabolic stress related to prolonged cultivation of ВУ-2 cells suspension culture, as well as changes in the acetylation level of α -tubulin, were studied. It was shown that the depletion of sucrose in a cultivation medium leads to the rapid development of autophagy, which is accompanied by a reduced protein level in cells. Using the Western blot analysis, the hyperacetylation of α -tubulin was discovered that was clearly correlated in time with the titled characteristics. Obtained data suggest a role for this posttranslational modification of tubulin in the maintaining of a functional state of the cytoskeleton that is necessary for the implementation of autophagy in plant cell.