

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОССУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ
КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Рябовол Виктория Вадимовна

Характеристика морфологических, биохимических и молекулярных
признаков аутофагии в корнях *Triticum aestivum* при стрессе

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Минибаева Фарида Вилевна

Казань 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Типы аутофагии.....	12
1.2. Молекулярные механизмы аутофагии.....	14
1.3. Биогенез аутофагосом.....	23
1.4. Селективная и неселективная аутофагия.....	28
1.5. Физиологическая роль аутофагии в растениях.....	31
1.5.1. Аутофагия в ходе роста и развития.....	31
1.5.2. Аутофагия при стрессе.....	33
1.6. АФК и окислительные модификации макромолекул.....	36
1.7. Программируемая клеточная смерть у растений.....	43
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	50
2.1. Объекты исследований.....	50
2.2. Определение содержания H_2O_2	50
2.3. Определение интенсивности ПОЛ.....	51
2.4. Определение жизнеспособности клеток.....	51
2.5. Определение протеазной активности.....	51
2.6. Конфокальная микроскопия.....	52
2.7. Исследования ультраструктуры клеток.....	52
2.8. Выделение РНК, проведение ОТ-ПЦР в реальном времени и анализ экспрессии генов.....	53
2.9. Выделение РНК и проведение ОТ-ПЦР для получения полноразмерных кДНК.....	55
2.10. Выделение геномной ДНК растений пшеницы и проведение ПЦР для амплификации открытой рамки считывания (ОРС).....	56
2.11. Клонирование кДНК.....	56
2.12. Карта вектора pET-51b(+) Ek/LIC.....	58

2.13.	Определение нуклеотидной последовательности ДНК.....	60
2.14.	Получение и очистка рекомбинантного белка.....	60
2.15.	Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	62
2.16.	Одномерное электрофоретическое разделение белков.....	62
2.17.	Метод полусухого блоттирования (вестерн-блоттинг)	62
2.18.	Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия).....	63
2.19.	ЯМР-спектроскопия.....	64
2.20.	Биоинформатический анализ последовательностей.....	65
2.21.	Статистическая обработка.....	65
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	66
3.1.	Стресс-индуцированная аутофагия в корнях проростков пшеницы...	66
3.1.1.	Активация аутофагии при окислительном стрессе.....	66
3.1.2.	Индукция аутофагии при раневом стрессе.....	71
3.1.3.	Активация аутофагии при действии ингибиторов ЭТЦ митохондрий.....	75
3.1.4.	Стадии образования аутофагосом в условиях окислительного стресса.....	83
3.2.	Характеристика структуры аутофагического белка ATG8g пшеницы.....	86
3.2.1.	Особенности первичной структуры белка <i>TaATG8g</i> и <i>TaATG4</i>	86
3.2.2.	Клонирование и секвенирование экзон-интронной последовательности гена <i>TaATG8g</i>	94
3.2.3.	Получение и очистка рекомбинантного белка <i>TaATG8g</i>	96
3.2.4.	Пространственная структура белка <i>TaATG8g</i>	101
3.2.5.	Трехмерная модель белка <i>TaATG8g</i>	108
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
	ВЫВОДЫ.....	116
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
	ПРИЛОЖЕНИЕ.....	148

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

3-МА – 3-метиладенин

АГ – аппарат Гольджи

АО – альтернативная оксидаза

АФК – активные формы кислорода

ВТМ – вирус табачной мозаики

ГО – гиперчувствительный ответ

ДСН-ПААГ – ДСН-полиакриламидный гель

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ЛК – липидные капли

МДА – малоновый диальдегид

ОТ – обратная транскрипция

ОРС – открытая рамка считывания

Пк – паракват

ПКС – программируемая клеточная смерть

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

СК – салициловая кислота

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ЭР – эндоплазматический ретикулум

ATG гены – аутофагические гены

DCFDA – 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate

LT – LysoTracker Red

MetSox – метионин сульфоксид

MPTP – митохондриальные транзитные поры проницаемости

PAS – преаутофагосомальная структура

PE – фосфотидилэтаноламин

PI – пропидиум йодид

PI3PK 1 – фосфатидилинозитол 3-киназный комплекс 1

PI3P – фосфатидилинозитол 3-фосфат

PS– фосфотидилсерин

TOR – мишень для рапамицина

VPE – ферменты вакуолярного процессинга

VPS – вакуолярный сортиг белков

ВВЕДЕНИЕ

Постановка проблемы и ее актуальность. Аутофагия – универсальный катаболический процесс внутриклеточной деградации различных макромолекул и органелл. В начале 60-х годов XX века Кристиан де Дюв впервые описал этот процесс как образование одно- и двумембранных везикул (аутофагосом), содержащих фрагменты цитоплазмы и органеллы (по Yang, Klionsky, 2010). Процесс аутофагии консервативен и характерен для всех эукариот (Xie, Klionsky, 2007). Ранее изучение особенностей аутофагии у дрожжей при голодании позволило рассматривать аутофагическую деградацию в качестве компенсаторного механизма при недостатке энергетических ресурсов клетки (Tsukada, Ohsumi, 1993). Современные исследования расширили наше понимание о функциональной значимости аутофагии в различных эукариотических организмах. В связи с выявлением ключевой роли аутофагии при болезнях сердца, нейродегенеративных заболеваниях, инфекциях, старении и раке, интерес к исследованию аутофагии в организме человека в настоящее время значительно возрос. Были обнаружены различные типы аутофагии, показана возможность селективного удаления внутриклеточных компонентов. С открытием генов, контролирующих аутофагию, так называемых «аутофагических (*ATG*) генов», был начат новый этап в исследовании молекулярного механизма аутофагии. Наиболее подробно *ATG* гены изучены у дрожжей, где в настоящее время их насчитывается более тридцати (Nakatogawa et al., 2009). К сожалению, наше понимание относительно того, как аутофагия функционирует в растениях, остается достаточно ограниченным, однако сведения, полученные в последнее время, свидетельствуют о важности этого процесса в жизни растений. В организме растения аутофагия необходима для нормального развития в ходе органоморфогенеза и онтогенеза, а также при ответах на действие неблагоприятных факторов среды (Sláviková et al., 2008; Liu et al., 2009;

Hayward, Dinesh-Kumar, 2010; Vanhee et al., 2011). Одной из универсальных стрессовых реакций растительных клеток является усиленное образование активных форм кислорода (АФК), обладающих как токсичными, так и регуляторными эффектами. Последствия окислительных модификаций высокомолекулярных соединений могут быть чрезвычайно токсичными, в связи с чем, своевременное изолирование и удаление окисленных структур и поврежденных органелл посредством аутофагии необходимо для выживания организма (Bassham et al., 2006). Предполагается, что индукция и интенсивность развития аутофагии во многом зависит от редокс-статуса клетки.

Расшифровка механизмов аутофагии в растениях на клеточном и молекулярном уровне представляется сложной задачей. Это связано, в частности, с тем, что до настоящего времени не выявлены этапы формирования аутофагосом, не определена природа фагофора в растениях, не выяснена роль в аутофагии основных АФК-генерирующих органелл – митохондрий. Актуальной проблемой является изучение структуры и функций ключевых аутофагических белков, в частности, молекулярного маркера аутофагии ATG8. Сведения о структуре ATG белков в клетках растений представлены лишь в единичных работах (Chae et al., 2004, 2005). Кроме того, информация о количестве, структуре и экспрессии *ATG* генов в различных видах растений весьма ограничена.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилась характеристика морфологических, биохимических и молекулярных признаков аутофагии в клетках корней пшеницы при стрессе.

Были поставлены следующие задачи:

1. Анализ образования аутофагосом и активности генов *TaATG4* и *TaATG8g* в корнях пшеницы при изменении редокс-статуса под действием прооксиданта параквата (Пк) и в условиях раневого стресса.

2. Изучение влияния ингибиторов митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) на образование аутофагосом и активность генов *TaATG4* и *TaATG8g*.

3. Идентификация и характеристика этапов образования аутофагосом в корнях пшеницы в условиях окислительного стресса.

4. Определение и анализ экзон-интронной последовательности гена *TaATG8g*.

5. Получение рекомбинантного белка *TaATG8g* и анализ его структуры.

Научная новизна работы. Впервые идентифицированы и охарактеризованы основные последовательные этапы образования аутофагосом в растительных клетках. Впервые показана индукция аутофагии в растениях при раневом стрессе, что подтверждается появлением в цитозоле аутофагосом и повышением уровня экспрессии аутофагических генов. Примечательно, что временная динамика образования аутофагосом в ходе раневого стресса совпадает с динамикой накопления АФК. Обнаружено, что митохондрии растений так же, как митохондрии животных, вовлечены в редокс-регуляцию аутофагии. Впервые показано, что нарушение работы переносчиков митохондриальной ЭТЦ растений, особенно комплекса III и альтернативной оксидазы, приводит к индукции аутофагии, интенсивность которой соотносится с повышенным содержанием H_2O_2 и уровнем перекисного окисления липидов (ПОЛ). Впервые выявлено, что ген *TaATG8g* состоит из пяти экзонов и четырех интронов. Впервые получен очищенный препарат рекомбинантного белка *TaATG8g*, охарактеризована его первичная, вторичная и третичная структуры, сконструирована трехмерная модель белка *TaATG8g* и выявлены множественные мотивы, необходимые для его взаимодействия с лигандами. Эти данные свидетельствуют о том, что *TaATG8g* обладает характеристиками, необходимыми для его вовлечения в биогенез аутофагосомальных мембран.

Практическая значимость. Разработан комплекс методических подходов для анализа аутофагии в клетках растений с целью выяснения роли этого процесса при стрессе. Эффективным подходом является изучение экспрессии аутофагических генов в сочетании с универсальными стрессовыми маркерами, в том числе уровнем АФК и жизнеспособностью клеток. Данные параметры могут быть использованы при оценке стрессовой устойчивости растений. Разработана система получения рекомбинантного аутофагического белка в препаративных количествах. Отработана методика очистки и повышения растворимости нестабильного белка, которая может быть использована для предотвращения агрегации «проблемных» белков. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть применены в учреждениях сельскохозяйственного, биологического и биотехнологического профиля, а также при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии растений и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами. Работа проводилась с 2009 по 2013 г.г. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Молекулярные механизмы антиоксидантной защиты растительных клеток» (государственный регистрационный № 01201357062). Исследования автора, как руководителя и исполнителя, поддержаны грантами РФФИ, ВНШ, ФЦП, FEBS. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались автором на Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, Россия, 2010); всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, Россия, 2010); третьем международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, Россия, 2011); VII съезде физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, Россия, 2011); международной конференции FEBS «Plant

organellar signaling from algae to higher plants» (Примоштен, Хорватия, 2011); международной конференции EMBO «Autophagy in health and disease» (Ma'ale Nachamisha, Израиль, 2011); 10-ой международной конференции «Reactive oxygen and nitrogen species in plants» (Будапешт, Венгрия, 2011); международной конференции «Programmed cell death in biology and medicine» (Москва, Россия, 2012); итоговых конференциях КИББ КазНЦ РАН (2010, 2011); международной конференции «South African Association of Botanists» (Дракенсберг, ЮАР, 2013); международном симпозиуме «Oxidative stress and cell death in plants: Mechanisms and implication» (Флоренция, Италия, 2013); 11-ой международной конференции «Reactive oxygen and nitrogen species in plants» (Варшава, Польша, 2013); международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, Россия, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 работы, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. В работе представлено 5 таблиц, 38 рисунков. Список литературы включает 272 источников, в том числе, 257 – иностранных.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность и признательность моему научному руководителю доктору биологических наук Минибаевой Фариде Вилевне за всестороннюю поддержку, неоценимую помощь, огромное терпение и понимание. Выражаю искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма. Особо хочу поблагодарить своих коллег к.б.н. Пономареву Анастасию Анатольевну, к.б.н. Дмитриеву Светлану Анатольевну, к.ф.-м.н. Хайрутдинова Булата Имамутдиновича, к.б.н. Файзуллина Джигангира Асхатовича, к.б.н. Тарасову Надежду Борисовну и к.б.н. Петрову Наталью

Валентиновну за помощь в проведении экспериментов и плодотворное обсуждение результатов при выполнении данной работы. Выражаю глубокую признательность д.х.н., профессору Зуеву Юрию Федоровичу и д.ф.-м.н., профессору Университета Северной Каролины Несмеловой Ирине Владиславовне за обсуждение результатов, интерпретацию данных, ценные советы и указания. Особую благодарность выражаю д.б.н. Гоголеву Юрию Викторовичу и всем сотрудникам лаборатории молекулярной биологии (к.б.н. Гоголевой Наталье Евгеньевне, Горшкову Владимиру Юрьевичу, Топорковой Яне Юрьевне, Гориной Светлане Сергеевне, Осиповой Елене Валентиновне, Даминовой Амине Галеевне и др.) за помощь в приобретении экспериментальных навыков и за доверие к предоставленной инструментальной базе.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Типы аутофагии

Аутофагия (в переводе с греч. – «самопоедание») – катаболический процесс внутриклеточной деградации поврежденных органелл, фрагментов цитоплазмы, долгоживущих, денатурированных или агрегированных белков. Этот процесс консервативен и характерен для всех эукариот (животных, грибов, растений). Обычно аутофагия активируется при недостатке питательных веществ (Tsukada, Ohsumi, 1993). У млекопитающих, помимо голодания, аутофагия также индуцируется в ответ на различные стимулы, включая гормоны и повреждение клетки, а дисфункция этого процесса связана с рядом различных генетических заболеваний (Xie, Klionsky, 2007). В организме растения аутофагия необходима при прорастании семян, образовании сосудов и аэренхимы, кроме того, аутофагия вовлечена в процессы старения, органогенеза, биогенеза растительных вакуолей (Sláviková et al., 2005; Inoue et al., 2006). Существенную роль аутофагия также играет в ответе растительных клеток на стрессовые воздействия биотической и абиотической природы, такие как патогены, засуха, засоление и др. (Sláviková et al., 2008; Liu et al., 2009; Hayward, Dinesh-Kumar, 2010; Vanhee et al., 2011).

Для растений характерно два типа аутофагии: микро- и макроаутофагия. При микроаутофагии удаляемые компоненты захватываются непосредственно вакуолью. Это происходит посредством инвагинации тонопласта и высвобождения везикул, содержащих цитоплазматические компоненты, в люмен вакуоли. Подобный процесс наблюдается при депонировании запасных белков в формирующейся зерновке пшеницы (Levanony et al., 1992; Shy et al., 2001) и высвобождении резиновых частиц в вакуоль у гваюлы (Backhaus, Walsh, 1983), хотя данные процессы не приводят к немедленной деградации материала в вакуоли. Микроаутофагия также происходит у некоторых видов растений при прорастании в процессе

деградации крахмальных зерен и запасных белков (Van der Wilden et al., 1980; Toyooka et al., 2001). Учитывая тот факт, что в растительной клетке, завершившей свой рост, вакуоль занимает до 90% объема, некоторые исследователи считают, что микроаутофагия может играть даже большую роль, чем считалось ранее.

Макроаутофагия (далее в тексте называемая просто «аутофагия») характеризуется образованием аутофагосом, специализированных двумембранных вакуолей, которые транспортируют поврежденные и окисленные компоненты в вакуоль (Xie, Klionsky, 2007). Процесс образования аутофагосом начинается в цитоплазме с образования чаше-подобной мембранной структуры, называемой фагофором или изолирующей мембраной, которая постепенно расширяясь, захватывает удаляемые компоненты и затем схлопывается, образуя зрелую аутофагосому. Наружная мембрана аутофагосомы впоследствии сливается с тонопластом. При этом в люмен вакуоли высвобождается аутофагическое тело – содержимое, окруженное одной мембраной, которое впоследствии деградируется вакуолярными кислыми гидролазами. Продукты деградации при этом могут опять транспортироваться в цитоплазму (Bassham, 2007).

Для млекопитающих характерен еще один тип аутофагии – шаперон-опосредованная. Такой тип аутофагии участвует в удалении белков, имеющих KFERQ мотив. Этот мотив узнает цитозольный белок БТШ 73 кДа и связывается с ним. Затем комплекс субстрат / шаперон направляется в лизосому, где он связывается с ассоциированным на мембране лизосомы белком типа 2а (LAMP-2а). Такое взаимодействие обеспечивает разворачивание субстратного белка для его транспорта внутрь лизосомы и дальнейшей деградации (Cuervo, 2004).

1.2. Молекулярные механизмы аутофагии

Прорывом в исследовании молекулярного механизма аутофагии стало открытие у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) *ATG* (*AuTophagy-related genes*, «имеющих отношение к аутофагии») генов. В настоящее время у дрожжей обнаружено более тридцати (~35) *ATG* генов (Nakatogawa et al., 2009). Аналоги *ATG* генов были также идентифицированы у высших эукариот, в том числе и у растений. Так, у растения *Arabidopsis thaliana* были идентифицированы и описаны большинство гомологов *ATG* генов (Bassham et al., 2006) (табл. 1).

Обычно выделяют три группы белков, необходимых для сборки аутофагосомы, — это 1) *ATG9* комплекс, включающий *ATG1*, *ATG2*, *ATG9*, *ATG13*, *ATG18*, и *ATG27*; 2) фосфатидилинозитол 3 (*PI3*) - киназный комплекс, включающий *ATG6/VPS30/Beclin1*, *ATG14*, *VPS15*, и *VPS34*; 3) два убиквитин-подобных комплекса: *ATG3*, *ATG4*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG8*, *ATG10*, *ATG12* и *ATG16* (табл. 1). Эти белки вовлекаются на различных этапах образования аутофагосомы: а) индукции аутофагии; б) везикулярной нуклеации, экспансии и созревании аутофагосомы; в) докинге и слиянии с вакуолью; г) деградации аутофагического тела (Xie, Klionsky, 2007; Farré et al., 2009; Suzuki, Ohsumi, 2010; Tanida, 2011) (рис. 1).

Таблица 1. Белки, вовлеченные в аутофагию у дрожжей и арабидопсиса (по Bassham et al., 2006).

Белок <i>S. cerevisiae</i>	Предполагаемое количество гомологов у <i>A. thaliana</i>	Функции / характеристики белков <i>S. cerevisiae</i>
Индукция аутофагии, трансдукция сигнала, упаковка груза		
TOR	1	Протеинкиназа; негативный регулятор аутофагии
ATG11	нет	Периферический мембранный белок
ATG19	нет	Рецепторный белок

Образование аутофагосомы		
Фосфотидилинозитол-3-киназный комплекс		
ATG6	1	Взаимодействует с ATG14, VPS34, VPS15
ATG14	Нет	Субъединица PI3K комплекса
VPS15	1	Протеинкиназа, необходимая для VPS34
VPS34	1	PI3K каталитическая субъединица
Убиквитин-подобные комплексы конъюгации		
Комплекс 1		
ATG5	1	Формирует комплекс с ATG12
ATG7	1	E1-подобный фермент
ATG10	1	E2-подобный фермент
ATG12	2	Взаимодействует с ATG5
ATG16	1	Взаимодействует с ATG5
Комплекс 2		
ATG3	1	E2-подобный фермент
ATG4	2	Цистеиновая протеиназа
ATG7	1	E1-подобный фермент
ATG8	Малое генное семейство	Убиквитин-подобный модификатор; регулирует размер аутофагосомы
ATG9 комплекс		
ATG2	1	Взаимодействует с ATG9
ATG9	1	Взаимодействует с ATG2 и ATG2; интегральный мембранный белок
ATG23	нет	Удаляет ATG9 из PAS
Регуляция		
ATG1	Малое генное семейство	Серин/треонин киназа
ATG13	2	Фосфопротеин
ATG17	Нет	Взаимодействует с ATG11, ATG20, ATG24
ATG18	Малое генное семейство	Необходим для локализации ATG12 и утилизации ATG9 из PAS
ATG20	Малое генное семейство	Взаимодействует с ATG24 и ATG17
ATG21	Трудно отличить от ATG18	Необходим для ATG8
ATG24	Трудно отличить от ATG20	Взаимодействует с ATG1, ATG17, ATG20
ATG27	нет	PI3P-связывающий белок; мембранный белок
VAC8	Не найден	Взаимодействует с ATG13

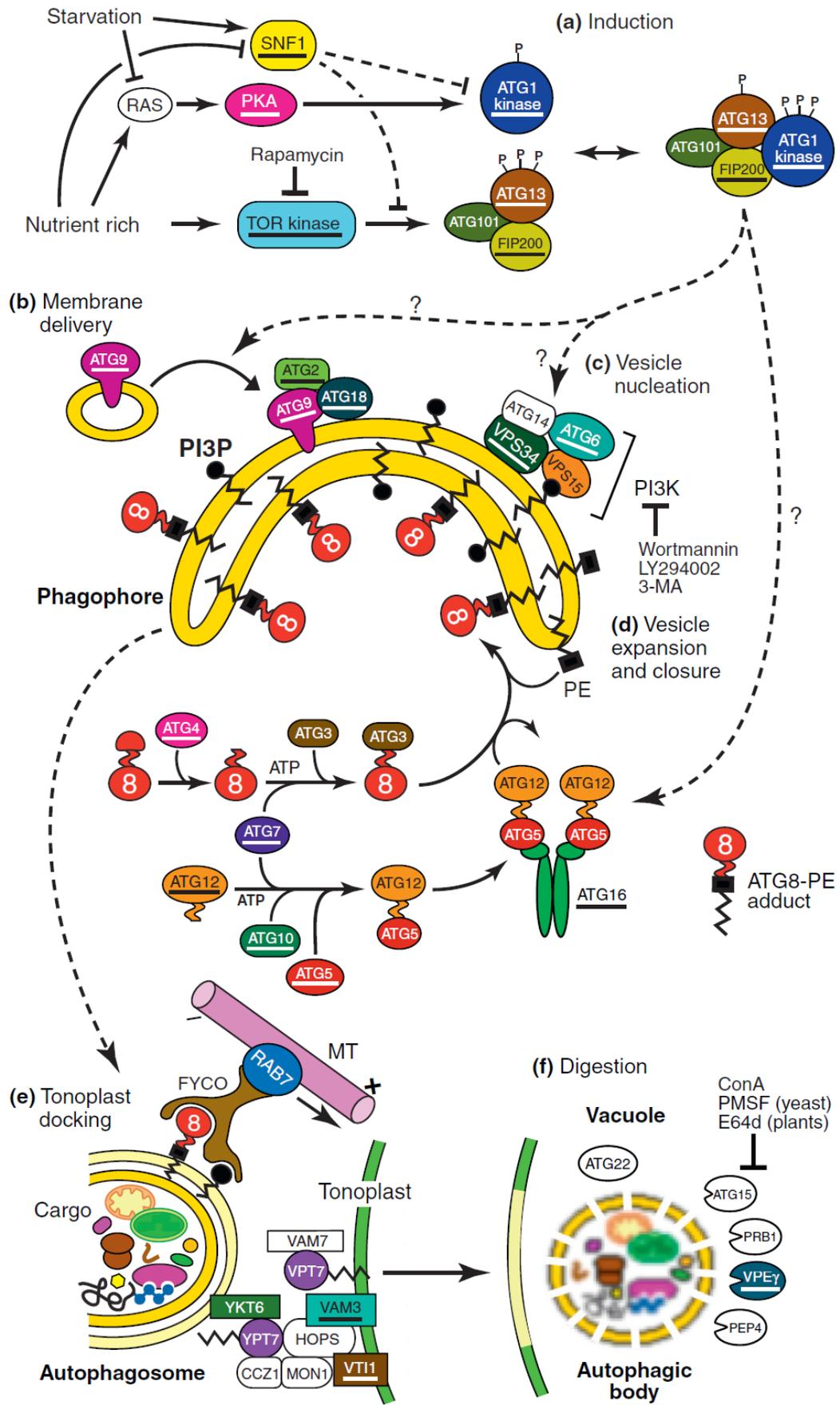


Рис.1. Молекулярный механизм аутофагии (по Li, Viera, 2012).

Хотя растения обладают набором *ATG* генов, похожим на гены, идентифицированные у дрожжей, однако некоторые гомологи представлены мультигенными семействами. Так, у арабидопсиса семейство *ATG1* представлено четырьмя представителями, *ATG12*, *ATG13* и *ATG4* – двумя, *ATG18* – восемью, *ATG8* – девятью (Hanaoka et al., 2002; Bassham et al., 2006; Hayward et al., 2009). Хотя до сих пор нет доказательств, объясняющих избыточность представителей семейств *ATG* генов, можно предположить, что их многообразие обеспечивает бóльшую специфичность и многофункциональность процесса аутофагии в растениях.

Регуляция индукции. Известно, что голодание может положительно регулировать аутофагию у всех организмов, а также в культуре клеток. У дрожжей и млекопитающих индукция аутофагии при голодании или другом стрессе обеспечивается протеинкиназой TOR (target of rapamycin - мишень для рапамицина), которая является негативным регулятором аутофагии. Рапамицин и другие ингибиторы TOR киназы широко используются для индукции аутофагии (Schmelzle, Hall, 2000). В нормальных физиологических условиях TOR опосредует гиперфосфорилирование *ATG13*. Эта высоко фосфорилированная форма *ATG13* имеет низкое сродство к серин/треонин протеинкиназе *ATG1*, и такое состояние ингибирует аутофагию. При стрессе *ATG13* дефосфорилируется, что делает его способным образовывать комплекс с *ATG1*, и, таким образом, активируется аутофагия (Kamada et al., 2000) (рис. 1).

У арабидопсиса обнаружен один ген *TOR* (Liu, Bassham, 2010). Нокаут-мутанты по *AtTOR* нежизнеспособны, а эксперименты с нокаунт-мутантами и мутантами со сверхэкспрессией *AtTOR* предполагают, что TOR участвует в регуляции размера растительных клеток и органов. У арабидопсиса также обнаружено два гена *ATG13*, хотя ввиду низкой степени гомологии пока неясно, действительно ли они являются гомологами *ATG13* дрожжей. *ATG1* представлен мультигенным семейством, однако ничего неизвестно функции, белок-белковых взаимодействиях и локализации белков этого семейства

(Suttangkakul et al., 2011). Еще недавно не было прямых доказательств того, что регуляция аутофагии в растениях происходит с помощью TOR (Bassham, 2009). Однако недавние исследования Liu и Bassham (2010) подкрепляют гипотезу, что TOR функционирует в качестве негативного регулятора аутофагии и в растительном организме. Используя мутанты *AtTOR RNAi*, они показали конститутивную активацию аутофагии и аккумуляцию аутофагосом.

ATG9 комплекс. ATG9 – единственный трансмембранный ATG белок, консервативный среди эукариот. Он имеет шесть трансмембранных доменов. N- и C- концы белка экспонированы в цитозоль. Функция этого белка заключается в доставке липидов к формирующейся аутофагосоме. У дрожжей белки ATG23 и ATG27 транспортируются вместе с ATG9 к преаутофагосомальной структуре (PAS)(Yen et al., 2006; Legakis et al., 2007). За извлечение ATG9 из мембраны ответственны белки киназа ATG1 и два периферических мембранных белка ATG2 и ATG18. Отсутствие этих белков приводит к аккумуляции ATG9 в мембране (Reggiori, 2004b). У дрожжей ATG18, помимо аутофагии, также может участвовать в ретроградном транспорте из вакуоли (Dove et al., 2004).

Везикулярная нуклеация. Регуляция везикулярной индукции и нуклеации осуществляется за счет PI3-киназного комплекса 1 (PI3PK 1), который состоит из трех субъединиц: каталитической субъединицы PI3-киназы VPS34, активирующей киназы VPS15, которая заякоривает комплекс в мембране, и регулирующей субъединицы ATG6 (также известной как Beclin1 у млекопитающих). У дрожжей и млекопитающих также идентифицирована четвертая субъединица – ATG14. Известно, что у дрожжей и млекопитающих VPS34 продуцирует фосфотидилинозитол 3-фосфат (PI3P), необходимый компонент для образования аутофагосом (рис. 1; Kihara et al., 2001). Ингибиторы PI3-киназной активности вортоманин и 3-метиладенин (3-МА) подавляют развитие аутофагии (Blommaert et al., 1997) и образование аутофагосомальных мембран, содержащих PI3P (Obara, Ohsumi, 2008).

У дрожжей ATG6 необходим не только для аутофагии, но для вакуолярного сортирования белков (VPS). Активность ATG6 зависит от работы ATG14 (в случае аутофагии) или от VPS34 (в случае VPS). У млекопитающих роль Beclin1 в везикулярном транспорте, помимо аутофагии не была выявлена (Liang et al., 1999). Однако недавние исследования обнаружили, что взаимодействующий с Beclin1 белок UVRAG опосредует эндоцитозный везикулярный транспорт, что предполагает участие Beclin1 в этом процессе (Itakura et al., 2008). Кроме того, у млекопитающих было обнаружено три различных комплекса Beclin1, некоторые из которых являются взаимоисключающими. Среди них Ambra1, ATG14, UVRAG и Rubicon (He, Levine, 2010).

Помимо PI3-киназ, PI3-фосфатазы (миотубулярин-связанная фосфатаза 3 (MTMR3) и Jumpy (MTMR4)) также вовлечены в аутофагию (Vergne et al., 2009; Taguchi-Atarashi et al., 2010). Они негативно контролируют образование и размер аутофагосом. Баланс между PI3-киназами и PI3-фосфатазами регулирует инициацию аутофагии путем изменения локального уровня PI3 (Mizushima et al., 2011).

Хотя белки комплекса PI3ПК 1, такие как ATG6, PI3К, VPS15 и UVRAG, идентифицированы в растениях, однако в литературе отсутствует информация о взаимодействии этих белков и вовлечении в процессы аутофагии.

Экспансия и созревание аутофагосомы. За экспансию и созревание аутофагосомы в клетке отвечают два убиквитин-подобных комплекса. Они регулируют размер, скорость экспансии и изгибание растущей аутофагосомы. Что интересно, почти все белки, которые функционируют на этом этапе, консервативны и имеют гомологи среди эукариот, в том числе среди растений (рис. 1).

Сборка первого комплекса ATG12–ATG5 начинается с конъюгирования С- терминального глицина ATG12 с цистеином E1-подобного фермента ATG7 через дисульфидный мостик, а затем с цистеином E2-подобного фермента

ATG10. В конечном итоге ATG12 формирует амидную связь с ATG5 (Phillips et al., 2008). Комплекс ATG12–ATG5 связывается в свою очередь с С концом белка ATG16 (у млекопитающих ATG16L), который олигомеризуясь формирует большие субъединицы. Комплекс ATG12–ATG5–ATG16, в свою очередь, связывается с фагофором (мембрана аутофагосомы на начальном этапе ее формирования), что обеспечивает его экспансию и изгибание. Комплекс ATG12–ATG5 не имеет деконъюгирующих ферментов и формируется постоянно, независимо от условий окружающей среды. У млекопитающих ATG12–ATG5–ATG16L1 преимущественно локализуется на изолирующей мембране и диссоциирует из мембраны сразу после завершения образования аутофагосомы (Mizushima et al., 2001). Количество таких комплексов невелико и маловероятно, что конъюгаты покрывают всю мембрану (Geng et al., 2008).

Второй комплекс *ATG8–PE* включает в себя уникальный убиквитин-подобный белок ATG8 и липид фосфотидилэтаноламин (PE). ATG8 синтезируется в клетке как белок-предшественник, и для выполнения его функций необходимо осуществление серьезных посттрансляционных модификаций (рис. 2). В частности, происходит отрезание («cleavage») С-конца синтезированного полипептида с помощью цистеиновой протеиназы ATG4, как было показано на растениях риса (Su et al., 2006). При этом экспонируется глицин, который с помощью ATG7 и ATG3 (E1- и E2 - подобные белки) ковалентно взаимодействует с аминогруппой PE, основным фосфолипидом мембраны аутофагосомы (Ichimura et al., 2000). Комплекс ATG8–PE локализуется как на наружной, так и внутренней мембране аутофагосомы (Kirisako et al., 1999), что объясняет тот факт, что ATG8 часто используют в качестве молекулярного маркера для мониторинга макроаутофагии (Kirisako et al., 1999; Kabeya et al., 2000). Деконъюгацию комплекса ATG8–PE наружной мембраны осуществляет ATG4. Дегградация комплекса внутренней мембраны происходит в вакуоли (Yu et al., 2012). Обнаружено, что у некоторых *atg* мутантов, дефектных по образованию

изолирующей мембраны, комплекс ATG8–PE формируется. Это предполагает возможность липидирования ATG8 без образования изолирующей мембраны (Suzuki et al., 2001). Однако, где происходит липидирование ATG8 и как этот комплекс встраивается в мембрану, неизвестно. Исследования *in vitro* обнаружили, что комплекс ATG8–PE проявляет также активность к мембранному связыванию и хемифьюжину (слиянию наружных слоев двух различных мембран, в то время как внутренние слои остаются интактными) (Nakatogawa et al. 2007).

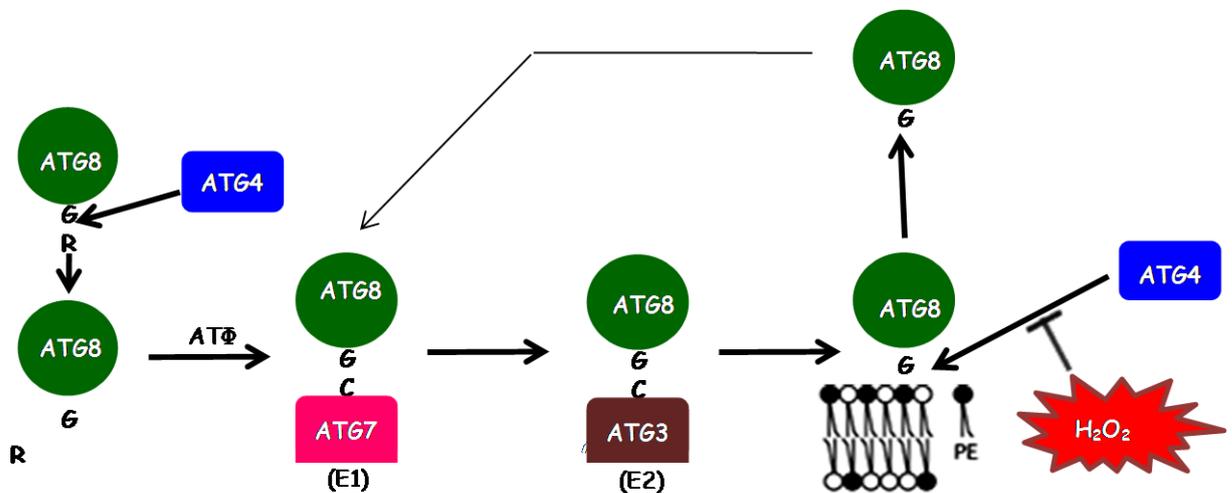


Рис. 2. Модификации белка ATG8 в процессе биогенеза аутофагосомы.

В то время, как у представителей царства грибов имеется лишь один ген *ATG8*, животные и растения обладают целым мультигенным семейством *ATG8* (Ichimura et al., 2000). У животных семейство *ATG8* делят на несколько подсемейств: 1) белок 1, ассоциированный с микротрубочками, легкая цепь 3 (MAP1 LC3), 2) белок, ассоциированный с рецептором γ -аминомасляной кислоты (GABARAP) и 3) ассоциированный с Гольджи АТФазный энхансер 16 кДа (GATE-16) (Weidberg et al., 2010). Показано, что белки каждого подсемейства выполняют определенную роль на различных этапах формирования аутофагосомы (Weidberg et al., 2010). В растениях арабидопсиса выявлено девять изоформ *ATG8* (a-i), которые подразделяют

на три подсемейства (Doelling et al., 2002), у сои – одиннадцать изоформ ATG8 (a-k; <http://www.phytozome.net/search.php>), у риса – пять (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Причина существования большого количества представителей этого семейства у растений до сих пор полностью не выяснена. Показано, что у арабидопсиса гены *ATG8* дифференциально экспрессируются в ответ на различные стрессовые факторы. Можно предположить, что многообразие представителей *ATG8* обеспечивает большую специфичность и многофункциональность процесса аутофагии в растениях. Действительно, *ATG8* является многофункциональным белком. Как показано у дрожжей, белок необходим не только для формирования, экспансии и созревания изолирующей мембраны аутофагосомы, но также для мембранного докинга и слияния с вакуолью/лизосомой (Nakatogawa et al., 2007). *ATG8* опосредует узнавание и связывание белков-мишеней при селективной аутофагии (Noda et al., 2010). Белок может связываться с тубулином, что свидетельствует о взаимосвязи аутофагии и цитоскелета (Wang et al., 1999). Кроме того, *ATG8* принимает участие во внутриклеточном транспорте (Wang et al., 1999), а также в регуляции гормонального сигналинга (Sláviková et al., 2008).

Безусловно, представляет интерес тот факт, что белок *ATG4* млекопитающих является редокс-регулируемым. Его способность к редокс-регуляции обеспечивается за счет специфического цистеинового остатка, расположенного вблизи активного центра этого фермента. Мутация по этому остатку приводила к предотвращению образования липидированного *ATG8* и, в конечном итоге, аутофагосом (Scherz-Shouval et al., 2007).

Две конъюгирующие системы взаимосвязаны. E1-подобный фермент *ATG7* необходим для функционирования обоих каскадов. Он активирует белок *ATG12* в одном комплексе и *ATG8* – в другом. Эксперименты *in vitro* показали, что комплекс *ATG12–ATG5* взаимодействует с *ATG3* и усиленно способствует реакции переноса *ATG8* с *ATG3* на PE (Hanada et al., 2007).

Кроме того, предполагается, что комплекс ATG12–ATG5–ATG16(L) может быть вовлечен в определение сайта липидирования (Fujita et al., 2008).

Слияние с вакуолью /лизосомой. Слияние аутофагосомы с лизосомой (в случае животных) или с вакуолью (в случае дрожжей и растений) – последний этап в жизненном цикле аутофагосом (рис. 1). Полагают, что для данного процесса необходим белок Rab7 (Gutierrez et al., 2004). Rab7 обеспечивает микротрубочко-плюс-направленный транспорт аутофагосом при его одновременной ассоциации с FYCO и LC3 (Pankiv et al., 2010). У млекопитающих в слияние также вовлечены некоторые факторы SNARE, такие как VAM7, Vti1b и VAM9 (Fader et al., 2009; Furuta et al., 2010). У дрожжей слияние аутофагосом с вакуолью вовлекает белки t-SNARE, VAM3, Vtip, and Sec18 (Darsow et al., 1997), а также малый ГТФ-азный фактор Ypt7 (Kirisako et al., 1999). Слияние аутофагосомы и лизосомы положительно регулируется UVRAG–VPS34–Beclin1 PI3P-киназным комплексом и негативно регулируется Rubicon – UVRAG–VPS34–BECLIN1 PI3-киназным комплексом (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009). Однако в настоящее время неясно, каким образом и какие факторы контролируют взаимодействие этих комплексов.

В конце июня 2013 года в базе данных NCBI появились нуклеотидные и аминокислотные последовательности белков, вовлеченных в аутофагию у *T. aestivum* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). У этого вида идентифицированы следующие ATG белки: ATG3a-c, ATG4a-b, ATG5a-b, ATG6a-c, ATG7a-c, ATG8a-h, ATG9a-b, ATG10a-b, ATG12a, ATG13a-b, ATG16a-b, ATG18a-b.

1.3. Биогенез аутофагосом

Споры по поводу происхождения мембраны аутофагосомы начались еще в 1966 году, когда был открыт процесс аутофагии (De Duve, Wattiaux, 1966), и продолжают до сих пор (Juhasz, Neufeld, 2006). Ранее были предложены две теории, объясняющие ее происхождение. Согласно первой модели (модели созревания), мембраны аутофагосом образуются из

эндоплазматического ретикулума (ЭР). Согласно второй теории (модель сборки), мембраны собираются *de novo* за счет синтеза или транспорта липидов (Juhász, Neufeld, 2006). Прямых доказательств ни той, ни другой теории получены не были.

У дрожжей аутофагосомы образуются на или около специального места около вакуоли – PAS. PAS обычно локализуется в месте соединения ядра и вакуоли (Ishihara et al., 2001, Reggiori et al., 2004a). PAS может быть также соединена с ЭР. Существует ли PAS в клетках млекопитающих, до сих пор неясно. У млекопитающих были выявлены множественные сайты образования аутофагосом. Среди них ЭР, митохондрии, аппарат Гольджи (АГ), ядерная и плазматическая мембраны. Что касается растений, то информация о том, где и каким образом формируются аутофагосомы, в литературе отсутствует.

Эндоплазматический ретикулум. Недавно две группы ученых экспериментально доказали, что основным источником мембраны аутофагосомы в клетках млекопитающих является ЭР (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009). Во-первых, с помощью иммуногистохимии было показано, что аутофагосомы локализуются вблизи ЭР. Во-вторых, с использованием трехмерной электронной томографии было подтверждено, что между ЭР и аутофагосомой имеется физическая связь (рис. 3 А).

Трехмерная томография показала, что в клетках млекопитающих ЭР локализуется как внутри, так и снаружи фагофора, т.е. фагофор был «выстелен» мембраной ЭР с двух сторон. При этом наблюдалось несколько сайтов взаимодействия между мембранами этих структур. Интересно, что большинство взаимодействий между мембранами фагофора и ЭР наблюдали на внутренней стороне аутофагосомы. Таким образом, внутренняя и наружная мембраны ЭР, по-видимому, выполняют различные роли, и внутренний ЭР вносит бóльший вклад в экспансию мембраны аутофагосомы, чем внешний ЭР (Ylä-Anttila et al., 2009).

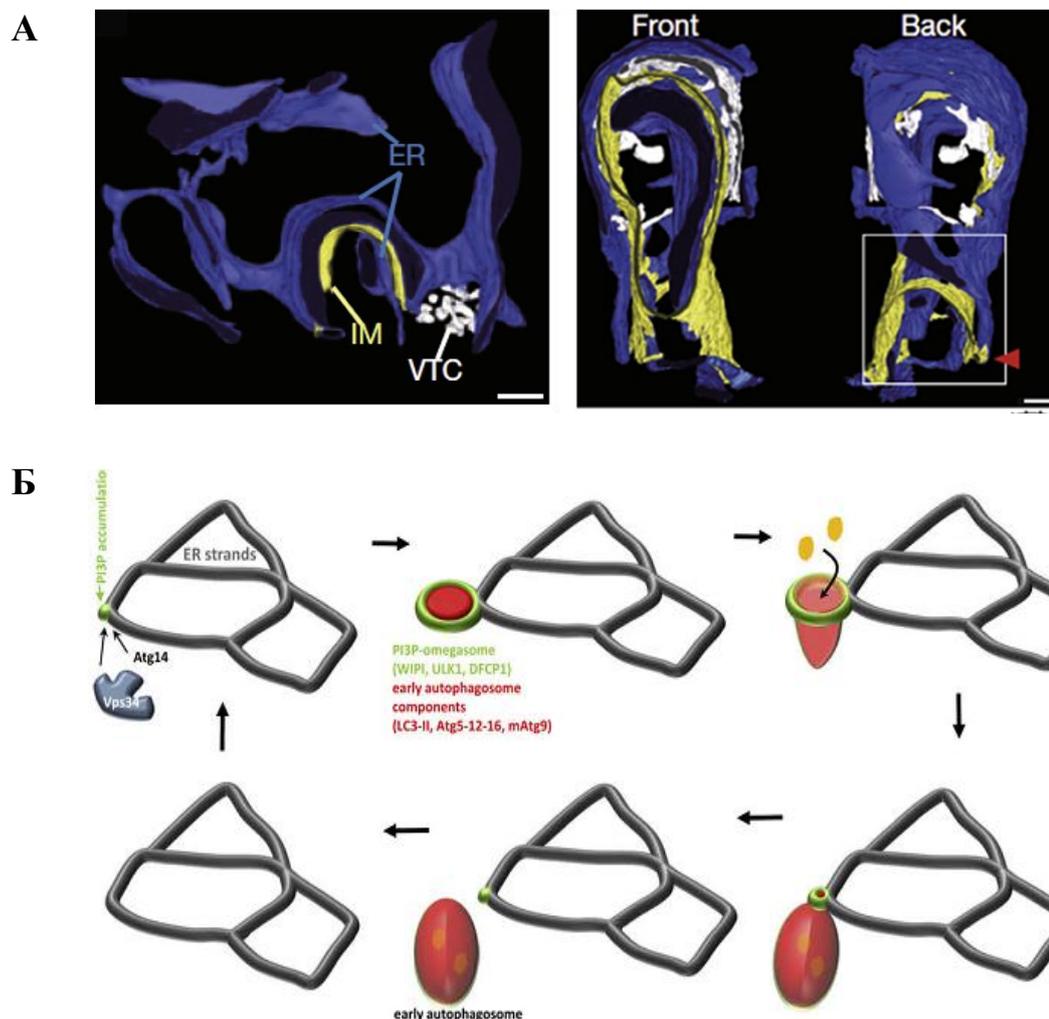


Рис. 3. А – Электронная томография комплекса изолирующая мембрана – ЭР (по Hayashi-Nishino et al., 2009). Б – Модель образования аутофагосомы (по Burman, Ktistakis, 2010).

Образование PI3P, который генерируется в ходе работы PI3P-киназного комплекса, является ключевым событием в биогенезе аутофагосом (Burman, Ktistakis, 2010). Ахе с соавт. (2008) идентифицировали белок DFCP1, содержащий двойной FYVE домен, который способен связывать PI3P. Как было показано, в условиях наличия питательных веществ DFCP1 локализуется в ЭР и АГ беспорядочно. При голодании DFCP1 концентрируется в определенных местах на ЭР, которые частично со-локализуются с маркерами аутофагии LC3 и ATG5. Мембраны таких компартментов в ассоциации с ЭР часто имеют форму греческой буквы Ω

(«омега»), поэтому их называли омегасомами. Считается, что такие структуры обеспечивают платформу для экспансии изолирующей мембраны (рис. 3 Б). Была выдвинута гипотеза, согласно которой накопление PI3P изменяет кривизну ЭР таким образом, что на ЭР образуется суб-домен, на котором формируется аутофагосома (Burman, Ktistakis, 2008).

Митохондрии. Исследования Hailey с соавт. (2010) предполагают, что митохондрии также могут быть вовлечены в биогенез аутофагосом в качестве потенциальных мембранных источников. С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что мембранный маркер митохондрий со-локализовался с ATG5 и LC3, а с помощью фотобличинга (photobleaching) был продемонстрирован обмен липидов мембран митохондрий и аутофагосом. Более того, Hailey с соавт. (2010) показали, что образование аутофагосом снижается в клетках – нокаутах по митохондриальному белку митофузину 2 (Mfn2). PE, основной компонент мембран аутофагосом, продуцируется в митохондриях из фосфотидилсерина (PS), а ЭР содержит этот липид в достаточно большом количестве. Таким образом, было сделано предположение, что взаимодействие между митохондриями и аутофагосомами зависит от Mfn2 и необходимо для переноса PS из ЭР в митохондрии, где он преобразовывается в PE. Существует, однако, еще один альтернативный путь, согласно которому PE, синтезированный в митохондриях, транспортируется из ЭР к аутофагосомам путем взаимодействия митохондрий и ЭР. Хотя митохондриальная гипотеза не исключает другие предположения происхождения мембраны аутофагосом, однако, на сегодняшний день нет прямых доказательств того, что взаимодействия между митохондриями и ЭР необходимы для образования аутофагосом на ЭР, и что аутофагосомы формируются с помощью этих компартментов.

Плазматическая и ядерная мембраны. Так как ядерная мембрана – это продолжение мембраны ЭР, то можно предположить, что она тоже может участвовать в образовании аутофагосом. Действительно, было обнаружено,

что при инфицировании вирусом простого герпеса типа 1 аутофагосом-подобные структуры образуются из ядерных оболочек макрофагов (English et al., 2009). Кроме того, у дрожжей образование PAS часто наблюдается в месте перехода ядра в вакуоль, что предполагает возможное участие ядерной мембраны при сборке PAS (Suzuki, Ohsumi, 2010).

Результаты Ravikumar с соавт. (2010) свидетельствуют, что плазматическая мембрана вовлечена в образование аутофагосом. Исследователи обнаружили, что аутофагический белок ATG16L1 взаимодействовал с тяжелой цепью клатрина. Везикулы, содержащие ATG16L1, формировались на плазматической мембране или рядом с ней. При недостатке ранних эндоцитозных факторов, таких как тяжелая цепь клатрина, эпсин 1 и AP2, образование аутофагосом частично подавлялось.

Аппарат Гольджи и эндосомы. АГ также может быть потенциальным мембранным источником аутофагосом. Было показано, что у млекопитающих белки Rab33В, взаимодействующие с ATG16L, и ATG9L1 при нормальных условиях локализуются в АГ, а при индукции аутофагии появляются на мембране аутофагосом (Young et al., 2006; Itoh et al., 2008). У дрожжей образование аутофагосом также вовлекает такие факторы везикулярного транспорта, как субъединицы COG и факторы АДФ рибозилирования Sec2, Sec4, Sec7, Gea1 и Gea2 (Geng et al., 2010; Van der Vaart et al., 2010; Yen et al., 2010).

Взаимосвязь между аутофагией и эндоцитозом было обнаружена уже достаточно давно (Tooze et al., 1990; Liou et al., 1997). Так, было показано, что аутофагосомы могут сливаться с эндосомами с образованием, так называемых «амфисом», которые, в свою очередь, сливаются с лизосомой (Gordon, Seglen, 1988). Кроме того, у млекопитающих ATG9 локализуется как в АГ, так и в эндосомах.

Таким образом, вероятно, что в клетке существуют несколько мембранных источников для формирования аутофагосом. Однако, необходимы ли они все или требуются какие-либо определенные источники

в зависимости от условий, места или мишени для удаления, к настоящему времени неизвестно.

1.4. Селективная и неселективная аутофагия

В зависимости от способа удалять компоненты аутофагию подразделяют на селективную и неселективную. При неселективной аутофагии цитоплазма и другие органеллы поглощаются аутофагосомами неизбирательно. В свою очередь, селективная аутофагия является целенаправленной и требует специальных белков-рецепторов для удаления определенных компонентов.

В качестве рецепторов при селективной аутофагии выступают белки семейства ATG8 (Noda et al., 2010). Белки-субстраты или адаптеры узнают ATG8 через определенный WXXL-мотив. Такими белками являются ATG19 (адаптор для CVT пути) и ATG32 (митохондриальный «карго» рецептор) у дрожжей, и p62/SQSTM1 (секвестром 1), NBR1 и Nix (также называемый Vnp3L) у млекопитающих (Johansen, Lamark, 2011). В литературе, однако, существует информация, что p62 и NBR1 могут участвовать в селективной аутофагии независимо от ATG8/LC3 (Itakura, Mizushima, 2011). В клетках табака недавно был идентифицирован структурный и функциональный гомолог p62 и NBR1 – Joka2 из семейства UP9/LSU. Было показано, что так же, как и p62 и NBR1, Joka2 имеет двойную локализацию (в ядре и цитоплазме), имеет консервативные домены, характерные для белков p62 и NBR1, формирует гомодимеры и взаимодействует с ATG8 (Zientara-Rytter et al., 2011).

Митофагия. Митохондрии часто обнаруживают в аутофагосомах. Некоторые из них, особенно при голодании, могут удаляться неселективно. Однако появляется все больше данных, которые свидетельствуют о том, что аутофагосомы могут узнавать и избирательно удалять митохондрии. Данный процесс называют митофагией. Первоначально было показано, что белки Uth1 и Aup1 участвуют в деградации митохондрий в вакуоли (Kissova et al.,

2004; Tal et al., 2009). Недавние исследования показывают, что у дрожжей, помимо основных ATG белков, в митофагию вовлечены ATG11, ATG20 и ATG24 (Kanki, Klionsky, 2008). Кроме того, у дрожжей были идентифицированы митохондриальный рецептор ATG32, который находится на наружной стороне митохондриальной мембраны (Kanki et al., 2009a; Okamoto et al., 2009), а также фактор ATG33, который также вовлечен в митофагию (Kanki et al., 2009b). Хотя ATG32 не является консервативным белком у высших эукариот, селективное удаление поврежденных и старых митохондрий с помощью митофагии также наблюдается и у млекопитающих (Kim et al., 2007; Mortensen et al., 2010). Недавно, было показано, что Parkin и Nix вовлечены в селективное удаление митохондрий у человека (Narendra et al., 2008; Novak et al., 2010). Parkin, убиквитиновая лигаза E3, селективно присоединяется к поврежденным митохондриям, в то время как другой белок PINK1 (PTEN-индуцируемая киназа 1, связанная с паркинизмом и нейропсихиатрическими болезнями), опосредует присоединение фактора Parkin к поврежденным митохондриям и активирует его (Scherz-Shouval, et al., 2007). Nix, в свою очередь, может служить в качестве адаптора между митохондриями и LC3 на мембране аутофагосом (Novak et al., 2010).

Что касается растений, то специфичные белки и факторы, вовлеченные в митофагию у растений, до сих пор не удалось идентифицировать. Возможно, что некоторые представители белков из мультигенных семейств ATG18 и ATG8 могут выполнять данную функцию (Hayward et al., 2009).

Пексофагия. Селективное удаление пероксисом в ходе аутофагии называют пексофагией. Различают два типа пексофагии. Захват пероксисом непосредственно вакуолью происходит в ходе микропексофагии. Удаление этих органелл с помощью двумембранных структур (пексофагосом) называют макропексофагией (Manjithaya et al., 2010a). Пексофагию можно индуцировать через различные сигнальные каскады, активирующие MAP киназы Stl2. Кроме того, у дрожжей были идентифицированы белки ATG30, ATG28 и ATG26, специфичные для данного процесса. ATG30

функционирует как медиатор, который одновременно может связывать пероксисомный белок Pex14 и аутофагический белок ATG11. Pex14 – единственный пероксин, который может участвовать и в образовании пероксисом, и в их деградации (Manjithaya et al., 2010b). Белок ATG26 опосредует элонгацию мембраны пексофагосом, а также наряду с ATG30 участвует в определении размера пероксисом (Yamashita et al., 2006; Nazarko et al., 2009).

Хлорофагия. В отличие от митофагии и пексофагии, процесс хлорофагии продемонстрирован в растениях. Ishida и Yoshimoto (2008) сообщили о том, что при старении главный фермент фотосинтеза Рубиско может специфично удаляться с помощью специальных телец в процессе аутофагии.

Рибофагия. Поскольку аутофагосомы часто содержат участки цитоплазмы с рибосомами, долгое время считалось, что рибосомы удаляются неселективно. Вероятно, так оно происходит в большинстве случаев. Однако, недавно Kraft с соавт. (2008) продемонстрировали, что субъединица рибосом 60S у дрожжей подвергается селективному удалению. В этом процессе определяющую роль играет убиквитинирующий фермент Ubr3/Bre5p. Ossareh-Nazari с соавт. (2010) идентифицировали два дополнительных компонента, необходимых для рибофагии: Cdc48, шаперон-подобный белок, играющий ключевую роль в протеосомном пути, и Ufd3, убиквитин-связывающий адаптор Cdc48. Существование рибофагии у млекопитающих и растений до сих пор не доказано.

Липофагия. До недавнего времени считалось, что деградация триглицеридов, содержащихся в липидных каплях (ЛК), происходит в цитозоле, однако, появилось несколько сообщений о вовлечении аутофагии в метаболизм ЛК. Так, было показано, что LC3 может взаимодействовать с ЛК. Пока не установлено, конъюгирует ли этот белок прямо с поверхностью ЛК или аутофагосома обворачивается вокруг этой структуры (Shibata et al., 2009; Singh et al., 2009). Singh с соавт. (2009) обнаружили, что аутофагия может

быть вовлечена в поддержание гомеостаза ЛК как при нормальных условиях, так и в условиях недостатка питательных веществ.

Ксенофагия. В процессе селективной аутофагии также могут удаляться различные патогены, особенно бактерии. Данный процесс называют ксенофагией (Levine et al., 2011; Randow, 2011; Shahnazari, Brumell, 2011). Бактерии обычно проникают в клетки путем эндоцитоза. В цитоплазме некоторые бактерии, такие как *Listeria monocytogenes*, локализуются с полиубиквитинированными белками. Было предположено, что белки на поверхности этих бактерий способны убиквитинироваться и захватываться аутофагосомами (Mizushima et al., 2011).

1.5. Физиологическая роль аутофагии в растениях

1.5.1. Аутофагия в ходе роста и развития

Аутофагия – конститутивный механизм, необходимый в процессе жизнедеятельности растительного организма. Аутофагия вовлечена в удаление и деградацию неправильно свернутых, долгоживущих белков и поврежденных органелл в процессе роста и развития растений.

Потенциальная роль конститутивной аутофагии активно исследуется с помощью растений-мутантов. Так, в мутантах арабидопсиса RNAi-AtATG18a наблюдался повышенный уровень окисленных белков и липидов, а также высокое содержание АФК и ферментативных антиоксидантов. Такие растения находятся в условиях постоянного окислительного стресса, поскольку не способны удалять поврежденные компоненты (Xiong et al., 2007).

С использованием ингибитора протеаз E-64d было показано, что аутофагия происходит даже при наличии питательных веществ, по крайней мере, в определенных типах клеток. Так, инкубация кончиков корней арабидопсиса и ячменя в присутствии E-64d приводила к накоплению цитоплазматических включений в вакуолях в зонах меристемы и элонгации.

Это предполагает, что деградация клеточных компонентов путем аутофагии активно происходит в клетках такого типа (Inoue et al., 2006).

Аутофагия участвует в регуляции цветения. Известно, что в пшенице меристема колоска продуцирует до двенадцати цветочных примордиев, но не все из них развиваются в фертильные цветки. Кроме того, условия длинного дня ускоряют переход от вегетативного к репродуктивному развитию растений пшеницы, что, в свою очередь, тоже уменьшает число формируемых фертильных цветков. Было обнаружено, что в клетках abortируемых цветков происходит образование аутофагосом, увеличение размера вакуоли, усиление экспрессии *ATG* генов, генов некоторых протеаз и генов, ассоциированных со смертью. Таким образом, в этих клетках происходит ПКС (программируемая клеточная смерть) путем аутофагии. Было сделано предположение, что индукция аутофагии в клетках цветка происходит вследствие снижения уровня сахаров, что и ведет, в конечном итоге, к клеточной смерти (Ghiglione et al., 2008).

Аутофагия также ответственна за деградацию клеточных компонентов при старении лепестков. Однако, пока неизвестно, является ли этот процесс действительной причиной смерти клеток или это только механизм для переваривания перед непосредственной гибелью клеток. Этот процесс также регулируется уровнем сахара в этих органах. Добавление экзогенных сахаров, как было показано, задерживало или совсем предотвращало старение этих органов (Azad et al., 2008).

В литературе широко представлены данные о важности аутофагии при созревании и прорастании семян. Известно, что в семенах различных видов растений синтезируется и запасается огромное количество запасных веществ, которые деградируют при их прорастании. На поздних этапах созревания семян, запасные белки транспортируются от ЭР к запасяющим вакуолям с помощью внутриклеточного механизма, похожего на аутофагию (Galili et al., 1993; Bassham, 2002). Этот процесс также сопровождался повышенным уровнем экспрессии *ATG* генов. Что интересно, высокий уровень экспрессии

ATG наблюдался даже в сухих и обезвоженных семенах (Angelovici et al., 2009).

Образование ксилемных трахеидных элементов также требует масштабной деградации клеточных компонентов. Хотя в ходе ксилогенеза не происходит усиление экспрессии *ATG* генов, однако поглощение цитоплазматического материала в вакуоль происходит в большей степени благодаря аутофагии (Turner et al., 2007).

Аутофагия также играет большую роль в биогенезе вакуолей. Недавно Уано с соавт. (2007) показали, что в образование вакуолей в протопластах табака ВУ-2 вовлечен механизм, похожий на аутофагию. Однако этот процесс не блокировался ингибиторами аутофагии, такими как 3-МА и вортманин. Вероятно, механизмы аутофагии при биогенезе вакуоли отличаются от механизмов канонической аутофагии, происходящей, например, при голодании.

1.5.2. Аутофагия при стрессе

Аутофагия играет значительную роль в ответах растительных клеток на стрессовые воздействия как абиотической, так и биотической природы. Наиболее часто аутофагия демонстрируется в любых типах клеток при голодании. В условиях недостатка питательных веществ аутофагия является стратегией выживания, в процессе которой деградируются и усваиваются собственные энергетические источники клетки (Aubert et al., 1996; Rose et al., 2006). Голодание у растений происходит при дефиците азота и углерода, сахарозы, а также в темноте. Так, использование дефицита сахаров в качестве стрессового фактора является прекрасной моделью для исследования аутофагии в суспензионной культуре клеток (Bassham et al., 2006). Rose с соавт. (2006) было установлено, что при голодании происходит повышение уровня транскриптов таких *ATG* генов, как *AtATG4a*, *AtATG4b*, *AtATG8a*-

AtATG8i, *AtATG3* и *AtATG7*, а мутанты *Atatg7-1*, *Atatg9-1*, *Atatg4a4b-1*, *Atatg5-1*, *Atatg10-1* проявляют повышенную чувствительность к этому виду стресса.

Засоление и засуха являются наиболее распространенными стрессовыми факторами, которые влияют на рост и развитие растения в процессе его жизнедеятельности (Zhu, 2001). Эти стрессовые воздействия, как известно, сопровождаются повышенным содержанием АФК и окисленных белков (Tsugane et al., 1999). Некоторые *ATG* гены, такие как *AtATG8* у арабидопсиса и *OsATG10b* у риса, задействованы, как было показано, в ответе клетки на солевой и осмотический стрессоры (Sláviková et al., 2008). Liu с соавт. (2009) обнаружили, что активация аутофагии при солевом и осмотическом стрессе сопровождается повышенной экспрессией гена *AtATG18a*. Кроме того, с помощью ингибитора NADPH оксидазы было показано, что регуляция аутофагии может осуществляться NADPH оксидаза-зависимым (в случае солевого стресса) и NADPH оксидаза-независимым (в случае осмотического стресса) способами (Liu et al., 2009).

Растения постоянно подвергаются атакам различных патогенов. В течение длительного со-существования с патогенами растения выработали различные защитные механизмы, направленные на предотвращение патогенного проникновения. Результаты недавнего исследования показали, что аутофагия может быть вовлечена в гиперчувствительный ответ (ГО), который индуцируется как одна из иммунных реакций растений. Было показано, что при инфицировании вирусом табачной мозаики (ВТМ) в клетках табака дикого типа индуцируется аутофагия, которая ограничивает ВТМ -индуцированную клеточную смерть в месте проникновения инфекции. В свою очередь в мутантных растениях, в которых ген *ATG6/Beclin1* выключен, аутофагия не индуцируется, и локального ограничения клеточной смерти не происходит (Liu et al., 2005). Hofius с соавт. (2009) обнаружили, что в мутантах *atg7* и *atg9* арабидопсиса при инфицировании клеток авирулентным бактериальным штаммом *Pto AvrRPS4* или авирулентным

изолятом Noco2 фитопатогенного оомицета *Hyaloperonospora arabidopsidis* замедляется процесс протекания ПКС.

Интересной представляется связь между аутофагией, ПКС и салициловой кислотой (СК), известным регулятором роста растений. При изучении фенотипа мутантных по аутофагии растений Yoshimoto с соавт. (2009) обнаружили накопление в листьях этих растений большого количества СК. Было показано, что блокирование сигнальной роли СК или уменьшение биосинтеза СК подавляет раннее старение, а также ПКС. Кроме того, известно, что агонист СК индуцирует аутофагию. Таким образом, было сделано предположение, что аутофагия негативно регулирует процесс ПКС с помощью СК-зависимой сигнализации при старении и иммунном ответе (Yoshimoto et al., 2009). Это предположение подтверждается и работе Lenz с соавт. (2011), в которой показано, что мутантные линии арабидопсиса *Atatg5*, *Atatg10* и *Atatg18a* имеют повышенную устойчивость к вирулентным патогенам *Pst DC3000*. Такие растения характеризуются повышенным уровнем СК и повышенным уровнем экспрессии салицилат-зависимых генов, что указывает на то, что аутофагия негативно регулирует СК-зависимую иммунную устойчивость к полубиотрофным патогенам *Pst DC3000*. Похожая реакция наблюдалась при инфицировании растений арабидопсиса мучнистой росой. Было показано, что устойчивость к мучнистой росе зависит от уровня СК, в то время как ПКС, индуцированная этим патогеном, только частично зависит от СК (Wang et al., 2011a, 2011b). Кроме того, мутантные линии арабидопсиса *Atatg5*, *Atatg10* и *Atatg18a* являются чувствительными к некротрофным аскомицетам и *Plectosphaerella cucumerina*. Инокулирование растений спорами этих микроорганизмов приводило к хлорозу листьев и распространению некроза, что, в свою очередь, приводило к увеличению поверхности поражения, уменьшению содержания хлорофилла и снижению устойчивости к различным болезням (Lenz et al., 2011).

Одной из универсальных реакций растений на действие стрессовых факторов биотической и абиотической природы является повышенное

образование АФК, что может приводить к их накоплению и индуцировать окислительный стресс. В свою очередь, окислительный стресс является мощным индуктором аутофагии в клетках эукариот.

1.6. АФК и окислительные модификации макромолекул

Кислород играет ключевую роль в энергетике большинства живых существ. Однако одним из неблагоприятных моментов жизни в аэробных условиях является образование АФК как побочных продуктов реакции восстановления O_2 . Образование кислородных радикалов можно представить как последовательные этапы одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода до воды (рис. 4).

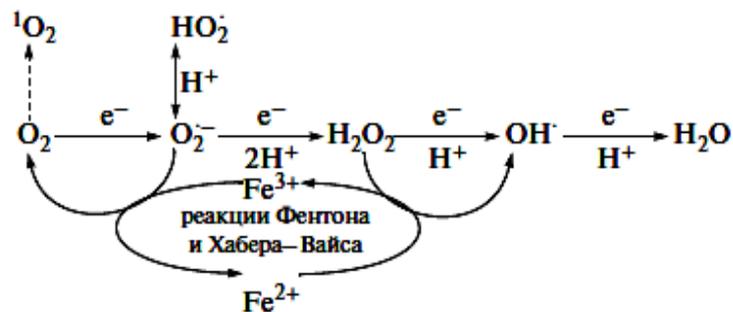


Рис. 4. Схема образования АФК в процессе восстановления кислорода (по Vranova et al., 2002).

Первичным продуктом такого восстановления является супероксидный анионрадикал $O_2^{\bullet -}$ или при слабокислых значениях pH – его протонированная форма, гидроперекисный радикал (HO_2^{\bullet}). Эти радикалы обладают слабокислыми окислительно-восстановительными свойствами и сами по себе редко вызывают повреждение биологических молекул. Однако $O_2^{\bullet -}$ представляет большую опасность, поскольку он имеет относительно большое

время жизни и является источником других форм АФК. Образование пероксида водорода (H_2O_2) происходит при следующем получении еще одного электрона и также в результате взаимодействия (дисмутации) двух молекул $O_2^{\cdot-}$ (рис. 4) (Мерзляк, 1999). H_2O_2 – довольно долгоживущая молекула (время полужизни 1 мс), которая способна диффундировать на некоторое расстояние от места образования (Levine et al., 1994). При дальнейшем одноэлектронном восстановлении возможно появление гидроксильного радикала (HO^{\cdot}) (рис. 4), который является необыкновенно сильным окислителем. Его появление в биологических системах связывают с двумя основными реакциями (Фентона и Хабера-Вайса), протекающими при участии H_2O_2 и восстановленных ионов металлов переменной валентности, в частности меди и железа (Мерзляк, 1999).

В оптимальных условиях АФК продуцируются на низком уровне, главным образом, в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Потенциальными источниками АФК могут также служить НАДФН-оксидазы, пероксидазы клеточной стенки, аминоксидазы, флавиносодержащие оксидазы и некоторые другие ферментные системы (Минибаева, Гордон, 2003; Колупаев, Карпец, 2010; Swanson, Gilroy, 2010). В частности, источником АФК в апопласте являются связанные с клеточной стенкой оксидазы, пероксидазы, полиаминоксидазы (Mittler, 2002; Minibayeva et al., 2009). В условиях стресса образование АФК может резко увеличиться и вызывать окислительный стресс. Растения продуцируют большое количество АФК в ответ на воздействия стрессоров биотической и абиотической природы (Foyer, Noctor, 2005).

В процессе эволюции растения сформировали различные механизмы адаптации, в том числе, различные регуляторные пути преодоления окислительного стресса, вызванного действием неблагоприятных факторов окружающей среды. Одним из механизмов защиты от окислительного стресса является мобилизация различных защитных систем, позволяющих снизить уровень образования АФК и усилить их нейтрализацию.

Компоненты антиоксидантной системы многочисленны и разнообразны. В настоящее время предложено несколько принципов классификации систем антиоксидантной защиты (Прадедова и др., 2011). Один из принципов предполагает существование трех групп антиоксидантов. Первая группа антиоксидантов препятствует образованию АФК, прежде всего, путем хелатирования металлов переменной валентности. Вторая группа участвует в обезвреживании радикалов с помощью антиоксидантов ферментативной (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктазы) и неферментативной природы (аскорбат, глутатион, токоферол, флавоноиды). И, наконец, третья группа антиоксидантов участвует в исправлении повреждений, т.е. в репарации.

Будучи реактивными молекулами, АФК способны окислять все типы клеточных компонентов (белки, углеводы, ненасыщенные липиды, нуклеиновые кислоты), таким образом, повреждая их структуру и нарушая

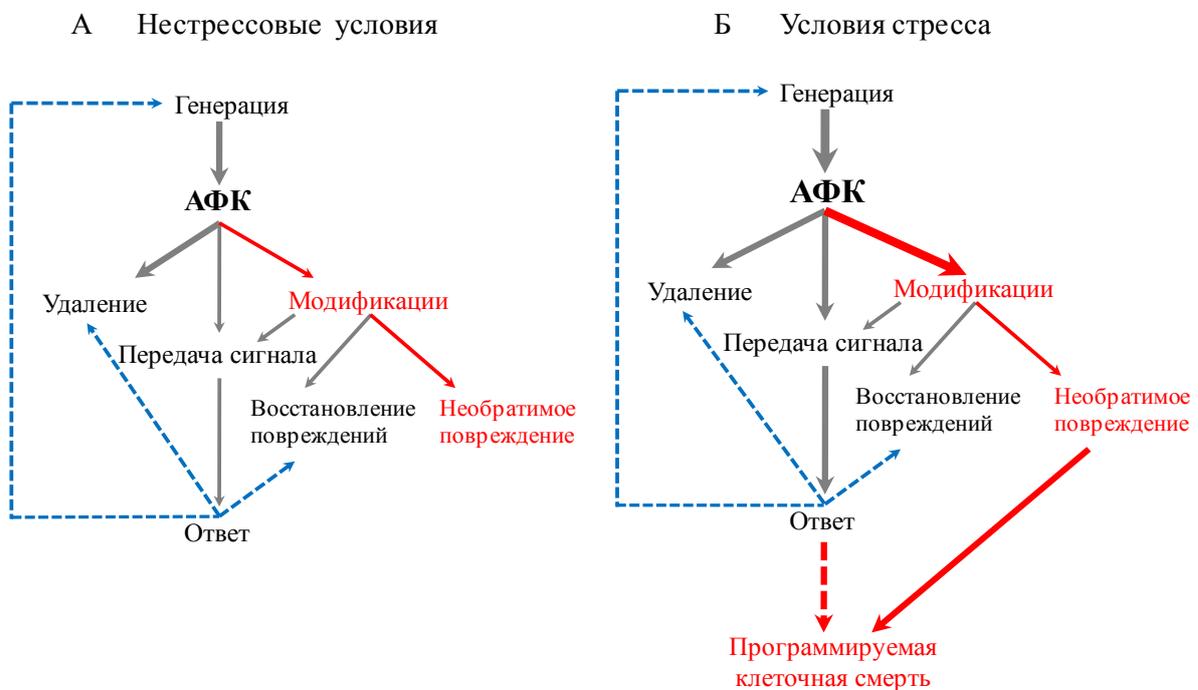


Рис. 5. Упрощенная схема передачи АФК-индуцированного сигнала и его последствия в растительных клетках (по Møller et al., 2007).

их функции (рис. 5). В то же время такие окисленные макромолекулы могут служить вторичными сигнальными посредниками, которые запуская определенные сигнальные каскады, опосредуют ответ клетки на стрессовое воздействие (Møller et al., 2007).

Окислительные модификации белков. Белки – наиболее часто окисляемые компоненты, на их долю приходится 68 % от всех окисляемых в клетке молекул (Rinalducci et al., 2008). Вероятно, поэтому окисление белков часто используют в качестве маркера окислительного стресса. АФК могут окислять белки напрямую или косвенно через редокс-чувствительные молекулы, такие как глутатион (GSH) и тиоредоксины, которые контролируют клеточный редокс-статус (Thannickal, Fanburg, 2000). Большинство типов белкового окисления необратимо, однако найдены и обратимые модификации (Møller et al., 2007).

Прежде всего, АФК могут изменять структуру и активность белков, действуя на тиоловые группы аминокислот (Spadaro et al., 2010). Как известно, серосодержащими аминокислотами в клетке являются остатки цистеина и метионина, которые очень чувствительны к окислению всеми формами активного кислорода. В ходе окисления цистеинового остатка, могут образовываться внутри- и межмолекулярные дисульфиды ($R_1-S-S-R_2$), производные сульфеновой (R-SOH), сульфиновой (R-SO₂H) и сульфоновой (R-SO₃H) кислот. Первые три из этих модификаций являются обратимыми, в то время как образование сульфоновой кислоты – уже необратимо. Обратимость окисления / восстановления играет ключевую роль в изменении активности ферментов (Spadaro et al., 2010). Кроме того, могут образовываться и дисульфиды с глутатионом. Считается, что образование таких «смешанных» дисульфидов может защитить белок от дальнейшего более сильного окисления (Ghezzi, Bonetto, 2003). Остатки метионина также могут подвергаться окислению с последовательным образованием метионинсульфоксида (MetSox) и метионинсульфона. MetSox под действием фермента метионинсульфоксидредуктазы может восстанавливаться до

метионина. Малые белки теплового шока в хлоропластах работают именно по такому механизму (Gustavsson et al., 2002). Известно также, что некоторые периферические метиониновые остатки могут работать как эндогенные антиоксиданты, защищая активные центры и другие чувствительные к АФК домены белков (Levine et al., 1996). Следует также добавить, что окисление метиониновых остатков «делает» пептиды более гидрофобными, и они становятся чувствительнее к деградации под действием мультিকаталитической протеазы (Rinalducci et al., 2008).

Особый интерес представляет окисление аминокислотных остатков с образованием карбонильных (альдегидной и кетонной) групп. Это наиболее часто встречающиеся окислительные модификации белков. Они необратимы и вызывают инактивацию белков. Карбонилированию подвергаются такие аминокислотные остатки как лизин, аргинин, гистидин, пролин, треонин (Møller et al., 2007).

Окисление триптофана – ещё одна необратимая белковая модификация. Такое окисление приводит к образованию N-формилкинуренина за счет диоксигенации триптофана. Предполагают, что аминокислотные остатки триптофана, также как и метионин, могут функционировать в качестве внутримолекулярных антиоксидантов (Møller et al., 2007).

При атаке свободными радикалами тирозиновые остатки могут превращаться в производные 3,4-дигидрокситирозина и би-тирозина. Окисление тирозина, во-первых, может изменять гидрофобность аминокислотных остатков, что в свою очередь влияет на структуру белка. Во-вторых, тирозиновое окисление играет важную роль в фосфорилировании белков. Окисление этих аминокислот может блокировать фосфорилирование тирозиновыми протеинкиназами (Rinalducci et al., 2008).

Важным механизмом, способствующим удалению окисленных белков, является процесс аутофагии (Bassham et al., 2006). В трансгенных растениях риса *atg10b* и арабидопсиса *RNAi-AtATG18a*, дефектных по образованию аутофагосом, обнаружен повышенный уровень окисленных белков и

пониженная степень их деградации, по сравнению с растениями дикого типа. При ингибировании вакуолярных протеаз конканамицином А окисленные белки накапливались в вакуолях в растениях дикого типа, в то время как в трансгенных растениях они локализовались в цитоплазме. Эти данные показывают, что при окислительном стрессе окисленные белки транспортируются в вакуоль для дальнейшей деградации (Xiong et al., 2007; Shin et al., 2009).

Окислительные модификации липидов. Известно, что мембраны как естественный барьер первыми подвергаются действию стрессовых факторов (Чиркова, 1997). Таким образом, мембранные структуры, и прежде всего, липидные компоненты, становятся мишенью поражающего действия АФК (Мерзляк, Соболев, 1975). Считается, что это энергетически выгодно для клетки, поскольку повреждение липидного компонента «дешевле» для клетки, чем удаление и восстановление окисленной молекулы белка (Møller et al., 2007). Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), в частности линолевая и линоленовая кислоты, являются основными ЖК в составе фосфо- и галактолипидов растительных мембран. Известно, что ПНЖК – чувствительны к атаке $O_2^{\cdot -}$ и HO^{\cdot} , образуя при окислении различные гидропероксиды (Halliwell, Gutteridge, 1999). Чрезмерное перекисное окисление ПНЖК приводит к уменьшению текучести мембран, повышению выхода электролитов и повреждению мембранных белков (Halliwell, 2006). Токсичные продукты перекисного окисления липидов, такие как 4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид, формируют конъюгаты с ДНК и белками. Так, названные альдегидные продукты могут вызвать цитоплазматическую мужскую стерильность кукурузы, поскольку ген-восстановитель у этого вида кодирует митохондриальную альдегиддегидрогеназу (Liu et al., 2001).

Помимо своего токсического действия, продукты липидного окисления (например, гидроксиоктодекатриеновая кислота) или их модифицированные производные могут служить вторичными посредниками, функционируя в

качестве триггера в запуске сигнальных каскадов (Гречкин, Тарчевский, 1999; Тарчевский, 2002).

Окислительные модификации ДНК. АФК вызывают окислительные модификации ДНК, главным образом нуклеотидных оснований, что потенциально может привести к мутационным изменениям. Гуанин, взаимодействуя с $O_2^{\cdot-}$ или HO^{\cdot} , образует 8-гидроксигуанин. Учитывая, что мтДНК и хпДНК находятся ближе всего к месту образования АФК и не имеют гистонов и хроматиновой структуры, можно ожидать высокий уровень окислительных модификаций, как это происходит в случае мтДНК животных (Wiseman, Halliwell, 1996). Можно предположить, что многокопийность растительных мтДНК и хпДНК помогает избежать негативных мутаций. Вообще, окислительное повреждение мтДНК и хпДНК, по-видимому, не всегда бывает случайным, однако, до сих пор не было найдено ни одного гена, особенно чувствительного к окислительному повреждению (Møller et al., 2007). Окислительное повреждение мтДНК играет ключевую роль в целом ряде болезней, а также в процессе старения (Skulachev, 2004). Помимо мутаций, окислительные модификации ДНК могут участвовать в изменении метилирования цитозинов, выполняющих важную роль в регуляции генной экспрессии (Halliwell, 2006).

Окислительные модификации углеводов. Углеводы, такие как сахара и полиолы, также могут реагировать с АФК (Smirnoff, Cumbes, 1989). Трансгенные растения табака, аккумулирующие повышенное количество маннитола в хлоропластах, как было показано, проявляли устойчивость к окислительному стрессу, поскольку HO^{\cdot} реагировал в первую очередь с маннитолом (Shen et al., 1997). Окисление сахаров часто приводит к высвобождению муравьиной кислоты (Isbell et al., 1973). Полисахариды клеточной стенки очень чувствительны к окислению HO^{\cdot} в физиологических условиях (Fry, 1998). Растяжение клетки, как известно, опосредуется ауксином, что сопровождается генерацией АФК в апопласте (Schopfer et al., 2002). При этом HO^{\cdot} действует как разрыхлитель клеточной стенки, и такое

окисление полисахаридов является не только не вредным для клетки, но и физиологически необходимым в процессе ее жизнедеятельности (Fry, 2004).

Таким образом, окислительные модификации макромолекул являются важным компонентом редокс-опосредованных внутриклеточных сигналов, регулирующих физиологические процессы роста, развития и стрессовые реакции растительного организма. Однако накопление окисленных макромолекул представляет опасность для жизнедеятельности клетки, поскольку может привести к повреждению и нарушению функций клеточных органелл и в результате к смерти клетки, которая может носить программируемый характер (рис. 5).

1.7. Программируемая клеточная смерть у растений

Программируемая клеточная смерть – генетически детерминированный процесс, который описан как для клеток эукариот, так и прокариот. У животных в настоящее время различают три основных типа ПКС: апоптоз, аутофагию и некроз (Kroemer et al., 2007). В отличие от млекопитающих, у растений до сих пор существует путаница в классификации ПКС. Существование «классического» апоптоза в растительных клетках в настоящее время широко дискутируется. Апоптоз у животных сопровождается сжатием протопласта, конденсацией хроматина и фрагментацией ядра (Kroemer et al., 2007). Митохондрии также вовлечены в апоптоз, инициация которого сопровождается образованием митохондриальных транзитных пор проницаемости (MPTP), уменьшением митохондриального трансмембранного потенциала, за которым следует высвобождение цитохрома *c* и про-апоптотических белков из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль (Yao et al., 2004) и последующая активация ферментов каспаз. Подобные изменения часто наблюдаются и в растительных клетках. Так, сжатие протопласта, конденсации хроматина и фрагментация ядра при окислительном стрессе в

корнях пшеницы показано ранее в исследованиях нашей лаборатории (Дмитриева и др., 2007). Высвобождение цитохрома *c* – ключевого фактора в развитии ПКС - продемонстрировано в различных растениях, например, картофеле (Aragaus et al., 2002), огурце (Balk et al., 1999), подсолнечнике (Balk, Leaver, 2001), арабидопсисе (Yao et al., 2004) и других. В ходе ПКС часто можно наблюдать агрегацию митохондрий (Gao et al., 2008), их набухание (Aragaus et al., 2002), потерю электронной плотности и крист (Crompton, 1999; Scott, Logan, 2008). Митохондрии могут образовывать агрегаты с хлоропластами и собираться в структуры, напоминающие кольцо, вокруг ядра (Lord et al., 2011). Кроме того, в ходе ПКС митохондрии могут активно продуцировать АФК, что способствует ускорению клеточной гибели (Ježek, Hlavatá, 2005). До недавнего времени выявление подобных ПКС-индуцированных изменений в растениях побуждало некоторых исследователей называть этот процесс «апоптозом» (Ванюшин, 2001). В настоящее время, однако, тщательный анализ морфологических различий животной и растительной клетки и появление новых молекулярных данных свидетельствует о неоднозначности классификации ПКС и ставит под сомнение сам факт апоптоза в клетках растений. Во-первых, существование жесткой клеточной стенки препятствует образованию апоптотических телец, которые образуются в ходе распада клеточного содержимого. Во-вторых, у растений нет фагоцитов, которые способны поглощать эти тельца. W.G. van Doorn с соавт. (2011) предложили классификацию ПКС растений, основанную на морфологических критериях. Согласно этой классификации, можно выделить следующие два типа ПКС растений: вакуолярная гибель и некроз. Характеристиками вакуолярной гибели является вакуолизация клеток, появление аутофагосом, разрыв тонопласта и высвобождение гидролаз. В конечном итоге это приводит к разрушению всего протопласта или даже в некоторых случаях целой клетки, включая клеточную стенку. Такая гибель клеток происходит в ходе развития растения, в частности, при формировании и удалении тканей и органов. Вклад аутофагии в гибель

клеток является одним из наиболее обсуждаемых и противоречивых вопросов в этой области исследований. Аутофагия находится на перекрестке между выживанием и гибелью клеток. Этот процесс способствует выживанию путем деградации белков и органелл, поврежденных при стрессе, однако он также активируется как часть программы смерти в условиях, когда повреждения не могут быть устранены (Scherz-Shouval et al., 2007). Программируемый некроз у растений характеризуется ранним разрывом плазматической мембраны и сжатием протопласта. Вакуоль в этом типе ПКС не участвует (van Doorn et al., 2011). Существование в клетках, наряду с непрограммируемым, программируемого некроза отмечается и в работах других авторов (Galluzzi et al., 2011; Ouyang et al., 2012).

Некоторые виды клеточной гибели у растений не могут быть причислены к основным классам ПКС. Это, например, относится к ГО при действии биотрофных патогенных микроорганизмов, который может сочетать в себе черты и некроза, и вакуолярной гибели клеток (см. главу 1.5.2.). Кроме того, ПКС в крахмалистом эндосперме у зерновых и ПКС при самонесовместимости пыльцы также не укладывается в существующую классификацию (van Doorn et al., 2011).

Существование различий в механизмах программируемой гибели у растений и животных подтверждается и на молекулярном уровне. Так, ярким примером такого расхождения является отсутствие в растениях каспаз, ключевых ферментов апоптоза животных. Каспазы – цистеин-зависимые аспартат-специфичные протеазы, которые способны осуществлять расщепление белков в процессе апоптоза (Degterev et al., 2003). Несмотря на отсутствие каспаз, у растений обнаружены белки, обладающие каспазо-подобной активностью, в частности, цистеин-зависимые протеиназы, названные метакаспазами. Помимо растений, метакаспазы найдены у простейших и грибов (Uren et al., 2000). Филогенетический анализ показал, что каспазы, метакаспазы и паракаспазы эукариот эволюционно удалены друг от друга на одинаковое расстояние и принадлежат к клану цистеин-

зависимых протеиназ (Vercammen et al., 2007). Структурной особенностью этого клана является наличие белкового сворачивания по типу каспаз / гемоглобиназ. Кроме того, белки содержат в каталитическом центре типичную для белков этого клана диаду Cys и His остатков (Aravind, Koonin, 2002).

Метакаспазы синтезируются как белки-предшественники и локализуются в цитозоле. Выделяют два типа метакаспаз (Tsiatsiani, 2011). Тип I имеет на N-конце про-домен, содержащий богатые пролином повторяющиеся мотивы, а также мотив «цинковые пальцы». Тип II обнаружен исключительно у растений, не имеет про-домена, а его большая и малая субъединицы разделены довольно большим линкерным участком (рис. 6). Зрелые метакаспазы процессируются в ходе автокатализа про-фермента (Vercammen et al., 2004; Bozhkov et al., 2005; Watanabe, Lam, 2011). Отличительной чертой метакаспаз является их строгая Lys- и Arg-субстратная специфичность.

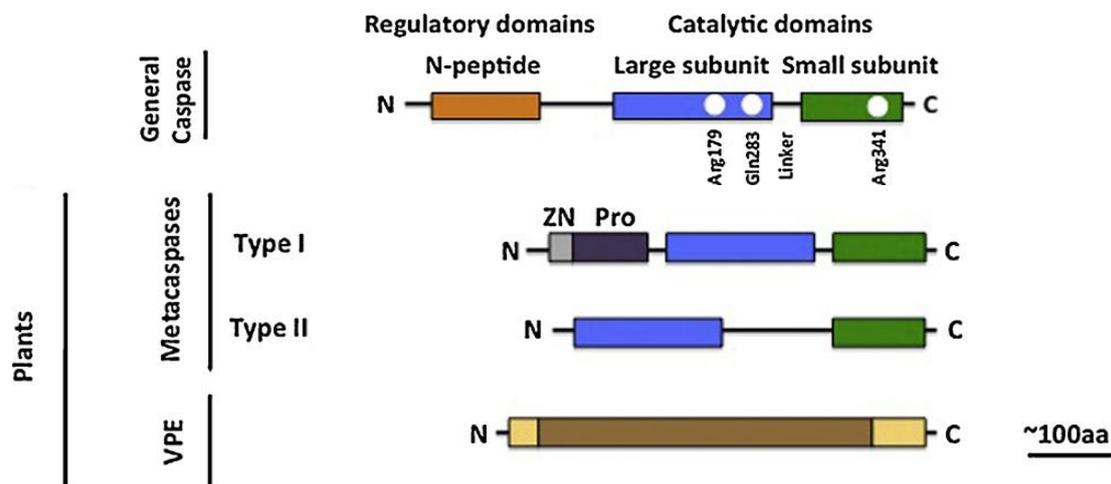


Рис. 6. Схемическое изображение структуры каспаз животных и каспазо-подобных белков растений (по Lord et al., 2012).

Известно, что метакаспазы вовлечены в различные клеточные процессы, включая ПКС. Замолкание генов метакаспаз приводит к нарушению терминальной клеточной дифференциации и развития зародыша у ели (Suarez et al., 2004). Нокаут-растения арабидопсиса по *AtMC8* обладали повышенной устойчивостью к гербициду параквату (Watanabe, Lam, 2011). Показано, что *AtMC1* является позитивным регулятором ГО, в то время как *AtMC2* подавляет его проапоптотический эффект (Coll et al., 2010).

Каспазо-подобной активностью обладают также ферменты вакуолярного процессинга (vacuolar processing enzymes, VPE) (Hara-Nishimura et al., 2005). VPE также по своей третичной структуре напоминают каспазы, в активном центре содержат Cys и His, способные, так же как каспазы, гидролизовать пептидную связь после Asp (рис. 6). Однако, в отличие от каспаз, VPE локализуются в вакуоли (Hatsugai et al., 2004). У арабидопсиса обнаружено четыре гена, кодирующих VPE, каждый из которых жизненно важен для развития растения (Hara-Nishimura et al., 2005). Так, показано, что VPE играют важную роль в ПКС у табака при заражении ВТМ. ПКС сопровождается разрывом тонопласта, фрагментацией ДНК и образованием зоны мертвых клеток. При замолкании VPE генов эти процессы подавляются (Hatsugai et al., 2004; Hatsugai et al., 2006). Показано, что экспрессия генов VPE увеличивается в начале ГО, но затем очень быстро снижается. Этот эффект, вероятно, указывает на то, что VPE играют роль на начальных стадиях клеточной гибели. Однако точные механизмы вовлечения VPE в описанные выше процессы остаются неизвестными. VPE также вовлечены в ПКС, индуцированную некоторыми токсинами грибного происхождения (Kuroyanagi et al., 2005).

Обнаружено, что индукция ГО у растений *Nicotiana tabacum* при инфицировании ВТМ сопровождается активацией протеазы, которая по специфичности похожа на каспазу-3 человека и может осуществлять гидролиз после остатка Asp в мотиве TATD (Chichkova et al., 2004). Данная протеаза была названа фитаспазой (от англ. «*plant aspartate-specific*

protease»). Субстратами фитаспаз являются пептид Ac-VEID-AFC (субстрат каспазы-6), VAD (субстрат различных каспаз), YVAD (субстрат каспазы-1), VDVAAD (субстрат каспазы-2), IETD (субстрат каспазы-8) и LEHD (субстрат каспазы-9). Несмотря на то, что фитаспазы проявляют каспазо-подобную активность, дальнейшие исследования показали их отличие от каспаз. Во-первых, фитаспазы являются субтилазами – серин-зависимыми протеазами. Они синтезируются как неактивные предшественники, содержащие N-терминальный сигнальный пептид, про-домен и протеазный домен. N-терминальный пептид необходим для секреции фермента. Активация фитаспаз происходит автокаталитически и конститутивно посредством расщепления про-домена. Локализация фитаспаз также принципиально отличается. В нестрессовых условиях они локализируются в апопласте, однако при индукции ПКС транспортируются в цитозоль, где активны в виде мономера (Chichkova et al., 2010; Vartapetian et al., 2011). Фитаспазы активируются при ПКС в ходе биотического и абиотического стресса. Была продемонстрирована индукция клеточной гибели при повышении уровня активности фитаспаз, и, наоборот, подавление ПКС при уменьшении активности этого фермента вследствие специфического ингибирования и РНК-интерференции (Chichkova et al., 2010).

К субтилизин-подобным протеазам также относят и саспазы (серин-зависимые аспартат-специфичные протеазы), выделенные из *Avena sativa*. Они также способны гидролизовать субстраты каспаз. Однако, в отличие от фитаспаз, они не способны гидролизовать производные VEID, поэтому их выделяют в отдельный класс протеаз (Coffeen, Wolpert, 2004).

Таким образом, имеющиеся в литературе данные о биохимических, морфологических и молекулярных изменениях, индуцируемых в растительных клетках при программируемой гибели, свидетельствуют о сложности и неоднозначности механизмов ПКС в растениях.

Обзор данных литературы свидетельствует о том, что в последние годы резко возрос интерес к физиологической роли аутофагии. С расшифровкой молекулярных механизмов аутофагии к нам приходит понимание того, что в растениях аутофагия вовлечена в фундаментальные биологические процессы, такие как эмбрио- и органогенез, старение, смерть, показана ее важная роль при стрессе.

Процесс аутофагии консервативен и характерен для всех эукариот (Xie, Klionsky, 2007). Несмотря на большой прогресс, достигнутый в расшифровке механизмов аутофагии в дрожжах и млекопитающих (Mizushima et al., 2011), наше знание того, как этот процесс функционирует в растениях, остается достаточно ограниченным. Так, до настоящего времени не выявлены этапы формирования аутофагосом и природа фагофора в растениях. Фрагментарными являются данные о профиле экспрессии *ATG* генов. Структура и функции некоторых ключевых аутофагических белков *in planta* до сих пор не расшифрованы. В связи с вышеизложенным, настоящая работа посвящена изучению морфологических и биохимических признаков макроаутофагии в клетках корней пшеницы в условиях окислительного стресса, а также характеристике ключевого белка ATG8, принимающего непосредственное участие в формировании аутофагосом.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

В качестве объекта исследований использовали кончики корней (0,6-0,8 см) проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская Юбилейная. Растения выращивали на растворе 0,25 мМ CaCl₂ при температуре +22° С и освещенности 100 Вт/м² с 12 ч фотопериодом в течение 4 суток. Затем растения перемещали на исследуемые растворы и выдерживали в течение 3-12 ч. В качестве прооксиданта использовали 10 мкМ Пк; в качестве ингибиторов электрон-транспортной цепи митохондрий – 50 мкМ ротенона (комплекс I), 10 мкМ малоната (комплекс II), 1 мкМ антимицина А (комплекс III), 100 мкМ цианида калия (комплекс IV), 100 мкМ салицилгидроксамовой кислоты (ингибитор альтернативной оксидазы). Раневой стресс моделировали путем отрезания кончиков корней и последующей инкубации в растворе 0,25 мМ CaCl₂ при умеренном покачивании на Shaker S-4 (ELMI, Latvia).

2.2. Определение содержания H₂O₂

Концентрацию H₂O₂ определяли в растворимой фракции гомогената корней с использованием ксиленола оранжевого. Растительную ткань (0,5 г) растирали в 2 мл 0,1 М Tris-HCl буфере (pH 7,5), затем центрифугировали в течение 10 мин при 10 тыс. об/мин. Супернатант и реагент смешивали в соотношении 1:5 и через 1 ч измеряли оптическую плотность при $\lambda = 560$ нм. В состав реагента входили 25 мМ FeSO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ H₂SO₄, 125 мкМ ксиленола оранжевого и 100 мМ сорбита. Концентрацию перекиси рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям перекиси.

2.3. Определение интенсивности ПОЛ

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли в растворимой фракции гомогената по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). В основе метода лежит реакция между малоновым диальдегидом (МДА) и ТБК, которая при высокой температуре и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы ТБК. Гомогенат приготавливали как описано в гл. 2.2. Реакционную смесь (0,3 % раствор тритона X-100, 0,1 М HCl, 0,03 М ТБК) смешивали с супернатантом (3:1) и инкубировали на водяной бане в течение 30 мин. Оптическую плотность продукта реакции измеряли при $\lambda = 532$ нм. Уровень ПОЛ выражали в процентах, за 100 % принимали количество ТБК-прореагировавших продуктов, содержащихся в клетках исходных корней.

2.4. Определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли с помощью красителя Эванса синего (Baker, Моск, 1994), проникающего только в мертвые клетки. Корни окрашивали 0,25 % раствором Эванса синего в течение 15 мин. Окрашенные корни промывали водой 3 раза по 10 мин, отсекали кончики корней (0,6 см) и отмывали их в N,N-диметилформамиде в течение 1 ч при комнатной температуре. Оптическую плотность отмытого раствора измеряли при $\lambda = 600$ нм.

2.5. Определение протеазной активности

Общую протеазную активность измеряли с использованием азоказеина (Battelli et al., 2011). Растительную ткань растирали в 1 объеме холодного буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,1 %

Тритон X-100, затем центрифугировали в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин при 4° С. Реакционную смесь, содержащую 400 мкл 1 мМ ацетатного буфера рН 5,5, 400 мкл 0,4 % азоказеина, 200 мкл супернатанта, 5 мкл 250 мМ β-меркаптоэтонола, инкубировали в течение ночи при 32° С. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл 50 % ТХУ, затем образцы центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об/мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли при $\lambda = 330$ нм. Протеазную активность рассчитывали в пересчете на белок. Белок измеряли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

2.6. Конфокальная микроскопия

Для микроскопического анализа делали тонкие продольные срезы кончика корня с помощью лезвия. Срезы окрашивали следующими красителями: для детекции АФК – 20 мкМ 2',7'- Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma, λ_{ab} 504 nm / λ_{em} 529 nm), для визуализации аутофагосом – 1 мкМ LysoTracker Red DND 99 (LT, Invitrogen, λ_{ab} 577 нм / λ_{em} 590 нм), для оценки жизнеспособности клеток – 0,0002 % йодидом пропидия (PI, Sigma, λ_{ab} 537 нм / λ_{em} 617 нм) в течение 15 мин. Срезы промывали 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,2). Флуоресценцию клеток в зоне растяжения регистрировали с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Germany) с использованием HeNe лазера (543 нм 60,0 %). Специфичность окрашивания DCFDA подтверждали с помощью супероксиддисмутазы (250 ед/мл). Специфичность окрашивания LT подтверждали с применением ингибитора аутофагии 3-Мам(10 мМ).

2.7. Исследования ультраструктуры клеток

Высечки ткани из зоны растяжения корня фиксировали в течение 2 ч в 2,5 % глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,2). Затем их обрабатывали в течение 2 ч в 1 % раствором OsO₄ (Serva),

приготовленном на том же буфере с добавлением сахарозы (25 мг/мл). Дегидратацию препаратов проводили в растворах этанола возрастающей концентрации (30, 40, 50, 60, 70, 96 %), ацетона и окиси пропилена. Образцы заключали в Эпон-812 (Serva) и полимеризовали в течение 3 сут, увеличивая температуру от 37 до 60° С. Срезы получали на ультрамикротоме (LKB III, Sweden), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата (60° С, 10 мин), а затем водным раствором цитрата свинца в течение 10 мин. Ультраструктуру клеток паренхимы центрального цилиндра анализировали с помощью электронного микроскопа Jem 1200EX (Jeol, Japan).

2.8. Выделение РНК, проведение ОТ-ПЦР в реальном времени и анализ экспрессии генов

Тотальную РНК для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени выделяли с помощью реагента TRIzol (фенол, насыщенный Tris-HCl, pH 8,0; 0,8 мМ GuSCN; 0,4 мМ NH₄SCN; 3 М ацетат натрия pH 5,0; 6 % глицерин). Растительную ткань (100 мг) растирали в керамической ступке в жидком азоте до гомогенного состояния, переносили в центрифужную пробирку и добавляли 1 мл реагента TRIzol. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 2 мин и центрифугировали при 14 тыс. об/мин в течение 5 мин. К супернатанту добавляли 300 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1). Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 2 мин и центрифугировали при 14 тыс. об/мин 5 мин. К отобранной верхней фазе добавляли равный объем изопропанола и выдерживали в течение ночи при -20°С, после чего центрифугировали при 14 тыс. об/мин 4° С 30 мин. Осадок растворяли в 200 мкл MilliQ с 0,01 % DEPC, осаждали четырьмя объемами ледяного 96% этанола и выдерживали в течение ночи при -20°С. После этого опять центрифугировали при 14 тыс. об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяли в 50 мкл MilliQ с 0,01 % DEPC. Для удаления ДНК образцы обрабатывали 0,1 ед. ДНКазы (Fermentas) при 37° С в течение 30 мин.

Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически с помощью NanoDrop-1000 (Fisher, USA); нативность РНК оценивали с помощью электрофоретического разделения в 2 % агарозном геле.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл. На первой стадии 2 мкл РНК в присутствии 1 мкл праймеров Oligo(dT)₁₅ (1 мкМ) и 18 мкл MilliQ прогревали при 70° С в течение 5 мин. На второй стадии к этой смеси добавляли 3 мкл дезоксирибонуклеотидфосфатов (2 мМ), 2,5 мкл 10-кратного M-MLV буфера (рН 8,3, 75 мМ MgCl₂) и 200 ед. M-MLV обратной транскриптазы (Силекс). Реакцию ОТ проводили в амплификаторе DNA Engine thermocycler (Bio-Rad, USA) при следующем температурном режиме: 25° С – 10 мин, 37° С – 60 мин, 70° С – 10 мин.

ПЦР в реальном времени проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, в состав которой входили 18,25 мкл MilliQ, 2,5 мкл 10-кратный Taq-буфера (рН 8,6), 1,5 мкл смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (2 мМ), 2 мкл ДНК-матрицы, 0,25 мкл каждого праймера и зонда (10 пМ), 0,25 мкл 5 ед. Taq-полимеразы (Fermentas). Использовали праймеры *ATG4F*, *ATG4R*, *ATG8F*, *ATG48R* и зонды *ATG4Z*, *ATG8Z* (табл. 2). В качестве референтного гена был использован ген фактора АДФ-рибозилирования (Paolacci et al., 2009) (табл. 2). Зонды TaqMan содержали флуоресцентный краситель FAM совместно с экранирующим агентом BHQ-1. ПЦР проводили в ICycler IQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) в следующих условиях: 3 мин при 95° С, 40 циклов по 10 с при 95° С и 40 с при соответствующей для каждой пары праймеров температуре.

ПЦР продукты оценивали по флуоресценции FAM с абсорбцией при $\lambda = 490$ нм и эмиссией при $\lambda = 530$ нм с использованием соответствующих фильтров для возбуждения флуорофора и фиксирования флуоресценции. Для оценки изменения экспрессии генов использовали сравнительный метод (Pfaffl, 2001).

Таблица 2. Список использованных праймеров и флуоресцентных зондов TaqMan. Все праймеры и зонды *TaATG4* и *TaATG8* сконструированы на основе последовательностей, представленных в базе данных GenBank (No: FJ750846.1, FJ750848.1) и синтезированы в НПО «Синтол» (Москва).

Праймеры и зонды	Последовательность	Температура отжига, °С
<i>ATG4F</i>	5'-CTAGTGATGTCAACTGGGGCTGC-3'	65
<i>ATG4R</i>	5'-GATCCTTGTATGTTCTGGGTCAGATG-3'	
<i>ATG4Z</i>	5'-CTGTGCGGGC(T-BHQ-1)TTCTCCAAGACCTTCC-3'	
<i>ATG8F</i>	5'-GGCTGATAAGTCTGATGTCCCG-3'	55
<i>ATG8R</i>	5'-GAAGCAGTCGGTGGCAAGG-3'	
<i>ATG8Z</i>	5'-CAGCTTGA(T-BHQ-1)CCTCTCCGCACCACG-3'	
<i>RibF</i>	5'-GCTCTCCAACAACATTGCCAAC-3'	55
<i>RibR</i>	5'-GCTTCTGCCTGTCACATACGC-3'	
<i>RibZ</i>	5'-CGTGCTGGA(T-BHQ-1)GTCTCAACAACACTCACTGC-3'	
<i>ATG4ekF</i>	5'-ATGACGAGCTTGCCTGAGAGG-3'	65
<i>ATG4ekR</i>	5'-TCAGAGAATCTGCCACTCGTCTTC-3'	
<i>ATG8ekF</i>	5'-ATGGCCAAGACTTGCTTCAAGAC-3'	65
<i>ATG8ekR</i>	5'-TTAGGCAGAGCCGAAAGTGTTTC-3'	

2.9. Выделение РНК и проведение ОТ-ПЦР для получения полноразмерных кДНК

Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy mini kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. Реакцию ОТ проводили с использованием набора Mint (Евроген) согласно протоколу производителя. ПЦР проводили в амплификаторе C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) при следующем температурном режиме: 3 мин – 95° С, (30 с – 95° С, 25 с – 65° С, 40 с (для *TaATG8*) или 90 с (для *TaATG4*) при 72° С) 28 циклов, 5 мин при 72° С.

Использовали следующие праймеры: для *TaATG4* – *ATG4ekF* и *ATG4ekR*; для *TaATG8* – *ATG8ekF* и *ATG8ekR* (табл. 2). О результате ПЦР судили по электрофоретическому разделению ДНК в 1 % агарозном геле. ПЦР фрагменты очищали с помощью набора АхуPrep™ PCR Cleanup Kit (Ахуgen Biosciences).

2.10. Выделение геномной ДНК растений пшеницы и проведение ПЦР для амплификации открытой рамки считывания (ОРС)

Геномную ДНК пшеницы выделяли с помощью набора DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК оценивали спектрофотометрически с помощью NanoDrop-1000 (Fisher, USA), качество выделенной ДНК оценивали электрофоретически в 1 % агарозном геле. Для нарабатывания ОРС гена *TaATG8g* ПЦР проводили в амплификаторе С1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) при следующем температурном режиме: 3 мин – 95° С, (30 с – 95° С, 30 с – 65° С, 2 мин при 72° С) 28 циклов, 5 мин при 72° С. В состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили MilliQ, 10-кратный Таq-буфера (рН 8,6), 2,5 мкл смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (2 мМ), 200 нг геномной ДНК, 1 мкл каждого праймера (*ATG8ekF* и *ATG8ekR*, табл. 2) (10 пМ), 0,25 мкл 5 ед. смеси Таq- и Pfu-полимераз (30:1). О результате ПЦР судили по электрофоретическому разделению ДНК в 1 % агарозном геле. ПЦР фрагменты очищали с помощью набора АхуPrep™ PCR Cleanup Kit (Ахуgen Biosciences).

2.11. Клонирование кДНК

В работе использовались векторы рAL-ТА (Евроген), рGEM-T Easy (Promega) и вектор рЕТ-51b(+) Ек/LIC (Novagen, рис. 7). Клонирование в вектор рAL-ТА и рGEM-T Easy осуществляли за счет выступающих на

концах амплифицированных фрагментов ДНК дезоксиаденозиновых остатков, согласно протоколам производителей (Евроген, Promega). Клонирование в вектор pET51b(+) Ek/LIC осуществляли с помощью метода безлигазного клонирования (LIC, Ligation Independent Cloning) с помощью Ek/LIC Cloning Kits (Novagen). Для этого были сконструированы специальные праймеры *ATG8ekF* и *ATG8ekR*, содержащие вспомогательные последовательности комплементарные одноцепочечным концам вектора (табл. 2).

Плазмиды, содержащие целевые вставки, трансформировали в химически компетентные клетки. Для трансформации использовали 50 мкл химически компетентных клеток, которые оттаивали на льду в течение 5 мин, после чего добавляли 100-250 нг плазмидной ДНК, инкубировали на льду 5 мин, затем – 30 с при 42° С и вновь на льду 2 мин, добавляли 250 мкл среды SOC комнатной температуры и инкубировали в течение 1 ч при 37° С. Далее производили высев 100 мкл культуры на чашку Петри с агаризованной средой Luria-Bertani (LB), содержащей соответствующие антибиотики. Культуру выращивали в течение 15-18 ч при 37° С. Проверку трансформантов проводили с помощью реакции ПЦР с соответствующими праймерами (табл. 2). Для дальнейшей работы использовали отдельную колонию, которую высевали на жидкую среду LB. Выделение плазмидных ДНК-конструкций производилось с использованием набора AxyPrep™ Plasmide Mini-Kit (Axygen Biosciences) по инструкции производителя.

В работе были использованы штаммы *Escherichia coli* Nova Blue и BL21 (DE3) pLysS (Novagen). Штамм BL21 (DE3) pLysS обеспечивает контролируемый уровень экспрессии, правильный фолдинг и посттрансляционную модификацию целевого белка. Этот штамм имеет дополнительную плазмиду pLysS, которая снижает базовый уровень экспрессии целевого гена. Кроме того, присутствие плазмиды pLysS облегчает приготовление клеточных экстрактов, поскольку имеющийся в клетке T7 лизоцим при pH 8,0 эффективно лизирует клетки.

В состав жидкой среды LB (pH 7,5) для культивирования бактерий входили 1 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1 % NaCl. Для приготовления агаризованной среды добавляли 1,5 % агара. В состав жидкой питательной среды SOC входили 2 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM глюкоза. В среду LB для культивирования бактерий штамма *E. coli* Nova Blue добавляли 12,5 мкг/мл тетрациклина, для штамма BL21 (DE3) pLysS – 34 мкг/мл хлорамфеникола. При культивировании трансформантов, содержащих плазмиды pAL-TA, pGEM-T Easy и pET-51b(+) Ek/LIC с целевыми вставками, в среду LB дополнительно добавляли 100 нг/мкл ампициллин.

2.12. Карта вектора pET-51b(+) Ek/LIC

Конструкция вектора для экспрессии pET-51b(+) Ek/LIC включает в себя следующие компоненты: T7 промотор, lac-оператор, Strep•Tag II, сайт мультиклонирования, в том числе сайт клонирования Ek/LIC, His•Tag, T7 терминатор, сайт f1 origin, последовательность гена lacI, а также регион, ответственный за устойчивость к антибиотику ампициллину (рис. 7).

Транскрипция клонированных в вектор генов находится под контролем сильного промотора, выделенного из фага T7, и инициируется T7 РНК-полимеразой, которая встроена в бактериальную хромосому. Активация транскрипции гена T7 РНК-полимеразы происходит при добавлении в среду культивирования бактерий изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ). His•Tag и Strep•Tag II позволяют очищать белок с помощью металлоаффинной хроматографии.

2.13. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом автоматического секвенирования, в основе которого лежит метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих транскрипцию дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (Sanger et al., 1977). Для постановки ПЦР использовали набор Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). В состав реакционной смеси объемом 10 мкл входили следующие компоненты: 2 мкл плазмидной ДНК (150-250 нг/мкл), 0,5 мкл праймера (3,2 пМ); 2 мкл Ready reaction mix; 2 мкл 5-кратного BigDye Term Sequencing buffer; 3,5 мкл MilliQ. ПЦР проводили в амплификаторе C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) при следующих параметрах реакции амплификации: 1 мин – 95° С, (10 с – 95° С, 5 с – 50° С, 4 мин при 60° С) 35 циклов, хранение 12° С. Очистку реакционной смеси от свободных модифицированных нуклеотидов проводили с использованием ацетата натрия (3 М). Нуклеотидные последовательности секвенировали с помощью автоматического ДНК-анализатора ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Анализ секвенированных последовательностей проводили с использованием программы Sequencing Analysis 5.3.1. (Applied Biosystems, USA).

2.14. Получение и очистка рекомбинантного белка

Продукт рекомбинантного белка ATG8 пшеницы получали путем трансформированием компетентных клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) pLysS вектором, содержащем вставку гена *TaATG8*, с последующей селекцией на твердой среде с соответствующими антибиотиками. Культуру штамма *E. coli* BL21 (DE3) pLysS выращивали в течение ночи при 37° С и 180 об/мин в Orbital Incubator (Japan). Ночную культуру высевали в свежую жидкую среду LB из расчета 1:100 и выращивали при 37° С и 180 об/мин до оптической

плотности 0,6–0,8. Индукцию синтеза белка проводили путем инкубации культуры клеток с 0,5 мМ ИПТГ при 180 об/мин, 18 С в течение 18 ч. В дальнейшем клетки собирали центрифугированием при 6 тыс. об/мин в течение 20 мин и замораживали при - 80°C. Клетки лизировали путем их оттаивания и ресуспендировали в Na-фосфатном буфере (20 мМ, рН 7,5), содержащем 300 мМ NaCl. Рекомбинантные белки, полученные в системе для экспрессии рЕТ-51b Ek/LIC, содержат на С-конце полипептида последовательность из десяти гистидиновых остатков (10 x His-tag), что облегчает их очистку с помощью металлоаффинной хроматографии. Предварительную очистку рекомбинантного белка осуществляли методом металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях с помощью BIO-Scale Mini Cartridges (Bio-Rad) в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, USA). Для этого в лизат добавляли гуанидин гидрохлорид до конечной концентрации 6 М. Денатурированный лизат центрифугировали при 30 тыс. об/мин, 4 С в течение 30 мин. Супернатант наносили на колонку. Колонку промывали 100 мл буфера А (20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,5, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол), содержащего 8 М мочевины. Для удаления денатуранта колонку последовательно промывали 50 мл буфера А, содержащего 4, 2, 1 и 0 М мочевины, соответственно. Белок элюировали буфером О (20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,5, 300 мМ NaCl, 0,5 М мочевины, 1 % глицерин), который содержал 300 мМ имидазола. Очищенный рекомбинантный белок отмывали от имидазола и концентрировали в концентраторах Amicon® Ultra -15 10K (Millipore) при 5 тыс. об/мин, 20 С.

Дальнейшую очистку белка проводили с помощью гель-фильтрации на колонке SEC125 в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, USA). Элюцию проводили в буфере О (NaCl 100 мМ) при скорости потока 0,3 мл/мин. Фракцию, содержащую целевой белок, собирали и концентрировали с помощью Microcon YM-10 (Millipore) при 8 тыс. об/мин, 20 С. Степень чистоты и молекулярную массу белка определяли электрофоретически в 15 % ДСН-полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ).

2.15. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофоретическое разделение ДНК и РНК проводили в 1-2 % агарозном геле в горизонтальной камере SE-1 (Helicon, Russia) при напряжении 5-10 В/см. В качестве электролита использовали Tris -ацетатный буфер, pH 8,0 (40 mM Tris-ацетат, 2 mM ЭДТА). О ходе электрофореза судили по миграции бромфенолового синего. ДНК регистрировали по люминесценции в ультрафиолетовом свете после экспозиции геля в 1 % растворе бромистого этидия с помощью установки видео-документации гелей Gel-Doc (Bio-Rad, USA).

2.16. Одномерное электрофоретическое разделение белков

Разделение белков проводили в 15 % ДСН-ПААГ по методу Laemmli (1970) с использованием электрофоретической ячейки Mini-Protean 3. В образцы добавляли загрузочный буфер в соотношении 1:3 и кипятили в течение 5 мин. Образцы загружали в объеме 5 мкл. Электрофорез проводили при напряжении 120 мВ в концентрирующем геле и 150 мВ в разделяющем геле. Гели окрашивали красителем Кумасси бриллиантовый голубой R-250. В качестве маркеров молекулярного веса использовали Page Ruler Unstained protein Ladder #SM0661 (Fermentas).

2.17. Метод полусухого блоттирования (вестерн-блоттинг)

Белки, разделенные электрофоретически, переносили из геля на PVDF-мембрану. Мембрану и бумагу для блоттинга вымачивали в буфере для переноса (25 mM Tris основной, 20 % этанол, 192 mM глицин). На блоттер (Helicon, Russia) выкладывали последовательно слои смоченной бумаги для

блоттинга, PVDF-мембрану, гель, а затем еще один слой бумаги, следя за тем, чтобы между слоями не образовывалось пузырьков воздуха. Перенос белков проводили при напряжении 20 В в течение 1 ч. После переноса мембрану выдерживали в течение ночи в 2 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) для предотвращения неспецифического связывания антител с мембраной. Затем мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере TBS-T/БСА буфере (pH 7,4; 25 mM Tris основной, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1 Tween-20, 2 % БСА) с первичными антителами Anti-ATG8A (Abcam), разведенными в соотношении 1:1000, и промывали несколько раз в TBS-T буфере (без БСА). В дальнейшем мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в TBS-T/БСА буфере с вторичными антителами IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (Abcam), разведенными в соотношении 1:5000, и опять промывали несколько раз в TBS-T буфере. Для идентификации полипептидов, связавшихся с антителами, использовали хемилюминесцентный метод. Метод основывается на окислении люминола пероксидазой хрена в присутствии кумаровой кислоты. Мембрану помещали в реагент ECL, фиксировали в кассете и помещали на рентгеновскую пленку (Aqua). Пленку проявляли в растворе проявителя, затем промывали в дистиллированной воде и фиксировали в растворе фиксажа.

2.18. Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия)

Белковые образцы переводили с помощью гель-фильтрационной колонки Zeba в буфер, приготовленный на дейтерированной воде. Применяли кюветы из CaF₂ с толщиной слоя 100 мкм, термостатированные при 25 °С. Измерения были выполнены на ИК-спектрофотометре IR-Affinity1 (Shimadzu, Japan) с разрешением 4 см⁻¹, количество сканов 256. Для удаления паров воды прибор продували сухим азотом. Из спектра раствора белка в буфере вычитали спектр буфера и остаточных паров воды. Спектры сглаживали по 9 точкам и

подвергали Фурье-самодеконволюции (FSD) для увеличения разрешения. Параметры FSD: ширина 13 см^{-1} , коэффициент разрешения 2. Спектры FSD амид1 раскладывали на гауссовы компоненты, соответствующие поглощению элементов вторичной структуры. Использовали программу Fityk 0.9.8. Отнесение компонент проводили на основе работ (Byler, Susi, 1986; Susi, Byler, 1986; Dong et al., 1992 a,b). Полученный набор компонент использовали затем в качестве стартового для разложения исходных спектров поглощения (спектры Abs).

2.19. ЯМР-спектроскопия

Все спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Avance III (Bruker, Germany) с рабочей частотой 600 МГц на ядрах ^1H используя 5-мм инверсный трех-ядерный датчик $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, оснащенный градиентной катушкой. При записи одномерных ЯМР спектров ^1H подавление сигналов протонов воды осуществлялось по методике предварительного насыщения. Для восстановления намагниченности перед импульсной последовательностью в случае записи одномерных спектров ЯМР ^1H и двумерных ^1H - ^1H -NOESY (Hwang, Shaka, 1995) использовали релаксационную задержку $d1$ равную 2 с, а для спектров ^1H - ^{15}N -HSQC (Davis, 1995) задержка $d1$ устанавливалась равной 1 с. Число накоплений для различных экспериментов варьировалось от 8 до 224. Длительность 90-градусного импульса калибровалась перед записью каждого двумерного спектра и изменялась в диапазоне 9,9-12,1 мкс. Для записи спектров NOESY использовалась стандартная последовательность `noesyegpph` (Hwang, Shaka, 1995) с подавлением сигналов протонов воды из библиотеки импульсных последовательностей входящих в комплектацию спектрометра. Особенность данной импульсной последовательности в том, что в ней реализована методика селективного подавления сигналов в спектре с помощью подбора формы импульса (*excitation sculpting*) (Hwang, Shaka, 1995; Weigelt et al.,

1996). Время смешивания для спектров ^1H - ^1H -NOESY устанавливалось равным 120 мс. Для обработки всех спектров и их последующей визуализации применялись программы Topspin 2.1, nmrPipe и Sparky.

2.20. Биоинформатический анализ последовательностей

Поиск и сравнение гомологичных последовательностей проводили с помощью программы BLAST на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Подбор последовательностей нуклеотидных праймеров, трансляцию нуклеотидных последовательностей, выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, определение расчетной массы предсказанного белка выполняли с помощью программы Vector NTI Suite 9. Поиск мотивов выполняли с помощью сервера MEME Suite (<http://meme.nbcr.net/meme/>). Предсказание вторичной и третичной структуры проводили с помощью серверов I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) и Jpred 3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). Компьютерное моделирование пространственной структуры выполняли с помощью программы PyMol.

2.21. Статистическая обработка

Все опыты проводили не менее чем в 4-х биологических и аналитических повторностях. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента при $P \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Стресс-индуцированная аутофагия в корнях проростков пшеницы

3.1.1. Активация аутофагии при окислительном стрессе

Растения произрастают в постоянно меняющихся условиях внешней среды и подвергаются действию различных стрессоров. Усиленное образование АФК является универсальной стрессовой реакцией живых организмов. Неэффективность антиоксидантных систем может привести к развитию окислительного стресса. С целью направленного индуцирования окислительного стресса в настоящей работе мы использовали «классический» прооксидант Пк, который приводил к накоплению АФК в клетках при действии на интактные корни проростков пшеницы в течение 12 ч (табл. 3, рис. 8). АФК при действии Пк, в основном, аккумулируются в пристеночном слое цитоплазмы и клеточной стенке (рис. 8 б). Токсическое действие Пк обусловлено индукцией в клетках свободнорадикальных процессов. Он легко проникает в клетки и в результате ферментативного восстановления превращается в свободный монокатион-радикал, способный взаимодействовать с кислородом с образованием $O_2^{\cdot-}$. Особенно ярко токсические эффекты Пк проявляются в фотосинтезирующих тканях при его восстановлении на свету в фотосистеме I. В нефотосинтезирующих тканях восстановление гербицида может происходить в любой электрон-транспортной цепи, в том числе митохондриальной (Schansker et al., 2005).

АФК проявляют высокую активность и легко повреждают различные клеточные компоненты. Неэффективность антиоксидантных и других защитных систем может приводить к накоплению окисленных макромолекул, повреждению органелл и потере их функции. Растения имеют сложные системы деградации и утилизации нежелательных и поврежденных внутриклеточных компонентов, появляющихся в ходе развития и в стрессовых условиях. Белки являются наиболее уязвимыми мишенями и легко окисляются в ходе токсического действия АФК (см. главу 1.5.2.1.).

Деградация окисленных белков может происходить несколькими способами, в том числе с помощью протеолитических систем (Shang, Taylor, 2011). В наших экспериментах при обработке корней Пк наблюдали небольшое повышение общей протеазной активности (табл. 3). Стимуляция протеазной активности часто наблюдается при различных стрессах. Протеолиз способствует поддержанию клеточного гомеостаза путем деградации окисленных, неправильно свернутых и агрегированных белков (Viestra, 1996). Кроме того, активация специфичных протеаз, как известно, может быть вовлечена в ПКС. Так, у животных представители цистиновых протеиназ – каспазы участвуют в запуске апоптоза (Degterev et al., 2003). У растений цистеиновые и сериновые протеиназы, такие как метакаспазы, VPE и др., активируются при АФК-опосредованной ПКС (см. главу 1.6.). Показано, что при окислительном стрессе, индуцированном ультрафиолетом, H_2O_2 и Пк, стимулируется экспрессия гена AtMC8. Сверхэкспрессия этого гена вызывала повышение уровня ПКС в ответ на действие ультрафиолета и H_2O_2 в протопластах арабидопсиса (He et al., 2008). В наших экспериментах токсическое действие Пк приводило к гибели 21 % клеток кончиков корней пшеницы (табл. 3). Однако носит ли эта гибель программируемый или непрограммируемый характер, остается неизвестным.

Таблица 3. Содержание H_2O_2 , общая протеазная активность и жизнеспособность клеток при действии Пк (100 мкМ)

Варианты	Содержание H_2O_2 , мкМ/мг сыр. в.	Общая протеазная активность, (Abs/мкг/мин)* 10^{-6}	Количество живых клеток, % от контроля
Контроль	$4,7 \pm 1,2$	$3,9 \pm 0,7$	100 ± 0
Пк	$7,7 \pm 3,1$	$4,4 \pm 0,1$	79 ± 7

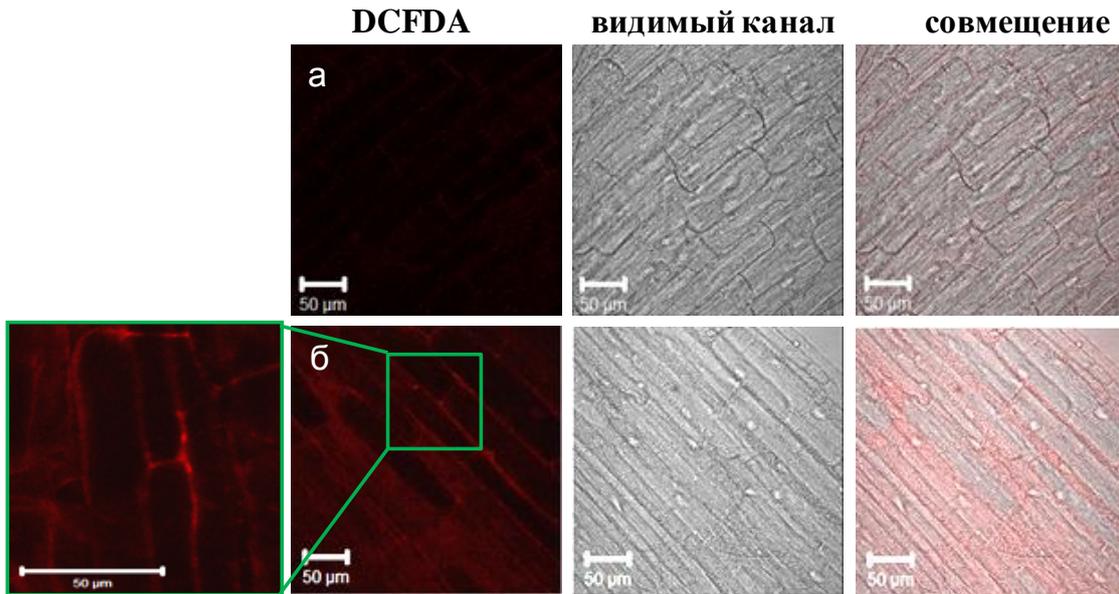


Рис. 8. Визуализация АФК с помощью окрашивания клеток корней пшеницы DCFDA: а – контроль, б – Пк (100 мкМ). Масштабный отрезок – 50 мкм.

Другим эффективным способом деградации и утилизации окисленных макромолекул и поврежденных клеточных структур является процесс аутофагии. Так, в работе Xiong и др. (2007) показано, что в клетках *A. thaliana* в ходе Пк-индуцированного окислительного стресса окисленные белки транспортируются в вакуоль с помощью аутофагосом. Нами обнаружено, что при действии Пк в клетках корней пшеницы происходит образование многочисленных аутофагосом (рис. 9 б). Аутофагосомы визуализировали как интенсивно окрашенные яркие точечные образования, локализованные по всему объему клетки. Аутофагосомы содержали фрагменты цитоплазмы и органеллы, в том числе митохондрии (Дмитриева и др., 2012). С целью выяснения, является ли образование аутофагосом следствием окислительного стресса, корни были предварительно обработаны тироном – ловушкой для $O_2^{\cdot-}$. Предобработка растений пшеницы тироном способствовала значительному уменьшению количества аутофагосом при действии Пк (рис. 9 в-г). Специфичность окрашивания аутофагосом мы подтвердили с помощью ингибитора аутофагии 3-МА. При совместном

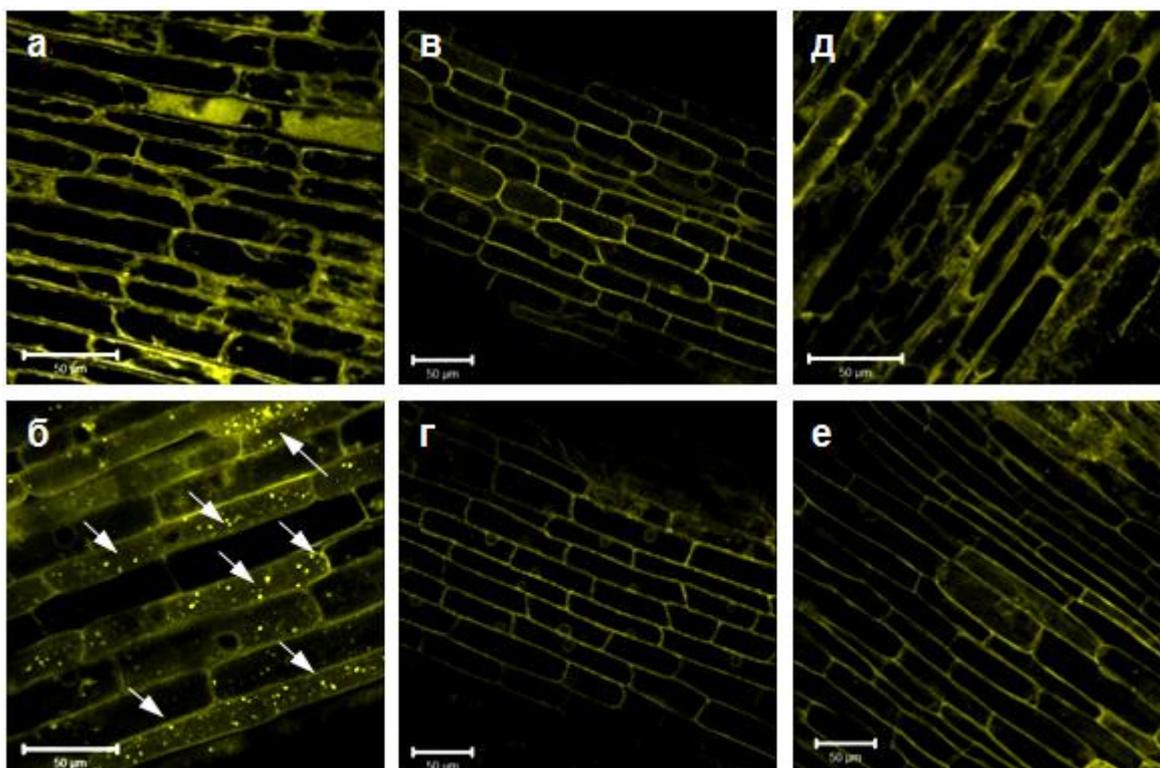


Рис. 9. Визуализация аутофагосом (показаны стрелками) с помощью красителя LT в клетках корней пшеницы: а – контроль, б – Пк (100 мкМ), в – тирон (10 мМ); г – тирон + ПК, д – 3-МА (10 мМ), е – 3-МА + Пк. Масштабный отрезок – 50 мкм.

действии Пк и 3-МА образования аутофагосом не наблюдалось (рис. 9 д-е). Как известно, 3-МА ингибирует PI3-киназную активность, подавляя, тем самым, развитие аутофагии (Blommaert et al., 1997).

Контроль процессов аутофагии осуществляется посредством многочисленных аутофагических белков и генов (см. главу 1.2.). С помощью ОТ-ПЦР анализа нами было обнаружено образование транскриптов генов *TaATG4* и *TaATG8g* у нестрессированных растений (рис. 10 А). Конститутивный уровень экспрессии *ATG* генов, по-видимому, необходим для поддержания клеточного гомеостаза растений в процессе их роста и развития. Эти гены, как было показано у растений риса, экспрессируются повсеместно в молодых и зрелых корнях и листьях, а также колосках (Su et al., 2006).

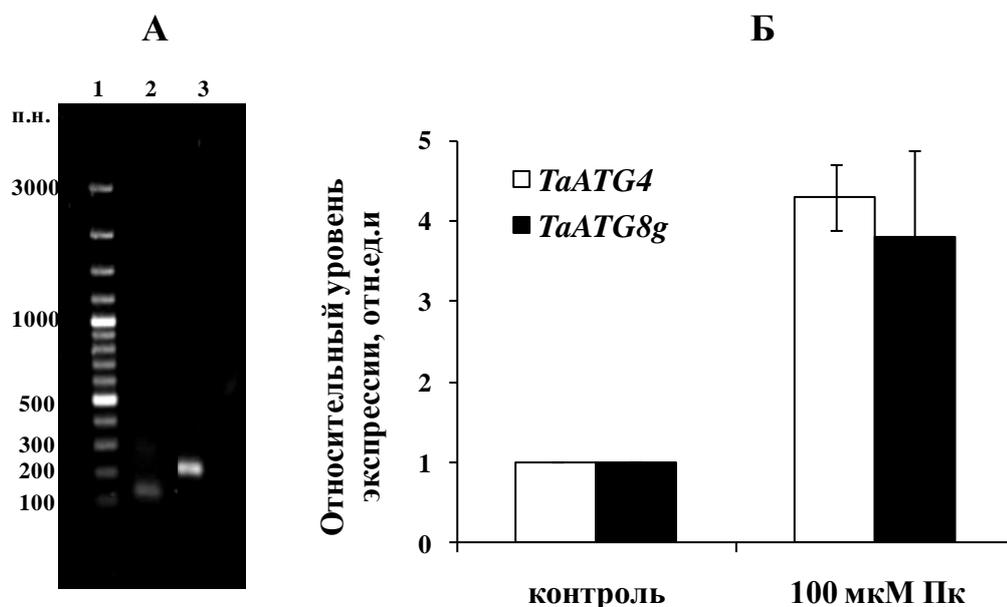


Рис. 10. А – Экспрессия *ATG* генов в нестрессовых условиях: **1** – маркер молекулярной массы, **2** – продукт амплификации фрагмента кДНК пшеницы, полученный в результате ПЦР с помощью праймеров *ATG4F* и *ATG4R* (*TaATG4*), **3** – продукт амплификации фрагмента кДНК пшеницы, полученный в результате ПЦР с помощью праймеров *ATG8F* и *ATG8R* (*TaATG8g*). Б – Относительный уровень экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* при действии Пк (100 мкМ).

Аутофагические белки *ATG4* и *ATG8* играют определяющую роль в процессе образования аутофагосомальных мембран (см. главу 1.2.) и являются важнейшими компонентами убиквитин-подобного комплекса (Mizushima, 2006). Поскольку в стрессовых условиях происходит интенсивное образование аутофагосом, логично предположить, что потребность в синтезе этих белков и уровень экспрессии кодирующих их генов возрастает. С целью проверки данного предположения нами был проведен анализ экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* в ходе обработки проростков пшеницы Пк. Оценка относительного уровня транскриптов этих генов с помощью ОТ-ПЦР анализа в реальном времени выявила, что в клетках корней при действии Пк происходит повышение экспрессии исследуемых генов в несколько раз (рис. 10 Б). Усиление экспрессии *ATG*

генов в условиях окислительного стресса, вероятно, обусловлено недостаточностью исходного пула мРНК *ATG4* и *ATG8g* и необходимостью их синтеза *de novo*. Ранее было продемонстрировано увеличение *ATG* транскриптов в растениях при различных стрессовых условиях, в частности, при голодании (Yoshimoto et al., 2004) и индуцированном старении (Xiao, Chye, 2010). Недостаток питательных элементов стимулирует образование АФК и приводит к окислительному стрессу, что, в свою очередь, индуцирует аутофагию (Scherz-Shouval et al., 2007).

Таким образом, окислительный стресс в корнях пшеницы при действии Пк сопровождается стимуляцией протеазной активности, повышенным образованием аутофагосом и увеличением уровня экспрессии *ATG* генов. Наши данные подтверждают, что в растениях АФК могут индуцировать аутофагию. Для выявления возможной физиологической роли аутофагии в растениях при действии других неблагоприятных факторов нами был проведен анализ характеристик аутофагических процессов в корнях проростков пшеницы в условиях раневого стресса.

3.1.2. Индукция аутофагии при раневом стрессе

Раневой стресс, индуцированный различными биотическими и абиотическими факторами, в частности, грызущими насекомыми и млекопитающими, а также в результате сельскохозяйственной практики человека, является одним из распространенных стрессов в растениях. Он может привести к потере тканей или органов, а также способствовать проникновению патогенов через рану. Растения отвечают на поранение активацией защитных систем, которая направлена на репарацию поврежденных тканей и/или отпугивание патогенов. Установлено, что одним из универсальных ответов растений на поранение является образование АФК (Orozco-Cárdenas et al., 2001; Ross et al., 2006). Многие редокс-ферменты и гены, их кодирующие, активируются при раневом стрессе. В арабидопсисе

это гены, кодирующие белок-гомолог D NADPH-оксидазы, L-аскорбат оксидазу, глутатион редуктазу, глутатион-S-трансферазу (Cheong et al., 2002). Ранее в нашей лаборатории было показано, что раневой стресс, индуцированный отсечением корней от проростков пшеницы, сопровождается окислительным взрывом и накоплением АФК в апопласте на ранней стадии раневого стресса (Минибаева и др., 1997; Minibayeva et al., 1998). Были идентифицированы апопластные пероксидазы, ответственные за детоксикацию и образование АФК в корнях пшеницы при раневом стрессе (Minibayeva et al., 2001; Minibayeva et al., 2009). Данные об индукции, развитии и физиологической роли аутофагии в растительных клетках при раневом стрессе до настоящего времени отсутствуют в литературе. Интересно, что у млекопитающих индукция аутофагия в различных тканях в условиях механического повреждения неоднократно описана. Так, показано, что острый травматический шок головного и спинного мозга часто сопровождается усиленной аутофагией, а добавление антиоксидантов уменьшает степень ее развития (Smith et al., 2011). При ожоговом стрессе индукция аутофагии в клетках кожи способствует заживлению раны (Xiao et al., 2013). Является ли интенсификация аутофагии частью общего стрессового ответа или же это побочное проявление механического повреждения ткани, остается дискуссионным вопросом.

Проведенный нами анализ динамики раневого стресса в отсеченных корнях пшеницы выявил возможную корреляцию между накоплением АФК и формированием аутофагосом. На начальном этапе раневого стресса (первые 2 ч после отсечения корней и их инкубации в 0,25 мМ CaCl₂) было визуализировано образование АФК в апопласте (окрашивание DCFDA) и наличие небольшого количества аутофагосом в цитозоле клеток корней (окрашивание LT) (рис. 11). В течение 6-12 ч инкубации отсеченных корней накопления АФК не наблюдалось (рис. 11), что согласуется с полученными ранее данными о фазовом характере образования АФК при раневом стрессе

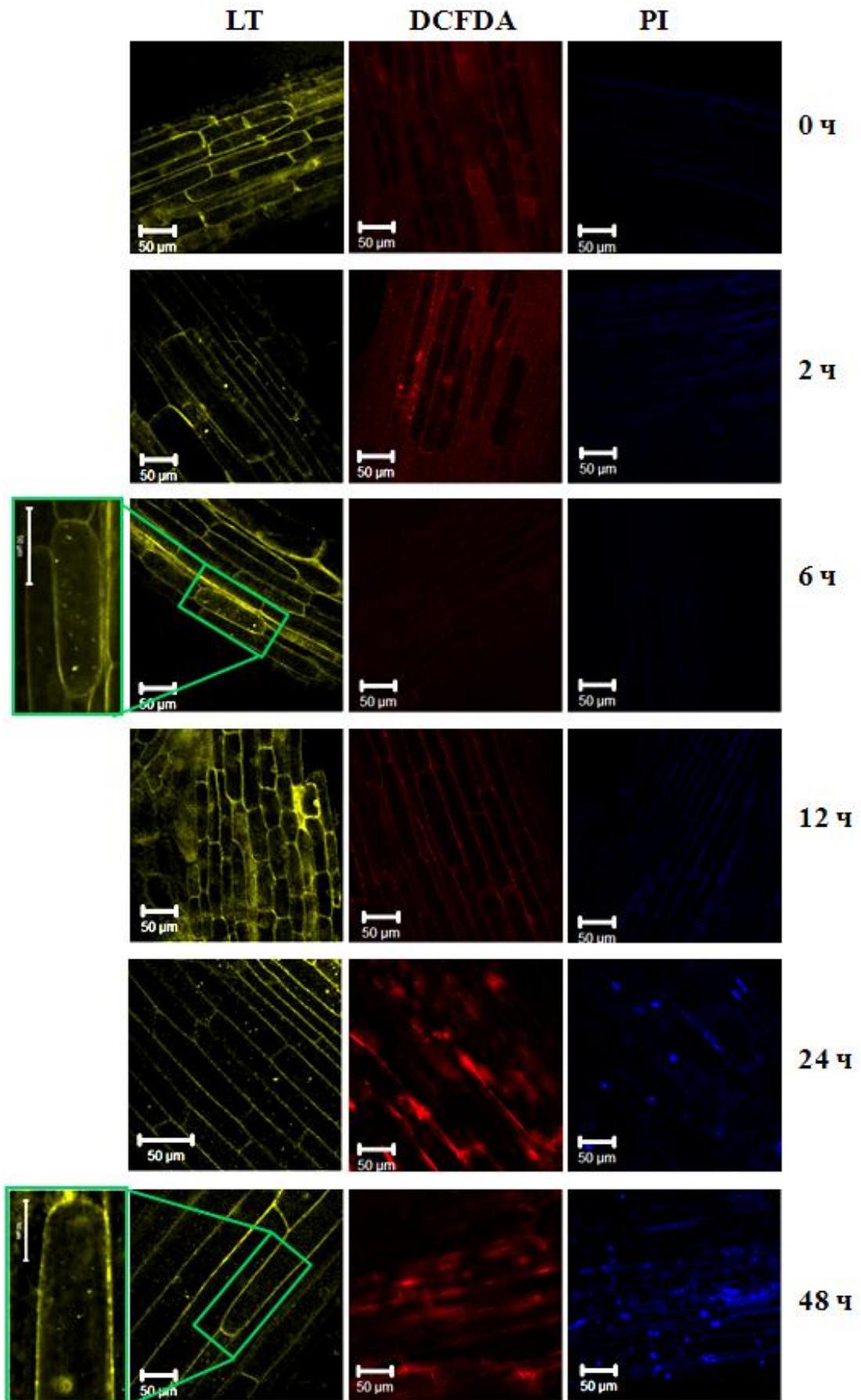


Рис. 11. Визуализация аутофагосом, АФК и мертвых клеток с помощью флуоресцентных красителей LT, DCFDA и PI в корнях пшеницы в ходе раневого стресса в течение 48 ч. Масштабный отрезок – 50 мкм.

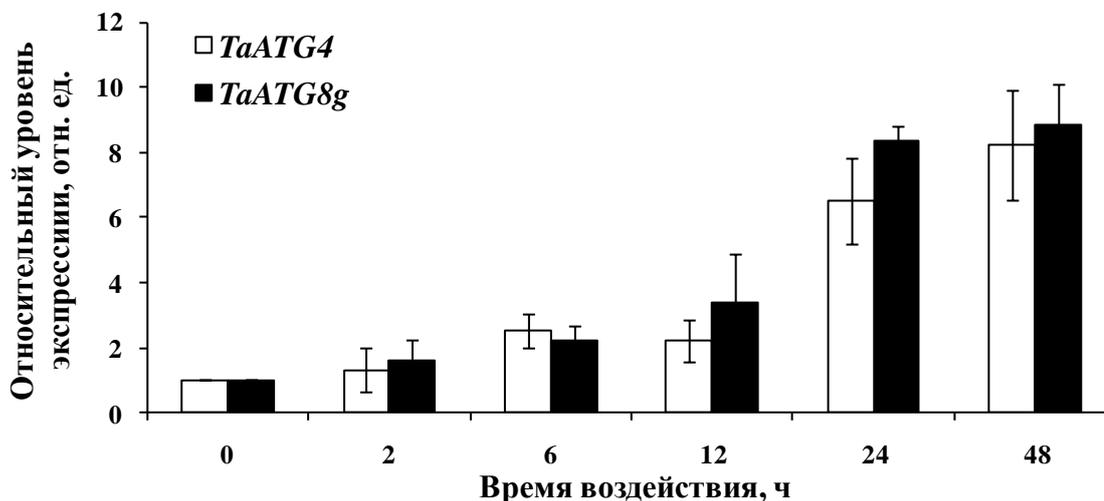


Рис. 12. Динамика экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* при раневом стрессе.

(Minibayeva et al., 1998). Однако в эти временные точки аутофагосомы детектировали повсеместно в цитозоле. Длительная инкубация отсеченных корней в течение 24 и 48 ч сопровождалась массивным образованием АФК внутри клетки, накоплением аутофагосом и гибелью большого количества клеток, о чем свидетельствует появление PI-позитивных клеток (рис. 11). При исследовании динамики экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8* с помощью ПЦР в реальном времени мы наблюдали значительное (в 6-9 раз) повышение уровня их экспрессии в 24-48 ч инкубации отсеченных корней (рис. 12).

Таким образом, наши данные впервые продемонстрировали индукцию аутофагии в растениях при раневом стрессе. Анализ раневого ответа корней во временной динамике позволил нам выявить двойственную роль аутофагии при стрессе. На начальном этапе раневого стресса образование аутофагосом, вероятно, является составной частью неспецифического стрессового ответа.

На данной этапе аутофагия выполняет роль защитного механизма для обезвреживания и деградации окисленных макромолекул и поврежденных органелл. В условиях длительного раневого стресса накопление АФК (рис. 11) и окисленных структур, недостаток питательных элементов в изолированном органе (Пахомова, Гордон, 1991) сопровождаются усиленной аутофагической деградацией. Вероятно, что аутофагия при избыточном накоплении повреждений приводит к масштабной деградации внутриклеточного содержимого, что приводит к гибели клеток. Таким образом, аутофагия находится на перекрестке между выживанием и гибелью клеток, и в зависимости от степени повреждения клеток и физиологического состояния организма она является либо защитным механизмом, либо способом гибели клеток.

3.1.3. Активация аутофагии при действии ингибиторов ЭТЦ митохондрий

Клеточные сайты образования АФК являются также первичными «источниками» и мишенями АФК-индуцируемых повреждений. Как известно, в нефотосинтезирующей растительной клетке основным сайтом генерации АФК является ЭТЦ митохондрий (Rasmusson et al., 2004). В этой связи, важным представляется изучение взаимосвязи между митохондриальным редокс-метаболизмом и индукцией аутофагии. При нормальном функционировании митохондрий уровень АФК невысок, поскольку они эффективно утилизируются с помощью антиоксидантных систем. Однако нарушения в работе ЭТЦ митохондрий могут приводить к утечке электронов на кислород и усилению генерации $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и других типов АФК, что, в свою очередь, может повреждать митохондрий и другие клеточные компоненты (Navrot et al., 2007). Комплексы I и III являются основными источниками образования АФК в митохондриях. Кроме того, комплекс II в определенных условиях при обратном транспорте электронов

также может способствовать усиленной продукции $O_2^{\bullet -}$ (Turrens, 2003; Андреев и др., 2005).

Одной из особенностей митохондрий высших растений является наличие альтернативного пути переноса электронов. Этот путь устойчив к действию цианида, поэтому назван цианидустойчивым. Альтернативный путь переноса электронов ответвляется от основной (цитохромной) дыхательной цепи на уровне убихинона, минуя, таким образом, два из трех пунктов запаса энергии, которая высвобождается в виде тепла (Vanlerberghe, McIntosh, 1997). Функционирование в митохондриях альтернативной оксидазы (АО) придает растительному метаболизму бóльшую устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды (Blokchina, Fagerstedt, 2010). Усиление экспрессии белков АО показано при тепловом стрессе, осмотическом шоке, поранении, голодании, патогенной атаке (Wang, Vanlerberghe, 2013).

Использование ингибиторов митохондриальной цепи позволяет оценить вклад определенного компонента ЭТЦ в активность митохондрий и образование АФК. Ранее в нашей лаборатории было показано изменения активности митохондрий в корнях пшеницы при блокировании определенных комплексов митохондриальной ЭТЦ (Рахматуллина и др., 2005). В настоящей работе мы использовали следующие ингибиторы митохондриальных комплексов: ротенон (комплекс I), малонат (комплекс II), антимицин А (комплекс III), KCN (комплекс IV), а также ингибитор АО – салицилгидроксамовую кислоту (SHAM) (рис. 13).

Применение ингибиторов ЭТЦ митохондрий (в течение 3 ч) приводило к различным изменениям содержания H_2O_2 и уровня ПОЛ (табл. 4). Так, применение ингибитора комплекса I ротенона не приводило к изменению редокс-статуса клеток. Отсутствие эффекта ротенона может быть связано с работой альтернативных переносчиков при блокировании основной

межмембранное пространство

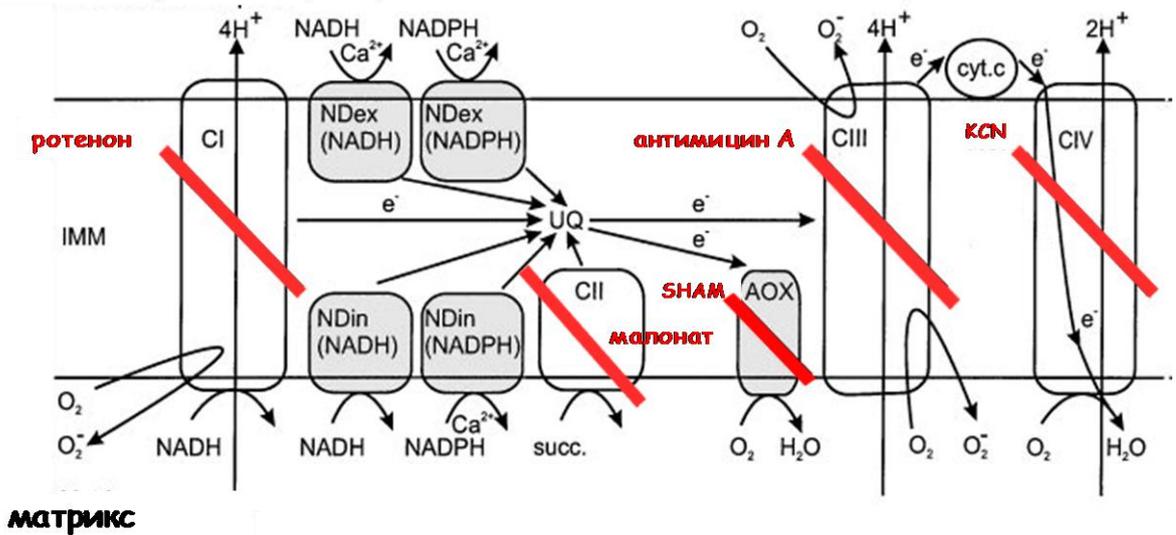


Рис. 13. Схема ЭТЦ митохондрий растений (по Møller, 2001).

NAD(P)H дегидрогеназы. Известно, что, в отличие от митохондрий животных, в митохондриях растений, наряду с ротенон-чувствительным комплексом I, присутствует ряд ротенон-нечувствительных NADH и NAD(P)H дегидрогеназ, локализованных с наружной и внутренней стороны внутренней мембраны митохондрий и передающих электроны на убихинон (Møller, 2001). При действии малоната, антимицина А и цианида калия содержание H_2O_2 и уровень ПОЛ были высокими (табл. 4). Наиболее яркий эффект проявлялся при блокировании комплекса III ЭТЦ с помощью антимицина А. Известно, что при действии антимицина прекращается транспорт электронов на цитохром *b*, в результате чего происходит резкое повышение $O_2^{\cdot-}$, содержание которого при нормальных условиях не высоко (Han et al., 2001). Образование $O_2^{\cdot-}$ в комплексе III происходит вследствие автоокисления убисемихинон анион радикала ($UQ^{\cdot-}$). При этом, $O_2^{\cdot-}$ высвобождается как в матрикс, так и в межмембранное пространство митохондрий (рис. 13). В дальнейшем $O_2^{\cdot-}$ может транспортироваться по специальным анионным каналам IMAC из матрикса в межмембранное пространство, а оттуда – в цитозоль через поры наружной мембраны VDAC (Ježek, Hlavatá, 2005). В клетках мелкокопитающих показано, что

Таблица 4. Содержание H_2O_2 , уровень ПОЛ и жизнеспособность клеток при действии ингибиторов ЭТЦ митохондрий

Варианты	Содержание H_2O_2 , мкМ/мг сыр. в.	ПОЛ, %	Количество живых клеток, % от контроля
Контроль	$3,7 \pm 0,9$	99 ± 9	$97 \pm 0,3$
Ротенон, 50 мкМ	$4,5 \pm 0,6$	111 ± 10	$96 \pm 0,6$
Малонат, 10 мкМ	$10,9 \pm 0,1$	117 ± 7	$89 \pm 2,3$
Антимицин А, 1 мкМ	$16,4 \pm 0,8$	157 ± 7	$68 \pm 9,3$
KCN, 100 мкМ	$8,9 \pm 0,6$	124 ± 13	$84 \pm 3,2$
SHAM, 100 мкМ	$5,1 \pm 0,9$	148 ± 10	$96 \pm 0,6$
SHAM + Ротенон	$5,9 \pm 0,6$	137 ± 9	$92 \pm 1,8$
SHAM + Малонат	$12,6 \pm 0,1$	154 ± 8	$74 \pm 6,0$
SHAM + Антимицин А	$17,7 \pm 0,8$	167 ± 10	$59 \pm 13,1$
SHAM + KCN	$11,2 \pm 0,6$	124 ± 11	$77 \pm 5,5$

высвобождающийся $O_2^{\bullet-}$ может индуцировать апоптоз путем вовлечения VDAC в образование MPTP (Ježek, Hlavatá, 2005).

При одновременном блокировании основного и альтернативного пути переноса электронов с помощью совместного действия одного из исследованных ингибиторов основной ЭТЦ и АО с помощью SHAM происходило еще бóльшее повышение уровня АФК и увеличение интенсивности ПОЛ (табл. 4). Повышение уровня H_2O_2 при одновременном блокировании АО и переносчика цитохромного пути свидетельствует об

антиоксидантной роли АО в стрессовых условиях. Ранее было показано, что АО участвует в снижении образования АФК (Møller, 2001). Как известно, при торможении электронного транспорта происходит «перевосстановление» цепи митохондрий, сопровождающееся интенсивным образованием АФК. Активация АО приводит к снижению степени восстановленности пула убихинонов за счет быстрого сброса электронов на кислород с образованием воды. Прямым доказательством этой функции альтернативного пути явились данные по накоплению АФК в тканях трансгенных растений табака с пониженным содержанием АО, в присутствии ингибиторов ЭТЦ (Maxwell et al., 1999). Также показано, что АО участвует в стабилизации пула убихинонов *in vivo* (Millenaar, Lambers, 2003). Кроме того, было показано, что H_2O_2 является вторичным посредником в сигнальном каскаде, приводящем к экспрессии гена АО – *Aox1* (Vanlerberghe et al., 1997).

Окислительный стресс при действии на проростки митохондриальных ядов сопровождался падением жизнеспособности клеток корней (табл. 4). Наименьшее количество живых клеток детектировали при действии на корни антимицина А и особенно его совместном действии с SHAM (табл. 4). Снижение жизнеспособности при одновременном ингибировании переносчиков альтернативного и цитохромного пути позволяет предполагать, что АО может выполнять цитопротекторную функцию. По мнению Robson и Vanlerberghe (2002), АО может предотвращать клеточную гибель. В этой связи, АО называют митохондриальным белком «выживания», который способен предотвратить активацию ПКС (Vanlerberghe et al., 2002). Так, было показано, что предварительное «закаливание» клеток сои аноксией, во время которого происходила активация АО, приводила к уменьшению гибели клеток, вызванной H_2O_2 , в то время как ингибиторы АО усугубляли токсические эффекты H_2O_2 (Amor et al., 2000).

Таким образом, наши результаты и данные литературы свидетельствуют о том, что нарушение работы ЭТЦ с помощью митохондриальных ядов приводит к накоплению АФК и способствует

проявлению их токсических эффектов, приводящих, в результате, к гибели клеток. Особую роль в поддержании функционирования митохондрий растительной клетки в условиях стресса играют альтернативные пути передачи электронов. Полученные нами данные о значительном усилении токсических эффектов при одновременном блокировании основного и альтернативного пути передачи электронов подтверждают значимость АО в расширении адаптивных возможностей растительного организма при стрессе.

В клетках животных считается доказанным, что митохондрии как основные АФК-образующие органеллы могут выступать в качестве триггера аутофагии (Scherz-Shouval, Elazar, 2010). До настоящего времени роль митохондрий в индукции аутофагии в клетках растений оставалась неизученной. Эта проблема представляет особую сложность, если принять во внимание особенности строения растительных митохондрий, в том числе наличие множества альтернативных путей. В настоящей работе возможность вовлечения митохондрий в индукцию аутофагии в растениях была проанализирована при нарушении работы ЭТЦ митохондрий.

В наших экспериментах применение ингибиторов (3 ч) комплексов I, II и IV основной ЭТЦ не индуцировало образования аутофагосом (рис. 14 *в, д, и*). Интересно, что при совместном ингибировании АО и комплексов I, II или IV мы визуализировали многочисленные аутофагосомы (рис. 14 *г, е, к*). Наиболее интенсивное образование аутофагосом наблюдали при блокировании комплекса III с помощью антимицина А как в отсутствие, так и в присутствии SHAM (рис. 14 *ж, з*). Можно полагать, что образование аутофагосом при действии антимицина А, а также совместном действии SHAM и ингибиторов основной ЭТЦ коррелирует с наблюдаемым повышенным уровнем АФК и ПОЛ в клетках корней (табл. 4, рис. 14). На раковых клетках U87 Chen и Gibson (2008) также показали, что ротенон и TTFA (ингибитор комплекса II) активируют регулируемую митохондриями аутофагию.

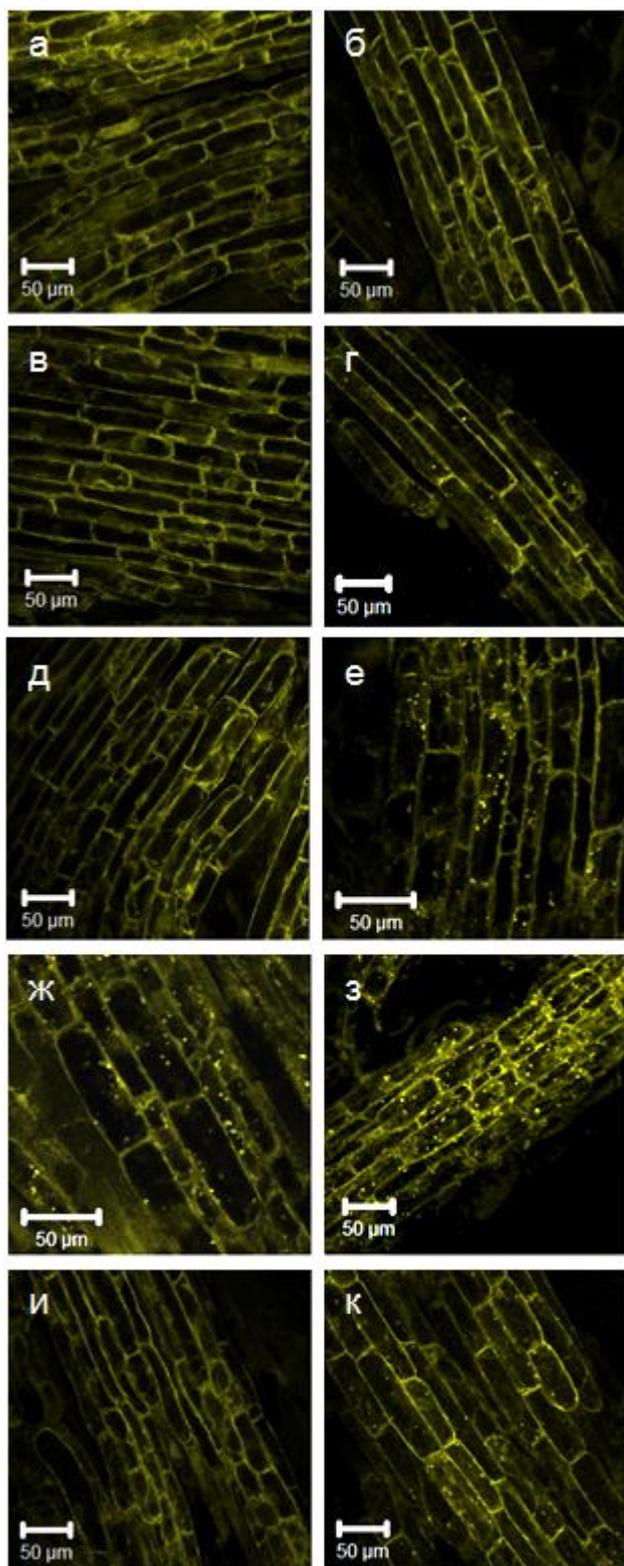


Рис. 14. Визуализация аутофагосом с помощью LT в клетках корней пшеницы при действии: а – контроль, б – SHAM (100 мкМ), в – ротенон (50 мкМ), г – ротенон + SHAM, д – малонат (10 мкМ), е – малонат + SHAM, ж – антимицин А (1 мкМ), з – антимицин А + SHAM, и – KCN (100 мкМ), к – KCN + SHAM. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Еще одним свидетельством индукции аутофагии при действии на корни митохондриальных ядов являются результаты анализа профиля экспрессии *ATG* генов. Небольшую стимуляцию экспрессии *TaATG4* и *TaATG8g* мы наблюдали при совместном действии ингибиторов комплексов I, II и IV основной ЭТЦ и АО (примерно в 2 раза) (рис. 15). Наибольший уровень экспрессии был выявлен при совместном применении антимицин А и SHAM (рис. 11). Данные результаты являются ожидаемыми, поскольку комплекс III, будучи основным митохондриальным источником АФК, индуцирует наибольший окислительный стресс и, тем самым, способствует интенсивному развитию аутофагии (табл. 4, рис. 14).

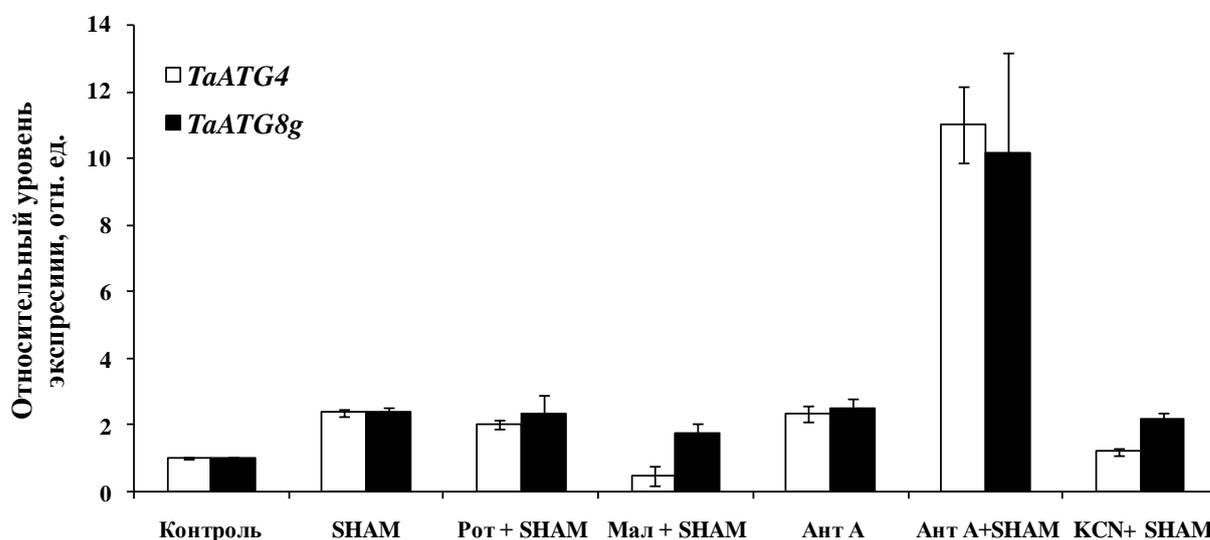


Рис. 15. Относительный уровень экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* при действии ингибиторов основных и альтернативного переносчиков митохондриальных ЭТЦ митохондрий.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что митохондрии растительных клеток вовлечены в процесс аутофагии. Нарушение работы митохондриальной ЭТЦ сопровождается повышением уровня АФК и ПОЛ, что, в свою очередь, индуцирует аутофагию. Переносчики ЭТЦ митохондрий вносят различный вклад в продукцию АФК. Обнаружено, что степень окислительного стресса, как правило, коррелирует с интенсивностью

образования аутофагосом и активностью *ATG* генов. Комплекс III является основным митохондриальным источником АФК и, по-видимому, играет решающую роль в активации аутофагии. Участие альтернативного пути транспорта электронов в контроле уровня АФК в митохондриях предполагает вовлечение АО в регуляцию аутофагии у растений.

3.1.4. Стадии образования аутофагосом в условиях окислительного стресса

Образование аутофагосом в клетках корней пшеницы, подобно тому, как это происходит в клетках других эукариотических организмов, представляет собой многоэтапный и многокомпонентный процесс. Он включает в себя: а) индукцию аутофагии; б) везикулярную нуклеацию, экспансию фагофора и созревание аутофагосомы; в) докинг и слияние с вакуолью; г) деградацию аутофагического тела (Xie, Klionsky, 2007; Farré et al., 2009; Suzuki, Ohsumi, 2010; Tanida, 2011).

Нами были выявлены последовательные стадии образования аутофагосом (рис. 16). Начальный этап формирования аутофагосомы начинается с обособления подлежащего удалению участка внутриклеточного содержимого мембраной, по форме напоминающей чашевидную (*cup-shaped*) структуру (рис. 16 б), которую называют фагофором (Seglen, 1987) или изолирующей мембраной (Locke, Sykes, 1975; Yamamoto et al., 1990). Несмотря на большой прогресс в изучении механизмов аутофагии, вопрос о происхождении фагофора до сих пор остается открытым. Различные исследования предполагают, что в инициации образования фагофора могут участвовать как ЭР, так и комплекс Гольджи, митохондрии и плазматическая мембрана (Hamasaki, Yoshimori, 2010). У дрожжей аутофагосомы возникают вблизи вакуоли в определенной области, которую называют PAS (Longatti, Tooze, 2009). Исследования Ylä-Anttila с соавт. (2009) на клетках млекопитающих с использованием 3D томографии показали наличие ЭР с

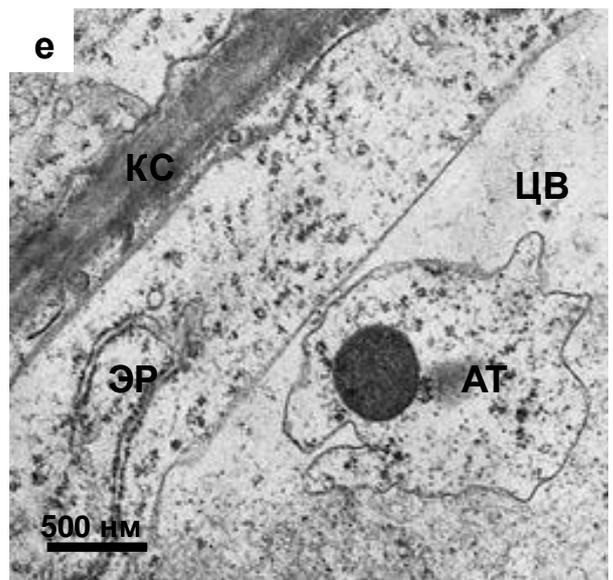
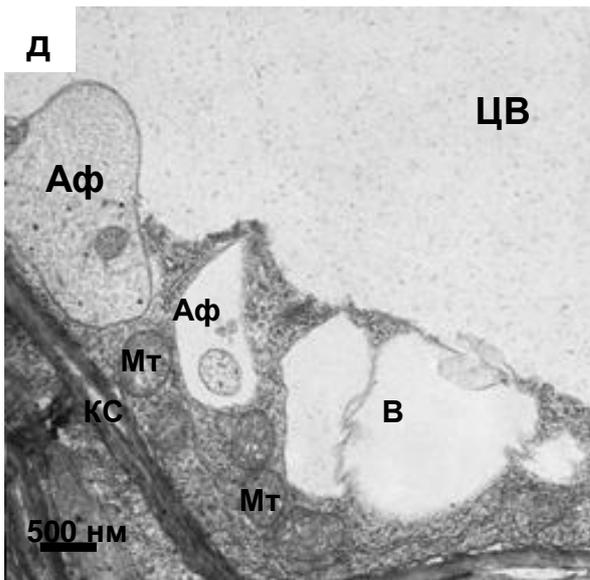
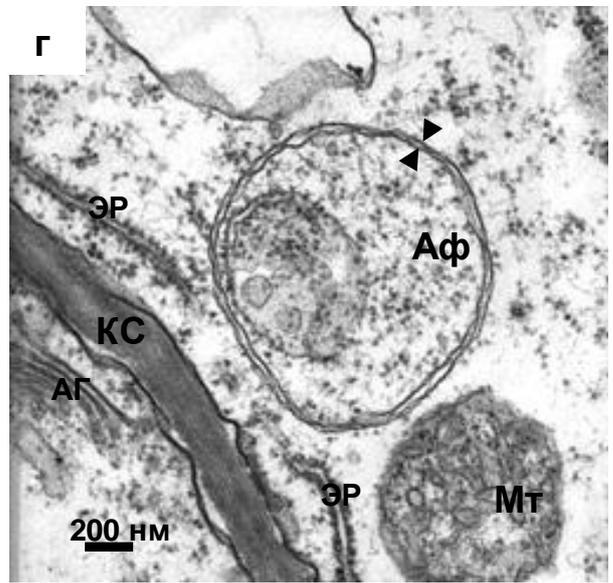
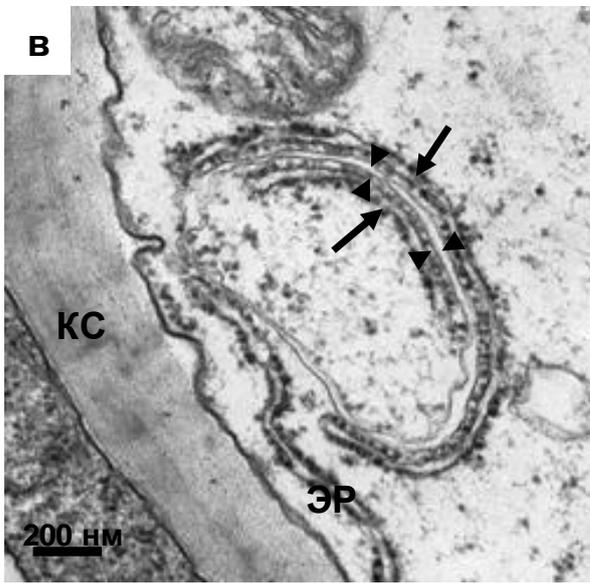
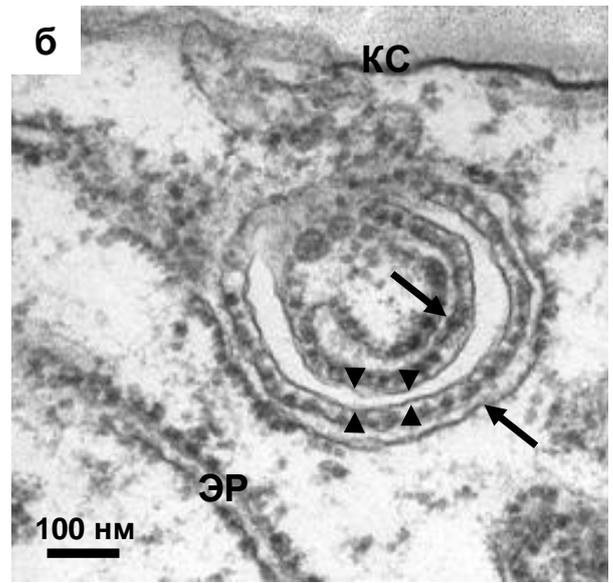
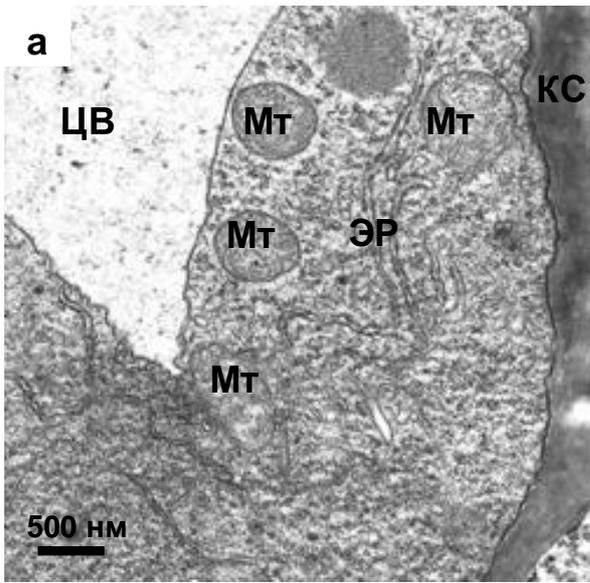


Рис. 16. Стадии образования аутофагосом: а – нуклеация фагофора, б – экспансия фагофора, в – зрелая аутофагосома, г – слияние с вакуолью, д – аутофагическое тело. КС – клеточная стенка, ЦВ – центральная вакуоль, В – вакуоль, Мт – митохондрия, ЭР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи, Аф – аутофагосома, АТ – аутофагическое тело. Стрелками показаны каналы шероховатого ЭР, выстилающие фагофор, треугольником – наружная и внутренняя мембрана фагофора.

внутренней и внешней сторон фагофора и существование контактов между этими мембранными структурами. Была выдвинута гипотеза, согласно которой аутофагосомы, вероятно, формируются как субдомен ЭР, который постепенно преобразуется в многослойную сферическую структуру (Ylä-Anttila et al., 2009). Информация о том, где и как формируется фагофор в растительных клетках, в литературе отсутствует. С помощью электронно-микроскопического анализа клеток корней пшеницы нами обнаружено, что ЭР локализуется вблизи аутофагосомальной мембраны, причем, каналы шероховатого ЭР окружают фагофор как снаружи, так и внутри (рис. 16 б-в). Примечательно, что такое «параллельное» расположение ЭР снаружи и внутри изолирующей мембраны наблюдается на ранних (но не на поздних) стадиях образования аутофагосомы (т.е. на стадии фагофора) (рис. 16 б-в). Эти факты свидетельствуют о том, что в растительных клетках, подобно клеткам животных, ЭР может быть вовлечен в инициацию формирования аутофагосом.

Фагофор затем расширяется и замыкается сам на себе, формируя таким образом «зрелую» аутофагосому (рис. 16 г) (Dunn, 1990). Исследования ультраструктуры клеток корней пшеницы также показали, что аутофагосомы содержат различные органеллы: митохондрии, шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭР), а также фрагменты цитоплазмы с рибосомами (рис. 16 в-е). В дальнейшем аутофагосомы доставляются в вакуоль, при этом ее наружная мембрана сливается с тонопластом.

Содержимое аутофагосомы, окруженное внутренней мембраной, образует так называемое «аутофагическое тело» (рис. 16 е), которое в дальнейшем подвергается деградации внутри вакуоли (Bassham, 2009). Известно, однако, что деградация аутофагосомального содержимого может происходить и в самих аутофагосомах, поскольку они содержат гидролитические ферменты (Takatsuka et al., 2011). В зависимости от степени деградации содержимого Rose с соавт. (2006) выделили три типа аутофагических вакуолей с неразрушенным, полупереваренным и полностью деградированным содержимым. Интересно, что в наших экспериментах при действии на корни прооксидантов наряду с аутофагосомами, содержащими полупереваренные фрагменты, мы также наблюдали появление одномембранных электронно-прозрачных вакуолей (рис. 16 д). Таким образом, в ходе аутофагии деградация клеточного содержимого может осуществляться как путем слияния аутофагосом с центральной литической вакуолью, так и в аутофагосомах, локализованных в цитозоле.

3.2. Характеристика структуры аутофагического белка ATG8g пшеницы

3.2.1. Особенности первичной структуры белка *TaATG8g* и *TaATG4*

Формирование аутофагосом на различных этапах обеспечивается активностью многочисленных ATG белков, среди которых особую роль играет белок ATG8. Этот белок локализуется как на наружной, так и внутренней мембранах аутофагосомы (Kirisako et al., 1999), вследствие чего ATG8 часто используют в качестве молекулярного маркера для мониторинга макроаутофагии (Kabeu et al., 2000). В клетках дрожжей белок необходим для формирования изолирующей мембраны, ее экспансии, созревания, а также мембранного докинга и слияния с вакуолью (Nakatogawa et al., 2007). Кроме того, ATG8 опосредует узнавание и связывание белков-мишеней при селективной аутофагии (Noda et al., 2010). ATG8 принадлежит к суперсемейству убиквитиновых белков (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Уникальные свойства и функциональное многообразие белка ATG8 во многом определяются его пространственной структурой. Однако в литературе представлены лишь единичные экспериментальные данные об активности, структуре и вовлечении белка ATG8 в формирование аутофагосом в растениях. До настоящего времени нет ни одной работы, посвященной полной расшифровке пространственной организации белков ATG8 в растениях.

Для обнаружения мРНК *ATG8* пшеницы на основе нуклеотидных последовательностей ATG8 *T. aestivum*, представленных в базе данных GenBank (No: FJ750848.1 и AF542187.1), нами были сконструированы Eк/LIC праймеры, комплементарные 5'- и 3'-концам кодирующей области гена *TaATG8* и содержащие вспомогательные последовательности, комплементарные одноцепочечным концам вектора (табл. 2). С помощью ПЦР был получен продукт с молекулярным весом 360 п.н. (рис. 17), который с помощью технологии безлигазного клонирования был встроен в вектор pET-51b(+) Eк/LIC. В результате молекулярного клонирования было получено несколько клонов, содержащих целевую вставку, и определена их нуклеотидная последовательность. В конце июня 2013 года в базе данных NCBI появились нуклеотидные и аминокислотные последовательности ATG8 *T. aestivum* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Согласно этим данным, семейство ATG8 у пшеницы представлено восемью членами: a, b, c, d, e, f, g, h (рис. 18 A). Сопоставление полученных последовательностей с базой данных NCBI показало, что все клонированные нами последовательности идентичны последовательности мРНК *TaATG8g* (No: KF294813.1; см. приложение). Таким образом, обнаруженная нами ранее последовательность была идентифицирована как *TaATG8g*.

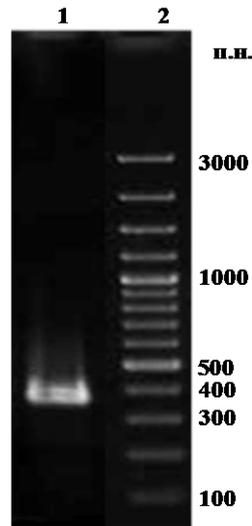
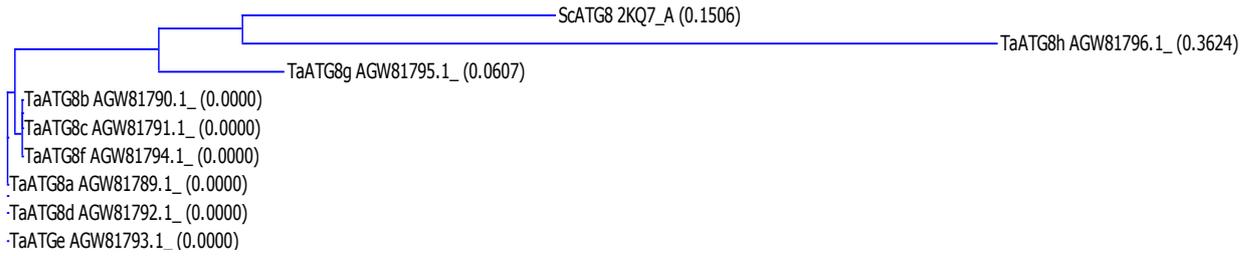


Рис. 17. Электрофореграмма продуктов амплификации кДНК пшеницы, полученных в результате ПЦР с использованием праймеров *ATG8(el)F* и *ATG8 (el)R* (1); маркер молекулярного веса (2).

Биоинформатический анализ транслированной последовательности показал, что *TaATG8g* имеет достаточно высокую степень сходства с другими представителями семейства ATG8 пшеницы (88 % - с *TaATG8a-f*, 57 % - с *TaATG8h*) и обладает рядом особенностей, характерных для белков данного семейства (рис. 18). *TaATG8g* является низкомолекулярным белком с молекулярной массой 13,5 кДа. Белок консервативен среди эукариот и имеет 76 % идентичности с ATG8 *S. cerevisiae* (рис. 18 Б). Первичная структура белка *TaATG8g* представлена на рисунке 19. Основу первичной последовательности составляет убиквитиновый домен GAVARAP (F₆-G₁₁₇). На С-конце белка между аминокислотами G₁₁₇ и S₁₁₈ находится сайт разрезания (cleavage), которое осуществляет белок ATG4 (рис. 19). Глициновый остаток в этом положении высококонсервативен и обнаруживается в структуре всех изоформ семейства ATG8. Белок *TaATG8g* обладает ATG7-связывающим сайтом (A₃₇, F₈₀, S₁₁₁), а также сайтом связывания с тубулином (K₇, Q₁₆, A₂₀-R₂₁, R₂₃-E₂₄), что косвенно указывает на взаимосвязь аутофагосомы с цитоскелетом.

A



Б



Рис. 18. Филогенетическое древо (А) и результат множественного выравнивания аминокислотных последовательностей (Б) белков семейства ATG8 *T. aestivum* и *S. cerevisiae*. Красный цвет – идентичные аминокислоты, зеленый – консервативные, синий – слабосхожие, черный – неидентичные.

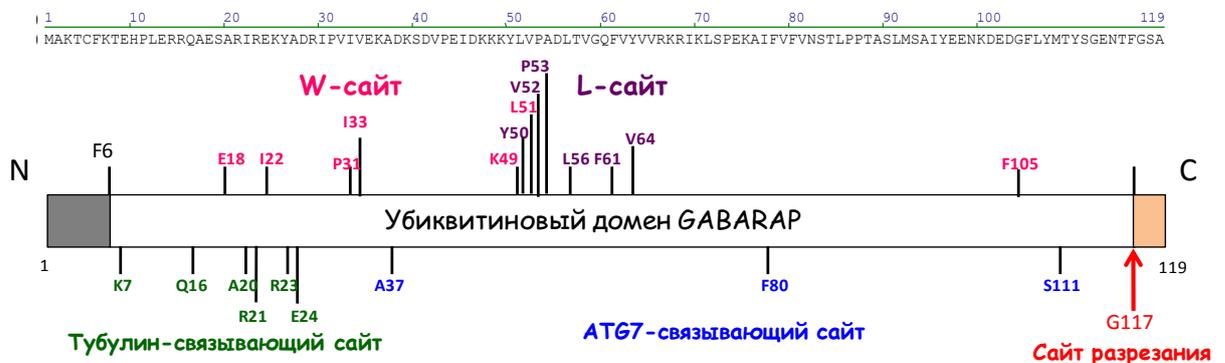


Рис. 19. Схема первичной структуры белка *TaATG8g*.

Как известно, ATG8 способен взаимодействовать с различными белками. К ним относят ATG3 и ATG4, участвующие в созревании белка ATG8, а также целый ряд белков, опосредующих селективную аутофагию. В этом случае ATG8 выступает в качестве рецептора, который узнается белками-адаптерами или субстратами посредством специальных W- и L-сайтов, вследствие чего происходит удаление мишени (см. главу 1.4.; Noda et al., 2010). Белки узнают и связывают аминокислоты W- и L-сайтов белка ATG8 с помощью AIM или LIR мотива (ATG8-family interacting motif или LC3 interacting motif) в своей структуре. W-сайт ответственен за связывание триптофана, а L-сайт – лейцина в AIM-мотиве соответствующих белков (рис. 20). Аминокислоты AIM-мотива обычно консервативны, хотя в некоторых случаях триптофан может быть заменен на тирозин, а лейцин – на изолейцин или на валин (рис. 20). Было показано, что замена триптофана на аланин значительно уменьшала степень взаимодействия ATG8 с белком ATG19 (Noda et al., 2008). Аминокислоты, формирующие W- и L-сайты, также консервативны, хотя L-сайт, как показано, более вариабелен среди гомологов ATG8 (Noda et al., 2010). На основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей в структуре *TaATG8g* нами были обнаружены W- и L-сайты. W-сайт *TaATG8g* состоит из аминокислот E₁₈, I₂₂, P₃₁, I₃₃, K₄₉, L₅₁, L-сайт включает Y₅₀, V₅₂, P₅₃, L₅₆, F₆₁ и V₆₄ (рис. 19).

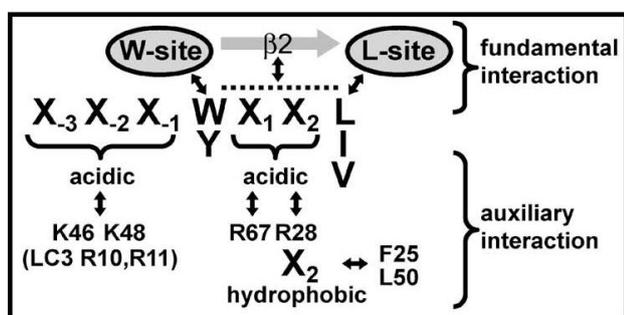


Рис. 20. Схема взаимодействия W- и L-сайтов белка ATG8 с AIM-мотивом (по Noda et al., 2010).

Наличие в структуре белка *TaATG8g* консервативных последовательностей подтверждает его принадлежность к семейству ATG8 убиквитиновых белков и может свидетельствовать о его связи с элементами цитоскелета и другими белками, содержащими AIM-мотивы.

Как отмечалось ранее, в процессе формирования аутофагосом белок ATG8 подвергается множественным посттрансляционным модификациям (см. главу 1.2.). Процессы конъюгации-деконъюгации этого белка с липидом аутофагосомальной мембраны обеспечиваются белком ATG4 (Kirisako et al., 2000). ATG4 принадлежит к семейству цистеиновых эндопептидаз C54 (<http://merops.sanger.ac.uk/>). В связи с этим, ATG4 представляет собой большой интерес, поскольку на данный момент является единственным известным редокс-регулируемым ATG белком (Scherz-Shouval et al., 2007).

С целью изучения особенностей первичной структуры белка ATG4 *T. aestivum* нами была проведена работа по выявлению и определению его кодирующей последовательности. Получить целевую полноразмерную кДНК *TaATG4* удалось только после ряда методических приемов – проведения ПЦР, очистки фрагмента из геля и его последующей амплификации (рис. 21). Полученный фрагмент был встроен в вектор pAL-TA (рис. 22) и секвенирован. В июне 2013 года в NCBI были аннотированы ATG белки *T. aestivum* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Согласно этим данным, геном *T. aestivum* содержит два варианта гена *TaATG4* – *TaATG4a* и *TaATG4b* (идентичность их аминокислотных последовательностей – 96 %). В результате проведения BLAST клонированную последовательность идентифицировали как *TaATG4b*.

Нуклеотидная последовательность *TaATG4b* была транслирована в программе Vector NTI. Белок имеет низкий процент идентичности с последовательностями ATG4 *S. cerevisiae* (27 %) и ATG4 *H. sapiens* (36 %) (см. приложение). С помощью множественного выравнивания аминокислотных последовательностей были выявлены аминокислоты активного центра фермента – Y₁₄₇, C₁₆₇, D₃₆₄, H₃₆₆ (см. приложение),

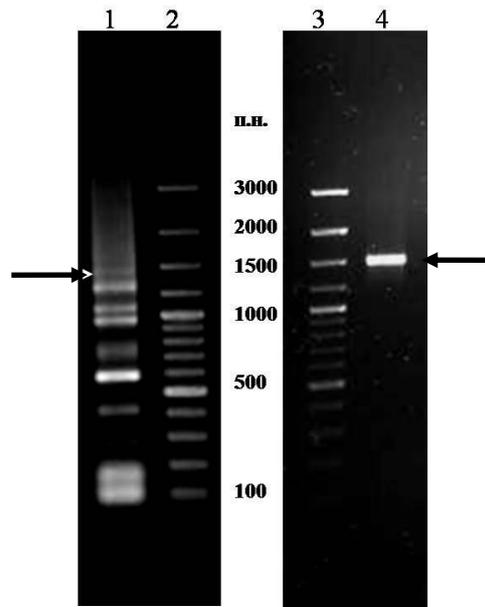


Рис. 21. Электрофореграмма продуктов амплификации кДНК пшеницы, полученных в результате ПЦР с использованием праймеров *ATG4(el)F* и *ATG4(el)R* (1,4); маркер молекулярного веса (2,3). Стрелкой обозначен целевой ПЦР-продукт с молекулярной массой ~1500 п.н.

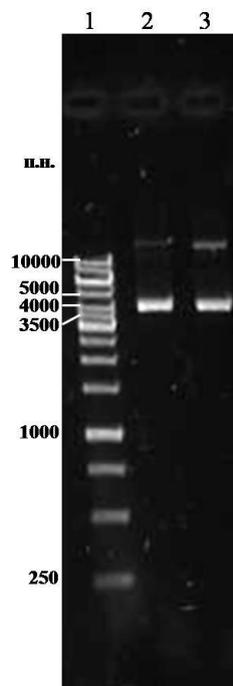


Рис. 22. Электрофореграмма препарата ДНК рекомбинантной плазмиды рAL-ТА, содержащей вставку кодирующей последовательности гена *TaATG4* (2-3); маркер молекулярного веса (1).

являющимися высококонсервативными среди эукариот.

В настоящее время исследователи уделяют повышенное внимание идентификации белков, содержащих AIM-мотивы. ATG4 животных и дрожжей, а также другие белки ATG19, p62, Nix, тяжелая цепь 1 клатрина, как было показано экспериментально, способны взаимодействовать с представителями семейства ATG8 посредством AIM-мотива (Noda, 2008). В отличие от животных и грибов, у растений было выявлено лишь несколько ATG8-связывающих белков. Так, показано, что белки NBR1 и TSP0 арабидопсиса могут выступать в качестве субстратов при селективной аутофагии (Svenning et al., 2011; Vanhee et al., 2011). С помощью сервера MEME Suit (<http://meme.nbcr.net/meme/>) в аминокислотных последовательностях белков *TaATG4a-b* мы обнаружили последовательность **WQIL** (рис. 23) – потенциальный мотив связывания с белком *TaATG8g*. Кроме того, наличие кислых аминокислот в положении X_{-3} , X_{-2} , X_{-1} (в данном случае EDE) и гидрофобной аминокислоты в положении X_2 (в данном случае I) необходимо для дополнительного взаимодействия с белком ATG8 (рис. 20, 23).

Интересным представляется тот факт, что белок ATG4 является редокс-регулируемым. Scherz-Shouval с соавт. (2007) показали, что в клетках HeLa

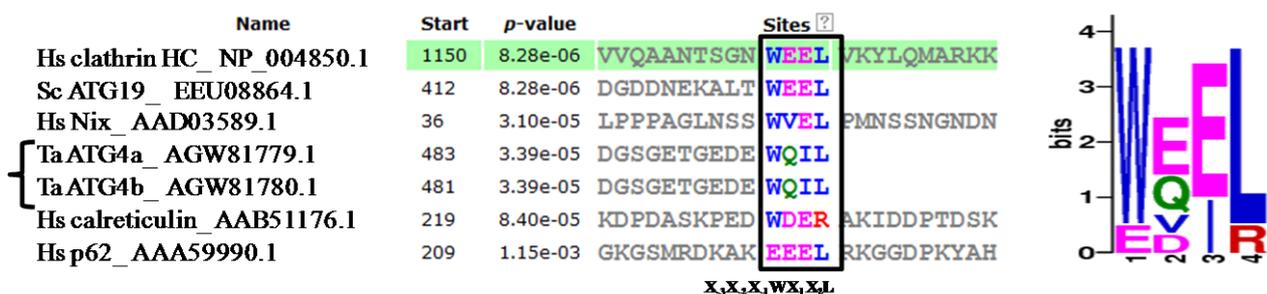


Рис. 23. Выявление AIM-мотива (выделен рамкой) в белках *TaATG4a-b* с помощью выравнивания последовательностей белков с использованием сервера MEME Suit.

белок ATG4 подвергается обратимому окислению при действии H_2O_2 , действуя как редокс-сенсор клетки. Исследователи обнаружили, что аминокислотный остаток цистеина (Cys_{81}), располагающийся около каталитического центра фермента, может подвергаться обратимому окислению, вследствие чего меняется активность белка. Точечная мутация по Cys_{81} приводила к предотвращению образования аутофагосом. Такое редокс-регулирование предполагает наличие нового пути трансдукции сигнала, в котором АФК функционируют как сигнальные молекулы, не только индуцирующие, но и регулирующие аутофагию.

3.2.2. Клонирование и секвенирование экзон-интронной последовательности гена *TaATG8g*

В связи с тем, что до настоящего времени геном пшеницы полностью не секвенирован, в базах данных информация о локализации и структуре генов, кодирующих белки семейства ATG8 пшеницы, отсутствует. Kuzuoglu-Ozturk с соавт. (2012) определили возможную хромосомную локализацию генов *ATG8* пшеницы. В геноме *T. aestivum* (AABBDD) они обнаружили три различные копии *ATG8*. С помощью нулли-тетрасомного анализа было показано, что две копии гена локализуются на хромосоме 2A и 2D, а третья копия – на хромосоме 1B.

Нами была проведена работа по выявлению и определению нуклеотидной последовательности экзон-интронной области гена *TaATG8g*. Используя в качестве матрицы геномную ДНК и праймеры *ATG8ekF* и *ATG8ekR* (табл. 2), которые сконструированы на 5'- и 3'-концевые участки кодирующей области гена *TaATG8g*, нами было обнаружено образование нескольких ПЦР-фрагментов, два из которых являлись высокомолекулярными. Данные фрагменты размером около 1900 и 2200 п.н. были условно названы *TaATG8g1* и *TaATG8g2*, соответственно (рис. 24). Фрагмент *TaATG8g1* был встроен в вектор pGEM-T Easy (рис. 25), после чего

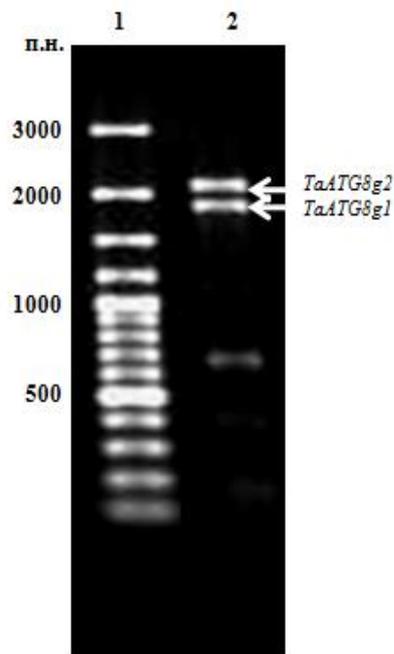


Рис. 24. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК пшеницы, полученных в результате ПЦР с использованием праймеров *ATG8(el)F* и *ATG8(el)R* (2); маркер молекулярного веса (1). Стрелкой указаны ПЦР-фрагменты, условно названные *TaATG8g1* и *TaATG8g2*.

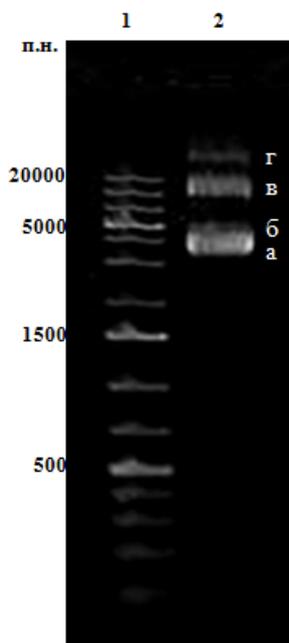


Рис. 25. Электрофореграмма препарата ДНК рекомбинантной плазмиды pGEM-T Easy, содержащей вставку гена *TaATG8g1*: а – суперскрученная форма, б – кольцевая форма, в – линейная форма, г – геномная ДНК бактерий (2); маркер молекулярного веса (1).

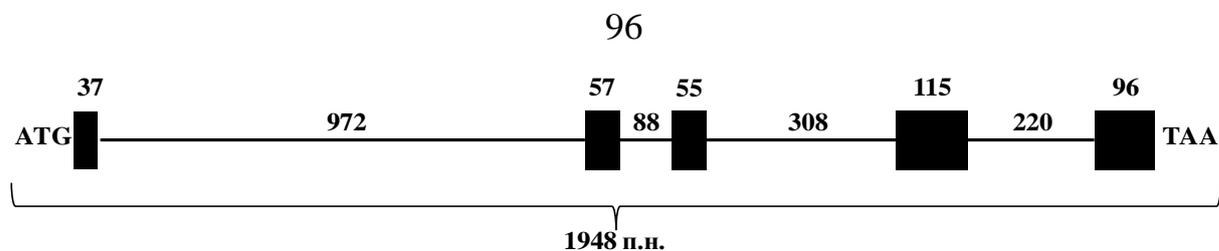


Рис. 26. Схема структуры гена *TaATG8g*. Прямоугольниками показаны экзоны, линией – интроны. Цифры указывают на длину экзона/интрона, п.н.

определили его нуклеотидную последовательность. Методические трудности, потери в ходе очистки фрагментов, их высокая молекулярная масса затруднили молекулярное клонирование фрагмента *TaATG8g2*.

В результате сопоставления идентифицированной нами последовательности (1948 п.н.) с кодирующей последовательностью (360 п.н.) нами обнаружено, что ген *TaATG8g* состоит из пяти экзонов и четырех интронов (рис. 26). С помощью программы BLAST нами обнаружено, что белок риса ATG8 (NP_001059767.1) и кодирующая его мРНК (NM_001066302) наиболее идентичны соответствующим последовательностям ATG8g пшеницы. Ген *ATG8* риса размером 2701 п.н. (ОРС – 1924 п.н.) локализуется на хромосоме 7 и имеет пять экзонов и четыре интрона. Таким образом, анализ идентифицированной последовательности выявил, что ген *TaATG8g* соответствует структуре гомологичных генов семейства *ATG8* растений.

3.2.3. Получение и очистка рекомбинантного белка *TaATG8g*

С целью изучения особенностей структуры и физико-химических свойств белка ATG8 пшеницы нами была проведена наработка и очистка рекомбинантного белка. Для клонирования нами был использован вектор pET-51b(+)-Ek/LIC, который является экспрессионным и предназначен для продукции в *E. coli* рекомбинантных белков (см главу 2.12.). С помощью технологии безлигазного клонирования целевая вставка полноразмерной кДНК *TaATG8g* была встроена в вектор pET-51b(+)-Ek/LIC. Конструкция

была трансформирована в неэкспрессирующий штамм бактерии-хозяина *E. coli* Nova Blue. Для получения рекомбинантного белка плазмиду pET-51b(+) Ek/LIC, содержащую вставку *TaATG8g*, трансформировали в экспрессирующий штамм *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Проверку эффективности трансформации осуществляли с помощью ПЦР.

После добавления индуктора синтеза белка ИПТГ в клетках хозяина-продуцента наблюдали образование целевого гибридного белка с молекулярной массой 17,8 кДа, что соответствует теоритически рассчитанной массе (рис. 27). Иммунологический анализ с применением специфичного антитела Anti-ATG8 подтвердил, что в клетках действительно синтезируется белок ATG8 (рис. 28). Рекомбинантный белок *TaATG8g* на N-конце содержит 18 дополнительных аминокислот (Strep•Tag II) и на C-конце – 19 аминокислот, в том числе десять His (His•Tag). Наличие в нуклеотидной последовательности дополнительных «хвостов» было подтверждено в ходе определения нуклеотидной последовательности транскрибируемой области белка *TaATG8*.

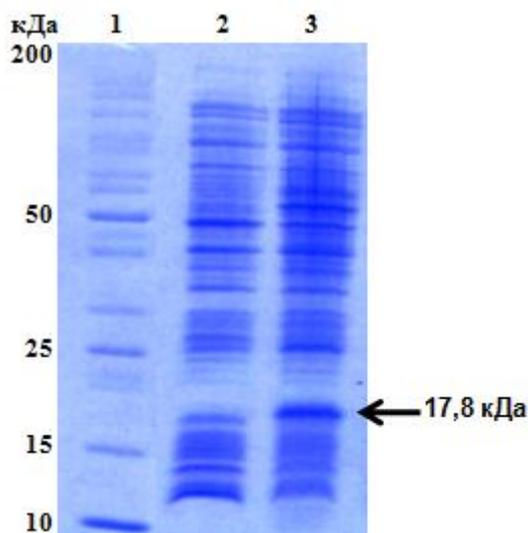


Рис. 27. Электрофореграмма белков в 15 % ДСН-ПААГ: **1** – маркер молекулярного веса, кДа; **2** – клеточный лизат штамма BL21 (DE3) pLysS продуцента до индукции IPTG; **3** – клеточный лизат штамма BL21 (DE3) pLysS после индукции IPTG.

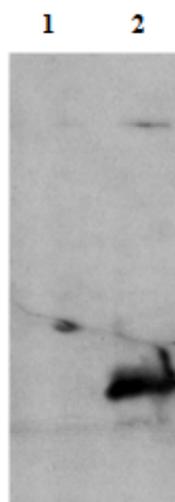


Рис. 28. Вестерн-блотт анализ *TaATG8g* (антитела Anti-ATG8A): **1** – клеточный лизат штамма BL21 (DE3) pLysS до индукции; **2** – клеточный лизат штамма BL21 (DE3) pLysS после индукции IPTG.

В дальнейшем белок подвергался двойной очистке с помощью металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации. Важной характеристикой любого очищенного белка является его стабильность. Было обнаружено, что в ходе очистки белок *TaATG8g* в буферном растворе подвергается агрегации, которая сопровождается выпадением в осадок, наблюдаемый визуально. Интересно, что в литературе данный факт описан для гомологичного белка у дрожжей (Kumeta et al., 2010). В отличие от этого, у животных белки семейства ATG8 стабильны даже при высокой концентрации в растворе.

С целью повышения стабильности белка нами была разработана система его очистки и элюирования. Первая стадия очистки рекомбинантного белка включала металлоаффинную хроматографию в денатурирующих условиях (рис. 29; см. главу 2.14). Имобилизация денатурированного белка на колонке с помощью His•Tag на С-конце позволяет свернуть белок после элюции нецелевых молекул и предотвратить агрегацию между частично свернутыми молекулами целевого белка (Ueda et al., 2003). Для получения стабильного нативного белка были протестированы различные агенты,

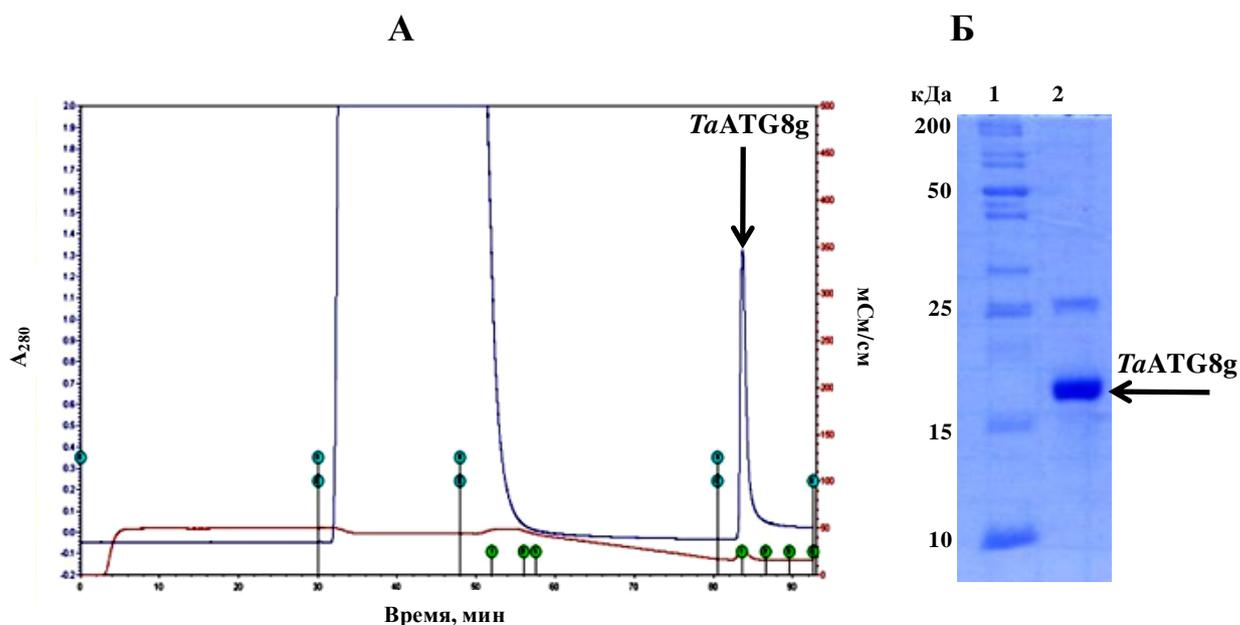


Рис. 29. А – Профиль элюции белка *TaATG8g*. Б – Электрофореграмма белка *TaATG8g* после очистки с помощью металлоаффинной хроматографии в 15 % ДСН-ПААГ: 1 –маркер молекулярного веса, кДа; 2 – очищенный и сконцентрированный белок.

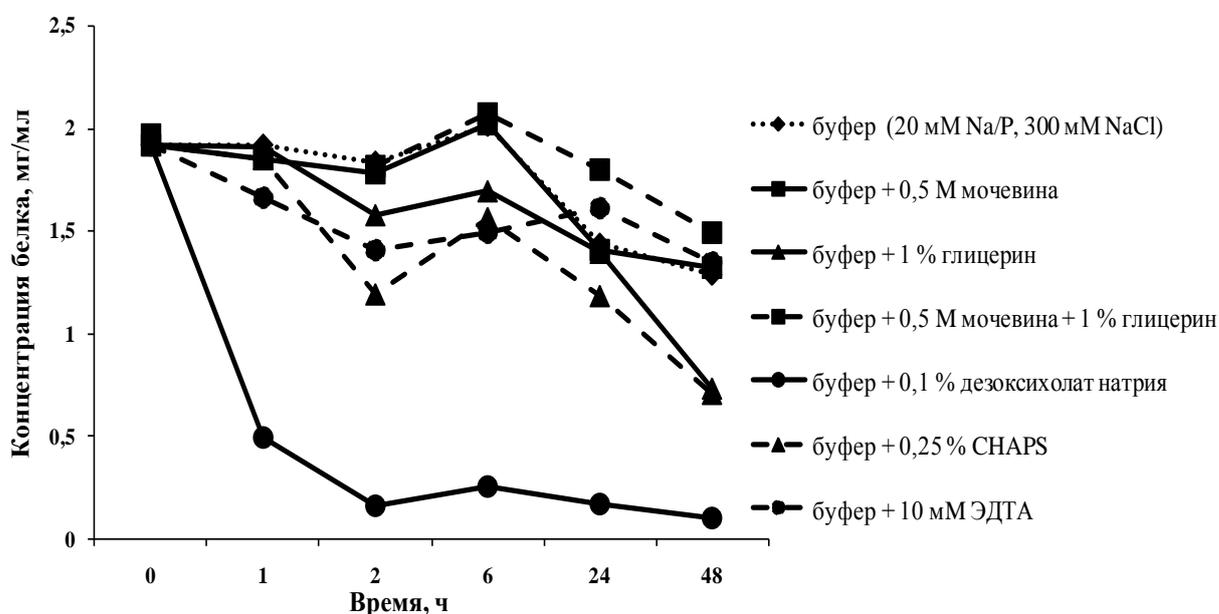


Рис. 30. Динамика изменения концентрации белка *TaATG8g* (мг/мл) в 20 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 300 мМ NaCl и различные стабилизирующие агенты.

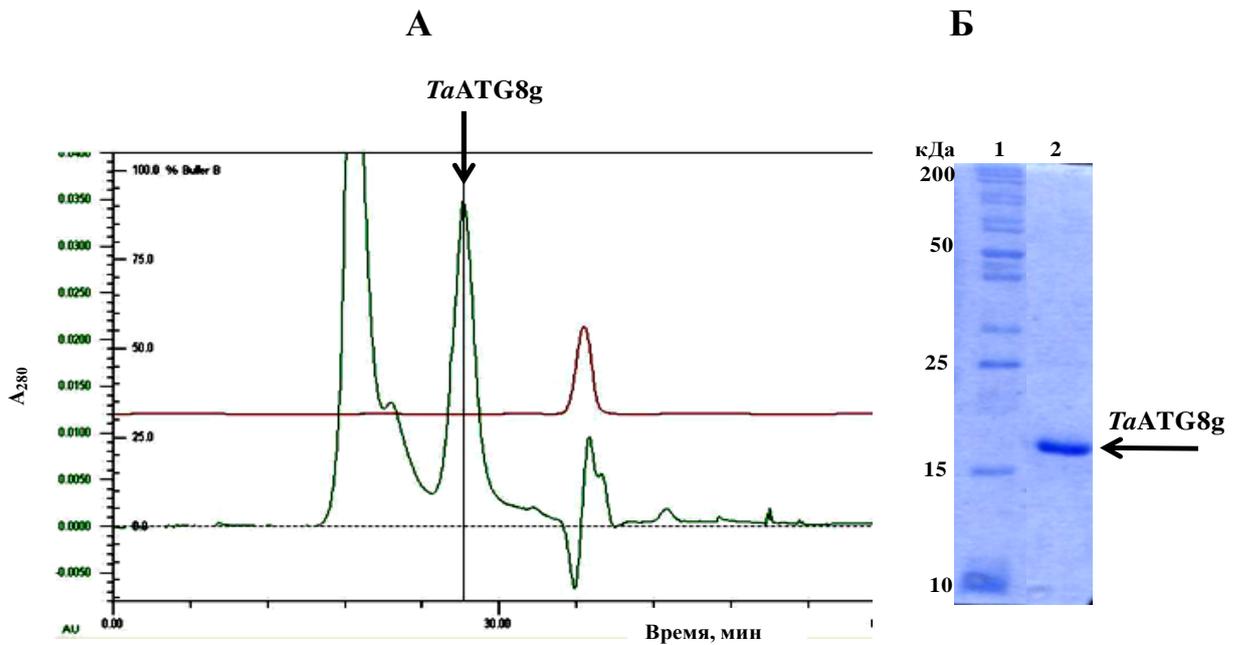


Рис. 31. А – Профиль элюции при гель-фильтрации белков. Б – Электрофореграмма белка *TaATG8g* в 15 % ДСН-ПААГ после очистки с помощью гель-фильтрации: **1** – маркер молекулярного веса, кДа; **2** – очищенный и сконцентрированный белок.

которые добавляли в буфер элюции: глицерин (1%), мочевины (500 мМ), смесь глицерина (1%) и мочевины (500 мМ), анионный детергент дезоксихолат натрия (0,1 %), цвитерионный детергент CHAPS (0,25 %) и хелатор ионов ЭДТА (10 мМ). Агрегацию оценивали по интенсивности выпадения белка в осадок в буферном растворе. При совместном действии глицерина и мочевины концентрация белка в растворе в течение 48 ч изменялась менее значительно, чем при использовании остальных агентов (рис. 30), что косвенно указывает на стабилизирующее действие данных веществ. Белок оказался более стабилен в нейтральных (рН 7) или слабощелочных условиях (рН 8) (данные не представлены). Кроме того, для предотвращения агрегации концентрацию белка в растворе доводили до 2-2,5 мг/мл. Чае с соавторами (2004) показали, что применение Na-фосфатного буфера, содержащего 300 мМ NaCl, 500 мМ мочевины и 1 % глицерин, предотвращает (или замедляет) агрегацию белка APG8a арабидопсиса (*At4g21980*). Глицерин и мочевины, по-видимому, разрушают

межмолекулярные взаимодействия (Panda et al., 2000; Soejima et al., 2001). Мочевина слегка дестабилизирует свернутый белок, а глицерин, являясь защитным агентом, необходим для «правильного» сворачивания интермедиатов (Meng et al., 2001). NaCl в высокой концентрации разрушает ионные взаимодействия между белковыми молекулами (Futami et al., 2000).

Как показано на рис. 29 Б, очистка препарата с помощью металлоаффинной хроматографии не позволила получить высокоочищенный целевой белок, однако его содержание было преобладающим. На следующем этапе очистки белка применяли хроматографию с помощью гель-фильтрации (рис. 31 А). Конечный выход белка составил 0,4-0,5 мг/мл. Последующее электрофоретическое разделение белка продемонстрировало получение высокоочищенного препарата белка *TaATG8g* (рис. 31 Б).

3.2.4. Пространственная структура белка *TaATG8g*

Для изучения особенностей пространственной структуры и физико-химических свойств белка *TaATG8g* нами были использованы методы ИК- и ЯМР-спектроскопии. Данные об особенностях пространственной структуры белков ATG8 у растений практически отсутствуют. Имеется единственное краткое сообщение, в котором представлен ЯМР-спектр ATG8 арабидопсиса (Chae et al., 2005). Использование ИК-спектроскопии позволяет установить наличие у изучаемого белка различных элементов вторичной структуры и количественно оценить, какая доля аминокислотной последовательности образует тот или иной тип вторичной структуры. На рисунке 32 представлены ИК-спектры поглощения рекомбинантного белка *TaATG8g*. В области амид 2 присутствует лишь полоса поглощения карбоксильных остатков Asp и Glu с максимумом при 1560 и 1580 см^{-1} (Barth, 2000). Амидные N-H группы (1520-1550 см^{-1}) полностью обменивались за время эксперимента и не проявлялись в спектре (рис. 32 А). Полоса амид 1 (1600-1700 см^{-1}) имеет сложную многокомпонентную форму, указывающую на

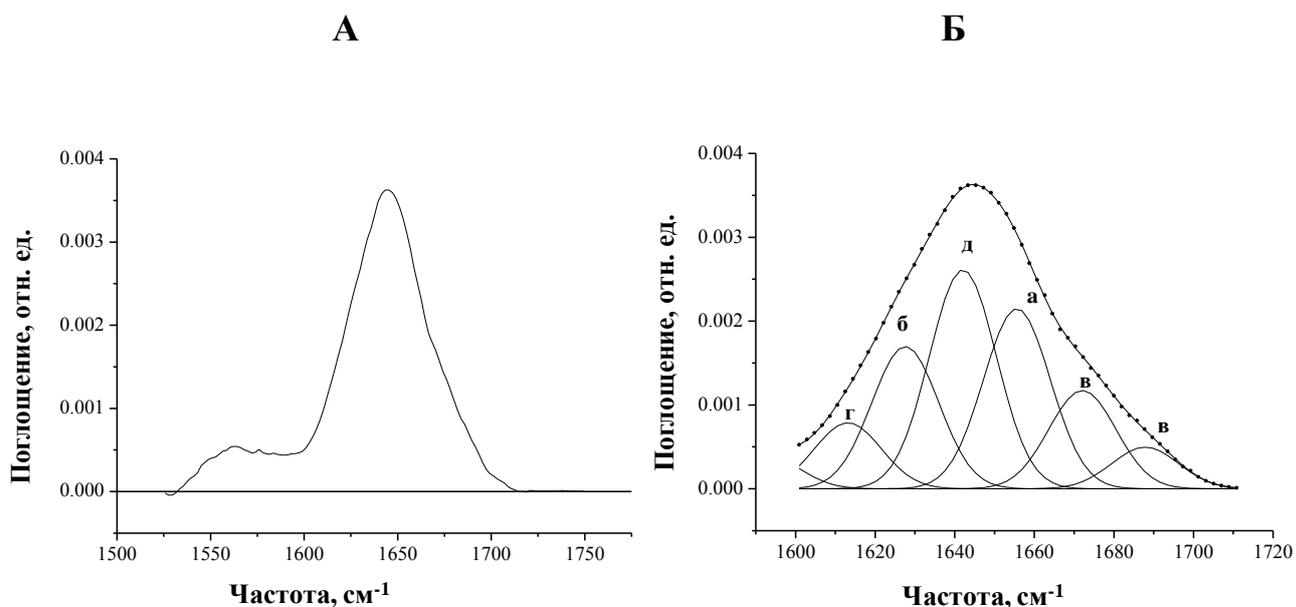


Рис. 32. А – ИК-спектр поглощения белка *TaATG8g* в D₂O в области колебаний амид 1 (1700-1600 см⁻¹, νC=O) и амид 2 (1600-1500 см⁻¹, δN-H). Б – ИК-спектр поглощения белка в области амид 1 (обозначен точками). Сплошной линией обозначены компоненты разложения и их сумма: а – α-спираль, б – β-структура, в – β-повороты, г – агрегационная β-структура, д – неупорядоченная структура.

Таблица 5. Содержание элементов вторичной структуры (в %) белка *TaATG8g*, определенное с помощью ИК-спектроскопии и сервера I-TASSER

Тип структуры	ИК-спектроскопия	I-TASSER
α-спирали	23	23-28
β-структура	18	11-15
β-повороты	17	-
агрегационная β-структура	9	-
неупорядоченная структура	33	-

вклад в поглощение со стороны различных элементов вторичной структуры белка. Результаты разложения полосы амид 1 (рис. 32 Б) свидетельствуют, что рекомбинантный белок *TaATG8g* содержит значительную долю упорядоченной вторичной структуры (41 %). Содержание α -спиралей составило 23 %, β -структур – 18 % (табл. 5). В то же время быстрый Н-D обмен пептидных групп белка, практически завершившийся за время эксперимента, указывает на то, что третичная структура белка довольно подвижна по сравнению с глобулярными белками близкой массы (лизоцим, РНКазы А, миоглобин).

Нами был проведен сравнительный анализ полученных экспериментальных данных по вторичной структуре *TaATG8g* и результатов, предсказанных с помощью программного пакета сервера I-TASSER. Программа I-TASSER предсказывает структуру целевого белка с помощью сложного алгоритма LOMETS (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) на основе массива данных по белкам, структура которых расшифрована и представлена в библиотеке PDB-банка. В целом, экспериментальные данные по вторичной структуре белка согласуются с предсказанными расчетными результатами, однако содержание β -структуры несколько различается. Некоторое расхождение между предсказанными и экспериментальными данными по содержанию β -структуры (табл. 5), вероятно, обусловлено тем, что при компьютерном анализе учитывается статистическая вероятность нахождения того или иного аминокислотного остатка в структуре определенного типа. Однако мы не исключаем того, что расхождение экспериментальных и предсказанных данных может быть обусловлено также нестабильностью белка и, вследствие этого, наложением поглощения не только мономерного, но и частично агрегированного белка в ИК-спектре. Действительно, при сравнении ИК-спектров белка в растворе и осадке после центрифугирования агрегированного белка было обнаружено, что агрегация белка *TaATG8* сопровождается уменьшением доли содержания

α -спиралей и повышением относительного содержания β -структуры (данные не представлены).

Структура белка *TaATG8g* была также охарактеризована с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. На рисунке 33 представлены одномерные ^1H ЯМР-спектры, снятые при различных температурах – слабopольная область спектра, характерная для амидных протонов (H-N) основной цепи, для ароматических и N-H₂ протонов боковых цепей. В одномерном спектре ЯМР белка обнаружено, что некоторые спектральные линии узкие, а другие существенно уширены и сильно перекрываются. Кроме того, наблюдается изменение положения спектральных линий в зависимости от температуры. В спектре выявлены признаки, характерные для наличия химического обмена, который может быть обусловлен внутримолекулярной подвижностью отдельных участков белка и процессом его олигомеризации и/или агрегации (рис. 33).

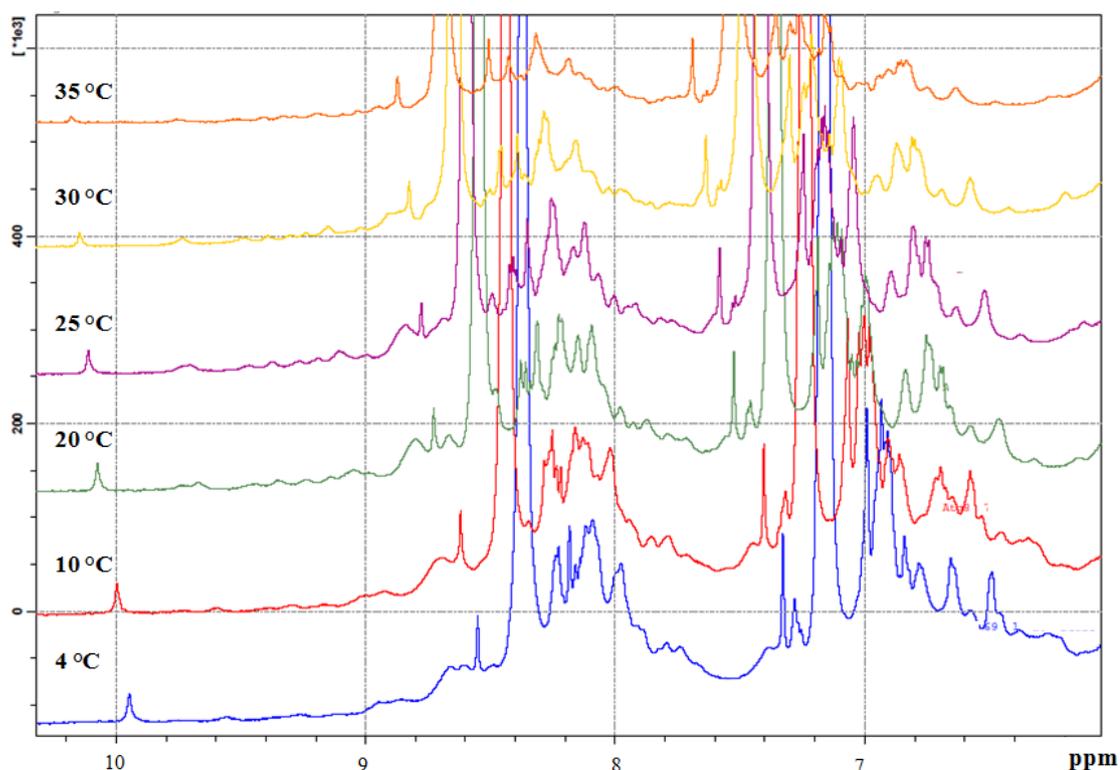


Рис. 33. ^1H -спектры рекомбинантного белка *TaATG8g* при различной температуре.

Двумерные эксперименты ^1H - ^1H -NOESY продемонстрировали наличие в спектре белка уширенных кросс-пиков (рис. 34). При этом количество кросс-пиков, являющихся следствием ядерного эффекта Оверхаузера, было меньше, чем можно ожидать для белка, полипептидная цепь которого содержит 156 аминокислот. Вероятно, в ходе эксперимента белок агрегирует, что приводит к уменьшению времен релаксаций, уширению сигналов и, как следствие, уменьшению количества сигналов в спектрах ^1H - ^1H -NOESY.

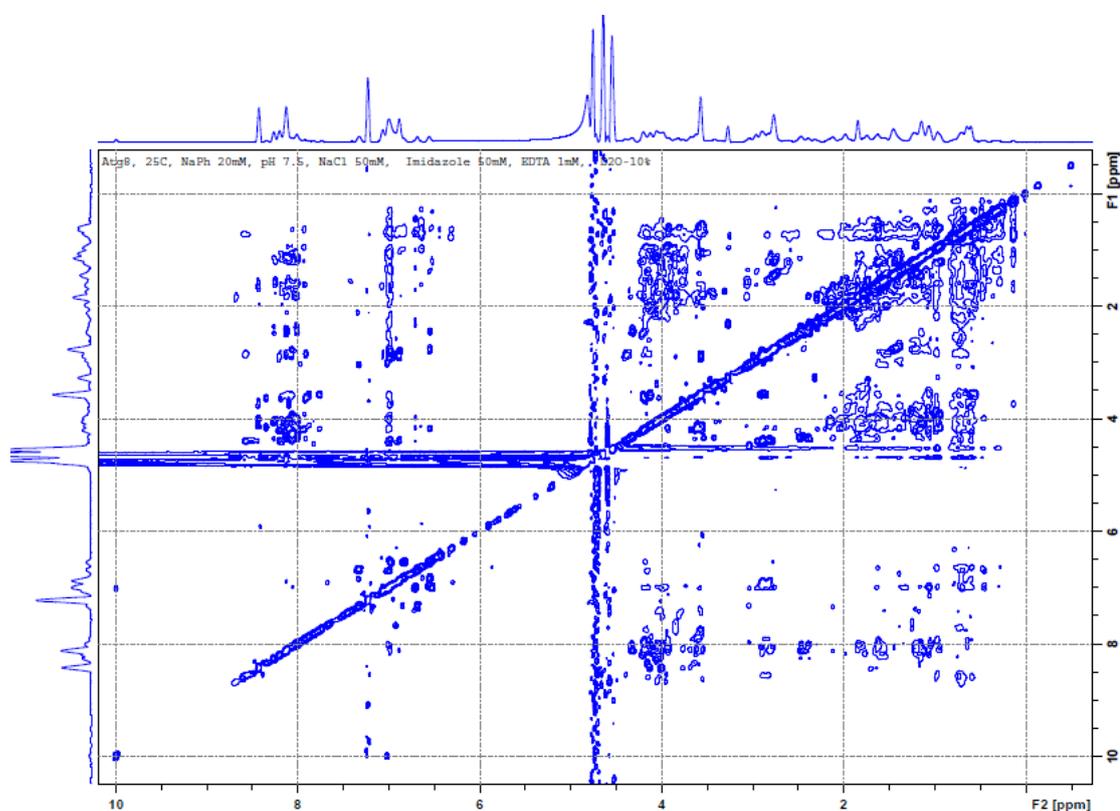


Рис. 34. ^1H - ^1H -NOESY спектр белка *TaATG8g*, 25 °С.

С целью дальнейшего изучения особенностей пространственной структуры нами был получен рекомбинантный белок *TaATG8g*, обогащенный изотопом ^{15}N . Белок был стабилизирован с помощью добавления в буферный раствор 1% глицерина и 500 мМ мочевины (см. гл.3.2.3.). В ^1H - ^{15}N -HSQC спектре образца, мы обнаружили 127 пиков (рис. 35). Каждый пик в спектре характеризует связь N-H по двум координатам, соответствующим химическому сдвигу для каждого атома.

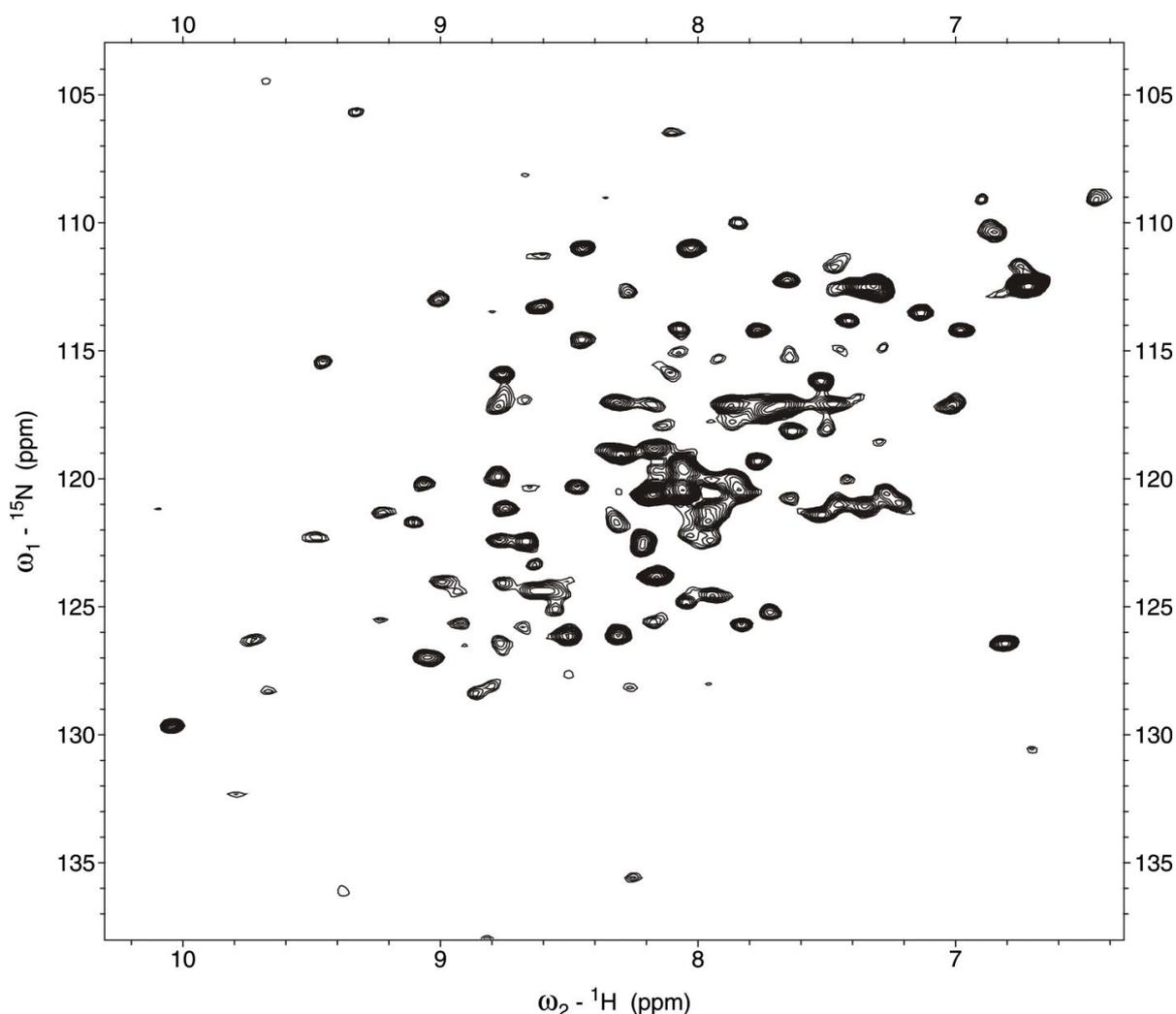


Рис. 35. [^1H - ^{15}N] HSQC спектр рекомбинантного белка *TaATG8g*, 25 °С.

Поскольку белок *TaATG8g* состоит из 156 аминокислот, то ожидаемое число видимых сигналов от H-N протонов основной цепи равно 147. Это обусловлено наличием в аминокислотной последовательности белка девяти пролинов, детекция которых в спектре ЯМР не происходит, вследствие отсутствия у них амидного протона. Таким образом, соотношение экспериментальных сигналов к теоретически ожидаемым равно 86 %. В ЯМР-спектре ATG8 арабидопсиса отнесение сигналов также составило близкое значение – 85 % (Chae et al., 2005).

В целом, дисперсия пиков, наблюдаемая в спектре (рис. 35), характерна для структурированного белка. В спектре присутствуют сигналы с химическими сдвигами больше 9 ppm, что характерно для β -структур, и менее 7 ppm, что, как правило, соответствует α -спиралям. Для спектра ^1H - ^{15}N -HSQC характерна некоторая неоднородность по интенсивности сигналов. В нем присутствуют как интенсивные и узкие сигналы, обычно обусловленные наличием подвижных, несвернутых N- и C-концов, так и уширенные сигналы с низкой амплитудой. Уширение сигналов характерно для аминокислот, вовлеченных в обменный процесс между различными конформационными состояниями белка и/или различными агрегатами белка в растворе. По данным литературы, белок ATG8 *S. cerevisiae* может находиться в закрытой и открытой конформации. Показано, что в комплексе с лигандом белок ATG8 становится более стабильным, что связано с ограничением подвижности $\alpha 2$ спирали, которая участвует в формировании межмолекулярных взаимодействий (Kumeta et al., 2010).

Таким образом, анализ структурной организации *TaATG8g* указывает на то, что этот белок характеризуется значительной долей упорядоченной вторичной структуры. Дисперсия пиков, наблюдаемых в ЯМР-спектрах, свидетельствует о фолдинге и хорошей структурированности белка. Полученные результаты указывают также на высокую структурную подвижность белка *TaATG8g*, что, вероятно, обуславливает его функционирование при межмолекулярном распознавании и взаимодействии

с функциональными лигандами. Такая структурная особенность характерна и для других аутофагических белков данного семейства (Chae et al., 2005; Kumeta et al., 2010) ввиду их множественного взаимодействия с различными лигандами при формировании аутофагосом.

3.2.5. Трехмерная модель белка *TaATG8g*

К настоящему времени с помощью ЯМР-спектроскопии и кристаллографии были установлены и охарактеризованы структуры белков семейства ATG8 животных, таких как MAP LC3 (Sugawara et al., 2004), GABARAP (Stangler et al., 2002), GATE-16 (Paz et al., 2000), и ATG8 дрожжей (Kumeta et al., 2010). Несмотря на то, что у некоторых растений ATG8 представлен большим количеством изоформ (Doelling et al., 2002), которые, вероятно, необходимы для осуществления разнообразных функций при образовании аутофагосом, до настоящего времени нет ни одной работы, посвященной полной расшифровке пространственной организации белков ATG8 растений.

С помощью сервера I-TASSER и программы PyMol нами была построена модель трехмерной структуры белка *TaATG8g*. Согласно данным I-TASSER, белок *TaATG8g* в своей структуре имеет четыре α -спирали и четыре β -слоя (рис. 36 А). Вероятность такого предсказания показана на рис. 36 Б. В целом, сконструированная трехмерная модель белка *TaATG8g* продемонстрировала классическую трехмерную структуру белков семейства ATG8 (рис. 37). С-терминальный домен *TaATG8g* состоит из сложенных вчетверо центральных β -листов, из которых два центральных β -листа параллельны друг другу (β_1 , β_4) и два наружных β -листа (β_2 , β_3) – антипараллельны центральным листам. Между этими листами лежат две α -спирали (α_3 и α_4). Кроме С-терминального домена, белок *TaATG8g* обладает двумя дополнительными α -спиралями на N-конце белка (α_1 и α_2) (рис. 37).

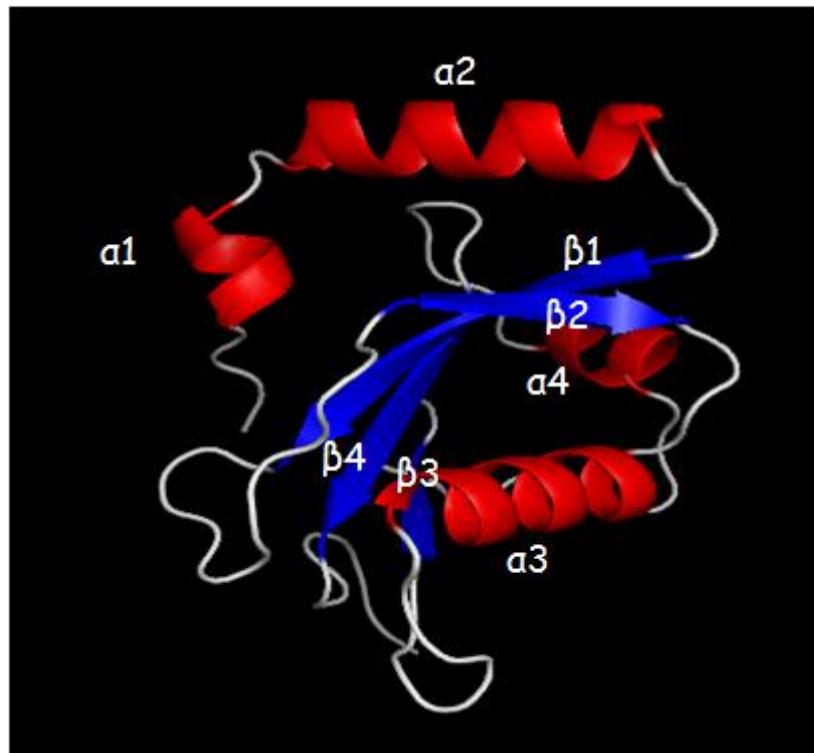


Рис. 37. Модель трехмерной структуры белка *TaATG8g*. Красным цветом обозначены α -спирали, синим – β -слои, белым – неупорядоченная структура.

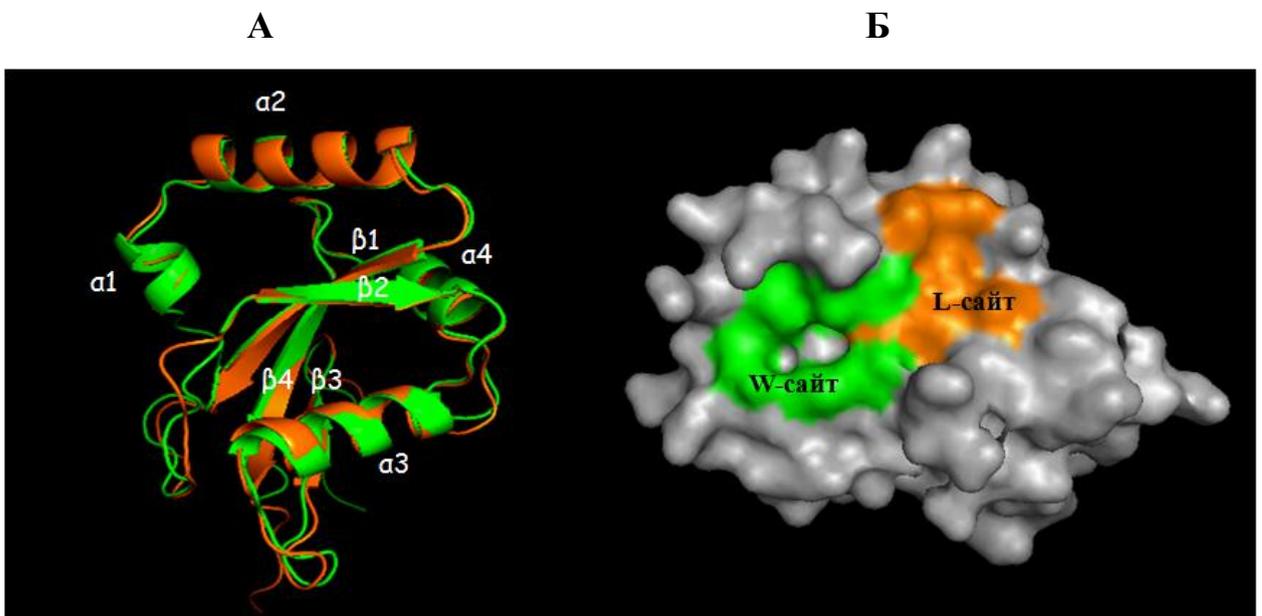


Рис. 38. А – Наложение моделей структур белков ATG8g *T. aestivum* (зеленый) и ATG8 *S. cerevisiae* (PDB code: 2li5; оранжевый). Б – Иллюстрация W-сайта (зеленый) и L-сайта (оранжевый) на поверхности белка *TaATG8g*.

С-терминальный домен называют убиквитиновым. Сворачивание этого участка полипептидной цепи напоминает укладку третичной структуры убиквитина. Интересно, что, несмотря на то, что пространственные структуры ATG8 и убиквитина очень похожи, их первичные последовательности сильно различаются. Так, аминокислотные последовательности GABARAP и убиквитина идентичны только на 7 % (Mohrlüder et al., 2009). Однако убиквитиновый домен среди членов семейства ATG8, как правило, состоит из консервативных аминокислот (Shpilka et al., 2011). Эта область, как предполагают, играет важную роль в белок-лигандных взаимодействиях. В отличие от убиквитинового домена, N-терминальный участок является малоконсервативным и варьируемым среди ATG8 у различных организмов. Именно он является главной уникальной особенностью в структуре каждого вида белка из семейства ATG8 (Shpilka et al., 2011). Показано, что этот домен отвечает за связывание тубулина и олигомеризацию белка при образовании аутофагосомы (Coyle et al., 2002). ATG8g пшеницы обладает 76 % идентичности с белком ATG8 дрожжей *S. cerevisiae* (см. главу 3.2.1.). Мы сравнили сконструированную нами модель ATG8g пшеницы с трехмерной структурой белка ATG8 дрожжей, которая расшифрована и представлена в PDB банке (PDB code: 2li5; рис. 38 А). Сравнительный анализ показал, что в целом их структуры очень похожи. Отличие между ними состоит в укладке N- и C-концевых неструктурированных участков молекулы, а также в положении варибельной спирали $\alpha 1$ (рис. 38 А).

ATG8 способен взаимодействовать с различными белками. Большинство белок-белковых взаимодействий осуществляется, в основном, посредством образования комплекса между аминокислотами W- и L-сайта белка ATG8 и AIM-мотива белка-рецептора (Noda et al., 2010). В первичной структуре *Ta*ATG8g нами были выявлены аминокислоты, формирующие W- и L-сайты (см. главу 3.2.1.). С помощью компьютерного моделирования показано, что аминокислоты этих сайтов конформационно сближены и формируют на

поверхности белка *TaATG8g* два гидрофобных кармана (рис. 38 Б). W-сайт белка *TaATG8g* (E₁₈, I₂₂, P₃₁, I₃₃, K₄₉, L₅₁) локализован между $\alpha 2$ и $\beta 2$, L-сайт (Y₅₀, V₅₂, P₅₃, L₅₆, F₆₁, V₆₄) – между $\beta 2$ и $\alpha 3$ (рис. 36 А).

Таким образом, сконструированная нами трехмерная модель белка *TaATG8g* продемонстрировала классическую трехмерную структуру, характерную для белков семейства ATG8. Учитывая полученные нами экспериментальные данные о значительной доле упорядоченной вторичной структуры, фолдинге и высокой подвижности белка *TaATG8g* и *in silico* данные о наличии в структуре этого белка множественных мотивов, необходимых для взаимодействия с лигандами, можно полагать, что *TaATG8g* обладает характеристиками, необходимыми для его вовлечения в биогенез аутофагосомальных мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время изучение физиологической роли аутофагии при стрессе является одной из актуальных проблем биологии, поскольку в зависимости от степени повреждения клеток этот процесс может способствовать либо выживанию, либо гибели клеток (Baehrecke, 2005). Результаты настоящей работы продемонстрировали, что в клетках растений индукция аутофагии, сопровождающаяся образованием аутофагосом и усилением экспрессии аутофагических генов, происходит при действии стрессовых факторов, прямо или опосредованно влияющих на редокс-статус клеток. Так, активация аутофагии наблюдается при действии типичного прооксиданта параквата и при раневом стрессе. Кроме того, нами обнаружено, что митохондрии как основные АФК-образующие органеллы вовлечены в редокс-регуляцию аутофагии в клетках растений (Minibayeva et al., 2012). До настоящего времени роль митохондрий в индукции аутофагии в клетках растений оставалась неизученной. Эта проблема представляет особую сложность, если принять во внимание особенности строения растительных митохондрий, в том числе наличие альтернативных путей. По нашим данным, комплекс III митохондриальной ЭТЦ вносит наиболее значительный вклад, по сравнению с другими переносчиками, в образование АФК и формирование аутофагосом. Другой возможный механизм, контролирующей аутофагию, осуществляется посредством альтернативной оксидазы. Об этом свидетельствуют данные наших экспериментов по одновременному ингибированию основной и альтернативной ЭТЦ в митохондриях. Таким образом, комплекс III митохондриальной ЭТЦ и альтернативную оксидазу можно рассматривать как механизмы митохондриальной регуляции аутофагии у растений.

Нами показана двойственная роль аутофагии при стрессе. Так, анализ раневого ответа корней во временной динамике выявил, что на ранних этапах повышение уровня АФК сопровождается образованием аутофагосом, однако

не приводит к гибели клеток. Можно полагать, в начальную фазу стресса аутофагия играет роль защитного и антиоксидантного механизма, вследствие эффективного удаления образовавшихся окисленных макромолекул. Однако при длительном воздействии стрессового фактора и избыточном накоплении повреждений происходит масштабная аутофагическая деградация внутриклеточного содержимого, что, в свою очередь, приводит к гибели клеток. Таким образом, аутофагию можно рассматривать как компонент стрессового ответа растительных клеток. В зависимости от степени повреждения клеток и физиологического состояния организма аутофагия является либо защитным механизмом, либо способом гибели клеток.

«Белым пятном» в исследовании аутофагии в клетках растений до настоящего времени являлись морфологические характеристики стадий формирования аутофагосом. Несмотря на частую детекцию аутофагосом, последовательные этапы их формирования в клетках растений не были выявлены. С помощью ультраструктурного анализа нами были идентифицированы и охарактеризованы основные этапы формирования аутофагосом. Одной из дискутируемых в настоящее время проблем аутофагии является вопрос о происхождении аутофагосомальных мембран. Нами обнаружено, что в растительных клетках, подобно клеткам животных, эндоплазматический ретикулум вовлечен в инициацию формирования аутофагосом.

Формирование аутофагосом на различных этапах обеспечивается активностью многочисленных ATG белков, среди которых особую роль играет белок ATG8 – молекулярный маркер макроаутофагии (Kabeya et al., 2000). Обнаруженная в наших экспериментах стимуляция экспрессии гена *TaATG8g* может свидетельствовать о его вовлечении в регуляцию стресс-индуцированной аутофагии в корнях пшеницы. Уникальные свойства и функциональное многообразие этого убиквитин-подобного белка во многом определяются его пространственной структурой. Сконструированная нами трехмерная модель белка *TaATG8g* продемонстрировала классическую

трехмерную структуру, характерную для белков семейства ATG8. Учитывая полученные нами экспериментальные данные с помощью ИК- и ЯМР-спектроскопии о значительной доле упорядоченной вторичной структуры, фолдинге и высокой подвижности белка *TaATG8g* и *in silico* данные о наличии в структуре этого белка множественных мотивов, необходимых для взаимодействия с лигандами, можно полагать, что *TaATG8g* обладает характеристиками, необходимыми для его вовлечения в биогенез аутофагосомальных мембран. Полученные результаты открывают новые возможности исследования молекулярных механизмов аутофагии в клетках растений.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в клетках корней пшеницы активные формы кислорода индуцируют аутофагию. Образование аутофагосом при действии прооксиданта параквата предотвращается антиоксидантом тироном и ингибитором аутофагии 3-метиладенином.

2. Впервые показана индукция аутофагии в растениях при раневом стрессе. Начальный этап раневого стресса (2 ч) характеризуется незначительным увеличением содержания АФК и появлением аутофагосом. При длительной инкубации отсеченных корней (24 и 48 ч) масштабное накопление АФК и образование аутофагосом сопровождаются гибелью части клеток.

3. Впервые показано, что нарушение работы основной и альтернативной митохондриальной ЭТЦ растений приводит к индукции аутофагии. Блокирование комплекса III с помощью антимицина А является наиболее эффективным митохондриальным индуктором окислительного стресса и аутофагии.

4. Впервые идентифицированы и охарактеризованы основные последовательные этапы образования аутофагосом в растительных клетках.

5. Выявлено, что ген *TaATG8g* состоит из пяти экзонов и четырех интронов. В условиях окислительного стресса происходит повышение уровня экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g*, что свидетельствует о вовлечении этих генов в регуляцию аутофагии.

6. Показано, что белок *TaATG8g* имеет значительную долю упорядоченной вторичной структуры (41 %). Дисперсия пиков, наблюдаемая в спектре [¹H-¹⁵N]-HSQC, свидетельствует о наличии хорошо структурированного белка.

7. Созданная трехмерная модель белка *TaATG8g* продемонстрировала классическую пространственную структуру, характерную для белков семейства ATG8. *In silico* данные выявили наличие в структуре *TaATG8g*

множественных сайтов его взаимодействия с лигандами. Обнаружено, что *TaATG8g* обладает характеристиками, необходимыми для вовлечения этого белка в биогенез аутофагосомальных мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Андреев, А.Ю.** Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарера, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – Р. 246–264.
2. **Ванюшин, Б.Ф.** Апоптоз у растений / Б.Ф. Ванюшин // Успехи биологической химии. – 2001 – Т. 41. – С. 3–38.
3. **Гречкин, А.Н.** Липоксигенезная сигнальная система / А.Н. Гречкин, И.А. Тарчевский // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – С. 132–142.
4. **Дмитриева, С.А.** Индуцированное старение и гибель клеток при окислительном стрессе в корнях пшеницы / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Доклады РАН. – 2007. – Т. 414. – С. 133–136.
5. **Дмитриева, С.А.** Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность растительных митохондрий *in vivo* / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, В.В. Рябовол, Ф. В. Минибаева // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29. – С. 267–275.
6. **Колупаев, Ю.Е.** Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессов / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец – Киев: Основа, 2010. – 352 с.
7. **Мерзляк, М.Н.** Роль супероксидных анион-радикалов и синглетного кислорода в патологии мембран / М.Н. Мерзляк, А.С. Соболев // Итоги науки и техники. Биофизика. – 1975. – Т. 5. – С. 118–165.
8. **Мерзляк, М.Н.** Активированный кислород и жизнедеятельность растений / М.Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20–26.
9. **Минибаева, Ф.В.** Роль супероксида в формировании неспецифического адаптационного синдрома корневых клеток /

Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон, Д.Ф. Рахматуллина, Н.Н. Вылегжанина // Доклады РАН. – 1997. – Т. 355. – С. 554–556.

10. **Минибаева, Ф.В.** Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных клетках при стрессе / Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 459–464.

11. **Пахомова, В.М.** Общие закономерности ответной реакции корней на стрессовое воздействие / В.М. Пахомова, Л.Х. Гордон // Журнал общей биологии. – 1991. – Т.52. – С. 36–43.

12. **Прадедова, Е.В.** Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений // Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Салаяев // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – С. 177–185.

13. **Рахматуллина, Д. Ф.** Дыхание клеток корней пшеницы в условиях одновременного ингибирования 1 и 3 участков электрон-транспортной цепи митохондрий / Д.Ф. Рахматуллина, Л.Х. Гордон, Т.И. Огородникова // Цитология. – 2005. – Т.47. – С. 230–236.

14. **Тарчевский, И.А.** Сигнальные системы клеток растений / И.А. Тарчевский – М.: Наука, 2002. – 294 с.

15. **Чиркова, Т.В.** Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т.В. Чиркова // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С.12–17.

16. **Amor, Y.** Anoxia pretreatment protects soybean cells against H₂O₂-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of the alternative oxidase / Y. Amor, M. Chevion, A. Levine // FEBS Lett. – 2000. – V. 477. – P. 175–180.

17. **Angelovici, R.** Deciphering transcriptional and metabolic networks associated with lysine metabolism during Arabidopsis seed development / R. Angelovici, A. Fait, X. Zhu, J. Szymanski, E. Feldmesser, A.R. Fernie, G. Galili // Plant Physiol. – 2009. – V. 151. – P. 2058–2072.

18. **Aravind, L.** Classification of caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of eukaryotic separins / L. Aravind, E.V. Koonin // *Proteins*. – 2002. – V. 46. – P. 355–367.
19. **Arpagaus, S.** Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants / S. Arpagaus, A. Rawyler, R. Braendle // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 18. – P. 1780–1787.
20. **Aubert, S.** Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates / S. Aubert, E. Gout, R. Bligny, D. Marty-Mazars, F. Barrieu, J. Alabouvette, F. Marty, R. Douce // *J. Cell Biol.* – 1996. – V. 133. – P. 1251–1263.
21. **Axe, E.L.** Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum / E.L. Axe, S.A. Walker, M. Manifava, P. Chandra, H.L. Roderick, A. Habermann, G. Griffiths, N.T. Ktistakis // *J. Cell Biol.* – 2008. – V. 82. – P. 685–701.
22. **Azad, A.K.** Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip / A.K. Azad, T. Ishikawa, T. Ishikawa, Y. Sawa, H. Shibata // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 2085–2095.
23. **Backhaus, R.A.** The ontogeny of rubber formation in guayule, *Parthenium-argentatum* gray / R.A. Backhaus, S. Walsh // *Bot. Gazette*. – 1983. – V. 144. – P. 391–400.
24. **Baehrecke, E.H.** Autophagy: dual roles in life and death? / E.H. Baehrecke // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – V. 6. – P. 505–10.
25. **Baker, C.J.** An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue / C.J. Baker, N.M. Mock // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1994. – V. 39. – P. 7–12.
26. **Balk, J.** Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants / J. Balk, C.J. Leaver, P.F. McCabe // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 463. – P. 151–154.

27. **Balk, J.** The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release / J. Balk, C.J. Leaver // *Plant Cell*. – 2001. – V. 13. – P. 1803–1818.
28. **Barth, A.** The infrared absorption of amino acid side chains / A. Barth // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2000. – V. 74. – P. 141–173.
29. **Bassham, D.C.** Golgi-independent trafficking of macromolecules to the plant vacuole / D.C. Bassham // *Adv. Bot. Res.* – 2002. – V. 38. – P. 65–91.
30. **Bassham, D.C.** Autophagy in development and stress responses of plants / D.C. Bassham, M. Laporte, F. Marty, Y. Moriyasu, Y. Ohsumi, L.J. Olsen, K. Yoshimoto // *Autophagy*. – 2006. – V. 2. – P. 2–11.
31. **Bassham, D.C.** Plant autophagy—more than a starvation response / D.C. Bassham // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – V. 10. – P. 587–593.
32. **Bassham, D.C.** Function and regulation of macroautophagy in plants / D.C. Bassham // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – V. 1793. – P. 1397–1403.
33. **Battelli, R.** Changes in ultrastructure, protease and caspase-like activities during flower senescence in *Lilium longiflorum* / R. Battelli, L. Lombardi, H.J. Rogers, P. Picciarelli, R. Lorenzi, N. Ceccarelli // *Plant Sci.* – 2011. – V. 180. – P. 716–725.
34. **Blokhina, O.** Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems / O. Blokhina, K.V. Fagerstedt // *Physiol. Plant*. – 2010. – V. 138. – P. 447–462.
35. **Blommaart, E.F.** The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes / E.F. Blommaart, U. Krause, J.P. Schellens, H. Vreeling-Sindelárová, A.J. Meijer // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V. 243. – P. 240–246.
36. **Bozhkov, P.V.** Cysteine protease mCII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis / P.V. Bozhkov, M.F. Suarez, L.H. Filonova, G. Daniel, A.A. Zamyatnin, S. Rodriguez-Nieto, B. Zhivotovsky, A. Smertenko // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – V. 102. – № 40. – P. 14463–14468.

37. **Bradford, J.K.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding / J.K. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
38. **Burman, C.** Autophagosome formation in mammalian cells / C. Burman, N.T. Ktistakis // *Semin. Immunopathol.* – 2010. – V. 32. – P. 397–413.
39. **Byler, D.M.** Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra / D.M. Byler, H. Susi // *Biopolymer.* – 1986. – V. 25. – P. 469–487.
40. **Chae, Y.K.** Prevention of aggregation after refolding by balanced stabilization-destabilization: production of the *Arabidopsis thaliana* protein APG8a (At4g21980) for NMR structure determination / Y.K. Chae, H. Im, Q. Zhao, J.H. Doelling, R.D. Vierstra, J.L. Markley // *Protein Exp. Purif.* – 2004. – V. 34. – P. 280–283.
41. **Chae, Y.K.** ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of a protein involved in the autophagy process, At4g21980.1 from *Arabidopsis thaliana* / Y.K. Chae, K. Lee, J.L. Markley // *J. Biomol. NMR.* – 2005. – V. 32. – P. 337.
42. **Chen, Y.** Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? / Y. Chen, S.B. Gibson // *Autophagy.* – 2008. – V. 4. – P. 246–248.
43. **Cheong, Y.H.** Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis* / Y.H. Cheong, H-S. Chang, R. Gupta, X. Wang, T. Zhu, S. Luan // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. – P. 661–677.
44. **Chichkova, N.V.** A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response // N.V. Chichkova, S.H. Kim, E.S. Titova, M. Kalkum, V.S. Morozov, Y.P. Rubtsov, N.O. Kalinina, M.E. Taliansky, A.B. Vartapetian // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16. – P. 157–171.
45. **Chichkova, N.V.** Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity // N.V. Chichkova, J. Shaw, R.A. Galiullina, G.E. Drury, A.I. Tuzhikov, S.H. Kim, M. Kalkum, T.B. Hong, E.N. Gorshkova, L.

- Torrance, A.B. Vartapetian, M. Taliansky // *EMBO J.* – 2010. – V.29. – P. 1149–1161.
46. **Coffeen, W.C.** Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa* / W.C. Coffeen, T.J. Wolpert // *Plant Cell.* – 2004. – V. 16. – P. 857–873.
47. **Coll, N. S.** Arabidopsis type I metacaspases control cell death / N.S. Coll, D. Vercammen, A. Smidler, C. Clover, F. Van Breusegem, J.L. Dangl, P. Epple // *Plant J.* – 2010. – V. 330. – P. 1393–1397.
48. **Coyle, J.E.** Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding / J.E. Coyle, S. Qamar, K.R. Rajashankar, D.B. Nikolov // *Neuron.* – 2002. – V. 3. – P. 63–74.
49. **Crompton, M.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death / M. Crompton // *Biochem. J.* – 1999. – V. 341. – P. 233–249.
50. **Cuervo, A.M.** Autophagy: many paths to the same end / A.M. Cuervo // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – V. 263. – P. 55–72.
51. **Darsow, T.** A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole / T. Darsow, S.E. Rieder, S.D. Emr // *J. Cell Biol.* – 1997. – P.138. – V. 517–529.
52. **De Duve, C.** Functions of lysosomes / C. De Duve, R. Wattiaux // *Annu. Rev. Physiol.* – 1966. – V. 28. – P. 435–492.
53. **Degterev, A.** A decade of caspases / A. Degterev, M. Boyce, J. Yuan // *Oncogene* – 2003. – V. 22. – P. 8543–8567.
54. **Davis, J.H.** Refocusing revisited: an optimized, gradient-enhanced refocused HSQC and its applications in 2D and 3D NMR and in deuterium exchange experiments / J.H. Davis // *J. Biomol. NMR.* – 1995. – V. 5. – P. 433–437.
55. **Doelling, J.H.** The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana* / J.H. Doelling,

J.M. Walker, E.M. Friedman, A.R. Thompson, R.D. Vierstra // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 33105–33114.

56. **Dong, A.** Secondary structure of the pentraxin female protein in water determined by infrared spectroscopy: Effects of calcium and phosphorylcholine / A. Dong, B. Caughey, W.S. Caughey, K.S. Bhat, J.E. Coe // *Biochemistry.* – 1992a. – V. 31. – P. 9364–9370.

57. **Dong, A.** Redox-dependent changes in extended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra / A. Dong, P. Huang, W.S. Caughey // *Biochemistry.* – 1992b. – V. 31. – P. 182–189.

58. **Dove, S.K.** Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors / S.K.Dove, R.C. Piper, R.K. McEwen, J.W. Yu, M.C. King, D.C. Hughes, J. Thuring, A.B. Holmes, F.T. Cooke, R.H. Michell, P.J. Parker, M.A. Lemmon // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – P. 1922–1933.

59. **Dunn, W.A.Jr.** Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole // *J Cell Biol.* – 1990. – V. 110. – P. 1923–1933.

60. **English, L.** Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection / L. English, M. Chemali, J. Duron, C. Rondeau, A. Laplante, D. Gingras, D. Alexander, D. Leib, C. Norbury, R. Lippé, M. Desjardins // *Nat. Immunol.* – 2009. – V. 10. – P.480–487.

61. **Fader, C.M.** TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways / C.M. Fader, D.G. Sanchez, M.B. Mestre, M.I. Colombo // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1793. – P. 1901–1916.

62. **Farré, J.C.** Turnover of organelles by autophagy in yeast / J.C. Farré, R. Krick, S. Subramani, M. Thumm // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2009. – V. 21. – P. 522–530.

63. **Foyer, C.H.** Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses / C.H. Foyer, G. Noctor // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17. – P. 1866–1875.
64. **Fry, S.C.** Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals / S.C. Fry // *Biochem. J.* – 1998. – V. 332. – P. 507–515.
65. **Fry, S.C.** Primary cell wall metabolism: Tracking the careers of wall polymers in living plant cells / S.C. Fry // *New Phytol.* – 2004. – V. 161. – P. 641–675.
66. **Fujita, N.** The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy / N. Fujita, T. Itoh, H. Omori, M. Fukuda, T. Noda, T. Yoshimori // *Mol. Biol. Cell*. – 2008. – P. 19. – V. 2092–2100.
67. **Furuta, N.** Combinational soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes / N. Furuta, N. Fujita, T. Noda, T. Yoshimori, A. Amano // *Mol. Biol. Cell*. – 2010. – V. 21. – P. 1001–1010.
68. **Futami, J.** Convenient and efficient in vitro folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies / J. Futami, Y. Tsushima, H. Tada, M. Seno, H. Yamada // *J. Biochem.* – 2000. – P. 127. – P. 435–441.
69. **Galili, G.** Assembly and transport of seed storage proteins / G. Galili, Y. Altschuler, H. Levanony // *Trends Cell Biol.* – 1993. – V. 3. – P. 437–442.
70. **Galluzzi, L.** FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis / L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer // *Cell Res.* – 2011. – V. 21. – P. 1383–1385.
71. **Gao, C.** Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure / C. Gao, D. Xing, L. Li, L. Zhang // *Planta*. – 2008. – V. 227. – P. 755–767.

72. **Geng, J.** Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy / J. Geng, M. Baba, U. Nair, D.J. Klionsky // *J. Cell Biol.* – 2008. – P. 182. – V. 129–140.
73. **Geng, J.** Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisia* // J. Geng, U. Nair, K. Yasumura-Yorimitsu, D.J. Klionsky // *Mol. Biol. Cell.* – 2010. – V. 21. – P. 2257–2269.
74. **Ghezzi, P.** Redox proteomics: Identification of oxidatively, modified proteins / P. Ghezzi, V. Bonetto // *Proteomics.* – 2003. – V. 3. – P. 1145–1153.
75. **Ghiglione, H.O.** Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat / H.O. Ghiglione, F.G. Gonzalez, R. Serrago, S.B. Maldonado, C. Chilcott, J.A. Curá, D.J. Miralles, T. Zhu, J.J. Casal // *Plant J.* – 2008. – V. 55. – P. 1010–1024.
76. **Gordon, P.B.** Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways / P.B. Gordon, P.O. Seglen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – V. 151. – P. 40–47.
77. **Gustavsson, N.** A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein / N. Gustavsson, B.P. Kokke, U. Härndahl, M. Silow, U. Bechtold, Z. Poghosyan, D. Murphy, W.C. Boelens, C. Sundby // *Plant J.* – 2002. – V. 29. – P. 545–553.
78. **Gutierrez, M.G.** Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells / M.G. Gutierrez, D.B. Munafo, W. Beron, J. Colombo // *Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – P. 2687–2697.
79. **Hailey, D.W.** Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation / D.W. Hailey, A.S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P.K. Kim, J. Lippincott-Schwartz // *Cell.* – 2010. – V. 141. – P. 656–667.
80. **Halliwell, B.** Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge – Ed.: Oxford: Oxford Univ. Press, 1999. – 936 p.

81. **Halliwell, B.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life / B. Halliwell // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 312–322.
82. **Hamasaki, M.** Where do they come from? Insights into autophagosome formation / M. Hamasaki, T. Yoshimori // *FEBS Lett.* – 2010. – V. 584. – P. 1296–1301.
83. **Han, D.** Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space / D. Han, E. Williams, E. Cadenas // *Biochem. J.* – 2001. – V. 353. – P. 411–416.
84. **Hanada, T.** The ATG12-ATG5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy / T. Hanada, N.N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, F. Inagaki, Y. Ohsumi // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 37298–37302.
85. **Hanaoka, H.** Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene / H. Hanaoka, T. Noda, Y. Shirano, T. Kato, H. Hayashi, D. Shibata, S. Tabata, Y. Ohsumi // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. – P. 1181–1193.
86. **Hara-Nishimura, I.** Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death / I. Hara-Nishimura, N. Hatsugai, S. Nakaune, M. Kuroyanagi, M. Nishimura // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – V. 8. – P. 404–408.
87. **Hatsugai, N.** A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death / N. Hatsugai, M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, S. Tsuda, M. Kondo, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // *Science.* – 2004. – V. 305. – P. 855–858.
88. **Hatsugai, N.** A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death / N. Hatsugai, M. Kuroyanagi, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura // *Apoptosis.* – 2006. – V. 11. – P. 905–911.
89. **Hayashi-Nishino, M.** A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation / M. Hayashi-Nishino, N. Fujita, T. Noda,

- A. Yamaguchi, T. Yoshimori, A. Yamamoto // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – V. 11. – P. 1433–1437.
90. **Hayward, A.P.** Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation / A.P.Hayward, J.Tsao, S.P.Dinesh-Kumar // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2009. – V. 20. – P. 1041–1047.
91. **Hayward, A.P.** What can plant autophagy do for an innate immune response? / A.P.Hayward, S.P.Dinesh-Kumar // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2010. – V. 49. – P. 4.1–4.20.
92. **He, C.** The Beclin 1 interactome / C. He, B. Levine // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – V. 22. – P. 140–149.
93. **He, R.** Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis death / R. He, G.E. Drury, V.I. Rotari, A. Gordon, M. Willer, T. Farzaneh, E.J. Woltering, P. Gallois // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 282. – P. 774–783.
94. **Hofius, D.** Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis / D. Hofius, T. Schultz-Larsen, J. Joensen, D.I. Tsitsigiannis, N.H. Petersen, O. Mattsson, L.B. Jørgensen, J.D. Jones, J. Mundy, M. Petersen // *Cell.* – 2009. – V. 137. – P. 773–783.
95. **Hwang, T.-L.** Water suppression that works - excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients / T.-L. Hwang, A.J. Shaka // *J. Magn. Reson. Series A.* – 1995. – V. 112. – P. 275–279.
96. **Ichimura, Y.** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation / Y. Ichimura, T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, T. Noda, Y. Ohsumi // *Nature.* – 2000. – P. 408. – V. 488–492.
97. **Inoue, Y.** AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells / Y.Inoue, T.Suzuki, M.Hattori, K.Yoshimoto, Y.Ohsumi, Y.Moriyasu // *Plant Cell Physiol.* – 2006. – V. 47. – P. 1641–1652.

98. **Isbell, H.S.** Reactions of carbohydrates with hydroperoxides. Oxidation of aldoses with sodium peroxide / H.S. Isbell, H.L. Frush, E.T. Martin // *Carbohydr. Res.* – 1973. – V. 26. – P. 287–295.
99. **Ishida, H.** Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy / H. Ishida, K. Yoshimoto // *Autophagy.* – 2008. – V. 4. – P. 961–962.
100. **Ishihara, N.** Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion / N. Ishihara, M. Hamasaki, S. Yokota, K. Suzuki, Y. Kamada, A. Kihara, T. Yoshimori, T. Noda, Y. Ohsumi // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – V. 12. – P. 3690–3702.
101. **Itakura, E.** Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG // E. Itakura, C. Kishi, K. Inoue, N. Mizushima // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – P. 19. – V. 5360–5372.
102. **Itakura, E.** p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding / E. Itakura, N. Mizushima // *J. Cell Biol.* – 2011. – V. 192. – P. 17–27.
103. **Itoh, T.** Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation / T. Itoh, N. Fujita, E. Kanno, A. Yamamoto, T. Yoshimori, M. Fukuda // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – V. 19. – P. 2092–2100.
104. **Ježek, P.** Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism / P. Ježek, L. Hlavatá // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – V. 37. – P. 2478–2503.
105. **Johansen, T.** Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins / T. Johansen, T. Lamark // *Autophagy.* – 2011. – V. 7. – P. 279–296.
106. **Juhasz, G.** Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source / G. Juhasz, T.P. Neufeld // *PLoS Biol.* – 2006. – V. 4. – P. e36.
107. **Kabeya, Y.** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing / Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, T. Yoshimori // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – P. 5720–5728.

108. **Kamada, Y.** Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex / Y.Kamada, T.Funakoshi, T.Shintani, K.Nagano, M.Ohsumi, Y.Ohsumi // *J Cell Biol.* – 2000. – V. 150. – P. 1507–1513.
109. **Kanki, T.** Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism / T. Kanki, D.J. Klionsky // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – P. 32386–32393.
110. **Kanki, T.** A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy / T. Kanki, K. Wang, M. Baba, C.R. Bartholomew, M.A. Lynch-Day, Z. Du, J. Geng, K. Mao, Z. Yang, W.L. Yen, D.J. Klionsky // *Mol. Biol. Cell.* – 2009a. – V. 20. – P. 4730–4738.
111. **Kanki, T.** Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy / T. Kanki, K. Wang, M. Baba, D.J. Klionsky // *Dev. Cell.* – 2009b. – V. 17. – P. 98–109.
112. **Kihara, A.** Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae* / A.Kihara, T.Noda, N.Ishihara, Y.Ohsumi // *J. Biol Chem.* – 2001. – V. 152. – P. 519–530.
113. **Kim, I.** Selective degradation of mitochondria by mitophagy / I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, J.J. Lemasters // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2007. – V. 462. – P. 245–253.
114. **Kirisako, T.** Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast / T. Kirisako, M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda, Y. Ohsumi // *J. Cell Biol.* – 1999. – V. 147. – P. 435–446.
115. **Kirisako, T.** The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway / T. Kirisako, Y. Ichimura, H. Okada, Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. Ohsumi, T. Takao, T. Noda, Y. Ohsumi // *J. Cell. Biol.* – 2000. – V. 151. – P. 263–276.

116. **Kissova, I.** Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria / I. Kissova, M. Deffieu, S. Manon, N. Camougrand // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 39068–39074.
117. **Kraft, C.** Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease / C. Kraft, A. Deplazes, M. Sohrmann, M. Peter // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – V. 10. – P. 602–610.
118. **Kroemer, G.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87. – P. 99–163.
119. **Kumeta, H.** The NMR structure of the autophagy-related protein Atg8 / H. Kumeta, M. Watanabe, H. Nakatogawa, M. Yamaguchi, K. Ogura, W. Adachi, Y. Fujioka, N.N. Noda, Y. Ohsumi, F. Inagaki // *J. Biomol. NMR.* – 2010. – V. 47. – P. 237–241.
120. **Kuroyanagi, M.** New diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their antioxidative activity / M. Kuroyanagi, M. Shimomae, Y. Nagashima, N. Muto, T. Okuda, N. Kawahara, T. Nakane, T. Sano // *Chem. Pharm. Bull.* – 2005. – V. 53. – P. 1519–1523.
121. **Kuzuoglu-Ozturk, D.** Autophagy-related gene, TdAtg8, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response / D. Kuzuoglu-Ozturk, O. Cebeci Yalcinkaya, B.A. Akpinar, G. Mitou, G. Korkmaz, D. Gozuacik, H. Budak // *Planta.* – 2012. – V. 236. – P. 1081–1092.
122. **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
123. **Legakis, J.E.** A cycling protein complex required for selective autophagy / J.E. Legakis, W.L. Yen, D.J. Klionsky // *Autophagy.* – 2007. – V. 3. – P. 422–432.
124. **Lenz, H.D.** Autophagy controls plant basal immunity in a pathogenic lifestyle-dependent manner / H.D. Lenz, E. Haller, E. Melzer, A.A. Gust, T. Nürnberger // *Autophagy.* – 2011. – V. 7. – P. 773–774.

125. **Levanony, H.** Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles / H. Levanony, R. Rubin, Y. Altschuler, G. Galili // *J. Cell Biol.* – 1992. – V. 119. – P. 1117–1128.
126. **Levine, A.** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response / A. Levine, R. Tenhaken, R. Dixon, C. Lamb // *Cell.* – 1994. – V. 79. – P. 583–593.
127. **Levine, B.** Autophagy in immunity and inflammation / B. Levine, N. Mizushima, H.W. Virgin // *Nature.* – 2011. – V. 469. – P. 323–335.
128. **Levine, R.L.** Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins / R.L. Levine, L. Mosoni, B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – P. 15036–15040.
129. **Li, F.** Autophagy: multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling / F. Li, R.D. Vierstra // *Trends Plant Sci.* – 2012. – V. 17. – P. 526–537.
130. **Liang, X.H.** Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 / X.H. Liang, S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, B. Levine // *Nature.* – 1999. – V. 402. – P. 672–676.
131. **Liou, W.** The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles / W. Liou, H.J. Geuze, M.J. Geelen, J.W. Slot // *J. Cell Biol.* – 1997. – V. 136. – P. 61–70.
132. **Liu, F.** Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize / F. Liu, X.Q. Cui, H.T. Horner, H. Weiner, P.S. Schnable // *Plant Cell.* – 2001. – V. 12. – P. 1063–1078.
133. **Liu, Y.** Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response / Y. Liu, M. Schiff, K. Czymmek, Z. Tallóczy, B. Levine, S.P. Dinesh-Kumar // *Cell.* – 2005. – V. 121. – P. 567–577.
134. **Liu, Y.** Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants / Y. Liu, Y. Xiong, D.C. Bassham // *Autophagy.* – 2009. – V. 5. – P. 954–963.

135. **Liu, Y.** TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana* / Y.Liu, D.C.Bassham // PLoS One. – 2010. – V. 5. – P. 11883.
136. **Locke, M.** The role of the Golgi complex in the isolation and digestion of organelles / M. Locke, A.K. Sykes // Tissue Cell. – 1975. – V. 7. – P. 143–158.
137. **Longatti, A.** Vesicular trafficking and autophagosome formation / A. Longatti, S.A. Tooze // Cell Death Differ. – 2009. – V. 16. – P. 956–965.
138. **Lord, C.E.** Do mitochondria play a role in remodelling lace plant leaves during programmed cell death? / C.E. Lord, J.N. Wertman, S. Lane, A.H. Gunawardena // BMC Plant Biol. – 2011. – V. 11. – P. 102.
139. **Lord, C.E.** Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants / C.E. Lord, A.H. Gunawardena // Eur. J. Cell Biol. – 2012. – V.91. – P. 603–613.
140. **Manjithaya, R.** Molecular mechanism and physiological role of pexophagy / R. Manjithaya, T.Y. Nazarko, J.C. Farre, S. Subramani // FEBS Lett. – 2010a. – V. 584. – P. 1367–1337.
141. **Manjithaya, R.** A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways / R Manjithaya, S. Jain, J.C. Farre, S. Subramani // J. Cell Biol. – 2010b. – V. 189. – P. 303–310.
142. **Matsunaga, K.** Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages / K. Matsunaga, T. Saitoh, K. Tabata, H. Omori, T. Satoh, N. Kurotori, I. Maejima, K. Shirahama-Noda, T. Ichimura, T. Isobe, S. Akira, T. Noda, T.Yoshimori // Nat. Cell Biol. – 2009. – V. 11. – P. 385–396.
143. **Maxwell, D.P.** The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells / D.P. Maxwell, Y. Wang, L. McIntosh // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96. – P. 8271–8276.
144. **Meng, F.** Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase / F. Meng, Y. Park, H. Zhou // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2001. – V. 33. – P. 701–709.
145. **Millenaar, F.F.** The alternative oxidase: in vivo regulation and function / F.F. Millenaar, H. Lambers // Plant Biol. – 2003. – V. 5. – P. 2–15.

146. **Minibayeva, F.V.** Contribution of a plasma membrane redox system to the superoxide production by wheat roots / F.V. Minibayeva, O.P. Kolesnikov, L.K. Gordon // *Protoplasma*. – 1998. – V. 205. – P. 101–106.
147. **Minibayeva, F.V.** Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells / F.V. Minibayeva, L.K. Gordon, O.P. Kolesnikov, A.V. Chasov // *Protoplasma*. – 2001. – V. 217. P. 125–128.
148. **Minibayeva, F.** Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species / F. Minibayeva, O. Kolesnikov, A. Chasov, R.P. Beckett, S. Lüthje, N. Vylegzhanina, F. Buck, M. Böttger // *Plant, Cell & Environment*. – 2009. – V. 32. – P. 497–508.
149. **Minibayeva, F.** Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria / F. Minibayeva, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, V. Ryabovol // *Plant Physiol. Biochem.* – 2012. – V. 59. - P. 11–19.
150. **Mittler, R.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 405–410.
151. **Mizushima, N.** Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells / N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiya, Y. Ohsumi, T. Yoshimori // *J. Cell Biol.* – 2001. – V. 152. – P. 657–668.
152. **Mizushima, N.** The role of autophagy in quality control inside neural cells / N. Mizushima // *Rinsho Shinkeigaku*. – 2006. – V. 46. –P. 885–886.
153. **Mizushima, N.** The role of Atg proteins in autophagosome formation / N. Mizushima, T. Yoshimori, Y. Ohsumi // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2011. – P. 27. – V. 107–132.
154. **Mohrlüder, J.** Structure and potential function of gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein / J. Mohrlüder, M. Schwarten, D. Willbold // *FEBS J.* – 2009. – V. 276. – P. 4989–5005.

155. **Møller, I.M.** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I.M. Møller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 561–591.
156. **Møller, I.M.** Oxidative modifications to cellular components in plants / I.M. Møller, P.E. Jensen, A. Hansson // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – V. 58. – P. 459–481.
157. **Mortensen, M.** Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: Clearly important, but just how much so? / M. Mortensen, D.J. Ferguson, A.K. Simon // *Cell Cycle.* – 2010. – V. 9. – P. 1901–1906.
158. **Nakatogawa, H.** Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion / H. Nakatogawa, Y. Ichimura, Y. Ohsumi // *Cell.* – 2007. – V. 130. – P. 165–178.
159. **Nakatogawa, H.** Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast / K.Suzuki, Y.Kamada, Y.Ohsumi // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – P. 458–467.
160. **Narendra, D.** Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy / D. Narendra, A. Tanaka, D.F. Suen, R.J. Youle // *J. Cell Biol.* – 2008. – V. 183. – P. 795–803.
161. **Navrot, N.** Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria / N. Navrot, N. Rouhier, E. Gelhaye, J.-P. Jacquo // *Physiol. Plant.* – 2007. – V. 129. – P. 185–195.
162. **Nazarko, T.Y.** Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins / T.Y. Nazarko, J.C. Farre, S. Subramani // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – V. 20. – P. 3828–3839.
163. **Noda, N.N.** Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy / H. Kumeta, H. Nakatogawa, K. Satoo, W. Adachi, J. Ishii, Y. Fujioka, Y. Ohsumi, F. Inagaki // *Genes Cells.* – 2008. – V. 13. – P. 1211–1218.
164. **Noda, N.N.** Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy / N.N. Noda, Y. Ohsumi, F. Inagaki // *FEBS Lett.* – 2010. – V. 584. – P. 1379–1385.

165. **Novak, I.** Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance / I. Novak, V. Kirkin, D.G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F. Löhr, D. Popovic, A. Occhipinti, A.S. Reichert, J. Terzic, V. Dötsch, P.A. Ney, I. Dikic // *EMBO J.* – 2010. – V. 11. – P. 45–51.
166. **Obara, K.** Dynamics and function of PtdIns(3)P in autophagy / K.Obara, Y.Ohsumi // *Autophagy.* – 2008. – V.4. – P. 952–954.
167. **Okamoto, K.** Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy / K. Okamoto, N. Kondo-Okamoto, Y. Ohsumi // *Dev. Cell.* – 2009. – V. 17. – P. 87–97.
168. **Orozco-Cárdenas, M.L.** Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. / M.L. Orozco-Cárdenas, J. Narvaez-Vasquez, C.A. Ryan // *Plant Cell.* – 2001. – V. 13. – P. 179–191.
169. **Ossareh-Nazari, B.** Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy / B. Ossareh-Nazari, M. Bonizec, M. Cohen, S. Dokudovskaya, F. Delalande, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, C. Dargemont // *EMBO J.* – 2010. – V. 11. – P. 548–554.
170. **Ouyang, L.** Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis / L. Ouyang, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. // *Cell Prolif.* – 2012. – V.45. –P. 487–498.
171. **Panda, M.** Productive and nonproductive intermediates in the folding of denatured rhodanese / M.Panda, B.M. Gorovits, P.M. Horowitz // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 63–70.
172. **Pankiv, S.** FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport / S. Pankiv, E.A. Alemu, A. Brech, J.A. Bruun, T. Lamark, A. Overvatn, G. Bjørkøy, T. Johansen // *J. Cell Biol.* – 2010. – V. 188. – P. 253–269.
173. **Paolacci, A.R.** Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat / A.R. Paolacci, OA Tanzarella, E. Porceddu, M. Ciaffi // *BMC Mol. Biol.* – 2009. – 10:11.

174. **Paz, Y.** Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p / Y. Paz, Z. Elazar, D. Fass // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 25445–25450.
175. **Pfaffl, M.W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M.W. Pfaffl // *Nucleic. Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. e45.
176. **Phillips, A.R.** The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana* // A.R. Phillips, A. Suttangkakul, R.D. Vierstra // *Genetics.* – 2008. – V. 178. –P. 1339–1353.
177. **Randow, F.** How cells deploy ubiquitin and autophagy to defend their cytosol from bacterial invasion / F.Randow // *Autophagy.* – 2011. – V. 7. – P. 304–309.
178. **Rasmusson, A.G.** Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria / A.G. Rasmusson, K.L. Soole, T.E. Elthon // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 23–39.
179. **Ravikumar, B.** Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures / B. Ravikumar, K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, D.C. Rubinsztein // *Nat. Cell Biol.* – 2010. – V. 12. – P. 747–757.
180. **Reggiori, F.** Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae* / F. Reggiori, C.W. Wang, U. Nair, T. Shintani, H. Abeliovich, D.J. Klionsky // *Mol. Biol. Cell.* – 2004a. – V. 15. – P. 2189–2204.
181. **Reggiori, F.** The Atg1–Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure / F.Reggiori, K.A.Tucker, P.E.Stromhaug, D.J. Klionsky // *Dev. Cell.* – 2004b. – V. 6. – P. 79–90.
182. **Rinalducci, S.** Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants / S. Rinalducci, L. Murgiano, L. Zolla // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 3781–3801.
183. **Robson, C.A.** Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and –independent

pathways of programmed cell death / C.A. Robson, G.C. Vanlerberghe // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. P. – 1908–1920.

184. **Rose, T.L.** Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis* / T.L. Rose, L. Bonneau, C. Der, D. Marty-Mazars, F. Marty // *Biol. Cell.* – 2006. – V. 98. – P. 53–67.

185. **Ross, C.** Involvement of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the wound response of *Dasycladus vermicularis* / C. Ross, F.C. Küpper, R.S. Jacobs // *Chemistry and Biology.* – 2006. – V. 13. – P. 353–364.

186. **Sanger, F.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – V. 74. – P. 5463–5467.

187. **Schansker, G.** Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP / G. Schansker, S.Z. Tóth, R.J. // *Strasser Biochim Biophys Acta.* – 2005. – V. 1706. – P. 250–261.

188. **Scherz-Shouval, R.** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 / R. Scherz-Shouval, E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, Z. Elazar // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – P. 1749–1760.

189. **Scherz-Shouval, R.** Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology / R. Scherz-Shouval, Z. Elazar // *Trends Biochem. Sci.* – 2010. – V. 36. – P. 30–38.

190. **Schmelzle, T.** TOR, a central controller of cell growth / T. Schmelzle, M.N. Hall // *Cell.* – 2000. – V. 103. – P. 253 – 262.

191. **Schopfer, P.** Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth / P. Schopfer, A. Liskay, M. Bechtold, G. Frahry, A. Wagner // *Planta.* – 2002. – V. 214. – P. 821–828.

192. **Scott, I.** Mitochondria and cell death pathways in plants: Actions speak louder than words / I. Scott, D.C. Logan // *Plant Signal Behav.* – 2008. – V. 3. – P. 475–477.

193. **Seglen, P.O.** Lysosomes: Their role in protein breakdown / P.O. Seglen / Ed.: H. Glaumann, F.J. Ballard. – Orlando, London, 1987. – P. 371–414.
194. **Shahnazari, S.** Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway / S. Shahnazari, J.H. Brumell // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2011. – V. 14. – P. 68–75.
195. **Shang, F.** Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress / F. Shang, A. Taylor // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – V. 51. – P. 5–16.
196. **Shen, B.** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts / B. Shen, R.G. Jensen, H.J. Bohnert // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 113. – P. 1177–1183.
197. **Shibata, M.** TheMAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation / M. Shibata, K. Yoshimura, N. Furuya, M. Koike, T. Ueno, M. Komatsu, H. Arai, K. Tanaka, E. Kominami, Y. Uchiyama // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 382. – P. 419–423.
198. **Shin, J.H.** OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice / J.H. Shin, K. Yoshimoto, Y. Ohsumi, J.S. Jeon, G. An // *Mol Cells.* – 2009. – V. 27. – P. 67–74.
199. **Shpilka, T.** Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family / T. Shpilka, H. Weidberg, S. Pietrokovski, Z. Elazar // *Genome Biol.* – 2011. – V. 12. – P. 226.
200. **Shy, G.** Expression patterns of genes encoding endomembrane proteins support a reduced function of the Golgi in wheat endosperm during the onset of storage protein deposition / G. Shy, L. Ehler, E. Herman, G. Galili // *J. Exp. Bot.* – 2001. – V. 52. – P. 2387–2388.
201. **Singh, R.** Autophagy regulates lipid metabolism / R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A.M. Cuervo, M.J. Czaja // *Nature.* – 2009. – V. 458. – P. 1131–1135.

202. **Skulachev, V.P.** Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group / V.P. Skulachev // *Aging Cell*. – 2004 – V. 3 – P. 17–19.
203. **Sláviková, S.** The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants / S.Sláviková, G.Shy, Y.Yao, R.Glozman, H.Levanony, S.Petrokovski, Z.Elazar, G.Galili // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56. – P. 2839–2849.
204. **Sláviková, S.** An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses / S.Sláviková, S.Ufaz, T.Avin-Wittenberg, H.Levanony, G.Galili // *J. Exp. Bot.* – 2008 – V. 59. – P. 4029–4043.
205. **Smirnoff, N.** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes / N. Smirnoff, Q.J. Cumbes // *Phytochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 1057–1060.
206. **Smith, C.M.** Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly? / C.M. Smith, Y. Chen, M.L. Sullivan, P.M. Kochanek, R.S. Clark // *Neurobiol. Dis.* – 2011. – V. 43. – P. 52–59.
207. **Soejima, K.** An efficient refolding method for the preparation of recombinant human prethrombin-2 and characterization of the recombinant-derived alpha-thrombin / K. Soejima, N. Mimura, H. Yonemura, H. Nakatake, T. Imamura, C. Nozaki // *J. Biochem.* – 2001. – V. 130. – P. 269–277.
208. **Spadaro, D.** The Redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications / D. Spadaro, B.W. Yun, S.H. Spoel, C. Chu, Y.Q. Wang, G.J. Loake // *Physiol. Plant.* – 2010. – V. 138. – P. 360–371.
209. **Stangler, T.** Solution structure of human GABA(A) receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation / T. Stangler, L.M. Mayr, D. Willbold // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 13363–13366.
210. **Stennicke, H.R.** Caspase assays / H.R. Stennicke, G.S. Salvesen // *Methods Enzymol.* – 2000. – V. 322. – P. 91–100.

211. **Su, W.** Identification and characterization of two rice autophagy associated genes, OsAtg8 and OsAtg4 // W. Su, H. Ma, C. Liu, J. Wu, J. Yang // *Mol. Biol. Rep.* – 2006. – V. 33. – P. 273–278.
212. **Suarez, M. F.** Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis / M. F. Suarez, L. H. Filonova, A. Smertenko, E. I. Savenkov, D. H. Clapham, S. von Arnold, B. Zhivotovsky, P. V. Bozhkov // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14. – P. 339–340.
213. **Sugawara, K.** The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8 / K. Sugawara, N.N. Suzuki, Y. Fujioka, N. Mizushima, Y. Ohsumi, F. Inagaki // *Genes Cells.* – 2004. – V. 9. – P. 611–618.
214. **Susi, H.** Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes / Susi H., Byler D.M. // *Methods Enzymol.* – 1986. – V. 130. – P. 290–311.
215. **Suttangkakul, A.** The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis* / A.Suttangkakul, F.Li, T.Chung, R.D.Vierstra // *Plant Cell.* – 2011. – V. 23. – P. 3761–3779.
216. **Suzuki, K.** The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation / K. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, Y. Ohsumi // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – P. 5971–5781.
217. **Suzuki, K.** Current knowledge of the preautophagosomal structure (PAS) / K.Suzuki, Y.Ohsumi // *FEBS Lett.* – 2010. – V. 584. – P. 1280–1286.
218. **Svenning, S.** Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1 / S. Svenning, T. Lamark, K. Krause, T. Johansen // *Autophagy.* – 2011. – V. 7 – P. 993–1010.
219. **Swanson, S.** ROS in plant development / S. Swanson, S. Gilroy // *Physiol. Plant.* – 2010. – V. 138. – P. 384–392.

220. **Taguchi-Atarashi, N.** Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy / N. Taguchi-Atarashi, M. Hamasaki, K. Matsunaga, H. Omori, N.T. Ktistakis, T. Yoshimori, T. Noda // *Traffic*. – 2010. – P. 4. – V. 468–478.
221. **Takatsuka, C.** Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: isolation of the autolysosome and its characterization / C. Takatsuka, Y. Inoue, T. Higuchi, S. Hillmer, D.G. Robinson, Y. Moriyasu // *Plant Cell Physiol*. – 2011. – V. 52. – P. 2074–2087.
222. **Tal, M.C.** Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling / M.C. Tal, M. Sasai, H.K. Lee, B. Yordy, G.S. Shadel, A. Iwasaki // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106. – P. 2770–2775.
223. **Tanida, I.** Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy / I. Tanida // *Antioxid. Redox Signal*. – 2011. – V. 14. – P. 2201–2214.
224. **Thannickal, V.J.** Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg, J. Am // *Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. – 2000. – V. 279. – P. L1005–L1028.
225. **Tooze, J.** In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome / J. Tooze, M. Hollinshead, T. Ludwig, K. Howell, B. Hoflack, H. Kern // *J. Cell Biol*. – 1990. – V. 111. – P. 329–345.
226. **Toyooka, K.** Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components / K. Toyooka, T. Okamoto, T. Minamikawa // *J. Cell Biol*. – 2001. – V. 154. – P. 973–982.
227. **Tsiatsiani, L.** Metacaspases / L. Tsiatsiani, F. Van Breusegem, P. Gallois, A. Zaviyalov, E. Lam, P.V. Bozhkov // *Cell Death Differ*. – 2011. – V. 18. P. 1279–1288.
228. **Tsugane, K.** A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification

/ K Tsugane, K. Kobayashi, Y. Niwa, Y. Ohba, K. Wada, H.Kobayashi // *Plant Cell*. – 1999. – V. 11. – P. 1195–1206.

229. **Tsukada, M.** Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* / M.Tsukada, Y.Ohsumi // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 333. – P. 169–174.

230. **Turner, S.** Tracheary element differentiation / S. Turner, P. Gallois, D. Brown // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – V. 58. – P. 407–433.

231. **Turrens, J.F.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F.Turrens // *J. Physiol.* – 2003. – V. 552. – P. 335–344.

232. **Ueda, E.K.** Current and prospective applications of metal ion-protein binding / E.K. Ueda, P.W. Gout, L. Morganti // *J. Chromatogr.* – 2003. – P. 988. – P. 1–23.

233. **Uren, A.G.** Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma / A.G. Uren, K. O'Rourke, L.A. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E.V. Koonin, V.M. Dixit // *Mol. Cell* – 2000. – V. 6. – P. 961–967.

234. **Van der Vaart, A.** Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // A. Van Der Vaart, J. Griffith, F. Reggiori // *Mol. Biol. Cell*. – 2010. – V. 21. – P. 2270–2284.

235. **Van der Wilden, W.** Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles / W.Van der Wilden, E.M.Herman, M.J.Chrispeels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980. – V. 77. – P. 428–432.

236. **Van Doorn, W.G.** Morphological classification of plant cell deaths / W.G. Van Doorn, E.P. Beers, J.L. Dangl, V.E. Franklin-Tong, P. Gallois, I. Hara-Nishimura, A.M. Jones, M. Kawai-Yamada, E. Lam, J. Mundy, L.A. Mur, M. Petersen, A. Smertenko, M. Taliansky, F. Van Breusegem, T. Wolpert, E. Woltering, B. Zhivotovsky, P.V. Bozhkov // *Cell Death Differ.* – 2011. – V. 18. – P. 1241–1246.

237. **Vanhee, C.** The Arabidopsis multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an

- autophagy-dependent degradation mechanism / C. Vanhee, G. Zapotoczny, D. Masquelier, M. Ghislain, H. Batoko // *Plant Cell*. – 2011. – V. 23. – P. 785–805.
238. **Vanlerberghe, G.C.** Alternative oxidase: from gene to function / G.C. Vanlerberghe, L. McIntosh // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* – 1997. – V. 48. – P. 703–734.
239. **Vanlerberghe, G.C.** Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death / G.C. Vanlerberghe, C.A. Robson, J.Y.H. Yip // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. – P. 1829–1842.
240. **Vartapetian, A.B.** A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases / A.B. Vartapetian, A.I. Tuzhikov, N.V. Chichkova, M. Taliansky, T.J. Wolpert // *Cell Death. Differ.* – 2011. – V. 18. – P. 1289–1297.
241. **Vercammen, D.** Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine / D. Vercammen, B. Van de Cotte, G. De Jaeger, D. Eeckhout, P. Casteels, K. Vandepoele, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, D. Inzé, F. Van Breusegem // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 45329–45336.
242. **Vercammen, D.** Are metacaspases caspases? / D. Vercammen, W. Declercq, P. Vandenameele, F. Van Breusegem // *J. Cell Biol.* – 2007. – V. 179. – P. 375–380.
243. **Vergne, I.** Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy / I. Vergne, E. Roberts, R.A. Elmaoued, V. Tosch, M.A. Delgado, T. Proikas-Cezanne, J. Laporte, V. Deretic // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – P. 2244–2258.
244. **Vierstra, R.D.** Proteolysis in plants: mechanisms and functions / R.D. Vierstra // *Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 32. – P. 275–302.
245. **Vranova, E.** Signal transduction during oxidative stress / E. Vranova, D. Inze, F. van Breusegem // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53. – P. 1227–1236.

246. **Wang, H.** GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton / H. Wang, F.K. Bedford, N.J. Brandon, S.J. Moss, R.W. Olsen // *Nature*. – 1999. – V. 397. – P. 69–72.
247. **Wang, Y.** The autophagy gene, ATG18a, plays a negative role in powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in Arabidopsis / Y. Wang, Y. Wu, D. Tang // *Plant Signal Behav.* – 2011a. – V. 6. – P. 1408–1410.
248. **Wang, Y.** ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in Arabidopsis / Y. Wang, M.T. Nishimura, T. Zhao, D. Tang // *Plant J.* – 2011b. – V. 68. – P. 74–87.
249. **Wang, J.** A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress / J. Wang, G.C. Vanlerberghe // *Physiol. Plant.* – 2013. – doi: 10.1111/ppl.12059.
250. **Watanabe, N.** Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses / N. Watanabe, E. Lam // *Plant J.* – 2011. – V. 66. – P. 969–982.
251. **Weidberg H.** LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis / H. Weidberg, E. Shvets, T. Shpilka, F. Shimron, V. Shinder, Z. Elazar // *EMBO J.* – 2010. – V. 29. – P. 1792–1802.
252. **Weigelt, J.** Removal of zero-quantum coherence in protein NMR spectra using SESAM decoupling and suppression of decoupling sidebands / J. Weigelt, A. Hammarstrom, W. Bermel, G. Otting // *J. Magn. Res.* – 1996. – V. 110. – P. 219–224.
253. **Wiseman, H.** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer / H. Wiseman, B. Halliwell // *Biochem. J.* – 1996. – V. 313. – P. 17–29.
254. **Xiao, M.** Rapamycin reduces burn wound progression by enhancing autophagy in deep second-degree burn in rats / M. Xiao, L. Li, Q. Hu, L. Ma, L. Liu, W. Chu, H. Zhang // *Wound Repair Regen.* – 2013. – doi: 10.1111/wrr.12090.

255. **Xiao, S.** The *Arabidopsis thaliana* ACBP3 regulates leaf senescence by modulating phospholipid metabolism and ATG8 stability / S. Xiao, M.L. Chye // *Autophagy*. – 2010. – V. 6. – P. 802–804.
256. **Xie, Z.** Autophagosome formation: core machinery and adaptations / Z.Xie, D.J.Klionsky // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 1102–1109.
257. **Xiong, Y.** Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis* / Y. Xiong, A.L. Contento, D.C. Bassham // *Autophagy*. – 2007. – V. 3. - P. – P. 257–258.
258. **Yamamoto, A.** Absence of cytochrome P-450 and presence of autolysosomal membrane antigens on the isolation membranes and autophagosomal membranes in rat hepatocytes / A. Yamamoto, R. Masaki, Y. Fukui, Y. Tashiro // *J. Histochem. Cytochem.* – 1990. – V. 38. – P. 1571–1581.
259. **Yamashita, S.** PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy / S. Yamashita, M. Oku, Y. Wasada, Y. Ano, Y. Sakai // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 173. – P. 709–717.
260. **Yano, K.** A novel type of autophagy occurs together with vacuole genesis in miniprotoplasts prepared from tobacco culture cells / K. Yano, M. Hattori, Y. Moriyasu // *Autophagy*. – 2007. – V. 3. – P. 215–221.
261. **Yang, Z.** Eaten alive: a history of macroautophagy / Z.Yang, D.J.Klionsky // *Nat. Cell Biol.* – 2010. – V. 12. – P. 814–822.
262. **Yao, N.** The mitochondrion – an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* / N. Yao, B.J. Eisfelder, J. Marvin, J.T. Greenberg // *Plant J.* – 2004. – V. 40. – P. 596–610.
263. **Yen, W.L.** Atg27 is required for autophagydependent cycling of Atg9 / W.L.Yen, J.E.Legakis, U.Nair, D.J.Klionsky // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – V. 18. – P. 581–593.
264. **Yen, W.L.** The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy / W.L.Yen, T. Shintani, U. Nair, Y. Cao, B.C. Richardson, Z. Li, F.M. Hughson, M. Baba, D.J. Klionsky // *J. Cell Biol.* – 2010. – V. 188. – P. 101–114.

265. **Ylä-Anttila, P.** 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum / P. Ylä-Anttila, H. Vihinen, E. Jokitalo, E.L. Eskelinen // *Autophagy*. – 2009. – V. 5. – P. 1180–1185.
266. **Yoshimoto, K.** Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy / K. Yoshimoto, H. Hanaoka, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Noda, Y. Ohsumi // *Plant Cell*. – 2004. – V. 16. – P. 2967–2983.
267. **Yoshimoto, K.** Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis / K. Yoshimoto, Y. Jikumaru, Y. Kamiya, M. Kusano, C. Consonni, R. Panstruga, Y. Ohsumi, K. Shirasu // *Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2914–2927.
268. **Young, A.R.J.** Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes / A.R.J. Young, E.Y.W. Chan, X.W. Hu, R. Köchl, S.G. Crawshaw, S. High, D.W. Hailey, J. Lippincott-Schwartz, S.A. Tooze // *J. Cell Sci*. – 2006. – V. 119. – P. 3888–3900.
269. **Yu, Z.Q.** Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy / Z.Q. Yu, T. Ni, B. Hong, H.Y. Wang, F.J. Jiang, S. Zou, Y. Chen, X.L. Zheng, D.J. Klionsky, Y. Liang, Z. Xie // *Autophagy*. – 2012. – V. 8. – P. 883–892.
270. **Zhong, Y.** Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex / Y. Zhong, Q.J. Wang, X. Li, Y. Yan, J.M. Backer, B.T. Chait, N. Heintz, Z. Yue // *Nat. Cell Biol*. – 2009. – V. 11. – P. 468–476.
271. **Zhu, J.K.** Cell signaling under salt, water and cold stresses / J.K. Zhu // *Curr. Opin. Plant Biol*. – 2001. – V. 4. – P. 401–406.
272. **Zientara-Rytter, K.** Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors / K. Zientara-Rytter, J. Lukomska, G. Moniuszko, R. Gwozdecki, P. Surowiecki, M. Lewandowska, F. Liszewska, A. Wawrzyńska, A. Sirko // *Autophagy*. – 2011 – V. 7. – P. 1145–1158.

ПРИЛОЖЕНИЕ

TaATG8a KF294807.1_ (59)	ATGGCGAAGAGCTCGTTCAAGCTGGAGCACCCGCTCGAGAGGAGGCAGGCCGAGGCTAACCCGATAAAGGGAGAAGTACTC
TaATG8b KF294808.1_ (15)	ATGGCGAAGAGCTCGTTCAAGCTGGAGCACCCGCTCGAGAGGAGGCAGGCCGAGGCTAACCCGATAAAGGGAGAAGTACTC
TaATG8c KF294809.1_ (53)	ATGGCGAAGAGCTCGTTCAAGCTGGAGCACCCGCTCGAGAGGAGGCAGGCCGAGGCTAACCCGATAAAGGGAGAAGTACTC
TaATG8d KF294810.1_ (15)	ATGGCGAAGAGCTCGTTCAAGCTGGAGCACCCGCTCGAGAGGAGGCAGGCCGAGGCTAACCCGATAAAGGGAGAAGTACTC
TaATG8e KF294811.1_ (59)	ATGGCGAAGAGCTCGTTCAAGCTGGAGCACCCGCTCGAGAGGAGGCAGGCCGAGGCTAACCCGATAAAGGGAGAAGTACTC
TaATG8f KF294812.1_ (13)	ATGGCGAAGAGCTCGTTCAAGCTGGAGCACCCGCTCGAGAGGAGGCAGGCCGAGGCTAACCCGATAAAGGGAGAAGTACTC
TaATG8g KF294813.1_ (91)	ATGGCCAAGACTTGCTTCAAGACCGAGCACCCCTGGAAAGGAGGCAAGCTGAATCTGCTAGGATCCGTGAGAAGTATGC
<u>TaATG8 clone2</u> (1)	ATGGCCAAGACTTGCTTCAAGACCGAGCACCCCTGGAAAGGAGGCAAGCTGAATCTGCTAGGATCCGTGAGAAGTATGC
TaATG8h KF294814.1_ (83)	ATG---AAG---TCCTTCAAGAAAGGAATCACCTTGAGAGGAGGCGGAATGAGTCGGCCGCCATGATCGCCAAGTACCC

TaATG8a KF294807.1_ (139)	TGACAGAATTCCTGTGATCGTTGAGAAGGCTGGGAAGAGTGATATTCCTGACATTGACAAGAAAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8b KF294808.1_ (95)	TGACAGAATTCCTGTGATCGTTGAGAAGGCTGGGAAGAGTGACATTTCCTGACATCGACAAGAAAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8c KF294809.1_ (133)	TGACAGAATTCCTGTGATCGTTGAGAAGGCTGGGAAGAGTGACATTTCCTGACATCGACAAGAAAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8d KF294810.1_ (95)	TGACAGAATTCCTGTGATCGTTGAGAAGGCTGGGAAGAGTGATATTCCTGACATTGACAAGAAAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8e KF294811.1_ (139)	TGACAGAATTCCTGTGATCGTTGAGAAGGCTGGGAAGAGTGATATTCCTGACATTGACAAGAAAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8f KF294812.1_ (93)	TGACAGAATTCCTGTGATCGTTGAGAAGGCTGGGAAGAGTGACATTTCCTGACATCGACAAGAAAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8g KF294813.1_ (171)	TGACAGAATTCGGTGTGATCGTTGAGAAGGCTGATAAGTCTGATGTCCCGGAAATGATAAGAGAAGTACCTTGTCCCTG
<u>TaATG8 clone2</u> (81)	TGACAGAATTCGGTGTGATCGTTGAGAAGGCTGATAAGTCTGATGTCCCGGAAATGATAAGAGAAGTACCTTGTCCCTG
TaATG8h KF294814.1_ (157)	CGGCAGGATCCCGTGTGTTGAAAGGTTTTCGAGGAGTAAACTTCCAGAAATGGAGAAGAGAAGTACCTTGTCCCTG

TaATG8a KF294807.1_ (219)	CCGACCTTACAGTTGGACAGTTCGTGTACGTTGTCGGGAAGCGGATCAAGCTCAGTGTGAGAAGGCGATCTTCATCTTT
TaATG8b KF294808.1_ (175)	CTGACCTTACAGTTGGACAGTTCGTGTACGTTGTCGGAAAGCGGATCAAGCTCAGCGCTGAGAAGGCGATCTTCATCTTT
TaATG8c KF294809.1_ (213)	CTGACCTTACAGTTGGACAGTTCGTGTACGTTGTCGGAAAGCGGATCAAGCTCAGCGCTGAGAAGGCGATCTTCATCTTT
TaATG8d KF294810.1_ (175)	CCGACCTTACGGTTGGACAGTTCGTGTATGTTGTCGGGAAGCGGATCAAGCTCAGTGTGAGAAGGCGATCTTCATCTTT
TaATG8e KF294811.1_ (219)	CTGATCTTACAGTTGGACAGTTCGTGTATGTCGTCGGGAAGCGGATCAAGCTCAGCGCTGAGAAGGCGATCTTCATCTTT
TaATG8f KF294812.1_ (173)	CTGACCTTACAGTTGGACAGTTCGTGTATGTCGTCGGGAAGCGGATCAAGCTCAGCGCTGAGAAGGCGATCTTCATCTTT
TaATG8g KF294813.1_ (251)	CCGACCTCACTGTTGGCCAGTTTGTCTACGTTGTCGGGAAGAGGATCAAGCTGAGCCAGAAAAGGCCATCTTCGTCCTT
<u>TaATG8 clone2</u> (161)	CCGACCTCACTGTTGGCCAGTTTGTCTACGTTGTCGGGAAGAGGATCAAGCTGAGCCAGAAAAGGCCATCTTCGTCCTT
TaATG8h KF294814.1_ (237)	GTGACATGCCAGTTGGGAGTTCATTTTCATCTCCGCTCCAGGTTACATCTGTCTCCAGGGACGGCGCTTTTCGTCGTTT

TaATG8a KF294807.1_ (299)	GTGAAGAACACTCTTCCACCGACAGCTGCCCTGATGCTGCCATTTACGAGGAGAACAAAGGACGAG---GATGGCTTCCT
TaATG8b KF294808.1_ (255)	GTGAAGAACACTCTTCCACCGACAGCTGCCCTGATGCTGCCATTTATGAGGAGAACAAAGGATGAG---GACGGCTTCCT
TaATG8c KF294809.1_ (293)	GTGAAGAACACTCTTCCACCGACAGCTGCCCTGATGCTGCCATTTATGAGGAGAACAAAGGACGAG---GACGGCTTCCT
TaATG8d KF294810.1_ (255)	GTGAAGAACACTCTTCCACCGACAGCTGCCCTGATGCTGCCATTTACGAGGAGAACAAAGGACGAG---GACGGCTTCCT
TaATG8e KF294811.1_ (299)	GTGAAGAACACTCTTCCACCTACAGCTGCCCTGATGCTGCCATTTACGAGGAGAACAAAGGACGAG---GACGGCTTCCT
TaATG8f KF294812.1_ (253)	GTGAAGAACACTCTTCCACCTACAGCTGCCCTGATGCTGCCATTTACGAGGAGAACAAAGGACGAG---GACGGCTTCCT
TaATG8g KF294813.1_ (331)	GTGAATAGCACCTTGCCACCGACTGCTTCGTTGATGTCAGCGATCTATGAAGAAAACAAGGACGAG---GACGGCTTCCT
<u>TaATG8 clone2</u> (241)	GTGAATAGCACCTTGCCACCGACTGCTTCGTTGATGTCAGCGATCTATGAAGAAAACAAGGACGAG---GACGGCTTCCT
TaATG8h KF294814.1_ (317)	GTGCGCAACACTTGCCTCCAGCCGCTAACCTGATGGTAGCGTGATGATTCGTACAAAGATAAGCAGGATGGCTTCCT

TaATG8a KF294807.1_ (376)	CTACATGACCTACAGCGGTGAGAACACCTTCGGATTGC-TCTAG
TaATG8b KF294808.1_ (332)	CTACATGACCTACAGCGGTGAGAACACCTTCGGATTGC-TCTAG
TaATG8c KF294809.1_ (370)	CTACATGACCTACAGCGCGGAGAACACCTTCGGATTGC-TCTAG
TaATG8d KF294810.1_ (332)	CTACATGACCTACAGCGCGGAGAACACCTTCGGATTGC-TCTAG
TaATG8e KF294811.1_ (376)	CTACATGACCTACAGCGCGGAGAACACCTTCGGATTGC-TCTAG
TaATG8f KF294812.1_ (330)	CTACATGACCTACAGCGCGGAGAACACCTTCGGATTGC-TCTAG
TaATG8g KF294813.1_ (408)	GTACATGACTTACAGTGGCGAGAACACTTTCGGCTCCG-CCTAA
<u>TaATG8 clone2</u> (318)	GTACATGACTTACAGTGGCGAGAACACTTTCGGCTCTG-CCTAA
TaATG8h KF294814.1_ (397)	CTACATGTGTACAGCAGCGGAGAAGACATTTGGGTGACATCTGC

Рис. 1. Результат выравнивания нуклеотидных последовательностей мРНК *TaATG8a-h T. aestivum*, представленных в базе данных NCBI, и клонированной последовательности *TaATG8 clone 2*. Красный цвет – 100 % идентичности, зеленый – 60-80 %, черный – 0 %.

ATGGCCAAGACTTGCTTCAAGACCGAGCACCCCCTGGGTTTGTCCTTCTCTCTTGCCCCTCTC
CCTGTTAATTTCTGTCATTTAGGCCCTGTCATGGTTGTTGATCTGATCGATAGTAGAATAAGAGACTGG
TAGCACACCAGTTGTTTCGCCTGAAACTAGTTTAGCCTTTTTTTACGTGACGTGATAATCTGGTTATAGT
TGATTGCTTCTGCGCTCAGGCAACGTGCTAATGTGTGTTATCCGTATGTTCTTTCTTGTCCCATATGCT
GTTGTTACATTATGGAGGGCAGATGGTTGTCCGCGTATTCAGATTGGTGTTCATTGAAGCACCATCT
ACACTAATGTTTCATATCTATTACATCAAAAGGATTAATAATCAATCGGAAGACTTAGTAATCAATTAG
TAGTCTCTGTTTTTCAGATTGAGTTGTATTCTTATTGAATGGTGTCTGGAAAGATAACTTTGGTCTTAGAT
GATTTTGTGGATATTAATTTGGTTTATCATCTTGCAATAGAAATTTACTCCCTCTGTAACAAATACAG
GAGTGTGTTAGATCACTACTTTAGATGATCTAAACGCTCTTATATTTCTTTATGGAGGGAGTACTTCTGA
GA CTATATCTCAATTCATATTCCTGAATGCCTTGCTTTCTGGATGCTCTTGTATAATTCCTGTTAATCAG
GTTTCGTAAGATTCTATTTAAGTAACCAGCAATTATGTGATCCTTTGGCACCTTCTGTCTTATTGGATGG
ATTGCCAAAAGTATTCCTCCATTTTGAAGGGACCTTAGGTTTTAAGAAATATTTACAAATGGTCTCA
AGTATTTCTTTTGTAACTATGTA CTACTATCTTGAGTGTGTTTCTGTTTTGCACTGGTTGATGCTTTTGTATA
TGCGCAGTTACTGTCTCCACTAAA ACTCTAATGAGAACATGTTCAAGCTTTAAATGTTTTTCCAGTTA
CTAGATATTTTCATCTCGTGTGATTA AAAATTACCCTTTTATAGAAAGGAGGCAAGCTGAATCTGCTAGG
ATCCGTGAGAAGTATGCTGACAGAATTCCGGTATATATATCTCTGGACTTACCTTCTACATGTGGTAGA
TTATCAACATTCATTTCTCTATTGAGTTCTGTGGTCAATTATTTAGGTGATCGTTGAGAAGGCTGAT
AAGTCTGATGTCCCGAAATTGATAAGAAGAAGTACAGCTATTCTTCTTCATCACTCGTATTCTGATGG
CAGATGAGCAGTTCTTTTCATTGTTTTCTGGGGTTGAGCTCTGCTCTCAGCTGCATCTAGAGATGCAAT
CTCTCCTTAACTTGCCAATATTTCA TTTCCATTTGTCTTGTATGCCATAACAATTTGTTATGTTTGGAT
GAGCTCCCTTCGATATAAATTGTTGGCTATTTGTTCTATTGTTTATTTAGTCTTGAAATAATTTCTTATCT
GCTGTTTCATGTTGGAATCTGTATTATTGATTTGTCTTGCTCTGTACAATGTTTCTTGCAGGTATCTTGTC
CCTGCCGACCTCACTGTTGGCCAGTTTGTCTACGTGGTGC GGAAGAGGATCAAGCTGAGCCCAGAAAA
GGCCATCTTCGTCTTTGTGAATAGCACCTTGCCACCGACTGGTAATGTTTTTAAATAAACATATTAATA
AATACTCCCTCCGTCCGAAAATACTTGT CATCAAAATGGACAAAAATGGATGTATCTAGAACTAAAAT
ACATCTAGATACATCCCCTTTTATTCATTTTGATGACAAGTATTTCTGGATGGAGGGAGTACTTTGTTA
TTGGTCATATGTTGTCTGCCACAATCCTCATGTATCGATGTTCTTTTTTGGCAGCTTCGTTGATGTCA
GCGATCTATGAAGAAAACAAGGACGAGGACGGCTTCCTGTACATGACTTACAGTGGCGAGAACA CTT
TCGGCTCTGCCTAA

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность экзон-интронной области гена *TaATG8g*.

```

TaATG4a_AGW81779.1_ (1) MTSLPERGAAAPPNPTPSSSREGDAAVASSSSSSAS-EEQKKGDSPKQCKASILSSVLT----IFEPDQDQSG-RSGGHAS
TaATG4b_AGW81780.1_ (1) MTSLPERGATPPSNPTSSSSCEGDAAVASSSSASSASEEQKKGDSPKQCKASILSSVLT----IFEPDQDQSG-RSGGHAS
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_ (1) MTSLPDRGVSS-SS--SDPLCEGNIAPCSSSS----EQKEDCSLKQSKTSILSCVFNSPFNIFEAHQDSSANKSPKSSS
AtATG4a_NP_850412.1_ (1) MKALCDRFRVFPQCCSSSSKSDTHDKSPLVSDSG-----PSDNKSKFTLWSNVFTSSSSVSQPYRESSTSGHKQVCT
Hs ATG4a_pdb_2P82_A (1) -----MHHHHHSSG-----
ScATG4p_EGA77161.1_ (1) ---MQRWLQLWKMDLVQKVSHGVFEGSXEEPX-----ALMNHDIVLGEVYPERDEESG-----AE
                                                                                                     ★
TaATG4a_AGW81779.1_ (75) GSYAWSRVLRRFVGGG----SMWRFLG---CGKALTAGDVWFLGKCYKLSSEESSSDSDSEGGHAAFLEDFSSRVWITY
TaATG4b_AGW81780.1_ (76) GSYAWSRVLRRFVGGG----SMWRFLG---CGKALTAADVWFLGKCYKLSSEESSSDSDSEGGHAAFLEDFSSRVWITY
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_ (73) GSYDWLRVLRRFVGGG----SMWRFLG---TSKVLTSSDVWFLGKCYKLSSEESSSDSDSEGHATLFLEDFSSRIWITY
AtATG4a_NP_850412.1_ (71) TRNGWTAFVKRVMSASGAIRRFQERVLGPNRTGLPSTSDVWLLGVCYKISADENSGETDTGTVLAALQLDFSSKILMTY
Hs ATG4a_pdb_2P82_A (11) -----RENLYFQ-----PDTDELVWILGKQHLLKTEKS-----LSDISARLWFTY
ScATG4p_EGA77161.1_ (54) QCEQDCRYRGEAVSXGFLSSLFGREISSYTKEFLLDVQSRVNFTYRTRFVPIARAPDGP-----SPLSNLLVRTNPIS
                                                                                                     ★
TaATG4a_AGW81779.1_(147) RKGFDVISDSKLTSDVNWGCMIRSSQMLVAQALIFHHLGRSWRKPAQNPSDPEHTRILHLFGDSEVCAFSIHNLLQAGKS
TaATG4b_AGW81780.1_(148) RKGFDAISDSKLTSDVNWGCMIRSSQMLVAQALIFHHLGRSWRKPAQNPSDPEHTRILHLFGDSEVCAFSIHNLLQAGKS
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_(145) RRGFDAISDSKYTSDVNWGCMIRSSQMLVAQALIFHHLGRSWRRPSEKPYNPEYIGILHMFGDSEACAFSIHNLLQAGNS
AtATG4a_NP_850412.1_(151) RKGFEPFRDTTYTSDVNWGCMIRSSQMLFAQALIFHRLGRAWTKKSELP-EQEYLETLEPFGDSEPSAFSIHNLIIAGAS
Hs ATG4a_pdb_2P82_A (54) RRKFSPIGGTGPSSDAGWGCMLRCGMMLAQALICRHLGRDWSEKQKEQPKEYQRILQCFLDRKDCCYSIHQMAQMGVG
ScATG4p_EGA77161.1_(128) TIEDYIANPDCFNTDIGWGCMIRTGQSLLGNALQLIHLGRDFRVNGNES-LERESKFVNWFNDTPEAPPSLHNFVSAGTE
                                                                                                     ★★
TaATG4a_AGW81779.1_(227) YGLA-AGSWVGPYAMCRAWQTLIRTNREQPEVINRNECFPMALYVVSGD-----DGERGGAPVVCIDVAAQLCYDFNKD
TaATG4b_AGW81780.1_(228) YGLA-AGSWVGPYAMCRAWQTLIRTNREQPEVINRNESFPMALYVVSGD-----DGERGGAPVVCIDVAAQLCYDFNKD
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_(225) YGLA-AGSWVGPYAMCRAWQTLVRTNREQHEVDGNESFPMALYVVSGD-----DGERGGAPVVCIDVAAQLCYDFNKG
AtATG4a_NP_850412.1_(230) YGLA-AGSWVGPYAICRAWESLACKRRKQ---TDSKNQTLPMAVHIVSGSE-----DGERGGAPILCIEDATKSCLEFSKG
Hs ATG4a_pdb_2P82_A(134) EGKS-IGEWFGPNTVAQVLKKLALFDEWNSLVVYSMDNTVVIEDIKKMCRVLPLSADTAGDRPPDSLTASNQSKGTSAY
ScATG4p_EGA77161.1_(207) LSDKRPGEWFGPAATARSIQSLIYGFPECG-----IDDCIVSVSSGD-----IYENEVEKVFAEN
                                                                                                     ★★★
TaATG4a_AGW81779.1_(321) NPRYIPLLKETFTFPQSLGILGKGPGASTYIAGVQDDRALYLDPEVQLAVNIASDNLEANTSSYHCSTVRDMPLDLIDP
TaATG4b_AGW81780.1_(322) NPRYIPLLKETFTFPQSLGILGKGPGASTYIAGVQDDRALYLDPEVQMAVNIASDNLEADTSSYHCSTVRDMPLDLIDP
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_(319) NPRYIPLLKETFTFPQSLGILGKGPGTSTYIAGVQDDRALYLDPEVQMAVDIAADNEADTSSYHCSTVRDLALDLIDP
AtATG4a_NP_850412.1_(322) NPRYIPSLVATFTFFPQSVGILGGKPGASTYIVGVQEDKGFYLDPEVQVVTVNKETPDVTSSYHCNVLRYVPLESLDP
Hs ATG4a_pdb_2P82_A(233) NPVYVDAFKECFKMPQSLGALGKGKPNAYFIGFLGDELIFLDPHTTQTFVDEENGTVNDQTFHCLQSPQRMNILNLDP
ScATG4p_EGA77161.1_(280) NESYRESICGILSTQSVGIAGRPSSSLYFFGYQNEFLHFDPHIPQPAVEDS-----FVESCHTSKFGKLQLSEMDP
                                                                                                     ★★
TaATG4a_AGW81779.1_(401) SLAIGFYCRDK-----DDFDDFCSRASELAEQANGAPLFTVVQSVQPSKQMYNQDDGSGCSG
TaATG4b_AGW81780.1_(402) SLAIGFYCRDK-----DDFDDFCSRASELAEQANGAPLFTVVQSVQPSKQMYNQDDGSGCSG
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_(399) SLAIGFYCRDK-----DDFDDFCSRATELVDKANGAPLFTVVQSVQPSKQMYNQDDVLGISG
AtATG4a_NP_850412.1_(402) SLALGFYCRDK-----DDFDDFCLRALKLAESNGAPLFTVTQTHTAIN-----QSN-
Hs ATG4a_pdb_2P82_A(313) SVALGFFCKEE-----KDFDNWCSLVQKEILKEN-LRMFELVQKHPSHW-----
ScATG4p_EGA77161.1_(354) SMLIGILIKEKDWQQWKLEVAESAINVLAKRMDDFDVCSMDDVESVSSNSMKKDASNNENLGVLEGDYVDIGAIFPH
                                                                                                     ★
TaATG4a_AGW81779.1_(458) YGASDNIDELDLDGSETGEDEWQIL-----
TaATG4b_AGW81780.1_(459) YGVSDNIDAELDLDGSETGEDEWQIL-----
OsATG4b_sp_Q2XPP4.2_(456) DG---NINVEDLDASETGEEEWQIL-----
AtATG4a_NP_850412.1_(449) YG-----FADDDSEDEREDDWQML-----
Hs ATG4a_pdb_2P82_A(356) -----
ScATG4p_EGA77161.1_(434) TTNTEDVDEYDCFQDIHCKKQKIVVMGNTHTVNANLTDYEVEGVLVEKETVGIHSPIDEKC

```

Рис. 3. Результат выравнивания аминокислотных последовательностей цистеиновых протеиназ семейства ATG4 *T. aestivum* и различных организмов. Красный цвет – идентичные аминокислоты, зеленый – консервативные, синий – слабосхожие, черный – неидентичные. Звездочками обозначены аминокислоты активного центра фермента.