

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Научный руководитель:	доктор биологических наук, заведующий лабораторией окислительно-восстановительного метаболизма КИББ КазНЦ РАН Минибаева Фарида Вилевна
Официальные оппоненты:	доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной биологии гена НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва Вартапетян Андрей Борисович
	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической физиологии ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург Войцеховская Ольга Владимировна
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Защита состоится 18 сентября 2014 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 30, тел/факс (843)2927347, dissovet@mail.knc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН и на сайте <http://www.kibb.knc.ru/>.

Автореферат разослан «        » июля 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Пономарева Анастасия Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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; Nayward, 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, ВНИИ, 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.

## 1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**1.1. 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 0,25 мМ CaCl<sub>2</sub> при температуре +22° С и освещенности 100 Вт/м<sup>2</sup> с 12 ч фотопериодом в течение 4 суток. Затем растения перемещали на исследуемые растворы и выдерживали в течение 3-12 ч.

**1.2. Определение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, уровня ПОЛ, протеазной активности, жизнеспособности.** Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли в растворимой фракции гомогената с использованием ксиленола оранжевого ( $\lambda = 560$  нм). Концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> рассчитывали по калибровочной кривой. Интенсивность ПОЛ определяли в растворимой фракции гомогената по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) ( $\lambda = 560$  нм). Уровень ПОЛ выражали в процентах, за 100% принимали количество ТБК-прореагировавших продуктов, содержащихся в клетках исходных корней. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,25 % красителя Эванса синего (Baker, Моск, 1994). Общую протеазную активность измеряли в растворимой фракции гомогената с использованием азоказеина ( $\lambda = 330$  нм; Battelli et al., 2011).

**1.3. Конфокальная и электронная микроскопия.** Продольные срезы кончика корня окрашивали следующими флуоресцентными красителями: для детекции АФК – 20 мкМ 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma,  $\lambda_{ab}$  504 нм /  $\lambda_{em}$  529 нм), для визуализации аутофагосом – 1 мкМ LysoTracker Red DND 99 (LT, Invitrogen,  $\lambda_{ab}$  577 нм /  $\lambda_{em}$  590 нм), для оценки жизнеспособности клеток – 0,0002 % йодидом пропидия (PI, Sigma,  $\lambda_{ab}$  537 нм /  $\lambda_{em}$  617 нм). Флуоресценцию клеток в зоне растяжения корня регистрировали с помощью конфокального микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Germany). Ультраструктуру клеток паренхимы центрального цилиндра анализировали с помощью электронного микроскопа Jem 1200EX (Jeol, Japan) по методу, описанному ранее (Пономарева, Польшгалова, 2012).

**1.4. ОТ-ПЦР в реальном времени.** Все праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). Тотальную РНК выделяли с помощью реагента TRIzol. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили в амплификаторе DNA Engine thermocycler (BioRad, USA) в реакционной смеси, содержащей 1 мкМ Oligo(dT)<sub>15</sub> праймеров, а также 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas). Накопление ПЦР продуктов оценивали по эмиссии зонда TaqMan с помощью амплификатора с оптическим модулем ICycler IQ-4 (Bio-Rad, USA.). Для оценки изменения экспрессии генов использовали сравнительный метод (Pfaffl, 2001). В качестве референтного гена был использован ген фактора АДФ-рибозилирования (Paolacci et al., 2009).

**1.5. Выделение ДНК растений и клонирование гена *TaATG8g*.** Геномную ДНК пшеницы выделяли с помощью набора DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. Электрофоретическое разделение ДНК проводили в 1 % агарозном геле в горизонтальной камере SE-1 (Helicon, Russia) при напряжении 5-10

В/см. ПЦР проводили в амплификаторе C100<sup>0TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). ПЦР-фрагменты очищали с помощью набора АхуPrep<sup>TM</sup> PCR Cleanup Kit (Ахуgen Biosciences) и встраивали в вектор pGEM-T Easy (Promega). Нуклеотидные последовательности ДНК определяли с помощью ДНК-анализатора 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA).

**1.6. Получение и очистка рекомбинантного белка.** Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy mini kit (Qiagen). Реакцию ОТ проводили с использованием набора Mint (Евроген). ПЦР проводили в амплификаторе C100<sup>0TM</sup> Thermal Cycler. Для получения рекомбинантного белка кодирующую последовательность *TaATG8g* встраивали в экспрессирующий вектор pET-51b(+) Ek/LIC (Novagen), реципиентами которого служили клетки штаммов *E. coli* NovaBlue и BL21 (DE3) pLysS (Novagen). Индукцию синтеза белка проводили путем инкубации культуры клеток с 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом. Очистку рекомбинантного белка осуществляли методами металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях и гель-фильтрации в хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad, USA). Белок элюировали 20 мМ Na-фосфатным буфером, рН 7,5, содержащим 300 мМ NaCl, 0,5 М мочевины, 1 % глицерин и 300 мМ имидазола. Степень чистоты и молекулярную массу белка определяли электрофоретически в 15 % полиакриламидном геле по методу Laemmli (1970). Для подтверждения наработки рекомбинантного белка ATG8 в системе *E. coli* проводили вестерн-блот анализ с применением специфичного антитела Anti-ATG8A (Abcam).

**1.7. ИК-спектроскопия.** Измерения были выполнены на ИК-спектрофотометре IR-Affinty1 (Shimadzu, Japan) с разрешением 4 см<sup>-1</sup>, количество сканов 256. Отнесение компонент проводили на основе работ (Susi, Byler, 1986; Dong et al., 1992). Белковые образцы переводили в буфер, приготовленный на D<sub>2</sub>O.

**1.8. ЯМР-спектроскопия.** Спектры ЯМР <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC регистрировали на спектрометре Avance III 600 МГц (Bruker, Germany) с TXI датчиком 5 мм, оснащенный градиентной катушкой. Для обработки спектров и их последующей визуализации применялись программы Sparky.

**1.9. Биоинформатический анализ.** Поиск и сравнение гомологичных последовательностей проводили с помощью программы BLAST на сервере NCBI. Подбор праймеров, трансляцию и выравнивание последовательностей, определение расчетной массы предсказанного белка выполняли с помощью программы Vector NTI Suite 9. Поиск мотивов выполняли с помощью сервера MEME Suit. Предсказание вторичной и третичной структуры проводили с помощью сервера I-TASSER. Компьютерное моделирование пространственной структуры выполняли с помощью программы PyMol.

**1.10. 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 ≤ 0,05.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Стресс-индуцированная аутофагия в корнях проростков пшеницы.

**2.1.1. Активация аутофагии при окислительном стрессе.** С целью индуцирования окислительного стресса в настоящей работе был использован «классический» прооксидант паракват. Токсическое действие параквата (100 мкМ) на интактные корни проростков пшеницы в течение 12 ч приводило к накоплению АФК, небольшому повышению протеазной активности и гибели части клеток (рис. 1, табл. 1).

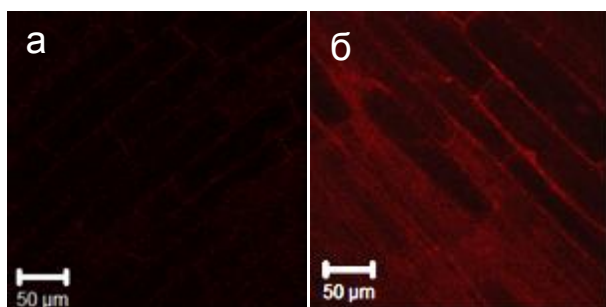


Рис. 1. Визуализация АФК в клетках корней пшеницы с помощью DCFDA: а – контроль, б – Пк (100 мкМ). Масштабный отрезок – 50 мкм.

Таблица 1. Содержание  $H_2O_2$ , общая протеазная активность и жизнеспособность клеток при действии параквата (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	$4,7 \pm 1,2$	$3,9 \pm 0,7$	$100 \pm 0$
Пк	$7,7 \pm 3,1$	$4,4 \pm 0,1$	$79 \pm 7$

Кроме того, нами обнаружено, что паракват индуцирует аутофагию, характеризующуюся образованием многочисленных аутофагосом (рис. 2 б). Аутофагосомы визуализировали как интенсивно окрашенные яркие точечные образования, локализованные по всему объему клетки. С целью выяснения, является ли образование аутофагосом следствием окислительного стресса, корни были предварительно обработаны тироном – ловушкой супероксидного анион-радикала. Предобработка растений пшеницы тироном способствовала значительному уменьшению количества аутофагосом при действии параквата (рис. 2 в-г). Специфичность окрашивания аутофагосом мы подтвердили с помощью ингибитора аутофагии 3-метиладенина (3-МА). Как известно, 3-МА ингибирует фосфатидилинозитол-киназную активность, подавляя, тем самым, развитие аутофагии (Blommaert et al., 1997). При совместном действии Пк и 3-МА образования аутофагосом не наблюдалось (рис. 2 д-е).



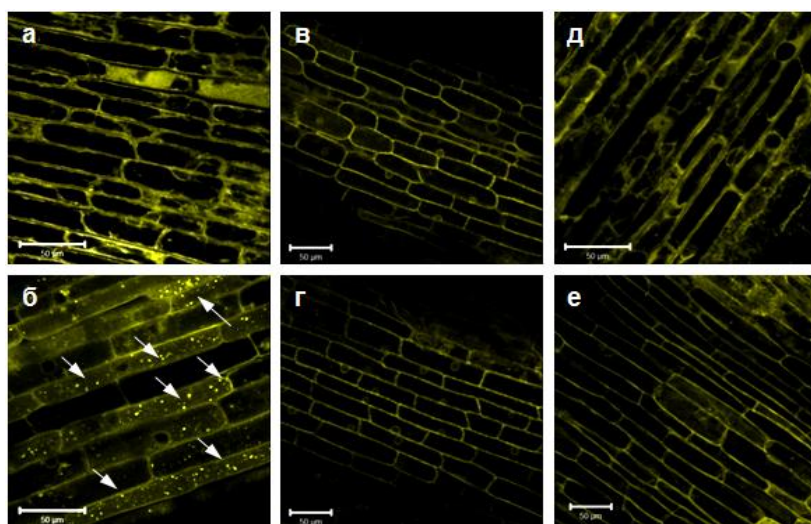


Рис. 2. Визуализация аутофагосом (показаны стрелками) в клетках корней пшеницы: а – контроль, б – Пк (100 мкМ), в – тирон (10 мМ); г – тирон + ПК, д – 3-МА (10 мМ), е – 3-МА + Пк. Масштабный отрезок – 50 мкм.

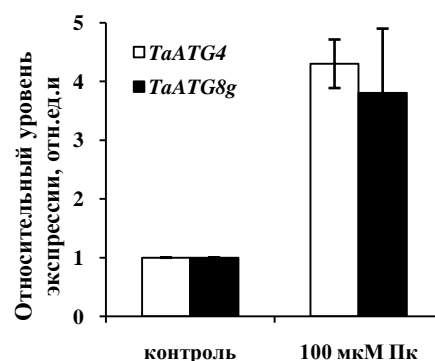


Рис. 3. Уровень экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* при действии Пк (100 мкМ).

Формирование аутофагосом обеспечивается активностью многочисленных АТГ белков. Белки АТГ4 и АТГ8 являются важнейшими компонентами убиквитин-подобного комплекса, необходимого для образования аутофагосомальных мембран (Mizushima, 2006). С помощью ОТ-ПЦР анализа нами было обнаружено образование транскриптов генов *TaATG4* и *TaATG8g* у нестрессированных растений (рис. 3). Конститутивный уровень экспрессии АТГ генов, по-видимому, необходим для поддержания клеточного гомеостаза растений в процессе их роста и развития. Оценка относительного уровня транскриптов этих генов в условиях окислительного стресса выявила повышение экспрессии исследуемых генов в несколько раз (рис. 3). Усиление экспрессии АТГ4 и АТГ8g генов в условиях окислительного стресса, вероятно, обусловлено недостаточностью исходного пула их мРНК и необходимостью синтеза *de novo*. Таким образом, наши данные подтверждают, что в растениях АФК индуцируют аутофагию.

**2.1.2. Индукция аутофагии при раневом стрессе.** Раневой стресс, индуцированный различными биотическими и абиотическими факторами, является одним из распространенных стрессов в растениях. Как известно, одной из универсальных стрессовых реакций растительных клеток, в том числе при поранении, является усиленное образование АФК (Минибаева и др., 1997). В настоящей работе показано, что уже через 2 ч после поранения корней, индуцированного их отсечением от проростков и инкубацией в 0,25 мМ CaCl<sub>2</sub>, в клетках происходит образование многочисленных аутофагосом (рис. 4). Проведенный нами анализ динамики раневого стресса в отсеченных корнях пшеницы выявил зависимость между накоплением АФК и формированием аутофагосом. На начальном этапе раневого стресса (первые 2 ч) визуализировано образование АФК в апопласте и наличие небольшого количества

аутофагосом в цитозоле клеток корней (рис. 4). В течение 6-12 ч инкубации отсеченных корней накопления АФК не наблюдалось (рис. 4), что согласуется с полученными ранее данными о фазовом характере образования АФК при раневом стрессе (Minibayeva et al., 1998). 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. 4). 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. 5).

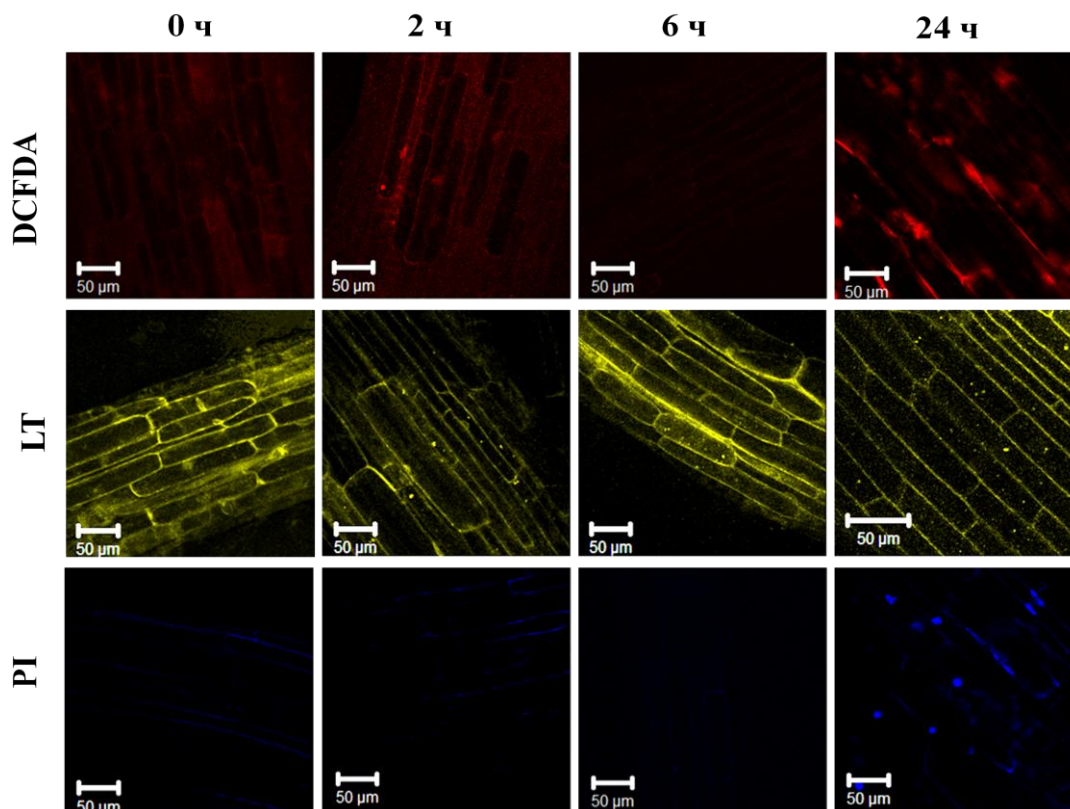


Рис. 4. Визуализация АФК (DCFDA), аутофагосом (LT) и мертвых клеток (PI) в отсеченных корнях пшеницы. Масштабный отрезок – 50 мкм.

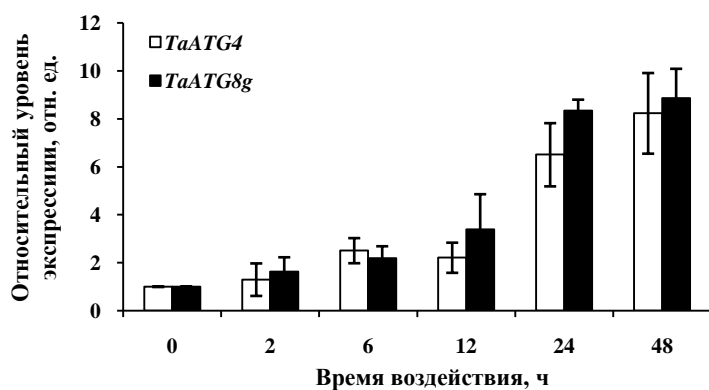


Рис. 5. Динамика экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* при раневом стрессе.

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 стрессового ответа. На данном этапе аутофагия играет роль защитного механизма для обезвреживания и деградации окисленных макромолекул и поврежденных органелл. В условиях длительной инкубации отсеченных корней накопление АФК и окисленных структур, недостаток питательных элементов в изолированном органе сопровождаются усиленной аутофагической деградацией. Вероятно, что аутофагия при избыточном накоплении повреждений приводит к масштабной деградации внутриклеточного содержимого, что вызывает клеточную гибель. 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.

### **2.1.3. Активация аутофагии при действии ингибиторов ЭТЦ митохондрий.**

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. Использование ингибиторов митохондриальной цепи позволяет оценить вклад определенного компонента ЭТЦ в активность митохондрий и образование АФК. В настоящей работе мы использовали следующие ингибиторы митохондриальных комплексов: 50 мкМ ротенон (комплекс I), 10 мкМ малонат (комплекс II), 1 мкМ антимицин А (комплекс III), 100 мкМ KCN (комплекс IV), а также ингибитор альтернативной оксидазы (АО) – 100 мкМ салицилгидроксамовая кислота (SHAM). Применение ингибиторов ЭТЦ митохондрий в течение 3 ч приводило к различным изменениям содержания  $H_2O_2$  и уровня ПОЛ (табл. 2). Так, применение ингибитора комплекса I ротенона не приводило к изменению редокс-статуса клеток. Отсутствие эффекта ротенона может быть связано с работой 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. 2). Наиболее яркий эффект проявлялся при блокировании комплекса III ЭТЦ с помощью антимицина А, что согласуется с данными литературы (Han et al., 2001; Morel et al., 2009). При одновременном блокировании основного и альтернативного пути переноса электронов происходило еще большее повышение содержания АФК, увеличение интенсивности ПОЛ и падение жизнеспособности клеток (табл. 2), что свидетельствует об антиоксидантной и цитопротекторной роли АО в стрессовых условиях.

Таким образом, нарушение работы ЭТЦ с помощью митохондриальных ядов приводит к накоплению АФК и способствует проявлению их токсических эффектов, приводящих, в результате, к гибели клеток. 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.

Таблица 2. 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	$3,7 \pm 0,9$	$99 \pm 9$	$97 \pm 0,3$
Ротенон	$4,5 \pm 0,6$	$111 \pm 10$	$96 \pm 0,6$
Малонат	$10,9 \pm 0,1$	$117 \pm 7$	$89 \pm 2,3$
Антимицин А	$16,4 \pm 0,8$	$157 \pm 7$	$68 \pm 9,3$
KCN	$8,9 \pm 0,6$	$124 \pm 13$	$84 \pm 3,2$
SHAM	$5,1 \pm 0,9$	$148 \pm 10$	$96 \pm 0,6$
SHAM + Ротенон	$5,9 \pm 0,6$	$137 \pm 9$	$92 \pm 1,8$
SHAM + Малонат	$12,6 \pm 0,1$	$154 \pm 8$	$74 \pm 6,0$
SHAM + Антимицин А	$17,7 \pm 0,8$	$167 \pm 10$	$59 \pm 13,1$
SHAM + KCN	$11,2 \pm 0,6$	$124 \pm 11$	$77 \pm 5,5$

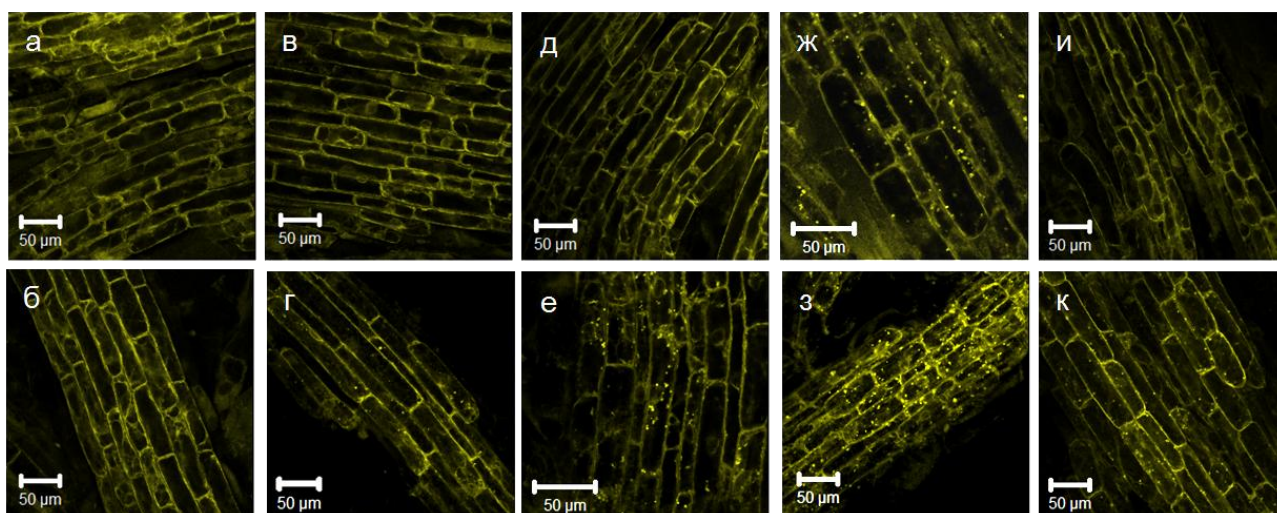


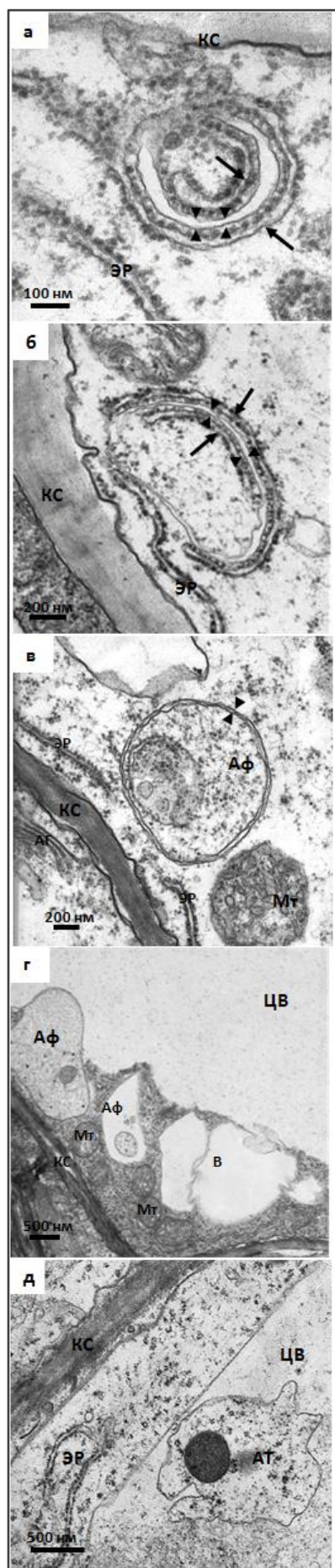
Рис. 6. Визуализация аутофагосом в клетках корней пшеницы при действии ингибиторов ЭТЦ митохондрий. На рисунке: а – контроль, б – SHAM, в – ротенон, г – ротенон + SHAM, д – малонат, е – малонат + SHAM, ж – антимицин А, з – антимицин А + SHAM, и – KCN, к – KCN + SHAM. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Известно, что митохондрии как основные АФК-образующие органеллы могут выступать в качестве триггера аутофагии в клетках животных (Scherz-Shouval, Elazar, 2007). До настоящего времени роль митохондрий в индукции аутофагии в клетках растений оставалась неизученной. В настоящей работе возможность вовлечения митохондрий в индукцию аутофагии в растениях была проанализирована при нарушении работы ЭТЦ митохондрий. Применение ингибиторов комплексов I, II и IV основной ЭТЦ в течение 3 ч не индуцировало образования аутофагосом в клетках корней (рис. 6 в, д, и). Однако при совместном ингибировании АО и комплексов I, II или IV наблюдали многочисленные аутофагосомы (рис. 6 г, е, к) и повышение уровня экспрессии генов *TaATG4* и *TaATG8g* (данные представлены в диссертации). Наиболее интенсивное образование аутофагосом детектировали при блокировании комплекса III с помощью антимицина А как в отсутствие, так и в присутствии SHAM (рис. 6 ж-з).

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, соотносится с интенсивностью образования аутофагосом (табл. 2, рис. 6). 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.

**2.1.4. Стадии образования аутофагосом.** Образование аутофагосом в клетках растений представляет собой многоэтапный и многокомпонентный процесс, подобно тому, как это происходит в клетках других эукариотических организмов. Нами были выявлены следующие стадии образования аутофагосом в клетках корней пшеницы: везикулярная нуклеация, экспансия аутофагосомы, созревание аутофагосомы, слияние с вакуолью, деградация аутофагического тела (рис. 7).

Начальный этап формирования аутофагосомы начинается с обособления подлежащего удалению участка внутриклеточного содержимого мембраной, по форме напоминающей чашевидную структуру (рис. 7 а), которую называют фагофором (Seglen, 1987) или изолирующей мембраной (Locke et al., 1975; Yamamoto et al., 1990). Нами обнаружено, что шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭР) локализуется вблизи аутофагосомальной мембраны, причем, каналы ЭР окружают фагофор как снаружи, так и внутри (рис. 7 а-б). Примечательно, что такое «параллельное» расположение ЭР снаружи и внутри фагофора наблюдается на ранних (но не на поздних) стадиях образования аутофагосомы (рис. 7 а-б). Эти факты свидетельствуют о том, что в растительных клетках, подобно клеткам животных, ЭР может быть вовлечен в инициацию формирования аутофагосом.



Формирование «зрелой» аутофагосомы (рис. 7 в) происходит после расширения и «схлопывания» фагофора (рис. 7 б). Мы обнаружили, что аутофагосомы могут содержать различные органеллы: митохондрии, шероховатый ЭР, а также фрагменты цитоплазмы с рибосомами (рис. 7 в-г). В дальнейшем аутофагосомы доставляются в вакуоль, при этом их наружная мембрана сливается с тонопластом (рис. 7 г). Содержимое аутофагосомы, окруженное внутренней мембраной, образует так называемое «аутофагическое тело» (рис. 7 д), 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 наших экспериментах при действии на корни прооксидантов наряду с аутофагосомами, содержащими полупереваренные фрагменты, мы также наблюдали появление одномембранных электронно-прозрачных вакуолей (рис. 7 г). Таким образом, в ходе аутофагии деградация клеточного содержимого, вероятно, может осуществляться как путем слияния аутофагосом с центральной литической вакуолью, так и в аутофагосомах, локализованных в цитозоле.

Рис. 7. 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.

## 2.2. Характеристика структуры аутофагического белка ATG8g пшеницы.

**2.2.1. Особенности первичной структуры белка *TaATG8g*.** Формирование аутофагосом на этапах ее созревания обеспечивается активностью белка ATG8. Этот белок часто используют в качестве молекулярного маркера для мониторинга макроаутофагии (Kabeya et al., 2000). Биоинформатический анализ первичной структуры белка *TaATG8g* (рис. 8) показал, что *TaATG8g* является низкомолекулярным белком (13,5 кДа) из суперсемейства убиквитиновых белков. Белок консервативен среди эукариот и имеет 76 % идентичности с ATG8 *S. cerevisiae*. Основу первичной последовательности составляет убиквитиновый домен GABARAP (F<sub>6</sub>-G<sub>117</sub>). На С-конце белка между аминокислотами G<sub>117</sub> и S<sub>118</sub> находится сайт разрезания, которое осуществляет белок ATG4. Глициновый остаток в этом положении высококонсервативен и обнаруживается в структуре всех изоформ семейства ATG8. Белок *TaATG8g* обладает ATG7-связывающим сайтом (A<sub>37</sub>, F<sub>80</sub>, S<sub>111</sub>), а также сайтом связывания с тубулином (K<sub>7</sub>, Q<sub>16</sub>, A<sub>20</sub>-R<sub>21</sub>, R<sub>23</sub>-E<sub>24</sub>), что косвенно указывает на взаимосвязь аутофагосомы с цитоскелетом.

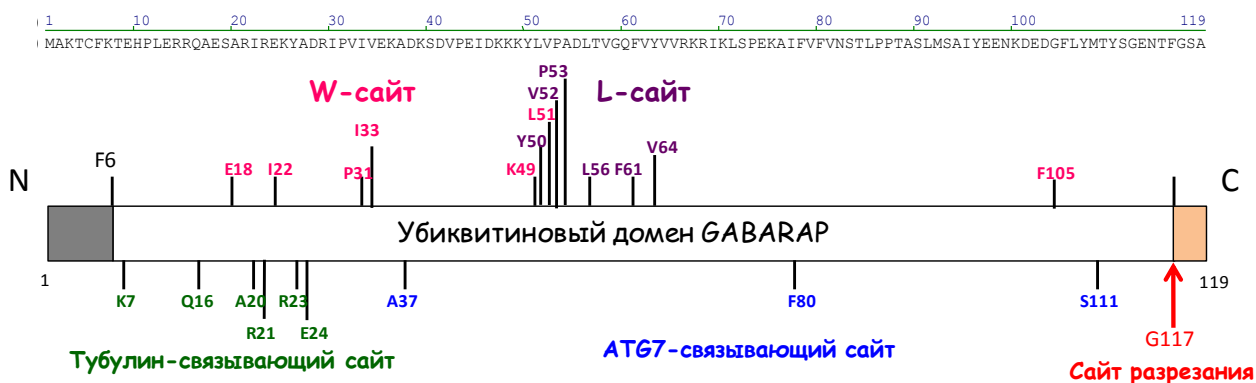


Рис. 8. Схема первичной структуры белка *TaATG8g*.

На основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей белков семейства ATG8 различных представителей в структуре *TaATG8g* нами были обнаружены W- и L-сайты, которые необходимы для взаимодействия ATG8 с различными лигандами. К таким лигандам относят белки ATG3 и ATG4, осуществляющие посттрансляционную модификацию ATG8, а также целый ряд белков, опосредующих селективную аутофагию (Noda et al., 2010). W-сайт *TaATG8g* состоит из аминокислот E<sub>18</sub>, I<sub>22</sub>, P<sub>31</sub>, I<sub>33</sub>, K<sub>49</sub>, L<sub>51</sub>, L-сайт включает Y<sub>50</sub>, V<sub>52</sub>, P<sub>53</sub>, L<sub>56</sub>, F<sub>61</sub> и V<sub>64</sub> (рис. 8). С помощью сервера MEME Suit в аминокислотных последовательностях белков *TaATG4a-b* мы обнаружили мотив **WQIL** (рис. 9) – потенциальный AIM-мотив связывания с белком *TaATG8g*. Кроме того, наличие кислых аминокислот в положении X<sub>-3</sub>, X<sub>-2</sub>, X<sub>-1</sub> (в данном случае это аминокислоты EDE) и гидрофобной аминокислоты в положении X<sub>2</sub> (в данном случае аминокислота I) необходимо для дополнительного взаимодействия с белком ATG8 (рис. 9). Интересным представляется тот факт, что белок ATG4 является цистеиновой

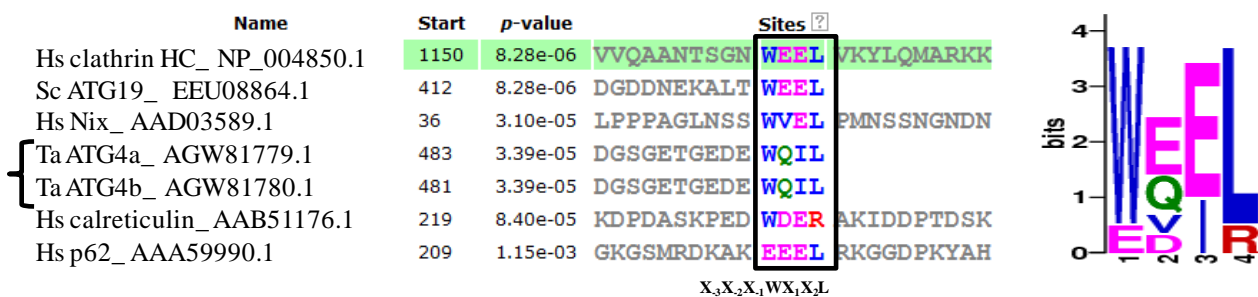


Рис. 9. Выявление AIM-мотива (выделен рамкой) в белках *TaATG4a-b* с помощью выравнивания последовательностей белков с использованием MEME Suit.

протеазой и на данный момент является единственным известным редокс-регулируемым ATG белком (Scherz-Shouval et al., 2007).

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 белками, вовлеченными в аутофагию.

**2.2.2. Клонирование и секвенирование экзон-интронной последовательности гена *TaATG8g*.** До настоящего времени информация о локализации и структуре генов, кодирующих белки семейства ATG8 пшеницы, отсутствует. С этой целью нами была проведена работа по выявлению и определению нуклеотидной последовательности экзон-интронной области гена *TaATG8g*. Используя в качестве матрицы геномную ДНК и праймеры, которые сконструированы на 5'- и 3'-концевые участки кодирующей области гена *TaATG8g*, нами было обнаружено образование нескольких ПЦР-фрагментов, два из которых являлись высокомолекулярными. Один из ПЦР-фрагментов был встроен в вектор pGEM-T Easy, после чего определили его нуклеотидную последовательность.

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. 10). Анализ идентифицированной последовательности выявил, что этот ген соответствует структуре гомологичных генов семейства ATG8 растений.

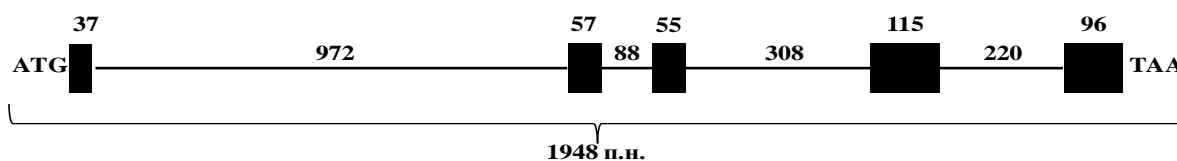


Рис. 10. Схема структуры гена *TaATG8g*. Прямоугольниками показаны экзоны, линией – интроны. Цифры указывают на длину экзона/интрона, п.н.



**2.2.3. Получение и очистка рекомбинантного белка *TaATG8g*.** На основе нуклеотидных последовательностей (GenBank No: FJ750848.1 и AF542187.1) были сконструированы Eк/LIC праймеры, комплементарные 5'- и 3'-концам кодирующей области гена *TaATG8* и содержащие вспомогательные последовательности, комплементарные одноцепочечным концам вектора. С помощью ПЦР был получен продукт с молекулярной массой 360 п.н., который с использованием технологии безлигазного клонирования был встроен в вектор для экспрессии рЕТ-51b(+) Eк/LIC, после чего секвенирован. Клонированная нами последовательность была идентифицирована как *TaATG8g*. Белок *TaATG8g* экспрессировали в бактериальной системе *E. coli*. Вестерн-блот анализ с применением специфичного антитела Anti-ATG8A подтвердил получение целевого белка. В дальнейшем белок подвергался двойной очистке с помощью металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации. Было обнаружено, что белок *TaATG8g* подвергается агрегации, что сопровождается выпадением его в осадок. Для получения стабильного нативного белка были протестированы различные агенты и условия (данные представлены в диссертации). Наилучшие результаты были достигнуты при использовании Na-фосфатного буфера (20 мМ, рН 7,5), содержащего 300 мМ NaCl, 1 % глицерин и 500 мМ мочевины при концентрации белка 2-2,5 мг/мл.

**2.2.4. Пространственная структура белка *TaATG8g*.** Уникальные свойства и функциональное многообразие белка ATG8 во многом определяются его пространственной структурой. Однако до настоящего времени в литературе не было ни одной работы, посвященной полной расшифровке трехмерной организации белков ATG8 в растениях. В связи с этим, изучение особенностей третичной структуры и физико-химических свойств *TaATG8g* представляется целесообразным. Результаты ИК-спектроскопии свидетельствуют, что рекомбинантный белок *TaATG8g* содержит

Таблица 3. Содержание элементов вторичной структуры (в %) белка *TaATG8g*, определенное с помощью ИК-спектроскопии и сервера I-TASSER

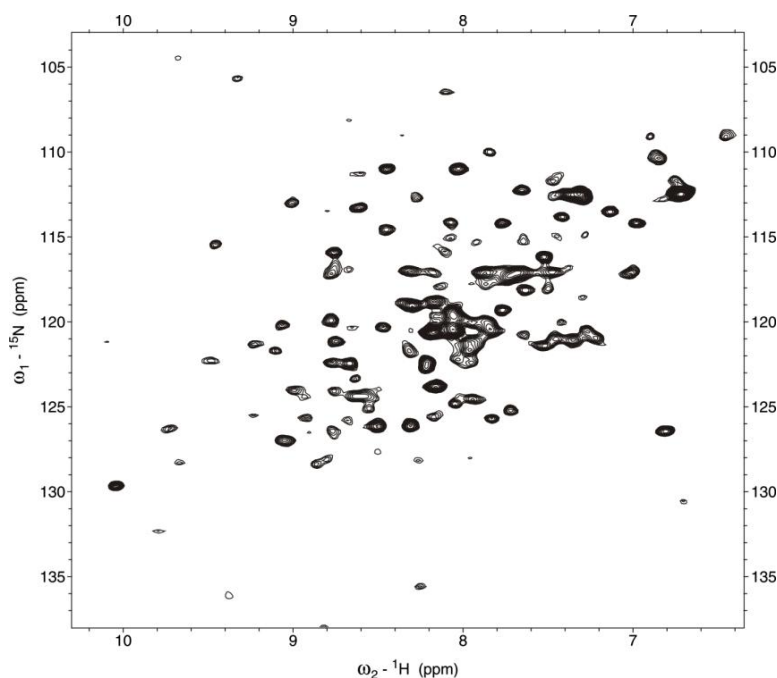
Тип структуры	ИК-спектроскопия	I-TASSER
$\alpha$ -спирали	23	23-28
$\beta$ -структура	18	11-15
$\beta$ -повороты	17	-
агрегационная $\beta$ -структура	9	-
неупорядоченная структура	33	-

значительную долю упорядоченной вторичной структуры (41 %). Содержание  $\alpha$ -спиралей составило 23 %,  $\beta$ -структур – 18 % (табл. 3). 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, РНКаза А, миоглобин).

Нами был проведен сравнительный анализ полученных экспериментальных данных по вторичной структуре *TaATG8g* и результатов, предсказанных с помощью сервера I-TASSER. В целом, экспериментальные данные согласуются с предсказанными расчетными результатами, однако содержание  $\beta$ -структуры несколько различается (табл. 3). Такое расхождение, вероятно, обусловлено тем, что при компьютерном анализе учитывается статистическая вероятность нахождения того или иного аминокислотного остатка в структуре определенного типа. Кроме того, расхождение экспериментальных и предсказанных данных может быть обусловлено 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 *TaATG8g* сопровождается уменьшением относительного содержания  $\alpha$ -спиралей и повышением доли  $\beta$ -структуры.

Результаты одномерного ( $^1\text{H}$ ) и двумерного ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY) ЯМР-анализа (данные представлены в диссертации) свидетельствуют, что для белка *TaATG8g* характерно наличие химического обмена, который может быть обусловлен внутримолекулярной подвижностью отдельных участков белка и процессом его олигомеризации и/или агрегации.

С целью дальнейшего изучения особенностей пространственной структуры нами был получен рекомбинантный белок *TaATG8g*, обогащенный изотопом  $^{15}\text{N}$ . В  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC спектре образца, содержащего стабилизирующие агенты (1% глицерин и 500 мМ мочевины), мы обнаружили 127 пиков из 147 ожидаемых (рис. 11). Дисперсия пиков, наблюдаемая в спектре, характерна для структурированного белка (рис. 11). В спектре присутствуют сигналы с химическими сдвигами больше 9 ppm, что характерно для  $\beta$ -структур, и менее 7 ppm, что, как правило, соответствует  $\alpha$ -спиралям. Для спектра  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC характерна некоторая неоднородность интенсивности сигналов (рис. 11). В нем присутствуют как интенсивные и узкие сигналы, обычно обусловленные наличием подвижных, несвернутых N- и C-концов, так и уширенные сигналы с низкой амплитудой. Известно, что уширение сигналов характерно для аминокислот, вовлеченных в обменный процесс между



обусловленные наличием подвижных, несвернутых N- и C-концов, так и уширенные сигналы с низкой амплитудой. Известно, что уширение сигналов характерно для аминокислот, вовлеченных в обменный процесс между

Рис. 11. [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ] HSQC спектр рекомбинантного белка *TaATG8g*, 25 °С.

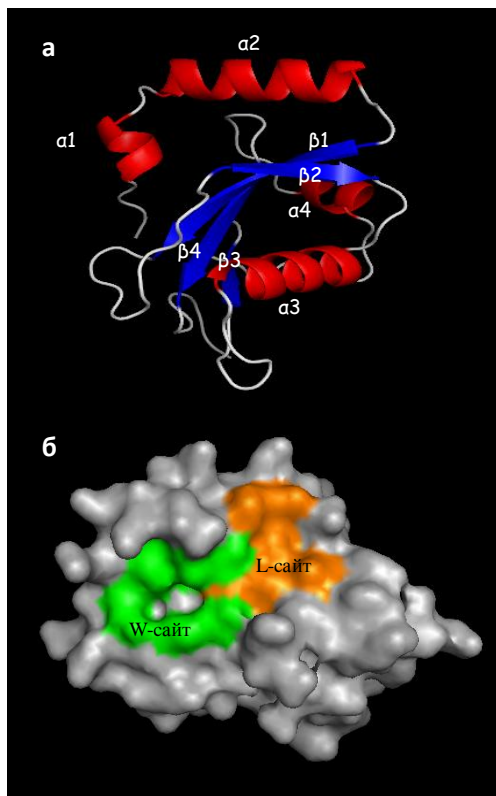
различными конформационными состояниями белка и/или различными агрегатами белка в растворе. По данным литературы, белок ATG8 *S. cerevisiae* может находиться в закрытой и открытой конформации. Показано, что в комплексе с лигандом белок ATG8 становится более стабильным, что связано с ограничением подвижности  $\alpha 2$  спирали, которая участвует в межмолекулярных взаимодействиях (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 при формировании аутофагосом. Такая структурная особенность характерна и для других аутофагических белков данного семейства (Chae et al., 2005; Kumeta et al., 2010).

**2.2.5. Трехмерная модель белка *TaATG8g*.** С помощью сервера I-TASSER и программы PyMol нами была построена модель трехмерной структуры белка *TaATG8g*. В целом, сконструированная трехмерная модель белка *TaATG8g* (рис. 12 а) продемонстрировала классическую трехмерную структуру белков семейства ATG8 (Paz et al., 2000; Stangler et al., 2002; Kumeta et al., 2010). Структура *TaATG8g* включает в себя четыре  $\alpha$ -спирали и четыре  $\beta$ -слоя. С-терминальный (убиквитиновый) домен *TaATG8g* состоит из сложенных вчетверо центральных  $\beta$ -листов, из которых два центральных  $\beta$ -листа параллельны друг другу ( $\beta 1$ ,  $\beta 4$ ) и два наружных  $\beta$ -листа ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) – антипараллельны центральным листам. Между этими листами лежат две  $\alpha$ -спирали ( $\alpha 3$  и  $\alpha 4$ ). Кроме С-терминального домена, белок *TaATG8g* обладает двумя дополнительными  $\alpha$ -спиралями на N-конце белка ( $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ ) (рис. 12 а).

ATG8 способен взаимодействовать с различными белками. Большинство белок-белковых взаимодействий осуществляется, в основном, посредством образования комплекса между аминокислотами WXXL-сайта белка ATG8 и AIM-мотива белка-рецептора (Noda et al., 2010).

Рис. 12. (а) Модель трехмерной структуры белка *TaATG8g*. Красным цветом обозначены  $\alpha$ -спирали, синим –  $\beta$ -слои, белым – неупорядоченная структура; (б) Иллюстрация W-сайта (зеленый) и L-сайта (оранжевый) на поверхности белка *TaATG8g*.



Нами обнаружено, что WXXL-аминокислоты конформационно сближены (рис. 12 б) и формируют на поверхности белка *TaATG8g* два гидрофобных кармана. W-сайт белка *TaATG8g* локализован между  $\alpha 2$  и  $\beta 2$ , L-сайт – между  $\beta 2$  и  $\alpha 3$ .

Таким образом, сконструированная нами трехмерная модель белка *TaATG8g* продемонстрировала классическую трехмерную структуру, характерную для белков семейства ATG8. Наличие в структуре этого белка множественных мотивов, необходимых для взаимодействия с лигандами, свидетельствует о том, 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). 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 митохондрий. 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. 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. 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 в исследованиях 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 [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N]-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Дмитриева, С.А. Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность митохондрий *in vivo* / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, **В.В. Рябовол**, Ф.В. Минибаева // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29. – № 4. – С. 267-275.
2. Minibayeva, F. Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria / F. Minibayeva, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, **V. Ryabovol** // Plant Physiology and Biochemistry. – 2012. – V. 59. – P. 9–11.
3. **Рябовол, В.В.** Аутофагические белки ATG4 и ATG8 пшеницы: особенности структуры и роль при стрессе / **В.В. Рябовол**, Ф.В. Минибаева // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 458. – № 4.

### Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. **Рябовол, В.В.** Индукция аутофагии в клетках корней пшеницы в условиях окислительного стресса / **В.В. Рябовол**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева // Всероссийский симпозиум «Растение и стресс»: тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 305-306.
2. **Рябовол, В.В.** АФК-индуцируемая аутофагия в клетках корней пшеницы. / **В.В. Рябовол**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева // Российская конференция «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии»: тезисы докладов. – Казань, 2010. – С. 51.
3. Minibayeva, F.V. Oxidative stress-induced autophagy in wheat roots: the role of mitochondria / F.V. Minibayeva, S.A. Dmitrieva, **V.V. Ryabovol**, А.А. Ponomareva // 10<sup>th</sup> International conference on reactive oxygen and nitrogen species in plants: Book of abstracts. – Budapest, Hungary, 2011. – P. 118.

4. **Ryabovol, V.** Redox regulated autophagic proteins ATG4 and ATG8 in *Triticum aestivum* roots / **V. Ryabovol**, A. Ponomareva, Y. Gogolev, F. Minibayeva // FEBS workshop «Plant organellar signaling from algae to higher plants»: Book of abstracts. – Primošten, Croatia, 2011. – P. 113.
5. Minibayeva, F. Oxidative stress-induced autophagy in wheat roots: a case study of mitophagy / F. Minibayeva, S. Dmitrieva, **V. Ryabovol**, A. Ponomareva // EMBO conference series «Autophagy in health and disease»: Book of abstracts. – Ma'ale Nachamisha, Israel, 2011. – P. 94.
6. **Ryabovol, V.** Oxidative stress induces autophagosome formation in wheat roots / **V. Ryabovol**, A. Ponomareva, Y. Gogolev, F. Minibayeva // EMBO conference series «Autophagy in health and disease»: Book of abstracts. – Ma'ale Nachamisha, Israel, 2011. – P. 99.
7. Дмитриева, С.А. Митофагия как защитная реакция клетки в условиях окислительного стресса / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, **В.В. Рябовол**, Ф.В. Минибаева // Третий международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тезисы докладов. – Казань, 2011. – С. 50-51.
8. Минибаева Ф.В. Окислительный стресс и аутофагия в растительных клетках / Ф.В. Минибаева, **В.В. Рябовол**, С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева // Третий международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тезисы докладов. – Казань, 2011. – С. 110-111.
9. **Рябовол, В.В.** Окислительный стресс как индуктор аутофагической гибели клеток корней пшеницы / **В.В. Рябовол**, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева // Третий международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тезисы докладов. – Казань, 2011. – С. 161-162.
10. Пономарева, А.А. Ультроструктурные изменения в клетках корней пшеницы при индукции аутофагии активными формами кислорода / А.А. Пономарева, **В.В. Рябовол**, Ф.В. Минибаева // Третий международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тезисы докладов. – Казань, 2011. – С. 144-145.
11. Дмитриева, С.А. Блокирование митохондриального транспорта электронов индуцирует аутофагию в растительных клетках / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, Ф.В. Минибаева, **В.В. Рябовол** // VII съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»: материалы докладов в двух частях. – Нижний Новгород, 2011. – Ч. 1. – С. 214-215.
12. **Рябовол, В.В.** Редокс регулируемые аутофагические белки *Triticum aestivum* L. / **В.В. Рябовол**, Ю.В. Гоголев, Ф.В. Минибаева // VII съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»: материалы докладов в двух частях. – Нижний Новгород, 2011. – Ч. 2. – С. 600-601.
13. Minibayeva, F. Autophagic cell death in plants induced by mitochondrial poisons / F. Minibayeva, S. Dmitrieva, **V. Ryabovol**, A. Ponomareva // International Conference «Programmed Cell Death in Biology and Medicine»: Book of abstracts. – Moscow, 2012. – P. 39.
14. **Ryabovol, V.** Autophagic cell death in wheat seedlings in response to oxidative stress / **V. Ryabovol**, A. Ponomareva, F. Minibayeva // International Conference «Programmed Cell Death in Biology and Medicine»: Book of abstracts. – Moscow, 2012. – P. 43.
15. **Ryabovol, V.** Oxidative stress-induced autophagosome formation and expression of ATG4 and ATG8 genes in wheat plants / **V. Ryabovol**, F. Minibayeva // SEB plant symposium «Oxidative stress and cell death in plants: Mechanisms and implication»: Book of abstracts. – Florence, Italy, 2013. – P. 48.

16. Minibayeva F. Oxidative stress- and wounding-induced autophagy in *Triticum aestivum* roots / F. Minibayeva, **V. Ryabovol**, A. Ponomareva, S. Dmitrieva // SEB plant symposium «Oxidative stress and cell death in plants: Mechanisms and implication»: Book of abstracts.– Florence, Italy, 2013. – P. 47.
17. Minibayeva, F. Oxidative stress induced autophagic cell death in plants / F. Minibayeva, **V. Ryabovol**, A. Ponomareva, S. Dmitrieva, A. Sulkarnayeva // 11th International POG conference «Reactive oxygen and nitrogen species in plants»: Book of abstract. – Warsaw, Poland, 2013. – P. 184.
18. Minibayeva, F. Oxidative stress-induced autophagy in wheat seedlings / F. Minibayeva, **V. Ryabovol**, A. Ponomareva // 39th Annual conference «South African Association of Botanists»: Book of abstract. – Drakensberg, South Africa, 2013. – P. 83.
19. **Рябовол, В.В.** Аутофагический белок TaATG8: идентификация гена, анализ экспрессии, характеристика структуры / В.В. Рябовол, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев, Ф.В. Минибаева // Первый международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений»: тезисы докладов. – Казань, 2013. – С. 82.
20. Дмитриева, С.А. АФК-индуцируемая митофагия в клетках растений при блокировании электрон-транспортной цепи митохондрий / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, **В.В. Рябовол**, Ф.В. Минибаева // Первый международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений»: тезисы докладов. – Казань, 2013. – С. 29.
21. Пономарева, А.А. Морфологические характеристики аутофагии в клетках корней пшеницы в условиях окислительного стресса / А.А. Пономарева, **В.В. Рябовол**, С.А. Дмитриева, Ф.В. Минибаева // Первый международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений»: тезисы докладов. – Казань, 2013. – С. 48.