

УДК 577.112.5

doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.541-556

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ПШЕНИЦЫ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

*А.Б. Мазина^{1,2}, С.А. Дмитриева², А.Г. Ренкова², Ю.Н. Валитова²,
В.Р. Хабибрахманова^{2,3}, Ф.В. Минибаева^{1,2}*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН,
г. Казань, 420111, Россия

³Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, 420015, Россия

Аннотация

Аутофагия – высококонсервативный процесс внутриклеточной деградации поврежденных, окисленных или избыточных макромолекул и органелл в клетках эукариот. Базовый уровень аутофагии при оптимальных условиях невысок, однако в стрессовых условиях активность аутофагических процессов значительно возрастает. Настоящая работа посвящена анализу биохимических характеристик аутофагосом, образующихся в клетках суспензионной культуры пшеницы при голодании и обработке полиамином спермином. Аутофагосомы, выделенные из клеток, испытывающих недостаток сахарозы, характеризовались высокой активностью кислой фосфатазы и протеазы – маркерных ферментов литических везикул, а также изменением липидного состава. Обнаружено, что полиамин спермин индуцирует аутофагию, которая сопровождалась изменением редокс-статуса клеток и энергетического статуса митохондрий. Спермин-индуцированные аутофагосомы характеризовались высокой ферментативной активностью кислой фосфатазы и протеазы. Полученные результаты свидетельствуют о функциональной универсальности основных биохимических маркеров аутофагосом в клетках растений.

Ключевые слова: суспензионная культура пшеницы, аутофагосомы, голодание, спермин, кислая фосфатаза, протеаза

Введение

В жизнедеятельности эукариот большое значение имеет высококонсервативный, сложно регулируемый катаболический процесс – аутофагия. В ходе этого процесса происходит изолирование и расщепление эндогенных макромолекул с целью обеспечения клеток необходимыми строительными и энергетическими субстратами. В растениях роль аутофагии показана в онто- и органогенезе при формировании растительных тканей, например при образовании аэренхимы и сосудов ксилемы [1], в процессах старения и программируемой гибели клеток [2]. Аутофагия активируется при действии на растения таких неблагоприятных факторов, как голодание, затопление, засоление, засуха [1]. Активация аутофагических

процессов при стрессе направлена на своевременное удаление окисленных или отслуживших макромолекул и поврежденных структур [2].

Аутофагия характеризуется образованием аутофагосом – двумембранных аутофагических везикул, в процесс формирования которых вовлечено более 30 аутофагических белков. В растениях с помощью аутофагосом может происходить транспортировка подлежащего удалению клеточного материала к центральной вакуоли и его литическая деградация. Деградация сложных веществ и биополимеров внутри аутофагосом осуществляется комплексом литических ферментов, в том числе протеаз и фосфатаз, обладающих низким рН-оптимумом активности. С помощью методов электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии было показано, что аутофагосомы растений содержат кислую фосфатазу – маркерный фермент лизосом животных [3].

Индукция аутофагии и формирование аутофагосом контролируется множеством метаболических путей и сигнальных молекул, в том числе активными формами кислорода (АФК). Ранее с помощью флуоресцентного красителя LysoTracker Red и электронной микроскопии нами было визуализировано появление аутофагосом в корнях проростков пшеницы при действии прооксидантов параквата и салициловой кислоты [4, 5]. Кроме того, активация аутофагических процессов была подтверждена стимуляцией экспрессии ключевых аутофагических генов *TaATG4* и *TaATG8* [6]. Среди индукторов аутофагии большой интерес представляют активные формы азота, в частности оксид азота (NO) и его естественные доноры – полиамины. Нами показано, что полиамин спермин в физиологической (10 мкМ) концентрации индуцирует аутофагию в клетках корней пшеницы [7]. До настоящего времени биохимический состав аутофагосом в клетках растений оставался практически неизученным.

Цель настоящей работы – проанализировать особенности аутофагии и дать характеристику аутофагосом в клетках суспензионной культуры пшеницы в условиях голодания и при действии спермина.

1. Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали суспензионную культуру пшеницы. Штамм культуры клеток *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (коллекционный № 34) был получен из Всероссийской коллекции культур клеток высших растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва). Культуру выращивали в темноте на среде Шенка – Хандебранда [8] при температуре +26 °С и непрерывном качании (130 об./мин) в течение 10 дней.

Для индукции голода на 9-й день роста культуры клеток полная среда Шенка – Хандебранда заменялась на среду, содержащую 1/2 дозы сахарозы, для инкубации в течение 1 сут. В экспериментах со спермином суспензионную культуру клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста (10 дней), инкубировали в растворах, содержащих спермин (Sigma, США) в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ, в течение 3 ч при комнатной температуре.

1.1. Визуализация аутофагосом, оценка жизнеспособности клеток и митохондриального мембранного потенциала. Для визуализации аутофагосом клетки окрашивали 1 мкМ LysoTracker Red DND 99 (Invitrogen, λ_{ab} 577 нм / λ_{em} 590 нм).

Об образовании аутофагосом судили по образованию ярких точек внутри цитоплазмы клеток, специфичность окрашивания подтверждали с применением ингибитора аутофагии – 3-метиладенина (Sigma, США) [9]. Косвенную оценку жизнеспособности проводили по визуализации мертвых клеток с помощью красителя пропидия йодида (1 мкМ PI, Sigma, λ_{ab} 485 нм / λ_{em} 610 нм) [10]. Флуоресценцию анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM-510 META (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Мембранный потенциал митохондрий оценивали с помощью потенциал-зависимого флуоресцентного красителя метилового эфира тетраметилпродамина (TMRM, Sigma, λ_{ab} 543 нм / λ_{em} 573 нм), который накапливается в матриксе энергизованных митохондрий [11]. Флуоресценцию анализировали с помощью конфокального микроскопа. О снижении митохондриального мембранного потенциала судили по рассеиванию свечения.

1.2. Определение интенсивности потребления кислорода. Интенсивность потребления кислорода определяли манометрическим методом Варбурга [12]. Навеску культуры клеток (200 мг) помещали в соответствующие растворы (3 мл) в сосудики Варбурга. После 15 мин термостатирования интенсивность дыхания измеряли в течение 3 ч, показания снимали каждый час.

1.3. Определение содержания H_2O_2 и интенсивности ПОЛ. Содержание H_2O_2 определяли спектрофотометрически в растворимой фракции гомогената с использованием ксиленола оранжевого (Sigma, США) [13]. Изменения в оптической плотности регистрировали на спектрофотометре Lambda-25 (США, λ_{560}). Концентрацию H_2O_2 рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям H_2O_2 .

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Оптическую плотность продукта реакции измеряли при λ_{532} .

1.4. Выделение аутофагосом в градиенте плотности перколла. Выделение фракции, содержащей аутофагосомы, проводили по методике [3] с модификациями. Клетки суспензии дважды промывали охлажденной средой, содержащей 20 мМ HEPES pH 7.4, 0.1 М сахарозу, затем добавляли 10 мл среды выделения (20 мМ HEPES pH 7.4, 0.1 М сахароза, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.1% БСА, DTT, PVP). Далее клетки выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 45 мин, гомогенизировали в течение 2 мин и центрифугировали (600 g, +4 °C, 10 мин). Супернатант далее центрифугировали (17000 g, +4 °C, 20 мин). Получившийся осадок ресуспендировали в 600 мкл среды, содержащей 10 мМ HEPES pH 7.4, 0.1 М маннитол, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.1% БСА, затем наслаивали на перколл и центрифугировали в непрерывном градиенте плотности перколла (40000 g, +4 °C, 1 ч). Получившиеся фракции отбирали для определения ферментативной активности, анализа липидного состава и визуализации аутофагосом.

1.5. Определение активности кислой фосфатазы и протеазы. Для определения ферментативной активности в каждую аутофагосомальную фракцию добавляли 1%-ный Тритон X-100 (10:1). Для определения активности кислой

фосфатазы в реакционную среду, содержащую 500 мкл 0,1 М Na-ацетатного буфера, рН 5.0, 380 мкл H₂O, 20 мкл 1 мМ 4-нитрофенилфосфата, добавляли 100 мкл аутофагосомальной фракции, перемешивали и инкубировали в термостате при +37 °С в течение 1 ч. Активность кислой фосфатазы рассчитывали по изменению оптической плотности при λ_{405} в пересчете на мг белка.

Для определения активности протеазы в реакционную среду, содержащую 400 мкл 1 мМ Na-ацетатного буфера, рН 5.5, 400 мкл 0.4%-ного азоказеина, добавляли 200 мкл аутофагосомальной фракции и 5 мкл 250 мМ β -меркаптоэтанола, инкубировали в течение ночи при +32 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 50%-ной ТХУ, после чего центрифугировали (13200 g, 10 мин). Протеазную активность рассчитывали по изменению оптической плотности при λ_{330} в пересчете на мг белка.

1.6. Анализ липидной фракции. Липидный экстракт был получен из аутофагосомальной фракции по методу Николса с модификациями [14]. Разделение полярных липидов в системе растворителей: хлороформ/метанол/вода (65/25/4) – и денситометрический анализ пластинок осуществляли с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием системы САМАГ (Швейцария).

1.7. Статистическая обработка результатов. Все опыты проводили в 4–6 биологических и 3 аналитических повторностях. Статистическая обработка результатов производилась с использованием *t*-критерия Стьюдента. Звездочкой отмечены статистически значимые от контроля отличия ($p < 0.05$).

2. Результаты

Одними из наиболее распространенных индукторов образования аутофагосом являются голодание и недостаток питательных элементов [15]. Результаты наших экспериментов показали, что голодание, индуцированное недостатком обеспечения сахарозы, приводит к образованию аутофагосом в клетках суспензионной культуры пшеницы (рис. 1, б). В результате деления культуры клеток в непрерывном градиенте перколла были отобраны десять субклеточных фракций. Во всех фракциях не наблюдалось существенного изменения активности сукцинат-дегидрогеназы и каталазы между контрольным и опытным вариантом (данные не представлены), что говорит об отсутствии загрязнения фракций митохондриями и пероксисомами. Окрашивание специфичным красителем LysoTracker Red выявило наличие аутофагосом во фракциях № 6 и 7, что соответствует 28%-ной плотности перколла (рис. 1, г, е).

Важной биохимической характеристикой аутофагосом является активность маркерных ферментов – кислой фосфатазы и протеазы. Ферментативный комплекс аутофагосом адаптирован к расщеплению большинства сложных веществ и биополимеров и характеризуется достаточно низким значением рН-оптимума активности.

Наличие этих маркерных ферментов широко показано для аутолизосом в клетках млекопитающих, где большинство ферментов относится к группе кислых гидролаз. С помощью методов электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии было показано, что аутофагосомы растений также содержат кислую

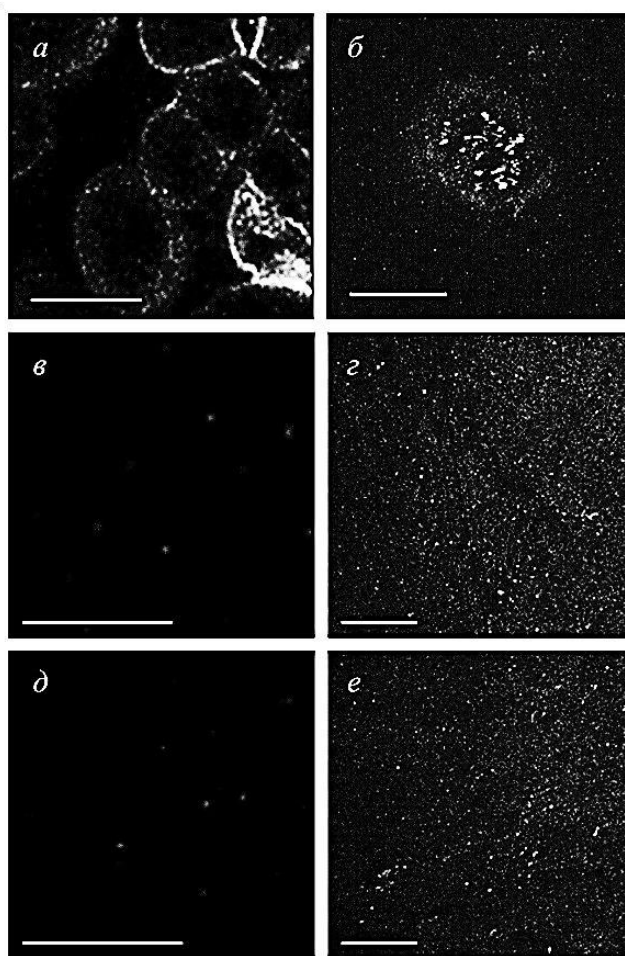


Рис. 1. Визуализация аутофагосом в голодающих клетках суспензионной культуры пшеницы (а–б) и в субклеточных фракциях, обладающих повышенной активностью кислой фосфатазы (в–е): а – контроль; б – голод; в – фракция № 6, контроль; г – фракция № 6, голод; д – фракция № 7, контроль; е – фракция № 7, голод

фосфатазу – маркерный фермент лизосом животных [3]. Анализ ферментной активности кислой фосфатазы в субклеточных фракциях, выделенных из клеток суспензионной культуры пшеницы, показал, что наибольшей активностью обладали фракции № 6 и 7 (рис. 2). Интересно, что активность кислой фосфатазы во фракции № 6 была в два раза выше, чем во фракции № 7. В то же время активность протеазы во фракциях № 6 и 7 почти не отличалась, но была выше по сравнению с другими фракциями (рис. 2).

Известно, что источники мембран для формирования аутофагосом достаточно многообразны: это могут быть уже имеющиеся в клетке мембраны эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, митохондрий, плазматической мембраны [16].

Существует также теория, согласно которой мембраны аутофагосом могут собираться *de novo* за счет синтеза или транспорта липидов [17]. В наших экспериментах для анализа липидного состава была использована фракция № 6,

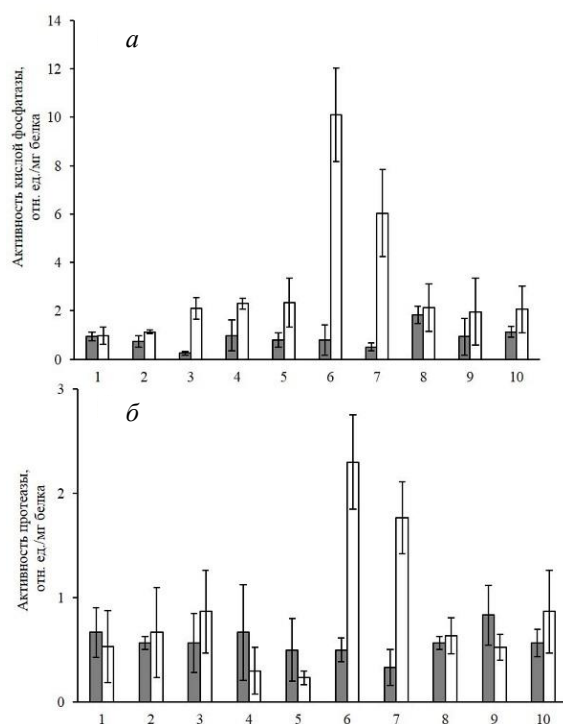


Рис. 2. Распределение активности кислой фосфатазы (*а*) и протеазы (*б*) в субклеточных фракциях, разделенных в градиенте плотности перколлы. Серым цветом отмечена активность в контрольном варианте, белым цветом – активность в голодающих клетках. Номера фракций представлены последовательно от верхней к нижней части центрифужной пробирки

Табл. 1

Относительное содержание липидов в аутофагосомальной фракции, выраженное в % от общего содержания липидов в экстрактах из контрольных и голодающих клеточных культур

Липиды	Контроль	Голодание
Фосфатидилхолин	17.55	31.74
Фосфатидилэтаноламин	28.83	24.00
Гликоцерамиды	2.47	0.74

обогащенная аутофагосомами и обладающая высокой ферментативной активностью. В результате проведенного анализа липидного состава аутофагосомальной фракции были обнаружены фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин (фосфолипиды) и гликоцерамиды (сфинголипиды) (табл. 1).

Интересно, что при стрессе, индуцированном голоданием, относительное содержание этих липидов заметно менялось: содержание фосфатидилхолина увеличивалось почти в два раза, содержание фосфатидилэтаноламина незначительно уменьшалось, в то время как уровень гликоцерамидов значительно снижался. Изменение уровня фосфатидилхолина можно связать с необходимостью синтеза кардиолипина, который находится во внутренней мембране митохондрий [18]. Можно предположить, что изменение содержания липидов косвенно указывает на наличие митохондрий внутри аутофагосом. Так, ранее нами было

показано наличие полуразрушенных и интактных митохондрий в аутофагосомах при действии на растения прооксидантов [4]. Изменение липидного состава также может быть связано с участием липидных сигнальных молекул в индукции аутофагии, однако данное предположение требует дополнительного подтверждения. Таким образом, в настоящей работе продемонстрировано, что аутофагосомы, образовавшиеся в клетках суспензионной культуры под действием голодания, характеризовались высокой активностью аутофагических ферментов – кислой фосфатазы и протеазы, а также изменением липидного состава.

К одним из мало изученных естественных индукторов аутофагии относятся полиамины. Полиамины (спермин, спермидин, кадаверин) являются низкомолекулярными азотсодержащими соединениями, уровень которых возрастает в условиях стресса и способствует запуску механизмов защиты [19]. Экспериментально было показано, что введение спермидина стимулирует аутофагию в стареющих дрожжах, мухах и нематодах и в культивируемых клетках млекопитающих и способствует продлению их жизни за счет утилизации токсичных клеточных структур [20]. Ранее нами продемонстрировано, что в клетках корней пшеницы полиамин спермин в физиологической (10 мкМ) концентрации индуцирует аутофагию в корнях пшеницы [7]. В настоящей работе было проанализировано образование аутофагосом в культуре клеток пшеницы после 3 ч обработки спермином в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ. Наиболее интенсивно образование аутофагосом происходило при действии 10 мкМ спермина. Воздействие спермина в более высокой (100 мкМ) концентрации приводило к образованию в клетках крупных конгломератов, формирование которых не предотвращалось применением ингибитора аутофагии 3-метиладенина. Можно полагать, что спермин в физиологических (1 и 10 мкМ) концентрациях индуцирует аутофагию, однако в высокой концентрации этот полиамин токсичен для клеток. Данное предположение подтвердилось в снижении жизнеспособности клеток (рис. 3, з) при действии 100 мкМ спермина.

Известно, что полиамины являются редокс-активными соединениями. Они обладают как антиоксидантными [21], так и прооксидантными свойствами, индуцируя генерацию H_2O_2 в ходе стресс-индуцированного окислительного взрыва [22]. Ранее нами продемонстрировано, что обработка экзогенным спермином корней пшеницы индуцировала синтез оксида азота (NO), что подтверждалось характерным парамагнитным спектром триплетной структуры, детектированным с помощью электронного парамагнитного резонанса [7]. В суспензионной культуре клеток пшеницы спермин в концентрациях 1 и 10 мкМ приводил к почти двукратному увеличению содержания H_2O_2 (табл. 2). Интересно, что при этом не наблюдалось повышения уровня ПОЛ (табл. 2). Спермин в концентрации 100 мкМ приводил к снижению содержания H_2O_2 в культуре клеток, однако при этом происходило усиление ПОЛ, с которым связывают развитие окислительного стресса (табл. 2). Генерация АФК при действии спермина в концентрациях 1 и 10 мкМ может играть сигнальную роль в запуске аутофагии в клетках растений. Значительное же усиление ПОЛ, образование конгломератов внутри клеток и снижение жизнеспособности клеток – все это свидетельствует о развитии в клетках окислительного стресса и токсичном действии спермина в концентрации 100 мкМ.

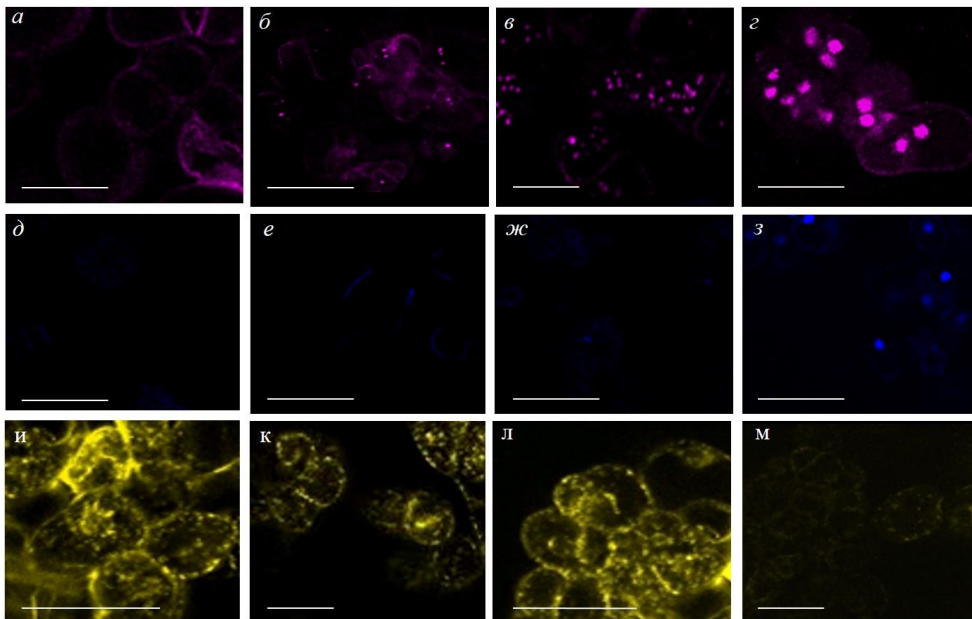


Рис. 3. Визуализация аутофагосом в клетках суспензионной культуры пшеницы через 3 ч действия спермина: *a* – контроль; *б* – 1 мкМ спермин; *в* – 10 мкМ спермин; *г* – 100 мкМ спермин. Жизнеспособность клеток суспензионной культуры пшеницы через 12 ч действия спермина: *д* – контроль; *е* – 1 мкМ спермин; *ж* – 10 мкМ спермин; *з* – 100 мкМ спермин. Митохондриальный мембранный потенциал в клетках суспензионной культуры пшеницы через 3 ч действия спермина: *и* – контроль; *к* – 1 мкМ спермин; *л* – 10 мкМ спермин; *м* – 100 мкМ спермин. Масштабный отрезок – 50 мкМ. LT – LysoTracker Red, PI – Propidium Iodide, TMRM – Tetramethylrhodamine Methyl Ester

Табл. 2

Изменение содержания H_2O_2 , уровня ПОЛ и интенсивности дыхания клеток суспензионной культуры пшеницы при действии спермина. Звездочкой отмечены статистически значимые от контроля отличия ($p < 0.05$)

Варианты	Концентрация	H_2O_2 , мкМ (3 ч)	ПОЛ, % (6 ч)	Поглощение кислорода, мкг/ч/г с.в. (3 ч)
Контроль	–	8.3 ± 0.2	7.27 ± 0.3	449.88 ± 44
Спермин	1 мкМ	$10.8 \pm 0.3^*$	7.6 ± 0.4	515.26 ± 40
	10 мкМ	$12.4 \pm 0.3^*$	7.06 ± 0.3	434.03 ± 32.7
	100 мкМ	$6.5 \pm 0.4^*$	$11.3 \pm 0.3^*$	$328.03 \pm 50.9^*$

В клетках млекопитающих полиамины индуцируют аутофагию посредством энергозависимых сигнальных каскадов, в том числе через АМФ-зависимую протеинкиназу и снятие ингибирующего влияния киназы mTOR. Несмотря на то что индукция аутофагии при действии полиаминов напрямую не связана с изменением функционирования митохондрий, от энергообеспечения клетки зависит сам процесс запуска аутофагии и формирования аутофагосом [20]. Кроме того, АТФ расходуется на поддержание градиента рН в аутофагосомах. Митохондрии как основные АТФ-образующие органеллы играют важную роль в индукции аутофагии,

в том числе в нефотосинтезирующих клетках растений [5]. Анализ изменений интенсивности дыхания суспензионных клеток выявил повышение интенсивности потребления кислорода при действии спермина в концентрациях 1 и 10 мкМ (табл. 2). В концентрации 100 мкМ спермин ингибировал дыхание, что подтверждает токсичность этого полиамина в высокой концентрации.

Спермин-индуцированные изменения дыхания сопровождались изменениями митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$). При действии на культуру клеток 1 и 10 мкМ спермина митохондрии находились в энергизованном состоянии, о чем свидетельствует яркое точечное свечение флуоресцентного красителя TMRM (рис. 3, *к, л*). В то же время после воздействия 100 мкМ спермина $\Delta\Psi_m$ значительно понижался (рис. 3, *м*). Можно предположить, что спермин в высокой концентрации нарушает функциональную активность митохондрий и способствует развитию в клетках окислительного стресса, в то время как полиамины в физиологических концентрациях могут стимулировать функционирование митохондрий. Показано, что в дрожжах в присутствии спермина в концентрациях, близких к физиологическим, также происходила стимуляция дыхания вследствие увеличения активного поглощения Ca^{2+} митохондриями [23].

Анализ десяти субклеточных фракций, полученных в результате центрифугирования суспензии клеток в градиенте плотности перколла, показал, что обработка 10 мкМ спермином приводила к увеличенному содержанию аутофагосом во фракциях № 4 и 7, визуализированных как LysoTracker-позитивные яркие точечные образования (рис. 4). Аутофагия является одним из способов деградации и утилизации внутриклеточных белков. Показано, что деградация окисленных белков может происходить в том числе с помощью протеолитических систем, локализованных в аутофагосомах [24]. Ферментный анализ выявил наличие во фракциях № 4 и 7 высокой активности протеазы и кислой фосфатазы. Мы наблюдали значительное (в 12 раз по сравнению с контролем) спермин-индуцированное повышение протеазной активности во фракции аутофагосом № 4, в то время как увеличение протеазной активности во фракции № 7 было незначительным (рис. 5). Уровень активности кислой фосфатазы во фракциях № 4 и 7 был в 4.5–6 раз выше по сравнению с активностью в других фракциях (рис. 5). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что выделенные в результате центрифугирования в градиенте плотности перколла фракции № 4 и 7 содержат аутофагосомы, образовавшиеся при воздействии на клетки 10 мкМ спермина. Вариабельность морфологии и биохимического состава аутофагосом, изменение их седиментационных свойств при разных типах стрессовых воздействий, вероятно, вносят вклад в ферментативную гетерогенность выделенных фракций.

Таким образом, установлено, что в клетках суспензионной культуры пшеницы при голодании, индуцированном дефицитом углеводов, и действии полиамина спермина в физиологических концентрациях запускается процесс аутофагии. Аутофагия сопровождается изменениями редокс-статуса и энергетического статуса. Кроме того, показано, что аутофагосомы клеток растений, подобно аутофагосомам из клеток дрожжей и животных, характеризуются высокой активностью маркерных протеолитических ферментов – кислой фосфатазой и протеазой, что подтверждает функциональную универсальность этих литических структур.

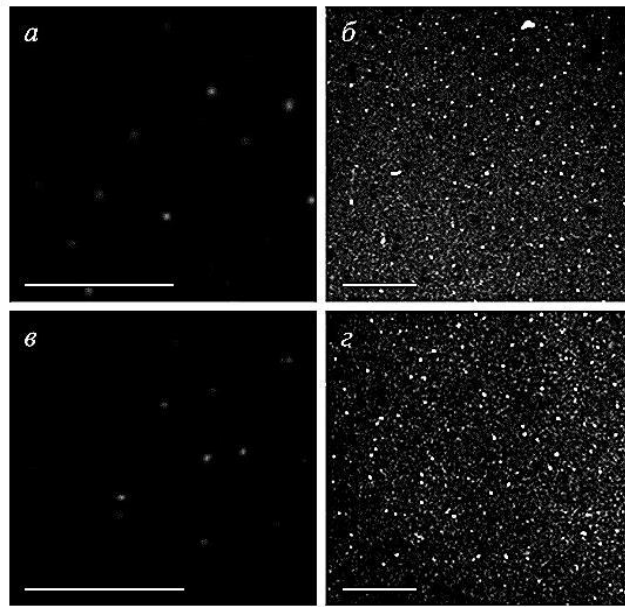


Рис. 4. Визуализация аутофагосом в субклеточных фракциях, обладающих повышенной активностью кислой фосфатазы: *a* – фракция № 4, контроль; *б* – фракция № 4, 10 мкМ спермин; *в* – фракция № 7, контроль; *г* – фракция № 7, 10 мкМ спермин

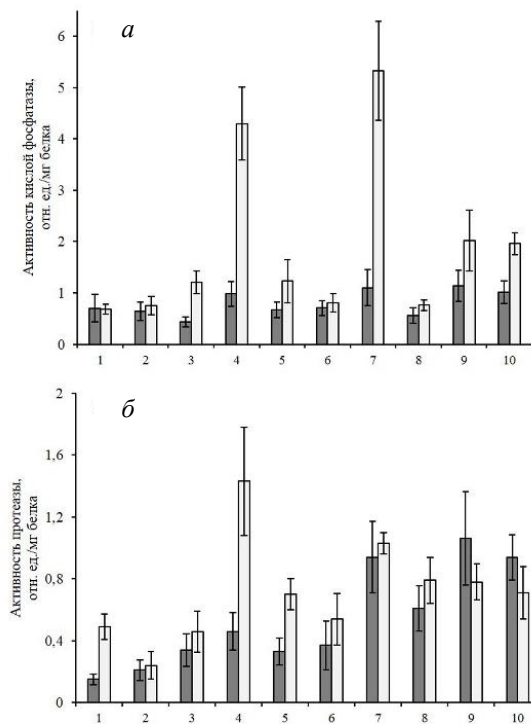


Рис. 5. Распределение активности кислой фосфатазы (*a*) и протеазы (*б*) в субклеточных фракциях, разделенных в градиенте плотности перколлы. Серым цветом отмечена активность в контрольном варианте, белым цветом – активность в клетках, обработанных спермином. Номера фракций представлены последовательно от верхней к нижней части центрифужной пробирки

Благодарности. Работа частично выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН (характеристика аутофагической активности), а также частично за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (изолирование аутофагосом).

Исследование аутофагии в клетках суспензионной культуры пшеницы проведено с использованием штамма *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. из Всероссийской коллекции культур клеток высших растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва).

Литература

1. *Siyiannis V.F., Protonotarios V.E., Zechmann B., Chorianopoulou S.N., Müller M., Hawkesford M.J., Bouranis D.L.* Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or phosphate deprivation // *Protoplasma*. – 2012. – V. 249, No 3. – P. 671–686. – doi: 10.1007/s00709-011-0309-y.
2. *Filomeni G., De Zio D., Cecconi F.* Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs // *Cell Death Differ.* – 2015. – V. 22, No 3. – P. 377–386. – doi: 10.1038/cdd.2014.150.
3. *Takatsuka C., Inoue Y., Higuchi T., Hillmer S., Robinson D.G., Moriyasu Y.* Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization // *Plant Cell Physiol.* – 2011. – V. 52, No 12. – P. 2074–2087. – doi: 10.1093/pcp/pcr137.
4. *Дмитриева С.А., Пономарева А.А., Рябовол В.В., Минибаева Ф.В.* Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность растительных митохондрий *in vivo* // *Биол. мембраны*. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 267–275.
5. *Minibayeva F.V., Dmitrieva S.A., Ponomareva A.A., Ryabovol V.V.* Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria // *Plant Physiol. Biochem.* – 2012. – V. 59. – P. 11–19. – doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.013.
6. *Рябовол В.В., Минибаева Ф.В.* Молекулярные механизмы аутофагии в растениях: роль белка ATG8 в формировании и функционировании аутофагосом // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81, Вып. 4. – С. 348–363.
7. *Dmitrieva S.A., Ponomareva A.A., Gurjanov O.P., Mazina A.B., Andrianov V.V., Iyudin V.S., Minibayeva F.V.* Spermine induces autophagy in plants: Possible role of NO and reactive oxygen species // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2018. – V. 483, No 4. – P. 341–343. – doi: 10.1134/S1607672918060121.
8. *Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F.* An introduction to plant cell culture // *Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds.) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, V. 318. – 2006. – P. 3–8. – doi: 10.1385/1-59259-959-1:003.
9. *Yang X., Bassham D.C.* New insight into the mechanism and function of autophagy in plant cells // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2015. – V. 320. – P. 1–40. – doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.07.005.
10. *Bahmani P., Schellenberger E., Klohs J., Steinbrink J., Cordell R., Zille M., Farr T.D.* Visualization of cell death in mice with focal cerebral ischemia using fluorescent annexin A5, propidium iodide, and TUNEL staining // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2011. – V. 31, No 5. – P. 1311–1320. – doi: 10.1038/jcbfm.2010.233.0.

11. *Scaduto R.C. Jr., Grottyohann L.W.* Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76, No 1, Pt. 1. – P. 469–477. – doi: 10.1016/S0006-3495(99)77214-0.
12. *Семухатова О.А., Чулановская М.В.* Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. – М.-Л.: Наука, 1965. – 168 с.
13. *Gay C., Gebicki J.M.* A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay // *Anal. Biochem.* – 2000. – V. 284, No 2. – P. 217–220. – doi: 10.1006/abio.2000.4696.
14. *Nichols B.W.* Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1963. – V. 70. – P. 417–422. – doi: 10.1016/0006-3002(63)90771-6.
15. *Scott R.C., Schuldiner O., Neufeld T.P.* Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body // *Dev. Cell.* – 2004. – V. 7, No 2. – P. 167–178. – doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.009.
16. *Zaffagnini G., Martens S.* Mechanisms of selective autophagy // *J. Mol. Biol.* – 2016. – V. 428, No 9, Pt. A. – P. 1714–1724. – doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.004.
17. *Juhasz G., Neufeld T.P.* Autophagy: A forty-year search for a missing membrane source // *PloS Biol.* – 2006. – V. 4, No 2. – Art. e36, P. 161–164. – doi: 10.1371/journal.pbio.0040036.
18. *Kameoka S., Adachi Y., Okamoto K., Iijima M., Sesaki H.* Phosphatidic acid and cardiolipin coordinate mitochondrial dynamics // *Trends Cell Biol.* – 2018. – V. 28, No 1. – P. 67–76. – doi: 10.1016/j.tcb.2017.08.011.
19. *Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I.* Polyamines and stress tolerance of plants // *Plant Stress.* – 2007. – V. 1, No 1. – P. 50–71.
20. *Madeo F., Eisenberg T., Pietrocola F., Kroemer G.* Spermidine in health and disease // *Science.* – 2018. – V. 359, No 6374. – Art. eaan2788, P. 1–10. – doi: 10.1126/science.aan2788.
21. *Wimalasekera R., Tebartz F., Günther F.E.* Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses // *Plant Sci.* – 2011. – V. 181, No 5. – P. 593–603. – doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002.
22. *Gupta K., Sengupta A., Chakraborty M., Gupta B.* Hydrogen peroxide and polyamines act as double edged swords in plant abiotic stress responses // *Front. Plant Sci.* – 2016. – V. 7. – Art. 1343, P. 1–19. – doi: 10.3389/fpls.2016.01343.
23. *Votyakova T.V., Bazhenova E.N., Zvjagilskaya R.A.* Polyamines improve Ca²⁺ transport system of the yeast mitochondria // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 261, No 1. – P. 139–141. – doi: 10.1016/0014-5793(90)80655-3.
24. *Bird S.W., Maynard N.D., Covert M.W., Kirkegaard K.* Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – V. 111, No 36. – P. 13081–13086. – doi: 10.1073/pnas.1401437111.

Поступила в редакцию
10.03.2020

Мазина Анастасия Борисовна, аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии; младший научный сотрудник

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: abmazina@gmail.com

Дмитриева Светлана Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: *s_dmitrieva@list.ru*

Ренкова Альбина Гарифулловна, кандидат биологических наук, научный сотрудник
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: *renkova@kibb.knc.ru*

Валитова Юлия Наилевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: *yulavalitova@mail.ru*

Хабибрахманова Венера Равилевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, доцент кафедры пищевой биотехнологии
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
Казанский национальный исследовательский технологический университет
ул. К. Маркса, д. 68, г. Казань, 420015, Россия
E-mail: *venerakhabibrakhmanova@gmail.com*

Минибаяева Фарид Вилевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии; главный научный сотрудник
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
E-mail: *minibayeva@kibb.knc.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2020, vol. 162, no. 4, pp. 541–556

doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.541-556

**Cytological and Biochemical Markers of Autophagy
in Wheat Suspension Culture Cells under Abiotic Stress**

A.B. Mazina^{a,b*}, *S.A. Dmitrieva*^{b**}, *A.G. Renkova*^{b***}, *J.N. Valitova*^{b****},
V.R. Khabibrakhmanova^{b,c*****}, *F.V. Minibayeva*^{a,b*****},

^a*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^b*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia*

^c*Kazan National Research Technological University, Kazan, 420015 Russia*

E-mail: ^{*}*abmazina@gmail.com*, ^{**}*s_dmitrieva@list.ru*, ^{***}*renkova@kibb.knc.ru*,
^{****}*yulavalitova@mail.ru*, ^{*****}*venerakhabibrakhmanova@gmail.com*,
^{*****}*minibayeva@kibb.knc.ru*

Received March 10, 2020

Abstract

Autophagy is a highly conserved process of intracellular degradation of damaged, oxidized or excess macromolecules and organelles in eukaryotic cells. Under optimal conditions, the baseline level of

autophagy is low. However, the activity of autophagic processes greatly increases in response to stress. In this paper, we analyzed the biochemical characteristics of autophagosomes that are formed in the wheat suspension culture cells in response to starvation and as a result of treatment with polyamine spermine. High activity of acid phosphatase and protease, the marker enzymes of lytic vesicles, and changes in the lipid composition were observed in the autophagosomes isolated from the sucrose-deficient cells. It was revealed that polyamine spermine can induce autophagy, which was accompanied with the changes in the cellular redox status and the energy status of mitochondria. The spermine-induced autophagosomes were characterized by the high enzymatic activity of acid phosphatase and protease. The results obtained suggest the functional universality of the main biochemical markers of autophagosomes in plant cells.

Keywords: suspension culture of wheat, autophagosomes, starvation, spermine, acid phosphatase, protease

Acknowledgments. The study is performed in part within the state assignment to FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences (description of autophagic activity) and according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University (isolation of autophagosomes).

Autophagic processes in the wheat suspension culture cells were studied using the *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. strain from the All-Russian Collection of Cell Cultures of Higher Plants, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences (Moscow).

Figure Captions

Fig. 1. Visualization of autophagosomes in the wheat suspension culture cells under starvation (*a–b*) and in the subcellular fractions with high activity of acid phosphatase (*c–f*): *a* – control; *b* – starvation; *c* – fraction no. 6, control; *d* – fraction no. 6, starvation; *e* – fraction no. 7, control; *f* – fraction no. 7, starvation.

Fig. 2. Distribution of the activities of acid phosphatase (*a*) and protease (*b*) in the subcellular fractions after separation in the Percoll gradient. Gray color – activities in the control variant, white color – activities in the cells under starvation. Fraction numbers are given sequentially, from the top to the bottom of the centrifugal tube.

Fig. 3. Visualization of autophagosomes in the wheat suspension culture cells after 3 h of spermine action: *a* – control; *b* – 1 μM of spermine; *c* – 10 μM of spermine; *d* – 100 μM of spermine. Viability of the wheat suspension culture cells after 12 h of spermine action: *e* – control; *f* – 1 μM of spermine; *g* – 10 μM of spermine; *h* – 100 μM of spermine. Mitochondrial membrane potential in the wheat suspension culture cells after 3 hours of spermine action: *i* – control; *j* – 1 μM of spermine; *k* – 10 μM of spermine; *l* – 100 μM of spermine. Scale bar – 50 μM . LT – LysoTracker Red, PI – Propidium Iodide, TMRM – Tetramethylrhodamine Methyl Ester.

Fig. 4. Visualization of autophagosomes in the subcellular fractions with increased activity of acid phosphatase: *a* – fraction no. 4, control; *b* – fraction no. 4, 10 μM of spermine; *c* – fraction no. 7, control; *d* – fraction no. 7, 10 μM of spermine.

Fig. 5. Distribution of the activities of acid phosphatase (*a*) and protease (*b*) in the subcellular fractions after separation in the Percoll gradient. Gray color – activities in the control variant, white color – activities in the cells treated with spermine. Fraction numbers are given sequentially, from the top to the bottom of the centrifugal tube.

References

1. Siyiannis V.F., Protonotarios V.E., Zechmann B., Chorianopoulou S.N., Müller M., Hawkesford M.J., Bouranis D.L. Comparative spatiotemporal analysis of root aerenchyma formation processes in maize due to sulphate, nitrate or phosphate deprivation. *Protoplasma*, 2012, vol. 249, no. 3, pp. 671–686. doi: 10.1007/s00709-011-0309-y.
2. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.*, 2015, vol. 22, no. 3, pp. 377–386. doi: 10.1038/cdd.2014.150.
3. Takatsuka C., Inoue Y., Higuchi T., Hillmer S., Robinson D.G., Moriyasu Y. Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant Cell Physiol.*, 2011, vol. 52, no. 12, pp. 2074–2087. doi: 10.1093/pcp/pcr137.

4. Dmitrieva S.A., Ponomareva A.A., Ryabovol V.V., Minibaeva F.V. *In vivo* effects of oxidative stress on the ultrastructure and functional activity of mitochondria. *Biol. Membr.*, 2012, vol. 29, no. 4, pp. 267–275. (In Russian)
5. Minibayeva F.V., Dmitrieva S.A., Ponomareva A.A., Ryabovol V.V. Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, 2012, vol. 59, pp. 11–19. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.013.
6. Ryabovol V.V., Minibayeva F.V. Molecular mechanisms of autophagy in plants: Role of ATG8 proteins in formation and functioning of autophagosomes. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, vol. 81, no. 4, pp. 348–363. doi: 10.1134/S0006297916040052.
7. Dmitrieva S.A., Ponomareva A.A., Gurjanov O.P., Mazina A.B., Andrianov V.V., Iyudin V.S., Minibayeva F.V. Spermine induces autophagy in plants: Possible role of NO and reactive oxygen species. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2018, vol. 483, no. 4, pp. 341–343. doi: 10.1134/S1607672918060121.
8. Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. An introduction to plant cell culture. In: Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (Eds.) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2006, vol. 318, pp. 3–8. doi: 10.1385/1-59259-959-1:003.
9. Yang X., Bassham D.C. New insight into the mechanism and function of autophagy in plant cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2015, vol. 320, pp. 1–40. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.07.005.
10. Bahmani P., Schellenberger E., Klohs J., Steinbrink J., Cordell R., Zille M., Farr T.D. Visualization of cell death in mice with focal cerebral ischemia using fluorescent annexin A5, propidium iodide, and TUNEL staining. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2011, vol. 31, no. 5, pp. 1311–1320. doi: 10.1038/jcbfm.2010.233.0.
11. Scaduto R.C. Jr., Grotyohann L.W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.*, 1999, vol. 76, no. 1, pt. 1, pp. 469–477. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77214-0.
12. Semikhatova O.A., Chulanovskaya M.V. *Manometricheskie metody izucheniya dykhaniya i fotosinteza rastenii* [Manometric Methods for Studying Respiration and Plant Photosynthesis]. Moscow, Leningrad, Nauka, 1965. 168 p. (In Russian)
13. Gay C., Gebicki J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric–xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 284, no. 2, pp. 217–220. doi: 10.1006/abio.2000.4696.
14. Nichols B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, vol. 70, pp. 417–422. doi: 10.1016/0006-3002(63)90771-6.
15. Scott R.C., Schuldiner O., Neufeld T.P. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell*, 2004, vol. 7, no. 2, pp. 167–178. doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.009.
16. Zaffagnini G., Martens S. Mechanisms of selective autophagy. *J. Mol. Biol.*, 2016, vol. 428, no. 9, pt. A, pp. 1714–1724. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.004.
17. Juhasz G., Neufeld T.P. Autophagy: A forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol.*, 2006, vol. 4, no. 2, art. e36, pp. 161–164. doi: 10.1371/journal.pbio.0040036.
18. Kameoka S., Adachi Y., Okamoto K., Iijima M., Sesaki H. Phosphatidic acid and cardiolipin coordinate mitochondrial dynamics. *Trends Cell Biol.*, 2018, vol. 28, no. 1, pp. 67–76. doi: 10.1016/j.tcb.2017.08.011.
19. Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I. Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress*, 2007, vol. 1, no. 1, pp. 50–71.
20. Madeo F., Eisenberg T., Pietrocola F., Kroemer G. Spermidine in health and disease. *Science*, 2018, vol. 359, no. 6374, art. eaan2788, pp. 1–10. doi: 10.1126/science.aan2788.
21. Wimalasekera R., Tebartz F., Günther F.E. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.*, 2011, vol. 181, no. 5, pp. 593–603. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002.
22. Gupta K., Sengupta A., Chakraborty M., Gupta B. Hydrogen peroxide and polyamines act as double edged swords in plant abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.*, 2016, vol. 7, art. 1343, pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2016.01343.

23. Votyakova T.V., Bazhenova E.N., Zvjagil'skaya R.A. Polyamines improve Ca²⁺ transport system of the yeast mitochondria. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 261, no. 1, pp. 139–141. doi: 10.1016/0014-5793(90)80655-3.
24. Bird S.W., Maynard N.D., Covert M.W., Kirkegaard K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, vol. 111, no. 36, pp. 13081–13086. doi: 10.1073/pnas.1401437111.

Для цитирования: Мазина А.Б., Дмитриева С.А., Ренкова А.Г., Валитова Ю.Н., Хабибрахманова В.Р., Минибаева Ф.В. Цитологические и биохимические маркеры аутофагии в клетках суспензионной культуры пшеницы при абиотическом стрессе // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 4. – С. 541–556. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.541-556.

For citation: Mazina A.B., Dmitrieva S.A., Renkova A.G., Valitova J.N., Khabibrakhmanova V.R., Minibayeva F.V. Cytological and biochemical markers of autophagy in wheat suspension culture cells under abiotic stress. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 4, pp. 541–556. doi: 10.26907/2542-064X.2020.4.541-556. (In Russian)